



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση δισυσταδικών τριπολυμερών
πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*-πολυ(L-ιστιδίνη-co-L-αλανίνη) και
μελέτη της επίδρασης της L-αλανίνης στη συσσωμάτωση και
την δευτεροταγή δομή.**

**ΔΗΜΗΤΡΑ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΪΟΣ 2017

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση δισυσταδικών τριπολυμερών πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*-πολυ(L-ιστιδίνη-co-L-αλανίνη) και μελέτη της επίδρασης της L-αλανίνης στη συσσωμάτωση και την δευτεροταγή δομή.

ΔΗΜΗΤΡΑ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΚΗ

A.M.: 151010

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 26/05/2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση μίας σειράς υβριδικών πολυπεπτιδικών συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) με διαφορετικά ποσοστά κατά mol 10%, 20%, 40% Ala/His, καθώς και του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PAla. Η σύνθεση των πολυμερών πραγματοποιήθηκε μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των αντίστοιχων προστατευμένων N-καρβοξυ ανυδριτών (μονομερή), με χρήση αμινο-τελικού πολυ(αιθυλενοξειδίου) (m-PEO-NH₂) ως μακροαπαρχητή. Για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων, τον καθαρισμό των διαλυτών, αλλά και για τη λήψη καλά καθορισμένων πολυμερών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού, εξασφαλίζοντας υψηλή καθαρότητα στο σύστημα. Η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC), του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR) και της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR). Επιπλέον μελετήθηκε η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων από το pH και τη θερμοκρασία με την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού (CD). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της δυναμικής (DLS) και της στατικής (SLS) σκέδασης φωτός, προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα αυτοοργάνωσης και το μέγεθος των συντιθέμενων πολυπεπτιδίων. Τα αμφίφιλα συμπολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) έχουν την ικανότητα να αυτοοργανώνονται σε υδατικά διαλύματα και να σχηματίζουν μικκυλιακές δομές σε νανοκλίμακα. Το εξωτερικό υδρόφιλο κέλυφος των νανοδομών αποτελείται από τις αλυσίδες του PEO, ενώ ο pH-αποκρινόμενος πυρήνας αποτελείται από την PHis και την PAla. Η PAla χρησιμοποιήθηκε ως υδρόφοβο συστατικό. Απώτερος στόχος είναι η δημιουργία εν δυνάμει καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, που θα χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές στοχευμένης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης στα καρκινικά κύτταρα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: πολυπεπτίδια, πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου, N-καρβοξυ ανυδρίτες, δευτεροταγής δομή, μεταφορά φαρμάκων

ABSTRACT

In the present research project is presented the synthesis of a series of hybrid polypeptide copolymers of the type PEO-*b*-P(His-co-Ala) with different rates 10%, 20%, 40% Ala/His, as well as the synthesis of the diblock copolymer PEO-*b*-PAla. The synthesis of polymers was achieved through ring-opening polymerization (ROP) process of the corresponding protected N-carboxy anhydrides (monomers), using an amine end-functionalized poly(ethylene oxide) (m-PEO-NH₂) macroinitiator. High-vacuum techniques were used for the synthesis of N-carboxy anhydrides of α -amino acids, for the purification of solvents and for the isolation of well-defined polymers as well, ensuring the high purity of the system. The successful synthesis of the polymers was confirmed by size exclusion chromatography (SEC), proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) and infrared spectroscopy (FT-IR). In addition, the relation between the secondary structure of the polypeptides and the pH and temperature was studied, using the technique of circular dichroism (CD). Finally, dynamic light scattering (DLS) and static light scattering (SLS) were used, in order to investigate the ability of the polypeptides to self-assemble into micelles, as well as their size. These amphiphilic copolymers of the PEO-*b*-P(His-co-Ala) type possess the ability to self-assemble in aqueous media and form micelle-like nanostructures. The outer hydrophilic corona of the nanostructures was comprised of poly(ethylene oxide) chains, while the pH-responsive core was based on PHis and PAla. PAla was used as a hydrophobic component. The ultimate goal is to create novel hybrid drug delivery systems, which will be used for targeted and controlled drug release applications to cancer cells.

SUBJECT AREA: Polymers

KEYWORDS: polypeptides, ring-opening polymerization, N-carboxy anhydrides, secondary structure, drug delivery

**Στους γονείς μου, την αδερφή μου και τον Κώστα, που είναι δίπλα μου κάθε
στιγμή της ζωής μου...**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την διπλωματική μου εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα εκείνα τα πρόσωπα, που με την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση που έδειξαν, με βοήθησαν να εκπονήσω την εργασία αυτή.

Αρχικά, για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ερμόλαο Ιατρού για τη συνεργασία, την καθοδήγηση, την επιστημονική και ηθική υποστήριξη και εν γένει την πολύτιμη συμβολή του, στην ολοκλήρωση της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Μαρίνο Πιτσικάλη και κ. Γεώργιο Σακελλαρίου, για τις άρτιες και υψηλού επιπέδου γνώσεις που μας μετέδωσαν στα πλαίσια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης, καθώς και για την στήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ, μέσα από την καρδιά μου, σε όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες για την άριστη συνεργασία τους και βοήθεια τους όλο το χρονικό διάστημα εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ, ξεχωριστά, τις φίλες μου, κα. Δήμητρα Φωτοπούλου και κα. Ιωάννα Αντζουλάτου, για την συναισθηματική υποστήριξη, όλο αυτό το διάστημα. Ιδιαίτερως θέλω ολόψυχα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Σκαρλάτο για την συμπαράσταση και την αγάπη του, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά του στην τελειοποίηση αυτής της εργασίας.

Τέλος και πάνω από όλα, θέλω να ευχαριστήσω και να αφιερώσω την εργασία αυτή στους γονείς μου και την αδελφή μου, οι οποίοι όλα αυτά τα χρόνια μου παρέχουν τόσο ηθική και συναισθηματική στήριξη, όσο και υλική, και με βοηθούν να πραγματοποιώ κάθε όνειρο και στόχο μου. Κυρίως όμως, τους ευχαριστώ για την αγάπη που μου έδωσαν και που με έμαθαν να την ανταποδίδω σε καθετί με το οποίο καταπιάνομαι.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	21
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	22
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
2.1 Γενικά για τις πρωτεΐνες και τα αμινοξέα.....	23
2.1.1 Ο πεπτιδικός δεσμός	25
2.1.2 Τα επίπεδα οργάνωσης των πρωτεϊνών	26
2.2 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους και με καθορισμένη αλληλουχία 31	
2.3 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους	32
2.4 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP).....	33
2.4.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α- αμινοξέων	35
2.4.1.1 Μηχανιστικές μελέτες πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs πριν το 1997 36	
2.4.1.2 Μηχανιστικές μελέτες πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs μετά το 1997 42	
2.5 Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs)	47
2.6 Αποκρινόμενα πολυμερή.....	50
2.6.1 Φυσικώς αποκρινόμενα πολυμερή	53
2.6.2 Χημικώς αποκρινόμενα πολυμερή	54
2.6.3 Βιολογικώς αποκρινόμενα πολυμερή.....	56
2.6.4 Διπλά αποκρινόμενα πολυμερή	56
2.7 Μικκύλια – Κυστίδια	57
2.8 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με αλανίνη	58
2.9 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία	66

2.9.1	Πολυαιθυλενοξειδιο (PEO)	66
2.9.2	Πολύ(Ιστιδίνη) (PHis)	67
2.9.3	Αλανίνη	70
2.10	Μοριακός χαρακτηρισμός	71
2.10.1	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών	71
2.10.2	Φασματοσκοπία Υπερύθρου	75
2.10.3	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός	79
2.10.4	Δυναμική Σκέδαση Φωτός	83
2.10.5	Στατική Σκέδαση Φωτός	84
2.10.6	Κυκλικός Διχρωϊσμός	87
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	90
3.1	Τεχνική Υψηλού Κενού (High Vacuum Technique, HVT)	90
3.2	Καθαρισμός Διαλυτών	92
3.3	Σύνθεση και καθαρισμός N-Καρβοξυανυδριτών	95
3.3.1	Σύνθεση N ^{im} -Trt-(L)-His-NCA	96
3.3.2	Σύνθεση L-Alanine NCA	101
3.4	Σύνθεση Υβριδικών Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)- <i>b</i> -Poly(L-Histidine- <i>co</i> -L-Alanine) (m-PEO- <i>b</i> -P(His- <i>co</i> -Ala))	102
3.4.1	Σύνθεση Υβριδικών Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)- <i>b</i> -Poly(L-Histidine- <i>co</i> -L-Alanine) (m-PEO- <i>b</i> -P(His- <i>co</i> -Ala)) με 10% Ala	103
3.4.2	Σύνθεση Υβριδικών Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)- <i>b</i> -Poly(L-Histidine- <i>co</i> -L-Alanine) (m-PEO- <i>b</i> -P(His- <i>co</i> -Ala)) με 20% Ala	115
3.4.3	Σύνθεση Υβριδικών Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)- <i>b</i> -Poly(L-Histidine- <i>co</i> -L-Alanine) (m-PEO- <i>b</i> -P(His- <i>co</i> -Ala)) με 40% Ala	116

3.5	Σύνθεση του Υβριδικού Κατά Συστάδες Συμπολυμερούς Poly(Ethylene Oxide)- <i>b</i> -Poly(L-Alanine) (m-PEO- <i>b</i> -P(Ala))	117
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	120
4.1	Μελέτη των N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs) με την τεχνική της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου	120
4.2	Μελέτη των N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs) με την τεχνική του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	123
4.3	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου	124
4.4	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	127
4.5	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Χρωματογραφίας Αποκλεισμού Μεγεθών	129
4.6	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική του Κυκλικού Διχρωϊσμού	132
4.7	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.....	139
4.8	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Στατικής Σκέδασης Φωτός.....	140
4.9	Συμπεράσματα - Μελλοντικοί Στόχοι	144
5.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	146
6.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	150
7.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	155

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM).	38
Σχήμα 2: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή.	40
Σχήμα 3: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.....	40
Σχήμα 4: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.	41
Σχήμα 5: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.	44
Σχήμα 6: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνουν ισοκυανато χλωρίδιο και μετέπειτα N-χλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη.....	46
Σχήμα 7: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών.....	49
Σχήμα 8: Σχηματική αναπαράσταση των αλλαγών στη διαμόρφωση της δομής του mPEG-L-PA ως συνάρτηση α) της συγκέντρωσης του πολυμερούς στο νερό και β) της θερμοκρασίας.	59
Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση των αλλαγών στη διαμόρφωση της δομής του mPEG-L-PA ως συνάρτηση του μοριακού βάρους κάθε συστάδας.....	60
Σχήμα 10: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης).	68
Σχήμα 11: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού.....	91
Σχήμα 12: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου.	92
Σχήμα 13: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ.....	94
Σχήμα 14: Αντίδραση σύνθεσης N ^{im} -trityl-(L)-His NCA.	96
Σχήμα 15: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του Ni ^m -Trt-(L)-His NCA.	101

Σχήμα 16: Η αντίδραση σύνθεσης του N-καρβόξυ ανυδρίτη της L-αλανίνης.	102
Σχήμα 17: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης σύνθεσης των πολυμερών του τύπου PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala).....	105
Σχήμα 18: Φάσμα IR (a) της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH, (b) μετά από 2.5 ώρες αντίδρασης και (c) του τελικού προϊόντος N ^{im} -Trt-His NCA μετά τις ανακρυσταλλώσεις.	121
Σχήμα 19: Φάσμα IR της πρόδρομης ένωσης της L-Αλανίνης (μπλε γραμμή), και του τελικού προϊόντος ALA-NCA (κόκκινη γραμμή).	122
Σχήμα 20: Φάσμα ¹ H-NMR του N ^{im} -Trt-His NCA, σε CDCl ₃	123
Σχήμα 21: Φάσμα ¹ H NMR του Ala-NCA σε DMSO-d.	124
Σχήμα 22: Φάσμα IR του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 10% Ala/His (κόκκινη γραμμή), μετά την πλήρη αποπροστασία του (μπλε γραμμή).	125
Σχήμα 23: Φάσμα IR του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 20% Ala/His (κόκκινη γραμμή), μετά την πλήρη αποπροστασία του (μπλε γραμμή).	126
Σχήμα 24: Φάσμα IR του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 40% Ala/His (κόκκινη γραμμή), μετά την πλήρη αποπροστασία του (μπλε γραμμή).	126
Σχήμα 25: Φάσμα IR του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -PAla.....	127
Σχήμα 26: Φάσμα ¹ H-NMR του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 20% Ala/His, σε DMSO-d.	128
Σχήμα 27: Φάσμα ¹ H-NMR του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -PAla, σε TFA-d.	129
Σχήμα 28: Χρωματογράφημα SEC σε νερό του μακροαπαρχητή m-PEO-NH ₂ και του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 10% Ala/His.	131
Σχήμα 29: Χρωματογράφημα SEC σε νερό του μακροαπαρχητή m-PEO-NH ₂ και του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 20% Ala/His.	131

Σχήμα 30: Χρωματογράφημα SEC σε νερό του μακροαπαρχητή m-PEO-NH ₂ και του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 40% Ala/His.	132
Σχήμα 31: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 10% Ala/His, συναρτήσει του pH, στους 25 °C.	134
Σχήμα 32: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 10% Ala/His, συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε pH=7,4.....	135
Σχήμα 33: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 10% Ala/His, συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε pH=6,5.....	135
Σχήμα 34: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 10% Ala/His, συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε pH=5.....	136
Σχήμα 35: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 10% Ala/His, συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε pH=3.....	136
Σχήμα 36: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 20% Ala/His, συναρτήσει του pH, στους 25 °C.	137
Σχήμα 37: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 40% Ala/His, συναρτήσει του pH, στους 25 °C.	138

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Τα L- και D- ισομερή των α-αμινοξέων.....	24
Εικόνα 2: Ο βαθμός ιοντισμού των αμινοξέων.....	24
Εικόνα 3: Τα 20 βασικά αμινοξέα.....	25
Εικόνα 4: Η δημιουργία πεπτιδικού δεσμού.....	26
Εικόνα 5: Η α-έλικα.....	28
Εικόνα 6: Η β-πτυχωτή δομή.....	29
Εικόνα 7: Η β-στροφή.....	29
Εικόνα 8: Το τυχαίο σπείραμα.....	30
Εικόνα 9: Ταξινόμηση των αποκρινόμενων πολυμερών.....	52
Εικόνα 10: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα ("proton sponge effect").	69
Εικόνα 11: Πρότυπο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού.....	89
Εικόνα 12: Συσκευή πολυμερισμού.....	107
Εικόνα 13: Απόσταξη βενζολίου στον απαρχητή του πολυμερισμού.....	108
Εικόνα 14: Καταβύθιση του πολυμερούς και διήθηση υπό κενό με συσκευή διηθήσεως Buchner.....	111
Εικόνα 15: Αποπροστασία του πολυμερούς.....	112
Εικόνα 16: Διαδικασία διαπίδυσης (dialysis).....	114
Εικόνα 17: Διαδικασία λυοφιλοποίησης (freeze-drying).....	115
Εικόνα 18: Πειραματική διάταξη πολυμερισμού του PEO- <i>b</i> -PAIa.....	118

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1} ...	78
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (ppm).	81
Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων DLS για τα συμπολυμερή του τύπου PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala), με 10, 20,40 (%) Ala/His, σε διαφορετικά pH και θερμοκρασίες	140
Πίνακας 4: Μετρήσεις SLS για το πολυμερές PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 10% Ala/His, σε pH= 7.4, 6.5, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 41 °C.	141
Πίνακας 5: Μετρήσεις SLS για το πολυμερές PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 20% Ala/His, σε pH= 7.4, 6.5, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 41 °C.	142
Πίνακας 6: Μετρήσεις SLS για το πολυμερές PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala) με 40% Ala/His, σε pH= 7.4, 6.5, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 41 °C.	143
Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων SLS για τα συμπολυμερή του τύπου PEO- <i>b</i> -P(His-co-Ala), με 10, 20,40 (%) Ala/His, σε διαφορετικά pH και θερμοκρασίες	143
Πίνακας 8: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίες των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων	146

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας (Τομέας Επιστήμης Πολυμερών) του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ερμόλαου Ιατρού.

Αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας είναι η σύνθεση αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών πολυμερών και η μελέτη της συσσωμάτωσής τους σε υδατικά διαλύματα, καθώς επίσης και της δευτεροταγούς δομής τους, με απώτερο σκοπό να αποτελέσουν έξυπνα νανοσυστήματα για την μεταφορά και την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βιολογικά συστήματα παράγουν πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να αυτοοργανώνονται σε πολύπλοκες, αλλά εξαιρετικά διατεταγμένες δομές. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έκδηλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη συνθετικών οδών για την παρασκευή αυτών των φυσικών πολυμερών, καθώς επίσης και τη σύνθεση πολυπεπτιδικών αλληλουχιών, για εφαρμογές στην ιατρική (τεχνητός ιστός, εμφυτεύματα), και την ανάλυση (βιοαισθητήρες, ιατρική διάγνωση). Για να είναι επιτυχείς αυτές οι εφαρμογές, είναι σημαντικό τα υλικά να μπορούν να αυτοοργανώνονται σε ακριβείς δομές. Τα πολυπεπτίδια έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών συνθετικών πολυμερών, επειδή μπορούν να υιοθετήσουν σταθερές και καθορισμένες διαμορφώσεις. Ανάλογα με τους υποκαταστάτες της πλευρικής αλυσίδας των αμινοξέων, τα πολυπεπτίδια είναι σε θέση να υιοθετήσουν διάφορες δευτεροταγείς δομές (έλικες, φύλλα, στροφές), τριτοταγείς και τεταρτοταγείς διαμορφώσεις.

Έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν βρεθεί βελτιωμένες μέθοδοι χημικής σύνθεσης πολυπεπτιδίων και είναι δυνατή η παρασκευή ολοένα και περισσότερο σύνθετων αλληλουχιών, με ελεγχόμενα μοριακά χαρακτηριστικά.

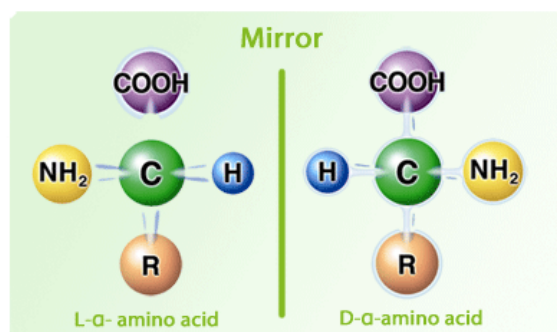
Μέχρι και σήμερα, η αποδοτικότερη, γρηγορότερη και οικονομικότερη τεχνική για την σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, περιλαμβάνει τον πολυμερισμό μέσω διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N-καρβοξυ-ανυδριτών των α -αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs). Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για τη σύνθεση των κατα συστάδες συμπολυμερών (diblock copolymers) του γενικού τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) και του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PALa, που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία, αφού πρώτα συντέθηκαν εργαστηριακά οι αντίστοιχοι NCAs. Σε δεύτερο στάδιο τα συντιθέμενα πολυμερή μελετήθηκαν με τεχνικές μοριακού χαρακτηρισμού, ως προς την ικανότητα απόκρισής τους σε μεταβολές του pH και της θερμοκρασίας, και ως προς την αυτοοργάνωσή τους. [1]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

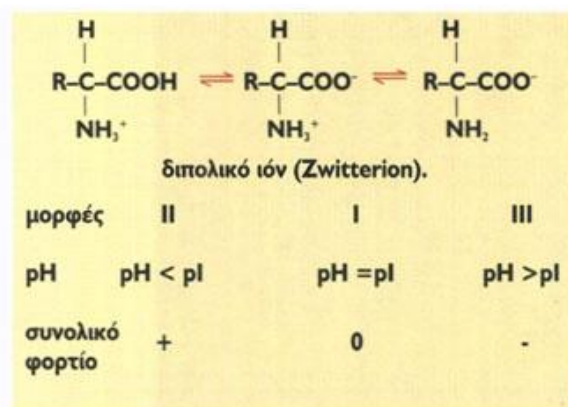
2.1 Γενικά για τις πρωτεΐνες και τα αμινοξέα

Οι πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των βιομορίων μαζί με τα νουκλεϊκά οξέα, τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια. Είναι πολυλειτουργικά μακρομόρια που βρίσκονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και έχουν πολύ σημαντικό ρόλο σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες. Ανάλογα με το είδος τους, οι πρωτεΐνες μπορούν να ελέγχουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση, να προκαλούν κίνηση, να διαβιβάζουν νευρικές ώσεις, να προσφέρουν μηχανική στήριξη και ανοσοπροστασία, να δρουν καταλυτικά και ακόμα μπορούν να μεταφέρουν και να αποθηκεύουν άλλα μόρια, όπως το οξυγόνο. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες μπορούν να θεωρηθούν πληροφοριακά μακρομόρια του κυττάρου, με την έννοια ότι η πληροφορία για τη μοναδική στερεοδομή της κάθε πρωτεΐνης βρίσκεται στην αλληλουχία των δομικών της μονάδων. Οι δομικοί λίθοι των πρωτεϊνών είναι τα αμινοξέα. Στη φύση υπάρχουν 20 διαφορετικά αμινοξέα, που όλα αποτελούνται από μια βασική αμινομάδα, μια όξινη καρβοξυλομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μια χαρακτηριστική ομάδα R, η οποία ονομάζεται και πλευρική αλυσίδα. Οι τέσσερις διαφορετικές ομάδες βρίσκονται συνδεδεμένες σε ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, που λέγεται α-άνθρακας, από όπου προκύπτει και το όνομα α-αμινοξέα. Με εξαίρεση το αμινοξύ γλυκίνη, στο οποίο η ομάδα R είναι το υδρογόνο, τα υπόλοιπα α-αμινοξέα είναι χειρόμορφα (chiral) καθώς ο α-άνθρακας είναι στερεογονικό κέντρο. Οι δύο εναντιομερείς μορφές είναι το L-ισομερές και D-ισομερές, όμως στη φύση χρησιμοποιούνται μόνο τα L-αμινοξέα στη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Επίσης, για όλα σχεδόν τα αμινοξέα το L-ισομερές έχει διαμόρφωση S και όχι R. (Εικόνα 1)



Εικόνα 1: Τα L- και D- ισομερή των α-αμινοξέων.

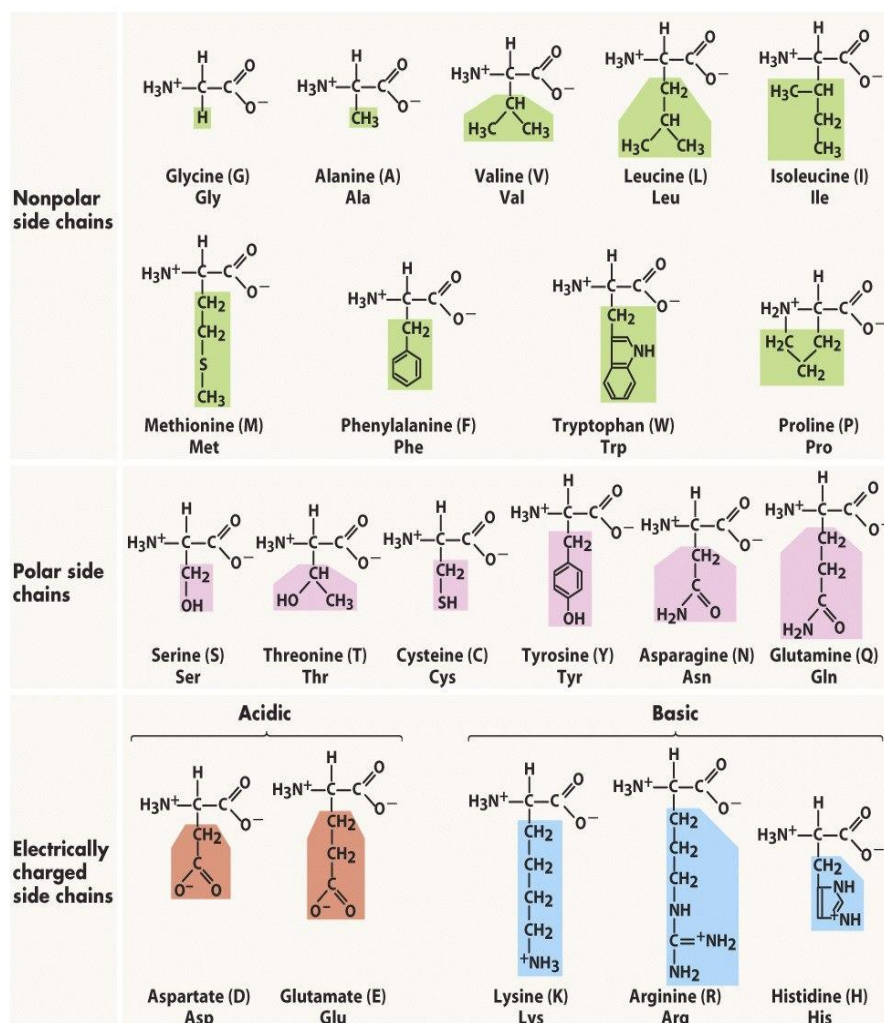
Τα αμινοξέα απαντούν με τη μορφή διπολικών ή αμφοτερικών ιόντων (zwitterions), στην οποία η αμινομάδα είναι πρωτονιωμένη ($-\text{NH}_3^+$) και η καρβοξυλομάδα είναι αποπρωτονιωμένη ($-\text{COO}^-$). Ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος διαφοροποιείται και ο βαθμός ιοντισμού ενός αμινοξέος. Έτσι, σε όξινο διάλυμα, το καρβοξυλικό ανιόν ($-\text{COO}^-$) πρωτονιώνεται και τα αμινοξέα απαντούν ως κατιόντα. Σε βασικό διάλυμα το κατιόν αμμωνίου ($-\text{NH}_4^+$) αποπρωτονιώνεται και επομένως τα αμινοξέα εμφανίζονται ως ανιόντα. Σε ενδιάμεση τιμή pH, επέρχεται ισορροπία ανάμεσα στην ανιοντική και κατιοντική μορφή και έτσι το αμινοξύ βρίσκεται στην ουδέτερη μορφή του διπολικού ιόντος. Η τιμή αυτή του pH ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο, συμβολίζεται με pI και είναι χαρακτηριστική για κάθε αμινοξύ. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Ο βαθμός ιοντισμού των αμινοξέων.

Όπως αναφέραμε ανωτέρω, οι πρωτεΐνες είναι πολυδύναμα μακρομόρια με πολλαπλούς βιολογικούς ρόλους. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στην ποικιλότητα των 20 αμινοξέων και πιο συγκεκριμένα στα 20 είδη πλευρικών ομάδων, τα οποία διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, τη δεσμευτική

συγγένεια υδρογόνου, την υδροφοβικότητα και τη χημική αντιδραστικότητα. Στην εικόνα 3 παρατίθενται τα 20 βασικά αμινοξέα και οι ονομασίες τους. [2]

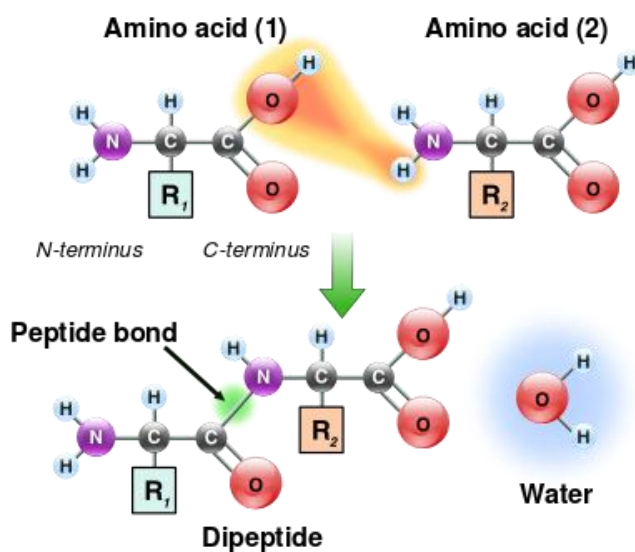


Εικόνα 3: Τα 20 βασικά αμινοξέα.

2.1.1 Ο πεπτιδικός δεσμός

Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή, τα οποία δομούνται από μονομερή αμινοξέων, ενωμένα μεταξύ τους με πεπτιδικό δεσμό. Ο πεπτιδικός δεσμός, ή αλλιώς αμιδικός δεσμός, δημιουργείται από την ένωση της αμινομάδας (NH₂) του ενός αμινοξέος με την καρβοξυλομάδα (COOH) του επόμενου αμινοξέος. Η αντίδραση καλείται συμπύκνωση και ελευθερώνεται ένα μόριο νερού (Εικόνα 4). Η συνένωση δύο αμινοξέων δημιουργεί ένα διπεπτίδιο, η συνένωση τριών αμινοξέων δημιουργεί τα τριπεπτίδια κ.ο.κ. Οι αλυσίδες με λιγότερα από 50 αμινοξέα ονομάζονται πεπτίδια, ενώ ο όρος πρωτεΐνες

χρησιμοποιείται για τις μεγαλύτερες αλυσίδες. Ο πεπτιδικός δεσμός είναι βασικά επίπεδος. Η επίπεδη φύση του δεσμού εξηγείται από το χαρακτήρα διπλού δεσμού του αμιδικού δεσμού, ο οποίος αποτρέπει την περιστροφή γύρω από τον εαυτό του περιορίζοντας τις στερεοδιατάξεις του πεπτιδικού κορμού. Η περιστροφή γύρω από το δεσμό C-N είναι εφικτή μόνο όταν προσφερθεί ενέργεια, γι' αυτό και οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι αρκετά σταθεροί κινητικά, αλλά όχι και θερμοδυναμικά. [2]



Εικόνα 4: Η δημιουργία πεπτιδικού δεσμού.

2.1.2 Τα επίπεδα οργάνωσης των πρωτεϊνών

Στις πρωτεΐνες διακρίνονται τέσσερα επίπεδα οργάνωσης, η πρωτοταγής δομή, η δευτεροταγής δομή, η τριτοταγής δομή και η τεταρτοταγής δομή. Παρακάτω αναλύεται ξεχωριστά κάθε ένα από τα επίπεδα οργάνωσης. [2]

Πρωτοταγής δομή

Το πρώτο επίπεδο οργάνωσης της δομής μια πρωτεΐνης αναφέρεται ως πρωτοταγής δομή και περιλαμβάνει την αλληλουχία και τον αριθμό των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας καθώς και τις θέσεις των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ δύο καταλοίπων κυστεΐνης, εφόσον υπάρχουν.

Δευτεροταγής δομή

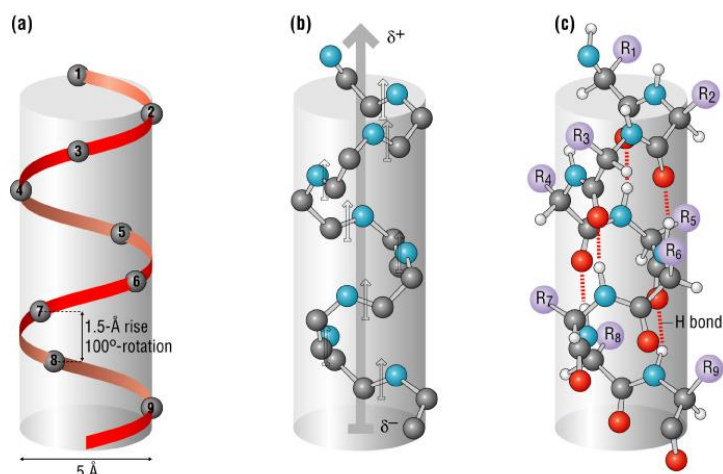
Η ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ γειτονικών αμινοξέων, ή περιοχών της ίδιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας, ή παραπλήσιων πεπτιδικών αλυσίδων

και η επακόλουθη τοπική αναδίπλωσή της, συνιστά τη δευτεροταγή δομή. Η δευτεροταγής δομή καθορίζεται τοπικά, αυτό σημαίνει ότι πολλά διαφορετικά είδη αναδιπλώσεων μπορούν να συνυπάρχουν στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα.

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

- **α-έλικα**

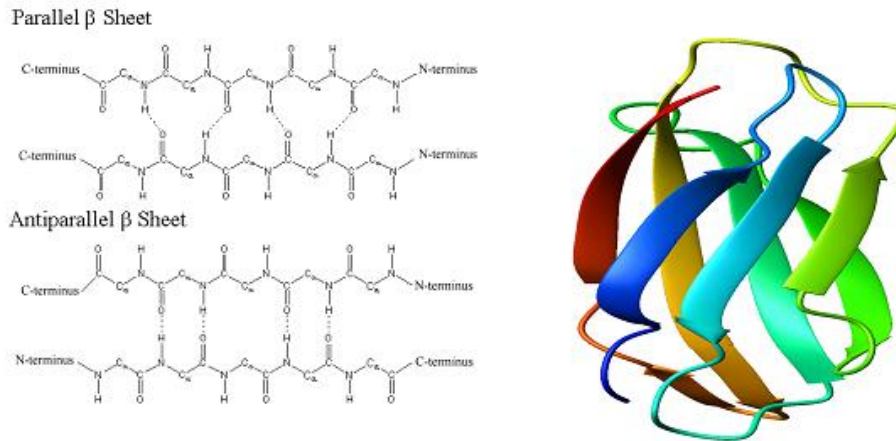
Στην α-έλικα (α-helix) ο κορμός της πολυπεπτιδικής αλυσίδας έχει σχήμα σπειράματος και οι πλευρικές ομάδες εκτείνονται προς τα έξω σε μια ελικοειδή διάταξη. Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται είναι ενδομοριακοί και σχεδόν παράλληλοι προς τον κυρίως άξονα της έλικας, σταθεροποιώντας έτσι τη δομή και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



Εικόνα 5: Η α-έλικα.

- **β-πτυχωτή δομή**

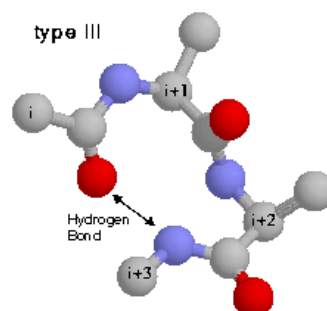
Μια β-επιφάνεια, ή β-φύλλο (β-sheet) δημιουργείται όταν δύο ή περισσότερες β-πτυχώσεις συνδεθούν με δεσμούς υδρογόνου. Οι υδρογονικοί δεσμοί αναπτύσσονται είτε ενδομοριακά, είτε μεταξύ κοντινών πολυπεπτιδικών αλυσίδων ή ομάδων τους. Η β-επιφάνεια είναι σχεδόν απόλυτα απλωμένη σε σύγκριση με το σφιχτό σπείραμα της α-έλικας. Οι διαδοχικές β-πτυχώσεις μπορεί να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλη β-επιφάνεια) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλη β-επιφάνεια). Στην αντιπαράλληλη β-επιφάνεια οι ομάδες NH και CO ενός αμινοξέος συνδέονται αντίστοιχα με δεσμούς υδρογόνου με τις ομάδες CO και NH του αμινοξέος της γειτονικής β-πτυχώσης (Εικόνα 6). Στην παράλληλη β-επιφάνεια η ομάδα NH κάθε αμινοξέος συνδέεται στο CO του αμινοξέος της γειτονικής β-πτυχώσης, ενώ η ομάδα CO συνδέεται στο NH του αμινοξέος που βρίσκεται δύο κατάλοιπα πιο κάτω στην αλυσίδα (Εικόνα 6). Οι β-επιφάνειες μπορεί να είναι καθαρά παράλληλες, αντιπαράλληλες ή και μικτές. Παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλία από τις α-έλικες και μπορεί να είναι σχετικά ευθείες, αν και οι περισσότερες εμφανίζονται με την κάθε πτύχωση ελαφρά στριμμένη. Στα σχηματικά διαγράμματα παρουσιάζονται ως φαρδιά βέλη με κατεύθυνση προς το καρβοξυ-τελικό άκρο. Η βαλίνη, η ισολευκίνη, η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη είναι μερικά από τα αμινοξέα που δημιουργούν δομή β-φύλλου.



Εικόνα 6: Η β -πτυχωτή δομή.

- **β -στροφή**

Η β -στροφή (β -turn), γνωστή και ως στροφή αναστροφής ή κάμψη φουρκέτας, είναι η διάταξη εκείνη που έχει η πρωτεΐνη, στις περιπτώσεις εκείνες όπου η πολυπεπτιδική αλυσίδα πρέπει να καμπυλωθεί για να αλλάξει κατεύθυνση. Έτσι, υπάρχουν τέσσερα αμινοξέα που διευθετούνται στο χώρο κατάλληλα, ώστε να αντιστραφεί η αρχική κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας κατά 180° . Η δομή αυτή σταθεροποιείται με μία γέφυρα υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ του πρώτου και του τέταρτου αμινοξέος (Εικόνα 7). Τα αμινοξέα γλυκίνη, ασπαραγίνη και προλίνη έχουν την τάση να βρίσκονται σε στροφές.



Εικόνα 7: Η β -στροφή.

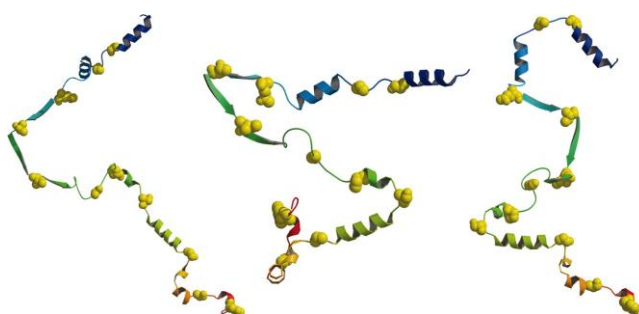
- **ω -θηλιά**

Οι ω -θηλιές (ω -loops) είναι πιο πολύπλοκες δομές, μέσω των οποίων επίσης επιτυγχάνεται αναστροφή της αλυσίδας. Οι στροφές και οι θηλιές βρίσκονται

κυρίως στην επιφάνεια των πρωτεϊνών έχουν σταθερές και απόλυτα καθορισμένες δομές, όμως δεν έχουν κανονικές περιοδικές δομές όπως οι α-έλικες και οι β-επιφάνειες.

- **Τυχαίο σπείραμα**

Στη δομή τυχαίου σπειράματος (random coil) (Εικόνα 8) η πολυπεπτιδική αλυσίδα αποκτά μία τυχαία διαμόρφωση. Απουσία συγκεκριμένων σταθεροποιητικών παραγόντων ο πρωτεϊνικός κορμός μπορεί να λάβει οποιαδήποτε πιθανή δομή, τυχαία.



Εικόνα 8: Το τυχαίο σπείραμα.

Τριτοταγής δομή

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

Τεταρτοταγής δομή

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

2.2 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους και με καθορισμένη αλληλουχία

Η σύνθεση των πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων, είναι πολύ σημαντική γιατί βρίσκει εφαρμογές σε μελέτες με φαρμακευτικό και ιατρικό ενδιαφέρον. Η σύνθεση αυτού του είδους των πεπτιδίων είναι δύσκολη, απαιτητική και δαπανηρή διαδικασία, εντούτοις λαμβάνει χώρα μέσω των ακόλουθων επικρατέστερων μεθόδων [3, 4]:

A. Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση (Μέθοδος Merrifield)

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

B. Σύνθεση σε διάλυμα

Ένα αμινοξύ προσκολλημένο σε ένα διαλυτό πολυμερές, από την καρβοξυλική του ομάδα μπορεί να ακυλιωθεί από ένα κατάλληλα προστατευμένο και ενεργοποιημένο αμινοξύ, και να αρχίσει με αυτόν τον τρόπο η σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας. Τα ενδιάμεσα πεπτίδια, καταβυθίζονται και εκπλένονται για να απομακρυνθούν όσα από τα αντιδρώντα δεν αντέδρασαν, και παραπροϊόντα. Το καθαρό προϊόν επαναδιαλύεται, αποπροστατεύεται, ακυλιώνεται ξανά σε διάλυμα κ.ο.κ. Μετά από τη σύζευξη, η πεπτιδική σύνθεση μπορεί να συνεχιστεί με απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων. Όταν χρησιμοποιούνται αμινοξέα με τρεις λειτουργικές ομάδες, θεωρείται απαραίτητη η προστασία της δραστηκής πλευρικής ομάδας. Ενώ όμως οι πλευρικές ομάδες πρέπει να παραμένουν προστατευμένες καθ' όλη την διάρκεια της σύνθεσης, η α-προστατευτική ομάδα (αμινομάδα ή καρβοξυλομάδα) πρέπει να απομακρύνεται εύκολα πριν από κάθε σύζευξη. Επομένως, απαιτούνται δύο είδη προστατευτικών ομάδων που να έχουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς τα αντιδραστήρια αποπροστασίας. Μετά το τέλος της σύνθεσης, οι προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται και λαμβάνεται το επιθυμητό πεπτίδιο, το οποίο στη συνέχεια καθαρίζεται από τα παραπροϊόντα. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μέγιστη προστασία όλων των δραστηκών ομάδων που μειώνει τις πιθανότητες πραγματοποίησης παράπλευρων αντιδράσεων, ενώ βασικά μειονεκτήματα είναι η δυσκολία απομάκρυνσης των προστασιών στο τέλος της σύνθεσης καθώς και η αυξημένη δυσδιαλυτότητα που εμφανίζουν τα μεγαλύτερα πεπτίδια.

2.3 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς τα συγκεκριμένα πολυμερή έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται και να αποκτούν δευτεροταγή δομή ανάλογη με αυτή των πρωτεϊνών που προάγει την αυτο-οργάνωσή τους, ενώ επίσης είναι βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα και συνεπώς βρίσκουν μεγάλο αριθμό εφαρμογών.

