



**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, Χαρακτηρισμός και Αυτο-Οργάνωση  
Αποκρινόμενων Συμπολυμερών Πολυ(αιθυλενοξειδίου),  
Πολυ(ιστιδίνης) για τον Εγκλωβισμό και την Ελεγχόμενη  
Αποδέσμευση Φαρμάκων**

**ΒΑΡΒΑΡΑ ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2017**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

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

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΒΑΡΒΑΡΑ**

**A.M.: 151001**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 25/05/2017



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση πολυπεπτιδικών συμπολυμερών βασισμένων στην πολυ(L-ιστιδίνη) (PHis), τα οποία έχουν την ιδιότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα μεταβάλλοντας τη δομή τους. Η σύνθεση των πολυμερών επετεύχθη μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου σε ένα στάδιο των αντίστοιχων προστατευμένων N-καρβοξυ ανυδριτών (μονομερή), με χρήση αμινοτελικού πολυ(αιθυλενοξειδίου) ( $N_3$ -PEO-NH<sub>2</sub>) ως μακροαπαρχητή. Το αζίδιο στην άκρη του μακροαπαρχητή χρησιμοποιείται για αντίδραση “click” με το φολικό οξύ, το οποίο υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα. Για τη σύνθεση του N-καρβόξυ ανυδρίτη του α-αμινοξέος, τον καθαρισμό των διαλυτών, αλλά και για τη λήψη καλά καθορισμένων πολυμερών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού, εξασφαλίζοντας υψηλή καθαρότητα στο σύστημα και απουσία προσμίξεων που θα οδηγούσαν σε μη ελεγχόμενες διαδικασίες πολυμερισμού. Αυτά τα αμφίφιλα συμπολυμερή του τύπου  $N_3$ -PEO-*b*-PHis έχουν την ικανότητα να αυτο-οργανώνονται σε υδατικά διαλύματα και να σχηματίζουν μικκυλιακές δομές και κυστίδια σε νανοκλίμακα. Το εξωτερικό υδρόφιλο κέλυφος των νανοδομών αποτελείται από τις αλυσίδες του PEO, ενώ ο pH-αποκρινόμενος πυρήνας αποτελείται από την PHis. Εκτενής μοριακός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με σκοπό να επιβεβαιωθεί η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών και των επιθυμητών νανοδομών. Απώτερος στόχος είναι η δημιουργία καινοτόμων πολυμερικών 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 ανυδρίτης, αποκρινόμενα πολυμερή

## ABSTRACT

In the present master thesis the synthesis of polypeptide copolymers based on poly(L-histidine) (PHis) was performed, that possess the ability to respond to external stimuli by altering their structure. The synthesis of polymers was achieved through a one-step ring-opening polymerization (ROP) process of the corresponding protected N-carboxy anhydrides (monomers), using an amine end-functionalized poly(ethylene oxide) (N<sub>3</sub>-PEO-NH<sub>2</sub>) macroinitiator. High-vacuum techniques were used for the synthesis of N-carboxy anhydrides of  $\alpha$ -amino acids, for the purification of solvents and for the isolation of well-defined polymers as well, ensuring the high purity of the system and the absence of impurities that would result in uncontrolled polymerization processes. These amphiphilic copolymers of the N<sub>3</sub>-PEO-*b*-P(His) type possess the ability to self-assemble in aqueous media and form micelle-like nanostructures and vesicles. The outer hydrophilic corona of the nanostructures was comprised of poly(ethylene oxide) chains, while the pH-responsive core was based on PHis. Extensive molecular characterization studies were conducted in order to confirm the successful synthesis of the polymers. The ultimate goal is to create novel polymeric 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 anhydride, stimuli-responsive polymers

**“Chance favors only the prepared mind”**

**(Louis Pasteur, 1822-1895)**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας τον κύκλο των μεταπτυχιακών σπουδών εις πέρας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην υλοποίησή της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον προσωπικό μου επιβλέποντα, Καθηγητή κο Ερμόλαο Ιατρού, για την άριστη συνεργασία μας, την επιστημονική καθοδήγηση και στήριξή του. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω, γιατί η εκτίμησή μου απέναντι στις ερευνητικές του ικανότητες αλλά και η μελέτη τόσο ελπιδοφόρων και ταυτόχρονα υψίστου επιστημονικού ενδιαφέροντος αντικειμένων, αποτέλεσαν τα θεμέλια για τη συνέχιση των σπουδών μου σε διδακτορικό επίπεδο.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή π.Μαρίνο Πιτσικάλη, για την άριστη διδασκαλία του στα μαθήματα του μεταπτυχιακού προγράμματος, για τις απίστευτες γνώσεις που μου παρείχε σε οποιοδήποτε πεδίο της Επιστήμης Πολυμερών. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κο Γεώργιο Σακελλαρίου, τόσο για την εξαιρετική διδασκαλία του στα μαθήματα του μεταπτυχιακού προγράμματος όσο και για τον μοναδικό τρόπο που είχε στο να μεταδίδει τις γνώσεις του με τρόπο εύκολο και κατανοητό.

Φυσικά δε θα μπορούσα να παραλείψω τον πολύτιμο φίλο και συνεργάτη μου, υποψήφιο διδάκτορα, Παναγιώτη Χριστακόπουλο, για την ανεκτίμητης αξίας συνεργασία του και στήριξή του, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Ο Δρ.Χριστακόπουλος είναι ένας εξαιρετικός επιστήμονας και είναι εκείνος που με βοήθησε να διευρύνω τους ορίζοντες μου και να γίνω ανεξάρτητη όσον αφορά τις εργαστηριακές απαιτήσεις. Η υλοποίηση της παρούσας εργασίας λοιπόν, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό και στη συνεισφορά του ίδιου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους μου από την ερευνητική ομάδα του κ. Ιατρού, αλλά και από το υπόλοιπο εργαστήριο για όλη τη βοήθεια τους και για το άριστο κλίμα συνεργασίας που υπήρχε κατά την παρουσία μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τον σύντροφό μου για τη στήριξή τους, τις συμβουλές και τη βοήθεια τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Ξέρω ότι πάντα θα είναι δίπλα μου και θα προσπαθούν να λύσουν όλα τα προβλήματα και τις δυσκολίες που θα εμφανιστούν στη ζωή μου.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
2.1	Αμινοξέα, Πεπτίδια, Πρωτεΐνες.....	21
2.2	Σύνθεση Πεπτιδίων Μικρού Μοριακού Βάρους με Καθορισμένη Αλληλουχία.....	32
2.3	Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους.....	36
2.3.1	Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP).....	37
2.3.2	Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (ROP) των N-καβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων .....	40
2.3.2.1	Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM) .....	41
2.3.2.2	Μηχανισμός του Blout.....	43
2.3.2.3	...Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM).....	44
2.3.2.4	Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Χρήση Συμπλόκων των Στοιχείων Μετάπτωσης... 46	
2.3.2.5	Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Χρήση Πρωτοταγών Αμινών και Τεχνικών Υψηλού Κενού .....	48
2.4	Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs) .....	50
2.5	Νανοτεχνολογία και Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων .....	52
2.5.1	Νανοτεχνολογία και Εφαρμογές της.....	52
2.5.2	Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων μέσω Πολυμερικών Υλικών .....	54
2.6	Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε Εξωτερικά Ερεθίσματα .....	58
2.6.1	pH-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων.....	60

2.6.2	Θερμο-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων .....	63
2.6.3	Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε Οξειδοαναγωγικούς Παράγοντες .....	64
2.7	Τεχνικές Μοριακού Χαρακτηρισμού .....	65
2.7.1	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC) .....	67
2.7.2	Φασματοσκοπία Υπερύθρου (Infrared Spectroscopy, IR) .....	67
2.7.3	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) .....	70
2.7.5	Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD) .....	74
2.7.5	Σκέδαση Φωτός (Light Scattering) .....	76
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	81
3.1	Τεχνικές Υψηλού Κενού (High-Vacuum Techniques, HVT) .....	81
3.2	Καθαρισμός Διαλυτών .....	83
3.3	Καθαρισμός Απαρχητών και Αντιδραστηρίων.....	88
3.4	Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Carboxy Anhydride της $N^{(im)}$ -Trityl-L-Histidine ( $N^{(im)}$ -Trt-His NCA) .....	88
3.5	Σύνθεση των Κατά Συστάδων Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)- <i>b</i> -Poly(L-Histidine) (PEO- <i>b</i> -PHis) .....	91
3.5.1	Σύνθεση Προστατευμένων Συμπολυμερών $N_3$ -PEO- <i>b</i> -P(Trt-His) με Χρήση $N_3$ -PEO-NH <sub>2</sub> ως Μακροαπαρχητή .....	97
3.5.2	Εκλεκτική Αποπροστασία των Δομικών Μονάδων της Πολυ(Ιστιδίνης) (PHis) .....	97
4	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	101
4.1	Σύνθεση του N-Καρβοξυ Ανυδρίτη του $\alpha$ -Αμινοξέος (NCA) .....	101
4.1.1	Σύνθεση του $N^{(im)}$ -Trt-His NCA.....	101

4.2	Μελέτη Αυτο-Οργάνωσης των pH-Αποκρινόμενων κατά Συστάδων Συμπολυμερών N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis.....	109
5	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	114
6	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	115
7	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	117
8	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	119

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ο ιοντισμός της ιστιδίνης. ....	24
Σχήμα 2: Το γλουταμικό οξύ. ....	24
Σχήμα 3: Η δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού .....	25
Σχήμα 4: Κατεύθυνση πεπτιδικού δεσμού. ....	26
Σχήμα 5: α) Ο πεπτιδικός δεσμός έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού. β) Γωνίες στροφής αμινοξέος. ....	26
Σχήμα 6: Στάδια σύνθεσης με την τεχνική Merrifield .....	33
Σχήμα 7: Οι βάσεις του DNA, αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη. ....	34
Σχήμα 8: Αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs .....	40
Σχήμα 9: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM) .....	42
Σχήμα 10: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή .....	43
Σχήμα 11: Στάδια έναρξης και διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό κατά Blout .....	44
Σχήμα 12: Στάδια ενεργοποίησης και έναρξης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM) .....	45
Σχήμα 13: Στάδιο διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM) .....	46
Σχήμα 14: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μεταπτώσεως .....	48
Σχήμα 15: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών. .	51
Σχήμα 16: Χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά.....	82
Σχήμα 17: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης).....	62
Σχήμα 18: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού (HVL) .....	82
Σχήμα 19: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου .....	82
Σχήμα 20: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ.....	84
Σχήμα 21: Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης του Trt-His NCA, μετά την αντίδραση παραλαμβάνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό το άλας του NCA αλλά και μικρό ποσοστό από το αρχικό και το ελεύθερο NCA τα οποία είναι διαλυτα σε EtAc στους 45 °C ενώ το άλας του NCA παραμένει αδιάλυτο και έτσι απομονώνεται. ....	91

Σχήμα 22: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -P(Trt-His) όπου R ο δακτύλιος της ιστιδίνης με την τρίτυλο προστατευτική ομάδα.....	97
Σχήμα 23: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του συμπολυμερούς N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis.....	100
Σχήμα 24: Φάσμα υπέρυθρου του N <sup>(im)</sup> -Trt-His NCA .....	102
Σχήμα 25 : Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του N <sup>(im)</sup> -Trt-His NCA, σε CDCl <sub>3</sub> .....	103
Σχήμα 26: Φάσμα υπέρυθρου του συμπολυμερούς N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis (3.5K-3.5K) μετά την αποπροστασία της PHis .....	104
Σχήμα 27: Φάσμα υπέρυθρου του συμπολυμερούς N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis (9K-9K) μετά την αποπροστασία της PHis .....	104
Σχήμα 28 : Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του μακροαπαρχητή N <sub>3</sub> -PEO-NH <sub>2</sub> (3.5K) σε D <sub>2</sub> O και DCl .....	105
Σχήμα 29: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του μακροαπαρχητή N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis (3.5K – 3.5K) σε D <sub>2</sub> O και DCl μετά την αποπροστασία της PHis.....	106
Σχήμα 30: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του μακροαπαρχητή N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis (9K – 6K) σε D <sub>2</sub> O και DCl μετά την αποπροστασία της PHis.....	107
Σχήμα 31: Χρωματογράφημα SEC του συμπολυμερούς N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis (9K-9K) μετά την αποπροστασία της PHis και του μακροαπαρχητή N <sub>3</sub> -PEO-NH <sub>2</sub> (9K) σε διαλύτη νερό.....	108
Σχήμα 32: Χρωματογράφημα SEC του συμπολυμερούς N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis (3.5K-3.5K) μετά την αποπροστασία της PHis και του μακροαπαρχητή N <sub>3</sub> -PEO-NH <sub>2</sub> (3.5K) σε διαλύτη νερό.....	108
Σχήμα 33: Φάσματα κυκλικού διχρωσμού του πολυμερούς N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis (3.5 K - 3.5 K) σε pH 7.0 και 5.0 αντίστοιχα.....	110
Σχήμα 34: Φάσματα κυκλικού διχρωσμού του πολυμερούς N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis (3.5 K - 3.5 K) σε pH 5.0, 6.5 και 7.0 αντίστοιχα.....	111

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των διαδικασιών εγκλωβισμού και ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης υδρόφοβων φαρμάκων μέσω πολλαπλά αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών νανοφορέων.....	20
Εικόνα 2: Η δομή ενός α-αμινοξέος .....	22
Εικόνα 3: Τα είκοσι βασικά αμινοξέα που συντελούν τις πρωτεΐνες .....	23
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση δευτεροταγών δομών που απαντώνται συνηθέστερα στα πολυπεπτίδια α) τυχαίο σπείραμα, β) α-έλικα και γ) αντιπαράλληλο β-φύλλο.....	28
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α-έλικας.....	29
Εικόνα 6: β-πτυχωτή επιφάνεια. ....	29
Εικόνα 7: Η δομή μιας στροφής αναστροφής της αλυσίδας: Η ομάδα C=O του αμινοξικού κατάλοιπο <i>i</i> της πολυπεπτιδικής αλυσίδας δεσμεύεται με δεσμό-H στην ομάδα NH του καταλοίπου <i>i</i> +3 και σταθεροποιεί τη στροφή.....	30
Εικόνα 8: (a) Ιστόγραμμα στο οποίο απεικονίζεται η συχνότητα των φουρκετών ως συνάρτηση του μήκους τους για 62 διαφορετικές πρωτεΐνες. (b) Οι δύο πιο συχνά απαντώμενες στροφές, μήκους δύο καταλοίπων. Στροφή Τύπου I στα αριστερά και Τύπου II στα δεξιά. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί εντός των ορίων των στροφών παρουσιάζονται με πράσινο χρώμα. ....	30
Εικόνα 9: Απεικόνιση της τεχνικής του ανασυνδιασμένου DNA. ....	36
Εικόνα 10: Χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά ....	52
Εικόνα 11: Χαρακτηριστικά μεγέθη μορίων, νανοϋλικών και βιολογικών οντοτήτων ..	53
Εικόνα 12: Κυριότεροι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών βασισμένοι σε πολυμερικά υλικά και ανόργανα νανοσωματίδια .....	57
Εικόνα 13: Τα κυριότερα εξωτερικά ερεθίσματα που προκαλούν απόκριση στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες.....	60
Εικόνα 14: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα ("proton sponge effect") .....	63
Εικόνα 15: Χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών ενός μορίου.....	68
Εικόνα 16: Το ελλειπτικά πολωμένο φως (βιολετί) προέρχεται από την άνιση απορρόφηση του δεξιά (μπλε) και αριστερά (κόκκινο) κυκλικά πολωμένου φωτός. ....	75
Εικόνα 17: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε διαμόρφωση α-έλικας (κόκκινη καμπύλη), β-φύλλου (πράσινη καμπύλη), δομή τυχαίου σπειράματος (μπλε καμπύλη) και στροφής (πορτοκαλί καμπύλη). ....	76
Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση ενός λέιζερ σκέδασης φωτός.....	80
Εικόνα 19: THF .....	87

Εικόνα 20: Συσκευή πολυμερισμού .....	94
Εικόνα 21: Πορεία του πολυμερισμού του υβριδικού συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(Trt-His) μετά από (Α) 1 ημέρα, (Β) 2 ημέρες, (Γ) 4 ημέρες και (Δ) 6 ημέρες αντίστοιχα.....	96
Εικόνα 22: Διάλυμα του πολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(Trt-His) σε TFA πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την προσθήκη ποσότητας (iPr) <sub>3</sub> SiH αντίστοιχα.....	98
Εικόνα 23: Διαδικασία dialysis για την καθαρισμό του πολυμερούς από τις προστατευτικές τριτυλο-ομάδες .....	99

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σχετικές συχνότητες εμφάνισης καταλοίπων αμινοξέων στη δευτεροταγή δομή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.....	31
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές ομάδες κυκλικών μονομερών και ο συνήθης μηχανισμός πολυμερισμού ROP για κάθε κατηγορία.....	39
Πίνακας 3: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε $\text{cm}^{-1}$ .....	70
Πίνακας 4: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (ppm) .....	73
Πίνακας 5: Απορροφήσεις των τριών διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στον κυκλικό διχρωισμό.....	11276
Πίνακας 6: Μετρήσεις DLS για πολυμερές $\text{N}_3\text{-PEO-}b\text{-PHis}$ (3.5K-3.5K) σε θερμοκρασία $37^\circ\text{C}$ και γωνία $90^\circ$ .....	112



## 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 αυτο-οργάνωσης τους σε υδατικά διαλύματα, με απώτερο σκοπό να αποτελέσουν έξυπνα νανοσυστήματα για την μεταφορά και την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Το παρόν ερευνητικό θέμα είναι εξαιρετικά ελπιδοφόρο και προσφέρεται ως εναρκτήρια μελέτη για περαιτέρω διερεύνηση στο πεδίο των πολυπεπτιδικών νανοφορέων που αποκρίνονται σε μεταβολές των εξωτερικών ερεθισμάτων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις προηγούμενες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί τεράστια ανάπτυξη στη χημεία των πεπτιδίων σε σχέση όχι μόνο με την απομόνωση, σύνθεση, ταυτοποίηση δομής και διαλεύκανση του τρόπου δράσης τους, αλλά επίσης και στην εφαρμογή τους ως εργαλεία στο πλαίσιο των επιστημών υγείας. Τα πεπτίδια παρουσιάζουν ενδιαφέρον όχι μόνο στη βιοχημεία, αλλά και στη βιολογία, τη φαρμακευτική χημεία, τη βιοτεχνολογία και γονιδιακή τεχνολογία [1], [2].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αναπτύσσεται επίσης, τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο, για την παρασκευή βιοσυμβατών και βιοδιασπώμενων πολυμερών. Τα πολυπεπτίδια, είναι από τα κυριότερα πολυμερή αυτής της κατηγορίας, και πλήθος ερευνών έχουν διενεργηθεί πάνω στην σύνθεση, την διαμόρφωση και τις ιδιότητες τους. Το γεγονός αυτό δεν είναι τυχαίο, αν αναλογιστεί κανείς ότι οι πρωτεΐνες είναι τα πιο διαδεδομένα πολυμερή στη φύση, με την εξαιρετική ικανότητα που διαθέτουν, να οργανώνονται σε περίπλοκες τρισδιάστατες δομές.

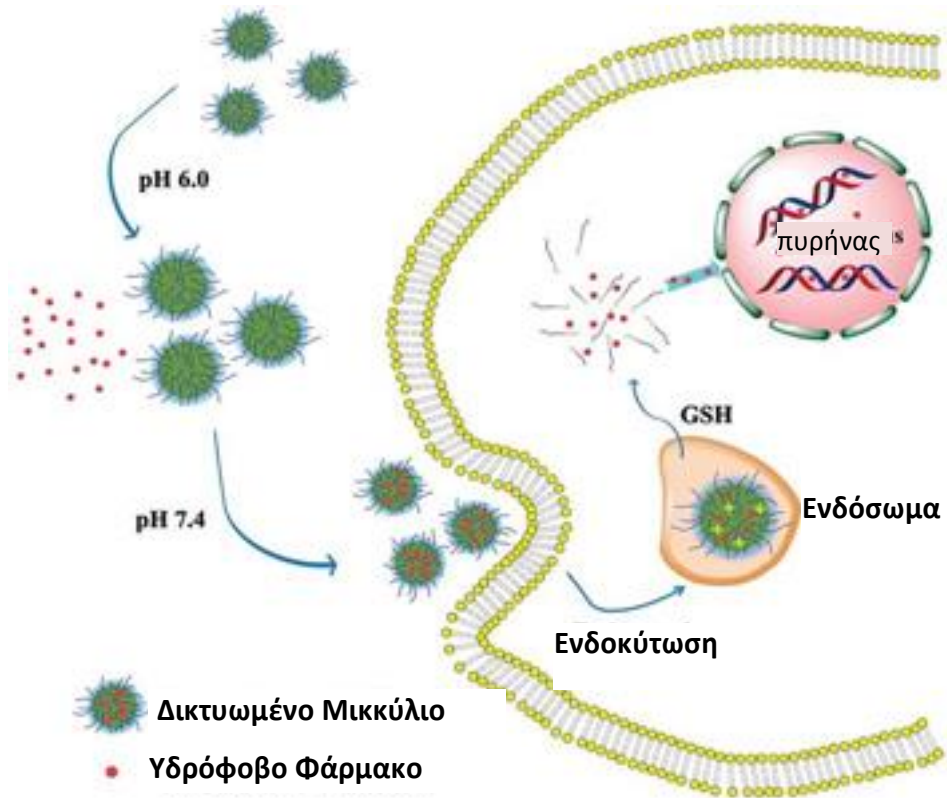
Από την δεκαετία κιάλας του 50', αναπτυχθήκαν πολλές μέθοδοι για την σύνθεση πεπτιδίων. Όμως μέχρι και σήμερα, η αποδοτικότερη, γρηγορότερη και οικονομικότερη τεχνική για την σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, περιλαμβάνει τον πολυμερισμό μέσω διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N-καρβοξυ-ανυδριτών των α-αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs), μέθοδος που αναπτύσσεται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 2.3 [3]. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για τη σύνθεση των δισυσταδικών συμπολυμερών (diblock copolymers) του γενικού τύπου  $N_3$ -PEO-*b*-PHis που μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο πόνημα, αφού πρώτα συντέθηκε εργαστηριακά ο αντίστοιχος NCA.

Τα αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή, μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα σε υδατικά διαλύματα, και να οργανωθούν σε μικκύλια, διπλοστιβάδες και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ακόμα και κυστίδια ανάλογα με το μέγεθος του υδρόφοβου και υδρόφιλου τμήματός τους. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πολυμερικοί ναυοφορείς που έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν υδρόφοβα φάρμακα (π.χ. everolimus, paclitaxel, doxorubicin), αυξάνοντας τον χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα και οδηγώντας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου στον οργανισμό [4], [5].

Σε αυτό το ερευνητικό πλαίσιο κινείται και το αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας διπλώματος ειδίκευσης, κατά τη διάρκεια της οποίας πραγματοποιήθηκε σύνθεση των κατα συστάδων συμπολυμερών  $N_3$ -PEO-*b*-PHis, τα οποία στη συνέχεια αυτο-οργανώθηκαν προς το σχηματισμό ανώτερων δικτυωμένων υπερμοριακών δομών. Σε δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε η διαδικασία της συσσωμάτωσης τους και η ικανότητά τους να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Μέσω των πειραματικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από μετρήσεις μοριακού χαρακτηρισμού διεξήχθη το συμπέρασμα για την καταλληλότητα αυτού του πολυμερικού συστήματος ως σύστημα μεταφοράς φαρμάκων καθώς και η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη αλλά και βελτιστοποίησή του.

Ειδικότερα, το PEO αποτέλεσε το εξωτερικό υδρόφιλο τμήμα των νανοδομών, καθώς είναι βιοαποικοδομήσιμο και βιοσυμβατό πολυμερές, ενώ επιπλέον δεν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του ορού του αίματος, που θα το αναγνώριζαν ως αντιγόνο, προσδίδοντας “stealth” ιδιότητες στο σύστημα. Αντίστοιχα, ο δικτυωμένος πολυπεπτιδικός πυρήνας των νανοσωματιδίων αποτελείται από την πολυ(L-ιστιδίνη), που επιλέχθηκε με σκοπό να καταστήσει το σύστημα pH-αποκρινόμενο στην περιοχή pH=5.0-6.5, δηλαδή στο εύρος pH που διαθέτουν τα καρκινικά κύτταρα. Εξαιτίας, του ιμιδαζολικού δακτυλίου του μορίου, μπορεί να πρωτονιώνεται ή όχι ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται.

Απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η στοχευμένη εναπόθεση φαρμάκων μέσω αυτών των αποκρινόμενων νανομεταφορέων σε καρκινικούς στόχους, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι στην περιοχή κοντά στα καρκινικά κύτταρα το pH είναι χαμηλότερο του φυσιολογικού, βελτιώνοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Με αυτό τον τρόπο εισάγεται μία πρωτότυπη ιδέα στον τομέα των Βιοπολυμερών και της Νανοϊατρικής, η οποία μπορεί να αναπτυχθεί με περεταίρω έρευνα, οδηγώντας σε ελπιδοφόρα αποτελέσματα ικανά να δώσουν τέλος στη μάστιγα του καρκίνου [6]. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται ο τρόπος λειτουργίας των πολυμερικών συστημάτων ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.



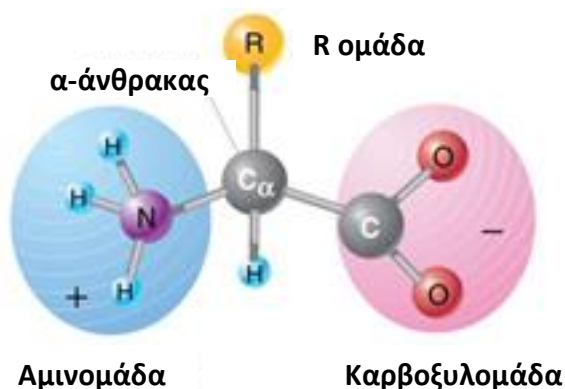
Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των διαδικασιών εγκλωβισμού και ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης υδρόφοβων φαρμάκων μέσω πολλαπλά αποκρινόμενων πολυτεπτιδικών νανοφορέων

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Αμινοξέα, Πεπτίδια, Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι μόρια υψίστης βιολογικής σημασίας, όπως άλλωστε φανερώνει και το όνομά τους, το οποίο προέρχεται από την ελληνική λέξη πρώτος που σημαίνει της «πρώτης γραμμής». Οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο είναι αρκετές. Τεράστια είναι η συμβολή τους στην ενζυμική κατάλυση, καθώς τα περισσότερα ένζυμα τα οποία καταλύουν τις χημικές αντιδράσεις στους ζωντανούς οργανισμούς είναι πρωτεΐνες. Σημαντικό είναι το έργο τους στη μεταφορά και στην αποθήκευση μικρών μορίων και ιόντων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μεταφορά του οξυγόνου στα ερυθροκύτταρα από την αιμοσφαιρίνη. Επιπροσθέτως, συμβάλλουν στην κίνηση και τη μηχανική υποστήριξη, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη δράση του κολλαγόνου, καθώς και στην ανοσολογική προφύλαξη λαμβάνοντας κανείς υπόψιν ότι τα αντισώματα είναι εξειδικευμένες πρωτεΐνες που αντιδρούν και συνδέονται με ξένες ουσίες όπως ιοί, βακτήρια και κύτταρα άλλων οργανισμών. Όλες λοιπόν αυτές οι ιδιότητες των πρωτεϊνών δικαιολογούν τη στροφή του έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος στην προσπάθεια για εργαστηριακή σύνθεση και χρήση αυτών των μορίων.

Τα αμινοξέα είναι οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών και των πολυπεπτιδίων. Ένα  $\alpha$ -αμινοξύ αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, συνδεδεμένο με μία αμινομάδα, μία καρβοξυλική ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μία χαρακτηριστική για το κάθε αμινοξύ πλευρική ομάδα R (Εικόνα 2). Λόγω των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες με το άτομο του  $\alpha$ -άνθρακα, τα  $\alpha$ -αμινοξέα είναι χειρόμορφα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται δυο κατοπτρικά είδη που ονομάζονται D- και L-ισομερή. Μάλιστα μόνο τα L-αμινοξέα απαντούν στις πρωτεΐνες, ενώ για όλα σχεδόν τα αμινοξέα, το L-ισομερές έχει διαμόρφωση S και όχι R [7].

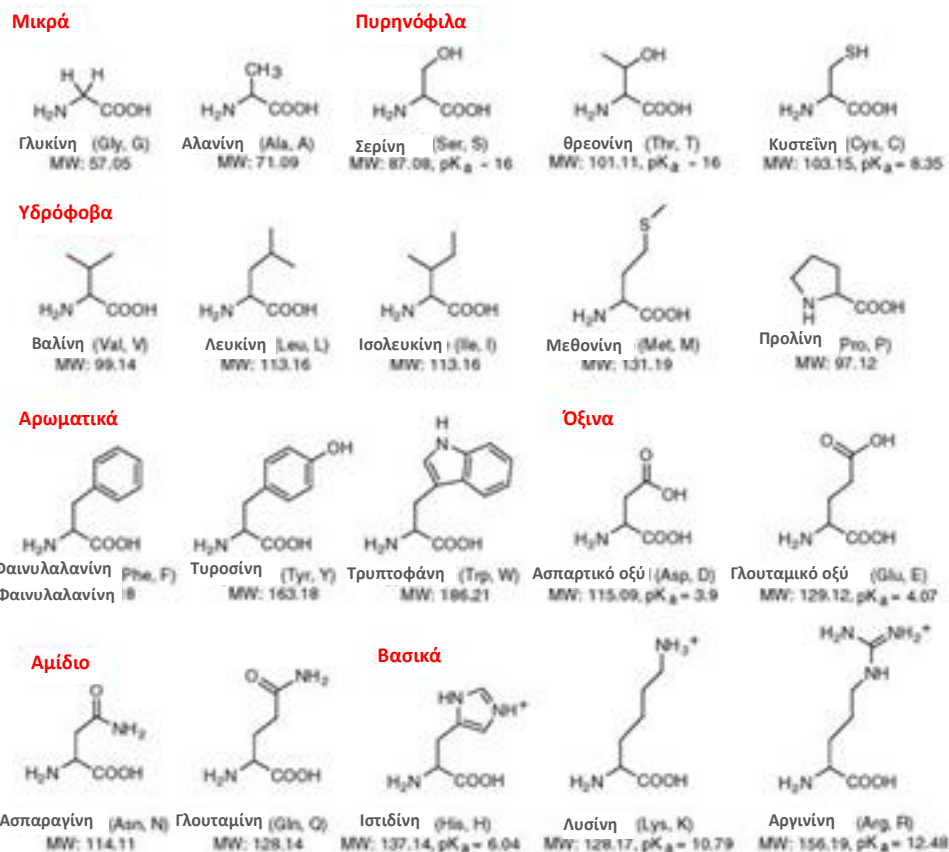


Εικόνα 2: Η δομή ενός α-αμινοξέος

Κάθε μια από τις λειτουργικές ομάδες ενός α-αμινοξέος μπορεί να υπάρχει στην πρωτονιωμένη ή την αποπρωτονιωμένη μορφή [8]. Η ιοντική κατάσταση μιας λειτουργικής ομάδας καθορίζεται από δυο παραμέτρους: την χημική της φύση και το pH του περιβάλλοντος. Καθώς το pH αλλάζει η λειτουργική ομάδα κερδίζει ή χάνει ένα πρωτόνιο. Η χημική φύση της ομάδας καθορίζει σε ποια μικρή περιοχή του pH αυτό συμβαίνει. Αυτή η περιοχή ορίζεται από τον λογάριθμο της σταθεράς ιοντισμού της ομάδας (pKa).

