



**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 ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΙΣΤΙΔΙΝΗΣ ΜΕ  
γ-BENZΥΛΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΣΤΟ  
pKa ΤΗΣ ΠΟΛΥΙΣΤΙΔΙΝΗΣ**

**ΣΚΟΥΛΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΜΑΡΤΙΟΣ 2014**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Σύνθεση συμπολυμερών πολυαθυλενοξειδίου και ιστιδίνης με γ-βενζυλεστέρα του γλουταμικού οξέος και επίδραση του εστέρα στο  $pK_a$  της πολυιστιδίνης

**ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΣΚΟΥΛΑΣ**

**A.M.:** 121004

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

Ιατρού Ερμόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ιατρού Ερμόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πισικάλης Μαρίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 09/04/2014



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η σύνθεση συμπολυμερών με βάση την ιστιδίνη που θα χρησιμοποιηθούν για την εκλεκτική και ελεγχόμενη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων. Παρουσιάζεται η πρότυπη μέθοδος για την σύνθεση του Nim-Trt-L-Histidine NCA με την τρίτυλο προστατευτική ομάδα που δίνει τα πλεονεκτήματα της εκλεκτικής και εύκολης αποπροστασίας και της μη ρακεμείωσης. Επίσης πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA. Η επιτυχής σύνθεση των μονομερών επαληθεύτηκε με τεχνικές IR και NMR. Πραγματοποιήθηκε η επιτυχής σύνθεση ομοπολυμερούς της ιστιδίνης καθώς και συμπολυμερούς της με m-PEO αλλά και τυχαίων δισυσταδικών συμπολυμερών με προσθήκη PBLG σε ποσοστό 10%, 20% και 40% κατά mol ως προς την ιστιδίνη στη δεύτερη συστάδα ξεκινώντας με m-PEO-NH<sub>2</sub> ως μακροαπαρχητή στην πρώτη συστάδα. Για την πραγματοποίηση των πολυμερισμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ROP των NCA των αντίστοιχων αμινοξέων σε συνδυασμό με την χρήση των τεχνικών υψηλού κενού. Όλα τα πολυμερή χαρακτηρίστηκαν με τις τεχνικές του GPC, NMR και IR.

Τα πολυμερή έχουν την ικανότητα να αυτοοργανώνονται και να σχηματίζουν σε νανοκλίμακα και σε διαλύτη νερό μικκυλιακές δομές και κυστίδια. Εξαιτίας αυτής της αυτοοργάνωσης μπορούν να μεταφέρουν φάρμακα. Αυτή η ικανότητα επιβεβαιώθηκε με περάματα DLS. Αξιοσημείωτη είναι η ικανότητα τους να αποκρίνονται σε μεταβολές του pH, ιδιότητα στην οποία στηρίζεται η εκλεκτική απελευθέρωση του φαρμάκου. Το  $pK_a$  του ομοπολυμερούς της ιστιδίνης βρέθηκε στο 6,65 με 6,7 με φασματοφωτομετρικές τιτλοδοτήσεις. Παράλληλα με κατά βάρος τιτλοδοτήσεις βρέθηκε ότι έχουμε αύξηση της ισχύος της οξύτητας των συμπολυμερών με αύξηση του ποσοστού του PBLG. Πραγματοποιήθηκε και μελέτη της δευτεροταγούς δομής της πολυιστιδίνης με κυκλικό διχρωϊσμό όπου και βρέθηκαν οι διαφορετικές διαμορφώσεις που υιοθετεί το πολυμερές σε μεταβολή του pH και της θερμοκρασίας.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Πολυμερή

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** πολυπεπτίδια, N-καβοξυ ανυδρίτες, αυτοοργάνωση, μεταφορά φαρμάκων, βιοεφαρμογές

## ABSTRACT

The purpose of this thesis is the synthesis of diblocks containing L-Histidine, which will be used for the selective and controlled delivery of anticancer drugs. It is presented a novel method for the synthesis of Nim-Trt-L-Histidine NCA with Trityl protecting group, which gives the advantages of selective and easy deprotection and no racemization. Also the synthesis of  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA took place. The successful synthesis of the monomers was confirmed with IR and NMR techniques. The successful synthesis of the poly(L-histidine), of a diblock with m-PEO and co-diblocks with addition of PBLG in rates of 10%, 20% and 40% in relation with histidine in the second block of the polymers took place beginning with m-PEO-NH<sub>2</sub> as macroinitiator in the first block. The ROP method for the polymerization of the NCAs of the aminoacids took place in combination with the use of high vacuum techniques. All polymers were characterized with GPC, NMR and IR techniques.

The polymers have the ability of self-assembly by shaping in nanoscale micelles and clusters in water as solvent. Because of the self-assembly, they can deliver drugs. This ability was confirmed with DLS. These polypeptides can respond in pH change, an ability in which the selective release of the drug is based on. The pKa of poly(L-histidine) was found between 6.65 and 6.7 with UV titrations. Moreover titrations by weight have shown that we have increase of the Ka of the diblocks, when we have increase in the rate of the PBLG. A study of the secondary structure of the poly(L-histidine) took place by using circular dichroism. The different molds of the polymer were found by changing pH and temperature.

**SUBJECT AREA:** Polymers

**KEYWORDS:** polypeptides, NCAs, self-assembly, drug delivery, bioapplications







**Στους γονείς μου, τον αδερφό μου,  
την θεία μου και την γιαγιά μου**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή μου Ερμόλαο Ιατρού, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο Εργαστήριο Πολυμερών και έτσι να έρθω σε άμεση επαφή με το αντικείμενο της Μακρομοριακής Χημείας, που μου προκαλεί έντονο ενδιαφέρον. Θέλω να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που με περιέβαλε, την καθοδήγηση του, τις συμβουλές του, τον συντονισμό και την επιμέλεια της έρευνας αλλά και τις γνώσεις που μου προσέφερε καθόλη την διάρκεια της παρούσας έρευνας. Ακόμα θέλω να τον ευχαριστήσω για τις διδαχές του και την επιμονή, υπομονή και την εργατικότητα του, αρετές που συνάδουν με το ήθος που είναι απαραίτητο στον χώρο της Επιστήμης και της Έρευνας. Κατά την διάρκεια όλου αυτού του πονήματος είχαμε μια άριστη συνεργασία μέσα από την οποία συνειδητοποίησα ότι εκτός από λαμπρός επιστήμονας, είναι και ένας ακαίρεος άνθρωπος.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τον Μεταδιδάκτορα Παναγιώτη Μπιλάλη για την συνεργασία μας, την πολύτιμη βοήθεια, τις συμβουλές του, την καθοδήγηση του, την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη που μου προσέφερε σε όλη την διάρκεια της εργασίας μου. Με όλες τις συζητήσεις που είχαμε με βοήθησε να καταλάβω καλύτερα και σε μεγαλύτερο βάθος το αντικείμενο της Επιστήμης μας.

Θέλω να ευχαριστήσω και τον υποψήφιο Διδάκτορα Δημήτρη Μαυρογιώργη για την δική του βοήθεια και υποστήριξη και τις γνώσεις που μου προσέφερε στο αντικείμενο μας, εργαστηριακές και ερευνητικές, ιδιαίτερα κατά τα πρώτα βήματα μου στο Εργαστήριο Πολυμερών.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω και τους Καθηγητές μου, τον κύριο Μαρίνο Πιτσικάλη και τον κύριο Γεώργιο Σακελλαρίου για τις γνώσεις που μου προσέφεραν και για την συνολική υποστήριξη και το έργο τους στο Εργαστήριο μας.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>23</b>
<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>24</b>
1.1 Σκοπός της εργασίας.....	25
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>27</b>
2.1 Γενικά για τις πρωτεΐνες και τα αμινοξέα .....	27
2.2 Πεπτιδική Σύνθεση .....	32
2.2.1 Μέθοδος του δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου.....	32
2.2.2 Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων.....	33
2.2.3 Προστατευτικές ομάδες.....	35
2.2.4 Τεχνική στερεάς φάσης κατά Merrifield.....	37
2.2.5 Σύνθεση με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA.....	38
2.2.6 Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCA).....	39
2.3 Μακρομοριακή Σύνθεση Πολυπεπτιδίων.....	40
2.3.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (R.O.P).....	41
2.3.1.1 Κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού.....	42
2.3.1.2 Μηχανισμός του Blout.....	43
2.3.1.3 Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς.....	45
2.3.2 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με σύμπλοκα Στοιχείων Μετάπτωσης.....	46
2.3.3 Πολυμερισμός με υδροχλωρικές αμίνες.....	47
2.3.4 Πολυμερισμός με τριμεθυλοπυριτικές αμίνες.....	48
2.3.5 Μακρομοριακή Σύνθεση με πρωτοταγείς Αμίνες και Τεχνικές Υψηλού Κενού.....	50
2.3.6 «Ζωντανός» Πολυμερισμός.....	51
2.4 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Ιστιδίνη .....	51
2.5 Τεχνολογία Στοχευμένης Μεταφοράς Φαρμάκων (Targeted "Smart" Drug Delivery).....	60

2.6	Μοριακός Χαρακτηρισμός.....	61
2.6.1	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών.....	61
2.6.2	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός.....	63
2.6.3	Φασματοσκοπία Υπερύθρου.....	65
2.6.4	Δυναμική Σκέδαση Φωτός.....	66
2.6.5	Κυκλικός Διχρωϊσμός.....	70
2.6.6	Φασματοσκοπία Μοριακής Απορρόφησης στο Ορατό.....	72
<b>3.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>73</b>
3.1	Τεχνική υψηλού κενού.....	73
3.2	Καθαρισμός Διαλυτών .....	76
3.3	Καθαρισμός Απαραχητή και Αντιδραστηρίων.....	77
3.4	Πλεονεκτήματα της Τρίτυλο Προστατευτικής Ομάδας της Ιστιδίνης.....	78
3.5	Σύνθεση $N_{im}$ -Trt-L-Histidine NCA.....	80
3.6	Σύνθεση $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA.....	88
3.7	Σύνθεση πολύ-L-ιστιδίνης.....	91
3.8	Σύνθεση poly(m-PEO)-b-poly(L-His).....	98
3.9	Σύνθεση poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG.....	103
3.10	Σύνθεση poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG.....	108
3.11	Σύνθεση poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG.....	111
<b>4.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>117</b>
4.1	Μελέτη της αυτοοργάνωσης μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.....	117
4.2	Φασματοφωτομετρικές Τιτλοδοτήσεις της πολύ-L-ιστιδίνης·HCl.....	123
4.3	Κατά βάρος Τιτλοδοτήσεις για εύρεση μεταβολής οξύτητας.....	126
4.4	Επίδραση του PBLG στην ισχύ οξύτητας των συμπολυμερών.....	129
4.5	Μελέτη της δευτεροταγούς δομής της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε μεταβολή του pH και της θερμοκρασίας.....	132
4.6	Συμπεράσματα – Μελλοντικοί Στόχοι.....	137

5. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	139
6. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....	140
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι ΟΡΓΑΝΑ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ.....	142
8. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	144

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Χημική και στερεοχημική φύση των α-αμινοξέων. ....	28
Σχήμα 2: Ο ιοντισμός της ιστιδίνης.....	29
Σχήμα 3: Το γλουταμικό οξύ.....	30
Σχήμα 4: Πεπτιδικός δεσμός. Η σύνδεση δυο αμινοξέων συνοδεύεται από την απώλεια ενός μορίου νερού.....	30
Σχήμα 5: α-έλικα και β-φύλλο.....	31
Σχήμα 6: Σύνθεση διπεπτιδίου με την μέθοδο DCC.....	32
Σχήμα 7: Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων.....	33
Σχήμα 8: Προστατευτικές ομάδες Z, t-Boc και F-moc.....	34
Σχήμα 9: Προστατευτικές ομάδες μεθυλεστέρα και βενζυλεστέρα.....	35
Σχήμα 10: Στάδια σύνθεσης με την τεχνική Merrifield.....	36
Σχήμα 11: Μέθοδος του Leuchs για τον σχηματισμό των N-Καρβοξυανυδριτών, όπου X=Cl ή Br.....	38
Σχήμα 12: Σχηματισμός N-καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs-Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος.....	39
Σχήμα 13: Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου των NCA.....	40
Σχήμα 14: Έναρξη και Διάδοση σύμφωνα με τον κανονικό μηχανισμό πολυμερισμού...41	
Σχήμα 15: Μηχανισμός του Blout .....	43
Σχήμα 16:Στάδιο προέναρξης και έναρξης στον μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς.....	44
Σχήμα 17: Στάδιο διάδοσης στον μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς.....	44
Σχήμα 18: Μηχανισμός για την σύνθεση πολυπεπτιδίων με σύμπλοκα μετάπτωσης....	46
Σχήμα 19: Πολυμερισμός με υδροχλωρικές αμίνες.....	47
Σχήμα 20: Πολυμερισμός με τριμεθυλοπυριτικές αμίνες.....	48
Σχήμα 21: Σύνθεση poly-L-histidine κατά τον Katchalski.....	52
Σχήμα 22: Πορεία για την σύνθεση του NCA ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP....	53
Σχήμα 23: Πολυμερισμός του NCA ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP.....	54

Σχήμα 24: Σύνθεση πολύ(L-γαλακτικό οξύ)-b-πολυαιθυλενοξειδίου-b-πολύ(L-ιστιδίνη)...	55
Σχήμα 25: Σύνθεση πολύ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)-b-πολύ(L-ιστιδίνη).....	56
Σχήμα 26: Πολυμερισμός ιστιδίνης σε συνδυασμό με χημεία click.....	57
Σχήμα 27: Πολυμερισμός ιστιδίνης με σχηματισμό διακλαδισμένων πολυμερών .....	58
Σχήμα 28: Συμπολυμερισμός ιστιδίνης με συνδυασμό πολυμερισμών RAFT και ROP...	59
Σχήμα 29: Συμπολυμερισμός ιστιδίνης με υαλουρονικό οξύ.....	59
Σχήμα 30: Γραμμή υψηλού κενού.....	74
Σχήμα 31: Αντλία Διαχύσεως Υδραργύρου.....	75
Σχήμα 32: Συσκευή αραίωσης απαρχητή.....	78
Σχήμα 33: Αντίδραση σύνθεσης Nim-Trt-L-Histidine NCA.....	80
Σχήμα 34: Αντίδραση σύνθεσης γ-Bz-L-Glutamate NCA.....	88
Σχήμα 35: Ανακρυσταλλώσεις υπό αδρανή ατμόσφαιρα.....	90
Σχήμα 36: Συσκευή πολυμερισμού ομοπολυμερούς ιστιδίνης.....	92





## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Φάσμα IR της Boc-L-Histidine-(Trt)-OH.....	81
Εικόνα 2: Συσκευές κατά την αντίδραση για την σύνθεση Nim-Trt-L-Histidine NCA.....	82
Εικόνα 3: Φάσμα IR της Nim-Trt-L-Histidine NCA 2 ώρες μετά την αντίδραση.....	82
Εικόνα 4: Φάσμα IR της Nim-Trt-L-Histidine NCA.....	86
Εικόνα 5: Φάσμα NMR της Nim-Trt-L-Histidine NCA.....	87
Εικόνα 6: Συσκευές κατά την αντίδραση για την σύνθεση γ-Bz-L-Glutamate NCA.....	89
Εικόνα 7: Φάσμα IR της γ-Bz-L-Glutamate NCA.....	91
Εικόνα 8: Φάσμα IR της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl πριν την αποπροστασία.....	96
Εικόνα 9: Φάσμα IR της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl μετά την αποπροστασία.....	96
Εικόνα 10: Φάσμα NMR της πολύ-L-ιστιδίνης·HCl.....	97
Εικόνα 11: Χρωματογράφημα GPC σε νερό της πολύ-L-ιστιδίνης·HCl.....	98
Εικόνα 12: Συσκευή συμπολυμερισμού.....	98
Εικόνα 13: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) μετά τον πολυμερισμό.....	101
Εικόνα 14: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) μετά την αποπροστασία.....	102
Εικόνα 15: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-poly(L-His).....	103
Εικόνα 16: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG μετά το πολυμερισμό.....	104
Εικόνα 17: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG μετά την αποπροστασία.....	105
Εικόνα 18: Φάσμα NMR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG.....	106
Εικόνα 19: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG.....	107
Εικόνα 20: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG μετά το πολυμερισμό.....	108
Εικόνα 21: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG μετά την αποπροστασία.....	109
Εικόνα 22: Φάσμα NMR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG.....	110

Εικόνα 23: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG.....	111
Εικόνα 24: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG μετά το πολυμερισμό.....	112
Εικόνα 25: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG μετά την αποπροστασία.....	113
Εικόνα 26: Φάσμα NMR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG.....	114
Εικόνα 27: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG.....	115
Εικόνα 28: Χρωματογράφημα GPC σε DMF του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG.....	116
Εικόνα 29: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) σε pH 7,4.....	119
Εικόνα 30: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) σε pH 5.....	119
Εικόνα 31: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG σε pH 7,4.....	120
Εικόνα 32: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG σε pH 5.....	120
Εικόνα 33: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG σε pH 7,4.....	121
Εικόνα 34: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG σε pH 5.....	121
Εικόνα 35: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG σε pH 7,4.....	122
Εικόνα 36: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG σε pH 5.....	122
Εικόνα 37: Διάγραμμα φασματομετρικής τιτλοδότησης για την πολύ-L-ιστιδίνη·HCl.....	123
Εικόνα 38: Καμπύλη τιτλοδότησης για την πολύ-L-ιστιδίνη·HCl.....	126
Εικόνα 39: Καμπύλη τιτλοδότησης για το poly(m-PEO)-b-poly(L-His).....	127
Εικόνα 40: Καμπύλη τιτλοδότησης για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG.....	127

Εικόνα 41: Καμπύλη τιτλοδότησης για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG.....	128
Εικόνα 42: Καμπύλη τιτλοδότησης για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG.....	128
Εικόνα 43: Συγκριτική μελέτη της επίδρασης του ποσοστού του PBLG στην οξύτητα των συμπολυμερών.....	129
Εικόνα 44: Διάγραμμα της μεταβολής του $pK_a$ με το ποσοστό του PBLG στην δεύτερη συστάδα.....	131
Εικόνα 45: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε τιμές pH 3,25 3,30 3,97 και 4,06.....	133
Εικόνα 46: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε τιμές pH 4,06 4,46 5,13 και 5,56.....	133
Εικόνα 47: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε τιμές pH 5,56 6,09 και 6,38. ....	134
Εικόνα 48: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε όλες τις τιμές pH 135	
Εικόνα 49: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε pH 6,38 και σε θερμοκρασίες 25°C 37°C και 50°C.....	136



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Αποτελέσματα DLS.....	1188
Πίνακας 2: Αποτελέσματα φασματομετρικής τιτλοδότησης της πολύ-L-ιστιδίνης·HCl...	124
Πίνακας 3: Ποσοστό PBLG στα συμπολυμερή και αντίστοιχο pH στο ισοδύναμο σημείο.....	130
Πίνακας 4: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	135
Πίνακας 5: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	140

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας (τομέας Πολυμερών) του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η εργασία αυτή έχει ως σκοπό τον εγκλωβισμό αντικαρκινικών φαρμάκων σε πολυτεππίδια. Ελπίζω η πρόοδος που συντελέστηκε, τα συμπεράσματα που εξήχθησαν και τα αποτελέσματα που καταλήξαμε να αποτελέσουν την βάση για περαιτέρω χρήσιμες έρευνες και μελέτες.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη της Επιστήμης των Πολυμερών κατά τον προηγούμενο αιώνα υπήρξε ραγδαία. Από την υιοθέτηση της έννοιας του μακρομορίου μέχρι και τις σύγχρονες εξελίξεις και εφαρμογές των πολυμερών σε σχεδόν όλους τους τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας η εποχή μας μπορεί να χαρακτηριστεί ως *η εποχή των πολυμερικών υλικών*.

Τα πολυμερή έδωσαν πρακτικές λύσεις σε πολλά προβλήματα της επιστήμης και της βιομηχανίας ενώ έφεραν και επανάσταση σε πολλούς τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας και ζωής. Καθημερινά ερχόμαστε σε επαφή με τα αποτελέσματα της προόδου στον τομέα των πολυμερών. Χρώματα, πλαστικά, υφάνσιμες ύλες, φιλμ, υλικά συσκευασίας, κόλλες, λάστιχα αυτοκινήτων, σωλήνες, κινητά τηλέφωνα και υπολογιστές είναι μερικά από τα προϊόντα που όλοι μας χρησιμοποιούμε καθημερινά και αποτελούνται από πολυμερή. Παράλληλα τα πολυμερή χρησιμοποιούνται σε εξελίξεις και εφαρμογές σε τομείς υψηλής τεχνολογίας όπως η διαστημική, η μικροηλεκτρονική, η βιοτεχνολογία, η ιατρική και η νανοτεχνολογία. Μέλη ακόμα και όργανα σώματος έχουν αντικατασταθεί από πολυμερικά υλικά (οστά, καρδιά, τεχνητές αρτηρίες), ενώ πολλά μέρη αεροσκαφών και διαστημοπλοίων κατασκευάζονται από πολυμερή με ασυναγώνιστες μηχανικές και θερμικές ιδιότητες. Μικροηλεκτρονικά συστήματα, κυκλώματα στερεής κατάστασης αποτελούνται από πολυμερή και πραγματοποιούν λειτουργίες που άλλα υλικά δεν μπορούν.

Έχοντας ως δεδομένο ότι βιολογικά υλικά όπως το DNA και πολλές πρωτεΐνες είναι πολυμερή δεν άργησε να στραφεί το ενδιαφέρον σε αυτούς τους τομείς. Ανάμεσα στα υλικά που εμφανίζονται ιδιαίτερα υποσχόμενα είναι τα πολυπεπτίδια με τα οποία και ασχολούμαστε στην παρούσα εργασία. Τα πολυπεπτίδια όντας βιοαποικοδομήσιμα και βιοσυμβατά ανοίγουν νέους ορίζοντες καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τεχνολογία μεταφοράς φαρμάκων με εκλεκτική και ελεγχόμενη αποδέσμευση αυτών σε ιστούς που πάσχουν, αυξάνοντας τα οφέλη από την χρήση ιδιαίτερα ισχυρών φαρμάκων και μειώνοντας όποιες τυχόν παρενέργειες. Οι εφαρμογές τους περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την χρήση τους ως βάση για την προετοιμασία συνθετικών



αντιγόνων ή μιμητών πρωτεϊνών, βιοαισθητήρων βιοαπορροφούμενων ραμμάτων, ελασμάτων για ενίσχυση των οστών, βιολογικών μεμβρανών, οπτικών διακόπτων και υδροκρυσταλλικών υλικών.

### 1.1 Σκοπός της εργασίας

Η ικανότητα των πολυπεπτιδίων να αυτοοργανώνονται σε διάφορες δομές έδωσε το έναυσμα για την έρευνα και την μελέτη τους. Η δυνατότητα εγκλωβισμού φαρμάκων αποτελεί μια σημαντική ιδιότητα τους που μπορεί να οδηγήσει σε μελλοντικές εφαρμογές. Έτσι ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση πρότυπων πολυπεπτιδίων που θα έχουν αυτήν την δυνατότητα και θα μπορούν να φέρουν και να αποδεσμεύουν εκλεκτικά στους πάσχοντες ιστούς αντικαρκινικά φάρμακα.

Η εκλεκτικότητα σχετίζεται με το γεγονός της αποκρισιμότητας των πολυμερών αυτών στην αλλαγή του pH. Παράλληλα τα πολυπεπτίδια όντας οχήματα μεταφοράς φαρμάκων σε νανοκλίμακα έχουν την ικανότητα να βελτιώνουν τις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες των υπαρχόντων θεραπευτικών μέσων και φαρμάκων. Ο αυξημένος χρόνος κυκλοφορίας τους στο αίμα, η ελεγχόμενη αποδέσμευση και η στοχευμένη μεταφορά δύναται να υποστηρίξει, την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων και να μειώσει τις παρενέργειες τους. Παρουσιάζεται λοιπόν έντονο το ενδιαφέρον για τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό τέτοιων πολυμερών που θα έχουν ελεγχόμενες ιδιότητες.

Ανάμεσα στα αμινοξέα που έγιναν προσπάθειες να πολυμεριστούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η ιστιδίνη. Αυτό οφείλεται στο ότι η ιστιδίνη μπορεί να έχει όλα τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως και ιδιαίτερα αυτό της εκλεκτικότητας, επειδή έχει μεγάλη αποκρισιμότητα στο pH. Εξαιτίας του ιμιδαζολίου, μπορεί το μόριο να φορτιστεί ή να παραμείνει αφόρτιστο ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος που βρίσκεται.

Παρατηρείται λοιπόν στη βιβλιογραφία μια στροφή του ενδιαφέροντος και της μελέτης στον πολυμερισμό της ιστιδίνης ειδικά τα τελευταία χρόνια όπου η τεχνολογία της μεταφοράς φαρμάκων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Ως προστατευτικές ομάδες έχουν χρησιμοποιηθεί η βένζυλο και η DNP. Η παρούσα εργασία αποτελεί, ως προς την έως σήμερα γνώση μας, την πρώτη

εργασία που περιέχει τον πολυμερισμό του NCA ιστιδίνης με τρίτυλο προστατευτική ομάδα, η οποία και δίνει επιπλέον πλεονεκτήματα που θα αναφερθούν παρακάτω.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του Nim-Trt-L-Histidine NCA, ο πολυμερισμός του καθώς και ο συμπολυμερισμός του με PEO, το οποίο είναι υδρόφιλο, μη τοξικό, δεν παρεμβάλλεται σε κυτταρικές λειτουργίες και δεν αποτελεί στόχο ανοσογονικότητας. Η σύνθεση poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] της με διαφορετικές αναλογίες PBLG κατά mol ως προς την πολυιστιδίνη έγινε ώστε να μελετηθεί το αποτέλεσμα που έχει η αύξηση του PBLG στη μεταβολή του pKa των πολυμερών και συνεπώς στην αποκρισσιμότητα που έχουν τα πολυμερή στην αλλαγή του pH. Παράλληλα έγινε μελέτη των δομών που σχηματίζονται σε διαλύτη νερό, αλλά και της δευτεροταγούς δομής της πολυιστιδίνης σε διαφορετικά pH και θερμοκρασίες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 2.1 Γενικά για τις πρωτεΐνες και τα αμινοξέα

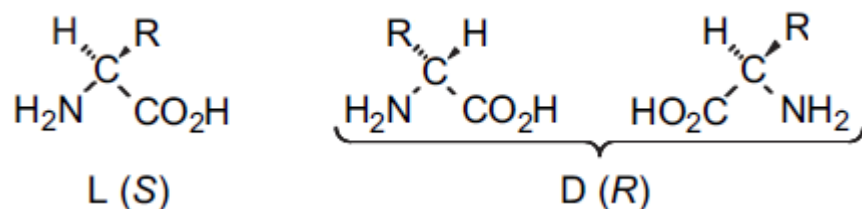
Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα βιομόρια που συναντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Αυτά τα πολυδύναμα μακρομόρια παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλες τις βιολογικές λειτουργίες<sup>1</sup>. Πρωτεΐνες μπορούν να λειτουργούν είτε ως καταλύτες, για την μεταφορά και αποθήκευση άλλων μορίων, να παρέχουν ανοσοπροστασία και μηχανική στήριξη, να δημιουργούν κίνηση, να διαβιβάζουν νευρικές ώσεις και να ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση.

Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή δομούμενα από μονομερή αμινοξέων και περιέχουν μια μεγάλη σειρά λειτουργικών ομάδων όπως αλκοόλες, θειόλες, καρβοξυλικές ομάδες και διάφορες βασικές ομάδες. Έχουν την δυνατότητα να δημιουργούν πολύπλοκα συσσωματώματα αλληλοεπιδρώνοντας με βιολογικά μακρομόρια, με τα οποία δρουν συνεργειακά αποκτώντας ιδιότητες που δεν προϋπήρχαν σε αυτά. Η μεταγωγή σημάτων αλλά και διάφορες μακρομοριακές μηχανές που βοηθούν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του DNA είναι παραδείγματα τέτοιων συσσωματωμάτων. Ανάλογα με την ευκαμψία η την ακαμψία τους λειτουργούν ως δομικά στοιχεία του κυτταρικού σκελετού η του συνδετικού ιστού.

Τα α-αμινοξέα αποτελούνται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, τον α-άνθρακα, που συνδέεται με μια αμινική ομάδα, μια καρβοξυλική ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μια χαρακτηριστική ομάδα **R**, που λέγεται πλευρική αλυσίδα. Έχοντας στο τετραεδρικό άτομο του άνθρακα τέσσερις διαφορετικές ομάδες, τα α-αμινοξέα είναι χειρόμορφα. Υπάρχουν λοιπόν δυο κατοπτρικά είδωλα τα L- και D- ισομερή. Μόνο τα L-αμινοξέα συναντώνται στις πρωτεΐνες. Για όλα σχεδόν τα αμινοξέα, το L-ισομερές έχει διαμόρφωση S και όχι R.

Κάθε μια από τις λειτουργικές ομάδες ενός α-αμινοξέος μπορεί να υπάρχει στην πρωτονιωμένη η την αποπρωτονιωμένη μορφή<sup>2</sup>. Η ιοντική κατάσταση μιας λειτουργικής ομάδας καθορίζεται από δυο παραμέτρους: την χημική της φύση και το pH του περιβάλλοντος. Καθώς το pH αλλάζει η λειτουργική ομάδα

κερδίζει η χάνει ένα πρωτόνιο. Η χημική φύση της ομάδας καθορίζει σε ποια μικρή περιοχή του pH αυτό συμβαίνει. Αυτή η περιοχή ορίζεται από τον λογάριθμο της σταθεράς ιοντισμού της ομάδας (**pKa**).



**Σχήμα 1: Χημική και στερεοχημική φύση των α-αμινοξέων.**

Οι είκοσι πλευρικές αλυσίδες **R** διαφοροποιούν τα αμινοξέα, διότι αποτελούνται από διαφορετικές χαρακτηριστικές ομάδες που διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, τη δεσμευτική συγγένεια υδρογόνου, την υδροφοβικότητα και την χημική αντιδραστικότητα<sup>1</sup>. Τα 19 από τα 20 αμινοξέα είναι πρωτοταγείς αμίνες, ενώ μόνο η προλίνη είναι δευτεροταγής αμίνη. Κάθε αμινοξύ μπορεί να αναγραφεί συντομογραφικά με τους τρεις πρώτους χαρακτήρες της αγγλικής ονομασίας: Ala για την αλανίνη, Gly για την γλυκίνη κ.λπ. Και τα 20 αμινοξέα είναι απαραίτητα στην πρωτεϊνική σύνθεση, όμως ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να βιοσυνθέσει μόνο τα 10 από αυτά. Τα υπόλοιπα 10 ονομάζονται *απαραίτητα αμινοξέα*, γιατί ο οργανισμός πρέπει να τα αποκτήσει με την διατροφή<sup>3</sup>.

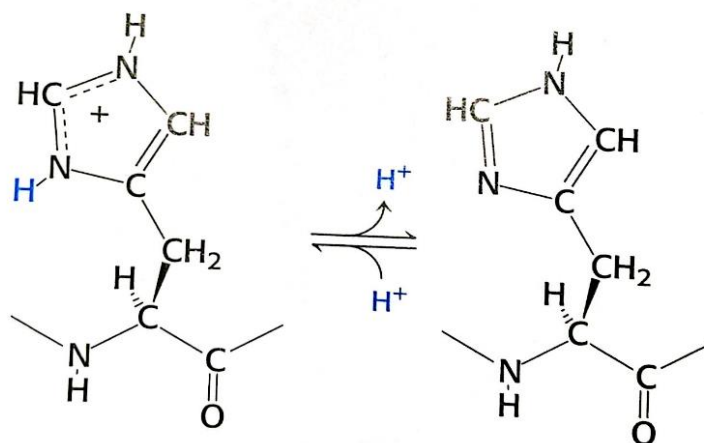
Το απλούστερο αμινοξύ είναι η γλυκίνη, που έχει μόνο ένα άτομο υδρογόνου στην πλευρική αλυσίδα. Η αλανίνη είναι το επόμενο με μια μεθυλομάδα αντί του υδρογόνου. Μεγαλύτερες υδρογονανθρακικές αλυσίδες (με τρία και τέσσερα άτομα άνθρακα ) βρίσκονται στην βαλίνη την λευκίνη και την ισολευκίνη. Αυτές οι μεγαλύτερες αλυσίδες προσδίδουν υδροφοβικότητα μέσω της οποίας επέρχεται σταθεροποίηση των δομών στις πρωτεΐνες.

Εν συνεχεία ακολουθούν τρία αμινοξέα με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες . Η φαινυλαλανίνη, περιέχει ένα φαινολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μια μεθυλενική ομάδα καθώς και η τρυπτοφάνη που περιέχει ένα ινδολικό δακτύλιο. Τα δυο αυτά παρουσιάζουν μεγάλη υδροφοβικότητα. Τέλος η τυροσίνη που έχει έναν φαινολικό δακτύλιο. Οι αρωματικοί δακτύλιοι των συγκεκριμένων αμινοξέων περιέχουν απεντοπισμένα τα ηλεκτρονικά τους νέφη π, που τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν με άλλα συστήματα π και να μεταφέρουν ηλεκτρόνια.

Ένα άτομο θείου εμφανίζεται στις πλευρικές αλυσίδες της κυστεΐνης και της μεθειονίνης. Η κυστεΐνη περιέχει σουλφιδρυλομάδα και η μεθειονίνη δεσμό θειοαιθέρα.

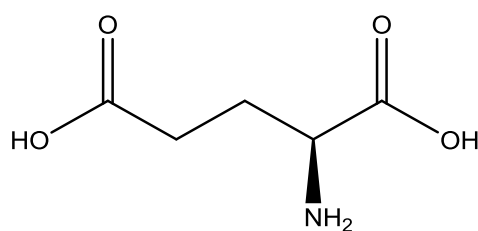
Δυο αμινοξέα, η σερίνη και η θρεονίνη, περιέχουν αλειφατικές υδροξυλικές ομάδες. Τα υδροξύλια τις καθιστούν πιο υδρόφιλες από τις αντίστοιχες αλειφατικές.

Αμινοξέα με πολύ πολικές πλευρικές ομάδες και μεγάλη υδροφιλικότητα είναι η λυσίνη, η αργινίνη και η ιστιδίνη. Η λυσίνη και η αργινίνη είναι θετικά φορτισμένες σε ουδέτερο pH. Η ιστιδίνη περιέχει μια ομάδα ιμιδαζολίου, έναν αρωματικό δακτύλιο που μπορεί να φορτιστεί. Με pKa κοντά στο 6, η ομάδα του ιμιδαζολίου μπορεί να φορτιστεί θετικά ή να είναι αφόρτιστη σε ουδέτερο pH, ανάλογα με το μικροπεριβάλλον που θα βρεθεί. Πολύ συχνά απαντάται η ιστιδίνη στο ενεργό κέντρο των ενζύμων, όπου το ιμιδαζόλιο μπορεί να δεσμεύει και να απελευθερώνει πρωτόνια κατά την διάρκεια των ενζυμικών αντιδράσεων.



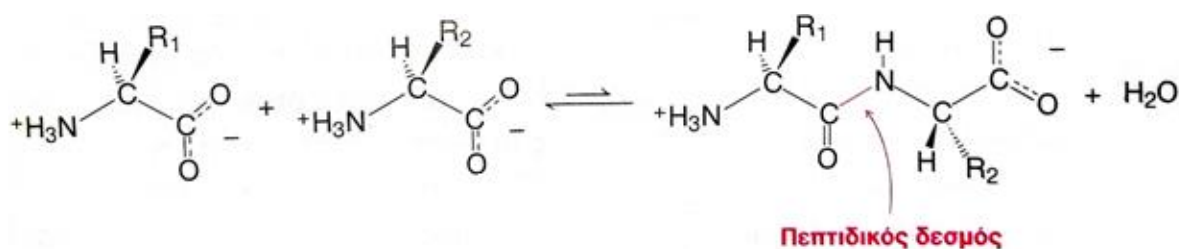
Σχήμα 2: Ο ιοντισμός της ιστιδίνης.

Μεταξύ των αμινοξέων υπάρχουν επίσης και δυο με όξινες πλευρικές αλυσίδες, το ασπαρτικό και το γλουταμικό οξύ. Τα μη φορτισμένα τους παράγωγα ονομάζονται ασπαραγίνη και γλουταμίνη και περιέχουν μια τελική αμιδική ομάδα στη θέση της καρβοξυλικής.



Σχήμα 3: Το γλουταμικό οξύ

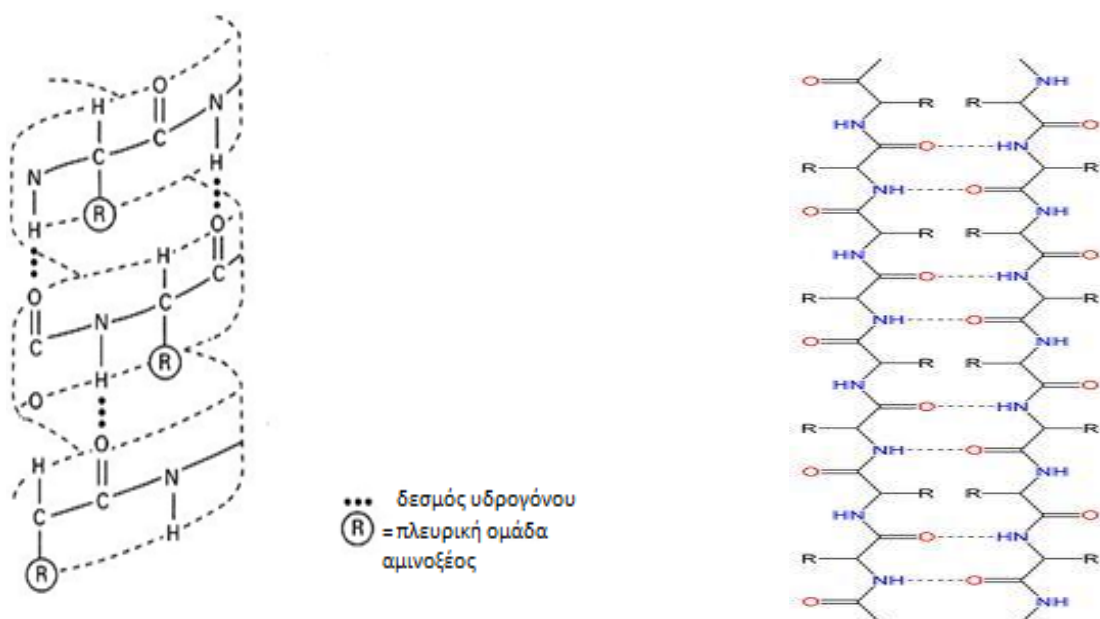
Τα αμινοξέα, που είναι τα μονομερικά στοιχεία των πρωτεϊνών, ενώνονται μεταξύ τους με τον *πεπτιδικό δεσμό*. Ο πεπτιδικός δεσμός λέγεται και αμιδικός δεσμός και γίνεται ανάμεσα στην α-καρβοξυλική ομάδα ενός αμινοξέος και στην α-αμινική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος με την απελευθέρωση ενός μορίου νερού. Η ισορροπία της αντίδρασης βρίσκεται μάλλον προς την πλευρά της υδρόλυσης παρά της σύνθεσης, κάτι που σημαίνει ότι η βιοσύνθεση του πεπτιδικού δεσμού χρειάζεται την προσθήκη ελεύθερης ενέργειας. Οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι αρκετά σταθεροί κινητικά.



Σχήμα 4: Πεπτιδικός δεσμός. Η σύνδεση δυο αμινοξέων συνοδεύεται από την απώλεια ενός μορίου νερού

Οι πρωτεΐνες έχουν τέσσερα διαφορετικά επίπεδα δομής<sup>4</sup>. Η *πρωτοταγής* δομή μιας πρωτεΐνης αναφέρεται στην ακολουθία με την οποία τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους. Οι χημικές ιδιότητες μιας πρωτεΐνης εξαρτώνται επίσης από τα ανώτερα επίπεδα δομών, δηλαδή από το πώς η πεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται ώστε να αποκτήσει το μόριο ένα συγκεκριμένο τρισδιάστατο σχήμα. 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 στον χώρο. Η *τεταρτοταγής δομή* αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο πολλά μόρια πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για τον σχηματισμό μεγάλων δομικών συσσωματωμάτων.

Οι δυο βασικές περιοδικές δευτεροταγείς δομές που απαντώνται στις πρωτεΐνες είναι η α-έλικα και η β-πτυχωτή επιφάνεια<sup>5</sup>. Η α-έλικα είναι δεξιόστροφη και έχει δομή ράβδου, με την ελιγμένη κύρια αλυσίδα να σχηματίζει το εσωτερικό της και τις πλευρικές αλυσίδες να εκτείνονται προς τα έξω, διαμορφωμένες σε έλικα. Η διαμόρφωση α-έλικας σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ  $-NH$  και  $-CO$  που απέχουν τέσσερα κατάλοιπα στην κύρια αλυσίδα με κάθε κατάλοιπο να απέχει από το επόμενο  $1,5 \text{ \AA}$  και να είναι στραμμένο  $100^\circ$  σε σχέση με τον κύριο άξονα ενώ το βήμα της έλικας είναι  $3,6$  αμινοξέα ( $5,4 \text{ \AA}$ ). Η β-πτυχωτή, δομή ανοιχτή και επίπεδη με δεσμούς υδρογόνου να σχηματίζονται διαμοριακά μεταξύ  $-NH$  και  $-CO$  διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η απόσταση μεταξύ των γειτονικών αμινοξέων είναι  $3,5 \text{ \AA}$  ενώ οι γειτονικές αλυσίδες σε μια β-πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλες). Η τάση ενός πεπτιδίου για δευτεροταγή δομή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση του σε αμινοξέα<sup>6</sup>.



Σχήμα 5: α-έλικα και β-φύλλο

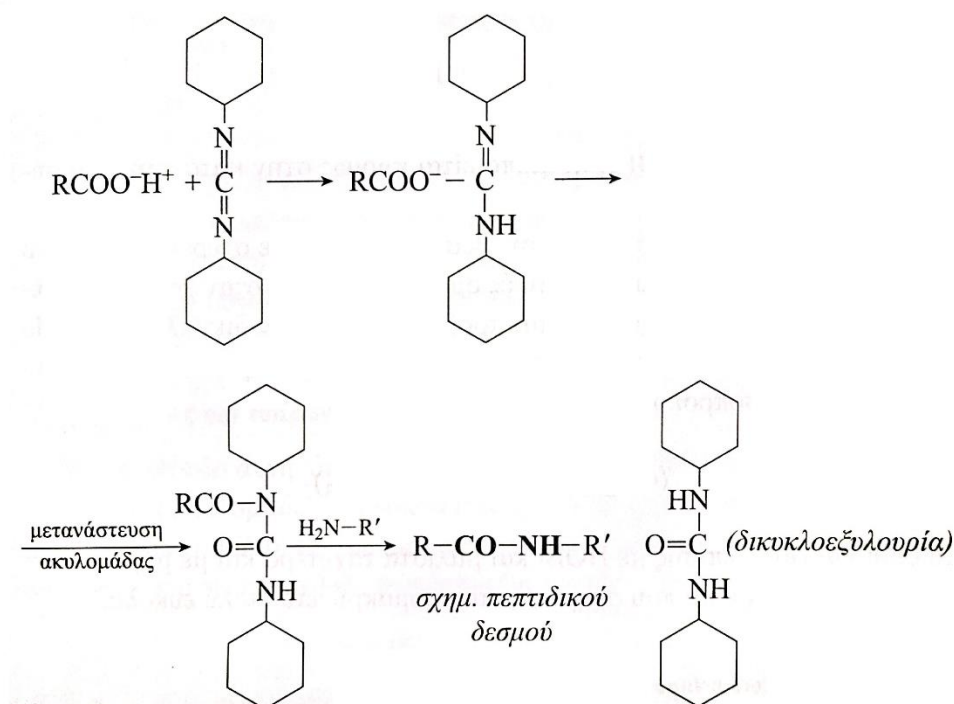
## 2.2 Πεπτιδική σύνθεση

Ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δυο αμινοξέων απαιτεί την προστασία της καρβοξυλομάδας του ενός αμινοξέος και της αμινομάδας του δεύτερου. Ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που πρόκειται να σχηματίσει τον πεπτιδικό δεσμό με την ελεύθερη αμινομάδα του άλλου αμινοξέος.

Για την πεπτιδική σύνθεση υπάρχουν πολλές μέθοδοι. Από αυτές η μέθοδος του **δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου** και η μέθοδος των **ενεργών εστέρων** είναι οι πιο γνωστές και εύχρηστες<sup>7</sup>. Παράλληλα ιδιαίτερη εφαρμογή βρίσκουν τόσο η μέθοδος **Merrifield** όσο και η τεχνική του **ανασυνδυσμένου DNA**.

### 2.2.1 Μέθοδος του δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου

Η μέθοδος των καρβοδιιμιδίων στην πεπτιδική σύνθεση εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1955 από τους Sheehan και Hess. Το δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίο είναι μέχρι σήμερα το πιο διαδεδομένο αντιδραστήριο. Η αντίδραση γίνεται στους 0°C και σε διαλύτες απόλυτο DMF, EtAc και διχλωρομεθάνιο. Χρησιμοποιούνται ισομοριακές ποσότητες DCC και των παραγώγων των δυο αμινοξέων.



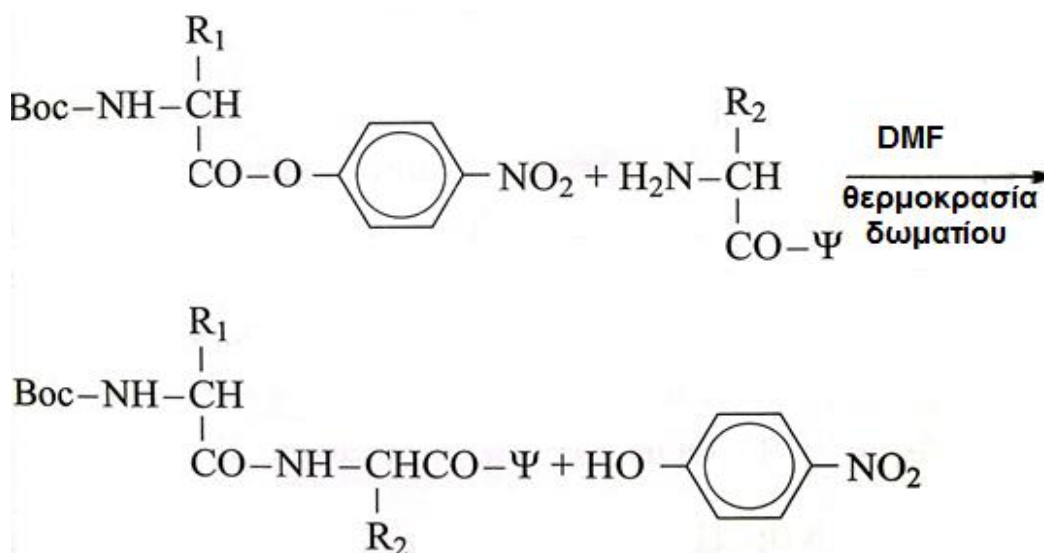
Σχήμα 6: Σύνθεση διπεπτιδίου με την μέθοδο DCC



Η ευρεία χρήση του οφείλεται στο χρόνο αντίδρασης που είναι μικρός και στις μεγάλες συνήθως αποδόσεις. Μειονέκτημα της μεθόδου του DCC είναι η τάση που έχει το πολύ ενεργό ενδιάμεσο να σχηματίζει οξαζολόνη, με αποτέλεσμα τη ρακεμείωση και σχηματισμό N-ακυλουρίας που δύσκολα απομακρύνεται. Κατά καιρούς χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι διαλύτες και ασθενείς βάσεις όπως N-μεθυλομορφολίνη, για τον περιορισμό του σχηματισμού N-ακυλουρίας.

### 2.2.2 Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων

Η ενεργοποίηση της προς αντίδρασης καρβοξυλομάδας του αμινοξέος με τη μέθοδο αυτή γίνεται σε ξεχωριστό στάδιο. Η καρβοξυλομάδα του N-προστατευμένου αμινοξέος μετατρέπεται σε π-νιτροφαινυλεστέρα με ισομοριακή ποσότητα π-νιτροφαινόλης, ο οποίος παρασκευάζεται και απομονώνεται σε καθαρή κατάσταση. Στη συνέχεια ο εστέρας του συγκεκριμένου αμινοξέος αντιδρά με την αμινομάδα του άλλου αμινοξέος προς σχηματισμό του αντίστοιχου πεπτιδίου. Η αντίδραση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με διαλύτη απόλυτο DMF, EtAc ή απόλυτο THF. Η μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων και γενικά των ενεργών εστέρων μειονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων πεπτιδικής σύζευξης στο ότι ο χρόνος αντίδρασης είναι αρκετά μεγάλος 24-72 ώρες. Αντίθετα έχει το πλεονέκτημα ότι δε λαμβάνεται καθόλου ρακεμικό προϊόν.



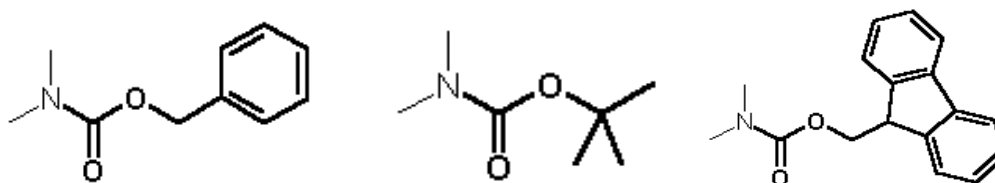
Σχήμα 7: Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων

### 2.2.3 Προστατευτικές ομάδες

Συχνά συμβαίνει, ιδιαίτερα κατά την σύνθεση περίπλοκων μορίων, μια λειτουργική ομάδα να παρεμποδίζει την πραγματοποίηση κάποιας επιθυμητής αντίδρασης σε μια άλλη λειτουργική ομάδα του ίδιου μορίου που βρίσκεται σε διαφορετική θέση. Όταν προκύπτει τέτοιο πρόβλημα μπορούμε να το παρακάμψουμε προστατεύοντας την λειτουργική ομάδα που αναστέλλει την πραγματοποίηση της επιθυμητής αντίδρασης. Η προστασία περιλαμβάνει τρία στάδια :

1. Εισαγωγή της προστατευτικής ομάδας για να δεσμεύσει την ομάδα που παρεμποδίζει
2. Πραγματοποίηση της επιθυμητής αντίδρασης
3. Απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας

Υπάρχουν πολλές προστατευτικές ομάδες για την προστασία τόσο της αμινομάδας όσο και της καρβοξυλομάδας. Σε γενικές αρχές μια αμινομάδα μπορεί να προστατευτεί αντιστρεπτά με ακυλίωση, αλκυλίωση και αλκυλοακυλίωση. Για τις αμίνες οι κυριότερες προστατευτικές ομάδες είναι οι καρβοβενζοξυομάδα (**Z**), η τριτοταγής βουτυλοκαρβονυλομάδα (**t-Boc**) και η 9-φλουορενυλομεθυλοξυ-καρβονυλομάδα (**F-moc**).



Σχήμα 8: Προστατευτικές ομάδες Z, t-Boc και F-moc

Η προστασία της α-καρβοξυλομάδας των αμινοξέων γίνεται με εστεροποίηση και χρησιμοποιούνται συνήθως μεθυλ-εστέρες, αιθυλ-εστέρες, 4-Νιτροβενζυλεστέρες και βενζυλεστέρες. Η συνηθέστερη προστασία της καρβοξυλομάδας του ασπαρτικού και του γλουταμικού οξέος είναι η βενζυλική. Η προστασία γίνεται τοποεκλεκτικά ως προς το καρβοξύλιο του αμινοξέος με βενζυλική αλκοόλη και θειικό οξύ σε μεγάλες αποδόσεις.



Σχήμα 9: Προστατευτικές ομάδες μεθυλεστέρα και βενζυλεστέρα

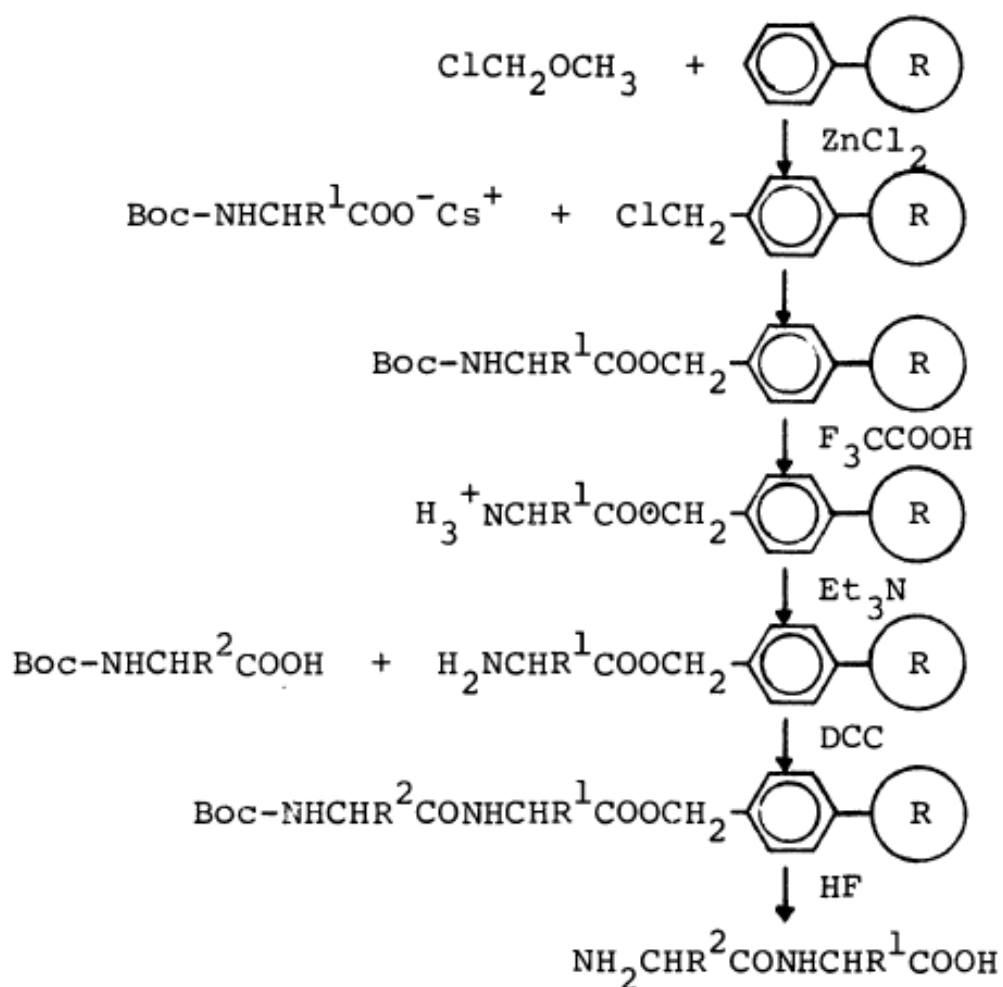
#### 2.2.4 Τεχνική στερεάς φάσης κατά Merrifield

Η σύνθεση μεγάλων πεπτιδικών αλυσίδων με σταδιακή προσθήκη ενός αμινοξέος είναι χρονοβόρος και ιδιαίτερα επίπονη παρουσιάζοντας ιδιαίτερες δυσκολίες όπως είναι η δυσδιαλυτότητα. Επανάσταση στο συγκεκριμένο τομέα έφερε η μέθοδος στερεάς φάσης, που αναπτύχθηκε από τον R. Bruce Merrifield (βραβείο Nobel 1984). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή<sup>8,9</sup> η πεπτιδική σύνθεση πραγματοποιείται σε στερεά φάση από σφαιρίδια πολυμερούς πολυστυρενίου, που έχει παρασκευαστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε σε κάθε 100 περίπου βενζυλικούς δακτύλιους, κάποιος να φέρει σε θέση πάρα-μια χλωρομέθυλο ομάδα. Είναι δυνατή η απομάκρυνση της περίσσειας των αντιδραστηρίων και των παραπροϊόντων με διήθηση και εκπλύσεις. Οι μέθοδοι προστασίας και σύζευξης παραμένουν ίδιες με αυτές της συνθεσης σε διάλυμα με την ενεργοποίηση του καβοξυλίου με αντιδραστήριο σύζευξης όπως το DCC και την αντίδραση μιας ελεύθερης αμινομάδας με το ενεργό καρβοξύλιο για την δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού. Για την πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης ακολουθούνται τέσσερα στάδια :

1. Το προστατευμένο αμινοξύ ενώνεται ομοιοπολικά με το πολυστυρενικό πολυμερές με σχηματισμό ενός εστερικού δεσμού (αντίδραση  $S_N2$ )
2. Το αμινοξύ που συνδέεται με το πολυμερές εκπλύνεται από πιθανή περίσσεια αντιδραστηρίων και κατόπιν υφίσταται κατεργασία με κάποιο οξύ για την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας του αμινοξέος.
3. Ένα δεύτερο προστατευμένο αμινοξύ ενώνεται με το πρώτο, παρουσία DCC. Η περίσσεια των αντιδραστηρίων απομακρύνεται με έκπλυση του στερεού μη διαλυτού πολυμερούς. Ο κύκλος της αποπροστασίας, σύζευξης και έκπλυσης επαναλαμβάνεται τόσες φορές όσα και τα αμινοξέα που θέλουμε να προσθέσουμε στην πεπτιδική αλυσίδα.