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους με καθορισμένο βαθμό πολυμερισμού, μοριακή σύσταση και άρα συγκεκριμένες ιδιότητες, που να μπορούν να μιμηθούν επαρκώς τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών, περιλαμβάνει τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N-καρβοξυ ανυδριτών (N-carboxy anhydrides, NCAs) των α-αμινοξέων. Η συμβατική μέθοδος σύνθεσης σε στερεά φάση δεν μπορεί να εφαρμοστεί στη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, εξαιτίας των πολλών σταδίων αποπροστασίας και σύζευξης που την καθιστούν εξαιρετικά δύσκολη. Ακόμα, είναι σημαντικό να μπορούν να επιτευχθούν στενές κατανομές ($I \leq 1.2$), έτσι ώστε τα πολυπεπτίδια να αυτο-οργανώνονται σε καλά καθορισμένες νανοδομές, μεταφέροντας με αυτό τον τρόπο τις επιθυμητές ιδιότητες στη μακρο-κλίμακα. [3, 5, 6, 7, 9]

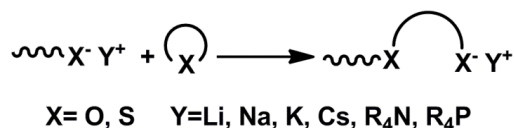
2.4 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)

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

Μερικά είδη πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου μπορούν να θεωρηθούν ως τύποι αλυσωτού πολυμερισμού, με την έννοια ότι γίνεται προσθήκη μονομερούς στο τελικό άκρο της αναπτυσσόμενης πολυμερικής αλυσίδας, όμως οι περισσότερες αντιδράσεις είναι πιο πολύπλοκες και λαμβάνουν χώρα μέσω διαφορετικών μηχανισμών όπως για παράδειγμα μέσω ενεργοποιημένου μονομερούς. Σε κάθε περίπτωση η κινητήριος δύναμη στον ROP αποτελεί η αυξημένη τάση διάνοιξης δακτυλίου (ring strain) του μονομερούς και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να την συνοδεύουν, σε αντίθεση με τα άλλα είδη πολυμερισμού στα οποία το

έναυσμα δίνεται από τη μετατροπή των πολλαπλών δεσμών σε απλούς. Συνήθως, ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου δεν συνοδεύεται από την παραγωγή μικρών μορίων με εξαίρεση τον ROP των N-καρβοξυ ανυδριτών (ή ανυδρίτες Leuchs) και τον ROP του μονομερούς 2,2-diphenyl-4-methylene-1,3-dioxolane. Όλοι οι τύποι πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου έχουν ως κοινό το γεγονός ότι τα μονομερή είναι κυκλικά μόρια, όμως ο λόγος που καθένα από αυτά μπορεί να πολυμεριστεί διαφέρει. Γενικότερα, τα μονομερή πρέπει να φέρουν μία κινητική δραστική ομάδα που να μπορεί να αντιδράσει εύκολα και επίσης η τάση διάνοιξης του δακτυλίου πρέπει να είναι μεγάλη. Δακτύλιοι που αποτελούνται από 3, 4 ή 8, 9 άτομα, έχουν μεγάλη τάση δακτυλίου και ευνοείται η διάνοιξή τους, εξαιτίας της απώλειας ενθαλπίας, η οποία συνδέεται με την απώλεια της τάσης του δακτυλίου. Οι εξαμελείς δακτύλιοι είναι θερμοδυναμικά σταθεροί και κατά γενικό κανόνα δεν πολυμερίζονται, ενώ οι πενταμελείς και επταμελείς δακτύλιοι βρίσκονται ενδιάμεσα και τις περισσότερες φορές μπορούν να πολυμεριστούν. Επιπλέον, σε δακτύλιους που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς, καρβονύλιο ή ομάδες Si, ένα επιπρόσθετο φαινόμενο που οδηγεί στον πολυμερισμό τους μέσω διάνοιξης δακτυλίου είναι η αυξημένη ελευθερία περιστροφής αυτών των ομάδων στην τελική γραμμική αλυσίδα, η οποία οδηγεί σε αύξηση της εντροπίας. Ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο πραγματοποιείται ο πολυμερισμός ROP σε κάθε τύπο μονομερών, διακρίνονται τέσσερα είδη: ο ριζικός ROP (RROP), ο ανιοντικός ROP (AROP), ο κατιοντικός ROP (CROP) και ο πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου (ROMP), με τη χρήση καταλυτών μετάθεσης. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι πολλά πολυμερή βιομηχανικής σημασίας παρασκευάζονται μέσω του ROP, όπως για παράδειγμα το πολυαιθυλενοξειδίο, το πολυνορβορνένιο, η πολυσιλοξάνη κ.α. [8]

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

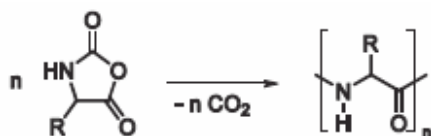


2.4.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων

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

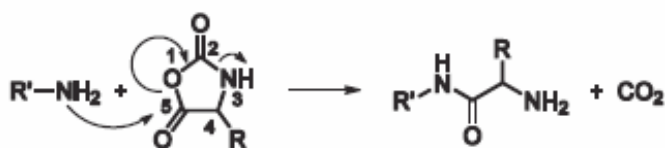
Η σύνθεση πολυπεπτιδικών αλυσίδων μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλές μεθόδους, κάθε μία από τις οποίες παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η απευθείας σύνθεση πολύπλοκων συμπολυπεπτιδίων από μονομερή αμινοξέων αποτελεί μία απλή διαδικασία, όμως δεν μπορεί να αποδώσει πολυπεπτίδια μεγάλου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

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

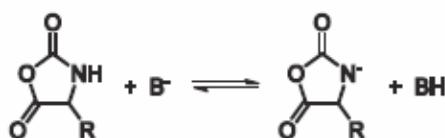


Έχει αποδειχθεί από μελέτες ιχνηθετημένων μονομερών με ¹⁴C, ότι το παραγόμενο CO₂ προέρχεται αποκλειστικά από τον άνθρακα C(2).

Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό, ως απαραίτητες χρησιμοποιούνται πρωτοταγείς αμίνες. Το ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων του N της πρωτοταγούς αμίνης προσβάλλει τον C-5 του μονομερούς, δηλαδή τον C με την λιγότερη ηλεκτρονική πυκνότητα, επομένως σπάνε οι δεσμοί C-5-O-1 και C-2-N-3 και παράγεται CO₂.



Σε ένα εναλλακτικό μηχανισμό, ως απαραίτητης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία βάση B⁻ (π.χ. ⁻OCH₃, H⁻, ⁻OOCCH₃). Σε αυτή την περίπτωση, είναι δυνατόν να δημιουργηθεί ένα ανιόν από το μόριο oxazolidin-2,5-diones, το οποίο μέσω της πυρηνόφιλης προσβολής του επόμενου μονομερούς, μπορεί να συνεχίσει την ανάπτυξη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. [1, 8, 9, 10, 11]



2.4.1.1 Μηχανιστικές μελέτες πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs πριν το 1997

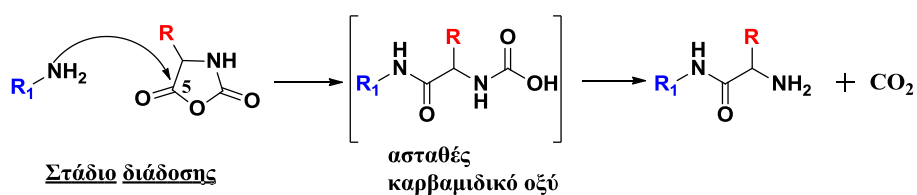
Από το 1940 και έπειτα ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των NCAs των α-αμινοξέων αποτελεί την κυριότερη τεχνική για παραγωγή, σε μεγάλη

κλίμακα, πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους. Όμως, μέχρι το 1997, τα συντιθέμενα πολυπεπτίδια ήταν κυρίως ομοπολυμερή, τυχαία συμπολυμερή ή εμβολιασμένα συμπολυμερή, χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία και μονοδιασπορά, όπως οι φυσικές πρωτεΐνες. Επομένως, η χρήση αυτών των πολυμερών για βιομιμητικές εφαρμογές ήταν περιορισμένη. Το 1997 ο Deming με μία καινοτόμο ιδέα εγκαινίασε μία νέα εποχή στην πολυπεπτιδική σύνθεση, προσδίδοντάς της χαρακτήρα ζωντανού πολυμερισμού. Μέχρι το 1997 οι ερευνητές συμφωνούσαν στην ύπαρξη δύο πιθανών μηχανισμών για τον ROP των NCAs. Οι μηχανισμοί αυτοί διακρίνονται με βάση το είδος το απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί, στον “κανονικό μηχανισμό αμινών” (“normal amine mechanism”, NAM), και στον “μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς” (“activated monomer mechanism”, AMM). Ο πρώτος μηχανισμός αναφέρεται στον πολυμερισμό με πρωτοταγείς αμίνες, που είναι ισχυρότερα πυρηνόφιλα από ότι βάσεις, και ο δεύτερος μηχανισμός χρησιμοποιεί ως απαρχητές αλκοξείδια μετάλλων ή τεταρτοταγείς αμίνες, δηλαδή ισχυρότερες βάσεις από ότι πυρηνόφιλα. Η συνύπαρξη των δύο μηχανισμών προτείνεται στην περίπτωση των δευτεροταγών αμινών, οι οποίες είναι ασθενή πυρηνόφιλα και βάσεις. [1, 9, 10, 11]

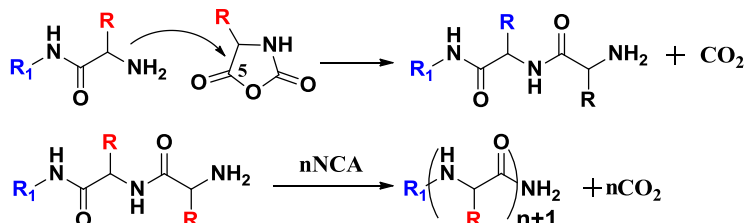
- **Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)**

Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται στον πολυμερισμό των NCAs με χρήση μη ιοντικών απαρχητών, οι οποίοι διαθέτουν τουλάχιστον ένα ευκίνητο άτομο υδρογόνου (του τύπου βάση-H), όπως είναι οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες (π.χ. n-εξυλαμίνη, διμεθυλαμίνη), οι αλκοόλες και το νερό. Τα στάδια της έναρξης και της διάδοσης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.

Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 1: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM).

Η έναρξη βασίζεται στην πυρηνόφιλη προσβολή του απαρχητή στο καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Στη συνέχεια, το ασταθές ενδιάμεσο καρβαμιδικό οξύ που παράγεται αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια νέα ελεύθερη αμινομάδα, η οποία προωθεί τον πολυμερισμό. Στο στάδιο της διάδοσης η τελική αμινομάδα λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο, προσβάλλοντας το καρβονύλιο της θέσης 5' ενός δεύτερου μορίου NCA και η πορεία συνεχίζεται μέχρι πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς. Οι πρωτοταγείς αμίνες ως απρχητές δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα, σε ότι αφορά τη συμφωνία μεταξύ του θεωρητικά υπολογιζόμενου στοιχειομετρικού μοριακού βάρους και αυτού που λαμβάνεται πειραματικά. Δεδομένου ότι οι πρωτοταγείς αμίνες είναι περισσότερο πυρηνόφιλες από τις ακραίες αμινομάδες που βρίσκονται στις αναπτυσσόμενες αλυσίδες, ο ρυθμός έναρξης είναι πολύ μεγαλύτερος από το ρυθμό διάδοσης, οδηγώντας σε πολυπεπτίδια με στενές κατανομές μοριακών βαρών.

Οι διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν διαπιστώσει ότι, εκτός από την επιθυμητή αντίδραση που παίρνουμε με τις πρωτοταγείς αμίνες, υπάρχουν αποκλίσεις από τον ζωντανό χαρακτήρα του ROP των NCAs, καθώς επίσης και από τη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλων μοριακών βαρών. Οι παράγοντες στους οποίους οφείλονται οι αποκλίσεις από τον ζωντανό χαρακτήρα αυτού του είδους πολυμερισμού είναι η ισορροπία μεταξύ καρβαμιδικού οξέος και CO₂, η επιλογή διαλύτη, η θερμοκρασία της

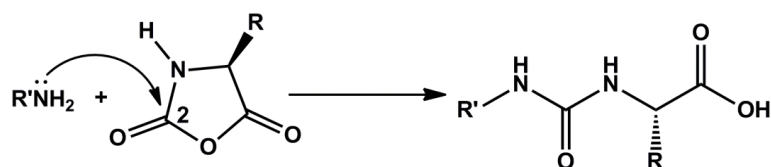
αντίδρασης και η ύπαρξη υγρασίας ή άλλων προσμίξεων (υδρόλυση του μονομερούς).

Συγκεκριμένα, το ενδιάμεσο καρβαμιδικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό NAM. Ο Ballard παρουσίασε τα ιδιαίτερα κινητικά χαρακτηριστικά του πολυμερισμού του NCA της σαρκοσίνης (Sar-NCA) σε νιτροβενζόλιο και παρατήρησε ότι το καρβαμιδικό οξύ σχηματίζει άλας με τις αμινομάδες των αναπτυσσόμενων αλυσίδων, παρεμποδίζοντας έτσι τις αλυσίδες να συνεχίσουν τη διάδοση. Το φαινόμενο εξαφανίζεται όταν ο πολυμερισμός γίνεται σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Το DMF έχει μεγαλύτερη οξύτητα σε σχέση με το νιτροβενζόλιο, η οποία μειώνει τη βασικότητα του ενεργού κέντρου της αμίνης, παρεμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό αλατος. Επιπλέον, η πίεση στην οποία λαμβάνει χώρα η αντίδραση, αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα που επηρεάζει την κινητική της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, υπό σταθερή πίεση (συνεχής απομάκρυνση του CO₂ από το διαλύτη), το καρβαμιδικό οξύ είναι ασταθές και επομένως παρατηρείται κινητική 1^{ης} τάξης, ενώ όταν η αντίδραση πραγματοποιείται χωρίς απομάκρυνση του CO₂, σχηματίζονται άλατα του καρβαμιδικού οξέος και ευνοούνται διαφορετικές κινητικές.

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

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

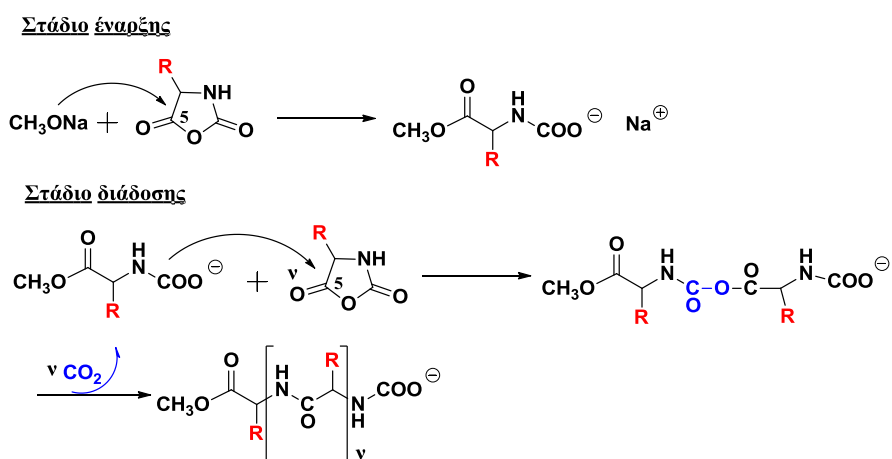
μεγαλύτερη είναι η πυρηνοφιλικότητα του αμινο-απαρχητή, τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα προσβολής της θέσης 2-CO.



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

- **Μηχανισμός του Blout**

Ο μηχανισμός του Blout είναι μία ιοντική εκδοχή του μηχανισμού NAM, που προτάθηκε στην περίπτωση του πολυμερισμού του BLG-NCA σε διοξάνη, με χρήση μεθοξειδίου του νατρίου ως απαρχητή. Το στάδιο της έναρξης περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή του ανιοντικού κέντρου του άλατος, η οποία ακολουθείται από διάνοιξη του δακτυλίου, ενώ δεν λαμβάνει χώρα αποκαρβοξυλίωση. Στο στάδιο της διάδοσης, το λαμβανόμενο καρβαμιδικό ανιόν συμπεριφέρεται όπως το ανιόν μεθοξειδίου και επομένως απελευθερώνεται CO₂. Ο συνολικός μηχανισμός παρατίθεται στο Σχήμα 3. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε N-μη υποκατεστημένους, όσο και σε N-υποκατεστημένους NCAs.



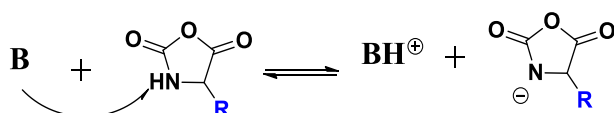
Σχήμα 3: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.

- **Μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM)**

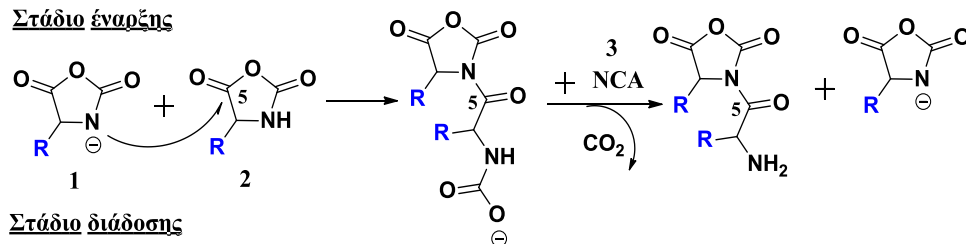
Ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς βρίσκει εφαρμογή στους πολυμερισμούς όπου εκκινούνται από ισχυρές βάσεις ή τριτοταγείς αμίνες. Στον μηχανισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς ο βασικός απαρχητής δεν δρα ως απαρχητής αλυσίδας μέσω της πυρηνοφιλικότητας του αλλά ως καταλύτης μέσω της βασικότητάς του για τον ιοντισμό του μονομερούς σε αντίδραση οξέος βάσεως προς σχηματισμό ανιόντος ανυδρίτη που δρα ως πυρηνόφιλο (Σχήμα 4). Στην περίπτωση αυτή η πολυμερική αλυσίδα είναι αυτοεκκινούμενη. Αυτός ο μηχανισμός εφαρμόζεται σε N-μη υποκατεστημένους NCAs.

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

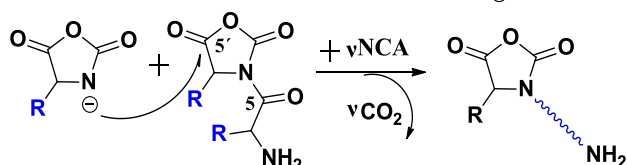
Στάδιο προέναρξης



Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 4: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.

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

2.4.1.2 Μηχανιστικές μελέτες πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs μετά το 1997

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, μέχρι το 1997, οι προσπάθειες να συντεθούν πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους, με καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και μικρή κατανομή, ήταν ανεπιτυχείς, λόγω του μεγάλου αριθμού ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων. Έκτοτε, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με την πολυπεπτιδική σύνθεση και έχουν καταφέρει να προτείνουν εναλλακτικούς τρόπους πολυμερισμού των NCAs των α-αμινοξέων, βελτιώνοντας σημαντικά τις ιδιότητες και τα μοριακά χαρακτηριστικά των λαμβανόμενων πολυπεπτιδίων. Οι σημαντικότερες ερευνητικές προσπάθειες που έχουν γίνει στον τομέα αυτό, αφορούν τη σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μετάπτωσης [1, 9, 10, 11], τον πολυμερισμό με υδροχλωρικές αμίνες [1, 9, 10, 11], την πολυπεπτιδική σύνθεση με τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού [1, 9, 10, 11, 12], τον πολυμερισμό πεπτιδίων με πρωτοταγείς αμίνες και χαμηλή θερμοκρασία [1, 9, 10, 11] και τέλος την σύνθεση πεπτιδίων με παράγωγα σιλανίων [1, 9, 10, 11, 14]. Παρακάτω, αναφέρονται συνοπτικά τα γενικά χαρακτηριστικά των τριών πιο σημαντικών μεθόδων πολυμερισμού, που αποτέλεσαν σταθμούς στην προσπάθεια σύνθεσης «ζωντανών πολυμερών».

- **Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μετάπτωσης**

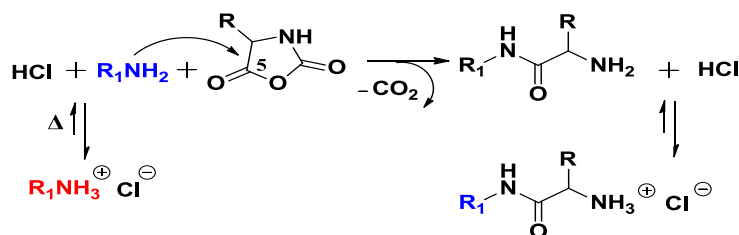
Πρώτος ο Deming πρότεινε μια νέα σειρά απαρχητών, βασισμένους σε οργανομεταλλικές ενώσεις, οι οποίοι μπορούν να περιορίσουν τις αντιδράσεις τερματισμού. Ο Deming χρησιμοποίησε σύμπλοκα νικελίου μηδενικού σθένους του τύπου bipyNi(COD) ($\text{bipy}=2,2'\text{-bipyridyl}$, $\text{COD}=1,5\text{-cyclooctadiene}$) και κατάφερε να συνθέσει ομοπολυμερή και κατά συστάδες συμπολυμερή με καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και στενές κατανομές μοριακών βαρών. Αργότερα, ανακάλυψε ότι και η χρήση απαρχητών με κοβάλτιο, του τύπου $(\text{PMe}_3)_4\text{Co}$ είναι επίσης αποτελεσματική. Το κυριότερο μειονέκτημα αυτού του μηχανισμού, είναι η παρουσία ιχνών των μετάλλων στα τελικά πολυπεπτίδια, καθιστώντας τα τοξικά και άρα αδύνατο να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικές εφαρμογές. Επιπλέον, ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται μόνο σε μη N-υποκατεστημένους NCAs. [1, 9, 10, 11]

- **Σύνθεση πολυπεπτιδίων με υδροχλωρικά άλατα πρωτοταγών αμινών**

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

Έχοντας ως βάση τα παραπάνω ο Schlaad, χρησιμοποίησε υδροχλωρικά άλατα αμινοτελικών μακροαπαρχητών, με την σκέψη ότι τα επιπλέον πρωτόνια του συστήματος θα εμποδίζουν τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς, εφόσον η επαναπρωτονίωση του μονομερούς

θα ήταν γρηγορότερη από την πυρηνόφιλη προσβολή σε ένα άλλο μονομερές (Σχήμα 5).



Σχήμα 5: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.

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

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

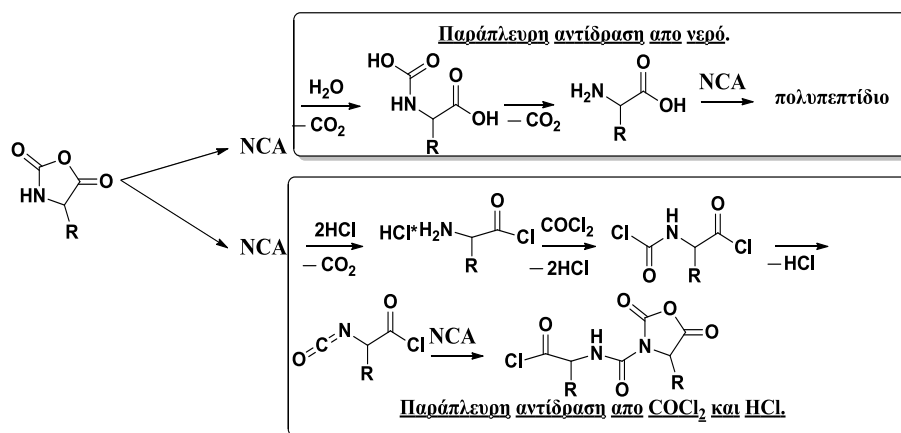
- **Σύνθεση πολυπεπτιδίων με πρωτοταγείς αμίνες και χρήση τεχνικών υψηλού κενού**

Το 2004 η ομάδα των Iatrou, Aliferis, Hadjichristidis ανέφερε το πρώτο ζωντανό σύστημα πολυμερισμού με πρωτοταγείς αμίνες ως απαρχητές, με τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού (high vacuum techniques, HVT). [1, 9, 10, 12, 13] Οι τεχνικές αυτές είναι αναγκαίες εξαιτίας της ευαισθησίας των χρησιμοποιούμενων απαρχητών (π.χ. sec-Buli) και των μακροανιόντων που δημιουργούνται, στα ίχνη του νερού, του διοξειδίου του άνθρακα, του οξυγόνου και άλλων δραστικών προσμίξεων. Η χρήση αυτών των τεχνικών είναι επίσης αποτελεσματική σε περιπτώσεις που η διάρκεια της αντίδρασης είναι αρκετά μεγάλη (π.χ. μερικές μέρες, ή λίγες εβδομάδες). Σε εναλλακτικές

συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας, η καθαρότητα του συστήματος δεν είναι επαρκής ώστε να ληφθούν τα επιθυμητά πολυπεπτίδια.

Η τεχνική αυτή είναι γενική και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον πολυμερισμό υποκατεστημένων όσο και μη υποκατεστημένων μονομερών. Με χρήση πρωτοταγών αμινών ευνοείται αποκλειστικά ο κανονικός μηχανισμός αμινών, ενώ τα προϊόντα έχουν μεγάλη συνθετική ομοιογένεια και υψηλές αποδόσεις. Με την τεχνική υψηλού κενού, είναι δυνατόν να αποφευχθούν όλα εκείνα τα προβλήματα που προκύπτουν στον κανονικό μηχανισμό αμινών NAM. Οι περιορισμοί του NAM έγκεινται κυρίως στην ευαισθησία του σε προσμίξεις, όπως τα υδροχλωρικά άλατα και ακυλοχλωρίδια που προέρχονται από τη σύνθεση των NCAs, που οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού, όπως επίσης και στην ύπαρξη άλλων ειδών που μπορούν δυνητικά να εκκινήσουν τον πολυμερισμό (νερό και άλλες αμίνες), δίνοντας έτσι πολυμερικά υλικά με μεγάλες κατανομές μοριακών βαρών. Επιπλέον, η παρουσία CO₂ επηρεάζει την κινητική των αντιδράσεων και οδηγεί σε ανεπιθύμητα προϊόντα. Με βάση τα ανωτέρω, κρίνεται αναγκαίος ο καθαρισμός των μονομερών, ο οποίος μπορεί να επιτευχθεί τηρώντας αυστηρά τα πρωτόκολλα καθαρισμού για όλα τα επιμέρους αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεσή τους.

Οι N-καρβοξυανυδρίτες παρουσιάζουν εξαιρετική ευαισθησία σε θέρμανση, νερό και βάσεις. Αντιδρούν ταχύτατα ακόμα και σε στερεή φάση δίνοντας πολυπεπτιδικά προϊόντα μέχρι την τελική τους κατανάλωση. Ακόμα και κατά την σύνθεσή τους αν δεν τηρηθούν τα πρότυπα καθαρότητας δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις (Σχήμα 6). Έτσι, απαιτούνται προσεκτικές επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις υπό κενό (για να αποφύγουν την μόλυνση από την ατμοσφαιρική υγρασία) για τον καθαρισμό των NCAs, οι οποίες πρέπει να προηγούνται του πολυμερισμού. Επιπλέον, μετά το πέρας της αντίδρασης, για να αποφευχθούν οι παράπλευρες αντιδράσεις, γίνεται ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου υδροχλωρίου αλλά και του τριφωσγενίου, που δεν αντέδρασε με το πρόδρομο αμινοξύ, με τη χρήση του υψηλού κενού.



Σχήμα 6: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλωρίδιο και το φωσγένιο δίνουν ισοκυανато χλωρίδιο και μετέπειτα N-χλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μία παράμετρος κλειδί για τον επιτυχή ζωντανό πολυμερισμό των NCAs των α-αμινοξέων αποτελεί η απομάκρυνση του CO₂ που παράγεται κατά το στάδιο της διάδοσης. Η χρήση τεχνικών υψηλού κενού προσφέρει τη συνεχή απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂, οδηγώντας την αντίδραση του πολυμερισμού προς τα προϊόντα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιάμεσου. Λόγω της μικρής διαλυτότητας του διοξειδίου του άνθρακα σε διαλύτες όπως το DMF, η αποκαρβοξυλίωση του καρβαμιδικού οξέος δεν συμβαίνει ακαριαία, με αποτέλεσμα ορισμένα ενεργά κέντρα να παραμένουν όπως είναι και άλλα να δημιουργούν άλατα με τις ενεργές αμινομάδες. Και στις δυο περιπτώσεις οι δομές που δημιουργούνται είναι απενεργοποιημένες, και οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού και σε μη ολοκληρωμένο πολυμερισμό. Με την χρήση ειδικών αντιδραστήρων πολυμερισμού, με όγκο τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερο από το εκλουόμενο διοξείδιο του άνθρακα, αποφεύγεται ο σχηματισμός καρβαμικών αλάτων με τα αμινοτελικά άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, λόγω της γρηγορότερης αποκαρβοξυλίωσης που συμβαίνει στο σύστημα.

Με τη εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων και τεχνικών, η ομάδα των Ιατρού, Αλiferis, Hadjichristidis κατάφερε για πρώτη φορά να επιτύχει ζωντανό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων και να συνθέσει πολυπεπτίδια με τις μικρότερες κατανομές μοριακών βαρών

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

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

2.5 Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α -Αμινοξέων (NCAs)

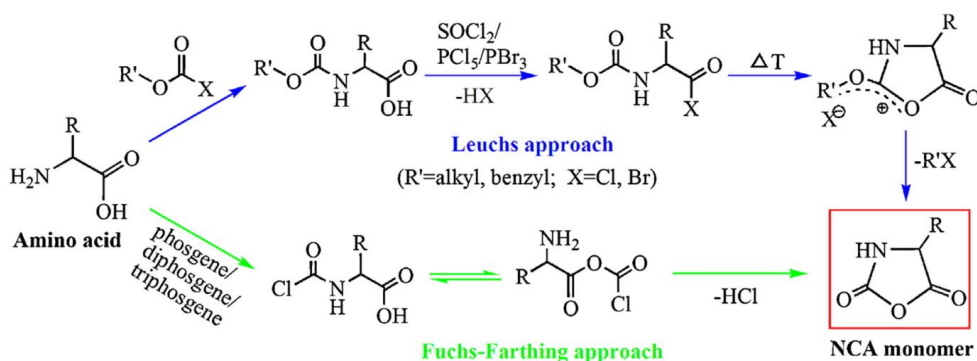
Οι N-καρβοξυ ανυδρίτες των α -αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Leuchs, το 1906. Επίσης ο Leuchs παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και κατάφερε να απομονώσει το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος, περιλαμβάνει την αντίδραση κυκλοποίησης των προστατευμένων N-αλκοξυκαρβονυλοαμινο-αλογονιδίων, υπό παρατεταμένη θερμοκρασία 70-90 °C (Σχήμα 7). Το κύριο

μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες μπορεί να πραγματοποιηθεί αποσύνθεση των NCAs και διάνοιξη του δακτυλίου.

Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια, με τα οποία θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η δημιουργία του αλογονιδίου οξέος. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο (SOCl_2) από τον ίδιο τον Leuchs. Εν συνεχεία, δοκιμάστηκε το πενταχλωρίδιο του φωσφόρου, που ήταν δραστικότερο αλλά έδινε ως παραπροϊόν το αντίστοιχο οξείδιο και είχε επίδραση στην κρυστάλλωση του ανυδρίτη, ενώ το ισχυρότερο μέσω αλογόνωσης της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το τριβρωμίδιο του φωσφόρου (PBr_3). Επιπλέον, στην τελευταία περίπτωση το ανιόν του βρωμίου είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το αντίστοιχο του χλωρίου στο στάδιο της κυκλοποίησης, αλλά και καλύτερο πυρηνόφιλο για το τελικό στάδιο. Συνεπώς η συνολική αντίδραση προχωράει γρηγορότερα και σε θερμοκρασίες μικρότερες από 25°C . Όσον αφορά τον υποκαταστάτη R' , ο Leuchs είχε παρατηρήσει ότι τα μεθόξυ- αντιδρούσαν πιο εύκολα από τα αντίστοιχα αιθοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων, αποδεικνύοντας ότι το καθοριστικό (αργό) στάδιο της αντίδρασης είναι η αλκυλίωση του ιόντος αλογόνου. Η μέθοδος του Leuchs δεν είναι μόνο ιστορικής σημασίας, αλλά χρησιμοποιείται ακόμη με τις παραλλαγές της, για τον σχηματισμό διαφόρων NCAs.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την σύνθεση των NCAs σήμερα, είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον Fuchs το 1922 για την παρασκευή του NCA της N-φαινυλογλυκίνης και τροποποιήθηκε ακολούθως από τους Farthing, Coleman και Levy ώστε να εφαρμοστεί στη σύνθεση ενός μεγάλου εύρους NCAs. Η ονομασία που έχει επικρατήσει βιβλιογραφικά για την προσέγγιση αυτή είναι μέθοδος “Fuchs-Farthing”. Η συγκεκριμένη διαδικασία περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο, όπου στο πρώτο βήμα της αντίδρασης το ελεύθερο αμινοξύ αντιδρά με το φωσγένιο, σχηματίζοντας πολύ γρήγορα το ενδιάμεσο N-χλωροφόρμυλο αμινοξύ (συνήθως δεν απομονώνεται), το οποίο ακολούθως μετατρέπεται σε N-καρβοξυ ανυδρίτη, ενώ πραγματοποιείται και ταυτόχρονη παραγωγή HCl (Σχήμα 7). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται διότι οι ανυδρίτες είναι διαλυτοί

στους περισσότερους απρωτικούς πολικούς διαλύτες, ενώ τα ελεύθερα αμινοξέα είναι αδιάλυτα. Καθοριστικό ρόλο στην αντίδραση διαδραματίζουν ο διαλύτης, η θερμοκρασία αλλά και ο χρόνος της αντίδρασης. Το τετραυδροφουράνιο (THF) και το 1,4-διοξάνιο είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, ωστόσο δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις όταν κατεργάζονται με υδροχλώριο για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Γενικά, όλοι οι διαλύτες που είναι αδρανείς ως προς το φωσγένιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα αντίδρασης, αλλά οι λιγότερο πολικοί όπως το χλωροφόρμιο, ο τετραχλωράνθρακας και ο οξικός αιθυλεστέρας, αυξάνουν τους χρόνους της αντίδρασης. Από τους πιο πολικούς διαλύτες μόνο το ακετονιτρίλιο είναι αδρανές αρκετά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, προτιμάται για την σύνθεση του NCA της γλυκίνης.



Σχήμα 7: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών.

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

Οι παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη σύνθεση ενός NCA περιλαμβάνουν κυρίως την διάνοιξη του δακτυλίου του τελικού προϊόντος και λαμβάνουν χώρα λόγω αυξημένης θερμοκρασίας, αυξημένου χρόνου αντίδρασης ή υψηλής συγκέντρωσης παραγόμενου υδροχλωρίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις χαμηλής απόδοσης ανυδρίτη, το παραγόμενο HCl πρωτονιώνει την αμινομάδα κάποιων αμινοξέων, σχηματίζοντας άλας και εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο το κλείσιμο του δακτυλίου. Ακόμα όμως και να σχηματιστεί ο δακτύλιος είναι πιθανό να επέλθει διάνοιξή του σε αυξημένες συγκεντρώσεις HCl. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται βάσεις (όπως η Et₃N), ή ενώσεις της οικογένειας των πινενίων (όπως το D,L-λιμονένιο) ως αντιδραστήρια δέσμευσης του παραγόμενου HCl για την διευκόλυνση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Τα τελευταία 15 χρόνια, έχει συντεθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός NCAs όλων των βασικών αμινοξέων αλλά και αρκετών παραγώγων τους. Αναγκαία κρίνεται η χρησιμοποίηση διάφορων προστατευτικών ομάδων για τις δραστικές πλευρικές ομάδες των αμινοξέων, έτσι ώστε να αποφεύγονται παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των μονομερών και του πολυμερισμού. [3, 15-27]

2.6 Αποκρινόμενα πολυμερή

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

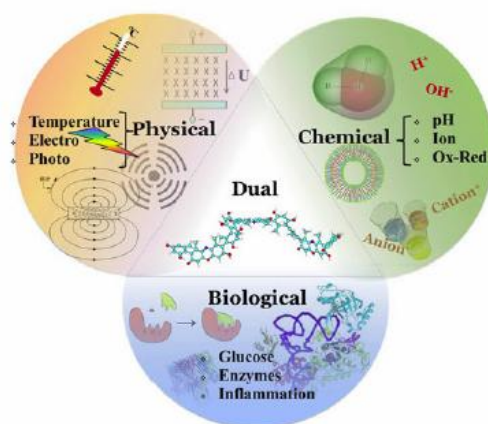
διαμέρισμα, 3) προσαρμοσμένη απόκριση στο παθολογικό συμβάν, 4) χρήση μη τοξικών, βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων συστημάτων.

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

οδηγήσει στην ανάπτυξη πολυάριθμων συνθετικών πολυμερών που έχουν σχεδιαστεί για να μιμούνται τα φυσικά τους ανάλογα.

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

Τα αποκρινόμενα πολυμερή ταξινομούνται συνήθως σε τρεις κατηγορίες: 1) Τα φυσικώς αποκρινόμενα (φως, θερμοκρασία, υπερήχους, μαγνητικά, μηχανικά, ηλεκτρικά), τα οποία συνήθως τροποποιούν τη δυναμική της αλυσίδας, δηλαδή το επίπεδο ενέργειας του συστήματος πολυμερούς/διαλύτη. 2) Τα χημικώς αποκρινόμενα (διαλύτης, ιοντική ισχύς, ηλεκτροχημικά, pH), τα οποία διαμορφώνουν μοριακές αλληλεπιδράσεις, είτε μεταξύ πολυμερών και μορίων διαλύτη, ή μεταξύ αλυσίδων πολυμερούς. 3) Τα βιολογικώς αποκρινόμενα (ένζυμα, υποδοχείς), τα οποία σχετίζονται με την πραγματική λειτουργία των μορίων: ενζυματικές αντιδράσεις, αναγνώριση μορίων. Τέλος, υπάρχουν τα διπλά αποκρινόμενα πολυμερή (dual stimuli-responsive), τα οποία ανταποκρίνονται ταυτόχρονα σε περισσότερα από ένα ερεθίσματα (Εικόνα 9). [28-37]



Εικόνα 9: Ταξινόμηση των αποκρινόμενων πολυμερών.

