



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

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

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΩΝ  
ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΜΕ ΠΟΛΥΛΕΥΚΙΝΗ**

**ΒΑΡΔΑΚΩΣΤΑ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Σύνθεση Και Χαρακτηρισμός Συμπολυμερών Πολυαιθυλενοξειδίου Με  
Πολυλευκίνη

**ΒΑΡΔΑΚΩΣΤΑ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ**

**A.M.:** 111001

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:** Ιατρού Ερμόλαος Αναπληρωτής Καθηγητής  
ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ιατρού Ερμόλαος	Αναπληρωτής Καθηγητής
Πιτσικάλης Μαρίνος	Αναπληρωτής Καθηγητής
Σακελλαρίου Γεώργιος	Λέκτορας

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 29/01/2014**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός αυτής της ερευνητικής εργασίας είναι η σύνθεση των κατά συστάδων συμπολυμερών πολυαιθυλενοξειδίου – πολυλευκίνης με διαφορετικά μοριακά βάρη. Για την επίτευξη του στόχου, κρίσιμο στάδιο αποτελεί η σύνθεση του N-καρβοξυ-ανυδρίτη της λευκίνης, ο οποίος αποτελεί το κυκλικό πρόδρομο μονομερές της πολυλευκίνης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Fuchs-Farthing επιτυχής σύνθεση του ανυδρίτη και έπειτα μέσω του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου συντέθηκε η πολυλευκίνη. Τέλος συντέθηκαν τα συμπολυμερή πολυαιθυλενοξειδίου – πολυλευκίνης με μακροαπαρχητή το εμπορικά διαθέσιμο πολυαιθυλενοξείδιο με μία ακραία αμινομάδα και υπολογίστηκε η σύστασή τους. Ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με υπέρυθρη φασματοσκοπία (IR) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού σε συνδυασμό με τεχνικές αργού διασφαλίζοντας την καθαρότητα των διαλυτών, των αντιδραστηρίων και των λαμβανόμενων πολυμερών.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Πολυπεπτίδια

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** N-καρβόξυ ανυδρίτης, λευκίνη, πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου, αμινοξέα

## **ABSTRACT**

The purpose of the present thesis is the synthesis of block copolymers polyethylenoxide - polyleucine with different molecular weights. The synthetic approach involves the synthesis of the monomer of leucine. The precursor leucine N-carboxy-anhydride was successfully synthesized using Fuchs-Farthing method and was used to prepare polyleucine followed by the ring opening polymerization of the monomer with end – amino – functionalized PEO as the macroinitiator. The synthesized copolymers were characterized and identified by Infrared Spectroscopy (IR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The success of the synthesis was based on the employment of high vacuum techniques in combination with argon inert atmosphere techniques, providing highly purified solvents, reagents and synthesized polymers.

**SUBJECT AREA:** Polypeptides

**KEYWORDS:** N-carboxy-anhydride, leucine, ring opening polymerization,  
amino acids

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b> .....	<b>21</b>
1.1 Εισαγωγή .....	21
1.1 Δομές των αμινοξέων .....	22
1.2 Διπολική δομή των αμινοξέων .....	26
1.3 Δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών.....	29
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b> .....	<b>33</b>
2.1 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με συγκεκριμένη αλληλουχία .....	33
2.1.1 Σύνθεση σε διάλυμα.....	34
2.1.2 Σύνθεση σε στερεά φάση (Μέθοδος Merrifield).....	35
2.1.3 Σύνθεση με τεχνική ανασυνδιασμένου DNA <sup>3,30</sup> .....	37
2.2 Σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία 40	
2.2.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (R.O.P.).....	41
2.2.2 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου NCA's α-αμινοξέων.....	43
2.2.3 Κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού (Normal Route).....	49
2.3 Σύνθεση πεπτιδίων με σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως .....	55
2.4 Πολυμερισμός με τριμεθυλοπυριτικές αμίνες.....	61
2.5 Μέθοδος του Schlaad.....	62
2.6 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση υψηλού κενού .....	63
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b> .....	<b>65</b>
3.1 Φασματομετρία Απορρόφησης Υπερύθρου .....	65
3.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού .....	67
3.3 Θερμοσταθμική Ανάλυση .....	70
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b> .....	<b>71</b>
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>71</b>

4.1 Τεχνική υψηλού κενού .....	71
4.2 Καθαρισμός διαλυτών .....	74
4.3 Καθαρισμός άλλων αντιδραστηρίων .....	76
4.4 Σύνθεση και καθαρισμός N-Καρβοξυανυδριτών .....	78
4.4.1 Σύνθεση Leu NCA.....	80
4.5 Σύνθεση Poly – Leucine .....	82
4.6 Σύνθεση συμπολυμερών PEO- <i>b</i> -PLEU.....	83
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....</b>	<b>85</b>
<b>Αποτελέσματα – Συζήτηση .....</b>	<b>85</b>
5.1 Σύνθεση N – Καρβοξυανυδριτών .....	85
5.1.1 Leucine NCA.....	85
5.2 Πολυμερή .....	88
5.2.1 Πολυ – λευκίνη .....	88
5.2.2 PEO – PLeu .....	89
5.3 Σύσταση των συμπολυμερών PEO-PLEU.....	95
<b>ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....</b>	<b>99</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....</b>	<b>101</b>
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>	<b>103</b>



## Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1: Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου NCAs .....	22
Σχήμα 1.2: L αμινοξύ .....	23
Σχήμα 1.3: Λευκίνη.....	26
Σχήμα 1.4: Αλανίνη .....	27
Σχήμα 1.5: Ιδιότητα των αμφοτερικών αμινοξέων .....	27
Σχήμα 1.6: Ισοηλεκτρικό σημείο των αμινοξέων .....	28
Σχήμα 1.7: Δημιουργία πεπτιδικού δεσμού .....	30
Σχήμα 1.8: Δομές συντονισμού του πεπτιδικού δεσμού.....	30
Σχήμα 2.1: Σχηματισμός διπεπτιδίου με απώλεια νερού.....	34
Σχήμα 2.2: Σύζευξη και έκπλυση .....	36
Σχήμα 2.3: Οι βάσεις του DNA .....	38
Σχήμα 2.4: Πλασμίδια .....	40
Σχήμα 2.5: Χαρακτηριστικά παραδείγματα R.O.P μονομερών. ....	42
Σχήμα 2.6: Μερικά χαρακτηριστικά προϊόντα R.O.P. ....	43
Σχήμα 2.7: Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβόξυ ανυδριτών (NCA's).....	43
Σχήμα 2.8: Βελτιωμένο μοντέλο της μεθόδου του Leuchs για την σύνθεση N-καρβόξυ ανυδριτών. ....	46
Σχήμα 2.9: Σύνθεση N-καρβόξυ ανυδριτών με την μέθοδο Fuchs-Farthing. ....	46
Σχήμα 2.10: Τα κυριότερα παραπροϊόντα κατά την σύνθεση των NCA's. ....	48
Σχήμα 2.11: Τα τέσσερα ενεργά κέντρα των NCA's, που καταδεικνύουν την μεγάλη ευαισθησία του.....	48
Σχήμα 2.12: Κανονικός σχηματισμός πολυμερισμού.....	50
Σχήμα 2.13: Παράπλευρη αντίδραση τερματισμού με προσβολή του -CO στη θέση 2' της αλυσίδας. ....	51
Σχήμα 2.14: Μηχανισμός του Blout.....	52
Σχήμα 2.15: Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (AMM).....	53
Σχήμα 2.16: Αντίδραση διάδοσης .....	54
Σχήμα 2.17: Παράπλευρη αντίδραση τερματισμού με σχηματισμό υδαντοϊκών οξέων. ....	55
Σχήμα 2.18 Βέλτιστο σύμπλοκο bipyNi (COD) για πολυμερισμό των NCA's .....	57

Σχήμα 2.19 Σύγκριση της συμπεριφοράς διαφορετικών απαρχητών στον έλεγχο του μοριακού βάρους του PBLG .....	58
Σχήμα 2.20 Προτεινόμενος μηχανισμός για πολυμερισμό NCA's με σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης. ....	59
Σχήμα 2.21 Σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης με στερεοεκλεκτικότητα στον πολυμερισμό NCA's. ....	60
Σχήμα 2.22 Μηχανισμός πολυμερισμού μέσω τριμεθυλοπυριτικών αμινών. ....	61
Σχήμα 2.23 Μέθοδος του Schlaad.....	62
Σχήμα 4.1: Αντίδραση του αμινοξέως με το φωσγένιο προς σχηματισμό NCA..	78
Σχήμα 4.2: Παράπλευρες αντιδράσεις κατά τον σχηματισμό του ανυδρίτη.....	79

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1: Δομή των πρωτεϊνών .....	31
Εικόνα 2.1 Συσκευή ανακρυστάλλωσης-καθαρισμού των NCA's με την τεχνική υψηλού κενού.....	64
Εικόνα 3.1: Σχηματική λειτουργία ενός φασματομέτρου NMR. ....	68
Εικόνα 4.1: Απεικόνιση της γραμμής υψηλού κενού.....	72
Εικόνα 4.2 Σχεδιάγραμμα μίας απλής αντλίας διαχύσεως. ....	72
Εικόνα 4.3: Συσκευή αμπουλών για την παραλαβή ενώσεων χαμηλού σημείου ζέσεως .....	77
Εικόνα 4.4: Συσκευή αραίωσης απαρχητή.....	78
Εικόνα 4.5: Συσκευή σύνθεσης του μονομερούς NCA .....	80
Εικόνα 4.6: Συσκευή ανακρυστάλλωσης σε υψηλό κενό .....	81
Εικόνα 4.7: Μεταφορά τελικού διαλύματος NCA με cannula σε σφαιρική φιάλη. 82	
Εικόνα 5.1 Φάσμα IR L – Leu .....	86
Εικόνα 5.2 Φάσμα IR Leu – NCA.....	87
Εικόνα 5.3 Φάσμα <sup>1</sup> H NMR Leu – NCA σε CDCl <sub>3</sub> .....	87
Εικόνα 5.4 Φάσμα IR PLeu.....	88
Εικόνα 5.5 Φάσμα <sup>1</sup> H NMR PLeu σε d-TFA.....	89
Εικόνα 5.6 Φάσμα IR του PEO .....	90
Εικόνα 5.7 Φάσμα IR PEO – PLeu 10.000 - 3000 .....	91
Εικόνα 5.8 Φάσμα <sup>1</sup> H NMR του PEO – PLeu 10.000 – 3000 σε d-TFA.....	92
Εικόνα 5.9 Φάσμα IR PEO – PLeu 10.000 – 6000.....	93
Εικόνα 5.10 Φάσμα <sup>1</sup> H NMR του PEO – PLeu 10.000 – 6000 σε d-TFA.....	94
Εικόνα 5.11 Πρώτη παράγωγος μεταβολής βάρους συναρτήσει της θερμοκρασίας για τον μακροαπαρχητή PEO-NH <sub>2</sub> και το ομοπολυμερές PLeu. ....	95
Εικόνα 5.12 Πρώτη παράγωγος μεταβολής βάρους συναρτήσει της θερμοκρασίας για το συμπολυμερές PEO- <i>b</i> -PLeu1.....	96
Εικόνα 5.13 Πρώτη παράγωγος μεταβολής βάρους συναρτήσει της θερμοκρασίας για το συμπολυμερές PEO- <i>b</i> -PLeu2.....	97



## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1: Τα είκοσι συνήθη αμινοξέα των πρωτεϊνών.....	24
---	----



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Βιομηχανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Πριν από την αναλυτική παρουσίαση της εργασίας οφείλω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους που συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της.

Κατ' αρχάς ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή μου κ. Ερμόλαο Ιατρού για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και τη στήριξη που μου παρείχε. Ευχαριστώ πολύ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μαρίνο Πιπσικάλη και το Λέκτορα κ. Γιώργο Σακελλαρίου για τη βοήθεια που μου πρόσφεραν, για την ανοχή που επέδειξαν καθώς επίσης και για τις προσωπικές μας συζητήσεις.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Αναστάση Καρατζά για την καταλυτική συνεισφορά του καθώς επίσης και τους Δημήτρη Μαυρογιώργη και Παναγιώτη Μπιλάλη για τη στήριξή τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους στο εργαστήριο.





# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί έντονο ενδιαφέρον, τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο, για την παρασκευή βιοσυμβατών και βιοδιασπόμενων πολυμερών. Από τα πιο ενδιαφέροντα και διαδεδομένα πολυμερή στη φύση είναι τα πολυπετίδια. Στα ριβοσώματα των βιολογικών συστημάτων παράγονται πρωτεΐνες με καθορισμένη αλληλουχία και σύσταση, κάτι που είναι ιδιαίτερα δύσκολο να επιτευχθεί στο εργαστήριο.

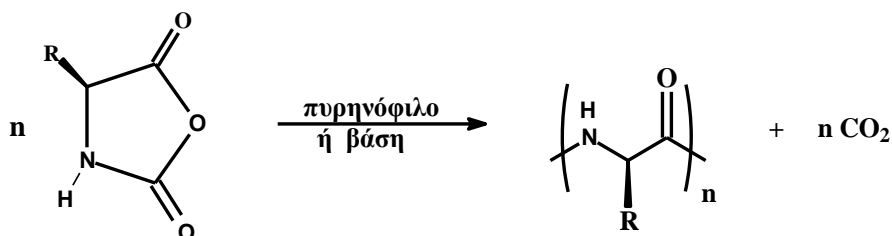
Τα συνθετικά πεπτιδία μπορούν να χρησιμοποιηθούν<sup>1</sup>:

- Ως αντιγόνα και να ενεργοποιήσουν τη σύνθεση ειδικών αντισωμάτων.
- Για να απομονωθούν οι υποδοχείς πολλών ορμονών και άλλων σηματοδοτικών μορίων.
- Ως φάρμακα.
- Ως μεταφορείς φαρμάκων.

Η μελέτη των συνθετικών πεπτιδίων μπορεί επίσης να βοηθήσει στον καθορισμό των κανόνων που διέπουν την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών. Μπορούμε δηλαδή να ερευνήσουμε αν μία συγκεκριμένη αλληλουχία διαμορφώνεται σε  $\alpha$  – έλικα,  $\beta$  – πτύχωση, στροφή φουρκέτας ή αν συμπεριφέρεται ως τυχαίο σπείραμα<sup>1</sup>.

Από τη δεκαετία του '40 αναπτύχθηκαν πολλές μέθοδοι για τη σύνθεση πεπτιδίων όπως σύνθεση σε διάλυμα, σύνθεση σε στερεή φάση, σύνθεση με την τεχνική του ανασυνδιασμένου DNA καθώς και από φυσικές πηγές με ενζυμική υδρόλυση. Όλες οι μέθοδοι σύνθεσης παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται στην εργασία αυτή περιλαμβάνει τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβόξυ-ανυδριτών  $\alpha$  – αμινοξέων (NCAs). Από το 1906, όπου συντέθηκε από τον Leuchs ο πρώτος ανυδρίτης, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών σχετικά με τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου αυτών των μονομερών έχει δημοσιευθεί. Τα

πολυμερή με αυτή τη μέθοδο λαμβάνονται σε μεγάλες αποδόσεις και χωρίς ρακεμίωση. Τα πολυπεπτίδια συνθέτονται με πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου NCAs α – αμινοξέων με πρωτικές αμίνες, βασικά άλατα καθώς και με θερμικές και καταλυτικές μεθόδους<sup>2</sup>.

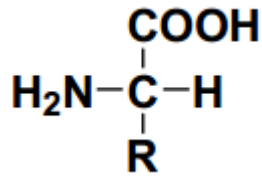


Σχήμα 1.1: Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου NCAs

Τα συνθετικά πολυπεπτίδια που παράγονται από τα NCAs έχουν την ικανότητα, όπως οι φυσικές πρωτεΐνες, να σχηματίσουν διαμόρφωση α – έλικα, β – φύλλο. Αυτές οι δευτεροταγείς δομές συνεισφέρουν σημαντικά στο χαρακτήρα αυτοοργάνωσης των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, οδηγώντας σε νέες υπερμοριακές δομές με πιθανές βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές<sup>2</sup>.

### 1.1 Δομές των αμινοξέων

Τα αμινοξέα είναι οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών. Ένα σύνολο 20 αμινοξέων συγκροτεί τις πρωτεΐνες. Και τα 20 είναι α – αμινοξέα, που σημαίνει ότι σε όλα η αμινομάδα αποτελεί υποκαταστάτη στο άτομο άνθρακα που βρίσκεται σε θέση α ως προς το καρβονύλιο. Συγκεκριμένα, ένα α – αμινοξύ αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, που λέγεται α – άνθρακας, συνδεδεμένο με μία αμινική ομάδα, μία καρβοξυλική ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μία χαρακτηριστική ομάδα R, την οποία ονομάζουμε και πλευρική αλυσίδα.

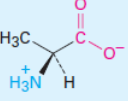
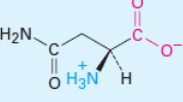
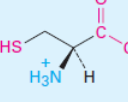
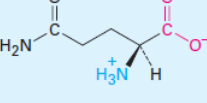
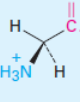
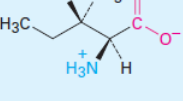
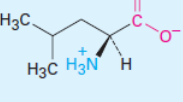
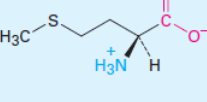
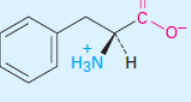
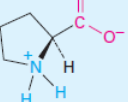


Σχήμα 1.2: L αμινοξύ

Αν εξαιρέσουμε τη γλυκίνη,  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ , όλοι οι α – άνθρακες των αμινοξέων είναι στρεογονικά κέντρα. Παρόλο που τα αμινοξέα μπορούν να υπάρξουν σε δύο εναντιομερείς μορφές, η φύση χρησιμοποιεί στη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών μόνο το ένα εναντιομερές, εκείνο με διαμόρφωση S. Λόγω της στεreoχημικής τους ιδιότητας με τα L – σάκχαρα, τα φυσικά αμινοξέα αναφέρονται και ως L – αμινοξέα.

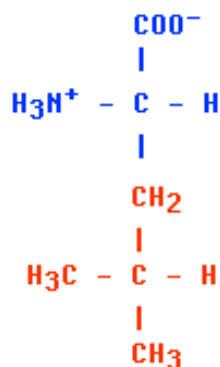
Τα 20 συνήθη αμινοξέα ταξινομούνται περαιτέρω σε ουδέτερα, όξινα ή βασικά, ανάλογα τη δομή της πλευρικής αλυσίδας τους. Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με τα 20 συνήθη αμινοξέα των πρωτεϊνών και όπως φαίνεται, υπάρχουν 20 είδη πλευρικών αλυσίδων, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, την υδροφοβικότητα και τη χημική αντιδραστικότητα.

Πίνακας 1.1: Τα είκοσι συνήθη αμινοξέα των πρωτεϊνών

Όνομασία	Συντομογραφίες	MB	Δομή	pK <sub>a</sub> α-CO <sub>2</sub> H	pK <sub>a</sub> α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	pK <sub>a</sub> side chain	pI	
<i>Ουδέτερα αμινοξέα</i>								
Αλανίνη	Ala	A	89		2.34	9.69	—	6.01
Ασπαράγινη	Asn	N	132		2.02	8.80	—	5.41
Κυστεΐνη	Cys	C	121		1.96	10.28	8.18	5.07
Γλουταμίνη	Gln	Q	146		2.17	9.13	—	5.65
Γλυκίνη	Gly	G	75		2.34	9.60	—	5.97
Ισολευκίνη	Ile	I	131		2.36	9.60	—	6.02
Λευκίνη	Leu	L	131		2.36	9.60	—	5.98
Μεθειονίνη	Met	M	149		2.28	9.21	—	5.74
Φαινυλαλανίνη	Phe	F	165		1.83	9.13	—	5.48
Προλίνη	Pro	P	115		1.99	10.60	—	6.30

Όνομασία	Συντομογραφίες	MB	Δομή	pK <sub>a</sub> α-CO <sub>2</sub> H	pK <sub>a</sub> α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	pK <sub>a</sub> side chain	pI	
<i>Ουδέτερα αμινοξέα</i>								
Προλίνη	Ser	S	105		2.21	9.15	—	5.68
Θρεονίνη	Thr	T	119		2.09	9.10	—	5.60
Θρυποφάνη	Trp	W	204		2.83	9.39	—	5.89
Τυροσίνη	Tyr	Y	181		2.20	9.11	10.07	5.66
Βαλίνη	Val	V	117		2.32	9.62	—	5.96
<i>Οξίνα αμινοξέα</i>								
Ασπαρτικό οξύ	Asp	D	133		1.88	9.60	3.65	2.77
Γλουταμικό οξύ	Glu	E	147		2.19	9.67	4.25	3.22
<i>Βασικά αμινοξέα</i>								
Αργινίνη	Arg	R	174		2.17	9.04	12.48	10.76
Ισπιδίνη	His	H	155		1.82	9.17	6.00	7.59
Λυσίνη	Lys	K	146		2.18	8.95	10.53	9.74

Στην εργασία αυτή το αμινοξύ που χρησιμοποιήθηκε και μέσω του ανυδρίτη του πολυμερίστηκε είναι η λευκίνη.

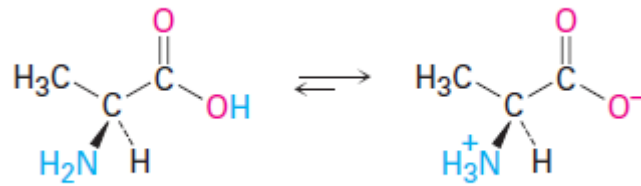


Σχήμα 1.3: Λευκίνη

Ανήκει στα απαραίτητα αμινοξέα, δηλαδή σ' αυτά που δεν μπορεί να συνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός και πρέπει να λαμβάνονται με την τροφή. Η πλευρική της αλυσίδα είναι ένα αλκύλιο και ταξινομείται στα υδρόφοβα αμινοξέα.<sup>1</sup>

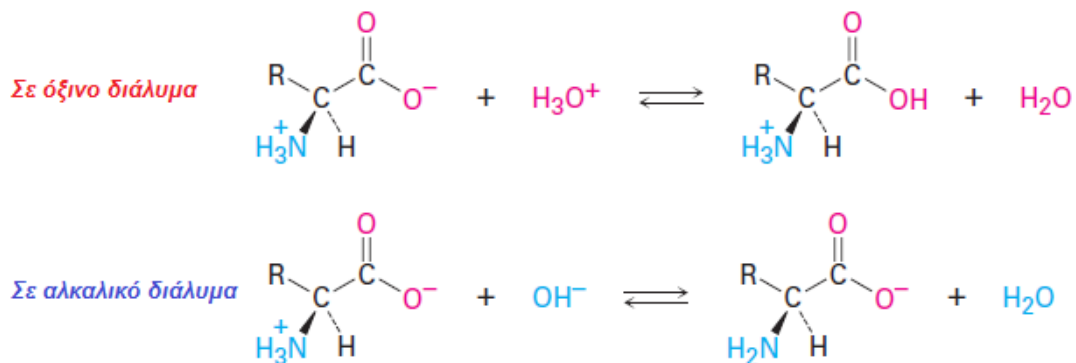
## 1.2 Διπολική δομή των αμινοξέων

Τα αμινοξέα, όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους, περιέχουν δύο λειτουργικές ομάδες, τη βασική αμινομάδα και την όξινη καρβοξυλομάδα. Λόγω αυτής της συνύπαρξης υφίστανται μία ενδομοριακή οξεοβασική αντίδραση, με αποτέλεσμα ν' απαντούν κυρίως με την μορφή διπολικών ιόντων ή αμφοτερικών ιόντων.



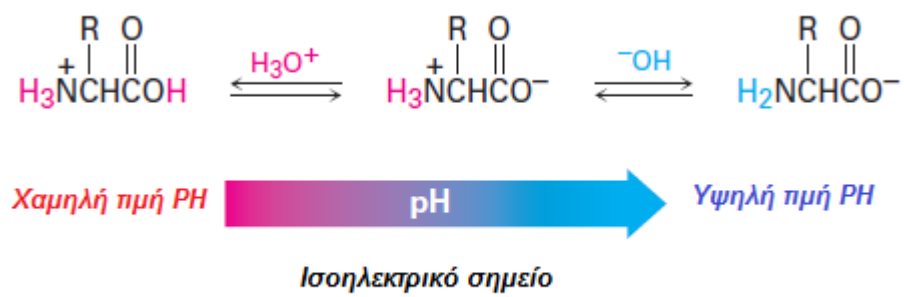
Σχήμα 1.4: Αλανίνη

Επιπλέον τα αμινοξέα είναι αμφοτερίζουσες ενώσεις: αντιδρούν είτε ως οξέα είτε ως βάσεις, ανάλογα με τις συνθήκες.



Σχήμα 1.5: Ιδιότητα των αμφοτερικών αμινοξέων

Σ' ένα διάλυμα οξέος με χαμηλή τιμή ΡΗ, τα αμινοξέα πρωτονιόνονται και απαντούν κατά κανόνα ως κατιόντα. Σ' ένα διάλυμα βάσης με υψηλή τιμή ΡΗ, τα αμινοξέα αποπρωτονιόνονται και απαντούν κατά κανόνα ως ανιόντα. Η ενδιάμεση τιμή ΡΗ, στην οποία τα αμινοξέα απαντούν με την ουδέτερη μορφή του διπολικού ιόντος, ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο.<sup>1</sup>



Σχήμα 1.6: Ισοηλεκτρικό σημείο των αμινοξέων



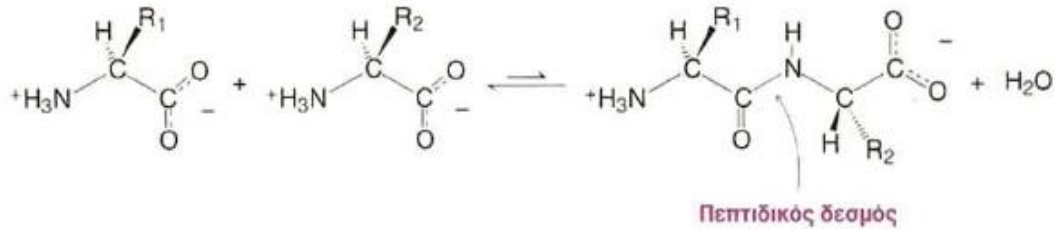
### 1.3 Δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα βιομόρια που απαντούν σε όλους τους ζώντες οργανισμούς. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη πρωτεϊνών, τα οποία συμμετέχουν σε όλες σχεδόν τις βιολογικές λειτουργίες. Λειτουργούν ως καταλύτες, μεταφορείς και αποθηκευτές άλλων μορίων, παρέχουν μηχανική στήριξη και ανοσοπροστασία, δημιουργούν κίνηση, διαβιβάζουν νευρικές ώσεις και ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση. Οι βασικές ιδιότητες που επιτρέπουν στις πρωτεΐνες να συμμετέχουν σε ένα τόσο ευρύ φάσμα λειτουργιών είναι:

1. Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή δομούμενα από μονομερή αμινοξέων. Η αλληλουχία των αμινοξέων καθορίζει την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, η οποία με τη σειρά της ευθύνεται για την λειτουργία της.
2. Οι πρωτεΐνες περιέχουν μια μεγάλη σειρά λειτουργικών ομάδων. Οι ομάδες αυτές περιλαμβάνουν αλκοόλες, θειόλες, θειοαιθέρες, καρβοξυλομάδες και ποικιλία βασικών ομάδων. Ο συνδυασμός αυτών των λειτουργικών ομάδων εξηγεί το φάσμα των λειτουργιών των πρωτεϊνών.
3. Οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με άλλα βιολογικά μακρομόρια, για να δημιουργήσουν περίπλοκα συσσωματώματα. Μέσα σε αυτά τα συσσωματώματα, οι πρωτεΐνες μπορούν να δράσουν συνεργειακά και να εμφανίσουν ιδιότητες που δεν προϋπήρχαν.
4. Μερικές πρωτεΐνες είναι σχεδόν άκαμπτες και μπορούν να λειτουργήσουν ως δομικά στοιχεία του κυτταρικού σκελετού. Ενώ υπάρχουν άλλες πρωτεΐνες που εμφανίζουν ευκαμψία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλες λειτουργίες.