4. Μετά τον σχηματισμό του επιθυμητού πεπτιδίου, η αντίδραση με άνυδρο HF απομακρύνει την τελευταία προστατευτική ομάδα αμινοξέος και διασπά τον εστερικό δεσμό ανάμεσα στο πεπτίδιο και το πολυμερές, οπότε το ελεύθερο πεπτίδιο αποχωρίζεται και απομονώνεται.

Η μέθοδος της στερεάς φάσης αποτελείται από έξι είδη αντιδράσεων, τρία από τα οποία λαμβάνουν χώρα μόνο μια φορά και τρία τα οποία επαναλαμβάνονται σε κάθε κύκλο σύνθεσης<sup>10</sup>.



Σχήμα 10: Στάδια σύνθεσης με την τεχνική Merrifield

Εκτός από το DCC σήμερα χρησιμοποιείται το N,N'-διηδοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο διότι είναι πιο διαλυτό στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες και απομακρύνεται ευκολότερα. Πλεονεκτήματα της σύνθεσης σε στερεά φάση είναι η μεγάλη ταχύτητα, η αποφυγή δυσδιαλυτότητας, η αύξηση απόδοσης και η δυνατότητα αυτοματισμού.

### 2.2.5 Σύνθεση με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA

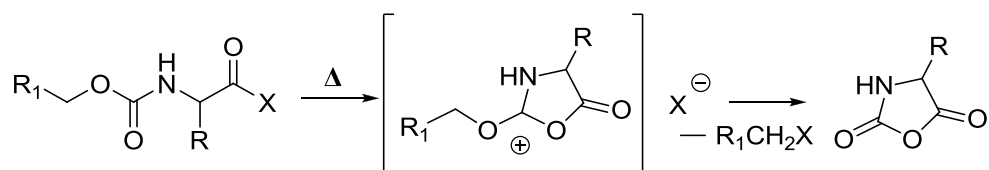
Το DNA είναι ένα επιμήκες βιοπολυμερές από δεοξυνουκλεοτίδια που περιέχει τις γενετικές πληροφορίες του οργανισμού. Οι βάσεις του DNA μεταφέρουν τις γενετικές πληροφορίες ενώ το σάκχαρο και η φωσφορική ομάδα παίζουν δομικό ρόλο και αποτελούν την κύρια αλυσίδα του πολυμερούς. Υπάρχει σχέση μεταξύ της 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.

Την δεκαετία του '70 οι Berg (βραβείο Νόμπελ 1980), Boyer και Cohen ανέπτυξαν την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA<sup>11,12</sup>. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή 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 με συγκεκριμένη αλληλουχία που κωδικοποιεί την επιθυμητή πρωτεΐνη. 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 όπου η μεταγραφή και η 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. Μειονέκτημα αποτελεί το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την δημιουργία των ανασυνδυασμένων φορέων με το είδος του κυττάρου ξενιστή να επηρεάζει σημαντικά τον χρόνο.

## 2.2.6 Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCA)

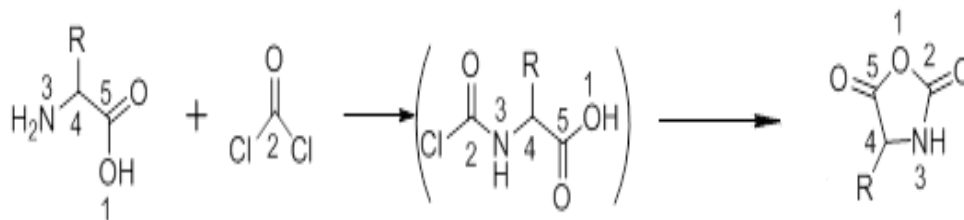
Οι N-Καρβοξυανυδρίτες των α-αμινοξέων περιγράφηκαν πρώτα από τον Leuchs<sup>13</sup> περισσότερο από εκατό χρόνια πριν. Επίσης παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και απομόνωσε το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο. Κατά την μεθοδολογία του Leuchs η παρατεταμένη θέρμανση στους 70-90 βαθμούς οδηγεί στο σχηματισμό του ανυδρίτη. Υπό τις συνθήκες αυτές όμως οι NCAs αρχίζουν να αποσυντίθεται και έχουμε διάνοιξη του δακτυλίου. Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια όπου η δημιουργία του χλωριδίου οξέος θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο από τον ίδιο τον Leuchs<sup>14</sup>. Εν συνεχεία το πενταχλωρίδιο του φωσφόρου<sup>15</sup>, που ήταν δραστικότερο αλλά έδινε ως παραπροϊόν το αντίστοιχο οξείδιο και είχε επίδραση στην κρυστάλλωση του ανυδρίτη. Όσον αφορά τον υποκαταστάτη R<sub>1</sub> ο Leuchs είχε παρατηρήσει ότι τα μεθόξυ αντιδρούσαν πιο εύκολα από τα αντίστοιχα αιθοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων αποδεικνύοντας ότι το καθοριστικό στάδιο της ταχύτητας είναι η αλκυλίωση του ιόντος αλογόνου.



**Σχήμα 11: Μέθοδος του Leuchs για τον σχηματισμό των N-Καρβοξυανυδριτών, όπου X=Cl ή Br**

Η Φωσγενίωση των ελεύθερων αμινοξέων αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την σύνθεση των NCAs σήμερα. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε πρώτα από τον Fuchs<sup>16</sup> το 1922 για την παρασκευή της N-φαινυλ-γλυκίνης NCA. Το πρώτο στάδιο της φωσγενίωσης φαίνεται να είναι ο σχηματισμός του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος επειδή η προσθήκη ανιλίνης<sup>17</sup> οδηγεί στο σχηματισμό του 5-φαινυλ-υδαντοϊκού οξέος. Το THF και το 1,4-διοξάνιο είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, ωστόσο δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις όταν κατεργάζονται με υδροχλώριο για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Σε γενικές αρχές, όλοι οι διαλύτες που είναι αδρανείς ως προς το φωσγένιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα αντίδρασης, αλλά οι λιγότερο πολικοί όπως το χλωροφόρμιο, ο τετραχλωράνθρακας και ο οξικός

αιθυλεστέρας, αυξάνουν τους χρόνους της αντίδρασης. Από τους πιο πολικούς διαλύτες μόνο το ακετονιτρίλιο είναι αδρανές αρκετά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, προτιμάται για την σύνθεση του NCA της γλυκίνης.



**Σχήμα 12: Σχηματισμός N-καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs-Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος**

Το φωσγένιο είναι ένα υψηλής δραστηριότητας αντιδραστήριο και εξαιτίας της υψηλής τοξικής του φύσης, η μεταχείρισή του ακόμα και σε μικρή εργαστηριακή κλίμακα χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Επιπλέον είναι δύσκολο, λόγω της αέριας φύσης του, να τηρηθεί η στοιχειομετρία στις αντιδράσεις που συμμετέχει. Το τριχλωρομέθυλο χλωροφορμικό ή αλλιώς διφωσγένιο και το δις(τριχλωρομέθυλο)-ανθρακικό ή τριφωσγένιο (BTC) έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί στην οργανική σύνθεση ως πηγές φωσγενίου. Το διφωσγένιο και το τριφωσγένιο είναι υγρό και κρυσταλλικό στερεό αντίστοιχα, γεγονός που επιτρέπει την πρακτικότερη και ασφαλέστερη χρησιμοποίησή τους, ως πρόδρομα δυο και τριών μορίων φωσγενίου. Στην σύνθεση των NCAs έχουν χρησιμοποιηθεί και τα δυο αλλά το τριφωσγένιο έχει επικρατήσει. Οι παράπλευρες αντιδράσεις περιλαμβάνουν κυρίως την διάνοιξη του δακτυλίου των NCA και λαμβάνουν χώρα λόγω αυξημένης θερμοκρασίας, αυξημένου χρόνου αντίδρασης και υψηλής συγκέντρωσης υδροχλωρίου. Επίσης η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό.

### 2.3 Μακρομοριακή Σύνθεση Πολυπεπτιδίων

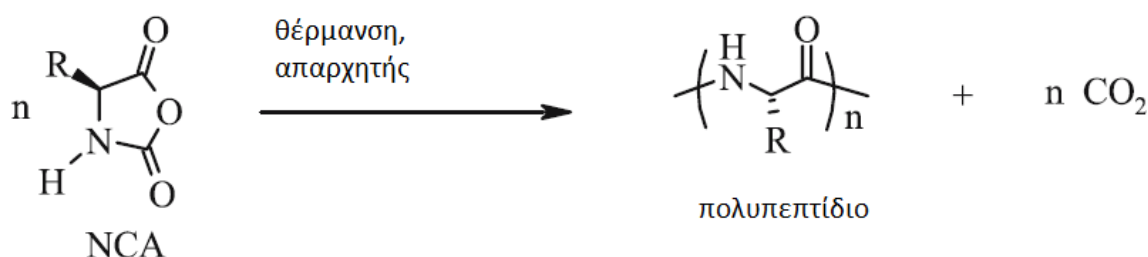
Ο πολυμερισμός των NCA αποτελεί βασικό κομμάτι για την σύνθεση πολυπεπτιδίων με καθορισμένο βαθμό πολυμερισμού, καθορισμένη μοριακή σύσταση και συγκεκριμένες ιδιότητες. Η ικανότητα που έχουν τα πολυπεπτιδία να σχηματίζουν σταθερές δευτεροταγείς δομές και να αυτοοργανώνονται, ανοίγει τον δρόμο για την χρησιμοποίησή τους σε διάφορες εφαρμογές μεταφοράς φαρμάκων αλλά και στην βιοτεχνολογία<sup>18,19</sup>. Η δυνατότητα σύνθεσης βιοπολυμερών, τα οποία θα ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα του

περιβάλλοντος όπως κάνουν τα φυσικά βιοπολυμερή στους οργανισμούς, αποτελεί βασική επιστημονική προσπάθεια και θα ανοίξει νέους ορίζοντες με την υιοθέτησή τους σε διάφορες τεχνολογίες.

### 2.3.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (R.O.P)

Η μέθοδος που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα στην σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, καθώς και συμπολυμερών πεπτιδίων είναι ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων. Τα συγκριτικά της πλεονεκτήματα είναι :

- Ευκολία
- Ταχύτητα
- Μεγάλες αποδόσεις
- Αποφυγή ρακεμείωσης
- Μεγάλος αριθμός απαρχητών κυρίως βάσεις όπως οι αμίνες, αλκοξείδια, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα και θέρμανση



**Σχήμα 13: Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου των NCA**

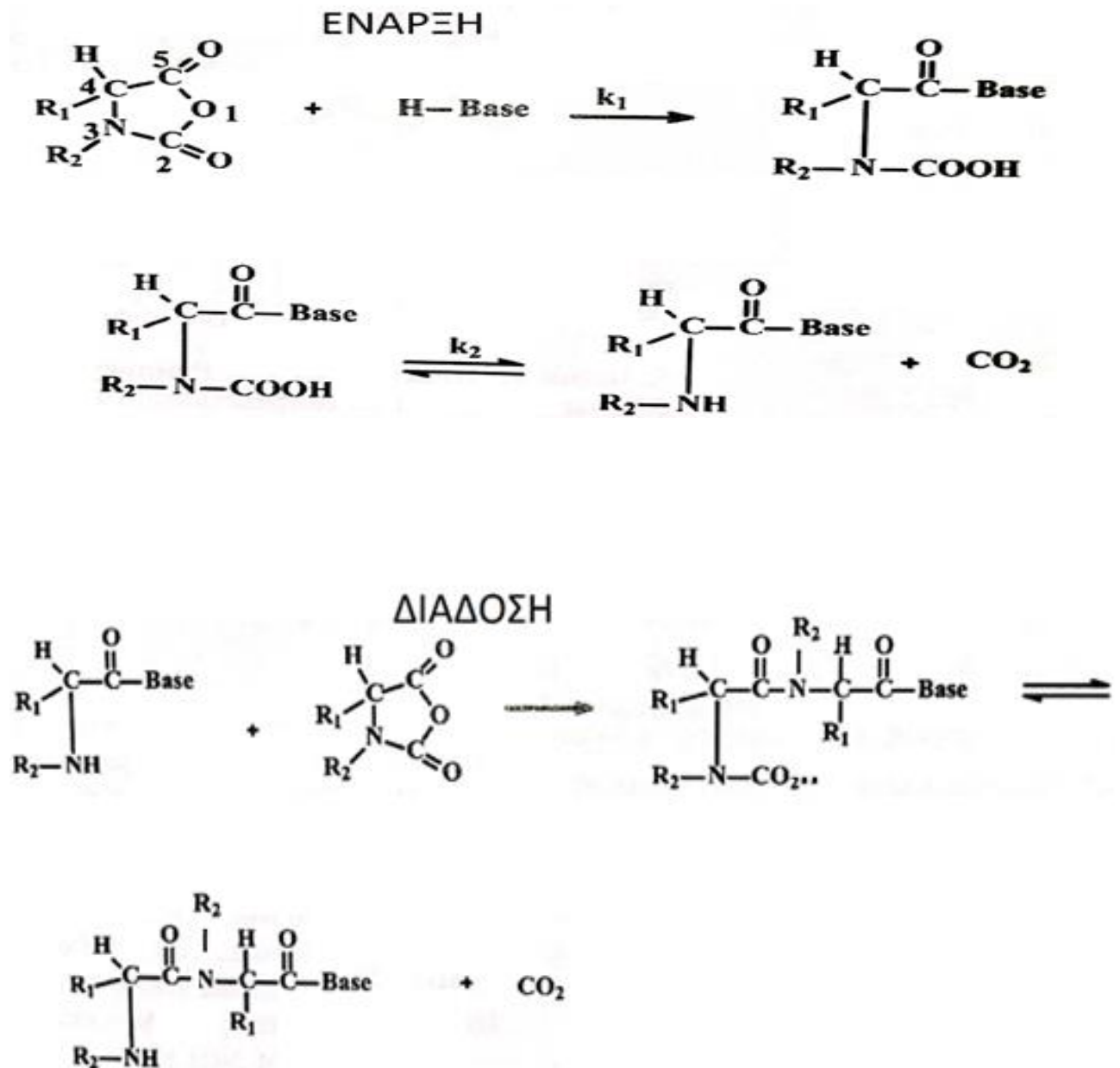
Η αντίδραση προχωρά με το σχηματισμό CO<sub>2</sub> και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους. Με τη χρήση επισημασμένου <sup>14</sup>C του NCA της γλυκίνης έχει αποδειχθεί ότι το CO<sub>2</sub> προέρχεται αποκλειστικά από τον C(2)<sup>20</sup>.

Τρεις μηχανισμοί έχουν προταθεί για τον πολυμερισμό των NCA από βασικούς απαρχητές. Καθοριστικό ρόλο για το ποιος από τους μηχανισμούς επικρατεί κάθε φορά παίζει ο **λόγος πυρηνοφιλικότητας/βασικότητας του απαρχητή**.



### 2.3.1.1 Κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού

Αυτός ο μηχανισμός χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό των NCAs που ξεκινούν από μη ιοντικούς απαρχητές και έχουν τουλάχιστον ένα ενεργό υδρογόνο όπως πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες, νερό και οι αλκοόλες.<sup>21</sup> Ισχύει τόσο για τα μη υποκατεστημένα NCA (N-H) όσο και για τα υποκατεστημένα (N-R). Η έναρξη του πολυμερισμού βασίζεται στην πυρηνόφιλη προσβολή του απαρχητή στο 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>.



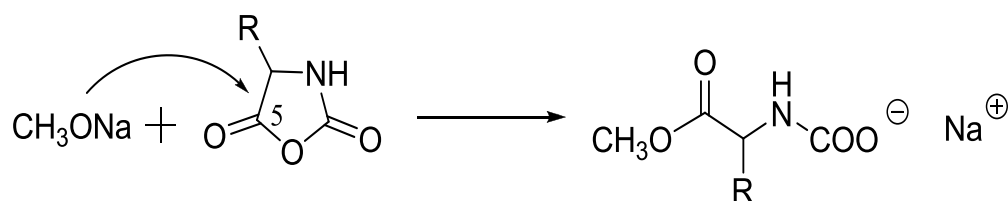
Σχήμα 14: Έναρξη και Διάδοση σύμφωνα με τον κανονικό μηχανισμό πολυμερισμού<sup>21</sup>

Τα καλύτερα αποτελέσματα για πρωτοταγείς αμίνες δίνει η n-εξυλαμίνη που προκαλεί ταχεία έναρξη. Αν δεν υπήρχαν αντιδράσεις τερματισμού θα έπρεπε η αντίδραση να παρουσιάζει κινητική 1<sup>η</sup>ς τάξης και ο πολυμερισμός να είναι ζωντανός. Υπάρχουν διάφοροι λόγοι που έχουμε απόκλιση από την ζωντανή φύση του ROP. Αυτό μπορεί να συμβαίνει εξαιτίας του σχηματισμού αλατιού του καρβαμιδικού οξέος με την αμινομάδα της αναπτυσσόμενης αλυσίδας. Επίσης ένας άλλος παράγοντας που εμποδίζει την αντίδραση να ακολουθήσει κινητική πρώτης τάξης είναι η πίεση στην οποία συμβαίνει ο πολυμερισμός. Χωρίς την απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> έχουμε τον σχηματισμό αλατιού του καρβαμιδικού οξέος, γιαυτό και επιδιώκεται ο πολυμερισμός να συμβαίνει υπό σταθερή πίεση. Ένας άλλος παράγοντας που παίζει ρόλο στον ROP είναι η καθαρότητα των NCAs. Το νερό μπορεί να επηρεάσει τον μηχανισμό. Ακόμα και η έκθεση στην υγρασία έχει ως αποτέλεσμα οι κρυσταλλικοί ανυδρίτες να αυτοπολυμερίζονται με απελευθέρωση CO<sub>2</sub>.

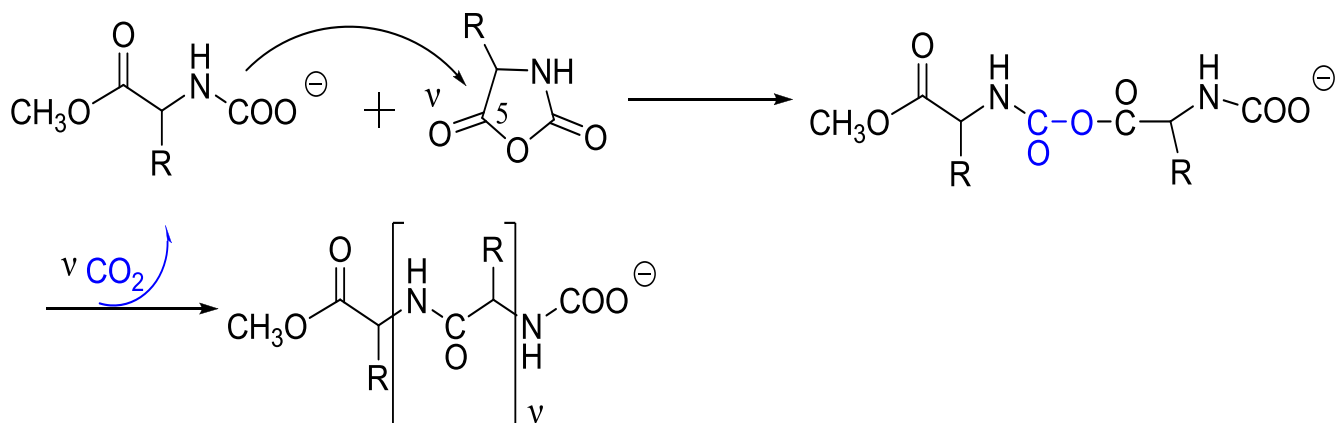
### **2.3.1.2 Μηχανισμός του Blout**

Οι Blout και Idelson<sup>22</sup> πρότειναν ένα μηχανισμό για ισχυρές βάσεις, σύμφωνα με το οποίο, το σταθερό καρβαμιδικό ανιόν εκκινεί και διαδίδει τον πολυμερισμό. Το καρβαμιδικό ανιόν, είναι ικανό να εκκινήσει πολυμερισμό, μέσω πυρηνόφιλης προσβολής στη θέση 5' και διάνοιξης δακτυλίου. Κατά την έναρξη του πολυμερισμού έχουμε πυρηνόφιλη προσβολή της ιοντικής μορφής του βασικού άλατος δηλαδή του ανιόντος μεθοξειδίου (CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup>), ακολουθούμενη από πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου. Σε αυτόν τον μηχανισμό δεν λαμβάνει χώρα απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα κατά την έναρξη του πολυμερισμού. Κατά την διάδοση του πολυμερισμού το καρβαμιδικό ανιόν συμπεριφέρεται ως ανιόν του μεθοξειδίου. Σε αυτό το βήμα απελευθερώνεται διοξείδιο του άνθρακα. Ο μηχανισμός βρίσκει εφαρμογή στα N-υποκατεστημένα και στα N-μη υποκατεστημένα NCAs. Επειδή όμως τα ενεργά καρβαμιδικά άκρα είναι ασθενέστερα πυρηνόφιλα σε σχέση με τα αντίστοιχα αμινοτελικά, ο μηχανισμός αυτός είναι λιγότερο πιθανός. Εξαρτάται όμως από τις συνθήκες της αντίδρασης όπως η θερμοκρασία και το pH αφού τόσο η πρωτονίωση όσο και η αποκαρβοξυλίωση είναι αντιστρεπτές αντιδράσεις.

### Στάδιο έναρξης



### Στάδιο διάδοσης

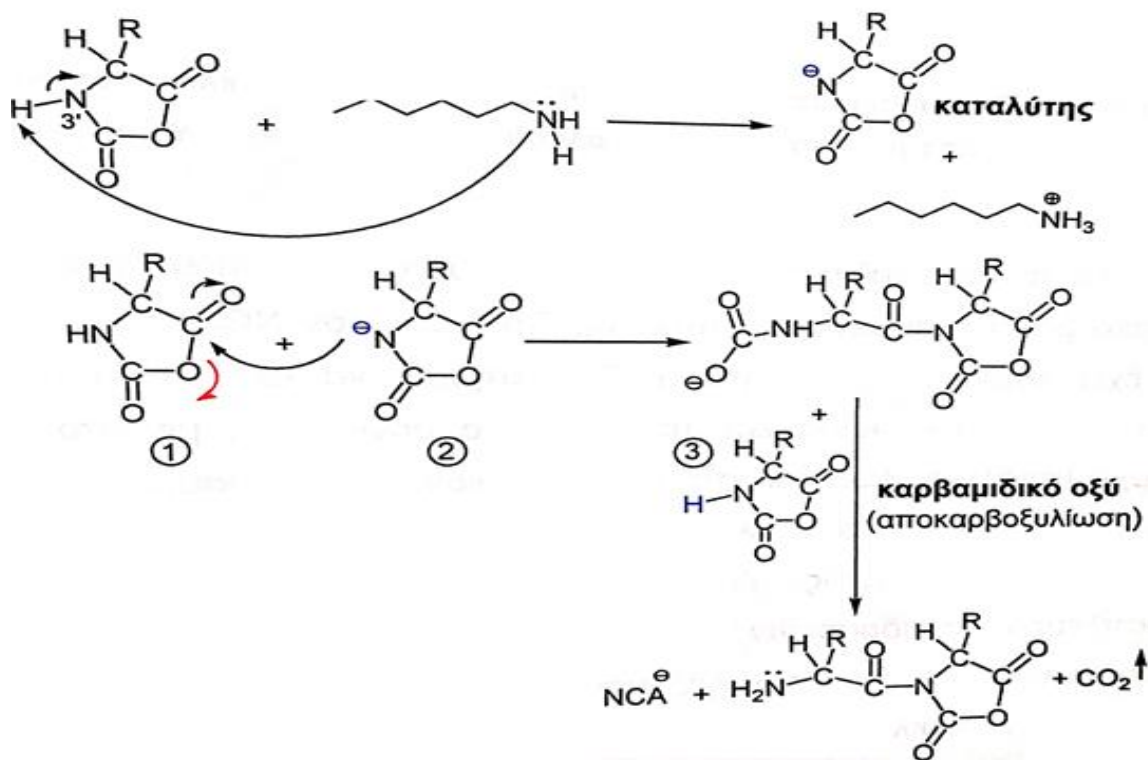


Σχήμα 15: Μηχανισμός του Blout

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

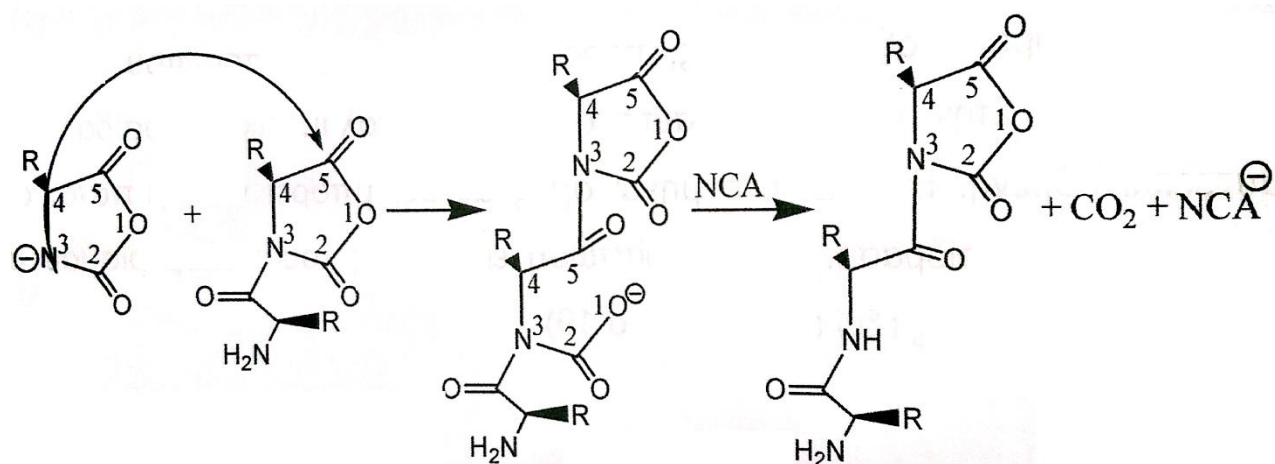
#### 2.3.1.3 Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς

Στην περίπτωση των τριτοταγών αμινών καθώς και σε δευτεροταγείς αμίνες υψηλής βασικότητας πιστεύεται ότι ο μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς<sup>23</sup> συνυπάρχει με τον κανονικό μηχανισμό πολυμερισμού. Αρχικά στο στάδιο πριν την έναρξη, ο απαρχητής δρα ως βάση απομακρύνοντας το πρωτόνιο από το N του NCA σχηματίζοντας το αντίστοιχο ανιόν. Στον μηχανισμό αυτό ο απαρχητής δρα ως καταλύτης και όχι ως μια ένωση έναρξης του πολυμερισμού. Συνεπάγεται λοιπόν ότι ο μηχανισμός αυτός μπορεί να δράσει μόνο σε μη υποκατεστημένους στο N καρβοξυανυδρίτες. Στο στάδιο της έναρξης, ο απαρχητής είναι τελικά το ανιόν NCA που προκύπτει από το στάδιο της προέναρξης, το οποίο προσβάλλει το 5-CO, ακολουθούμενο από αντίδραση με άλλον NCA, δημιουργώντας ένα νέο ανιόν και απελευθερώνοντας CO<sub>2</sub>.



Σχήμα 16: Στάδιο προέναρξης και έναρξης στον μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς

Κατά το στάδιο της διάδοσης το διμερές που σχηματίστηκε προσβάλλεται από ένα άλλο ανιόν NCA για να δώσει τριμερές. Το ανιόν του NCA αναγεννάται σε κάθε αντίδραση. Χαρακτηριστικό του μηχανισμού είναι ότι δεν περιλαμβάνει ενσωμάτωση τμήματος του απαρχητή στην αλυσίδα και είναι 100 φορές ταχύτερος από τον κανονικό μηχανισμό.



Σχήμα 17: Στάδιο διάδοσης στον μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς

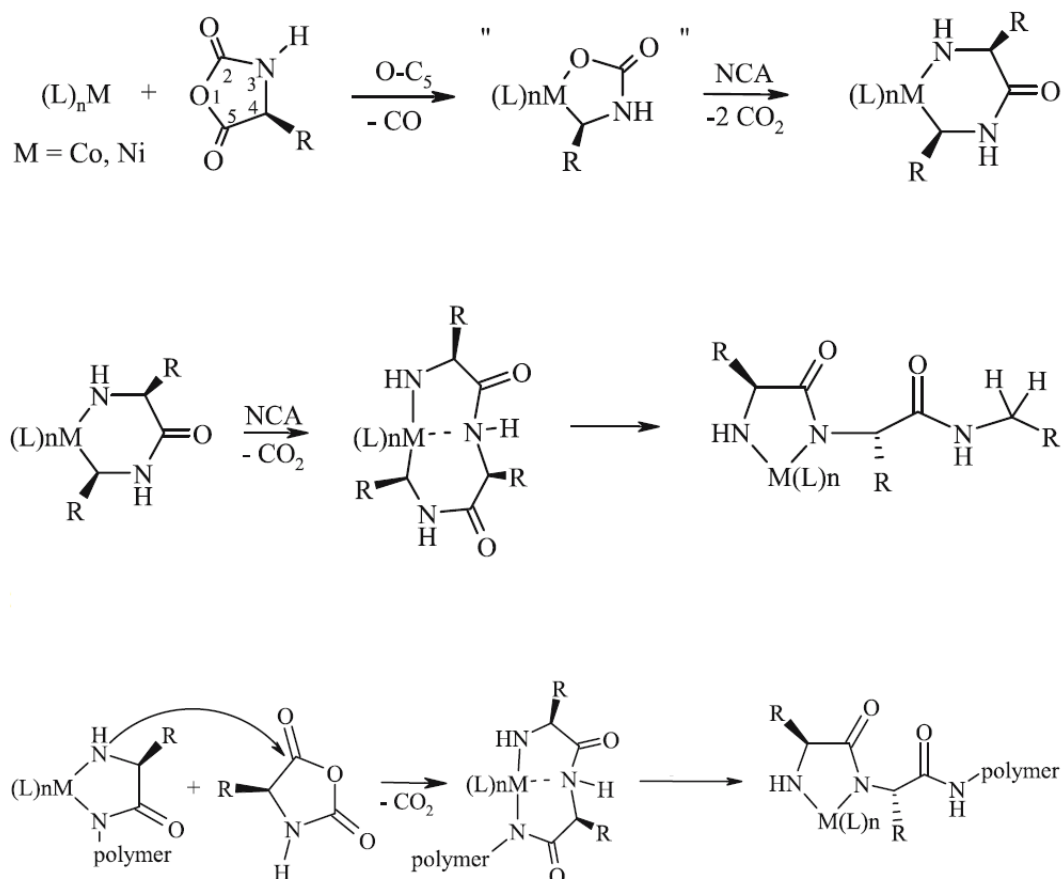
Τα πολυπεπτίδια που λαμβάνονται με αυτήν την μέθοδο έχουν υψηλό μοριακό βάρος και μεγάλη κατανομή, διότι το ανιόν NCA που αναγεννάται δεν έχει καμία

εκλεκτικότητα. Μπορεί δηλαδή να αντιδράσει είτε με την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε με ένα άλλο μονομερές. Ο μηχανισμός αυτός απέχει πολύ από το να χαρακτηριστεί ζωντανός. Τέλος υπάρχει πλήθος συνδυασμών πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων που τερματίζουν τον πολυμερισμό, όπως αντιδράσεις διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας, ισομερείωσης και ενδομοριακής κυκλοποίησης.

### **2.3.2 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με σύμπλοκα Στοιχείων Μετάπτωσης**

Οι προσπάθειες σύνθεσης υψηλού μοριακού βάρους ομοπολυμερών και συμπολυμερών με ελεγχόμενα μοριακά χαρακτηριστικά και στενή κατανομή μοριακού βάρους ήταν ανεπιτυχείς, εξαιτίας των ανεπιθύμητων πλευρικών αντιδράσεων, μέχρι το 1997. Τότε ο Deming ανακάλυψε μια νέα στρατηγική για τον πολυμερισμό των NCAs. Ο Deming χρησιμοποίησε απαρχητές των NCA βασισμένους σε οργανομεταλλικές ενώσεις, οι οποίες μπορούσαν να ξεπεράσουν τις αντιδράσεις τερματισμού. Οι απαρχητές που χρησιμοποίησε ήταν μηδενικού σθένους σύμπλοκα του νικελίου και του κοβαλτίου  $\text{bpyNi}(\text{COD}) (\text{PMe}_3)_4\text{Co}^{24}$ . Έτσι συνέθεσε ομοπολυμερή και συμπολυμερή με προβλεπόμενα μοριακά χαρακτηριστικά και μικρές κατανομές μοριακού βάρους. Και τα δύο αυτά μέταλλα αντιδρούν με μονομερή NCA ώστε να επιτύχουν με οξειδωτική προσθήκη μεταλλοκυκλικές ενώσεις. Στην συνέχεια αυτές αντιδρούν με ένα δεύτερο NCA για να δώσουν μια εξαμελή αμιδοαλκυλική μεταλοκυκλική ένωση. Αυτή αντιδρά με ένα επόμενο NCA και απελευθερώνει  $\text{CO}_2$ . Αποτέλεσμα αυτού είναι μια μεγάλη μεταλοκυκλική ένωση και μέσω μετανάστευσης ενός αμιδικού πρωτονίου στην καρβομεταλική ένωση, παράγεται μια πενταμελής ένωση, που είναι το ενεργό ενδιάμεσο του πολυμερισμού.

Η διάδοση του πολυμερισμού προχωρά μέσω αυτής της πενταμελής ένωσης με προσβολή της πυρηνόφιλης αμιδικής ομάδας στο ηλεκτρονιόφιλο 5-CO του NCA. Έτσι αναγεννάται το ενεργό ενδιάμεσο του πολυμερισμού με απόσπαση  $\text{CO}_2$  και μετανάστευση πρωτονίου. Με αυτούς τους οργανομεταλλικούς απαρχητες παίρνουμε ομοπολυμερή και συμπολυμερή με στενές κατανομές μοριακών βαρών και ελεγχόμενα μοριακά χαρακτηριστικά.



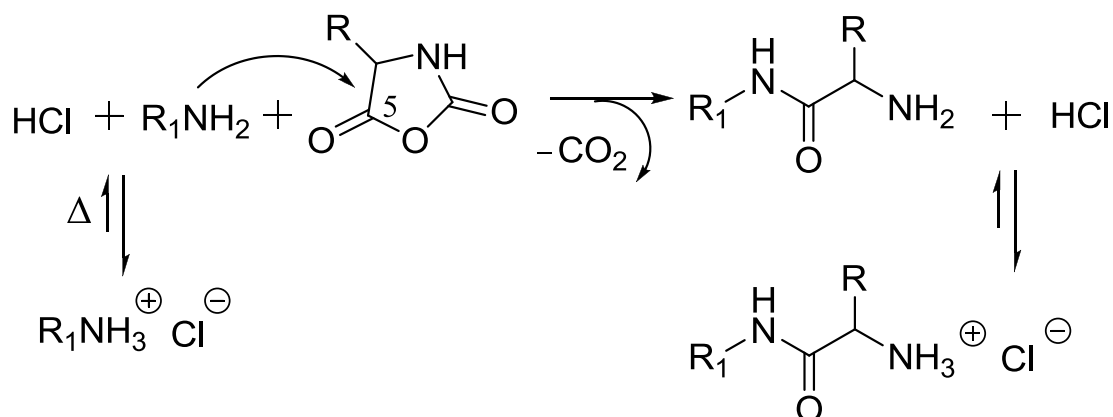
**Σχήμα 18: Μηχανισμός για την σύνθεση πολυπεπτιδίων με σύμπλοκα μετάπτωσης**

Ένα βασικό μειονέκτημα αυτού του μηχανισμού είναι η παρουσία των μετάλλων στα τελικά πολυπεπτιδία. Οπότε απαιτείται η επισταμένη απομάκρυνση του μετάλλου από το τελικό πολυμερές, κάτι που δεν είναι ούτε εύκολο ούτε ποσοτικό. Πρακτικά λοιπόν μειώνεται η χρησιμότητα των πολυπεπτιδίων αυτών και οι εφαρμογές τους, αφού ο κυριότερος λόγος σύνθεσης τέτοιων πολυμερών είναι η βιοσυμβατότητα τους.

### 2.3.3 Πολυμερισμός με υδροχλωρικές αμίνες

Μια άλλη προσέγγιση στον πολυμερισμό των NCA αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Schlaad<sup>25</sup> το 2003. Χρησιμοποίησε υδροχλωρικά άλατα πρωτοταγών αμινοτελικών μακροαπαρχητών. Η προσθήκη πρωτονίων στο σύστημα εμποδίζει τον σχηματισμό των ανιόντων NCA και έτσι η επαναπρωτονίωση των ανιόντων NCA είναι ταχύτερη από την πυρηνόφιλη προσβολή σε άλλο μονομερές NCA. Όπως αναφέρει, οι μεγάλες τιμές στην πολυδιασπορά οφείλονται στο ότι ο πολυμερισμός των NCA's υποφέρει από παράπλευρες αντιδράσεις, η πιο συνηθισμένη εκ των οπαίων είναι η διαδικασία του

ενεργοποιημένου μονομερούς. Συνεπώς κατά την διάρκεια του πολυμερισμού, η αλυσίδα αναπτύσσεται αλλάζοντας συνεχώς μεταξύ των δυο μηχανισμών, της κανονικής πορείας και του ενεργοποιημένου μονομερούς. Ο πολυμερισμός που προτείνει έχει ως διαλύτη DMF και συμβαίνει σε θερμοκρασία 40-80°C. Έτσι ο Schlaad συνέθεσε δισυσταδικά συμπολυμερή με μικρή κατανομή μοριακών βαρών χρησιμοποιώντας πολυστυρένιο με υδροχλωρικό άλας πρωτοταγούς αμινοτελικού μακροαπαρχητή.



Σχήμα 19: Πολυμερισμός με υδροχλωρικές αμίνες

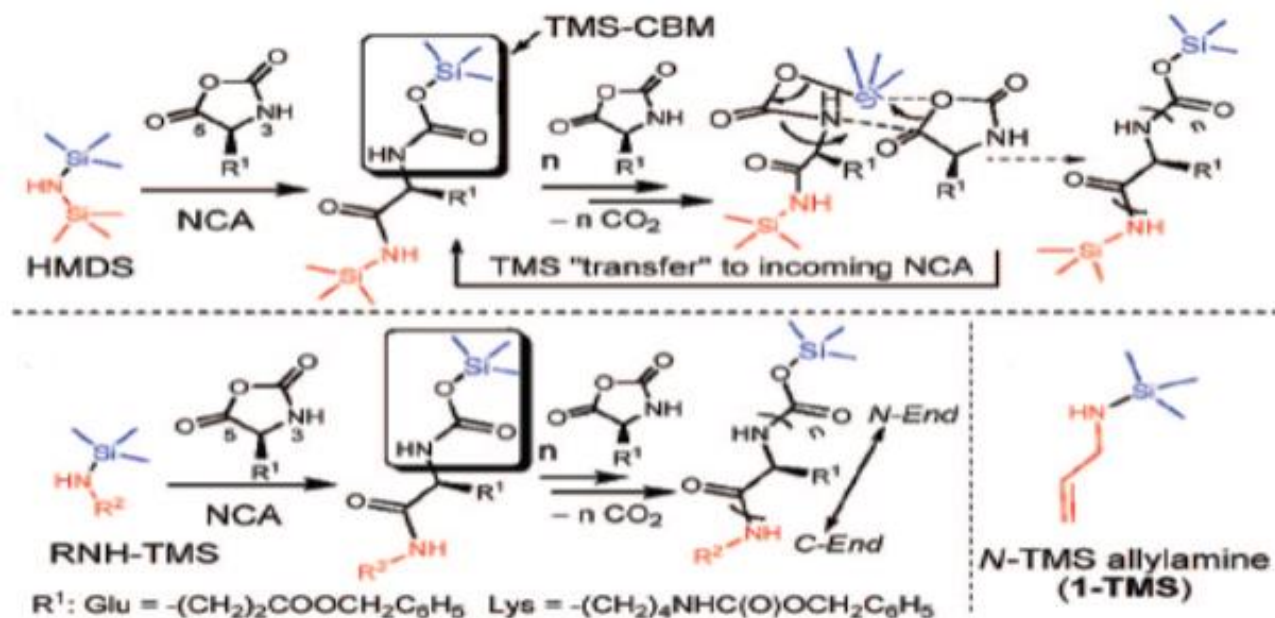
Ο μηχανισμός αυτός παρά τα πλεονεκτήματα της απλότητας και των μη απαιτητικών συνθηκών καθώς και της μικρής κατανομής, δεν μπορεί να θεωρηθεί ζωντανός. Αυτό συμβαίνει για τους παρακάτω λόγους :

1. Είναι αναγκαία η απομάκρυνση του μακροαπαρχητή που δεν αντέδρασε
2. Η απόδοση της αντίδρασης κυμαίνεται 69-76% ανάλογα το μοριακό βάρος
3. Δεν είναι εφικτή η σύνθεση κατά συστάδες συμπολυμερών με διαδοχική προσθήκη μονομερών

#### 2.3.4 Πολυμερισμός με τριμεθυλοπυριτικές αμίνες

Το 2007 ο Cheng<sup>26</sup> πρότεινε ένα σύστημα με την χρήση του εξαμεθυλοδισυλαζανίου (HDMS) για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των N-καρβοξυανυδριτών. Ένα μοναδικό τριμεθυλοπυριτικό καρβαμιδικό (TMS-CBM) μέσο διάδοσης είναι ο τρόπος που εξελίσσεται αυτός ο πολυμερισμός, βασικό κομμάτι του οποίου είναι το σπάσιμο του δεσμού Si-N του εξαμέθυλοδισυλαζανίου κατά την έναρξη. Η προκύπτουσα τριμεθυλοπυριτική (TMS) αμίνη, ως δευτεροταγής αμίνη, ανοίγει τον δακτύλιο του NCA στην θέση

5 προς σχηματισμό TMS-αμιδίου στον τελικό άνθρακα, ενώ ταυτόχρονα, ως βάση αποπρωτονιώνει στην θέση 3-N, και στον N-τελικό άνθρακα σχηματίζεται η ομάδα που διαδίδει τον πολυμερισμό. Κατά την διάδοση γίνεται μεταφορά της τριμεθυλοπυριπτικής ομάδας από τον τελικό άνθρακα στο εισερχόμενο μονομερές προς σχηματισμό νέου TMS-CBM.



Σχήμα 20: Πολυμερισμός με τριμεθυλοπυριπτικές αμίνες

Με το σύστημα αυτό η ομάδα του Cheng παρασκεύασε ομοπολυπεπτίδια και δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια με ελεγχόμενα μοριακά βάρη, με ικανοποιητικές κατανομές μοριακών βαρών (~1,2) και υψηλές αποδόσεις (>99%). Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η εισαγωγή δραστικών ομάδων στο C-τελικό άκρο του πολυπεπτιδίου με την χρήση κατάλληλων αμινών.

### 2.3.5 Μακρομοριακή Σύνθεση με πρωτοταγείς Αμίνες και Τεχνικές Υψηλού Κενού

Το 2004 η ομάδα του Εργαστηρίου Πολυμερών του Πανεπιστημίου της Αθήνας ανέφερε τον πρώτο ζωντανό πολυμερισμό των NCAs. Χρησιμοποίησε τις τεχνικές υψηλού κενού<sup>27</sup>, οι οποίες είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές εξαιτίας της απομάκρυνσης ακαθαρσιών όπως το νερό, οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα κ.τ.λ. Επίσης εξήλθε το συμπέρασμα ότι ο πυρηνόφιλος μηχανισμός αμίνης είναι αυτός που λαμβάνει χώρα. Όπως είναι γνωστό ο πυρηνόφιλος μηχανισμός αμίνης έχει ορισμένα αδύναμα σημεία τα οποία είναι η ευαισθησία του σε ακαθαρσίες όπως τα υδροχλωρικά άλατα και τα ακυλοχλωρίδια των α-



αμινοξέων που οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού αλλά και σε ενάρξεις πολυμερισμών εξαιτίας αμινών αλλά και του νερού. Επίσης η ύπαρξη CO<sub>2</sub> που απελευθερώνεται κατά τον πολυμερισμό μειώνει την κινητική του πολυμερισμού. Οπότε οι τεχνικές υψηλού κενού θα ήταν οι κατάλληλες για να υπερβούμε αυτά τα εμπόδια<sup>28</sup>. Εφαρμόζοντας τις τεχνικές υψηλού κενού, τα χαμηλού σημείου βρασμού αντιδραστήρια όπως το DMF και n-εξυλαμίνη καθαρίζονται απολύτως. Επίσης το DMF αποστάζεται στην γραμμή κενού σε τρία κλάσματα ώστε να απαλλαχθεί από ίχνη διμεθυλαμίνης. Επίσης η καθαρότητα των μονομερών είναι ιδιαίτερα σημαντική. Κάθε άλλη πρόσμιξη που μπορεί να υπάρχει κατά την σύνθεση των NCA πρέπει να απομακρυνθεί. Η απόδειξη της καθαρότητας του συστήματος σε συνθήκες κενού είναι η επ'αόριστον διατήρηση του διαλύματος NCA-DMF χωρίς τον πολυμερισμό του ή την αποσύνθεση του<sup>29</sup>.

Ένας παράγοντας κλειδί για τον ζωντανό πολυμερισμό των NCA, είναι η απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> που παράγεται κατά την διάδοση του πολυμερισμού. Η διαλυτότητα του CO<sub>2</sub> στο DMF είναι μικρή σε σύγκριση με αυτή άλλων διαλυτών<sup>30</sup> που χρησιμοποιούνται για τον πολυμερισμό των NCAs και η δραστηριότητα προς τις βάσεις είναι μεγαλύτερη στο DMF σε σχέση με άλλους διαλύτες<sup>31</sup>. Οπότε η αποκαρβοξυλίωση του καρβαμιδικού οξέος δεν συμβαίνει ακαριαία, και κάποια ενεργά μόρια παραμένουν ως έχουν ή σχηματίζουν άλατα με τις ενεργές αμίνες. Και στις δυο περιπτώσεις οι σχηματιζόμενες ενώσεις παραμένουν ανενεργές και οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού ή μη ολοκληρωμένους πολυμερισμούς. Μη ολοκληρωμένοι πολυμερισμοί παρατηρήθηκαν όταν οι συσκευές πολυμερισμού είχαν μικρότερο όγκο από αυτόν του CO<sub>2</sub> που παράγεται κατά τον πολυμερισμό. Χρησιμοποιώντας μεγαλύτερες συσκευές πολυμερισμού συνδεδεμένες στην γραμμή κενού και απομακρύνοντας σταδιακά το παραγόμενο αέριο, πετυχαίνουμε τον ζωντανό πολυμερισμό των NCA.

Με αυτές τις μεθόδους η ομάδα στο εργαστήριο μας πέτυχε να συνθέσει ομοπολυμερή και κατά συστάδες συμπολυμερή υψηλού μοριακού βάρους. Επίσης οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται για την σύνθεση περίπλοκων μακρομοριακών αρχιτεκτονικών<sup>32</sup> όπως γραμμικά πολυμερή με δυο και τρεις

συστάδες , καθώς και αστεροειδή ομοπολυμερή και αστεροειδή συμπολυμερή<sup>33</sup>.

### 2.3.6 «Ζωντανός» Πολυμερισμός

Ο έλεγχος της μακρομοριακής δομής έχει αποκτήσει εξαιρετικό ακαδημαϊκό και βιομηχανικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Το ενδιαφέρον αυτό προέρχεται αφενός μεν από τη διερεύνηση των σχέσεων που συνδέουν τη μακρομοριακή δομή και τις ιδιότητες των πολυμερών σε διάλυμα και σε στερεή κατάσταση, αφετέρου δε από τη συνειδητοποίηση, ότι η αλλαγή της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής μπορεί να οδηγήσει σε προϊόντα με νέες φυσικοχημικές ή/και μηχανικές ιδιότητες.

Οι τεχνικές «ζωντανού» πολυμερισμού, με κύριο χαρακτηριστικό την έλλειψη αντιδράσεων τερματισμού οδηγούν στη σύνθεση προϊόντων με καλό έλεγχο της μακρομοριακής δομής, στενή κατανομή μοριακών βαρών και μεγάλη ομοιογένεια σύστασης<sup>34</sup>. Η απόδειξη από το εργαστήριο μας ότι ο πολυμερισμός των NCAs α-αμινοξέων με πρωτοταγείς αλειφατικές αμίνες με την τεχνική του υψηλού κενού , προσεγγίζει τον ζωντανό χαρακτήρα , άνοιξε νέες προοπτικές για την σύνθεση καλά καθορισμένων συμπολυμερών πολυαμινοξέων και συμπολυμερών με περίπλοκη αρχιτεκτονική.

Για να χαρακτηριστεί ένας πολυμερισμός σαν «ζωντανός», θα πρέπει να ικανοποιούνται όλα τα παρακάτω κριτήρια:

1. Πλήρης πολυμερισμός του μονομερούς,
2. Γραμμικότητα του μοριακού βάρους με την απόδοση του πολυμερισμού,
3. Στοιχειομετρικός έλεγχος του μοριακού βάρους
4. Μικρή κατανομή μοριακών βαρών
5. Σύνθεση κατά συστάδες συμπολυμερών με την διαδοχική προσθήκη μονομερών.

Το μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό των πολυμερών προκαθορίζεται με ακρίβεια από τις ποσότητες του μονομερούς και του απαρχητή, σύμφωνα με

$$\text{την σχέση : } Mn = \frac{\text{gr μονομερούς}}{\text{moles απαρχητή}}$$

## 2.4 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Ιστιδίνη

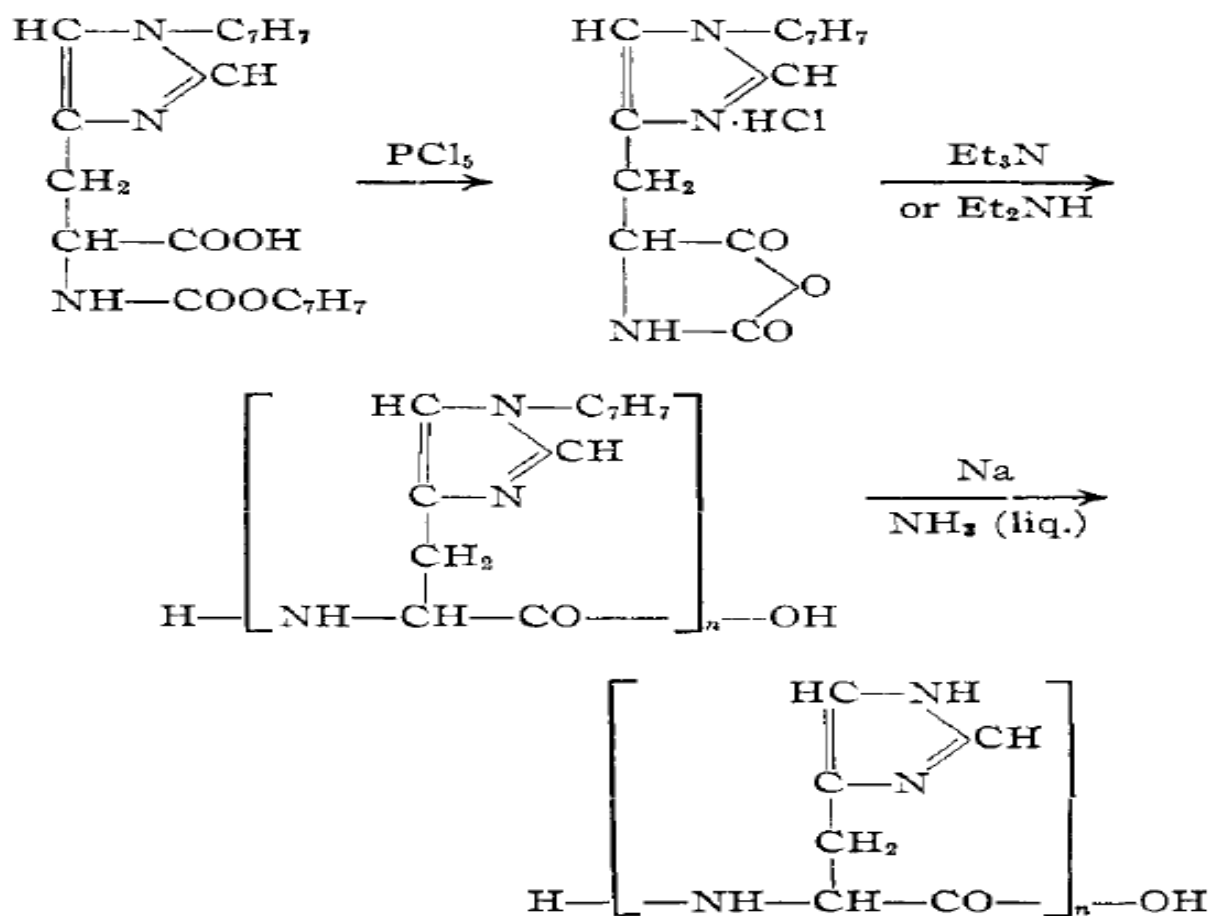
Η ιστοδίνη είναι ένα από τα πιο ενδιαφέροντα μόρια καθότι διαθέτει μια σειρά από ιδιότητες που την καθιστούν μοναδική. Αυτές οι ιδιότητες είναι που άνοιξαν το ενδιαφέρον για την εξέταση και την έρευνα της καθώς ο πολυμερισμός της θα μπορούσε να ανοίξει τον δρόμο σε νέες δυνατότητες και προοπτικές.

Ο ιμιδαζολικός της δακτύλιος της δίνει την δυνατότητα να μπορεί να φορτίζεται και να αποφορτίζεται όταν αλλάζει το pH. Οπότε η ιστοδίνη είναι ένα μόριο το οποίο έχει αποκρισιμότητα στο pH όταν πολυμεριστεί. Μπορεί να φτιάχνει ένα σταθερό πολυιοντικό συγκρότημα που συνδέεται με ένα αρνητικά φορτισμένο πολυμερές, όπως το DNA, ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια ή και ένζυμα. Μπορεί να σχηματίζει πολυμερικά μικκύλια που θα έχουν τη δυνατότητα να παγιδεύουν στον υδρόφοβο πυρήνα τους λιπόφιλα φάρμακα. Ταυτόχρονα με την αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της κατά την μεταβολή του pH θα μπορεί να απελευθερώνει το φάρμακο, όταν αλλάζουν οι εξωτερικές συνθήκες. Επίσης το γεγονός ότι σχηματίζει μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, την κάνει ένα ιδανικό μέσο για να χρησιμοποιηθεί για βιολογικούς και βιοφαρμακευτικούς σκοπούς. Η ικανότητα της να διαπερνά την εσωτερική μεμβράνη των όξινων υποκυτταρικών διαμερισμάτων, όπως τα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα, έχει αναπτύξει το ενδιαφέρον για το σχεδιασμό μη ιικών μέσων μεταφοράς γονιδίων. Με κατάλληλη επιλογή των μοριακών χαρακτηριστικών της θα μπορούσε να σχηματίσει ακόμα και κυστίδια, ενώ η συμμετοχή της σε πολύπλοκες αρχιτεκτονικές θα αύξανε το πιθανό πεδίο εφαρμογών της.

Παρά τις δυνατότητες που προκύπτουν από τον πολυμερισμό της ιστοδίνης τα εμπόδια στη σύνθεση περιόρισαν την εφαρμογή της. Ο σχηματισμός πολυπεπτιδίων με βάση την ιστοδίνη ξεκινά από το σχηματισμό του αντίστοιχου NCA του μορίου της, το οποίο και αποτελεί το μονομερές, για τον πολυμερισμό. Διάφορες προσπάθειες με διαφορετικές προστατευτικές ομάδες έλαβαν χώρα.