Γενικότερα, το φορτίο των αμινοξέων ποικίλει ανάλογα με το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Παρατηρώντας τις τιμές pKa<sub>1</sub> και pKa<sub>2</sub> της καρβοξυλομάδας και της αμινομάδας αντίστοιχα του βασικού κορμού του μορίου, γίνεται αντιληπτό πως σε ουδέτερο pH και οι δύο ομάδες είναι φορτισμένες ( $-\text{COO}^-$  και  $-\text{NH}_3^+$ ), σχηματίζοντας ένα αμφοτερικό ιόν (zwitterion). Σε όξινα υδατικά διαλύματα, η ομάδα  $-\text{COO}^-$  γίνεται δέκτης ενός πρωτονίου προς σχηματισμό ενός κατιόντος, ενώ αντίθετα σε αλκαλικά διαλύματα το δίπολο αποβάλλει ένα πρωτόνιο, οπότε σχηματίζεται ένα ανιόν. Το pH στο οποίο το συνολικό φορτίο του αμινοξέος είναι μηδέν, ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο pI και είναι χαρακτηριστικό για κάθε αμινοξύ [7].

Υπάρχουν είκοσι διαφορετικά είδη πλευρικών ομάδων R, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το σχήμα, το μέγεθος, το φορτίο, την υδροφοβικότητα/υδροφιλικότητα και τη χημική δραστηριότητα [9]. Συνεπώς, όλες οι πρωτεΐνες είναι δομημένες από τα ίδια 20 αμινοξέα. Τα είκοσι αυτά βασικά αμινοξέα και οι χαρακτηριστικότερες ιδιότητες τους παρατίθενται στην Εικόνα 3.



**Εικόνα 3: Τα είκοσι βασικά αμινοξέα που συντελούν τις πρωτεΐνες**

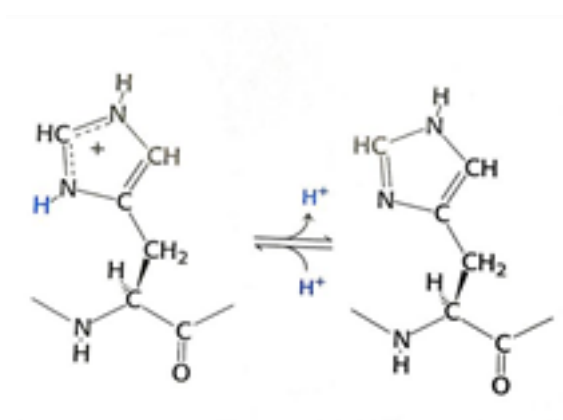
Το απλούστερο αμινοξύ είναι η γλυκίνη, που έχει μόνο ένα άτομο υδρογόνου στην πλευρική αλυσίδα. Η αλανίνη είναι το επόμενο με μια μεθυλομάδα αντί του υδρογόνου. Μεγαλύτερες υδρογονανθρακικές αλυσίδες (με τρία και τέσσερα άτομα άνθρακα) βρίσκονται στην βαλίνη την λευκίνη και την ισολευκίνη. Αυτές οι μεγαλύτερες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

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

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

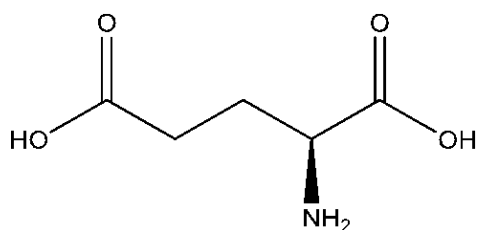
Δυο αμινοξέα, η σερίνη και η θρεονίνη, περιέχουν αλειφατικές υδροξυλικές ομάδες. Τα υδροξύλια τις καθιστούν πιο υδρόφιλες από τις αντίστοιχες αλειφατικές.

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



Σχήμα 1: Ο ιοντισμός της ιστιδίνης.

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



Σχήμα 2: Το γλουταμικό οξύ.

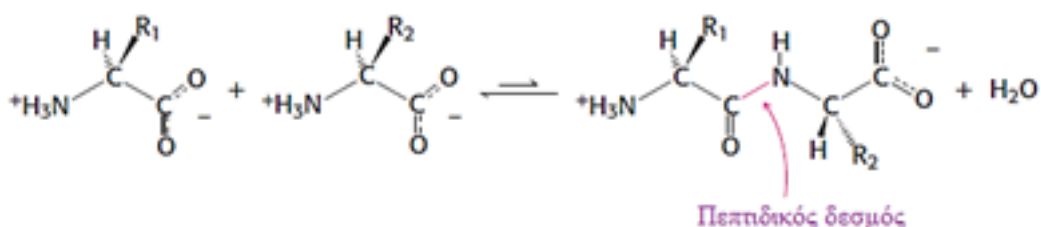


## Δομή πρωτεϊνών

Υπάρχουν τέσσερα επίπεδα δομής που αναφέρονται σχετικά με την αρχιτεκτονική των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και ειδικότερα των πρωτεϊνών [10]. Η πρωτοταγής δομή είναι η αλληλουχία αμινοξέων και η θέση των δισουλφιδικών δεσμών, δηλαδή των διασυνδέσεων που προκύπτουν από την οξειδωση της κυστεΐνης (αμινοξύ που περιέχει την ομάδα HS-) μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων ή απομακρυσμένων περιοχών στην ίδια αλυσίδα. Μπορούμε να πούμε ότι η πρωτοταγής δομή αποτελεί την πλήρη περιγραφή των ομοιοπολικών συνδέσεων σε μία πρωτεΐνη. Η δευτεροταγής δομή εξετάζει τη χωροδιάταξη των αμινοξέων που βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο στην αλληλουχία (π.χ. α-έλικα, β-πτυχωτή). Η τριτοταγής δομή αναφέρεται στη στερεοδιάταξη αμινοξέων απομακρυσμένων μεταξύ τους στη γραμμική αλληλουχία και ο διαχωρισμός της από αυτή της δευτεροταγούς δομής είναι σχετικός. Τέλος, οι πρωτεΐνες που περιέχουν στο μόριό τους περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες (υπομονάδες) έχουν ακόμη ένα επίπεδο δομής. Η τεταρτοταγής δομή αναφέρεται στη χωροδιάταξη αυτών των υπομονάδων και στα είδη των επαφών τους.

## Πεπτιδικός δεσμός (πρωτοταγής δομή)

Η σύνδεση της καρβοξυλικής ομάδας ενός αμινοξέος με την αμινική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος συντελεί στη δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού (ονομάζεται και αμιδικός δεσμός), με παράλληλη απώλεια ενός μορίου ύδατος. Η ισορροπία της αντίδρασης βρίσκεται προς την υδρόλυση παρά στο διπεπτίδιο. Παρά την θερμοδυναμική αστάθεια ο πεπτιδικός δεσμός είναι κινητικά σταθερός, ο χρόνος ζωής του σε υδατικό διάλυμα προσεγγίζει τα χίλια χρόνια [11].

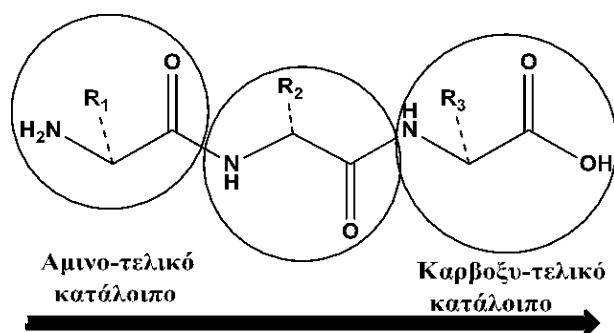


Σχήμα 3: Η δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού

Πολλά αμινοξέα ενώνονται διαδοχικά μέσω πεπτιδικών δεσμών δημιουργώντας μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ του καρβονυλίου και του αζώτου είναι άκαμπτος και επίπεδος, έχοντας χαρακτήρα μερικώς

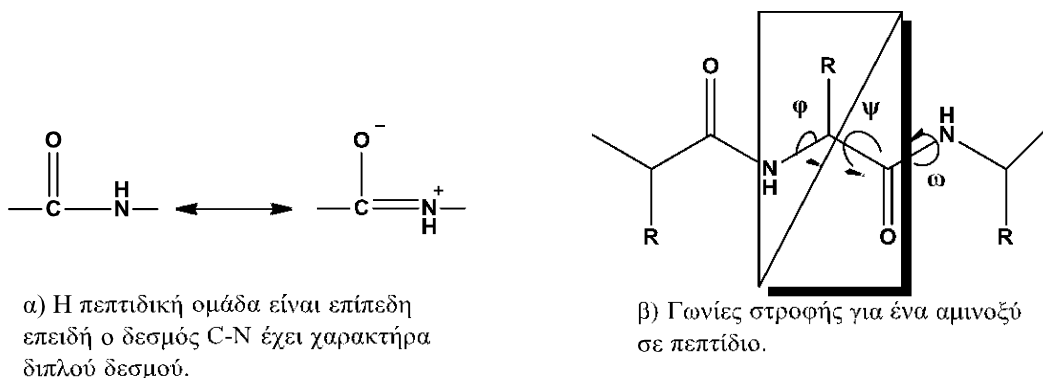
διπλού δεσμού (1.32 Å) λόγω απεντοπισμού των ηλεκτρονίων μέσω δομών συντονισμού. Το γεγονός αυτό εμποδίζει την ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον δεσμό αυτό και μειώνει την δραστικότητα του, καθιστώντας τον κινητικά σταθερό [12], [13].

Μια ομάδα αμινοξέος λέγεται κατάλοιπο στην αλυσίδα, επιπλέον κάθε αλυσίδα έχει κατεύθυνση καθώς τα δομικά της στοιχεία έχουν διαφορετικά άκρα. Από χημικής πλευράς δεν υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων. Ονοματολογικά αλυσίδες με λιγότερα από δεκαπέντε αμινοξέα λέγονται πεπτίδια, έως πενήντα πολυπεπτίδια και μεγαλύτερες ως πρωτεΐνες.



Σχήμα 4: Κατεύθυνση πεπτιδικού δεσμού.

Το 1951, οι Pauling και Corey απέδειξαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X αμινοξέων, αμιδίων τους και απλών πεπτιδίων ότι ο δεσμός C-N είναι βραχύτερος από τον απλό δεσμό. Η απεντόπιση λόγω συντονισμού προσδίδει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού. Η διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας χαρακτηρίζεται από τρεις γωνίες στροφής (την  $\phi$  {C(=O)-N-C<sup>a</sup>-C(=O)}, την  $\psi$  {N-C<sup>a</sup>-C(=O)-N} και την  $\omega$  {C<sup>a</sup>-C(=O)-N-C-}).



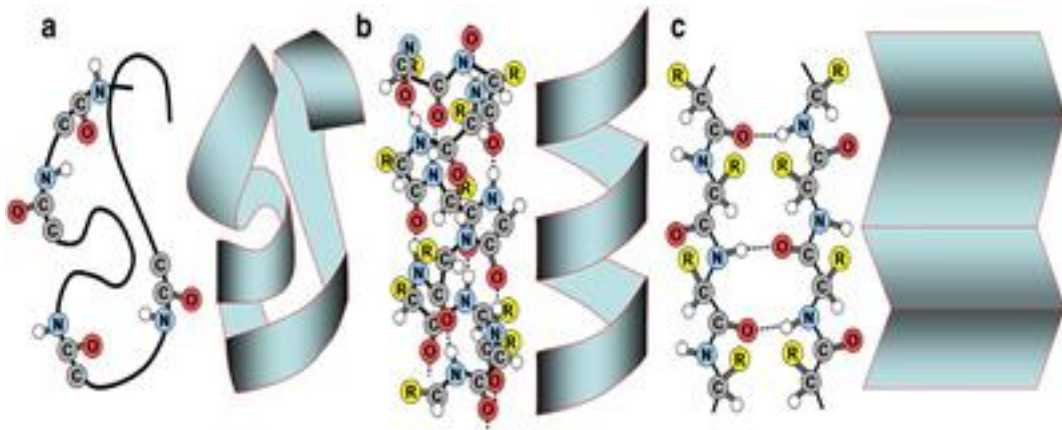
Σχήμα 5: α) Ο πεπτιδικός δεσμός έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού. β) Γωνίες στροφής αμινοξέος.

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

### Δευτεροταγής δομή

Η βασική διαφορά μεταξύ των πολυπεπτιδίων και των πρωτεϊνών είναι ότι τα πολυπεπτίδια είναι βιοπολυμερή που δημιουργούνται από επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες (μονομερή) ενός μόνο είδους αμινοξέος, ενώ οι πρωτεΐνες είναι σύνολα διαφόρων αμινοξέων με αυστηρά καθορισμένη αλληλουχία (πρωτοταγή δομή). Βέβαια, αν και τα συνθετικά πολυπεπτίδια χαρακτηρίζονται από πολυμοριακότητα, σε αντίθεση με τις φυσικές πρωτεΐνες, έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται και να αποκτούν δευτεροταγή δομή ανάλογη με αυτή των πρωτεϊνών, όπως η α-έλικα που σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου και τα β-φύλλα που αναπτύσσουν δεσμούς υδρογόνου διαμοριακά [14-16].

Όσον αφορά τη δευτεροταγή δομή, η διαμόρφωση που θα πάρει πολυπεπτιδική αλυσίδα ορίζεται από τις γωνίες περιστροφής  $\phi$ ,  $\psi$  και  $\omega$ , μαζί με παράγοντες σταθεροποίησης όπως οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Σε σύγκριση με μια αλειφατική αλυσίδα ως προς τον αριθμό των πιθανών διαμορφώσεων, η πολυπεπτιδική έχει περιορισμό λόγω του αμιδικού δεσμού. Πρόσθετες πληροφορίες για την στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών προκύπτουν από το γεγονός ότι τα αμινοξέα έχουν διαφορετικές συχνότητες εμφάνισης στις δευτεροταγής δομές (Πίνακας 1). Η δημιουργία α-έλικας διευκολύνεται από το γλουταμικό, τη μεθειονίνη και τη λευκίνη. Δομές β-πτυχής διευκολύνονται από την βαλίνη, την ισολευκίνη και την φαινυλαλανίνη. Οι στροφές αναστροφής από την προλίνη, την γλυκίνη και την σερίνη.

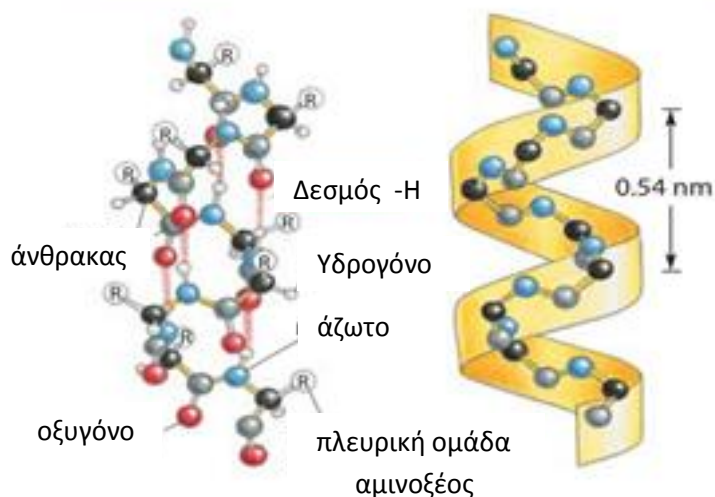


Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση δευτεροταγών δομών που απαντώνται συνηθέστερα στα πολυπεπτιδία α) τυχαίο σπείραμα, β) α-έλικα και γ) αντιπαράλληλο β-φύλλο.

### Η α-έλικα.

Η α-έλικα έχει δομή ράβδου. Η σφιχτά ελιγμένη πολυπεπτιδική κύρια αλυσίδα σχηματίζει το εσωτερικό μέρος της ράβδου, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες εκτείνονται προς το εξωτερικό σε μία ελικοειδή διαμόρφωση (Εικόνα 5). Η α-έλικα σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ομάδων NH και CO της κύριας αλυσίδας. Η ομάδα CO είναι ενωμένη με δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH του αμινοξέος που βρίσκεται 4 μονάδες μπροστά από αυτή στη γραμμική αλληλουχία. Επομένως, όλες οι ομάδες CO και NH της κύριας αλυσίδας συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Κάθε κατάλοιπο απέχει από το προηγούμενο 0,15 nm (1,5 Å) κατά μήκος του άξονα της έλικας και έχει περιστραφεί σε σχέση με αυτό κατά 100°, δίνοντας έτσι 3,6 αμινοξέα ανά στροφή της έλικας. Επομένως, αμινοξέα που απέχουν τρεις ή τέσσερις θέσεις στη γραμμική αλληλουχία βρίσκονται πολύ κοντά σε μία α-έλικα. Αντιθέτως, αμινοξέα που απέχουν δύο θέσεις στη γραμμική αλληλουχία βρίσκονται απέναντι στην έλικα και επομένως δεν είναι δυνατόν να συναντηθούν. Το βήμα της έλικας είναι 0,54 nm, δηλαδή το γινόμενο της μετατόπισης (0,15 nm) και του αριθμού των καταλοίπων ανά στροφή (3,6). Η φορά στροφής μπορεί να είναι είτε προς τα δεξιά είτε προς τα αριστερά. Οι α-έλικες στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες είναι δεξιόστροφες, γιατί η αριστερόστροφη ευνοείται λιγότερο ενεργειακά.

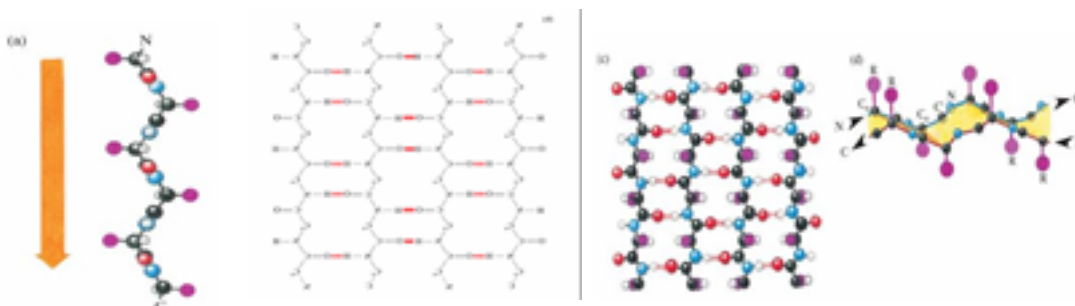
## α-έλικα



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α-έλικας.

## Η β-πτυχωτή επιφάνεια

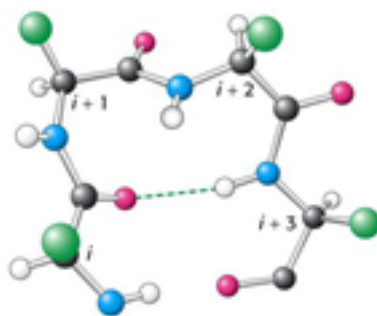
Η β-πτυχωτή επιφάνεια διαφέρει από την α-έλικα γιατί είναι μία επίπεδη δομή και όχι ράβδος. Μία πολυπεπτιδική αλυσίδα στη β-πτυχωτή επιφάνεια είναι σχεδόν τελείως ανοικτή και όχι σφικτά περιελιγμένη όπως στην α-έλικα. Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι 3,5 Å σε αντίθεση με το 1,5 Å της α-έλικας.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



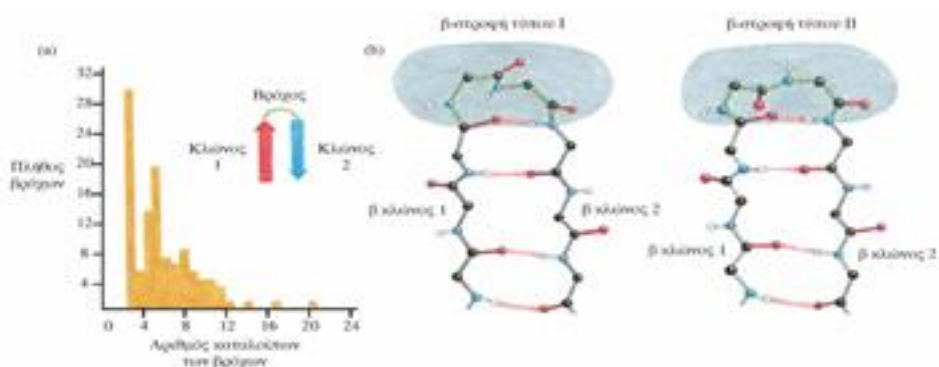
Εικόνα 6: β-πτυχωτή επιφάνεια.

## β-στροφή, ω-θηλιά

Επίσης, η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάζει κατεύθυνση λόγω ενός δομικού στοιχείου που ονομάζεται β-στροφή. Η σχηματισμός αυτής της στροφής φουρκέτας είναι όταν η ομάδα CO της θέσης  $n$  ενός πολυπεπτιδίου ενώνεται με δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH της θέσης  $(n+3)$ . Με τον τρόπο αυτό μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάξει ξαφνικά την κατεύθυνσή της. Οι β-στροφές συχνά συνδέουν αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, για το λόγο αυτό πήραν και αυτό το όνομα. Είναι ακόμα γνωστές ως στροφές αναστροφής ή κάμψεις φουρκέτας. Η ω-θηλιά αναφέρεται σε ένα μεγαλύτερο βρόγχο που συνδέει πρωτεϊνικά τμήματα και στον οποίο δεν σχηματίζονται ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου.



Εικόνα 7: Η δομή μιας στροφής αναστροφής της αλυσίδας: Η ομάδα C=O του αμινοξικού κατάλοιπο  $i$  της πολυπεπτιδικής αλυσίδας δεσμεύεται με δεσμό-H στην ομάδα NH του καταλοίπου  $i+3$  και σταθεροποιεί τη στροφή.



Εικόνα 8: (a) Ιστόγραμμα στο οποίο απεικονίζεται η συχνότητα των φουρκετών ως συνάρτηση του μήκους τους για 62 διαφορετικές πρωτεΐνες. (b) Οι δύο πιο συχνά απαντώμενες στροφές, μήκους δύο καταλοίπων. Στροφή Τύπου I στα αριστερά και Τύπου II στα δεξιά. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί εντός των ορίων των στροφών παρουσιάζονται με πράσινο χρώμα.

Η τάση ενός πεπτιδίου για δευτεροταγή δομή, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση του σε αμινοξέα [12], [17]. Οι σχετικές πιθανότητες να εμφανιστεί ένα κατάλοιπο αμινοξέος σε μία συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή έχουν προσδιοριστεί. Αυτές οι δευτεροταγείς δομές συμβάλλουν σημαντικά στην αυτο-οργάνωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, οδηγώντας σε νέες υπερμοριακές δομές με πιθανές βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Τα πολυπεπτίδια έχουν αποτελέσει αντικείμενο εντατικών μελετών λόγω του θεμελιώδη ρόλου τους στον εγκλωβισμό και στην ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών που έχουν σχεδιαστεί για χρήση στη γονιδιακή και αντικαρκινική θεραπεία [18-20].

**Πίνακας 1: Σχετικές συχνότητες εμφάνισης καταλοίπων αμινοξέων στη δευτεροταγή δομή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων [21].**

<b>Ονομασία</b>	<b>Σύντμηση</b>	<b><math>\alpha</math>-έλικα</b>	<b><math>\beta</math>-πτυχωτή επιφάνεια</b>	<b><math>\beta</math>-στροφή</b>
Αλανίνη	Ala	1,29	0,90	0,78
Κυστεΐνη	Cys	1,11	0,74	0,80
Λευκίνη	Leu	1,30	1,02	0,59
Μεθειονίνη	Met	1,47	0,97	0,39
Γλουταμικό οξύ	Glu	1,44	0,75	1,00
Γλουταμίνη	Gln	1,27	0,80	0,97
Ιστιδίνη	His	1,22	1,08	0,69
Λυσίνη	Lys	1,23	0,77	0,96
Βαλίνη	Val	0,91	1,49	0,47
Ισολευκίνη	Ile	0,97	1,45	0,51
Φαινυλαλανίνη	Phe	1,07	1,32	0,58
Τυροσίνη	Tyr	0,72	1,25	1,05
Θρυπτοφάνη	Trp	0,99	1,14	0,75
Θρεονίνη	Thr	0,82	1,21	1,03
Γλυκίνη	Gly	0,56	0,92	1,64
Σερίνη	Ser	0,82	0,95	1,33
Ασπαρτικό οξύ	Asp	1,04	0,72	1,41
Ασπαραγίνη	Asn	0,90	0,76	1,28
Προλίνη	Pro	0,52	0,64	1,91
Αργινίνη	Arg	0,96	0,99	0,88

## 2.2 Σύνθεση Πεπτιδίων Μικρού Μοριακού Βάρους με Καθορισμένη Αλληλουχία

Η σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων είναι μία μέθοδος ιδιαίτερης σημασίας, διότι βρίσκει εφαρμογές σε μελέτες με φαρμακευτικό και βιοϊατρικό ενδιαφέρον. Παρόλο που η σύνθεση αυτών των ενώσεων είναι μία δύσκολη και δαπανηρή διαδικασία, οι παρακάτω τρόποι είναι οι επικρατέστεροι και πιο αξιόπιστοι σε εργαστηριακή κλίμακα:

### A. Σύνθεση σε στερεά φάση (Μέθοδος Merrifield)

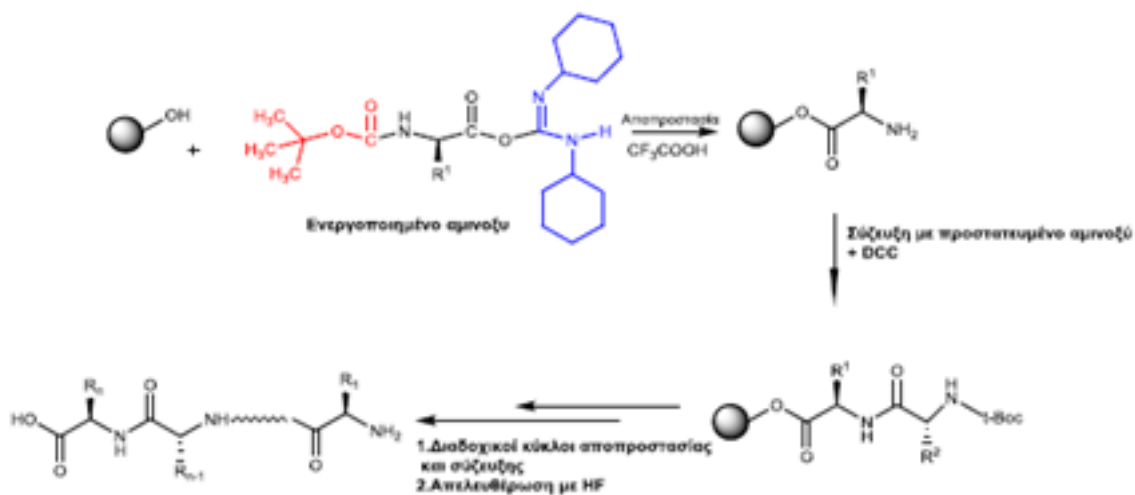
Η σύνθεση μεγάλων πεπτιδικών αλυσίδων με σταδιακή προσθήκη ενός αμινοξέος είναι χρονοβόρος και ιδιαίτερα επίπονη παρουσιάζοντας ιδιαίτερες δυσκολίες όπως είναι η δυσδιαλυτότητα. Επανάσταση στο συγκεκριμένο τομέα έφερε η μέθοδος στερεάς φάσης, που αναπτύχθηκε από τον R. Bruce Merrifield (βραβείο Nobel 1984). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή [22], [23], η πεπτιδική σύνθεση πραγματοποιείται σε στερεά φάση από σφαιρίδια πολυμερούς πολυστυρενίου, που έχει παρασκευαστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε σε κάθε 100 περίπου βενζυλικούς δακτύλιους, κάποιος να φέρει σε θέση πάρα-μια χλωρομέθυλο ομάδα. Είναι δυνατή η απομάκρυνση της περίσσειας των αντιδραστηρίων και των παραπροϊόντων με διήθηση και εκπλύσεις. Οι μέθοδοι προστασίας και σύζευξης παραμένουν ίδιες με αυτές της συνθεσης σε διάλυμα με την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου με αντιδραστήριο σύζευξης όπως το DCC και την αντίδραση μιας ελεύθερης αμινομάδας με το ενεργό καρβοξύλιο για την δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού. Για την πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης ακολουθούνται τέσσερα στάδια :

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



εστερικό δεσμό ανάμεσα στο πεπτιδίο και το πολυμερές, οπότε το ελεύθερο πεπτιδίο αποχωρίζεται και απομονώνεται.

Η μέθοδος της στερεάς φάσης αποτελείται από έξι είδη αντιδράσεων, τρία από τα οποία λαμβάνουν χώρα μόνο μια φορά και τρία τα οποία επαναλαμβάνονται σε κάθε κύκλο σύνθεσης [24].



Σχήμα 6: Στάδια σύνθεσης με την τεχνική Merrifield

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

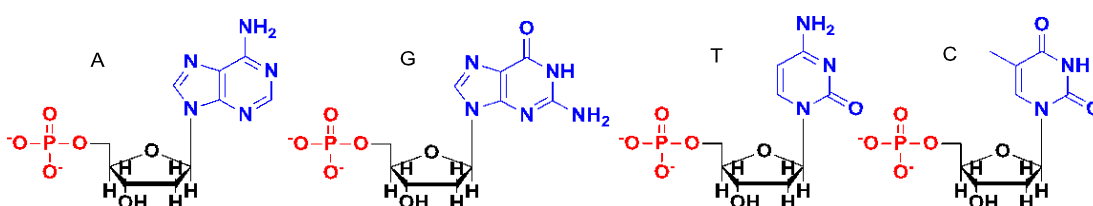
## B. Σύνθεση σε διάλυμα [25]

Ένα αμινοξύ προσκολλημένο σε ένα διαλυτό πολυμερές μέσω της καρβοξυλικής του ομάδας, μπορεί να ακυλιωθεί από ένα κατάλληλα προστατευμένο και ενεργοποιημένο αμινοξύ, και να αρχίσει με αυτόν τον τρόπο η σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας. Τα ενδιάμεσα πεπτιδία καταβυθίζονται και εκπλένονται ώστε να απομακρυνθούν τα αρχικά αντιδρώντα, καθώς και τα τυχόν παραπροϊόντα. Το τελικό καθαρό προϊόν επαναδιαλύεται, αποπροστατεύεται, ακυλιώνεται ξανά σε διάλυμα και ακολουθεί η ίδια

διαδικασία. Μετά από τη σύζευξη, η πεπτιδική σύνθεση μπορεί να συνεχιστεί με απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων. Όταν χρησιμοποιούνται αμινοξέα με τρεις λειτουργικές ομάδες, θεωρείται απαραίτητη η προστασία της δραστικής πλευρικής ομάδας. Ενώ όμως οι πλευρικές ομάδες πρέπει να παραμένουν προστατευμένες καθ' όλη την διάρκεια της σύνθεσης, η  $\alpha$ -προστατευτική ομάδα (αμινομάδα ή καρβοξυλομάδα) πρέπει να απομακρύνεται εύκολα πριν από κάθε σύζευξη. Επομένως, απαιτούνται δύο είδη προστατευτικών ομάδων που να έχουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς τα αντιδραστήρια αποπροστασίας. Μετά το τέλος της σύνθεσης, οι προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται και λαμβάνεται το επιθυμητό πεπτίδιο, το οποίο στη συνέχεια καθαρίζεται από τα παραπροϊόντα. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μέγιστη προστασία όλων των δραστικών ομάδων που μειώνει τις πιθανότητες πραγματοποίησης παράπλευρων αντιδράσεων, ενώ βασικά μειονεκτήματα είναι η δυσκολία απομάκρυνσης των προστασιών στο τέλος της σύνθεσης καθώς και η αυξημένη δυσδιαλυτότητα που εμφανίζουν τα μεγαλύτερα πεπτίδια.