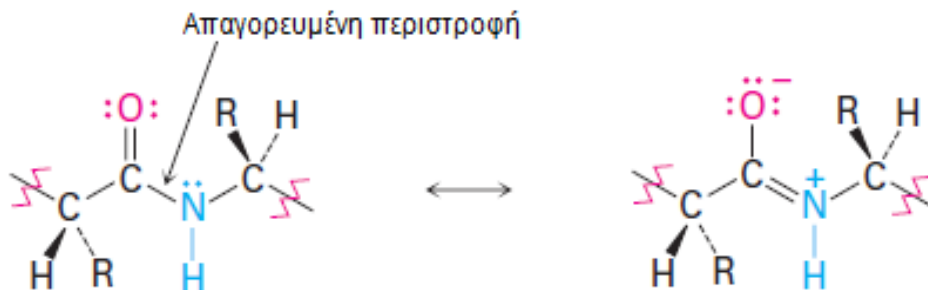
Οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή αμινοξέων. Οι δομικές μονάδες τους, που ονομάζονται κατάλοιπα, είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους με αμιδικούς δεσμούς. Η αμινομάδα ενός αμινοξέους σχηματίζει πεπτιδικό δεσμό με την

καρβοξυλομάδα ενός άλλου αμινοξέος, με ταυτόχρονη απώλεια ενός μορίου ύδατος.



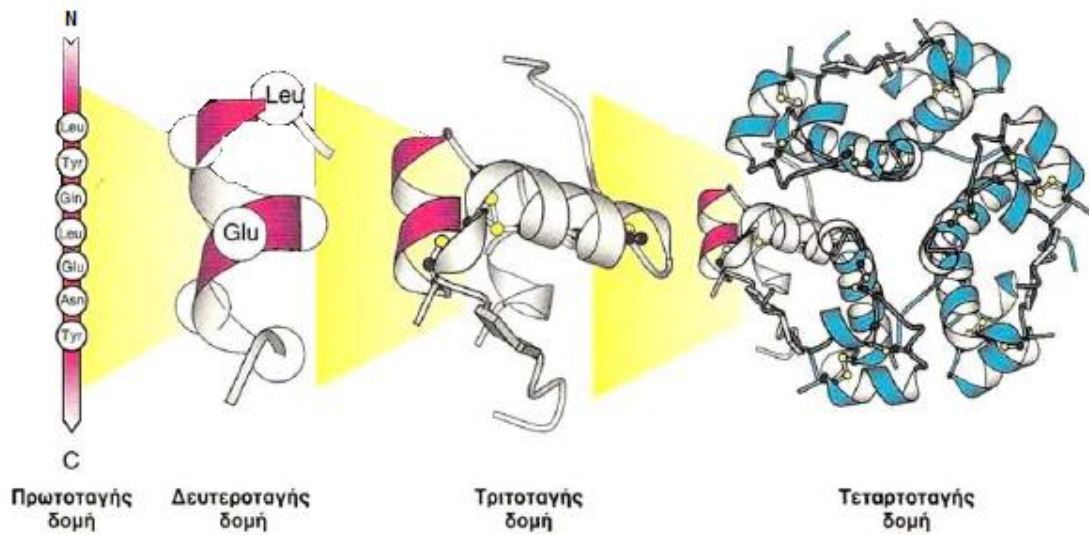
Σχήμα 1.7: Δημιουργία πεπτιδικού δεσμού

Ο πεπτιδικός δεσμός είναι αρκετά σταθερός κινητικά έχει, εν μέρει, χαρακτήρα διπλού δεσμού, ο οποίος περιορίζει την ελεύθερη περιστροφή.



Σχήμα 1.8: Δομές συντονισμού του πεπτιδικού δεσμού

Κατά σύμβαση, τα πεπτίδια γράφονται πάντοτε με το N-τελικό αμινοξύ στα αριστερά, και το C-τελικό αμινοξύ στα δεξιά. Η αλληλουχία των αμινοξέων αποτελεί την πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών.



**Εικόνα 1.1: Δομή των πρωτεϊνών**

Η δευτεροταγής δομή αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο τμήματα μιας πεπτιδικής αλυσίδας προσανατολίζονται λόγω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων. Η τριτοταγής δομή αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο ολόκληρο το μόριο της πρωτεΐνης περιελίσσεται συνολικά στο χώρο. Τέλος, η τεταρτοταγής δομή αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο πολλά μόρια πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για το σχηματισμό μεγάλων δομικών συσσωματωμάτων.<sup>3</sup>



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.1 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με συγκεκριμένη αλληλουχία

Τα πεπτίδια ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων που συμμετέχουν στην αλυσίδα διακρίνονται σε ολιγοπεπτίδια και πρωτεΐνες. Κατά παραδοχή, μόρια μέχρι πενήντα αμινοξέα θεωρούνται ως πεπτίδια, ενώ τα μεγαλύτερα ως πρωτεΐνες. Αρχικά τα πεπτίδια αντιμετωπίστηκαν ως μοντέλα για την συνθετική προσέγγιση και την μελέτη πρωτεϊνών και το πρώτο πεπτίδιο βιολογικής δράσης να συντίθενται στα μέσα τις δεκαετίας του 50'.

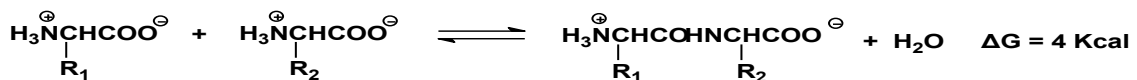
Η σύνθεση 'πεπτιδίων καθορισμένης αλληλουχίας' είναι ουσιαστική για αρκετούς λόγους. Πρώτον, τα συνθετικά πεπτίδια μπορούν να αποκαλύψουν τους κανόνες που καθορίζουν την τρισδιάστατη στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών. Μπορούμε να ερευνήσουμε αν μια συγκεκριμένη αλληλουχία διαμορφώνεται σε α-έλικα, β-επιφάνεια, ή στροφή φουρκέτας ή αν συμπεριφέρεται σαν τυχαίο σπείραμα. Δεύτερον, πολλές ορμόνες και άλλα μηνυματοφόρα μόρια είναι πεπτίδια από την φύση τους. Η βαζοπρεσίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που ενεργοποιεί την επαναπροσρόφηση του νερού στα νεφρά, ενώ τα λευκοκύτταρα του αίματος έλκονται προς τα βακτήρια μέσω πεπτιδίων που προκύπτουν από την διάσπαση βακτηριακών πρωτεϊνών. Τα συνθετικά πεπτίδια έχουν αποδειχθεί χρήσιμα στον προσδιορισμό του υποδοχέα αυτής της τάξης των πεπτιδίων που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Επίσης, προσδεμένα σε κόκκους αραγόζης χρησιμοποιούνται για την δημιουργία στηλών χρωματογραφίας για το καθάρισμα πρωτεϊνών του υποδοχέα, που αναγνωρίζει ειδικά, αυτά τα πεπτίδια. Τέταρτον, τα συνθετικά πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα και ως αντιγόνα στην παραγωγή ειδικών αντισωμάτων. Συντίθενται με τους παρακάτω τρόπους:

- Σύνθεση σε διάλυμα
- Αυτοματοποιημένες μεθόδους στερεάς φάσης

- Τεχνική ανασυνδιασμένου DNA

### 2.1.1 Σύνθεση σε διάλυμα

Κατά το σχηματισμό των πεπτιδίων, η καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέως ενώνεται με την αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέως με ένα πεπτιδικό δεσμό. Ο σχηματισμός συνδέεται με απώλεια ενός μορίου νερού και απεικονίζεται στο σχήμα 2.1. Η ανάπτυξη της πεπτιδικής αλυσίδας γίνεται με την προσθήκη ενός αμινοξέως κάθε φορά είτε από την πλευρά της αμινομάδας είτε από την πλευρά του καρβοξυλίου. Η ισορροπία αυτής της αντίδρασης βρίσκεται προς την πλευρά της υδρόλυσης παρά της σύνθεσης. Η βιοσύνθεση πεπτιδικών δεσμών απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, ενώ η υδρόλυση απελευθερώνει ενέργεια. Εκτός όμως από το επιθυμητό διπεπτίδιο μπορούν να σχηματισθούν ακόμα και μεγαλύτερα πεπτίδια, καθώς και άλλα προϊόντα από την πολυσυμπύκνωση.



Σχήμα 2.1: Σχηματισμός διπεπτιδίου με απώλεια νερού.

Για την ελεγχόμενη σύνθεση ακόμη και του απλούστερου διπεπτιδίου απαιτείται η προστασία του N<sup>α</sup> της αμινομάδας του ενός αμινοξέως και του C<sup>α</sup> της καρβοξυλομάδας του άλλου, με κατάλληλες προστατευτικές ομάδες<sup>26</sup>. Μετά από τη σύζευξη, η πεπτιδική σύνθεση μπορεί να συνεχιστεί με απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων. Όταν χρησιμοποιούνται αμινοξέα με τρεις λειτουργικές ομάδες θεωρείται απαραίτητη η προστασία της δραστικής πλευρικής ομάδας. Ενώ όμως οι πλευρικές ομάδες πρέπει να παραμένουν προστατευμένες καθ' όλη την διάρκεια της σύνθεσης, η α-προστατευτική ομάδα (αμινομάδα ή καρβοξυλομάδα) θα πρέπει να απομακρύνεται εύκολα πριν από κάθε σύζευξη. Επομένως χρειάζονται δύο είδη ομάδων που να έχουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς τα

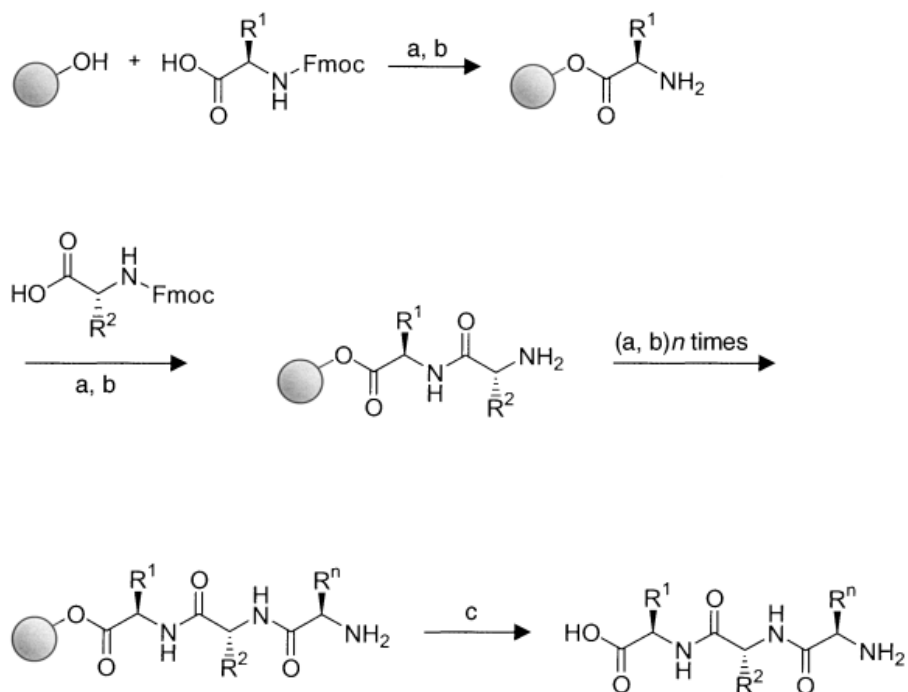
αντιδραστήρια αποπροστασίας. Μετά το τέλος της σύνθεσης, οι προστατευτικές ομάδες πρέπει να απομακρυνθούν, για να ληφθεί το επιθυμητό πεπτίδιο, το οποίο και καθαρίζεται από τα παραπροϊόντα. Κατά συνέπεια, η επιλογή των προστατευτικών ομάδων που θα χρησιμοποιηθούν είναι πολύ σημαντική για την επιτυχή σύνθεση των πεπτιδίων και εξαρτάται από τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνσή τους. Βασικό επίσης είναι οι συνθήκες αποπροστασίας να είναι τέτοιες ώστε το πεπτίδιο να είναι σταθερό και να μην προκαλείται ρακεμίωση. Στο πεδίο αυτό, είναι τεράστια η συμβολή του Ζέρβα και του Bergmann.

Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η **μέγιστη προστασία όλων των δραστικών ομάδων** που αυξάνει τις πιθανότητες για αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων, ενώ μειονέκτημα η δυσκολία απομάκρυνσης των προστασιών στο τέλος της σύνθεσης καθώς και η αυξημένη δυσδιαλυτότητα που παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα πεπτίδια. Για τον λόγο αυτό στην σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων, εφαρμόζεται η ελάχιστη προστασία.

### 2.1.2 Σύνθεση σε στερεά φάση (Μέθοδος Merrifield)

Τα προβλήματα που εμφανίζονται στην σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων όπως η δυσδιαλυτότητα και ο αυξημένος χρόνος αντίδρασης, ξεπεράστηκαν με την σύζευξη σε στερεή φάση, που εισήχθη και αναπτύχθηκε από τον Bruce Merrifield το 1963 (βραβείο Nobel το 1984). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, η αναπτυσσόμενη πεπτιδική αλυσίδα είναι ενωμένη με χημικό δεσμό σε ένα υπόστρωμα αδιάλυτο στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες της σύνθεσης. Έτσι είναι δυνατή η απομάκρυνση της περίσσειας των αντιδραστηρίων και των παραπροϊόντων με **απλή διήθηση** (filtration) και **εκπλύσεις**. Οι μέθοδοι προστασίας και σύζευξης παραμένουν οι ίδιες με αυτές της σύνθεσης σε διάλυμα (προστασία όλων των δυνατών θέσεων αντίδρασης), με την επιπλέον ενεργοποίηση του καρβοξυλίου με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης όπως το δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC) και την αντίδραση μίας ελεύθερης

αμινομάδας με το ενεργό καρβοξύλιο για την δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού.



Σχήμα 2.2: Σύζευξη και έκπλυση

Αρχικά συζεύγνυται το προστατευμένο αμινοξύ στην ρητίνη. Στην συνέχεια ακολουθεί αποπροστασία, έκπλυση, προσθήκη νέου αμινοξέως και αντιδραστηρίου σύζευξης και πάλι έκπλυση. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τόσες φορές, όσα τα αμινοξέα που θέλουμε στην αλυσίδα. Τέλος αποσπάται το πεπτίδιο από την ρητίνη.

Συνήθως ως στερεά φάση χρησιμοποιείται δικτυωμένο πολυστυρένιο με μια δραστική ομάδα ανά εκατό αρωματικούς δακτυλίους. Το προστατευμένο αμινοξύ συνδέεται στο υπόστρωμα με εστερικό δεσμό. Στην συνέχεια απομακρύνεται η προστατευτική ομάδα, γίνεται έκπλυση του αντιδραστηρίου και προστίθεται νέο αμινοξύ και αντιδραστήριο σύζευξης. Ακολουθούν εν συνεχεία τόσο κύκλοι όσα είναι τα αμινοξέα που θέλουμε να προσθέσουμε στην αλυσίδα (σχήμα 2.3), ενώ στο τέλος της σύνθεσης τα πεπτίδια απελευθερώνονται με προσθήκη HF, που διασπά τον καρβοξυλικό εστέρα, ενώ την ίδια στιγμή απομακρύνονται και προστατευτικές ομάδες σε πιθανές πλευρικές αλυσίδες. Ως αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε αρχικά το

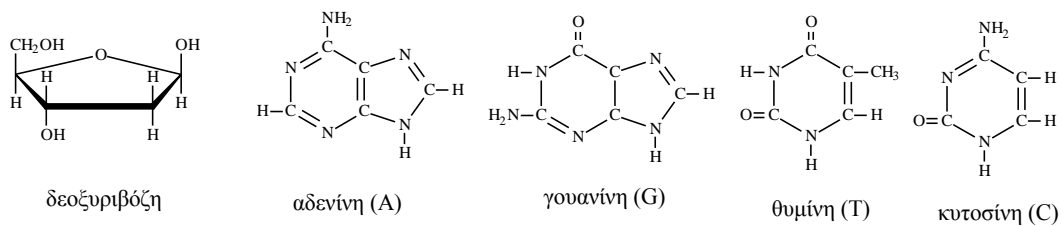


N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο (DCC), αλλά σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως το N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC), διότι είναι πιο διαλυτό στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες και απομακρύνεται ευκολότερα.

Πλεονεκτήματα της σύνθεσης σε στερεή φάση, αποτελούν η μεγάλη ταχύτητα του, η αποφυγή δυσδιαλυτότητας, η αύξηση της απόδοσης και η δυνατότητα αυτοματισμού σε βάση ρουτίνας, αφού το προϊόν σε κάθε στάδιο είναι δεσμευμένο στους κόκκους της ρητίνης και μπορεί να ξεπλυθεί, χωρίς να υπάρχει ανάγκη να καθαριστούν τα ενδιάμεσα προϊόντα. Η μεγάλη σπουδαιότητα της, οφείλεται στο ότι είναι η μοναδική μέχρι σήμερα συνθετική μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων με καθορισμένη αλληλουχία. Μειώνονται κατά πολύ τα ενδιάμεσα στάδια καθαρισμού και τα παραπροϊόντα απομακρύνονται άμεσα. Αντίθετα μειονέκτημα, αποτελούν τα πολλαπλά στάδια αποπροστασιών και συζεύξεων, η σταθερότητα του δεσμού πεπτιδίου-ρητίνης στις συνθήκες απόσπασης της α-αμινο προστατευτικής ομάδας, οι ισχυρά όξινες συνθήκες που απαιτούνται για την απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη που μπορεί να προκαλέσουν ζημιά στην πεπτιδική αλυσίδα (διάσπαση ή ρακεμίωση) και η ετερογένεια των λαμβανόμενων προϊόντων, αφού η απόδοση δεν είναι πάντα 100%, με αποτέλεσμα να απαιτείται καθαρισμός του κύριου προϊόντος από παραπροϊόντα μικρότερου μοριακού βάρους κυρίως με χρωματογραφικές μεθόδους. Επίσης με σύνθεση σε στερεά φάση δεν μπορούν να συντεθούν πεπτιδικές αλληλουχίες με περισσότερα από 20 αμινοξέα, ενώ το βασικότερο μειονέκτημα είναι ότι το τελικό προϊόν είναι της τάξης των mgf. Συγκρίνοντάς το με την σύνθεση σε διάλυμα επίσης, υπάρχει περιορισμός στην επιλογή διαλυτών και προστατευτικών ομάδων.<sup>27-29</sup>

### **2.1.3 Σύνθεση με τεχνική ανασυνδιασμένου DNA<sup>3,30</sup>**

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



**Σχήμα 2.3: 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).

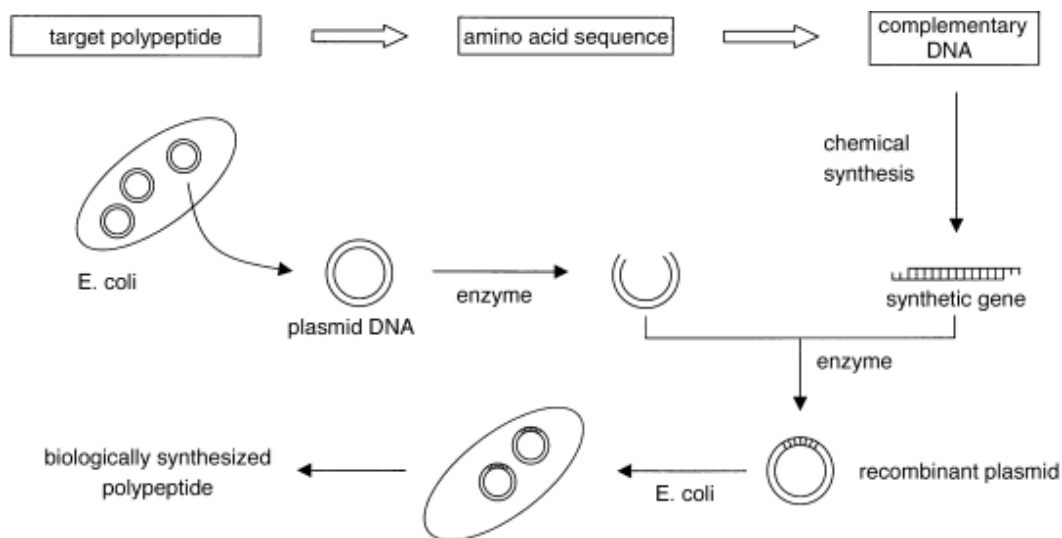
Το 1953 οι Watson και Crick ανακάλυψαν την δομή της **διπλής έλικας** του DNA και την εξειδίκευση των βάσεων όπου η αδενίνη ζευγαρώνει με την θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη λόγω δεσμών υδρογόνου και στερικών παραγόντων. Το DNA όμως δεν είναι το άμεσο εκμαγείο για την πρωτεϊνοσύνθεση. Προηγείται 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 Marsall Nirenberg<sup>31</sup> 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 (σχήμα 2.4).



## Σχήμα 2.4: Πλασμίδια

Αρχικά είναι απαραίτητη η δημιουργία του γονιδίου με συγκεκριμένη αλληλουχία που κωδικοποιεί την επιθυμητή πρωτεΐνη. Ακολουθεί ενσωμάτωση του τμήματος του DNA σε φορείς όπως τα πλασμίδια. Στην συνέχεια γίνεται εισαγωγή των πλασμιδίων σε κύτταρα ξενιστές όπως τα βακτήρια, όπου η μεταγραφή και μετάφραση τους οδηγεί σε πρωτεΐνες με μεγάλη απόδοση.

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.

## 2.2 Σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία

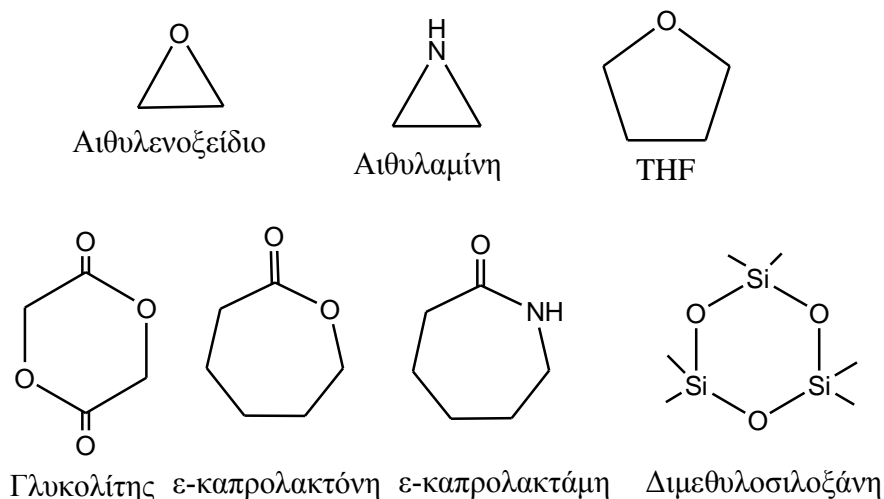
Η σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους με καθορισμένο βαθμό πολυμερισμού, μοριακή σύσταση και άρα συγκεκριμένες ιδιότητες (και επομένως εφαρμογές), που να μπορούν να μιμηθούν επαρκώς τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών, περιλαμβάνει την πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ring opening polymerization) των N-καρβόξυ ανυδριτών (NCA's). Η ανακάλυψη ότι οι δευτεροταγείς δομές μπορούν να ληφθούν και από απλά πολυαμινοξέα έδωσε μεγάλη ώθηση στην συνθετική παρασκευής τους. Τα πολυπεπτίδια παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά συνθετικά πολυμερή, δεδομένου ότι κατέχουν σταθερές

δευτεροταγείς δομές εξαιτίας των δεσμών υδρογόνου, που συμβάλλουν έντονα στον αυτοοργανωτικό χαρακτήρα των αλυσίδων.

Συμπολυπεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων, μέσω της σύνθεσης κατάλληλης ακολουθίας πολυαμινοξέων. Βασική αρχή πίσω από τις περισσότερες μελέτες για τη σύνθεση συμπολυμερών πεπτιδίων είναι η ιδιότητα που παρουσιάζουν τα αμφίφυλα συμπολυμερή να αυτοοργανώνονται σε μικκύλια, χρησιμοποιώντας τον υδροφοβικό τους πυρήνα ως παγίδα φαρμάκων.

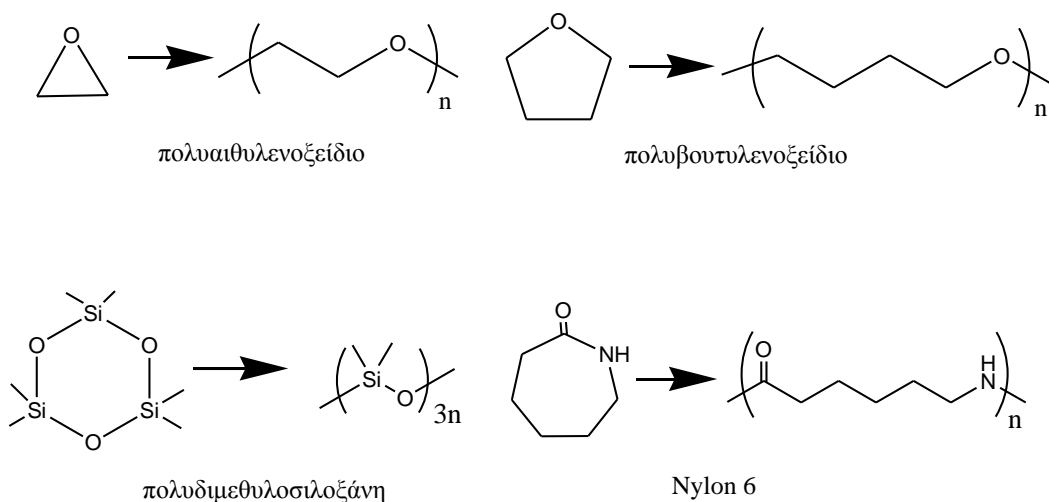
### **2.2.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (R.O.P.)**

Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου αποτελεί εκείνο το είδος πολυμερισμού στο οποίο η τελική μακροαλυσίδα προέρχεται από ένα κυκλικό πρόδρομο μονομερές, κατόπιν διάνοιξης του δακτυλίου του. Τα πιο συνηθισμένα μονομερή που πολυμερίζονται με διάνοιξη δακτυλίου περιέχουν κάποιο ετεροατόμο στο δακτύλιο τους όπως O, S, N. Δεν μπορούν να πολυμεριστούν ωστόσο όλες οι κυκλικές ενώσεις. Για να γίνει αυτό εφικτό, θα πρέπει ο πολυμερισμός να ευνοείται κινητικά και θερμοδυναμικά. Αφενός μεν τα μονομερή να φέρουν μια κινητικά δραστική ομάδα που να μπορεί να αντιδράσει και αφετέρου η τάση διάνοιξης του δακτυλίου να είναι μεγάλη. Δακτύλιοι που περιέχουν 3, 4 ή 8, 9 ανθρακόατομα, είναι πολύ στρεσαρισμένοι και ευνοείται η διάνοιξή τους. Οι εξαμελείς δακτύλιοι είναι θερμοδυναμικά οι πιο σταθεροί και σπάνια πολυμερίζονται. Πενταμελείς και εφταμελείς δακτύλιοι βρίσκονται στο ενδιάμεσο και τις περισσότερες φορές πολυμερίζονται. Αντιπροσωπευτικά μονομερή πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου δίδονται στο σχήμα 2.5.