Η πρώτη προσπάθεια που αναφέρεται στην βιβλιογραφία είναι η προσπάθεια της ομάδας του Katchalski<sup>35</sup> το 1957, ο οποίος ενδιαφερόταν να εξετάσει τις ιδιότητες της ιστοδίνης σε μεγαλύτερα μοριακά της βάρη και κυρίως της ικανότητας της να συνδέεται με μέταλλα, ερευνώντας τον ρόλο που παίζει στις μεταλλοπρωτεΐνες. Χρησιμοποίησε την βένζυλο ομάδα για την προστασία του

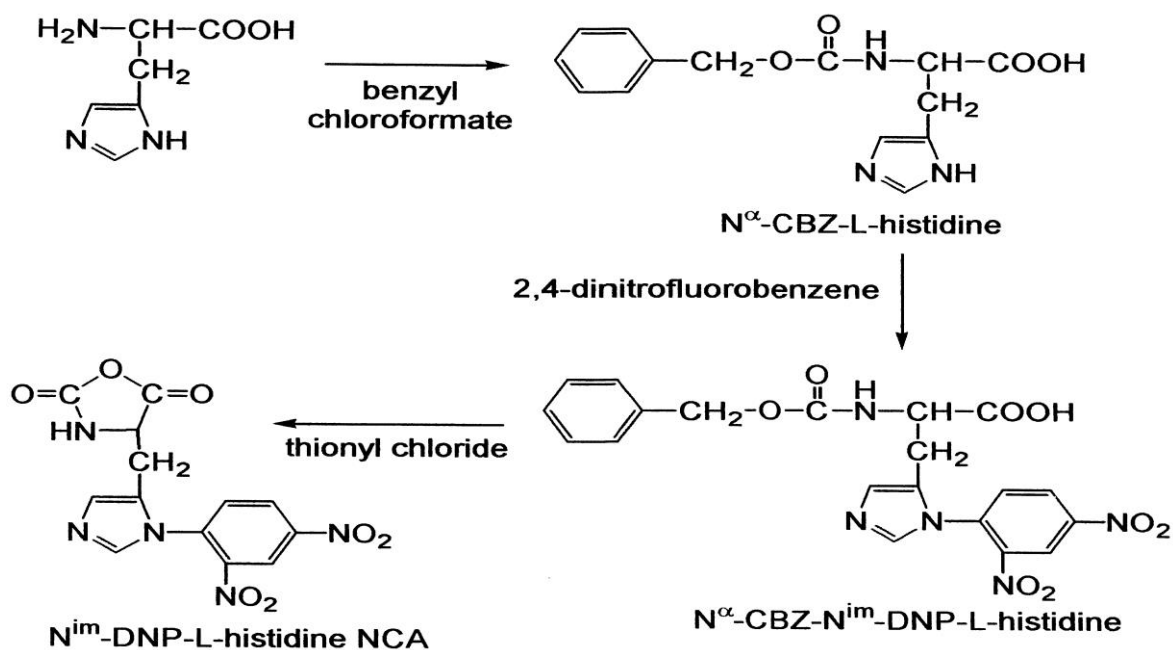
αζώτου στον ιμιδαζολικό δακτύλιο καθώς και για την προστασία του αζώτου δίπλα στον α-άνθρακα. Ξεκινώντας από την 1-βένζυλο-N-καρβοβενζοξυ-L-ιστιδίνη και αντιδρώντας την με πενταχλωριούχο φωσφόρο έφτιαξε τον αντίστοιχο N-καρβοξυανυδρίτη με απομάκρυνση της προστασίας στο άζωτο δίπλα στον α-άνθρακα. Ο διαλύτης ήταν το διοξάνιο ενώ απομάκρυνε το υδροχλώριο που παράγεται κατά την αντίδραση και σχηματίζει το αντίστοιχο αλάτι με χρήση τριαιθυλαμίνης και διήθηση του αδιάλυτου υδροχλωρικού αλατος του τριαιθυλοαμμωνίου. Ο πολυμερισμός έλαβε χώρα με διμεθυλαμίνη ή τριαιθυλαμίνη. Η απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας έγινε με αντίδραση με νάτριο σε υγρή αμμωνία. Με ανάλυση των τελικών ομάδων κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο βαθμός πολυμερισμού ήταν 15-50. Επίσης ανέφερε ότι δεν μπόρεσε να διώξει το νερό με ξήρανση υπό κενό. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχαν οι αργυρομετρικές τιτλοδοτήσεις καθώς και η εξάρτηση του pH από τον βαθμό ιοντισμού.



Σχήμα 21: Σύνθεση poly-L-histidine κατά τον Katchalski<sup>35</sup>

Από τότε διάφορα συνθετικά προβλήματα, τόσο με την προστασία του αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου όσο και την καθαρότητα του NCA, εμπόδισαν την περαιτέρω πρόοδο. Υπήρξαν αναφορές στην βιβλιογραφία για προσπάθειες σύνθεσης πολυιστιδίνης με μεθόδους στερεάς φάσης, αλλά το μοριακό βάρος στο οποίο έφτασαν ήταν μικρό.

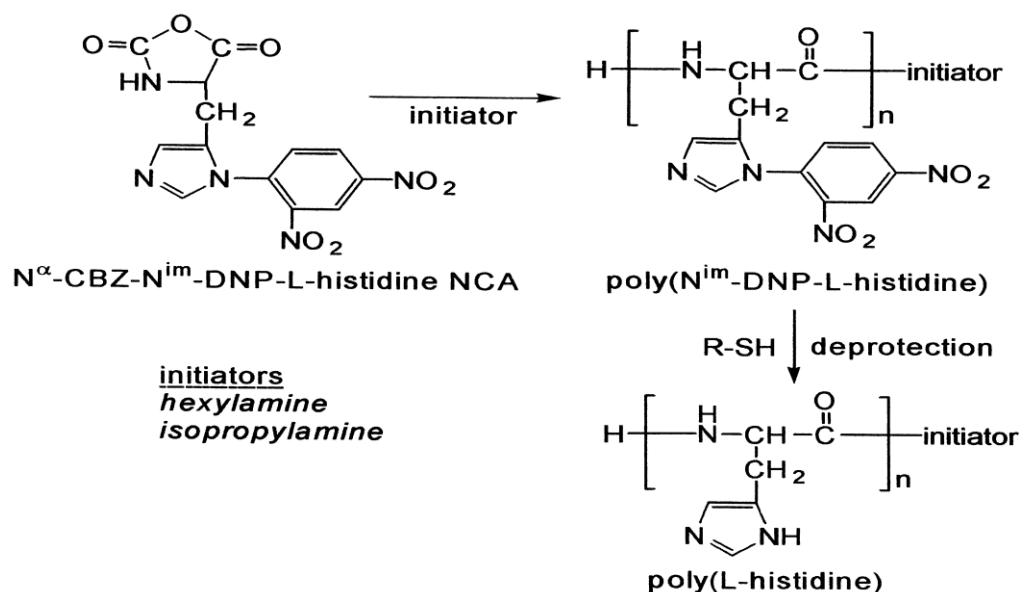
Το ενδιαφέρον στράφηκε το 2003 στον πολυμερισμό της ιστιδίνης με την προστατευτική ομάδα DNP<sup>36</sup>. Σε αυτήν την προσπάθεια ξεκινώντας από την L-ιστιδίνη, συντέθηκε η N-καρβοβένζοξυ-L-ιστιδίνη με αντίδραση με χλωροφορμικό βενζύλιο. Στην συνέχεια προστέθηκε η DNP προστατευτική ομάδα κατά την αντίδραση του προϊόντος του προηγούμενου βήματος με 2,4-δινιτροφθοροβενζόλιο. Τέλος έγινε η αντίδραση με θειόνυλο χλωρίδιο για την παραλαβή του αντίστοιχου NCA.



Σχήμα 22: Πορεία για την σύνθεση του NCA ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP<sup>36</sup>

Ακολούθησε ο πολυμερισμός του μονομερούς χρησιμοποιώντας ως απαρχητή εξυλαμίνη ή ισοπροπυλαμίνη σε διαλύτη άνυδρο DMF. Ο πολυμερισμός έγινε σε θερμοκρασία δωματίου με απελευθέρωση CO<sub>2</sub>. Η αποπροστασία έγινε με μερκαπτοαιθανόλη, η οποία προστέθηκε σε διάλυμα του πολυμερούς σε DMF. Με αυτή την προστατευτική ομάδα, αν και η αποπροστασία γίνεται εύκολα, δεν αποφεύγεται η ρακεμείωση του πολυμερούς. Επίσης αποκλείεται η χρήση της

σε οποιαδήποτε δομή φέρει δισουλφιδικούς δεσμούς γιατί η μερκαπτοαιθανόλη σπάει τον δεσμό θείο-θείο.



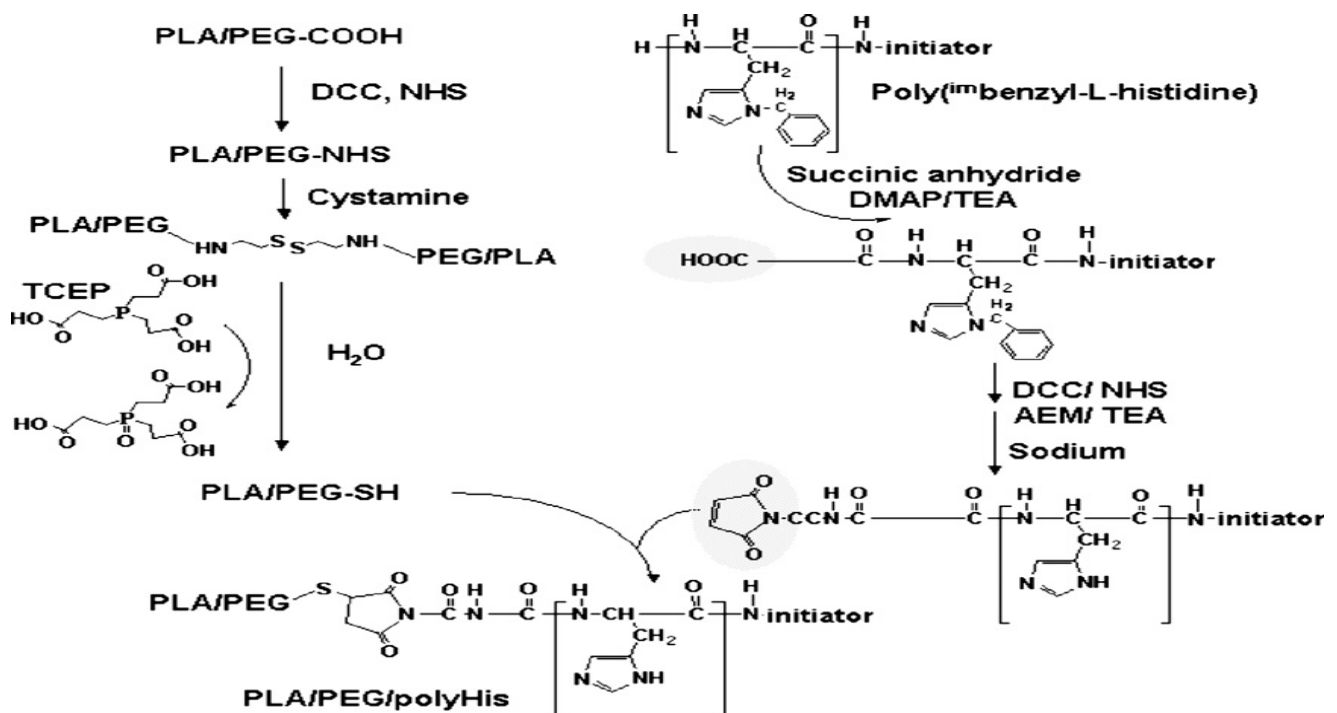
Σχήμα 23: Πολυμερισμός του NCA ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP<sup>36</sup>

Η σύνθεση συμπολυμερών ιστιδίνης με πολυαιθυλενοξειδίο σε μια χωριστή συστάδα δημιούργησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ιδιαίτερα σημαντική είναι στην βιβλιογραφία η σύνθεση του συμπολυμερούς πολύ(αιθυλενοξειδίο)-b-(πολυιστιδίνη-co-πολυφαινυλαλανίνη) το οποίο έχει την ικανότητα να σχηματίζει μικκύλια και να μεταφέρει φαρμακα<sup>37</sup>. Αρχικά συντέθηκε ο NCA της ιστιδίνης από την 1-βένζυλο-N-καρβοβενζοξυ-L-ιστιδίνη με πενταχλωρίδιο του φωσφόρου και διαλύτη 1,4-διοξάνιο. Η L-φαινυλαλανίνη μετατράπηκε με αντίδραση με τριφωσγένιο στον αντίστοιχο NCA σε διαλύτη 1,4 διοξάνιο. Η απομάκρυνση του υδροχλωρίου από τον NCA της ιστιδίνης έγινε με την προσθήκη τριαιθυλαμίνης και τον επακόλουθο σχηματισμό του αντίστοιχου αδιάλυτου υδροχλωρικού άλατος του τριαιθυλοαμμωνίου. Στην συνέχεια οι δυο NCAs αναμίχθηκαν σε διάφορες αναλογίες και το μίγμα πολυμερίστηκε σε DMF χρησιμοποιώντας ισοπροπυλαμίνη ως απαρχητή.

Επόμενο βήμα ήταν η προετοιμασία του πολυαιθυλενοξειδίου. Συντέθηκε ένα μίγμα από μονοκαβοξυλιομένο και δικαβοξυλιομένο πολυαιθυλενοξειδίο και με την χρήση στήλης απομονώθηκε το πρώτο. Με την χρήση NHS και DCC το μονοκαβοξυλιομένο πολυαιθυλενοξειδίο ενεργοποιήθηκε και στην συνέχεια προστέθηκε το συμπολυμερές πολυιστιδίνη-co-πολυφαινυλαλανίνη. Η αντίδραση έγινε σε DMSO. Ακολούθησε η αποπροστασία της βένζυλο ομάδας

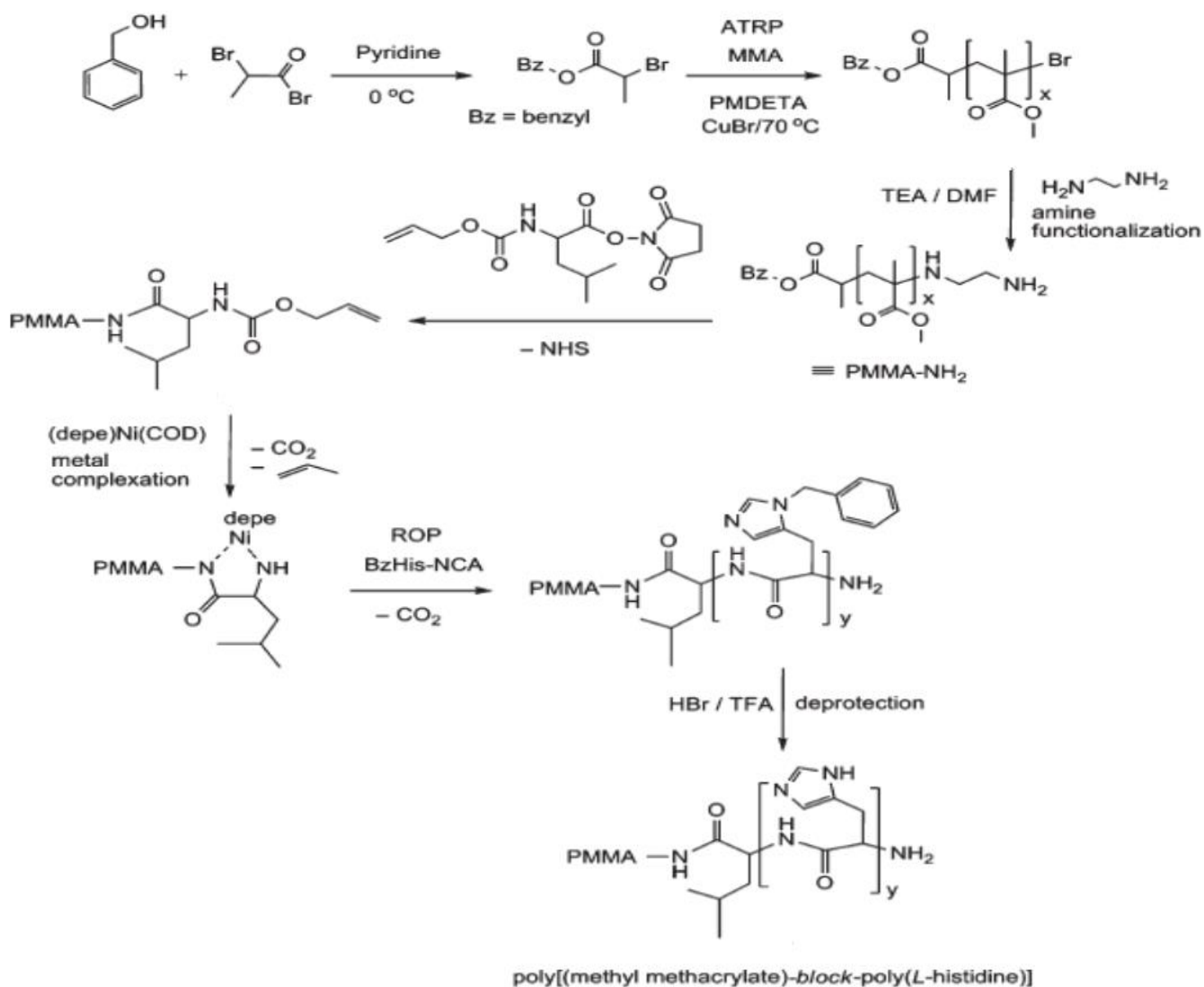
της ιστιδίνης με μεταλλικό νάτριο σε υγρή αμμωνία. Σύμφωνα με αυτήν την εργασία σχηματίστηκαν μικκύλια με αυτά τα πολυμερή και έγινε μελέτη της μεταβολής του pKa ανάλογα με το ποσοστό της φαινυλαλανίνης με τιτλοδοτήσεις.

Ακολούθησε η σύνθεση τρισυπολυμερούς<sup>38</sup> πολύ(L-γαλακτικό οξύ)-b-πολυαιθυλενοξείδιο-b-πολύ(L-ιστιδίνη) το οποίο σχηματίζει μικκύλια με αποκρισιμότητα σε pH. Χρησιμοποιήθηκε πολύ(βένζυλο-L-ιστιδίνη) όπου και έγινε τροποποίηση της ακραίας αμινομάδας με ηλεκτρικό ανυδρίτη, 4-διμεθυλάμινοπυριδίνη και τριαιθανολαμίνη σε DMF. Έτσι είχαμε την μετατροπή της ακραίας αμινομάδας σε καρβοξυλομάδα. Για να μετατρέψουμε την ακραία καρβοξυλομάδα σε N-(2-αμινοαιθυλο) μαλεϊμίδιο ομάδα χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση NHS και DCC. Στην συνέχεια προστέθηκε N-(2-αμινοαιθυλο) μαλεϊμίδιο τριφθοροξικό άλας και τριαιθανολαμίνη, ενώ με μεταλλικό νάτριο έλαβε χώρα η αποπροστασία. Το συμπολυμερές πολύ(L-γαλακτικό οξύ)-b-πολυαιθυλενοξείδιο ενεργοποιήθηκε με NHS και DCC και με προθήκη κυσταμίνης προστέθηκαν δισουλφιδικοί δεσμοί. Τέλος έγινε η σύζευξη των δυο προϊόντων για την παραλαβή του τελικού πολυμερούς. Διαπιστώθηκε ότι σχηματίστηκαν μικκύλια ενώ παράλληλα έλαβαν χώρα μελέτες για την δέσμευση και την αποδέσμευση φαρμάκου.



Σχήμα 24: Σύνθεση πολύ(L-γαλακτικό οξύ)-b-πολυαιθυλενοξείδιο-b-πολύ(L-ιστιδίνη)<sup>38</sup>

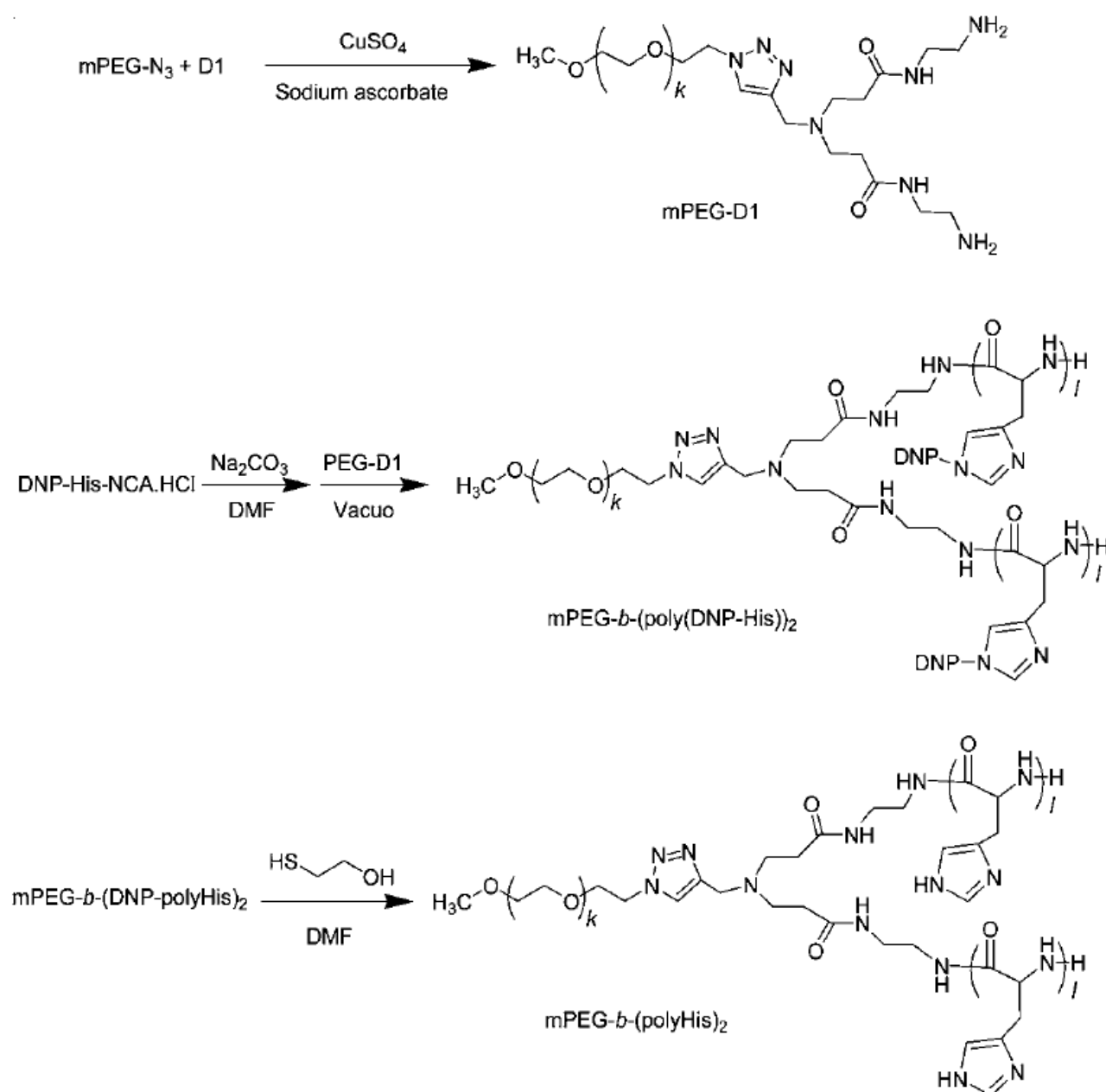
Επόμενη αξιολογή μελέτη ήταν και η σύνθεση πολύ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)-b-πολύ(L-ιστιδίνη) συνδυάζοντας τους πολυμερισμούς ATRP και ROP<sup>39</sup>. Αρχικά πολυμερίστηκε ο μεθακρυλικός μεθυλεστέρας ακολουθώντας την τυπική διαδικασία του ATRP. Στην συνέχεια και με χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων προστέθηκαν ομάδες οι οποίες διαμόρφωσαν τον κατάλληλο μακροαπαρχητή για τον πολυμερισμό του NCA της βένζυλο-ιστιδίνης με ROP. Εξετάστηκαν οι δυνατότητες αυτοοργάνωσης αυτού του πολυμερούς όπου η συστάδα του μεθακρυλικού παίζει τον ρόλο του υδρόφοβου κομματιού στο μικκύλιο και η συστάδα της ιστιδίνης του υδρόφιλου. Σχηματίστηκαν κυκλικά μικκύλια με την παρουσία AgNO<sub>3</sub> όπου στον πυρήνα βρέθηκε το κομμάτι της πολυιστιδίνης, ενώ ο μεθακρυλικός ήταν έξω από αυτόν. Επίσης το μέγεθος των μικκυλίων μπορεί να ελεγχθεί από την θερμοκρασία μικυλλίωσης.



Σχήμα 25: Σύνθεση πολύ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)-b-πολύ(L-ιστιδίνη)<sup>39</sup>

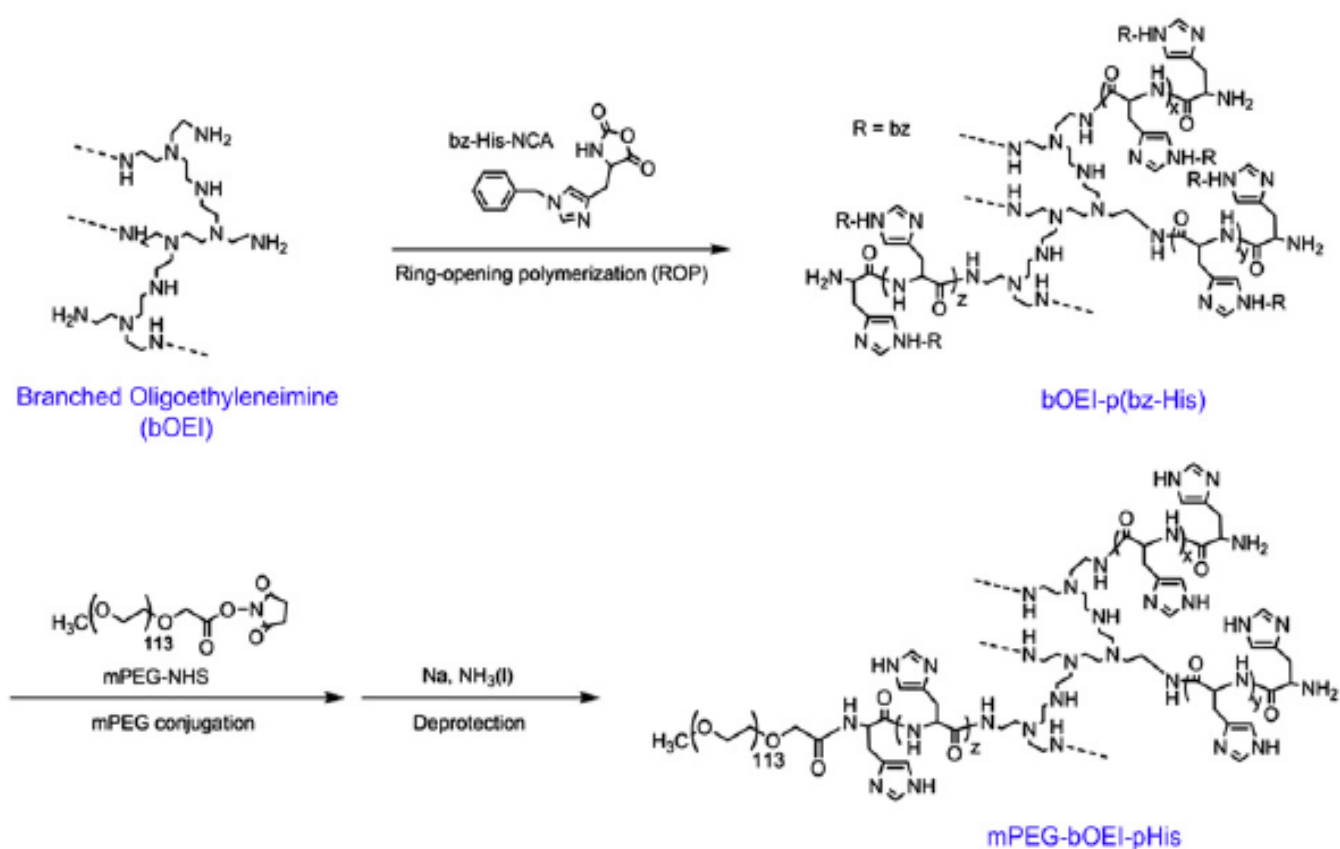


Ακολούθησε μια μελέτη όπου έγινε συνδυασμός του ROP με την χημεία click<sup>40</sup>. Χρησιμοποιήθηκε πολυαιθυλενοξειδίο με ακραία αζιδοομάδα στο οποίο με εφαρμογή της χημείας click προστέθηκε μια τριδραστική δενδρικού τύπου πολυαμιδοαμίνη με προσαρμοσμένο έναν τριπλό δεσμό. Στην συνέχεια ακολούθησε πολυμερισμός ROP της ιστιδίνης με DNP προστατευτική ομάδα και αποπροστασία αυτής με 2-μερκαπτοαιθανόλη. Οι αντιδράσεις έγιναν υπό ροή αζώτου. Σχηματίστηκαν δομές σε νανοκλίμακα με δέσμευση φαρμάκου.



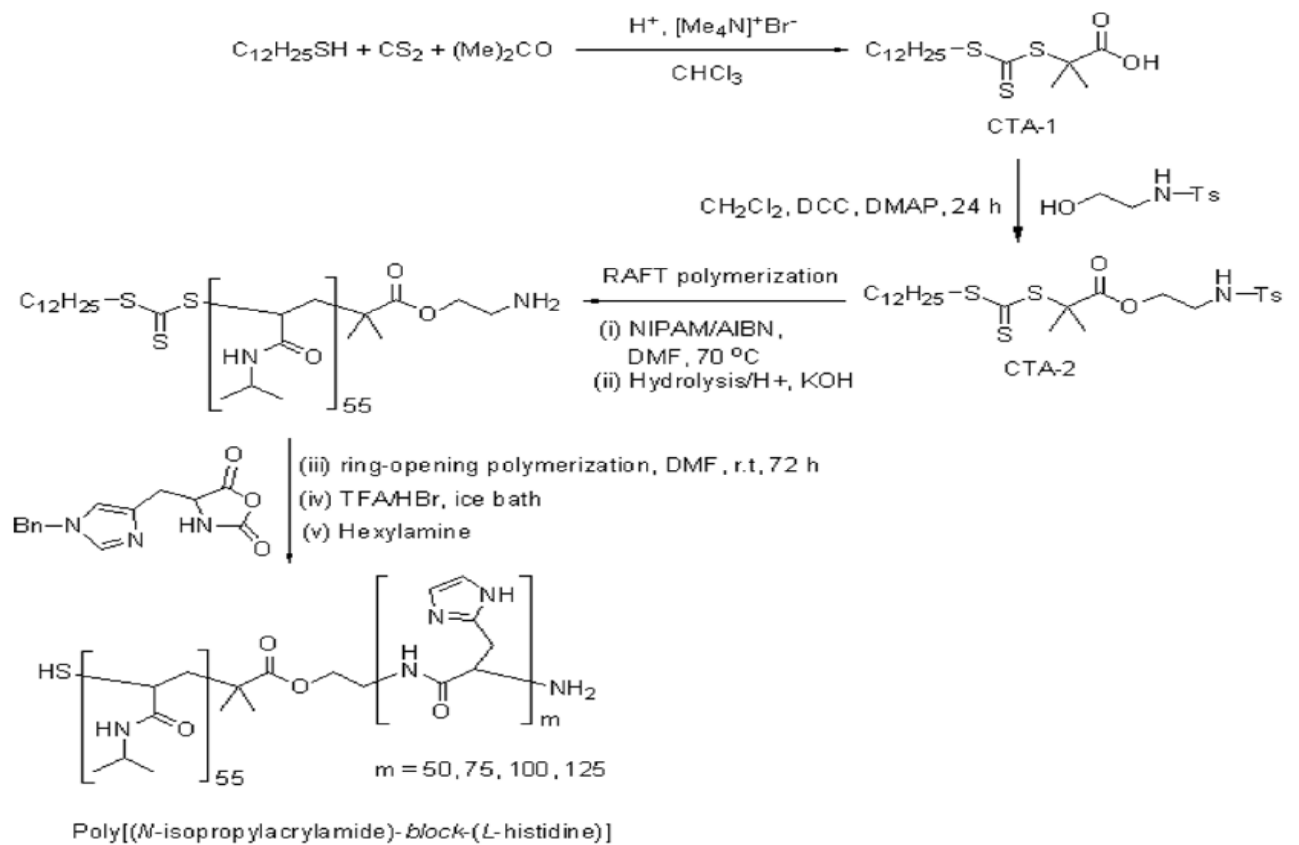
Σχήμα 26: Πολυμερισμός ιστιδίνης σε συνδυασμό με χημεία click<sup>40</sup>

Μια νέα μελέτη στην οποία είχαμε πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης εμφανίστηκε το 2012<sup>41</sup>. Σύμφωνα με αυτή, έλαβε χώρα η χρήση διακλαδισμένων ολιγοαιθυλενοϊμινών όπου οι ακραίες αμινομάδες εκκινούν τον πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης, ο οποίος έχει την βένζυλο προστασία. Ακολουθεί η σύζευξη με πολυαιθυλενοξειδίο, ενώ στο τέλος έχουμε την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας. Σχηματίστηκαν έτσι μικροσφαίρες που μπορούσαν να μεταφέρουν ινσουλίνη.



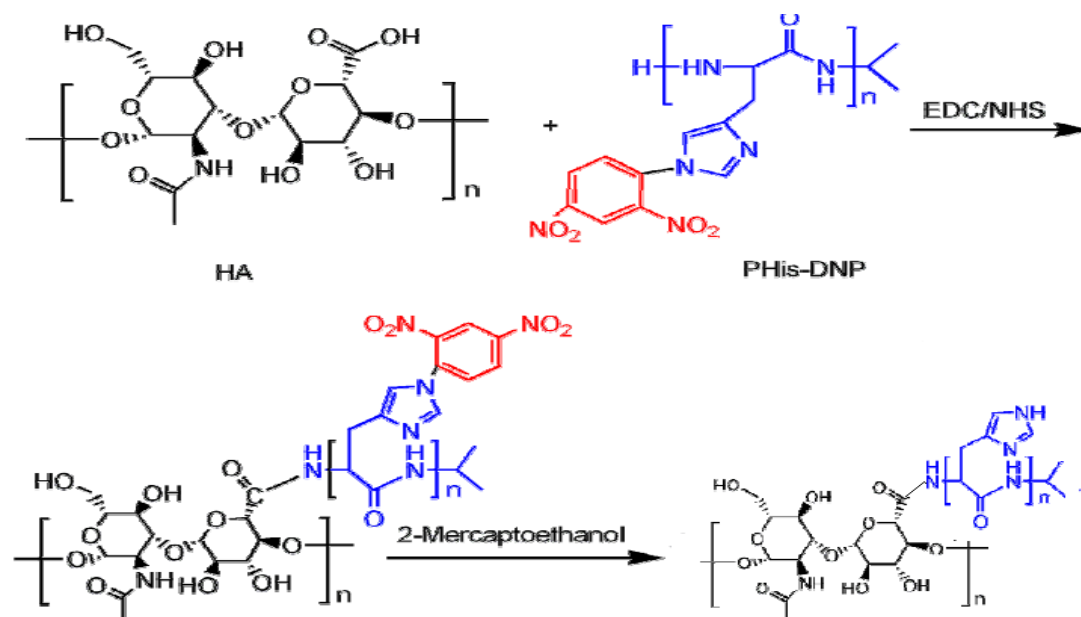
Σχήμα 27: Πολυμερισμός ιστιδίνης με σχηματισμό διακλαδισμένων πολυμερών<sup>41</sup>

Πρόσφατα μια νέα εργασία παρουσίασε τον πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης, φτιάχνοντας συμπολυμερή με την χρήση των πολυμερισμών RAFT και ROP<sup>42</sup>. Αρχικά με την χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων για τον RAFT πολυμερισμό πολυμερίστηκε το N-ισοπρωπυλοακρυλαμίδιο και στην συνέχεια συμπολυμερίστηκε ο NCA της ιστιδίνης με την βένζυλο προστασία. Ακολούθησε η αποπροστασία της βένζυλο ομάδας. Σχηματίστηκαν σφαιρικά μικκύλια που ανταποκρίνονταν τόσο στην αλλαγή του pH όσο και της θερμοκρασίας.



Σχήμα 28: Συμπολυμερισμός ιστιδίνης με συνδυασμό πολυμερισμών RAFT και ROP<sup>42</sup>

Τελευταίες μελέτες<sup>43</sup> αφορούν το πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP και σύζευξη του με υαλουρονικό οξύ. Τέτοια πολυμερή μπορούν να σχηματίζουν μικκύλια και να φέρουν αντικαρκινικά φάρμακα, που τα απελευθερώνουν σε μειωμένο pH.



Σχήμα 29: Συμπολυμερισμός ιστιδίνης με υαλουρονικό οξύ<sup>43</sup>

## 2.5 Τεχνολογία Στοχευμένης Μεταφοράς Φαρμάκων (Targeted “Smart” Drug Delivery)

Η τεχνολογία Στοχευμένης Μεταφοράς Φαρμάκων<sup>44</sup> είναι ένα σύνολο μεθόδων και τρόπων για την μεταφορά φαρμάκων σε έναν ασθενή, έτσι ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση του φαρμάκου σε κάποια τμήματα του σώματος ή σε κάποια όργανα ή κύτταρα που πάσχουν σε σχέση με άλλα. Ο στόχος είναι να γίνεται εκλεκτική και ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων από τα μέσα μεταφοράς τους στους πάσχοντες ιστούς για να αυξηθεί η αποδοτικότητα του φαρμάκου και να μειωθούν οι παρενέργειες. Πολυμερή που μπορούν να διαμορφώνουν δομές όπως μικκύλια, κυστίδια, υδροζελ είναι κατάλληλα μέσα μεταφοράς φαρμάκων και πεδίο έρευνας με πολλές προοπτικές και ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Επιπροσθέτως οι τελευταίες εξελίξεις και επιτυχίες στον χώρο της Μακρομοριακής Χημείας επιτρέπουν την ενασχόληση με πολυμερή τα οποία θα είναι αποκρίσιμα σε διάφορα εξωτερικά ερεθίσματα όπως είναι η αλλαγή του pH ή της θερμοκρασίας<sup>45</sup>. Η πρόοδος στις διάφορες τεχνικές πολυμερισμού μας δίνει την δυνατότητα σήμερα για ελεγχόμενα μοριακά χαρακτηριστικά και κατανομές μοριακών βαρών αλλά και ελεγχόμενες μοριακές αρχιτεκτονικές στα πολυμερή που συνθέτουμε. Αυτά είναι βήματα προς την δημιουργία ιδανικών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, τα οποία θα έχουν υψηλή ικανότητα μεταφοράς τους και κατάλληλη σταθερότητα στην κυκλοφορία του αίματος. Επίσης η ικανότητα μακράς κυκλοφορίας στο αίμα και η επιλεκτική συσσώρευση στο σημείο δράσης μαζί με την κατάλληλη αποδέσμευση του φαρμάκου θα αυξήσουν την αποτελεσματικότητά τους. Ένα απαραίτητο χαρακτηριστικό αυτών των πολυμερών είναι επίσης η βιοσυμβατότητα, ώστε να είναι δυνατή η χρήση τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Η λειτουργικότητα τέτοιων μακρομορίων μπορεί να βελτιωθεί, καθότι οι ιδιότητές τους ελέγχονται από την χημική τους δομή αλλά και από την ικανότητα αυτοοργάνωσής τους.

Επίσης η θεραπεία γενετικών ασθενειών με την μεταφορά κατάλληλων γονιδίων τα οποία θα θεραπεύουν ή θα «επιδιορθώνουν» το γενετικό υλικό είναι άλλη μια πολλά υποσχόμενη προοπτική της τεχνολογίας μεταφοράς φαρμάκων με βάση τα πολυμερή<sup>46</sup>. Χάρη στις εξελίξεις στην μοριακή βιολογία πολλές

ασθένειες όπως ο HIV, η ασθένεια Parkinson, η ασθένεια Huntington, η ασθένεια Alzheimer έχουν πλέον μια γνωστή γενετική ταυτότητα.

## **2.6 Μοριακός Χαρακτηρισμός**

### **2.6.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών**

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) ή αλλιώς χρωματογραφία μέσω πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC) σήμερα αποτελεί την ευρύτερα αναγνωρισμένη μέθοδο για τον προσδιορισμό του μέσου μοριακού βάρους, αλλά κυρίως της κατανομής μοριακών βαρών και της καθαρότητας των πολυμερών. Πρόκειται ουσιαστικά για μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προσαρμοσμένης για την ανάλυση μεγαλομορίων όπως τα πολυμερή. Ο διαχωρισμός γίνεται μέσα σε στήλες στις οποίες μεταφέρεται το δείγμα από το φέροντα διαλύτη. Οι στήλες περιέχουν κατάλληλα συσκευασμένο πορώδες υλικό με μεγάλο εύρος διαστάσεων πόρων ( $10^2 - 10^6$  Å). Το υλικό πλήρωσης των στηλών μπορεί να είναι οργανικής φύσεως (π.χ. δικτυωμένο πολυστυρένιο με διβινυλοβενζόλιο) ή ανόργανο (silica gel ή πορώδες γυαλί). Συνήθως προτιμάται υλικό πλήρωσης από πολυστυρένιο, επειδή δε δημιουργούνται δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις (προσρόφηση, ασυμβατότητα) που θα οδηγούσαν σε δευτερογενείς διαδικασίες κατανομής. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις αυξάνουν το χρόνο έκλουσης με αποτέλεσμα να δίνουν μοριακό βάρος μικρότερο του πραγματικού για το άγνωστο δείγμα. Σε ιδανικές στήλες ο διαχωρισμός οφείλεται μόνο στο μοριακό μέγεθος (υδροδυναμικός όγκος) και δεν υπάρχει κανενός άλλου είδους αλληλεπίδραση μεταξύ πορώδους υλικού και μακρομορίων. Ο μηχανισμός διαχωρισμού (αποκλεισμός λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης) επιτρέπει στα μεγαλύτερα μόρια να περάσουν μέσα από ένα μικρό ποσοστό πόρων, ενώ τα μικρότερα μόρια διέρχονται από περισσότερους πόρους. Κατά συνέπεια οι πολυμερικές αλυσίδες διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, αφού τα μεγαλύτερα μακρομόρια διανύουν μικρότερη απόσταση και εκλούνται σε συντομότερους χρόνους από τα μικρότερα. Ο διαχωρισμός εξαρτάται από την ταχύτητα του φέροντος διαλύτη, το εύρος του πορώδους των στηλών, τη

θερμοκρασία και την ποιότητα του διαλύτη σε σχέση με τα διαχωριζόμενα μόρια.

Η ανίχνευση των εκλούμενων μορίων πραγματοποιείται με κατάλληλο ανιχνευτή που βρίσκεται στην έξοδο των στηλών. Οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές βασίζονται στη μέτρηση της σκέδασης φωτός σε μικρές γωνίες, του ιξώδους του διαλύματος, των διαφορών στο δείκτη διάθλασης και τέλος στη μέτρηση των μεταβολών στην απορρόφηση των συστατικών του διαλύματος σε μήκη κύματος στην περιοχή του υπεριώδους (UV – Vis), εφόσον το πολυμερές απορροφά σε αυτή την περιοχή.

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί έμμεση μέθοδο για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών. Για το λόγο αυτό απαιτείται βαθμονόμηση των στηλών, που πραγματοποιείται με μέτρηση του χρόνου έκλουσης δειγμάτων προτύπων γραμμικών πολυμερών, δηλαδή πολυμερών με γνωστό μοριακό βάρος και μικρή κατανομή μοριακών βαρών. Με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων κατασκευάζεται καμπύλη βαθμονόμησης. Η απευθείας αντιστοίχιση του μοριακού βάρους στον όγκο έκλουσης μπορεί να γίνει μόνο στην περίπτωση που τα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του οργάνου και τα άγνωστα δείγματα είναι ομοειδή. Η παράμετρος κλειδί για το διαχωρισμό των διαφόρων μακρομορίων του πολυμερούς είναι ο υδροδυναμικός όγκος  $V_h$ . Ο υδροδυναμικός όγκος εξαρτάται εκτός από το μοριακό βάρος και από τη χημική σύσταση και τη δομή (αρχιτεκτονική) των μακρομορίων.

Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους πολυμερών, με διαφορετική χημική σύσταση ή αρχιτεκτονική από αυτή των πολυμερών με τα οποία έγινε η βαθμονόμηση, απαιτεί τη χρησιμοποίηση μίας παγκόσμιας καμπύλης αναφοράς. Συγκεκριμένα, λόγω της διαφοροποίησης στον υδροδυναμικό όγκο είναι αναγκαία η μετατροπή του “φαινομένου” μοριακού βάρους, που λαμβάνεται από την καμπύλη βαθμονόμησης, μέσω κατάλληλων συντελεστών.

## 2.6.2 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποτελεί μία από τις σπουδαιότερες μεθόδους χαρακτηρισμού της δομής και χρησιμοποιείται ευρέως σε σχεδόν όλους τους κλάδους της χημείας. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο, εφόσον με τη βοήθεια αυτής της τεχνικής μπορούμε να προσδιορίσουμε τη στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) του πολυμερούς καθώς και τη γεωμετρική ισομέρεια, τη δομή και τη σύσταση των συμπολυμερών, ενώ τελευταία έχει αναπτυχθεί και τεχνική για τη μελέτη της κίνησης των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση.

Υπάρχουν δύο είδη φασματοφωτομέτρων, τα συνεχούς κύματος και τα παλμικά ή μετασχηματισμού Fourier. Τα συνεχούς κύματος φασματοφωτόμετρα διέπονται από την ίδια αρχή που ισχύει και για τα οπτικά φασματοφωτόμετρα στα οποία το σήμα απορρόφησης καταγράφεται σαν συνάρτηση της συχνότητας της πηγής. Στα παλμικά, το δείγμα δέχεται περιοδικά ακτινοβολία, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σήμα στην περιοχή του χρόνου το οποίο φθίνει. Αυτό το σήμα στη συνέχεια με μετασχηματισμό Fourier μετατρέπεται σε σήμα στην περιοχή των συχνοτήτων, με αποτέλεσμα ένα φάσμα ανάλογο με αυτό που λαμβάνεται από τα συνεχούς κύματος φασματοφωτόμετρα.

Το φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την μελέτη των πολυμερών, αποτελείται από μία ομάδα φασματικών γραμμών οι οποίες οφείλονται στα διαφορετικά είδη πρωτονίων του δείγματος. Υπάρχουν τρεις βασικές πληροφορίες που μπορούμε να πάρουμε από ένα φάσμα:

1. Η θέση της φασματικής γραμμής ή όπως λέγεται η χημική μετατόπιση, η οποία είναι χαρακτηριστική του είδους των πυρήνων και του μοριακού περιβάλλοντός τους.
2. Το εμβαδόν της περιοχής κάτω από κάθε φασματική γραμμή, το οποίο είναι ανάλογο με τον αριθμό των πυρήνων που υπάρχουν στο δείγμα.
3. Το εύρος της φασματικής γραμμής, το οποίο σχετίζεται με το μοριακό περιβάλλον του συγκεκριμένου πρωτονίου.

Ο συντονισμός του κάθε πυρήνα σε διαφορετική συχνότητα οφείλεται στην ύπαρξη ηλεκτρονίων τα οποία τον περιβάλλουν. Τα ηλεκτρόνια αυτά δημιουργούν τοπικά μαγνητικά πεδία τα οποία τον προσταπίζουν, με

αποτέλεσμα ο πυρήνας να αισθάνεται πεδίο  $B_{loc}$  διαφορετικό από το εφαρμοζόμενο  $B$ .

$$B_{loc} = B(1 - \sigma)$$

όπου  $\sigma$  είναι η σταθερά προάσπισης, ένα αδιάστατο μέγεθος που καθορίζει την ηλεκτρονική πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα και άρα και το βαθμό προάσπισής του. Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα είναι η διαφορά μεταξύ της συχνότητας συντονισμού του πυρήνα και μιας πρότυπης ουσίας αναφοράς. Η ουσία αναφοράς για το φάσμα πρωτονίου είναι το τετραμεθυλοσιλάνιο ( $Si(CH_3)_4$ ), που αναφέρεται ως TMS και έχει δώδεκα ισοδύναμα και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Η χημική μετατόπιση  $\delta$  ορίζεται από τις σχέσεις:

$$\delta = \frac{B_a - B_\delta}{B_a} \times 10^6 \text{ ppm}$$

$$\delta = \frac{\nu_a - \nu_\delta}{\nu_a} \times 10^6 \text{ ppm}$$

όπου  $B_a$  και  $B_\delta$  τα πεδία συντονισμού των πυρήνων της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα, ενώ  $\nu_a$  και  $\nu_\delta$  οι συχνότητες της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα. Γενικά όσο πιο προασπισμένος είναι ένας πυρήνας (μεγάλη τιμή του  $\sigma$ ) τόσο ο συντονισμός θα επιτυγχάνεται σε υψηλά εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία και σε χαμηλότερη συχνότητα.

Το γεγονός ότι η περιοχή κάτω από τη φασματική γραμμή είναι ανάλογη με τον αριθμό των σωματιδίων στο δείγμα αποτελεί τη βάση της ποσοτικής ανάλυσης. Παίρνοντας το λόγο διαφορετικών φασματικών γραμμών οι οποίες οφείλονται σε διαφορετικά είδη πυρήνων μπορούμε να προσδιορίσουμε τη σύσταση συμπολυμερών.

Τέλος, ο βαθμός διάσχισης της κορυφής μας βοηθάει στην ταυτοποίησή της. Ο αριθμός των φασματικών γραμμών που παίρνουμε δίνεται από τον τύπο  $(2n_x I_x + 1)$ , όπου  $n_x$  είναι ο αριθμός των ισοδύναμων γειτονικών πυρήνων και  $I_x$  το spin του πυρήνα. Στην περίπτωση του  $^1H$  και του  $^{13}C$ , όπου το spin τους είναι  $I = \frac{1}{2}$ , η παραπάνω σχέση ανάγεται στην  $n_x + 1$ . Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος  $(1 + x)^n$ . Έτσι για



παράδειγμα, ένας πυρήνας που διασχίζεται από δύο άλλους γειτονικούς, θα δίνει μία τριπλή κορυφή με εντάσεις κορυφών 1:2:1.

### 2.6.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου

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

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

Η περιοχή υπερύθρου (IR) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος καλύπτει την περιοχή αμέσως μετά το ορατό ( $7,8 \cdot 10^{-5} \text{cm}$ ), μέχρι τα  $10^{-2} \text{cm}$  περίπου, αλλά μόνο η ενδιάμεση περιοχή, από τα  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{cm}$  ως τα  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{cm}$ , χρησιμοποιείται από τους οργανικούς χημικούς. Τα μήκη κύματος εντός της περιοχής IR δίνονται συνήθως σε μικρότερα ( $1 \mu\text{m} = 10^{-4} \text{cm}$ ), ενώ οι συχνότητες εκφράζονται σε κυματαριθμούς ( $\nu$ ) μάλλον παρά σε Hertz. Ο κυματάριθμος, που εκφράζεται σε μονάδες αντιστρόφων εκατοστόμετρων ( $\text{cm}^{-1}$ ), είναι απλώς το αντίστροφο του μήκους κύματος. Έτσι η χρήσιμη περιοχή του IR είναι από τα  $4000 \text{ cm}^{-1}$  ως τα  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Όλα τα μόρια διαθέτουν κάποια συγκεκριμένη ποσότητα ενέργειας, κατανεμημένη σε όλη την δομή τους, που προκαλεί στους δεσμούς δονήσεις (επιμηκύνσεις) και κάμψεις. Ταυτόχρονα, εξαιτίας της, τα άτομα πάλλονται και περιστρέφονται, ενώ παρατηρούνται και διάφορες άλλες

μοριακές δονήσεις. Μερικές επιτρεπτές μορφές δονήσεων και κάμψεων είναι οι παρακάτω: η συμμετρική δόνηση τάσης, η αντισυμμετρική δόνηση τάσης, η ομοεπίπεδη κάμψη και η κάμψη εκτός πεδίου.

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

#### 2.6.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Για αραιά διαλύματα που δεν απορροφούν το φως, η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού του μεταφορικού (και μερικές φορές και του περιστροφικού) συντελεστή διάχυσης σωματιδίων μεγέθους από μερικές δεκάδες angstroms μέχρι μερικά μm, κάτω από μία ποικιλία συνθηκών. Σε πολλές περιπτώσεις ο συντελεστής διάχυσης μπορεί να συνδεθεί με το φαινόμενο μοριακό μέγεθος και επομένως το μέγεθος των σκεδαζόντων σωματιδίων μπορεί να συνδεθεί με το περιβάλλον τους.

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

$$\frac{\partial P(\rho, t)}{\partial t} = D_t \nabla^2 P(\rho, t)$$

όπου  $D_t$  είναι ο συντελεστής διάχυσης μεταφορικής κίνησης του μορίου. Αντίστοιχα αν ένα μόριο κυλινδρικού σχήματος υπόκειται σε κίνηση Brown, η

πιθανότητα να βρεθεί στις σφαιρικές συντεταγμένες  $\theta, \varphi$  στο χρόνο  $t$  είναι  $P(\theta/\theta_0, \varphi/\varphi_0, t)$  με  $\theta_0, \varphi_0$  τις συντεταγμένες σε  $t=0$  και δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{\Omega}{\sin^2 \theta} \left[ \left( \sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right)^2 + \left( \frac{\partial^2}{\partial \varphi^2} \right) \right] P$$

όπου  $\Omega$  ο συντελεστής διάχυσης περιστροφικής κίνησης. Από αυτές τις σχέσεις φαίνεται ότι οι συντελεστές διάχυσης των μακρομορίων συνδέονται άμεσα με την κίνησή τους. Αφού τα κινούμενα μόρια σκεδάζουν φως με τρόπο που συνδέεται ποσοτικά με την κίνησή τους, τα πειράματα σκέδασης φωτός αποτελούν έναν τρόπο προσδιορισμού των συντελεστών διάχυσης των μορίων. Οι συντελεστές αυτοί συνδέονται άμεσα με χαρακτηριστικές ιδιότητες των μορίων όπως το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθος των μορίων, καθώς και με αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-διαλύτη. Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα διαυγές υγρό, το φως σκεδάζεται λόγω διακυμάνσεων πυκνότητας. Στην περίπτωση διαλυμάτων η σκέδαση φωτός οφείλεται κυρίως σε διακυμάνσεις συγκέντρωσης. Οι διακυμάνσεις αυτές συνδέονται με την κίνηση Brown. Αν δεν υπάρχει αλλαγή συχνότητας της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με αυτήν της προσπίπτουσας, η σκέδαση ονομάζεται ελαστική. Αν οι διακυμάνσεις (πυκνότητας και συγκέντρωσης) δεν αλλάζουν πολύ με το χρόνο ή εάν η ένταση σκεδάσεως μετράται για μια χρονική περίοδο που είναι μεγάλη σε σχέση με το χρόνο μεταβολής των διακυμάνσεων, δεν παρατηρείται αλλαγή στη συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός.