### Γ. Σύνθεση με τεχνητή ανασυνδιασμένου DNA [26], [27]

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



Σχήμα 7: Οι βάσεις του DNA, αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη.

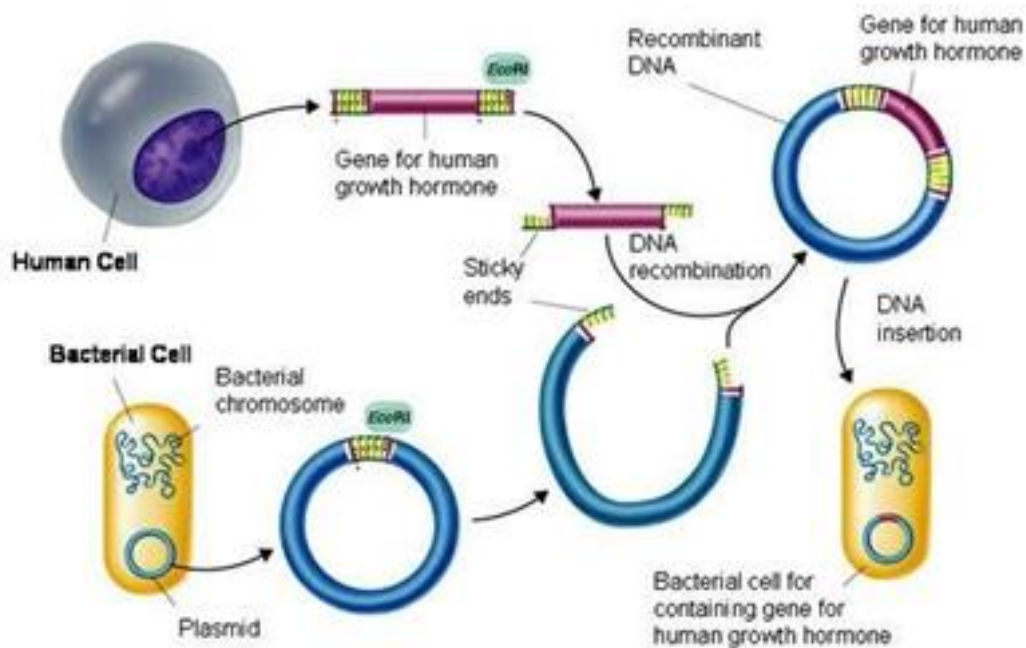
Το 1953 οι Watson και Crick ανακάλυψαν την δομή της διπλής έλικας του DNA και την εξειδίκευση των βάσεων όπου η αδενίνη ζευγαρώνει με την θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη λόγω δεσμών υδρογόνου και στερικών παραγόντων. Το DNA όμως δεν είναι το άμεσο εκμαγείο για την πρωτεϊνοσύνθεση. Προηγείται η διαδικασία της

μεταγραφής (transcription) προς αγγελιοφόρο RNA και ακολουθεί η διαδικασία της μετάφρασης στα ριβοσώματα (translation) δηλαδή η σύνθεση των πρωτεϊνών. Η ροή των γενετικών πληροφοριών γίνεται ως εξής :



Υπάρχει σχέση μεταξύ της αλληλουχίας βάσεων του DNA και της αλληλουχίας των αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη μέσω του γενετικού κώδικα. Ένα αμινοξύ κωδικοποιείται από μια ομάδα τριών βάσεων του DNA που λέγεται κωδικόνιο. Υπάρχουν  $4^3=64$  πιθανές τριπλέτες, επομένως για τα περισσότερα αμινοξέα υπάρχουν περισσότερες από μια χαρακτηριστικές τριπλέτες δηλαδή ο γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος. Οι βάσεις διαβάζονται διαδοχικά ξεκινώντας από ένα συγκεκριμένο σημείο (που αντιστοιχεί σε χαρακτηριστική αλληλουχία) και ονομάζονται προαγωγείς (promoters). Για παράδειγμα το 1961 ο Marsall Nirenberg [28] ανακάλυψε ότι προσθήκη πολυουρακίλης σε ένα σύστημα ελεύθερων κυττάρων οδηγεί στην σύνθεση πολυφαινουλαανίνης, διότι το κωδικόνιο UUU κωδικοποιεί την φαινουλαανίνη. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η σύνθεση ομοπολυμερών πεπτιδίων χρησιμοποιώντας αγγελιοφόρους με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τρινουκλεοτιδίων.

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



Εικόνα 9: Απεικόνιση της τεχνικής του ανασυνδισμένου DNA.

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

### 2.3 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους

Εκτός από την παρασκευή συνθετικών πεπτιδίων με απόλυτα καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων (πρωτοταγή δομή), την τελευταία εικοσαετία παρουσιάζει ενδιαφέρον η δημιουργία πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία. Το ενδιαφέρον αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι 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  $\alpha$ -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], [29-31].

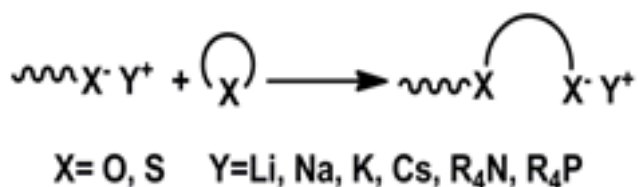
### **2.3.1 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)** [32], [33]

Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) μαζί με τον ριζικό και τον ανιοντικό πολυμερισμό, θεωρούνται τα πιο διαδεδομένα είδη πολυμερισμού για τη σύνθεση καλά καθορισμένων μακρομορίων. Ο ROP αποτελεί το είδος πολυμερισμού κατά το οποίο η τελική μακρομοριακή αλυσίδα προέρχεται από ένα κυκλικό πρόδρομο μονομερές, κατόπιν διάνοιξης του δακτυλίου του. Αν και ο ROP θεωρείται ως επί το πλείστον αλυσωτός πολυμερισμός (προσθήκη του μονομερούς σε μία αναπτυσσόμενη αλυσίδα), υπάρχουν αρκετές πιο περίπλοκες περιπτώσεις που περιλαμβάνουν ενεργοποιημένα μονομερή. Εκτός συγκεκριμένων εξαιρέσεων, όπως είναι ο ROP των N-καρβοξυ ανυδριτών (ή ανυδρίτες Leuchs), ο ROP δεν συνοδεύεται από την παραγωγή μικρών μορίων κατά τη διάδοση του πολυμερισμού, τα όποια πρέπει να απομακρύνονται ώστε να προάγεται η αντίδραση.

Στα περισσότερα είδη πολυμερισμού, η κινητήρια δύναμη για να προαχθεί ο πολυμερισμός είναι η μετατροπή ενός πολλαπλού δεσμού σε απλό. Αντιθέτως, στον ROP κινητήρια δύναμη αποτελεί η αυξημένη τάση διάνοιξης δακτυλίου (ring strain) του μονομερούς και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να την συνοδεύουν. Ωστόσο, δεν μπορούν να πολυμεριστούν όλες οι κυκλικές ενώσεις. Για να γίνει αυτό εφικτό, θα πρέπει ο πολυμερισμός να ευνοείται τόσο κινητικά όσο και θερμοδυναμικά. Αφενός μεν τα μονομερή πρέπει να φέρουν μία κινητικά δραστική ομάδα που να μπορεί να αντιδράσει εύκολα και αφετέρου η τάση διάνοιξης του δακτυλίου πρέπει να είναι




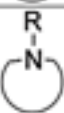

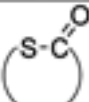
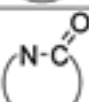

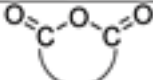
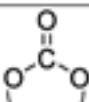

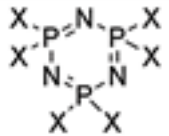
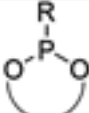
μεγάλη. Δακτύλιοι που περιέχουν 3, 4 ή 8, 9 άτομα, έχουν μεγάλη τάση δακτυλίου και ευνοείται η διάνοιξή τους, λόγω της μείωσης της ενθαλπίας που την συνοδεύει. Οι εξαμελείς δακτύλιοι είναι θερμοδυναμικά σταθεροί και κατά γενικό κανόνα δεν πολυμερίζονται, ενώ οι πενταμελείς και επταμελείς δακτύλιοι βρίσκονται ενδιάμεσα και τις περισσότερες φορές μπορούν να πολυμεριστούν. Τα συνηθέστερα κυκλικά μονομερή που πολυμερίζονται με διάνοιξη δακτυλίου περιέχουν κάποιο ετεροατόμο στο δακτύλιο τους, όπως O, S ή N, και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διάφορες οικογένειες ανάλογα με τις χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες που φέρουν. Επιπλέον, ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο διαδίδεται 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). Ειδικότερα, οι κυριότερες ομάδες κυκλικών μονομερών, το μέγεθος του δακτυλίου τους καθώς και το είδος του μηχανισμού με τον οποίο προάγεται ο ROP σε κάθε περίπτωση συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Όπως φαίνεται, 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:



Τα κυριότερα μονομερή που πολυμερίζονται μέσω AROP είναι το αιθυλενοξειδίο, το προπυλενοξειδίο, το λακτίδιο και η εξαμεθυλ(κυκλοτρισιλοξάνη) (D<sub>3</sub>), από την οποία προκύπτει το γνωστό PDMS, ενώ οι σημαντικότεροι απαρχητές που χρησιμοποιούνται για την έναρξη του πολυμερισμού είναι οργανομεταλλικές ενώσεις των αλκαλίων (Li, Na, K) και διαφορές αμίνες.

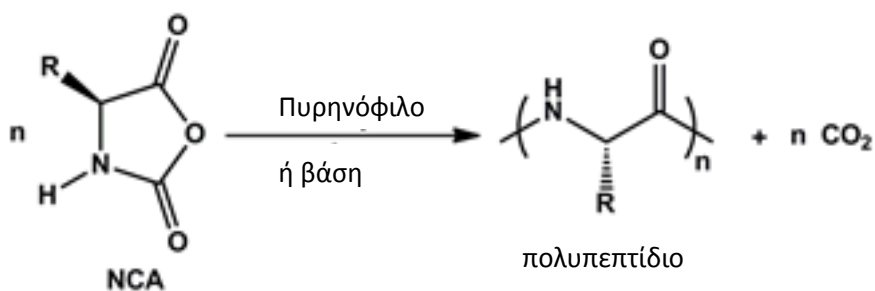
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές ομάδες κυκλικών μονομερών και ο συνήθης μηχανισμός πολυμερισμού ROP για κάθε κατηγορία

Name	Structure	Ring size	Mechanism
Olefin		4,5,8	Metathesis
Ether		3–5,7	Cationic, anionic
Thioether		3,4	Cationic, anionic
Amine		3,4,7	Cationic
Lactone		4,6–8	Anionic, cationic
Thiolactone		4–8	Anionic, cationic
Lactam		≥4	Anionic, cationic
Disulfide		≥8	Radical
Anhydride		5 and ≥7	Anionic
Carbonate		6–8 and ≥20	Anionic
Silicone		6,8 and ≥10	Anionic, cationic
Phosphazene		6	Cationic
Phosphonite		3,5–7	Anionic

### 2.3.2 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (ROP) των N-καβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων [3], [29-31]

Η πιο διαδεδομένη και αποδοτική μέθοδος σύνθεσης πολυπεπτιδικών ομο- και συμπολυμερών, αποτελεί ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων. Μάλιστα στην περίπτωση των NCAs αυτό το είδος πολυμερισμού είναι συντομότερο, οικονομικότερο και μπορεί να δώσει ένα μεγάλο αριθμό παραγώγων πολυπεπτιδίων, σε σχέση με άλλες συνθετικές πορείες, χωρίς την ανεπιθύμητη λήψη ρακεμικού μίγματος των δύο οπτικών αντιπόδων των αμινοξέων.

Ο πολυμερισμός των NCAs μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο αριθμό απαρχητών, περιλαμβάνοντας βάσεις όπως αμίνες, αλκοξειδία, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα, αλλά μπορεί επίσης να εκκινήσει με θέρμανση. Μέχρι σήμερα, έχει χρησιμοποιηθεί ένα μεγάλο εύρος μονομερών (και παραγώγων τους) για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων, ανάλογα με τις επιθυμητές ιδιότητες που επιλέγονται για τα τελικά πολυμερή. Η αντίδραση συνοδεύεται από την παραγωγή αερίου CO<sub>2</sub>, και κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους. Μελέτες ιχνηθετημένων μονομερών με <sup>14</sup>C αποδεικνύουν ότι το παραγόμενο CO<sub>2</sub> προέρχεται αποκλειστικά από τον άνθρακα C(2). Η γενική αντίδραση πολυμερισμού των NCAs για την σύνθεση πολυπεπτιδίων δίνεται στο Σχήμα 8.



Σχήμα 8: Αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs

Βέβαια, για να επιτευχθεί ο πολυμερισμός των NCAs των α-αμινοξέων απαιτείται όλα τα αντιδραστήρια και κυρίως τα μονομερή, τα οποία βρίσκονται σε στερεή μορφή, να καθαριστούν ενδελεχώς από προσμίξεις με επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις κάτω από υψηλό κενό (high-vacuum techniques). Χρησιμοποιώντας τις τεχνικές υψηλού κενού ο πολυμερισμός χαρακτηρίζεται ως ζωντανός (απαραίτητη προϋπόθεση για την διατήρηση του ζωντανού χαρακτήρα του πολυμερισμού είναι η ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου CO<sub>2</sub>) και τα πολυπεπτιδία που λαμβάνονται διαθέτουν καλά καθορισμένες ιδιότητες.

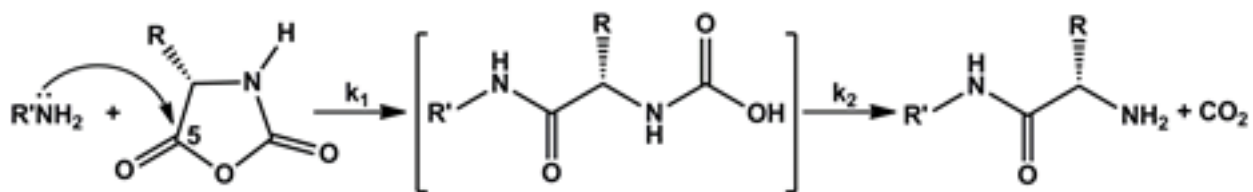


Συνήθως, για την πραγματοποίηση της διάνοιξης του δακτυλίου χρησιμοποιούνται ως απαρχητές είτε πρωτοταγείς αμίνες που είναι ισχυρότερα πυρηνόφιλα παρά βάσεις, ή τριτοταγείς αμίνες και αλκοξειδία μετάλλων που είναι ισχυρότερες βάσεις και έτσι μπορούν να δώσουν πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους. Με βάση το είδος του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί, υπάρχουν δύο κύριες μηχανιστικές πορείες ώστε να συντεθούν τα πολυπεπτίδια. Ο πρώτος μηχανισμός είναι γνωστός ως “κανονικός μηχανισμός αμινών” (“normal amine mechanism”, NAM), ενώ ο δεύτερος είναι ο “μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς” (“activated monomer mechanism”, AMM).

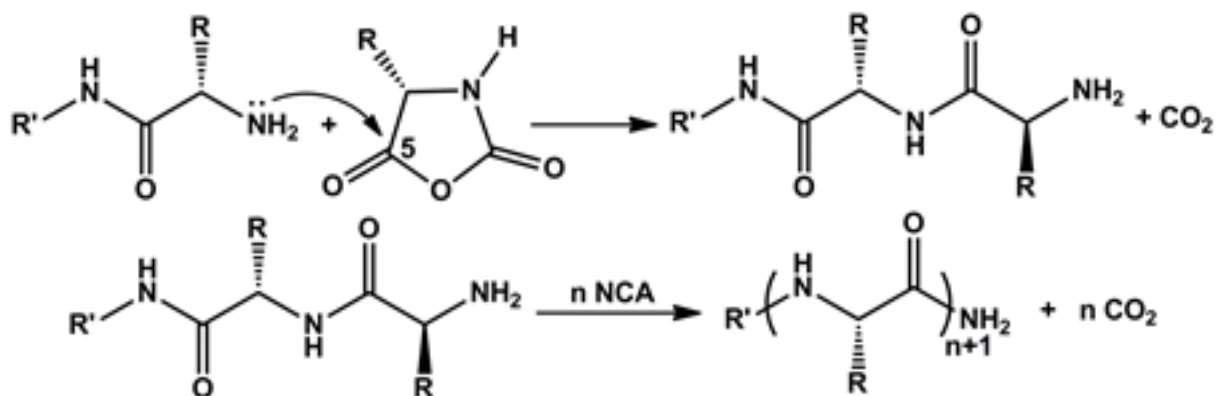
### **2.3.2.1 Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)**

Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται γενικά για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση μη ιοντικών απαρχητών που διαθέτουν τουλάχιστον ένα άτομο υδρογόνου, το οποίο μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα (του τύπου βάση-H), όπως είναι οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες (π.χ. n-εξυλαμίνη, διμεθυλαμίνη), οι αλκοόλες και το νερό. Οι απαρχητές αυτοί δρουν ως ισχυρότερα πυρηνόφιλα παρά βάσεις, με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται κατάλοιπα τους στις τελικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Τα στάδια της έναρξης και της διάδοσης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού δείχνονται στο Σχήμα 9.

### Στάδιο Έναρξης:



### Στάδιο Διάδοσης:

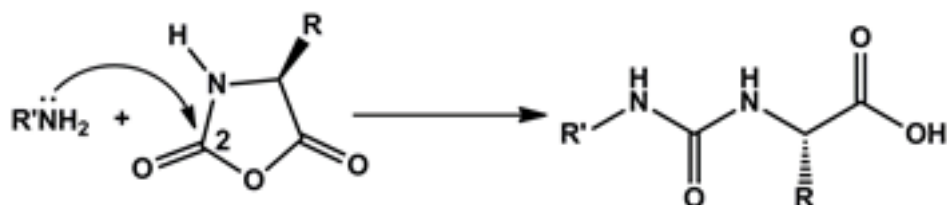


Σχήμα 9: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM)

Όπως φαίνεται, κατά το στάδιο της έναρξης ο πυρηνόφιλος απαρχητής προσβάλλει το καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Το ενδιάμεσο καρβαμιδικό οξύ που παράγεται είναι θερμοδυναμικά ασταθές και συνεπώς αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια ελεύθερη αμινομάδα, η οποία είναι ικανή να προάγει 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 δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα, λαμβάνοντας υπόψη τη συμφωνία μεταξύ των πειραματικά παρατηρούμενων μοριακών βαρών και αυτών που αναμένονται θεωρητικά. 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. Αυτό αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του «ζωντανού πολυμερισμού», και συνεπώς οι κατανομές των πολυπεπτιδίων που λαμβάνονται είναι ιδιαίτερα στενές.

Βέβαια, εκτός της προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 5' κατά το στάδιο της έναρξης, μπορεί να πραγματοποιηθεί παράπλευρη αντίδραση με προσβολή στη θέση 2', προς σχηματισμό ενός ακραίου ουρείδο οξέος (Σχήμα 10). Με αυτό τον τρόπο επέρχεται πρόωρος τερματισμός του πολυμερισμού καθώς η αμίνη δεν μπορεί να αναγεννηθεί. Η

πιθανότητα πραγματοποίησης της αντίδρασης τερματισμού μειώνεται όσο ισχυρότερο πυρηνόφιλο είναι ο απαρχητής που θα χρησιμοποιηθεί. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν αποκλίσεις από τον «ζωντανό» χαρακτήρα του ROP είναι η ισορροπία μεταξύ καρβαμιδικού οξέος και CO<sub>2</sub>, η επιλογή διαλύτη, η θερμοκρασία της αντίδρασης και η ύπαρξη υγρασίας ή άλλων προσμίξεων (υδρόλυση του μονομερούς).

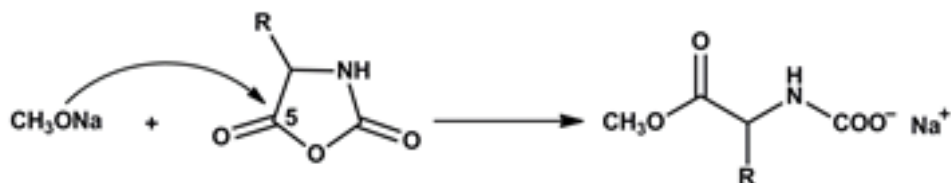


Σχήμα 10: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή

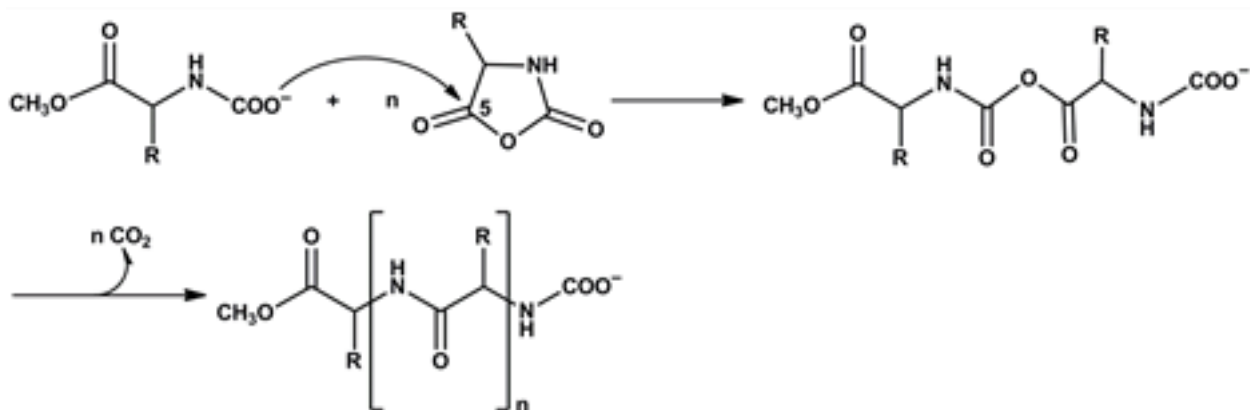
### 2.3.2.2 Μηχανισμός του Blout

Ο μηχανισμός του Blout (“Blout mechanism”) είναι μια «ιοντική» μορφή του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM). Το 1958 οι Idelson και Blout, μελέτησαν τον πολυμερισμό των NCAs μέσω ισχυρών βάσεων, χρησιμοποιώντας μεθοξειδίο του νατρίου [34]. Κατά το στάδιο της έναρξης, το μεθοξειδίο του νατρίου προβάλλει πυρηνόφιλα τον C(5) του N-καρβοξυ ανυδρίτη προκαλώντας διάνοιξη δακτυλίου. Στο στάδιο έναρξης του πολυμερισμού δεν λαμβάνει χώρα παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα. Η διάνοιξη του δακτυλίου επέρχεται προς σχηματισμό του καρβαμιδικού ανιόντος, το οποίο είναι υπεύθυνο για την διάδοση του πολυμερισμού. Η αλυσίδα αναπτύσσεται με την προσθήκη του καρβαμιδικού ανιόντος σε ένα νέο μόριο ανυδρίτη, προς σχηματισμό ενός ενδιάμεσου καρβαμικού-καρβόξυλο μικτού ανυδρίτη. Εν συνεχεία, απελευθερώνεται CO<sub>2</sub> προς σχηματισμό ενός νέου καρβαμιδικού ανιόντος. Επειδή όμως τα ενεργά καρβαμιδικά άκρα είναι ασθενέστερα πυρηνόφιλα σε σχέση με τα αντίστοιχα αμινο-τελικά, ο μηχανισμός αυτός είναι λιγότερο πιθανός.

### Στάδιο Έναρξης:



### Στάδιο Διάδοσης:



Σχήμα 11: Στάδια έναρξης και διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό κατά Blout

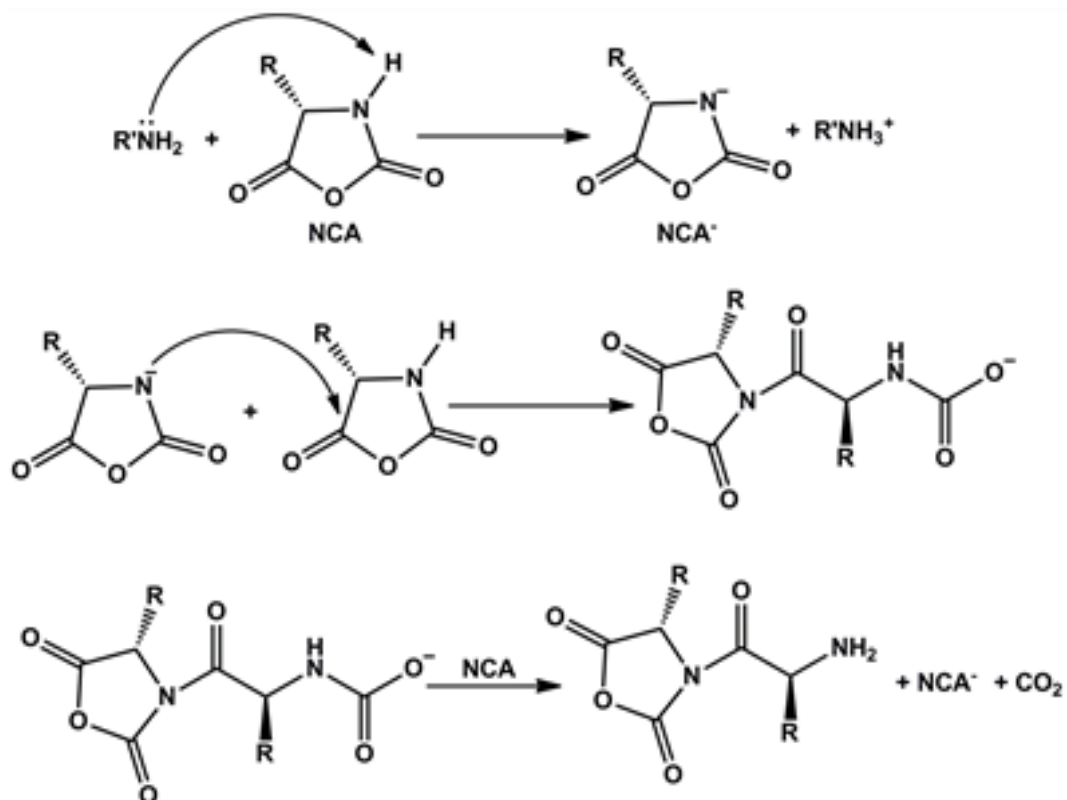
Ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν απαιτεί το πρωτόνιο από τον απαρχητή, και μπορεί να έχει εφαρμογή τόσο σε N-υποκατεστημένους NCAs, όσο και σε μη υποκατεστημένους. Παρ' ότι υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι ο μηχανισμός του Blout μπορεί να εφαρμοστεί κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, είναι γενικά αποδεκτό ότι ο πολυμερισμός των NCAs με χρήση ισχυρών βάσεων, όπως το μεθοξείδιο του νατρίου, προχωρά μέσω του “μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς”.

#### 2.3.2.3 Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM)

Αυξάνοντας την βασικότητα του απαρχητή, χρησιμοποιώντας τριτοταγείς αμίνες καθώς και δευτεροταγείς υψηλής βασικότητας, το σύστημα ακολουθεί ένα διαφορετικό μηχανισμό πολυμερισμού. Σε αυτόν ο απαρχητής δεν δρα ως πυρηνόφιλο δίνοντας ζεύγος ηλεκτρονίων, αλλά ως καταλύτης ενεργοποιώντας ένα μόριο μονομερούς. Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση είναι ότι το άζωτο στη θέση 3 του NCA πρέπει να μην είναι υποκατεστημένο και να διαθέτει ένα ευκίνητο υδρογόνο.

Επειδή ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM) διαδίδεται μέσω ανιόντων, έχει αποδειχθεί ότι είναι ταχύτερος από τον αντίστοιχο κανονικό μηχανισμό αμινών (NAM) και τα πολυπεπτίδια που παράγονται έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

Επιπλέον, όμως, τα πολυμερή που συντίθενται μέσω αυτού του μηχανισμού έχουν μεγαλύτερη κατανομή μοριακών βαρών, λόγω του ότι το ανιόν  $NCA^-$  δεν έχει εκλεκτικότητα και μπορεί να αντιδράσει τόσο με την μακρομοριακή αλυσίδα όσο και με ένα νέο μονομερές, δίνοντας έτσι προϊόντα με μεγάλη ανομοιογένεια. Τα στάδια της ενεργοποίησης του μονομερούς και της έναρξης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού δείχνονται στο Σχήμα 12.

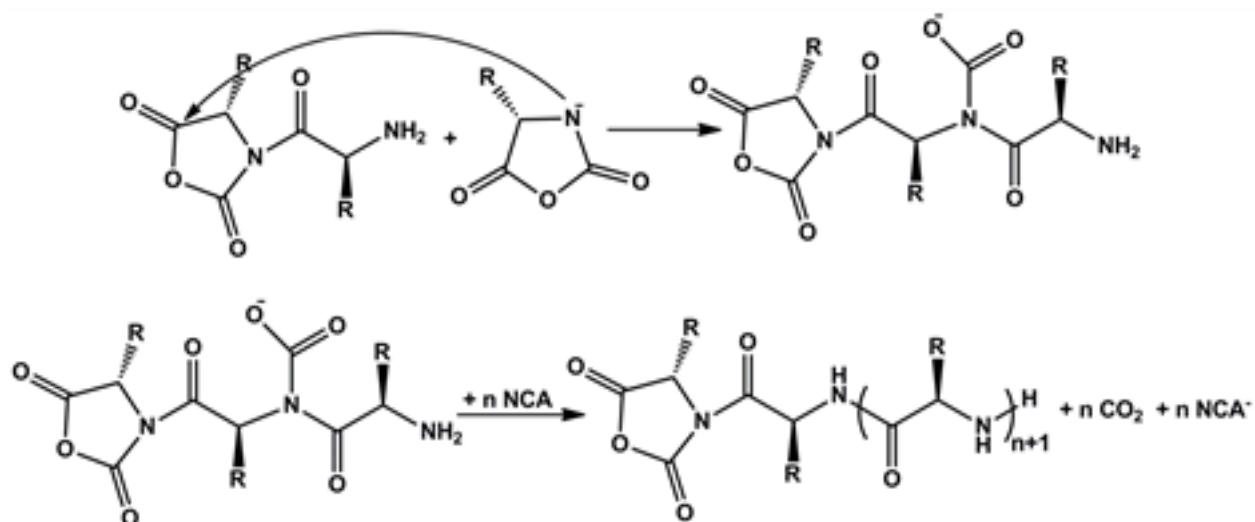


Σχήμα 12: Στάδια ενεργοποίησης και έναρξης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)

Στο στάδιο της προέναρξης ο απαρχητής δρα ως βάση δεσμεύοντας το όξινο H του αζώτου στο δακτύλιο του μονομερούς. Ουσιαστικά, ο μηχανισμός έναρξης περιλαμβάνει την αποπρωτονίωση του δεσμού N-H του NCA από τον απαρχητή-βάση και την πυρηνόφιλη προσβολή το σχηματισθέντος ανιόντος σε ένα δεύτερο μόριο μονομερούς στον άνθρακα 5', ανοίγοντας τον δακτύλιο και δίνοντας ένα διμερές. Το καρβαμιδικό ανιόν που σχηματίζεται πρωτονιώνεται από ένα τρίτο μόριο μονομερούς, σχηματίζοντας το ασταθές καρβαμιδικό οξύ, το οποίο και αποκαρβοξυλιώνεται, παράγοντας ενεργές αμινομάδες ενώ αναγεννάται ο καταλύτης ( $NCA^-$ ) και εκλύεται  $CO_2$ .