**Σχήμα 2.5: Χαρακτηριστικά παραδείγματα R.O.P μονομερών.**

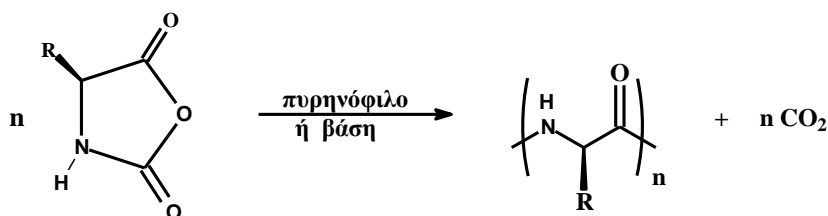
Πολλές φορές δεν αρκεί μόνο η διάνοιξη ενός δακτυλίου να είναι θερμοδυναμικά εφικτή. Πρέπει ταυτόχρονα να υπάρχει μια αντίδραση έναρξης του πολυμερισμού, η οποία να είναι κινητικά ευνοούμενη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, απαρχητές είναι πολικά ή ιοντικά είδη. Από τα κυκλικά μονομερή, το αιθυλενοξείδιο ήταν ένα από τα πρώτα μονομερή που πολυμερίστηκαν ανιοντικά. Σήμερα κυκλικά σουλφίδια, λακτόνες, λακτάμες και κυκλοσιλοξάνες μπορούν να πολυμεριστούν ανιοντικά. Εμπορικά πολυμερή που παρασκευάζονται μέσω πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου είναι αρκετά σημαντικά όπως το πολυ(αιθυλενοξείδιο), πολυ(βουτυλενοξείδιο), το νάιλον 6, η πολυ(διμεθυλοσιλοξάνη), κλπ. Μερικά χαρακτηριστικά εμπορικά πολυμερή φαίνονται στο σχήμα 2.6.



Σχήμα 2.6: Μερικά χαρακτηριστικά προϊόντα R.O.P.

### 2.2.2 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου NCA's α-αμινοξέων

Μέχρι σήμερα η ευκολότερη, γρηγορότερη, οικονομικότερη και εν τέλει καλύτερη τεχνική για την σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, περιλαμβάνει τη διάνοιξη δακτυλίου των N-καρβόξυ-ανυδριτών α-αμινοξέων (NCA's)<sup>15,16,32-34</sup>. Πολυπεπτίδια λαμβάνονται με αυτή την μέθοδο σε μεγάλη απόδοση και χωρίς ρακεμίωση. Ένας σημαντικός αριθμός NCA's έχει συντεθεί και πολυμεριστεί μέχρι σήμερα. Τα πολυπεπτίδια γενικά συνθέτονται από πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου NCA's α-αμινοξέων με πρωτικές (πρωτοταγείς και δευτεροταγείς) και απρωτικές αμίνες (τριτοταγείς), βασικά άλατα, καθώς και με θερμικές και καταλυτικές μεθόδους, σύμφωνα με το σχήμα 2.7.



Σχήμα 2.7: Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβόξυ ανυδριτών (NCA's).

Επιτυχής σύνθεση πολυπεπτιδίων (που να μπορούν να μιμηθούν τις ιδιότητες των φυσικών πρωτεϊνών) με αυτή την μέθοδο δεν ήταν εφικτή για

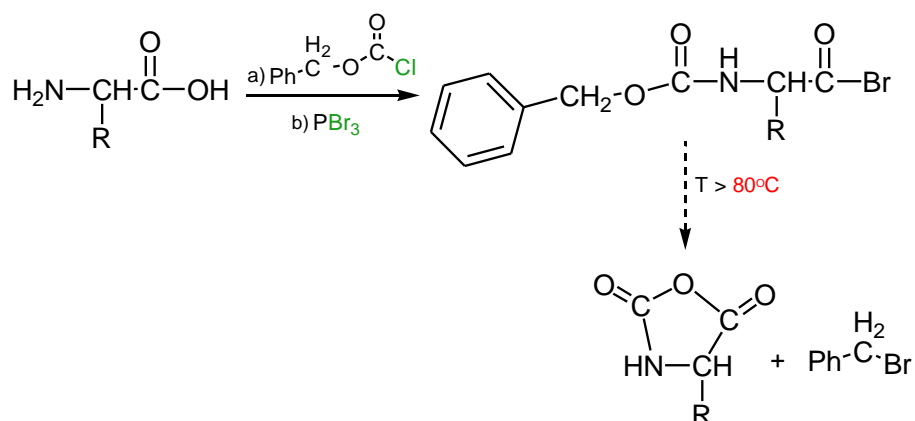
περισσότερο από 50 χρόνια, εξ' αιτίας των αναπόφευκτων αντιδράσεων τερματισμού που εμποδίζουν τον σχηματισμό επακριβώς καθορισμένων αλυσίδων. Έτσι η σύνθεση πρότυπων πολυπεπτιδίων καθώς και οι ιδιότητες αυτών ήταν περιορισμένες.<sup>10-14</sup>, με την προβλεπόμενη μίμηση των πρωτεϊνών να μην είναι η επιθυμητή, λόγω κακής οργάνωσης της δομής των αμινοξέων. Βιβλιογραφικά, η σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους από πολυμερισμό διάνοιξης NCA's αμινοξέων, αναφέρεται από έξι ομάδες που ακολουθούν διαφορετική προσέγγιση: τις ομάδες των Deming, Schlaad, Hadjichristidis-Iatrou, Klok, Gianni, και προσφάτως την ομάδα του Cheng, ενώ πολύ σημαντική είναι η συνεισφορά του συνθετικού Kricheldorf.

Αναφέρονται δυο διαφορετικοί τρόποι ιστορικά, για την σύνθεση των NCA's. Οι N-καρβόξυ ανυδρίτες των α-αμινοξέων περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1906 από τον Hermann **Leuchs**<sup>33,34</sup>, ο οποίος στη συνέχεια ασχολήθηκε με τον πολυμερισμό τους και κατόρθωσε να απομονώσει το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο. Εντούτοις, στα έτη προτού τον πρώτο Παγκόσμιο πόλεμο η επιστήμη των πολυμερών δεν υπήρχε και οι περισσότεροι χημικοί δεν παραδέχονταν την ύπαρξη ομοιοπολικά συνδεδεμένων μακρομορίων. Επομένως, ο Leuchs απέδωσε τα πολυπεπτίδια που παρασκεύασε ως ένα είδος συσσωματωμάτων α-λακταμών και όχι ως πολυμερικές αλυσίδες αποτελούμενες από ομοιοπολικούς δεσμούς. Γύρω στο έτος του 1925, έγιναν συστηματικές μελέτες γύρω από τον πολυμερισμό των NCA's και τις ιδιότητες των συνθετικών πολυπεπτιδίων από την ομάδα του Wessely<sup>35-37</sup> στη Βιέννη. Από τότε υπήρξε συστηματική έρευνα και ένα πλήθος εργασιών αφιερώθηκαν στον πολυμερισμό πολυπεπτιδίων καθώς και στις ιδιότητες αυτών. Ομο- και συμπολυμερή παρασκευασμένα με την τεχνική διάνοιξης δακτυλίου, έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρότυπα πρωτεϊνών, ως συνθετικές ίνες και σαν υποστρώματα ενζύμων.

Η μέθοδος του Leuchs, περιλαμβάνει την κυκλοποίηση των προστατευμένων N-αλκοξυ-καρβονυλο αμινο-αλογονιδίων σε παρατεταμένη θερμοκρασία 70-90°C. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες μπορεί να υπάρξει αποσύνθεση των NCA's και διάνοιξη του δακτυλίου. Σε μια

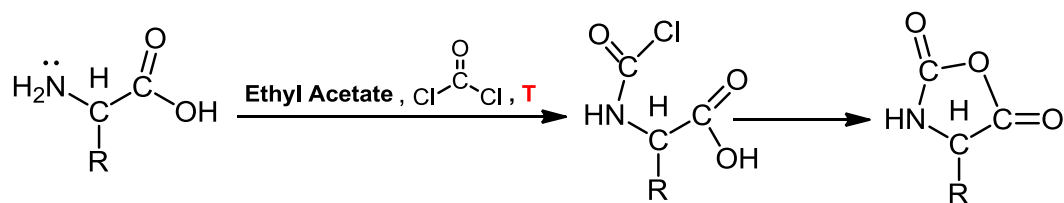


πιο βελτιωμένη έκδοση της μεθόδου, χρησιμοποιείται  $PBr_3$  ως μέσο αλογόνωσης<sup>38</sup> της καρβοξυλομάδας του αμινοξέως (το  $Br^-$  είναι καλή αποχωρούσα ομάδα), ενώ για την προστασία της αμινομάδας χρησιμοποιείται η ομάδα Z, που προέρχεται από αντίδραση του αμινοξέως με N-βενζυλοξυκαρβόνυλο χλωρίδιο<sup>39</sup> (σχήμα 2.8). Επειδή στην μέθοδο αυτή, το καθοριστικό στάδιο είναι αλκυλίωση του  $Br^-$  από το  $RCH_2$  παράγωγο κατά το κλείσιμο του δακτυλίου. Τα βένζυλο-παραγωγα είναι ισχυρότεροι αλκυλιωτικοί παράγοντες από τα μεθυλο ή αιθυλο παράγωγα ως περισσότερο ηλεκτρονιόφιλα και κλείνουν τον δακτύλιο γρηγορότερα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα, για την παρασκευή NCA's  $N^\epsilon$ -(Z)-λυσίνης<sup>40</sup> και  $N^\epsilon$ -(Z)-ορνιθίνης<sup>41</sup>, διότι η εκλεκτική προστασία των ω-αμινομάδων με την βενζυλοξυκαρβόνυλο ομάδα καθώς και ο σχηματισμός του δακτυλίου, γίνεται ταυτόχρονα σε ένα στάδιο παρουσία  $PCl_5$ .



Σχήμα 2.8: Βελτιωμένο μοντέλο της μεθόδου του Leuchs για την σύνθεση N-καρβοξυ ανυδριτών.

Η πιο διαδεδομένη ωστόσο μέθοδος για την προετοιμασία των NCA's, είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον **Fuchs**<sup>42</sup> για την παρασκευή του NCA της N-φαινυλο-γλυκίνης και τροποποιήθηκε ακολούθως από τους **Farthing**<sup>43-45</sup>, **Coleman**<sup>46</sup> και **Levy**<sup>47</sup> για ένα πλήθος NCA's. Περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο, όπου στο πρώτο βήμα της αντίδρασης το αμινοξύ αντιδρά με το φωσγένιο, σχηματίζοντας πολύ γρήγορα το ενδιάμεσο N-χλωροφόρμυλο αμινοξύ (συνήθως δεν απομονώνεται), το οποίο μετατρέπεται σε N-καρβόξυ ανυδρίτη, ενώ αποδίδει HCl (σχήμα 2.9). Διαχωρισμός επιτυγχάνεται διότι οι ανυδρίτες είναι διαλυτοί στους περισσότερους απρωτικούς πολικούς διαλύτες, ενώ τα ελεύθερα αμινοξέα είναι αδιάλυτα.



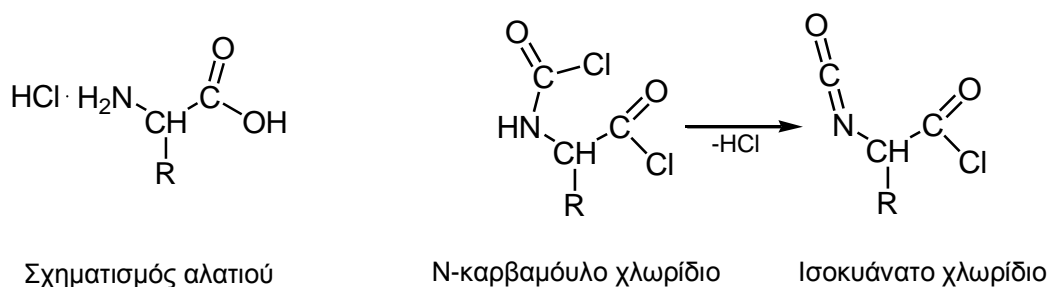
Σχήμα 2.9: Σύνθεση N-καρβόξυ ανυδριτών με την μέθοδο Fuchs-Farthing.

Αρχικά, το τετραυδροφουράνιο (THF) και το 1,4 διοξάνιο αποτέλεσαν τα πιο διαδεδομένα μέσα αντίδρασης. Ωστόσο και οι δύο παραπάνω διαλύτες δίνουν

παράπλευρες αντιδράσεις παρουσία HCl σε πολύωρη διαδικασία αντίδρασης, γεγονός στο οποίο συμβάλλει και η αυξημένη διαλυτότητα του οξέως σε αυτά τα μέσα αντίδρασης. Για να χρησιμοποιηθεί επομένως ένας διαλύτης ως μέσο αντίδρασης θεωρείται σκόπιμο να είναι ανενεργός ως προς το φωσγένιο. Σε λιγότερο πολικούς διαλύτες ωστόσο, όπως χλωροφόρμιο, τολουόλιο και οξικό αιθυλεστέρα, ο χρόνος αντίδρασης αυξάνεται. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε αλογονομένους υδρογονάνθρακες, το HCl παρουσιάζει μικρή διαλυτότητα<sup>48</sup> και πολλές φορές χρησιμοποιείται μείγμα THF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

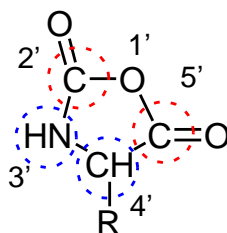
Οι παράπλευρες αντιδράσεις περιλαμβάνουν κυρίως την διάνοιξη του δακτυλίου των NCA's και λαμβάνουν χώρα λόγω **αυξημένης θερμοκρασίας, αυξημένου χρόνου αντίδρασης και υψηλής συγκέντρωσης υδροχλωρίου**, κυρίως όταν ποσότητες αμινοξέων μεγαλύτερες ( $\geq 0.5$  mol) πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Στις περισσότερες περιπτώσεις χαμηλής απόδοσης ανυδρίτη, το παραγόμενο HCl επικάθεται στην αμινομάδα κάποιων αμινοξέων, σχηματίζοντας **αλάτι** και εμποδίζοντας το κλείσιμο του δακτυλίου. Ακόμα όμως και να σχηματιστεί ο δακτύλιος είναι πιθανόν σε αυξημένες συγκεντρώσεις HCl, αυτό να ανοίξει τον δακτύλιο. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται μια βάση όπως Et<sub>3</sub>N για την δέσμευση του παραγόμενου HCl και την διευκόλυνση σχηματισμού του δακτυλίου. Εάν δεν εμποδιστεί η δημιουργία του αλατιού, αυτό μπορεί να αντιδράσει με το φωσγένιο δίνοντας **N-καρβαμόυλο χλωρίδιο**, το οποίο βρίσκεται σε ισορροπία με το **α-ισοκυανατο χλωρίδιο**. Το τελευταίο κάτω από κατάλληλες συνθήκες, μπορεί να γίνει ακόμα και το κύριο προϊόν<sup>49</sup>. Τα τρία βασικά παραπροϊόντα (δίνονται στο σχήμα 14), είναι ελαφρώς όξινα και δύσκολα αποστάζουν. Έτσι εάν παραμείνουν στον ανυδρίτη αυτές οι προσμίξεις, θα αντιδράσουν κατά τον πολυμερισμό με τον βασικό απαρχητή, με αποτέλεσμα το σύστημα να μην είναι πλέον ζωντανό. Ο Kricheldorf αναφέρει<sup>48</sup> ότι παρουσία από ίχνη νερού είναι ευνοϊκή για τον ανυδρίτη, διότι αυτό αντιδρά με τυχόν όξινες προσμίξεις χωρίς να καταστρέφεται ο απαρχητής. Πιστεύει δηλαδή ότι πολύ καθαρά NCA's μπορούν να ληφθούν, μερικές μέρες μετά το πέρας της αντίδρασης. Τα περισσότερα NCAs έχουν κρυσταλλική μορφή σε αντίθεση με τη μορφή των προσμίξεων και επομένως δύο ή τρεις ανακρυσταλλώσεις από κατάλληλους

διαλύτες (και μη διαλύτες) αποτελούν την πιο συνηθισμένη και επαρκή διαδικασία καθαρισμού.



**Σχήμα 2.10:** Τα κυριότερα παραπροϊόντα κατά την σύνθεση των NCA's.

Για τον πολυμερισμό τώρα των NCA's, χρησιμοποιούνται ως απαρχητές πρωτικές και απρωτικές αμίνες, καθώς και βασικά άλατα. Οι NCA's είναι πολύ ευαίσθητα μονομερή διότι περιέχουν στον δακτύλιο τους τέσσερα ενεργά κέντρα, δυο ηλεκτρονιόφιλα (2',5') και δυο πυρηνόφιλα (3',4'), όπως φαίνεται στο σχήμα 2.11 .



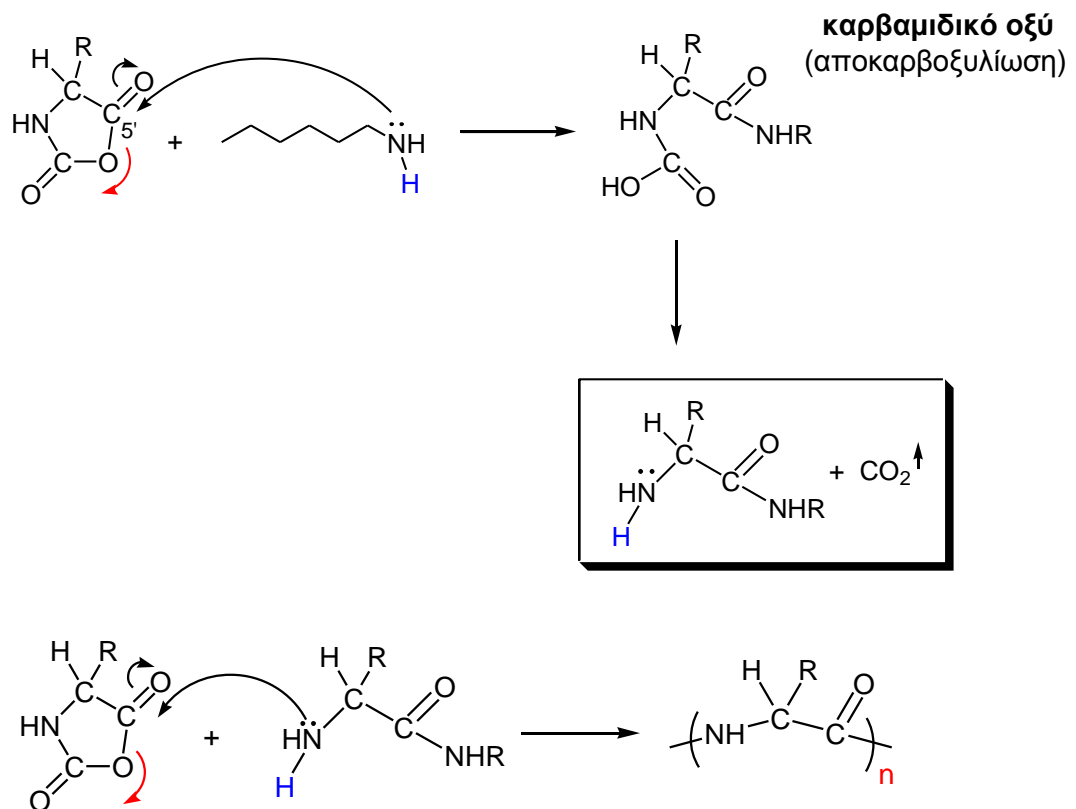
**Σχήμα 2.11:** Τα τέσσερα ενεργά κέντρα των NCA's, που καταδεικνύουν την μεγάλη ευαισθησία του.

Τρεις μηχανισμοί είναι γνωστοί και έχουν προταθεί για τον πολυμερισμό των NCA's από βασικούς απαρχητές, εκ των οποίων δυο είναι οι κυριότεροι. Στην πραγματικότητα, ο πολυμερισμός δεν προχωρά μόνο με τον ένα μηχανισμό αλλά συνυπάρχουν και οι δυο, σε διαφορετικό βαθμό σε κάθε περίπτωση<sup>50-53</sup>. Καθοριστικότερο ρόλο για το ποιος από τους δύο μηχανισμούς επικρατεί κάθε φορά, παίζει ο **λόγος πυρηνοφιλικότητας / βασικότητα του απαρχητή**. Όταν ο απαρχητής δρα ως πυρηνόφιλο, επικρατεί ο λεγόμενος κανονικός μηχανισμός (Normal Route) και όταν δρα ως

βάση ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM).

### 2.2.3 Κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού (Normal Route)

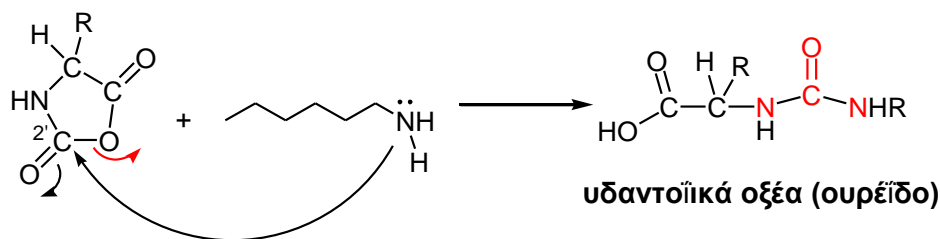
Ισχύει για πυρηνόφιλους απαρχητές που έχουν τουλάχιστον ένα ενεργό υδρογόνο όπως είναι οι πρωτοταγείς και οι δευτεροταγείς αμίνες (χαμηλής βασικότητας, με αλειφατικούς υποκατάστατες μέχρι δυο άνθρακες καθώς οι δευτεροταγείς αρωματικές αμίνες, όπως η πυριδίνη), το νερό και οι αλκοόλες. Οι απαρχητές αυτοί δρουν ως πυρηνόφιλα με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται κατάλοιπα τους στις τελικές αλυσίδες. Τα ενεργά κέντρα σε αυτό το μηχανισμό είναι μη ιοντικά πυρηνόφιλα και ο πολυμερισμός γίνεται σταδιακά. Κατά το στάδιο της έναρξης ο πυρηνόφιλος απαρχητής προσβάλλει το καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Το καρβαμιδικό οξύ που παράγεται είναι θερμοδυναμικά ασταθές και αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια ελεύθερη αμινομάδα και CO<sub>2</sub> (σχήμα 2.12). Επειδή όμως τα μόρια της διμεθυλαμίνης είναι ισχυρότερα πυρηνόφιλα από τα ενεργά αμινο-τελικά άκρα της αλυσίδας, η έναρξη του πολυμερισμού γίνεται γρηγορότερα από την διάδοση, οπότε το καθοριστικό και αργό στάδιο είναι αυτό της διάδοσης του πολυμερισμού, οπότε όλες οι μονομερικές μονάδες ξεκινάνε ουσιαστικά ταυτόχρονα να πολυμερίζονται, με τον ίδιο αριθμό μονομερικών μονάδων να προστίθεται κάθε φορά στην αλυσίδα. Ο μηχανισμός αυτός, που προτάθηκε αρχικά από τον **Wessely**<sup>35-37</sup> και επιβεβαιώθηκε αργότερα από τον **James Watson**<sup>54</sup>, είναι σχετικά αργός και ισχύει τόσο για μη υποκατεστημένα NCA (N-H) όσο και για υποκατεστημένα (N-R). Η πυρηνοφιλικότητα της πρωτικής αμίνης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αντίδραση.



Σχήμα 2.12: Κανονικός σχηματισμός πολυμερισμού

Ο κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού περιλαμβάνει προσβολή του πυρηνόφιλου στον άνθρακα 5' του ανυδρίτη, αποκαρβοξυλίωση και αναγέννηση της αμινομάδας, μέχρι πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς.

Σύμφωνα με τους Sela και Berger<sup>55</sup>, το πυρηνόφιλο μπορεί επίσης να προσβάλλει τον ανυδρίτη στην θέση 2', δίνοντας υδαντοϊκά οξέα (ουρείδο) στην άκρη της αλυσίδας. Η δευτερογενής αυτή αντίδραση οδηγεί στον τερματισμό του πολυμερισμού καθώς δεν γίνεται αναγέννηση της αμινομάδας στην άκρη της αλυσίδας (σχήμα 2.13).



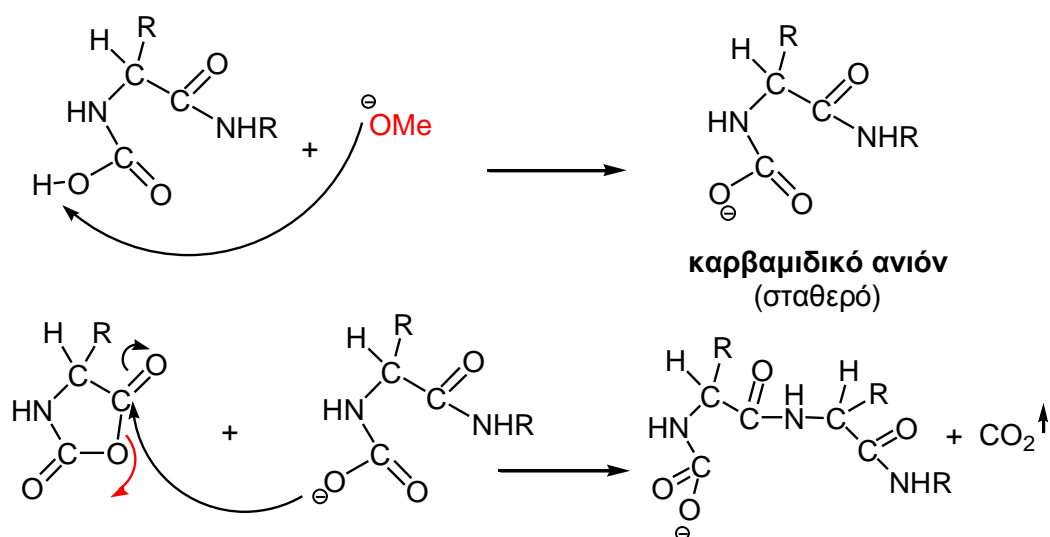
**Σχήμα 2.13:** Παράπλευρη αντίδραση τερματισμού με προσβολή του -CO στη θέση 2' της αλυσίδας.

Τα καλύτερα αποτελέσματα για πρωτοταγείς απαρχητές, δίνει η n-εξυλαμίνη που προκαλεί ταυτόχρονα ταχεία έναρξη και η πιθανότητα προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' είναι μόλις 0,15%, όπως έχει υπολογιστεί για τον πολυμερισμό του NCA του γ-βενζυλο-(L)-γλουταμικού εστέρα<sup>56</sup>. Δηλαδή, μόλις 1 αλυσίδα περίπου στις 670 κατά το στάδιο της έναρξης παίρνει την λάθος πορεία που προκαλεί τερματισμό. Για τις πρωτοταγείς αμίνες θεωρητικά, εάν δεν υπήρχαν αντιδράσεις τερματισμού θα έπρεπε η αντίδραση να παρουσιάζει κινητική 1<sup>ης</sup> τάξης και ο πολυμερισμός να είναι ζωντανός.

#### 2.2.4 Μηχανισμός του Blout (Carbamate mechanism)

Το 1958 οι Blout και Idelson<sup>57</sup> πρότειναν ένα μηχανισμό για ισχυρές βάσεις (όπως το  $\text{MeO}^-\text{Na}^+$ ), σύμφωνα με τον οποίο, το σταθερό καρβαμιδικό ανιόν εκκινεί και διαδίδει τον πολυμερισμό. Το καρβαμιδικό ανιόν, είναι ικανό να εκκινήσει πολυμερισμό, μέσω πυρηνόφιλης προσβολής στην θέση 5' και διάνοιξης δακτυλίου. Επειδή όμως τα ενεργά καρβαμιδικά άκρα είναι ασθενέστερα πυρηνόφιλα σε σχέση με τα αντίστοιχα αμινο-τελικά, ο μηχανισμός αυτός είναι λιγότερο πιθανός. Εξαρτάται ωστόσο από τις συνθήκες της αντίδρασης<sup>58,59</sup> (θερμοκρασία, pH, πίεση  $\text{CO}_2$ ), αφού τόσο η πρωτονίωση όσο και η αποκαρβοξυλίωση είναι αντιστρεπτές αντιδράσεις. Τα καρβαμιδικά άλατα είναι σταθερά, σχηματίζονται εύκολα και η σταθερότητα τους εξαρτάται από την φύση του αντισταθμιστικού κατιόντος και από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του αζώτου (αυξημένη οδηγεί σε πιο σταθερά

άλατα). Επίσης, στην περίπτωση εκκίνησης του πολυμερισμού με κάποια αμίνη, η παρουσία  $\text{MeO}^-\text{Na}^+$ , οδηγεί σε αποπρωτονίωση του καρβαμιδικού οξέως και παράπλευρη διάδοση με καρβαμιδικά ανιόντα (σχήμα 18).