2.6.1 Φυσικώς αποκρινόμενα πολυμερή

- **Θέρμο-αποκρινόμενα πολυμερή**

Τα πολυμερή που αποκρίνονται στην θερμοκρασία έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον στις εφαρμογές βιοτεχνολογίας, επειδή ορισμένες ασθένειες εμφανίζουν αλλαγές θερμοκρασίας. Κανονικά, αυτά τα συμπολυμερή χαρακτηρίζονται από μια κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος, γύρω από την οποία οι υδρόφοβες και υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων και του υδατικού μέσου μεταβάλλονται απότομα μέσα σε ένα μικρό εύρος θερμοκρασίας. Αυτό προκαλεί τη διακοπή των ενδο- και διαμοριακών ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και οδηγεί σε κατάρρευση ή επέκταση αλυσίδας. Τυπικά, αυτά τα πολυμερικά διαλύματα διαθέτουν ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος (upper critical solution temperature, UCST), πάνω από την οποία υπάρχει μία φάση πολυμερούς και κάτω από την οποία υπάρχει ένας διαχωρισμός φάσεων. Εναλλακτικά, διαλύματα πολυμερών που εμφανίζονται ως μονοφασικά κάτω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία και διφασικά πάνω από αυτή, γενικά έχουν μια λεγόμενη χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος (lower critical solution temperature, LCST). Ανάλογα με τον μηχανισμό και τη χημεία των ομάδων, έχουν αναφερθεί διάφορα θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή: πολυ(N-αλκύλιο υποκατεστημένα ακρυλαμίδια), π.χ. πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (PNiPAAm), πολυ(N-βινυλαλκυλαμίδια), π.χ. πολυ(N-βινυλοκαπρολακτάμη) (PNVC) και συμπολυμερή όπως πολυ(L-γαλακτικό οξύ) - πολυ(αιθυλενογλυκόλη) - πολυ(L-γαλακτικό οξύ) (PLLA-PEG-PLLA) και πολυ(αιθυλενοξειδίο) - πολυ(προπυλενοξειδίο) - πολυ(αιθυλενοξειδίο) (PEO-PPO-PEO). Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η ερευνητική ομάδα του κυρίου Ιατρού ανέφερε τη σύνθεση του συμπολυμερούς πολυ(αιθυλενοξειδίου)-πολυ(L-ιστιδίνη) (PEO-PHis), το οποίο βρέθηκε ότι αποκρίνεται και σε μεταβολές της θερμοκρασίας εκτός των μεταβολών του pH. [28-37]

- **Ήλεκτρο-αποκρινόμενα πολυμερή**

Τα ηλεκτρικώς και ηλεκτροχημικώς αποκρινόμενα πολυμερή χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα και τις εφαρμογές, λόγω των

πλεονεκτημάτων τους από την ακρίβεια του ελέγχου μέσω της έντασης του ρεύματος, της διάρκειας ενός ηλεκτρικού παλμού ή του διαστήματος μεταξύ παλμών. Τυπικά ηλεκτρικά ανταποκρινόμενα πολυμερή είναι αγωγίμα πολυμερή, όπως για παράδειγμα το πολυθειοφαίνιο (PT), ή το σουλφονωμένο πολυστυρόλιο (PSS), το οποίο μπορεί να εμφανίσει διόγκωση, συρρίκνωση ή κάμψη σε απόκριση σε εξωτερικό πεδίο. [28-37]

- **Φώτο-αποκρινόμενα πολυμερή**

Επειδή το φως μπορεί να εφαρμοστεί στιγμιαία και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες με υψηλή ακρίβεια, τα φώτο-αποκρινόμενα πολυμερή εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα. Το φως μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στην επιφάνεια του πολυμερούς ή μπορεί να μεταδοθεί σε απομακρυσμένες τοποθεσίες χρησιμοποιώντας οπτικές ίνες. Τα περισσότερα φώτο-ευαίσθητα πολυμερή περιέχουν χρωμοφόρες ομάδες όπως ομάδες αζοβενζολίου, σπироπυρανικές ομάδες, ή νιτροβενζυλομάδες. [28-37]

2.6.2 Χημικώς αποκρινόμενα πολυμερή

- **pH-αποκρινόμενα πολυμερή**

Το pH είναι μια σημαντική περιβαλλοντική παράμετρος για τις βιοϊατρικές εφαρμογές, επειδή οι αλλαγές στο pH συμβαίνουν σε πολλά παθολογικά διαμερίσματα. Για παράδειγμα, υπάρχει μία εμφανής αλλαγή στο pH κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού, από το στομάχι ($\text{pH} = 1-3$) στο έντερο ($\text{pH} = 5-8$). Επίσης, οι χρόνιες πληγές έχουν τιμές pH μεταξύ 7,4 και 5,4, και ο καρκινικός όγκος είναι όξιнос εξωκυτταρικά. Επομένως, σε αντίθεση με τις αλλαγές θερμοκρασίας, αυτή η ιδιότητα μπορεί να εκμεταλλευτεί για άμεση απόκριση σε συγκεκριμένο ιστό ή σε κυτταρικό διαμέρισμα. Το βασικό στοιχείο για τα pH-αποκρινόμενα πολυμερή είναι η παρουσία ιονιζόμενων, ασθενών όξινων ή βασικών τμήματα που συνδέονται με μια υδρόφοβη σπονδυλική στήλη, όπως οι πολυηλεκτρολύτες. Κατά τον ιονισμό, οι ηλεκτροστατικές απώσεις των παραγόμενων φορτίων (ανιόντα ή κατιόντα) προκαλούν μια δραματική επέκταση των σπειροειδών αλυσίδων. Ένα άλλο τυπικό πολυμερές που αποκρίνεται στο pH φέρει ομάδες που μπορούν να

πρωτονιώνονται ή να αποπρωτονιόνονται ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, όπως για παράδειγμα καρβοξυλομάδες ή αμινομάδες. Τα pH-αποκρινόμενα πολυμερή τυπικά περιλαμβάνουν χιτοζάνη, αλβουμίνη, ζελατίνη, πολυ(ακρυλικό οξύ) (PAAc)/χιτοζάνη IPN, πολυ(μεθακρυλικό οξύ-g-αιθυλενογλυκόλη) [P(MAA-g-EG)], πολυ(αιθυλενο ιμίνη) (PEI), πολυ (N, N-διακυλαμινο αιθυλομεθακρυλικά άλατα) (PDAAEMA) και πολυ(λυσίνη) (PL). Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η ερευνητική ομάδα του κυρίου Ιατρού ανέφερε τη σύνθεση του συμπολυμερούς πολυ(αιθυλενοξειδίου)-πολυ(L-ιστιδίνη) (PEO-PHist), το οποίο βρέθηκε ότι αποκρίνεται και σε μεταβολές του pH λόγω ύπαρξης του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης, ο οποίος ανάλογα με τις μεταβολές του pH μπορεί να πρωτονιώνεται ή να αποπρωτονιώνεται. [28-37]

- **Ιοντικώς-αποκρινόμενα πολυμερή**

Η απόκριση στην ιοντική ισχύ είναι μια τυπική ιδιότητα των πολυμερών που περιέχουν ιονιζόμενες ομάδες. Αυτά τα πολυμερικά συστήματα παρουσιάζουν ασυνήθιστη ρεολογική συμπεριφορά ως αποτέλεσμα των ελκτικών αλληλεπιδράσεων Coulomb μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων ειδών, τα οποία μπορεί να καθιστούν το πολυμερές αδιάλυτο σε απιονισμένο νερό, αλλά διαλυτό παρουσία κρίσιμης συγκέντρωσης των προστιθέμενων ηλεκτρολυτών. Επομένως, οι μεταβολές της ιοντικής ισχύος προκαλούν αλλαγές στο μήκος των πολυμερικών αλυσίδων, την διαλυτότητα και τον φθορισμό των πολυμερών. [28-37]

- **Οξειδοαναγωγικώς-αποκρινόμενα πολυμερή**

Πολυμερή που περιέχουν ευκίνητες ομάδες έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσουν βιοδιασπώμενα ή βιοαποικοδομήσιμα συστήματα που ανταποκρίνονται στην οξειδοαναγωγή. Όξινα, ευκίνητα τμήματα μέσα στους πολυανυδρίτες, πολυ(γαλακτικό/γλυκολικό οξύ) (PLGA), και πολυ (β-αμινο εστέρες) (PbAEs) προκαλούν οξειδοαναγωγή αποκρισιμότητα. Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί ομάδες δισουλφιδίου, οι οποίες επάγουν οξειδοαναγωγική απόκριση, επειδή είναι ασταθείς σε αναγωγικό περιβάλλον, και έτσι διασπώνται στις αντίστοιχες ομάδεςθειόλης. Πολυμερή με δισουλφιδικούς

δεσμούς αποικοδομούνται όταν εκτίθενται σε κυστεΐνη ή γλουταθειόνη, τα οποία είναι αναγωγικά μόρια προερχόμενα αμινοξέα. [28-37]

2.6.3 Βιολογικώς αποκρινόμενα πολυμερή

Τα βιολογικώς αποκρινόμενα πολυμερή τυπικά περιλαμβάνουν βιομακρομόρια όπως γλυκόζη, γλουταθειόνη, ένζυμα, υποδοχείς και υπερεκφρασμένους μεταβολίτες στη φλεγμονή. Τα πολυμερή ευαίσθητα στη γλυκόζη έχουν τεράστια δυναμική στην προσπάθεια δημιουργίας, για παράδειγμα, τρόπων αυτορρύθμισης χορήγησης της ινσουλίνης. Σε αυτού του είδους τα πολυμερή, η οξειδάση γλυκόζης (GOx) είναι συζευγμένη σε ένα έξυπνο, ευαίσθητο στο pH πολυμερές. Η GOx οξειδώνει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ, το οποίο προκαλεί αλλαγή του pH στο περιβάλλον. Το ευαίσθητο στο pH πολυμερές στη συνέχεια εμφανίζει μεταβολή στον όγκο του σε απόκριση στο μειωμένο pH. Με αυτόν τον τρόπο, οι δραστικές αλλαγές στη διαμόρφωση του πολυμερούς ρυθμίζονται από το επίπεδο γλυκόζης του σώματος, το οποίο, με τη σειρά του, επηρεάζει σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα και την πρόσβαση στο υπόστρωμα. Στα περισσότερα πολυμερή που αποκρίνονται στα ένζυμα, τα ένζυμα χρησιμοποιούνται για την καταστροφή του πολυμερούς ή των συσσωματωμάτων τους. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτού του τύπου των αποκρίσιμων πολυμερών είναι ότι δεν απαιτούν εξωτερικό ερέθισμα για την αποικοδόμησή τους, παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα και δρουν υπό ήπιες συνθήκες. [28-37]

2.6.4 Διπλά αποκρινόμενα πολυμερή

Για βιοϊατρικές εφαρμογές, γίνεται ένα ακόμη βήμα, εάν τα έξυπνα υλικά ανταποκρίνονται ταυτόχρονα σε περισσότερα από ένα ερέθισμα. Τα διπλά αποκρινόμενα πολυμερή θα ήταν ιδανικά ως θεραπευτικά μέσα, δηλαδή ως εργαλεία τα οποία θα συνδυάζουν την διάγνωση με την θεραπεία. Ως εκ τούτου, πολλαπλά αποκρινόμενα πολυμερή, όπως θερμο- και pH-αποκρινόμενα συστήματα, προσελκύουν όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Ενδεικτικά, αναφέρεται το παράδειγμα, ενός διπλά αποκρινόμενου συστήματος χορήγησης φαρμάκου, το οποίο χρησιμοποιεί τόσο το pH όσο και τη γλουταθειόνη. Σε αυτό το σύστημα, είναι δυνατόν να συντονιστεί η κινητική

απελευθέρωσης με συστηματική μεταβολή της σύνθεσης του ευαίσθητου στο pH υδρόφοβου τμήματος (ακρυλικός βουτυλεστέρας), ή με τροποποίηση της απόκρισης της γλουταθειόνης (ακρυλικό πυριδυλο δισουλφίδιο), ή τροποποιώντας και τους δύο αυτούς παράγοντες. [28-37]

2.7 Μικκύλια – Κυστίδια

Επιφανειοδραστικές ή αμφίφιλες ουσίες, δηλαδή ουσίες που αποτελούνται από μόρια τα οποία έχουν ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα, οργανώνονται στο νερό σε μικκύλια. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η συγκέντρωση να είναι μεγαλύτερη από μια τιμή συγκέντρωσης που ονομάζεται κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση, ή για συντομογραφία CMC (Critical Micelle Concentration). Η CMC είναι διαφορετική για κάθε επιφανειοδραστική ουσία και σε αυτή την συγκέντρωση παρατηρείται απότομη αλλαγή στις φυσικοχημικές της ιδιότητες, η οποία όπως αρχικά ερμηνεύτηκε από τον Mc Bain (1914), οφείλεται στο σχηματισμό μικκυλίων.

Οι μικκυλιακές δομές εμφανίζονται ως σφαιρικοί, φυλλοειδείς και κυλινδρικοί σχηματισμοί. Στα μικκύλια, οι λιπόφιλες υδρογονανθρακικές αλυσίδες προσανατολίζονται προς το εσωτερικό τους, αφήνοντας τις υδρόφιλες ομάδες στο εξωτερικό μέρος σε επαφή με τα πολικά μόρια του νερού. Σε μη πολικούς διαλύτες όπως για παράδειγμα κυκλοεξάνιο, οργανώνονται κατ' αντίστροφο τρόπο, δηλαδή με τις ανθρακικές αλυσίδες προς τα έξω και τις υδρόφιλες κεφαλές προς το εσωτερικό του μικκυλίου. Η διαμόρφωση αυτή αποτελεί το αντεστραμμένο μικκύλιο. [38-41]

Τα κυστίδια είναι υπερμοριακά συστήματα σφαιρικού σχήματος και μεγέθους από 10 nm έως 800 nm, τα οποία σχηματίζονται κατά την αυτοοργάνωση συνθετικών ή φυσικών αμφιφιλικού τύπου μορίων σε υδατικά διαλύματα. Τα αμφιφιλικά μόρια από τα οποία αποτελούνται συνήθως τα κυστίδια διαθέτουν δύο μακριές υδρογονανθρακικές αλυσίδες και μία πολική κεφαλή, με αποτέλεσμα να έχουν σχήμα κυλινδρικό. Στην περίπτωση κατά την οποία οι υπερμοριακές αυτές δομές αποτελούνται από φυσικά φωσφολιπίδια, ονομάζονται λιποσώματα, ενώ στην περίπτωση που αποτελούνται από συνθετικά μόρια (συνθετικά αμφίφιλα μόρια ή αμφίφιλα πολυμερή) λέγονται

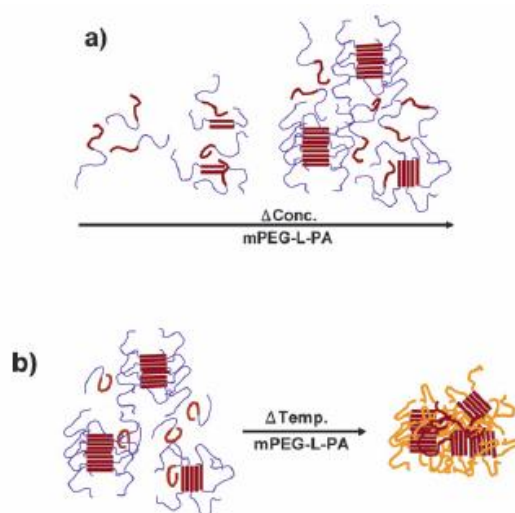
κυστίδια. Η αναλογία $p=Rg/Rh$ είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο εξαρτάται από τη μορφολογία των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων (χρήση στατικής σκέδασης-SLS). Η τιμή p κοντά στο 1 αποδίδεται σε μια γεωμετρία κυστιδίου ενώ σε μικρότερες τιμές αποδίδεται σε σφαιρικά μικκύλια (θεωρητικά $p=0.775$). [38, 42-44]

2.8 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με αλανίνη

Η ομάδα του Yoshida, το 1991 πρώτη δημοσίευσε τη σύνθεση παραγώγων μεθακρυλοϋλο-L-αλανίνης με ποικίλες προστατευτικές ομάδες του καρβοξυλίου όπως, υδρογόνο, μέθυλο- αίθυλο και βένζυλο- ομάδες. Τα πολυμερή αυτά σε υδατικό περιβάλλον παρουσίασαν μία κανονική αποκρισιμότητα στις θερμοκρασιακές μεταβολές στην κλίμακα των 0-40 °C, αφού με μείωση της θερμοκρασίας διογκώνονταν στο νερό, ενώ με αύξηση απο-διογκώνονταν. [45]

Το 2008 η ομάδα του Jeong ανέφερε τη σύνθεση δύο αμφίφιλων, δισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(αιθυλενογλυκόλης)-πολυ(L-αλανίνης). Τα συμπολυμερή poly(ethylene glycol)-L-polyalanine (mPEG-L-PA) και poly(ethylene glycol)-DL-polyalanine (mPEG-DL-PA) που είχαν παρόμοια μοριακά βάρη και διέφεραν μόνο ως προς τη στερεοχημεία, μελετήθηκαν για τη δευτεροταγή τους δομή και την αποκρισιμότητά τους σε μεταβολές της θερμοκρασίας. Η ομάδα κατέληξε στα εξής συμπεράσματα: Τα L-ισομερή υφίστανται αλλαγές στη δευτεροταγή τους δομή, καθώς αυξανόμενη της συγκέντρωσης του πολυμερούς, η αρχική δομή τυχαίου σπειράματος μετατρέπεται σε β-πτυχωτή επιφάνεια. Κάτι ανάλογο δεν παρατηρείται στην περίπτωση των DL-ισομερών, τα οποία διατηρούν την δομή τυχαίου σπειράματος χωρίς να αναπτύσσουν ιδιαίτερη νανοδομή. Επιπλέον, σε υψηλές συγκεντρώσεις πολυμερούς, τα υδατικά διαλύματα αυτών των πολυμερών υπόκεινται σε “sol-to-gel” μεταβάσεις αυξανόμενη της θερμοκρασίας, υφίστανται δηλαδή τη λεγόμενη διαδικασία αντίστροφης θερμικής ζελατινοποίησης (reverse thermal gelation). Τα L-ισομερή με την δομή β-φύλλου διευκολύνουν την “sol-to-gel” μετάβαση, σε αντίθεση με τα DL-ισομερή που έχουν δομή τυχαίου σπειράματος. Έτσι, μόνο τα L-ισομερή

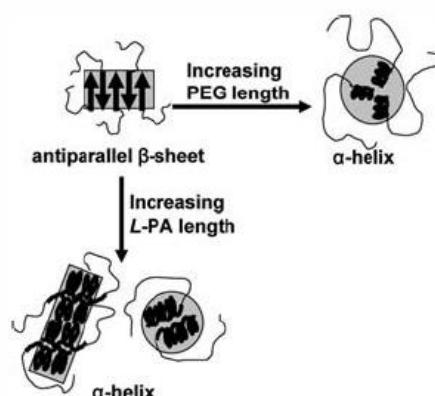
υφίστανται “*sol-to-gel*” μετάβαση στις θερμοκρασίες 20-40 °C, με αποτέλεσμα να αποτελούν πολλά υποσχόμενα βιοϋλικά για τη χρήση τους ως *in situ* εφαρμόσιμα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων και ως ικριώματα στη μηχανική ιστών. Στο σχήμα 8 που ακολουθεί απεικονίζονται οι αλλαγές στη διαμόρφωση της δομής του mPEG-L-PA συναρτήσει της συγκέντρωσης του πολυμερούς στο νερό και της θερμοκρασίας. Οι λεπτές καφέ γραμμές υποδεικνύουν τη δομή β-φύλλου, ενώ οι λεπτές μπλε γραμμές αναπαριστούν την PEG. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται η PEG αφυδατώνεται (λεπτές κίτρινες γραμμές) και η δομή β-φύλλου σταδιακά συσσωματώνεται για να σχηματίσει gel. [46]



Σχήμα 8: Σχηματική αναπαράσταση των αλλαγών στη διαμόρφωση της δομής του mPEG-L-PA ως συνάρτηση α) της συγκέντρωσης του πολυμερούς στο νερό και β) της θερμοκρασίας.

Σε συνέχεια των προηγούμενων μελετών, η ίδια ομάδα συνέθεσε μία σειρά από δισυσταδικά συμπολυμερή του τύπου PEG-L-PA με διαφορετικά μήκη αλυσίδων και διερεύνησε την επίδραση του μοριακού βάρους κάθε μιας από τις δύο συστάδες του συμπολυμερούς PEG-L-PA, σε ό,τι αφορά τη δευτεροταγή δομή των πολυπεπτιδίων, την αυτοοργάνωση τους σε νανοκλίμακα και την θερμική αποκρισσιμότητα των υδατικών διαλυμάτων τους. Οι ερευνητές έδειξαν ότι τόσο η αύξηση του μήκους της αλυσίδας PEG (με σταθερό το μοριακό βάρος της συστάδας PA), όσο και η αύξηση του μήκους της αλυσίδας PA (με σταθερό το μοριακό βάρος της συστάδας PEG)

προκαλούν αλλαγές στη δευτεροταγή δομή του πολυπεπτιδίου αφού από β-πτυχωτή δομή μεταβαίνει σε δομή α-έλικας. Ταυτόχρονα, παρατηρούνται αλλαγές στη νανοδιαμόρφωση του πεπτιδίου, καθώς η αρχική δομή ινιδίων (fibrous structure) μετατρέπεται σε σφαιρική μικυλλιακή δομή (spherical micellar structure). Επιπλέον, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του πολυμερούς στα υδατικά διαλύματα των πολυπεπτιδίων λαμβάνουν χώρα “sol-to gel” μεταβάσεις. Στο σχήμα 9 που ακολουθεί απεικονίζονται οι αλλαγές στη διαμόρφωση της δομής του mPEG-L-PA συναρτήσει του μοριακού βάρους κάθε συστάδας. Οι παχιές και λεπτές γραμμές υποδεικνύουν τη συστάδα L-PA και τη συστάδα PEG, αντίστοιχα. [47]



Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση των αλλαγών στη διαμόρφωση της δομής του mPEG-L-PA ως συνάρτηση του μοριακού βάρους κάθε συστάδας.

Το ίδιο έτος, η ίδια ερευνητική ομάδα ανέφερε τη χρήση των θερμο-αποκρινόμενων πολυπεπτιδίων με αλανίνη, του τύπου Polyalanine-poloxamer-polyalanine (PA-PLX-PA) όπου PLX: Poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol) bis(2-aminopropyl ether) ως βάση για τη σύνθεση εξωκυτταρικών μηχανικών καλουπιών (ικριωμάτων) των χονδροκυττάρων. Τα υδατικά διαλύματα αυτών των πολυμερών υφίστανται “sol-to-gel” μεταβάσεις με την αύξηση της θερμοκρασίας ευνοώντας τον in situ σχηματισμό τρισδιάστατων κυττάρων στους 37 °C. Ειδικότερα, το ποσοστό της β-πτυχωτής δομής της συστάδας της πολυαλανίνης σχετίζεται με τον πληθυσμό και την πυκνότητα της ινώδους νανοδομής των υδρογέλων (hydrogels), η οποία με τη σειρά της επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την πρωτεϊνική έκφραση των εγκλωβισμένων στη γέλη χονδροκυττάρων. Το

ενέσιμο αυτό σύστημα χονδροκυττάρων εφαρμόστηκε *in vivo* σε ποντίκια και τα αποτελέσματα το καθιστούν ένα πολλά υποσχόμενο βιοϋλικό στη μηχανική ιστών. [48, 49]

Το 2012, πάλι η ομάδα του Jeong ανέφερε την χρήση των θερμο-αποκρινόμενων γελών (thermogels) (PEG-L-PA) ως τεχνητές μήτρες στις οποίες λαμβάνει χώρα η διαδικασία της ινοπλασίας (fibroplasias), μέσω εγκλωβισμού των ινοβλαστών στη γέλη. Στη διαδικασία αυτή συμπεριλαμβάνεται ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών, η παραγωγή νέου κολλαγόνου και η επούλωση της πληγής. Στα *in vitro* πειράματα, οι ερευνητές μελέτησαν την τρισδιάστατη δομή των ινοβλαστών και την ικανότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σχηματισμού δύο τύπων κολλαγόνου (I και III). Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με το εμπορικά διαθέσιμο Matrigel, απεδείχθη η υπεροχή του τεχνητού thermogel έναντι του εμπορικού Matrigel. Στα *in vivo* πειράματα διερευνήθηκε η ικανότητα επούλωσης πληγής σε τομή του δέρματος ποντικίου. Υδατικό διάλυμα του πολυμερούς με εγκλωβισμένα κύτταρα ινοβλαστών δόθηκε με ενέσιμη μορφή στην τομή της επιδερμίδας του ποντικίου και η γέλη σχηματίστηκε *in situ*. Το σύστημα αυτό συγκρίθηκε και με γέλη χωρίς εγκλωβισμένα ινοβλαστικά κύτταρα, αλλά και με γέλη με φωσφορικό αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα. Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των τριών αυτών διαφορετικών θερμο-αποκρινόμενων γελών έδειξαν ότι το thermogel με τα εγκλωβισμένα ινοβλαστικά κύτταρα όχι μόνο επιτάχυνε την επούλωση της πληγής, αλλά βελτίωσε και όλη τη διαδικασία σχηματισμού της επιδερμίδας, δίνοντας έμφαση στη δυναμική αυτού του thermogel ως ενέσιμο εξωκυτταρικό καλούπι στη μηχανική ιστών. [50]

Ακολουθώντας την ίδια συλλογιστική πορεία, η ομάδα κατά τα έτη 2013 και 2014 ανέφερε τη χρήση των πολυπεπτιδίων PEG-L-PA για εγκλωβισμό βλαστοκυττάρων προερχόμενων από λιπώδη ιστό [51] και μεσεγχυματικών αρχέγονων κυττάρων από τον μυελό των οστών [52]. Οι τρισδιάστατες αυτές κυτταρικές μήτρες δημιουργούνται μέσα στον οργανισμό, μετά από χορήγηση σε ενέσιμη μορφή των υδατικών διαλυμάτων τους, εξαιτίας της “*sol-to-gel*” μετάβασης που υφίστανται τα θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή το οποία μετατρέπονται σε γέλες στους 37 °C. Επομένως, τα thermogels αυτά

αποτελούν ελάχιστα επεμβατικά και πολλά υποσχόμενα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων και ικρίωματα μηχανικής ιστών.

Κατά τα έτη 2009 και 2012 η ίδια ομάδα με επικεφαλής τον Jeong ανέφερε τη σύνθεση του συμπολυμερούς Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(alanine-co-phenyl alanine) (PEG-PAF), το υδατικό διάλυμα του οποίου, παρόμοια με τα προηγούμενα συστήματα που μελετήθηκαν, υφίσταται “*sol-to-gel*” μετάβαση καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται (αντίστροφη θερμική ζελατινοποίηση). Το πολυπεπτίδιο αυτό σχηματίζει μικύλλια στο H₂O με υδρόφοβο πυρήνα PAF και υδρόφιλο περίβλημα PEG και αποκτά μία ενδιάμεση δομή μεταξύ β-πτυχωτής, η οποία ενισχύεται με αύξηση της θερμοκρασίας, και τυχαίου σπειραμάτος. Επιπλέον, υφίσταται διάσπαση στον υποδόριο ιστό των ποντικών παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων όπως η καθεψίνη B, η καθεψίνη C και η ελαστάση. Τέλος, οι ιδιότητές του το καθιστούν ένα πολυδύναμο σύστημα για χρήση στη μηχανική ιστών, στη θεραπεία βλαστοκυττάρων και στη μεταφορά φαρμάκων. Ως παραδείγματα μπορούν να αναφερθούν οι εφαρμογές του ως ενέσιμο σύστημα για απελευθέρωση της ινσουλίνης και της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης hGH. [53, 54]

Ο Jeong και οι συνεργάτες του το 2012 και 2013 ανέφεραν την επίδραση της στερεοχημείας σε ό,τι αφορά τις ιδιότητες και την θερμική αποκκρισιμότητα των πολυμερών PEG-PAF. Οι ερευνητές συνέθεσαν τα πολυπεπτίδια PEG-L-PAF και PEG-D-PAF και τα συνέκριναν μεταξύ τους καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά στην “*sol-to-gel*” μετάβαση και διαφορετική συμπεριφορά στην ιστοσυμβατότητα και τη βιοαποικοδομησιμότητα, καθώς μόνο το PEG-L-PAF διασπάται παρουσία των πρωτεολυτικών ενζύμων. [55] Επίσης, συνέθεσαν μία σειρά πολυπεπτιδίων PEG-PAF με μικτή σύνθεση από L- και D- αλανίνη και τα μελέτησαν ως προς την δευτεροταγή τους δομή, την θερμο-αποκκρισιμότητά τους και την βιοαποικοδομησιμότητά τους. [56]

Η σύνθεση μιας σειράς συμπολυμερών poly(L-Ala-co-L-Phe)-poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)-poly(L-Ala-co-L-Phe) (PAF-PLX-PAF) με διαφορετική αναλογία Ala/Phe και διαφορετικά μήκη αλυσίδων των συστάδων πραγματοποιήθηκε το 2009 από την ίδια ομάδα και

μελετήθηκε ως προς την θερμική αποκρυσιμότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα πολυμερή αυτά σχηματίζουν μικύλλια στο νερό και η “*sol-to-gel*” μετάβαση συνοδεύεται από μερική αφυδάτωση της συστάδας PLX και αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της συστάδας PAF από τυχαίο σπείραμα σε β-φύλλο. Το πλεονέκτημα αυτού του πολυμερούς είναι ότι εμφανίζει μεγάλη διάρκεια ως gel σε μεγάλη ποσότητα νερού. [57]

Το προηγούμενο έτος, το 2008, η ομάδα είχε αναφέρει τη σύνθεση συμπολυμερών του τύπου poly(Ala)-poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)-poly(Ala) (PA-PLX-PA) με διαφορετικά μοριακά βάρη των συστάδων PA και PLX και διαφορετικές αναλογίες L-Ala/DL-Ala. Τα πολυμερή αυτά υπόκεινται στη διαδικασία της αντίστροφής θερμικής ζελατινοποίησης με αύξηση της θερμοκρασίας και διασπώνται στον υποδόριο ιστό των ποντικών, γεγονός το οποίο τα καθιστά εν δυνάμει βιοϋλικά. [58]

Το 2011 η ομάδα παρουσίασε τη σύνθεση του συμπολυμερούς poly(alanine-co-leucine)-poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)-poly(alanine-co-leucine) (PAL-PLX-PAL). Το αμφίφιλο αυτό συμπολυμερές σχηματίζει μικύλλια στο νερό και υφίσταται “*sol-to-gel*” μετάβαση καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται διατηρώντας τη δευτεροταγή δομή της α-έλικας της συστάδας PAL. Επιπλέον, διασπάται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα ελαστάση και μήτρα μεταλλοπρωτεϊνών, αλλά όχι από τα ένζυμα καθεψίνη B, καθεψίνη C και χυμοθρυψίνη. Τέλος, δοκιμάστηκε ως εν δυνάμει σύστημα μεταφοράς φαρμάκων και απεδείχθη πολλά υποσχόμενο. [59]

Η σύνθεση ενός εμβολιασμένου συμπολυμερούς του τύπου poly(ethylene glycol)-poly(alanine) grafted chitosan (Cs-g-(PA-PEG)) προτάθηκε το 2011 από τον Jeong και τους συνεργάτες του. Εκμεταλλευόμενοι την αποκρυσιμότητα στο pH της χιτοζάνης και την θερμο-αποκρυσιμότητα του συμπολυμερούς PA-PEG κατάφεραν να συνθέσουν ένα νέο, διαφορετικό thermogel με αποκρυσιμότητα στο pH και τη θερμοκρασία. [60]

Το 2009, σε μία προσπάθεια αντικατάστασης της συστάδας PEG των πολυεπετιδίων με αλανίνη, η ομάδα του Jeong πρότεινε τη σύνθεση του συμπολυμερούς poly(N-vinyl pyrrolidone)-*b*-poly(alanine) (PVP-PA). Τα

αμφίφιλα αυτά συμπολυμερή με την υδρόφιλη συστάδα PVP και την υδρόφοβη συστάδα PA σχηματίζουν μικύλλια στο νερό και αυτά με τη σειρά τους συσσωματώνονται περαιτέρω αυξανόμενης της θερμοκρασίας ακολουθώντας την διαδικασία της αντίστροφης θερμικής ζελατινοποίησης. Έτσι, το PVP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό μέσο για την δημιουργία θερμο-αποκρινόμενων γελών με προοπτικές για βιο-εφαρμογές. [61]

Τέλος το 2012, σε μία καινοτόμο εργασία, ο Jeong και οι συνεργάτες του ανέφεραν τη σύνθεση του συμπολυμερούς PEG-poly(L-alanine)-azo-benzene-poly(L-alanine)-PEG (PEG-PA-Z-PA-PEG). Το πολυτεπτίδιο αυτό είναι ευαίσθητο τόσο στη θερμοκρασία όσο και στο φως. Υφίσταται αντιστρεπτές *trans-to-cis* ή *cis-to-trans* αλλαγές στη διαμόρφωση με έκθεση στο υπεριώδες (UV) ή στο ορατό (vis), αντίστοιχα και “*sol-to-gel*” μετάβαση αυξανόμενης της θερμοκρασίας. [62]

Το 2013 η ομάδα του Cameron ανέφερε τη σύνθεση αστεροειδών πολυμερών του τύπου $(PAla_n)_4$ -(StarPEG). Τα πολυμερή αυτά έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν υδρογέλες και να εγκλωβίζουν πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη, καθώς επίσης και να βιοδιασπώνται από πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η ελαστάση. Επομένως, αυτά τα υλικά έχουν πολλές δυνατότητες να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά, ως συστήματα μεταφοράς πρωτεϊνών και ως ικρίωματα για την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. [63]

Ο Cao και οι συνεργάτες του, το 2010, παρουσίασαν τη σύνθεση μίας σειράς αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών με διαφορετικά μοριακά βάρη του τύπου poly(N-isopropylacrylamide)-*b*-poly(L-alanine) (PNIPAAm-*b*-PAla). Τα πολυμερή αυτά μπορούν να αυτοοργανώνονται σε μικυλλιακές δομές και με αύξηση της θερμοκρασίας υπόκεινται στη διαδικασία της αντίστροφης θερμικής ζελατινοποίησης, γεγονός το οποίο τα καθιστά ιδανικά ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η ομάδα απέδειξε αυτή τους τη δυνατότητα εγκλωβίζοντας στον πυρήνα των μικυλλίων το αντικαρκινικό φάρμακο αδριαμικίνη. Η ελεγχόμενη και εκλεκτική αποδέσμευση του φαρμάκου που επιτεύχθηκε ανέδειξε το συμπολυμερές αυτό σε ένα καινοτόμο μεταφορέα φαρμάκων, κατάλληλο για στοχευμένη θεραπεία. [64]

Σε μία πρωτότυπη εργασία, το 2014, η ομάδα του Deng δημοσίευσε τη σύνθεση μιας υδρογέλης η οποία συνδυάζει την αποκρισιμότητα στο pH με την χειρομορφία του πολυπεπτιδίου. Η υδρογέλη που συντέθηκε με τη χρήση του ριζικού πολυμερισμού αποτελείται από poly(N-acryloyl-L-alanine) και β-κυκλοδεξτρίνη εμφανίζει διόγκωση σε υδατικό περιβάλλον, ευαισθησία στις μεταβολές του pH, και οπτική ενεργότητα και αποτελεί πολλά υποσχόμενο χειραλικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκων. [65]

Το 2008 η ομάδα με επικεφαλής τον Hadjichristidis παρουσίασε τη σύνθεση μιας σειράς πολυπεπτιδίων Poly(γ -benzyl-L-glutamate)-*b*-polyalanine (PBLG-*b*-PAla). Οι ερευνητές εφάρμοσαν συνδυαστικά διάφορες τεχνικές, θερμικές και τεχνικές που αποδίδουν τη δομή των πολυπεπτιδίων, με σκοπό να διερευνήσουν την επίδραση του θερμοδυναμικού πεδίου στη σταθερότητα και στη διατήρηση της δευτεροταγούς δομής της α -έλικας και του β -φύλλου. Τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξαν ήταν ότι η καθαρή PAla σταθεροποιεί και α -έλικα και β -πτυχωτή δομή, όμως στα συμπολυμερή η β -πτυχωτή δομή περιορίζεται, άρα η α -έλικα είναι πιο σταθερή δομή στην PAla. [66]

Ο Hamley και οι συνεργάτες του, το 2013, ανέφεραν τη σύνθεση μέσω μηχανισμού διάνοιξης δακτυλίου, ενός ολιγοπεπτιδίου το οποίο περιέχει 12 κατάλοιπα αλανίνης και 2 κατάλοιπα αργινίνης. Το επιφανειοδραστικού-τύπου πεπτιδίο σχηματίζει αντιπαράλληλα διμερή, τα οποία συσσωματώνονται σε «στριμμένα» ινίδια (twisted fibrils), δομή η οποία μπορεί να βρει ποικίλες εφαρμογές στη νανοβιοτεχνολογία. [67]

Το επόμενο έτος η ομάδα του Hamley παρουσίασε τη σύνθεση του επιφανειοδραστικού-τύπου πεπτιδίου (Ala)₁₀-(His)₆ το οποίο συσσωματώνεται σε αμυλοειδή ινίδια. Οι ερευνητές κατάφεραν επιτυχώς να συνδέσουν στα ινίδια αυτά νανοσωματίδια χρυσού (Nanogold) δίνοντας μία άλλη διάσταση στη δημιουργία νέων υβριδικών υλικών. [68]

Το 2015 ο Avgeropoulos και η ομάδα του δημοσίευσε τη σύνθεση ενός τρισυσταδικού συμπολυμερούς με κεντρική συστάδα αυτή του poly(L-glutamic acid) (PGA) και δύο ακραίες συστάδες poly(L-alanine) (PAla), (PAla₅-PGA₁₁-PAla₅). Αυτό το σύστημα είναι ευαίσθητο τόσο στις μεταβολές του pH όσο και

της θερμοκρασίας εξαιτίας των συστάδων PGA και PAla, αντίστοιχα. Επομένως, έχει πολλές προοπτικές για βιο-εφαρμογές ως θέρμο- και pH-αποκρινόμενη υδρογέλη. [69]

Το 2016 ο Ιατρου και οι συνεργάτες του παρουσίασαν τη σύνθεση καινοτόμων τηλεχηλικών πεπτιδίων, τα οποία αποτελούνται από μία κεντρική υδρόφιλη συστάδα πολυαιθυλενοξειδίου (PEO) ή πολυαλανίνης (PAla), και δύο ακραίες συστάδες από τριμερή ή πενταμερή τυροσίνης (Tyr_{3/5}). Αυτού του τύπου τα πολυπεπτίδια εμφανίζουν δομή β-πτυχωτής επιφάνειας και αυτο-οργανώνονται σε ινώδεις δομές. Αυτά τα πολυμερή δεν παρουσίασαν σχηματισμό υδρογελών, γεγονός το οποίο μελλοντικά μπορεί να αξιοποιηθεί στη χρήση αυτών των πεπτιδίων ως ενζυμο-αποκρίσιμα υλικά. [70]

2.9 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

2.9.1 Πολυαιθυλενοξειδίο (PEO)

Η πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (polyethylene glycol, PEG) είναι ένας γραμμικός ή διακλαδισμένος πολυαιθέρας, με ποικιλία μοριακών βαρών. Η PEG είναι γνωστή και ως πολυ(αιθυλενοξειδίο) (polyethylene oxide, PEO), και ως πολυ(οξυαιθυλένιο) (polyoxyethylene, POE) ανάλογα με το μοριακό της βάρος. Οι τρεις διαφορετικές ονομασίες είναι χημικά συνώνυμες, αλλά η ονομασία PEG προτιμάται στον βιοϊατρικό κλάδο, ενώ το όνομα PEO χρησιμοποιείται κυρίως στην χημεία των πολυμερών. Επιπλέον, το όνομα PEG αναφέρεται σε πολυμερή με μοριακά βάρη κάτω των 20.000 g/mol, το PEO σε πολυμερή με μοριακά βάρη άνω των 20.000 g/mol, ενώ το POE σε πολυμερή οποιουδήποτε μοριακού βάρους. Τα PEG και PEO, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος είναι υγρά ή στερεά χαμηλού σημείου τήξεως. Πιο συγκεκριμένα σε μοριακό βάρος μικρότερο από 1000 g/mol είναι ιξώδη και άχρωμα υγρά ενώ σε υψηλότερα μοριακά βάρη τα PEG είναι κηρώδη και λευκά στερεά. Το σημείο τήξεως είναι ανάλογο του μοριακού βάρους προσεγγίζοντας ένα όριο περίπου στους 67 °C. Η PEG παράγεται από τον ανιοντικό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου του οξειδίου του αιθυλενίου. Η έναρξη του πολυμερισμού λαμβάνει χώρα με την πυρηνόφιλη προσβολή ενός

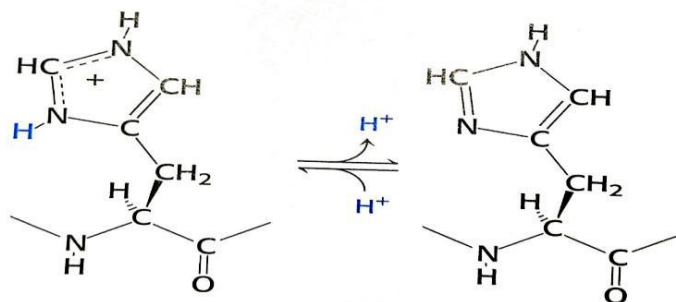
υδροξυλίου στον εποξειδικό δακτύλιο. Διαφορετικά είδη PEG μπορούν να συντεθούν, ανάλογα με το είδος του χρησιμοποιούμενου απαρχητή. Η πιο χρήσιμη μορφή της είναι η μονομεθόξυ- PEG (monomethoxy PEG, mPEG) με δομή $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$. Η PEG είναι διαλυτή στο νερό, τη μεθανόλη, την αιθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το βενζόλιο και το διχλωρομεθάνιο και είναι αδιάλυτη στον διαιθυλαιθέρα και το εξάνιο.

Η πολύ(αιθυλενογλυκόλη), μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλά επιστημονικά πεδία όπως τη βιο-φαρμακευτική, τη χημεία των επιφανειών, βιολογία και τη βιο-ιατρική. Είναι γνωστό ότι το PEO κατέχει την πρώτη θέση σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, εξαιτίας της υψηλής του ευκαμψίας, σταθερότητας του υδροφιλικότητας του, της μη τοξικότητας του, της βιο-αποικοδομισημότητας, αφού αφομοιώνεται και αποβάλλεται εύκολα από τον οργανισμό και της βιοσυμβατότητας του, καθώς δεν αλληλεπιδρά με της πρωτεΐνες του αίματος, οι οποίες χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα για την ειδική αναγνώριση των αντιγόνων. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό του PEO είναι ότι αυξάνει το χρόνο κυκλοφορίας του συστήματος στο αίμα. Τα τελευταία χρόνια το PEO είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη υδατοδιαλυτή συστάδα, στα αμφίφυλα κατά συστάδες συμπολυμερή. Αυτού του τύπου τα πολυμερή παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω του συνδιασμού των υδρόφιλων και των υδρόφοβων ιδιοτήτων τους και έχουν πιθανή εφαρμογή ως σταθεροποιητές διάχυσης, γαλακτωματοποιητές, συμβατοποιητές και στη μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων. [71-78]

2.9.2 Πολύ(Ιστιδίνη) (PHis)

Η L-ιστιδίνη (L- His) ως αμινοξύ κατέχει μια μοναδική ιδιότητα που το καθιστά ξεχωριστό ανάμεσα στα 20 φυσικά αμινοξέα. Λόγω αυτής της ιδιότητας, το πολυμερές της ιστιδίνης (Poly(L-His), PHis)) αποτελεί ένα πολυδύναμο εργαλείο με αξιοσημείωτες δυνατότητες, καθώς επίσης και ιδανικό πολυπεπτίδιο ως συστατικό σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η ξεχωριστή ιδιότητα που διαθέτει είναι η ομάδα ιμιδαζολίου, ένας αρωματικός δακτύλιος που μπορεί να φορτιστεί (Σχήμα 10). Στον ιμιδαζολικό δακτύλιο το μη υποκατεστημένο άζωτο φέρει ένα μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων, και μπορεί

να πρωτονιωθεί σε $pK_a \sim 6.5$. Έτσι, η ομάδα του ιμιδαζολίου μπορεί να είναι είτε φορτισμένη θετικά, είτε αφόρτιστη σε ουδέτερο pH, ανάλογα με το μικροπεριβάλλον στο οποίο θα βρεθεί, προσδίδοντας στο μόριο pH-αποκρισιμότητα.

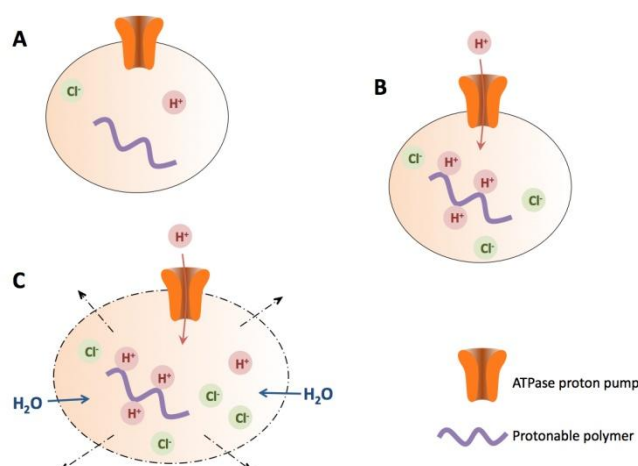


Σχήμα 10: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης).