Παρ' όλα αυτά οι διακυμάνσεις σε διαλύματα εξαρτώνται από το χρόνο εξαιτίας της κίνησης Brown. Έτσι η συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός θα έχει ένα φάσμα χαρακτηριστικό της χρονικής εξάρτησης των διακυμάνσεων και της κίνησης των μακρομορίων (φαινόμενο Doppler). Επειδή η διαφορά συχνότητας μεταξύ προσπίπτουσας και σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι μικρή, το είδος αυτό της σκέδασης καλείται ημιελαστική σκέδαση φωτός. Τα σκεδάζοντα μακρομόρια σε ένα διάλυμα κινούνται με παρόμοιες ταχύτητες αλλά σε τυχαίες κατευθύνσεις. Εξαιτίας της ομοιότητας στην κίνησή τους το σκεδαζόμενο φως από τα μόρια αυτά λέγεται ότι έχει συσχέτιση στο χρόνο. Γενικά μια συνάρτηση

συσχέτισης χρόνου (time correlation function) μεταξύ δύο σημάτων A και B έχει τη μορφή:

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

όπου τ ο χρόνος καθυστέρησης (ή χρόνος δειγματοληψίας, delay time or sample time),  $t_0$  ο αρχικός χρόνος, T ο χρόνος διεξαγωγής της μέτρησης. Αν το B είναι μια «αργοπορημένη» μορφή του A τότε η εξίσωση αποτελεί μια συνάρτηση αυτοσυσχέτισης. Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης αποτελεί πραγματική ποσότητα και μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλες διατάξεις. Μια στενά συνδεδεμένη με την  $g(\tau)$  συνάρτηση είναι το φάσμα ισχύος (power spectrum)  $I(\omega)$  που δίνεται από την σχέση:

$$I(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\lambda}^{\infty} e^{-i\omega\tau} \langle A(t)A(t-\tau) \rangle dt$$

Η σχέση αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier της  $g(\tau)$ , οπότε ο πειραματικός προσδιορισμός της μίας οδηγεί στην άλλη. Η μέθοδος σκεδάσεως φωτός που περιγράφηκε παραπάνω ονομάζεται φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων ή δυναμική σκέδαση φωτός. Στην απλή περίπτωση ενός συνόλου από σφαιρικά, μη αλληλεπιδρώντα μεταξύ τους, ομοειδή σωματίδια που κινούνται μέσα σε ένα υγρό (διάλυμα) η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης γράφεται:

$$g(\tau) = A_0 + Ae^{-\Gamma\tau}$$

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

Με τη βοήθεια του  $D_t$  μπορούν να προσδιοριστούν κάποιες μοριακές ιδιότητες του πολυμερούς αλλά και θερμοδυναμικές ιδιότητες του διαλύματος. Γενικά, το  $D_t$  δίνεται από τη σχέση Stokes-Einstein:  $D_t = \frac{kT}{f}$  όπου  $D_t$  ο συντελεστής διάχυσης σε άπειρη αραιώση, k η σταθερά Boltzmann και f ο μοριακός συντελεστής τριβής. Για σφαιρικά μη αλληλεπιδρώντα σωματίδια ισχύει:

$f = 3\pi\eta d$  όπου  $\eta$  το ιξώδες του ρευστού σε θερμοκρασία  $T$  και  $d$  η διάμετρος του σωματιδίου. Έτσι για την πιο απλή περίπτωση, είναι δυνατόν με τη δυναμική σκέδαση φωτός να εξαχθεί το μέγεθος των σκεδαζόντων σωματιδίων. Για μη σφαιρικά σωματίδια, το  $d$  από τη σχέση γίνεται μια μέση τιμή. Στη γενική περίπτωση ισχύει η σχέση:

$f = 6\pi\eta d(r^2)^{1/2}$  όπου το  $F$  αποτελεί έναν παράγοντα δομής και  $(r^2)^{1/2}$  είναι η τετραγωνική ρίζα του τετραγώνου της μέσης από άκρο σε άκρο απόστασης για το μόριο που εξετάζεται. Στην περίπτωση που υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων το  $D_t$  εμφανίζει σημαντική εξάρτηση από τη συγκέντρωση, οπότε:

$$D_t = D_t^0 (1 + k_D c + \dots) \text{ με}$$

$k_D = 2A_2 M - k_f - \frac{N_A V_1}{M}$  όπου  $A_2$  ο δεύτερος συντελεστής Virial,  $M$  το μοριακό βάρος,  $N_A$  ο αριθμός Avogadro,  $V_1$  ο όγκος του μορίου του πολυμερούς και  $k_f$  ο συντελεστής αναλογίας στη σχέση που δίνει την εξάρτηση του μοριακού συντελεστή τριβής  $f$  του πολυμερούς από τη συγκέντρωση στο συγκεκριμένο διαλύτη,  $f = f_0 (1 + k_f c)$ . Για τις περισσότερες εφαρμογές είναι αρκετό να υπολογιστεί μια υδροδυναμική ακτίνα  $R_h (=d_h/2)$  ισοδύναμης σφαίρας από την:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_t^0}$$

Η  $R_h$  αποτελεί ένα μέτρο του υδροδυναμικού όγκου του πολυμερούς στο διάλυμα όπως αυτός καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-διαλύτη, τη θερμοκρασία κλπ. Για ομόλογα γραμμικά πολυμερή ο συντελεστής διάχυσης συνδέεται με το μοριακό βάρος μέσω της σχέσης .

$$D_t^0 = k_A M^{-b}$$

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

### 2.6.5 Κυκλικός Διχρωϊσμός

Το φως είναι ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα που ταλαντώνεται τόσο στο χρόνο όσο και στο χώρο. Στο κύμα, το ηλεκτρικό και το μαγνητικό διάνυσμα που είναι αναλογικά μεταξύ τους σε μέγεθος, είναι αμοιβαίως κάθετα και επίσης κάθετα στη διεύθυνση διαδόσεως. Το μη πολωμένο φως αποτελείται από δονήσεις σε πολλές και διαφορετικές διευθύνσεις πολώσεως. Στο γραμμικά πολωμένο φως (συχνά αναφερόμενο ως επίπεδα πολωμένο φως) το ηλεκτρικό διάνυσμα  $\mathbf{E}$  ταλαντώνεται ημιτονοειδώς σε μια διεύθυνση (επίπεδο) που στη φασματοσκοπία ονομάζεται συμβατικά επίπεδο πολώσεως. Στο κυκλικά πολωμένο φως, το μέγεθος του  $\mathbf{E}$  παραμένει σταθερό αλλά διαγράφει μια έλικα ως συνάρτηση του χρόνου. Σύμφωνα με τη σύμβαση που χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD), στις δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένες ακτίνες φωτός ιδωμένες από παρατηρητή με μέτωπο προς την πηγή φωτός, το  $\mathbf{E}$  θα εμφανίζεται περιστρεφόμενο κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού και αντιστρόφως αυτής, αντίστοιχα. Είναι πιο χρήσιμο να αντιμετωπιστεί το γραμμικά πολωμένο φως ως άθροισμα μιας δεξιά και μίας αριστερά κυκλικά πολωμένης ακτίνας ίδιας εντάσεως. Το άθροισμα των οριζοντίων συνιστωσών είναι μηδενικό κι επομένως το άθροισμα δύο ορθογωνικά κυκλικά πολωμένων ακτινών πραγματικά ανάγεται σε μία γραμμικώς (κατακορύφως) πολωμένη ακτίνα.

Συγκεκριμένα, μια ακτίνα γραμμικά πολωμένου φωτός μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από δύο κυκλικά πολωμένες σε φάση ακτίνες της αυτής συχνότητας και μισού εύρους δονήσεως μια δεξιόστροφη και μια αριστερόστροφη. Η προβολή στο επίπεδο του χαρτιού (επίπεδο  $xy$ ) του ανύσματος  $\mathbf{E}$  του ηλεκτρικού πεδίου αναλύεται σε δύο συνιστώσες, το  $\mathbf{E}_R$ , που στρέφεται κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού και το  $\mathbf{E}_L$  που στρέφεται αντίθετα. Καθώς τα  $\mathbf{E}_R$  και  $\mathbf{E}_L$  περιστρέφονται, η συνισταμένη τους ιχνογραφεί μια ευθεία γραμμή. Επειδή οι οπτικά ενεργές ουσίες έχουν διαφορετική πολωσιμότητα για τη δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένη ακτινοβολία, όταν μια επίπεδα πολωμένη ακτινοβολία προσπίπτει σ' ένα τέτοιο υλικό, οι ταχύτητες με τις οποίες οι δύο συνιστώσες διέρχονται μέσω του υλικού θα είναι διαφορετικές

Η γωνία στροφής  $\alpha$  ενός διαλύματος σε δεδομένη θερμοκρασία διαλύτη και μήκος κύματος, εξαρτάται από την ειδική στροφική ικανότητα  $[\alpha]$ , το μήκος  $l$  της διαδρομής του φωτός στο δείγμα και από τη συγκέντρωση  $c$  (g/100ml διαλύματος) ή πυκνότητα  $d$  (g/ml). Ανάλογα με τις χρησιμοποιούμενες μονάδες η ειδική στροφική ικανότητα εκφράζεται από την εξίσωση

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha_{\lambda}^t}{l \times c} \times 100 \quad \text{ή} \quad [\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha_{\lambda}^t}{l \times d}$$

Όπως ένα υλικό μπορεί να έχει διαφορετικό δείκτη διάθλασης για τη δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένη ακτινοβολία μπορεί επίσης να έχει διαφορετική μοριακή απορροφητικότητα,  $\epsilon_R$  και  $\epsilon_L$ . Η άνιση απορρόφηση των δύο συνιστωσών που θα συμβεί θα έχει ως αποτέλεσμα το συνιστάμενο άνυσμα να ιχνογραφεί μια έλλειψη και το εξερχόμενο φως χαρακτηρίζεται ως ελλειπτικά πολωμένο. Το φαινόμενο αυτό καλείται *κυκλικός διχρωϊσμός* και μπορεί να μετρηθεί είτε με τη διαφορά των μοριακών απορροφητικοτήτων της δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένης ακτινοβολίας σύμφωνα με την εξίσωση

$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$  είτε με την ελλειπτικότητα  $\theta$ , που είναι η γωνία της οποίας η εφαπτομένη είναι ο λόγος του μικρού προς το μεγάλο άξονα της έλλειψης που ιχνογραφείται από το συνιστάμενο άνυσμα. Η μοριακή ελλειπτικότητα  $[\theta]$  αποδεικνύεται ότι υπακούει στις σχέσεις :  $[\theta] = 3300\Delta\epsilon$  και

$$[\theta] = \frac{\theta_{\text{παρατ}}(\text{cms}) \cdot f \cdot M}{10 \cdot c \cdot l} \quad \text{όπου } \theta_{\text{παρατ}} \text{ είναι το ύψος ή το εύρος σε cm της}$$

ταινίας της προκύπτουσας καμπύλης,  $f$  είναι παράγοντας ευαισθησίας οργάνου,  $M$  ο μέσος όρος του  $M.W$  των μονάδων των αμινοξέων-για διαλύματα πρωτεϊνών-  $c$  η συγκέντρωση σε g/ml και  $l$  το μήκος της οπτικής διαδρομής σε cm. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε  $\text{degrees} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimole}^{-1}$ .

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

Από τα παραπάνω μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι οι έννοιες κυκλικός διχρωϊσμός και ελλειπτικότητα είναι ισοδύναμες, καθώς όταν υπάρχει εκλεκτική απορρόφηση του ενός συστατικού του **E** (δηλ.  $CD = A_L - A_R$ , μη μηδενικό) οι δύο εντάσεις δεν παραμένουν ίσες κι επομένως η ακτίνα καθίσταται ελλειπτικά πολωμένη. Έτσι αν και οι σύγχρονοι διχρωγράφοι μετρούν διαφορές απορρόφησης, είναι κοινή πρακτική να εκφράζεται ο κυκλικός διχρωϊσμός σε μονάδες ελλειπτικότητας, millidegrees (mdeg,  $1\text{mdeg} = 3.3 \cdot 10^{-5}$  a.u.). Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού προκύπτει από την ενδο- ή διαμοριακή ασυμμετρία μιας μοριακής δομής. Χειρικότητα μιας δομής σημαίνει ότι η τελευταία δεν μπορεί να συμπίσει με το κατοπτρικό της είδωλο. Αυτή η έλλειψη συμμετρίας που προκύπτει για παράδειγμα όταν ένα άτομο άνθρακα ενός μορίου ενώνεται με τέσσερα διαφορετικά υπολείμματα αποτελεί ιδιότητα όλων σχεδόν των βιολογικά συντιθέμενων οργανικών μορίων.

## 2.6.6 Φασματοσκοπία Μοριακής Απορρόφησης στο Ορατό

Η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης στηρίζεται στη μέτρηση της διαπερατότητας,  $T$ , ή της απορρόφησης  $A$  διαλυμάτων, που τοποθετούνται σε διαφανείς κυψελίδες οπτικής διαδρομής  $b$ . Συνήθως η συγκέντρωση  $c$  ενός αναλύτη που απορροφά συνδέεται γραμμικά με την απορρόφηση σύμφωνα με την εξίσωση:  $A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$

όπου  $P_0$ : ισχύς ακτινοβολίας μετά την διέλευση της από την κυψελίδα για διαλύτη,  $P$ : ισχύς ακτινοβολίας μετά την διέλευση της από την κυψελίδα για αναλύτη,  $\epsilon$ : Γραμμομοριακός συντελεστής απόσβεσης,  $b$ : μήκος διαδρομής ακτινοβολίας στην κυψελίδα.

Στις δυο επιφάνειες αέρα/τοιχώματος της κυψελίδας συμβαίνουν ανακλάσεις. Εξασθένιση μιας δέσμης μπορεί να συμβεί ακόμα και ως αποτέλεσμα σκέδασης από μεγάλα μόρια, αλλά και απορρόφησης από τα τοιχώματα της κυψελίδας. Για αντιστάθμιση αυτών των φαινομένων συγκρίνεται η ισχύς της δέσμης που διαπερνά το διάλυμα αναλύτη με την ισχύ της δέσμης που διαπερνά την κυψελίδα που περιέχει τον διαλύτη. Οι πειραματικές τιμές της διαπερατότητας και της απορρόφησης υπολογίζονται από τις εξισώσεις:

$$T = \frac{P_{\text{διάλυμα}}}{P_{\text{διαλύτης}}} = \frac{P}{P_0} \quad A = -\log T = \log \frac{P_{\text{διαλύτης}}}{P_{\text{διαλυμα}}}$$



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

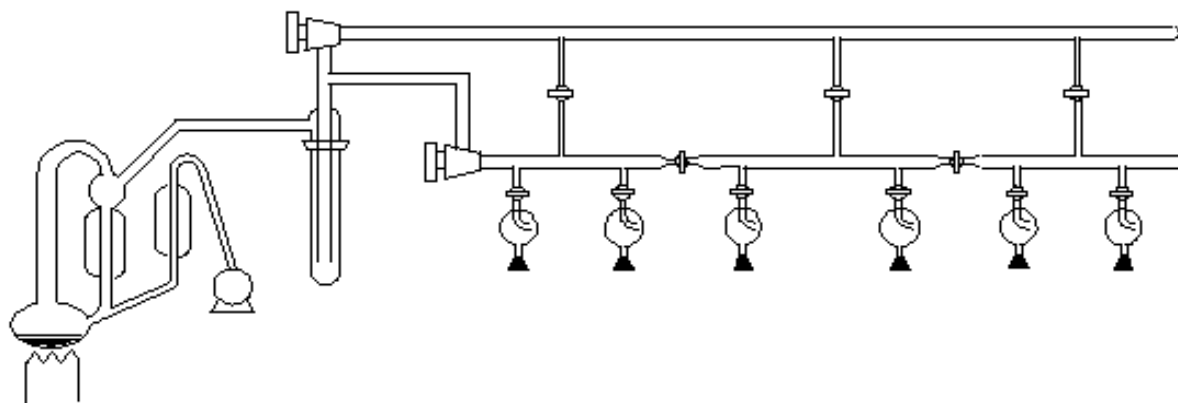
#### 3.1 Τεχνική υψηλού κενού

Ο «ζωντανός» πολυμερισμός αποτελεί την καλύτερη τεχνική για την σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών. Για να παραμείνει ένα σύστημα ζωντανό είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν διάφορες ανεπιθύμητες ουσίες που θα προκαλέσουν πρόωρο τερματισμό των ζωντανών αλυσίδων, εξαιτίας της μεγάλης δραστηριότητας των μονομερών. Έτσι τόσο κατά τη σύνθεση των μονομερών όσο και κατά τη σύνθεση των πολυμερών είναι απαραίτητη η τήρηση ενός πρωτοκόλλου για τον καθαρισμό τόσο των μονομερών, αλλά και των διαλυτών και όλων των αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιηθούν, ώστε να είμαστε σίγουροι ότι δεν θα λάβουν χώρα ανεπιθύμητες αντιδράσεις.

Η τήρηση αυτών των αυστηρών διαδικασιών επιτυγχάνεται με την επίτευξη υψηλού κενού στον αντιδραστήρα πολυμερισμού και την απομάκρυνση του ατμοσφαιρικού αέρα που περιέχει πλήθος ανεπιθύμητων προσμίξεων, όπως οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, υγρασία, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με τους χρησιμοποιούμενους απαρχητές και τις αναπτυσσόμενες αλυσίδες. Όλες οι συσκευές που χρησιμοποιούνται είναι χειροποίητες και έχουν κατασκευαστεί στο εργαστήριο μας με την χρήση υαλουργίας. Αποτελούνται από γυαλί γιατί εμπορικές συσκευές με εσφυρίσματα ενέχουν τον κίνδυνο διαρροής ή εισαγωγής υγρασίας ή άλλων προσμίξεων του αέρα. Η απομάκρυνση της υγρασίας είναι απαραίτητη και απολύτως αναγκαία, γιατί το νερό ανάλογα με τη συγκέντρωση που βρίσκεται είτε υδρολύει τα NCA, είτε δρα ως απαρχητής πολυμερισμού. Τονίζουμε ότι όλες οι διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για το στάδιο της σύνθεσης περιλαμβάνουν τόσο την χρήση των τεχνικών υψηλού κενού όσο και την κατασκευή συσκευών και αντιδραστηρίων με τις τεχνικές της υαλουργίας<sup>47</sup>.

Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από γυάλινους σωλήνες (Pyrex), στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (Rotaflo HP 10 mm,  $10^{-8}$  mm Hg), μία αντλία ελαίου και μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου. Η αντλία ελαίου δημιουργεί κενό

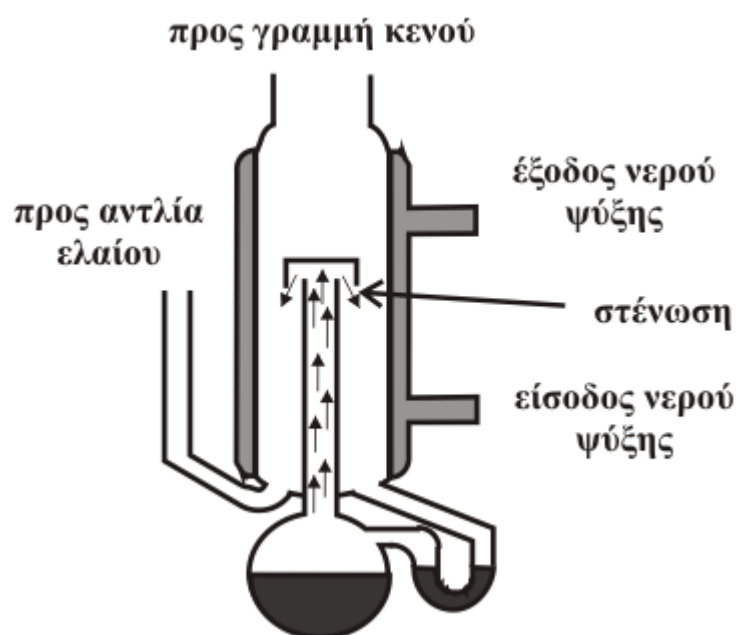
της τάξης των  $10^{-2} - 10^{-3}$  mm Hg. Το προκαταρκτικό αυτό κενό είναι απαραίτητο για να αποστάξει ο υδράργυρος, που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως, σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία. Καθώς τα μόρια του υδραργύρου κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξηση της ταχύτητάς τους με ταυτόχρονη ελάττωση της πίεσής τους, σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli. Σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli, όταν ένα ασυμπίεστο ρευστό ρέει κατά μήκος ενός σωλήνα ροής που δεν έχει σταθερή διατομή, η παροχή (ρυθμός ροής) του δεν πρέπει να αλλάζει. Όταν ένα στοιχείο του ασυμπίεστου ρευστού επιταχύνεται, θα πρέπει να κινείται από μία περιοχή υψηλής πίεσης προς μία άλλη χαμηλής πίεσης, ώστε να υπάρχει συνισταμένη δύναμη που να το επιταχύνει προς τα εμπρός. Όταν η διατομή του σωλήνα ροής μεταβάλλεται, θα πρέπει να αλλάζει και η πίεση ακόμα και αν δεν υπάρχει διαφορά στο ύψος. Έτσι, κατά τη δίοδο των μορίων του υδραργύρου μέσα από τη στένωση προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς τους και λόγω της μείωσης της πίεσης που αυτό προκαλεί, δημιουργείται διαφορά πίεσης (υποπίεση) στα άκρα της στήλης. Κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα, ο υδράργυρος συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη, όπου και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Έτσι επιτυγχάνεται το τελικό κενό που είναι της τάξης των  $10^{-6}$  mm Hg, ίσο με την τάση ατμών του υδραργύρου.



**Σχήμα 30: Γραμμή υψηλού κενού**

Για την προστασία της αντλίας διαχύσεως και ελαίου από πτητικά συστατικά, υπάρχουν δύο παγίδες υγρού αζώτου πριν από κάθε αντλία. Με τις στρόφιγγες το κενό κατευθύνεται σε συγκεκριμένα σημεία της γραμμής και καθίσταται δυνατή η απομόνωση άλλων σημείων. Με την βοήθεια διαφόρων εσφυρισμάτων επιτυγχάνεται η προσαρμογή των χρησιμοποιούμενων

συσκευών στη γραμμή κενού και γίνεται η απόσταξη των διαφόρων ουσιών (διαλύτες, μονομερή, κλπ.) στις συγκεκριμένες συσκευές.

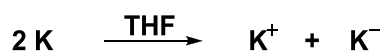


Σχήμα 31: Αντλία Διαχύσεως Υδραργύρου

Πριν χρησιμοποιηθεί η γραμμή κενού για απαέρωση, πρέπει να τεθεί σε λειτουργία η αντλία ελαίου, να προσαρμοστεί στην γραμμή κενού η κενή συσκευή πολυμερισμού και να ανιχνευθεί τυχόν ύπαρξη μικροοπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla. Μόνο όταν εξασφαλιστεί απόλυτη στεγανότητα στη γραμμή με την χρήση του πηνίου Tesla είναι δυνατή η διεξαγωγή οποιασδήποτε εργασίας στη γραμμή κενού. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται εύκολα, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ή λουτρό ισοπροπανόλης – ξηρού πάγου ( $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Ο χειρισμός της γραμμής κενού και οι απαραίτητες προφυλάξεις αναφέρονται εκτενώς στη βιβλιογραφία, ενώ κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων η λήψη και η ενδεδειγμένη τήρηση όλων των μέτρων ασφαλείας είναι απολύτως απαραίτητη.

### 3.2 Καθαρισμός Διαλυτών

**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 :



**Οξικός αιθυλεστέρας(EtAc)**. Ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται ως διαλύτης για τις ανακρυσταλλώσεις των μονομερών. Ο διαλύτης αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε φιάλη 2 L με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) για μια μέρα. Ο διαλύτης αποκτά ένα ασθενές μαύρο χρώμα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή κενού, απαερώνεται και εν συνεχεία αποστάζεται σε διπλανή φιάλη 2 L με στρόφιγγα , εκτός από το τελευταίο κλάσμα, το οποίο δεν χρησιμοποιούμε. Η φιάλη 2 L απαερώνεται άλλη μια φορά.

**Εξάνιο**. Το εξάνιο αποτελεί το μη διαλύτη στο σύστημα ανακρυσταλλώσεων διαλύτη-μη διαλύτη για τον καθαρισμό των N-Καρβοξυανυδριτών. Ο καθαρισμός του περιλαμβάνει κατεργασία με λεπτότατα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου για μια ημέρα σε φιάλη των 2L, απαέρωση και απόσταξη στη γραμμή του υψηλού κενού σε γειτονική φιάλη που περιέχει κανονικό βουτυλολίθιο αραιωμένο σε εξάνιο, το οποίο θα αντιδράσει με τις όποιες τυχόν προσμίξεις. Η φιάλη με το υδρίδιο του ασβεστίου απενεργοποιείται μετά με τολουόλιο και μεθανόλη.

**Διμεθυλοφορμαμίδιο(DMF)**. Το DMF αποτελεί το διαλύτη του πολυμερισμού των NCAs. Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για την αραίωση του απαρχητή. Το DMF υπόκειται σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική παράγεται διμεθυλαμίνη και μονοξείδιο του άνθρακα. Επίσης

υδρολύεται αργά παρουσία νερού, παράγοντας διμεθυλαμίνη και φορμικό οξύ, συστατικά που του αποδίδουν και την χαρακτηριστική οσμή του. Το DMF φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box σε μπουκάλια, μεταγγίζεται σε φιάλη με στρόφιγγά, που πριν έχει ξηρανθεί στη γραμμή υψηλού κενού και περιέχει υδρίδιο του ασβεστίου. Αφήνεται να αντιδράσει για μισή ώρα, απαερώνεται και αποστάζεται σε διπλανή φιάλη κλασματικά. Χρησιμοποιούνται τα μεσαία κλάσματα πάντα σε κάθε απόσταξη. Το DMF που προκύπτει φυλάσσεται στην κατάψυξη και προστατεύεται από το φως. Επίσης πρέπει να καταναλωθεί το συντομότερο δυνατόν από την ημέρα καθαρισμού του.

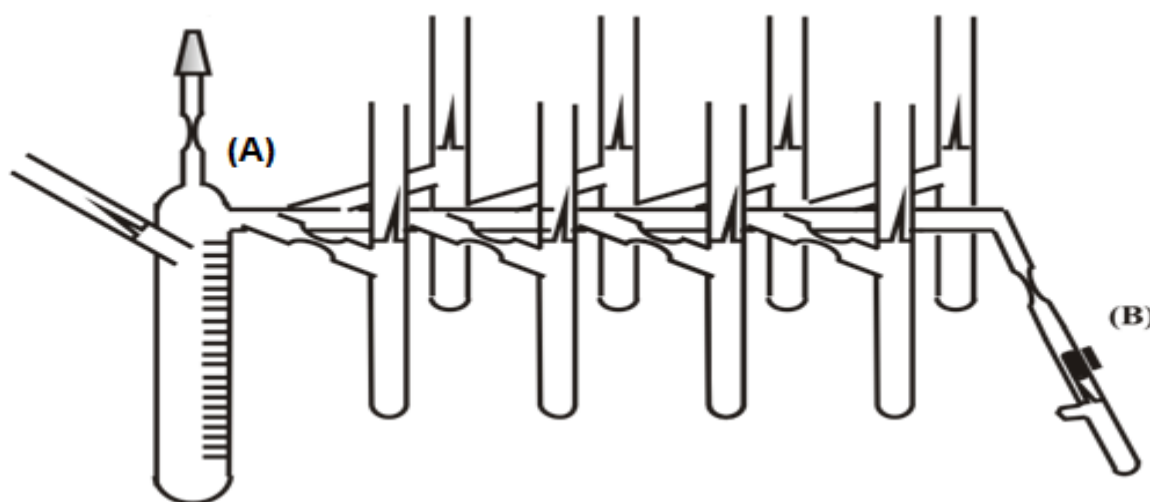
**Βενζόλιο.** Το βενζόλιο προστίθεται σε θειικό οξύ για να απομακρυνθεί το θειοφαίνιο και άλλες ολεφίνες. Αφού το ανακινήσουμε και το εκπλύνουμε με νερό, υδροξείδιο νατρίου και πάλι νερό, σχηματίζονται δυο φάσεις μια διαυγής και μια σκούρα. Εμείς παίρνουμε με προσοχή την διαυγή φάση σε φιάλη και προσθέτουμε λεπτότατα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου υπό ανάδευση για μια νύχτα για να αντιδράσει με την υγρασία. Ακολουθεί απόσταξη στη γραμμή του υψηλού κενού σε γειτονική φιάλη που περιέχει κανονικό βουτυλολίθιο, το οποίο θα αντιδράσει με τις όποιες τυχόν προσμίξεις. Η φιάλη με το υδρίδιο του ασβεστίου απενεργοποιείται μετά με τολουόλιο και μεθανόλη.

### **3.3 Καθαρισμός Απαρχητή και Αντιδραστηρίων**

**Διμεθυλαμίνη** 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 στη γραμμή κενού και γίνεται διεξοδικός έλεγχος με τη βοήθεια του πηνίου Tesla για τυχόν διαρροές. Σε γειτονική στρόφιγγα προσαρμόζεται φιάλη των 100ml που περιέχει κάτοπτρο νατρίου και είναι απαερωμένη. Η φιάλη εν συνεχεία ψύχεται με τη βοήθεια λουτρού ισοπροπανόλης ξηρού πάγου στους -78°C. Τέλος ανοίγεται η στρόφιγγα της οβίδας σιγά και με προσοχή για 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 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. Μία από τις αμπούλες αυτές προσαρμόζεται σε συσκευή αραίωσης, η οποία μέσω του εσφυρίσματος τοποθετείται στη γραμμή κενού. Ακολουθεί προσεκτική απαέρωση και ξήρανση της συσκευής με 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).



Σχήμα 32: Συσκευή αραίωσης απαρχητή

**Τριαιθυλαμίνη.** Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται ως μέσω δέσμευσης του υδροχλωρίου. Ο καθαρισμός της γίνεται με  $\text{CaH}_2$  για μια μέρα και μετά ακολουθεί απόσταξη σε φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει μεταλλικό νάτριο.

### 3.4 Πλεονεκτήματα της Τρίτυλο Προστατευτικής Ομάδας της Ιστιδίνης

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει τη σύνθεση του NCA της ιστιδίνης με την τρίτυλο προστατευτική ομάδα στο άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Με την έως τώρα γνώση μας, δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ο πολυμερισμός του NCA της ιστιδίνης με την συγκεκριμένη προστατευτική ομάδα.

Οι προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί έως σήμερα για την προστασία του αζώτου στον ιμιδαζολικό δακτύλιο είναι η DNP και η βένζυλο. Η βένζυλο είναι από τις πλέον χρησιμοποιούμενες προστατευτικές ομάδες στα αμινοξέα γενικά, παρουσιάζει όμως μερικά σοβαρά μειονεκτήματα. Η βένζυλο προστατευτική ομάδα είναι ανεπαρκής σε αρκετές περιπτώσεις καθώς η απομάκρυνσή της με καταλυτική υδρογόνωση είναι αργή και όχι πάντα αποτελεσματική. Επίσης η απομάκρυνσή της με την χρήση νατρίου σε υγρή αμμωνία είναι μια πολύ δραστική διαδικασία που μπορεί να προκαλέσει ακόμα και ρήξη του πεπτιδικού δεσμού<sup>48</sup>. Επιπροσθέτως η βένζυλο προστατευτική ομάδα έχει παρατηρηθεί<sup>49</sup> ότι δεν μπορεί να εμποδίσει την ρακεμείωση των αντίστοιχων πεπτιδίων στα οποία φέρεται, δίνοντας ένα μίγμα των δυο ισομερών D και L.

Η DNP προστατευτική ομάδα είναι σαφώς πιο εύκολο να απομακρυνθεί με την χρήση μερκαπτοαιθανόλης<sup>48</sup>. Όμως δεν μπορεί να συνδυαστεί με καμία δομή στην οποία θα περιέχονται δισουλφιδικοί δεσμοί, γιατί κατά την αποπροστασία με μερκαπτοαιθανόλη σπάει ο δεσμός θείου-θείου. Μάλιστα η χρήση δισουλφιδικών δεσμών σε δομές με πολυπεπτίδια παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω της ύπαρξης ενζύμων στα κύτταρα όπως η αναγωγάση του γλουταθείου που μπορούν να διασπασούν στο κύτταρο τον δισουλφιδικό δεσμό. Έτσι σε μια δομή που περιέχει φάρμακο, μπορούμε να εκμεταλλευτούμε αυτήν την ιδιότητα για την απελευθέρωση του. Άρα η DNP δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί.

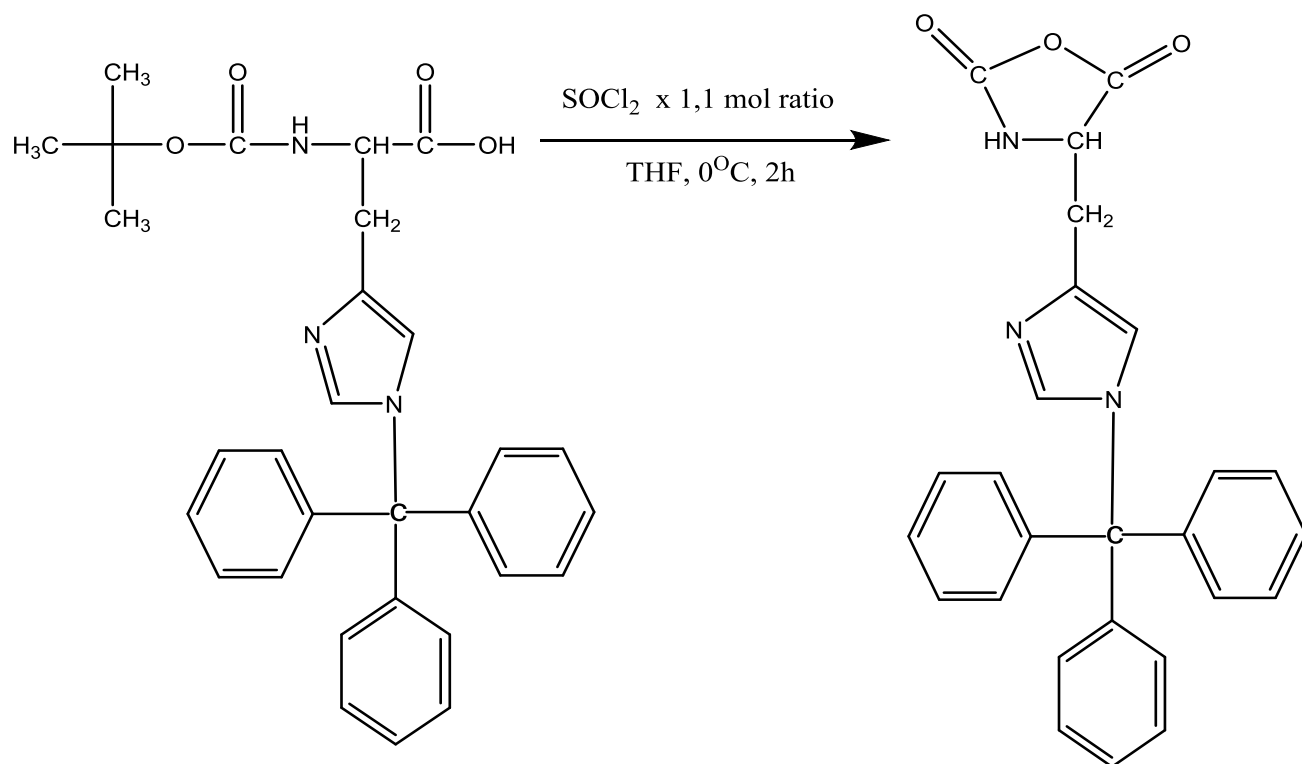
Η τρίτυλο προστατευτική ομάδα αποτελεί την καλύτερη λύση καθώς εμφανίζει τα παρακάτω συγκριτικά πλεονεκτήματα :

- Εμποδίζει την ρακεμείωση των πεπτιδίων, στα οποία φέρεται δίνοντας σχεδόν αποκλειστικά το L ισομερές<sup>50,51,52</sup>
- Είναι πολύ εύκολη και αποτελεσματική η αποπροστασία της με ασθενή οξέα<sup>53</sup>
- Υπάρχει εκλεκτικότητα κατά την αποπροστασία της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας καθώς με αυτές τις συνθήκες θα φύγει μόνο η τρίτυλο, ενώ οι άλλες προστατευτικές ομάδες δεν θα επηρεαστούν
- Η τρίτυλο προστατευτική ομάδα είναι απόλυτα σταθερή απέναντι σε ουδέτερα και αλκαλικά μέσα, αλλά και ως προς τα πυρηνόφιλα<sup>50</sup>

Για τη σύνθεση του αντίστοιχου NCA έγιναν αρκετές προσπάθειες, οι οποίες ήταν όλες ανεπιτυχείς, πριν καταλήξουμε στον τελικό τρόπο συνθεσης. Αρχικά χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο Fuchs-Farthing με διάφορες παραλλαγές σε διαλύτες, εκχυλίσσεις, αντιδραστήρια και ανακρυσταλλώσεις. Είτε το προϊόν που πέραμε δεν ήταν κατάλληλο είτε περιείχε ο τελικός NCA υδροχλώριο με αποτέλεσμα ο πολυμερισμός να είναι ιδιαίτερα αργός. Ο πιθανότερος λόγος για τον οποίο αυτές οι προσπάθειες δεν είχαν επιτυχία είναι ότι το τ-N του ιμιδαζολικού δακτυλίου δεν παραμένει ανενεργό παρά την προστασία του π-N, αλλά μεταφέρεται μέσω συντονισμού ηλεκτρονική πυκνότητα σε αυτό, με αποτέλεσμα να αντιδρά με το τριφωσγένιο.

### 3.5 Σύνθεση $N_{im}$ -Trt-L-Histidine NCA

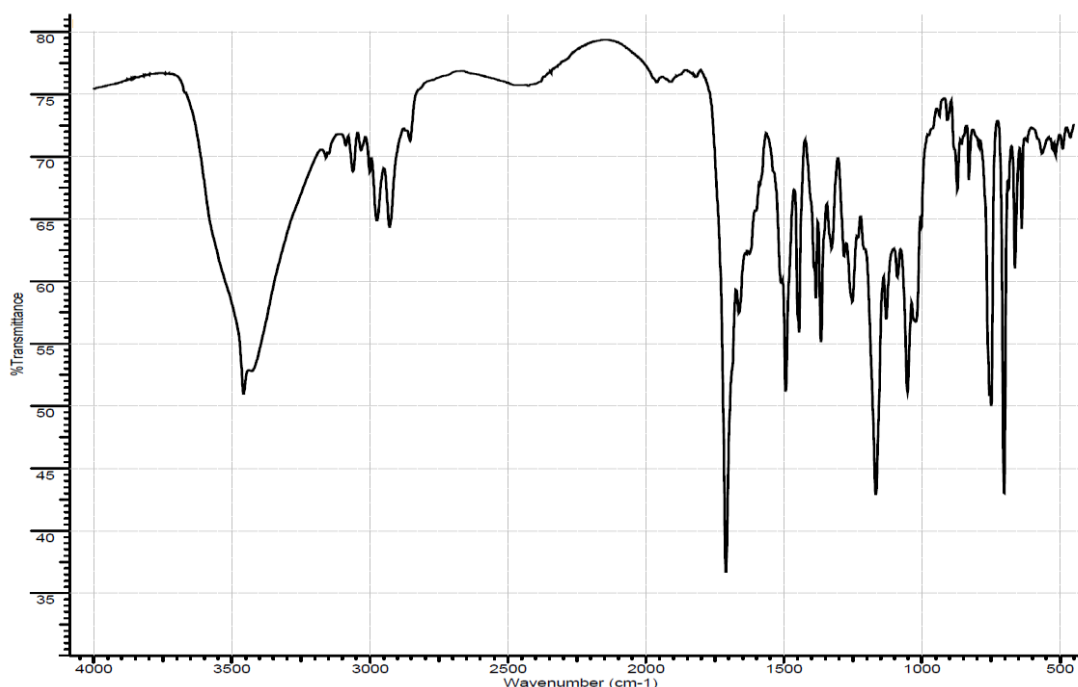
Η διαδικασία της σύνθεσης του  $N_{im}$ -Trt-L-Histidine NCA διαρκεί περίπου τρεις ημέρες. Σε όλα τα στάδια γίνεται χρήση ανάδευσης στις συσκευές με τη βοήθεια μαγνητών και ηλεκτρικού αναδευτήρα. Όλες οι συσκευές που χρησιμοποιούνται και τα φίλτρα έχουν μπει σε φούρνο για μία ημέρα στους  $600^{\circ}\text{C}$ , ώστε να έχει απομακρυνθεί κάθε είδους ανεπιθύμητη ένωση από αυτές και να είναι τελείως καθαρές. Σε αυτές τις θερμοκρασίες όλα αποσυντίθενται ή καταστρέφονται, εκτός από το γυαλί.



Σχήμα 33: Αντίδραση σύνθεσης  $N_{im}$ -Trt-L-Histidine NCA



1. Σε καθαρή δίκλιμη σφαιρική φιάλη των 1000 ml προσαρμόζεται κατάλληλο επίθεμα και την ανεβάζουμε στην γραμμή κενού. Εκεί απαερώνεται και υφίσταται τρία flame drying ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία.
2. Αφού κρυώσει, την κατεβάζουμε και ζυγίζουμε 20 γραμμάρια Boc-L-Histidine-(Trt)-OH. Στην συνέχεια αποστάζονται 200ml THF, ώστε να έχουμε ένα διάλυμα περίπου 10%. Όπως βλέπουμε στο αντίστοιχο φάσμα του IR υπάρχουν δύο χαρακτηριστικές κορυφές, μια οξεία στα  $1710\text{ cm}^{-1}$  του καρβονυλίου του α-αμινοξέος και μια ευρεία στα  $1660\text{ cm}^{-1}$  της αμινομάδας του α-αμινοξέος.



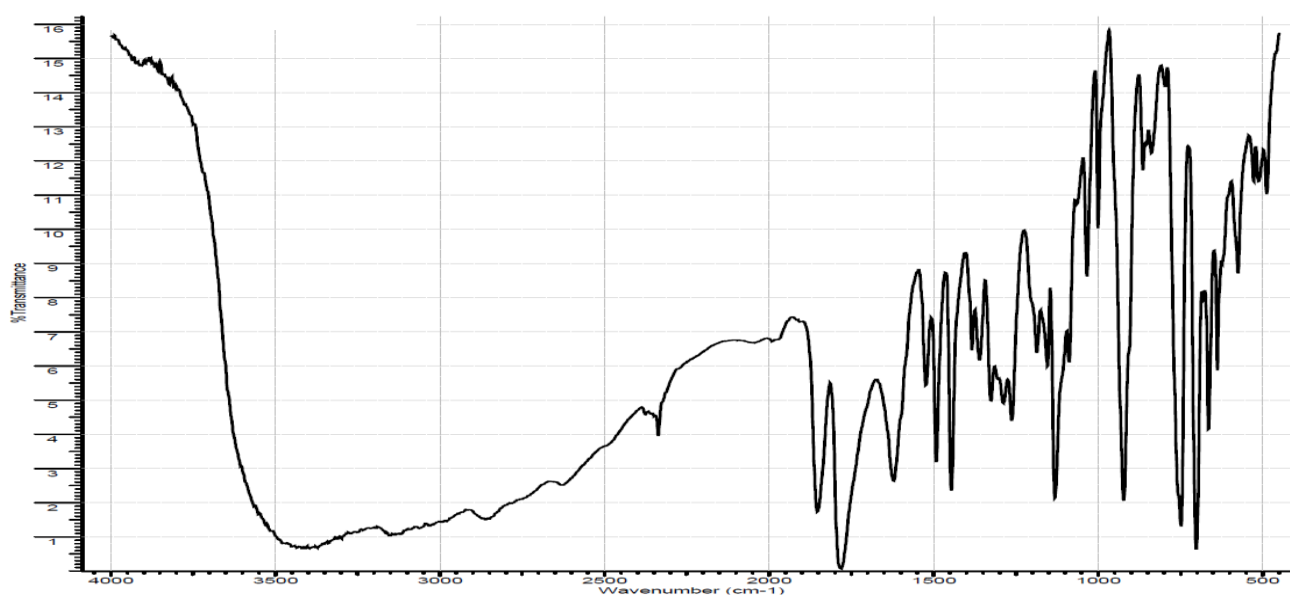
**Εικόνα 2: Φάσμα IR της Boc-L-Histidine-(Trt)-OH**

3. Μετά την ολοκλήρωση της απόσταξης, κατεβάζουμε την φιάλη με τη στρόφιγγα κλειστή, ώστε μέσα να υπάρχει κενό. Με προσαρμογή ειδικού επιθέματος στον αντάπτορα κενού και χρήση φιάλης αργού, ανοίγουμε την στρόφιγγα και βάζουμε αργό στην συσκευή. Μετά κλείνουμε τη στρόφιγγα. Πετυχαίνουμε έτσι να υπάρχει αργό μέσα στην συσκευή, για όσο χρόνο θα αφαιρέσουμε τον αντάπτορα κενού. Το αργό είναι βαρύ και αδρανές αέριο οπότε θα βρίσκεται πάνω στο διάλυμα αποτρέποντας να έρθει σε επαφή το διάλυμα με την υγρασία και την ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια προσαρμόζουμε κατάλληλο δίκλιμο επίθεμα, ώστε να έχουμε τη συσκευή μας συνδεδεμένη στη φιάλη αργού συνέχεια. Έτσι επιτυγχάνουμε συνεχή ροή αργού.



**Εικόνα 2:** Συσκευές κατά την αντίδραση για την σύνθεση  $N_{im}$ -Trt-L-Histidine NCA

Η συσκευή τοποθετείται πάνω σε αναδευτήρα και κάψα και στηρίζεται με την χρήση στατό και μοχλοβραχιόνων. Προσθέτουμε το θειόνυλο χλωρίδιο με σταγονομετρικό χωνί, έχοντας προσέξει η αναλογία του να είναι πολλαπλασιασμένη επί 1,1 κατά mol ως προς το αντιδρών, δηλαδή την Boc-L-Histidine-(Trt)-OH. Προσθέτουμε στην κάψα παγόνερο ώστε η θερμοκρασία της αντίδρασης να είναι στους 0°C. Η αντίδραση αφήνεται για δυο ώρες.



**Εικόνα 3:** Φάσμα IR της  $N_{im}$ -Trt-L-Histidine NCA 2ώρες μετά την αντίδραση

Στο φάσμα του IR μετά από δυο ώρες είναι χαρακτηριστικές οι κορυφές στα  $1780\text{ cm}^{-1}$  του C2 και στα  $1820\text{ cm}^{-1}$  του C5 του σχηματισμένου πλέον NCA, ενώ οι κορυφές στα  $1660\text{ cm}^{-1}$  και  $1710\text{ cm}^{-1}$  του α-αμινοξέος δεν υπάρχουν πια.

4. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, χύνουμε το περιεχόμενο της συσκευής που έλαβε χώρα η αντίδραση σε ποτήρι ζέσης που περιέχει διαιθυλαιθέρα περίπου δέκα φορές σε σχέση με το THF. Εκεί το προϊόν της αντίδρασης θα καταπέσει και στη συνέχεια θα το φιλτράρουμε με φίλτρο No 3, στο οποίο έχουμε προσαρμόσει κατάλληλο πλαστικό πώμα και το έχουμε τοποθετήσει στον ένα από τους δυο λαιμούς μιας άλλης δίλαιμης σφαιρικής φιάλης 1000ml. Με κατάλληλο επίθεμα και προσαρμοσμένο σε αυτό λάστιχο συνδέουμε τον άλλο λαιμό της φιάλης στο κενό του πάγκου. Κατά τη διάρκεια του φιλτραρίσματος έχουμε προσαρμόσει χωνί στο λάστιχο εξόδου της φιάλης αργού, και έτσι όλη η διαδικασία του φιλτραρίσματος γίνεται υπό αργό. Κρατάμε το στερεό που παραμένει στο φίλτρο και το μεταφέρουμε προσεκτικά σε μια τρίτη σφαιρική φιάλη 1000ml. Τοποθετούμε σε αυτήν κατάλληλο σύνδεσμο και την ανεβάζουμε στην γραμμή κενού όπου και απαερώνουμε. Στη συνέχεια αφήνουμε το στερεό μια νύχτα στη γραμμή κενού για ξήρανση.
5. Στην συνέχεια αποστάζουμε στην φιάλη οξικό αιθυλεστέρα με την βοήθεια της γραμμής κενού. Αποστάζουμε περίπου 250ml για κάθε 10 γραμμάρια. Αφού ολοκληρωθεί η απόσταξη, ξεπαγώνω την δίλαιμη φιάλη τοποθετώντας την σε δοχείο με νερό.
6. Μετά τοποθετούμε την φιάλη πάνω σε κάψα που περιέχει νερό και αυτήν σε αναδευτήρα με θέρμανση και θερμαίνω υπό ανάδευση στους  $45^{\circ}\text{C}$  για μια ώρα. Προσέχω την θερμοκρασία με την βοήθεια θερμόμετρου. Έτσι τα πάντα θα διαλυθούν στον EtAc.
7. Μετά το πέρας της μιας ώρας αντικαθιστώ το ζεστό νερό στην κάψα με λουτρό πάγου. Μειώνεται έτσι η διαλυτότητα του NCA και παρατηρούμε ότι ο σχηματισμένος λευκός NCA καταβυθίζεται ενώ πάνω σχηματίζεται ένα κίτρινο διάλυμα. Το κίτρινο διάλυμα είναι οι διάφορες προσμίξεις, ακαθαρσίες, παραπροϊόντα ή μη αντιδρώντα που είναι διαλυτά στον EtAc.

8. Στην συνέχεια φιλτράρουμε πάλι το περιεχόμενο της συσκευής μας. Χρησιμοποιώ φίλτρο Νο 3 προσαρμοσμένο σε πλαστικό πώμα και αυτό τοποθετείται στον ένα από τους δυο λαιμούς μιας δίλαιμης 1000αρας φιάλης. Στον άλλο λαιμό βάζω επίθεμα στο οποίο προσαρμόζω λάστιχο που συνδέεται με το κενό του πάγκου. Κατά την διάρκεια του διήθησης έχουμε προσαρμόσει χωνί στο λάστιχο εξόδου της φιάλης αργού, και έτσι όλη η διαδικασία του φιλτραρίσματος γίνεται υπό αργό. Κρατάμε το στερεό πάνω στο φίλτρο που είναι ο NCA με υδροχλώριο. Το υδροχλώριο που παράγεται κατά την αντίδραση δεν φεύγει, γιατί λόγω της ενεργότητας του τ-N του ιμιδαζολικού δακτυλίου το υδροχλώριο συνδέεται σε αυτό.
9. Το στερεό αυτό πάνω στο φίλτρο το ζυγίζουμε. Αυτό το κάνουμε για να υπολογίσουμε την ποσότητα της τριαιθυλαμίνης που θα χρησιμοποιήσουμε σε επόμενο βήμα. Ζυγίσαμε 13,4 γραμμάρια του NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο. Ξέρουμε πως το μοριακό βάρος του NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο είναι 459,5. Είναι πολύ σημαντικό να υπολογίσουμε σωστά την ποσότητα της τριαιθυλαμίνης που θα χρησιμοποιήσουμε, γιατί αν ρίξουμε λιγότερο δεν θα φύγει όλο το υδροχλώριο με συνέπεια ο πολυμερισμός να μη γίνεται σωστά και αν ρίξουμε περισσότερο υπάρχει κίνδυνος έναρξης πολυμερισμού, αφού η τριαιθυλαμίνη ως βάση μπορεί να εκκινήσει τον πολυμερισμό των NCAs.
10. Μετά μεταφέρουμε προσεκτικά σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη 500 ml τον NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο. Σε αυτήν τοποθετούμε έναν σύνδεσμο για σύνδεση στη γραμμή κενού. Αφού ανεβάσουμε τη φιάλη στη γραμμή κενού, απαερώνουμε και αφήνουμε για ξήρανση για μια νύχτα.
11. Στην συνέχεια αποστάζω στην φιάλη με την βοήθεια της γραμμής κενού EtAc 250ml για κάθε 10γραμμάρια. Αφού ξεπαγώσω, τοποθετώ την τρίλαιμη σφαιρική 500αρα σε παγόλουτρο. Σε μια άλλη μικρή φιάλη αποστάζω επίσης άλλα 15ml EtAc.
12. Υπολογίσαμε πως στη φιάλη έχω 0,029 mol από τον NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο ( $13,4 \text{ g} / 459,5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} = 0,029 \text{ mol}$ ). Ξέρουμε ότι το μοριακό βάρος της τριαιθυλαμίνης είναι  $101,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Άρα θα χρειαστούμε  $101,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \times 0,029 \text{ mol} = 2,95 \text{ γραμμάρια τριαιθυλαμίνης}$ . Η πυκνότητα της τριαιθυλαμίνης είναι  $0,7255 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Και από τον τύπο της πυκνότητας

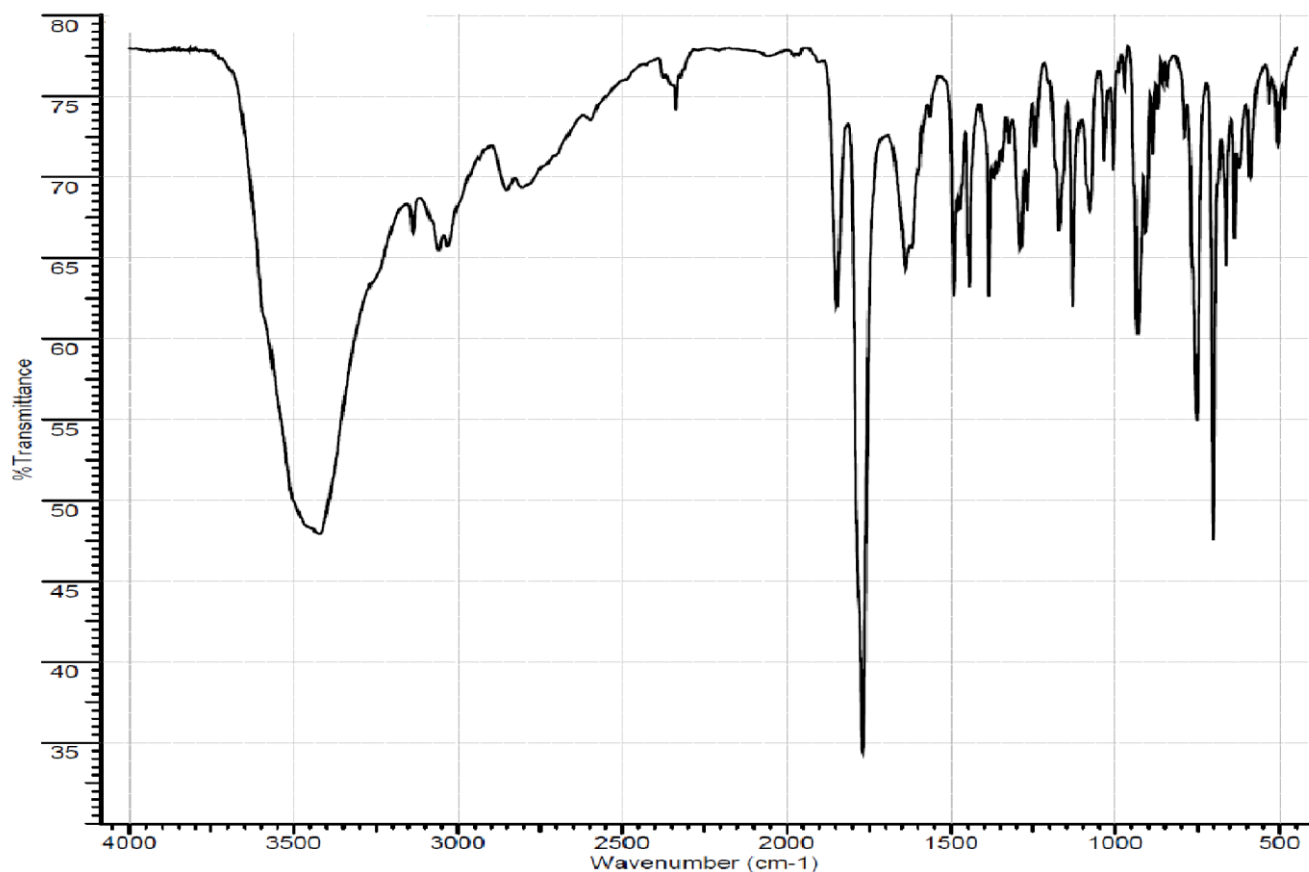
$d = \frac{m}{v}$  λύνω ως προς όγκο και έχω 4,06 ml τριαιθυλαμίνης. Οπότε αποστάζουμε με την βοήθεια της γραμμής κενού σε μια μικρή φιάλη περίπου 5ml τριαιθυλαμίνης από την φιάλη με το μεταλλικό νάτριο που φυλάσσεται. Με την βοήθεια σύριγγας παίρνουμε τέσσερα ml τριαιθυλαμίνης και τα βάζουμε σε σταγονομετρικό χωνί. Εκεί προσθέτουμε και τα 15 ml EtAc που απέσταξαμε σε μια άλλη μικρή φιάλη στο προηγούμενο βήμα.