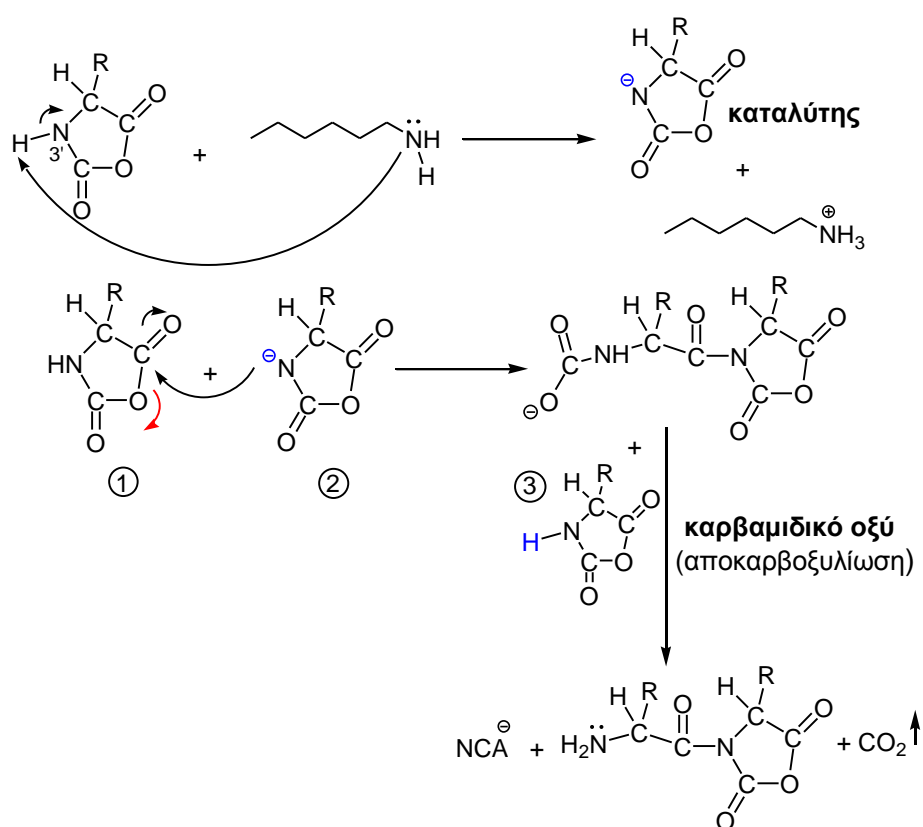
Σχήμα 2.14: Μηχανισμός του Blout.

### 2.2.5 Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (A.M.M)

Αυξάνοντας την βασικότητα του απαρχητή, πηγαίνοντας σε τριτοταγείς αμίνες καθώς και σε δευτεροταγείς υψηλής βασικότητας (με αλειφατικούς υποκατάστατες πάνω από δύο άνθρακες), το σύστημα ακολουθεί ένα διαφορετικό μηχανισμό. Ο μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς προτάθηκε αρχικά από τους Ballard και **Bamford**<sup>60-62</sup> για τις τριτοταγείς αμίνες αλλά και για τις ισχυρές βάσεις<sup>63</sup> και τα μεταλλικά άλατα<sup>64</sup> για **μη υποκατεστημένα NCA** (N-H). Περιλαμβάνει την αποπρωτονίωση του δεσμού N-H του NCA από τον απαρχητή-βάση και την πυρηνόφιλη προσβολή του ανιόντος σε ένα δεύτερο μόριο μονομερούς στον άνθρακα 5', ανοίγοντας τον δακτύλιο και δίνοντας ένα διμερές. Το καρβαμιδικό ανιόν που σχηματίζεται



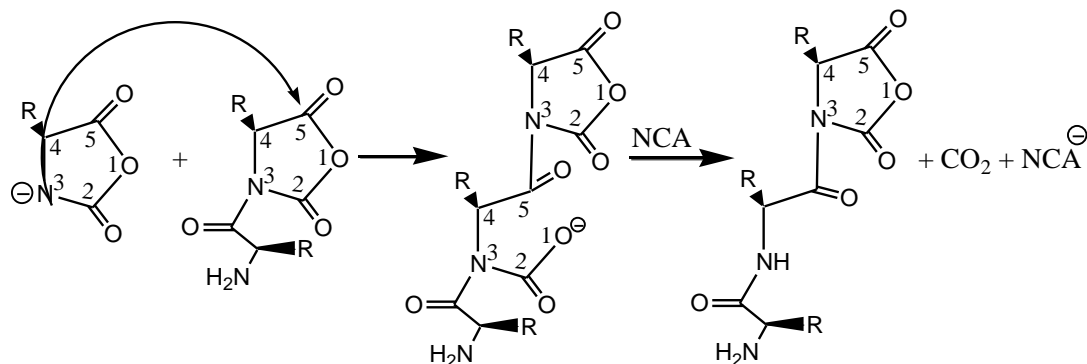
πρωτονιώνεται από ένα τρίτο μόριο μονομερούς, σχηματίζοντας το ασταθές καρβαμιδικό οξύ το οποίο και αποκαρβοξυλιώνεται, παράγοντας ενεργές αμινομάδες ενώ αναγεννάζεται και ο καταλύτης. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει τρία μόρια μονομερούς και αυτό που αναγεννάζεται κάθε φορά, είναι το ανιόν  $NCA^-$ . Ο βασικός απαρχητής επομένως δεν δρα ως απαρχητής μέσω της πυρηνοφιλικότητας του, αλλά ως καταλύτης για τον ιοντισμό του μονομερούς σε μια αντίδραση οξέος-βάσεως, προς σχηματισμό ανιόντος που δρα ως πυρηνόφιλο. Στην περίπτωση αυτή δηλαδή, η πολυμερική αλυσίδα είναι αυτοεκκινούμενη. Επιπλέον, ο μηχανισμός αυτός, μπορεί να υφίσταται ως παράπλευρη αντίδραση, στην περίπτωση εκκίνησης του πολυμερισμού με κάποια αμίνη, όπως εξυλαμίνη (σχήμα 2.15).



Σχήμα 2.15: Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (ΑΜΜ).

Κατά το στάδιο της διάδοσης το διμερές που σχηματίστηκε προσβάλλεται από ένα άλλο ανιόν  $NCA^-$  για να δώσει τριμερές, κτλ. Το  $NCA^-$  αναγεννάζεται σε κάθε

αντίδραση (σχήμα 2.16). Ο μηχανισμός αυτός είναι τουλάχιστον 100 φορές γρηγορότερος από τον κανονικό μηχανισμό και δεν περιλαμβάνει ενσωμάτωση τμήματος του απαρχητή στην τελική αλυσίδα.



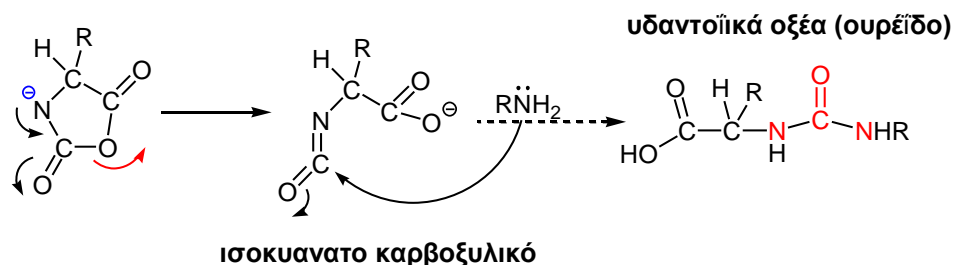
Σχήμα 2.16: Αντίδραση διάδοσης

όπου το  $NCA^-$  δεν έχει καμιά εκλεκτικότητα και μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα καινούργιο μονομερές.

Τα πολυτεππίδια που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο έχουν υψηλό μοριακό βάρος και μεγάλη κατανομή, διότι 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. Ο μηχανισμός αυτός δεν είναι επιθυμητός καθώς ο πολυμερισμός αυτός, απέχει πολύ από το να χαρακτηριστεί ζωντανός. Υπάρχει επίσης πλήθος συνδυασμών πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων που μπορούν να τερματίσουν τον πολυμερισμό, όπως αντιδράσεις διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας ή ισομερίωσης και ενδομοριακής κυκλοποίησης. Όπως εύκολα αντιλαμβανόμαστε, ο έλεγχος όλων αυτών των αντιδράσεων και επομένως του πολυμερισμού είναι πολύ δύσκολος.

Ο **Kopple**<sup>65,66</sup> και αργότερα οι **Seeney** και **Harwood**<sup>67</sup> καθώς και ο **Kricheldorf**<sup>68</sup>, πρότειναν ένα μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο το αρνητικά φορτισμένο άτομο του αζώτου του σχηματισθέντος καρβαμιδικού ανιόντος δίνει ηλεκτρονική πυκνότητα στο καρβονύλιο, διανοίγοντας τον δακτύλιο και σχηματίζοντας ένα ισοκυανато καρβοξυλικό ανιόν. Αυτό μπορεί να

προσβληθεί από ενεργά αμινοτελικά άκρα πολυμερικών αλυσίδων, δίνοντας υδαντοϊκά οξέα και τερματίζοντας τον πολυμερισμό (σχήμα 2.17).



**Σχήμα 2.17:** Παράπλευρη αντίδραση τερματισμού με σχηματισμό υδαντοϊκών οξέων.

Ανακεφαλαιώνοντας, όσο αυξάνεται η βασικότητα και η συγκέντρωση του απαρχητή, αυξάνεται η λάθος πορεία. Το είδος της έναρξης, εξαρτάται από τον λόγο πυρηνοφιλικότητας προς βασικότητα (κυρίως στις δευτεροταγείς αμίνες), τον λόγο  $M/I$ , καθώς και από τις συνθήκες της αντίδρασης. Η επιλογή του απαρχητή πρέπει να είναι τέτοια, ώστε αφενός μεν η ταχύτητα έναρξης να είναι πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάδοσης και αφετέρου ο απαρχητής να μην είναι πολύ βασικός για να περιορίζεται η λάθος πορεία.

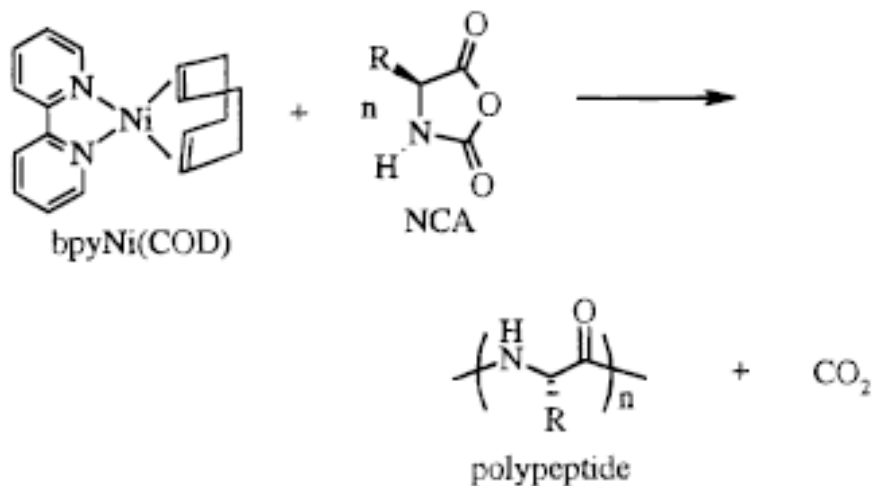
### 2.3 Σύνθεση πεπτιδίων με σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως

Αναπτύχθηκε από τον Timothy Deming<sup>15,16</sup> η πιο γνωστή τεχνική παρασκευής πολυαμινοξέων διεθνώς χρησιμοποιώντας σαν απαρχητές σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως. Κατάφερε να επιτύχει έλεγχο στην δραστικότητα του απαρχητή ανάλογα με τους υποκαταστάτες και το μέσο της αντίδρασης. Ο απαρχητής που χρησιμοποιεί παρέχει ενεργά κέντρα που είναι λιγότερο προσβάσιμα λόγω στερεοχημικών και ηλεκτρονιακών λόγων, περιορίζοντας έτσι τις παράπλευρες αντιδράσεις. Δημιούργησε δηλαδή ένα σύστημα λιγότερο ευαίσθητο σε προσμίξεις που μπορούν να δώσουν παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας. Με την μέθοδο αυτή είναι

δυνατή η παρασκευή ομοπολυμερών και συμπολυμερών πεπτιδίων με σχετικά μικρή κατανομή μοριακών βαρών και έλεγχο στο μοριακό βάρος.

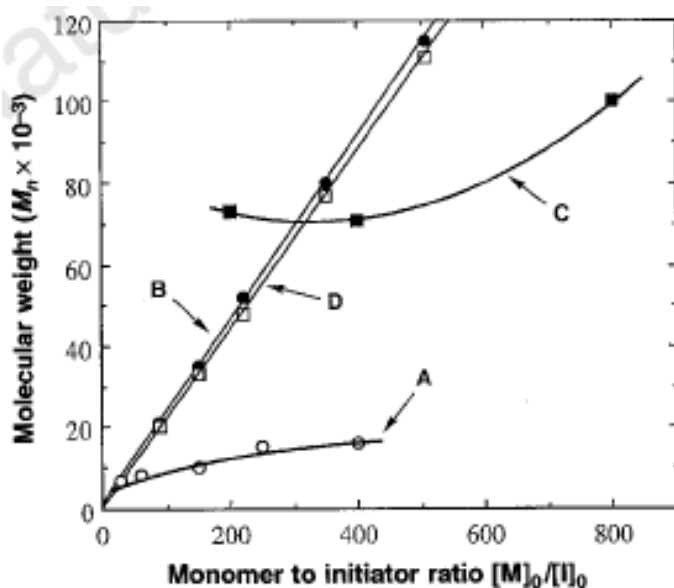
Αρχικά ο Deming έπρεπε να βρει τον κατάλληλο συνδυασμό μετάλλου, υποκαταστατών και μέσου αντίδρασης ώστε το σύμπλοκο να είναι αρκετά δραστικό και να δίνει ικανοποιητική ταχύτητα έναρξης και διάδοσης αλλά ταυτόχρονα να είναι και σταθερό για να εμποδιστεί η αποσύνθεση του ενεργού οργανομεταλλικού κέντρου καθώς και ο τερματισμός στην ανάπτυξη της αλυσίδας. Το σκεπτικό του ήταν πως εάν η τελική αμινομάδα παρέμενε καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης συνδεδεμένη με το μέταλλο, θα ήταν εφικτός ο έλεγχος προσθήκης του μονομερούς στην αλυσίδα και ο «ζωντανός» πολυμερισμός του. Στην προσπάθεια του αυτή, δοκίμασε διάφορους πολυμερισμούς αλλά τα σύμπλοκα του έδιναν μεγάλες κατανομές και μικρές αποδόσεις σε πολυμερές. Οι αποδόσεις καθώς επίσης και το μοριακό βάρος, διαπίστωσε πως άλλαζαν ανάλογα με το μέταλλο. Κατέληξε στο ότι το νικέλιο ήταν το πιο αποτελεσματικό για την παρασκευή πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους.

Έπειτα από πολλούς συνδυασμούς υποκαταστατών και μέσων αντίδρασης κατέληξε τελικώς πως ο καλύτερος συνδυασμός υποκαταστάτη - μετάλλου βρέθηκε να είναι το σύμπλοκο  $\text{bipyNi(COD)}$ , όπου  $\text{bipy}=2,2'$ -διπυριδίνη,  $\text{COD}=1,5$ -κυκλο οκταδιένιο σε DMF, το οποίο παράγει PBLG σε μεγάλη απόδοση με μονομοριακή κατανομή μοριακών βαρών. Αυτός ο συνδυασμός, παρέχει την ιδανική ισορροπία μεταξύ στερεοχημικής παρεμπόδισης και ηλεκτρονιακών αλληλεπιδράσεων και κάνει το σύμπλοκο αρκετά ενεργό ώστε να εκκινήσει τον πολυμερισμό, κρατώντας ταυτόχρονα την τελική αμινομάδα συνδεδεμένη με το μέταλλο (σχήμα 2.18).



**Σχήμα 2.18** Βέλτιστο σύμπλοκο  $\text{bipyNi}$  (COD) για πολυμερισμό των NCA's (Μέθοδος Deming), όπου  $\text{bipy}=2,2'$ -διπυριδίνη,  $\text{COD}=1,5$ -κυκλοοκταδιένιο.

Τα μοριακά βάρη που παρασκευάζονται με αυτόν τον απαρχητή σε DMF, αυξάνονται γραμμικά με την αναλογία μονομερούς-απαρχητή, αποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την απουσία αντιδράσεων τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας (σχήμα 2.19). Με τον απαρχητή αυτόν, συνέθεσε συμπολυμερή πολυπεπτιδίων διαλυτά σε DMF, όπως πολυ(γ-βενζυλο γλουταμικό) (PBLG) και πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL), καθώς και συμπολυμερή που περιείχαν μια αδιάλυτη συστάδα όπως η L-λευκίνη, η οποία εξαιτίας των διαλυτών συστάδων PBLG και PZLL, παρέμεινε και αυτή διαλυτή.

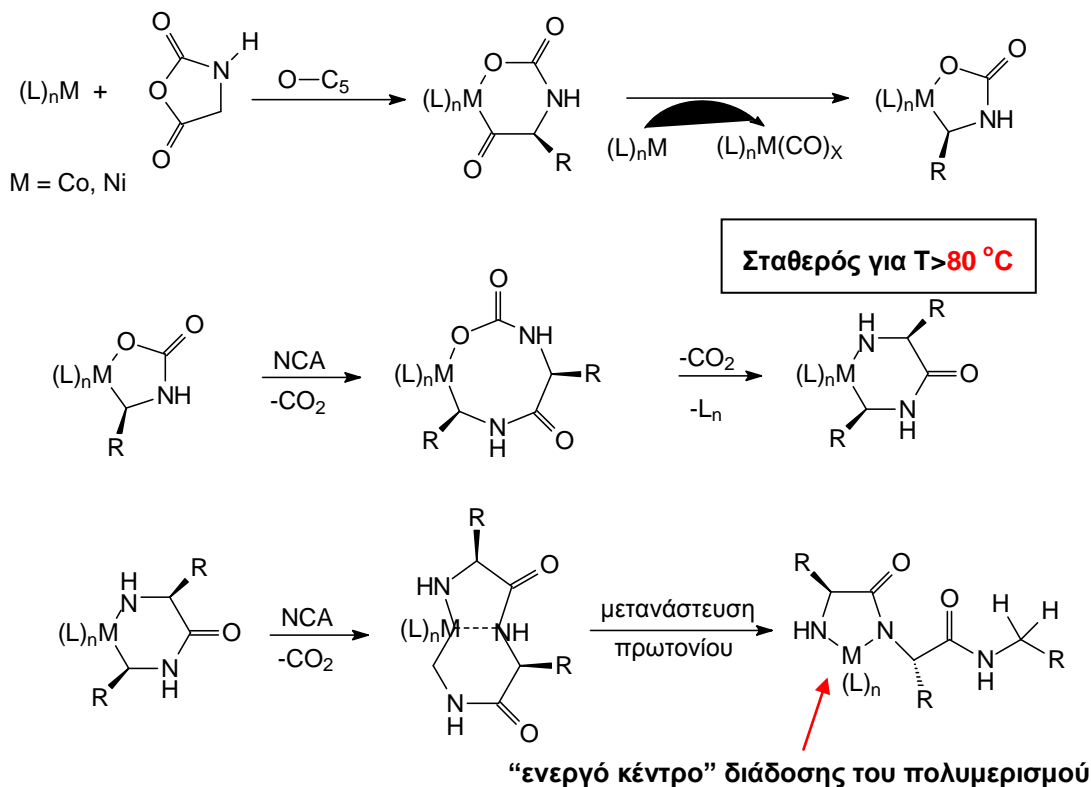


Σχήμα 2.19 Σύγκριση της συμπεριφοράς διαφορετικών απαρχητών στον έλεγχο του μοριακού βάρους του PBLG

συναρτήσει της συγκέντρωσης του απαρχητή σε πολυμερισμό γ-βενζυλο γλουταμικού ανυδρίτη: A: φαινυλαιθυλαμίνη, B: bipyNi(COD), C: βουτοξείδιο του νατρίου, D: θεωρητικό μοριακό βάρος από την αναλογία  $[M]_0/[I]_0$ . Όλοι οι πολυμερισμοί έχουν γίνει σε άνυδρο DMF στους 25°C για 1 μέρα, ενώ το μέσο μοριακό βάρος  $M_n$  υπολογίστηκε με GPC με ανιχνευτή σκέδασης φωτός.

Ο Deming πρότεινε ένα πιθανό μηχανισμό για το πολυμερισμό των NCA με απαρχητή, οργανομεταλλικά σύμπλοκα (σχήμα 2.20). Με ισοτοπική επισήμανση έδειξε την στερεοεκλεκτική οξειδωτική προσθήκη στον O-C5 δεσμό, την οποία ακολούθησε η προσθήκη ενός δεύτερου μονομερούς προς σχηματισμό συμπλόκου με εξαμελή αμιδο-άλκυλο μεταλλοκυκλικό δακτύλιο, ύστερα από αποκαρβοξυλίωση (προ-εκκινητής). Ακόμα μια προσθήκη μονομερούς, οδηγεί στην μετατροπή του ενδιάμεσου σε πενταμελή αμινο-αμιδικό μεταλλοκυκλικό δακτύλιο, που αποτελεί το ενεργό κέντρο του πολυμερισμού. Αυτή η συστολή του δακτυλίου πιστεύεται ότι συμβαίνει με μετανάστευση του πρωτονίου του αμιδίου στο δεσμό άνθρακα μετάλλου, που ελευθερώνει την άκρη της αλυσίδας από το μέταλλο. Με τον τρόπο αυτό το μέταλλο μπορεί να μεταναστεύει κατά μήκος της αναπτυσσόμενης αλυσίδας και ταυτόχρονα να είναι γερά δεμένο στο ενεργό άκρο. Τα μεταλλοκυκλικά

αυτά ενδιάμεσα θεωρείται ότι αποτελούν τα ενεργά κέντρα στον πολυμερισμό των ανυδριτών, με την μέθοδο του Deming.

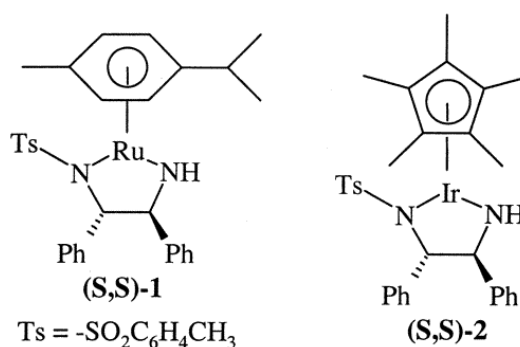


**Σχήμα 2.20** Προτεινόμενος μηχανισμός για πολυμερισμό NCA's με σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης.

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 bry, διαπιστώθηκε σχηματισμός του πενταμελούς δακτυλίου μόνο σε DMF σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ σε THF χρειάστηκε θερμοκρασία μεγαλύτερη των  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 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 π.χ. 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 ισομερών<sup>69</sup> (σχήμα 2.21) Αλλαγή μιας χειρικής διαμόρφωσης σε ένα μόνο αμινοξύ, μπορεί να σταθεροποιεί ή να διακόπτει την δομή του πεπτιδίου.



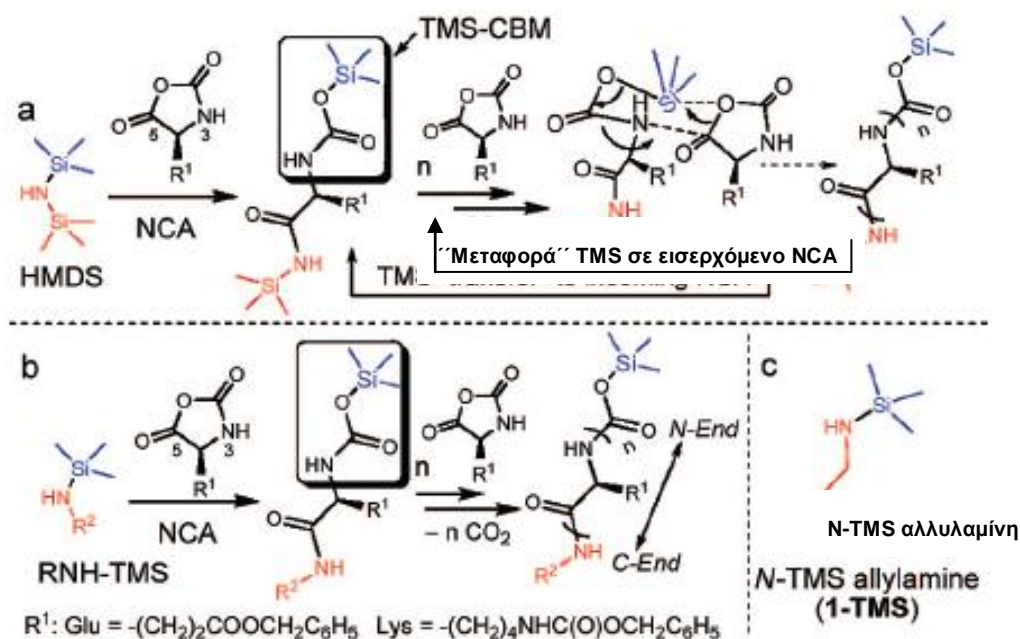
**Σχήμα 2.21 Σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης με στερεοεκλεκτικότητα στον πολυμερισμό NCA's.**

Ανακεφαλαιώνοντας, η μέθοδος που ανέπτυξε ο Deming είναι πολύ σημαντική και έδωσε ώθηση στην παρασκευή καλά καθορισμένων πολυ-α-αμινοξέων, σε ένα τομέα που είχε έλθει σε αδιέξοδο μετά από περίπου 50 χρόνια έρευνας. Οι δομές που συνέθεσε ωστόσο, περιορίζονται σε γραμμικά συμπολυμερή χωρίς περίπλοκες αρχιτεκτονικές. Επίσης απαιτείται η επισταμένη απομάκρυνση του βιοτοξικού μετάλλου από το τελικό πολυμερές, πράγμα που δεν είναι ούτε εύκολο αλλά ούτε και ποσοτικό, μειώνοντας έτσι την χρησιμότητα και τις εφαρμογές τους στην πράξη, καθώς ο βασικότερος λόγος παρασκευής τέτοιων πολυμερών είναι η βιοσυμβατότητα τους.



## 2.4 Πολυμερισμός με τριμεθυλοπυριτικές αμίνες

Το 2007 ο Cheng<sup>70</sup> πρότεινε ένα σύστημα με την χρήση του εξαμεθυλοδισυλαζανίου (HMDS) για τον πολυμερισμό των N-καρβοξυ ανυδριτών. Αυτός ο πολυμερισμός εξελίσσεται μέσω ενός μοναδικού τριμεθυλοπυριτικού καρβαμιδικού (TMS-CBM) μέσου διάδοσης του πολυμερισμού, που περιλαμβάνει σπάσιμο του δεσμού Si-N του εξαμεθυλοδισυλαζανίου κατά την έναρξη (σχήμα 2.22). 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. Με το σύστημα αυτό η ομάδα του Cheng παρασκεύασε ομοπολυπεπτίδια (PBLG) και δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια (PZLL-*b*-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

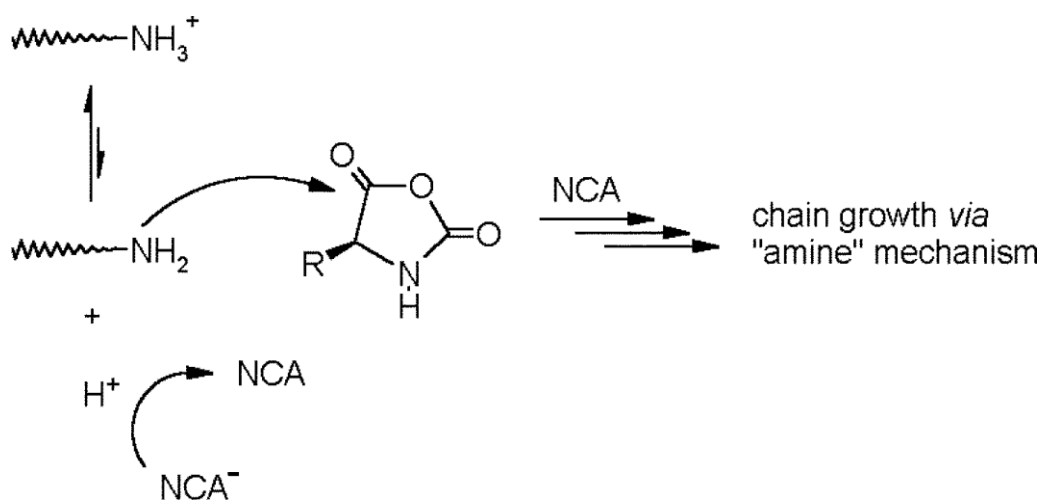


Σχήμα 2.22 Μηχανισμός πολυμερισμού μέσω τριμεθυλοπυριτικών αμινών.