Νανοφορείς οι οποίοι περιέχουν PHis έχουν την ικανότητα να ελέγχουν που θα μεταφερθούν τα φάρμακα μέσω της “*sol-to-gel*” pH-αποκρισιμότητας της ιστιδίνης. Πρακτικά, αυτό για ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων σημαίνει ότι σε $pH \sim 6.5$, δηλαδή το pH των καρκινικών κυττάρων, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της ιστιδίνης πρωτονιώνεται και προκαλείται διόγκωση στο σύστημα λόγω της αλλαγής της δευτεροταγούς δομής του πολυπεπτιδίου και άρα απελευθέρωση του φαρμάκου. Αντίθετα, στους υγιείς ιστούς που έχουν τιμή $pH = 7.4$ το μόριο είναι αποπρωτονιωμένο (υδρόφοβο) και απολύτως σταθερό. Η ιδιότητα αυτή της πολυ-ιστιδίνης την κάνει να πλεονεκτεί έναντι των περισσότερων pH-αποκρινόμενων μεταφορέων φαρμάκων, οι οποίοι επικεντρώνονται στην ενδοσωματική απόκριση του pH με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν το φάρμακο έξω από τα καρκινικά κύτταρα εξαιτίας του χαμηλού όξινου περιβάλλοντος, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου.

Μια ακόμη πολύ ενδιαφέρουσα ιδιότητα που εμφανίζει τόσο η ιστιδίνη όσο και η πολυ(L-ιστιδίνη), είναι το λεγόμενο “*proton sponge effect*”, κατά το οποίο ένα πολυμερές εισέρχεται στο κύτταρο με τη διαδικασία της ενδοκύτωσης και στη συνέχεια παγιδεύεται στο ενδόσωμα. Με την μεμβράνη των ενδοσωμάτων είναι συνδεδεμένη μία αντλία πρωτονίων, η οποία τα εφοδιάζει

συνεχώς με πρωτόνια, ειδικά όταν αντιληφθεί την ύπαρξη ξένου σώματος μέσα σε αυτά. Ένα πολυμερές όπως η πολυ(L-ιστιδίνη), που έχει τη δυνατότητα να πρωτονιωθεί, λαμβάνει αυτά τα πρωτόνια και έτσι η αντλία συνεχίζει να στέλνει πρωτόνια μέχρι να επιτευχθεί μείωση του pH. Η δράση αυτή της αντλίας, συνοδεύεται από παθητική είσοδο ιόντων χλωρίου, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ιόντων άρα και την εισροή νερού. Η υψηλή οσμωτική πίεση, οδηγεί σε διόγκωση και τελικά σε ρήξη των ενδοσωμάτων, απελευθερώνοντας όλο το περιεχόμενο στο κυτοσόλιο (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα ("proton sponge effect").

Άλλα πλεονεκτήματα της PHis είναι η ικανότητα σύνδεσης με μέταλλα όπως Au, Cu, Fe, Mn, Co, Ni καθώς και η δυνατότητα σχηματισμού σταθερών πολυϊοντικών συμπλεγμάτων, με αρνητικά φορτισμένα μόρια όπως είναι το DNA ή διάφορα ένζυμα, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Είναι φανερό, ότι η PHis συνδυάζει εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ιδιότητες, σχηματίζοντας μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, γεγονός το οποίο την καθιστά ένα ιδανικό μέσο για να χρησιμοποιηθεί σε βιολογικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς και πολλά υποσχόμενο εργαλείο στην αντικαρκινική θεραπεία. Παρόλο όμως τις ποικίλες ιδιότητες της, η ιστιδίνη παρουσιάζει ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα αυτό της ρακεμείωσης. Καθοριστικό παράγοντα στη μείωση της ρακεμείωσης αποτελεί η προστατευτική ομάδα. Οι προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση της PHis είναι είτε η benzyl προστατευτική ομάδα, είτε η 2,4-dinitrophenyl

προστατευτική ομάδα (DNP), όμως καμία δεν προσδίδει έλεγχο στη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών. Η benzyl προστατευτική ομάδα αποπροστατεύεται κάτω από πολύ δραστικές συνθήκες όπου μπορεί να προκαλέσει σπάσιμο του πεπτιδικού δεσμού ή ρακεμείωση ενώ η 2,4-dinitrophenyl προστατευτική ομάδα (DNP) δεν συνδυάζεται με δισουλφιδικούς δεσμούς αφού ο δεσμός αυτός σπάει κατά τη διάρκεια της αποπροστασίας του DNP με θειόλυση. Το 2014 η ερευνητική ομάδα του κ. Ιατρού ανέφερε τη σύνθεση της PHis με τρίτυλο προστατευτική ομάδα. Τα πλεονεκτήματα της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας είναι ότι εμφανίζει τη μικρότερη ρακεμείωση κατά την αποπροστασία και μπορεί να αποπροστατευτεί εύκολα με ασθενή οξέα. Επίσης, υπάρχει εκλεκτικότητα κατά την αποπροστασία της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας αφού οι άλλες προστατευτικές ομάδες δεν θα επηρεαστούν μόνο η τρίτυλο θα φύγει. Άλλο ένα χαρακτηριστικό της είναι ότι είναι πολύ σταθερή απέναντι σε ουδέτερα, αλκαλικά μέσα και ως προς τα πυρηνόφιλα. [79]

2.9.3 Αλανίνη

Η αλανίνη είναι το δεύτερο απλούστερο πρωτεϊνικό αμινοξύ, μετά τη γλυκίνη. Η χημικά καθαρή αλανίνη, στις κανονικές συνθήκες περιβάλλοντος, είναι λευκό κρυσταλλικό στερεό, αρκετά ευδιάλυτο στο νερό ($167,2 \text{ kg/m}^3$). Το μόριό της περιέχει μια α-αμινομάδα ($-\text{NH}_2$), που πρωτονιώνεται, υπό τις κανονικές βιολογικές συνθήκες, μια α-καρβοξυλομάδα ($-\text{COOH}$), που αποπρωτονιώνεται, καθώς και μια α-μεθυλομάδα (CH_3-). Ως αμινοξύ ταξινομείται στα «μη πολικά» ή «υδρόφοβα» αμινοξέα, ως προς τη διαλυτότητα της «πλευρικής αλυσίδας» της, καθώς και στα «μη απαραίτητα» για τους ανθρώπους, γιατί ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί ο ίδιος να τη συνθέσει, οπότε δεν είναι απαραίτητο να ληφθεί αυτούσια από την τροφή του. Η L-αλανίνη είναι ένα από τα 20 αμινοξέα που είναι κωδικοποιημένα για χρήση στις πρωτεΐνες από τον ανθρώπινο γενετικό κώδικα. Ακόμη, η L-αλανίνη είναι το δεύτερο αμινοξύ, μετά από μόνο τη L-λευκίνη, σε συχνότητα χρήσης της σε πρωτεΐνες, αφού αποτελεί (κατά μέσο όρο) το 7,8% της πρωτοταγούς δομής, σε δείγμα 1.150 πρωτεϊνών. Η D-αλανίνη, γνωστή ως β-αλανίνη, υπάρχει σε βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα, καθώς και σε κάποια

πεπτίδια αντιβιοτικών. Η β-αλανίνη (το 3-αμινοπροπανικό οξύ, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) δεν βρίσκεται στις πρωτεΐνες αλλά εμφανίζεται σε δύο φυσικά πολυπεπτίδια: καρνοσίνη και ανσερίνη, που βρίσκονται στο μαστοφόρο μυ. Είναι, ακόμη, ένα σημαντικό συστατικό του παντοθενικού οξέος (βιταμίνη B5).

2.10 Μοριακός χαρακτηρισμός

2.10.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών

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

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

- A. Να είναι πολύ καλά διαλυτή στον διαλύτη που χρησιμοποιείται στη διάταξη.
- B. Να μην αντιδρά με τον διαλύτη.
- Γ. Να μην αντιδρά με το μέσο διαχωρισμού.

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

Διάλυμα πολυμερούς διέρχεται μέσω στηλών οι οποίες περιέχουν ένα μέσο διαχωρισμού, συνήθως σφαιρικούς πόρους από δικτυωμένο πολυστυρένιο γνωστό με την εμπορική ονομασία styragel. Η πηκτή styragel διαθέτει πόρους το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από $60-10^7 \text{ \AA}$ (μέση διάμετρος). Το gel είναι πλήρως εμβαπτισμένο στον διαλύτη της διάταξης χωρίς την παρουσία αερίων. Όταν διάλυμα πολυμερούς εισέρχεται από τις στήλες, τα μόρια του πολυμερούς διέρχονται από τους πόρους οι οποίοι είναι αρκετά μεγάλοι ώστε αρκετά μεγάλα μόρια όπως είναι τα πολυμερή να χωρούν μέσα σε αυτούς. Επομένως, αφού οι στήλες είναι πακεταρισμένες με υλικό που παρουσιάζει κατανομή μεγέθους πόρων, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των πολυμερικών μορίων με βάση τη διαφορά μεγέθους τους. Τα μεγάλα μόρια περνούν από ελάχιστους πόρους με αποτέλεσμα να εκλούνται νωρίτερα από τα μικρότερα που λόγω του μικρού μεγέθους τους παραμένουν σε περισσότερους πόρους. Ουσιαστικά ο υδροδυναμικός όγκος είναι το μοριακό μέγεθος που καθορίζει τον χρόνο έκλουσης του πολυμερούς. Αν ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι καλός για κάποιο συγκεκριμένο πολυμερές τότε αυτό διογκώνεται και αποκτά όγκο (υδροδυναμικός όγκος). Έτσι καταλαβαίνουμε ότι μπορεί ο υδροδυναμικός όγκος να συνδεθεί άμεσα με τον χρόνο έκλουσης στην περίπτωση των γραμμικών μονομοριακών πολυμερών. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο με τα μίγματα ομοπολυμερών, συμπολυμερών και διακλαδισμένων ομοπολυμερών ή συμπολυμερών γιατί :

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

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

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών δεν είναι μία απόλυτη μέθοδος και ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση του χρωματογράφου με πρότυπα δείγματα. Αυτά περιλαμβάνουν συνήθως ομοπολυμερή πολυστυρενίου διαφορετικού μοριακού βάρους παρασκευασμένα με ανιοντικό πολυμερισμό για να εμφανίζουν στενές κατανομές προσδίδοντας στον χρωματογράφο μεγαλύτερη ακρίβεια στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και της κατανομής μοριακών βαρών ($I = M_w/M_n$). Αν κοιτάξει κανείς

την καμπύλη βαθμονόμησης, θα παρατηρήσει ότι αυτή παρουσιάζει μια περιοχή που εμφανίζει γραμμικότητα. Αυτή είναι και η περιοχή καλής ακρίβειας στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους. Σε πολύ μικρά ή πολύ μεγάλα μοριακά βάρη η διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου μικραίνει με αποτέλεσμα να μεγαλώνει η πιθανότητα σφάλματος που έτσι και αλλιώς αγγίζει στη GPC το 10%. Όπως προαναφέραμε, ένα διακλαδισμένο ομοπολυμερές (π.χ. αστέρι πολυστυρενίου) παρόλο που μπορεί να έχει το ίδιο μοριακό βάρος με ένα γραμμικό πολυστυρένιο, εκλούεται πρώτο αφού ο υδροδυναμικός του όγκος είναι μικρότερος. Αυτό καθιστά σαφές ότι ο χρόνος έκλουσης ενός πολυμερούς εξαρτάται άμεσα και από την αρχιτεκτονική κάτι που περιπλέκει τα πράγματα όσο αφορά στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους μέσω της SEC. Έπρεπε λοιπόν να βρεθεί ένας τρόπος για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα. Η λύση ήρθε από τον Άλμπερτ Αϊνστάιν ο οποίος πρώτος συσχέτισε τον χρόνο έκλουσης με το μοριακό βάρος M και το εσωτερικό ιξώδες $[\eta]$ σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$[\eta]M = 0.025N_A V_h$$

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

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

Ο ανιχνευτής UV χρησιμοποιείται όταν τα προς ανάλυση πολυμερή διαθέτουν κάποια χρωμοφόρο ομάδα η οποία απορροφά σε αυτήν την

περιοχή (συνήθως δουλεύουν μεταξύ 190 και 400 nm). Σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή DRI, δίνουν από κοινού πληροφορίες για τη σύσταση ενός συμπολυμερούς που διαθέτει κάποια συστάδα που απορροφά στην περιοχή του υπεριώδους. Μπορεί να λειτουργήσει κάτω από μέσες θερμοκρασίες και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται δεν θα πρέπει να απορροφούν στην περιοχή αυτή.

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

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

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

$$K_c/\Delta R_\theta = 1/M_w + 2A_2C + 3A_3C$$

(Με C συμβολίζουμε την κατά βάρος προς όγκο συγκέντρωση του πολυμερούς στο διάλυμα, A_2 και A_3 τον δεύτερο και τον τρίτο συντελεστή virial και με M_w το πραγματικό μοριακό βάρος).

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

Συμπεραίνουμε ότι η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί μία εύχρηστη και γρήγορη μέθοδο με τη βοήθεια της οποίας μπορεί να σχηματιστεί μία πρώτη εικόνα για το πολυμερές που παρασκευάστηκε, ως προς το μέσο μοριακό του βάρος, αλλά κυρίως προς την κατανομή μοριακών βαρών του και να εξαχθούν συμπεράσματα για την επίτευξη ή όχι της σύνθεσης του επιθυμητού μακρομορίου. [80-86]

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας όργανο αποτελούμενο από αντλία της Waters μοντέλο 510 και ανιχνευτές διαφορικού διαθλασίμετρου της Waters μοντέλο 401 και διοδική διάταξη UV-Vis. Η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στο 1 mL/min και ως φέρων διαλύτης χρησιμοποιήθηκε νερό.

2.10.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (infrared, IR) είναι μία από τις καλύτερες τεχνικές για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε είδους ουσίας και βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία και στην ανάλυση φαρμάκων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κλπ. Η περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας ή, όπως συνήθως αναφέρεται, το υπέρυθρο, εκτείνεται από το ορατό μέχρι τα μικροκύματα, 0,75-1000 μm . Για το χαρακτηρισμό του υπέρυθρου χρησιμοποιούνται μονάδες μήκους κύματος (L σε μm) και συνηθέστερα κυματαριθμού (ν σε cm^{-1}) που αλληλοσυνδέονται με

τις σχέσεις: ($1/\lambda = \nu$) και [ν (cm^{-1}) = $10^4/L$ (μm)]. Η περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας υποδιαιρείται στο εγγύς υπέρυθρο (0,75-2,5 μm , 1330-4000 cm^{-1}), το μέσο υπέρυθρο (2,5-25 μm , 4000-400 cm^{-1}) και το άπω υπέρυθρο (25-1000 μm , 400-10 cm^{-1}). Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη περιοχή είναι η μέση υπέρυθρη περιοχή. Η εγγύς υπέρυθρη περιοχή χρησιμοποιείται για ποσοτικούς προσδιορισμούς συγκεκριμένων ουσιών όπως το νερό, το διοξείδιο του άνθρακα, το θείο, υδρογονάνθρακες χαμηλού μοριακού βάρους, το αμινικό άζωτο και πολλές άλλες απλές ενώσεις που παρουσιάζουν ενδιαφέρον στη γεωργία και τη βιομηχανία. Η κύρια χρήση της άπω υπέρυθρης περιοχής αφορά στον προσδιορισμό των δομών ανόργανων και οργανομεταλλικών ουσιών. Τα φάσματα υπέρυθρου απεικονίζονται γραφικώς ως μεταβολή της διαπερατότητας (τεταγμένη) ή σπάνια της απορρόφησης, συναρτήσει του μήκους κύματος σε μm ή συνηθέστερα του κυματαριθμού σε cm^{-1} (τετμημένη).

Τα φάσματα απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης υπέρυθρου των διαφόρων ουσιών μπορούν να ερμηνευθούν θεωρώντας ότι οφείλονται σε μια ποικιλία ενεργειακών μεταβολών. Οι μεταβολές αυτές είναι αποτέλεσμα μεταπτώσεων των μορίων από μια δονητική ή μια περιστροφική ενεργειακή κατάσταση σε μια άλλη. Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας περιορίζεται στα μόρια στα οποία παρουσιάζονται μικρές ενεργειακές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δονητικών και περιστροφικών καταστάσεων. Ένα μόριο θα απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία μόνο εφόσον η διπολική ροπή του μορίου μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δονήσεως, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο υπέρυθρο. Για παράδειγμα, όταν δονούνται ή περιστρέφονται ομοπυρηνικά διατομικά μόρια, όπως τα O_2 , N_2 ή Cl_2 , δεν πραγματοποιείται καθαρή μεταβολή στη διπολική ροπή, οπότε τέτοιου είδους μόρια δεν απορροφούν στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος. Με εξαίρεση λίγων μορίων αυτού του είδους, όλα τα άλλα μόρια απορροφούν την υπέρυθρη ακτινοβολία και μάλιστα όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής τους ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση.

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

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

1. Περιοχή τάσεως υδρογόνου ($4000-2500\text{ cm}^{-1}$). Η απορρόφηση στην περιοχή αυτή προκαλείται από δονήσεις τάσεως των δεσμών C-H, O-H, N-H και S-H. Οι δεσμοί N-H και O-H απορροφούν στην περιοχή $3300-3650\text{ cm}^{-1}$, ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα 3000 cm^{-1} .
2. Περιοχή τάσεως τριπλού δεσμού ($2500-2000\text{ cm}^{-1}$). Στην περιοχή αυτή απορροφούν οι τριπλοί δεσμοί άνθρακα-άνθρακα και άνθρακα-αζώτου, καθώς επίσης και δύο διπλοί δεσμοί ($\text{C}=\text{C}$, $\text{N}=\text{C}=\text{O}$).
3. Περιοχή τάσεως διπλού δεσμού ($2000-1500\text{ cm}^{-1}$). Υπεύθυνες για την απορρόφηση στην περιοχή αυτή είναι οι δονήσεις των δεσμών $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$. Οι καρβονυλικές ομάδες απορροφούν γενικά στην περιοχή μεταξύ 1680 και 1750 cm^{-1} , ενώ η επιμήκυνση του δεσμού των αλκενίων εμφανίζεται συνήθως σε μια περιορισμένη περιοχή μεταξύ 1640 και 1680 cm^{-1} .
4. Περιοχή τάσεως και κάμψεως απλού δεσμού ($1500-700\text{ cm}^{-1}$). Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις, όπως π.χ. οι δονήσεις κάμψεως των δεσμών C-H και οι δονήσεις τάσεως και κάμψεως απλών δεσμών που συνδέουν ομάδες, όπως του μεθυλενίου, μεθυλίου και αμινομάδες, π.χ. C-C, C-O, C-N, C-X, C-S. Η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή των αποτυπωμάτων, επειδή το φάσμα στην περιοχή αυτή χαρακτηρίζει το μόριο ως σύνολο και αποτελεί κατά κάποιο τρόπο το δακτυλικό αποτύπωμα του μορίου.

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

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

Η τεχνική του IR εφαρμόζεται στα πολυπεπτίδια προκειμένου να διερευνηθεί ποιοτικά η επιτυχής σύνθεση είτε του N-καρβόξυανυδρίτη των αμινοξέων (συνήθεις δονήσεις έκτασης στα 1785 cm^{-1} και 1855 cm^{-1}), είτε για τη σύνθεση των πολυμερικών πεπτιδίων (δόνηση του αμιδικού δεσμού στα 1650 cm^{-1}). [87, 88]

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

2.10.3 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός

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

Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εκδηλώνουν όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων. Μόνο οι πυρήνες με άρτιο αριθμό νετρονίων και πρωτονίων δεν προξενούν μαγνητικά φαινόμενα ($I = 0$). Έτσι, οι πυρήνες πολλών ατόμων (^1H , ^{13}C) συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα (πυρηνικό spin, $I = 1/2$). Δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 . Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο. Όταν, όμως, ένα δείγμα που περιέχει αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ο πυρήνας μπορεί να διαταχθεί έτσι ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να είναι είτε παράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με κβαντικό μαγνητικό αριθμό spin, $m_I = 1/2$) είτε αντιπαράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με $m_I = -1/2$) προς το εξωτερικό πεδίο. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού.

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

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

$$H_{\text{πραγματικό}} = H_{\text{εφαρμοζόμενο}} - H_{\text{τοπικό}} \cdot$$

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

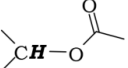


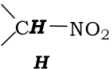
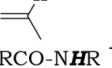


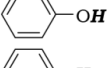

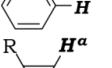

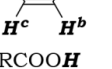


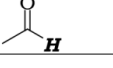

Συνέπεια των παραπάνω είναι ότι οι πυρήνες σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δίνουν διαφορετική γραμμή συντονισμού. Για να εκφραστούν με ενιαίο τρόπο οι μεταβολές των γραμμών συντονισμού, στους διάφορους πυρήνες, χρησιμοποιούνται πρότυπες ουσίες αναφοράς και εισάγεται η έννοια της χημικής μετατόπισης. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο [TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$], που έχει δώδεκα ισοδύναμα (άρα δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Η χημική μετατόπιση ορίζεται από τις σχέσεις:

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

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

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

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (ppm).

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

* Αφορούν σε ανταλλάξιμα πρωτόνια

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι κάθε διαφορετικός πυρήνας (π.χ. ^1H) θα σχηματίζει μία απλή κορυφή. Συχνό φαινόμενο αποτελεί, ωστόσο, η απορρόφηση ενός πυρήνα να διασπάται σε πολλαπλές κορυφές. Το φαινόμενο των πολλαπλών απορροφήσεων αποκαλείται σχάση spin – spin

και προκαλείται από την αλληλεπίδραση ή σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών πυρήνων. Εκτός από την ηλεκτρονιακή προστασία, το μαγνητικό πεδίο που υφίσταται ένας πυρήνας επηρεάζεται επίσης από τους γειτονικούς μαγνητικούς πυρήνες. Σύμφωνα με ένα γενικό κανόνα, που αποκαλείται κανόνας $n+1$, πυρήνες με n ισοδύναμους γειτονικούς πυρήνες εμφανίζουν $n+1$ κορυφές στο φάσμα του NMR. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος $(1+x)^n$. Έτσι για παράδειγμα, ένας πυρήνας που διαχωρίζεται από δύο άλλους γειτονικούς θα δίνει μια τριπλή κορυφή με εντάσεις κορυφών 1:2:1. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους κορυφών σε μία πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης και συμβολίζεται J . Η σταθερά σύζευξης είναι ίδια και για τους δύο πυρήνες, τα spin των οποίων συζεύγνυνται και δεν εξαρτάται από την ισχύ πεδίου του φασματοφωτόμετρου.

Τέλος, στη φασματοσκοπία ^1H -NMR και όχι στη ^{13}C -NMR (λόγω του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, Nuclear Overhauser Effect, NOE) το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι δυνατό να μετρήσουμε το σχετικό αριθμό των κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο. Με τον τρόπο αυτό εξάγονται ποσοτικά συμπεράσματα συγκρίνοντας το εμβαδόν χαρακτηριστικών κορυφών πρωτονίων ενός μορίου (π.χ. αν μία δραστική ομάδα έχει αντιδράσει με όλες τις μακρομοριακές αλυσίδες).

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

λαμβάνεται ένα φάσμα ανάλογο με αυτό που προκύπτει από τα φασματοφωτόμετρα συνεχούς κύματος. [89, 90]

Οι μετρήσεις της φασματοσκοπίας ^1H -NMR έγιναν σε διαλύτες δευτεριωμένο DMSO και TFA. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Varian Unity Plus 300/54.

2.10.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

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

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

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

όπου τ ο χρόνος καθυστέρησης (ή χρόνος δειγματοληψίας), t_0 ο αρχικός χρόνος, T ο χρόνος διεξαγωγής της μέτρησης. Εάν η B είναι μία αργοπορημένη μορφή της A τότε η παραπάνω εξίσωση αποτελεί συνάρτηση αυτοσυσχέτισης.

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

$$g(\tau) = A_0 + A \exp(-\Gamma t)$$

όπου $\Gamma = D_t q^2$ είναι η σταθερά παρακμής της συνάρτησης όπου χάνεται, δηλαδή η συσχέτιση των σημάτων, D_t ο συντελεστής διάχυσης και q το άνωμα σκέδασης. [91-93]

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⁺ (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.

2.10.5 Στατική Σκέδαση Φωτός

Στην στατική σκέδαση φωτός (Static Light Scattering, SLS), η μέση χρονική τιμή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, μετράται συναρτήσει της γωνίας σκέδασης θ και της συγκέντρωσης του διαλύματος c και εκφράζεται μέσω του λόγου Rayleigh, R_θ , ο οποίος ορίζεται ως:

$$R_\theta = \frac{d^2}{V f} \frac{I_s}{I_0} \quad (1)$$

όπου d είναι η απόσταση μεταξύ δείγματος και ανιχνευτή, V ο σκεδαζόμενος όγκος, f ο παράγοντας διόρθωσης ως προς το επίπεδο πόλωσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και I_s , I_0 οι εντάσεις της σκεδαζόμενης και προσπίπτουσας ακτινοβολίας, αντίστοιχα.

Σε ένα αραιό σύστημα, όπως για παράδειγμα ένα αέριο, τα μόρια κατανέμονται τυχαία στο χώρο και σε μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους, οπότε η συνεισφορά κάθε μορίου στην ένταση σκέδασης μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη του αριθμού τους. Στην περίπτωση όμως πυκνών συστημάτων,

όπως τα καθαρά υγρά και τα διαλύματα, τα μόρια βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις, οπότε η ακτινοβολία που σκεδάζεται από κάθε μόριο αλληλεπιδρά με εκείνη που προέρχεται από άλλα μόρια. Η πιθανότητα για καταστρεπτική συμβολή αυξάνεται και το φαινόμενο αυτό μειώνει την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Η περιγραφή του φαινομένου αυτού μπορεί να γίνει μέσω της θεωρίας των διακυμάνσεων Einstein-Smoluchowski, η οποία λαμβάνει υπόψη τις τοπικές διακυμάνσεις της διηλεκτρικής σταθεράς, σε κλίμακα της τάξης μεγέθους του μήκους κύματος, οι οποίες προέρχονται από διακυμάνσεις πυκνότητας σε ένα καθαρό υγρό και/ή από διακυμάνσεις συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η συνεισφορά των διακυμάνσεων συγκέντρωσης στη σκέδαση εκφράζεται μέσω της σχέσης:

$$\Delta R_{\theta} = R_{\theta, \text{διαλύματος}} - R_{\theta, \text{διαλύτη}} \quad (2)$$

Όπως φαίνεται στη σχέση (1), ο λόγος R_{θ} εξαρτάται από τη γεωμετρία της πειραματικής διάταξης. Για το λόγο αυτό στην πράξη υπολογίζεται ο απόλυτος λόγος R_{θ} , ο οποίος κανονικοποιείται ως προς πρότυπους διαλύτες όπως το τολουόλιο, ως εξής:

$$R_{\theta} = R_T \frac{n_0^2}{n_T^2} \frac{I_S}{I_{S,T}} \quad (3)$$

όπου R_T ο λόγος Rayleigh του τολουολίου, n_0 και n_T οι δείκτες διάθλασης του διαλύτη και του τολουολίου και I_S και $I_{S,T}$ οι εντάσεις της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας του διαλύματος και του τολουολίου, αντίστοιχα.

Στην περίπτωση των πολυμερικών διαλυμάτων, η διαφορά ΔR_{θ} συνδέεται με τα μοριακά χαρακτηριστικά του πολυμερούς και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του διαλύματος μέσω της εξίσωσης Zimm (4):

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right) + 2A_2 c \quad (4)$$

όπου M_w το μοριακό βάρος του πολυμερούς, R_g η γυροσκοπική ακτίνα του πολυμερούς, A_2 ο δεύτερος συντελεστής Virial, ο οποίος εκφράζει αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο μορίων και q το διάνυσμα σκέδασης, το οποίο

ορίζεται ως: (5)

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (5)$$

όπου λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η σταθερά K δίνεται από τη σχέση (6):

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \quad (6)$$

όπου N_A ο αριθμός του Avogadro και $\partial n / \partial c$ ο διαφορικός δείκτης διάθλασης.

Μέσω της εξίσωσης (4) και για μετρήσεις σε πολλαπλές γωνίες θ και συγκεντρώσεις c , προκύπτει το διάγραμμα Zimm. Από το διάγραμμα αυτό με διπλή προέκταση των μετρούμενων τιμών του λόγου $Kc/\Delta R_\theta$ σε μηδενική γωνία σκέδασης και μηδενική συγκέντρωση, εξάγεται το μοριακό βάρος M_w ως το αντίστροφο της κοινής τεταγμένης επί της αρχής, ενώ ο συντελεστής A_2 και η γυροσκοπική ακτίνα R_g υπολογίζονται από τις κλίσεις των ευθειών για $\theta = 0$ και $c = 0$, αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται από τη σχέση (6) ο διαφορικός δείκτης διάθλασης $\partial n / \partial c$ του πολυμερικού διαλύματος, είναι μια απαραίτητη παράμετρος για την ανάλυση των μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός. Η παράμετρος αυτή αποτελεί το μέτρο της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύματος συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης του πολυμερούς, είναι χαρακτηριστική του κάθε συστήματος πολυμερούς-διαλύτη και μετράται με τη χρήση διαφορικών διαθλασίμετρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση συμπολυμερών κατά συστάδες και διαλυμάτων που περιέχουν δύο ή περισσότερα συστατικά, τα οποία δεν παρουσιάζουν ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του διαλύματος ($\partial n / \partial c$) ολικό μπορεί να υπολογιστεί ως σταθμισμένος μέσος όρος των διαφορικών δεικτών διάθλασης ($\partial n / \partial c$)₁ και ($\partial n / \partial c$)₂ των επιμέρους συστατικών, ως εξής (7):

$$\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_{ολικό} = w_1 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_1 + w_2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_2 \quad (7)$$

όπου w_1 και w_2 τα κλάσματα βάρους των δύο συστατικών. [92]

2.10.6 Κυκλικός Διχρωϊσμός

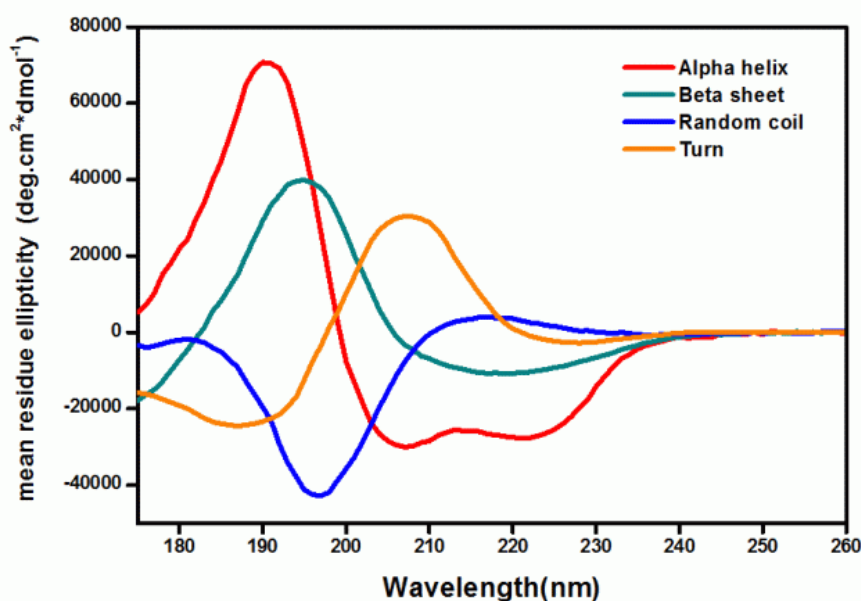
Ο κυκλικός διχρωϊσμός (circular dichroism, CD) αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως πολύτιμη τεχνική για την εξέταση της δομής των πρωτεϊνών σε διάλυμα. Το επίπεδα πολωμένο φως μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από 2 κυκλικά πολωμένα στοιχεία ίσου μεγέθους, όπου το ένα περιστρέφεται αριστερόστροφα (αριστερά, L) και το άλλο δεξιόστροφα (δεξιά, R). Ο κυκλικός διχρωϊσμός αναφέρεται στη διαφορική απορρόφηση αυτών των 2 συστατικών. Αν μετά τη διέλευση από το εξεταζόμενο δείγμα, τα συστατικά L και R δεν απορροφώνται ή απορροφώνται σε ίση εκτάση, ο ανασυνδυασμός των L και R θα αναγεννούσε ακτινοβολία πολωμένη στο αρχικό επίπεδο. Ωστόσο, εάν τα L και R απορροφώνται σε διαφορετική έκταση, η ακτινοβολία θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι κατέχει ελλειπτική πόλωση. Ένα σήμα κυκλικού διχρωϊσμού μπορεί να παρατηρηθεί όταν ένα χρωμοφόρο είναι χειρόμορφο (οπτικά ενεργό), για έναν από τους ακόλουθους λόγους: α) είναι εγγενώς χειραλικό λόγω της δομής του, για παράδειγμα, ένα άτομο C με 4 διαφορετικούς υποκαταστάτες, ή ένας δεσμός δισουλφιδίου που είναι χειρόμορφος λόγω των διεδρικών γωνιών του C-S-S-C των ατόμων της αλυσίδας, β) συνδέεται ομοιοπολικά με ένα χειρόμορφο κέντρο στο μόριο, ή γ) τοποθετείται σε ασύμμετρο περιβάλλον λόγω της τρισδιάστατης δομής που υιοθετείται από το μόριο. Στις πρωτεΐνες, τα χρωμοφόρα που μας ενδιαφέρουν περιλαμβάνουν τον πεπτιδικό δεσμό (απορρόφηση κάτω από 240 nm), αρωματικές πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων (απορρόφηση στο εύρος 260 έως 320 nm) και δισουλφιδικούς δεσμούς (αδύναμες ευρείες ζώνες απορρόφησης με κεντρικό άξονα γύρω από τα 260 nm). Τέλος, μπορεί να προκύψουν σήματα από υποκαταστάτες, οι οποίοι δεν έχουν ενδογενή χειρομορφία αλλά αποκτούν χειραλικότητα όταν συνδέονται σε ένα ασύμμετρο περιβάλλον, όπως αυτό που παρέχεται από μια πρωτεΐνη.

Τα όργανα του κυκλικού διχρωϊσμού (γνωστά ως φασματοπολτάμετρα) μετρούν τη διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ των L και R κυκλικά πολωμένων στοιχείων ($\Delta A = A_L - A_R$), αλλά αυτό γενικά αναφέρετε επίσης και σε όρους ελλειπτικότητας (ellipticity) (θ) σε μοίρες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι $\theta = \tan^{-1} (b / a)$ όπου b και a είναι ο ελάχιστος και ο μέγιστος άξονας της προκύπτουσας ελλείψεως. Υπάρχει μια απλή αριθμητική σχέση μεταξύ ΔA και ελλειπτικότητας (σε μοίρες), δηλαδή $\theta = 32,98 \Delta A$. Το φάσμα του κυκλικού διχρωϊσμού λαμβάνεται όταν ο διχρωϊσμός μετριέται ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι με τις οποίες το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού μπορεί να μετρηθεί: α) διαμόρφωση, στην οποία μεταδίδεται συνεχώς η προσπίπτουσα ακτινοβολία μεταξύ των συνιστωσών L και R, β) άμεση αφαίρεση, στην οποία οι απορροφήσεις των 2 συστατικών μετρώνται χωριστά και αφαιρούνται η μία από την άλλη και γ) ελλειψομετρική, στην οποία μετράται η ελλειπτικότητα της διαδιδόμενης ακτινοβολίας. Αν και οι μέθοδοι (β) και (γ) έχουν μερικά πλεονεκτήματα σε ό,τι αφορά το χρόνο μέτρησης του διχρωϊσμού, η μέθοδος της διαμόρφωσης είναι μακράν η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη. Σε ένα τέτοιο όργανο κυκλικού διχρωϊσμού το επίπεδα πολωμένο φως χωρίζεται στα L και R στοιχεία, μέσω διέλευσης από έναν διαμορφωτή, ο οποίος υποβάλλεται σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο (50 kHz είναι η συχνότητα που χρησιμοποιείται συχνότερα). Ο διαμορφωτής που συνήθως χρησιμοποιείται αποτελείται από ένα πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο χαλαζία και μια λεπτή πλάκα από ισότροπο υλικό (π.χ., πυρογενή διοξείδιο του πυριτίου) σφιχτά συνδεδεμένο με τον κρύσταλλο. Το εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί δομικές αλλαγές στον κρύσταλλο χαλαζία. Με αυτόν τον τρόπο, η πλάκα μεταδίδει κυκλικά πολωμένο φως στα άκρα του πεδίου. Καθώς μεταδίδεται η ακτινοβολία μεταξύ των L και R συστατικών, αυτά ανιχνεύονται με τη σειρά τους από τον φωτοπολλαπλασιαστή.

Θα πρέπει πάντα να θυμόμαστε ότι στις περισσότερες βιολογικές μελέτες τα παρατηρούμενα σήματα κυκλικού διχρωϊσμού είναι πολύ μικρά. Οι ελλειπτικές ιδιότητες είναι τυπικά στην περιοχή των 10 mdeg, που αντιστοιχούν σε διαφορά απορρόφησης ΔA της τάξης των 3×10^{-4} . Επομένως, είναι ιδιαίτερα

σημαντικό να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις πειραματικές συνθήκες προκειμένου να διασφαλιστεί η λήψη σωστών δεδομένων.

Οι πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από τη μελέτη των πρωτεϊνών με κυκλικό διχρωϊσμό είναι οι εξής: 1) Η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών (% έλικα, φύλλο, στροφές, κτλ.), η οποία ταυτοποιείται από την περιοχή του πεπτιδικού δεσμού. Η απορρόφηση στην περιοχή αυτή (240 nm και κάτω) οφείλεται κυρίως στον πεπτιδικό δεσμό. Υπάρχει μια αδύναμη αλλά ευρεία $n \rightarrow \pi^*$ μετατόπιση γύρω από τα 220 nm και μια πιο έντονη $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάβαση γύρω στα 190 nm. 2) Η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών. Τα φάσματα στην περιοχή 260-320 nm προκύπτουν από το αρωματικά αμινοξέα. Κάθε ένα από τα αμινοξέα τείνει να έχει ένα χαρακτηριστικό προφίλ μήκους κύματος. 3) Οι θέσεις δέσμευσης των συμπαραγόντων των πρωτεϊνών. 4) Συμπέρασμα σχετικά με τα χαρακτηριστικά της συνολικής δομής των πρωτεϊνών. 5) Μεταβολικές αλλαγές στις πρωτεΐνες. 6) Αναδίπλωση πρωτεϊνών. [94]



Εικόνα 11: Πρότυπο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

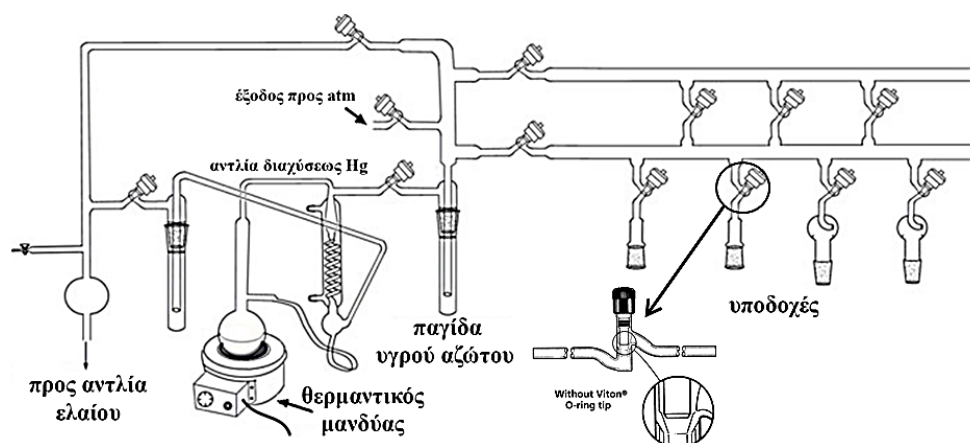
3.1 Τεχνική Υψηλού Κενού (High Vacuum Technique, HVT)

Η τεχνική υψηλού κενού, σε συνδυασμό με τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs είναι οι δύο μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την επιτυχή σύνθεση των πολυμερών της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Οι απαιτήσεις για τη σύνθεση μακρομορίων με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά, και στενές κατανομές μοριακών βαρών μπορούν να ικανοποιηθούν μόνο με τη χρήση αυτής της τεχνικής. Και αυτό γιατί η εφαρμογή υψηλού κενού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πολυμερισμού δίνει τη δυνατότητα επίτευξης αδρανούς ατμόσφαιρας και επομένως αποφυγής πρόωρου τερματισμού των αντιδράσεων από διάφορες ανεπιθύμητες προσμίξεις, σε όλα τα συνθετικά στάδια. Με την τεχνική υψηλού κενού απομακρύνεται ο ατμοσφαιρικός αέρας από τον αντιδραστήρα πολυμερισμού, ο οποίος περιέχει πλήθος ανεπιθύμητων προσμίξεων, όπως οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, υγρασία, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με τους χρησιμοποιούμενους απαρχητές και τις αναπτυσσόμενες αλυσίδες. Ιδιαίτερα, η απομάκρυνση της υγρασίας είναι απαραίτητη, καθώς το νερό ανάλογα με τη συγκέντρωση που βρίσκεται, μπορεί είτε να υδρολύσει τους NCAs, είτε να δράσει ως αργός απαρχητής πολυμερισμού. Επιπλέον, με κατάλληλες τεχνικές καθαρισμού αντιδραστηρίων και διαλυτών επιτυγχάνεται η απομάκρυνση από το σύστημα ανεπιθύμητων ουσιών, όπως αλκοόλες, αμίνες και οξέα, δραστικές προσμίξεις οι οποίες περιέχονται στα αντιδραστήρια που διατίθενται στο εμπόριο. Αξίζει να σημειωθεί, ότι όλες οι χρησιμοποιούμενες συσκευές είναι γυάλινες και έχουν κατασκευαστεί χειροποίητα με χρήση υαλουργίας, διότι εμπορικές συσκευές με εσφυρίσματα ενέχουν τον κίνδυνο διαρροής και εισαγωγής στον αντιδραστήρα υγρασίας και άλλων προσμίξεων από τον αέρα.