Κατά το στάδιο της διάδοσης το διμερές που σχηματίστηκε προσβάλλεται από ένα άλλο ανιόν  $NCA^-$  για να δώσει ένα τριμερές, κ.ο.κ., με τον  $NCA^-$  να αναγεννάται σε κάθε βήμα

της αντίδρασης (Σχήμα 13). Όπως γίνεται αντιληπτό ο AMM δεν περιλαμβάνει ενσωμάτωση τμήματος του απαρχητή στην τελική αλυσίδα.



Σχήμα 13: Στάδιο διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)

Τέλος, η καθαρότητα των μονομερών και του διαλύτη είναι κρίσιμοι παράγοντες για την έκβαση του AMM, ενώ υπάρχει επίσης πλήθος πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων που μπορούν να τερματίσουν τον πολυμερισμό, όπως αντιδράσεις διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας, ισομερείωσης και ενδομοριακής κυκλοποίησης. Είναι, λοιπόν, εμφανές ότι ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν είναι επιθυμητός, καθώς ο πολυμερισμός αυτός ελέγχεται δύσκολα και απέχει πολύ από το να μπορεί χαρακτηριστεί ως ζωντανός.

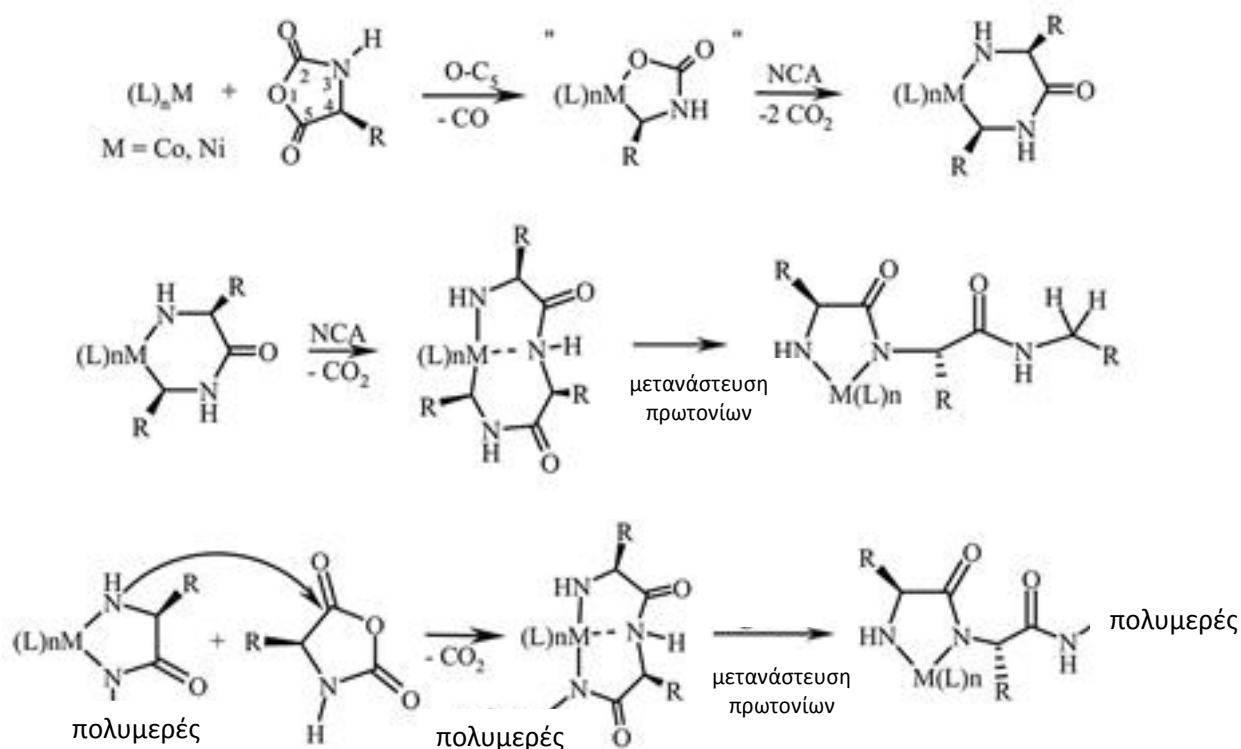
#### 2.3.2.4 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Χρήση Συμπλόκων των Στοιχείων Μετάπτωσης [35-37]

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. Η ερευνητική ομάδα του Deming κατάφερε κάτι τέτοιο προτείνοντας μια νέα σειρά απαρχητών, βασισμένους σε οργανομεταλλικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να περιορίσουν σε σημαντικό βαθμό τις αντιδράσεις τερματισμού. Ειδικότερα, χρησιμοποιώντας σύμπλοκα των στοιχείων μετάπτωσης (κυρίως Ni και Co) ως δραστικά κέντρα, επιτεύχθηκε ο έλεγχος της προσθήκης των μονομερών στα άκρα των αναπτυσσόμενων αλυσίδων. [35-37]

Αναπτύχθηκαν δραστικοί απαρχητές νικελίου και κοβαλτίου μηδενικού σθένους (π.χ.  $\text{bi}py\text{Ni}(\text{COD})$ , όπου  $\text{bi}py=2,2'$ -διπυριδίνη,  $\text{COD}=1,5$ -κυκλοοκταδιένιο, και  $(\text{PMe}_3)_4\text{Co}$ ), οι

οποίοι επιτρέπουν το «ζωντανό» πολυμερισμό των NCAs δίνοντας πολυεπιπέδια υψηλού μοριακού βάρους. Τα μεταλλικά ιόντα μπορούν στη συνέχεια να απομακρυνθούν από τα παραγόμενα πολυμερή με απλή καταβύθιση ή μέσω της διαδικασίας διαπίδυσης (dialysis). Τα σύμπλοκα που χρησιμοποιούνται παρέχουν ενεργά κέντρα που είναι λιγότερο προσβάσιμα λόγω στερεοχημικής και ηλεκτρονιακής παρεμπόδισης, με αποτέλεσμα οι παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας να περιορίζονται. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να παρασκευαστούν ομο- και συμπολυεπιπέδια με σχετικά μικρή κατανομή μοριακών βαρών και ελεγχόμενο μοριακό βάρος.

Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν πάνω στο συγκεκριμένο μηχανισμό, έδειξαν ότι αυτά τα μέταλλα αντιδρούν με τους NCAs, σχηματίζοντας μεταλλοκυκλικά σύμπλοκα, μέσω οξειδωτικής προσθήκης στους δεσμούς του ανυδρίτη. Οι αντιδράσεις οξειδωτικής προσθήκης ακολουθούνται από προσθήκη ενός δεύτερου μορίου NCA για να δώσουν σύμπλοκα, που χαρακτηρίζονται ως εξαμελή αμιδο-αλκυλο μεταλλοκυκλικά. Όμως, έχει βρεθεί ότι με την προσθήκη των NCAs, κάποια στιγμή, οι ενδιάμεσοι εξαμελείς δακτύλιοι μετατρέπονται σε πενταμελείς, λόγω της μετανάστευσης ενός αμιδικού πρωτονίου στον άνθρακα που κάνει δεσμό με το μέταλλο, κάτι το οποίο απελευθερώνει το τέλος της αλυσίδας από το μέταλλο. Η διάδοση γίνεται, με την προσβολή της πυρηνόφιλης αμινομάδας στον ηλεκτρονιόφιλο C(5) του NCA. Η αντίδραση αυτή καταλήγει σε ένα μεταλλοκυκλικό ενδιάμεσο, ενώ συνοδεύεται από ταυτόχρονη απελευθέρωση CO<sub>2</sub>. Με αυτόν τον τρόπο, το μέταλλο μετακινείται σε όλο το μήκος της αναπτυσσόμενης πολυμερικής αλυσίδας, η οποία στο ενεργό της άκρο φέρει μια ισχυρά χηλική ένωση (Σχήμα 14). Ο σχηματισμός αυτών των χηλικών μεταλλοκυκλικών ενδιαμέσων κρίνεται απαραίτητος για να χαρακτηρίζεται «ζωντανός» ένας πολυμερισμός που χρησιμοποιεί μέταλλα μετάπτωσης.



Σχήμα 14: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μεταπτώσεως

Το κυριότερο μειονέκτημα αυτού του μηχανισμού, είναι η παρουσία ιχνών των μετάλλων στα τελικά πολυπεπτιδία, καθιστώντας τα τοξικά και άρα αδύνατο να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικές εφαρμογές. Επιπλέον, ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται μόνο σε μη N-υποκατεστημένους NCAs, καθώς απαιτείται το πρωτόνιο στο 3-N.

### 2.3.2.5 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Χρήση Πρωτοταγών Αμινών και Τεχνικών Υψηλού Κενού

Το 2004, η ερευνητική ομάδα των Iatrou και Hadjichristidis παρουσίασε τον πρώτο «ζωντανό πολυμερισμό» των NCAs, χρησιμοποιώντας πρωτοταγείς αμίνες ως απαρχητές ROP και τεχνικές υψηλού κενού (HVT).[38] Η αναγκαιότητα αυτών των τεχνικών οφείλεται στην ευαισθησία των απαρχητών 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.

Η τεχνική του υψηλού κενού, αντιμετωπίζει επαρκώς όλες εκείνες τις αδυναμίες του μηχανισμού NAM που προαναφέρθηκαν. 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. Συνεπώς, ο ενδεδειγμένος καθαρισμός των μονομερών κρίνεται απαραίτητος και είναι δυνατό να επιτευχθεί τηρώντας αυστηρά τα πρωτόκολλα καθαρισμού για όλα τα επιμέρους αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεσή τους. Οι περισσότεροι NCAs βρίσκονται σε στερεή μορφή και απαιτούν προσεκτικές επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις υπό κενό για τον καθαρισμό τους, οι οποίες πρέπει να προηγούνται του πολυμερισμού. Μετά το πέρας της αντίδρασης, σύμφωνα με τα παραπάνω, κρίνεται αναγκαία η ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου υδροχλωρίου αλλά και του τριφωσγενίου, που δεν αντέδρασε με το πρόδρομο αμινοξύ, γεγονός που επιτυγχάνεται με τη χρήση του υψηλού κενού.

Επιπλέον, με την χρήση υψηλού κενού επιτυγχάνεται η συνεχής απομάκρυνση του παραγόμενου CO<sub>2</sub>, οδηγώντας την αντίδραση του πολυμερισμού προς τα προϊόντα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιαμέσου. Λόγω της μικρής διαλυτότητας του διοξειδίου του άνθρακα σε διαλύτες όπως το DMF, η αποκαρβοξυλίωση του καρβαμιδικού οξέος δεν συμβαίνει ακαριαία, με αποτέλεσμα ορισμένα ενεργά κέντρα να παραμένουν όπως είναι και άλλα να δημιουργούν άλατα με τις ενεργές αμινομάδες. Και στις δυο περιπτώσεις οι δομές που δημιουργούνται είναι απενεργοποιημένες, και οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού και σε μη ολοκληρωμένο πολυμερισμό. Με την χρήση ειδικών αντιδραστήρων πολυμερισμού, με όγκο τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερο από το εκλουόμενο διοξείδιο του άνθρακα, αποφεύγεται ο σχηματισμός καρβαμιδικών αλάτων με τα αμινοτελικά άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, λόγω της γρηγορότερης αποκαρβοξυλίωσης που συμβαίνει στο σύστημα.

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. Επίσης μέσω αυτής της τεχνικής μπορούν να συντεθούν πολυπεπτιδικά πολυμερή από μία πληθώρα μονομερών που διαθέτουν πολύπλοκη μακρομοριακή αρχιτεκτονική (συμπολυμερή, αστεροειδή αλλά και υβριδικά πολυπεπτιδικά). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η παρούσα πειραματική μελέτη βασίστηκε πάνω στην τεχνική του υψηλού κενού και στην εφαρμογή

της στο πεδίο των πολυεπετιδίων. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί επίσης και ορισμένες πιο πρόσφατες αλλά λιγότερο διαδεδομένες μεθοδολογίες για τη σύνθεση πολυεπετιδικών δομών, όπως ο πολυμερισμός με χρήση τριμεθυλοπυριτικών αμινών ή με χρήση υδροχλωρικών αλάτων πρωτοταγών αμινοτελικών μακροαπαρχητών (μέθοδος Schlaad), που ουσιαστικά αποτελούν παραλλαγές των μηχανισμών που αναλύθηκαν.

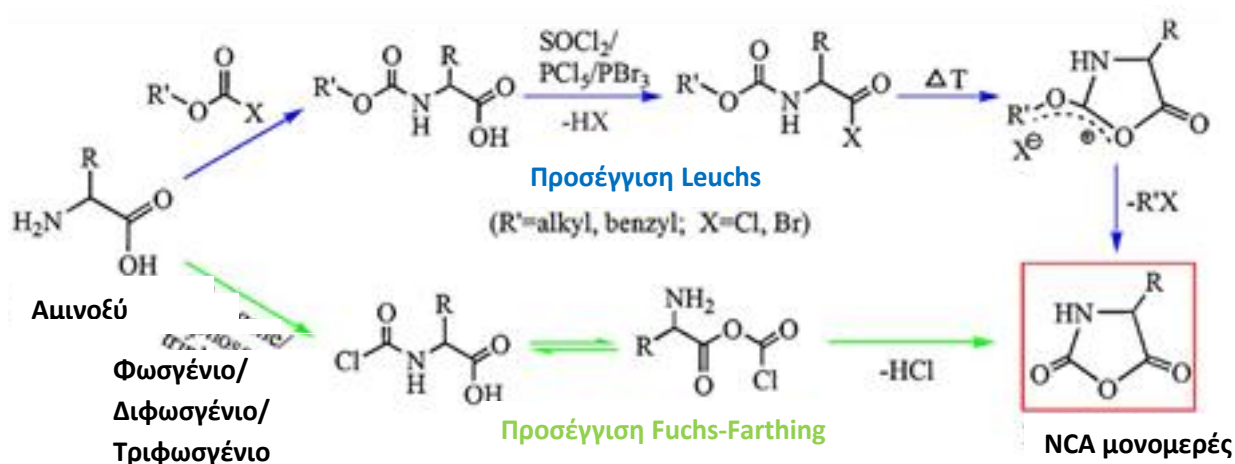
#### **2.4 Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των $\alpha$ -Αμινοξέων (NCAs) [19], [39]**

Οι N-καρβοξυ ανυδρίτες των  $\alpha$ -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 πολυεπετίδιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος, περιλαμβάνει την αντίδραση κυκλοποίησης των προστατευμένων N-αλκοξυκαρβονυλοαμινο-αλογονιδίων, υπό παρατεταμένη θερμοκρασία 70-90 °C (Σχήμα 15). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες μπορεί να πραγματοποιηθεί αποσύνθεση των NCAs και διάνοιξη του δακτυλίου [39], [40].

Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια, με τα οποία θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η δημιουργία του αλογονιδίου οξέος. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο ( $\text{SOCl}_2$ ) 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 ( $\text{PBr}_3$ ). 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.

Ωστόσο, η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την προετοιμασία των NCAs, είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον Fuchs 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” [41], [42]. 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 15). 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.

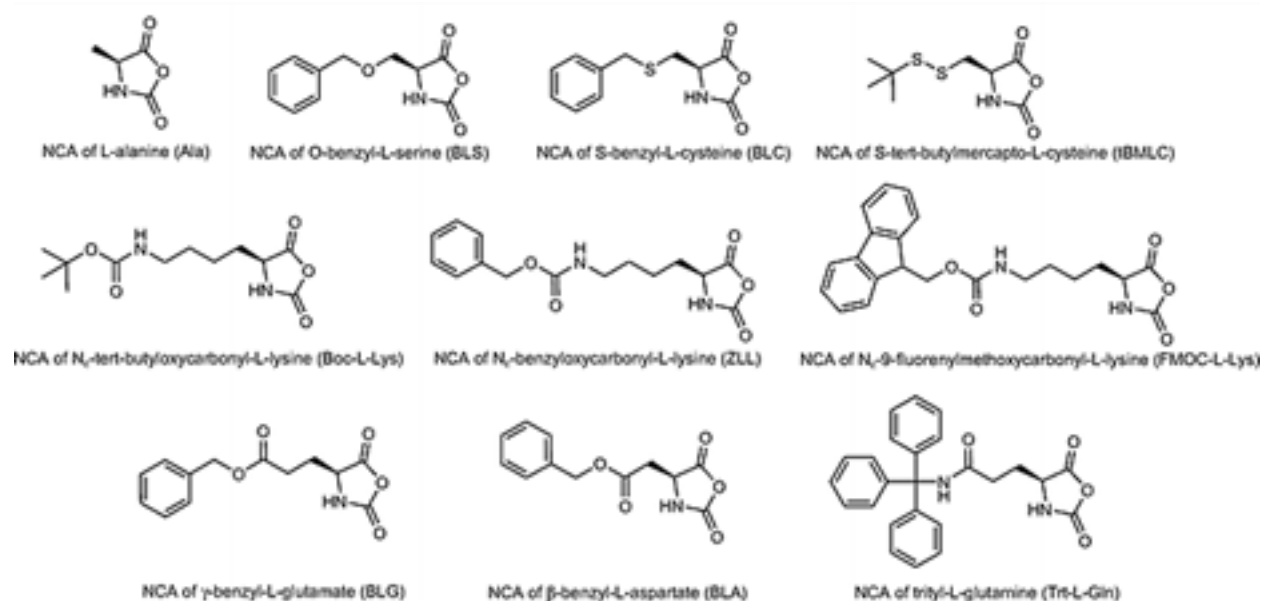


Σχήμα 15: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών

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 πρωτονώνει 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 διάνοιξη του σε αυξημένες συγκεντρώσεις HCl. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται βάσεις (όπως η Et<sub>3</sub>N), 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, ορισμένοι εκ των οποίων παρατίθενται στην Εικόνα 10 [43]. 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.



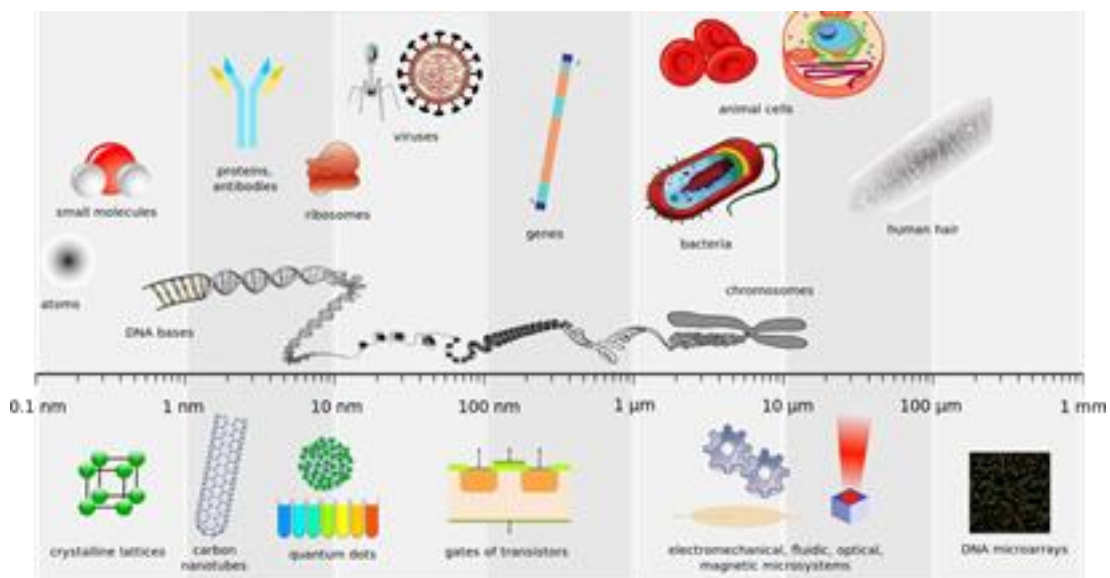
Εικόνα 10: Χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά

## 2.5 Νανοτεχνολογία και Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων

### 2.5.1 Νανοτεχνολογία και Εφαρμογές της

Με τον όρο «νανοτεχνολογία» περιγράφεται ο τομέας της επιστήμης που αφορά την ανάπτυξη και χρήση υλικών με τα οποία μπορούν να παρασκευασθούν και να χρησιμοποιηθούν συσκευές και προϊόντα τα οποία να έχουν διαστάσεις της τάξης του

δισεκατομμυριοστού του μέτρου (διαστάσεις τάξης μεγέθους μερικών δεκάδων ατόμων), δηλαδή δομές που δεν υπακούουν στους νόμους της Κλασσικής Μηχανικής, αλλά της Κβαντομηχανικής (Εικόνα 11) [44]. Τα νανοσωματίδια και τα νανοϋλικά παρουσιάζουν καινοτόμες ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθός τους. Στην επιστήμη και την τεχνολογία, το πρόθεμα «nano-» (από την ελληνική λέξη νάνος) σημαίνει  $10^{-9}$  (=0.000000001). Ένα νανόμετρο (nm) ισούται με ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου. Στην παρούσα εργασία ο όρος νανοτεχνολογία χρησιμοποιείται ως περιληπτικός όρος, καλύπτοντας τους διάφορους κλάδους νανοεπιστημών που σχετίζονται με την χημεία των πολυμερών.



**Εικόνα 11: Χαρακτηριστικά μεγέθη μορίων, νανοϋλικών και βιολογικών οντοτήτων**

Η νανοτεχνολογία αναφέρεται στην επιστήμη και τεχνολογία που αναπτύσσεται σε κλίμακα μορίων και υπερμοριακών συστημάτων (νανοκλίμακα), καθώς και σε επιστημονικές αρχές και νέες ιδιότητες με στόχο την εις βάθος κατανόηση των λειτουργιών και των δυνατοτήτων της ύλης σε αυτή την κλίμακα μεγέθους. Ταυτόχρονα, με την εξέλιξη και άλλων επιστημών, η νανοτεχνολογία αναμένεται να σημειώσει σημαντική πρόοδο την επόμενη δεκαετία στην ανάπτυξη βιοϊατρικών εφαρμογών, όπως η γονιδιακή θεραπεία, η στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων και η ανακάλυψη νέων καινοτόμων φαρμακευτικών ουσιών.

Η νανοτεχνολογία βρίσκει εφαρμογή σε ένα ευρύ πεδίο επιστημών όπως είναι η ενέργεια, η μικροηλεκτρονική και η μηχανική. Στην παρούσα εργασία θα μελετηθούν οι

βιολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές της.[45]-[47] Συγκεκριμένα, οι τομείς της ιατρικής και φαρμακευτικής που μπορεί να βρει εφαρμογή η νανοτεχνολογία είναι οι ακόλουθοι:

- **Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων (Drug delivery):** Τα οχήματα μεταφοράς φαρμάκων, που το μέγεθος τους βρίσκεται στη νανοκλίμακα, μπορούν: α) να ενισχύσουν τη θεραπευτική ικανότητα ενός φαρμάκου, μειώνοντας τις παρενέργειες, που σχετίζονται με τα ήδη διαθέσιμα φάρμακα, β) να προωθήσουν την επαναδιερεύνηση νέων μοριακών οντοτήτων, που δεν μπορούν να χορηγηθούν απευθείας στον άνθρωπο, λόγω των μη βέλτιστων φαρμακολογικών ιδιοτήτων, που όμως, είναι βιολογικά ενεργές αλλά μέχρι στιγμής θεωρούνται μη αναπτύξιμες [48].
- **Διαγνωστική:** Οι νανο-«αισθητήρες» (όπως νανοσωλήνες άνθρακα ή άλλα νανοσωματίδια), μπορούν να επιτρέψουν τη γρήγορη και αποδοτική ανίχνευση των βιοδεικτών μίας νόσου, με πολύ μεγάλη ευαισθησία και με απαίτηση μικρής ποσότητας δείγματος. Επιπλέον, η νανοτεχνολογία δίνει ελπίδα για την έγκαιρη διάγνωση ιών, βακτηρίων αλλά και καρκινικών κυττάρων.
- **Θεραπευτικές τεχνικές:** Ορισμένα νανοϋλικά, έχουν μοναδικές θεραπευτικές ιδιότητες, που διαφέρουν από τα συνηθισμένα φάρμακα, όπως τα νανοσωματίδια χρυσού που μπορούν να ενισχύσουν την ακτινοθεραπεία, οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα μαγνητικά νανοσωματίδια που μπορούν να προκαλέσουν υπερθερμία και να καταστρέψουν καρκινικά κύτταρα, ή τα νανοσωματίδια αργύρου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες.
- **In vivo απεικόνιση:** Η χρήση μορίων-στοχευμένων «διερευνητών», όπως είναι τα μαγνητικά νανοσωματίδια, μπορεί να παρέχει έγκυρο και ακριβή τρόπο διάγνωσης ασθενειών όπως ο καρκίνος καθώς και δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης μίας νόσου.
- **Βιοϋλικά:** Βιοσυμβατά νανοϋλικά που έχουν πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιατρικά εμφυτεύματα, στην οδοντιατρική ή ως υποκατάστατα οστών και εμφυτεύματα ιστών.

### **2.5.2 Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων μέσω Πολυμερικών Υλικών**

Η τεχνολογία ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών αποτελεί μία από τις ταχύτερα αναπτυσσόμενες επιστημονικές περιοχές, εξαιτίας των πολλαπλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους δοσολογίας. Η μη εκλεκτική κυτταροτοξικότητα που εμφανίζουν τα αντικαρκινικά φάρμακα, που είναι η

αιτία για τις σοβαρές παρενέργειες και τη χαμηλή ποιότητα ζωής των ασθενών, είναι αυτή που οδήγησε να στραφούν οι ερευνητές στη δημιουργία «μορίων-οχημάτων», που θα μεταφέρουν μία φαρμακευτική ουσία και θα την απελευθερώνουν στοχευμένα στους πάσχοντες ιστούς και κύτταρα [49].

Επιπλέον, όλες οι νέες μοριακές οντότητες που εισάγονται στη φαρμακοβιομηχανία, κρίνονται όχι για την ισχυρή τους δραστικότητα, που είναι και το ζητούμενο, αλλά για τη διαλυτότητά τους στο νερό ή το χρόνο ζωής τους στο αίμα. Αυτό συμβαίνει διότι όσο μεγάλη κι αν είναι η δραστικότητα ενός μορίου, είναι πρακτικά άχρηστη όταν αυτό δεν μπορεί να κυκλοφορήσει στο αίμα. Έτσι, λιγότερο δραστικές ουσίες, αλλά με χαρακτηριστικά που να μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό, προτιμούνται για εξέλιξη και περαιτέρω διερεύνηση. Σε κάθε περίπτωση, υπάρχει πάντα ένα επίπεδο συμβιβασμού, που μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή μη ιδανικών φαρμάκων. Έτσι, η ανάγκη να μεταφέρονται στοχευμένα σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς, φαρμακευτικές ουσίες, ξεπερνώντας τα εμπόδια που βάζει ο οργανισμός σε οτιδήποτε ξένο προς τον ίδιο, αποτέλεσε το κίνητρο για την εκτενή έρευνα στο πεδίο που ονομάζεται “drug delivery”. Οι νανοφορείς φαρμάκων μακράς κυκλοφορίας χρησιμοποιούνται για να διατηρήσουν το απαιτούμενο επίπεδο της φαρμακευτικής ουσίας στο αίμα για εκτεταμένα χρονικά διαστήματα με σκοπό την αποτελεσματικότερη δράση του φαρμάκου [50], [51].

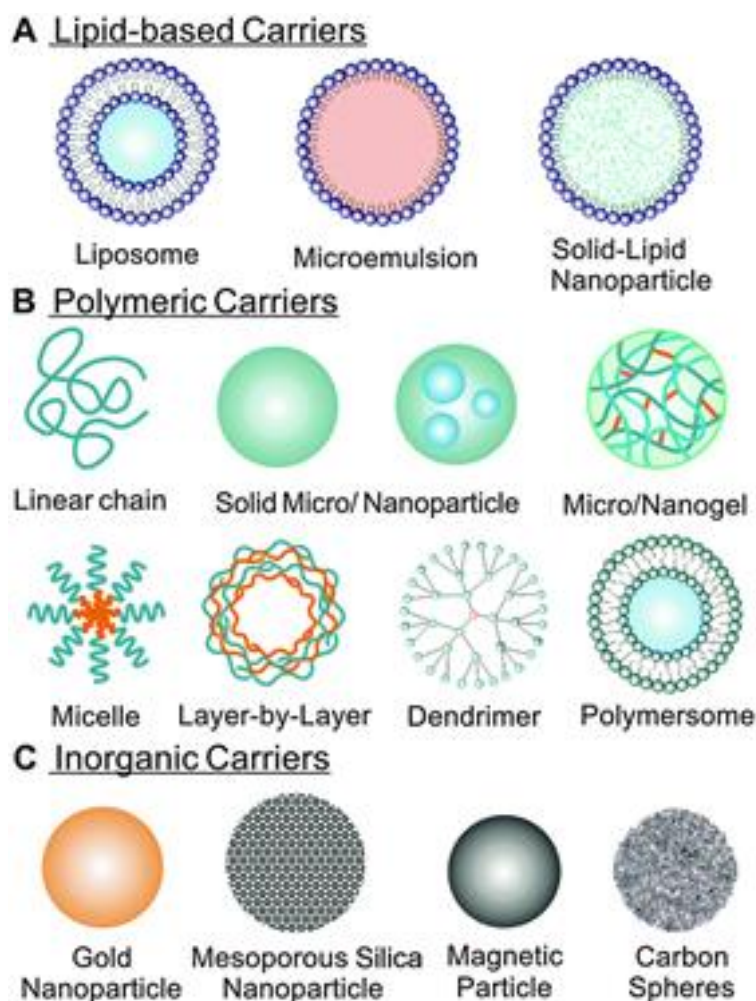
Το 1960 ήταν η πρώτη φορά που περιγράφηκαν τα λιποσώματα, και προτάθηκαν ως μεταφορείς φαρμάκων και πρωτεϊνών. Σήμερα, η νανοτεχνολογία έχει κάνει άλματα στην ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων. Συγκεκριμένα, για το σκοπό αυτό έχουν σχεδιαστεί βιοαποικοδομήσιμα πολυμερικά νανοσωματίδια, πολυμερικά μικκύλια, δενδριμερή κ.ά. Τα νανοσωματίδια ή τα μακρομοριακά συσσωματώματα μακράς κυκλοφορίας όταν διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς, συσσωρεύονται σταδιακά στις παθολογικές θέσεις (καρκινικοί όγκοι, φλεγμονές κλπ) και βελτιώνουν ή ενισχύουν την αποδέσμευση των φαρμάκων στις περιοχές αυτές [52].