## 2.5 Μέθοδος του Schlaad

Η ομάδα του Schlaad<sup>71,72</sup> (2003) παρουσίασε ένα καλά ελεγχόμενο πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου N<sup>ε</sup>-Z-(L)-λυσίνης NCA με χρήση υδροχλωρικών αλάτων πρωτοταγών αμινοτελικών μακροαπαρχητών. Έτσι, μπόρεσε να συνθέσει υβριδικά συμπολυμερή κατά συστάδες με μικρή κατανομή μοριακών βαρών. Όπως αναφέρει, οι μεγάλες τιμές στην πολυδιασπορά οφείλονται στο ότι ο πολυμερισμός των NCA's υποφέρει από παράπλευρες αντιδράσεις, η πιο συνηθισμένη εκ των οποίων είναι η διαδικασία του ενεργοποιημένου μονομερούς που ξεκινά με απόσπαση H από ένα μόριο NCA. Συνεπώς κατά την διάρκεια του πολυμερισμού, η αλυσίδα αναπτύσσεται αλλάζοντας συνεχώς μεταξύ των δυο μηχανισμών, της κανονικής πορείας και του ενεργοποιημένου μονομερούς.

Η λύση που έδωσε για την αποφυγή του μηχανισμού του ενεργοποιημένου μονομερούς είναι η προσθήκη πρωτονίων, ώστε το τυχόν σχηματιζόμενο NCA<sup>-</sup> να προσλαμβάνει πρωτόνια γρηγορότερα από την πυρηνόφιλη προσβολή του ανιόντος ανυδρίτη σε ένα άλλο μόριο NCA. Δηλαδή αντί να καθαρίσει το σύστημα του για να απομακρύνει τις προσμίξεις που προκαλούν το μηχανισμό αυτό, όπως κάνουμε εμείς, απλά προσθέτει πρωτόνια (σχήμα 2.23).



Σχήμα 2.23 Μέθοδος του Schlaad

για τον πολυμερισμό NCA's με χρήση υδροχλωρικών αλάτων πρωτοταγών αμινομάδων.

Ο πολυμερισμός που προτείνει, λαμβάνει χώρα σε διαλύτη **DMF σε θερμοκρασία 40-80°C**. Με την μέθοδο αυτή, ο Schlaad συνέθεσε συμπολυμερή με πολύ μικρή κατανομή μοριακών βαρών  $I < 1.05$ , που είναι κοντά σε κατανομή Poisson. Παρά την μικρή κατανομή, ο πολυμερισμός αυτός δεν μπορεί να θεωρηθεί ζωντανός, για τους εξής τρεις λόγους. Πρώτον, η επάρκεια του μακροαπαρχητή είναι σχετικά χαμηλή (περίπου 70%) με αποτέλεσμα να απαιτείται το επιπλέον στάδιο της απομάκρυνσης του πρόδρομου πολυμερούς (PS-NH<sub>2</sub>). Δεύτερον η απόδοση της αντίδρασης κυμαίνεται μεταξύ 69-76% ανάλογα την περίσταση και το μοριακό βάρος. Συνέπεια της ατελούς μετατροπής του μονομερούς, είναι η μη εφικτή παρασκευή κατά συστάδες συμπολυμερών πολυαμινοξέων με διαδοχική προσθήκη μονομερών. Η τεχνική αυτή επίσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα και την καθαρότητα του μονομερούς. Η μέθοδος του Schlaad μπορεί να θεωρηθεί επιτυχημένη για την σύνθεση υβριδικών συμπολυμερών με μια πολυπεπτιδική συστάδα, λόγω της απλότητας της και της χρήσης μη απαιτητικών συνθηκών.

## **2.6 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση υψηλού κενού**

Η τεχνική που χρησιμοποιούμε εμείς για τον πολυμερισμό των NCA's μέσω της διάνοιξης δακτυλίου, περιλαμβάνει την χρήση διμεθυλαμίνης ως απαρχητή και την τεχνική υψηλού κενού για τον καθαρισμό όλων των χημικών ειδών που λαμβάνουν χώρα στον πολυμερισμό (διαλυτών, μονομερών, απαρχητών). Πιστεύουμε ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες, μόνο ο πυρηνόφιλος μηχανισμός αμίνης λαμβάνει χώρα. Απαραίτητη για την τεχνική αυτή, είναι η γνώση υαλουργίας για την κατασκευή των απαιτούμενων, ειδικά σχεδιασμένων συσκευών (αντιδραστήρων), τόσο του πολυμερισμού όσο και του καθαρισμού των μονομερών (εικόνα 2.1). Τα πολυμερή που λαμβάνονται με την τεχνική αυτή, χαρακτηρίζονται από μεγάλη καθαρότητα και υψηλές αποδόσεις. Σε αυτό βέβαια, συμβάλει η επιτυχής σύνθεση και ο καθαρισμός των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδριτών) με ανακρυσταλλώσεις σε υψηλό

κενό, απομακρύνοντας έτσι τις διάφορες προσμίξεις και περιορίζοντας τις παράπλευρες αντιδράσεις.



**Εικόνα 2.1** Συσκευή ανακρυστάλλωσης-καθαρισμού των NCA's με την τεχνική υψηλού κενού.

Εκμεταλλεούμενοι τον ζωντανό χαρακτήρα του πολυμερισμού, έχουν συντεθεί στο εργαστήριο μας καλά καθορισμένα ομοπολυπεπτίδια (γλουταμικό, λυσίνη, γλυκίνη, αλανίνη, προλίνη, υδροξυπρολίνη, αργινίνη, ιστιδίνη), καθώς και κατά συστάδες συμπολυπεπτίδια<sup>17,18</sup> με διαδοχική προσθήκη μονομερών NCA's. Πλεονεκτεί η τεχνική αυτή έναντι των αντίστοιχων του Deming και του Schlaad, στο ότι μπορούν επιπλέον να συντεθούν συμπολυπεπτίδια, τόσο αστεροειδή όσο και υβριδικά<sup>19,20,21,22</sup>, καθώς και περίπλοκες μακρομοριακές αρχιτεκτονικές<sup>23</sup> με βάση τα πεπτίδια.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3.1 Φασματομετρία Απορρόφησης Υπερύθρου

Η σύγχρονη φασματομετρία υπερύθρου αποτελεί ένα αποτελεσματικότερο και εύχρηστο εργαλείο για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε είδους ουσίας. Οι εφαρμογές της φασματομετρίας υπερύθρου ταξινομούνται σε τρεις (3) μεγάλες κατηγορίες με βάση τις τρεις περιοχές του υπέρυθρου φάσματος. Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη περιοχή είναι η μέση υπέρυθρη περιοχή, η οποία εκτείνεται περίπου από τα 400 έως 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Η φασματοσκοπία υπερύθρου καταγράφει την επίδραση μορίων με ηλεκτρομαγνητική ενέργεια. Όταν κάποια οργανική ένωση προσβληθεί από μία δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, απορροφά ενέργεια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, ενώ σε διαφορετικά μήκη κύματος αφήνει την ενέργεια να διέλθει. Αν ακτινοβολήσουμε ένα δείγμα με ενέργεια πολλών διαφορετικών μηκών κύματος μπορούμε να προσδιορίσουμε το φάσμα απορρόφησης της ένωσης. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε ένα γράφημα στο οποίο ο οριζόντιος άξονας καταγράφει το μήκος κύματος και ο κατακόρυφος την ένταση των διαφόρων απορροφήσεων ενέργειας ως εκατοστιαία διαπερατότητα. Η απορρόφηση ακτινοβολίας μπορεί να αυξήσει την κινητική ενέργεια του μορίου προκαλώντας στους δεσμούς δονήσεις (επιμηκύνσεις) και κάμψεις. Μελετώντας το φάσμα IR διαπιστώνουμε τις κινήσεις του μορίου και μπορούμε να εξάγουμε τι είδους δεσμοί (λειτουργικές ομάδες) υπάρχουν στο μόριο.

Η πλήρης ερμηνεία ενός φάσματος IR είναι δύσκολη επειδή τα περισσότερα οργανικά μόρια είναι μεγάλα και εμφανίζουν δεκάδες μορφές επιμήκυνσης και κάμψης. Αυτή η περιπλοκότητα όμως είναι χρήσιμη, επειδή ένα φάσμα IR μπορεί να λειτουργήσει σαν ένα είδος δακτυλικού αποτυπώματος για μία ένωση.

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

- Η περιοχή από  $4.000\text{ cm}^{-1}$  έως  $2.500\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί σε απορροφήσεις που προκαλούνται από δονήσεις επιμηκύνσεις (τάσεις) των απλών δεσμών N-H, C-H, και O-H. Οι δεσμοί N-H και O-H απορροφούν στην περιοχή  $3.300 - 3.600\text{ cm}^{-1}$ , ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα  $3.000\text{ cm}^{-1}$
- Στην περιοχή  $2.500 - 2.000\text{ cm}^{-1}$  λαμβάνει χώρα η δόνηση επιμήκυνσης (τάσης) του τριπλού δεσμού. Εδώ απορροφούν τα νιτρίλια και τα αλκύνια.
- Στην περιοχή από  $2.000 - 1.500\text{ cm}^{-1}$  απορροφούν όλοι οι διπλοί δεσμοί. Οι καρβονυλικές ομάδες απορροφούν γενικά στην περιοχή μεταξύ  $1.680$  και  $1750\text{ cm}^{-1}$ , ενώ επιμήκυνση του δεσμού των αλκενίων συμβαίνει συνήθως σε μια περιορισμένη περιοχή μεταξύ  $1.640$  και  $1.680\text{ cm}^{-1}$ .
- Η περιοχή κάτω από τα  $1.500\text{ cm}^{-1}$  είναι περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος. Εδώ εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις που οφείλονται σε μια ποικιλία δεσμών C-C, C-O, C-N, C-X.

Οι μετρήσεις έγιναν σε μηχανήμα Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR. Για τον χειρισμό των στερεών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του σχηματισμού δισκίων KBr. Όταν χρησιμοποιείται η τεχνική αυτή ένα mg ή λιγότερο της λειοτριβημένης ουσίας αναμιγνύεται καλά με περίπου 200 mg ξηρής σκόνης KBr. Η μείξη γίνεται σε γουδί και στη συνέχεια το μείγμα πιέζεται σε ειδική μήτρα για να δημιουργηθεί ένα διαφανές δισκίο. Το δισκίο τοποθετείται στην οπτική δέσμη του φασματομέτρου. Το λαμβανόμενο φάσμα συχνά εμφανίζει ταινίες απορρόφησης στα  $3450$  και  $1640\text{ cm}^{-1}$  λόγω της προσροφημένης υγρασίας.<sup>4</sup>

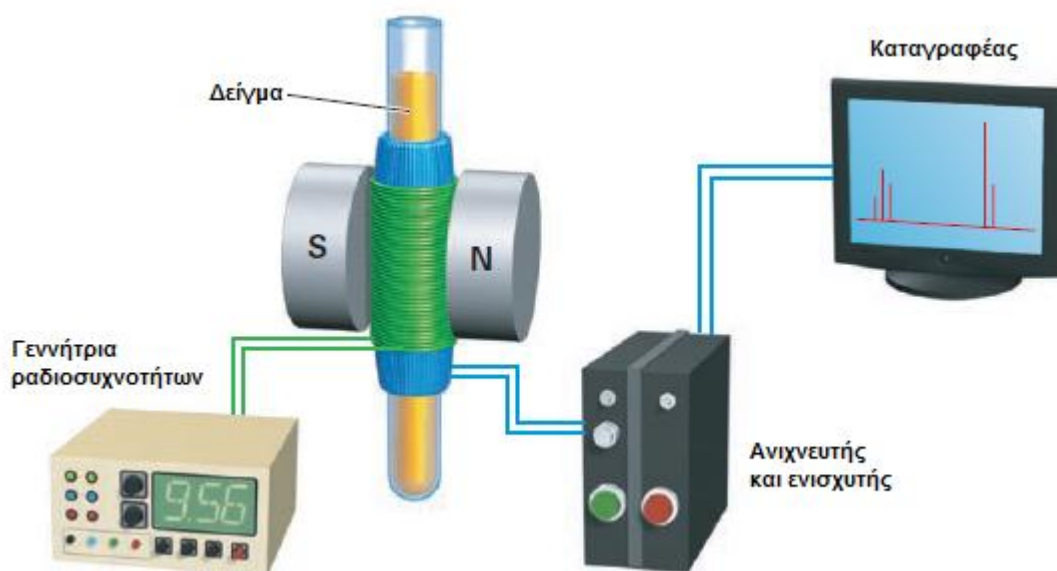
### 3.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear, Magnetic Resonance, NMR) είναι ένα από τα αποτελεσματικότερα εργαλεία για τον προσδιορισμό της δομής χημικών ουσιών. Στον τομέα των πολυμερών, με την τεχνική του NMR, μπορούμε να προσδιορίσουμε τη δομή ομοπολυμερών, αλλά και τη σύσταση και την τακτικότητα των συμπολυμερών. Η μελέτη και εξήγηση των φασμάτων NMR απαιτεί γνώση πολλών παραμέτρων και αρκετή εμπειρία. Θα αναφερθούμε συνοπτικά στη θεωρία του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

Πολλά είδη πυρήνων συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα και δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες. Απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, τα πυρηνικά σπιν των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται κατά τυχαίο τρόπο. Όταν, όμως, εφαρμοστεί εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ένας περιστρεφόμενος πυρήνας  $^{13}\text{C}$  ή  $^1\text{H}$  μπορεί να αποκτήσει τέτοιο προσανατολισμό ώστε το δικό του μικρό μαγνητικό πεδίο να διαταχθεί είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα προς το εξωτερικό πεδίο. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συγκεκριμένα ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας.

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας αλλάζει φορά προς την κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (αναστροφή σπιν). Τότε λέμε ότι οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, εξ ου και ο όρος πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός. 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 με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων εκδηλώνουν το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

Η συχνότητα απορρόφησης δεν είναι η ίδια για όλους του πυρήνες  $^1\text{H}$  ή  $^{13}\text{C}$ , διότι κάθε συγκεκριμένος πυρήνας ενός μορίου βρίσκεται σε κάπως διαφορετικό ηλεκτρονικό περιβάλλον. Τα ηλεκτρόνια τα οποία περιβάλλουν τους πυρήνες, δημιουργούν τα δικά τους μικρά τοπικά μαγνητικά πεδία, με την παρουσία ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι μικρότερο από το εξωτερικό. Η αρχή λειτουργία ενός τυπικού φασματομέτρου NMR απεικονίζεται στο επόμενο σχήμα.



**Εικόνα 3.1: Σχηματική λειτουργία ενός φασματομέτρου NMR.**

Ένας λεπτός γυάλινος σωλήνας που περιέχει διάλυμα του δείγματος τοποθετείται ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη και ακτινοβολείται με ενέργεια rf.

Τα φάσματα NMR αποτυπώνονται σε γραφήματα, στα οποία ο οριζόντιος άξονας καταγράφει το πραγματικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο που



υφίστανται οι πυρήνες, ενώ ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την ένταση απορρόφησης της ενέργειας. Η θέση στο γράφημα, όπου ένας πυρήνας απορροφά, καλείται χημική μετατόπιση. Κάθε κορυφή στο φάσμα NMR αντιστοιχεί σε έναν χημικά διακριτό πυρήνα του μορίου, ενώ οι χημικά ισοδύναμοι πυρήνες εμφανίζουν πάντα μία απορρόφηση. Το εμβαδόν κάτω από κάθε κορυφή απορρόφησης στα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR μπορεί να ολοκληρωθεί ηλεκτρονικά και να προσδιοριστεί ο σχετικός αριθμός των υδρογόνων που είναι υπεύθυνα για τη συγκεκριμένη κορυφή. Επιπλέον, τα γειτονικά πυρηνικά σπιν μπορεί να παρουσιάσουν σύζευξη, αναλύοντας τις κορυφές NMR σε πολλαπλές.

Το NMR πολύ εύστοχα παρουσιάζεται ως ένας “χάρτης” του όλου ανθρακικού σκελετού με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο. Οι μετρήσεις των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR έγιναν σε όργανο Varian Unity Plus 300 MHz/54, σε θερμοκρασία δωματίου. Για την παρασκευή των δειγμάτων, ζυγίστηκαν 20 mg πολυμερούς. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν  $\text{CDCl}_3$  και  $\text{CF}_3\text{COOD}$ .<sup>5</sup>

### 3.3 Θερμοσταθμική Ανάλυση

Σε μια θερμοσταθμική ανάλυση (thermogravimetry TG) καταγράφεται συνεχώς η μάζα του δείγματος σε μια ελεγχόμενη ατμόσφαιρα, ως συναρτησι της θερμοκρασίας ή του χρόνου καθώς η θερμοκρασία του δείγματος αυξάνει. Η θερμοσταθμική ανάλυση αποτελεί τεχνική χαρακτηρισμού υλικών αλλά και ποσοτικής ανάλυσης. Οι πληροφορίες που παρέχουν οι θερμοσταθμικές μέθοδοι είναι κάπως περιορισμένες, διότι οι θερμοσταθμικές μέθοδοι περιορίζονται σε αντιδράσεις διάσπασης και οξειδωσης καθώς επίσης και σε φυσικές διεργασίες, όπως η εξάτμιση, η εξάχνωση και η εκρόφηση.

Ίσως η σημαντικότερη εφαρμογή των θερμοσταθμικών μεθόδων βρίσκεται στη μελέτη των πολυμερών. Τα συμπεράσματα από τις TG αναλύσεις βασίζονται στη μελέτη των TG θερμογραφημάτων. Στα γραφήματα αυτά απεικονίζονται η μεταβολή βάρους του δείγματος σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία του δείγματος ή το χρόνο ανάλυσης του. Σημαντικό εργαλείο για την ερμηνεία των TG γραφημάτων είναι η πρώτη παράγωγος της καμπύλης βάρους του θερμοζυγού DTG. Η φυσική σημασία της πρώτης παραγωγού, είναι ο ρυθμός μεταβολής βάρους ενός δείγματος κατά τη θέρμανσή του. Τα θερμογραφήματα παρέχουν πληροφορίες για τους μηχανισμούς αποσύνθεσης των διαφόρων πολυμερικών υλικών. Επιπλέον τα διαγράμματα αποσύνθεσης είναι χαρακτηριστικά για κάθε είδος πολυμερούς και σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίησή τους.

Τα σύγχρονα εμπορικά όργανα για θερμοσταθμικές αναλύσεις αποτελούνται από: (1) έναν ευαίσθητο αναλυτικό ζυγό, (2) ένα φούρνο, (3) ένα σύστημα καθαρισμού με διαβίβαση αερίου που εξασφαλίζει αδρανή ατμόσφαιρα και (4) έναν μικροϋπολογιστή για έλεγχο του οργάνου και για συλλογή και παρουσίαση των δεδομένων. Οι μετρήσεις έγιναν στη συσκευή Thermogravimetric Analyzer Q50 της εταιρείας TA instruments, ενώ η επεξεργασία των αποτελεσμάτων ολοκληρώθηκε στο πρόγραμμα που παρέχεται μαζί με τη συσκευή και ονομάζεται TA Universal Analysis.<sup>5</sup>

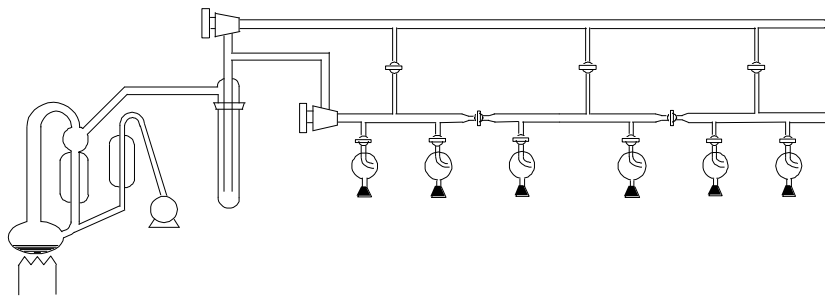
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 4.1 Τεχνική υψηλού κενού

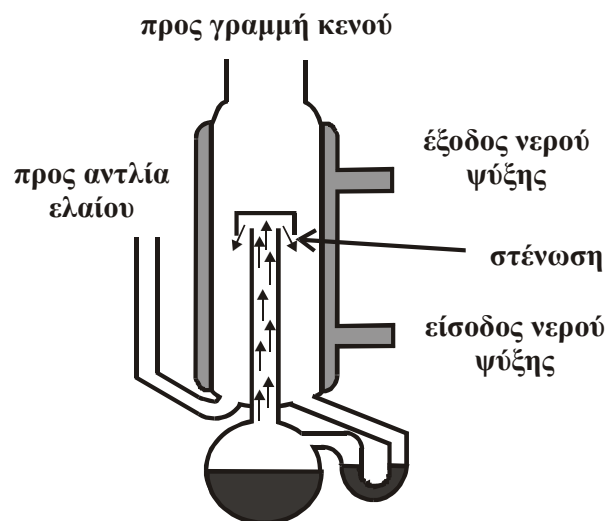
Μέχρι σήμερα η τεχνική υψηλού κενού<sup>6-7</sup> είναι η μόνη τεχνική που εξασφαλίζει ότι όλα τα αντιδραστήρια και το περιβάλλον της αντίδρασης είναι εντελώς απαλλαγμένα από προσμίξεις σε όλα τα συνθετικά βήματα. Όλες οι συσκευές που χρησιμοποιούνται είναι χειροποίητες και έχουν κατασκευαστεί μόνο με γυαλί, διότι εμπορικές συσκευές με εσφυρίσματα, ενέχουν το κίνδυνο διαρροής και εισαγωγής στον αντιδραστήρα υγρασίας και άλλων προσμίξεων από τον αέρα. Η απομάκρυνση της υγρασίας είναι καθοριστική, γιατί το νερό ανάλογα με την συγκέντρωση που βρίσκεται, είτε υδρολύει τα NCA's, είτε δρα ως αργός απαρχητής πολυμερισμού. Όλες οι διαδικασίες για τη σύνθεση των πολυμερών της συγκεκριμένης εργασίας πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της παραπάνω τεχνικής.

Η γραμμή υψηλού κενού (Εικόνα 4.1), αποτελείται από μία αντλία ελαίου, μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου, γυάλινους σωλήνες (Pyrex) και στρόφιγγες υψηλού κενού από teflon (Rotafilon HP 10mm). Η αντλία ελαίου δημιουργεί ένα προκαταρκτικό κενό της τάξης των  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  mmHg στην αντλία διαχύσεως του υδραργύρου, που βρίσκεται σε θερμοκρασία (350-400°C). Τελικώς δημιουργείται από την απόσταξη του υδραργύρου ένα κενό της τάξης  $10^{-6}$  mmHg.



**Εικόνα 4.1: Απεικόνιση της γραμμής υψηλού κενού**

Κατά τη δίοδο των μορίων του υδραργύρου μέσα από τη στένωση, προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς τους και λόγω της μειωμένης πίεσης που αυτό προκαλεί, δημιουργείται διαφορά πίεσης (υποπίεση) στα άκρα της στήλης. Ο υδράργυρος, κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη. Όλη η διαδικασία επαναλαμβάνεται, δημιουργώντας έτσι ένα κενό της τάξης των  $10^{-6}$  mmHg, ίσο με την τάση των ατμών του υδραργύρου (Εικόνα 4.2).



**Εικόνα 4.2 Σχεδιάγραμμα μίας απλής αντλίας διαχύσεως.**

Για την προστασία της αντλίας διαχύσεως και της αντλίας λαδιού από πτητικά συστατικά υπάρχει μία παγίδα υγρού αζώτου. Η αντλία διαχύσεως συνδέεται

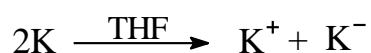
με το κύριο μέρος της γραμμής κενού (που αποτελείται από γυάλινους σωλήνες Pyrex), με στρόφιγγες υψηλού κενού. Με τις στρόφιγγες, το κενό κατευθύνεται σε συγκεκριμένα σημεία της γραμμής και καθίσταται δυνατή η απομόνωση άλλων σημείων. Η σύνδεση των ειδικά κατασκευασμένων συσκευών με τη γραμμή κενού γίνεται με εσφυρίσματα, με την βοήθεια των οποίων προσαρμόζονται οι συσκευές σε αυτήν. Με τον τρόπο αυτό, πραγματοποιούνται οι διάφορες διεργασίες (αποστάξεις διαλυτών, μονομερών, απαερώσεις κ.λ.π.) στις συγκεκριμένες συσκευές. Οι αποστάξεις γίνονται εύκολα σε υψηλό κενό, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με παγόνερο ή υγρό άζωτο. Ιδιαίτερα μέτρα ασφαλείας πρέπει να λαμβάνονται κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων στην γραμμή υψηλού κενού. Η «ποιότητα» του κενού είναι δυνατόν να ελεγχθεί με πηνίο Tesla. Όταν η γραμμή υψηλού κενού έχει απαερωθεί ικανοποιητικά, ο θόρυβος κατά την επαφή του πηνίου με τα γυάλινα τμήματα της γραμμής είναι ασήμαντος. Λεπτομέρειες για τη χρήση της γραμμής υψηλού κενού και τις απαραίτητες προφυλάξεις που πρέπει να λαμβάνονται, αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

## 4.2 Καθαρισμός διαλυτών

Η καθαρότητα των αντιδραστηρίων και διαλυτών που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση πολυμερών είναι πρωταρχικής σημασίας. Η απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών από το σύστημα και κυρίως της υγρασίας κρίνεται επιτακτική διαδικασία. Με τη βοήθεια του υψηλού κενού και της τεχνικής της απόσταξης, οι διαλύτες καθαρίζονται και δύνανται να χρησιμοποιηθούν.<sup>8</sup>

### Τετραϋδροφουράνιο (THF)

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



### Εξάνιο

Το εξάνιο, αφού αντιδράσει για μία μέρα υπό ανάδευση με λεπτότατα διαμερισμένο  $\text{CaH}_2$ , μεταφέρεται στη γραμμή κενού, απαερώνεται και αποστάζεται τελικά σε άλλη φιάλη που έχει ξηρανθεί στην γραμμή και περιέχει λεπτά κομμένες πλάκες Na ή βουτυλολίθιο.