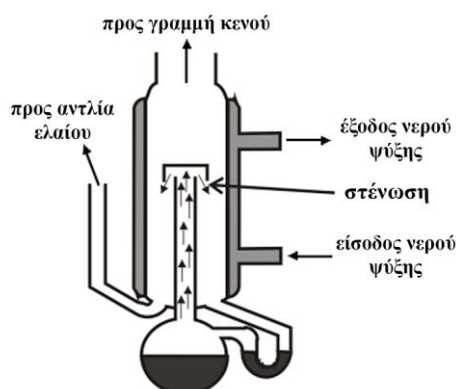
Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από γυάλινους σωλήνες (Pyrex), στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (Rotaflon HP 10 mm, 10^{-8} mm Hg), μία αντλία ελαίου και μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου (Σχήμα 11). Η αντλία

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. Ο υδράργυρος θερμαίνεται με τη βοήθεια ενός θερμαντικού μανδύα και 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 12).



Σχήμα 11: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού.



Σχήμα 12: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου.

Οι αντλίες ελαίου και διαχύσεως προστατεύονται από πτητικά συστατικά με παγίδες υγρού αζώτου. Με τις στρόφιγγες, το κενό εφαρμόζεται στα επιθυμητά τμήματα της γραμμής, ενώ τα υπόλοιπα τμήματα μένουν απομονωμένα. Η γραμμή κενού περιλαμβάνει πολλές εξόδους με εσφυρίσματα, μέσω των οποίων συνδέονται οι διάφορες συσκευές και γίνεται η εισαγωγή και η απόσταξη των αντιδραστηρίων (διαλύτες, μονομερή). Πριν χρησιμοποιηθεί η γραμμή κενού για απαέρωση, πρέπει να τεθεί σε λειτουργία η αντλία ελαίου, να προσαρμοστεί σ' αυτήν η κενή συσκευή πολυμερισμού και να ανιχνευθεί τυχόν ύπαρξη μικροοπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla. Μόνο όταν εξασφαλιστεί απόλυτη στεγανότητα η γραμμή είναι έτοιμη για τη διεξαγωγή της διαδικασίας απομάκρυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα από οποιοδήποτε προς πολυμερισμό σύστημα. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται εύκολα, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) ή λουτρό ισοπροπανόλης – ξηρού πάγου ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ο χειρισμός της γραμμής κενού και οι απαραίτητες προφυλάξεις αναφέρονται εκτενώς στη βιβλιογραφία. [95-97]

3.2 Καθαρισμός Διαλυτών

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις πολυμερισμού είναι εμπορικά διαθέσιμοι και υπόκεινται σε διαδικασίες καθαρισμού προκειμένου να απομακρυνθούν ίχνη υγρασίας, οξυγόνου αλλά και άλλων προσμίξεων που τυχόν υπάρχουν και οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν πρόωρο

τερματισμό του πολυμερισμού. Η συνήθης διαδικασία καθαρισμού περιλαμβάνει την απομάκρυνση της υγρασίας με τη βοήθεια κάποιου ξηραντικού μέσου και εν συνεχεία την απαέρωση και απόσταξη των διαλυτών υπό κενό. Ακολούθως παρατίθενται οι διαδικασίες καθαρισμού των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία: [95-97]

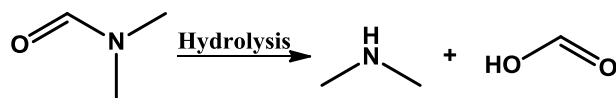
Βενζόλιο:

Η πιο συνηθισμένη πορεία για τον καθαρισμό του εμπορικά διαθέσιμου βενζολίου είναι η εξής: Αρχικά, το βενζόλιο προστίθεται σε θειϊκό οξύ H_2SO_4 και αφήνεται υπό ανάδευση στον απαγωγό για μία εβδομάδα προκειμένου να απομακρυνθούν το θειοφένιο και άλλες ενώσεις όπως το τολουόλιο και βινυλο-ενώσεις. Στη συνέχεια εκπλύνεται πολλές φορές με υδατικό διάλυμα NaOH και νερό, οπότε σχηματίζονται δύο φάσεις μιας διαυγής και μια σκούρα. Η επιθυμητή φάση είναι η διαυγής, οπότε προστίθεται σε αυτή λεπτότατα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2) και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα για την απομάκρυνση ιχνών νερού και υγρασίας. Ακολούθως, η φιάλη που περιέχει το βενζόλιο με το υδρίδιο του ασβεστίου προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα το βενζόλιο έχει ψυχθεί σε όλη του τη μάζα με χρήση υγρού αζώτου, απαερώνεται και αποστάζεται σε γειτονική βαθμονομημένη κυλινδρική φιάλη, η οποία περιέχει ήδη μικρή ποσότητα κανονικού βουτυλολιθίου ($n\text{-BuLi}$) και στυρενίου, τα οποία αντιδρούν με τις όποιες τυχόν προσμίξεις έχουν παραμείνει. Το ζωντανό πολυστυρολίο (PSLi) έχει έντονο πορτοκαλί χρώμα το οποίο διατηρείται μετά την απόσταξη σε αυτό του βενζολίου, γεγονός το οποίο αποτελεί ένδειξη για την καθαρότητα του διαλύτη. Τέλος, η ποσότητα CaH_2 της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF):

Το DMF αποτελεί το διαλύτη του πολυμερισμού των N-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων, ενώ χρησιμοποιείται επίσης για την αραίωση του απαρχητή. Το DMF υπόκειται σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική του αποικοδόμηση παράγεται διμεθυλαμίνη (DMA) και μονοξειδίο του άνθρακα. Επίσης υδρολύεται αργά παρουσία νερού, παράγοντας DMA και

φορμικό οξύ, συστατικά που του αποδίδουν και την χαρακτηριστική οσμή του (Σχήμα 13).



Σχήμα 13: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ.

Η παραγωγή DMA είναι μία διαδικασία που πρέπει να αποφεύγεται, καθώς κατά την διάρκεια του πολυμερισμού των NCAs μπορεί να δράσει ως απαρχητής, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα. Το DMF φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box και μεταγγίζεται σε φιάλη με στρόφιγγα, που πριν έχει ξηρανθεί στη γραμμή υψηλού κενού και περιέχει CaH_2 . Αφήνεται να αντιδράσει για μισή ώρα, απεερώνεται και αποστάζεται σε διπλανή φιάλη κλασματικά. Το πρώτο και το τελευταίο κλάσμα του διαλύτη απορρίπτονται πάντα κατά την απόσταξη και συλλέγονται μόνο τα μεσαία κλάσματα. Το απεσταγμένο DMF που λαμβάνεται, φυλάσσεται στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$, προστατευμένο από το φως. Επίσης πρέπει να καταναλωθεί το συντομότερο δυνατόν από την ημέρα καθαρισμού του.

Οξικός Αιθυλεστέρας (EtOAc):

Ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται ως διαλύτης τόσο για τη σύνθεση των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs) από τα αντίστοιχα α-αμινοξέα όσο και για τις ανακρυσταλλώσεις τους. Ο εμπορικά διαθέσιμος διαλύτης αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε σφαιρική φιάλη 2L με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5) για μια ημέρα, οπότε ο διαλύτης αποκτά ένα ασθενές μαύρο χρώμα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού, απεερώνεται και εν συνεχεία τα μεσαία κλάσματα του διαλύτη αποστάζονται σε διπλανή σφαιρική φιάλη 2L με στρόφιγγα. Μετά το πέρας της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση του διαλύτη.

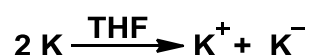
Εξάνιο:

Το εξάνιο χρησιμοποιείται ως μη διαλύτης κατά τη διαδικασία των ανακρυσταλλώσεων για τον καθαρισμό των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs). Ο καθαρισμός του εμπορικά διαθέσιμου εξανίου περιλαμβάνει αρχικά την κατεργασία του με μικρή ποσότητα λεπτότατα

διαμερισμένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2) για μια ημέρα σε σφαιρική φιάλη 2L, για την απομάκρυνση ιχνών υγρασίας. Ακολούθως, πραγματοποιείται απαέρωση και απόσταξη του διαλύτη στη γραμμή υψηλού κενού σε γειτονική σφαιρική φιάλη 2L, που περιέχει μικρή ποσότητα κανονικού βουτυλολιθίου ($n\text{-BuLi}$), το οποίο αντιδρά με τυχόν προσμίξεις, ενώ μετά το τέλος της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση. Η ποσότητα CaH_2 της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

Τετραϋδροφουράνιο (THF):

Αρχικά, το εμπορικά διαθέσιμο τετραϋδροφουράνιο αφήνεται να αντιδράσει για μία ημέρα 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 χαρακτηριστικού έντονου κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη υψηλής καθαρότητας του συγκεκριμένου διαλύτη. 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 διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

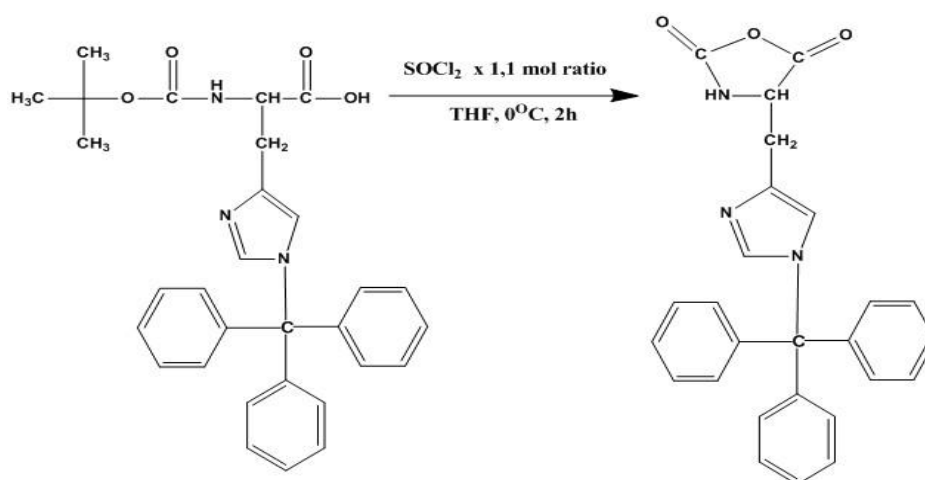


3.3 Σύνθεση και καθαρισμός N-Καρβοξυανυδριτών.

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

3.3.1 Σύνθεση N^{im}-Trt-(L)-His-NCA

Η σύνθεση του μονομερούς N^{im}-trityl-(L)-His NCA πραγματοποιείται σε δύο στάδια και διαρκεί περίπου τρεις ημέρες. Στο πρώτο στάδιο παραλαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας του N^{im}-trityl-(L)-His NCA και στη συνέχεια απομακρύνοντας το HCl παραλαμβάνεται το καθαρό μονομερές N^{im}-trityl-(L)-His NCA. Για την σύνθεση χρησιμοποιείται θειόνυλο χλωρίδιο αντι του τριφωσγενίου σε μια τροποποιημένη πορεία (Σχήμα 14). [79, 98]



Σχήμα 14: Αντίδραση σύνθεσης N^{im}-trityl-(L)-His NCA.

• Σύνθεση N^{im}-Trt-(L)-His-NCA·HCl

1. Μία δίλαιμη σφαιρική φιάλη 1L που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού (High vacuum line, HVL), απαερώνεται και απομακρύνεται από αυτήν η υγρασία κάνοντας τρία flame drying. Στη συνέχεια, προστίθενται σε αυτήν 20g (40.2 mmol, MB=497.58 g/mol) Boc-His(Trt)-OH, υπό ροή αργού, και η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή κενού προς ξήρανση του στερεού για μια μέρα.

2. Την επόμενη μέρα αποστάζονται ~150 ml καθαρού THF στη φιάλη με την Boc-His(Trt)-OH, και στο τέλος της απόσταξης λαμβάνει χώρα απαέρωση. Το στερεό διαλύεται αμέσως στο THF, δίνοντας ένα διαυγές και ελαφρώς υποκίτρινο διάλυμα. Μετά το πέρας της απόσταξης, η φιάλη απομακρύνεται

από τη γραμμή και ξεπαγώνει με νερό βρύσης. Έπειτα, τοποθετείται αργό μέσα στη συσκευή. Το αργό είναι βαρύ και αδρανές αέριο, επομένως παραμένει πάνω από το διάλυμα, αποτρέποντάς το να έρθει σε επαφή με την υγρασία και τον αέρα.

3. Εν συνεχεία η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό και προετοιμάζεται η διάταξη για την αντίδραση. Ακολουθεί τοποθέτηση της φιάλης σε παγόλουτρο (0°C), ώστε να επιβραδυνθούν πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις, και στη μία είσοδο της προσαρμόζεται κατάλληλο επίθεμα για συνεχή παροχή αργού, ενώ στη δεύτερη είσοδο της φιάλης προσαρμόζεται γυάλινο σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα, το οποίο έχει πρώτα ξηρανθεί σε φούρνο (150°C). Παράλληλα, σε άλλη σφαιρική φιάλη των 50 mL, αποστάζονται μέσω της γραμμής υψηλού κενού περίπου 20 mL καθαρού THF και μεταγγίζονται στο σταγονομετρικό χωνί της συσκευής. Ακολούθως στο χωνί προστίθενται με χρήση σύριγγας και διαλύονται 3.25 mL θειόνυλο χλωριδίου (SOCl_2 , 44.2 mmol, MB=118.97 g/mol, $d=1.631\text{ g/mL}$), δηλαδή 1.1 φορές τα mol της Boc-His(Trt)-OH.

4. Το θειόνυλο χλωρίδιο SOCl_2 , το οποίο είναι ήδη διαλυμένο σε καθαρό THF (~20ml), χρησιμοποιείται ως μέσο χλωρίωσης κατά την αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA και προστίθεται στάγδην υπό ροή αργού. Η προσθήκη του SOCl_2 πρέπει υποχρεωτικά να γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία, διότι σε υψηλές θερμοκρασίες υπάρχει ο κίνδυνος της απόσπασης των τρίτυλο-προστατευτικών ομάδων. Η προσθήκη ολοκληρώνεται μέσα σε περίπου 20 λεπτά και έπειτα το σταγονομετρικό χωνί αποσπάται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και η αντίδραση διατηρείται για 2.5 ώρες. Στο τέλος αυξάνεται η ροή του αργού. Όταν ολοκληρώνεται η προσθήκη, το διάλυμα αποκτά ένα ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα και το ιξώδες αυξάνεται σταδιακά. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδος της.

5. Στο σημείο αυτό, στη φιάλη της αντίδρασης υπάρχουν ο $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-His NCA}$, το υδροχλωρικό άλας του NCA ($\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-His NCA}\cdot\text{HCl}$) αλλά και ποσότητα της αρχικής ένωσης Boc-His(Trt)-OH που δεν έχει αντιδράσει. Για το λόγο αυτό το περιεχόμενο της αντίδρασης μεταγγίζεται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει

περίπου 2L διαιθυλαιθέρα, ποσότητα περίπου δεκαπλάσια σε σχέση με αυτήν του THF. Στον διαιθυλαιθέρα παραμένει διαλυτή η μικρή ποσότητα της πρόδρομης ένωσης της ιστιδίνης και η περίσσεια του SOCl_2 , ενώ καταβυθίζεται ως ίζημα το υδροχλωρικό άλας του NCA, το οποίο αποτελεί το κύριο προϊόν. Τα κύρια προϊόντα της αντίδρασης $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-His NCA}\cdot\text{HCl}$ και $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-His NCA}$ διαχωρίζονται από τα παραπροϊόντα μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner (φίλτρο No 3). Η διήθηση πραγματοποιείται υπό συνεχή παροχή αργού, ώστε να υπάρχει ασφαλές περιβάλλον για τον ανυδρίτη. Το διήθημα απορρίπτεται ενώ το υποκίτρινο στερεό (κύρια προϊόντα) που παραμένει στο φίλτρο συλλέγεται σε άδεια σφαιρική φιάλη 500 mL, που έχει πρώτα υποστεί flame-drying, και αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

6. Ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού του N-καρβοξυανυδρίτη, ένα από τα πιο σημαντικά στάδια για την παραλαβή καθαρού μονομερούς. Ο καθαρισμός περιλαμβάνει ανακρουστώσεις από σύστημα οξικού αιθυλεστέρα/ n-εξανίου. Αποστάζονται ~300 ml EtOAc στη φιάλη με το στερεό, οπότε προκύπτει ένα πυκνό κιτρινωπό γαλάκτωμα. Η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού, μεταφέρεται σε απαγωγό και αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου μία ώρα μέσα σε υδρόλουτρο στους ~45 °C. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι καλός διαλύτης για το αρχικό αμινοξύ, το ενδιάμεσο χλωρίδιο αλλά και το ελεύθερο μονομερές, ενώ αποτελεί κακό διαλύτη για το υδροχλωρικό άλας της $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-(L)-His}$. Εν συνεχεία το διάλυμα ψύχεται σε παγόλουτρο στους 0 °C για περίπου 15 λεπτά, ώστε να καταβυθιστεί ποσοτικά το στερεό $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-(L)-His}\cdot\text{HCl NCA}$.

7. Το διάλυμα διηθείται υπό κενό σε χωνί Buchner (με γυάλινο φίλτρο No 3) και παραλαμβάνεται ως μοναδικό προϊόν το $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-(L)-His}\cdot\text{HCl NCA}$. Το στερεό που έχει παραμείνει στο φίλτρο ξεπλένεται με ποσότητα EtOAc προς απομάκρυνση τυχόν προσμίξεων και έχει υφή πουδρας και λευκό χρώμα. Η διήθηση γίνεται σχετικά γρήγορα και με προσοχή, ενώ παράλληλα εφαρμόζεται ήπια ροή αργού ή αζώτου για να εμποδιστεί η επαφή του τελικού προϊόντος με τον ατμοσφαιρικό αέρα και την υγρασία. Τέλος, συλλέγεται σε

προζυγισμένη σφαιρική φιάλη 500 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

- **Σύνθεση του N^{im} -trityl-His NCA**

Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο σύνθεσης του N-καρβοξυανυδρίτη (L)-ιστιδίνης, το οποίο απαιτεί εξαιρετική προσοχή καθώς υπάρχει ο κίνδυνος έναρξης πολυμερισμού.

8. Την επόμενη ημέρα ζυγίζεται η φιάλη με το ξηρό πλέον στερεό (14.61 g, 31.8 mmol, MB=459.5 g/mol) και έπειτα αποστάζονται σ' αυτή 200 mL EtOAc. Αφού ληφθεί η απαιτούμενη ποσότητα του διαλύτη, η φιάλη απομακρύνεται από την HVL και τοποθετείται σε υδατόλουτρο (25 °C) όπου αφήνεται 1 ώρα υπό ανάδευση. Με την προσθήκη του διαλύτη στο στερεό δεν διαλύεται τίποτα απλά προκύπτει ένα λευκό γαλάκτωμα. Ακολούθως, η φιάλη γεμίζεται με αργό και τοποθετείται μέσα σε παγόλουτρο στους 0 °C.

9. Στη συνέχεια τιτλοδοτείται η ποσότητα του N^{im} -Trt-(L)-His*HCl NCA με ισομοριακή ποσότητα τριαιθυλαμίνης (Et_3N), έτσι ώστε να δεσμευτεί το HCl από το άλας του NCA, δίνοντας το τελικό προϊόν του καθαρού N^{im} -Trt-(L)-His NCA. Έτσι, σε καθαρή σφαιρική φιάλη των 50 mL, στην οποία έχει γίνει προηγουμένως flame-drying, αποστάζονται περίπου 20 mL EtOAc μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Σε αυτό τον όγκο διαλύτη θα πραγματοποιηθεί αραίωση της ποσότητας Et_3N που θα χρησιμοποιηθεί στην διαδικασία της τιτλοδότησης ώστε να μην δημιουργηθεί τοπική περίσσεια κατά την προσθήκη της στη φιάλη της αντίδρασης. Παράλληλα, αποστάζεται στη γραμμή υψηλού κενού μικρή ποσότητα (~6 mL) καθαρής Et_3N σε κατάλληλη απαερωμένη συσκευή που φέρει στρόφιγγα. Η φιάλη που περιέχει το υδροχλωρικό άλας του NCA τοποθετείται σε λουτρό με παγόνερο (0 °C), ενώ προσαρμόζονται σε αυτή με χρήση κατάλληλων επιθεμάτων, συνεχής παροχή αργού και γυάλινο σταγονομετρικό χωνί με στρόφιγγα, το οποίο έχει πρώτα ξηρανθεί σε φούρνο (150 °C). Τα 20 mL του EtOAc και 4.434 mL Et_3N (31.8 mmol, MB=101.19 g/mol, d=0.7255 g/mL) (1:1 ποσότητα σε σχέση με τα mol του άλατος N^{im} -Trt-(L)-His*HCl NCA) διαλύονται στο σταγονομετρικό χωνί και η προσθήκη του διαλύματος γίνεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε χρονικό διάστημα

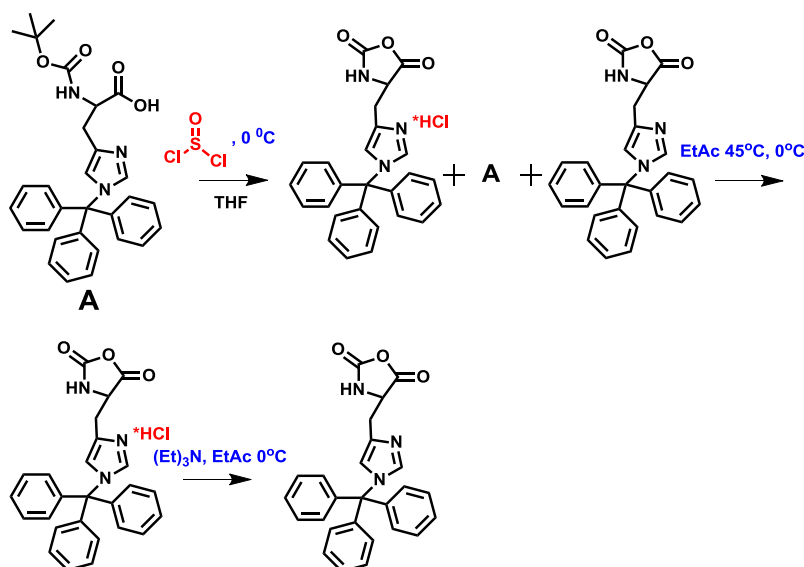
περίπου 15 min, για να μη συμβεί έναρξη του πολυμερισμού και να μη δημιουργηθεί τοπική περίσσεια τριαιθυλαμίνης. (Η ποσότητα της χρησιμοποιούμενης Et₃N λαμβάνεται ως εξής: Υπολογίζεται πως στη φιάλη υπάρχουν 0.031791 mol από τον NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο ($14.608 \text{ g} / 459.14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} = 0.031791 \text{ mol}$). Το μοριακό βάρος της τριαιθυλαμίνης είναι $101.19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Άρα χρειάζονται $101.19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \times 0.031791 \text{ mol} = 3.2169 \text{ g}$ Et₃N. Η πυκνότητα της Et₃N είναι $0.7255 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Από τον τύπο της πυκνότητας $m = d \cdot V$ υπολογίζονται 4.434 mL Et₃N. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται για μία ώρα και παρατηρείται χαρακτηριστική αλλαγή του χρώματος του διαλύματος που είναι ενδεικτική του σχηματισμού του τελικού προϊόντος. Το υδροχλωρικό άλας της τριαιθυλαμίνης (Et₃N·HCl) που προκύπτει ως παραπροϊόν είναι αδιάλυτο στον EtOAc (σχηματισμός ιζήματος), ενώ ο N^{im}-Trt-(L)-His NCA παραμένει διαλυτός. Συνεπώς, ο διαχωρισμός των δύο ενώσεων πραγματοποιείται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner.

10. Σε δίλαιο σφαιρική φιάλη 2L, η οποία έχει υποστεί προηγουμένως flame drying στη γραμμή υψηλού κενού, προστίθενται περίπου 1.5L απεσταγμένου εξάνιου και προσαρμόζεται σ' αυτή διηθητικό χωνί στο οποίο διηθείται το περιεχόμενο της παραπάνω φιάλης. Στο χωνί απομονώνεται το στερεό άλας Et₃N·HCl, ενώ το διήθημα οδηγείται στο εξάνιο, όπου καταβυθίζεται ο καθαρός πλέον N^{im}-Trt-(L)-His NCA.

11. Το προηγούμενο διήθημα με το εξάνιο και τον αδιάλυτο N^{im}-Trt-(L)-His NCA διαχωρίζεται με διήθηση σε άλλη φιάλη 2L, στην οποία έχει προσαρμοστεί χωνί Buchner, οπότε η ποσότητα του NCA παραμένει στο φίλτρο. Οι διηθήσεις πραγματοποιούνται υπό συνεχή παροχή αργού. Το λευκό στερεό που προκύπτει συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη των 250 mL, η οποία έχει πρώτα υποστεί flame-drying, και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

12. Την επόμενη ημέρα, η φιάλη απομακρύνεται από την HVL και μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και στη συνέχεια φυλάσσεται ο τελικός N^{im}-Trt-(L)-His NCA (12.1 g, 28.57 mmol, απόδοση=71.1%). Η πορεία των

αντιδράσεων που ακολουθείται για τη σύνθεση του N^{im} -trt-(L)-His NCA συνοψίζεται στο Σχήμα 15.

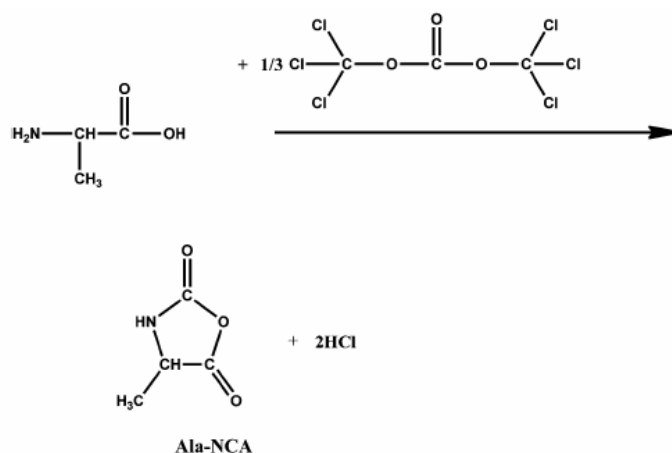


Σχήμα 15: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του N^{im} -Trt-(L)-His NCA.

Ο έλεγχος της επιτυχούς σύνθεσης του N^{im} -trt-(L)-His NCA γίνεται καθ' όλη τη διάρκεια της συνθετικής πορείας με τη λήψη φασμάτων FT-IR και επιβεβαιώνεται τελικά με τη χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και τη λήψη του τελικού φάσματος 1H -NMR.

3.3.2 Σύνθεση L-Alanine NCA

Η σύνθεση του N-καρβόξυ ανυδρίτη της L-αλανίνης (Ala-NCA) πραγματοποιείται με αντίδραση του αντίστοιχου L-αμινοξέος με τριφωσγένιο, σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, στους 70 ° C, κάτω από αδρανή ατμόσφαιρα (Σχήμα 18). Στη συνέχεια, οι ποσότητες που δεν αντέδρασαν καθώς επίσης και τα άλατα του αμινοξέος (αδιάλυτα είδη) απομακρύνονται με διήθηση. Ακολούθως ο Ala-NCA διαλύεται και ξηραίνεται πολλές φορές με οξικό αιθυλεστέρα κάτω από υψηλό κενό, προκειμένου να αφαιρεθεί η περίσσεια τριφωσγενίου, μαζί με το υπόλοιπο HCl. Τελικά, ο Ala-NCA διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και ανακρυσταλλώνεται από n-εξάνιο τρεις φορές υπό υψηλό κενό. Ο καθαρός Ala-NCA αποθηκεύεται σε αδρανή ατμόσφαιρα στους 0 ° C. [66, 99]



Σχήμα 16: Η αντίδραση σύνθεσης του N-καρβόξυ ανυδρίτη της L-αλανίνης.

Ο έλεγχος της επιτυχούς σύνθεσης του Ala-NCA πραγματοποιείται με τη λήψη φασμάτων FT-IR και επιβεβαιώνεται τελικά με τη χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και τη λήψη του τελικού φάσματος ^1H -NMR.

3.4 Σύνθεση Υβριδικών Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)-*b*-Poly(L-Histidine-co-L-Alanine) (m-PEO-*b*-P(His-co-Ala))

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala), μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N^{im}-Trt-His NCA και Ala NCA και με τη χρήση των τεχνικών υψηλού κενού (HVT). Ως μακροαπαρχητής του πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο πολυμερές m-PEO-NH₂ με μοριακό βάρος 10000 g/mol (Methoxypolyethylene glycol amine). Συντέθηκαν τρία πολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) με διαφορετικά ποσοστά Ala/His, 10, 20, 40% και με συνολικό βάρος της συστάδας P(His-co-Ala) ίσο με 6000 g/mol. Τέλος έλαβε χώρα η σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PAla με τα ίδια μοριακά βάρη (PEO = 10000 g/mol, PAla = 6000 g/mol). Οι πειραματικές πορείες που ακολουθήθηκαν για τον πολυμερισμό καθενός από τα τέσσερα συμπολυμερή περιγράφονται λεπτομερώς στα επόμενα κεφάλαια.

3.4.1 Σύνθεση Υβριδικών Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)-*b*-Poly(L-Histidine-co-L-Alanine) (m-PEO-*b*-P(His-co-Ala)) με 10% Ala

Για τη σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με αναλογία Ala/His = 10% χρησιμοποιούνται 0.2 g μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ (MB = 10000 g/mol), με ακραία αμινομάδα ικανή να εκκινήσει τον πολυμερισμό των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων της ιστιδίνης και της αλανίνης. Δεδομένης της γνωστής ποσότητας του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί και του συνολικού μοριακού βάρους της δεύτερης συστάδας (P(His-co-Ala) = 6000 g/mol), αρχικά γίνονται υπολογισμοί για την εύρεση των ποσοτήτων των δύο μονομερών N^{im}-Trt-His NCA και Ala NCA που θα χρησιμοποιηθούν.

Με βάση τα παραπάνω γίνονται οι εξής υπολογισμοί:

Το συνολικό μοριακό βάρος του N^{im}-Trt-His NCA = 423 g/mol.

Το μοριακό βάρος του αποπροστατευμένου (χωρίς την τρίτυλο προστασία) His NCA = 243 g/mol.

Το μοριακό βάρος του CO₂, που εκλύεται ως παραπροϊόν της διάνοιξης του δακτυλίου του His NCA = 44 g/mol.

Το μοριακό βάρος της μονομερικής μονάδας της αποπροστατευμένης His = 423-243-44 = 136 g/mol.

Το μοριακό βάρος της πολυμερισμένης His, χωρίς το CO₂, αλλά με την προστασία της είναι ίσο με 379/136 x 6000 g/mol = 16720 g/mol.

Τα mol απαρχητή (m-PEO-NH₂) είναι: $n = m/M_r$, $n = 0.2 \text{ g}/10000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, $n = 0.00002 \text{ mol}$.

Ισχύει η σχέση: MB πολυμερισμένου μονομερούς = g μονομερούς/ mol απαρχητή. Άρα, g μονομερούς (His) = 16720 g/mol x 0.00002 mol = 0.3344 g His.

Ζυγίζεται όμως ο N^(im)-Trt-His NCA, οπότε γίνεται διόρθωση ως προς το CO₂ που έχει ο NCA:

$379/423 \times X = 0.3344 \text{ g His}$, άρα $X = 0.3732 \text{ g N}^{(im)}\text{-Trt-His NCA}$.

Τα mol του N^(im)-Trt-His NCA = $m/M_r = 0.3732 \text{ g}/423 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} = 0.00088 \text{ mol}$.

Οι τελικές ποσότητες των δύο μονομερών N^{im}-Trt-His NCA και Ala NCA που χρησιμοποιούνται υπολογίζονται ως εξής:

Στα 100 mol	90mol His
Στα 0.00088 mol	x

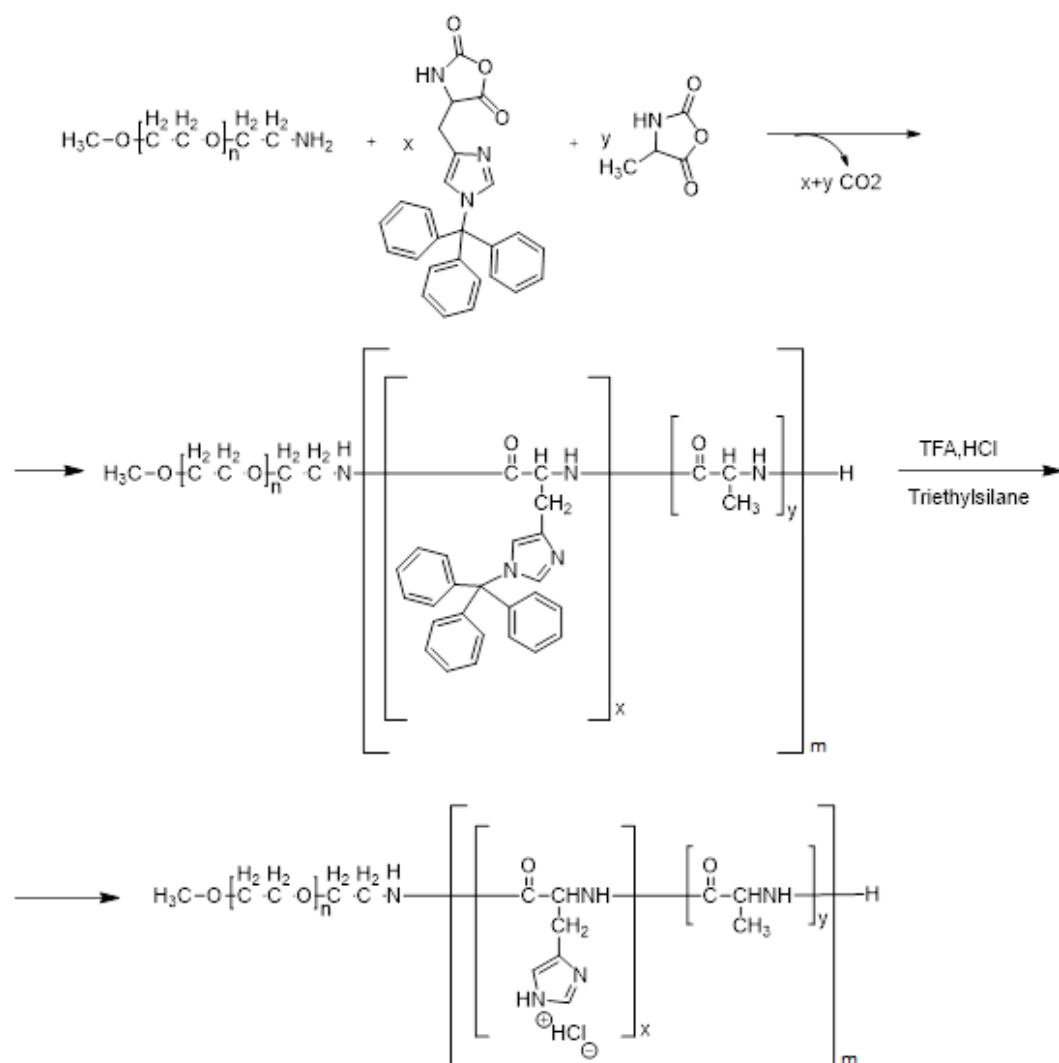
Άρα, x= 0.000792 mol His

$$g \text{ His} = 0.000792 \text{ mol} \times 423 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} = 0.335016 \text{ g}$$

Στα 100 mol	10mol Ala
Στα 0.00088 mol	y

Άρα, y= 0.000088 mol His

$$g \text{ Ala} = 0.000088 \text{ mol} \times 115.088 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} = 0.01013 \text{ g}$$



Σχήμα 17: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης σύνθεσης των πολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala).

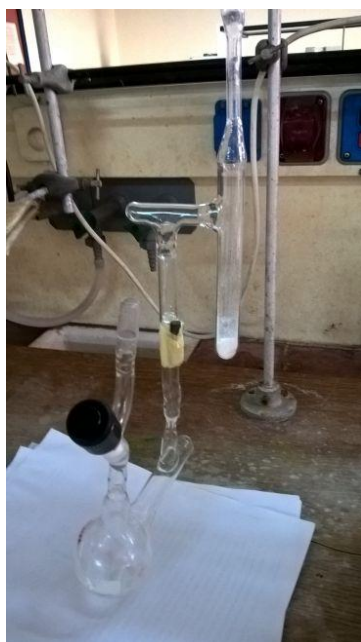
Οι συνήθεις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σε έναν πολυμερισμό είναι οι εξής:

- Ξήρανση του μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ στη γραμμή υψηλού κενού.
- Καθαρισμός του m-PEO-NH₂ με βενζόλιο.
- Προσθήκη των μονομερών και απόσταξη του διαλύτη DMF σε αυτά.
- Έναρξη του πολυμερισμού.
- Καταβύθιση του πολυμερούς.
- Αποπροστασία του πολυμερούς.
- Διαπίδυση (Dialysis).
- Λιοφυλοποίηση (Freeze-drying).

Οι διαδικασίες αυτές περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

Αρχικά, ειδικά σχεδιασμένη συσκευή πολυμερισμού κατασκευάζεται με τη χρήση υαλουργίας (Εικόνα 12). Η συσκευή αυτή αποτελείται από μία σφαιρική

φιάλη των 100 ml, στην οποία πραγματοποιείται ο πολυμερισμός και από μία αμπούλα σχήματος «Π» στην οποία αρχικά τοποθετούνται τα μονομερή. Η αμπούλα αυτή αποτελείται από ένα γυάλινο σωλήνα διαμέτρου 18 mm, στον οποίο προσκολλάται με υαλουργία, ένας γυάλινος σωλήνας τύπου heavy wall (παχύ τοίχωμα) διαμέτρου 10 mm με προσαρμοσμένο εσμύρισμα. Τέλος ένας σωλήνας με διάμετρο 14 mm χρησιμοποιείται ως γέφυρα που συνδέει το τμήμα που τοποθετούνται τα μονομερή με το τμήμα του break seal, το τμήμα δηλαδή που φέρει μία λεπτή μύτη γυαλιού. Η συσκευή πολυμερισμού σχεδιάζεται έτσι, ώστε να διαχωρίσει τον απαρχητή από τα μονομερή προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος της κινητικής του πολυμερισμού και το σύστημα να έχει χαρακτηριστικά «ζωντανού» πολυμερισμού. Έτσι, στο τμήμα της σφαιρικής φιάλης τοποθετείται ο απαρχητής του πολυμερισμού και ο κατάλληλος διαλύτης στον οποίο είναι διαλυτός, και στο τμήμα της αμπούλας τοποθετούνται τα μονομερή και ο αντίστοιχος διαλύτης τους. Προκειμένου να έρθουν σε επαφή τα διαλύματα του απαρχητή και των μονομερών και να ξεκινήσει ο πολυμερισμός, σπάει με τη βοήθεια ενός κατάλληλου μαγνήτη (breaker) η γυάλινη μύτη του break seal, και το διάλυμα των μονομερών ρέει γρήγορα από την αμπούλα προς την σφαιρική φιάλη για να αναμιχθεί με το διάλυμα του απαρχητή. Πρέπει να αναφερθεί ότι η αμπούλα, πριν χρησιμοποιηθεί προσαρμόζεται με τη βοήθεια ειδικού συνδέσμου (adaptors) στη γραμμή υψηλού κενού και ελέγχεται για τυχόν ύπαρξη μικροσπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla. Ακλούθως, και τα δύο τμήματα της συσκευής πολυμερισμού τοποθετούνται σε φούρνο 150 °C, προκειμένου να εξασφαλιστεί η καθαρότητά της, αφού σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες τυχόν υπάρχουσες ακαθαρσίες της συσκευής καίγονται.



Εικόνα 12: Συσκευή πολυμερισμού.

Στη συνέχεια, οι δύο πλέον καθαρές συσκευές, η σφαιρική φιάλη των 100 ml και η αμπούλα ενώνονται υαλουργικά από το τμήμα της αμπούλας που φέρει το break seal αφού προηγουμένως έχει τοποθετηθεί μαγνήτης εγκλωβισμένος σε γυαλί (breaker) κοντά στη μύτη του break seal. Η ελευθερία της κίνησης του breaker ελέγχεται με τη βοήθεια ενός εξωτερικού μαγνήτη, ο οποίος με κολλητική ταινία συγκρατεί αρχικά σε σταθερή θέση τον breaker και έπειτα τον κατευθύνει, έτσι ώστε να σπάσει η μύτη του break seal και να έρθουν σε επαφή τα μονομερή με τον απαρχητή. Επίσης, στην σφαιρική φιάλη τοποθετείται μαγνητικός αναδευτήρας και κατάλληλη στρόφιγγα. Ακολούθως, η συσκευή πολυμερισμού προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού από το τμήμα της σφαιρικής φιάλης, απαερώνεται, ελέγχεται για τυχόν ύπαρξη μικροοπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla και μόλις το σύστημα βρίσκεται υπό κενό υφίσταται τρία flame drying για απομάκρυνση της υγρασίας. Έπειτα, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και προστίθεται σε αυτή αέριο Ar προκειμένου να εξασφαλιστεί, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αδρανές περιβάλλον κατά την προσθήκη του απαρχητή σε αυτή. Ακολουθεί η ζύγιση 0.2 g του μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ και η μεταφορά του στη φιάλη πολυμερισμού. Τέλος, η συσκευή προσαρμόζεται πάλι στη γραμμή κενού, όπου απαερώνεται και αφήνεται για μία νύχτα προς ξήρανση του απαρχητή.