Η μεταφορά ενός φαρμάκου μέσω ειδικά σχεδιασμένων υπερμοριακών δομών, επιδιώκει να εξασφαλίσει την αύξηση του χρόνου παραμονής του στο αίμα, τη βελτίωση της διαλυτότητας του όταν πρόκειται για υδρόφοβο φάρμακο, τη μείωση της ανοσογονικότητας και τη μεταφορά του σε συγκεκριμένο στόχο. Η κυκλοφορία των δραστικών ουσιών για μακρό χρονικό διάστημα μπορεί να συντελέσει στην καλύτερη στόχευση, εφόσον αυξάνει τη συνολική ποσότητα του φορέα που συναντά το στόχο και

τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκου και περιοχής δράσης του. Έτσι ο όρος «drug delivery», περιλαμβάνει το σχεδιασμό και τη σύνθεση μορίων με χημικά χαρακτηριστικά τέτοια που να μπορέσουν να τα φέρουν όσο πιο κοντά στο κύτταρο-στόχο, αλλά και να τα καταστήσουν ικανά να εγκλωβίσουν ένα φάρμακο [53].

Για τη βελτίωση της εξειδικευμένης αποδέσμευσης των φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί διάφοροι φορείς, όπως τα λιποσώματα, τα ανόργανα νανοσωματίδια, τα νανοσυσσωματώματα και τα πολυμερικά μικκύλια και κυστίδια (Εικόνα 12) [54]. Πρόσφατα τα πολυμερικά μικκύλια (micelles) αποτέλεσαν το αντικείμενο έντονης ερευνητικής απασχόλησης. Τα μικκύλια είναι δομές της μορφής κορώνα/πυρήνας που συνήθως σχηματίζονται από αμφίφιλα κατά συστάδες πολυμερή και έχουν πάχος μόνο μερικά νανόμετρα, οι οποίες μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο ως “νανομεταφορείς”. Έχουν αναδειχθεί ως δυνητικοί φορείς φαρμακευτικών ουσιών αδιάλυτων στο νερό, εξαιτίας της ικανότητάς τους να εγκλωβίζουν τις ουσίες αυτές στο υδρόφοβο τμήμα τους λόγω χημικής συγγένειας, προστατεύοντας τις με τις εξωτερικές υδατοδιαλυτές πολυμερικές αλυσίδες που διαθέτουν. Η ενσωμάτωση των φαρμάκων στις μικκυλιακές δομές πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της διαπίδυσης (dialysis), με τη μέθοδο της διαλυτοποίησης–εξάτμισης ή μέσω της μεθόδου σχηματισμού λεπτών υμενίων (thin-film) [55].





**Εικόνα 12: Κυριότεροι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών βασισμένοι σε πολυμερικά υλικά και ανόργανα νανοσωματίδια**

Οι μικκυλιακές δομές, ως φορείς φαρμάκων προσφέρουν μερικά πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα. Έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν μη υδατοδιαλυτά φάρμακα, αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα τους και έχουν μικρό σχετικά μέγεθος (έως 200 nm) αποτρέποντας την καταστροφή τους από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι μπορούν να παραμείνουν στο αίμα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα παρέχοντας σταδιακή συσσωμάτωση της δραστικής ουσίας στην επιθυμητή περιοχή. Επιπλέον είναι δυνατό να παρασκευασθούν σε σχετικά μεγάλες ποσότητες εύκολα και επαναλήψιμα. Ωστόσο, η πιο σημαντική εφαρμογή τους είναι η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων χωρίς την εκδήλωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών που μπορεί να εκδηλωθούν στον ανθρώπινο οργανισμό αν αυτά εισαχθούν ελεύθερα στο κυκλοφορικό σύστημα [56], [57].

Τα υλικά που δομούνται από πολυπεπίδια είναι ιδανικά για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, χάρη στη βιοσυμβατότητα και τη βιοαποικοδομησιμότητα τους, την αρχιτεκτονική της δομής τους και διότι είναι ικανά να σχηματίζουν χαρακτηριστικές

δευτεροταγείς δομές. Τα αμφίφιλα πολυπεπτιδικά υλικά μπορούν να αυτο-οργανώνονται, σε μια πληθώρα από διαφορετικές αρχιτεκτονικές μέσα από ετεροπολικές αλληλεπιδράσεις, έχοντας την ικανότητα να εγκλωβίζουν και να μεταφέρουν φάρμακα. Υιοθετώντας συγκεκριμένες διαμορφώσεις, όπως η  $\alpha$ -έλικα ή το  $\beta$ -φύλλο, είναι πιο πιθανό να σχηματίσουν συγκεκριμένες επιθυμητές νανοδομές. Η αυτο-οργάνωση των αμφίφιλων πολυμερών μπορεί να καθοριστεί αν ελεγχθούν παράγοντες όπως η αναλογία των υδρόφοβων-υδρόφιλων συστατικών, το μοριακό βάρος και η χημική φύση των πολυμερών. Μέχρι στιγμής έχει δημοσιευτεί μία σειρά από νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων που βασίζονται στα πολυπεπτίδια, ενώ ήδη πολλά από αυτά τα συστήματα βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές [19], [57].

Υπό διερεύνηση και διαρκή μελέτη βρίσκεται επίσης η ανάπτυξη της μεθοδολογίας έτσι ώστε το τελικό προϊόν σε ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων, να έχει επιπρόσθετα χαρακτηριστικά εκτός από τη βιοσυμβατότητα. Τέτοιες επιθυμητές ιδιότητες είναι να παραμένει σταθερό όταν διαλύεται σε βιολογικά μέσα, να έχει ιδιότητες που το καθιστούν «άορατο» για το ενδοθηλιακό δίκτυο και να κατευθύνεται εκλεκτικά σε συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους [58].

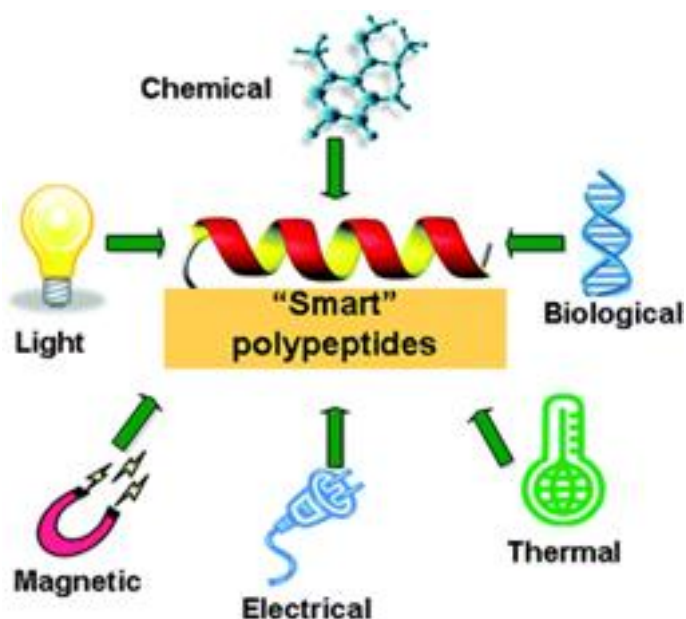
## **2.6 Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε Εξωτερικά Ερεθίσματα [59-61]**

Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη πολυμερών έχει στραφεί σε υλικά τα οποία μπορούν και αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (μεταξύ των οποίων είναι το pH, η θερμοκρασία, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, το φως και η ιοντική ισχύς) και να δημιουργούν πολυμοριακά συσσωματώματα, όπως σφαιρικά και κυλινδρικά μικκύλια, κυστιδιακές δομές (vesicles), σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών και «+». Το ενδιαφέρον για αυτά τα πολυμερή έχει αυξηθεί σημαντικά λόγω των δυναμικών εφαρμογών στη βιομηχανία των χρωμάτων, των καλλυντικών, τον καθαρισμό του νερού, αλλά κυρίως στο πεδίο της βιοϊατρικής.

Ως αποκρίσιμα σε εξωτερικά ερεθίσματα ορίζονται τα πολυμερή που υφίστανται σημαντικές και άμεσες φυσικές ή χημικές μεταβολές αποκρινόμενα σε μικρές εξωτερικές αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών. Σε αυτά τα πολυμερή έχουν δοθεί διάφορες ονομασίες όπως αποκρίσιμα, έξυπνα και περιβαλλοντικά ευαίσθητα (ενώ στα αγγλικά επικρατεί ο όρος “stimuli-responsive”). Αυτά τα συστήματα αναγνωρίζουν κάποιο

ερέθισμα ως σήμα, κρίνουν το μέγεθος του σήματος και μεταβάλουν τη διαμόρφωση της αλυσίδας με άμεση απόκριση. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την απόκριση των πολυμερών και μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως χημικά είτε ως φυσικά. Τα χημικά ερεθίσματα, όπως το pH και η ιοντική ισχύς, αλλάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων ή μεταξύ των αλυσίδων και του διαλύτη σε μοριακό επίπεδο. Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και η μηχανική τάση, επηρεάζουν τους θερμοδυναμικούς παράγοντες (ενθαλπία και εντροπία) και μεταβάλουν τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Η μεγάλη ποικιλομορφία των πλευρικών ομάδων των πολυπεπτιδίων, τα καθιστά άριστα πολυμερή που διαθέτουν την ικανότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Για το λόγο αυτό βρίσκουν τεράστια απήχηση σε εφαρμογές που απαιτείται η χρήση «έξυπνων» αποκρινόμενων υλικών, επιλέγοντας αντίστοιχα αμινοξέα που να εξυπηρετούν τις εκάστοτε ανάγκες (Εικόνα 13).

Αυτές οι αποκρίσεις των πολυμερικών και ειδικότερα των πολυπεπτιδικών συστημάτων είναι πολύ χρήσιμες σε βιολογικές εφαρμογές, όπως στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, στη βιοτεχνολογία και στη χρωματογραφία. Επιπλέον, ορισμένα πολυμερικά συστήματα έχουν την ικανότητα να είναι πολλαπλά αποκρίσιμα (multi-stimuli responsive), καθώς συνδυάζουν την αποκρισημότητα σε δυο ή περισσότερα εξωτερικά ερεθίσματα, για παράδειγμα είναι θερμο-ευαίσθητα αλλά και αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH. Από την άλλη μεριά, υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν την ταυτόχρονη επιβολή δύο ερεθισμάτων ώστε να υπάρξει απόκριση από το προς μελέτη πολυμερές. Μία καινούργια κατηγορία εξωτερικού ερεθίσματος που συναντάται στη βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια, θεωρείται το βιοχημικό ερέθισμα, το οποίο περιλαμβάνει απόκριση σε αντιγόνα, ένζυμα, υποκαταστάτες ή/και βιοχημικούς παράγοντες.



Εικόνα 13: Τα κυριότερα εξωτερικά ερεθίσματα που προκαλούν απόκριση στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες

### 2.6.1 pH-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων

Είναι γνωστό ότι οι τιμές του pH διαφέρουν σε διαφορετικούς ιστούς και διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι περισσότεροι καρκινικοί ιστοί, καθώς είναι ιστοί που φλεγμαίνουν, παρουσιάζουν διαφορετικό pH από αυτό που έχουν οι φυσιολογικοί ιστοί. Συνήθως το pH των καρκινικών κυττάρων είναι όξινο και αρκετά χαμηλότερο του φυσιολογικού. Συγκεκριμένα, το pH στο εξωτερικό περιβάλλον ενός καρκινικού κυττάρου είναι περίπου 6.5, συνεπώς πιο όξινο από τους γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς που έχουν pH 7.4. Ενώ το pH μέσα σε ένα καρκινικό κύτταρο, και συγκεκριμένα στα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα, είναι 5.0 έως 5.5, και άρα πιο χαμηλό σε σχέση με το pH του κυτοσολίου. Συνεπώς έχει μεγάλη πρακτική σημασία να ληφθεί αυτός ο παράγοντας υπόψη για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων που θα αποκρίνονται στις αλλαγές του pH. Δηλαδή, πιθανώς θα παρουσιάζουν αύξηση του μεγέθους τους σε συγκεκριμένη τιμή pH, ώστε να αποδεσμεύουν σε συγκεκριμένο σημείο του σώματος το φάρμακο που μεταφέρουν [62-64].

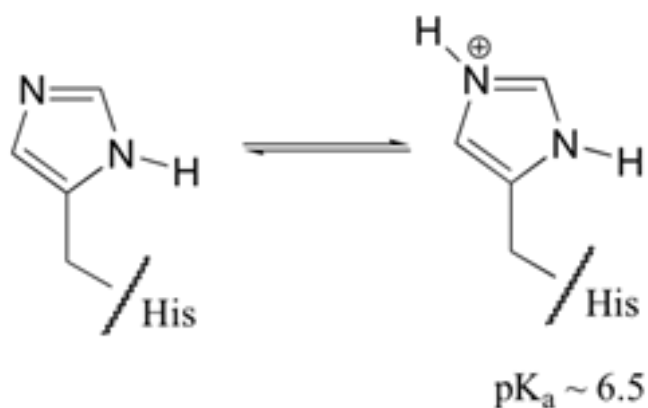
Τα πολυπεπτιδικά που εμφανίζουν ευαισθησία στο pH αποτελούνται από μονομερή των οποίων οι πλευρικές ομάδες μπορούν να ιονιστούν, δηλαδή έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν ή να παρέχουν πρωτόνια σε εξάρτηση με τη μεταβολή του pH. Καθώς το pH αλλάζει, ο βαθμός ιοντισμού του πολυμερούς αλλάζει δραματικά γύρω από μια

συγκεκριμένη τιμή pH, που ονομάζεται pKa και δίδεται από τον αρνητικό λογάριθμο της σταθεράς ισορροπίας ασθενούς οξέος ( $pKa = -\log Ka$ ). Αυτή η γρήγορη εναλλαγή στο συνολικό φορτίο της αλυσίδας προκαλεί μεταβολή του υδροδυναμικού όγκου των πολυμερικών αλυσίδων. Η μετάβαση από συρρικνωμένη σε πλήρως εκτεταμένη διαμόρφωση ερμηνεύεται από την οσμωτική πίεση που προκαλούν τα αντισταθμιστικά ιόντα των φορτίων των αλυσίδων.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ένας μεγάλος αριθμός pH-αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών νανοσυστημάτων, τα οποία συντίθενται από πολυμερή που φέρουν ασθενώς όξινες ομάδες (π.χ. καρβοξυλικές) ή ασθενώς βασικές (π.χ. αμινομαδές), και μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως δέκτες είτε ως δότες πρωτονίων (ή ως συνδυασμός των δύο). Οι μεταβολές του pH του περιβάλλοντος προάγουν την πρωτονίωση-αποπρωτονίωση των πολυπεπτιδίων που διαθέτουν αμινομαδές ή καρβοξυλικά οξέα στην πλευρική τους αλυσίδα. Τα πολυπεπτίδια οδηγούνται σε αντιστρεπτές μεταβολές στη διαμόρφωσή τους και στη συμπεριφορά της αυτο-οργάνωσής τους, κατά συνέπεια και της διαλυτότητας και της συσσωμάτωσής τους. Το πολυ( $\gamma$ -βενζυλο-L-γλουταμικό οξύ) και η πολυ(L-λυσίνη) έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε pH-αποκρινόμενα συστήματα, ενώ εξέχουσα θέση κατέχει η πολυ(L-ιστιδίνη) (PHis), η οποία διαθέτει έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο ανά δομική μονάδα που μπορεί να πρωτονιώνεται και να αποπρωτονιώνεται [59], [63].

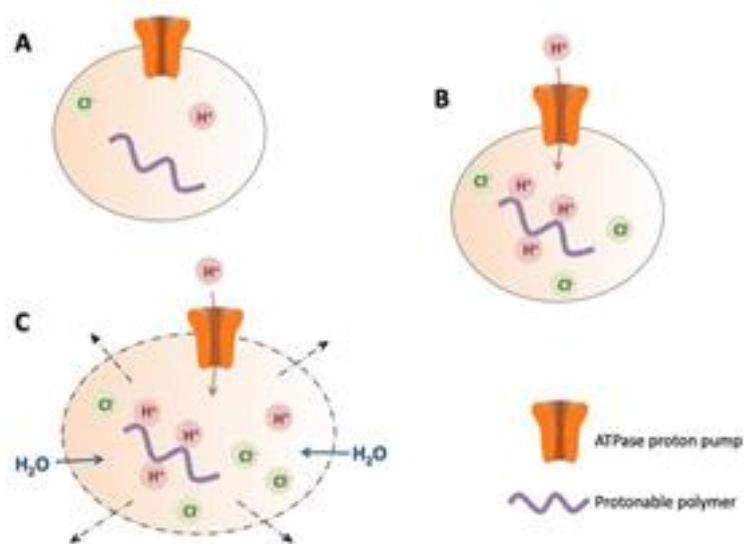
Η L-ιστιδίνη ως αμινοξύ παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον, καθώς το πολυμερές της αποτελεί ιδανικό πολυπεπτίδιο ως συστατικό σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η ξεχωριστή ιδιότητα που διαθέτει είναι το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων στο μη υποκατεστημένο άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου, το οποίο προσδίδει στο μόριο  $pKa \approx -6.5$  και κατά συνέπεια pH-αποκρισιμότητα. Πρακτικά, αυτό για ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων σημαίνει ότι σε  $pH \approx -6.5$ , 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 (Σχήμα 17). Αντίθετα, στους υγιείς ιστούς που έχουν τιμή  $pH = 7.4$  το μόριο είναι αποπρωτονιομένο (υδρόφοβο) και απολύτως σταθερό. Επιπλέον, η πολυ(L-ιστιδίνη) μπορεί να φτιάχνει σταθερά πολυϊοντικά συμπλέγματα, με αρνητικά φορτισμένα μόρια όπως είναι το DNA ή διάφορα ένζυμα, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Το γεγονός ότι σχηματίζει μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, την κάνει ένα ιδανικό μέσο για να χρησιμοποιηθεί σε

βιολογικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς. Για τους παραπάνω λόγους, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να συντεθούν πολυμερή βασισμένα στην PHis, που προκύπτουν από το μονομερές Trt-His-NCA, και έγινε προσπάθεια για δικτύωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων προς σχηματισμό ανώτερων σταθερών μικκυλιακών δομών [63], [65].



**Σχήμα 17: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης)**

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 ενδοκύττωσης 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 ωσμωτική πίεση, οδηγεί σε διόγκωση και τελικά σε ρήξη των ενδοσωμάτων, απελευθερώνοντας όλο το περιεχόμενο στο κυτοσόλιο (Εικόνα 14) [66].



Εικόνα 14: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα ("proton sponge effect")

### 2.6.2 Θερμο-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων

Τα θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή παρουσιάζουν μεταβολές των διαστάσεων τους σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία είναι γνωστή ως θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου (volume phase transition temperature, VPTT), όπου προκαλείται ξαφνική αύξηση ή μείωση του μεγέθους του σωματιδίου. Επιπλέον, απαιτείται η θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου των πολυμερικών νανοσωματιδίων να είναι μεγαλύτερη από τη φυσιολογική θερμοκρασία του οργανισμού (37 °C), όπως η θερμοκρασία που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα που φλεγμαίνουν (41 °C), έτσι ώστε τα κύτταρα αυτά να αποτελέσουν στόχο [59].

Χαρακτηριστικά παραδείγματα θερμο-αποκρινόμενων πολυπεπτιδίων, αποτελούν μία σειρά από αμφίφιλα υβριδικά συμπολυμερή που συντέθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Jeong, του γενικού τύπου πολυ(αιθυλενοξειδίο)-*b*-πολυ(αλανίνη-co-φαινουλαανίνη), πολυ(αιθυλενοξειδίο)-*b*-πολυ(φαινουλαανίνη) και πολυ(αιθυλενοξειδίο)-*b*-πολυ(αλανίνη) [67], [68]. Από τις συγκεκριμένες μελέτες βρέθηκε ότι οι δομές αυτές υφίστανται μεταβολή από διάλυμα σε gel, με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η συσσωμάτωση των μικκυλίων και η αλλαγή της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων, είναι πιθανώς οι λόγοι που οδηγούν σε αυτή τη μετατροπή. Η εμφάνιση τέτοιων ιδιοτήτων σε συστήματα πολυπεπτιδίων, αποτέλεσε έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη μιας πληθώρας συστημάτων. Πρόσφατα παρατηρήθηκαν αντίστοιχες ιδιότητες θερμοαποκρισιμότητας

σε πολυμερή του τύπου πολυ(αιθυλενοξειδίο)-*b*-πολυ(τυροσίνη), από την ερευνητική ομάδα του Heise [69].

### **2.6.3 Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε Οξειδοαναγωγικούς Παράγοντες**

Πέρα από τη βιοσυμβατότητα, από τις βασικότερες απαιτήσεις, είναι η σταθερότητα του συστήματος μεταφοράς μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Εάν ένα σύστημα δεν είναι σταθερό στα βιολογικά υγρά, υπάρχει πιθανότητα να οδηγηθεί σε απελευθέρωση του φορτίου του συστήματος (στην συγκεκριμένη περίπτωση του φαρμάκου) σε περιοχές μακριά από τον επιθυμητό στόχο. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος αύξησης της σταθερότητας ενός πολυμερικού συστήματος μεταφοράς φαρμάκων είναι η δικτύωση (cross-linking).

Τα νανοσωματίδια μπορούν να είναι δικτυωμένα, είτε στον πυρήνα, είτε στο κέλυφός τους, ή και στα δύο. Τα νανοσωματίδια που είναι δικτυωμένα και στο κέλυφος, ουσιαστικά ενισχύουν ακόμα περισσότερο τη σταθερότητα του συστήματος, σχηματίζοντας ένα διπλό αμυντικό σύστημα. Η δικτύωση μπορεί να επιτευχθεί είτε χρησιμοποιώντας μικρά μόρια μέσω των οποίων δημιουργείται το δίκτυο, είτε προκαλώντας τη δικτύωση μέσω UV ακτινοβολίας σε συγκεκριμένα συστήματα που έχουν αυτή τη δυνατότητα. Βέβαια, υπάρχουν και ορισμένα μειονεκτήματα που συνδέονται με τη δικτύωση, όπως είναι η περιπλοκότητα των τρόπων με τους οποίους λαμβάνει χώρα, όσο και η αποδοτικότητα της αντίδρασης [70].

Μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους δικτύωσης είναι η χρήση δισουλφιδικών δεσμών. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί (S–S), είναι ομοιοπολικοί δεσμοί, οι οποίοι προκύπτουν από την οξειδωση δύο σουλφυδριλομάδων (ή θειόλες, –SH). Τα δύο βασικότερα χαρακτηριστικά αυτού του δεσμού, που τον καθιστούν ελκυστικό για πολλά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, είναι η υψηλή σταθερότητά του στο πλάσμα του αίματος και η αναστρεψιμότητά του. Τα δικτυωμένα συστήματα που φέρουν δισουλφιδικούς δεσμούς, καθίστανται αυτόματα αποκρίσιμα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες (redox-responsive), λόγω της ιδιότητας των δεσμών αυτών να οξειδώνονται και να ανάγονται ανάλογα τις συνθήκες που επικρατούν [71].

Στην περίπτωση των «έξυπνων» συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, βασικός στόχος είναι οι δισουλφιδικοί δεσμοί να ανάγονται και συνεπώς να καταστρέφονται, μέσα ή



κοντά στο κύτταρο-στόχο, έτσι ώστε να επηρεαστεί η αυτο-οργάνωσή τους και να απελευθερώσουν εκλεκτικά το φάρμακο στη συγκεκριμένη περιοχή [72], [73].

Είναι γνωστό ότι στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχει η γλουταθειόνη (GSH), ένα τριπεπτίδιο, το οποίο ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, δηλαδή τους μετατρέπει στις αντίστοιχες θειόλες. Η γλουταθειόνη βρίσκεται σε αμελητέα συγκέντρωση στο αίμα (της τάξης των 1-2  $\mu\text{M}$ ), ενώ μέσα στον ενδοκυττάριο χώρο η συγκέντρωση της γλουταθειόνης είναι πολύ μεγαλύτερη (της τάξης των 10 mM). Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι στα καρκινικά κύτταρα η συγκέντρωση αυτή είναι ακόμη μεγαλύτερη (10-20 mM). Κάτι τέτοιο εξασφαλίζει ότι εφόσον το σύστημα προσεγγίσει τα καρκινικά κύτταρα-στόχους, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης της γλουταθειόνης στο εσωτερικό τους, θα αποικοδομηθεί και θα απελευθερώσει το φάρμακο [65], [74].

Τα τελευταία χρόνια έχει παρουσιαστεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον σχεδιασμό και στη σύνθεση πολυπεπτιδίων που μπορούν να οξειδώνονται ή να ανάγονται, ανάλογα με τον αντίστοιχο παράγοντα που υπάρχει στο χημικό περιβάλλον τους. Τα πολυπεπτίδια αυτά φέρουν συνήθως δισουλφιδικούς δεσμούς είτε στην κύρια αλυσίδα, είτε στην πλευρική, είτε πραγματοποιείται συμπολυμερισμός με μόρια που έχουν ήδη στη δομή τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Αντίστοιχα, χαρακτηριστικά παραδείγματα cross-linker σε κάθε περίπτωση είναι η χρήση του μορίου κυσταμίνης [75], η σύνθεση πολυπεπτιδίων βασισμένων στην πολυ(L-κυστεΐνη) ή την πολυ(L-κυστίνη) [76] και ο συμπολυμερισμός μέσω μακροαπαρχητή πολυ(αιθυλενοξειδίου) που φέρει δισουλφιδικούς δεσμούς (PEO-SS-NH<sub>2</sub>) [77].

## **2.7 Τεχνικές Μοριακού Χαρακτηρισμού**

Το κεφάλαιο αυτό αναφέρεται στην κατανόηση των βασικών αρχών των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των μορίων και των υπερμοριακών δομών που συντέθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ειδικότερα πρόκειται να αναλυθούν οι τεχνικές της φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), του κυκλικού διχρωϊσμού (CD)

### 2.7.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC)

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

Η ανίχνευση των εκλούμενων μορίων πραγματοποιείται με κατάλληλο ανιχνευτή που βρίσκεται στην έξοδο των στηλών. Οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές βασίζονται στη μέτρηση της σκέδασης φωτός σε μικρές γωνίες, του ιζώδους του διαλύματος, των διαφορών στο δείκτη διάθλασης και τέλος στη μέτρηση των μεταβολών στην

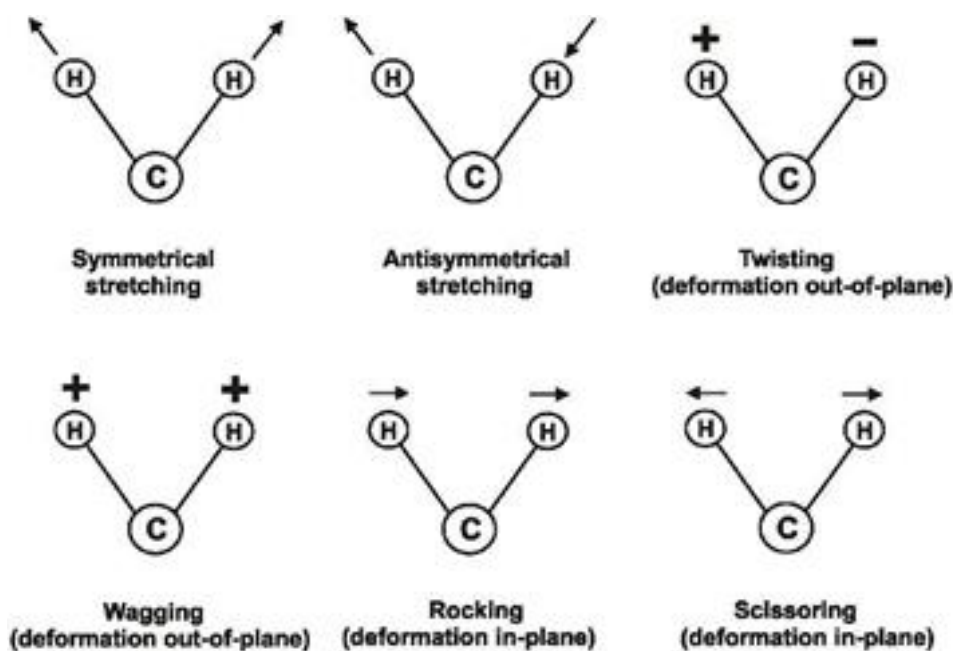
απορρόφηση των συστατικών του διαλύματος σε μήκη κύματος στην περιοχή του υπεριώδους (UV – Vis), εφόσον το πολυμερές απορροφά σε αυτή την περιοχή.

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

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

### **2.7.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (Infrared Spectroscopy, IR) [78], [79]**

Η υπέρυθη φασματοσκοπία (IR) θεωρείται σημαντική φασματοσκοπική τεχνική στην Οργανική Χημεία, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Στην περιοχή υπέρυθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ( $\lambda=0.7 \mu\text{m}-1000 \mu\text{m}$ ) πραγματοποιούνται απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις ή κάμψεις των δεσμών των μορίων για ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή, που μεταβάλλεται κατά την παραμόρφωση του μορίου και απορροφούν ισχυρά στην περιοχή υπέρυθρου. Εκτός από τις δονήσεις και τις κάμψεις υπάρχουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting) ή κάνει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), κ.λπ. (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών ενός μορίου

Όλα τα μόρια διαθέτουν κάποια συγκεκριμένη ποσότητα ενέργειας κατανεμημένη σε όλη τη δομή τους, που προκαλεί στους δεσμούς δονήσεις (επιμηκύνσεις) και κάμψεις. Ταυτόχρονα λόγω της ενέργειας αυτής, τα άτομα πάλλονται και περιστρέφονται, ενώ παρατηρούνται και διάφορες άλλες μοριακές δονήσεις, όπως αυτές που προαναφέρθηκαν. Η ποσότητα της ενέργειας που περιλαμβάνει ένα μόριο δεν μεταβάλλεται κατά συνεχή τρόπο, αλλά είναι κβαντισμένη. Δηλαδή ένα μόριο μπορεί να επιμηκύνεται, να πάλλεται ή να κάμπτεται σε συγκεκριμένες συχνότητες που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα ενεργειακά επίπεδα. Στην πραγματικότητα οι δεσμοί συνεχώς δονούνται και κάμπτονται, με συνέπεια το μήκος τους να αυξάνεται και να μειώνεται ανάλογα. Έτσι ένας δεσμός που συνδέει δύο άτομα, στην πραγματικότητα πάλλεται σαν ελατήριο.