## **Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)**

Χρησιμοποιείται DMF υψηλής καθαρότητας (ποιότητας extra dry με  $H_2O < 50$  ppm) που παραλαμβάνεται σε κλειστά δοχεία των 100 ml και φυλάσσεται σε αδρανή ατμόσφαιρα (glove box). Για τον καθαρισμό του, αφού το βγάλουμε από το glove box, το μεταγγίζουμε με γυάλινο χωνάκι σε σφαιρική φιάλη 1000 ml με στρόφιγγα που έχει υποστεί ξήρανση στην γραμμή κενού και περιέχει ρητίνη με ισοκυανομάδες (isocyanate resin), σε πενταπλάσια τουλάχιστον περίσσεια δραστικών ισοκυανικών ομάδων σε σχέση με τις δραστικές προσμίξεις ( $H_2O$ , βάσεις). Το DMF κάτω από κατάλληλες συνθήκες, διασπάται σε διμεθυλαμίνη, που είναι απαρχητής πολυμερισμού. Για την απαλλαγή από αυτές τις βασικές προσμίξεις, χρησιμοποιούνται οι όξινες ισοκυανομάδες. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 5 ώρες, για την απομάκρυνση όλων των δραστικών προσμίξεων. Στην συνέχεια ο διαλύτης διηθείται με γυάλινο ηθμό σε άλλη σφαιρική φιάλη 1000 ml με στρόφιγγα (που έχει υποστεί ξήρανση στην γραμμή κενού) και κατόπιν τοποθετείται στην γραμμή κενού και απαερώνεται. Το στάδιο αυτό, πραγματοποιείται δυο φορές. Από την σφαιρική φιάλη, λαμβάνονται με απόσταξη για τις απαιτούμενες αραιώσεις τα μεσαία κλάσματα.

(διηλ.σταθερά  $\epsilon_r = 36.71$  στους  $25^\circ C$  ,  $\Sigma.Z = 153^\circ C$ )

## **Βενζόλιο**

Το βενζόλιο (σ.ζ.  $80^\circ C$ ) αφήνεται τουλάχιστον μία εβδομάδα υπό ανάδευση σε κωνική φιάλη η οποία περιέχει πυκνό θειϊκό οξύ ( $H_2SO_4$ ) για την απομάκρυνση ακόρεστων ενώσεων, όπως το πολικό θειοφαίνιο (A) (σ.ζ.  $84^\circ C$ ) και το τολουόλιο (C), τα οποία περιέχονται ως παραπροϊόντα στο εμπορικά διαθέσιμο βενζόλιο (περίπου 0,5 % περιεκτικότητα σε θειοφαίνιο).

Στη συνέχεια το βενζόλιο μεταφέρεται σε φιάλη η οποία περιέχει λειοτριβημένο, σε λεπτό διαμερισμό, υδρίδιο του ασβεστίου, όπου αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα για την απομάκρυνση ιχνών υγρασίας ή νερού από την προηγούμενη διαδικασία. Ακολουθώντας, η φιάλη συνδέεται με τη

γραμμή κενού μέσω ειδικού εσφυρίσματος, το διάλυμα ψύχεται, απαερώνεται καλά και ακολούθως μεταφέρεται με απόσταξη σε βαθμονομημένο κύλινδρο στον οποίο έχει γίνει προηγουμένως, προσθήκη κανονικού βουτυλολιθίου και το βουτυλολίθιο προστίθεται για να αντιδράσει με τα τελευταία ίχνη υγρασίας που έχουν απομείνει στον κύλινδρο. Φρόνιμο θα ήταν ο συνθετικός πριν από κάθε απόσταξη βενζολίου στη συσκευή πολυμερισμού, να απαερώνει τουλάχιστον μία φορά το διάλυμα, στη συσκευή φύλαξής του. Εδώ θα πρέπει να επισημάνουμε, ότι δεν είναι απαραίτητη η θέρμανση του διαλύτη κατά την απόσταξη λίγων ml από τον κύλινδρο στον οποίο φυλάσσεται προς τη συσκευή που θέλουμε να τον συλλέξουμε, αφού σε συνθήκες κενού η μείωση της πίεσης είναι πολύ γρήγορη και η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε μη ελεγχόμενη απόσταξη.

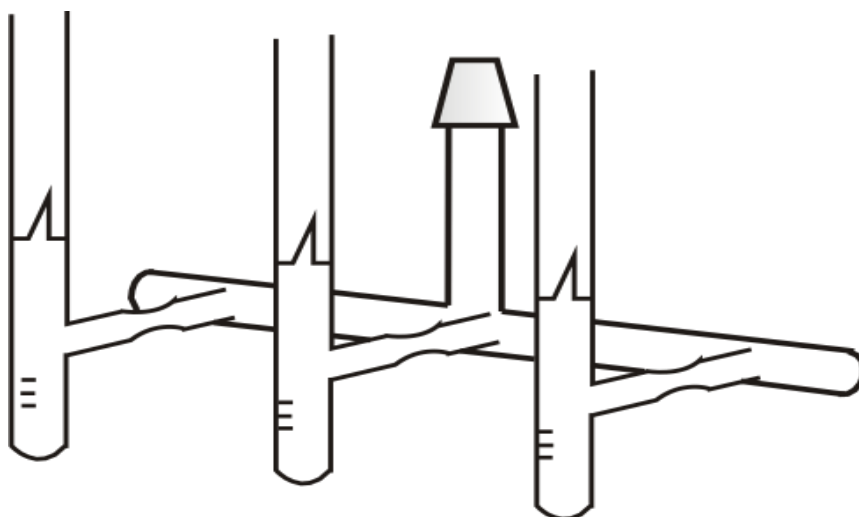
### **4.3 Καθαρισμός άλλων αντιδραστηρίων**

#### **Διμεθυλαμίνη(DMA)**

Η διμεθυλαμίνη χρησιμοποιήθηκε ως απαρχητής για τον πολυμερισμό των NCAs. Η διμεθυλαμίνη είναι αέριο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (σ.ζ=7°C) με υψηλή τάση ατμών(1.8 atm) και πρέπει να υγροποιηθεί για να ακολουθήσει ο καθαρισμός της. Για την υγροποίηση προσαρμόζεται η οβίδα του αερίου στην γραμμή κενού και γίνεται διεξοδικός έλεγχος με την βοήθεια του πηνίου Tesla για τυχόν διαρροές. Σε γειτονική στρόφιγγα προσαρμόζεται φιάλη των 100ml που περιέχει κάτοπτρο νατρίου και είναι απαερωμένη. Ακολούθως, η φιάλη ψύχεται με την βοήθεια λουτρού ισοπροπανόλης ξηρού πάγου στους -78°C και ανοίγεται η στρόφιγγα της οβίδας αργά και με προσοχή ώστε να μην συμπυκνωθεί μεγαλύτερος όγκος αερίου από αυτόν της φιάλης. Όταν έχουν συμπυκνωθεί 10ml περίπου το λουτρό ισοπροπανόλης ανταλλάσσεται γρήγορα με παγόνερο και αφήνεται το υγροποιημένο πλέον αέριο να αντιδράσει με το νάτριο για δυο ώρες. Περιοδικά συμπληρώνεται πάγος στο λουτρό ώστε η θερμοκρασία να μην υπερβεί το σημείο ζέσεως της διμεθυλαμίνης. Εν συνεχεία αποστάζεται σε συσκευή (Εικόνα 4.3) που περιέχει βαθμονομημένες αμπούλες, η επιθυμητή ποσότητα κάθε φορά. Η κάθε αμπούλα παγώνεται με

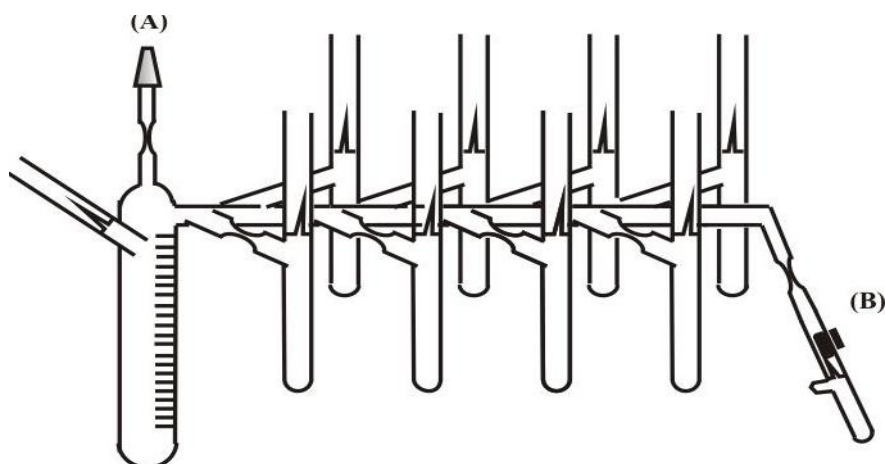


υγρό άζωτο, απαερώνεται, συντήκεται στην στένωση και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.



**Εικόνα 4.3:** Συσσκευή αμπουλών για την παραλαβή ενώσεων χαμηλού σημείου ζέσεως

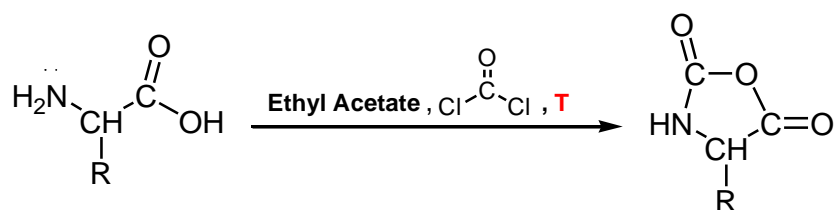
Μία από τις αμπούλες αυτές προσαρμόζεται σε συσκευή αραίωσης (Εικόνα 4.4), η οποία μέσω του εσφυρίσματος τοποθετείται στη γραμμή κενού. Ακολουθεί προσεκτική απαέρωση και ξήρανση της συσκευής (flame drying) πριν την απόσταξη ποσότητας διαλύτη, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του απαρχητή. Κατόπιν, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού με σύντηξη στο σημείο A και προστίθεται ο απαρχητής με θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας (B).



Εικόνα 4.4: Συσκευή αραίωσης απαρχητή

#### 4.4 Σύνθεση και καθαρισμός N-Καρβοξυανυδριτών

Τα μονομερή NCA's δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα και επομένως πρέπει να παρασκευαστούν από τα αντίστοιχα αμινοξέα. Η παρασκευή τους<sup>32,9,10</sup> είναι γνωστή διεθνώς στην βιβλιογραφία (μέθοδος Fuchs-Farthing) και γίνεται με αντίδραση στερεού τριφωσγενίου<sup>11-14</sup> με το α-αμινοξύ (Σχήμα 4.1) σε θερμοκρασία και διαλύτη, οξικό αιθυλεστέρα ή THF. Το τελευταίο συνήθως αποφεύγεται γιατί είναι πιο πολικό και μπορεί να αντιδράσει με το φωσγένιο. Αν το αμινοξύ περιέχει πλευρική χαρακτηριστική ομάδα, αυτή θα πρέπει να προφυλαχθεί με κατάλληλη προστασία.

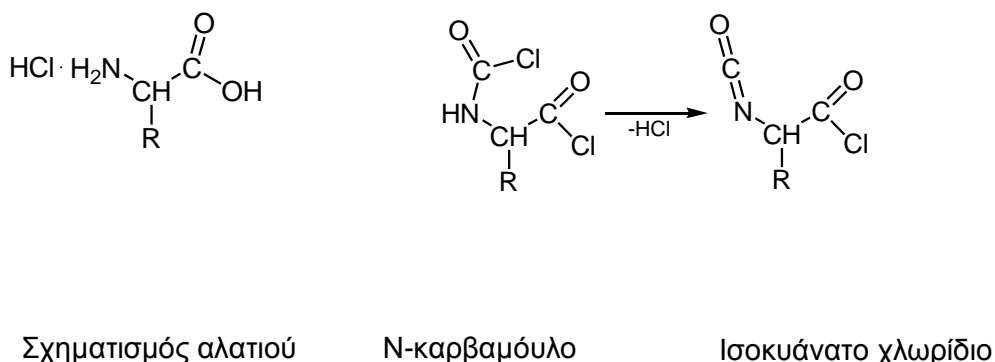


Σχήμα 4.1: Αντίδραση του αμινοξέως με το φωσγένιο προς σχηματισμό NCA

Αρχικά, αντιδρά το αμινοξύ (αιώρημα στον διαλύτη) με το παραγόμενο in situ φωσγένιο υπό Ar σε ένα γρήγορο στάδιο, παράγοντας HCl και N-καρβαμόυλο χλωρίδιο. Το τελευταίο, δεν απομονώνεται στα περισσότερα αμινοξέα διότι μετατρέπεται αμέσως στο επιθυμητό NCA. Στο τέλος της αντίδρασης, το χλωρίδιο υπάρχει σαν παραπροϊόν σε μικρό βαθμό. Το κλείσιμο του δακτυλίου του πιο πολικού N-καρβοξυ ανυδρίτη εξασφαλίζεται, με την

διάλυση του συνήθως στο μέσο αντίδρασης. Στην περίπτωση που παρασκευάζονται ανυδρίτες “άπ’ όλων” αμινοξέων όπως γλυκίνη, αλανίνη, λευκίνη κ.τ.λ., απαιτείται για το κλείσιμο του δακτυλίου, η χρήση αφενός μεγαλύτερης θερμοκρασίας, και αφετέρου η χρήση του πιο πολικού ακετονιτριλίου μετά από κάποιο χρονικό διάστημα.

Σε ορισμένα αμινοξέα, ο σχηματισμός του NCA επιβάλλει την χρήση μιας βάσης όπως  $\text{Et}_3\text{N}^{13}$ , γιατί το παραγόμενο  $\text{HCl}$  επικάθεται πάνω στο άζωτο του αμινοξέως, εμποδίζοντας τον δακτύλιο να κλείσει. Αυξημένη συγκέντρωση του οξέως αυτού, μπορεί επίσης να ανοίξει τον δακτύλιο. Έτσι, η αντίδραση μιας βάσης με τα όξινα παραπροϊόντα (Σχήμα 4.2) καθίσταται αναγκαία αφού αυτά δεν αποστάζουν και η εκδίωξη τους είναι δύσκολη, ακόμα και με χρήση τεχνικών υψηλού κενού.

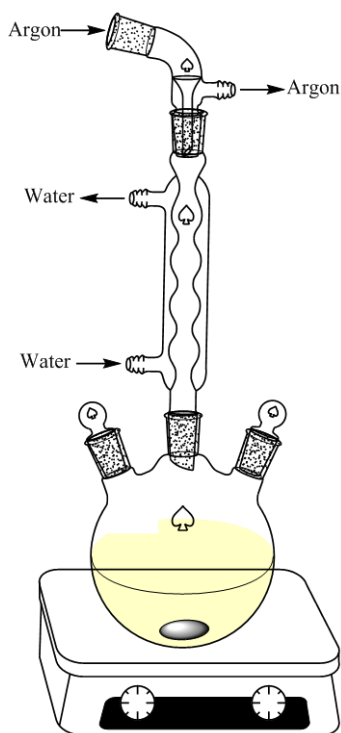


**Σχήμα 4.2:** Παράπλευρες αντιδράσεις κατά τον σχηματισμό του ανυδρίτη

Μετά το πέρας της αντίδρασης και την ομογενοποίηση του διαλύματος, καθαρίζεται το μείγμα με ανακρυσταλλώσεις σε υψηλό κενό. Η καθαρότητα του ανυδρίτη είναι τεράστιας σημασίας για την σύνθεση πεπτιδικών πολυμερών, καθώς τυχόν όξινες προσμίξεις θα αντιδράσουν με τον βασικό απαρχητή με αποτέλεσμα να υπάρχουν αντιδράσεις τερματισμού και η απόδοση του πολυμερισμού να είναι μικρή.

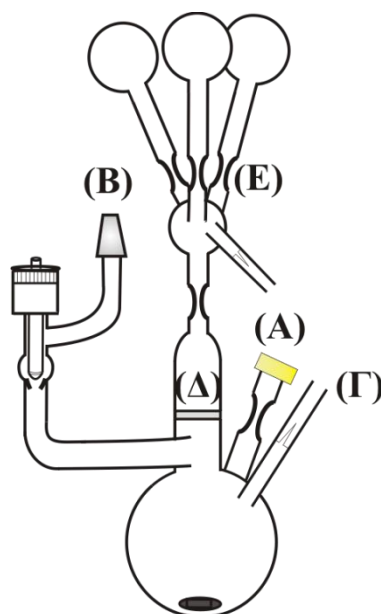
#### 4.4.1 Σύνθεση Leu NCA

15,0 g από το αμινοξύ (L) - Leu ζυγίζονται και τοποθετούνται σε δίκλιμη φιάλη των 1000ml, η οποία αφήνεται στη γραμμή υψηλού κενού για όλο το βράδυ. Την επόμενη μέρα αποστάζουμε στη φιάλη 250 ml άνυδρου THF, απαερώνουμε και αφού ξεπαγώσουμε, μεταφέρουμε τη φιάλη στη γραμμή αργού / κενού. Παρουσία αργού, τοποθετούμε στη φιάλη ψυκτήρα και υπό ανάδευση ανεβάζουμε τη θερμοκρασία στους 50 – 55° C. Προσθέτουμε 29,7 ml Λιμονένιο για να δεσμεύσει το παραγόμενο HCL. Αφήνουμε για 10 λεπτά και μετά προσθέτουμε 13,6 g τριφωσγένιο. Μετά από μία (1) ώρα το διάλυμα αρχίζει να διαυγάζει και έχει έντονη κίτρινη απόχρωση (λόγω του λιμονένιου). Αφήνουμε την αντίδραση γι' ακόμη μία ώρα υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού.



Εικόνα 4.5: Συσσκευή σύνθεσης του μονομερούς NCA

Μετά το τέλος της αντίδρασης υπό ροή αργού και με τη βοήθεια του κενού, διηθούμε το διάλυμα μέσω γυάλινου φίλτρου στο στένωμα (A) της συσκευής ανακρυσταλλώσεων (Εικόνα 4.5).



**Εικόνα 4.6:** Συσσκευή ανακρυσταλλώσεων σε υψηλό κενό

Απαραίτητο είναι να έχουμε ελέγξει πρώτα τη συσκευή ανακρυσταλλώσεων για τυχόν οπές και να την έχουμε ξηράνει καλά στη γραμμή κενού.

Έπειτα, ανεβάζουμε τη συσκευή στη γραμμή κενού από το εσμύρισμα (B), απαερώνουμε και διώχνουμε το διαλύτη με απόσταξη σε διπλανή σφαιρική φιάλη. Ταυτόχρονα κόβουμε το στένωμα (A) με σύντηξη. Τέλος αφήνουμε το μονομερές να ξηραθεί στην γραμμή κενού. Την επόμενη μέρα ξεκινάει το σημαντικό στάδιο των ανακρυσταλλώσεων.

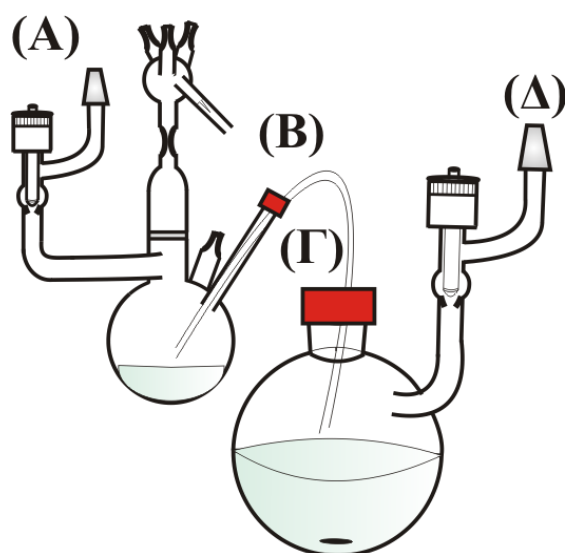
Αποστάζουμε την ελάχιστη δυνατή ποσότητα THF για να διαλυθεί το μονομερές υποβοηθώντας και με λίγη θέρμανση περίπου  $40^{\circ}\text{C}$ . Μόλις διαλυθεί το στερεό, αποστάζουμε εξάνιο (περίπου 3 φορές την ποσότητα του THF). Το μονομερές καταβυθίζεται και η συσκευή τοποθετείται στο ψυγείο στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για μία νύχτα.

Την επόμενη μέρα, διηθείται το υπερκείμενο υγρό μέσω του (γυάλινου) φίλτρου (Δ) της συσκευής σε παρακείμενη φιάλη η οποία και απομακρύνεται με σύντηξη στο (E).

Ανεβάζουμε τη συσκευή στη γραμμή κενού από το εσμύρισμα (B) και αφήνουμε το μονομερές να ξηραθεί για περίπου 2 ώρες. Στη συνέχεια

επαναλαμβάνουμε το στάδιο των ανακρυσταλλώσεων άλλες δύο φορές. Αφού απομακρυνθεί και η τελευταία σφαιρική φιάλη ανεβάζουμε τη συσκευή στη γραμμή κενού για ξήρανση.

Για να μπορέσουμε να συλλέξουμε ποσοτικά τον καθαρό ανυδρίτη, αποστάζουμε ποσότητα THF για να διαλυθεί, απασερώνουμε και μεταφέρουμε τη συσκευή στη γραμμή αργού / κενού. Με cannula (Εικόνα 4.7) μεταγγίζουμε το διάλυμα σε ξηρή φιάλη των 500ml και στη συνέχεια υπό κενό διώχνουμε το διαλύτη. Ο καθαρός τελικός ανυδρίτης ξηραίνεται καλά και φυλάσσεται προς χρήση στο glove box.



Εικόνα 4.7: Μεταφορά τελικού διαλύματος NCA με cannula σε σφαιρική φιάλη.

#### 4.5 Σύνθεση Poly – Leucine

Υάλινη αμπούλα που περιέχει τον απαρχητή (διμεθυλαμίνη) αραιωμένο σε DMF προσκολλάται στη συσκευή πολυμερισμού. Η συσκευή ξηραίνεται με flame –dry στη γραμμή κενού, ώστε να απομακρυνθεί και το τελευταίο ίχνος υγρασίας. Έπειτα η συσκευή μεταφέρεται μέσα στο glove box όπου και εισάγεται η επιθυμητή ποσότητα του ανυδρίτη. Η συσκευή μεταφέρεται στη γραμμή κενού και αποστάζεται κατάλληλη ποσότητα DMF και στη συνέχεια θράβεται η υάλινη αμπούλα και ξεκινά ο πολυμερισμός. Κατά την ανάδευση

τα πρώτα λεπτά παρατηρείται η χαρακτηριστική έκλυση φυσαλίδων του διοξειδίου του άνθρακα.

#### 4.6 Σύνθεση συμπολυμερών PEO-*b*-PLEU

Συντέθηκαν δύο συμπολυμερή PEO-*b*-PLEU, με στόχο το πρώτο PEO-*b*-PLEU1 να έχει μοριακά βάρη 10.000 για τη συστάδα PEO και 3.000 για τη συστάδα Pleu και το δεύτερο PEO-*b*-PLEU2 με μοριακά βάρη 10.000 για τη συστάδα PEO και 6.000 για τη συστάδα Pleu. Για τα συμπολυμερή χρησιμοποιήθηκε ως μακροαπαρχητής το εμπορικά διαθέσιμο πολυαιθυλενοξειδίο μοριακού βάρους 10.000, το οποίο φέρει μία ακραία αμινομάδα. Για να απομακρυνθεί η υγρασία από τον μακροαπαρχητή, αυτός διαλύεται σε βενζόλιο. Το βενζόλιο έχει την ικανότητα να κάνει αζεοτροπικό μίγμα με το νερό, με αποτέλεσμα να μειώνεται το σημείο ζέσεως του ύδατος και να απομακρύνεται πιο εύκολα από το υγροσκοπικό πολυαιθυλενοξειδίο. Στη συνέχεια αποστάζεται το αζεοτροπικό μίγμα βενζολίου - νερού και ο μακροαπαρχητής ξηραίνεται στη γραμμή κενού. Αφού ξηρανθεί καλά, αποστάζεται DMF περίπου 10 ml για 0,3 g μακροαπαρχητή και διάλυμα συλλέγεται σε υάλινη αμπούλα, η οποία απομακρύνεται με σύντηξη. Κατόπιν η αμπούλα που περιέχει τον μακροαπαρχητή ενώνεται στη συσκευή πολυμερισμού. Η συσκευή υφίσταται ξήρανση με χρήση φλόγας (flame dry) και μεταφέρεται στο glove box, όπου και τοποθετείται η επιθυμητή ποσότητα του ανυδρίτη Leu-NCA. Για τον πρώτο συμπολυμερισμό ζυγίστηκε ποσότητα 0,09g Leu-NCA, ενώ για το δεύτερο ζυγίστηκε η διπλάσια ποσότητα, δηλαδή 0,18g ανυδρίτη. Μεταφέρουμε τη συσκευή στη γραμμή κενού και αποστάζουμε κατάλληλη ποσότητα DMF. Αφού διαλυθεί καλά ο ανυδρίτης θραύεται ο υάλινος υμένας της αμπούλας και ο συμπολυμερισμός ξεκινάει. Η κινητική του συμπολυμερισμού είναι πολύ γρήγορη, καθώς μέσα σε διάστημα 2 -3 ημερών ο πολυμερισμός έχει ολοκληρωθεί.