Την επόμενη μέρα λαμβάνει χώρα απόσταξη περίπου 10-15 ml βενζολίου στη φιάλη που βρίσκεται ο απαρχητής μέσω της γραμμής υψηλού κενού (Εικόνα 13). Μετά την απόσταξη, η φιάλη με το διάλυμα βενζολίου- m-PEO-NH₂ ξεπαγώνει με ζεστό νερό, οπότε παρατηρείται πλήρης διάλυση του απαρχητή στο βενζόλιο. Το διαυγές διάλυμα αφήνεται για μία ώρα υπό ανάδευση στον εργαστηριακό πάγκο και έπειτα η συσκευή προσαρμόζεται πάλι στη γραμμή κενού, προκειμένου να απομακρυνθεί μέσω απόσταξης, σε μία άδεια σφαιρική φιάλη 250 ml, το βενζόλιο. Τέλος, ο απαρχητής αφήνεται προς ξήρανση για μία νύχτα στη γραμμή κενού. Σκοπός αυτού του βήματος είναι η πλήρης απομάκρυνση έστω και ιχνών υγρασίας του απαρχητή, με τη λογική ότι το βενζόλιο δημιουργεί αζεοτροπικό μίγμα με την υγρασία, επομένως κατά την απομάκρυνσή του μέσω απόσταξης συμπαρασύρει και τα ίχνη υγρασίας του απαρχητή.



Εικόνα 13: Απόσταξη βενζολίου στον απαρχητή του πολυμερισμού.

Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται απόσταξη 15-20 ml διαλύτη DMF, στη φιάλη που φέρει τον απαρχητή, μέσω της γραμμής κενού. Το DMF αποτελεί τον διαλύτη του πολυμερισμού, καθώς σε αυτόν διαλυτοποιούνται καλά τόσο ο απαρχητής, όσο και τα μονομερή. Η χρησιμοποιούμενη ποσότητα του DMF πρέπει να είναι τόση, ώστε να διαλυθεί το m-PEO-NH₂ και ταυτόχρονα, να μην είναι μεγάλη για να μην αυξηθεί ο χρόνος πολυμερισμού. Ακολούθως, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή, και ο παγωμένος διαλύτης με τον απαρχητή ξεπαγώνει, αρχικά κάτω από νερό βρύσης και έπειτα σε υδρόλουτρο (~ 45 °C). Ταυτόχρονα, το διάλυμα ανακινείται προσεκτικά, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του απαρχητή στο DMF. Η θερμοκρασία του υδρόλουτρου δεν πρέπει να είναι πολύ υψηλή, ώστε να αποφευχθεί η θερμική διάσπαση του DMF προς διμεθυλαμίνη, η οποία μπορεί εν δυνάμει να εκκινήσει πολυμερισμό. Ακολούθως, με τη βοήθεια ειδικού συνδέσμου προσαρμόζεται το τμήμα της αμπούλας της συσκευής πολυμερισμού στη γραμμή υψηλού κενού. Η αμπούλα ελέγχεται για την ύπαρξη τυχόν μικροοπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla και εν συνεχεία απαερώνεται και υφίσταται τρία flame drying για απομάκρυνση της υγρασίας. Είναι αναγκαίο το τμήμα της αμπούλας να βρίσκεται υπό κενό, καθώς στο επόμενο βήμα η συσκευή μεταφέρεται στο glove box, όπου γίνεται η προσθήκη των μονομερών, επομένως το σύστημα δεν πρέπει να μεταφέρει υγρασία σε αυτό. Έτσι, στο glove box στο οποίο φυλάσσονται ήδη τα μονομερή, μεταφέρεται η συσκευή πολυμερισμού, αφαιρείται ο ειδικός σύνδεσμος που διατηρεί υπό κενό την αμπούλα και ζυγίζονται και προστίθενται σε αυτήν με τη βοήθεια χωνιού 0.3350 g N^(im)-trt-His-NCA και 0.01013 g Ala NCA. Μετά την προσθήκη των NCAs προσαρμόζεται πάλι ο ειδικός σύνδεσμος στην αμπούλα και η συσκευή πολυμερισμού απομακρύνεται από το glove box. Ακολούθως, το τμήμα της αμπούλας προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω του συνδέσμου και απαερώνεται προκειμένου να απομακρυνθεί το αδρανές αέριο Ar που εισήχθη κατά την παραμονή της αμπούλας στο glove box. Έπειτα, στο τμήμα των μονομερών πραγματοποιείται απόσταξη περίπου 10 ml DMF. Μετά την απόσταξη, η αμπούλα συνεχίζει να ψύχεται με τη βοήθεια υγρού αζώτου, έτσι ώστε το διάλυμα να παγώσει πολύ καλά.

Διατηρώντας το διάλυμα παγωμένο, η αμπούλα απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού μετά από θέρμανση με χρήση φλόγας του γυάλινου σωλήνα τύπου heavy wall (10 mm), οπότε ο σωλήνας λιώνει και το γυαλί κλείνει, αποκόπτοντας υπό κενό το υπόλοιπο τμήμα της αμπούλας. Το διάλυμα διατηρείται παγωμένο έως ότου κρυώσει το κομμένο γυαλί και έπειτα ξεπαγώνει σε νερό βρύσης. Το διάλυμα των NCAs με το DMF, ανακινείται καλά έως ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως. Στη συνέχεια γίνεται θραύση της μύτης του break seal με τη βοήθεια του breaker και τα δύο διαλύματα των μονομερών και του απαρχητή έρχονται σε επαφή στη σφαιρική φιάλη πολυμερισμού, όπου λαμβάνει χώρα έντονη ανακίνηση για καλύτερη ανάμιξη. Σε αυτό το σημείο, πρέπει να σημειωθεί ότι η απόχυση του διαλύματος των μονομερών γίνεται γρήγορα και ποσοτικά προς τη φιάλη πολυμερισμού, ώστε να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές και να αποφευχθεί κάποια τοπική περίσσεια που δυνητικά θα οδηγούσε σε διαφορετικούς χρόνους έναρξης πολυμερισμού των αλυσίδων. Με αυτό τον τρόπο ξεκινά ο πολυμερισμός, και η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού όπου αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 7-10 ημέρες, χρονικό διάστημα το οποίο χρειάζεται για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός. Σε αυτό το χρονικό διάστημα, παρατηρείται έντονη έκλυση διοξειδίου του άνθρακα από το διάλυμα, το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για την διάδοση του πολυμερισμού. Για το λόγο αυτό, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η στρόφιγγα της συσκευής ανοίγεται για μικρό χρονικό διάστημα με σκοπό να εκτονωθεί και να απομακρυνθεί το υπερκείμενο αέριο διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί και έτσι η ισορροπία της αντίδρασης να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Ένδειξη ότι ο πολυμερισμός ολοκληρώθηκε αποτελούν η μειωμένη έως και ανύπαρκτη ποσότητα των φυσαλίδων που σχηματίζονται στο διάλυμα της αντίδρασης κατά την έκλυση του CO₂, καθώς και το γεγονός ότι το διάλυμα από διαυγές που ήταν αρχικά, αρχίζει να θολώνει, επομένως το πολυμερές έχει σχηματιστεί.

Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, σειρά έχει η καταβύθιση του πολυμερούς σε διαιθυλαιθέρα (Εικόνα 14). Για το λόγο αυτό, σε ποτήρι

ζέσεως 1000 ml προστίθενται περίπου 300 ml παγωμένου διαιθυλαιθέρα (ποσότητα περίπου δεκαπλάσια σε σύγκριση με εκείνη του DMF) και μέσα σ' αυτόν αποχύνεται προσεκτικά το περιεχόμενο της φιάλης πολυμερισμού. Παρατηρείται αμέσως σχηματισμός λευκού αιωρήματος, ένδειξη της επιτυχούς καταβύθισης του πολυμερούς και ακολούθως το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται για 20-30 λεπτά στο ψυγείο σε θερμοκρασία -20°C , προκειμένου να επιτευχθεί ποσοτική κατακρήμνιση του πολυμερούς. Έπειτα, το καταβυθισμένο πολυμερές διηθείται υπό κενό με συσκευή διηθήσεως Buchner και με φίλτρο Buchner με μέγεθος πόρων No 3, το οποίο έχει καλυφθεί με υδρόφοβο φίλτρο μεγέθους πόρων 0.45 μm . Στη συνέχεια, το στερεό που μένει πάνω στο φίλτρο, το οποίο είναι το πολυμερές, συλλέγεται σε μία σφαιρική φιάλη των 50 ml και αφήνεται στη γραμμή υψηλού κενού προς ξήρανση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα λαμβάνεται δείγμα από το πολυμερές προκειμένου να αναλυθεί με φασματοσκοπία FT-IR και να εξακριβωθεί η επιτυχής του σύνθεση.



Εικόνα 14: Καταβύθιση του πολυμερούς και διήθηση υπό κενό με συσκευή διηθήσεως Buchner.

Στο επόμενο βήμα, λαμβάνει χώρα η αποπροστασία των μονομερικών μονάδων της ιστιδίνης από τις τρίτυλο προστατευτικές τους ομάδες (Εικόνα 15). Έτσι, στο πολυμερές που βρίσκεται στη σφαιρική φιάλη των 50 ml προστίθενται 10 ml διχλωρομεθανίου και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 30 λεπτά, έως ότου σχηματιστεί ένα θολό κίτρινο γαλάκτωμα. Στη συνέχεια, προστίθενται στο παραπάνω μίγμα 10 ml τριφθοροξικού οξέος TFA,

οπότε το χρώμα του διαλύματος αλλάζει αμέσως σε έντονο κίτρινο και το διάλυμα διαυγάζει. Το γεγονός αυτό, αποτελεί ένδειξη ότι πραγματοποιήθηκε η αποπροστασία, καθώς οι τρίκυκλο προστατευτικές ομάδες όντας πια ελεύθερες στο διάλυμα απορροφούν στο ορατό λόγω των βενζολικών τους δακτυλίων (εξ' ου και το έντονο κίτρινο χρώμα του διαλύματος). Μετά την προσθήκη του TFA όλο το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για μία ώρα. Ακολούθως, στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται σιγά-σιγά με χρήση πιπέτας τριαιθυλοσιλάνιο, έως ότου το χρώμα του διαλύματος αλλάξει από έντονο κίτρινο σε διαυγές. Στο τριαιθυλοσιλάνιο προσκολλώνται οι ελεύθερες τρικυκλο προστατευτικές ομάδες τις ισιδίνης μετά την αποπροστασία, αποφεύγοντας έτσι την επανασύνδεσή τους με αυτήν.



Εικόνα 15: Αποπροστασία του πολυμερούς.

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την απομάκρυνση όλων των παραπάνω διαλυτών από το πολυμερές. Για το λόγο αυτό σε μία γυάλινη συσκευή σχήματος «Π» (ειδική διάταξη για “short path” απόσταξη) προσαρμόζεται από την μία πλευρά, μέσω κατάλληλου συνδέσμου η σφαιρική φιάλη των 50 ml που φέρει το πολυμερές και τους διαλύτες, και από την άλλη πλευρά μία άδεια σφαιρική φιάλη των 250 ml. Όλη η διάταξη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, όπου πραγματοποιείται η απόσταξη των διαλυτών προς την κενή φιάλη. Μετά το τέλος της απόσταξης, παραμένει στη φιάλη των 50 ml μόνο το στερεό πολυμερές, το οποίο αφήνεται στη γραμμή υψηλού κενού προς ξήρανση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα λαμβάνεται δείγμα από το

πολυμερές προκειμένου να αναλυθεί με φασματοσκοπία FT-IR και να εξακριβωθεί η επιτυχής αποπροστασία του.

Ακολούθως, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της διαπίδυσης (dialysis) για την απομάκρυνση των δεσμευμένων τριτυλο-ομάδων από το πολυμερές διαμέσου των πόρων της μεμβράνης (Εικόνα 16). Έτσι, το πολυμερές, που βρίσκεται στη σφαιρική φιάλη των 50 ml διαλύεται σε 10 mL νερό Milli-Q και αφήνεται υπό ανάδευση για 10-15 min. Ταυτόχρονα, κατάλληλη μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis), μεμβράνη πολυκυτταρίνης (όριο αποκλεισμού MWCO=3.5 kDa) μήκους 13 cm αφήνεται για 30 min, μέσα σε ποτήρι ζέσεως με νερό Milli-Q, ώστε να φουσκώσει και να ανοίξουν οι πόροι της. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετείται με την βοήθεια πιπέτας στη μεμβράνη, η οποία κλείνεται με κατάλληλα πιαστράκια και από τις δύο πλευρές και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως 2000 mL που περιέχει 2L νερό Milli-Q υπό ανάδευση. Το pH του εξωτερικού διαλύματος ρυθμίζεται με προσθήκη 4 σταγόνων HCl 1N. Η προσθήκη πυκνού HCl γίνεται για να μην σχηματίσει η ιστιδίνη β-φύλλο στη δευτεροταγή της δομή. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιείται αλλαγή του νερού Milli-Q και προστίθενται πάλι 4 σταγόνες HCl 1N (το διάλυμα του πολυμερούς στη μεμβράνη είναι θολό). Την Τρίτη ημέρα ανανεώνεται το νερό Milli-Q και προστίθενται σταγόνες βάσης NaOH 1N μέχρι το pH = 9. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για τρεις ακόμα ημέρες, μέχρι να παρατηρηθεί σταθεροποίηση του pH στην περιοχή 7-8. Όταν το pH σταθεροποιηθεί γίνονται ακόμα δύο αλλαγές νερού με σκέτο Milli-Q, ώστε να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια του NaOH. Η διαδικασία του dialysis διαρκεί συνολικά 7-8 ημέρες.



Εικόνα 16: Διαδικασία διαπίδυσης (dialysis).

Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της λυοφιλοποίησης (freeze-drying), για την εκδίωξη του νερού από το πολυμερές (Εικόνα 17). Το περιεχόμενο της μεμβράνης (πολυμερές διαλυμένο σε νερό) αποχύνεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, παγώνει με τη βοήθεια υγρού αζώτου και προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού σε συσκευή απόσταξης “short-path” με χρήση κατάλληλου προσαρμογέα. Η φιάλη αρχικά απαερώνεται και το νερό αποσπάζεται από τη αρχική φιάλη σε κενή γειτονική φιάλη, η οποία ψύχεται διαρκώς με χρήση υγρού αζώτου. Η διαδικασία του freeze-drying διαρκεί 3-4 ημέρες ανάλογα τον όγκο του διαλύματος που συλλέγεται μετά από το dialysis και στηρίζεται στη διαδικασία της εξάχνωσης του νερού από την αρχική φιάλη με το πολυμερές στην οποία είναι παγωμένο, προς την άδεια γειτονική φιάλη. Τελικά, λαμβάνεται το πολυμερές με μορφή λευκού στερεού.



Εικόνα 17: Διαδικασία λυοφιλοποίησης (freeze-drying).

Στο τελευταίο βήμα της συνθετικής πορείας το πολυμερές που βρίσκεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, από τη προηγούμενη διαδικασία, αναμιγνύεται με 30 ml διαιθυλαιθέρα και αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ώρα. Έπειτα, το διάλυμα αυτό διηθείται υπό κενό με συσκευή διηθήσεως Buchner και το λευκό στερεό που παραμένει πάνω στο φίλτρο συλλέγεται σε μία καθαρή σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Μετά την ξήρανσή του, το καθαρό πλέον πολυμερές ζυγίζεται (0.170 g) και φυλάσσεται σε ειδικά σακουλάκια, σε ψυγείο στους 0 °C. Η επιτυχής σύνθεση του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με αναλογία Ala/His = 10% ελέγχεται σε κάθε σχεδόν στάδιο της συνθετικής πορείας με λήψη φασμάτων FT-IR και επιβεβαιώνεται με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).

3.4.2 Σύνθεση Υβριδικών Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)-*b*-Poly(L-Histidine-co-L-Alanine) (m-PEO-*b*-P(His-co-Ala)) με 20% Ala

Για τη σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με αναλογία Ala/His = 20% χρησιμοποιούνται 0.2 g μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ (MB = 10000 g/mol), με ακραία αμινομάδα ικανή να εκκινήσει τον πολυμερισμό των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων της ιστιδίνης και της

αλανίνης. Δεδομένης της γνωστής ποσότητας του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί και του συνολικού μοριακού βάρους της δεύτερης συστάδας ($P(\text{His-co-Ala}) = 6000 \text{ g/mol}$), αρχικά γίνονται υπολογισμοί για την εύρεση των ποσοτήτων των δύο μονομερών $N^{\text{im}}\text{-Trt-His NCA}$ και Ala NCA που θα χρησιμοποιηθούν. Οι υπολογισμοί ακολουθούν τη συλλογιστική πορεία που αναφέρθηκε στην ενότητα 3.4.1, επομένως οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες των μονομερών σε αυτόν τον πολυμερισμό είναι $0.29779 \text{ g } N^{\text{im}}\text{-trt-His-NCA}$ και $0.02025 \text{ g Ala NCA}$. Η πειραματική πορεία που ακολουθείται για τον πολυμερισμό είναι ακριβώς η ίδια με εκείνη που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.4.1 για τη σύνθεση του συμπολυμερούς $\text{PEO-}b\text{-}P(\text{His-co-Ala})$ με αναλογία $\text{Ala/His} = 10\%$. Ο πολυμερισμός και σε αυτήν την περίπτωση διαρκεί 7-10 ημέρες και στο τέλος όλης της πειραματικής διαδικασίας λαμβάνονται 0.2095 g συμπολυμερούς $\text{PEO-}b\text{-}P(\text{His-co-Ala})$ με αναλογία $\text{Ala/His} = 20\%$. Η επιτυχής σύνθεση του πολυμερούς ελέγχεται σε κάθε σχεδόν στάδιο της συνθετικής πορείας με λήψη φασμάτων FT-IR και τελικά επιβεβαιώνεται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).

3.4.3 Σύνθεση Υβριδικών Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)-*b*-Poly(L-Histidine-co-L-Alanine) (m-PEO-*b*-P(His-co-Ala)) με 40% Ala

Για τη σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς $\text{PEO-}b\text{-}P(\text{His-co-Ala})$ με αναλογία $\text{Ala/His} = 40\%$ χρησιμοποιούνται 0.2 g μακροαπαρχητή $m\text{-PEO-NH}_2$ ($M_B = 10000 \text{ g/mol}$), με ακραία αμινομάδα ικανή να εκκινήσει τον πολυμερισμό των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων της ιστιδίνης και της αλανίνης. Δεδομένης της γνωστής ποσότητας του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί και του συνολικού μοριακού βάρους της δεύτερης συστάδας ($P(\text{His-co-Ala}) = 6000 \text{ g/mol}$), αρχικά γίνονται υπολογισμοί για την εύρεση των ποσοτήτων των δύο μονομερών $N^{\text{im}}\text{-Trt-His NCA}$ και Ala NCA που θα χρησιμοποιηθούν. Οι υπολογισμοί ακολουθούν τη συλλογιστική πορεία που αναφέρθηκε στην ενότητα 3.4.1, επομένως οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες των μονομερών σε αυτόν τον πολυμερισμό είναι $0.22334 \text{ g } N^{\text{im}}\text{-trt-His-NCA}$ και $0.04051 \text{ g Ala NCA}$. Η πειραματική πορεία που ακολουθείται για τον

πολυμερισμό είναι ακριβώς η ίδια με εκείνη που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.4.1 για τη σύνθεση του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με αναλογία Ala/His = 10%. Ο πολυμερισμός και σε αυτήν την περίπτωση διαρκεί 7-10 ημέρες και στο τέλος όλης της πειραματικής διαδικασίας λαμβάνονται 0.211 g συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με αναλογία Ala/His = 40%. Η επιτυχής σύνθεση του πολυμερούς ελέγχεται σε κάθε σχεδόν στάδιο της συνθετικής πορείας με λήψη φασμάτων FT-IR και τελικά επιβεβαιώνεται με χρήση της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC).

3.5 Σύνθεση του Υβριδικού Κατά Συστάδες Συμπολυμερούς Poly(Ethylene Oxide)-*b*-Poly(L-Alanine) (m-PEO-*b*-P(Ala))

Για τη σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PAla χρησιμοποιούνται 0.2 g μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ (MB = 10000 g/mol), με ακραία αμινομάδα ικανή να εκκινήσει τον πολυμερισμό του N-καρβοξυανυδρίτη του α-αμινοξέος της αλανίνης. Δεδομένης της γνωστής ποσότητας του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί και του συνολικού μοριακού βάρους της δεύτερης συστάδας (PAla = 6000 g/mol), αρχικά γίνονται υπολογισμοί για την εύρεση της ποσότητας του μονομερούς Ala NCA που θα χρησιμοποιηθεί.

Το συνολικό μοριακό βάρος του Ala NCA = 115.088 g/mol.

Το μοριακό βάρος της μονομερικής μονάδας της Ala χωρίς το CO₂ = 115.088 - 44 = 71.088 g/mol.

Τα mol απαρχητή (m-PEO-NH₂) είναι: $n = m/M_r$, $n = 0.2 \text{ g}/10000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, $n = 0.00002 \text{ mol}$.

Ισχύει η σχέση: MB πολυμερισμένου μονομερούς = g μονομερούς/ mol απαρχητή. Άρα, g μονομερούς (Ala) = 6000 g/mol x 0.00002 mol = 0.12 g His.

Ζυγίζεται όμως ο Ala NCA, οπότε γίνεται διόρθωση ως προς το CO₂ που έχει ο NCA:

$71.088/115.088 \times X = 0.12 \text{ g Ala}$, άρα $X = 0.1942 \text{ g Ala NCA}$

Επομένως η χρησιμοποιούμενη ποσότητα του μονομερούς είναι 0.1942 g Ala NCA. Η πειραματική πορεία που ακολουθείται για τον πολυμερισμό είναι παρόμοια με εκείνη που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.4.1 για τη σύνθεση του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με αναλογία Ala/His = 10%. Οι διαφορές που εντοπίζονται είναι οι εξής: Ο NCA της αλανίνης δεν είναι διαλυτός στο DMF, επομένως δεν είναι εφικτή η ποσοτική μεταφορά του μονομερούς που βρίσκεται στο τμήμα της αμπούλας προς τη φιάλη που βρίσκεται ο απαρχητής στη συσκευή πολυμερισμού. Επίσης, αμέσως μετά την ανάμιξη των διαλυμάτων του m-PEO-NH₂ και του Ala NCA, παρατηρείται ο σχηματισμός γέλης, επιβεβαιώνοντας τις βιβλιογραφικές αναφορές άλλων ερευνητών (Εικόνα 18). Γι' αυτό το λόγο η αντίδραση πολυμερισμού πραγματοποιείται στον εργαστηριακό πάγκο με ανάδευση και με σταθερή παροχή θερμότητας από υδρόλουτρο στους 30 °C και ανά τακτά χρονικά διαστήματα η συσκευή πολυμερισμού προσαρμόζεται στην γραμμή υψηλού κενού, προκειμένου να απομακρυνθεί το εκλυόμενο CO₂ σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία.



Εικόνα 18: Πειραματική διάταξη πολυμερισμού του PEO-*b*-PAIa.

Ο πολυμερισμός σε αυτήν την περίπτωση διαρκεί 7 ημέρες και η συνθετική πορεία ολοκληρώνεται με την καταβύθιση του πολυμερούς σε διαιθυλαιθέρα, την διήθησή του υπό κενό με συσκευή διηθήσεως Buchner, την ξήρανσή του στη γραμμή υψηλού κενού και τέλος τη συλλογή 0.2610 g συμπολυμερούς PEO-*b*-PAIa. Σε αυτόν τον πολυμερισμό παρακάμπτονται όλα τα στάδια που

αναφέρονται στην αποπροστασία και τον καθαρισμό του πολυμερούς, καθώς ο NCA της αλανίνης δεν φέρει προστατευτικές ομάδες. Η επιτυχής σύνθεση του πολυμερούς επιβεβαιώνεται με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR και NMR.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

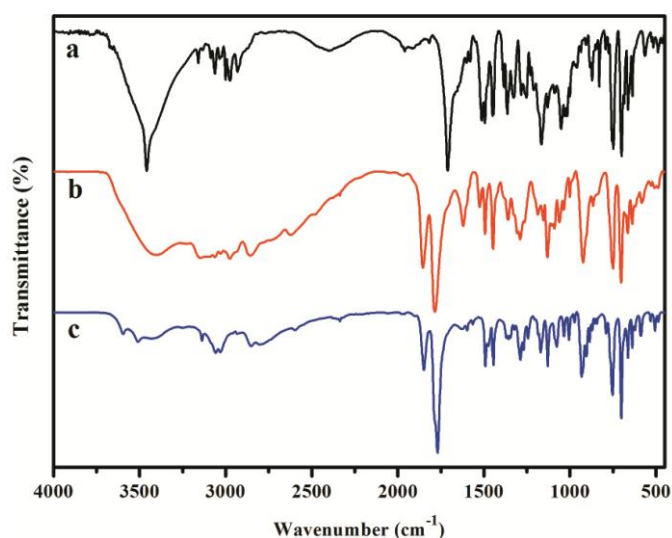
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μελέτη των N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs) με την τεχνική της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπερύθρου επιτρέπει την γρήγορη και αξιόπιστη αναγνώριση των NCAs εφόσον υπάρχει πρότυπο φάσμα για σύγκριση. Επιπλέον, όταν οι NCAs αρχίζουν να πολυμερίζονται, οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των καρβονυλίων του δακτυλίου εξαφανίζονται σταδιακά και παίρνουν την θέση τους οι χαρακτηριστικές δονήσεις των αμιδικών δεσμών, υποδηλώνοντας τον επιτυχή πολυμερισμό τους.

Σε ό,τι αφορά τον N^{im} -Trt-(L)-His NCA, αρχικά, προηγείται η λήψη φάσματος IR της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH (Σχήμα 18a). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1710 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου ($C=O$) του αμινοξέος της ιστιδίνης. Ακολουθώντας, στο διάλυμα της ένωσης προστίθεται το $SOCl_2$ που χρησιμοποιείται ως μέσο χλωρίωσης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης κυκλοποίησης και η αντίδραση αφήνεται για 2.5 ώρες. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με λήψη νέου φάσματος IR μετά την πάροδο του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος (Σχήμα 18b). Σε αυτό το φάσμα είναι ορατή η μείωση της κορυφής του αρχικού αντιδρώντος στα 1710 cm^{-1} και η εμφάνιση των δύο χαρακτηριστικών κορυφών του N^{im} -Trt-(L)-His NCA στα 1785 cm^{-1} και 1850 cm^{-1} . Η εμφάνιση αυτών των δύο κορυφών, υποδηλώνει την επιτυχή σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη. Ειδικότερα, η κορυφή στα 1785 cm^{-1} αποδίδεται στο καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του NCA (δηλ. του C2), ενώ η δεύτερη κορυφή στα 1850 cm^{-1} αφορά, αντίστοιχα, το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C5). Επιπλέον είναι ορατή και μία κορυφή στα 1620 cm^{-1} , η οποία οφείλεται σε έκταση δόνησης του δεσμού N–H και αποδίδεται στο σχηματισθέν υδροχλωρικό άλας του NCA της ιστιδίνης. Η πλήρης δέσμευση του HCl από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο του NCA επιτυγχάνεται με χρήση ισομοριακής ποσότητας Et_3N , προς σχηματισμό του

άλατος $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ υπό μορφή ιζήματος, το οποίο απομακρύνεται από το επιθυμητό προϊόν μέσω διήθησης. Στο φάσμα IR του τελικού NCA απουσιάζει η κορυφή στα 1710 cm^{-1} , που υποδηλώνει ότι το αρχικό αμινοξύ της ιστιδίνης έχει καταναλωθεί πλήρως, η κορυφή στα 1620 cm^{-1} , που δείχνει ότι δεσμεύτηκε ποσοτικά το HCl μετά την προσθήκη της ποσότητας τριαιθυλαμίνης και τέλος, η κορυφή στα 1650 cm^{-1} , που θα οφειλόταν στη δόνηση του πεπτιδικού δεσμού λόγω πιθανής έναρξης του πολυμερισμού από τυχόν περίσσεια της Et_3N (Σχήμα 18c). Καθ' όλη τη διάρκεια της συνθετικής πορείας δεν παρατηρείται, επίσης, μεταβολή των χαρακτηριστικών κορυφών της προστατευτικής ομάδας στα 701 cm^{-1} και 751 cm^{-1} , που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών $-\text{CH}=\text{CH}-$ των βενζολικών δακτυλίων.

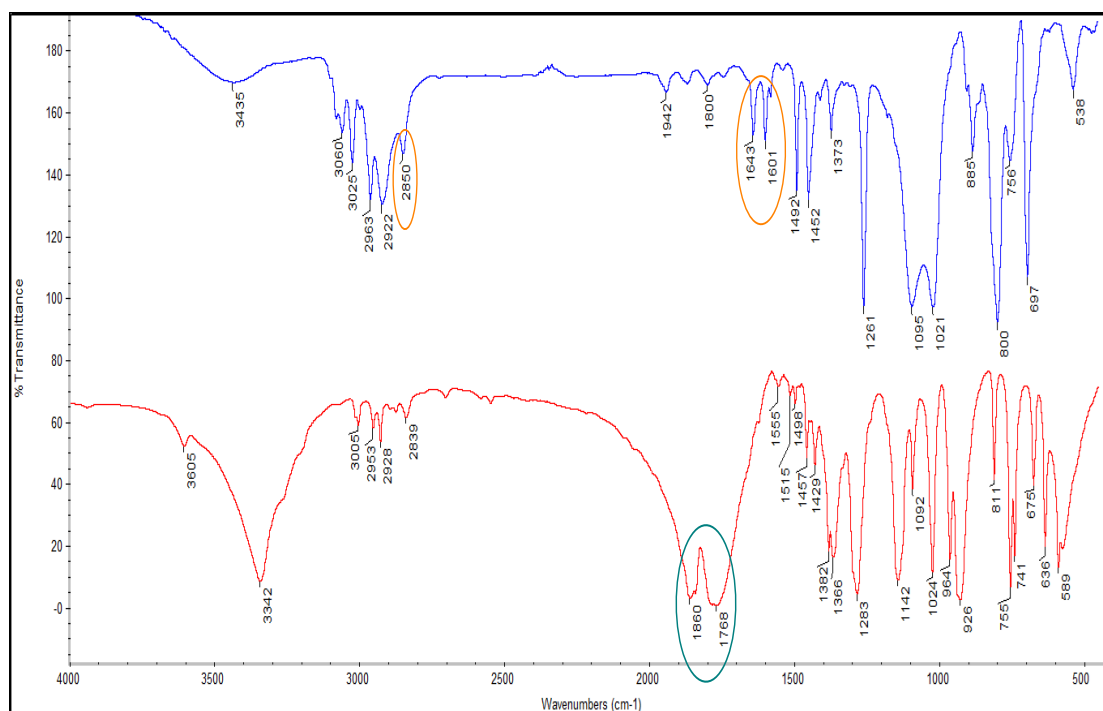


Σχήμα 18: Φάσμα IR (a) της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH , (b) μετά από 2.5 ώρες αντίδρασης και (c) του τελικού προϊόντος $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-His NCA}$ μετά τις ανακρυσταλλώσεις.

Σε ό,τι αφορά τον Ala-NCA , αρχικά, προηγείται η λήψη φάσματος IR της πρόδρομης ένωσης L-Alanine (Σχήμα 19, μπλε γραμμή). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1643 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου ($\text{C}=\text{O}$) του αμινοξέος της αλανίνης. Επίσης παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 2850 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του μεθυλίου (CH_3) του αμινοξέος της αλανίνης και η κορυφή στα 1601 cm^{-1} , που οφείλεται στη δόνηση κάμψης του δεσμού της ελεύθερης αμινομάδας ($-\text{NH}_2$).

Η αντίστοιχη δόνηση έκτασης του δεσμού -NH_2 εμφανίζεται στην ευρεία περιοχή 3435 cm^{-1} .

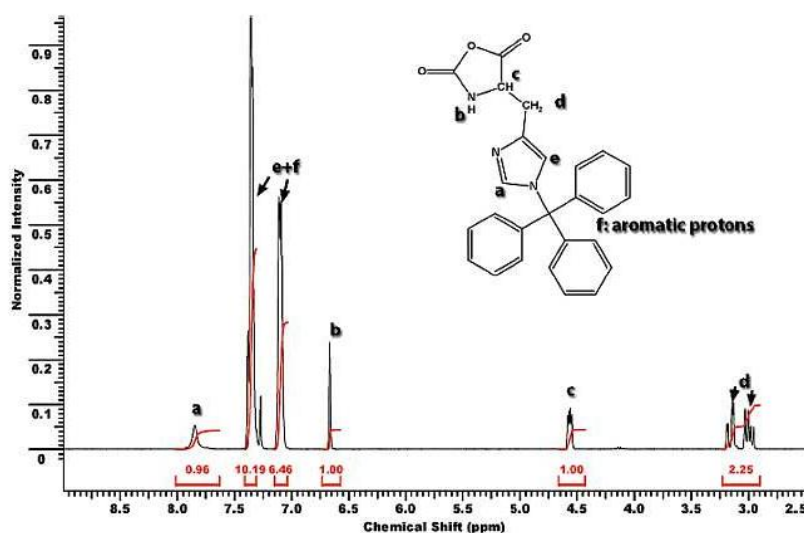
Στο φάσμα IR του τελικού Ala-NCA παρατηρείται ότι το αρχικό αμινοξύ της αλανίνης έχει καταναλωθεί πλήρως, καθώς απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές της ελεύθερης αμινομάδας και του καρβοξυλίου (Σχήμα 19, κόκκινη γραμμή). Επιπλέον, παρατηρούνται δύο νέες ταινίες που υποδηλώνουν την επιτυχή σύνθεση του NCA. Η απορρόφηση στα 1768 cm^{-1} αφορά τη δόνηση έκτασης του καρβονυλίου που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του ανυδρίτη (δηλ. του C_2), και η δεύτερη στα 1860 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση έκτασης του καρβονυλίου που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C_5). Επίσης, απουσιάζει η χαρακτηριστική ταινία του αμιδικού δεσμού στα 1650 cm^{-1} , γεγονός που αποδεικνύει ότι η τεχνική υψηλού κενού διασφαλίζει όλα τα συνθετικά στάδια.



Σχήμα 19: Φάσμα IR της πρόδρομης ένωσης της L-Αλανίνης (μπλε γραμμή), και του τελικού προϊόντος ALA-NCA (κόκκινη γραμμή).

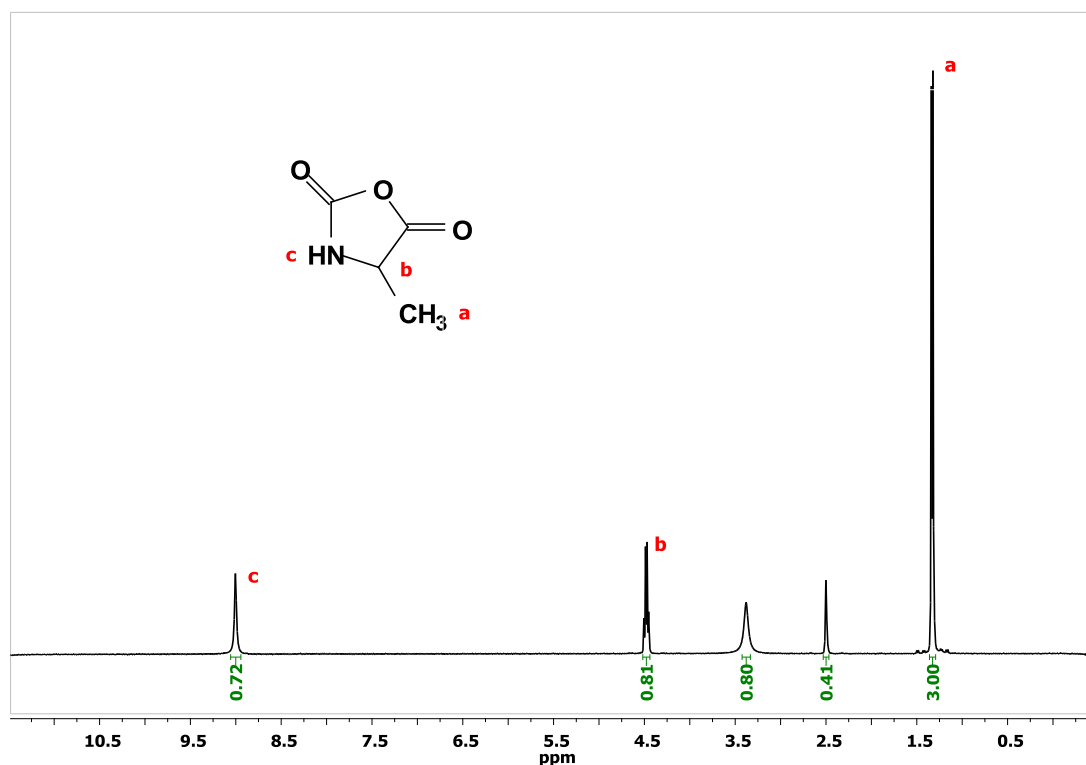
4.2 Μελέτη των N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs) με την τεχνική του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του N^{im}-trt-(L)-His NCA επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος ¹H-NMR του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl₃ (Σχήμα 20). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 2.80–3.20 (2H, –CH₂–), 4.50–4.65 (1H, –CH– του δακτυλίου του NCA), 6.70 (1H, –NH– του δακτυλίου του NCA), 7.00–7.45 (16H, ArH των τριτυλο-ομάδων και N–CH=C του ιμιδαζολικού δακτυλίου), 7.65–7.85 (1H, N–CH=N του ιμιδαζολικού δακτυλίου).



Σχήμα 20: Φάσμα ¹H-NMR του N^{im}-Trt-His NCA, σε CDCl₃

Η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του Ala-NCA επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος ¹H-NMR του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο DMSO (Σχήμα 21). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO, δ, ppm): 1.20–1.50 (3H, –CH₃–), 4.20–4.50 (1H, –CH– του δακτυλίου του NCA), 8.8–9.2 (1H, –NH– του δακτυλίου του NCA).



Σχήμα 21: Φάσμα ^1H NMR του Ala-NCA σε DMSO- d_6 .

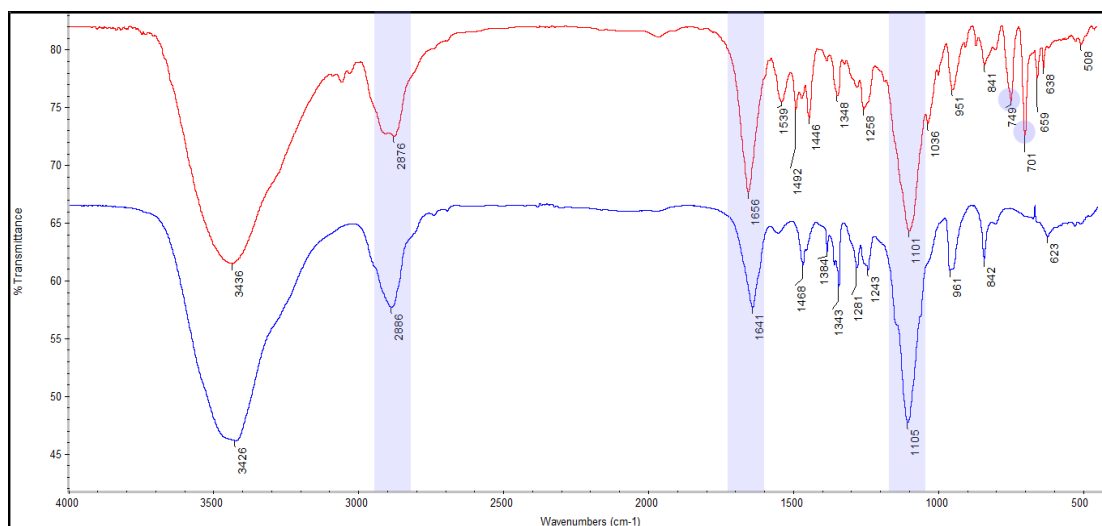
4.3 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου

Οι αντιδράσεις πολυμερισμού παρακολουθήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας IR, ενώ ο ελεγχόμενος χαρακτήρας του πολυμερισμού επιβεβαιώθηκε μέσω των τεχνικών ^1H -NMR και SEC.