13. Στην τρίλαιμη φιάλη ακολουθούμε την ίδια πορεία όπως στο βήμα 3 για να έχουμε συνεχή ροή αργού. Οπότε στον έναν λαιμό προσαρμόζουμε δίκαιμο επίθεμα για να υπάρχει ροή αργού και στον άλλο λαιμό βάζουμε το σταγονομετρικό χωνί με την τριαιθυλαμίνη διαλυμένη στον EtAc. Ρίχνουμε την τριαιθυλαμίνη στάγδην για 15 λεπτά περίπου και μετά αφήνουμε το διάλυμα για μια ώρα. Αυτό που θέλουμε να πετύχουμε είναι να αντιδράσει η τριαιθυλαμίνη που είναι βασική με το υδροχλώριο που υπάρχει στον NCA και εξαιτίας της χαμηλής θερμοκρασίας που έχουμε με το παγόλουτρο το άλας της τριαιθυλαμίνης, που δεν είναι διαλυτό, να καταβυθιστεί ώστε να μπορέσουμε με διήθηση στο επόμενο βήμα να το απομακρύνουμε.
14. Στην συνέχεια σε μια δίκαιμη σφαιρική φιάλη 1000ml προσθέτω 600ml εξάνιο και ένα μαγνητάκι ώστε να βρίσκεται υπό ανάδευση. Χρησιμοποιώ φίλτρο No 3 προσαρμοσμένο σε πλαστικό πώμα και αυτό τοποθετείται στον ένα από τους δυο λαιμούς της φιάλης. Στον άλλο λαιμό βάζω επίθεμα στο οποίο προσαρμόζω λάστιχο που συνδέεται με το κενό του πάγκου. Ρίχνουμε το περιεχόμενο της τρίλαιμης σφαιρικής του προηγούμενου βήματος πάνω στο φίλτρο, έτσι ώστε το άλας της τριαιθυλαμίνης να μείνει πάνω σε αυτό και να περάσει κάτω διαλυτός ο NCA. Κρατάμε το περιεχόμενο της δίκαιμης που είναι ο NCA σε εξάνιο και παρατηρούμε να πέφτει στο εξάνιο έχοντας άσπρο χρώμα.
15. Σε αυτό το βήμα φιλτράρουμε ξανά τον NCA στο εξάνιο. Χρησιμοποιούμε μια νέα δίκαιμη 1000ml σφαιρική φιάλη, προσαρμόζουμε το φίλτρο και το επίθεμα με το κενό του πάγκου και κρατάμε τον στερεό NCA που κάθεται πάνω στο φίλτρο. Η όλη διαδικασία γίνεται υπό ροή αργού ή αζώτου όπως στο βήμα 8.

16. Τέλος μεταφέρουμε τον NCA σε μια νέα μικρή φιάλη στην οποία προσαρμόζουμε έναν αντάπτορα κενού και ανεβαίνουμε στην γραμμή κενού όπου την αφήνουμε μια νύχτα για ξήρανση.

Ο NCA μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και φυλάσσεται εκεί, σε δοχείο υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Ζυγίσαμε τελικά 11 γραμμάρια. Για την απόδοση έχουμε:  $20\text{g}/497,58\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}=0,0402\text{mol}$  για το αντιδρών και  $11\text{g}/423\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}=0,0260\text{mol}$  για το προϊόν. Άρα η συνολική απόδοση είναι :

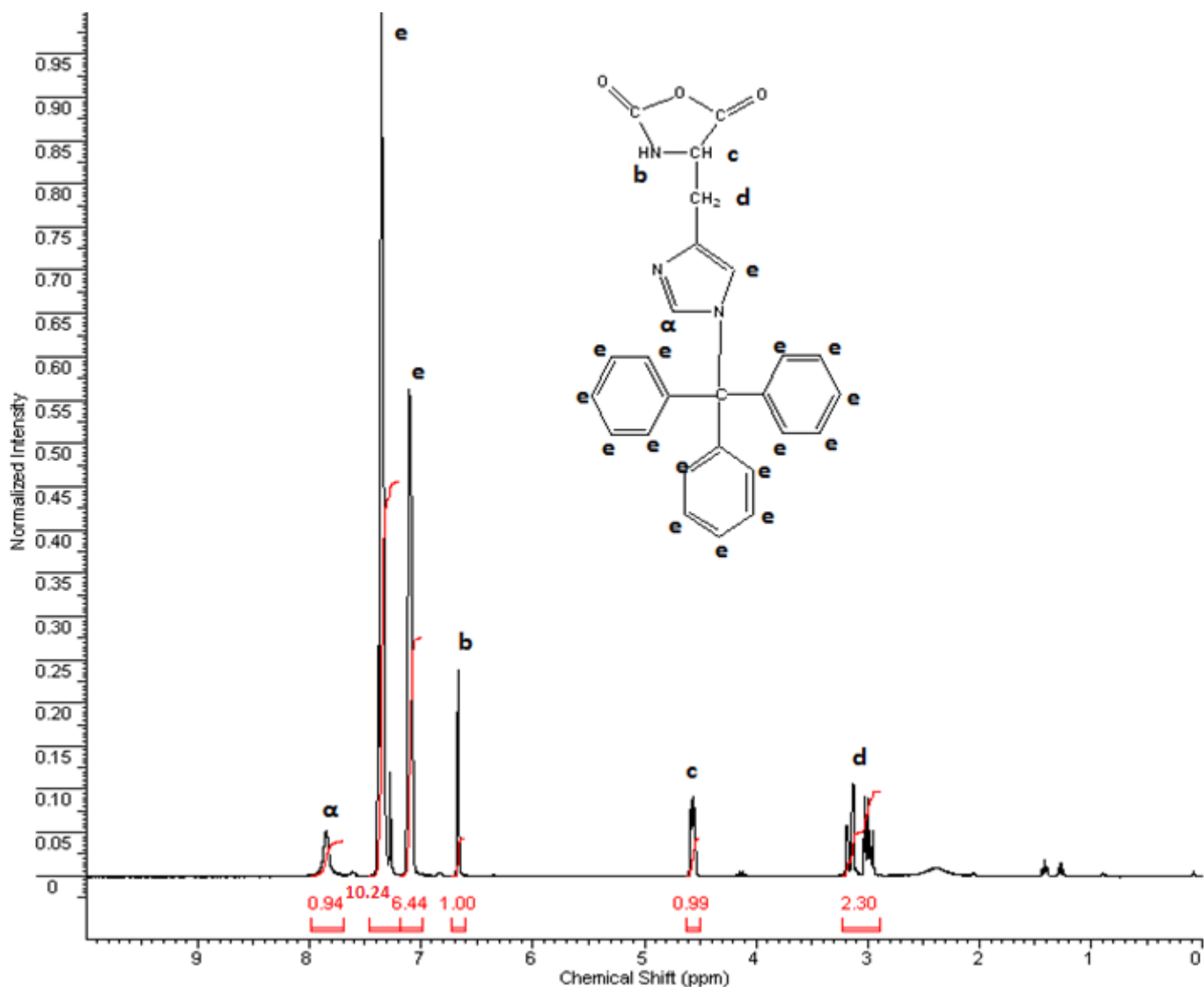
$$\frac{0,0260\text{mol}}{0,0402\text{mol}} \times 100\% = 64,7\%$$



Εικόνα 4: Φάσμα IR της  $N_{im}$ -Trt-L-Histidine NCA

Στο τελικό φάσμα του IR για τον  $N_{im}$ -Trt-L-Histidine NCA είναι χαρακτηριστικές οι κορυφές στα  $1768\text{ cm}^{-1}$  του C2 και στα  $1849\text{ cm}^{-1}$  του C5 του NCA.

Για την εξακρίβωση της σύνθεσης του NCA της ιστοδίνης με την τρίτυλο προστατευτική ομάδα έγινε λήψη του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

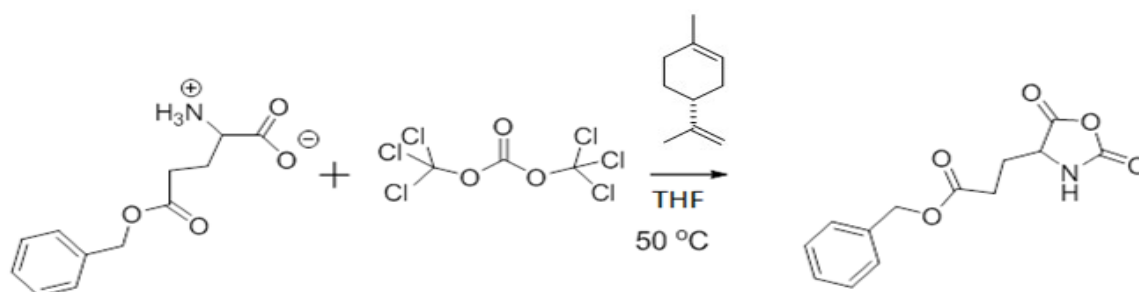


Εικόνα 5: Φάσμα NMR της Nim-Trt-L-Histidine NCA

Στο φάσμα του  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρούμε ότι το υδρογόνο του C του ιμιδαζολικού δακτυλίου που συνδέεται με το άζωτο που φέρει την προστασία (e) εντοπίζεται στην ίδια περιοχή με τα υδρογόνα της προστασίας. Επίσης στην ίδια περιοχή (7,2 ppm) έχουμε και την κορυφή από τον διαλύτη.

### 3.6 Σύνθεση $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA

Η διαδικασία της σύνθεσης του  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA διαρκεί περίπου πέντε ημέρες. Η αντίδραση είναι γρήγορη και οδηγεί σε μεγάλες αποδόσεις. Επιπλέον η παρουσία της βένζυλο ομάδας επιτρέπει τις όξινες συνθήκες της αντίδρασης χωρίς επιπλοκές. Σε όλα τα στάδια γίνεται χρήση ανάδευσης στις συσκευές με την βοήθεια μαγνητών και ηλεκτρικού αναδευτήρα. Όλες οι συσκευές που χρησιμοποιούνται και τα φίλτρα έχουν μπει σε φούρνο για μία ημέρα στους  $600^{\circ}\text{C}$ , ώστε να έχει απομακρυνθεί κάθε είδους ένωση ή βρωμιά από αυτές και να είναι τελείως καθαρές. Σε αυτές τις θερμοκρασίες όλα αποσυντίθενται ή καταστρέφονται, εκτός από το γυαλί.



Σχήμα 34: Αντίδραση σύνθεσης  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA

1. Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη 500 ml ζυγίζονται 10 γραμμάρια  $\gamma$ -βένζυλο-L-γλουταμικό οξύ και αφήνονται για ξήρανση ένα βράδυ στην γραμμή κενού με χρήση κατάλληλου αντάπτορα.
2. Την επόμενη ημέρα αποστάζονται σε αυτήν με τη βοήθεια της γραμμής κενού 167 ml THF. Αμέσως μετά πηγαίνουμε τη φιάλη μας με το αιώρημα στον απαγωγό. Εκεί την τοποθετούμε σε κάψα με νερό και αυτήν πάνω σε αναδευτήρα. Η συσκευή στηρίζεται με τη βοήθεια στατό και μοχλοβραχιόνων.
3. Με προσαρμογή ειδικού επιθέματος στον σύνδεσμο κενού και χρήση φιάλης αργού, ανοίγουμε την στρόφιγγα και βάζουμε αργό στη συσκευή. Μετά κλείνουμε τη στρόφιγγα. Πετυχαίνουμε έτσι να υπάρχει αργό μέσα στην συσκευή, για όσο χρόνο θα αφαιρέσουμε τον αντάπτορα κενού. Στη συνέχεια τοποθετούμε ψυκτήρα και προσαρμόζουμε την παροχή αδρανούς αερίου.
4. Θερμαίνουμε το νερό και όταν η θερμοκρασία ανέβει στους  $45^{\circ}\text{C}$  προστίθενται 10,9 ml από το λιμονένιο και μετά 5 γραμμάρια από το



τριφωσγένιο σε μία δόση. Η θερμοκρασία διατηρείται σε αυτά τα επίπεδα. Το λιμονένιο είναι ένα τερπένιο και θα αντιδράσει με όσα χλώρια περισσέψουν από το τριφωσγένιο.

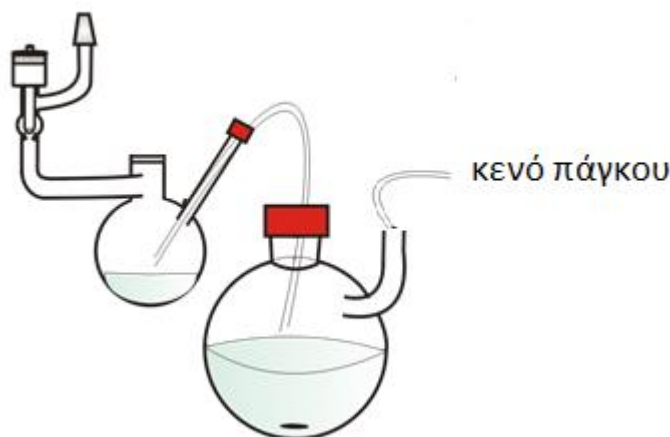
5. Στα πρώτα 20 λεπτά το διάλυμα έχει διαυγάσει και έχει γίνει ομογενές και αφήνεται συνολικά για μιάμιση ώρα.



**Εικόνα 6:** Συσκευές κατά την αντίδραση για την σύνθεση  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA

6. Διηθείται σε μια νέα φιάλη με χωνί No 3 και αυτήν την ανεβάζουμε με κατάλληλο αντάπτορα στην γραμμή όπου αποστάζεται προς εκδίωξη του THF.
7. Προστίθενται 200ml παγωμένου EtAc και όταν διαλυτοποιηθεί ο ανυδρίτης ακολουθεί το στάδιο των εκχυλίσεων.
8. Σε διαχωριστική χοάνη του ενός λίτρου μεταφέρεται το διάλυμα και εκχυλίζεται με υδατικό διάλυμα  $\text{NaHCO}_3$  0,5% και στην συνέχεια με παγωμένο νερό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά. Με την δεύτερη εκχύλιση το pH είναι ουδέτερο.
9. Λαμβάνεται η οργανική στοιβάδα και ξηραίνεται με ενεργοποιημένο  $\text{MgSO}_4$ . Μετά ακολουθεί διήθηση με χωνί No4 για απομάκρυνση του  $\text{MgSO}_4$ .
10. Μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη ώστε να αποταχθεί όλη η ποσότητα του διαλύτη μέχρι ξηρού. Ακολουθεί ξήρανση στη γραμμή.

11. Το επόμενο στάδιο είναι οι ανακρυσταλλώσεις. Αποστάζονται περίπου 80 ml EtAc ώστε να διαλυθεί ο NCA και μετά 200 ml εξάνιο. Έχουμε έντονη ανάδευση και παρατηρούμε ομογενή καταβύθιση. Το αφήνουμε στο ψυγείο για ένα βράδυ.
12. Την επόμενη ημέρα γίνεται μεταφορά με μετάγγιση από την φιάλη που βρίσκεται το διάλυμα σε άλλη δίκλιμη φιάλη υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Η αρχική μας φιάλη προσαρμόζεται στην γραμμή αργού και συνδέεται με πώμα και κατάλληλο λάστιχο με την φιάλη στην οποία θα πάνε οι διαλύτες, η οποία συνδέεται με το κενό του πάγκου. Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δυο φορές, έχουμε δηλαδή τρεις ανακρυσταλλώσεις.

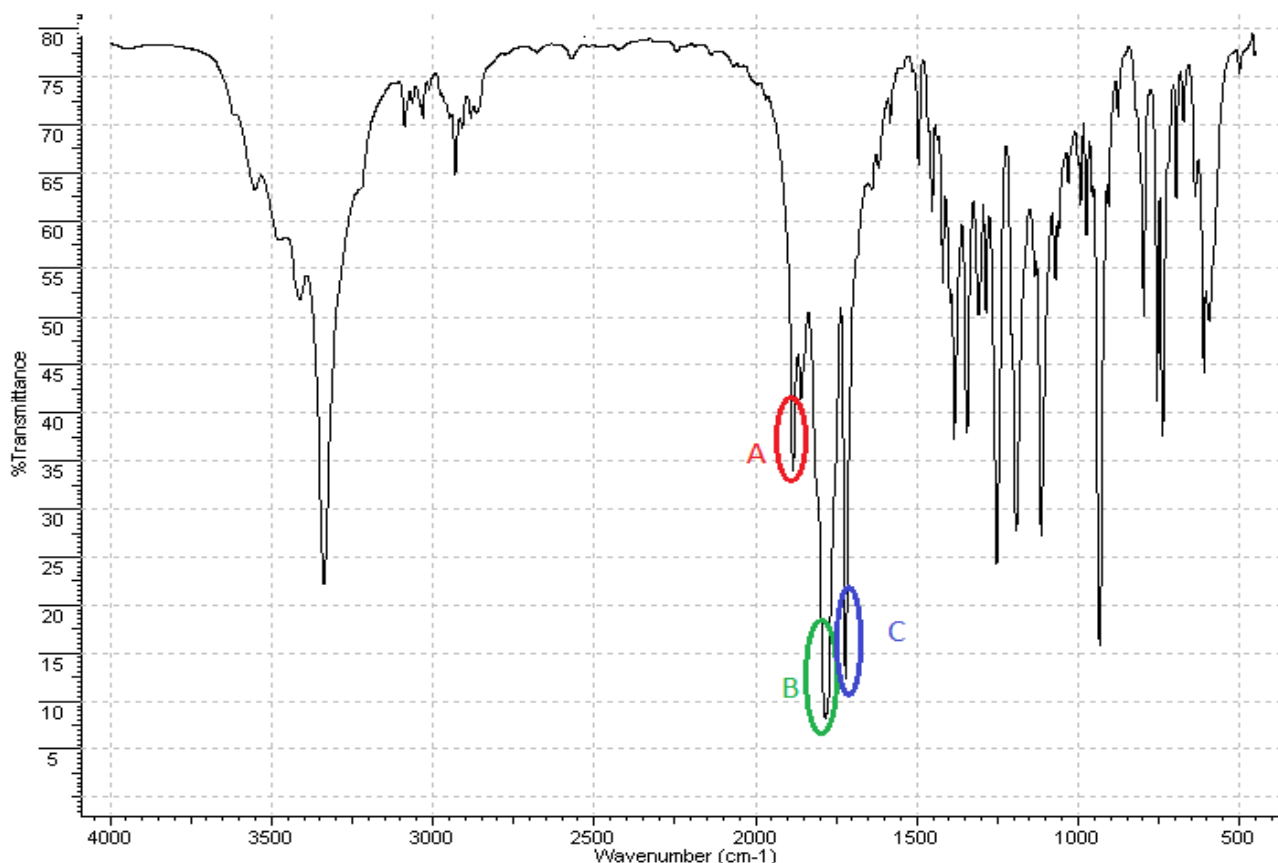


Σχήμα 35: Ανακρυσταλλώσεις υπό αδρανή ατμόσφαιρα

13. Τέλος αποστάζεται στην γραμμή κενού ο διαλύτης και αφήνεται μια νύχτα για ξήρανση.

Ο NCA μεταφέρεται στο glove box όπου ζυγίζεται και φυλάσσεται εκεί, σε δοχείο υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Ζυγίσαμε τελικά 10,2 γραμμάρια. Για την απόδοση έχουμε:  $10\text{g}/237,25\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}=0,0421\text{mol}$  για το αντιδρών και  $10,2\text{g}/263\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}=0,0388\text{mol}$  για το προϊόν. Άρα η συνολική απόδοση είναι :

$$\frac{0,0373\text{ mol}}{0,0421\text{ mol}} \times 100\% = 92,2\%$$



**Εικόνα 7: Φάσμα IR της  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA**

Η επιτυχής σύνθεση του NCA επιβεβαιώνεται από το φάσμα του IR όπου βλέπουμε τις εξής χαρακτηριστικές κορυφές: **A**: Δονήσεις έκτασης  $\text{C}=\text{O}$  κοντά στο O στα  $1883\text{cm}^{-1}$  **B**: Δονήσεις έκτασης  $\text{C}=\text{O}$  κοντά στο N στα  $1784\text{cm}^{-1}$  και **C**: Δονήσεις έκτασης  $\text{C}=\text{O}$  της προστασίας στα  $1722\text{cm}^{-1}$

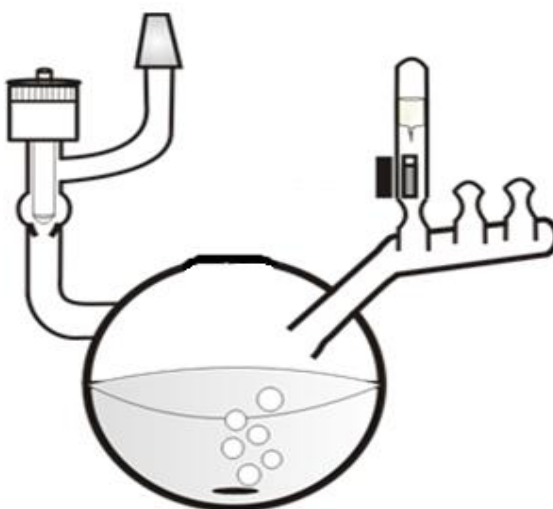
### 3.7 Σύνθεση πολύ-L-ιστιδίνης

Πρώτο βήμα στη σύνθεση της πολύ-L-ιστιδίνης είναι να υπολογίσουμε τις ποσότητες μονομερούς και απαρχητή που θα χρησιμοποιήσουμε. Για την σύνθεση του ομοπολυμερούς αποφασίσαμε να πάμε σε 6000 μοριακό βάρος, τιμή την οποία θα πρέπει να έχει η πολυιστιδίνη χωρίς το  $\text{CO}_2$  που φεύγει κατά τον πολυμερισμό της αλλά και μετά την αποπροστασία της. Έτσι από το μοριακό βάρος του Nim-Trt-L-Histidine NCA που είναι 423 πρέπει να αφαιρέσουμε το μοριακό βάρος του  $\text{CO}_2$  που είναι 44. Επίσης η πολύ-L-ιστιδίνη θέλουμε να έχει μοριακό βάρος 6000 χωρίς την προστασία. Άρα πρέπει να αφαιρέσουμε και το μοριακό βάρος της τρίτυλο προστασίας που είναι 243. Άρα έχουμε  $423-44-243=136$ . Άρα όταν θα είναι πολυμερισμένη η ιστιδίνη και θα

έχει φύγει το CO<sub>2</sub> αλλά όχι ακόμα η προστασία της το μοριακό της βάρος θα είναι :  $\frac{379}{136} \times 6000 = 16720$ .

Από την συσκευή αραίωσης του απαρχητή (περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3),πήραμε μια αμπούλα που περιείχε διμεθυλαμίνη 6 ml συγκέντρωσης  $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol/ml}$ . Άρα τα mol του απαρχητή είναι  $6,6 \times 10^{-5} \text{ mol}$ . Από τον τύπο  $Mn = \frac{\text{gr μονομερούς}}{\text{moles απαρχητή}}$  λυοντας προς γραμμάρια μονομερους βρισκουμε 1,10352 γραμμάρια. Και επειδή όταν το ζυγίζουμε πριν τον πολυμερισμό υπάρχει ακόμα το CO<sub>2</sub> ισχύει η διόρθωση :  $\frac{379}{423} \times = 1.10352$ . Άρα εμείς θα πρέπει να ζυγίσουμε : 1,24 γραμμάρια από τον Nim-Trt-L-Histidine NCA.

Οπότε βάζουμε για μια ημέρα την συσκευή πολυμερισμού που θα χρησιμοποιήσουμε στον φούρνο ώστε να καθαρίσει. Την επομένη κολλάμε με υαλουργία την αμπούλα με τον απαρχητή μας στη φιάλη, αφού φροντίσουμε να προσαρμόσουμε τον breaker πάνω από την μύτη του break seal της αμπούλας. Αφού βάλουμε μαγνήτη ανάδευσης και κατάλληλη στρόφιγγα στην φιάλη ανεβαίνουμε στην γραμμή κενού όπου απαερώνουμε, ελέγχουμε για τυχόν μικρές τρύπες με την βοήθεια πηνίου Tesla και αφού βεβαιωθούμε ότι το σύστημα μας είναι στεγανό κάνουμε τρία flame drying για απομάκρυνση της υγρασίας.



Σχήμα 36: Συσκευή πολυμερισμού ομοπολυμερούς ιστιδίνης

Στην συνέχεια κατεβαίνουμε από την γραμμή κενού και μπαίνουμε στο glove box. Εκεί ζυγίζουμε και ρίχνουμε το μονομερές μας στην φιάλη, αφού αφαιρέσουμε την στρόφιγγα. Κλείνουμε την στρόφιγγα πάλι και επιστέφουμε στην γραμμή κενού όπου αφού απαερώσουμε για να διώξουμε το αδρανές αέριο που μπήκε κατά την διαδικασία στο glove box, αποστάζουμε 30ml DMF. Αφού σιγουρευτούμε ότι το μονομερές διαλύθηκε καλά με την χρήση αναδευτήρα, σπάμε την μύτη του break seal και ανακινούμε ώστε ο απαρχητής να εκκινήσει τον πολυμερισμό. Ο πολυμερισμός διαρκεί 7 μέρες.

Τότε παίρνουμε ένα μεγάλο ποτήρι ζέσης βάζουμε μέσα παγωμένο διαιθυλαιθέρα περίπου 300 ml, ανοίγουμε την στρόφιγγα της φιάλης πολυμερισμού και καταβυθίζουμε το πολυμερές χύνοντας το μέσα. Παρατηρούμε το διάλυμα να θολώνει. Αφού βάλουμε για μισή με μια ώρα το ποτήρι ζέσης στην κατάψυξη χρησιμοποιούμε συσκευή διηθήσεως Buchner υπό κενό με φίλτρο που έχει μέγεθος πόρων 0,45 μm για να συλλέξουμε πάνω στο φίλτρο το πολυμερές. Στη συνέχεια μεταφέρουμε το πολυμερές σε μια μικρή φιάλη και ανεβαίνουμε στην γραμμή κενού, αφήνοντας το για ξήρανση. Ζυγίσαμε 0,073 γραμμάρια πολυμερούς.

Επόμενο βήμα είναι η αποπροστασία. Αρχικά διαλύουμε το πολυμερές μας σε 5 ml διχλωρομεθάνιο και το αφήνουμε για μισή ώρα υπό έντονη ανάδευση με την χρήση αναδευτήρα και σχηματίζεται ένα θολό κίτρινο γαλάκτωμα. Στην συνέχεια προσθέτουμε 10ml TFA. Με την χρήση του TFA οι τρίτυλο προστατευτικές ομάδες θα απομακρυνθούν. Παρατηρούμε ότι το διάλυμα έγινε έντονο κίτρινο, πιθανώς επειδή οι τρίτυλο κόβονται και απορροφούν στο ορατό. Το αφήνουμε υπό ανάδευση για μια ώρα. Στην συνέχεια θα προσθέσουμε τριαιθυλοσιλάνιο. Ο λόγος που χρησιμοποιώ αυτό το αντιδραστήριο είναι ο ακόλουθος: Με την χρήση του τριαιθυλοσιλανίου θα κολλήσουν σε αυτό οι τρίτυλο προστατευτικές ομάδες που θα κοπούν κατά την αντίδραση αποπροστασίας με το TFA. Έτσι αποφεύγουμε τον κίνδυνο οι τρίτυλο να ξαναενωθούν στο πολυμερές. Για την ποσότητα τριαιθυλοσιλανίου που θα ρίξω σκέφτομαι ως εξής: Έχω  $\frac{0.073g}{379 g/mol} = 0,000192$  mol πολυμερούς. Τόσα mol τριαιθυλοσιλανίου θα χρειαστώ. Άρα  $0,000192 \text{ mol} \times 116,28 \text{ g/mol} = 0,022g$  από το τριαιθυλοσιλάνιο. Και για να βρω τον όγκο που θα χρειαστώ:  $0,022g/0,728g \cdot ml^{-1} = 0,016ml$  τριαιθυλοσιλανίου. Οπότε με μια σύριγγα παίρνω

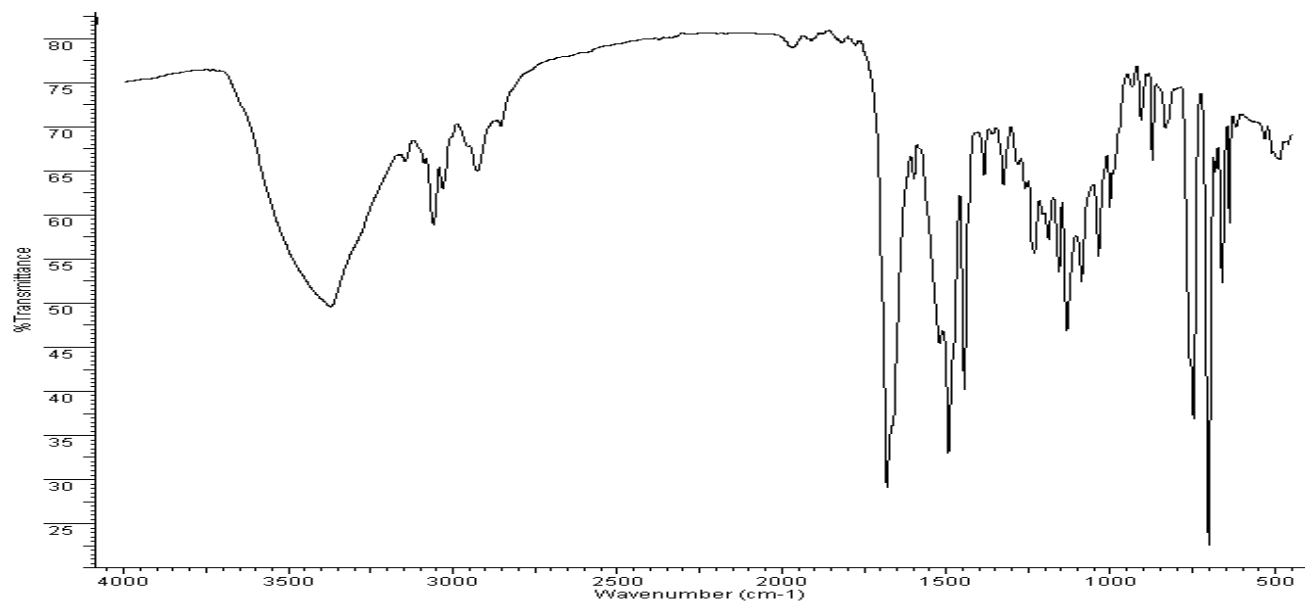
0,016 ml και ρίχνω στο διάλυμα στάγδην. Ρίχνω σταγόνες μέχρι το διάλυμα να αποχρωματιστεί.

Στην συνέχεια προσαρμόζω έναν αντάπτορα κενού στην φιάλη και την τοποθετώ σε μια γυάλινη συσκευή σχήματος Π. Η συσκευή προσαρμόζεται με εσμύρισμα που φέρει στην γραμμή κενού. Στο άλλο άκρο του Π βάζω μια κενή φιάλη που απαερώνω και με απόσταξη διώχνω το TFA και το διχλωρομεθάνιο. Έτσι μένει μόνο το πολυμερές. Ο λόγος που χρησιμοποιώ το Π είναι για να μην μείνει TFA στην γραμμή κενού προκαλώντας μελλοντικά προβλήματα κατά την χρήση της. Στη μικρή φιάλη του πολυμερούς προσθέτω DMSO περίπου 3 ml και αφού το πολυμερές διαλυθεί το καταβυθίζω σε 300 ml διαιθυλαιθέρα που έχω ήδη βάλει σε ποτήρι ζέσης. Παρατηρούμε το διάλυμα να θολώνει. Η τρίτυλο προστατευτική ομάδα είναι διαλυτή στον διαιθυλαιθέρα και θα περάσει μαζί του από το φίλτρο στην διήθηση. Αφού βάλουμε για μισή με μια ώρα το ποτήρι ζέσης στην κατάψυξη χρησιμοποιούμε συσκευή διηθήσεως Buchner υπό κενό με φίλτρο που έχει μέγεθος πόρων 0,45 μm για να συλλέξουμε πάνω στο φίλτρο το πολυμερές. Στη συνέχεια μεταφέρουμε το πολυμερές σε μια μικρή φιάλη και ανεβαίνουμε στην γραμμή κενού, αφήνοντας το για ξήρανση μια νύχτα. Κατά την διάρκεια της διήθησης χάθηκε αρκετή ποσότητα.

Επόμενο στάδιο είναι να διαλύσω το πολυμερές σε 10ml νερό milliQ. Παρατηρώ ότι το διάλυμα μου είναι υποκίτρινο. Κόβω ένα κομμάτι με ψαλίδι από μια μεμβράνη Dialysis(10cm), που φτιάχνεται από αναγεννημένη κυτταρίνη, προσέχοντας να έχει το επιθυμητό μέγεθος πόρων. Την βάζω σε ποτήρι ζέσης με νερό και περιμένω να φουσκώσει. Όταν η μεμβράνη φουσκώσει προθέτω με την βοήθεια πιπέτας το διαλυμένο σε νερό πολυμερές. Κλείνω την μεμβράνη και από τις δυο πλευρές με κατάλληλα πιαστράκια. Βάζω την μεμβράνη σε ποτήρι ζέσης με 900 ml νερό milliQ και ρίχνω 4 σταγόνες πυκνό υδροχλωρίο 1M και ένα μαγνητάκι ώστε το διάλυμα να είναι υπό ανάδευση. Η προσθήκη του πυκνού υδροχλωρίου γίνεται ώστε να μην σχηματίσει η πολύ-L-ιστιδίνη β-φύλλο στη δευτεροταγή της δομή. Ανανεώνω το διάλυμα νερού με 4 σταγόνες πυκνό υδροχλωρίο μια φορά κάθε μέρα για έξι μέρες. Το διάλυμα στο εσωτερικό της μεμβράνης γίνεται πλέον διαυγές, ένδειξη ότι καθάρισε. Μετά την αποπροστασία με TFA και διήθηση σε διαιθυλαιθέρα παίρνω πάνω στο φίλτρο αλάτι πολυιστιδίνης με TFA. Με την διαδικασία με την

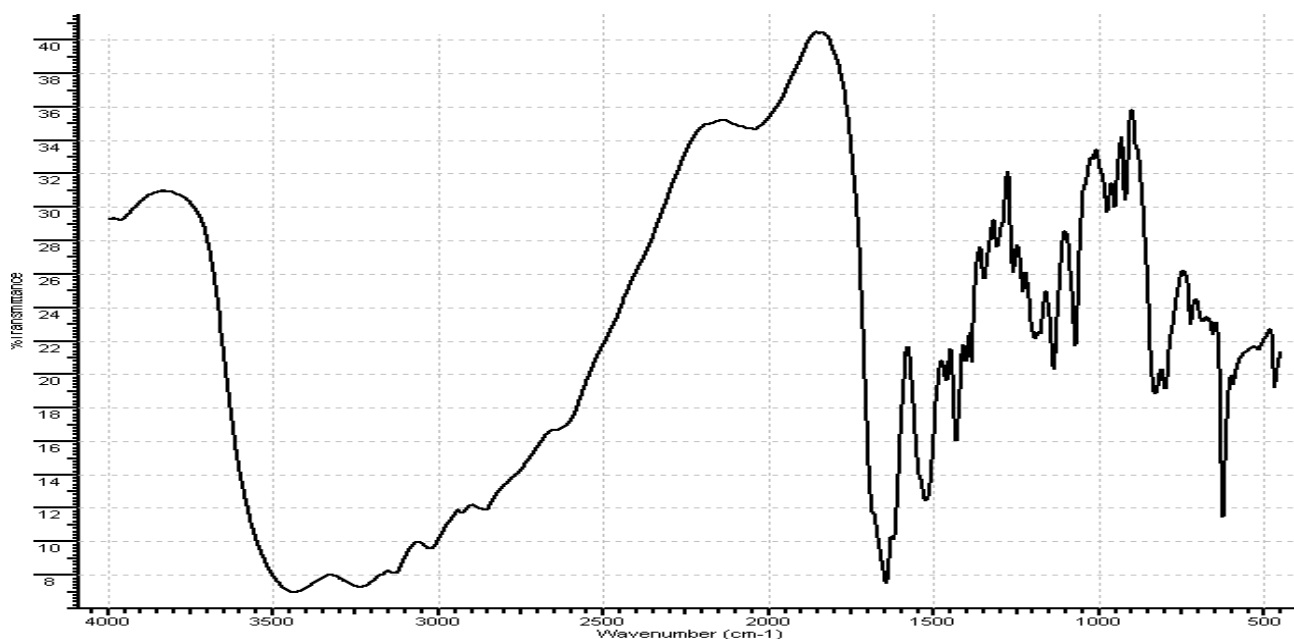
μεμβράνη dialysis παίρνω την πολυιστιδίνη με αλάτι υδροχλωρίου καθότι το TFA φεύγει. Το αλάτι σχηματίζεται με την παραμονή του υδροχλωρίου στο N του ιμιδαζολικού δακτυλίου που ήταν η προστασία. Έτσι καθαρίζει απόλυτα το πολυμερές, γιατί λόγω του μοριακού του βάρους δεν μπορεί να βγει από την μεμβράνη ενώ όλα τα άλλα μόρια που είναι μικρού μοριακού βάρους θα περάσουν από την μεμβράνη στο διάλυμα νερού. Η αρχή λειτουργίας στηρίζεται δηλαδή στο φαινόμενο της ώσμωσης, καθώς μόρια διαλύτη μπαίνουν μέσα στην μεμβράνη λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης μέσα και έξω από αυτήν. Είναι πολύ σημαντικό να προσέξω το μέγεθος πόρων της μεμβράνης να είναι τέτοιο, ώστε όλα τα μόρια με μοριακό βάρος μικρότερο από το μοριακό βάρος του πολυμερούς μου να περάσουν από αυτή ενώ αυτό να παραμένει εγκλωβισμένο μέσα στην μεμβράνη. Σε διαφορετική περίπτωση θα έχω μεγάλες απώλειες. Εμείς χρησιμοποιήσαμε μεμβράνη με μοριακό μέγεθος πόρων 3500.

Τελευταίο στάδιο είναι η λυοφιλοποίηση. Χρησιμοποιούμε πάλι την γυάλινη συσκευή Π ώστε να μην μείνει νερό στην γραμμή κενού. Προσαρμόζω το Π στην γραμμή κενού και βάζω μια μεγάλη 1000αρα φιάλη στο ένα άκρο του, την οποία απαερώνω. Παίρνω με την βοήθεια πιπέτας το διαλυμένο σε νερό υδροχλωρικό άλας της πολυιστιδίνης από το εσωτερικό της μεμβράνης και το βάζω σε μια 50αρα φιάλη. Προσαρμόζω στην φιάλη 500 ml σύνδεσμο κενού και την ανεβάζω στο άλλο άκρο του Π. Την απαερώνω δυο φορές και μετά ξεκινώ την λυοφιλοποίηση με τη βοήθεια υγρού αζώτου με το οποίο παγώνω την 50αρα φιάλη, και της γραμμής κενού. Πετυχαίνω έτσι την εξάχνωση του νερού από την 50αρα φιάλη στην οποία είναι παγωμένο, στην 1000αρα φιάλη. Στόχος μας είναι να απομακρύνουμε το νερό και να παραλάβουμε το πολυμερές στην τελική του μορφή. Η όλη διαδικασία διαρκεί τρεις ημέρες. Τελικά παραλαμβάνω 60mg πολυ-L-ιστιδίνης·HCl, η οποία φυλάσσεται σε ειδικά σακουλάκια στην κατάψυξη. Για τον χαρακτηρισμό της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές του IR και GPC.



**Εικόνα 8: Φάσμα IR της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl πριν την αποπροστασία**

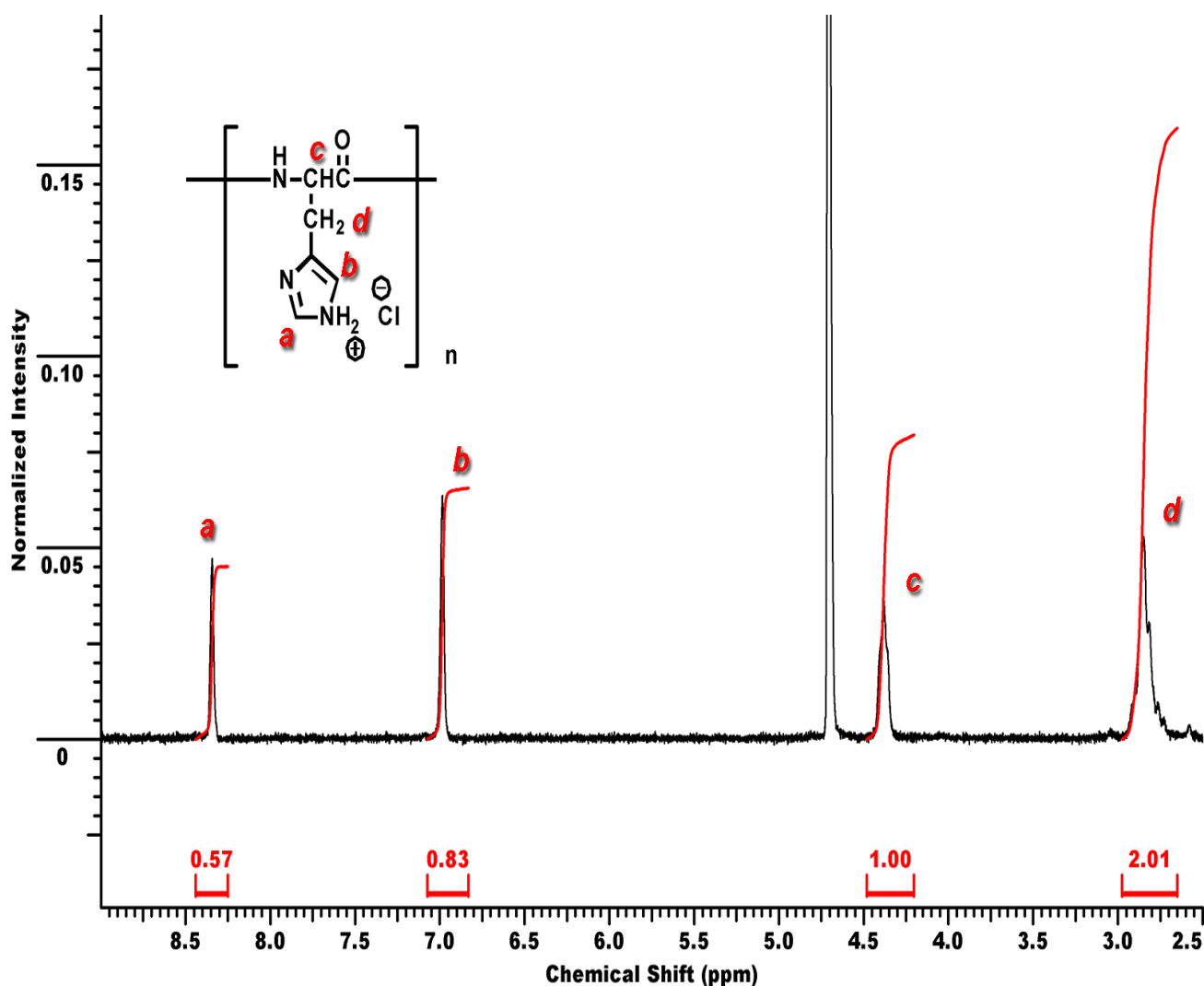
Στο φάσμα IR της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl πριν την αποπροστασία παρατηρούμε μια έντονη κορυφή στα  $1681\text{ cm}^{-1}$  που μας δείχνει την ύπαρξη πεπτιδικού δεσμού. Παράλληλα δεν υπάρχουν κορυφές στα  $1780\text{ cm}^{-1}$  και  $1850\text{ cm}^{-1}$ , κάτι που σημαίνει ότι δεν υπάρχει πια NCA. Από αυτές τις δυο παρατηρήσεις βγάζουμε το συμπέρασμα ότι καταναλώθηκε το μονομερές και ολοκληρώθηκε ο πολυμερισμός. Επίσης βλέπουμε κορυφές στα  $702\text{ cm}^{-1}$  και  $748\text{ cm}^{-1}$  που εμφανίζονται οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας. Αυτό αποδεικνύει την ύπαρξη της τρίτυλο προστασίας.



**Εικόνα 9: Φάσμα IR της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl μετά την αποπροστασία**

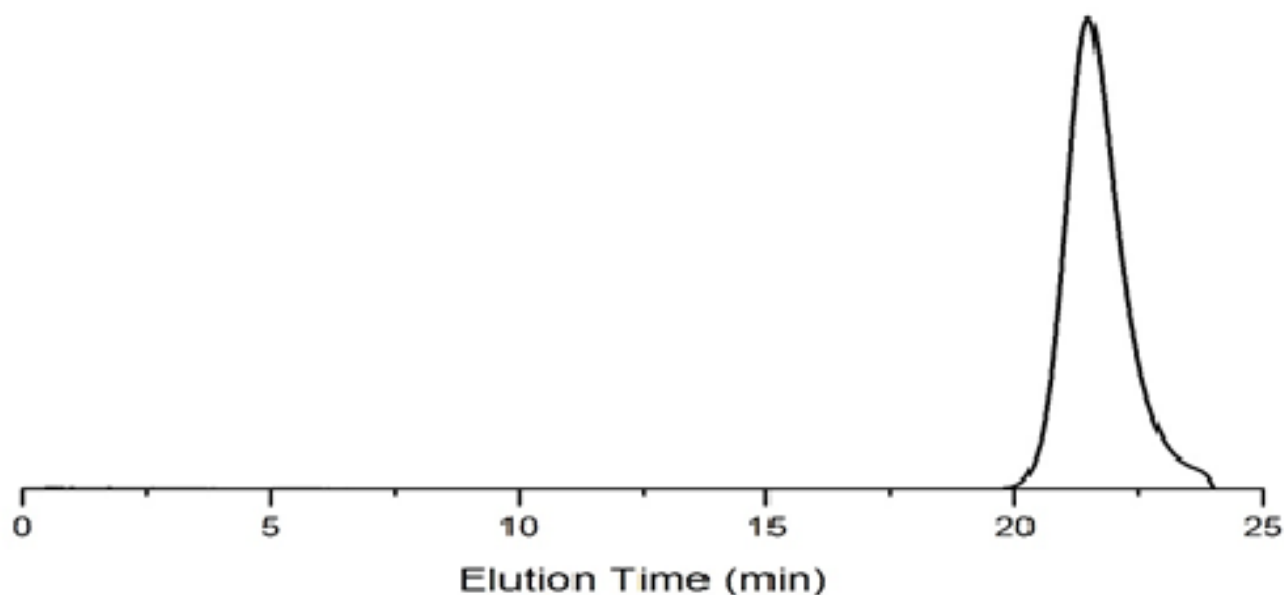


Στο φάσμα IR της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl μετά την αποπροστασία παρατηρούμε μια έντονη κορυφή στα  $1645\text{ cm}^{-1}$  που μας δείχνει την ύπαρξη πεπτιδικού δεσμού. Παράλληλα δεν υπάρχουν κορυφές στα  $1780\text{ cm}^{-1}$  και  $1850\text{ cm}^{-1}$ , κάτι που σημαίνει ότι δεν υπάρχει πια NCA. Από αυτές τις δυο παρατηρήσεις βγάζουμε το συμπέρασμα ότι καταναλώθηκε το μονομερές και ολοκληρώθηκε ο πολυμερισμός. Επίσης δεν βλέπουμε κορυφές στα  $700\text{ cm}^{-1}$  και  $750\text{ cm}^{-1}$  που εμφανίζονται οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας. Αυτό σημαίνει ότι η αποπροστασία ήταν επιτυχής.



Εικόνα 10: Φάσμα NMR της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl

Για την εξακρίβωση της σύνθεσης της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl έγινε λήψη του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  σε δευτεριωμένο νερό με την προσθήκη μικρής ποσότητας δευτερωμένου υδροχλωρίου για να διαλυθεί καλά.



**Εικόνα 11:** Χρωματογράφημα GPC σε νερό της πολύ-L-ιστιδίνης·HCl

Στο Χρωματογράφημα GPC σε διαλύτη νερό για την πολύ-L-ιστιδίνη·HCl παρατηρούμε μια ομοιόμορφη καμπύλη με συμμετρική και στενή κατανομή. Η κατανομή βρέθηκε **1,05** και το μοριακό βάρος του πολυμερούς **5356** με βάση μέτρηση του χρόνου έκλουσης δειγμάτων προτύπων γραμμικών πολυμερών.

### 3.8 Σύνθεση poly(m-PEO)-b-poly(L-His)

Για την σύνθεση του συμπολυμερούς poly(m-PEO)-b-poly(L-His) θα χρησιμοποιήσουμε ως μακροαπαρχητή το πολυμερές mPEO-NH<sub>2</sub> που έχει



**Εικόνα 12:** Συσκευή συμπολυμερισμού

ακραία αμινομάδα και θα εκκινήσει τον πολυμερισμό του Nim-Trt-L-Histidine NCA που είναι το μονομερές για την σύνθεση της δεύτερης συστάδας. Θέλουμε η δεύτερη συστάδα μας να έχει μοριακό βάρος 6000. Ξεκινούμε από 0,48 γραμμάρια μακροαπαρχητή που έχει μοριακό βάρος 10000 g\*ml<sup>-1</sup> και θέλουμε και η δεύτερη συστάδα μας να έχει τα ίδια mol πολυιστιδίνης. Άρα έχουμε 4,8x10<sup>-5</sup>mol μακροαπαρχητή. Στην δεύτερη συστάδα θέλω να έχω 4,8x10<sup>-5</sup>mol x 16720 g\*ml<sup>-1</sup> ≈ 0,81 γραμμάρια Nim-Trt-L-Histidine NCA. 16720 g\*ml<sup>-1</sup> είναι το μοριακό βάρος που θα έχει η ιστιδίνη όταν θα είναι

πολυμερισμένη στην δεύτερη συστάδα και θα έχει φύγει το CO<sub>2</sub> αλλά όχι ακόμα η προστασία της (παράγραφος 3.7). Και επειδή όταν το ζυγίζουμε πριν τον πολυμερισμό υπάρχει ακόμα το CO<sub>2</sub> ισχύει η διόρθωση :  $\frac{379}{423} x \times = 0,81$ . Άρα εμείς θα πρέπει να ζυγίσουμε : 0,91 γραμμάρια από τον Nim-Trt-L-Histidine NCA.

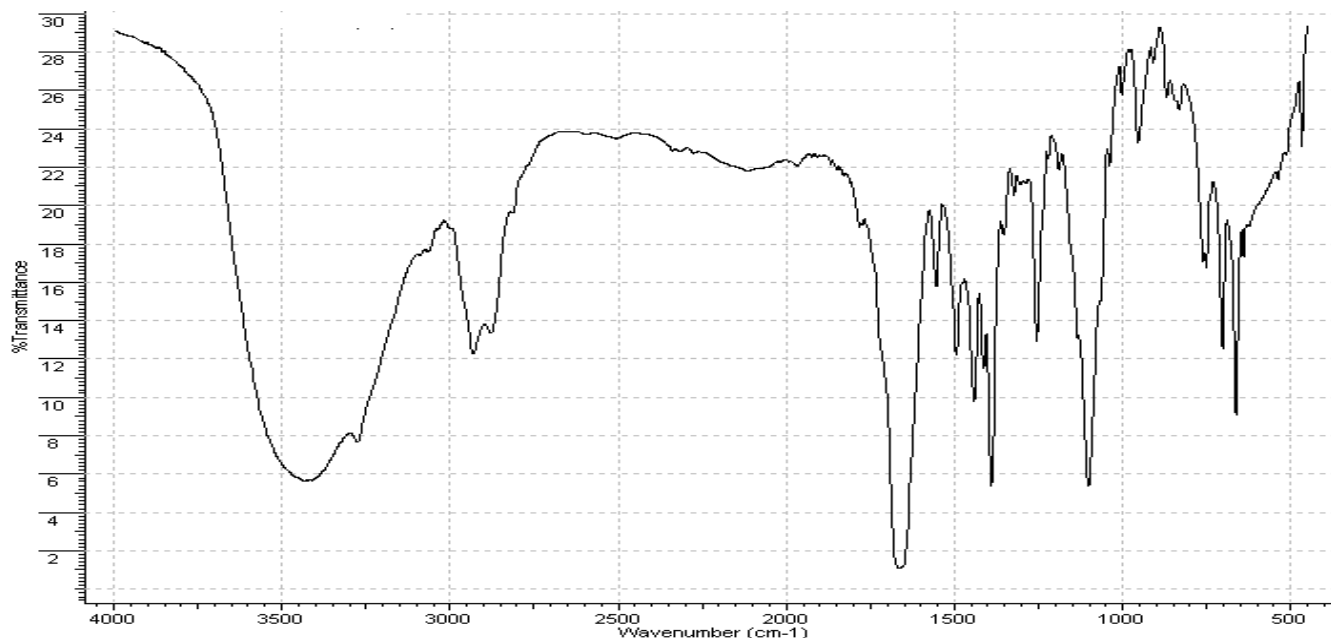
Για τον πολυμερισμό θα χρησιμοποιήσουμε συσκευή πολυμερισμού που σχεδιάζουμε και φτιάχνουμε εμείς με την χρήση υαλουργίας. Η συγκεκριμένη συσκευή είναι μια 250αρα σφαιρική φιάλη στην οποία προσαρμόζουμε ένα γυάλινο εξάρτημα ιδιοκατασκευής μας για την προσθήκη του μονομερούς της δεύτερης συστάδας. Το εξάρτημα αυτό αποτελείται από ένα προσαρμοσμένο γυάλινο μπράτσο κολλημένο στην φιάλη, μια στένωση ώστε να μην πέσει ο breaker στο μπράτσο, ένα break seal, το τμήμα όπου τοποθετείται το μονομερές, που είναι μια γυάλινη ράβδος 18αρα που κλείνουμε από κάτω και είναι ενωμένη με γυάλινη ράβδο 10αρα τύπου heavy wall(παχιά τοιχώματα γυαλιού), με προσαρμοσμένο εσμύρισμα που κολλάμε εμείς πάνω στην 10αρα ράβδο. Μια γέφυρα (14αρα γυάλινη ράβδος) ενώνει το break seal με το τμήμα που τοποθετείται το μονομερές.

Οπότε βάζουμε για μια ημέρα την συσκευή πολυμερισμού με το επιπλέον εξάρτημα που θα χρησιμοποιήσουμε στον φούρνο ώστε να καθαρίσει. Την επομένη κολλάμε με υαλουργία το εξάρτημα μας στην φιάλη, αφού φροντίσουμε να προσαρμόσουμε τον breaker πάνω από την μύτη του break seal και να τοποθετήσουμε εξωτερικά έναν άλλο μαγνήτη τυλίγοντας τον με κατάλληλη κολλητική ταινία ώστε να ελέγχουμε τον εσωτερικό μαγνήτη. Αφού βάλουμε μαγνήτη ανάδευσης και κατάλληλη στρόφιγγα στην φιάλη ανεβαίνουμε στην γραμμή κενού όπου απαερώνουμε, ελέγχουμε για τυχόν μικρές τρύπες με την βοήθεια πηνίου Tesla και αφού βεβαιωθούμε ότι το σύστημα μας είναι στεγανό κάνουμε τρία flame drying για απομάκρυνση της υγρασίας. Στην συνέχεια ζυγίζουμε 0,48 γραμμάρια από τον μακροαπαρχητή και τα τοποθετούμε στην φιάλη. Ανεβαίνουμε στην γραμμή κενού, απαερώνουμε και αφήνουμε την συσκευή μια νύχτα για ξήρανση.

Επόμενο βήμα είναι να αποστάξουμε βενζόλιο. Στόχος μας είναι να απομακρυνθεί ακόμα και σε ίχνη η υγρασία που έχει ο μακροαπαρχητής, καθώς το βενζόλιο με το νερό κάνουν αζεοτροπικό μίγμα. Μετά θα διώξουμε όλο τον διαλύτη με την χρήση γραμμής κενού και έτσι μαζί με το βενζόλιο θα φύγει και η υγρασία. Αποστάξουμε 30ml βενζολίου και αφού ο μακροαπαρχητής διαλυθεί καλά, τον αφήνουμε υπό ανάδευση για μια ώρα. Στην συνέχεια διώχνουμε το αζεοτροπικό μίγμα με χρήση της γραμμής κενού και αφήνουμε μια νύχτα τον μακροαπαρχητή για ξήρανση.