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

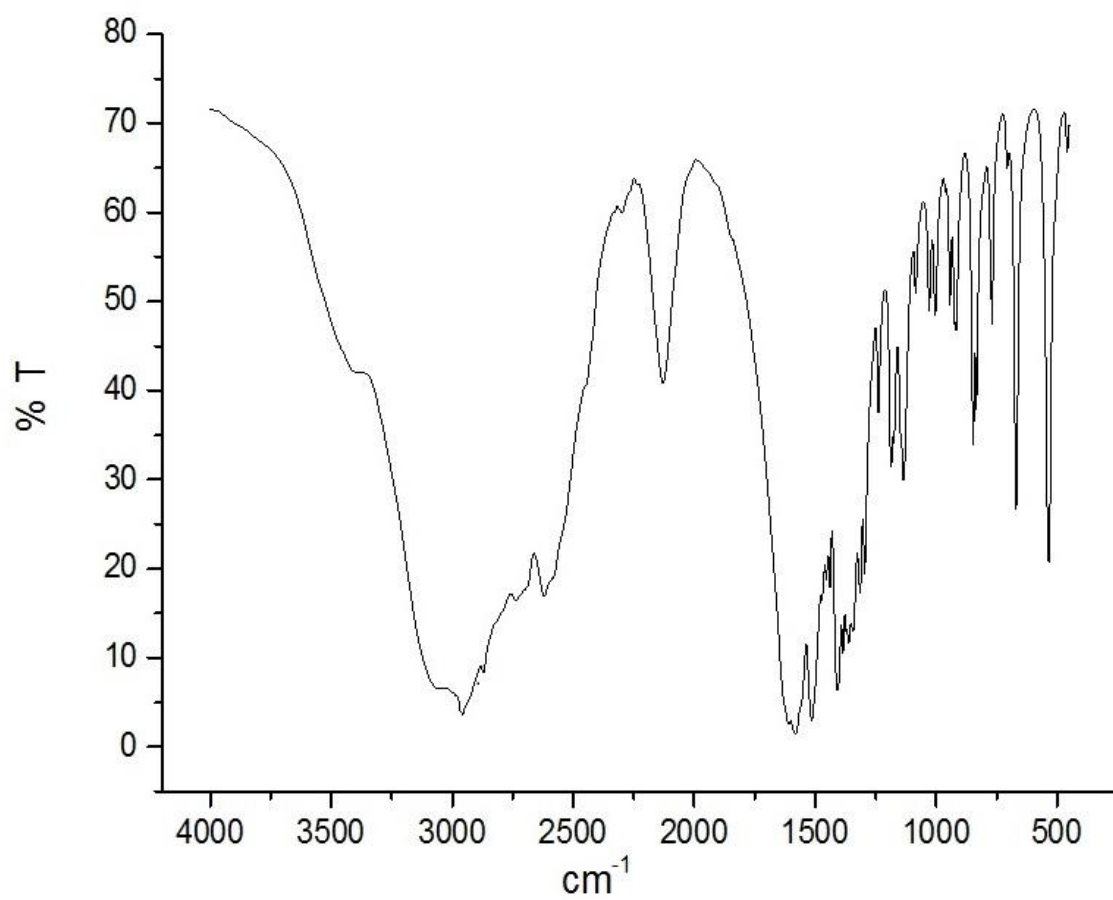
### Αποτελέσματα – Συζήτηση

#### 5.1 Σύνθεση N – Καρβοξυανυδριτών

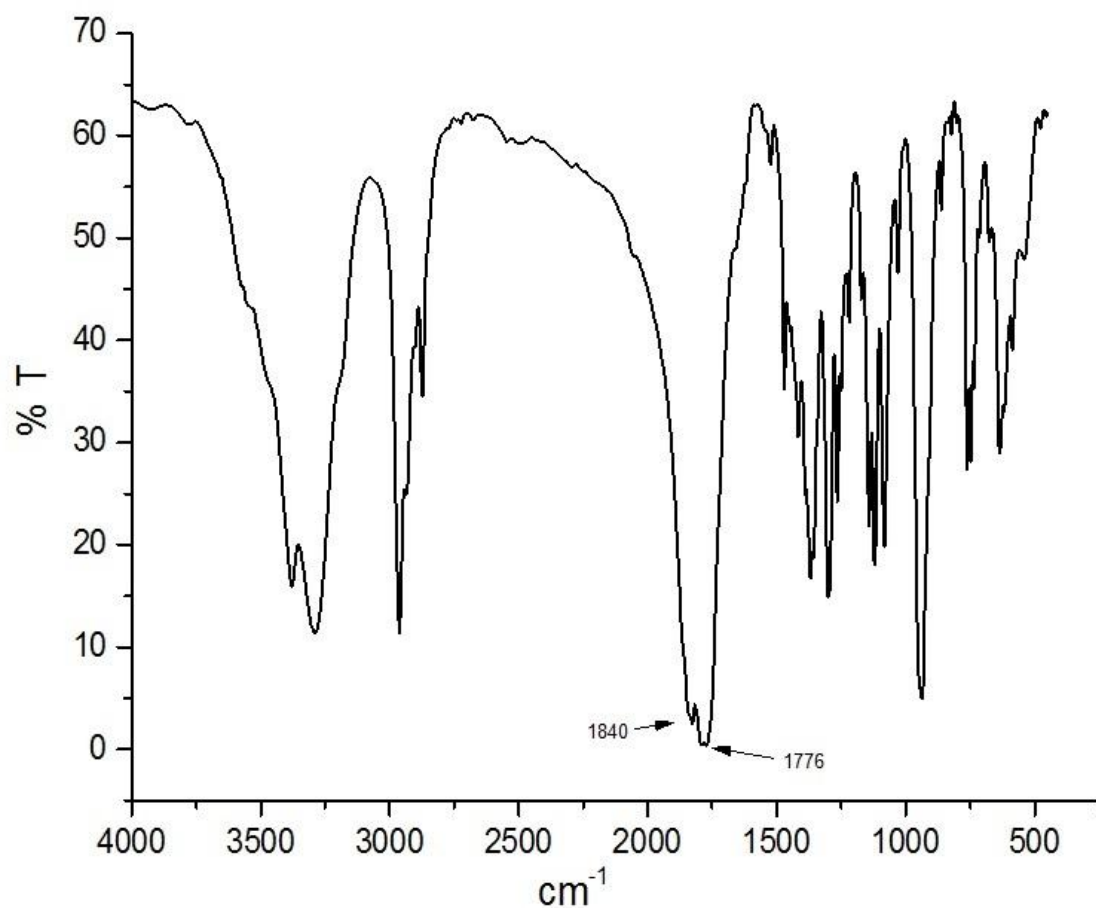
Κρίσιμο στάδιο για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου είναι η επιτυχής σύνθεση των N – Καρβοξυανυδριτών. Τα μονομερή πρέπει να ληφθούν σε καθαρή μορφή, χωρίς προσμίξεις. Επίσης, σημαντικό είναι η πλήρης μετατροπή του αρχικού αμινοξέως σε N – Καρβοξυανυδρίτη. Στην παρούσα εργασία, η σύνθεση του NCA ελέγχθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

##### 5.1.1 Leucine NCA

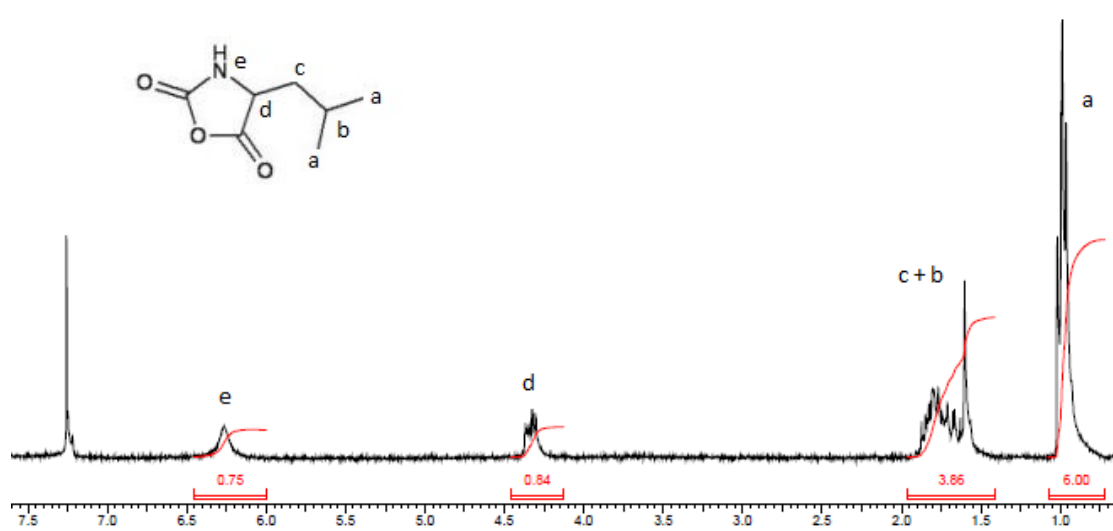
Πρώτα παρατίθενται τα φάσματα του αρχικού αμινοξέως L – Leu (Εικόνα 5.1) και του ανυδρίτη της λευκίνης (Εικόνα 5.2) . Στο φάσμα της Leu-NCA παρατηρούμε τις κορυφές στα  $1776\text{ cm}^{-1}$  και  $1840\text{ cm}^{-1}$  οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για τον σχηματισμό του ανυδρίτη. Επίσης παρατηρούμε την απουσία σχηματισμού κορυφής κοντά στα  $1650\text{ cm}^{-1}$ , περιοχή όπου εμφανίζεται ο αμιδικός δεσμός, το οποίο σημαίνει ότι δεν έχει λάβει χώρα κάποια αντίδραση πολυμερισμού. Αμέσως μετά παρατίθεται το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του ανυδρίτη (Εικόνα 5.3) σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο στο οποίο μπορούν να αποτιμηθούν όλες οι κορυφές και μ' αυτόν τον τρόπο να πιστοποιηθεί και η καθαρότητα του N - καρβοξυανυδρίτη.



Εικόνα 5.1 Φάσμα IR L – Leu



Εικόνα 5.2 Φάσμα IR Leu – NCA



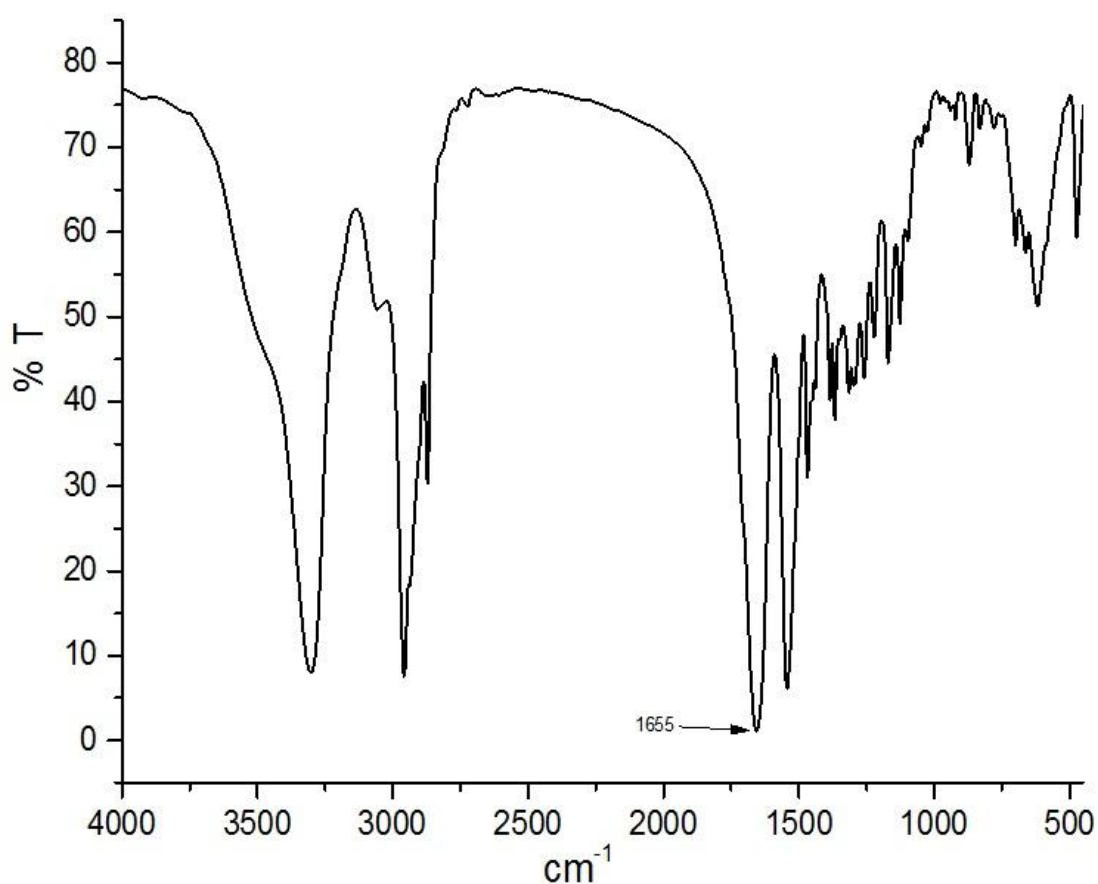
Εικόνα 5.3 Φάσμα <sup>1</sup>H NMR Leu – NCA σε CDCl<sub>3</sub>

Αποτίμηση των κορυφών της ουσίας: τα 6 ισοδύναμα υδρογόνα α στα 0,9 ppm , τα υδρογόνα c και b εμφανίζονται στην περιοχή μεταξύ 1,5 και 1,9 ppm, το d στα 4,3 ppm και το e στα 6,25 ppm. Η κορυφή του διαλύτη εμφανίζεται στα 7,25 ppm.

## 5.2 Πολυμερή

### 5.2.1 Πολυ – λευκίνη

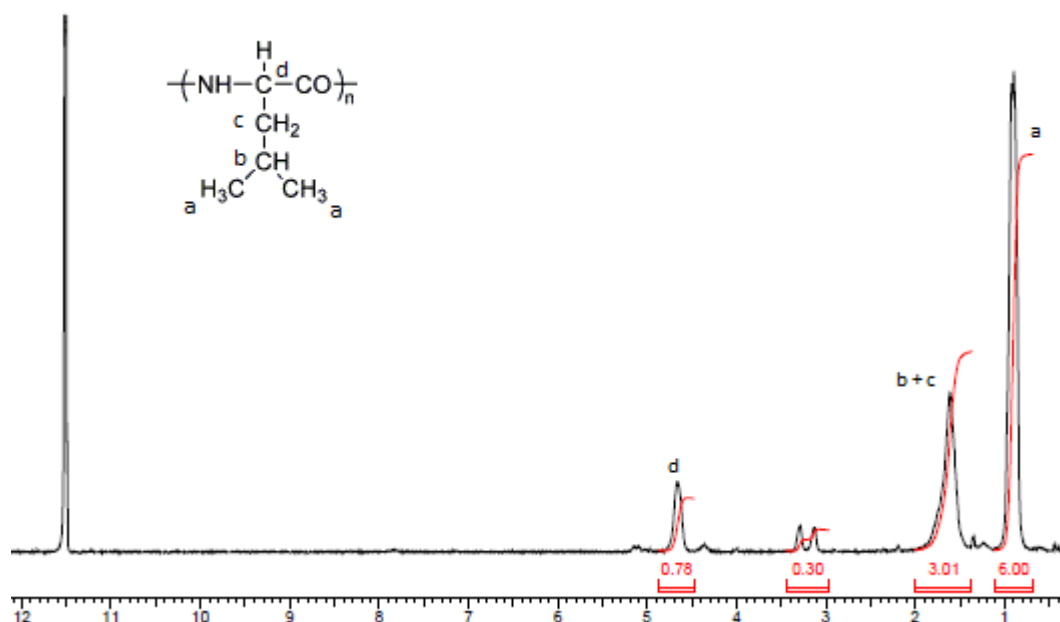
Παρατίθεται το φάσμα υπέρυθρου της πολυ – λευκίνης (Εικόνα 5.4) .



Εικόνα 5.4 Φάσμα IR PLeu.

Παρατηρούμε την εξαφάνιση των χαρακτηριστικών κορυφών του ανυδρίτη και την εμφάνιση της κορυφής στα 1655 cm<sup>-1</sup> που δείχνει το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού.

Για την περαιτέρω πιστοποίηση της δομής του ομοπολυμερούς, λάβαμε το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της PLeu (Εικόνα 5.5) σε δευτεριωμένο τριφθοροξικό.

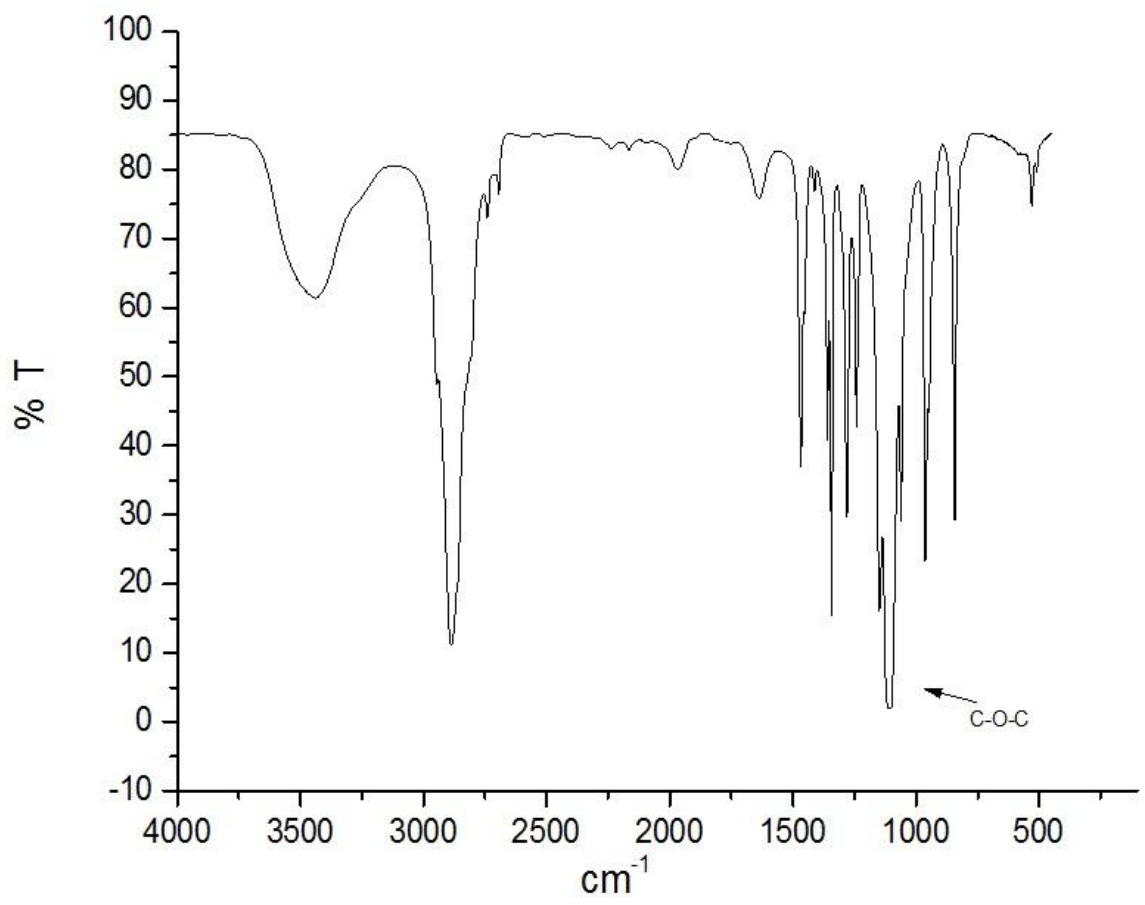


Εικόνα 5.5 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR PLeu σε  $d\text{-TFA}$

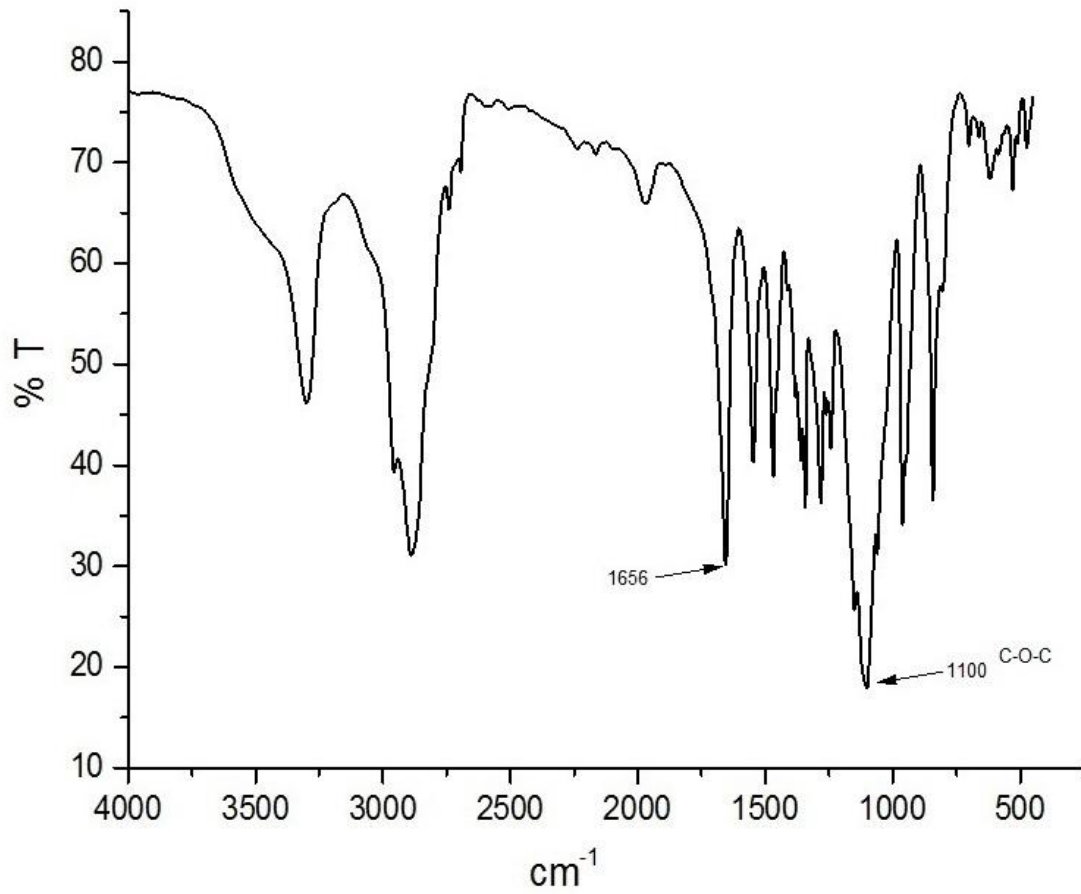
Αποτίμηση των κορυφών της ουσίας : a στα 0,9 ppm , b και c στην περιοχή μεταξύ 1,5 και 2,0 ppm , d στα 4,7 ppm. Η κορυφή του διαλύτη εμφανίζεται στα 11,5 ppm και τα υδρογόνα του απαρχητή στα 3,0 – 3,5 ppm.

### 5.2.2 PEO – PLeu

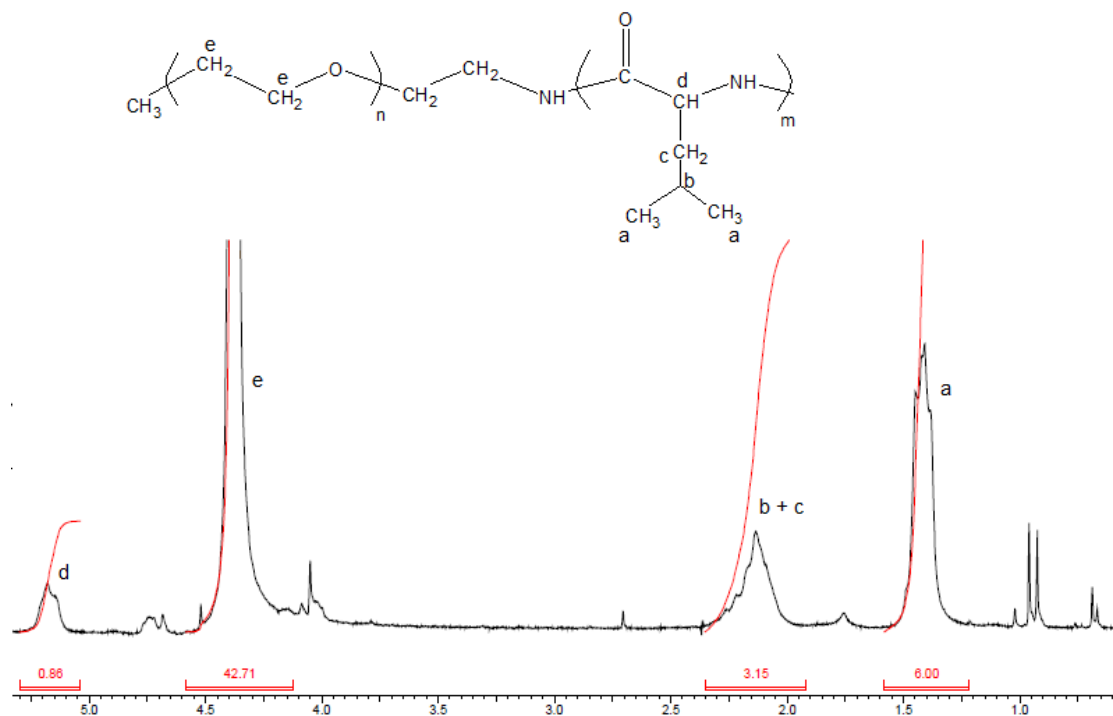
Χρησιμοποιώντας το πολυαιθυλενοξείδιο με μία ακραία αμινομάδα με μοριακό βάρος από τον κατασκευαστή 10.000, έγινε σύνθεση των δύο συμπολυμερών πολυαιθυλενοξειδίου – πολυλευκίνης. Αρχικά παρατίθεται το φάσμα IR του μακροαπαρχητή και μετά τα φάσματα IR και  $^1\text{H}$  NMR των δύο δισυσταδικών συμπολυμερών.



Εκόνα 5.6 Φάσμα IR του PEO



Εκόνα 5.7 Φάσμα IR PEO – PLeu 10.000 - 3000

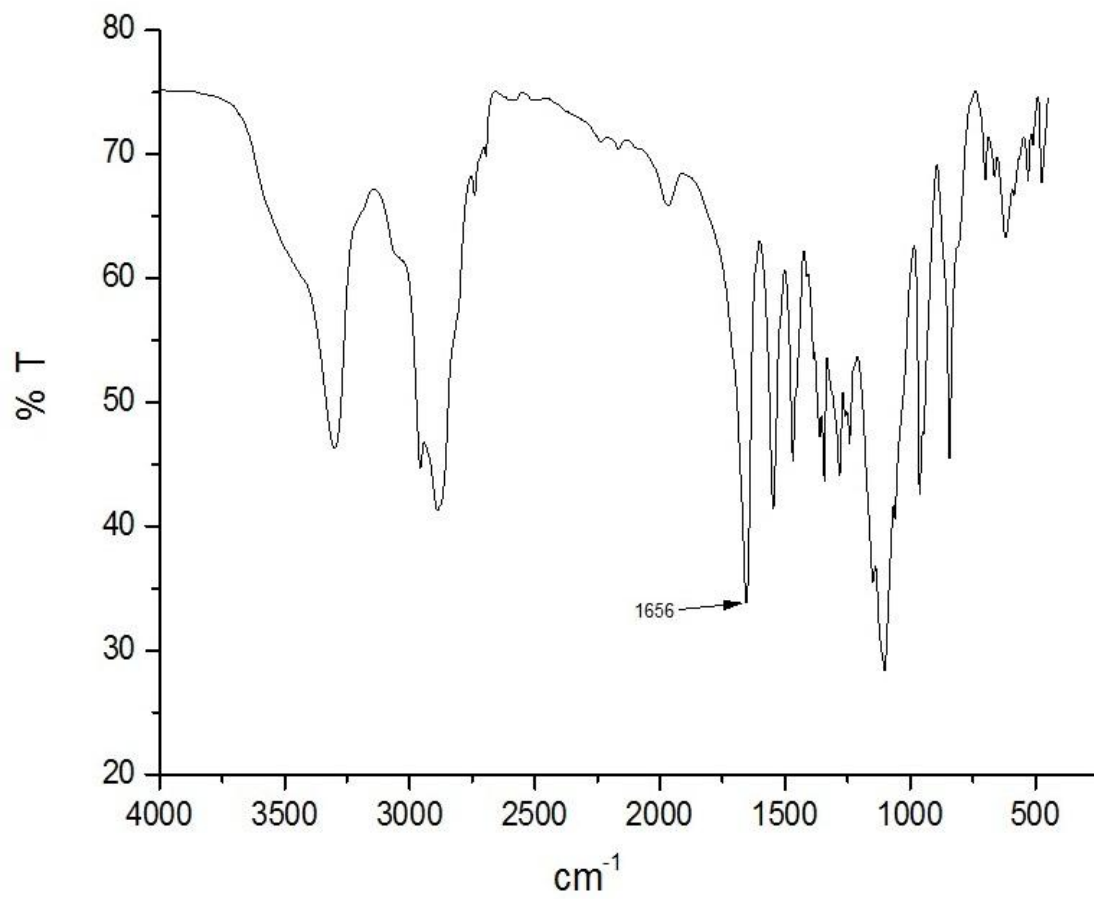


Εικόνα 5.8 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του PEO – PLeu 10.000 – 3000 σε d-TFA

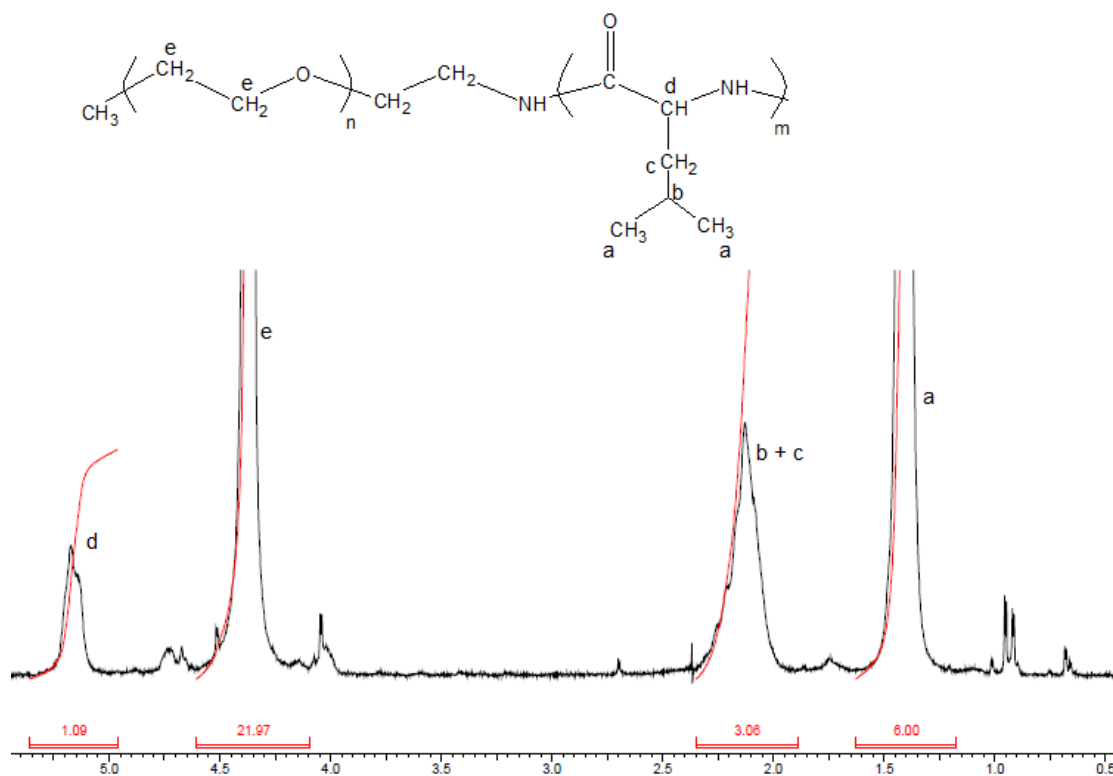
Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για το NMR και στα δύο συμπολυμερή ήταν το δευτεριωμένο τριφθοροξικό οξύ. Επειδή η συσκευή NMR δεν είχε στη μνήμη της την κορυφή αυτού του διαλύτη για να προσδιορίσει τον άξονα των  $\chi$ , όλες οι κορυφές είναι μετατοπισμένες σε υψηλότερα ppm. Έτσι αν και τα υδρογόνα του πολυαιθυλενοξειδίου παρουσιάζονται στα 3,6 ppm, εδώ στα φάσματα εμφανίζονται στα 4,4 ppm.