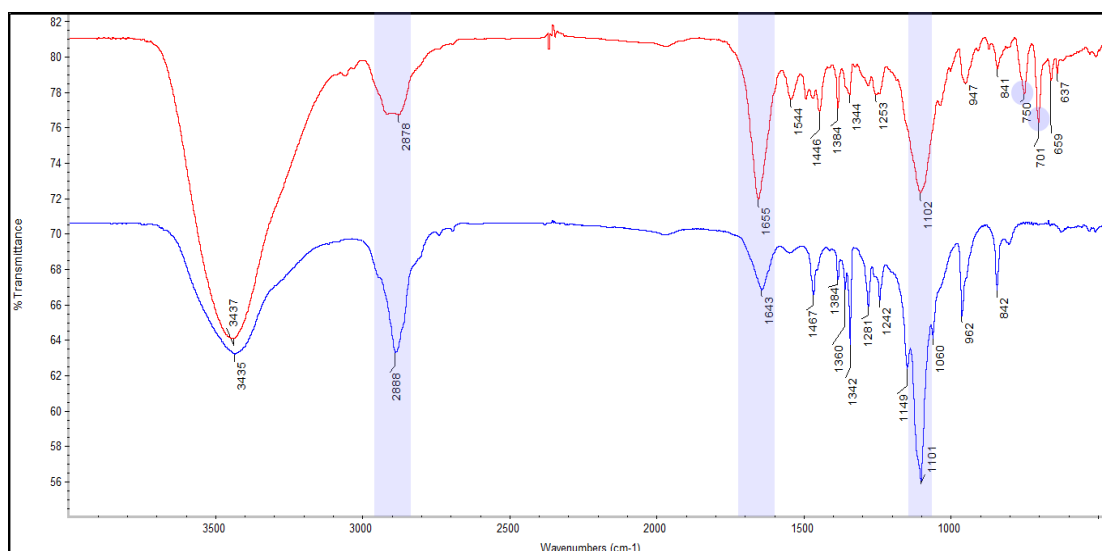
Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού των τεσσάρων συμπολυμερών που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία, λήφθηκαν φάσματα IR, τα οποία δίνουν τη δυνατότητα, να παρακολουθηθεί η πορεία του πολυμερισμού με επιτυχία, λόγω της χαρακτηριστικής κορυφής που δίνει η δόνηση του αμιδικού δεσμού (που σχηματίζεται στα εν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

Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και των τριών κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) με διαφορετικά ποσοστά Ala/His, 10, 20, 40%, αρχικά λαμβάνονται φάσματα IR, αμέσως μετά τον πολυμερισμό και πριν την αποπροστασία των πολυμερών και στο τέλος λαμβάνονται φάσματα IR μετά την ολοκλήρωση όλων των σταδίων του πολυμερισμού. Στα φάσματα που παρατίθενται, με κόκκινο χρώμα

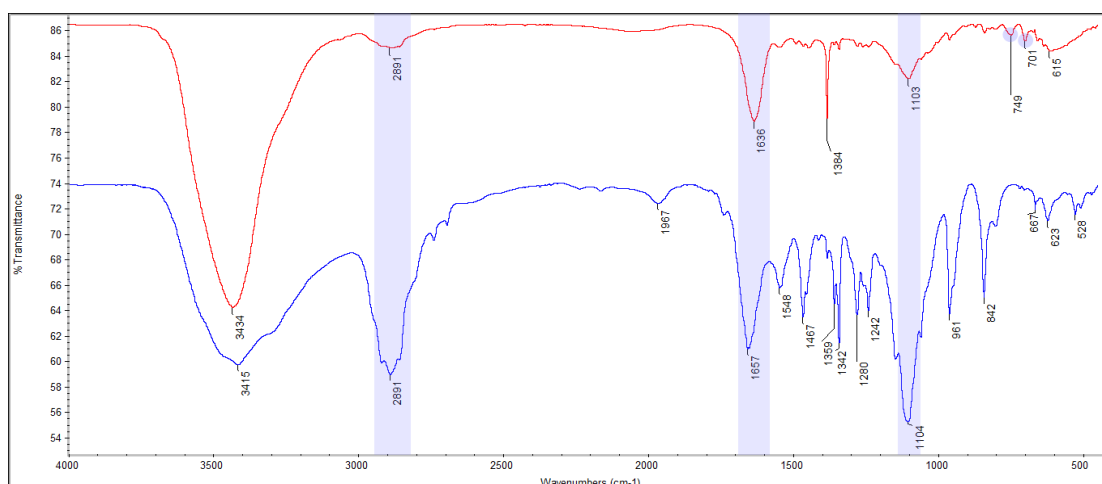
σημειώνονται τα φάσματα που αντιστοιχούν στα πολυμερή πριν την αποπροστασία και με μπλε χρώμα σημειώνονται τα φάσματα που αντιστοιχούν στα τελικά πολυμερή. Και στους δύο τύπους φασμάτων παρατηρείται η ταινία απορρόφησης της δόνησης του αμιδικού δεσμού των πολυμερών στα 1650 cm^{-1} , δηλαδή η δόνηση του αζώτου της μίας δομικής μονάδας που συνδέεται με το καρβονύλιο της επόμενης. Άλλες χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 1105 cm^{-1} και στα 2888 cm^{-1} , όπου βρίσκεται η δόνηση του αιθερικού δεσμού C–O–C του πολυ(αιθυλενοξειδίου). Στα φάσματα των πολυμερών πριν την αποπροστασία (κόκκινα φάσματα), στα 749 cm^{-1} και 701 cm^{-1} , εμφανίζονται κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών --CH=CH-- , των βενζολικών δακτυλίων των τρίτυλο- προστατευτικών ομάδων. Αυτές οι κορυφές απουσιάζουν από τα τελικά φάσματα των πολυμερών (μπλε φάσματα), καθώς οι τρίτυλο-ομάδες έχουν απομακρυνθεί με τη διαδικασία της αποπροστασίας (αντίδραση με TFA και επακόλουθη διαδικασία διαπίδυσης). Τα φάσματα IR των τριών συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) με διαφορετικά ποσοστά Ala/His, 10, 20, 40%, όπου διακρίνονται οι κορυφές που προαναφέρθηκαν, δίνονται στα ακόλουθα σχήματα.



Σχήμα 22: Φάσμα IR του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 10% Ala/His (κόκκινη γραμμή), μετά την πλήρη αποπροστασία του (μπλε γραμμή).



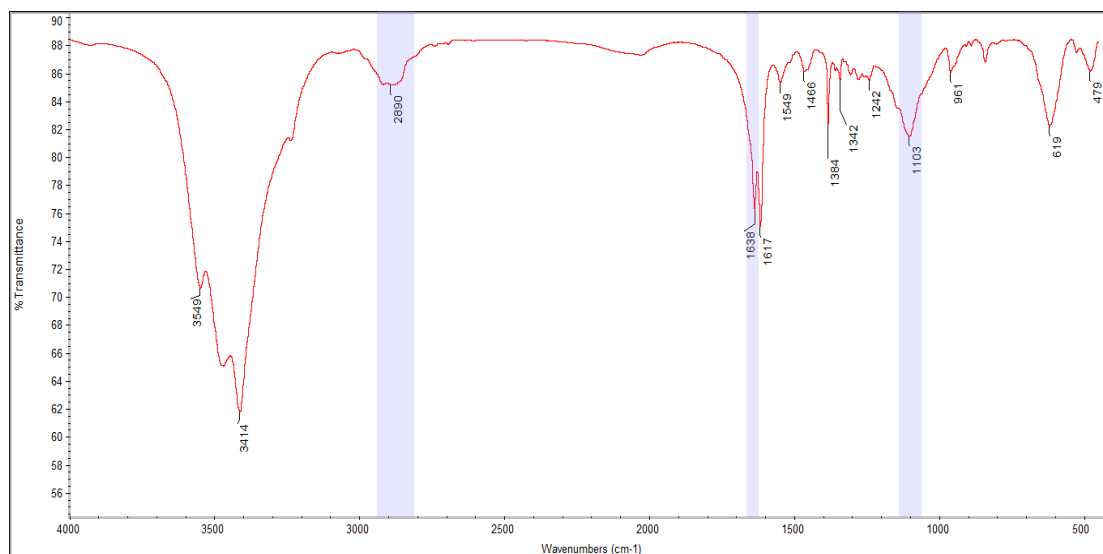
Σχήμα 23: Φάσμα IR του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 20% Ala/His (κόκκινη γραμμή), μετά την πλήρη αποπροστασία του (μπλε γραμμή).



Σχήμα 24: Φάσμα IR του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 40% Ala/His (κόκκινη γραμμή), μετά την πλήρη αποπροστασία του (μπλε γραμμή).

Η επιτυχής σύνθεση του πολυμερούς PEO-*b*-PAIa επιβεβαιώνεται με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR. Και σε αυτό το φάσμα παρατηρείται η ταινία απορρόφησης της δόνησης του αμιδικού δεσμού των πολυμερών στα 1638 cm^{-1} , δηλαδή η δόνηση του αζώτου της μίας δομικής μονάδας που συνδέεται με το καρβονύλιο της επόμενης. Άλλες χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 1103 cm^{-1} και στα 2919 cm^{-1} , όπου βρίσκεται η δόνηση του αιθερικού

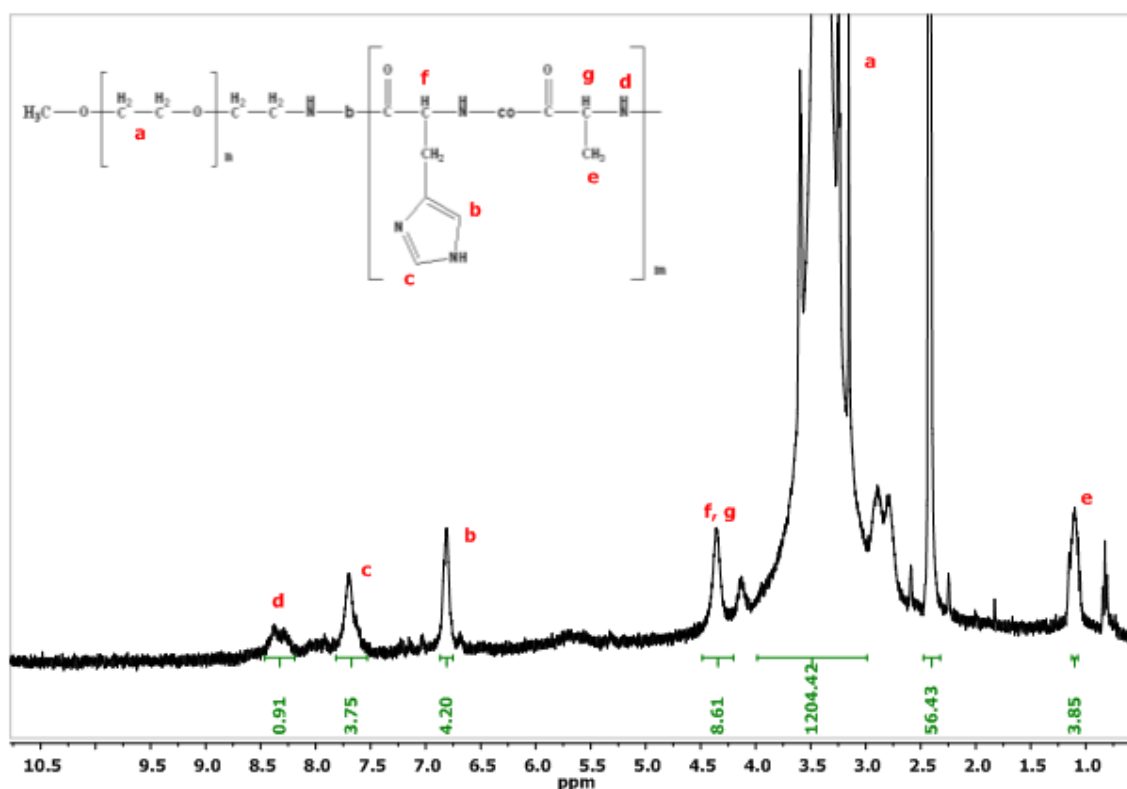
δεσμού C–O–C του πολυ(αιθυλενοξειδίου). Σε αυτό τον πολυμερισμό δεν υπήρχαν προστατευτικές ομάδες, επομένως δεν ελήφθησαν άλλα φάσματα IR κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του πολυμερισμού.



Σχήμα 25: Φάσμα IR του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PAIa.

4.4 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Η επιτυχής σύνθεση των δισυσταδικών τριπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) με διαφορετικά ποσοστά 10%, 20%, 40% Ala/His επιβεβαιώνεται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ των ληφθέντων πολυμερών σε διαλύτη δευτεριωμένο DMSO. Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά μόνο το φάσμα του πολυμερούς με 20% Ala/His (Σχήμα 26). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα των μονομερικών μονάδων, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, δ , ppm): Για την μονομερική μονάδα της αλανίνης: 1.20–1.50 (3H, $-\text{CH}_3-$), 4.20–4.50 (1H, $-\text{CH}-$), 8.20–8.60 (1H, $-\text{NH}-$). Για την μονομερική μονάδα της ιστιδίνης: 4.20–4.50 (1H, $-\text{CH}-$), 6.70–7.00 (N-CH=C του ιμιδαζολικού δακτυλίου), 7.50–7.80 (1H, N-CH=N του ιμιδαζολικού δακτυλίου). Για την μονομερική μονάδα του αιθυλενοξειδίου: 3.00–3.80 (4H, $-\text{CH}_2-$).



Σχήμα 26: Φάσμα ^1H -NMR του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 20% Ala/His, σε DMSO-*d*.

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR είναι δυνατόν να εξακριβωθεί ότι η σύσταση της δεύτερης συστάδας είναι 20% Ala/His από την ολοκλήρωση δυο χαρακτηριστικών κορυφών του φάσματος του σχήματος 26, της κορυφής **e**, η οποία αντιστοιχεί στα 3H του $-\text{CH}_3-$ της αλανίνης και της κορυφής **b**, η οποία αντιστοιχεί στο 1H του $\text{N}-\text{CH}=\text{C}$ του ιμιδαζολικού δακτυλίου.

Η συλλογιστική πορεία που ακολουθείται είναι η εξής:

Το εμβαδόν της κορυφής **e** είναι ίσο με 3.85 και αντιστοιχεί σε 3H. Επομένως, κάθε H του $-\text{CH}_3-$ της αλανίνης αντιστοιχεί σε εμβαδόν ίσο με 1.28. Αντίστοιχα, το εμβαδόν της κορυφής **b** είναι ίσο με 4.20 και αντιστοιχεί σε 1H. **Ο λόγος $e/e+b = 1.28/1.28+4.20=0.23$, δηλαδή 23%.**

Για τον λόγο των μονομερικών μονάδων της αλανίνης, ως προς την ιστιδίνη ισχύει:

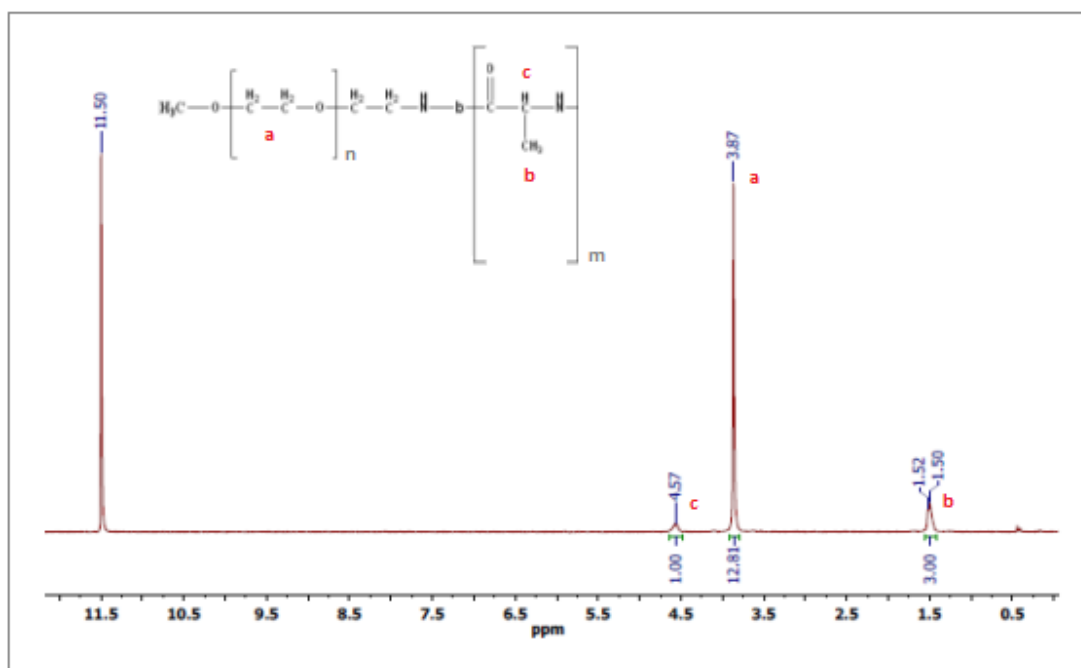
$$\text{Μονομ. Μον. Ala} = 0.02025\text{g Ala} / 115.088\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} = 1.76$$

$$\text{Μονομ. Μον. His} = 0.29779\text{g His} / 423\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} = 7.04$$

Ο λόγος $M.M. Ala/M.M Ala+M.M. His = 1.76/1.76+7.04=0.20$, δηλαδή 20%.

Παρατηρούμε ότι οι δύο λόγοι είναι περίπου ίσοι, επομένως είναι δυνατόν να επιβεβαιωθεί η επιτυχής σύνθεση του πολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με ποσοστό 20% Ala/His.

Η επιτυχής σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PAla επιβεβαιώνεται με λήψη φάσματος 1H -NMR του ληφθέντος πολυμερούς σε διαλύτη δευτεριωμένο TFA. Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα των μονομερικών μονάδων, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. 1H -NMR (300 MHz, TFA, δ, ppm): Για την μονομερική μονάδα της αλανίνης: 1.20–1.50 (3H, –CH₃–), 4.20–4.50 (1H, –CH–). Για την μονομερική μονάδα του αιθυλενοξειδίου: 3.50–4.00 (4H, –CH₂–).



Σχήμα 27: Φάσμα 1H -NMR του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PAla, σε TFA-d.

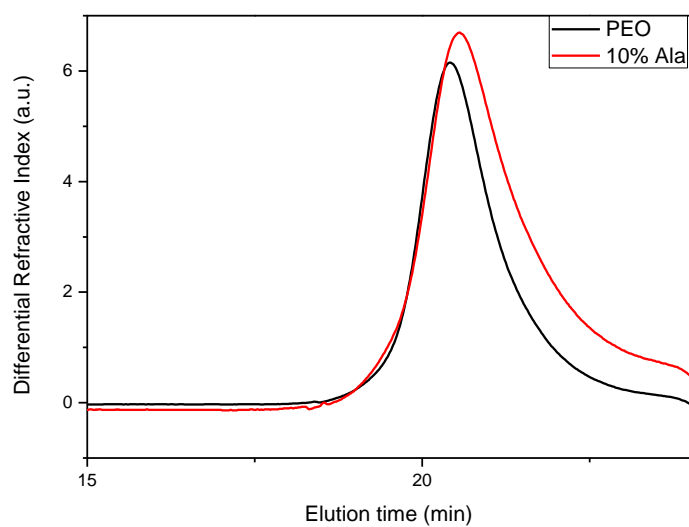
4.5 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Χρωματογραφίας Αποκλεισμού Μεγεθών

Τα χρωματογραφήματα SEC των δισυσταδικών τριπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) με διαφορετικά ποσοστά 10%, 20%, 40% Ala/His που

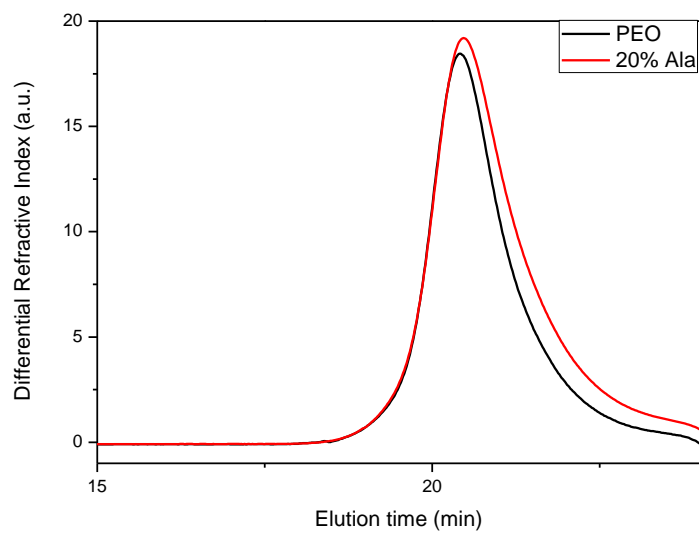
συντέθηκαν, παρατίθενται σε άμεση συσχέτιση με τα αντίστοιχα του μακροαπαρχητή $m\text{-PEO-NH}_2$ που χρησιμοποιήθηκε. Παρατηρούμε ότι και στα τρία χρωματογραφήματα (Σχήματα 28, 29, 30) οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πολυμερή εμφανίζονται λίγο μετά τις κορυφές που αντιστοιχούν στον μακροαπαρχητή. Το γεγονός αυτό, έρχεται σε αντίθεση με το γράφημα το οποίο αναμέναμε, στο οποίο η κορυφή του πολυμερούς θα έπρεπε να εμφανίζεται σε μικρότερο χρόνο έκλουσης, καθώς το μοριακό του βάρος είναι μεγαλύτερο (16 kDa) από αυτό του μακροαπαρχητή (10 kDa). Ο διαχωρισμός όμως στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών γίνεται με βάση τον υδροδυναμικό όγκο. Έτσι, είναι δυνατόν ο υδροδυναμικός όγκος του πολυμερούς να μειώνεται λόγω συσσωμάτωσης και επομένως να αυξάνεται ο χρόνος έκλουσής του.

Αν και η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών δεν μπορεί να γίνει εμφανής μέσω της SEC, ωστόσο μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα ότι πραγματοποιήθηκε εξαιτίας των αποτελεσμάτων που συγκεντρώνουμε από την χρήση των υπόλοιπων τεχνικών μοριακού χαρακτηρισμού.

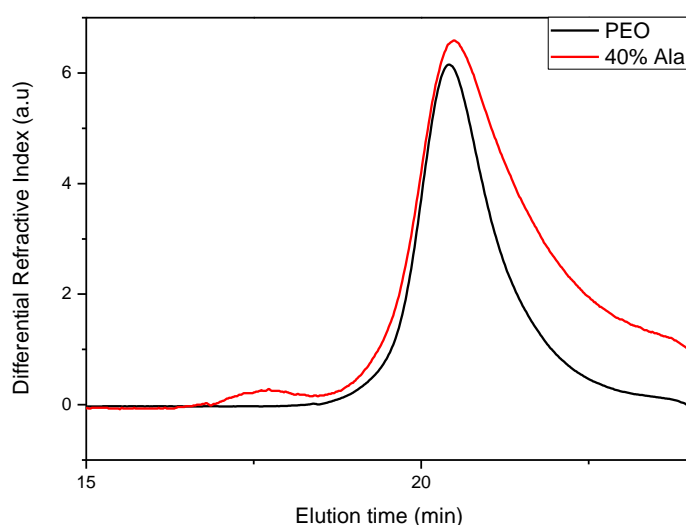
Το συμπολυμερές $\text{PEO-}b\text{-PAIa}$ δεν χαρακτηρίστηκε με αυτήν την τεχνική, λόγω της μειωμένης διαλυτότητας του πολυμερούς στα υδατικά του διαλύματα.



Σχήμα 28: Χρωματογράφημα SEC σε νερό του μακροαπαρχητή m -PEO-NH₂ και του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 10% Ala/His.



Σχήμα 29: Χρωματογράφημα SEC σε νερό του μακροαπαρχητή m -PEO-NH₂ και του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 20% Ala/His.



Σχήμα 30: Χρωματογράφημα SEC σε νερό του μακροαπαρχητή *m*-PEO-NH₂ και του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO-*b*-P(His-*co*-Ala) με 40% Ala/His.

4.6 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική του Κυκλικού Διχρωϊσμού

Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής των συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-*co*-Ala) με διαφορετικά ποσοστά Ala/His (10, 20, 40%) καθώς και του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PAla πραγματοποιήθηκε μέσω μετρήσεων κυκλικού διχρωϊσμού σε διάφορες τιμές pH και θερμοκρασίες. Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής αυτών των συμπολυμερών παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς οι μεταβολές της δομής εξαρτώνται άμεσα από τις μεταβολές του pH, επομένως μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την ικανότητα απόκρισης των συντιθέμενων πολυμερών σε αλλαγές του pH. Η μεταβολή του pH, αλλάζει την αυτοοργάνωση των πολυμερών, καθιστώντας τα εν δυνάμει συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, με δυνατότητες εκλεκτικής αποδεύσμευσης αυτών.

Για τη λήψη του φάσματος χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο JASCO J-815. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα διαστάσεων 0,1 cm, η οποία πληρώθηκε με τα υδατικά διαλύματα των πολυμερών συγκέντρωσης 35×10^{-4} g/ml. Η ρύθμιση του pH επετεύχθη ξεκινώντας από νερό Milli-Q και με επακόλουθη προσθήκη σταγόνων, αρχικά υδατικού διαλύματος NaCl 0.1N, έτσι ώστε το pH να ρυθμιστεί στο 7.4 και έπειτα με προσθήκη σταγόνων υδατικού

διαλύματος HCl 0.1N, έτσι ώστε να μειώνεται σταδιακά το pH και να λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα σε κάθε ενδιαμέση τιμή. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ψηφιακού πεχάμετρου. Οι τιμές του pH στις οποίες μελετήθηκαν οι μεταβολές της δευτεροταγούς δομής των πολυμερών ήταν οι εξής: pH=7.4, δηλαδή το pH του υγιούς κυττάρου, pH= 6.5, pH εξωκυττάριας περιοχής καρκινικών κυττάρων, pH=5, pH ενδοκυττάριας περιοχής καρκινικού κυττάρου και pH=3. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 25 °C (θερμοκρασία περιβάλλοντος), στους 37 °C (θερμοκρασία υγιούς κυττάρου) και στους 41 °C (θερμοκρασία καρκινικού κυττάρου) έλαβε χώρα με τη χρήση ειδικής ψηφιακής συσκευής θερμοστάτησης. Επιπλέον, η παροχή του αζώτου ρυθμίστηκε στα 15 l/min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σάρωση του δείγματος στην περιοχή μηκών κύματος 260-180 nm και οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν από το όργανο 5 φορές ώστε να μειωθεί ο θόρυβος.

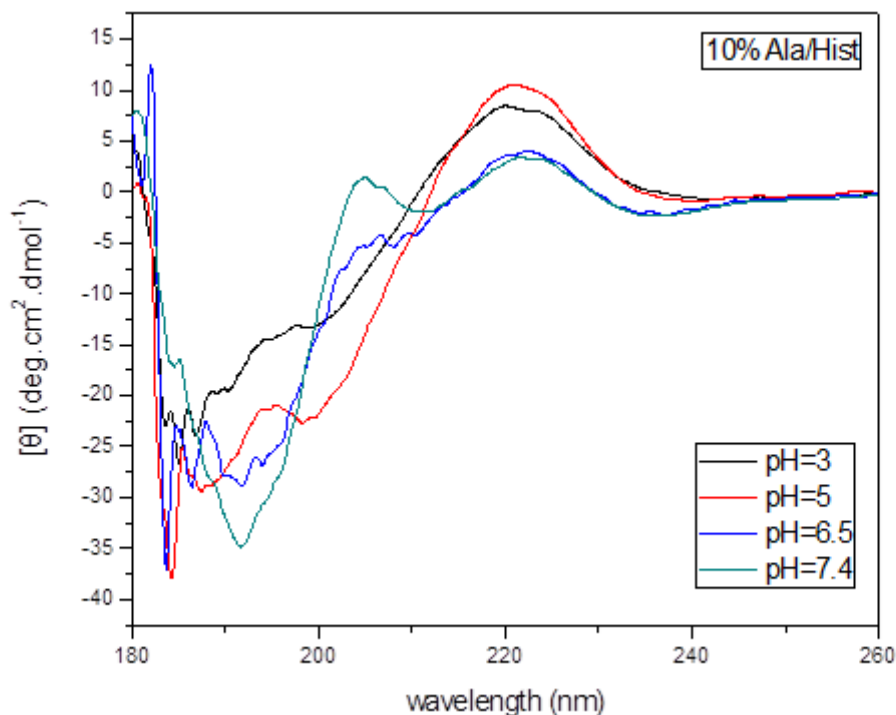
Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(Hist-co-Ala) με ποσοστό Ala/His = 10%, από το pH, σε σταθερή θερμοκρασία 25 °C παρουσιάζεται στο σχήμα 31. Από το συγκεκριμένο φάσμα φαίνεται ότι πραγματοποιείται μετάβαση της δευτεροταγούς δομής του πολυμερούς από β-στροφή, η οποία επικρατεί σε χαμηλές τιμές pH (pH=3 και pH=5), σε δομή τυχαίου σπειράματος όσο η τιμή του pH αυξάνεται ((pH=6.5 και pH=7.4).

Ειδικότερα, η παρατηρούμενη αρνητική κορυφή στα 185 nm, σε συνδυασμό με τη θετική κορυφή στα 220 nm είναι χαρακτηριστικές της δομής της β-στροφής. Ενώ, η παρατηρούμενη αρνητική κορυφή στα 195 nm, σε συνδυασμό με τη θετική κορυφή στα 205 nm είναι χαρακτηριστικές της δομής τυχαίου σπειράματος.

Η δευτεροταγής δομή της β-στροφής μπορεί να θεωρηθεί ότι οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό της ιστιδίνης στο συγκεκριμένο συμπολυμερές (90% His/Ala). Η β-στροφή είναι η μόνη διαμόρφωση που ευνοεί ενθαλπικά τη δομή του πολυπεπτιδίου στο χώρο, και αυτό γιατί με αυτή τη διαμόρφωση οι ιμιδαζολικοί δακτύλιοι της πολυ(L-ιστιδίνης) έρχονται τόσο κοντά μεταξύ τους αναπτύσσοντας δεσμούς υδρογόνου, όσο σε καμία άλλη διαμόρφωση. Σε αυτή τη διαμόρφωση, ανά 3 αμινοξέα δημιουργείται μία θηλειά, καθώς το N του ιμιδαζολικού δακτυλίου ενός αμινοξέος δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με

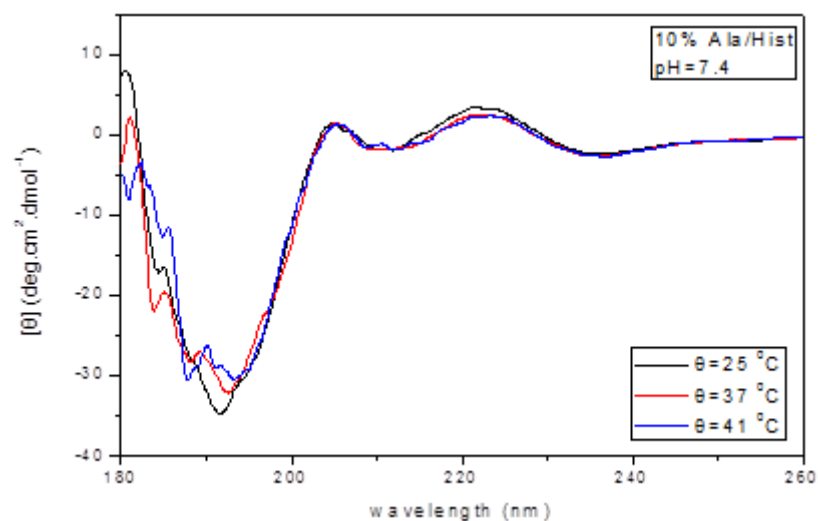
το καρβονύλιο του μεθεπόμενου αμινοξέος και ταυτόχρονα δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με το H του δικού του ιμιδαζολικού δακτυλίου.

Σε pH=7.4 οι δομικές μονάδες της πολυ(L-ιστιδίνης) είναι αποπρωτονιωμένες και άρα γίνονται υδρόφοβες, στο γεγονός αυτό ίσως οφείλεται η δομή τυχαίου σπειράματος που αποκτά το πολυπεπτίδιο όσο οι τιμές του pH αυξάνονται.

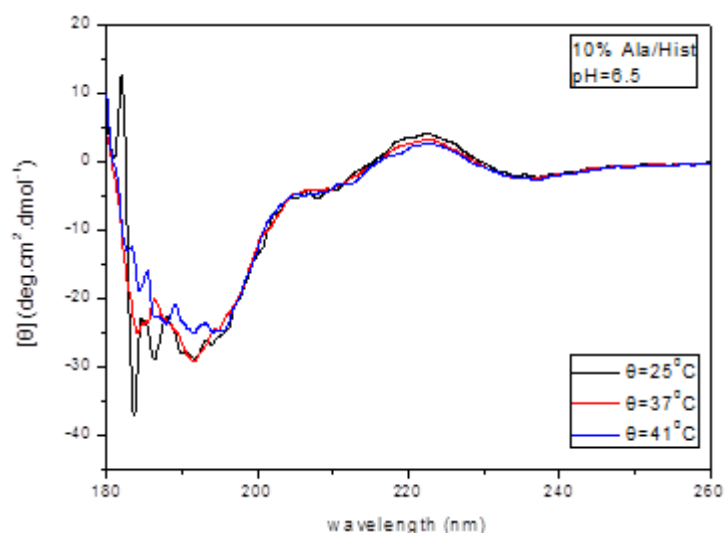


Σχήμα 31: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 10% Ala/His, συναρτήσει του pH, στους 25 °C.

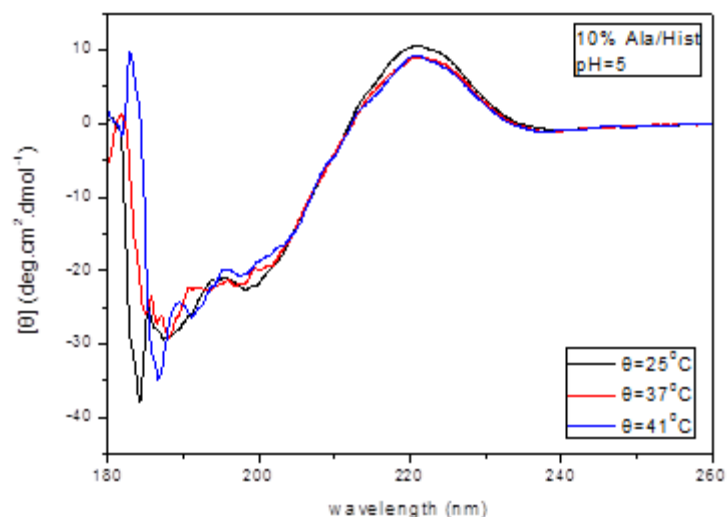
Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με ποσοστό Ala/His = 10%, από τη θερμοκρασία, στα διάφορα pH παρουσιάζεται στα επόμενα σχήματα 32-35. Από τα φάσματα παρατηρείται ότι δεν εμφανίζεται καμία αλλαγή στη δευτεροταγή δομή του πολυπεπτιδίου αυξανόμενης της θερμοκρασίας, σε σταθερή τιμή pH.



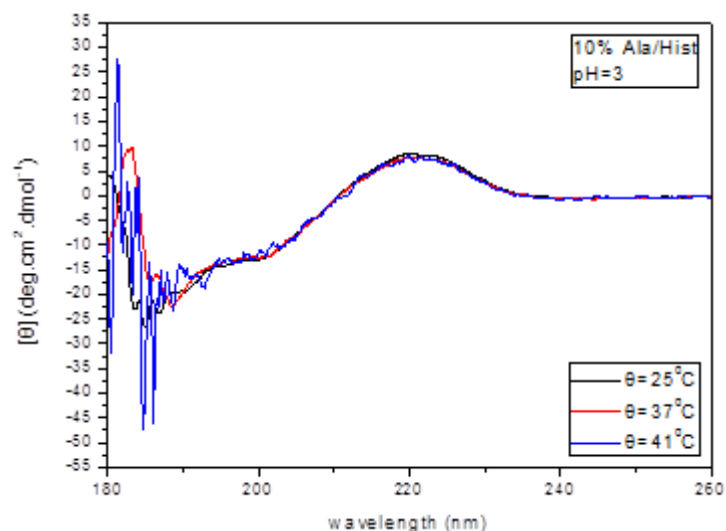
Σχήμα 32: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 10% Ala/Hist, συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε pH=7,4.



Σχήμα 33: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 10% Ala/Hist, συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε pH=6,5.



Σχήμα 34: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 10% Ala/His, συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε pH=5.

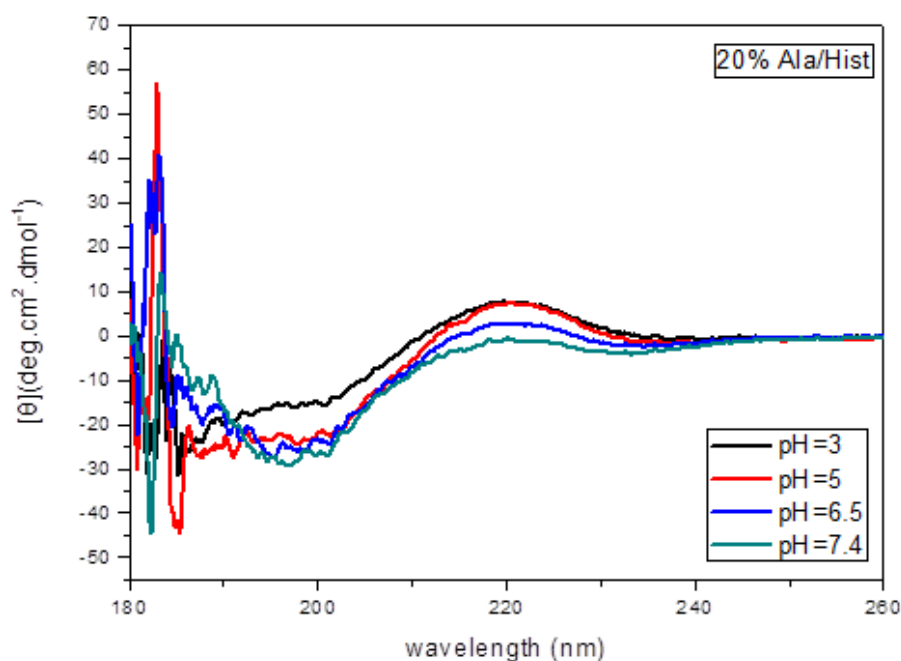


Σχήμα 35: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 10% Ala/His, συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε pH=3.

Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με ποσοστό Ala/His = 20%, από το pH, σε σταθερή θερμοκρασία 25 °C παρουσιάζεται στο σχήμα 36. Από το συγκεκριμένο φάσμα φαίνεται ότι πραγματοποιείται μετάβαση της δευτεροταγούς δομής του πολυμερούς από β-στροφή, η οποία επικρατεί σε χαμηλές τιμές pH (pH=3 και pH=5), σε δομή τυχαίου σπειράματος όσο η τιμή του pH αυξάνεται ((pH=6.5 και pH=7.4).

Ειδικότερα, η παρατηρούμενη αρνητική κορυφή στα 185 nm, σε συνδυασμό με τη θετική κορυφή στα 220 nm είναι χαρακτηριστικές της δομής της β-

στροφής. Ενώ, η παρατηρούμενη αρνητική κορυφή στα 195 nm, σε συνδυασμό με τη θετική κορυφή στα 205 nm είναι χαρακτηριστικές της δομής τυχαίου σπειράματος. Η συμπεριφορά του πολυπεπτιδίου αυτού προσομοιάζει εκείνη του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με ποσοστό Ala/His = 10%, επομένως μπορεί να δοθεί η ίδια ερμηνεία για την μεταβολή της δευτεροταγούς του δομής.



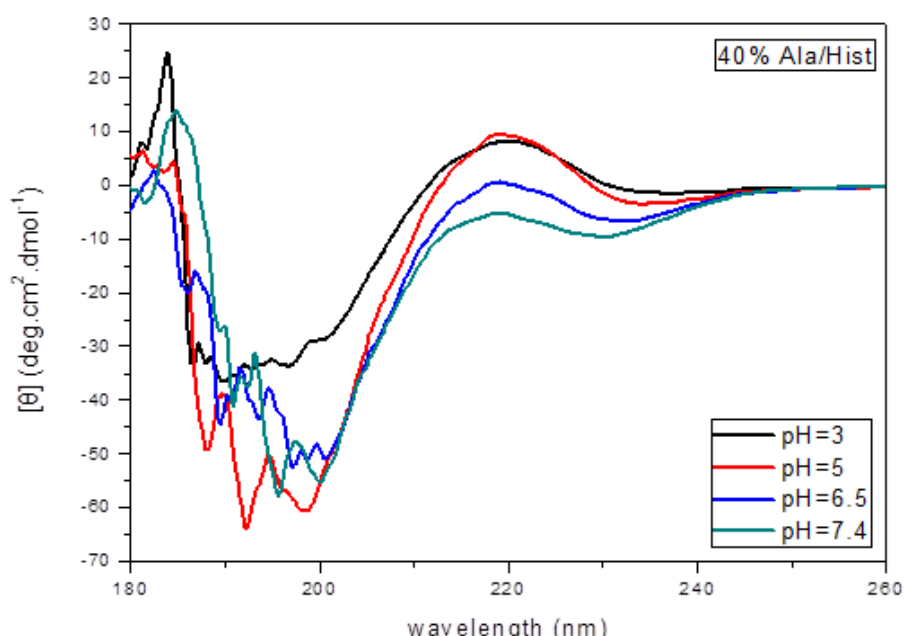
Σχήμα 36: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 20% Ala/His, συναρτήσει του pH, στους 25 °C.

Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με ποσοστό Ala/His = 20%, από τη θερμοκρασία, στα διάφορα pH παραλείπεται, καθώς δεν εμφανίζεται καμία αλλαγή στη δευτεροδιάταξη του πολυπεπτιδίου αυξανόμενης της θερμοκρασίας, σε σταθερή τιμή pH.

Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με ποσοστό Ala/His = 40%, από το pH, σε σταθερή θερμοκρασία 25 °C παρουσιάζεται στο σχήμα 37. Από το συγκεκριμένο φάσμα φαίνεται ότι σε όλα τα pH το πολυπεπτίδιο αποκτά μία ενδιάμεση δευτεροταγή δομή β-στροφής και α-έλικας .

Ειδικότερα στα pH=5 και 6.5, η παρατηρούμενη αρνητική κορυφή στα 185 nm, σε συνδυασμό με τη θετική κορυφή στα 220 nm είναι χαρακτηριστικές της

δομής της β-στροφής, ενώ η διπλή αρνητική κορυφή στα 200 nm είναι ενδεικτική της δομής της α-έλικας. Στα pH=3 και 7.4, η παρατηρούμενη θετική κορυφή στα 190 nm και η διπλή αρνητική κορυφή στα 200 nm είναι ενδεικτική της δομής της α-έλικας, ενώ η θετική κορυφή στα 220 nm είναι χαρακτηριστική της δομής της β-στροφής. Η δομή της α-έλικας είναι μία συνηθισμένη δομή που αποκτά η πόλυ(L-αλανίνη), σύμφωνα με διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές, ενώ η δομή της β-στροφής είναι η πιο ευνοϊκή θερμοδυναμικά δευτεροδιάταξη της πόλυ(L-ιστιδίνης), με βάση τα όσα αναφέρθηκαν ανωτέρω. Σε αυτό το πολυμερές, τα δύο αμινοξέα βρίσκονται περίπου σε ίση αναλογία (Ala/His = 40%), επομένως είναι λογικό το τελικό πολυπεπτίδιο να αποκτά μία ενδιάμεση δευτεροταγή δομή.



Σχήμα 37: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 40% Ala/His, συναρτήσει του pH, στους 25 °C.

Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Ala) με ποσοστό Ala/His = 40%, από τη θερμοκρασία, στα διάφορα pH παραλείπεται, καθώς δεν εμφανίζεται καμία αλλαγή στη δευτεροταγή δομή του πολυπεπτιδίου αυξανόμενης της θερμοκρασίας, σε σταθερή τιμή pH.

Για το συμπολυμερές PEO-*b*-PAla δεν λαμβάνονται φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού, λόγω της μειωμένης διαλυτότητας του πολυμερούς στα υδατικά του διαλύματα.

4.7 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός

Η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός χρησιμοποιείται προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα αυτοοργάνωσης και το μέγεθος των συντιθέμενων πολυπεπτιδίων. Έτσι, πραγματοποιούνται μετρήσεις για τα τρία πολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) με διαφορετικά ποσοστά Ala/His (10, 20, 40%), ενώ το συμπολυμερές PEO-*b*-PAla δεν χαρακτηρίζεται με αυτήν την τεχνική, λόγω της μειωμένης διαλυτότητας του πολυμερούς στα υδατικά του διαλύματα. Οι μετρήσεις λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά pH και θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται σε pH= 7.4 (pH του αίματος), σε pH= 6.5 (pH εξωτερικά ενός καρκινικού κυττάρου) και pH= 5 (pH καρκινικού κυττάρου). Σε κάθε pH γίνονται μετρήσεις σε τέσσερις θερμοκρασίες: 25 °C που είναι η θερμοκρασία δωματίου, στους 37 °C που είναι η θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος και στους 41 °C που είναι η θερμοκρασία της φλεγμονής που κάνουν τα καρκινικά κύτταρα. Σε κάθε pH και θερμοκρασία μετρίεται η διάμετρος των σωματιδίων σε τρεις γωνίες 45°, 90°, 135° για να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το πως σκεδάζουν τα μικρά σωματίδια και πως τα μεγάλα, καθώς και αν υπάρχει γωνιακή εξάρτηση.

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις με την τεχνική αυτή, αρχικά παρασκευάζονται διαλύματα των πολυμερών με THF, με συγκέντρωση 3mg πολυμερούς/2ml THF. Τα διαλύματα αφήνονται μία μέρα υπό ανάδευση με το THF, το οποίο χρησιμοποιείται προκειμένου να «σπάσει» τη συσσωμάτωση των πολυμερών. Την επόμενη μέρα, στα διαλύματα αυτά προστίθενται 2ml από το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο θα ρυθμίσει το επιθυμητό κάθε φορά pH. Έπειτα, τα διαλύματα αυτά, δηλαδή πολυμερές σε THF και ρυθμιστικό διάλυμα, θερμαίνονται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία μέχρι 80 °C, προκειμένου να εξατμιστεί το THF (Σ.Ζ = 66 °C) , αλλά όχι το νερό. Τα τελικά διαλύματα που λαμβάνονται προς μέτρηση έχουν συγκέντρωση 3mg πολυμερούς/2ml ρυθμιστικού διαλύματος.

Τα δείγματα των πολυμερών μετριοούνται με δυναμική σκέδαση φωτός με δύο τρόπους: 1) άμεσα, χωρίς να έχει προηγηθεί φιλτράρισμα, 2) κατόπιν

φιλτραρίσματος του δείγματος με υδρόφιλο φίλτρο πορώδους 0,45μm, ώστε να ελαχιστοποιηθεί το ποσοστό της σκόνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται και με τους δύο τρόπους, προκειμένου να συγκριθούν και να διεξαχθούν πιο αξιόπιστα συμπεράσματα.

Παρακάτω απεικονίζονται σε έναν συγκεντρωτικό πίνακα οι μετρήσεις της υδροδυναμικής ακτίνας για τα τρία πολυμερή σε pH= 7.4, 6.5, 5.0 και T=25 °C, 37 °C, 41 °C.

Από τα αποτελέσματα του DLS για τα τρία πολυμερή προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:.

Όσο μειώνεται το pH η υδροδυναμική ακτίνα (Rh) αυξάνεται και αυτό συμβαίνει γιατί φορτίζονται οι αλυσίδες με αποτέλεσμα τα συσσωματώματα να φουσκώνουν επειδή θέλουν να είναι πιο υδατοδιαλυτά.

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων DLS για τα συμπολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala), με 10, 20,40 (%) Ala/His, σε διαφορετικά pH και θερμοκρασίες

	ALA	10%			20%			40%		
	Temp	25°C	37°C	41°C	25°C	37°C	41°C	25°C	37°C	41°C
pH	angle	Rh (nm)								
7,4	45°	201,10	170,80	160,00	142,00	1) 42,47 2) 164,00	129,20	137,60	146,30	1) 46,70 2) 176,60
	90°	151,60	144,30	142,20	118,20	106,90	116,60	111,50	115,80	113,70
	135°	137,20	1) 152,50 2) 131,30	1) 10,77 2) 125,40	101,00	98,38	98,37	104,00	97,26	99,05
6,5	45°	1) 135,10 2) 801,40	235,50	253,50	237,00	223,90	293,90	168,70	233,10	223,00
	90°	152,00	121,90	133,60	163,70	1) 103,70 2) 2647,00	153,70	121,00	116,70	121,20
	135°	139,20	116,70	117,10	130,90	143,00	169,40	111,70	97,09	111,80
5	45°	254,00	227,60	255,10	321,20	309,90	1) 160,90 2) 716,70	1) 123,40 2) 527,30	374,00	1) 198,50 2) 765,60
	90°	143,30	211,50	1) 82,85 2) 314,10	165,30	164,40	177,10	1) 175,50 2) 1005,00	1) 119,30 2) 476,50	293,40
	135°	192,60	138,20	1) 46,45 2) 209,20	172,90	209,70	151,80	1) 56,92 2) 279,30 3) 2512,00	1) 83,17 2) 558,70	260,50

4.8 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Στατικής Σκέδασης Φωτός

Οι μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός πραγματοποιούνται με το ίδιο όργανο του DLS σε γωνιακό εύρος 30°-150° λαμβάνοντας μέτρηση ανά 10 μοίρες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό του γυροσκοπικού λόγου γίνεται με τη χρήση της προσέγγισης Guinier 2ης τάξης η οποία είναι μια

πολυωνυμική εξίσωση από την οποία βρίσκουμε το R_g/R_h . Η μέθοδος αυτή καθορίζει τη δομή των πολυμερών.

Η αναλογία $\rho=R_g/R_h$ είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο εξαρτάται από τη μορφολογία των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων. Η τιμή ρ κοντά στο 1 αποδίδεται σε μια γεωμετρία κυστιδίου ενώ σε μικρότερες τιμές αποδίδεται σε σφαιρικά μικκύλια (θεωρητικά $\rho=0.775$).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τη στατική σκέδαση και για τα τρία πολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) (Πίνακες 4, 5, 6, 7) και συγκρίνοντας το λόγο R_g/R_h με τη βιβλιογραφία, βρέθηκε ότι: Σε pH 6.5 και 5 και στα τρία πολυμερή η αναλογία $\rho=R_g/R_h \sim 0.2-0.5$, επομένως σχηματίζονται συσσωματώματα συσσωματωμάτων. Σε pH 7.4 τα πολυμερή με 10% και 40% Ala/His, στα οποία η αναλογία $\rho=R_g/R_h \sim 0.75$ σχηματίζουν δομές συσσωματώματος πυρήνα-κελύφους, ενώ το πολυμερές με αναλογία 20% Ala/His, στο οποίο η αναλογία $\rho=R_g/R_h \sim 1$ σχηματίζει κυστίδια (Πίνακας 7).

Πίνακας 4: Μετρήσεις SLS για το πολυμερές PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 10% Ala/His, σε pH= 7.4, 6.5, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 41 °C.

10% ALA - pH=7,4 - Filtration:Yes				
T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	119,9	181,914	0,659
37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	121,3	169,139	0,717
41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	122,7	189,574	0,647

10% ALA - pH=6,5 - Filtration:No				
T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	186,2	883,122	0,211
37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	181,8	756,106	0,240
41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	179,9	617,469	0,291

10% ALA - pH=5 - Filtration:No				
T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	199	400,462	0,497
37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	200,1	403,518	0,496
41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	201,6	449,366	0,449

Πίνακας 5: Μετρήσεις SLS για το πολυμερές PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 20% Ala/His, σε pH= 7.4, 6.5, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 41 °C.

20% ALA - pH=7,4 - Filtration:Yes				
T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	123,1	153,925	0,800
37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	124,3	137,174	0,906
41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	118	124,833	0,945

20% ALA - pH=6,5 - Filtration:No				
T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	188,6	860,613	0,219
37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	191,6	277,065	0,692
41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	190,3	490,33	0,388

20% ALA - pH=5 - Filtration:No				
T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	194,4	483,643	0,402
37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	193,5	510,273	0,379
41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	188,9	435,391	0,434

Πίνακας 6: Μετρήσεις SLS για το πολυμερές PEO-*b*-P(His-co-Ala) με 40% Ala/His, σε pH= 7.4, 6.5, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 41 °C.

40% ALA - pH=7,4 - Filtration:Yes				
T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	114,3	154,416	0,740
37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	120,2	160,981	0,747
41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	120	158,527	0,757

40% ALA - pH=6,5 - Filtration:No				
T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	158,5	326,213	0,486
37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	151,7	323,108	0,470
41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	153	279,266	0,548

40% ALA - pH=5 - Filtration:No				
T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	211,7	825,877	0,256
37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	213,4	686,339	0,311
41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	214,9	642,666	0,334

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων SLS για τα συμπολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala), με 10, 20,40 (%) Ala/His, σε διαφορετικά pH και θερμοκρασίες

ALA	10%			20%			40%		
Temp	25°C	37°C	41°C	25°C	37°C	41°C	25°C	37°C	41°C
pH	Rg / Rh (nm)								
7,4	0,659	0,717	0,647	0,800	0,906	0,945	0,740	0,747	0,757
6,5	0,211	0,240	0,291	0,219	0,692	0,388	0,486	0,470	0,548
5	0,497	0,496	0,449	0,402	0,379	0,434	0,256	0,311	0,334

4.9 Συμπεράσματα - Μελλοντικοί Στόχοι

Ολοκληρώνοντας την περιγραφή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής εργασίας, συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την σύνθεση των συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) με διαφορετικά ποσοστά 10%, 20%, 40% Ala/His.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο ελεγχόμενος πολυμερισμός ROP, με σκοπό τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών χρησιμοποιώντας ως μακροαπαρχητή το m-PEO-NH₂. Η επιτυχής σύνθεση των πολυπεπτιδίων επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές της SEC, του NMR και του IR. Σε επόμενο βήμα, μελετήθηκε η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων από το pH και τη θερμοκρασία με την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού, καθώς επίσης και η συσσωμάτωσή τους με τις τεχνικές της δυναμικής και της στατικής σκέδασης φωτός. Τα αποτελέσματα του κυκλικού διχρωϊσμού έδειξαν ότι για τα συμπολυμερή με 10% και 20% Ala/His, η δομή της β-στροφής ευνοείται στα χαμηλά pH (pH=3 και pH=5), ενώ η δομή τυχαίου σπειράματος ενισχύεται όσο το pH αυξάνεται ((pH=6.5 και pH=7.4). Το συμπολυμερές με 40% Ala/His, σε όλα τα pH, αποκτά μία ενδιάμεση δευτεροταγή δομή β-στροφής και α-έλικας. Τέλος, για συγκεκριμένη τιμή pH η δευτεροδιάταξη των πολυπεπτιδίων δεν επηρεάζεται αυξανόμενης της θερμοκρασίας από τους 25 στους 37 και τέλος στους 41 °C. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την μελέτη των πολυμερών με δυναμική σκέδαση φωτός έδειξαν ότι όσο μειώνεται το pH η υδροδυναμική ακτίνα (Rh) αυξάνεται και αυτό συμβαίνει γιατί φορτίζονται οι αλυσίδες με αποτέλεσμα τα συσσωματώματα να φουσκώνουν επειδή θέλουν να είναι πιο υδατοδιαλυτά. Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τη στατική σκέδαση και για τα τρία πολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Ala) και συγκρίνοντας το λόγο Rg/Rh με τη βιβλιογραφία, βρέθηκε ότι: Σε pH 6.5 και 5 και στα τρία πολυμερή η αναλογία $\rho = Rg/Rh \sim 0.2-0.5$, επομένως σχηματίζονται συσσωματώματα συσσωματωμάτων. Σε pH 7.4 τα πολυμερή με 10% και 40% Ala/His στα

οποία η αναλογία $p=Rg/Rh \sim 0.75$ σχηματίζουν δομές συσσωματώματος πυρήνα-κελύφους, ενώ το πολυμερές με αναλογία 20% Ala/His στο οποίο η αναλογία $p=Rg/Rh \sim 1$ σχηματίζει κυστίδια.

Τα συντιθέμενα πολυπεπτίδια θα μπορούσαν να αποτελέσουν εν δυνάμει συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, λόγω της ικανότητας συσσωμάτωσης και αυτοοργάνωσης σε διάφορα pH και θερμοκρασίες. Επομένως, μελλοντικό στόχο θα μπορούσε να αποτελέσει η δοκιμή εγκλωβισμού κάποιου φαρμάκου στο εσωτερικό των αμφίφιλων αυτών δισυσταδικών συμπολυμερών και ο έλεγχος αποδέσμευσης αυτού.

Η ικανότητα διάσπασης των πολυπεπτιδίων παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων όπως η καθεψίνη B, η καθεψίνη C και η ελαστάση θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει αντικείμενο μελέτης.

Επίσης, η σύνθεση και άλλων συμπολυμερών αυτού του τύπου με μεγαλύτερα ποσοστά Ala/His, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μελλοντικά προκειμένου να ελεγχθεί διεξοδικά η επίδραση της αλανίνης στη δευτεροταγή δομή και τη συσσωμάτωση των πολυμερών.

Τέλος, θα ήταν καλό να μελετηθεί η ικανότητα σχηματισμού υδρογέλης των συμπολυμερών του συγκεκριμένου τύπου σε μεγαλύτερα ποσοστά Ala/His, καθώς όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η αλανίνη ευνοεί τον σχηματισμό υδρογελών.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 8: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος Όρος	Ελληνικός Όρος
Diblock copolymers	Κατά συστάδες συμπολυμερή
Chiral	Χειρόμορφος
Zwitterion	Αμφοτερικό ιόν
α -Helix	α -Έλικα
β -Sheet	β -φύλλο
β -Turn	β -Στροφή
ω -Loop	ω -Θηλιά
Random coil	Τυχαίο σπείραμα
Ring-opening polymerization	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
N-Carboxy anhydride	N-Καρβοξυ ανυδρίτης
Ring strain	Τάση διάνοιξης δακτυλίου
High-vacuum techniques	Τεχνικές υψηλού κενού
Normal amine mechanism	Κανονικός μηχανισμός αμινών
Activated monomer mechanism	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
Blout mechanism	Μηχανισμός του Blout
Dialysis	Διαπίδυση

Drug delivery	Τεχνολογία μεταφοράς φαρμάκων
Micelle	Μικκύλιο
Vesicle (ή polymersome)	Κυστίδιο
Stimuli-responsiveness	Απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα
Physical stimuli-responsive	Αποκρινόμενα συστήματα σε φυσικά ερεθίσματα
Chemical stimuli-responsive	Αποκρινόμενα συστήματα σε χημικά ερεθίσματα
Biological stimuli-responsive	Αποκρινόμενα συστήματα σε βιολογικά ερεθίσματα
Dual stimuli-responsive	Διπλά αποκρινόμενα συστήματα
Upper critical solution temperature	Ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
Lower critical solution temperature	Χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
Critical micelle concentration	Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση
Reverse thermal gelation	Διαδικασία αντίστροφης θερμικής ζελατινοποίησης
Fibrous structure	Δομή ινιδίων
Spherical micellar structure	Σφαιρική μικκυλιακή δομή
Hydrogel	Υδρογέλη
Thermogel	Θερμο-αποκρινόμενη γέλη

Fibroplasias	Ινοπλασία
Twisted fibrils	«Στριμμένα» ινίδια
Nanogold	Νανοσωματίδια χρυσού
Nuclear magnetic resonance	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
Nuclear Overhauser effect	Πυρηνικό φαινόμενο Overhauser
Fourier transform	Μετασχηματισμός Fourier
Size exclusion chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Gel permeation chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Dynamic light scattering	Δυναμική σκέδαση φωτός
Static light scattering	Στατική σκέδαση φωτός
Circular dichroism	Κυκλικός διχρωϊσμός
High-vacuum line	Γραμμή υψηλού κενού
Glove box	Χώρος αποθήκευσης χημικών υλικών υπό αδρανή ατμόσφαιρα, όπου οι χειρισμοί γίνονται με την βοήθεια γαντιών προσαρμοσμένων σε υάλινο διάφραγμα
Flame-drying	Ξήρανση συσκευής στη γραμμή υψηλού κενού προς απομάκρυνση υγρασίας με χρήση φλόγας
Break-seal	Υάλινος υμένας αμπούλας

Milli-Q	Απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό υψηλής καθαρότητας
Freeze-drying	Λυοφιλοποίηση

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

pI	Ισοηλεκτρικό σημείο
BOC	Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα
DCC	<i>N,N'</i> -δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο
DIC	<i>N,N'</i> -διισοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο
ROP	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
NCA	N-Καρβοξυ ανυδρίτης
I	Κατανομή μοριακών βαρών
RROP	Ριζικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
AROP	Ανιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
CROP	Κατιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
ROMP	Πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου
Sar-NCA	N-καρβοξυ ανυδρίτης της σαρκοσίνης
HVT	Τεχνικές υψηλού κενού
NAM	Κανονικός μηχανισμός αμινών
AMM	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
bipy	2,2'-Διπυριδίνη
COD	1,5-Κυκλοοκταδιένιο

DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
SOCl_2	Θειονυλοχλωρίδιο
Et_3N	Τριαιθυλαμίνη
UCST	Ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
LCST	Χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
PNiPAAm	πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο)
PNVC	πολυ(N-βινυλοκαπρολακτάμη)
PLLA-PEG-PLLA	πολυ(L-γαλακτικό οξύ) - πολυ(αιθυλενογλυκόλη) - πολυ(L-γαλακτικό οξύ)
PEO-PPO-PEO	πολυ(αιθυλενοξείδιο) - πολυ(προπυλενοξείδιο) - πολυ(αιθυλενοξείδιο)
PEO-PHist	πολυ(αιθυλενοξείδιο)-πολυ(L-ιστιδίνη)
PT	πολυθειοφαίνιο
PSS	σουλφονωμένο πολυστυρόλιο
PAAc	πολυ(ακρυλικό οξύ)
P(MAA-g-EG)	πολυ(μεθακρυλικό οξύ-g-αιθυλενογλυκόλη)
PEI	πολυ(αιθυλενο-ιμίνη)
PDAAEMA	πολυ (N, N-διακυλαμινο αιθυλομεθακρυλικά άλατα)
PL	πολυ(λυσίνη)
PLGA	πολυ(γαλακτικό/γλυκολικό οξύ)
PbAEs	πολυ (β-αμινο εστέρες)

GOx	οξειδάση γλυκόζης
CMC	Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση
mPEG-L-PA	πολυ(αιθυλενογλυκόλη)-πολυ(L-αλανίνη)
mPEG-DL-PA	πολυ(αιθυλενογλυκόλη)-πολυ(DL-αλανίνη)
PA-PLX-PA	Polyalanine-poloxamer-polyalanine
PLX	Poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol) bis(2-aminopropyl ether)
PEG-PAF	Poly(ethylene glycol)- <i>b</i> -poly(alanine-co-phenyl alanine)
PAF-PLX-PAF	poly(L-Ala-co-L-Phe)-poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)-poly(L-Ala-co-L-Phe)
PA-PLX-PA	poly(Ala)-poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)-poly(Ala)
PAL-PLX-PAL	poly(alanine-co-leucine)-poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)-poly(alanine-co-leucine)
Cs-g-(PA-PEG)	poly(ethylene glycol)-poly(alanine) grafted chitosan
PVP-PA	poly(N-vinyl pyrrolidone)- <i>b</i> -poly(alanine)
PEG-PA-Z-PA-PEG	PEG-poly(L-alanine)-azo-benzene-poly(L-alanine)-PEG
PNIPAAm- <i>b</i> -PAIa	poly(N-isopropylacrylamide)- <i>b</i> -poly(L-alanine)
PBLG- <i>b</i> -PAIa	Poly(γ- benzyl-L-glutamate)- <i>b</i> -polyalanine
Tyr	Τυροσίνη
m-PEG	μονομεθόξυ- PEG

IR	Υπέρυθρη ακτινοβολία
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
SEC (ή GPC)	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
CD	Κυκλικός διχρωϊσμός
DLS	Δυναμική σκέδαση φωτός
SLS	Στατική σκέδαση φωτός
NOE	Nuclear Overhauser effect
UV-Vis	Υπεριώδες-ορατό
HVL	Γραμμή υψηλού κενού
CaH ₂	Υδρίδιο του ασβεστίου
<i>n</i> -BuLi	Κανονικό βουτυλολίθιο
PSLi	Πολυστυρολίθιο
H ₂ SO ₄	Θειϊκό οξύ
P ₂ O ₅	Πεντοξείδιο του φωσφόρου
DMA	Διμεθυλαμίνη
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
THF	Τετραϋδροφουράνιο
BOC-Hist(Trt)-OH	<i>N</i> _α -BOC- <i>N</i> ^{tr} -Trityl-L-histidine
PEO (ή PEG)	Πολυ(αιθυλενοξείδιο) (ή Πολυ(αιθυλενογλυκόλη))
PHist	Poly(L-Histidine)

PAIa	Poly(L-Alanine)
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
DHCl ₃	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
DMSO	Διμέθυλο σουλφοξείδιο

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. T. J. Deming, Synthesis and Self-Assembly of Well-Defined Block Copolypeptides via Controlled NCA Polymerization, *Adv. Polym. Sci.*, 2013, pp. 1-38.
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, I. Stryer, Βιοχημεία Τόμος 1, 2010, pp. 45-73.
3. Σ. Βάρλας, Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Αυτο-Οργάνωση Αποκρινόμενων Συμπολυμερών Πολυ(αιθυλενοξειδίου), Πολυ(ιστιδίνης) και Πολυ(κυστεΐνης) για τον Εγκλωβισμό και την Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκων, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2016, pp. 1-165.
4. M. Bodansky, A. Bodansky, The practice of peptide synthesis, 2nd ed. Springer-Verlag: New York, 1993.
5. M. Goodman, J. Hutchison, The mechanisms of polymerization of N-unsubstituted N-carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, vol. 88, pp. 3627-3630.
6. T. J. Deming, Synthesis and self-assembly of well-defined block copolypeptides via controlled NCA polymerization, *Adv. Polym. Sci.*, 2013, vol. 262, 1-38.
7. T. J. Deming, Peptide-Based Materials, 1st ed. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2012.
8. O. Nuyken, S. D. Pask, Ring-Opening Polymerization — An Introductory Review, *Polymers*, 2013, vol. 5, pp. 361-403.
9. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, Synthesis of Well-Defined Polypeptide-Based Materials via the Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, *Chem. Rev.*, 2009, vol. 109, pp. 5528–5578.

10. T. J. Deming, Living Polymerization of α -Amino Acid-N-Carboxyanhydrides, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 2000, vol. 38, pp. 3011–3018
11. H. R. Kricheldorf, Polypeptides and 100 Years of Chemistry of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, vol. 45, pp. 5752 – 5784.
12. T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, Living Polypeptides, *Biomacromolecules*, 2004, vol. 5, pp. 1653-1656.
13. D. L. Pickel, N. Politakos, A. Avgeropoulos, J. M. Messman, A Mechanistic Study of α -(Amino acid)-N-carboxyanhydride Polymerization: Comparing Initiation and Termination Events in High-Vacuum and Traditional Polymerization Techniques, *Macromolecules*, 2009, vol. 42, pp. 7781–7788.
14. H. Lu, J. Wang, Z. Song, L. Yin, Y. Zhang, H. Tang, C. Tu, Y. Lin, J. Cheng, Recent advances in amino acid N-carboxyanhydrides and synthetic polypeptides: chemistry, self-assembly and biological applications, *Chem. Commun.*, 2013, pp. 1-17.
15. Δ. Μαυρογιώργης, *Μακρομοριακή αρχιτεκτονική πολυπεπτιδίων*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2015, pp. 1-194.
16. H. Leuchs, Ueber die Glycin-Carbonsäure, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1906, vol. 39, pp. 857-861.
17. H. Leuchs, W. Geiger, Über die Anhydride von α -Amino-N-Carbonsäuren und die von α -Aminosäuren, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1908, vol. 41, pp. 1721-1726.
18. M. Bergmann, L. Zervas, W. Ross, On proteolytic enzymes VII. The synthesis of peptides of L-lysine and their behavior with papain, *J. Biol. Chem.*, 1935, vol. 111, pp. 245-260.

19. B. Ishai, D. Katchalski, Synthesis of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides from N-Carboxy- α -amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, vol. 74, pp. 3688-3689.
20. M. Green, M. A. Stahmann, Synthesis and enzymatic hydrolysis of glutamic acid polypeptides, *J. Biol. Chem.*, 1952, vol. 197, pp 771-782.
21. F. Fuchs, Über N-Carbonsäure-Anhydride, *Chem. Ber.*, 1922, vol. 55, pp. 2943.
22. D. Coleman, A. C. Farthing, Synthetic Polypeptides. Part II. Properties of Oxazolid-2:5-diones and an Initial Study of the Preparation of Polypeptides There-From, *J. Chem. Soc.*, 1950, pp. 3218-3222.
23. C. J. Brown, D. Coleman, A. C. Farthing, Further Studies in Synthetic Polypeptides, *Nature*, 1949, vol. 163, pp. 834-835.
24. A. L. Levy, Anhydro-N-Carboxy-dl-beta-Phenylalanine, *Nature*, 1950, vol. 165, pp. 152-153.
25. A. C. Farthing, Synthetic polypeptides. Part I. Synthesis of Oxazolid-2:5-diones and a New Reaction of Glycine, *J. Chem. Soc.*, 1950, pp. 3213-3217.
26. L. Cotarca, H. Eckert, Phosgenations – A Handbook, *Wiley*, 2003, pp. 125-128.
27. L. Cotarca, Conversion of bis (trichloromethyl) carbonate to phosgene and reactivity of triphosgene, diphosgene, and phosgene with methanol, *Synthesis*, 1996, pp. 553-560.
28. C. H. Alarcon, S. Pennadam, C. Alexander, Stimuli responsive polymers for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, vol. 34, pp. 276–285.
29. S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, M. Amiji, A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 2008, vol. 126, pp. 187–204.

30. B. Jeong, A. Gutowska, Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, *Trends in Biotechnology*, 2002, vol. 20, pp. 305-311.
31. A. S. Hoffman, Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, vol. 65, pp. 10-16.
32. N. Rapoport, Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, vol. 32, pp. 962–990.
33. D. Schmaljohann, Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, vol. 58, pp. 1655–1670.
34. M. C. Stuart, W. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. Sukhorukov, I. Szleifer, V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Iuzinov, S. Minko, Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials, *Nature Materials*, 2010, vol. 9, pp. 101-113.
35. X. He, J. Fan, K. L. Wooley, Stimuli-Triggered Sol–Gel Transitions of Polypeptides from α -Amino Acid N-Carboxyanhydride (NCA) Derived Polymerizations, *Chem. Asian J.*, 2016, vol. 11, pp. 437 – 447.
36. S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nature Materials*, 2013, vol. 12, pp. 991-1003.
37. E. Cabane, X. Zhang, K. Langowska, C. G. Palivan, W. Meier, Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine, *Biointerphases*, 2012, pp. 1-27.
38. Π. Αποστολίδη, *Επίδραση της αρχιτεκτονικής στην αυτοοργάνωση αμφίφιλων υβριδικών τετραπολυμερών του τύπου PEO-b-(PHIS-co-PBLG)-b-PLL. Μελέτη εγκλωβισμού και αποδέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου Everolimus*, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2016, pp. 1-159.

39. B. Lidman, H. Wennerstorm, Topics in Current Chemistry-Micelles, *New York*, vol. 26, 1st Edition, 1980.
40. K. Miyata, R.J. Christie, K. Kataoka, Polymeric micelles for nano-drug delivery, *Adv. Polym. Sci.*, 2010, vol. 71, pp.227-234.
41. J.F. Gohy, Block copolymer micelles, *Adv. Polym. Sci.*, 2005, vol. 190, pp. 65-136.
42. H. Iatrou, H. Frielinghaus, S. Hanski, N. Ferderikos, J. Ruokolainen, O. Ikkala, D. Richter, J. Mays, N. Hadjichristidis, Architecturally induced multiresponsive vesicles from well-defined polypeptides: formation of gene vehicles, *Biomacromolecules*, 2007, vol. 8, pp. 2173-81.
43. A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 1965, vol. 13, pp. 238.
44. F. Checot, A. Brylet, J. Oberdisse, Y. Gnanou, S. Lecommandoux, Structure of Polypeptide Based Diblock copolymers in Solution: Stimuli-responsive vesicles and micelles, *Lagmuir*, 2005, vol. 21, pp. 4308-4315.
45. M. Yoshida, M. Tamada, M. Kumakura, R. Katakai, Synthesis of methacryloyl-L-alanine derivatives having various carboxyl-protecting groups and thermo-response of its polymer hydrogels, *Radiat. Phys. Chem.*, 1991, vol. 38, pp. 7-10.
46. Y. Y. Choi, M. K. Joo, Y. S. Sohn, B. Jeong, Significance of secondary structure in nanostructure formation and thermosensitivity of polypeptide block copolymers, *Soft Matter*, 2008, vol. 4, pp. 2383–2387.
47. Y. Y. Choi, J.H. Jang, M. H. Park, B. G. Choi, B. Chi, B. Jeong, Block length affects secondary structure, nanoassembly and thermosensitivity of poly (ethylene glycol)-poly(L-alanine) block copolymers, *J. Mater. Chem.*, 2010, vol. 20, pp. 3416–3421.
48. B. G. Choi, M. H. Park, S. H. Cho, M. K. Joo, H. J. Oh, E. H. Kim, K. Park, D. K. Han, B. Jeong, In situ thermal gelling polypeptide for chondrocytes 3D culture, *Biomaterials*, 2010, vol. 31, pp. 9266-9272.

49. B. G. Choi, M. H. Park, S. H. Cho, M. K. Joo, H. J. Oh, E. H. Kim, K. Park, D. K. Han, B. Jeong, Thermal gelling polyalanine-poloxamine-polyalanine aqueous solution for chondrocytes 3D culture: Initial concentration effect, *Soft Matter*, 2011, vol. 7, pp. 456–462.
50. E. J. Yun, B. Yon, M. K. Joo, B. Jeong, Cell Therapy for Skin Wound Using Fibroblast Encapsulated Poly(ethylene glycol)-poly(L-alanine) Thermogel, *Biomacromolecules*, 2012, vol. 13, pp. 1106–1111.
51. B. Yeon, M. H. Park, H. J. Moon, S. J. Kim, Y. W. Cheon, B. Jeong, 3D Culture of Adipose-Tissue-Derived Stem Cells Mainly Leads to Chondrogenesis in Poly(ethylene glycol)-Poly(L-alanine) Diblock Copolymer Thermogel, *Biomacromolecules*, 2013, vol. 14, pp. 3256–3266.
52. M. H. Park, H. J. Moon, J. H. Park, U. P. Shinde, D. Y. Ko, B. Jeong, PEG-Poly(L-alanine) Thermogel As a 3D Scaffold of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Macromol. Biosci.*, 2015, vol. 15, pp. 464–472.
53. Y. Jeong, M. K. Joo, K. H. Bahk, Y. Y. Choi, H. T. Kim, W. K. Kim, H. J. Lee, Y. S. Sohn, B. Jeong, Enzymatically degradable temperature-sensitive polypeptide as a new in-situ gelling biomaterial, *Journal of Controlled Release*, 2009, vol. 137, pp. 25–30.
54. U. P. Shinde, M. K. Joo, H. J. Moon, B. Jeong, Sol–gel transition of PEG–PAF aqueous solution and its application for hGH sustained release, *J. Mater. Chem.*, 2012, vol. 22, pp. 6072–6079.
55. E. Y. Kang, B. Yeon, H. J. Moon, B. Jeong, PEG-L-PAF and PEG-D-PAF: Comparative Study on Thermogellation and Biodegradation, *Macromolecules*, 2012, vol. 45, pp. 2007–2013.
56. M. K. Joo, D. Y. Ko, S. J. Jeong, M. H. Park, U. P. Shinde, B. Jeong, Incorporation of D-alanine into poly(ethylene glycol) and L-poly(alanine-co-phenylalanine) block copolymers affects their nanoassemblies and enzymatic degradation, *Soft Matter*, 2013, vol. 9, pp. 8014–8022.

57. E. H. Kim, M. K. Joo, K. H. Bahk, M. H. Park, B. Chi, Y. M. Lee, B. Jeong, Reverse Thermal Gelation of PAF-PLX-PAF Block Copolymer Aqueous Solution, *Biomacromolecules*, 2009, vol. 10, pp. 2476–2481.
58. H. J. Oh, M. K. Joo, Y. S. Sohn, B. Jeong, Secondary Structure Effect of Polypeptide on Reverse Thermal Gelation and Degradation of L/DL-Poly(alanine) – Poloxamer – L/DL - Poly(alanine) Copolymers, *Macromolecules*, 2008, vol. 41, pp. 8204-8209.
59. H. J. Moon, B. G. Choi, M. H. Park, M. K. Joo, B. Jeong, Enzymatically Degradable Thermogelling Poly(alanine-co-leucine)-poloxamer-poly(alanine-co-leucine), *Biomacromolecules*, 2011, vol. 12, pp. 1234–1242.
60. J. H. Jang, Y. M. Choi, Y. Y. Choi, M. K. Joo, M. H. Park, B. G. Choi, E. Y. Kang, B. Jeong, pH/temperature sensitive chitosan-g-(PA-PEG) aqueous solutions as new thermogelling systems, *J. Mater. Chem.*, 2011, vol. 21, pp. 5484–5491.
61. J. O. Han, M. K. Joo, J. H. Jang, M. Hee Park, B. Jeong, PVPylated Poly(alanine) as a New Thermogelling Polymer, *Macromolecules*, 2009, vol. 42, pp. 6710–6715.
62. S. Y. Jeong, H. J. Moon, M. H. Park, M. K. Joo, B. Jeong, Molecular Captain: A Light-Sensitive Linker Molecule In Poly(ethyleneglycol)-Poly(L-alanine)-Poly (ethylene glycol) Triblock Copolymer Directs Molecular Nano-Assembly, Conformation, and Sol-Gel Transition, *Journal of polymer science part A: polymer chemistry*, 2012, vol. 50, pp. 3184–3191.
63. P. D. Thornton, S. M. R. Billah, N. R. Cameron, Enzyme-Degradable Self-Assembled Hydrogels From Polyalanine-Modified Poly(ethyleneglycol) Star Polymers, *Macromol. Rapid Commun.*, 2013, vol. 34, pp. 257–262.
64. P. Qiao, Q. Niu, Z. Wang, D. Cao, Synthesis of thermosensitive micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) and poly(l-alanine) for controlled

release of adriamycin, *Chemical Engineering Journal*, 2010, vol. 159, pp. 257–263.

65. P. Xie, X. Liu, R. Cheng, Y. Wu, J. Deng, pH-Sensitive Chiral Hydrogels Consisting of Poly(N-acryloyl-L-alanine) and β -Cyclodextrin: Preparation and Enantiodifferentiating Adsorption and Release Ability, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2014, vol. 53, pp. 8069–8078.
66. A. Gitsas, G. Floudas, M. Mondeshki, H. W. Spiess T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, Control of Peptide Secondary Structure and Dynamics in Poly(γ -benzyl-L-glutamate)-*b*-polyalanine Peptides, *Macromolecules*, 2008, vol. 41, pp. 8072-8080.
67. I. W. Hamley, A. Dehsorkhi, V. Castelletto, J. Seitsonen, J. Ruokolainenb, H. Iatrou, Self-assembly of a model amphiphilic oligopeptide incorporating an arginine headgroup, *Soft Matter*, 2013, vol. 9, pp. 4794–4801.
68. I. W. Hamley, S. Kirkham, A. Dehsorkhi, V. Castelletto, Self-Assembly of a Model Peptide Incorporating a Hexa-Histidine Sequence Attached to an Oligo-Alanine Sequence, and Binding to Gold NTA/Nickel Nanoparticles, *Biomacromolecules*, 2014, vol. 15, pp. 3412–3420.
69. M. T. Popescu, G. Lontos, A. Avgeropoulos, C. Tsitsilianis, Stimuli-responsive fibrous hydrogels from hierarchical self-assembly of a triblock copolypeptide, *Soft Matter*, 2013, vol. 0, pp. 1-3.
70. S. Kirkham, V. Castelletto, I. W. Hamley, M. Reza, J. Ruokolainen, D. H. Merino, P. Bilalis, H. Iatrou, Self-Assembly of Telechelic Tyrosine End-Capped PEO and Poly(alanine) Polymers in Aqueous solution, *Biomacromolecules*, 2016, vol.0, pp. 1-49.
71. M.A. Hillmyer, F.S. Bates, K. Almdal, K. Mortensen, A. J. Ryan, J. P. Fairclough, Complex Phase Behavior in Solvent-Free Nonionic Surfactants, *Science*, 1996, vol. 271, pp. 976.

72. J. M. Harris, Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly(Ethylene Glycol), Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, *New York*, 1992, vol. I, 1st Edition, pp. 1-14.
73. M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, Chemistry for peptide and protein PEGylation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, vol. 64, pp. 116-127.
74. F. E. Bailey, J. V. Koleske, Alkylene Oxides and Their Polymers, *New York*, 1976, vol. V, 3rd Edition.
75. R. Mahou, C. Wandrey, Versatile route to synthesize heterobifunctional poly(ethylene glycol) of variable functionality for subsequent pegylation, *Polymers*, 2012, vol. 4, pp. 561-589.
76. Y. Kim, Y. Nagasaki, K. Kataoka, M. Kato, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, Nanotechnology in Drug Delivery, *Polym. Bull*, 1994, vol. 60, pp. 33.
77. H. Iatrou, K. Dimas, M. Gkikas, C. Tsimblouli, S. Sofianopoulou, Polymersomes from Polypeptide Containing Triblock Co-and Terpolymers for Drug Delivery against Pancreatic Cancer: Asymmetry of the External Hydrophilic Blocks, *Macromolecular Bioscience*, 2014, vol. 14, pp. 1222-1238.
78. G. Lapenis, Star –shaped polymers having PEO arms, *Polymer Science*, 2009, vol. 34, pp. 852-892.
79. D. Mavrogiorgis, P. Bilalis, A. Karatzas, D. Skoulas, G. Fotinogiannopoulou, H. Iatrou, Controlled polymerization of histidine and synthesis of well- defined stimuli responsive polymers. Elucidation of the structure-aggregation relationship of this highly multifunctional material, *Polymer Chemistry*, 2014, vol. 5, pp. 6256-6278.
80. R. M. Wheaton, W. C. Bauman, Non-Ionic Separations with Ion Exchange Resins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1953, vol. 57, pp. 159-176.

81. G. H. Lathe, C. R. Ruthven, The Separation of Substances and Estimation of their Relative Molecular Sizes by the Use of Columns of Starch in Water, *Biochem. J.*, 1956, vol. 62, pp. 665-674.
82. J. Porath, P. Flodin, Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation, *Nature*, 1959, vol. 183, pp. 1657-1658.
83. D. J. Lea, A. H. Schon, Preparation of Synthetic Gels for Chromatography of Macromolecules, *Can. J. Chem.*, 1962, vol. 40, pp. 159-160.
84. B. Jones-Cortis, Gel Filtration of Organic Compounds, *Nature*, 1961, vol. 191, pp. 272.
85. M. F. Vaughan, Fractionation of Polystyrene by Gel Filtration, *Nature*, 1960, vol. 188, pp. 55.
86. J. C. Moore, Gel Permeation Chromatography. I. A New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 1964, vol. 2, pp. 835-843.
87. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, M. I. Καραγιάννης, Κ. Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 2005, pp. 1-984.
88. Ε. Γκίκας, *Αμφίφιλα Πολυπεπτίδια: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Μελέτη Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2012, pp. 1-208.
89. J. McMurry, *Οργανική Χημεία Ι*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1998
90. Μαυρομούστακος, Ι. Ματσούκας, *Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού*, Εκδόσεις Παρισιάνος, 2006, κεφάλαιο 1.
91. E. Peggion, E. Scoffone, A. Cosani, A. Portolan, Polymerization of gamma-benzyl-L-glutamate N-carboxyanhydride: effects of conditions of

- polymer precipitation on the molecular weight distribution, *Biopolymers*, 1966, vol. 4, pp. 695-704.
92. B. Chu, Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice, USA, 1991 vol. 1, 2nd Edition.
 93. R. Pecora, Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy, USA, 1985, vol. 1, 2nd Edition.
 94. S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, vol. 1751, pp. 119– 139.
 95. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, Anionic polymerization: High vacuum techniques, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2000, vol. 38, pp. 3211-3234.
 96. D. Uhrig, J. W. Mays, Experimental techniques in high-vacuum anionic polymerization, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2005, vol. 43, pp. 6179-6222.
 97. N. Hadjichristidis, A. Hirao, Anionic Polymerization: Principles, Practice, Strength, Consequences and Applications, 1st ed. Springer: Japan, 2015.
 98. I. W. Hamley, S. Kirkham, A. Dehsorkhi, V. Castelletto, J. Adamcik, R. Mezzenga, J. Ruokolainen, C. Mazzuca, E. Gato, M. Venanzi, E. Placidi, P. Bilalis, H. Iatrou, Self-assembly of a model peptide incorporating a hexa-histidine sequence attached to an oligo-alanine sequence, and binding to gold NTA/nickel nanoparticles, *Biomacromolecules*, 2014, vol. 15, pp. 3412-3420.
 99. I. W. Hamley, A. Dehsorkhi, V. Castelletto, J. Seitsonen, J. Ruokolainen, H. Iatrou, Self-assembly of a model amphiphilic oligopeptide incorporating an arginine headgroup, *Soft Matter*, 2013, vol. xx, pp. 1-9.