Την επομένη ημέρα αποστάξουμε στην γραμμή κενού 30ml DMF στην συσκευή του πολυμερισμού. Κατεβαίνουμε από την γραμμή, ξεπαγώνουμε και ανακινούμε μέχρι να διαλυθεί καλά ο μακροαπαρχητής στο DMF. Προσέχουμε να μην πάει το διάλυμα μας στο break seal. Τοποθετούμε κατάλληλο επίθεμα στο εσμύρισμα του εξαρτήματος για τον NCA αφού βάλουμε λίπος και το πιάσουμε με κατάλληλο μεταλλικό keck, και ανεβαίνουμε με την βοήθεια του επιθέματος στη γραμμή κενού και απαερώνουμε. Θέλουμε να υπάρχει κενό και εκεί ώστε να μπούμε στο glove box. Κοιτάμε για τρύπες στο εξάρτημα για τον NCA και αφού σιγουρευτούμε ότι υπάρχει απόλυτη στεγανότητα κάνουμε τρία flame drying. Στην συνέχεια μπαίνουμε στο glove box και ζυγίζουμε 0,91 γραμμάρια Nim-Trt-L-Histidine NCA . Τα βάζουμε στο εξάρτημα της συσκευής μας για τον NCA με την βοήθεια ενός μικρού χωνιού, αφού αφαιρέσουμε το επίθεμα, το οποίο και ξανατοποθετούμε μετά με προσθήκη λίπους και του keck. Ανεβαίνουμε στην γραμμή κενού με την βοήθεια του επιθέματος και απαερώνουμε, διώχνοντας το αδρανές αέριο που μπήκε στο glove box. Αποστάξουμε σε αυτό το επιπλέον εξάρτημα 10ml DMF και παγώνουμε το διάλυμα πολύ καλά με την βοήθεια υγρού αώτου. Αφού σιγουρευτούμε ότι το διάλυμα έχει παγώσει πολύ καλά κόβουμε με την χρήση φλόγας από πυρσό υαλοουργίας την 10αρα υάλινη ράβδο τύπου heavy wall. Συνεχίζουμε να κρατάμε παγωμένο το διάλυμα μέχρι να κρυώσει το κομμένο γυαλί. Στην συνέχεια ξεπαγώνουμε το διάλυμα με νερό κανονικής θερμοκρασίας και αφού σιγουρευτούμε ότι ο NCA διαλύθηκε καλά στο DMF σπάμε την μύτη του break seal και ανακινούμε την φιάλη ώστε να ενωθεί με το διάλυμα DMF του μακροαπαρχητή. Αφήνουμε το διάλυμα υπό έντονη ανάδευση και κατά διαστήματα ανοίγουμε την στρόφιγγα για απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> που

παράγεται κατά τον πολυμερισμό. Ο πολυμερισμός διαρκεί 7 ημέρες. Τότε καταβυθίζω σε διαιθυλαιθέρα το πολυμερές και το παίρνω με την βοήθεια συσκευή διηθήσεως Buchner ακολουθώντας την πορεία όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.7. Ζυγίσαμε 0,35 γραμμάρια πολυμερούς.



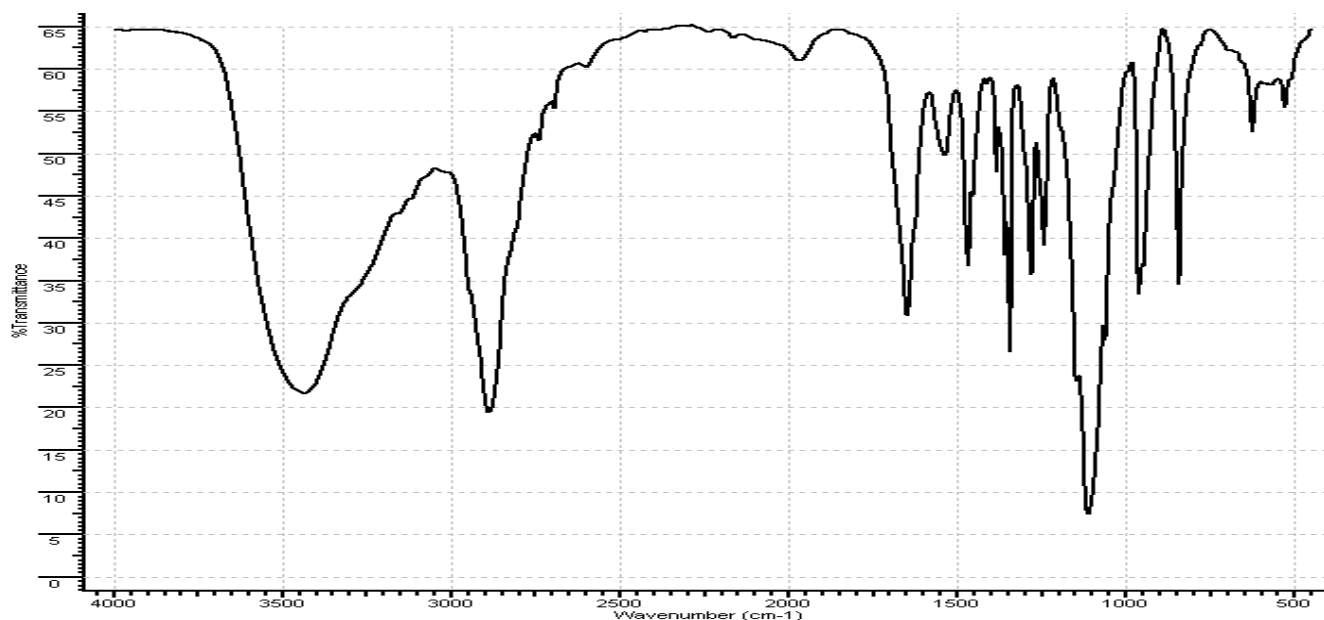
**Εικόνα 13: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) μετά τον πολυμερισμό**

Στο φάσμα του IR του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και πριν την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα  $1662\text{ cm}^{-1}$  που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα  $1850\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1780\text{ cm}^{-1}$  έχουν σχεδόν εξαφανιστεί τελείως κάτι που υποδηλώνει ότι το μονομερές καταναλώθηκε. Υπάρχουν κανονικά οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας στα  $700\text{ cm}^{-1}$  και  $750\text{ cm}^{-1}$ .

Ακολουθεί το στάδιο της αποπροστασίας με την ίδια πορεία όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.7. Η μόνη διαφορά είναι στην ποσότητα του τριαιθυλοσιλανίου που θα χρησιμοποιήσω. Σκέφτομαι ως εξής: Θεωρητικά από το πολυμερές μου περίμενα  $\frac{379}{423} \times 0,91\text{ γραμμάρια μονομερους} + 0,48\text{ γραμμάρια μακροαπαρχητη} = 1,29\text{ γραμμάρια πολυμερούς}$  Ζύγισα τελικά 0,35 γραμμάρια. Οπότε αφού στα 1,29 γραμμάρια πολυμερούς έχω 0,81 γραμμάρια ιστιδίνης, στα 0,35 γραμμάρια πολυμερούς έχω 0,22 γραμμάρια ιστιδίνης. Οπότε  $\frac{0,22\text{ g}}{379\text{ g/mol}} = 0,00058\text{ mol}$  ιστιδίνης. Τόσα mol τριαιθυλοσιλανίου θα χρειαστώ. Άρα  $0,00058\text{ mol} \times 116,28\text{ g/mol} = 0,067\text{ g}$  από το τριαιθυλοσιλάνιο.

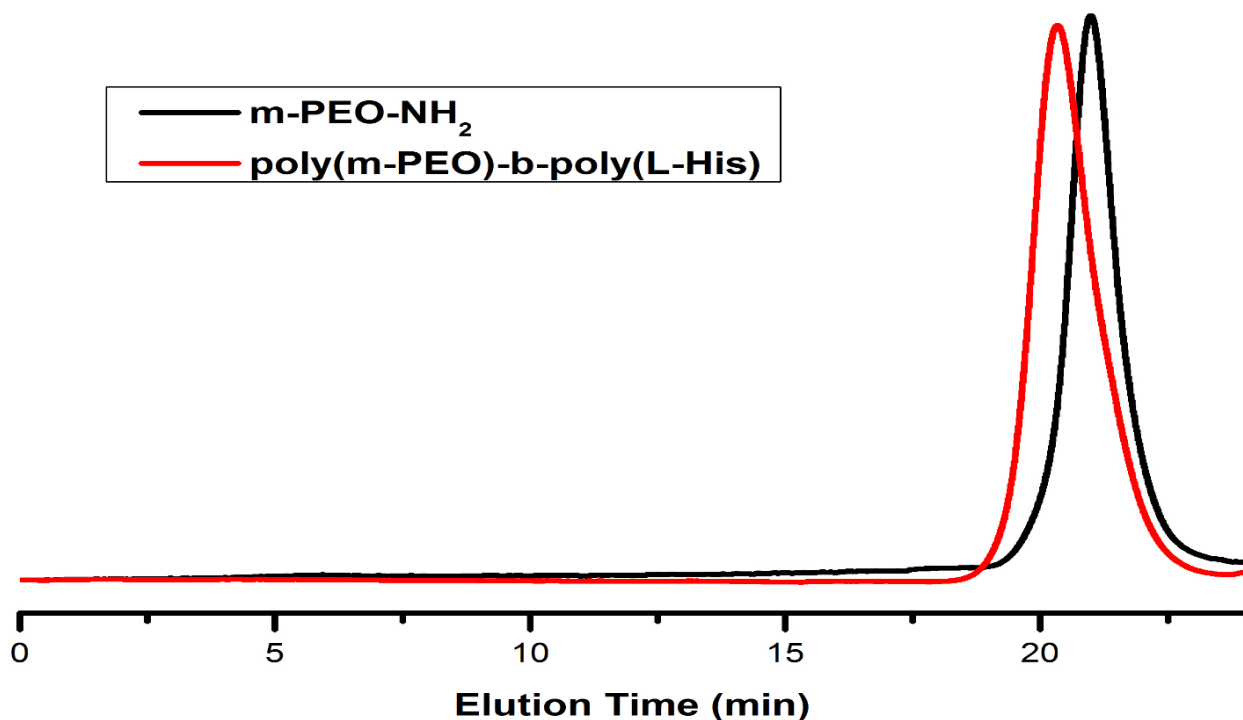
Και για να βρω τον όγκο που θα χρειαστώ:  $0,067\text{g}/0,728\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}=0,093\text{ml}$  τριαιθυλοσιλανίου. Οπότε με μια σύριγγα παίρνω 0,093 ml και ρίχνω στο διάλυμα στάγδην. Ρίχνω σταγόνες μέχρι το διάλυμα να αποχρωματιστεί. Παρατηρώ ότι ρίχνω λιγότερο κάτι που είναι λογικό, αφού οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τα θεωρητικά που είναι περισσότερα. Στην συνέχεια τα επόμενα βήματα της αποπρωστασίας του καθαρισμού με dialysis και της λυοφιλοποίησης είναι τα ίδια με το ομοπολυμερές. Όπως και στο ομοπολυμερές θα έχουμε και εδώ στο τέλος υδροχλώριο στο N του ιμιδαζολικού δακτυλίου της συστάδας της ιστιδίνης.

Παραλαμβάνω 0,2 γραμμάρια πολυμερούς που φυλάσσεται σε σακουλάκι στην κατάψυξη. Για τον χαρακτηρισμό του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές του IR και GPC.



**Εικόνα 14: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) μετά την αποπρωστασία**

Στο φάσμα IR του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και την αποπρωστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα  $1647\text{ cm}^{-1}$  που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα  $1850\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1780\text{ cm}^{-1}$  έχουν σχεδόν εξαφανιστεί τελείως κάτι που υποδηλώνει ότι το μονομερές καταναλώθηκε. Δεν υπάρχουν οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας στα  $700\text{ cm}^{-1}$  και  $750\text{ cm}^{-1}$ , οπότε η αποπρωστασία έγινε επιτυχώς. Επίσης υπάρχει μια κορυφή στα  $1113\text{ cm}^{-1}$  που ανήκει στην τάση  $-\text{C}-\text{O}-$  του PEO.



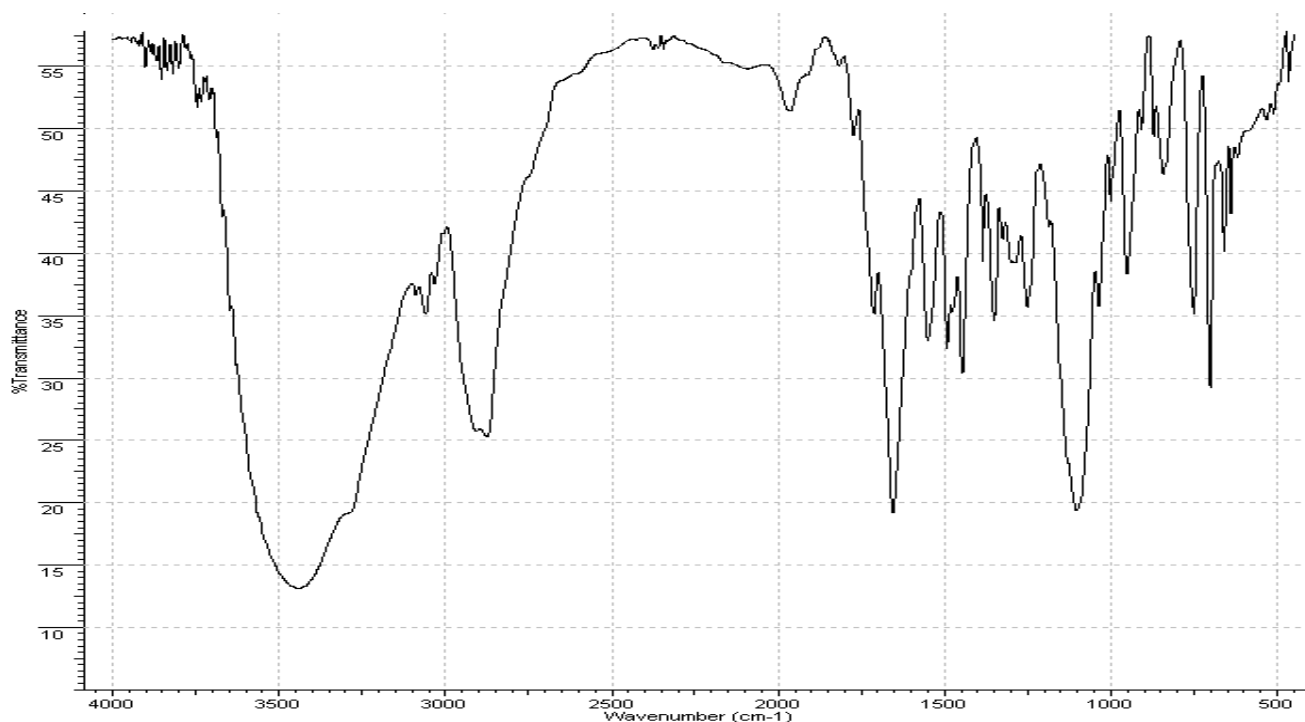
Εικόνα 15: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-poly(L-His)

Στο Χρωματογράφημα GPC σε διαλύτη νερό του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) παρατηρούμε μια ομοιόμορφη καμπύλη με συμμετρική και στενή κατανομή (κόκκινη). Η κατανομή βρέθηκε **1,19** και το μοριακό βάρος του πολυμερούς **18034** με βάση μέτρηση του χρόνου έκλουσης δειγμάτων προτύπων γραμμικών πολυμερών. Στο Χρωματογράφημα φαίνεται και η καμπύλη του μακροαπαρχητή που έχει 10000 μοριακό βάρος. Η καμπύλη του συμπολυμερούς εμφανίζεται νωρίτερα, κάτι αναμενόμενο αφού έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

### 3.9 Σύνθεση poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG

Για την σύνθεση του συμπολυμερούς poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG ποσοστό κατά mol ως προς την πολυιστιδίνη στην δεύτερη συστάδα θα χρησιμοποιήσουμε ως μακροαπαρχητή το πολυμερές mPEO-NH<sub>2</sub> που έχει ακραία αμινομάδα και θα εκκινήσει τον πολυμερισμό των Nim-Trt-L-Histidine NCA και γ-Bz-L-Glutamate NCA που είναι τα μονομερή για την σύνθεση της δεύτερης συστάδας. Ξεκινούμε από 0,6087 γραμμάρια μακροαπαρχητή που έχει μοριακό βάρος 10000 g\*ml<sup>-1</sup> άρα έχουμε 0,00006087 mol μακροαπαρχητή. Θέλουμε η δεύτερη συστάδα μας να έχει μοριακό βάρος 6000 μετά τον πολυμερισμό και την αποπρωσασία, έτσι ώστε να είναι άμεσα συγκρίσιμη με την δεύτερη συστάδα του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) που έχει

μόνο ιστιδίνη. Για τον πολυμερισμό του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) ζυγίσαμε 0,91 γραμμάρια από τον Nim-Trt-L-Histidine NCA. Οπότε έχουμε :  $\frac{0,91 \text{ g}}{423 \text{ g/mol}} = 0,00215 \text{ mol}$ . Τόσα mol θέλω να έχω και στην δεύτερη συστάδα μου, μόνο που τώρα το 10% αυτών θα είναι PBLG. Άρα θα έχω 0,00021 mol PBLG και 0,00193 mol πολύ-L-ιστιδίνη. Οπότε  $0,00021 \text{ mol PBLG} \times 263 \text{ g/mol} = 0,055 \text{ g } \gamma\text{-Bz-L-Glutamate NCA}$  και  $0,00193 \text{ mol πολύ-L-ιστιδίνη} \times 423 \text{ g/mol} = 0,82 \text{ g Nim-Trt-L-Histidine NCA}$ . Τα βήματα για την προετοιμασία και την διεξαγωγή του πολυμερισμού είναι ακριβώς τα ίδια με αυτά του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) που περιγράφηκαν στην παράγραφο 3.8 με μόνη διαφορά την προσθήκη των σωστών ποσοτήτων από τον μακροαπαρχητή και από τα δυο NCA στο glove box. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού σε 7 ημέρες ζυγίζουμε 1,135 γραμμάρια πολυμερούς.

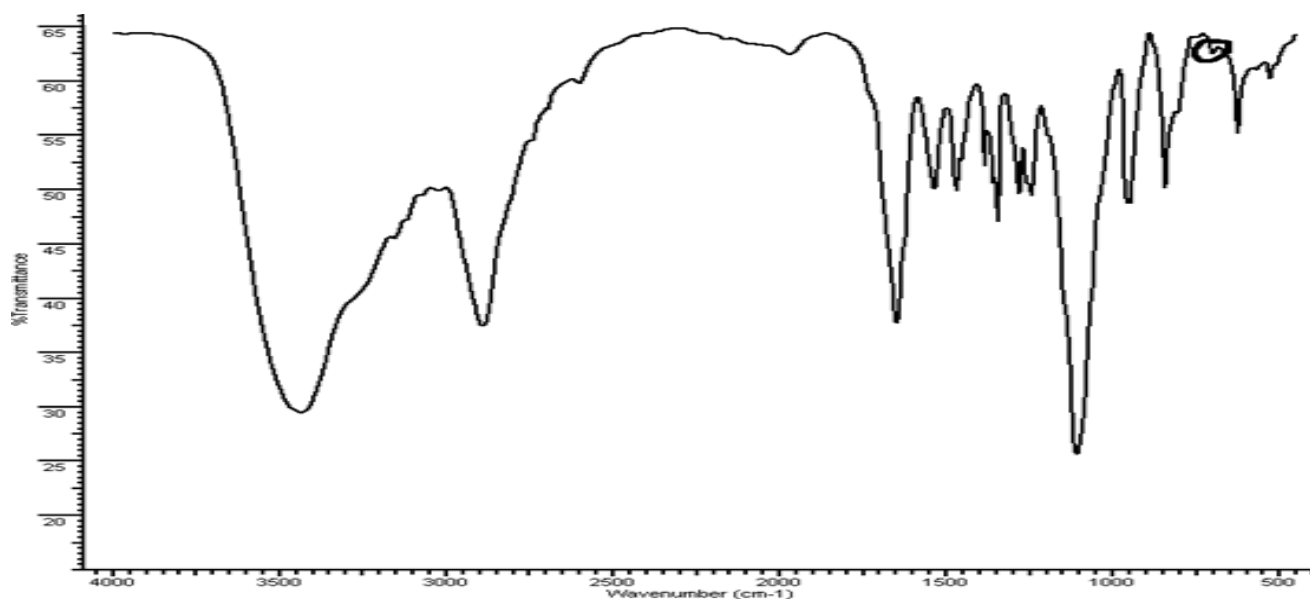


**Εικόνα 16: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG μετά το πολυμερισμό**

Στο φάσμα του IR του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και πριν την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα  $1650 \text{ cm}^{-1}$  που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα  $1850 \text{ cm}^{-1}$  και στα  $1780 \text{ cm}^{-1}$  έχουν μειωθεί πάρα πολύ κάτι που υποδηλώνει ότι το μονομερές καταναλώθηκε. Υπάρχουν κανονικά οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας στα  $700 \text{ cm}^{-1}$  και  $750 \text{ cm}^{-1}$ .

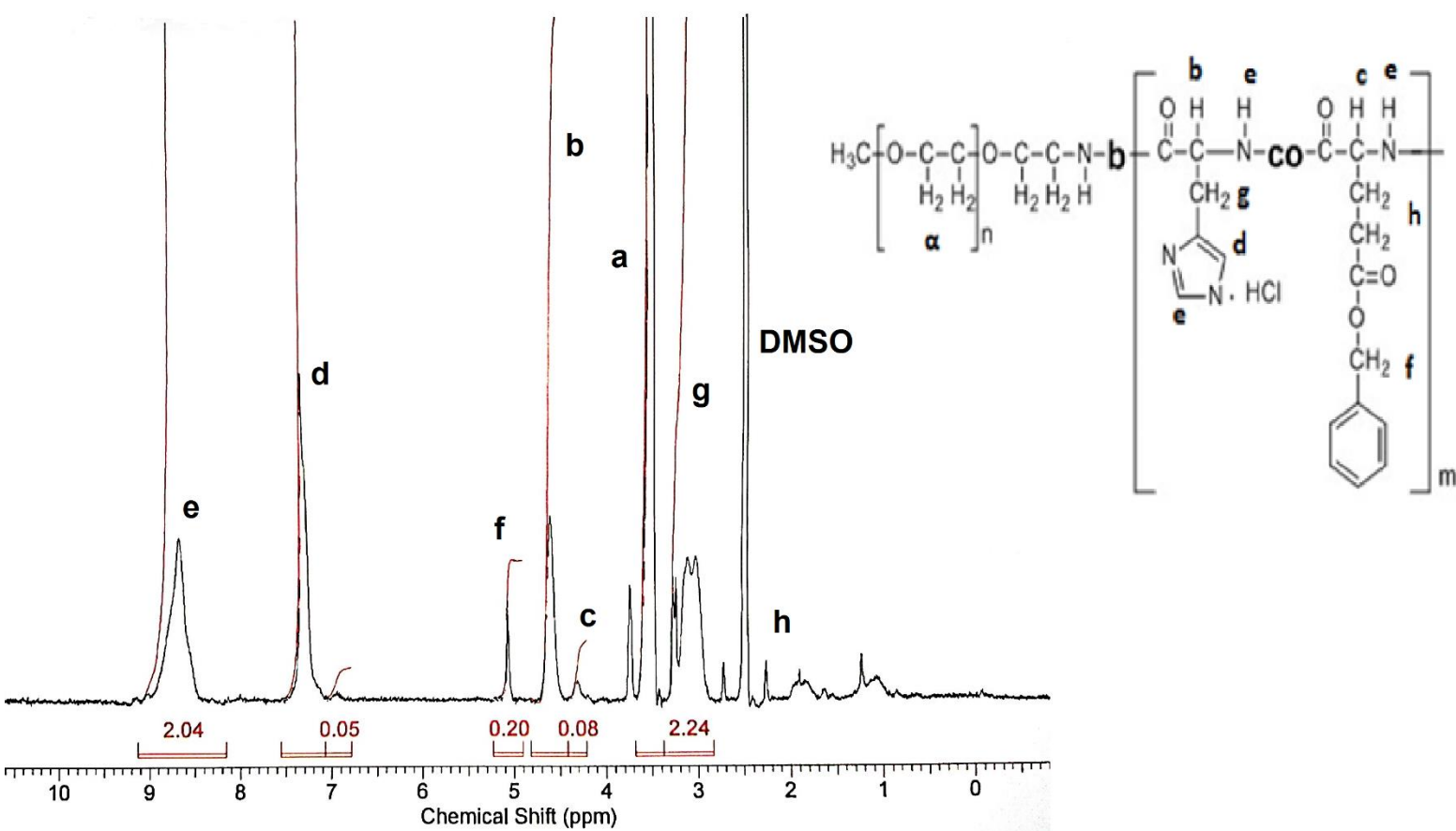


Ακολουθεί το στάδιο της αποπροστασίας με την ίδια πορεία όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.7. Η μόνη διαφορά είναι στην ποσότητα του τριαιθυλοσιλανίου που θα χρησιμοποιήσω. Σκέφτομαι ως εξής: Θεωρητικά από το πολυμερές μου περίμενα  $\frac{379}{423} \times 0,82 \text{ γραμμάρια ιστιδίνης NCA} + \frac{219}{263} \times 0,055 \text{ γραμμάρια γλουταμικού NCA} + 0,6087 \text{ γραμμάρια μακροαπαρχητή} = 1,39 \text{ γραμμάρια πολυμερούς}$  Ζύγισα τελικά 1,135 γραμμάρια. Οπότε αφού στα 1,39 γραμμάρια πολυμερούς έχω 0,73 γραμμάρια ιστιδίνης, στα 1,135 γραμμάρια πολυμερούς έχω 0,53 γραμμάρια ιστιδίνης. Οπότε  $\frac{0,53 \text{ g}}{379 \text{ g/mol}} = 0,0014 \text{ mol}$  ιστιδίνης. Τόσα mol τριαιθυλοσιλανίου θα χρειαστώ. Ανάλογα με πριν υπολογίζω ότι θα χρειαστώ 0,22 ml τριαιθυλοσιλανίου. Οπότε με μια σύριγγα παίρνω 0,22 ml και ρίχνω στο διάλυμα στάγδην. Ρίχνω σταγόνες μέχρι το διάλυμα να αποχρωματιστεί. Παρατηρώ ότι ρίχνω λιγότερο κάτι που είναι λογικό, αφού οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τα θεωρητικά που είναι περισσότερα. Στην συνέχεια τα επόμενα βήματα της αποπροστασίας του καθαρισμού με dialysis και της λυοφιλοποίησης είναι τα ίδια με το ομοπολυμερές. Όπως και στο ομοπολυμερές θα έχουμε και εδώ στο τέλος υδροχλώριο στο N του ιμιδαζολικού δακτυλίου της συστάδας της ιστιδίνης. Παραλαμβάνω 0,326 γραμμάρια πολυμερούς που φυλάσσεται σε ειδικό σακουλάκι στην κατάψυξη. Για τον χαρακτηρισμό του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές του IR, NMR και GPC.



**Εικόνα 17: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG μετά την αποπροστασία**

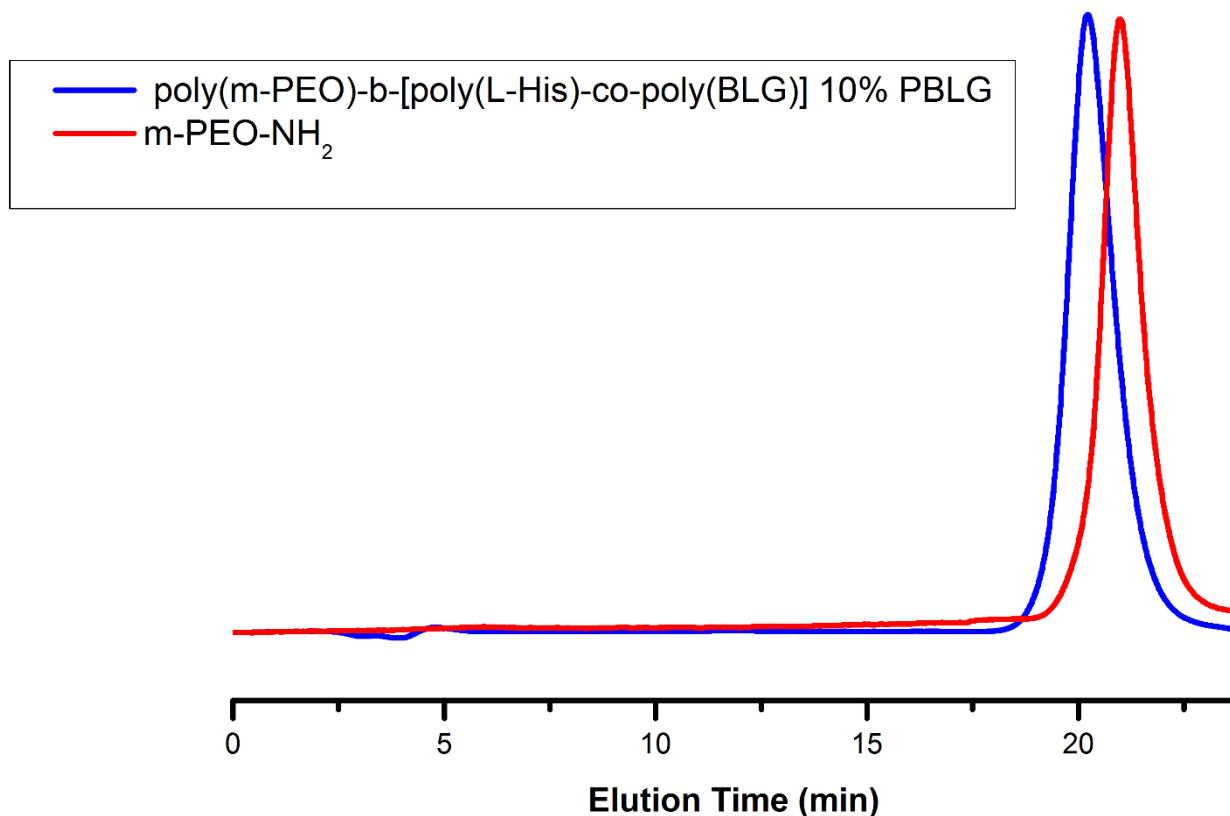
Στο φάσμα IR του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα  $1650\text{ cm}^{-1}$  που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα  $1850\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1780\text{ cm}^{-1}$  έχουν εξαφανιστεί τελείως κάτι που υποδηλώνει ότι ο καθαρισμός του πολυμερούς ήταν επιτυχής καθώς τα μικρού μοριακού βάρους μονομερή βγήκαν από την μεμβράνη. Δεν υπάρχουν οι κορυφές από την τρίτυλο προστασίας στα  $700\text{ cm}^{-1}$  και  $750\text{ cm}^{-1}$ , σε αντίθεση με το IR μετά τον πολυμερισμό, οπότε η αποπροστασία έγινε επιτυχώς. Η μικρή κορυφή στα  $700\text{ cm}^{-1}$  που φαίνεται ανήκει στο βενζολικό δακτύλιο της προστασίας του PBLG. Επίσης υπάρχει μια κορυφή στα  $1104\text{ cm}^{-1}$  που ανήκει στην τάση  $-\text{C}-\text{O}-$  του PEO και άλλη μία στα  $2886\text{ cm}^{-1}$  που ανήκει σε τάση δεσμού C-H.



**Εικόνα 18:** Φάσμα NMR του  $\text{poly}(m\text{-PEO})\text{-}b\text{-}[\text{poly}(\text{L-His})\text{-co-poly}(\text{BLG})]$  με 10% PBLG

Για την εξακρίβωση της σύνθεσης του  $\text{poly}(m\text{-PEO})\text{-}b\text{-}[\text{poly}(\text{L-His})\text{-co-poly}(\text{BLG})]$  με 10% PBLG έγινε λήψη του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  σε δευτεριωμένο  $\text{DMSO}$ . Με το NMR μπορούμε να εξακριβώσουμε ότι η σύσταση της δεύτερης συστάδας είναι 10% PBLG από την ολοκλήρωση δυο χαρακτηριστικών κορυφών, του H στον  $\alpha\text{-C}$  της ιστιδίνης και στον  $\alpha\text{-C}$  του γλουταμικού. Πράγματι

από το φάσμα παρατηρώ  $b/c = 1/0,08 = 12,5$  και αφού η αναλογία είναι 90:10 έχουμε:  $90/10 = 9$ . Άρα πλησιάσαμε πολύ την αναλογία 10% που θέλαμε. Επίσης από NMR διαπιστώνουμε ότι με την αποπροστασία φεύγει η τρίτυλο προστατευτική ομάδα αλλά η βένζυλο προστατευτική του γλουταμικού παραμένει. Αυτό το βλέπουμε συγκρίνοντας την ολοκλήρωση της κορυφής με τα υδρογόνα του μεθυλίου της βένζυλο με αυτά του  $\alpha$ -C του γλουταμικού δηλαδή  $f/c = 0,20/0,08 = 2,5$  πολύ κοντά με την αναλογία  $2/1 = 2$ .

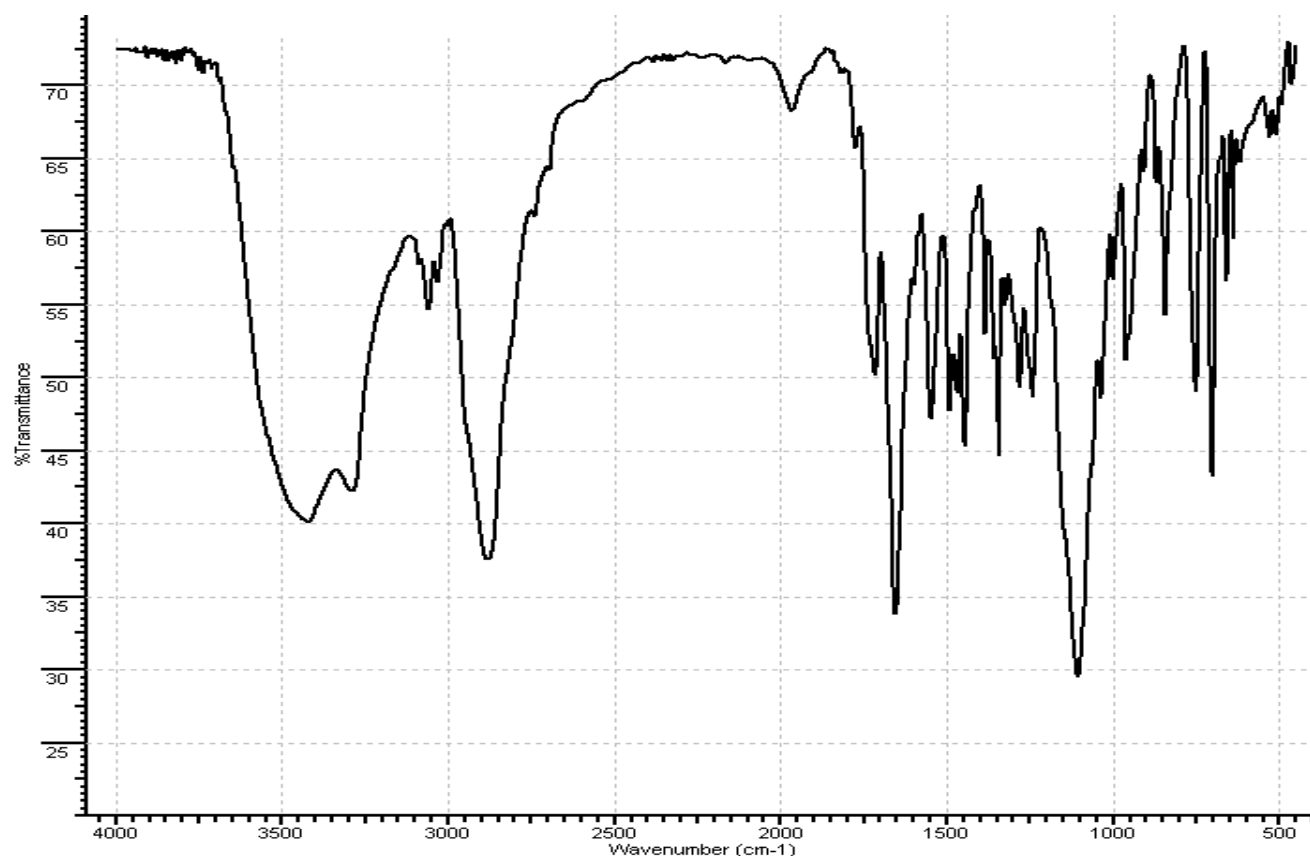


**Εικόνα 19:** Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG

Στο Χρωματογράφημα GPC σε διαλύτη νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG παρατηρούμε μια ομοιόμορφη καμπύλη με συμμετρική και στενή κατανομή (μπλε). Η κατανομή βρέθηκε **1,16**. Στο Χρωματογράφημα φαίνεται και η καμπύλη του μακροαπαρχητή που έχει 10000 μοριακό βάρος. Η καμπύλη του συμπολυμερούς 10% εμφανίζεται νωρίτερα, κάτι αναμενόμενο αφού έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

### 3.10 Σύνθεση poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG

Για την σύνθεση του συμπολυμερούς poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG ποσοστό κατά mol ως προς την πολυιστιδίνη στην δεύτερη συστάδα θα χρησιμοποιήσουμε ως μακροαπαρχητή το πολυμερές mPEO-NH<sub>2</sub> που έχει ακραία αμινομάδα και θα εκκινήσει τον πολυμερισμό των Nim-Trt-L-Histidine NCA και γ-Bz-L-Glutamate NCA που είναι τα μονομερή για την σύνθεση της δεύτερης συστάδας. Η διαδικασία και η μεθοδολογία των υπολογισμών είναι ακριβώς η ίδια με την σύνθεση του 10% με μόνη διαφορά την προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων από τα αντιδραστήρια. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήσα 0,6089 γραμμάρια μακροαπαρχητή, 0,73g Nim-Trt-L-Histidine NCA και 0,113 γραμμάρια γ-Bz-L-Glutamate NCA. Ο πολυμερισμός διαρκεί 7 ημέρες και ζυγίζουμε 1,042 γραμμάρια πολυμερούς.

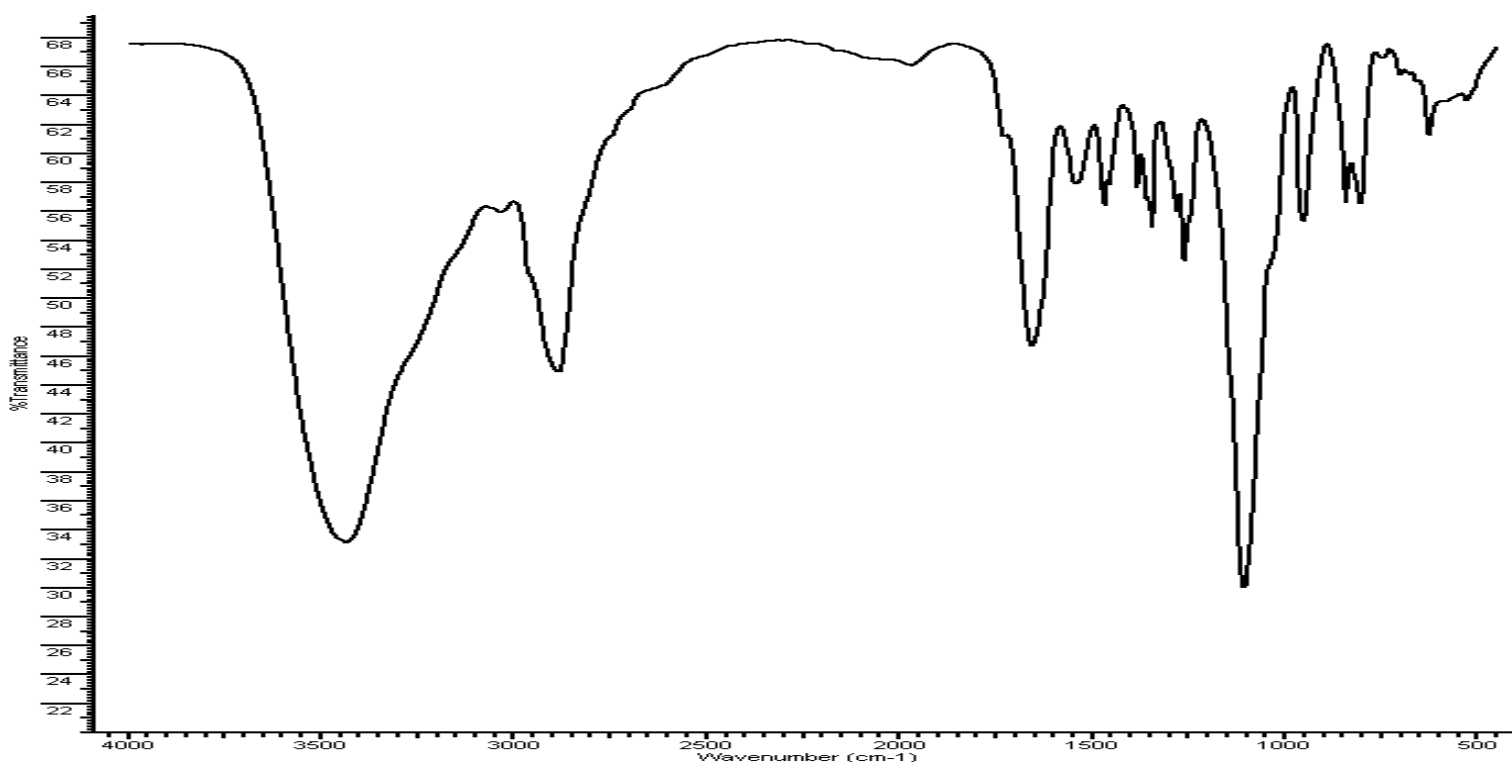


**Εικόνα 20: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG μετά το πολυμερισμό**

Στο φάσμα του IR του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και πριν την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα 1647 cm<sup>-1</sup> που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα 1850cm<sup>-1</sup> και στα 1780 cm<sup>-1</sup> έχουν

σχεδόν εξαφανιστεί κάτι που υποδηλώνει ότι το μονομερές καταναλώθηκε. Υπάρχουν κανονικά οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας στα  $700\text{ cm}^{-1}$  και  $750\text{ cm}^{-1}$ .

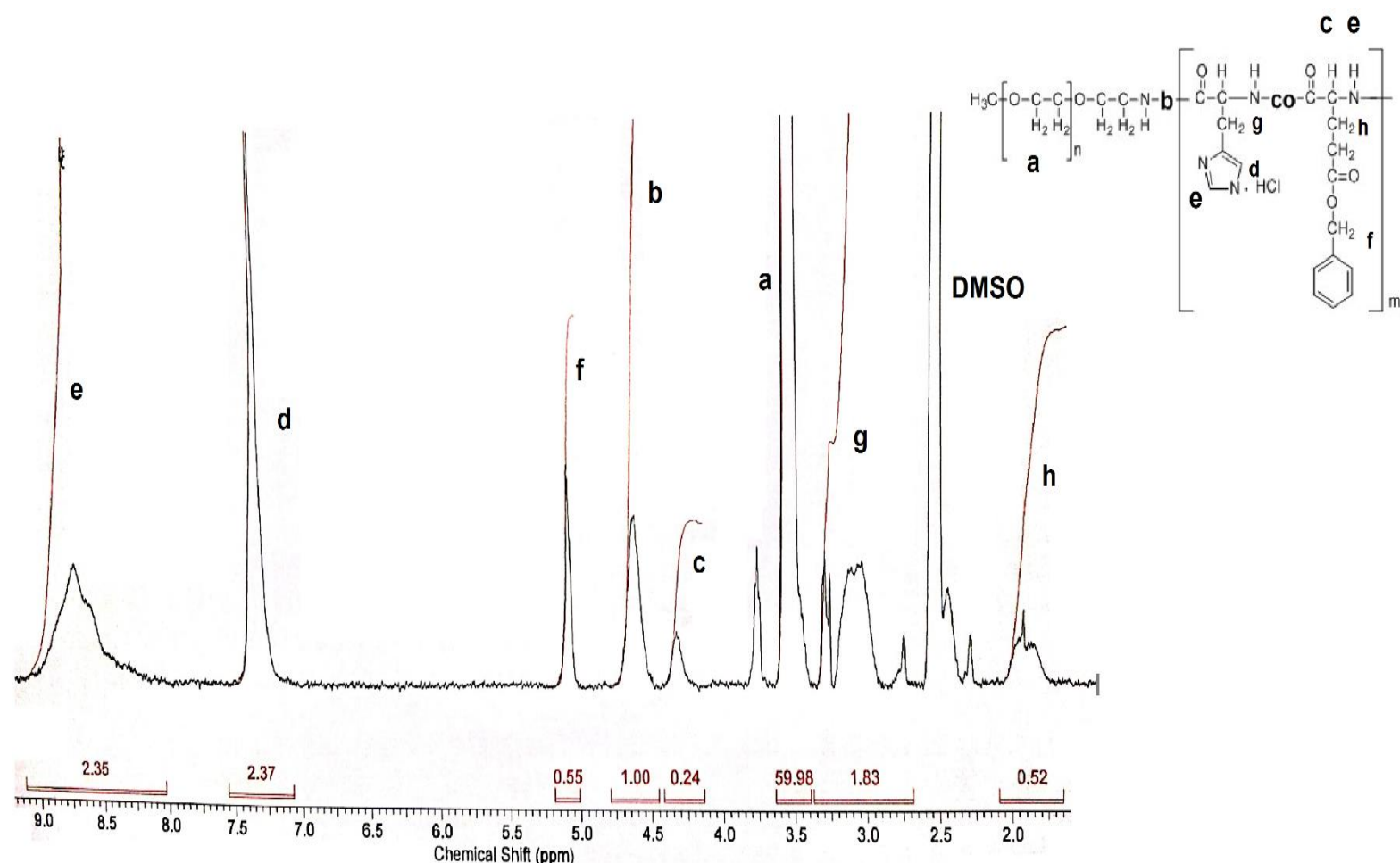
Τα επόμενα βήματα της αποπροστασίας του καθαρισμού με dialysis και της λυοφιλοποίησης είναι τα ίδια όπως περιγράφηκαν προηγουμένως. Όπως και στο ομοπολυμερές θα έχουμε και εδώ στο τέλος υδροχλώριο στο N του ιμιδαζολικού δακτυλίου της συστάδας της ιστιδίνης. Παραλαμβάνω 0,3568 γραμμάρια πολυμερούς που φυλάσσεται σε ειδικό σακουλάκι στην κατάψυξη. Για τον χαρακτηρισμό του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές του IR, NMR και GPC.



**Εικόνα 21: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG μετά την αποπροστασία**

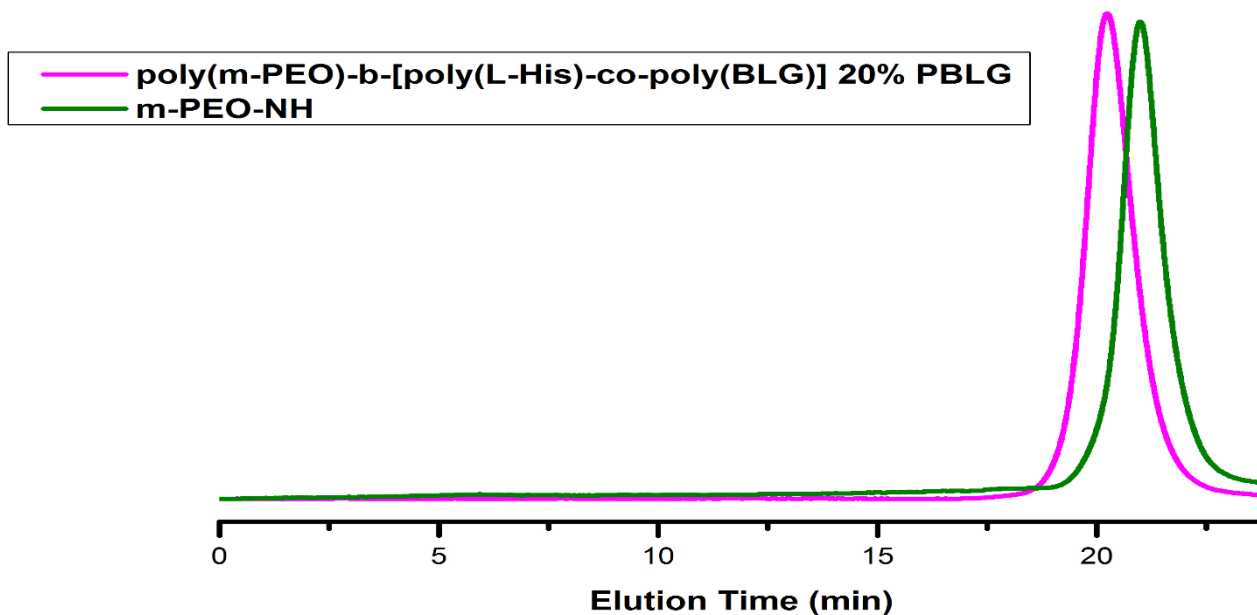
Στο φάσμα IR του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα  $1655\text{ cm}^{-1}$  που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα  $1850\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1780\text{ cm}^{-1}$  έχουν εξαφανιστεί τελείως κάτι που υποδηλώνει ότι ο καθαρισμός του πολυμερούς ήταν επιτυχής καθώς τα μικρού μοριακού βάρους μονομερή βγήκαν από την μεμβράνη. Δεν υπάρχουν οι κορυφές από την τρίτυλο προστασίας στα  $700\text{ cm}^{-1}$  και  $750\text{ cm}^{-1}$ , σε αντίθεση με το IR μετά τον πολυμερισμό, οπότε η αποπροστασία έγινε

επιτυχώς. Η μικρή κορυφή στα  $705\text{ cm}^{-1}$  που φαίνεται ανήκει στο βενζολικό δακτύλιο της προστασίας του PBLG. Επίσης υπάρχει μια κορυφή στα  $1109\text{ cm}^{-1}$  που ανήκει στην τάση  $-\text{C}-\text{O}-$  του PEO και άλλη μία στα  $2881\text{ cm}^{-1}$  που ανήκει σε τάση δεσμού C-H.



**Εικόνα 22: Φάσμα NMR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG**

Για την εξακρίβωση της σύνθεσης του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG έγινε λήψη του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  σε δευτεριωμένο DMSO. Από το φάσμα παρατηρώ  $\mathbf{b/c}=1/0,24=4,1$  και αφού η αναλογία είναι 80:20 έχουμε:  $80/20 = 4$ . Άρα πετύχαμε την αναλογία 20% που θέλαμε. Επίσης από NMR διαπιστώνουμε ότι με την αποπροστασία φεύγει η τρίτυλο προστατευτική ομάδα αλλά η βένζυλο προστατευτική του γλουταμικού παραμένει αφού  $\mathbf{f/c}=0,55/0,24=2,2$  πολύ κοντά με την αναλογία  $2/1=2$ .

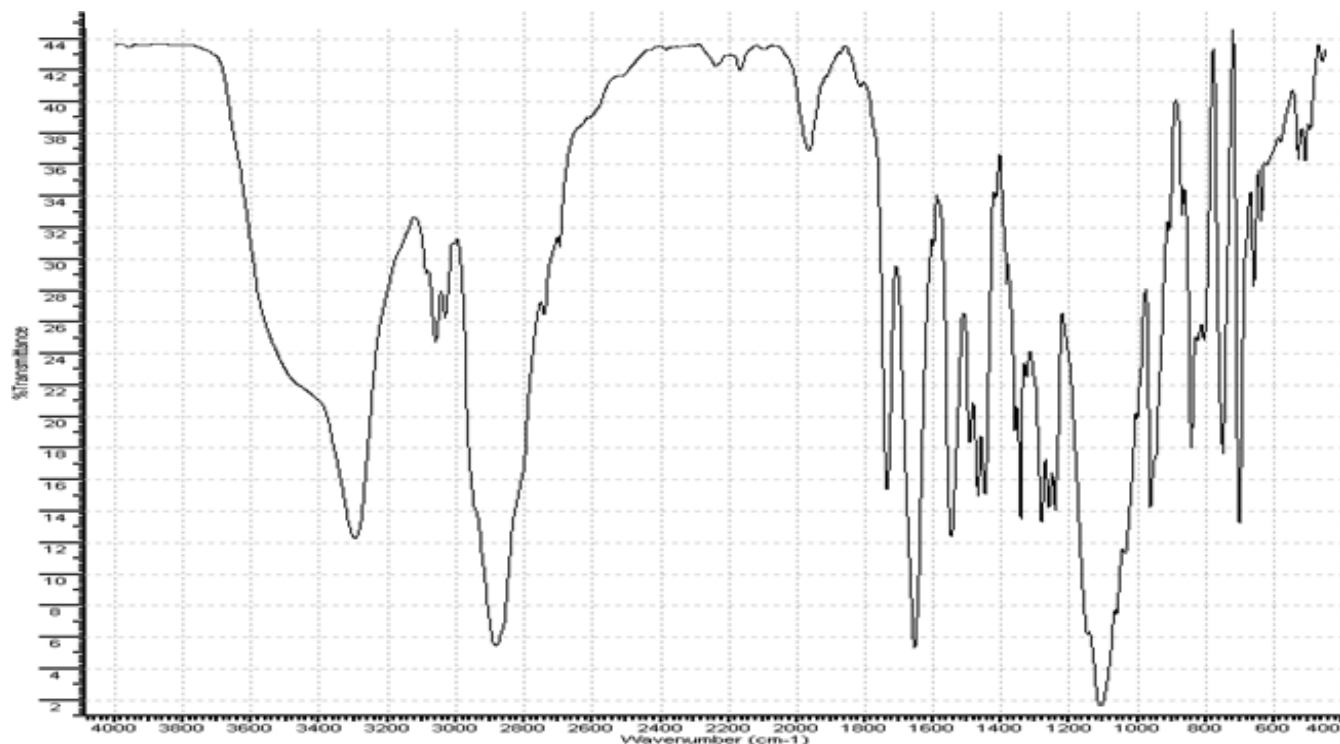


**Εικόνα 23:** Χρωματογράφημα GPC σε νερό του  $\text{poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)]}$  με 20% PBLG

Στο Χρωματογράφημα GPC σε διαλύτη νερό του  $\text{poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)]}$  με 20% PBLG παρατηρούμε μια ομοιόμορφη καμπύλη με συμμετρική και στενή κατανομή (μωβ). Η κατανομή βρέθηκε 1,15. Στο Χρωματογράφημα φαίνεται και η καμπύλη του μακροαπαρχητή που έχει 10000 μοριακό βάρος. Η καμπύλη του συμπολυμερούς 20% εμφανίζεται νωρίτερα, κάτι αναμενόμενο αφού έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

### 3.11 Σύνθεση $\text{poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)]}$ με 40% PBLG

Για την σύνθεση του συμπολυμερούς  $\text{poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)]}$  με 40% PBLG ποσοστό κατά mol ως προς την πολυιστιδίνη στην δεύτερη συστάδα θα χρησιμοποιήσουμε ως μακροαπαρχητή το πολυμερές mPEO-NH<sub>2</sub> που έχει ακραία αμινομάδα και θα εκκινήσει τον πολυμερισμό των Nim-Trt-L-Histidine NCA και  $\gamma\text{-Bz-L-Glutamate NCA}$  που είναι τα μονομερή για την σύνθεση της δεύτερης συστάδας. Η διαδικασία και η μεθοδολογία των υπολογισμών είναι ακριβώς η ίδια με την σύνθεση του 10% με μόνη διαφορά την προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων από τα αντιδραστήρια. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήσα 0,6090 γραμμάρια μακροαπαρχητή, 0,55g Nim-Trt-L-Histidine NCA και 0,226 γραμμάρια  $\gamma\text{-Bz-L-Glutamate NCA}$ . Ο πολυμερισμός διαρκεί 7 ημέρες και ζυγίζουμε 1,002 γραμμάρια πολυμερούς.