Όταν το μόριο δέχεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφάται ενέργεια μόνο στην περίπτωση που η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίδια με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δυο δονητικών συχνοτήτων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίση με εκείνη της ακτινοβολίας, αυξάνει το πλάτος της. Με άλλα λόγια, το «ελατήριο», που συνδέει τα δυο άτομα διαδοχικά, εκτείνεται και συμπιέζεται λίγο περισσότερο. Εφόσον κάθε συχνότητα που απορροφάται από ένα μόριο, αντιστοιχεί σε μια προκαθορισμένη μοριακή κίνηση μπορούν να διαπιστωθούν τις κινήσεις του μορίου, μελετώντας το φάσμα υπερέυθρου. Από την ερμηνεία αυτών των κινήσεων, μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί και κατά συνέπεια ποιες λειτουργικές ομάδες υπάρχουν στην προς μελέτη ένωση. Οι δονήσεις των

χαρακτηριστικών ομάδων μίας ένωσης είναι ανεξάρτητες της υπόλοιπης δομής και συνήθως εμφανίζονται σε περιοχές του υπέρυθρου φάσματος όπου δεν απορροφούν οι δονήσεις σκελετού (Πίνακας 3). Πιο συγκεκριμένα, η υπέρυθη περιοχή από  $4000\text{ cm}^{-1}$  έως  $400\text{ cm}^{-1}$  είναι δυνατό να χωριστεί σε τέσσερα τμήματα:

- Η περιοχή από  $4000\text{ cm}^{-1}$  έως  $2500\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί σε απορροφήσεις που προκαλούνται από δονήσεις επιμήκυνσης (τάσεις) των απλών δεσμών N-H, C-H, και O-H. Οι δεσμοί N-H και O-H απορροφούν στην περιοχή  $3300\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$ , ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα  $3000\text{ cm}^{-1}$ .
- Στην περιοχή  $2500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$  λαμβάνει χώρα η δόνηση επιμήκυνσης (τάση) των τριπλών δεσμών. Στη συγκεκριμένη περιοχή απορροφούν τα νιτρίλια και τα αλκίνια, όπως επίσης και η λειτουργική ομάδα -SH, που παρουσιάζει χαρακτηριστική απορρόφηση στα  $2565\text{ cm}^{-1}$ .
- Στην περιοχή από  $2000\text{ cm}^{-1}$  έως  $1500\text{ cm}^{-1}$  απορροφούν όλοι οι διπλοί δεσμοί. Οι καρβονυλικές ομάδες απορροφούν γενικά στην περιοχή μεταξύ  $1680$  και  $1750\text{ cm}^{-1}$ , ενώ η επιμήκυνση του δεσμού των αλκενίων εμφανίζεται συνήθως σε μια περιορισμένη περιοχή μεταξύ  $1640$  και  $1680\text{ cm}^{-1}$ .
- Η περιοχή κάτω από τα  $1500\text{ cm}^{-1}$  είναι περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος μίας ένωσης. Σε αυτή την περιοχή εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις που οφείλονται σε μια ποικιλία δεσμών όπως C-C, C-O, C-N, C-X, C-S.

Πίνακας 3: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε  $\text{cm}^{-1}$

Λειτουργική Ομάδα	Περιοχή Απορρόφησης ( $\text{I/cm}$ )			
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 <sub>3</sub>	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			

Στη χημεία των πολυπεπτιδίων η χρήση του IR είναι πολύ σημαντική, τόσο για την ποιοτική εξακρίβωση σύνθεσης του εκάστοτε N-καρβοξυ ανυδρίτη των  $\alpha$ -αμινοξέων (συνήθεις δονήσεις έκτασης στα  $1785 \text{ cm}^{-1}$  και  $1855 \text{ cm}^{-1}$ ) όσο και για την επιτυχή σύνθεση των πολυπεπτιδίων (χαρακτηριστική δόνηση του αμιδικού δεσμού στα  $1650 \text{ cm}^{-1}$ ).

### 2.7.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) [79], [80]

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χρησιμοποιείται ευρέως σχεδόν σε όλους τους κλάδους της χημείας και είναι μία μέθοδος προσδιορισμού της δομής των μορίων, η οποία παρέχει ένα “χάρτη” του ανθρακικού σκελετού και των ατόμων υδρογόνου σε ένα μόριο. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο, διότι με τη βοήθεια της τεχνικής αυτής μπορεί να προσδιοριστεί η στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) καθώς και η γεωμετρική ισομέρεια ενός πολυμερούς, η δομή και η σύσταση των συμπολυμερών, ενώ επίσης πραγματοποιείται μελέτη της κίνησης 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 εμφανίζουν μαγνητικές ιδιότητες




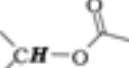





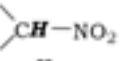

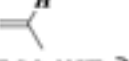
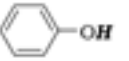
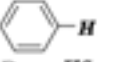
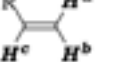
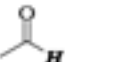
και είναι αδρανείς στα πειράματα NMR (πυρηνικό spin  $I=0$ ). Έτσι, οι πυρήνες πολλών ατόμων ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα ( $I=1/2$ ). Δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο  $B_0$ . Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο και συνεπώς όλοι οι προσανατολισμοί της πυρηνικής μαγνητικής ροπής είναι εκφυλισμένοι ενεργειακά. Όταν, όμως, ένα δείγμα που περιέχει αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, αίρεται ο εκφυλισμός και οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ο πυρήνας μπορεί να διαταχθεί έτσι ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να είναι παράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με κβαντικό μαγνητικό αριθμό spin  $m_I=1/2$ ) ή αντιπαράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με  $m_I=-1/2$ ) προς την κατεύθυνση του εξωτερικού πεδίου. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ειδικότερα, ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού. Στην περίπτωση που οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και μεταβάλλονται οι πληθυσμοί των πυρήνων στις δύο καταστάσεις (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, οι πυρήνες συντονίζονται 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 των μορίων περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν δικά τους 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 ( $B_{\text{πραγ.}}=B_{\text{εφαρμ.}}-B_{\text{τοπικό}}$ ). Περιγράφοντας αυτό το φαινόμενο, συμπεραίνεται 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 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. Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα είναι η διαφορά μεταξύ της συχνότητας συντονισμού του πυρήνα και μιας πρότυπης ουσίας αναφοράς. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο ((CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si, TMS), που έχει δώδεκα ισοδύναμα (δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR συνοψίζονται στον Πίνακα 4.



Πίνακας 4: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  (ppm)

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ $^1\text{H-NMR}$ (ppm)						
$\text{R-CH}_3$	0.8-1.2	Μεθύλιο				
$\text{R-CH}_2\text{-R}$	1.1-1.5	Μεθυλένιο				
$\text{R}_3\text{CH}$	1.4-1.9	Μεθίλιο				
$\text{C}=\text{CH}$	1.5-3.0	Ακραία αλκίνα				
	1.6-1.8	Αλλυλικά μεθύλια				
	0.5-4.0*	Πρωτόνια αμινών				
$\text{R-OH}$	1.0-5.5*	Αλκοολικά υδροξύλια				
$\text{R-SH}$	1.1-1.9*	Αλκυλοθειόλες				
	2.0-3.6	$\alpha$ -Καρβονυλικά πρωτόνια		3.7-5.4		Εστερικά αλκύλια
	2.0-3.2	$\alpha$ -Πρωτόνια θειολών	$\text{A-CH}_2\text{-Cl}$	-3.5 (A=R), -4.5 (A=Ar)		Χλωρίδια
	2.2-3.0	Βενζυλικά πρωτόνια	$\text{A-CH}_2\text{-Br}$	-3.4 (A=R), -4.4 (A=Ar)		Βρωμίδια
	2.2-3.6	$\alpha$ -Πρωτόνια Αμινών	$\text{A-CH}_2\text{-I}$	-3.2 (A=R), -4.4 (A=Ar)		Ιωδιδια
	2.7-4.2	Αρωματικές θειόλες	$\text{A-CH}_2\text{-F}$	-4.3 (A=R), -5.3 (A=Ar)		Φθορίδια
	3.3-4.3	Αιθερικά πρωτόνια		4.2-4.7		Νιτροαλκάνια
	3.5-4.0*	$\alpha$ -Πρωτόνια Αλκοολών		4.5-6.0		Βινυλικά πρωτόνια
			$\text{RCO-NHR}$ $\text{RCONH}_2$	5.0-8.0		Αμιδικά πρωτόνια
				5.0-8.0*		Φαινολικά υδροξύλια
				6.8-7.8		Αρωματικά πρωτόνια
				$\text{H}^a$ : 4.0-6.6 $\text{H}^b$ : 3.8-6.2 $\text{H}^c$ : 5.2-7.3		Βινυλικά πρωτόνια
			$\text{RCOOH}$	10-13*		Καρβοξυλικά οξεία
				9.0-10.1		Αλδεϋδικά πρωτόνια

\* Αφορούν σε ανταλλάξιμα πρωτόνια

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι κάθε διαφορετικός πυρήνας (π.χ.  $^1\text{H}$ ) θα σχηματίζει μία απλή κορυφή. Ωστόσο, συχνό φαινόμενο αποτελεί η απορρόφηση ενός πυρήνα να διασπάται σε πολλαπλές κορυφές. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους κορυφών σε μία πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης (J). Η σταθερά σύζευξης είναι ίδια και για τους δύο πυρήνες, τα spin των οποίων συζεύγνυνται και δεν εξαρτάται από την ισχύ πεδίου του φασματοφωτομέτρου. 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 γειτονικούς πυρήνες με spin I=1/2 εμφανίζουν n+1 κορυφές στο φάσμα του NMR. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος  $(1+x)^n$ .

Στη φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  (αλλά όχι στη  $^{13}\text{C-NMR}$ , λόγω του πυρηνικού φαινομένου Overhauser (Nuclear Overhauser Effect, NOE)) το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν τη συγκεκριμένη

κορυφή. Ολοκληρώνοντας, λοιπόν, το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι δυνατό να μετρηθεί ο σχετικός αριθμός 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 φασματοφωτομέτρων 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.

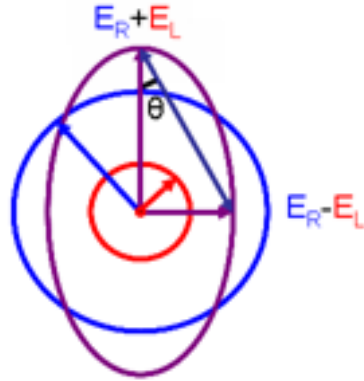
#### **2.7.4 Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD) [81]**

Τα μόρια και ειδικότερα οι πρωτεΐνες (οπτικά ενεργές ενώσεις), απορροφούν κβάντα φωτός, προάγοντας τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερες διεγερμένες καταστάσεις. Το εξερχόμενο φως έχει την ίδια συχνότητα αλλά έχει επιβραδυνθεί, εισάγοντας μια διάφορα φάσης, που είναι ανάλογη της ποσότητας του υλικού.

Στην τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού (CD), μετράται η διαφορά της μοριακής απορροφητικότητας ( $\Delta\epsilon = \epsilon_R - \epsilon_L$ ), κατά την απορρόφηση από την πρωτεΐνη (ή το πολυπεπτίδιο), μίας κυκλικά πολωμένης (αριστερόστροφα ή δεξιόστροφα) μονοχρωματικής ακτινοβολίας φωτός στην περιοχή του far-UV, που οδηγεί σε π-π\* ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Αυτές οι μεταβάσεις αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς των πεπτιδίων (χρωμοφόρα) και επηρεάζονται σημαντικά από την δευτεροταγή δομή τους. Η άνιση απορρόφηση των δύο συνιστώντων ανυσμμάτων οδηγεί το συνιστάμενο άνυσμα να ιχνογραφεί μια έλλειψη. Το εξερχόμενο φως χαρακτηρίζεται ως ελλειπτικά πολωμένο, ενώ το φαινόμενο καλείται κυκλικός διχρωϊσμός (Εικόνα 16). Αποτελεί το άθροισμα της συνεισφοράς των αμινοξέων του πολυπεπτιδίου και της συνεισφοράς από την αναδίπλωση της κάθε αλυσίδας. Μπορεί να μετρηθεί μέσω της ελλειπτικότητας  $\theta$  ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ), που αντιστοιχεί στην γωνία της οποίας η εφαπτομένη ισούται με τον λόγο του μικρού προς τον μεγάλο άξονα της έλλειψης.

$$[\theta] = \tan^{-1} \varepsilon_{R-L} = 3298.2 \cdot (\varepsilon_R - \varepsilon_L)$$

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_R - \varepsilon_L$$

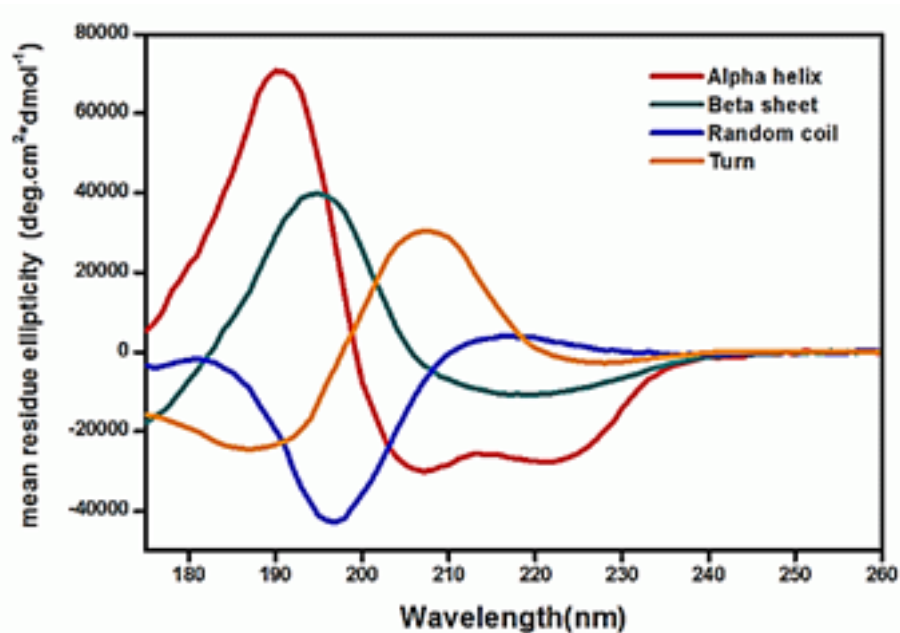


**Εικόνα 16:** Το ελλειπτικά πολωμένο φως (βιολετί) προέρχεται από την άνιση απορρόφηση του δεξιά (μπλε) και αριστερά (κόκκινο) κυκλικά πολωμένου φωτός.

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

$$CD = \Delta A = A_L - A_R = \Delta\varepsilon \cdot C \cdot l,$$

όπου  $C$  είναι η μοριακή συγκέντρωση και  $l$  το μήκος της κυψελίδας σε cm. Από τα παραπάνω μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι οι έννοιες του κυκλικού διχρωϊσμού και της ελλειπτικότητας είναι ισοδύναμες, καθώς όταν υπάρχει εκλεκτική απορρόφηση του ενός συστατικού του  $E$  (δηλ.  $CD = A_L - A_R \neq 0$ ) οι δύο εντάσεις δεν παραμένουν ίσες και επομένως η ακτίνα καθίσταται ελλειπτικά πολωμένη. Έτσι, αν και οι σύγχρονοι διχρωγράφοι μετρούν διαφορές απορρόφησης, είναι κοινή πρακτική να εκφράζεται ο κυκλικός διχρωϊσμός σε μονάδες ελλειπτικότητας, millidegrees ( $1 \text{ mdeg} = 3.3 \cdot 10^{-5} \text{ a.u.}$ ). Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού προκύπτει από την ενδο- ή διαμοριακή ασυμμετρία μίας μοριακής δομής. Οι χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των τριών συνηθέστερων διαμορφώσεων μίας πολυπεπτιδικής δομής ( $\alpha$ -έλικα,  $\beta$ -φύλλο και τυχαίο σπείραμα) δίνονται σχηματικά στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17: Φάσμα κυκλικού διχρωσμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε διαμόρφωση α-έλικας (κόκκινη καμπύλη), β-φύλλου (πράσινη καμπύλη), δομή τυχαίου σπειράματος (μπλε καμπύλη) και στροφής (πορτοκαλί καμπύλη).

Πίνακας 5: Απορροφήσεις των τριών διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στον κυκλικό διχρωσμό.

Διαμόρφωση	ταινία 1 (nm)	ταινία 2 (nm)	ταινία 3 (nm)
α-έλικα	191 (θετική)	208 (αρνητική)	222 (αρνητική)
β-φύλλο	195 (θετική)	217 (αρνητική)	
τυχαίο σπείραμα	197 (αρνητική)	217 (θετική)	

### 2.7.5 Σκέδαση Φωτός (Light Scattering)

Για τον προσδιορισμό των διαστάσεων ενός πολυμερούς σε διάλυμα χρησιμοποιείται η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) [80], [82].

Σε ένα διάλυμα πολυμερούς τα μόριά του βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση που προκαλείται από τη θερμική ενέργεια που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown). Εξαιτίας των συγκρούσεων τα μόρια του πολυμερούς εκτελούν μεταφορική, αλλά και περιστροφική κίνηση. Η πιθανότητα  $P(X,t)$

να βρεθεί ένα μόριο στη θέση  $X$  στη χρονική στιγμή  $t$ , αν υποθεθεί ότι βρισκόταν στην αρχή των αξόνων τη χρονική στιγμή  $t=0$  δίνεται από τη σχέση:

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

όπου  $D_t$  είναι ο συντελεστής διάχυσης μεταφορικής κίνησης του μορίου. Αντίστοιχα αν ένα μόριο κυλινδρικού σχήματος υπόκειται σε κίνηση Brown η πιθανότητα να βρεθεί στις σφαιρικές συντεταγμένες  $\theta, \varphi$  στο χρόνο  $t$  είναι  $P(\theta/\theta_0, \varphi/\varphi_0)$  με  $\theta_0, \varphi_0$  τις συντεταγμένες σε  $t=0$  και δίνεται από τη σχέση:

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

με  $\Omega$  το συντελεστή διάχυσης περιστροφικής κίνησης. Από τις Σχέσεις 1 και 2 φαίνεται ότι οι συντελεστές διάχυσης των μακρομορίων συνδέονται άμεσα με την κίνησή τους. Αφού τα κινούμενα μόρια σκεδάζουν φως με τρόπο που συνδέεται ποσοτικά με την κίνησή τους, είναι δυνατόν, χρησιμοποιώντας πειράματα σκέδασης φωτός, να προσδιοριστούν οι συντελεστές διάχυσης των μορίων. Οι συντελεστές αυτοί συνδέονται άμεσα με χαρακτηριστικές ιδιότητες των μορίων, όπως το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθός τους καθώς και με αλληλεπιδράσεις πολυμερούς – διαλύτη

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

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

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

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

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

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

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

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

$$D_t = D_{t,0} (1 + k_D c + \dots), \quad (5)$$

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

$$k_D = 2A_2 M - k_f - (N_A V_2 / M) = 2A_2 M - k_f - u_2, \quad (6)$$

όπου  $A_2$  ο δεύτερος συντελεστής virial,  $M$  το μοριακό βάρος,  $N_A$  η σταθερά του Avogadro,  $V_2$  ο όγκος του μορίου του πολυμερούς,  $u_2$  ο ειδικός γραμμομοριακός όγκος του πολυμερούς και  $k_f$  ο συντελεστής αναλογίας στη σχέση που δίνει την εξάρτηση του μοριακού συντελεστή τριβής  $f$  του πολυμερούς από τη συγκέντρωση,  $f = f_0(1 + k_f c)$  στο συγκεκριμένο διαλύτη. Γενικά ο  $D_t$  δίνεται από τη σχέση Stokes- Einstein:

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

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

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

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

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

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

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

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

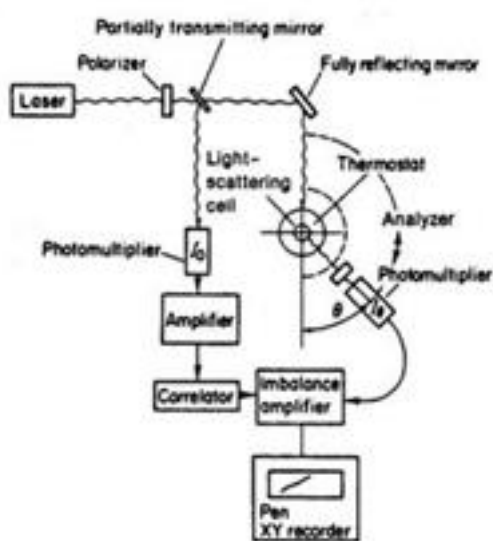
Η  $R_h$  αποτελεί ένα μέτρο του υδροδυναμικού όγκου του πολυμερούς στο διάλυμα, όπως αυτός καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς - διαλύτη, θερμοκρασίας και τα παρόμοια.

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

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

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

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



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση ενός λέιζερ σκέδασης φωτός.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

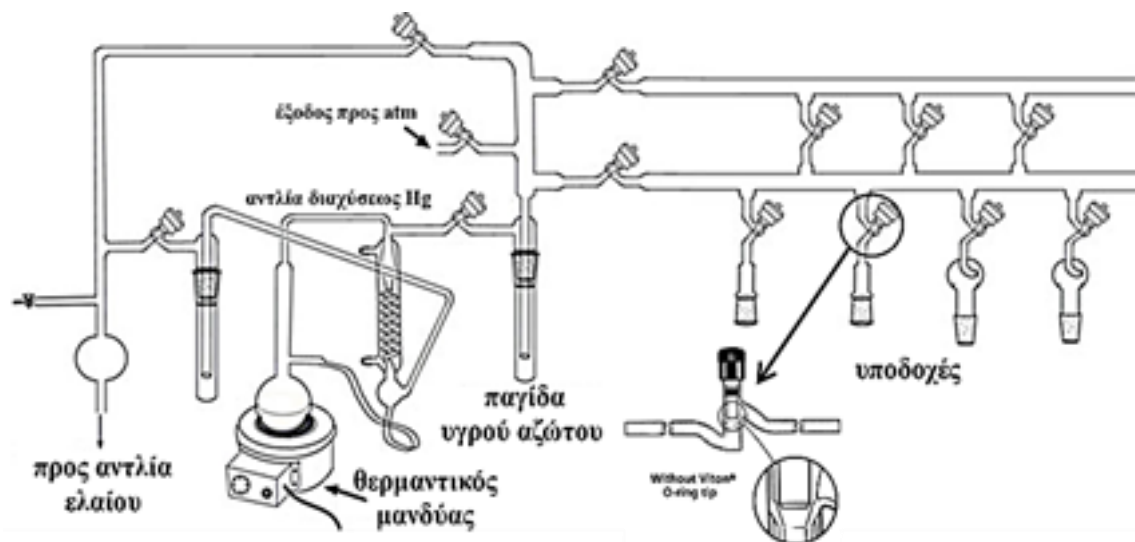
### 3.1 Τεχνικές Υψηλού Κενού (High-Vacuum Techniques, HVT) [83-85]

Η σύνθεση των πολυμερών, που αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε μέσω τεχνικών υψηλού κενού κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και με χρήση ειδικά σχεδιασμένων συσκευών πολυμερισμού, οι οποίες κατασκευάζονται με τη βοήθεια υαλουργικών τεχνικών. Ο συνδυασμός αυτός αποτελεί ιδανική μέθοδο για τη σύνθεση μακρομορίων με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και με δυνατότητα άμεσης συσχέτισης μεταξύ της δομής και των ιδιοτήτων τους. Συνεπώς, για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα απαιτούνται κατάλληλες τεχνικές υψηλού κενού ώστε να απομακρυνθούν από το περιβάλλον των αντιδράσεων όλες εκείνες οι προσμείξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε παράπλευρες αντιδράσεις.

Αρχικά, με την επίτευξη υψηλού κενού στον αντιδραστήρα του πολυμερισμού απομακρύνεται ο ατμοσφαιρικός αέρας που περιέχει πλήθος ανεπιθύμητων προσμείξεων, όπως οξυγόνο, ίχνη υγρασίας, κτλ., οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με τους απαρχητές, τα μονομερή αλλά και τις αναπτυσσόμενες πολυμερικές αλυσίδες. Στη συνέχεια, με εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών καθαρισμού των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και αντιδραστηρίων επιτυγχάνεται η απομάκρυνση διάφορων ανεπιθύμητων ουσιών από το σύστημα, όπως αλκοόλες, αμίνες, οξέα και άλλες δραστικές προσμείξεις (π.χ. σταθεροποιητές), που περιέχονται στα εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια.

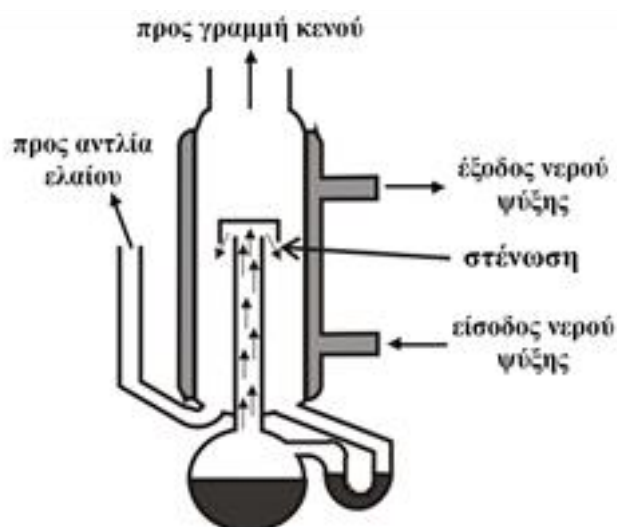
Όλες οι διαδικασίες καθαρισμού των αντιδραστηρίων, διαλυτών, απαρχητών όπως και οι διαδικασίες πολυμερισμού πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια της γραμμής υψηλού κενού (high-vacuum line, HVL), σχηματική αναπαράσταση της οποίας παρατίθεται στο σχήμα 18. Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από γυάλινους σωλήνες τύπου Pyrex, στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (HI-VAC στρόφιγγες χωρίς Viton O-ring tip, εφαρμογή κενού έως  $5 \cdot 10^{-7}$  mm Hg), μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου και μία αντλία ελαίου. Οι αντλίες ελαίου και διαχύσεως Hg προστατεύονται από διάφορα πτητικά συστατικά (π.χ. ατμοί διαλυτών, αέρια που εκλύονται κατά τη διεξαγωγή αντιδράσεων) τα οποία συμπυκνώνονται σε παγίδες υγρού αζώτου. Με τις στρόφιγγες, το κενό εφαρμόζεται μόνο στα επιθυμητά τμήματα της γραμμής, ενώ τα υπόλοιπα τμήματα παραμένουν απομονωμένα. Η γραμμή υψηλού κενού περιλαμβάνει εξόδους με εσφυρίσματα, μέσω

των οποίων συνδέονται οι διάφορες συσκευές και γίνεται η εισαγωγή και η απόσταξη των αντιδραστηρίων (διαλύτες, μονομερή, απαρχητές).



Σχήμα 19: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού (HVL)

Η αντλία ελαίου δημιουργεί ένα προκαταρκτικό κενό της τάξης των  $10^{-2} - 10^{-3}$  mm Hg. Το κενό αυτό είναι απαραίτητο για να αποστάξει ο υδράργυρος που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία (Σχήμα 20). Ο υδράργυρος θερμαίνεται με τη βοήθεια ενός θερμαντικού μανδύα και καθώς τα μόρια του κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξηση της ταχύτητάς τους με ταυτόχρονη ελάττωση της πίεσής τους, ακολουθώντας την αρχή του Bernoulli.



Σχήμα 20: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου

Σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli, όταν ένα ασυμπίεστο ρευστό ρέει κατά μήκος ενός σωλήνα που δεν έχει σταθερή διατομή, ο 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. 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 η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Έτσι επιτυγχάνεται το τελικό κενό που είναι της τάξης των  $10^{-6}$  mm Hg, ίσο με την τάση ατμών του υδραργύρου.

Πριν χρησιμοποιηθεί η γραμμή υψηλού κενού πρέπει να τεθεί σε λειτουργία η αντλία ελαίου, να προσαρμοστεί σ' αυτήν η επιθυμητή κενή συσκευή 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 σύστημα. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται με σχετική ευκολία, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο (-196 °C). Λεπτομέρειες σχετικά με τον χειρισμό της γραμμής υψηλού κενού, τις απαραίτητες προφυλάξεις και τα μέτρα ασφαλείας που πρέπει να λαμβάνονται κατά τη χρήση της αναφέρονται εκτενώς στη βιβλιογραφία. [83-85]

### **3.2 Καθαρισμός Διαλυτών**

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις πολυμερισμού όπως επίσης και στις περισσότερες οργανικές αντιδράσεις είναι απαραίτητο να μην περιέχουν ίχνη υγρασίας και οξυγόνου αλλά και να έχουν απομακρυνθεί ανεπιθύμητες προσμείξεις που μπορεί να υπάρχουν. Οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την πορεία των αντιδράσεων και ανάλογα τις συνθήκες μπορούν να δράσουν ως απαρχητές, επιβραδυντές ή αναστολείς πολυμερισμού, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα όπως είναι η ευρεία κατανομή μοριακών βαρών. Γι' αυτό το λόγο οι εμπορικά διαθέσιμοι διαλύτες υπόκεινται σε περαιτέρω διαδικασίες καθαρισμού, που στις περισσότερες των περιπτώσεων περιλαμβάνουν την αντίδραση τους με κάποιο ξηραντικό μέσο για απομάκρυνση της υγρασίας και εν συνεχεία την απαέρωση και απόσταξή τους υπό

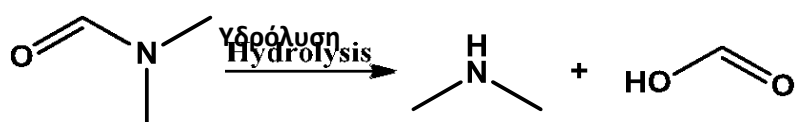
κενό. [83-85] Ακολούθως παρατίθενται οι διαδικασίες καθαρισμού των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:

### **Βενζόλιο:**

Το εμπορικά διαθέσιμο βενζόλιο (800 mL, 99% thiophen free grade, Sigma-Aldrich) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 1L, ακολούθως προστίθεται μικρή ποσότητα λεπτότατα διαμερισμένου υδριδίου του ασβεστίου ( $\text{CaH}_2$ ) και αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για μία ημέρα, για την δέσμευση ιχνών υγρασίας από το ξηραντικό μέσο. Στη συνέχεια η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα το βενζόλιο έχει ψυχθεί σε όλη του τη μάζα με χρήση υγρού αζώτου, απαερώνεται ενδελεχώς και αποστάζεται σε γειτονική σφαιρική φιάλη 1L στην οποία έχει γίνει προηγουμένως ένεση μικρής ποσότητας (~10 mL) κανονικού βουτυλολιθίου (n-BuLi), το οποίο αντιδρά με τις όποιες τυχόν προσμείξεις έχουν παραμείνει. Τέλος, η ποσότητα  $\text{CaH}_2$  της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

### **Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF):**

Το DMF αποτελεί το διαλύτη του πολυμερισμού των N-καρβοξυ ανυδριτών (N-carboxy anhydrides, NCAs) των  $\alpha$ -αμινοξέων, ενώ χρησιμοποιείται επίσης για την αραίωση των απαρχητών κατά τη σύνθεση των πολυπεπτιδίων αλλά και σε διάφορες οργανικές αντιδράσεις (π.χ. αντιδράσεις αποπροστασίας των πολυπεπτιδίων, αντιδράσεις χημείας “click”). Το DMF υπόκειται σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική του αποικοδόμηση παράγεται διμεθυλαμίνη (DMA) και μονοξείδιο του άνθρακα. Επίσης υδρολύεται αργά παρουσία νερού, παράγοντας DMA και φορμικό οξύ, συστατικά που του αποδίδουν και την χαρακτηριστική οσμή του (Σχήμα 20).