Η αποτίμηση των κορυφών του πρώτου συμπολυμερούς είναι: a στα 1,4 ppm, τα b και c στα 2,1 ppm, τα e στα 4,4 ppm και το d στα 5,2 ppm.





Εκόνα 5.9 Φάσμα IR PEO – PLeu 10.000 – 6000



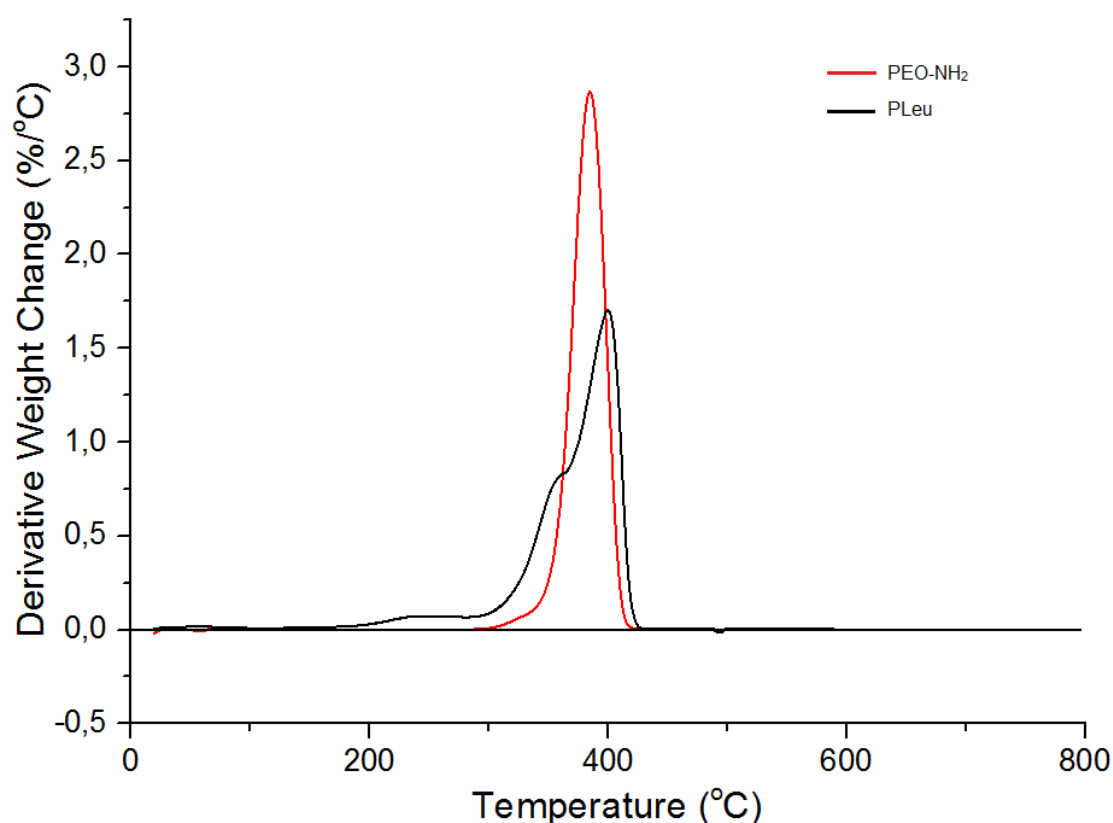
Εκόνα 5.10 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του PEO – PLeu 10.000 – 6000 σε d-TFA

Αποτίμηση κορυφών του δεύτερου συμπολυμερούς : a στα 1,4 ppm, b και c στα 2,1 ppm, e στα 4,4 ppm και d στα 5,2 ppm. Παρατηρούμε ότι και στα δύο φάσματα NMR οι κορυφές εμφανίζονται ακριβώς στην ίδια περιοχή ppm, όπως περιμέναμε αφού η μόνη τους διαφορά είναι η σύσταση.

### 5.3 Σύσταση των συμπολυμερών PEO-PLEU

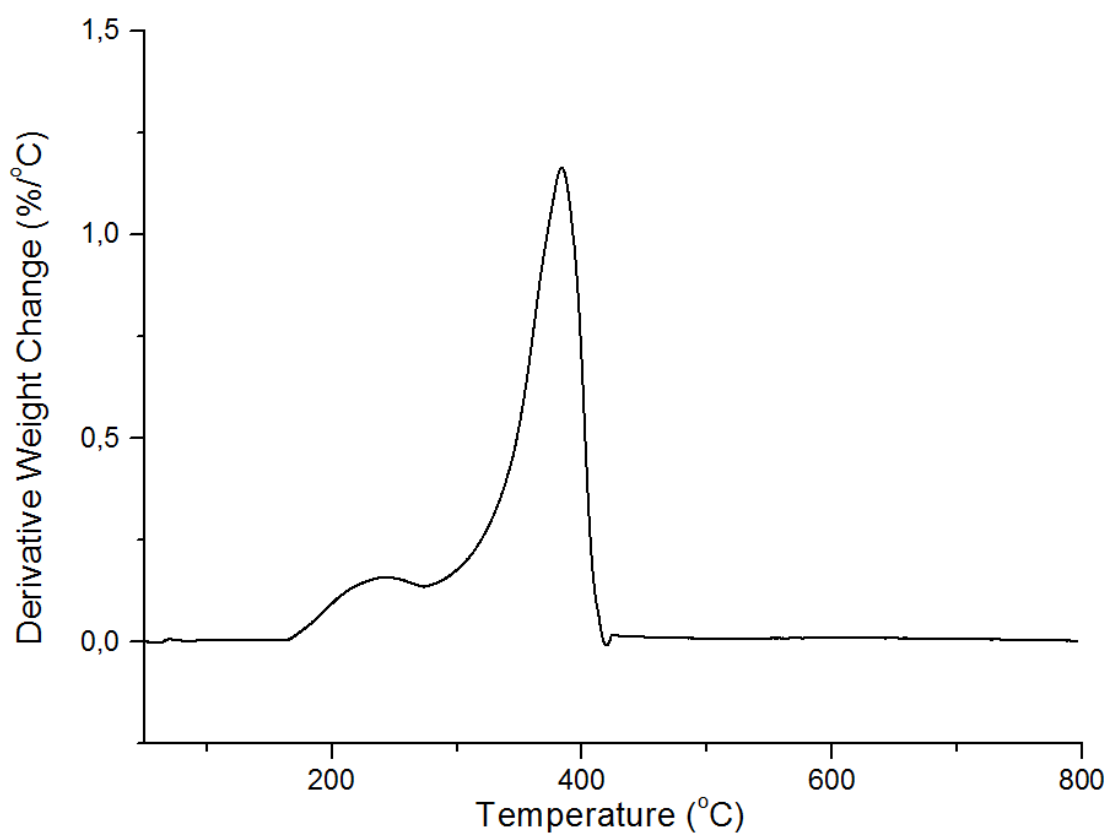
Αρχικά για την εύρεση της σύστασης των δύο συμπολυμερών πολυαιθυλενοξειδίου – πολυλευκίνης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της θερμοσταθμικής ανάλυσης (thermogravimetry, TG). Δυστυχώς, όμως, η προσπάθεια αυτή απέβη άκαρπη, διότι τα ομοπολυμερή του πολυαιθυλενοξειδίου και της πολυλευκίνης αποικοδομούνται στην ίδια περιοχή θερμοκρασιών και κατά συνέπεια δεν μπορούμε να εξάγουμε κάποιο συμπέρασμα για τη σύσταση.

Πιο κάτω παρατίθενται τα διαγράμματα στα οποία δίνεται η εξάρτηση της πρώτης παραγώγου της μεταβολής του βάρους σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για τα ομοπολυμερή και τα δύο συμπολυμερή.

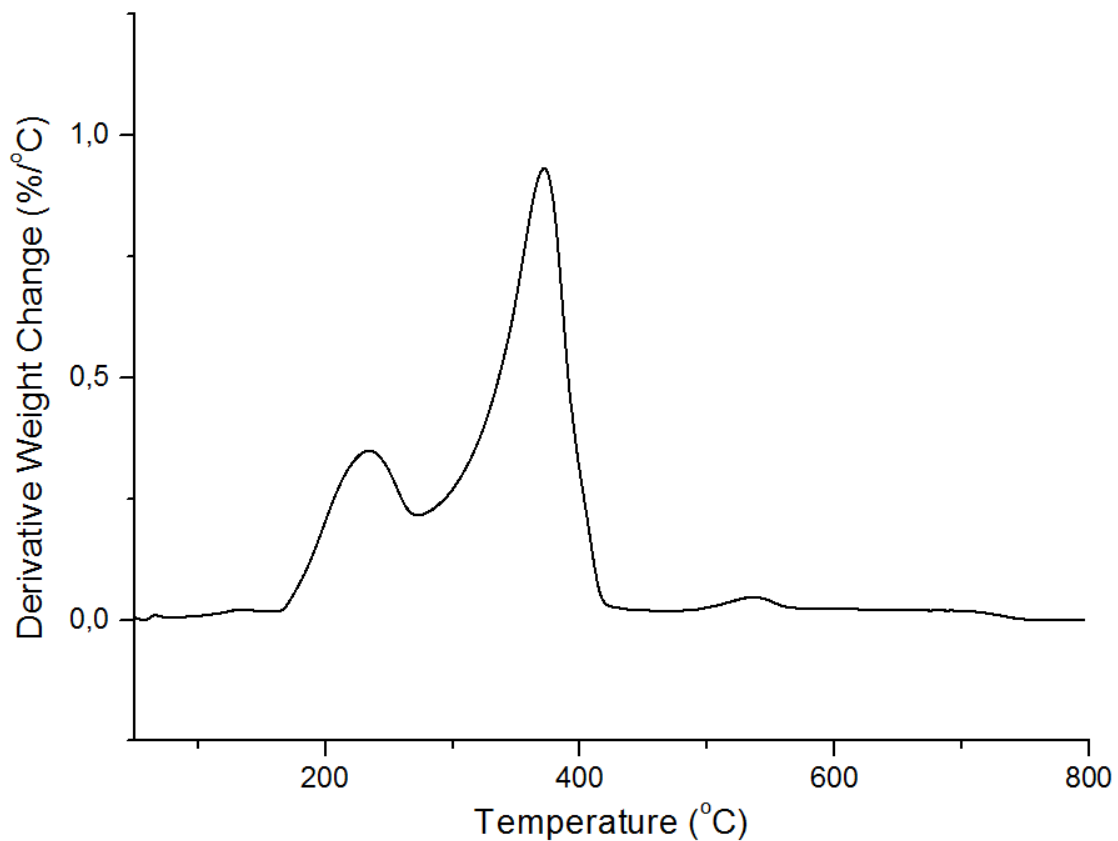


Εικόνα 5.11 Πρώτη παράγωγος μεταβολής βάρους συναρτήσει της θερμοκρασίας για τον μακροαπαρχητή PEO-NH<sub>2</sub> και το ομοπολυμερές PLeu.

Από τις καμπύλες (Εικόνα 5.11), παρατηρούμε ότι ο μηχανισμός αποικοδόμησης του PEO-NH<sub>2</sub> είναι πιο απλός από εκείνον της πολυλευκίνης. Επίσης, στο ομοπολυμερές της Leu υπάρχει μία ασθενής καμπύλη, η οποία δεν οφείλεται στην ύπαρξη υγρασίας και μπορεί να είναι και η πρώτη καμπύλη που παρατηρούμε στα διαγράμματα των συμπολυμερών (Εικόνες 5.12, 5.13), όπου εκεί δρα συνεργιστικά και γίνεται πιο έντονη.



**Εικόνα 5.12** Πρώτη παράγωγος μεταβολής βάρους συναρτήσει της θερμοκρασίας για το συμπολυμερές PEO-*b*-PLeu1



**Εικόνα 5.13** Πρώτη παράγωγος μεταβολής βάρους συναρτήσει της θερμοκρασίας για το συμπολυμερές PEO-*b*-PLeu2

Τελικά, η σύσταση των δισυσταδικών συμπολυμερών υπολογίστηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR σε διαλύτη δευτεριωμένο τριφθοροξικό οξύ. Από την ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών στα φάσματα του NMR (Εικόνα 5.8, Εικόνα 5.10) προκύπτει η αναλογία των mol των δύο διαφορετικών συσταδων και στη συνέχεια η % σύσταση κατά βάρος του δισυσταδικού συμπολυμερούς.

- Η σύσταση του συμπολυμερούς PEO – PLeu 10.000 – 3.000 υπολογίστηκε:
  - Κατά mol: 8,6 % PLeu – 91,4 % PEO
  - Κατά βάρος: 19,4 % PLeu – 80,6 % PEO

- Η σύσταση του συμπολυμερούς PEO – PLeu 10.000 – 6.000 υπολογίστηκε:
  - Κατά mol: 16,6 % PLeu – 83,4 % PEO
  - Κατά βάρος: 33,7 % PLeu – 66,3 % PEO

Θεωρητικά, περίμενα να έχω στο πρώτο συμπολυμερές 17,8 % κ.β. PLeu και στο δεύτερο 30,2 % κ.β. PLeu. Οι διαφορές αυτές βρίσκονται στα όρια των πειραματικών σφαλμάτων.

## ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Τα συμπολυμερή PEO, PLEU θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνδεση και μεταφορά φαρμάκων στον οργανισμό λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της πολυλευκίνης και της βιοσυμβατότητας του PEO. Θα ήταν λοιπόν χρήσιμο να εξεταστεί η δυνατότητα των συμπολυμερών που συνθέσαμε να σχηματίζουν ή όχι μικκύλια/ κυστίδια και οι ιδιότητες οι οποίες διέπουν τα χαρακτηριστικά αυτών των κυστιδίων. Για παράδειγμα θα μπορούσαμε να εγκλωβίσουμε τη φαρμακευτική ουσία στο εσωτερικό των κυστιδίων με σκοπό την προστασία της και την απελευθέρωση της στο εσωτερικό του κυττάρου. Κάτι τέτοιο, θα προϋποθέτει την μελέτη της συμπεριφοράς αυτών των συμπολυμερών σε διαφορετικές συνθήκες PH, συγκέντρωση ιόντων.





## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

PBLG	Πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικός εστέρας)
PLL	Πολυ(L-λυσίνη)
PZLL	Πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη)
PEO	Πολυ(αιθυλενοξειδίο)
NCA	N-καρβοξυ ανυδρίτης
ROP	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
THF	Τετραϋδροφουράνιο
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
DMA	Διμεθυλαμίνη
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
FTIR	Φασματοσκοπία υπέρυθρου ακτινοβολίας
TGA	Θερμοσταθμική ανάλυση
PLeu	Πολύ(λευκίνη)
L-Leu	L-Λευκίνη



## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. John McMurry, Οργανική Χημεία Τόμος II Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 2002
2. Synthesis of Well-Defined Polypeptide-Based Materials via the Ring-Opening Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides Nikos Hadjichristidis, Hermis Iatrou, Marinos Pitsikalis and Georgios Sakellariou Chem. Rev., 2009, 109 (11), pp 5528–5578 Publication Date (Web): August 20, 2009 (Review) DOI: 10.1021/cr900049t
3. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Τόμος I Εκδόσεις Κρήτης 2005
4. Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle, Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th Ed Silverstein 2005
5. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman, Αρχές Της Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκης 2002
6. Hirschmann, R., Schwam, H., Strachan, R. G., Schoenewaldt, E. F., Barkemeyer, H., Miller, S., Conn, J. B., Garsky, V., Veber, D. and Denkwalter, R. G., Controlled Synthesis of Peptides in Aqueous Medium. VIII. Preparation and Use of Novel  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* 1971, 93, 2746-2754.
7. Hadjichristidis, N., Iatrou, H., Pispas S. and Pitsikalis, M., Anionic Polymerization: High Vacuum Techniques, *J. Polym. Sci.* 2000, Part A, 38, 3211-3224.
8. Riddick, J. and Bunger, W., *Organic solvents: physical properties and methods of purification*, Έκδοση 3<sup>η</sup>, Τόμος 2<sup>ος</sup>, Wiley-Interscience, New York 1970.
9. Eckert, H. and Forster, B., Triphosgene, A Crystalline Phosgene Substitute, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1987, 26, 894-895.

10. Daly, W.; Poche, D., The Preparation of N-Carboxyanhydrides of  $\alpha$ -Amino Acids Using Bis(trichloromethyl)carbonate, *Tetr. Lett.* 1988, 29, 5859-5862.
11. Cotarca, L., Delogu, P., Nardelli, A. and Sunjic, V., Bis(trichloromethyl) Carbonate in Organic Synthesis, *Synthesis* 1996, 557-576.
12. Wilder, R. and Mobashery, S., The Use of Triphosgene in Preparation of N-Carboxy  $\alpha$ -Amino Acid Anhydrides, *J. Org. Chem* 1992, 57, 2755-2756.
13. Poche, D., Moore, M. J. and Bowles, J. L., An Unconventional Method for Purifying the N-Carboxyanhydride Derivatives of  $\gamma$ -Alkyl-L-Glutamates, *Synth. Comm.* 1999, 29, 843-854.
14. Gkikas, M., Iatrou, H., Thomaidis, N. S., Alexandridis, P. and Hadjichristidis, N., Well-Defined Homopolypeptides, Copolypeptides, and Hybrids of Poly(L-proline), *Biomacromolecules*, 2011, 12, 2396.
15. Woodward, R. B. and Schramm, C. H., Synthesis of protein analogs, *J. Am. Chem. Soc.* 1947, 69, 1551-1552.
16. Katchalski, E., Grossfeld, I. and Frankel, M., Poly-Lysine, *J. Am. Chem. Soc.* 1947, 69, 2564-2565.
17. Papadopoulos, P., Floudas, G., Schnell, I., Aliferis, T., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., Nanodomain-Induced Chain Folding in Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)-*b*-Polyglycine Diblock Copolymers, *Biomacromolecules* 2005, 6, 2352-2361.
18. Hanski, S., Houbenov, N., Ruokolainen, J., Chondronicola, D., Iatrou, H., Hadjichristidis, N. and Ikkala, O. Hierarchical Ionic Self-Assembly of Rod-Comb Block Copolypeptide-Surfactant Complexes, *Biomacromolecules* 2006, 7, 3379-3384.
19. Gitsas, A., Floudas, G., Mondeshki, M., Butt, H. J., Spiess, H. W., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., Effect of chain topology on the self-organization and dynamics of block copolypeptides: from diblock copolymers to stars
20. Iatrou, H., Frielinghaus, H., Hanski, S., Ferderigos, N., Ruokolainen, J., Ikkala, O., Richter, D., Mays, J. and Hadjichristidis, N., Architecturally Induced

Multiresponsive Vesicles from Well-Defined Polypeptides: Formation of Gene Vehicles, *Biomacromolecules* 2007, 8, 2173-2381.

21. 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.

22. 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.

23. Karatzas, A., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Inoue, K., Sugiyama, K. and Hirao, A., Complex Macromolecular Chimeras, *Biomacromolecules* 2008, 9, 2072-2080.

24. Fetters, L., *Encyclopedia of Polymer Science Engineering*, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Τόμος 10<sup>ος</sup>, Wiley-Interscience, New York 1987, pp.19-25

25. Quirk, R. P. and Lee, B., Experimental Criteria for Living Polymerizations *Polymer international*, 1992, 27, 359-367.

26. Τζουγκράκη, Χ. και Κόκοτος, Γ., *Θέματα Βιοοργανικής Χημείας*, Έκδοση 4<sup>η</sup>, Μέρος Α, Αθήνα 2003, pp. 20-73.

27. Merrifield, R., Automated Synthesis of Peptides, *Science* 1965, 150, 178-185.

28. Merrifield, R. and Stewart, J., Automated Peptide Synthesis, *Nature* 1966, 207, 522-523.

29. Dawson, P., Muir, T., Clark-Lewis, I. H. and Kent, S., Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, *Science* 1994, 266, 776-779.

30. (a) 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, 2904-2909. (b) Cohen, S., Chang, A., Boyer, H. and Helling, R., Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids in Vitro, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1973, 70,

- 3240-3244. (c) Yu, S. M., Conticello, V. P., Zhang, G., Kayser, C., Fournier, M. J., Mason, T. L. and Tirrell, D. A., Smectic Ordering in Solutions and Films of a Rod-Like Polymer Owing to Monodispersity of Chain Length, *Nature* 1997, 389, 167-170. (d) Tirrell, D. A., Fournier, M. and Mason, T., Genetic Engineering of Polymeric Materials, *MRS Bull.* 1991, 16, 23-28. (e) Zhang, K., Diehl, M. R. and Tirrell, D. A., Artificial Polypeptide Scaffold for Protein Immobilization, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 10136-10137.
31. 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.
32. Kricheldorf, H. R.,  *$\alpha$ -Aminoacid N-carboxyanhydrides and Related Materials*, Έκδοση 1<sup>η</sup>, Springer-Verlag, New York 1987.
33. Leuchs, H., Ueber die Glycin-Carbonsäure, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1906, 39, 857-861.
34. Leuchs, H. and Geiger, W., Über die Anhydride von  $\alpha$ -Amino-N-Carbonsäuren und die von  $\alpha$ -Aminosäuren, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1908, 41, 1721-1726.
35. Wessely, F., *Z. Physiol. Chem.* 1925, 146, 72.
36. Wessely, F. and Sigmund, F., *Z. Physiol. Chem.* 1926, 159, 102.
37. Wessely, F., Riedl, K. and Tuppy, K., Untersuchungen über  $\alpha$ -Amino-N-Carbonsäureanhydride, *Monatsh. Chem.* 1950, 81, 861-872.
38. Ben-Ishai, D. and Katchalski, E., Synthesis of N-Carboxy- $\alpha$ -amino Acid Anhydrides from N-Carboxy- $\alpha$ -amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide, *J. Am. Chem. Soc.* 1952, 74, 3688-3689.
39. Green, M. and Stahmann, M. A., Synthesis and Enzymatic Hydrolysis of Glutamic Acid Polypeptides, *J. Biol. Chem.* 1952, 197, 771-782.
40. Katchalski, E., Grossfeld, J. and Frankel, M., Poly-condensation of  $\alpha$ -Amino Acid Derivatives. III. Poly-lysine, *J. Am. Chem. Soc.* 1948, 70, 2094-2101.

41. Katchalski, E. and Spitnik, P., Poly-arginine, *Nature* 1949, 164, 1092-1093.
42. Fuchs, F., Über N-Carbonsäure-Anhydride, *Chem. Ber.* 1922, 55, 2943.
43. Brown, C. J., Coleman, D. and Farthing, A.C., Further Studies in Synthetic Polypeptides, *Nature* 1949, 163, 834-835.
44. Farthing, A. C. And Reynolds, R. J. W., Anhydro-N-Carboxy-DL-β-Phenylalanine, *Nature* 1950, 165, 647-647.
45. Farthing, A. C., Synthetic polypeptides. Part I. Synthesis of Oxazolid-2:5-diones and a New Reaction of Glycine, *J. Chem. Soc.* 1950, 3213-3217.
46. Coleman, D. And Farthing, 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, 3218-3222.
47. Levy, A. L., Anhydro-N-Carboxy-dl-beta-Phenylalanine, *Nature* 1950, 165, 152-153.
48. Kricheldorf, H. R., *Models of Biopolymers by Ring-Opening Polymerization*, Έκδοση 1<sup>η</sup>, CRC Press, Boca Raton 1990, pp. 8 & 11.
49. Iwakura, Y., Uno, K. and Kang, S., The Synthesis and Reactions of 2-Isocyanatoacyl Chlorides, *J. Org. Chem.* 1965, 30, 1158-1161.
50. Goodman, M. and Hutchison, J. The Mechanisms of Polymerization of N-Unsubstituted N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 3627-3630.
51. Kricheldorf, H. R., Mechanism of the NCA-Polymerization, 5. Catalysis by Secondary Amines, *Macromol. Chemie.* 1977, 178, 1959-1970.
52. Sekiguchi, H. and Froyer, G., Anionic Polymerization Mechanism of N-Carboxy-α-Amino Acid Anhydrides, *J. Polym. Sci.* 1975, 52, 157-171.
53. Sekiguchi, H., Mechanism of N-Carboxy-α-Amino Acid Anhydride (NCA) Polymerization, *Pure. Appl. Chem.* 1981, 53, 1689-1714.
54. Waley, S. G. and Watson, J., The Kinetics of the Polymerization of Sarcosine Carbonic Anhydride, *Proc. R. Soc.* 1949, 199, 499-517.

55. Sela, M. and Berger, A., The Terminal Groups of Poly- $\alpha$ -amino Acids, *J. Am. Chem. Soc.* 1955, *77*, 1893-1898.
56. Goodman, M. and Hutchison, J., Propagation Mechanism in Strong Base Initiated Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* 1965, *87*, 3524-3525.
57. 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.
58. Thuning, D., Semen, J. and Elias, H. G., Carbon dioxide influence on NCA polymerizations, *Macromol. Chem.* 1977, *178*, 603-607.
59. Bailey, J. L., A New Peptide Synthesis, *Nature* 1949, *164*, 889-899.
60. Ballard, D. G., Bamford, C. H. and Weymouth, F. J., New Observations on the Chemistry of N-Carboxy- $\alpha$ -Amino-Acid Anhydrides, *Nature* 1954, *174*, 173-175.
61. Ballard, D. G. and Bamford, C. H., The Polymerization of  $\alpha$ -Benzyl-LI-Glutamate N-Carboxy Anhydride, *J. Am. Chem. Soc.* 1957, *79*, 2336-2338.
62. Ballard, D. G., Bamford, C. H. and Elliot, A., Synthetic Polypeptides, *Macromol. Chem.* 1960, *35*, 222-238.
63. Goodman, M. and Hutchison, U., The Mechanisms of Polymerization of N-Unsubstituted N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* 1966, *88*, 3627-3630.
64. Ballard, D. G., Bamford, C. H. and Weymouth, F. J., Studies in Polymerization. VIII. Reactions of N-Carboxy- $\alpha$ -Amino Acid Anhydrides Initiated by Metal Cations, *Proc. R. Soc.* 1955, *227*, 155-183.
65. Kopple, K. D., The Reaction of Amines with Amino Acid N-Carboxy Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* 1957, *79*, 662-664.
66. Kopple, K. D., Some Reactions of Amino Acid N-Carboxy Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* 1957, *79*, 6442-6446.



67. Seeney, C. and Harwood J., Carbamate Ions as Propagating Species in N-Carboxy Anhydride Polymerizations, *J. Macromol. Sci. Chem.* 1975, 9, 779-795.
68. Kricheldorf, H. R., Mechanism of the NCA-Polymerization, 5. Catalysis by Secondary Amines, *Macromol. Chem.* 1977, 178, 1959-1970.
69. 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.
70. 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.
71. Kukula, H., Schlaad, H., Falkenhagen, J., Kruger, R.-P., Improved Synthesis and Characterization of  $\omega$ -Primary Amino-Functional Polystyrenes and Polydienes, *Macromolecules* 2002, 35, 7157-7160.
72. Dimitrov, I. and Schlaad, H., Synthesis of Nearly Monodisperse Polystyrene-Polypeptide Block Copolymers via Polymerisation of N-Carboxyanhydrides, *Chem. Commun.* 2003, 23, 2944-2945.