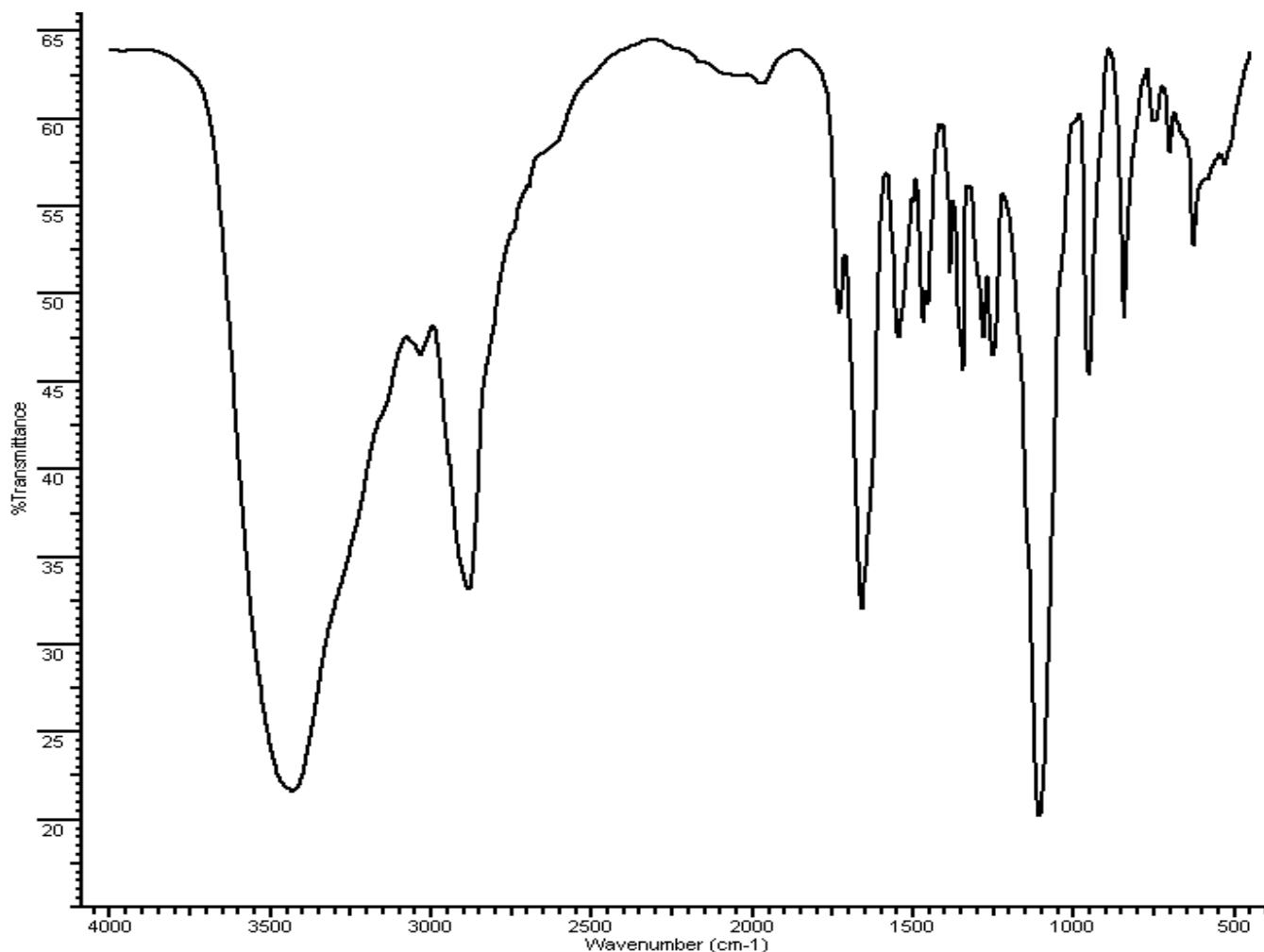
**Εικόνα 24: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG μετά το πολυμερισμό**

Στο φάσμα του IR του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και πριν την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα  $1655\text{ cm}^{-1}$  που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα  $1850\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1780\text{ cm}^{-1}$  έχουν σχεδόν εξαφανιστεί κάτι που υποδηλώνει ότι το μονομερές καταναλώθηκε. Υπάρχουν κανονικά οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας στα  $705\text{ cm}^{-1}$  και  $746\text{ cm}^{-1}$ .

Τα επόμενα βήματα της αποπροστασίας του καθαρισμού με dialysis και της λυοφιλοποίησης είναι τα ίδια όπως περιγράφηκαν προηγουμένως. Όπως και στο ομοπολυμερές θα έχουμε και εδώ στο τέλος υδροχλώριο στο N του ιμιδαζολικού δακτυλίου της συστάδας της ιστιδίνης. Παραλαμβάνω 0,2601 γραμμάρια πολυμερούς που φυλάσσεται σε ειδικό σακουλάκι στην κατάψυξη.

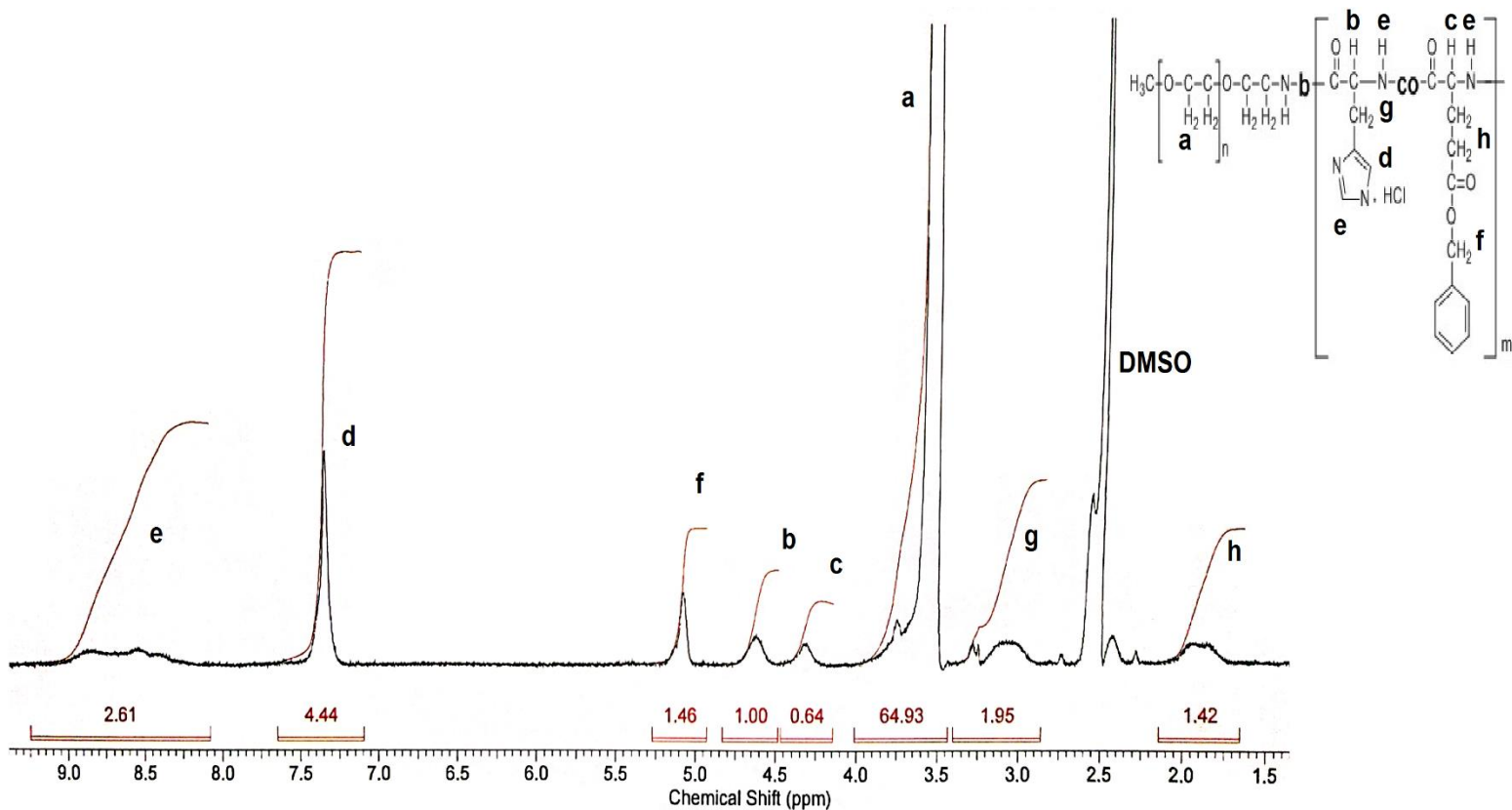
Για τον χαρακτηρισμό του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές του IR, NMR και GPC.





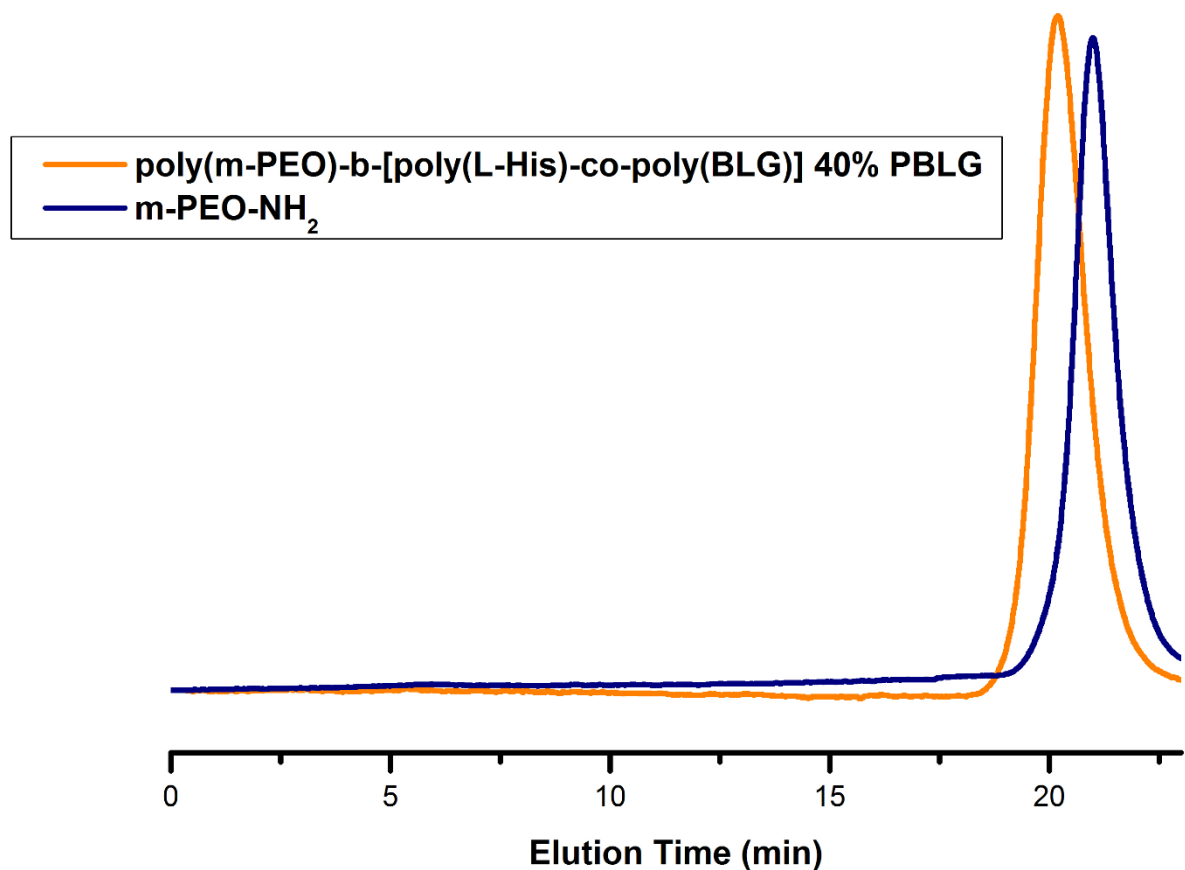
**Εικόνα 25: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG μετά την αποπροστασία**

Στο φάσμα IR του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα  $1657\text{ cm}^{-1}$  που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα  $1850\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1780\text{ cm}^{-1}$  έχουν εξαφανιστεί τελείως κάτι που υποδηλώνει ότι ο καθαρισμός του πολυμερούς ήταν επιτυχής καθώς τα μικρού μοριακού βάρους μονομερή βγήκαν από την μεμβράνη. Δεν υπάρχουν οι κορυφές από την τρίτυλο προστασία στα  $700\text{ cm}^{-1}$  και  $750\text{ cm}^{-1}$  και αυτές οι κορυφές που βλέπουμε στα  $702\text{ cm}^{-1}$  και  $750\text{ cm}^{-1}$  ανήκουν στο μονουποκατεστημένο βενζόλιο της βένζυλο προστασίας του PBLG, γιατί και βγαίνουν πιο ασθενείς, αφού έχουμε έναν αρωματικό δακτύλιο ανά μονομερική ομάδα. Στα  $1729\text{ cm}^{-1}$  βλέπουμε μια κορυφή που αντιστοιχεί στο καρβονύλιο της προστασίας του γλουταμικού. Επίσης υπάρχει μια κορυφή στα  $1109\text{ cm}^{-1}$  που ανήκει στην τάση  $\text{-C-O-}$  του PEO και άλλη μία στα  $2888\text{ cm}^{-1}$  που ανήκει σε τάση δεσμού C-H.



**Εικόνα 26:** Φάσμα NMR του  $\text{poly}(m\text{-PEO})\text{-}b\text{-}[\text{poly}(\text{L-His})\text{-co-poly}(\text{BLG})]$  με 40% PBLG

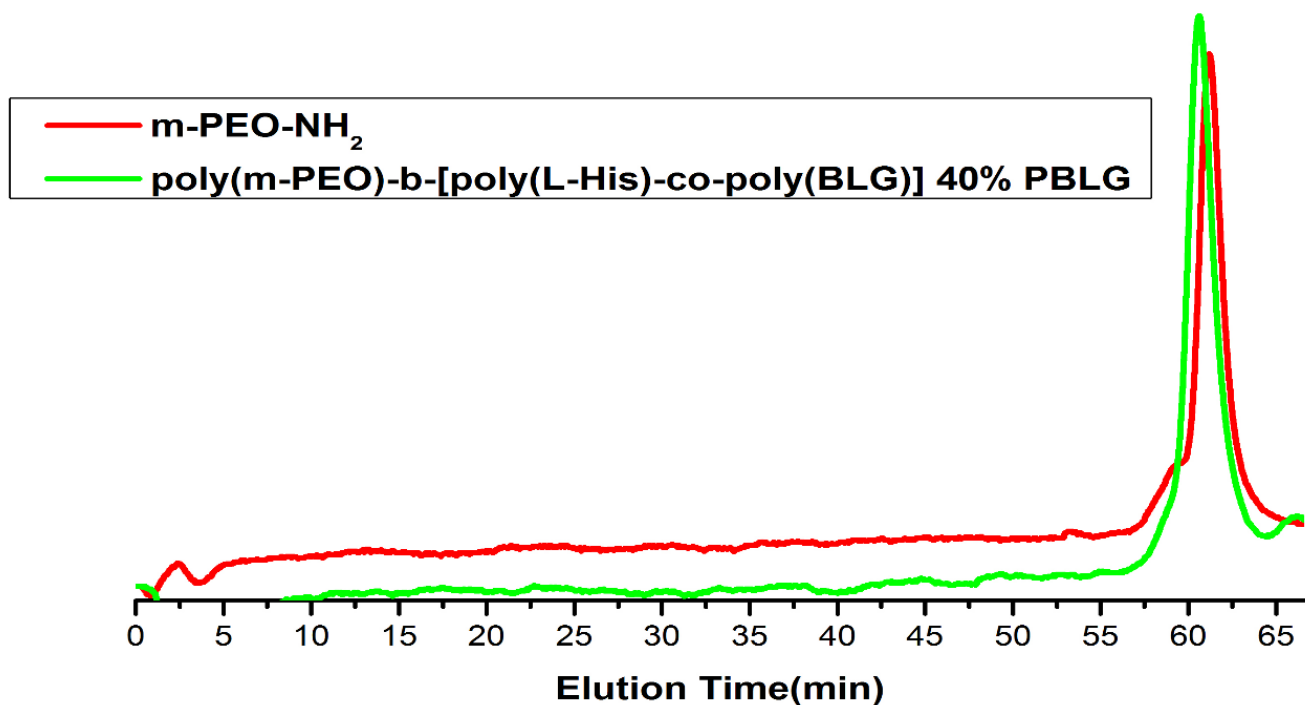
Για την εξακρίβωση της σύνθεσης του  $\text{poly}(m\text{-PEO})\text{-}b\text{-}[\text{poly}(\text{L-His})\text{-co-poly}(\text{BLG})]$  με 40% PBLG έγινε λήψη του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  σε δευτεριωμένο DMSO. Από το φάσμα παρατηρώ  $b/c = 1/0,64 = 1,56$  και αφού η αναλογία είναι 60:40 έχουμε:  $60/40 = 1,5$ . Άρα πετύχαμε την αναλογία 40% που θέλαμε. Επίσης από NMR διαπιστώνουμε ότι με την αποπροστασία φεύγει η τρίτυλο προστατευτική ομάδα αλλά η βένζυλο προστατευτική του γλουταμικού παραμένει αφού  $f/c = 1,46/0,64 = 2,2$  πολύ κοντά με την αναλογία  $2/1 = 2$ . Στα 7,3 ppm φαίνονται και τα υδρογόνα του βενζολικού δακτυλίου της προστασίας του PBLG που αποτελεί μεγάλο μέρος της δεύτερης συστάδας.



**Εικόνα 27: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG**

Στο Χρωματογράφημα GPC σε διαλύτη νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG παρατηρούμε μια ομοιόμορφη καμπύλη με συμμετρική και στενή κατανομή (κίτρινη). Η κατανομή βρέθηκε **1,12**. Στο Χρωματογράφημα φαίνεται και η καμπύλη του μακροαπαρχητή που έχει 10000 μοριακό βάρος. Η καμπύλη του συμπολυμερούς 40% εμφανίζεται νωρίτερα, κάτι αναμενόμενο αφού έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG και αφού το πολυμερές ήταν διαλυτό στο DMF, αποφασίστηκε η λήψη GPC σε διαλύτη DMF πριν την διαδικασία της αποπροστασίας, καθώς και λήψη GPC στον ίδιο διαλύτη του μακροαπαρχητή για την μεταξύ τους σύγκριση.



**Εικόνα 28:** Χρωματογράφημα GPC σε DMF του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG

Φαίνεται η διαφορά στον χρόνο έκλουσης μικρότερη από ότι είναι στην πραγματικότητα και από ότι φαίνεται στο GPC του νερού. Αυτό οφείλεται στο ότι η δεύτερη συστάδα του πολυμερούς στο DMF συσσωματώνεται, οπότε δεν φαίνεται πόσο διαφορετικός είναι ο υδροδυναμικός όγκος. Αντίθετα στο νερό δεν συμβαίνει κάτι τέτοιο. Επίσης στον ανιχνευτή UV που διαθέτει το GPC-DMF βλέπω στα 267 nm σήμα από το PBLG. Αυτό σημαίνει ότι έχω PBLG στο πολυμερές μου, ενώ αντίστοιχα στο GPC του μακροαπαρχητή δεν υπάρχει σήμα. Άρα η διαφορά είναι στην συσσωμάτωση της δεύτερης συστάδας του πολυμερούς στο DMF.

Μια παρατήρηση που πρέπει να ληφθεί υπόψιν είναι ότι κατά τον πολυμερισμό της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl και του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) το διάλυμα θολώνει αμέσως, ενώ όσο αυξάναμε το PBLG στα δισυσταδικά τριπολυμερή το διάλυμα δεν θολώνει. Ειδικά ο πολυμερισμός στο 40% δεν θόλωσε καθόλου. Και αφού επιβεβαιώσαμε από τα NMR ότι οι πολυμερισμοί έγιναν και πήραμε και τις αναλογίες που θέλαμε, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη του PBLG στην δεύτερη συστάδα γίνεται τυχαία και όχι κατά συστάδες. Αλλιώς θα έπρεπε να ήταν πρώτα διαυγές, γιατί θα είχαμε την προσθήκη του PBLG και μετά να θόλωνε, όταν θα έμπαινε η ιστιδίνη, κάτι που δεν συνέβη.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 4.1 Μελέτη της αυτοοργάνωσης μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός

Η μελέτη της ικανότητας μεταφοράς φαρμάκου που έχουν τα πολυμερή μας εξαρτάται από τις δομές που αυτά δημιουργούν όταν βρεθούν σε ένα καλό διαλύτη. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η επίτευξη μικκυλιακών δομών από τα πολυμερή. Για την μελέτη της δομής που υιοθετούν αλλά και του μεγέθους αυτής χρησιμοποιήθηκε η Δυναμική Σκέδαση Φωτός.

Για την μέτρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη κυψελίδα που πλύνουμε με νερό και ακετόνη μετά από κάθε μέτρηση και στεγνώναμε με ροή αέρα πριν την μέτρηση επόμενου δείγματος. Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα με γωνία σκέδασης  $90^\circ$  και θερμοκρασία  $25^\circ\text{C}$ . Οι μετρήσεις μας έγιναν σε 2 διαφορετικά pH για να διερευνήσουμε την μεταβολή στην δομή που προκαλείται από την αλλαγή στο pH. Τα διαλύματα τα φτιάχναμε με νερό από milliQ. Χρησιμοποιήσαμε ζυγό με ακρίβεια 5 δεκαδικών ψηφίων για την ζύγιση των πολυμερών. Για τα δείγματα των συμπολυμερών με 10%,20% και 40% PBLG καθώς και για το poly(m-PEO)-b-poly(L-His) σε pH 5 φτιάξαμε διαλύματα 3mg/2ml νερό και για το poly(m-PEO)-b-poly(L-His) σε pH 7,4 και pH 3 φτιάξαμε διαλύματα 6 mg/2ml νερό επειδή στις πρώτες μας μετρήσεις με αυτό το πολυμερές δεν είχαμε σήμα στα συγκεκριμένα pH. Για την μέτρηση της μάζας των πολυμερών μετρήσαμε αρχικά το απόβαρο των δοχείων που χρησιμοποιήθηκαν αφού πρώτα τα πλύνουμε με milliQ νερό και τα αφήσαμε σε φούρνο στους  $150^\circ\text{C}$  μια νύχτα για ξήρανση. Αφήναμε να περάσει μια μέρα από την παρασκευή των δειγμάτων και παίρναμε τις μετρήσεις μας την επομένη, ώστε το σύστημα μας να έχει έρθει σε ισορροπία και να έχουμε ακρίβεια.

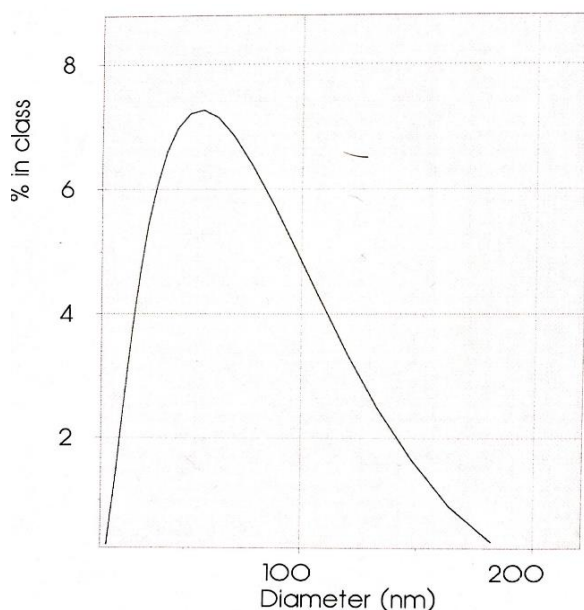
Στον Πίνακα που ακολουθεί κατατάσσουμε τα πολυμερή μας ως προς το ποσοστό κατά mol του PBLG προς την πολυιστιδίνη στην δεύτερη συστάδα. Με το 0 αναφερόμαστε στο poly(m-PEO)-b-poly(L-His), με 10 στο poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG και ούτω καθεξής.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα DLS

Ποσοστό PBLG	pH	R <sub>h</sub>		kilocounts	Polydispersity
0	7,4	54,6		10,301	0,48
0	5	180		11	0,19
0	3	-		2,6	0,57
10	7,4	99,3		70,9	0,38
10	5	605,1		28,6	0,60
20	7,4	83%	32,5	75	0,67
		17%	333,3		
20	5	257		108,4	0,36
40	7,4	68,8		30	0,40
40	5	36		21,1	0,88

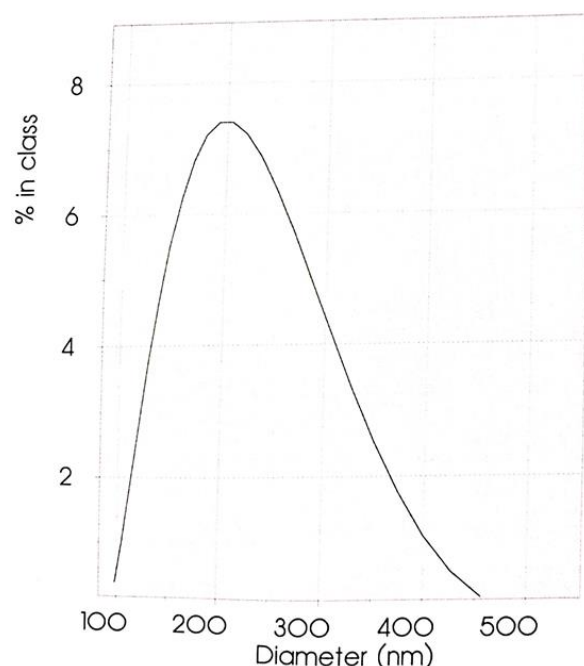
Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα πολυμερή και το pH στο οποίο έγινε η μέτρηση καθενός, καθώς επίσης και το μέγεθος του υδροδυναμικού τους όγκου που σχετίζεται με το μέγεθος των σωματιδίων που σχηματίζονται στο διάλυμα αλλά και τα kcounts που μας δείχνουν την ένταση σκέδασης, που είναι αντιπροσωπευτική της συγκέντρωσης των σωματιδίων. Τέλος δίνεται και η κατανομή της καμπύλης που υπολογίστηκε για τα σωματίδια σε κάθε μέτρηση.

Για τιμή της R<sub>h</sub> κάτω από 70-80 nm μπορούμε να συμπεράνουμε ότι έχουμε **μικκύλια** ενώ για πάνω από 70-80 nm έχουμε **κυστίδια**. Πολύ μεγαλύτερες τιμές της R<sub>h</sub> από αυτές μας δείχνουν **συσσωμάτωμα**, ενώ τιμές πάνω από 300nm μας δείχνουν **συσσωμάτωμα συσσωματωμάτων**.



Για το poly(m-PEO)-b-poly(L-His) συμπεραίνουμε ότι σχηματίζει **μικκύλια** σε pH 7,4. Επίσης φαίνεται πως χωρίς PBLG το πολυμερές δεν μπορεί να αυτοοργανωθεί, γιατί και έχουμε λίγα kcounts.

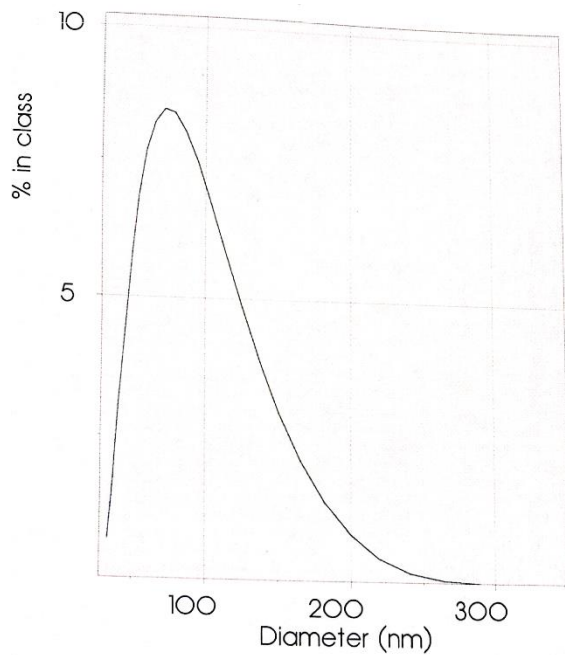
**Εικόνα 29: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) σε pH 7,4**



Για το poly(m-PEO)-b-poly(L-His) συμπεραίνουμε ότι σχηματίζει **συσσωματώματα** σε pH 5. Καθώς μειώνεται το pH το πολυμερές φαίνεται να «φουσκώνει» και γιατί σχηματίζει συσσωματώματα, καθότι η  $R_h$  μεγαλώνει ενώ τα kcounts είναι σχεδόν ίδια με την μέτρηση του ίδιου πολυμερούς για pH 7,4.

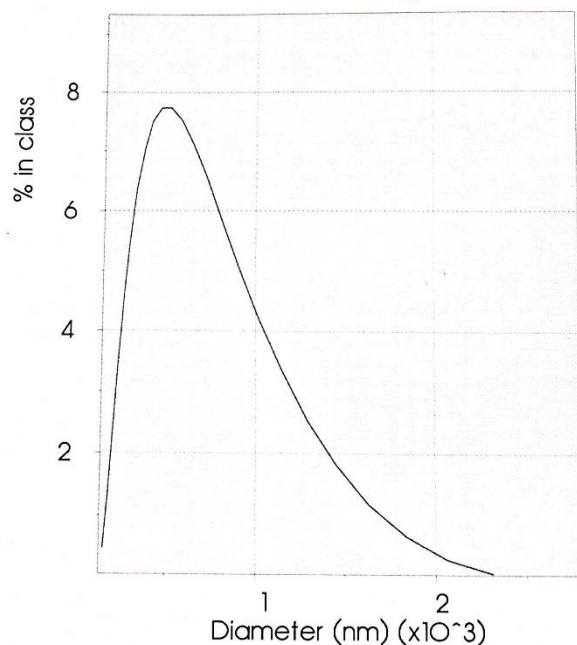
**Εικόνα 30: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-poly(L-His) σε pH 5**

Για το poly(m-PEO)-b-poly(L-His) σε pH 3 παρατηρούμε ότι έχουμε μόνο 2,6 kcounts στην μέτρηση μας. Πρακτικά δεν έχουμε σήμα και αυτό σημαίνει ότι το πολυμερές σε pH 3 **δεν παρουσιάζει κάποια αυτοοργάνωση**.



Για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG συμπεραίνουμε ότι σχηματίζει είτε συσσωμάτωμα μικκυλίων είτε κυστίδια σε pH 7,4. Επειδή βγαίνει μόνο ένας πληθυσμός τείνουμε προς την περίπτωση των κυστιδίων χωρίς να μπορούμε να το υποστηρίξουμε με βεβαιότητα.

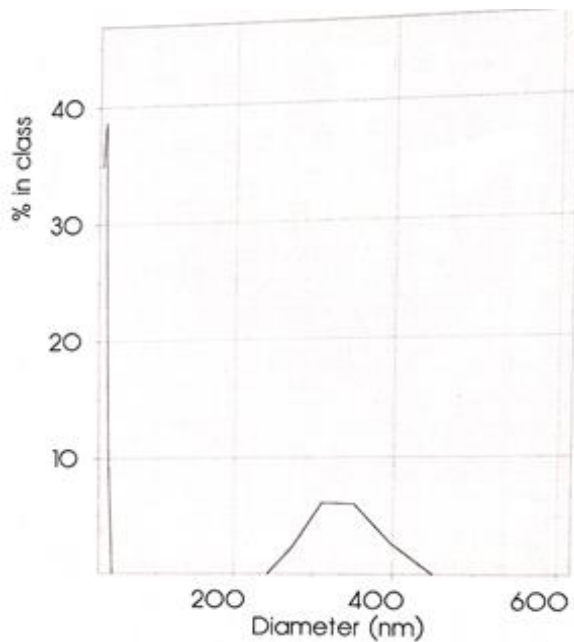
**Εικόνα 31: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG σε pH 7,4**



Για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG συμπεραίνουμε ότι σχηματίζει συσσωμάτωμα συσσωματωμάτων σε pH 5. Φαίνεται ότι το πολυμερές δεν μπορεί να οργανωθεί καλά και το υδρόφοβο κομμάτι του πολυμερούς βρίσκεται ένα άλλο υδρόφοβο κομμάτι άλλου πολυμερούς σχηματίζοντας συσσωμάτωμα συσσωματωμάτων.

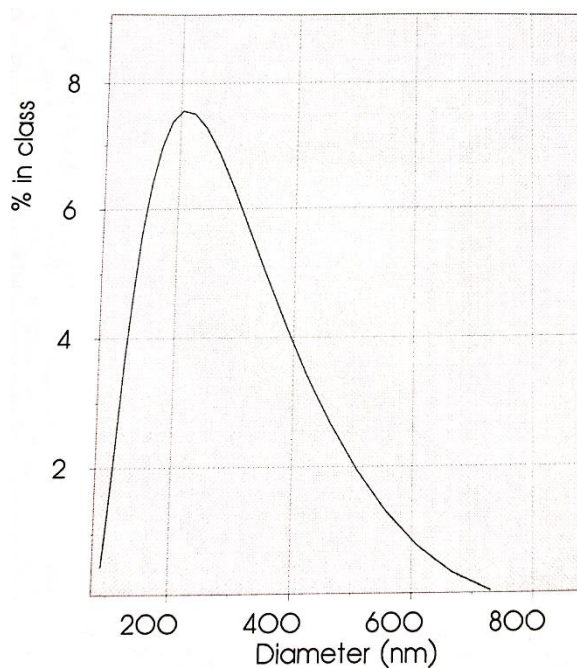
**Εικόνα 32: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG σε pH 5**





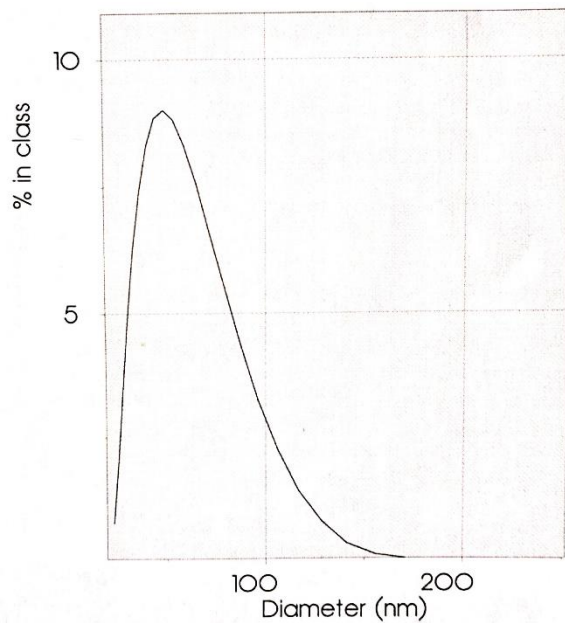
Για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG συμπεραίνουμε ότι σχηματίζει δυο πληθυσμούς σε pH 7,4. Ο ένας (83%) είναι μικκύλια και ο άλλος (17%) είναι συσσωμάτωμα συσσωματωμάτων.

**Εικόνα 33: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG σε pH 7,4**



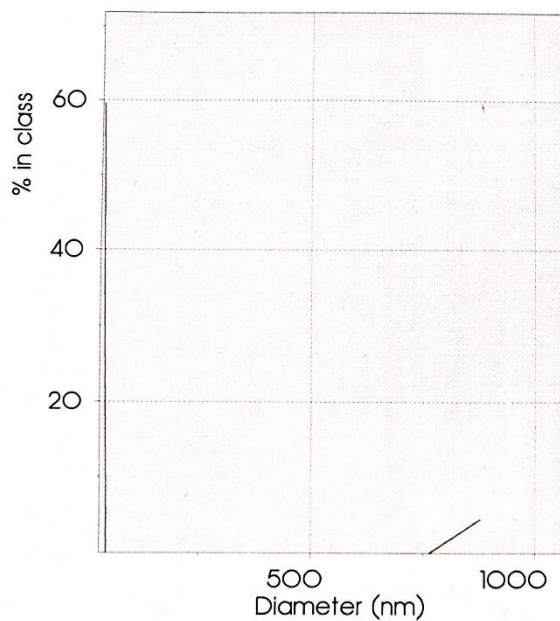
Για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG σε pH 5 κοιτώντας την τιμή Rh σε συνδυασμό με τα kcounts όπου έχουμε μια μεγάλη τιμή υποθέτουμε ότι έχουμε κυστίδια, αλλά η διάκριση από συσσωμάτωμα δεν είναι απόλυτη, οπότε δεν είμαστε βέβαιοι.

**Εικόνα 34: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG σε pH 5**



Για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG σε pH 7,4 δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι αν είναι μικκύλιο ή κυστίδιο, καθώς η τιμή που έχουμε για την  $R_h$  είναι στο όριο της διάκρισης ανάμεσα στις δυο αυτές δομές.

**Εικόνα 35: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG σε pH 7,4**



Για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG σε pH 5 συμπεραίνουμε ότι έχουμε **μικκύλια**.

**Εικόνα 36: Διάγραμμα DLS του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG σε pH 5**

#### 4.2 Φασματοφωτομετρικές Τιτλοδοτήσεις της πολύ-L-ιστιδίνης·HCl

Οι φασματοφωτομετρικές τιτλοδοτήσεις μας δίνουν την δυνατότητα να υπολογίσουμε το  $pK_a$  της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl που έχει 6000 μοριακό βάρος. Ζυγίσαμε 0,0115 γραμμάρια από την πολύ-L-ιστιδίνη·HCl και προσθέσαμε 3 ml νερό milliQ με πιπέτα. Αφήσαμε να περάσει μια μέρα από την παρασκευή του δείγματος και παίρναμε τις μετρήσεις μας την επομένη, ώστε το σύστημα μας να έχει έρθει σε ισορροπία και να έχουμε ακρίβεια. Την επομένη προσθέτουμε 3 σταγόνες από διάλυμα HCl 1M ώστε το pH του διαλύματος του πολυμερούς να φτάσει στο 2,41. Κατά την Ογκομέτρηση λαμβάναμε την μέτρηση απορρόφησης από το όργανο και στην συνέχεια προσθέταμε NaOH από διάλυμα 0,1M. Ζυγίζαμε το μπουκαλάκι με το διάλυμα μας και αφού μηδενίζαμε τον ζυγό ξαναζυγίζαμε, μετά την προσθήκη του διαλύματος NaOH. Έτσι ξέρουμε πόσο NaOH προσθέταμε. Χρησιμοποιούμε ζυγό για να έχουμε μεγαλύτερη ακρίβεια. Στην συνέχεια μετρούσαμε το pH με κατάλληλο πεχάμετρο.

Κατά την τιτλοδότηση ξεκινήσαμε από όξινες τιμές pH και μειώναμε την οξύτητα με προσθήκη διαλύματος NaOH. Διαλέξαμε να πάρουμε τις μετρήσεις μας σε μήκος κύματος 500 nm. Στα 500 nm δεν απορροφά ούτε το πολυμερές μας ούτε ο διαλύτης, οπότε απλά μετράμε πόσο θολώνει το διάλυμα κατά την αλλαγή του pH. Άρα η απορρόφηση οφείλεται στην θολότητα του διαλύματος. Με την προσθήκη του διαλύματος NaOH αυξάνει το pH και το πολυμερές παραμένει διαλυτό μέχρι το σημείο που δεν μπορεί να μείνει πια στο διάλυμα και με περαιτέρω αύξηση του pH αρχίζει να θολώνει αλλάζοντας την απορρόφηση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.

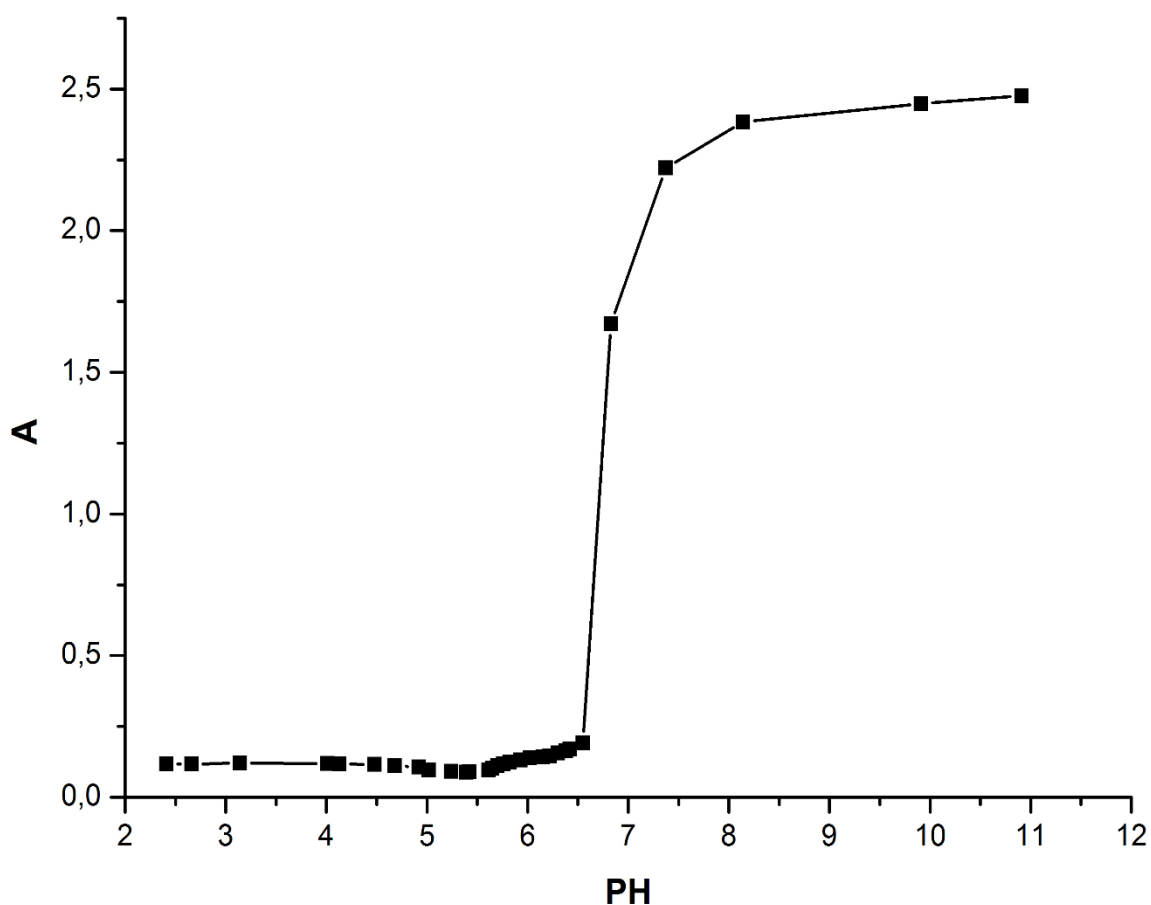
Κατά το πείραμα χρησιμοποιώ δυο κυψελίδες στο όργανο στην μια έχω το διάλυμα μου και στην άλλη βάζω τον διαλύτη που είναι το νερό ώστε το όργανο αυτόματα να αφαιρεί την απορρόφηση του διαλύτη από τις μετρήσεις του διαλύματος. Το νερό δεν είναι πτητικό οπότε οι συγκεντρώσεις μας δεν αλλάζουν. Χρησιμοποιούμε τα ίδια πλαστικά tips στην πιπέτα μας, ένα για το διάλυμα HCl και ένα για το διάλυμα NaOH ώστε να μην αλλάξουν οι συγκεντρώσεις μας. Αξιοσημείωτο είναι ότι φασματοφωτομετρικές τιτλοδοτήσεις κατορθώσαμε να κάνουμε μόνο στο διάλυμα της πολύ-L-ιστιδίνης·HCl, ενώ στα υπόλοιπα συμπολυμερή που συνθέσαμε δεν είχαμε

καθόλου θόλωμα με την αλλαγή του pH, επειδή το ΡΕΟ κρατούσε και την δεύτερη συστάδα του πολυμερούς διαλυτή στο διάλυμα.

Στον Πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι μετρήσεις που ελήφθησαν μαζί με τις απαραίτητες διορθώσεις αφού πρέπει να λάβουμε υπόψιν ότι το διάλυμα μας έχει 3 γραμμάρια νερό. Έτσι πολλαπλασιάζουμε την τιμή για την απορρόφηση που μετρήσαμε επί την διόρθωση για το βάρος.

**Πίνακας 2: Αποτελέσματα φασματομετρικής τιτλοδότησης της πολύ-L-ιστιδίνης·HCl**

Γραμμάρια NaOH που προστίθενται σε κάθε μέτρηση	Συνολικά γραμμάρια NaOH	+ 3 γραμμάρια νερού	Διαιρούμε διά 3 (Διόρθωση για το βάρος)	Απορρόφηση που μετρήσαμε	Διόρθωση Απορρόφησης (A)	pH
0	0	3	1	0,1174	0,1174	2,41
0,0804	0,0804	3,0804	1,0268	0,1149	0,117979	2,66
0,0804	0,1608	3,1608	1,0536	0,114	0,12011	3,14
0,0773	0,2381	3,2381	1,079367	0,1105	0,11927	4,01
0,0403	0,2784	3,2784	1,0928	0,1071	0,117039	4,13
0,0399	0,3183	3,3183	1,1061	0,1044	0,115477	4,48
0,0393	0,3576	3,3576	1,1192	0,099	0,110801	4,68
0,0408	0,3984	3,3984	1,1328	0,0937	0,106143	4,92
0,0373	0,4357	3,4357	1,145233	0,0837	0,095856	5,02
0,0409	0,4766	3,4766	1,158867	0,0782	0,090623	5,24
0,0404	0,517	3,517	1,172333	0,0757	0,088746	5,39
0,0403	0,5573	3,5573	1,185767	0,0761	0,090237	5,42
0,0417	0,599	3,599	1,199667	0,0793	0,095134	5,61
0,0214	0,6204	3,6204	1,2068	0,085	0,102578	5,65
0,0162	0,6366	3,6366	1,2122	0,0918	0,11128	5,7
0,0171	0,6537	3,6537	1,2179	0,0962	0,117162	5,76
0,0149	0,6686	3,6686	1,222867	0,1008	0,123265	5,82
0,0209	0,6895	3,6895	1,229833	0,1066	0,1311	5,93
0,0167	0,7062	3,7062	1,2354	0,112	0,138365	6,02
0,0207	0,7269	3,7269	1,2423	0,114	0,141622	6,15
0,0107	0,7376	3,7376	1,245867	0,1163	0,144894	6,22
0,0192	0,7568	3,7568	1,252267	0,124	0,155281	6,3
0,0187	0,7755	3,7755	1,2585	0,13	0,163605	6,38
0,0185	0,794	3,794	1,264667	0,1343	0,169845	6,42
0,0218	0,8158	3,8158	1,271933	0,1501	0,190917	6,55
0,0213	0,8371	3,8371	1,279033	1,3073	1,67208	6,83
0,0213	0,8584	3,8584	1,286133	1,727	2,221152	7,37
0,0197	0,8781	3,8781	1,2927	1,8445	2,384385	8,14
0,0413	0,9194	3,9194	1,306467	1,874	2,448319	9,91
0,0435	0,9629	3,9629	1,320967	1,8753	2,477209	10,91



**Εικόνα 37: Διάγραμμα φασματομετρικής τιτλοδότησης για την πολύ-L-ιστιδίνη·HCl**

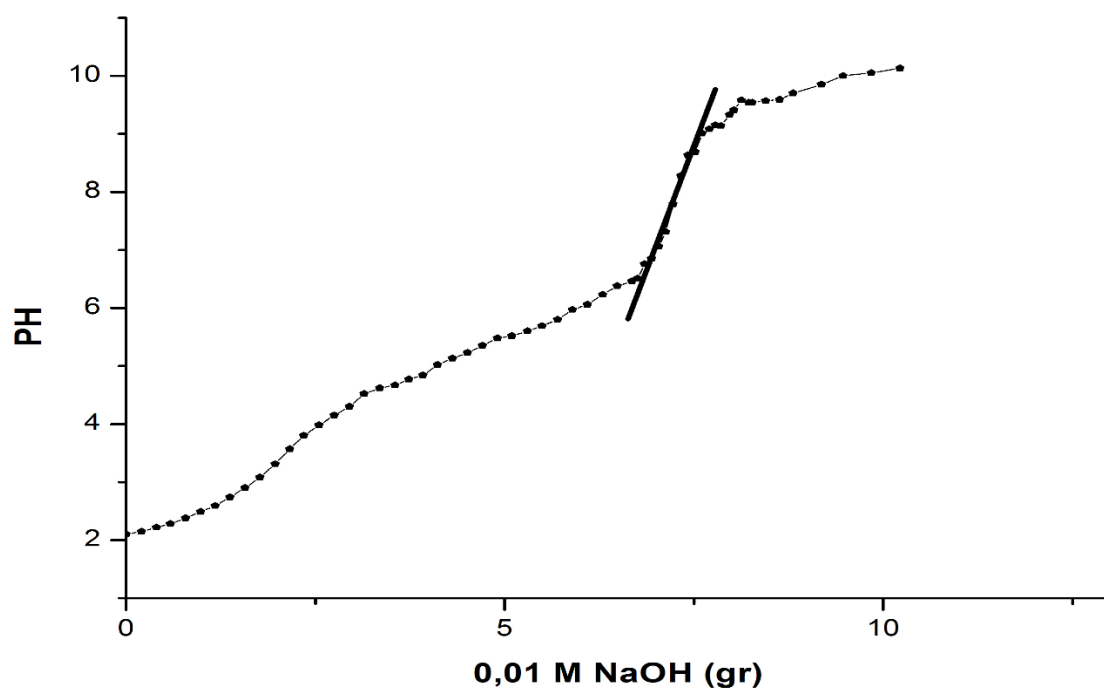
Για την πολύ-L-ιστιδίνη·HCl ξέρουμε ότι ισχύει<sup>35</sup>:  

$$PH = PKa + \log \frac{1-a}{a} - 0,868naw.$$
 Έτσι ο βαθμός ιοντισμού για το πολυμερές μας είναι ο αριθμός των μορίων του πολυμερούς που ιοντίζονται καθώς αυξάνει το pH προς τον αριθμό των μορίων αρχικά πριν την ξαφνική και έντονη αλλαγή του pH. Καθώς αυξάνει το pH και ιοντίζονται τα μόρια του πολυμερούς παρατηρούμε θόλωμα και έτσι αλλαγή της απορρόφησης. Άρα από την εξίσωση συμπεραίνουμε ότι όταν  $a=0,5$  δηλαδή όταν τα μισά μόρια του πολυμερούς ιοντιστούν τότε ο λογάριθμος μηδενίζεται και το pH ισούται με  $PKa$  μείον τον συντελεστή  $0,868naw$ . Από το διάγραμμα βλέπουμε ότι αυτό συμβαίνει στην περιοχή pH 6,7 με 6,8 στο μέσο περίπου της περιοχής που έχουμε την απότομη αύξηση της απορρόφησης καθότι στην μέγιστη τιμή της απορρόφησης όλα τα μόρια είναι ιοντισμένα ενώ στην μικρότερη τιμή της απορρόφησης δεν έχουμε ιοντισμό. Άρα συμπερασματικά καταλήγουμε ότι το  $pKa$  της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl βρίσκεται στην περιοχή **6,65 με 6,7**.

### 4.3 Κατά βάρος Τιτλοδοτήσεις για εύρεση μεταβολής οξύτητας

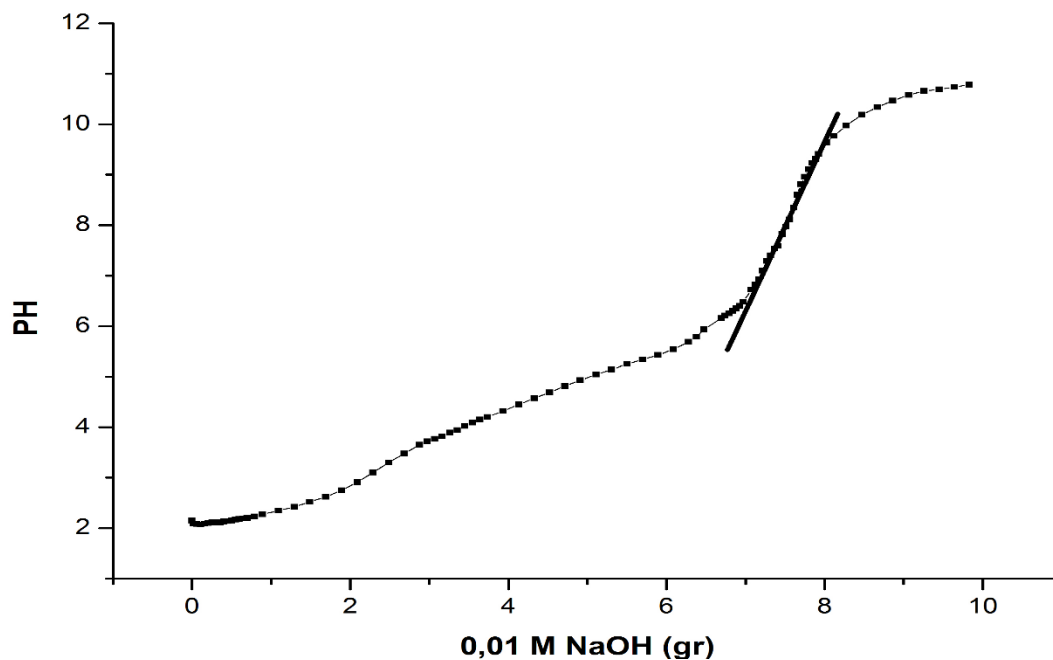
Μια ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα των πολυπεπτιδίων που θα αύξανε την επιτυχία τους ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων είναι η ευαισθησία και η αποκρισιμότητα τους στην αλλαγή του pH καθώς και η ικανότητα να «κρατάνε» το φάρμακο για περισσότερη ώρα. Σε αυτό θα βοηθούσε να έχουν μεγαλύτερη αντοχή στο όξινο περιβάλλον των καρκινικών ιστών. Το  $pK_a$  των συμπολυμερών μπορεί να ελεγχθεί από το ποσοστό του PBLG στην δεύτερη συστάδα. Για την σχετική μελέτη προχωρήσαμε σε τιτλοδοτήσεις των πολυμερών που συνθέσαμε.

Αρχικά φτιάχνουμε το διάλυμα του πολυμερούς μας και το αφήνουμε μια νύχτα αφού σιγουρευτούμε ότι διαλύθηκε καλά. Χρησιμοποιούμε διάλυμα HCl 1M για να πάμε το pH σε χαμηλές τιμές και ογκομετρούμε με προσθήκη ποσότητας διαλύματος NaOH 0,01M. Το διάλυμα NaOH είναι αραιό για να ανεβαίνει αργά το pH και να έχω περισσότερα σημεία. Οι Τιτλοδοτήσεις γίνονται κατά βάρος με ζύγιση της ποσότητας NaOH που προσθέτουμε, ώστε να έχουμε καλύτερη ακρίβεια στην ποσότητα που ρίχνουμε. Μέτρηση του pH γίνεται με κατάλληλα βαθμονομημένο πεχάμετρο. Λάβαμε τα ακόλουθα αποτελέσματα :



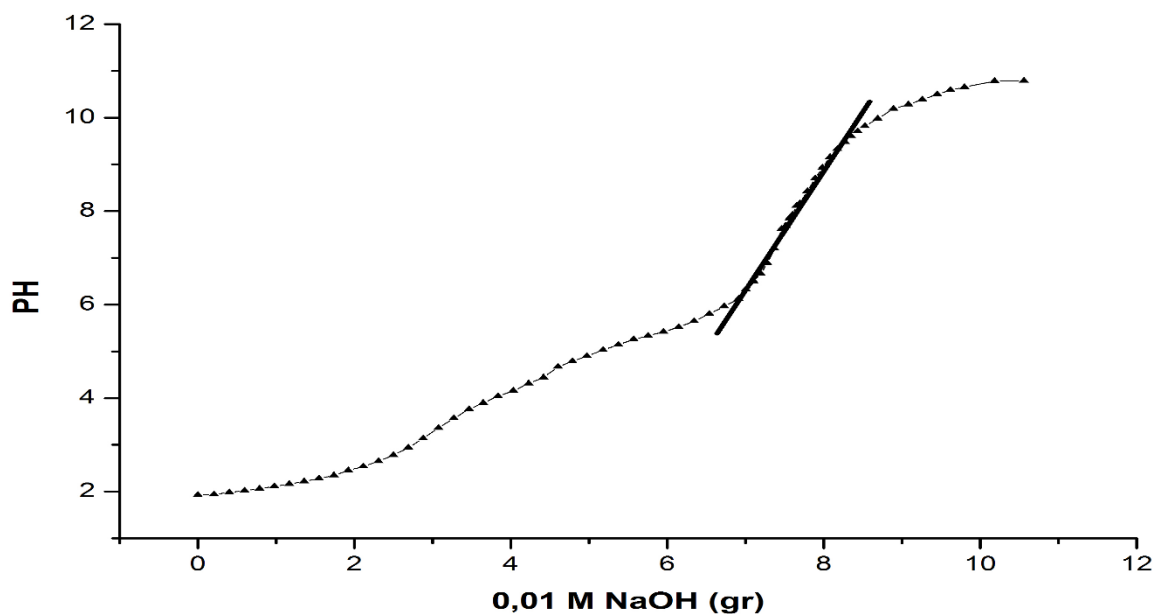
Εικόνα 38: Καμπύλη τιτλοδότησης για την πολύ-L-ιστιδίνη·HCl

Για το ομοπολυμερές με 6000 μοριακό βάρος ζυγίσαμε 0,0112 γραμμάρια πολύ-L-ιστιδίνη·HCl και προσθέσαμε 2 ml νερό. Το pH στο ισοδύναμο σημείο της τιτλοδότησης είναι **7,93**.