Σχήμα 20: 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. Για το λόγο αυτό το εμπορικό διαθέσιμο DMF (99.9+% με <50 ppm προσμίξεις, Fischer Scientific) φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box. Κατά τον καθαρισμό του, περίπου 700 mL του διαλύτη μεταγγίζονται σε σφαιρική φιάλη 1L που φέρει στρόφιγγα, η οποία προηγουμένως έχει υποστεί ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού (flame-drying). Στη συνέχεια η φιάλη με τον διαλύτη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται ενδεδειγμένα. Έπειτα το DMF αποστάζεται κλασματικά σε διπλανή σφαιρική φιάλη 1L. 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 °C, προστατευμένο από το φως.

### **Διχλωρομεθάνιο (DCM):**

Το εμπορικό διαθέσιμο διχλωρομεθάνιο (800 mL, ≥99.8%, Sigma-Aldrich) μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη 1L, η οποία περιέχει μικρή ποσότητα πεντοξειδίου του φωσφόρου (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) και αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για μία ημέρα, ώστε να δεσμευτούν τυχόν ίχνη υγρασίας από το ξηραντικό μέσο. Σε μία δεύτερη σφαιρική φιάλη τοποθετείται μικρή ποσότητα μοριακών κόσκινων και ακολούθως η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται. Μετά το πέρας των 24 ωρών, η φιάλη με τον διαλύτη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα απαερωθεί η ποσότητα του CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, αποστάζεται στη γειτονική φιάλη που περιέχει τα μοριακά κόσκινα και αφήνεται υπό κενό. Ο απεσταγμένος διαλύτης αποθηκεύεται σε δροσερό και σκοτεινό μέρος.

### **Εξάνιο:**

Το εξάνιο χρησιμοποιείται ως μη διαλύτης κατά τη διαδικασία των ανακρυσταλλώσεων για τον καθαρισμό των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs). Ο καθαρισμός του εμπορικού διαθέσιμου εξανίου (>99%, Merck Millipore) περιλαμβάνει αρχικά την κατεργασία του με μικρή ποσότητα λεπτότατα διαμερισμένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH<sub>2</sub>) για μια ημέρα σε σφαιρική φιάλη 2L, για την απομάκρυνση ίχνων υγρασίας. Ακολούθως, πραγματοποιείται απαέρωση και απόσταξη του διαλύτη στη γραμμή υψηλού κενού σε γειτονική σφαιρική φιάλη 2L, που περιέχει μικρή ποσότητα κανονικού βουτυλολιθίου (*n*-BuLi), το οποίο αντιδρά με τυχόν προσμίξεις, ενώ μετά το τέλος της

απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση. Η ποσότητα  $\text{CaH}_2$  της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

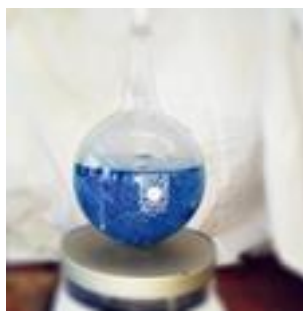
### **Οξικός Αιθυλεστέρας (EtOAc):**

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 εμπορικώς διαθέσιμος διαλύτης (1400 mL, >99.5%, Merck Millipore) αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε σφαιρική φιάλη 2L με πεντοξείδιο του φωσφόρου ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) για μια ημέρα, οπότε ο διαλύτης αποκτά ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται 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.

### **Τετραϋδροφουράνιο (THF):**

Αρχικά, το εμπορικώς διαθέσιμο τετραϋδροφουράνιο (1200 mL, max 0.005%  $\text{H}_2\text{O}$ , Merck Millipore) αφήνεται να αντιδράσει για τρεις ώρες παρουσία μεταλλικού νατρίου και στη συνέχεια μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη 2L, η οποία περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου  $\text{CaH}_2$  και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Ακολούθως, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και η ποσότητα του THF πρώτα απαερώνεται ενδελεχώς και έπειτα αποστάζεται σε νέα σφαιρική φιάλη που περιέχει κράμα μεταλλικού νατρίου και καλίου (Na/K alloy) σε αναλογία 1:3 κατά βάρος, όπου αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Η εμφάνιση χαρακτηριστικού έντονου κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη υψηλής καθαρότητας του συγκεκριμένου διαλύτη. 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:





Εικόνα 21:THF

### **Τολουόλιο:**

Όμοια με την διαδικασία που ακολουθείται για τον καθαρισμό του βενζολίου, το εμπορικώς διαθέσιμο τολουόλιο (800 mL, 99.8%, Sigma-Aldrich) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 1L που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου υδριδίου του ασβεστίου ( $\text{CaH}_2$ ) για να αντιδράσει τυχόν υγρασία και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Στη συνέχεια η σφαιρική φιάλη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού και ο διαλύτης απαερώνεται και αποστάζεται σε βαθμονομημένο κύλινδρο στην οποία έχει γίνει ένεση μικρής ποσότητας κανονικού βουτυλολιθίου ( $n\text{-BuLi}$ ). Το ζωηρό πορτοκαλί χρώμα του παραπάνω διαλύματος αποτελεί ένδειξη υψηλής καθαρότητας του συγκεκριμένου διαλύτη. Η ποσότητα  $\text{CaH}_2$  της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

### **Τριαιθυλαμίνη ( $\text{Et}_3\text{N}$ ):**

Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται κατά την σύνθεση του  $M^{(im)}$ -Trt-His NCA ως μέσω δέσμησης του παραγόμενου υδροχλωρίου. Για τον καθαρισμό της, η απαραίτητη ποσότητα  $\text{Et}_3\text{N}$  (150 mL, >99%, Acros Organics) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 250 mL που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου  $\text{CaH}_2$  και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Έπειτα η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα απαερωθεί η ποσότητα της  $\text{Et}_3\text{N}$ , ακολουθεί απόσταξη σε σφαιρική φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει λεπτότατα κομμένες πλάκες μεταλλικού νατρίου και αποθηκεύεται υπό κενό.

### 3.4. Σύνθεση και Καθαρισμός Μονομερούς (N-Καρβοξυ Ανυδρίτη του α-Αμινοξέος)

Τα μονομερή που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων, δηλαδή οι N-καρβοξυ ανυδρίτες (N-Carboxy Anhydrides, NCAs) των α-αμινοξέων, δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα κατά πλειονότητα και μπορούν να συντεθούν μόνο εργαστηριακά. Μόνο όταν είναι N-υποκατεστημένοι παρουσιάζουν σταθερότητα και άρα εμπορική εφαρμογή, ενώ χρησιμοποιούνται κατά την σύνθεση πεπτιδίων καθορισμένης αλληλουχίας. Η σύνθεση των NCAs που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, αλλά και με την εφαρμογή κατάλληλων τροποποιήσεων της συνθετικής πορείας όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο. Ακολουθως παρατίθεται η μέθοδος σύνθεσης και καθαρισμού του μονομερούς  $N^{(im)}$ -Trt-His NCA.

#### 3.4.1. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Carboxy Anhydride της $N^{(im)}$ -Trityl-L-Histidine ( $N^{(im)}$ -Trt-His NCA)

Η σύνθεση για το μονομερές  $N^{im}$ -trityl-(L)-His NCA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. 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 τη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε θειόνυλο χλωρίδιο αντι του τριφωσγενίου σε μια τροποποιημένη πορεία από αυτήν της λυσίνης. Οι λόγοι θα αναλυθούν σε επόμενο κεφάλαιο μαζί με τις αποτυχίες σύνθεσης του συγκεκριμένου μονομερούς. [65], [86]

#### Σύνθεση $N^{im}$ -Trt-(L)-His-NCA\*HCl

1. Σε δίλιαιμη φιάλη 2L, η οποία έχει αφεθεί προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού, προστίθεται Boc-His(trt)-OH (20g=40.2mmol). Η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή κενού και το στερεό αφήνεται προς ξήρανση για μια μέρα.
2. Την επόμενη μέρα αποστάζονται ~150 ml καθαρού THF, και στο τέλος της απόσταξης λαμβάνει χώρα απαέρωση.
3. Η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή, αφήνεται να ξεπαγώσει και τοποθετείται υπό ανάδευση μέσα σε υδρόλουτρο, με το νερό να είναι ελαφρώς ζεστό, ώστε να διαλυτοποιηθεί το στερεό ( το διάλυμα είναι ελαφρώς θολό και υποκίτρινο ).



4. Εν συνεχεία η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό και προετοιμάζεται η διάταξη για την αντίδραση. Ακολουθεί τοποθέτηση της φιάλης σε παγόλουτρο, ώστε να επιβραδυνθούν πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις, και από την είσοδο (A) τοποθετείται εσμύρισμα που είναι συνδεδεμένο με παροχή αργού. Προστίθεται στάγδην το θειόνυλο χλωρίδιο  $\text{SOCl}_2$  (3.25 mL = 44.2 mmol) υπό ροή αργού, το οποίο είναι ήδη διαλυμένο σε καθαρό THF (~20ml). Η προσθήκη ολοκληρώνεται μέσα σε περίπου είκοσι (20) λεπτά. Όταν η προσθήκη ολοκληρωθεί, το διάλυμα έχει αποκτήσει ένα ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα και το ιξώδες αυξηθεί σταδιακά μα αισθητά. Η αντίδραση παρακολουθείται μέσω IR, και ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονται δείγματα και παρακολουθήση της προόδου της αντίδρασης. Ένδειξη για το τέλος της αντίδρασης αποτελεί η μείωση της κορυφής στα  $1710 \text{ cm}^{-1}$  (IR), η οποία οφείλεται στην καρβοξυλική ομάδα του αρχικού αντιδρόντος. Η αντίδραση διήρκησε δύομιση ώρες. Στο τέλος αυξάνεται η ροή του αργού.

5. Προσθέτουμε διαιθυλαιθέρα ~2L (~9 φορές τον όγκο του THF) για την καταβύθιση του  $\text{N}^{\text{im}}\text{-trt-(L)-His}^*\text{HCl}$  NCA ως κύριο προϊόν, ενώ παράλληλα καταβυθίζονται και άλλες προσμίξεις οι οποίες ήταν διαλυτές στο THF, όπως το ενδιάμεσο χλωρίδιο και το αρχικό αμινοξύ.

6. Το διάλυμα διηθείται σε συσκευή Buchner (με γυάλινο φίλτρο), ενώ παράλληλα πάνω από το διάλυμα, το οποίο διηθείται, αλλά και από το στερεό εφαρμόζεται ήπια ροή αργού ώστε να δημιουργηθεί ένα ασφαλές περιβάλλον για τον NCA. Το στερεό που μένει στο φίλτρο είναι ελαφρώς υποκίτρινο και συλλέγεται σε μια σφαιρική φιάλη των 500 ml. Η φιάλη εφαρμόζεται στη γραμμή του κενού μέσω κατάλληλου εσμυρίσματος και αφήνεται προς ξήρανση για μια ημέρα.

7. Το στερεό ζυγίζεται μετά την ξήρανση (17,2 g). Ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού του N-καρβοξυανυδρίτη, ένα από τα πιο σημαντικά στάδια για την παραλαβή καθαρού μονομερούς. Ο καθαρισμός περιλαμβάνει ανακρυσταλλώσεις από σύστημα οξικού αιθυλεστέρα/n-εξανίου.

8. Αποστάζονται ~300 ml EtAc, το διάλυμα είναι ένα πυκνό λευκό γαλάκτωμα. Αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου μία ώρα μέσα σε υδρόλουτρο στους  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι καλός διαλύτης για το αρχικό αμινοξύ, το ενδιάμεσο χλωρίδιο, αλλά και το ελεύθερο μονομερές, ενώ αποτελεί κακό διαλύτη για το άλας της  $\text{N}^{\text{im}}\text{-trt-(L)-His}$ . Εν συνεχεία το διάλυμα ψύχεται σε παγόλουτρο στους  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , ώστε να καταβυθιστεί ποσοτικά το στερεό  $\text{trt-His NCA}^*\text{HCl}$ .

9. Το διάλυμα διηθείται μέσω Buchner (με γυάλινο φίλτρο τύπου 3) και έτσι παραλαμβάνεται ως μοναδικό προϊόν το  $N^{im}$ -trt-(L)-His\*HCl NCA. Το στερεό έχει υφή πούδρας και λευκό χρώμα. Η διήθηση πρέπει να 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.

10. Το στερεό συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέα φιάλη και ξηραίνεται στη γραμμη κενού όλο το βράδυ, ζυγίστηκε 12.5g ( 28mmol ).

### **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.

11. Την επόμενη μέρα αποστάζονται 200 ml EtAc, δεν διαλύεται τίποτα απλά προκύπτει ένα λευκό γαλάκτωμα, απομακρύνεται η φιάλη από τη γραμμή και το διάλυμα αφήνεται για περίπου μια ώρα υπό ανάδευση.

12. Εν συνεχεία η φιάλη γεμίζεται με αργό και τοποθετείται μέσα σε παγόλουτρο στους 0 °C.

13. Σε αυτό το βήμα προσθίθεται ισομοριακή ποσότητα απεσταγμένης τριαιθυλαμίνης(  $Et_3N$  ) (3.5ml=28mmol) η οποία έχει διαλυθεί σε 50 ml καθαρού διαλύτη EtAc, ωστέ να δεσμευθεί ποσοτικά το HCl, η προσθήκη γίνεται στους 0°C, για να μη συμβεί έναρξη του πολυμερισμού, στάγδην σε χρονικό διάστημα δέκα λεπτά και υπό έντονη ανάδευση, ωστέ να μη δημιουργηθεί τοπική περίσσεια τριαιθυλαμίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης δημιουργείται το στερεό άλας της τριαιθυλαμίνης ενώ το διάλυμα διαυγάζει καθώς σχηματίζεται ο  $N^{im}$ -trityl-His NCA που είναι διαλυτός στον οξεικό αιθυλεστέρα.

14. Το διάλυμα διηθείται προς εκδίωξη του άλατος ενώ παράλληλα το διήθημα πέφτει σε καθαρό εξάνιο 1,5 L για να κρυσταλλωθεί και να δημιουργηθεί  $N^{im}$ -trityl-His NCA.

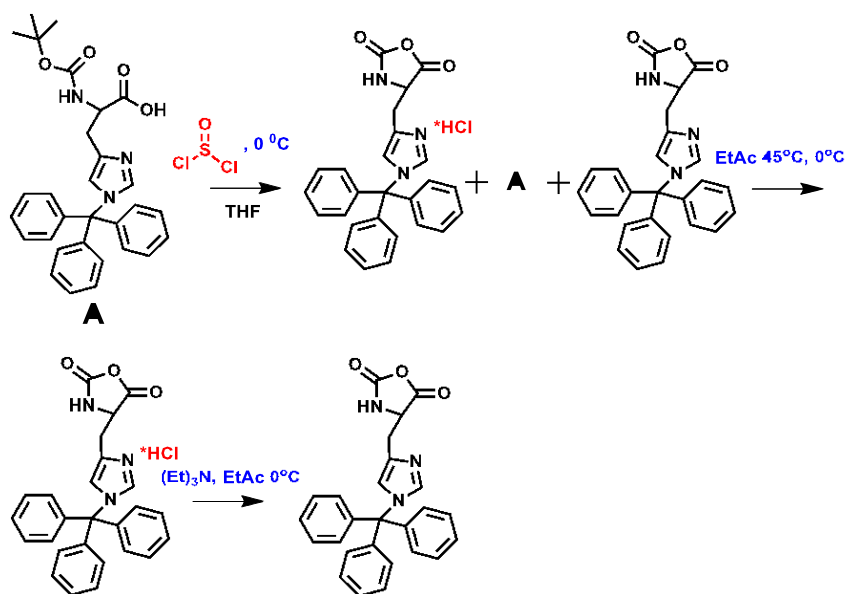
15. Το διάλυμα που προκύπτει επαναδιηθείται και συλλέγεται το καθαρό στερεό.

16. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται ακόμα μια φορά με σύστημα διαλύτη/ μη διαλύτη EtAc/ Hexane σε αναλογία 1:5 ωστέ να προκύψει ένα άσπρο στερεό.

17. Το στερεό συλλέγεται σε μικρή σφαιρική φιάλη και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή κενού για ένα βράδυ.

18. Την επόμενη μέρα το στερεό ζυγίζεται και φυλάσσεται στο glove box (11.05g=27mmol).

✓ Απόδοση<sub>συνολική</sub>=67%



Σχήμα 22: Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης του Trt-His NCA, μετά την αντίδραση παραλαμβάνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό το άλας του NCA αλλά και μικρό ποσοστό από το αρχικό και το ελεύθερο NCA τα οποία είναι διαλυτα σε EtAc στους  $45^\circ\text{C}$ , ενώ το άλας του NCA παραμένει αδιάλυτο και έτσι απομονώνεται.

### 3.5 Σύνθεση Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)-*b*-Poly(L-Histidine) (PEO-*b*-PHis)

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-PHis, αρχικά μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) του  $N^{(im)}$ -Trt-His NCA με χρήση του πολυμερούς  $\text{N}_3\text{-PEO-NH}_2$  ως μακροαπαρχητή. Τα προστατευμένα πολυμερή  $\text{N}_3\text{-PEO-}b\text{-P(Trt-His)}$  που προκύπτουν, υπόκεινται σε διαδοχικές αντιδράσεις αποπροστασίας των δομικών μονάδων της PHis, ώστε να ληφθούν τελικά τα πλήρως αποπροστατευμένα πολυμερή. Οι πειραματικές

διαδικασίες που ακολουθούνται για τον πολυμερισμό και την αποπροστασία των πολυμερών περιγράφονται λεπτομερώς παρακάτω.

### 3.5.1. Σύνθεση Προστατευμένων Συμπολυμερών $N_3$ -PEO-*b*-P(Trt-His) με Χρήση $N_3$ -PEO-NH<sub>2</sub> ως Μακροαπαρχητή [65], [67]

Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν δύο κατά συστάδες συμπολυμερή του τύπου  $N_3$ -PEO-*b*-PHis με μοριακά βάρη 9.000-6000 και 3.500-3.500 αντίστοιχα. Αρχικά υπολογίστηκε η ποσότητα του μονομερους που απαιτείται, με δεδομένη ποσότητα μακροαπαρχητή, προκειμένου να ληφθεί το επιθυμητό προϊόν.

#### $N_3$ -PEO-*b*-PHis (9K – 6K)

Η ποσότητα του μακροαπαρχητή που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.35 g, οπότε οι υπολογισμοί έγιναν ως εξής:

- 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 CO<sub>2</sub>, 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 CO<sub>2</sub>, αλλά με την προστασία της είναι ίσο με 379/136 x 6000 g/mol = 16720 g/mol.
- Τα mol απαρχητή ( $N_3$ -PEO-NH<sub>2</sub>) είναι:  $n = m/Mr$ ,  $n = 0.35 \text{ g}/9000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $n = 0.000039 \text{ mol}$ .
- Ισχύει η σχέση: MB πολυμερισμένου μονομερούς = g μονομερούς/ mol απαρχητή. Άρα, g μονομερούς (His) = 16720 g/mol x 0.000039 mol = 0.6502 g His.
- Ζυγίζεται όμως ο  $N^{(im)}$ -Trt-His NCA, οπότε γίνεται διόρθωση ως προς το CO<sub>2</sub> που έχει ο NCA:
- $379/423 \times X = 0.6502 \text{ g His}$ , άρα  $X = 0.7257 \text{ g } N^{(im)}$ -Trt-His NCA.
- Τα mol του  $N^{(im)}$ -Trt-His NCA =  $m/Mr = 0.7257 \text{ g}/423 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} = 0.0017 \text{ mol}$ .

Ειδικά σχεδιασμένη συσκευή (Εικόνα 22) πολυμερισμού των 100 mL, η οποία φέρει μαγνητικό αναδευτήρα και κατάλληλη αμπούλα με εσμύρισμα και break-seal για την προσθήκη των μονομερών, ελέγχεται πρώτα για την ύπαρξη μικροοπών με χρήση του πηνίου Tesla και ξηραίνεται ενδελεχώς στη γραμμή υψηλού κενού (flame-dying). Στη συσκευή (θέση A) προστίθενται 0.35 g μακροαπαρχητή N<sub>3</sub>-PEO-NH<sub>2</sub> (3.9·10<sup>-5</sup> mol, M<sub>n</sub>=9000) υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου και η ποσότητα του στερεού αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Ακολούθως, γίνεται απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας από το N<sub>3</sub>-PEO-NH<sub>2</sub>, με την προσθήκη καθαρού βενζολίου στη φιάλη του πολυμερισμού. Το βενζόλιο έχει την ικανότητα να σχηματίζει αζεοτροπικό μείγμα με το H<sub>2</sub>O και συνεπώς η υγρασία απομακρύνεται εύκολα από το πολυ(αιθυλενοξειδίο), καθώς η ποσότητα του διαλύτη αποστάζεται σε γειτονική φιάλη. Με αυτό τον τρόπο ίχνη υγρασίας συμπαρασύρονται κατά την απόσταξη του βενζολίου και έτσι απομακρύνονται ποσοτικά από τη συσκευή. Η υψηλή καθαρότητα τόσο του μακροαπαρχητή όσο και των μονομερών κρίνεται απαραίτητη για τον ελεγχόμενο χαρακτήρα του πολυμερισμού και για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων.



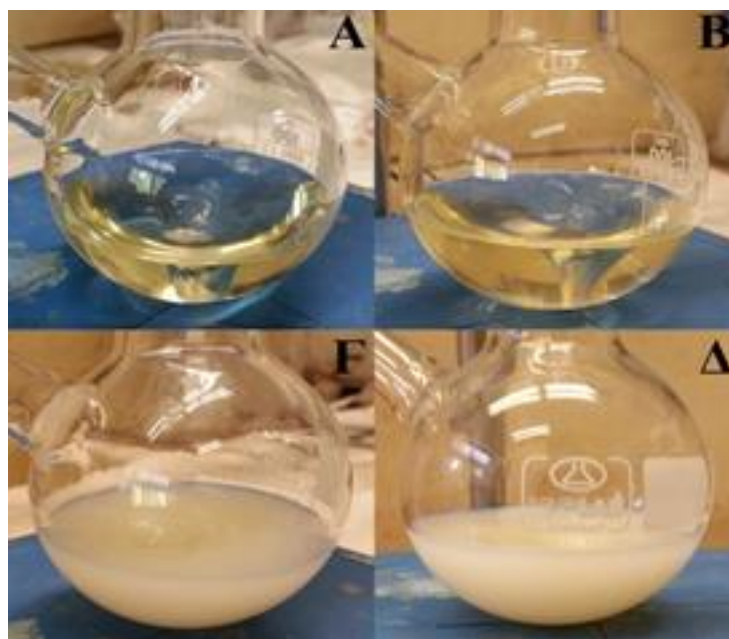
Εικόνα 22: Συσσκευή πολυμερισμού

Ειδικότερα, την επόμενη ημέρα, αποστάζονται περίπου 15 mL βενζολίου στη συσκευή του πολυμερισμού που περιέχει την ποσότητα του μακροαπαρχητή μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Μόλις ληφθεί η απαραίτητη ποσότητα, η φιάλη απομακρύνεται από την HVL και τοποθετείται σε υδατόλουτρο (25 °C) υπό συνεχή ανάδευση για 30 min, έτσι ώστε να διαλυθεί πλήρως το N<sub>3</sub>-PEO-NH<sub>2</sub>. Στη συνέχεια η συσκευή επαναπροσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, και η ποσότητα του βενζολίου αποστάζεται σε γειτονική κενή σφαιρική φιάλη. Στη φιάλη του πολυμερισμού έχει πλέον απομείνει το καθαρό από υγρασία N<sub>3</sub>-PEO-NH<sub>2</sub>, το οποίο αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

Την επόμενη ημέρα, αποστάζονται περίπου 20 mL καθαρού DMF στη συσκευή του πολυμερισμού, ενώ ο διαλύτης αποστάζεται κλασματικά απορρίπτοντας τα πρώτα mL στην παγίδα αζώτου. Αφού πρώτα πραγματοποιηθεί ενδεδειγμένη απαέρωση, η συσκευή απομακρύνεται από την HVL και τοποθετείται υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο (25 K°C) ώστε να υγροποιηθεί ο διαλύτης και να διαλυθεί πλήρως ο απαρχητής, δίνοντας ένα διαυγές και άχρωμο διάλυμα. Έπειτα η συσκευή προσαρμόζεται στην HVL από την πλευρά της αμπούλας (θέση Γ) και αφού απαερωθεί το συγκεκριμένο τμήμα της, μεταφέρεται στο glove box, όπου φυλάσσονται τα μονομερή (NCAs) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Μετά την εισαγωγή της συσκευής στον κύριο θάλαμο, ανοίγεται και

αφαιρείται ο προσαρμογέας ώστε να εξισορροπηθεί η πίεση εντός της αμπούλας της συσκευής και ακολούθως προστίθενται διαδοχικά με τη βοήθεια χωνιού 0.7257 g από τον  $N^{(im)}$ -Trt-His NCA (1.7 mmol, MB=423.46 g/mol. Η αμπούλα απομονώνεται πρώτα μέσω της στρόφιγγας του προσαρμογέα και η συσκευή εξέρχεται από το glove box, ενώ ύστερα μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού και η ποσότητα των μονομερών αφήνεται προς ξήρανση για τουλάχιστον μισή ώρα. Μετά την πάροδο των 30 min, αποστάζονται στην αμπούλα περίπου 15 mL καθαρού DMF, ώστε να διαλυτοποιηθούν τα μονομερή πριν γίνει η προσθήκη τους στο διάλυμα του μακροαπαρχητή. Όσο ακόμα το διάλυμα των μονομερών σε DMF είναι παγωμένο, η αμπούλα συντήκεται στη στένωση που φέρει ώστε να παραμείνει υπό κενό και η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού. Μετά την πλήρη διάλυση των μονομερών στο DMF, πραγματοποιείται θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας και το περιεχόμενο διάλυμα αποχύνεται ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη πολυμερισμού, ώστε να εκκινήσει ο πολυμερισμός.

Η έναρξη του πολυμερισμού συνοδεύεται από έκλυση διοξειδίου του άνθρακα από το διάλυμα υπό μορφή φυσαλίδων, το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη διάδοση του πολυμερισμού. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού ανοίγοντας τη στρόφιγγα 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. Το διάλυμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 6 ημέρες μέχρι να καταναλωθούν πλήρως τα μονομερή. Παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών που διεξάγεται ο πολυμερισμός το διάλυμα μετατρέπεται σταδιακά από έντονο κίτρινο και διαυγές που ήταν αρχικά σε λευκό-κιτρινωπό και μη διαυγές (θολό), γεγονός που αποτελεί ένδειξη για την επιτυχή σύνθεση του πολυπεπτιδικού συμπολυμερούς (Εικόνα 23).



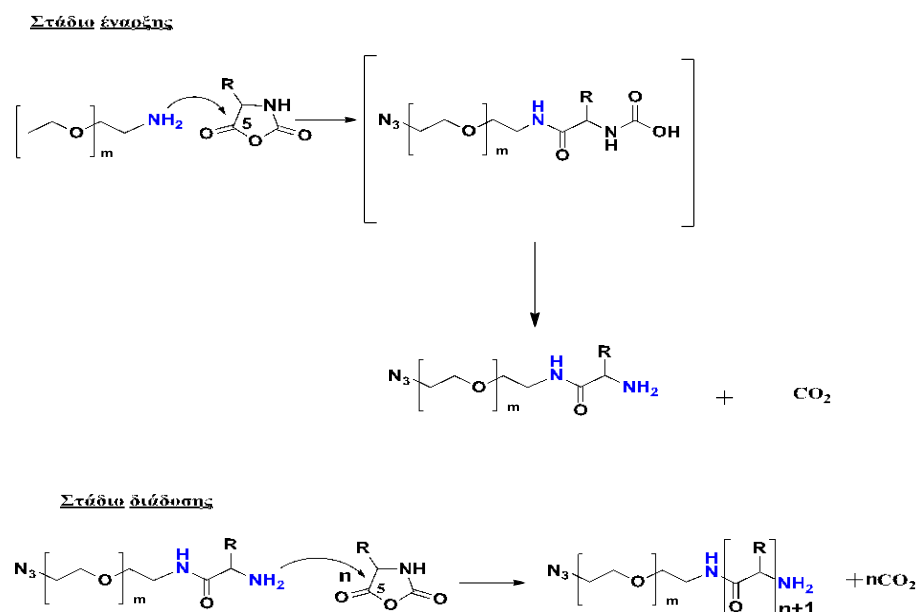
**Εικόνα 23:** Πορεία του πολυμερισμού του υβριδικού συμπολυμερούς  $N_3$ -PEO-*b*-P(Trt-His) μετά από (Α) 1 ημέρα, (Β) 2 ημέρες, (Γ) 4 ημέρες και (Δ) 6 ημέρες αντίστοιχα

Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του  $N_3$ -PEO-*b*-P(Trt-His) (δεν παρατηρείται πλέον έκλυση διοξειδίου του άνθρακα), η απομόνωση του πολυμερούς πραγματοποιείται με καταβύθισή του σε περίπου 500 mL ψυχρού διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια το στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου. Είναι απαραίτητο η διήθηση να λαμβάνει χώρα στον ελάχιστο δυνατό χρόνο και υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου. Το λευκό στερεό που συλλέγεται, μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Μετά την ξήρασή του, το τελικό προστατευμένο πολυμερές ζυγίζεται (0.513 g) και φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού απομονωμένο από τον ατμοσφαιρικό αέρα.

Ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω, πραγματοποιείται η σύνθεση του συμπολυμερούς  $N_3$ -PEO-*b*-PHis με μοριακά βάρη 3.5K - 3.5K.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η γενική αντίδραση ROP του  $N^{im}$ -trityl-His NCA χρησιμοποιώντας το  $N_3$ -PEO-NH<sub>2</sub> ως απαρχητή προς σχηματισμό του  $N_3$ -PEO-*b*-P(Trt-His) σε διαλύτη DMF. Όπου R είναι ο δακτύλιος της ιστιδίνης με την τρίτυλο προστατευτική ομάδα.



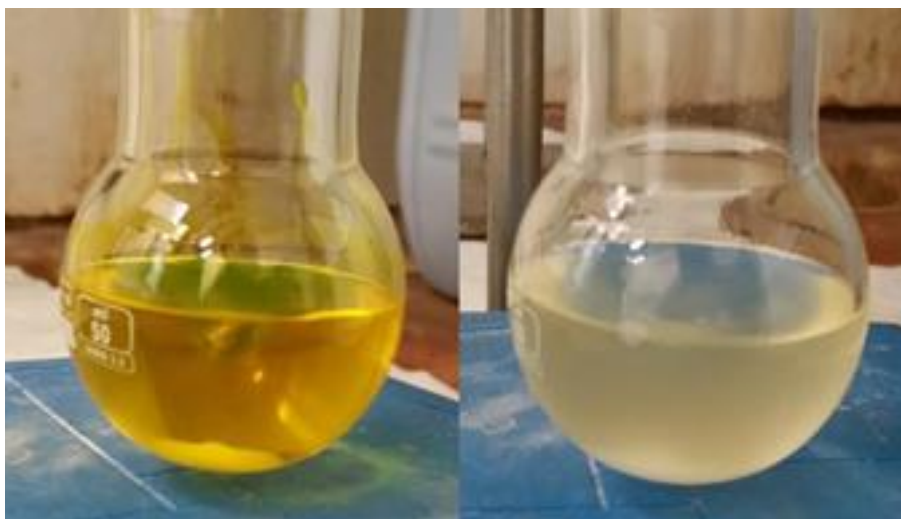


Σχήμα 22: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης  $N_3$ -PEO-*b*-P(Trt-His) όπου R ο δακτύλιος της ιστιδίνης με την τρίτυλο προστατευτική ομάδα.