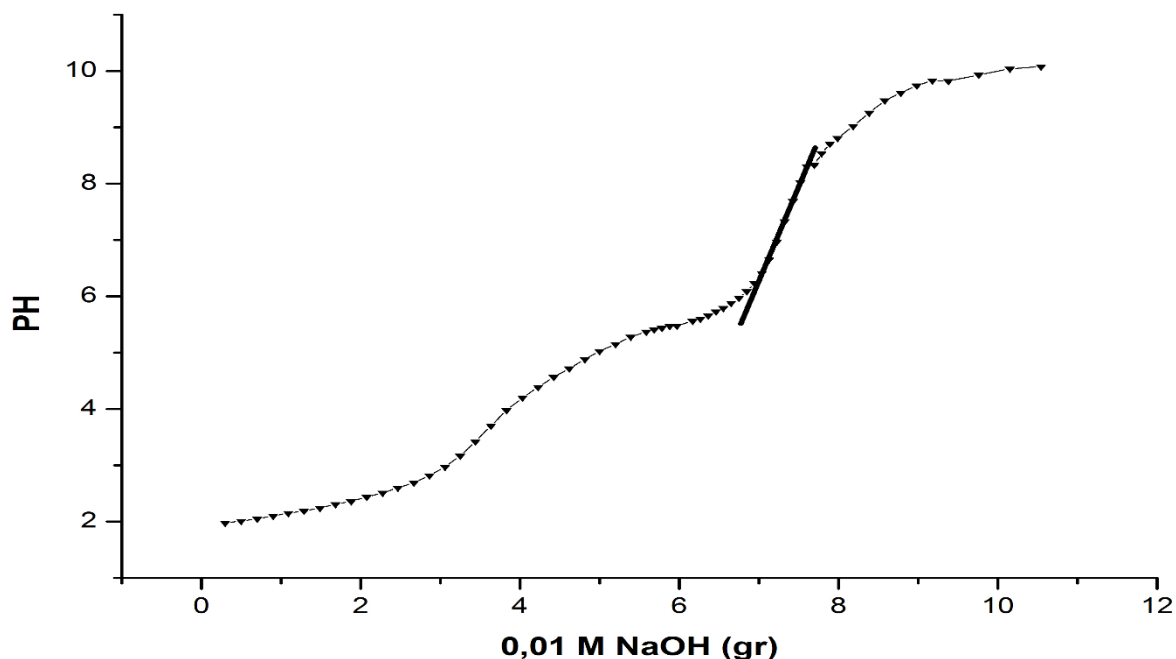
**Εικόνα 39: Καμπύλη τιτλοδότησης για το poly(m-PEO)-b-poly(L-His)**

Για το συμπολυμερές poly(m-PEO)-b-poly(L-His) ζυγίσαμε 0,0316 γραμμάρια και προσθέσαμε 2 ml νερό. Το pH στο ισοδύναμο σημείο της τιτλοδότησης είναι **8,06**.



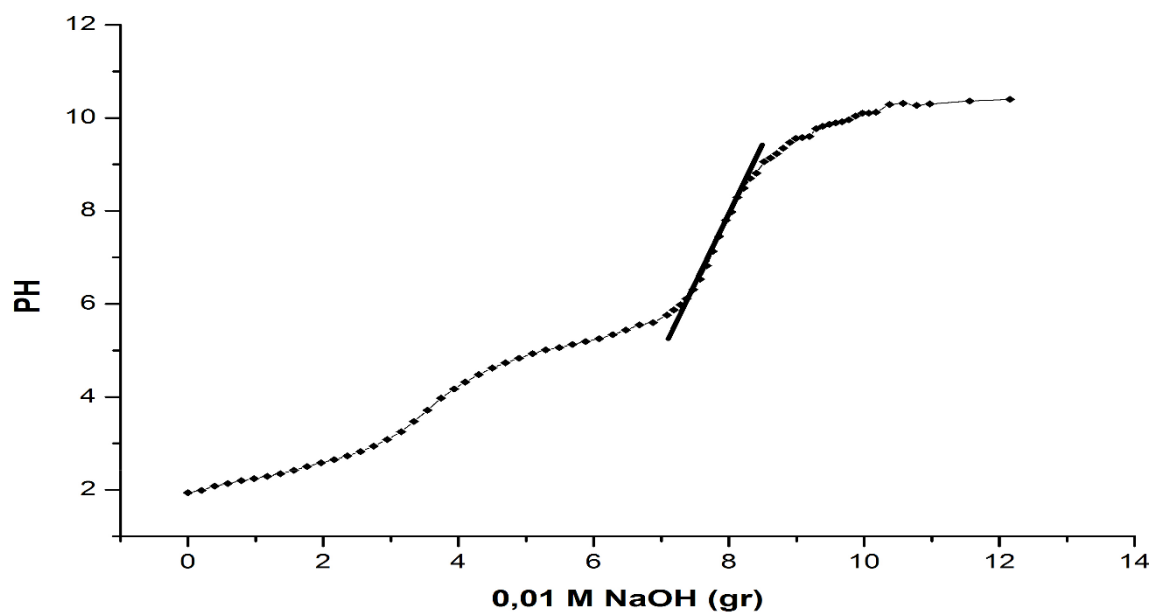
**Εικόνα 40: Καμπύλη τιτλοδότησης για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG**

Για το συμπολυμερές poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 10% PBLG ζυγίσαμε 0,034 γραμμάρια και προσθέσαμε 2 ml νερό. Το pH στο ισοδύναμο σημείο της τιτλοδότησης είναι **7,83**.



**Εικόνα 41:** Καμπύλη τιτλοδότησης για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG

Για το συμπολυμερές poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 20% PBLG ζυγίσαμε 0,0364 γραμμάρια και προσθέσαμε 2 ml νερό. Το pH στο ισοδύναμο σημείο της τιτλοδότησης είναι **7,27**.



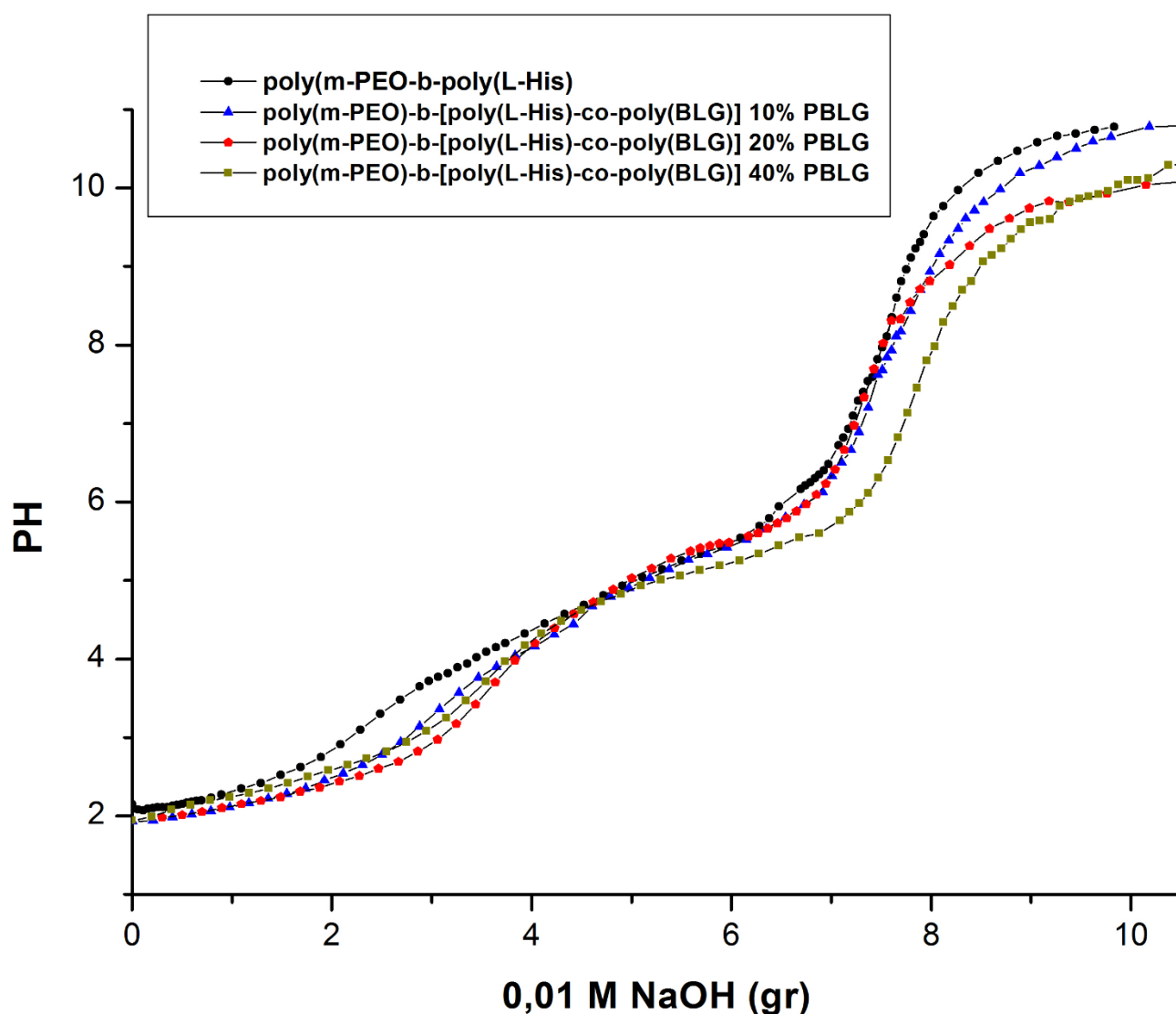
**Εικόνα 42:** Καμπύλη τιτλοδότησης για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG



Για το συμπολυμερές poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(BLG)] με 40% PBLG ζυγίσαμε 0,047 γραμμάρια και προσθέσαμε 2 ml νερό. Το pH στο ισοδύναμο σημείο της τιτλοδότησης είναι **7,20**.

#### 4.4 Επίδραση του PBLG στην ισχύ οξύτητας των συμπολυμερών

Στις τιτλοδοτήσεις που κάναμε βρήκαμε σε όλες το ισοδύναμο σημείο. Αυτό είναι ένα χαρακτηριστικό σημείο της καμπύλης τιτλοδότησης με βάση το οποίο μπορούμε συγκριτικά να δούμε την επίδραση του PBLG στην ισχύ της οξύτητας των συμπολυμερών. Θα χρησιμοποιήσουμε και το poly(m-PEO)-b-poly(L-His) ως "τυφλό" αφού δεν έχει PBLG ενώ τα άλλα συμπολυμερή έχουν PBLG στην δεύτερη συστάδα σε διαφορετικά ποσοστά.



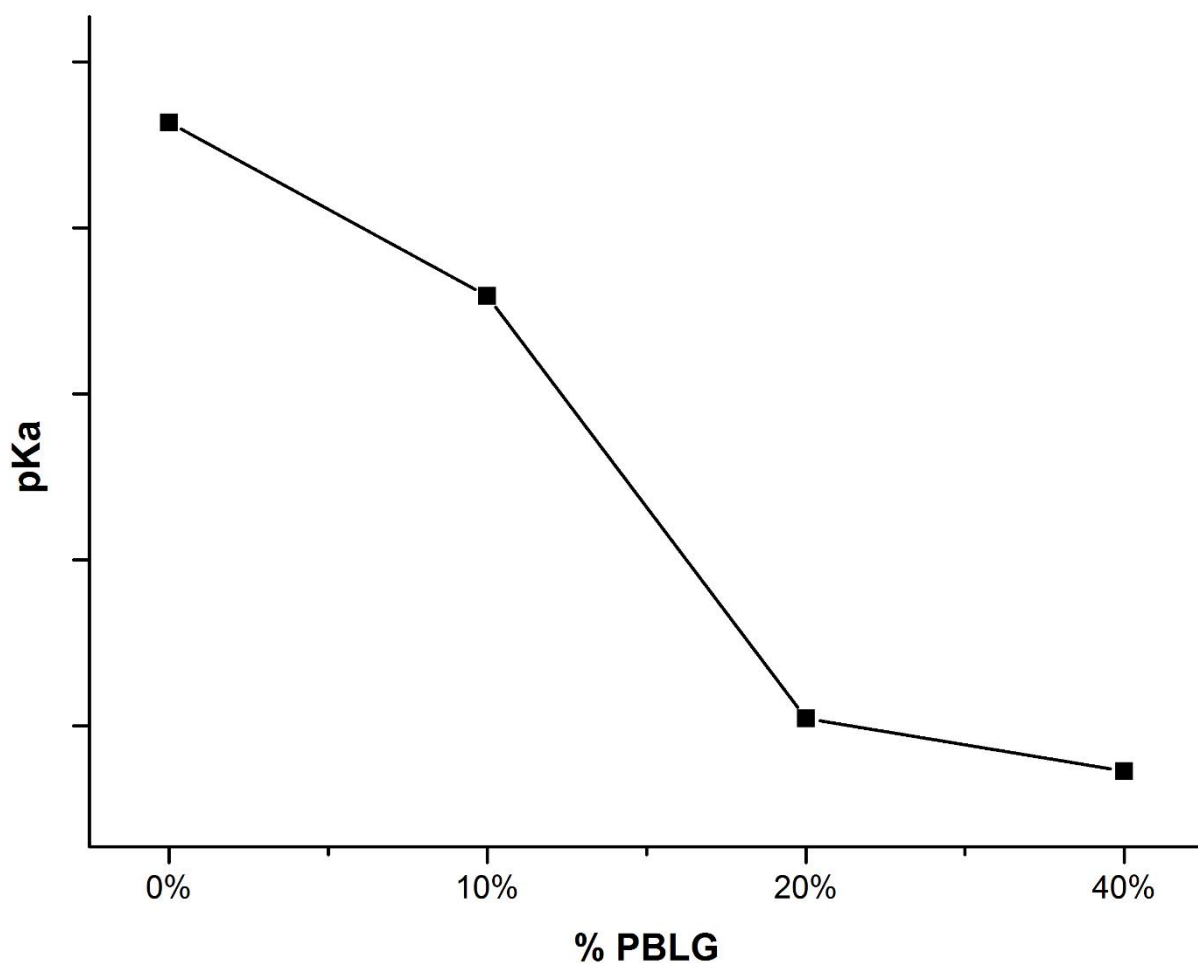
Εικόνα 43: Συγκριτική μελέτη της επίδρασης του ποσοστού του PBLG στην οξύτητα των συμπολυμερών

Το ισοδύναμο σημείο είναι το σημείο της τιτλοδότησης, όπου έχει αντιδράσει πλήρως το πολυμερές με ορισμένη ποσότητα του διαλύματος NaOH. Όλες οι τιτλοδοτήσεις έγιναν με προσθήκη ποσότητας διαλύματος NaOH 0,01M και μέτρηση του pH. Χρησιμοποιήσαμε κατάλληλες ποσότητες από το κάθε πολυμερές στα διαλύματα που φτιάξαμε για να τα τιτλοδοτήσουμε, έτσι ώστε η ποσότητα της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl της δεύτερης συστάδας των συμπολυμερών να είναι σε κάθε διάλυμα ίδια. Αυτό έγινε με βάση τις ποσότητες που περιμέναμε θεωρητικά. Έτσι μπορούμε να πούμε ότι η ποσότητα και η συγκέντρωση της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl είναι **περίπου ίδια** σε κάθε πολυμερές άρα και η αλλαγή στο pH που βλέπουμε και συγκεκριμένα η μείωση αυτού, αντιστοιχεί και σε μείωση του pKa και άρα της οξύτητας του πολυμερούς. Κρατώντας λοιπόν σταθερή την ποσότητα της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl στην δεύτερη συστάδα η αλλαγή στο pH θα οφείλεται στο ποσοστό του PBLG. Άρα όσο η ποσότητα του PBLG αυξάνεται στην δεύτερη συστάδα του συμπολυμερούς παρατηρούμε και μείωση του pH στο ισοδύναμο σημείο.

**Πίνακας 3: Ποσοστό PBLG στα συμπολυμερή και αντίστοιχο pH στο ισοδύναμο σημείο**

Ποσοστό PBLG στα συμπολυμερή	pH στο ισοδύναμο σημείο
0%	8,06
10%	7,83
20%	7,27
40%	7,20

Από τον πίνακα παρατηρούμε ότι με αύξηση του ποσοστού του PBLG στην δεύτερη συστάδα μειώνεται το pH των συμπολυμερών στο ισοδύναμο σημείο. Μεγάλη αλλαγή παρατηρείται στο 20%, όπου το pH μειώνεται απότομα ενώ στο 40% δεν βλέπουμε περαιτέρω αλλαγή του pH, αν και το ποσοστό του PBLG αυξάνεται πολύ. Η μεταβολή αυτή μεταφέρεται και στο pKa των συμπολυμερών.



**Εικόνα 44:** Διάγραμμα της μεταβολής του pKa με το ποσοστό του PBLG στην δεύτερη συστάδα

Για το 40% δεν έχουμε μεγάλη βεβαιότητα για την επίδραση της αύξησης του PBLG στο pH στο ισοδύναμο σημείο. Αυτό οφείλεται στο ότι ταυτόχρονα έχουμε και αποπροστασία της προστατευτικής ομάδας του PBLG λόγω της χρήσης NaOH στην τιτλοδότηση. Το NaOH μπορεί να προκαλέσει αποπροστασία της βένζυλο προστατευτικής ομάδας του PBLG. Στα υπόλοιπα συμπολυμερή το NaOH δεν επηρέασε την προστατευτική ομάδα του PBLG, πιθανώς λόγω των διαμορφώσεων των μορίων που λόγω του μεγάλου ποσοστού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl που είναι υδρόφοβη, συρρικνώνονται. Αντίθετα στο 40% το NaOH αποπροστάτευσε τις βένζυλο γιατί το PBLG είναι περισσότερο και το πολυμερές συρρικνώνεται λιγότερο, οπότε το NaOH μπορεί πιο εύκολα να αντιδράσει με την βένζυλο προστατευτική ομάδα του PBLG.

#### 4.5 Μελέτη της δευτεροταγούς δομής της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε μεταβολή του pH και της θερμοκρασίας

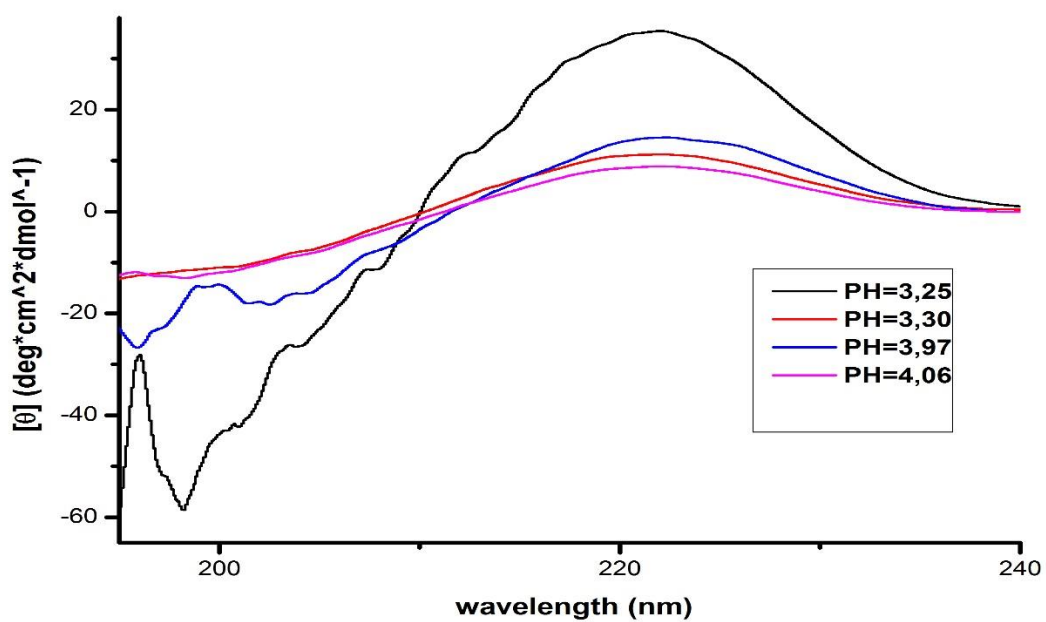
Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί ο τρόπος με τον οποίο αλλάζει η δευτεροταγής δομή του πολυμερούς σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα του να αποκρίνεται στην μεταβολή του pH. Έτσι με την αλλαγή του pH αλλάζει και η αυτοοργάνωση του πολυμερούς, μια ιδιότητα σημαντική στην ικανότητα που έχει το πολυμερές να μεταφέρει και να αποδεσμεύει εκλεκτικά φάρμακα. Παράλληλα μελετήθηκε και η αλλαγή της δευτεροταγούς δομής στην αλλαγή της θερμοκρασίας.

Για την λήψη του φάσματος χρησιμοποιούμε κυψελίδα διαστάσεων 0,1cm, όπου φέρεται υδατικό διάλυμα πολυ-L-ιστιδίνης·HCl συγκέντρωσης  $2 \times 10^{-4}$ g/ml η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 25°C, με τη χρήση ειδικής ψηφιακής συσκευής θερμοστάτησης και η παροχή του αζώτου στα 15 l/min . Πραγματοποιείται «σάρωση» του δείγματος στην περιοχή μηκών κύματος 260 – 185nm. Επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις από το μηχάνημα 10 φορές ώστε να έχουμε μείωση του θορύβου. Με μέτρηση με ψηφιακό πεχάμετρο προσδιορίζουμε την τιμή του pH, ενώ με την προσθήκη ποσότητας διαλύματος βάσης καυστικού νατρίου μεταβάλλουμε την τιμή του pH αυξάνοντας την και λαμβάνουμε το φάσμα για κάθε τιμή.

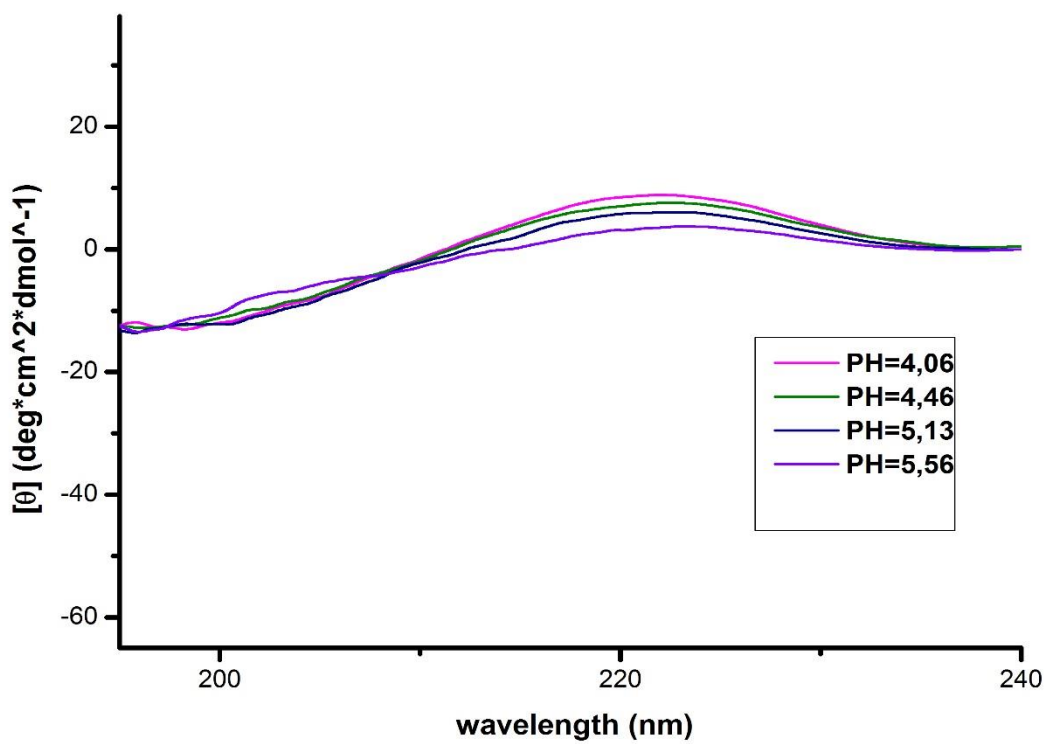
Επίσης επειδή το όργανο του κυκλικού διχρωισμού κάνει τις μετρήσεις σε mdeg, πρέπει να μετατρέψουμε τις μονάδες σε θ. Αυτό γίνεται ακολουθώντας την επόμενη εξίσωση :

$$\theta(\text{deg cm}^2\text{dmol}^{-1}) = \frac{\text{ελλειπτικότητα (mdeg)} \cdot 10^6 \cdot c (\text{g}^r/\text{L})}{\text{Μοριακο Βαρος (g}^r/\text{mol)} \cdot \text{διαστάσεις κυψελίδας (mm)}}$$

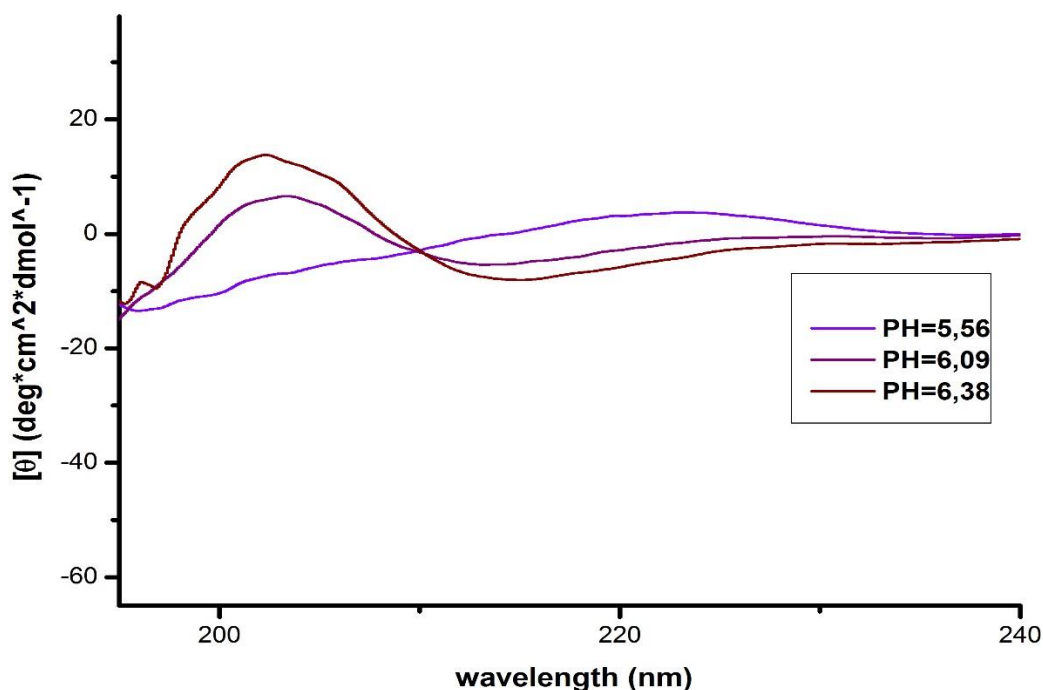
Για μοριακο βαρος έχουμε 173 της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl , συγκέντρωση  $2 \times 10^{-1}$ g/L και διαστάσεις κυψελίδας 1mm.



Εικόνα 45: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε τιμές pH 3,25 3,30 3,97 και 4,06



Εικόνα 46: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε τιμές pH 4,06 4,46 5,13 και 5,56



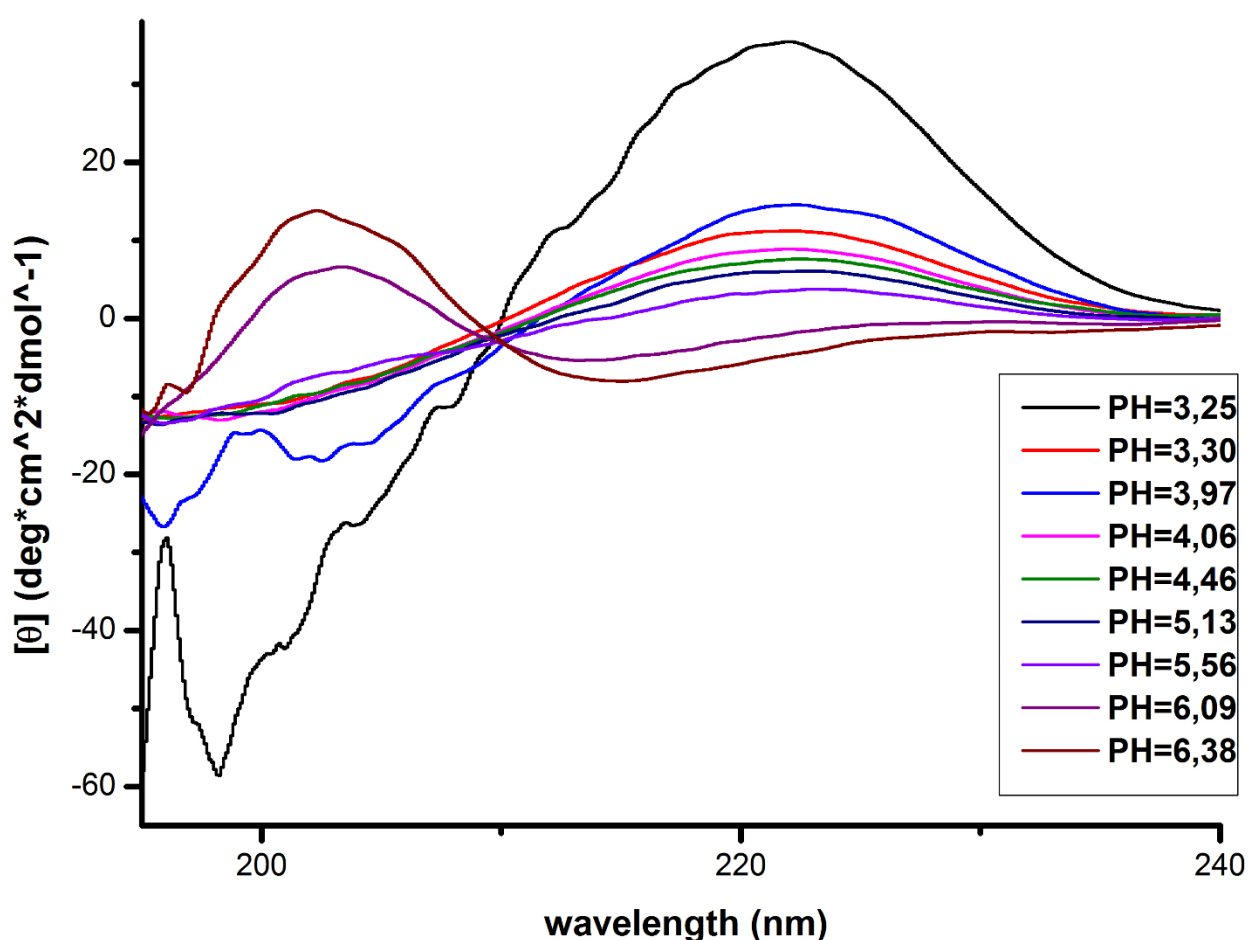
**Εικόνα 47: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε τιμές pH 5,56 6,09 και 6,38**

Από τα φάσματα που ελήφθησαν βλέπουμε πως οι ιδιότητες της δευτεροταγούς δομής αυτού του πολυμερούς είναι πολύπλοκες. Σίγουρα δεν υπάρχει μετάβαση από μια διαμόρφωση σε άλλη σε ένα μόνο βήμα με την μεταβολή του pH. Παρατηρούμε λοιπόν την ύπαρξη τριών κυρίως διαμορφώσεων :

- i. Μια διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος σε τιμή pH κάτω του 4. Τα φάσματα σε αυτές τις τιμές pH είναι συγκρίσιμα με πρότυπα μοντέλα που έχουν αυτήν την διαμόρφωση<sup>68,69</sup>. Όσο αυξάνεται το pH απομακρύνεται το πολυμερές από την διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος. Δίνεται και το φάσμα στην τιμή 4,06 για να φανεί η διαφορά.
- ii. Μια ενδιάμεση δομή στο εύρος τιμών pH 4 με 5,6. Η μορφή του δεν είναι τόσο ξεκάθαρη, ωστόσο φαίνεται να υπάρχει μια ενδιάμεση διαμόρφωση ανάμεσα σε τυχαίο σπείραμα και β-φύλλο, με κάποια χαρακτηριστικά α-έλικας. Υπάρχουν οι κορυφές πριν τα 200 nm που δικαιολογούν α-έλικα, λείπουν όμως αυτές στα 210 nm και 220 nm που θα δικαιολογούσαν την δομή αυτή πλήρως<sup>69</sup>.

- iii. Μια διαμόρφωση β-φύλλου σε pH πάνω από 5,6. Τα φάσματα σε αυτές τις τιμές σχετίζονται με πρότυπα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού για διαμόρφωση β-φύλλου<sup>70</sup>. Μάλιστα όσο αυξάνεται το pH το πολυμερές υιοθετεί πλήρως αυτήν την διαμόρφωση. Δίνεται και το φάσμα στην τιμή 5,56 για να φανεί η διαφορά.

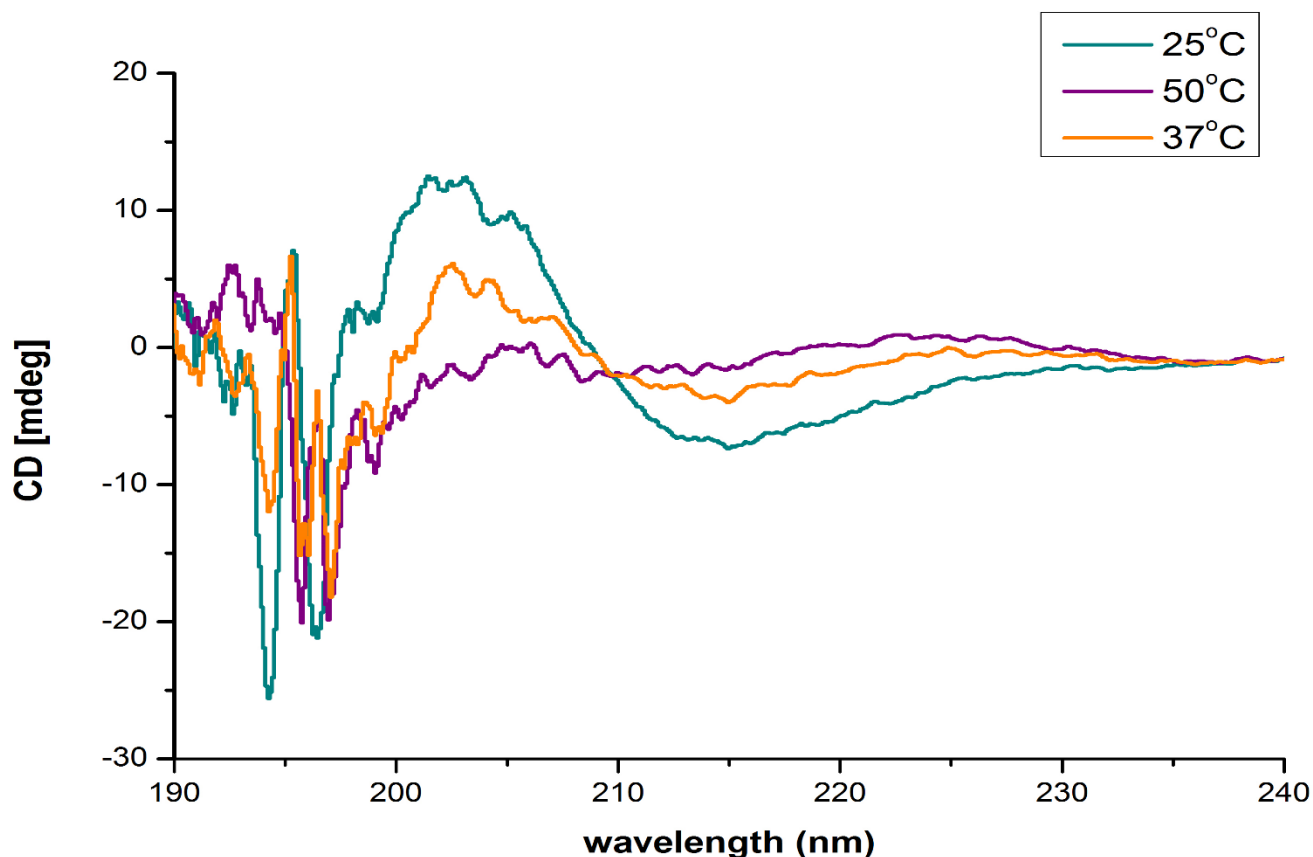
Σε μεγαλύτερες τιμές pH δεν στάθηκε δυνατόν να γίνει λήψη φασμάτων καθότι το διάλυμα της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl θόλωνε πολύ. Στο ακόλουθο διάγραμμα έχουμε συγκεντρωτικά όλες τις μετρήσεις του κυκλικού διχρωϊσμού.



Εικόνα 48: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε όλες τις τιμές pH

Στην συνέχεια έγινε λήψη τριών φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε pH σταθερό σε 6,38 και σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, ώστε να εξεταστεί αν το πολυμερές αλλάζει την δευτεροταγή του δομή με αύξηση της θερμοκρασίας διατηρώντας όλα τα άλλα χαρακτηριστικά του σταθερά, μεταξύ αυτών και του pH. Με την χρήση ειδικής ψηφιακής συσκευής θερμοστάτησης ρυθμίστηκε η θερμοκρασία σε τρεις διαφορετικές τιμές : 25°C

37°C και 50°C όπου και έγινε λήψη των φασμάτων σε κάθε μια από αυτές ξεχωριστά.



**Εικόνα 49:** Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl σε pH 6,38 και σε θερμοκρασίες 25°C 37°C και 50°C

Παρατηρούμε ότι στους 25°C το πολυμερές έχει διαμόρφωση β-φύλλου, την οποία και διατηρεί στους 37°C ενώ στους 50°C απομακρύνεται από αυτήν την διαμόρφωση. Καταλήγουμε λοιπόν ότι με αύξηση της θερμοκρασίας και διατηρώντας σταθερούς όλους τους άλλους παράγοντες η διαμόρφωση της πολυ-L-ιστιδίνης·HCl αλλάζει μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αλλά και στην θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος το πολυμερές διατηρεί την διαμόρφωση του β-φύλλου.



#### 4.6 Συμπεράσματα – Μελλοντικοί Στόχοι

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση πρότυπων συμπολυμερών με βάση την ιστιδίνη που θα χρησιμοποιηθούν στην τεχνολογία μεταφοράς φαρμάκων. Πρώτος στόχος ήταν η σύνθεση του κατάλληλου μονομερούς της ιστιδίνης με χρήση της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας η οποία και δίνει ιδιαίτερα πλεονεκτήματα. Η σύνθεση του NCA της ιστιδίνης και ο πολυμερισμός αυτής αναφέρεται με βάση την έως τώρα γνώση μας πρώτη φορά στην βιβλιογραφία. Ακολούθως έγινε σύνθεση ομοπολυμερούς της πολύ-L-ιστιδίνης καθώς και δισυσταδικών συμπολυμερών με μεθοξυπολυαιθυλενοξειδίο και πολύ[γ-βένζυλο]-L-γλουταμικό με διαφορετικές αναλογίες του τελευταίου κατά μοί ως προς την πολυ-L-ιστιδίνη. Η σύνθεση όλων των πολυμερών επιβεβαιώθηκε με χρήση μεθόδων μοριακού χαρακτηρισμού IR, NMR και GPC.

Στην συνέχεια επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός διαφόρων δομών αυτοοργάνωσης σε διαλύτη νερό. Οι δομές που επιτεύχθηκαν ήταν κυρίως μικκύλια και κυστίδια, δομές που χρησιμοποιούνται στην μεταφορά φαρμάκων. Επίσης βρέθηκε κοντά στο 6,7 το  $pK_a$  της πολύ-L-ιστιδίνης με φασματοφωτομετρικές τιτλοδοτήσεις. Στην συνέχεια έλαβαν χώρα τιτλοδοτήσεις των συμπολυμερών για να βρεθεί πως αλλά και πόσο επηρεάζει η αύξηση του ποσοστού του PBLG την ισχύ οξύτητας των συμπολυμερών. Βρέθηκε ότι με αύξηση του ποσοστού του PBLG μειώνεται το  $pK_a$  των συμπολυμερών. Έγινε μελέτη της μεταβολής της δευτεροταγούς δομής της πολύ-L-ιστιδίνης σε διαφορετικά pH και θερμοκρασίες με την χρήση του κυκλικού διχρωϊσμού, όπου και βρέθηκαν οι δομές που υιοθετεί το πολυμερές στην μεταβολή αυτών των συνθηκών.

Μελλοντικοί στόχοι αφορούν τον εγκλωβισμό αντικαρκινικών υδρόφοβων και υδρόφιλων φαρμάκων στα πολυμερή αυτά και μελέτη της ελεγχόμενης αποδέσμευσης τους σε πειραματόζωα. Επίσης η σύνθεση τρισυσταδικών συμπολυμερών με βάση την ιστιδίνη που σχηματίζουν κυστίδια. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύνθεση πολυμερών με βάση την ιστιδίνη που θα σχηματίζουν υδροζελ και θα έχουν ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα στην αποδέσμευση του φαρμάκου.



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Deoxyribonucleic acid	δε(σ)οξυριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ
Ring opening Polymerization	Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου
Click Chemistry	Αντίδραση κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκυνίου
Targeted (Smart) Drug Delivery	Τεχνολογία Στοχευμένης (έξυπνης) μεταφοράς φαρμάκων
Gel Permeation Chromatography	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών
Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
Glove box	Χώρος αποθήκευσης χημικού και βιολογικού υλικού σε αδρανή ατμόσφαιρα όπου οι χειρισμοί γίνονται με την βοήθεια γαντιών προσαρμοσμένων σε υάλινο διάφραγμα
Flame Drying	Ξήρανση συσκευής στη γραμμή κενού για απομάκρυνση υγρασίας με χρήση φλόγας από πυρσό
Brake seal	Υάλινος υμένας αμπούλας
Breaker	Μαγνήτης πακτωμένος μέσα σε κλειστή υάλινη ράβδο για σπάσιμο break seal
Drug Delivery	Τεχνολογία Μεταφοράς Φαρμάκων

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

### Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
EtAc	Οξικός Μεθυλεστέρας
DCC	Δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
THF	Τετραϋδροφουράνιο
S <sub>N</sub> 2	Substitution, Nucleophilic, Bimolecular
NCA	N-καρβοξυανυδρίτες α-αμινοξέων
BTC	Τριφωσγένιο
R.O.P	Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου
bipy	2,2`-διπυριδίνη
COD	1,5-κυκλοοκταδιένιο
HDMS	Εξαμεθυλοδισυλαζάνιο
TMS	Τριμεθυλοπυριτική αμίνη
Βένζυλο	Προστατευτική ομάδα του βενζυλεστέρα
DNP	2,4-δινιτροφθοροβένζυλο προστατευτική ομάδα
NHS	N-ύδροξυ ηλεκτριμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
ATRP	Ριζικός Πολυμερισμός Μεταφοράς Ατόμου
RAFT	Πολυμερισμός ελευθέρων ριζών αντίστροφης προσθήκης –διάσπασης μέσω μεταφοράς αλυσίδας
GPC	Gel Permeation Chromatography
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
IR	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία
DLS	Dynamic Light Scattering
Trt	Τρίτυλο Προστατευτική Ομάδα
TFA	Τριφθοροξικό οξύ

m-PEO	Μέθοξυ-Πολυαιθυλενοξειδίο
PBLG	Πολύ(γ-βένζυλο-L-γλουταμικό)
L-His	L-Ιστιδίνη
UV	Υπεριώδης ακτινοβολία

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

## ΟΡΓΑΝΑ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

### **Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών(SEC)**

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας όργανο αποτελούμενο από αντλία της Waters μοντέλο 510 και ανιχνευτές διαφορικού διαθλασιμέτρου της Waters μοντέλο 401 και διοδική διάταξη UV-Vis. Η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στο 1 mL/min και ως φέροντες διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν i) διάλυμα DMF με LiBr με περιεκτικότητα 0,1% κ.β. ii) νερό.

### **Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός(NMR)**

Οι μετρήσεις της φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$  έγιναν σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Varian Unity Plus 300/54.

### **Δυναμική σκέδαση φωτός(DLS)**

Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός, πραγματοποιήθηκαν με κατάλληλη διάταξη (Series 4700 Malvern) που αποτελείται από γωνιόμετρο τύπου PCS5101 με ρυθμιστή βήματος τύπου PCS7, laser μεταβλητής ισχύος Ar<sup>+</sup> (Cyonics) που λειτουργεί στα 488 nm, αντλία φιλτραρίσματος νερού RR98 και μονάδα ελέγχου θερμοκρασίας τύπου PCS8. Για την προσαρμογή των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε συσχετιστής με 192 κανάλια μνήμης, ενώ οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης αναλύθηκαν με την τεχνική κανονικοποίησης (regularization method), με χρήση του προγράμματος CONTIN.

### **Φασματοσκοπία υπερύθρου(IR)**

Οι μετρήσεις έγιναν σε μηχανήμα Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR, με την τεχνική διαπερατότητας μέσω διασποράς σε KBr. Τα δισκία προήλθαν κατά την κονιορτοποίηση 0.2g KBr με 1mg της προς εξέταση ουσίας, με εφαρμογή πίεσης μερικών τόνων ανα cm<sup>2</sup>.

### **Κυκλικός Διχρωϊσμός**

Χρησιμοποιήθηκε μοντέλο JASCO J-815. Το φασματοφωτόμετρο του κυκλικού διχρωϊσμού πρέπει να καθαρίζεται με άζωτο υψηλής καθαρότητας, ελεύθερο οξυγόνου, με παροχή 10-15 l /min επί δεκαπέντε λεπτά τουλάχιστον πριν ανάψουμε την πηγή φωτός καθώς και κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες με οπτική διαδρομή 0,1 cm.

### **Φασματοσκοπία Μοριακής Απορρόφησης στο Ορατό**

Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV-VIS μοντέλο PERKIN-ELMER LAMBDA 650 και κυψελίδες με οπτική διαδρομή 0,1 cm.

**H<sub>2</sub>O**: Από συσκευή Milli-Qplus 185 με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,20 μm.

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. L. Stryer, J.M. Berg, and J.L. Tymoczko, Βιοχημεία, *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, Τόμος Ι, 3<sup>η</sup> έκδοση, 2006.
2. N. L. Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis, *CRC Press Taylor & Francis Group*, 2006
3. Ε.Κ Βουδούρη, Μ.Γ. Κοντομηνά, Εισαγωγή στη Χημεία των Τροφίμων, *ΟΕΔΒ*, 2008
4. J. McMurry, Οργανική Χημεία, *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, Τόμος Ι Ι, 5<sup>η</sup> έκδοση, 2006.
5. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, J. Roberts, J. Watson, Molecular Biology of the Cell, *Garland Publishing*, 5<sup>η</sup> έκδοση, 1989, pp. 87-134 & 820-830.
6. P.Y. Chou, G.D. Fasman, *Conformational Parameters for Amino Acids in Helical, beta-Sheet and Random Coil regions calculated from Proteins*, Biochemistry, 1974, pp 211–222.
7. Μ. Λιακοπούλου-Κυριακίδου, Βιοργανική Χημεία, *Εκδόσεις ΖΗΤΗ*, 2004.
8. R. Merrifield, *Science*, 150, 178, 1965
9. R. Merrifield, J. Stewart, *Nature*, 207, 522, 1966
10. R. B. Merrifield, *Biopolymer Synthesis on Solid Support*, Pure and Appl. Chem., 1978, Vol. 50, pp 643-653
11. S. Cohen, A. Chang, H. Boyer, R. Helling, *Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids in Vitro*, Proc. Nat. Sci. USA, 1973, 70, pp 3240-3244
12. D. A. Tirrell, M. Fournier, T. Mason, *Genetic Engineering of Polymeric Materials*, MRS Bull., 1991, 16 , pp 23-28
13. H. Leuchs, W. Geiger, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1908, 41, 1721



14. H. Leuchs, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1906, 39, 857
15. M. Bergmann, L. Zervas, W. Ross, *J. Biol. Chemistry*, 1935, 111 245
16. F. Fuchs, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1922, 55, 2943
17. A. C. Farthing, *J. Chem. Soc.*, 1950, 3213
18. L.Y. Galaev, B. Mattiasson, *Trends Biotechnol*, 2000, 17, 335
19. S. Sharma, P. Kaur, A. Jain, MR Rajeswari, Mn. Gupta, *A smart bioconjugates of chymotrysin*, *Biomacromolecules*, 2003, 4, 330
20. E. Peggion, M. Goodman, *Pure & Appl. Chem.*, 1981, 53, 699
21. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, *Synthesis of Well-Defined Polypeptide-Based Materials via the Ring-Opening Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides*, *Chem. Rev.*, 2009, 109, 5528-5578
22. N. Idelson, E.R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 2387
23. J. L. Bailey, *A New Peptide Synthesis*, *Nature*, 1949, 164, 889-899
24. T. J. Deming, *Polypeptide and Polypeptide Hybrid Copolymer Synthesis via NCA Polymerization*, *Adv. Polymer Sci*, 2006, 202, 1-18
25. I. Dimitrov, H. Schlaad, *Synthesis of Nearly Monodisperse Polystyrene-Polypeptide Block Copolymers via Polymerization of N-Carboxyanhydrides*, *Chem. Commun.*, 2003, 23, 2944-2945
26. H. Lu, J. Cheng, *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
27. T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, *Living Polypeptides*, *Biomacromolecules*, 2004, 5, 1653-1656
28. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2000, 38, 3211

29. H. Kricheldorf, C. Von Lossow, G. Schwarz, *Macromol. Chem. phys.*, 2005, 206, 282
30. C. Chiehming, C. J. Chiu-Yang, *J. Chem. Eng. Data*, 1995, 40, 850
31. E. Hampe, D. Rudkevich, *Tetrahedron*, 2003, 59, 9619
32. T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, *Well-defined Linear Multiblock and Branched Polypeptides by Linking Chemistry*, *J. Polym. Sci.*, 2005, Part A, 43, 4670-4673
33. A. Karatzas, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, K. Inoue, K. Sugiyama, A. Hirao, *Complex Macromolecular Chimeras*, *Biomacromolecules*, 2008, 9, 2072-2080
34. N. Χατζηχριστίδης, Ε. Ιατρού, Μ. Πιπσικάλης, Σημειώσεις του Μαθήματος “Βιομηχανική Χημεία – Πολυμερή”, *ΕΚΠΑ*, 2008
35. A. Patchornik, A. Berger, E. Katchalski, *Poly-L-Histidine*, *JACS*, 1957
36. E. S. Lee, H. J. Shin, K. Na, Y. H. Bae, *Poly(L-histidine)-PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization*, *Journal of Controlled Release*, 2003, 90, 363–374
37. G. M. Kim, Y. H. Bae, W. H. Jo, *pH-induced Micelle Formation of Poly(histidine-co-phenylalanine)-block-Poly(ethylene glycol) in Aqueous Media*, *Macromolecular Bioscience*, 2005, 5, 1118-1124
38. E. S. Lee, K. T. Oh, D. Kim, Y. S. Youn, Y. H. Bae, *Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(L-lactic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(L-histidine)*, *Journal of Controlled Release* 2007, 123, 19–26
39. N. H. Shin, J. K. Lee, H. Li, C. S. Ha, Y. A. Shchipunov, I. Kim, *Synthesis of Poly(methyl methacrylate)-Block-Poly(L-histidine) and Its Use as a Hybrid Silver Nanoparticle Conjugate*, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2010**, Vol.10, 1–6
40. H. Yin, H. C. Kang, K. M. Huh, Y. H. Bae, *Biocompatible, pH-sensitive AB2 miktoarm polymer-based polymersomes: preparation, characterization, and acidic pH-activated nanostructural transformation*, *J. Mater. Chem.*, 2012, 22, 19168

41. W. Park, D. Kim, H. C. Kang, Y. H. Bae, K. Na, *Multi-arm histidine copolymer for controlled release of insulin from poly(lactide-co-glycolide) microsphere*, *Biomaterials*, 2012, 33, 8848-8857
42. R. P. Johnson, Y. Il Jeong, J. V. John, C. W. Chung, D. H. Kang, M. Selvaraj, H. Suh, Il Kim, *Dual Stimuli-Responsive Poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(L-histidine) Chimeric Materials for the Controlled Delivery of Doxorubicin into Liver Carcinoma*, *Biomacromolecules* 2013
43. L. Qiu, Z. Li, M. Qiao, M. Long, M. Wang, X. Zhang, C. Tian, D. Chen, *Self-assembled pH-Responsive Hyaluronic Acid-g-poly(L-histidine) Copolymer Micelles for Targeted Intracellular Delivery of Doxorubicin*, *Acta Biomaterialia*, 2013
44. R. Muller, C. Keck, C, *Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles*, *Journal of Biotechnology* , 2004, **113**, 151–170
45. O. Onaca, R. Enea, D. W. Hughes, W. Meier, *Stimuli-Responsive Polymersomes as Nanocarriers for Drug and Gene Delivery*, *Macromolecular Bioscience*, 2009, 9, 129–139
46. S. Y. Wonga, J. M. Peletb, D. Putnam, *Polymer systems for gene delivery—Past, present, and future*, *Progress in Polymer Science*, 2007, 32, 799–837
47. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, *Anionic Polymerization: High Vacuum Techniques*, *J. Polym. Sci. Part A*, 2000, 38, 3211-3224
48. M. Fridkin, S. Shaltiel, *A New Route to Polyamino Acids Containing Histidine*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1971, 147, 767-771
49. S. Terada, A. Kawabata, N. Mitsuyasu, H. Aoyagi, N. Izumiya, *Racemization during the Synthesis of Histidine-Containing Peptides*, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1978, 51, 3409-3410

50. P. Sieber, B. Riniker, *Protection of Histidine in Peptide Synthesis: A Reassessment of the Trityl Group*, Tetrahedron Letters, 1987, Vol.28, No.48, pp 6031-6034
51. S. J. Harding, J. H. Jones, A. N. Sabirov, V. V. Samukov, *im-Trityl Protection of Histidine*, Journal of Peptide Science, 1999, 5, 368–373
52. Y. F. Zhu, R. K. Blair, W. D. Fuller, *Esterification Of 4-Alkoxybenzyl Alcohol Resin With FMOC-Histidine (Nim-Trityll-N-Carboxyanhydride*, Tetrahedron Letters, 1999, Vol. 35, No. 27, pp. 4673-4676
53. S. Eleftheriou, D. Gatos, A. Panagopoulos, S. Stathopoulos, K. Barlos, *Attachment of Histidine, Histamine and Urocanic acid to Resins of the Trityl-Type*, Tetrahedron Letters, 1999, 40, 2825-2828
54. H. G. Barth, J. W. Mays , *Modern Methods of Polymer Characterization*, J. Willey & Sons ed., 1991
55. E. Barton, Dahneke (ed), *Measurement of suspended particles by Quasi-Elastic Light Scattering*, Interscience, New York 1983.
56. M. L. Martin M, J. J. Delpuech, G. J. Martin, *Practical NMR Spectroscopy*, Heyden & Son ed., 1980
57. P. M. Bayley, *The analysis of circular dichroism of biomolecules*, Prog. Biophys. Mol. Biol., 27, 1-76
58. S. Brahms, J. Brahms, G. Spach, A. Brack, *Identification of B, B-turns and unordered conformations in polypeptide chains by vacuum ultraviolet circular dichroism*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1977, 74, 3208-3212.
59. N. J. Greenfield, G. D. Fasman, G. D., *Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation*, Biochemistry, 1969, 8, 4108-4116
60. B. Jirgensons, *Optical Activity of Proteins and Other Macromolecules*, 2<sup>η</sup> έκδοση, Springer-Verlag, Berlin, 1973
61. A. J. Adler, N. J. Greenfield, G. D. Fasman, *Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides*, Methods Enzymol., 1973, 27, 675-735

62. W. B. Gratzer, *Circular Dichroism of Polypeptides*, Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and physical Sciences, 1967
63. J. C. Moore, *Gel Permeation Chromatography, I. A New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers*, *J. Polym. Sci.*, 1964, A2, 835
64. J. C. Moore, J. G. Hendrickson, *Gel permeation chromatography, II, The nature of the separation*, *J. Polym. Sci.*, 1965, C8, 233
65. Ν. Χατζηχριστίδης, Κ. Βύρας, Ε. Ιατρού, Σ. Πίσπας, Μ. Πιτσικάλης, Π. Πίσσης, *Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών*, Αθήνα, 1998
66. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Κωσταράκη Εκδόσεις*, 2007
67. B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, *Wiley*, 2004
68. Y. P. Myer, *The pH-Induced Helix-Coil Transition of Poly-L-lysine and Poly-L-glutamic Acid and the 238-m $\mu$  Dichroic Band*, *Macromolecules*, 1969, 2 (6), pp 624–628
69. Y. P. Myer, E. A. Barnard, *Structure-Reactivity Relations of Imidazole in Polypeptides II. Structural Transitions and a  $\beta$ -Structure in Poly-L-Histidine Solutions*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1971, 148, 116-122
70. B. Davidson, G. D. Fasman, *The Conformational Transitions of Uncharged Poly-L-lysine.  $\alpha$  Helix-Random Coil- $\beta$  Structure*, *Biochemistry*, 1967, 6 (6), pp 1616–1629