### 3.5.2 Εκλεκτική Αποπροστασία των Δομικών Μονάδων της Πολυ(Ιστιδίνης) (PHis) [52]

Ακολούθως περιγράφεται η γενική πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για την εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της PHis στα συμπολυμερή  $N_3$ -PEO-*b*-P(Trt-His) που συντέθηκαν.

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθενται 10 mL διχλωρομεθανίου ( $CH_2Cl_2$ , DCM) και στη συνέχεια προστίθεται σχεδόν όλη η ποσότητα που λήφθηκε από το εκάστοτε πλήρως προστατευμένο πολυμερές  $N_3$ -PEO-*b*-P(Trt-His). Το πολυμερές αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για 15 min, ώστε να διαλυθεί και να διογκωθεί στο  $CH_2Cl_2$  (καλώς διαλύτης για το πολυμερές). Έπειτα στη φιάλη προστίθενται 10 mL τριφθοροξικού οξέος ( $CF_3COOH$ , TFA,  $\geq 99.5\%$ , Fischer) και το έντονο κίτρινο και διαυγές διάλυμα που προκύπτει αφήνεται υπό ανάδευση για 20-30 min. Με την χρήση του TFA επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των προστατευτικών τρίτυλο-ομάδων από τις δομικές μονάδες της PHis. Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί ότι οι τρίτυλο-ομάδες που έχουν κοπεί δεν θα επανασυνδεθούν στην PHis, καθώς είναι καρβοκατιόντα, προστίθεται μικρή ποσότητα (μερικές σταγόνες) τριαίθυλοσιλανίου μέχρι πλήρους αποχρωματισμού του διαλύματος, το οποίο σχηματίζει σταθερό δεσμό μαζί τους και τις καθιστά ανενεργές (Εικόνα 24).



**Εικόνα 24:** Διάλυμα του πολυμερούς  $N_3$ -PEO-*b*-P(Trt-His) σε TFA πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την προσθήκη ποσότητας τριαίθυλοσιλανίου αντίστοιχα.

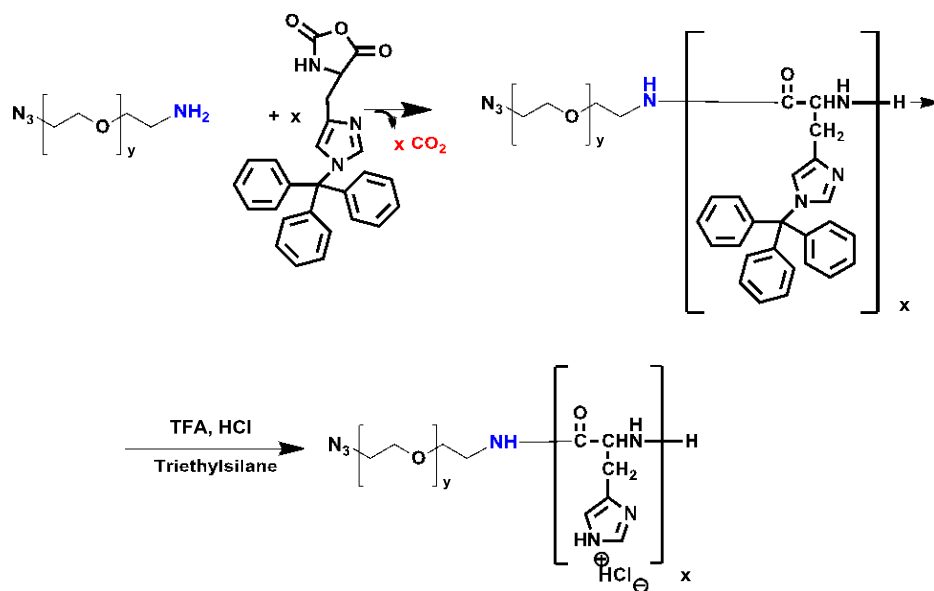
Στη συνέχεια η φιάλη της αντίδρασης προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού σε ειδική διάταξη για “short-path” απόσταση προς απομάκρυνση των DCM και TFA σε κενή γειτονική φιάλη. Συνεπώς στη φιάλη παραμένει μόνο το πολυμερές, το οποίο διαλύεται σε 30 mL νερό Milli-Q και αφήνεται υπό ανάδευση για 10-15 min. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, στη φιάλη γίνεται προσθήκη στερεού  $NaHCO_3$  (εξουδετέρωση) μέχρι να μην παρατηρείται πλέον αφρισμός του διαλύματος λόγω του παραγόμενου  $CO_2$ . Το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετείται με την βοήθεια πιπέτας σε κατάλληλη μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis) (όριο αποκλεισμού  $MWCO=3.5$  kDa), η οποία με τη σειρά της τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 2L νερό Milli-Q υπό ανάδευση (Εικόνα 25). Η διαδικασία της διαπίδυσης λαμβάνει χώρα για την απομάκρυνση των δεσμευμένων τριτυλο-ομάδων από το πολυμερές διαμέσου των πόρων της μεμβράνης. Το pH του εξωτερικού διαλύματος ρυθμίζεται στο 9 με προσθήκη 4-5 σταγόνων  $NaOH$  1N. Τις επόμενες ημέρες παρατηρείται μείωση του pH του νερού, οπότε πραγματοποιούνται διαδοχικές αλλαγές του ανά τακτές περιόδους με νέα ποσότητα και προσθήκη σταγόνων  $NaOH$  1N, 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 7-8 ημέρες και στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της λυοφιλοποίησης (freeze-drying), για την εκδίωξη του νερού από το πολυμερές.



**Εικόνα 25: Διαδικασία dialysis για την καθαρισμό του πολυμερούς από τις προστατευτικές τριτυλο-ομάδες**

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 αποστάζεται από τη μητρική φιάλη σε κενή γειτονική φιάλη, η οποία ψύχεται διαρκώς με χρήση υγρού αζώτου. Η διαδικασία του freeze-drying διαρκεί 3-4 ημέρες ανάλογα των όγκο του διαλύματος που συλλέγεται μετά από το dialysis και τα στερεό που λαμβάνεται τελικά είναι λευκό και κοκκώδες. Μετά την ξήρανσή του, το αποπροστατευμένο πολυμερές  $N_3$ -PEO-*b*-PHis ζυγίζεται και φυλάσσεται σε vial υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού απομονωμένο από τον ατμοσφαιρικό αέρα.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η συνολική αντίδραση σχηματισμού του κατά συστάδες συμπολυμερούς  $N_3$ -PEO-*b*-PHis ξεκινώντας από  $N_3$ -PEO-NH<sub>2</sub> ως μακροαπαρχητή, ο οποίος εκκινεί τον ROP του μονομερούς.



Σχημα 23: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του συμπολυμερούς N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHis.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

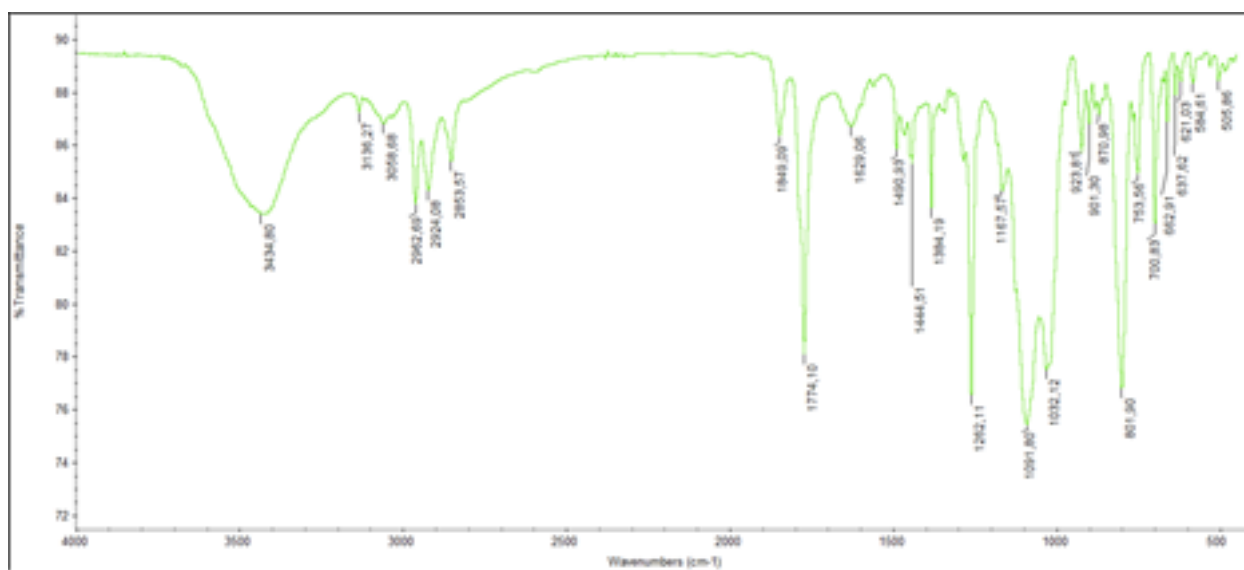
#### 4.1 Σύνθεση του N-Καρβοξυ Ανυδρίτη του $\alpha$ -Αμινοξέος (NCA)

Η σύνθεση του NCA του  $\alpha$ -αμινοξέος αποτελεί το πρώτο στάδιο της παρούσας εργασίας, καθώς αποτελεί το μονομερές για τον επακόλουθο ROP προς σχηματισμό των πολυπεπτιδίων. Ο έλεγχος της επιτυχούς σύνθεσης τους πραγματοποιείται μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H-NMR}$ ). Η φασματοσκοπία υπερύθρου επιτρέπει τη γρήγορη και αξιόπιστη αναγνώριση του NCA, εφόσον διατίθεται βιβλιογραφικά πρότυπο φάσμα για σύγκριση. Επιπλέον, όταν ο NCA αρχίζει να πολυμερίζεται, οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των καρβονυλίων του δακτυλίου εξαφανίζονται σταδιακά και παίρνουν την θέση τους οι χαρακτηριστικές δονήσεις των αμιδικών δεσμών, υποδηλώνοντας τον επιτυχή πολυμερισμό του.

##### 4.1.1 Σύνθεση του $N^{(im)}$ -Trt-His NCA

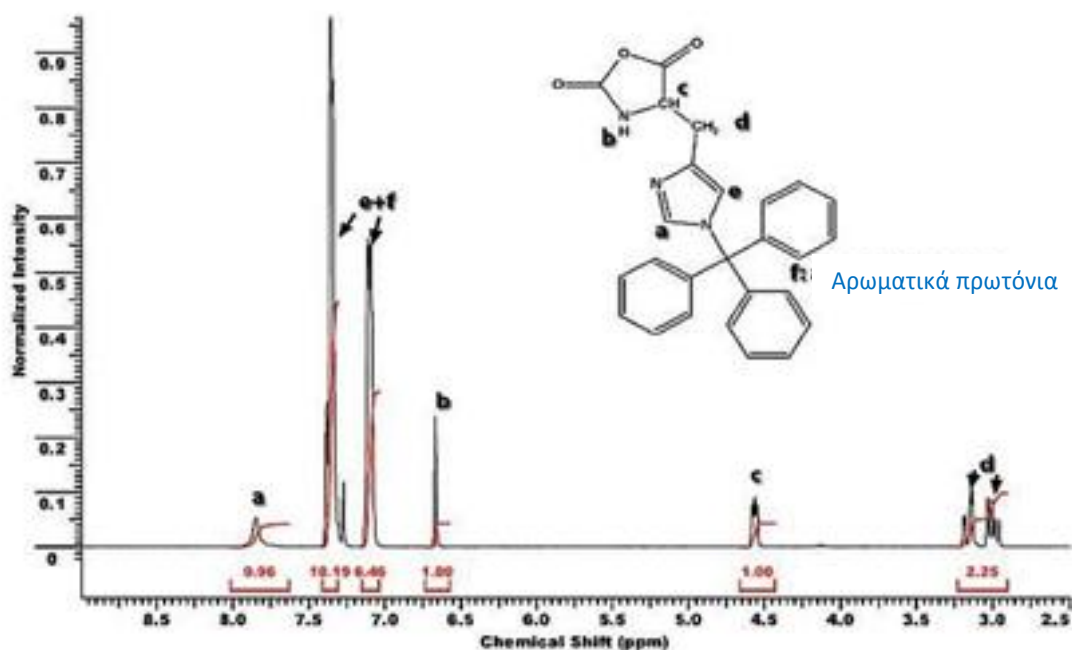
Αρχικά, προηγείται η λήψη φάσματος υπερύθρου (IR) της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH. Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα  $1710\text{ cm}^{-1}$ , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου (C=O) του αμινοξέος της ιστιδίνης. Ακολούθως, στο διάλυμα της ένωσης προστίθεται το  $\text{SOCl}_2$  που χρησιμοποιείται ως μέσο χλωρίωσης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης κυκλοποίησης και η αντίδραση αφήνεται για 2.5 ώρες. Η προσθήκη του  $\text{SOCl}_2$  πρέπει υποχρεωτικά να γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία, διότι σε υψηλές θερμοκρασίες ελλοχεύει ο κίνδυνος της απόσπασης των τρίτυλο-προστατευτικών ομάδων. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με λήψη νέου φάσματος IR μετά την πάροδο του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος (Σχήμα 24). Σε αυτό το φάσμα είναι ορατή η απουσία της κορυφής του αρχικού αντιδρώντος στα  $1710\text{ cm}^{-1}$  και η εμφάνιση των δύο χαρακτηριστικών κορυφών του  $N^{(im)}$ -Trt-His NCA στα  $1785\text{ cm}^{-1}$  και  $1850\text{ cm}^{-1}$ . Η εμφάνιση αυτών των δύο κορυφών, υποδηλώνει την επιτυχή σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη. Ειδικότερα, η κορυφή στα  $1785\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στο καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του NCA (δηλ. του  $\text{C}_2$ ), ενώ η δεύτερη κορυφή στα  $1850\text{ cm}^{-1}$  αφορά, αντίστοιχα, το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του  $\text{C}_5$ ). Επιπλέον είναι ορατή και μία κορυφή στα  $1620\text{ cm}^{-1}$ , 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<sub>3</sub>N, προς σχηματισμό του άλατος Et<sub>3</sub>N·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<sup>-1</sup>, που υποδηλώνει ότι το αρχικό αμινοξύ της ιστιδίνης έχει καταναλωθεί πλήρως, η κορυφή στα 1620 cm<sup>-1</sup>, που δείχνει ότι δεσμεύτηκε ποσοτικά το HCl μετά την προσθήκη της ποσότητας τριαιθυλαμίνης και τέλος, η κορυφή στα 1650 cm<sup>-1</sup>, που θα οφειλόταν στη δόνηση του πεπτιδικού δεσμού λόγω πιθανής έναρξης του πολυμερισμού από τυχόν περίσσεια της Et<sub>3</sub>N.



Σχήμα 24: Φάσμα υπερέυθρου του N<sup>(im)</sup>-Trt-His NCA

Επιπροσθέτως, η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του N<sup>(im)</sup>-Trt-His NCA επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος <sup>1</sup>H-NMR του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη CDCl<sub>3</sub> (Σχήμα 25). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 2.80 – 3.20 (2H, –CH<sub>2</sub>–), 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).

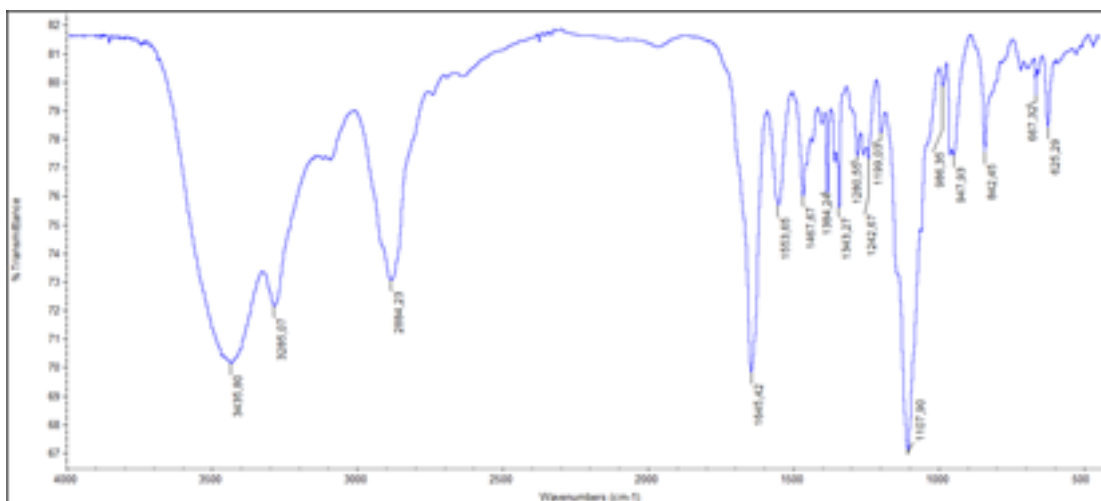


Σχήμα 25: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του  $N^{(im)}$ -Trt-His NCA, σε  $\text{CDCl}_3$ .

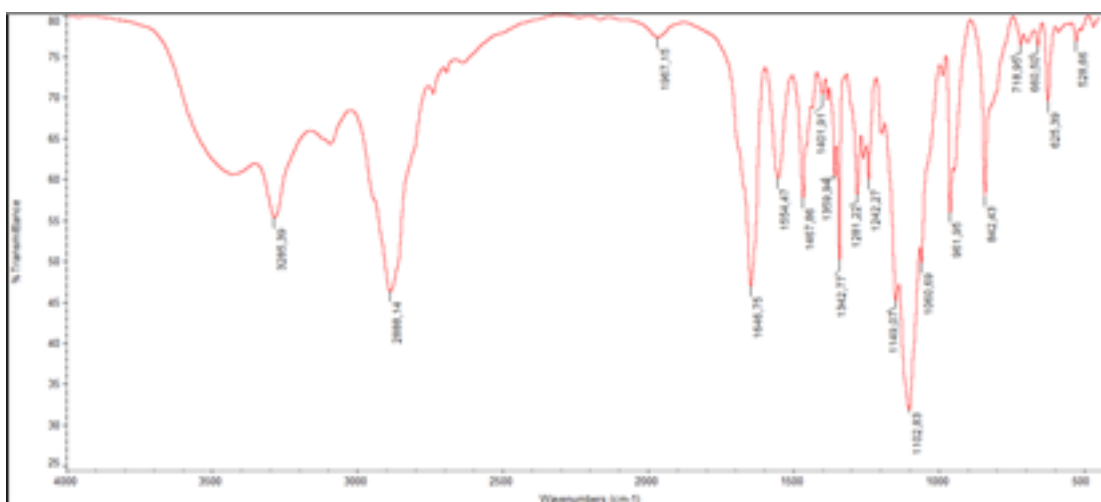
#### 4.1.2 Σύνθεση των κατά Συστάδων Συμπολυμερών του τύπου $\text{N}_3\text{-PEO-}b\text{-PHis}$

Στην παρούσα πειραματική προσπάθεια συντέθηκαν δύο κατά συστάδες συμπολυμερή του τύπου  $\text{N}_3\text{-PEO-}b\text{-PHis}$  χρησιμοποιώντας τον  $\text{N}_3\text{-PEO-NH}_2$  ως μακροαπαρχητή για την εκκίνηση του ROP του  $N^{(im)}$ -Trt-His NCA. Η επιτυχία στη σύνθεση αποδείχτηκε με τη λήψη φασμάτων IR. Η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα των συμπολυμερών επιβεβαιώθηκαν ακόμη με τη λήψη φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$ , αλλά και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η λήψη φασμάτων υπερύθρου (IR) των συμπολυμερών  $\text{N}_3\text{-PEO-}b\text{-PHis}$  (Σχήματα 26, 27) και συγκρίθηκαν με το αντίστοιχο φάσμα IR του  $N^{(im)}$ -Trt-His NCA προκειμένου να αποφανθούμε για την επιτυχία της σύνθεσης. Τα ληφθέντα φάσματα παρατίθενται και σχολιάζονται παρακάτω.



Σχήμα 26 : Φάσμα υπερέθρου του συμπολυμερούς N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHIs (3.5 K - 3.5 K) μετά την αποπροστασία της PHis.



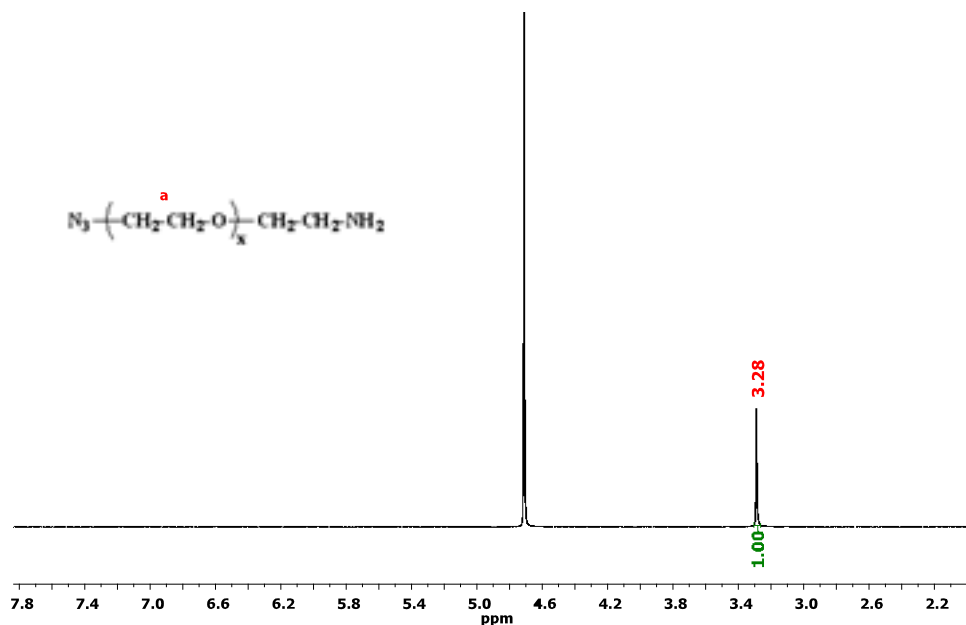
Σχήμα 27: Φάσμα υπερέθρου του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHIs (9 K - 6 K) μετά την αποπροστασία της PHis.

Στα φάσματα IR του πολυμερούς N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHIs (3.5K - 3.5K) και N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHIs (9K - 6K) μετά την αποπροστασία της PHis των πολυμερών, εμφανίζεται η ταινία απορρόφησης της δόνησης του αμιδικού δεσμού των πολυμερών στα 1650 cm<sup>-1</sup>, δηλαδή η δόνηση του αζώτου της μίας δομικής μονάδας που συνδέεται με το καρβονύλιο της επόμενης. Επίσης οι κορυφές στα 675 cm<sup>-1</sup>-730 cm<sup>-1</sup> που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών -CH=CH-, των βενζολικών δακτυλίων των τρίτυλοπροστατευτικών ομάδων απουσιάζουν στο τελικό φάσμα των πολυμερών καθώς έχουν απομακρυνθεί με τη διαδικασία της αποπροστασίας (αντίδραση με TFA και επακόλουθη διαδικασία διαπίδυσης). Άλλες χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 1102 cm<sup>-1</sup> και



στα  $2888\text{ cm}^{-1}$ , όπου βρίσκεται η δόνηση του αιθερικού δεσμού C–O–C του πολυ(αιθυλενοξειδίου).

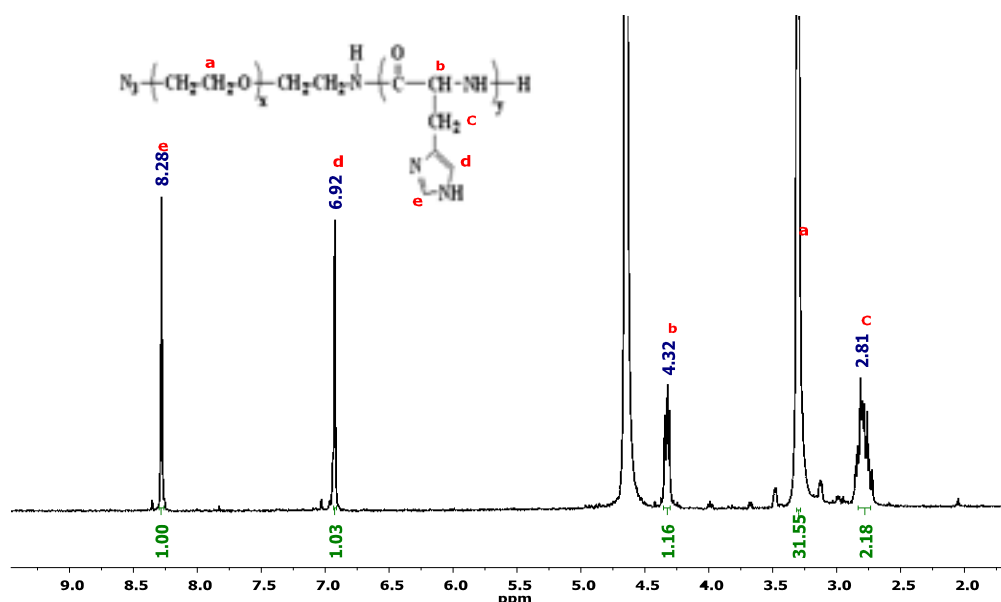
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  του μακροαπαρχητή  $\text{N}_3\text{-PEO-NH}_2$  (3.5 K) (Σχήμα 28) που χρησιμοποιήθηκε για τον ROP του  $M^{(im)}$ -Trit-His NCA καθώς και των συμπολυμερών  $\text{N}_3\text{-PEO-}b\text{-PHis}$  (Σχήματα 29, 30). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο νερό ( $\text{D}_2\text{O}$ ) με δυο σταγόνες δευτεριωμένο υδροχλώριο (DCI).



Σχήμα 28: Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  του μακροαπαρχητή  $\text{N}_3\text{-PEO-NH}_2$  (3.5 K) σε  $\text{D}_2\text{O}$  και DCI.

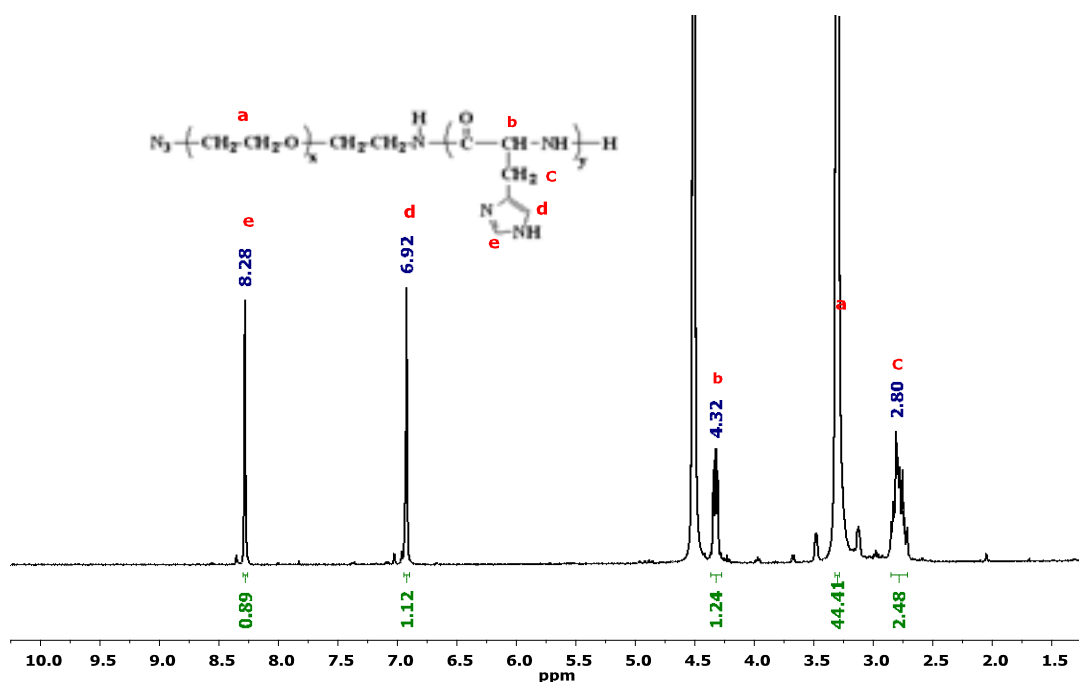
Στο φάσμα NMR του μακροαπαρχητή  $\text{N}_3\text{-PEO-NH}_2$  (3.5 K) παρατηρείται μία κορυφή η οποία αποδίδεται στα 4 ισοδύναμα υδρογόνα του πολυαιθυλενοξειδίου.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O/DCI}$ ,  $\delta$ , ppm): 3.28 (4H,  $-\underline{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}}-$ ). Η άλλη κορυφή που παρατηρείται στα 4.7 ppm είναι του διαλύτη ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Συμπεραίνουμε λοιπόν την επιτυχία στη σύνθεση καθώς και την καθαρότητα του μακροαπαρχητή.

Ακολουθώς δίνονται τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  των κατά συστάδων συμπολυμερών  $\text{N}_3\text{-PEO-}b\text{-PHis}$ .



Σχήμα 29: Φάσμα NMR του συμπολυμερούς N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHis (3.5 K– 3.5 K) μετά την αποπροστασία της PHis σε D<sub>2</sub>O και DCl.

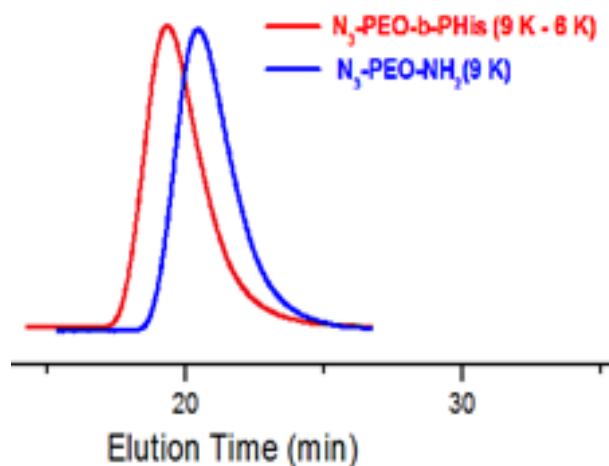
Στο παραπάνω φάσμα παρατηρούμε πως όλες οι κορυφές αντιστοιχούν στα υδρογόνα του συμπολυμερούς, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες, φανερώνοντας έτσι την επιτυχία της σύνθεσης αλλά και την καθαρότητα του συστήματος. Επίσης φαίνεται η απουσία των κορυφών που αντιστοιχούν στα υδρογόνα των τρίτυλο προστατευτικών ομάδων του NCA καθώς και των υπόλοιπων κορυφών που αντιστοιχούν στα υδρογόνα του μονομερούς φανερώνοντας την επιτυχία της αντίδρασης του ROP. Συγκεκριμένα παρατηρούνται οι εξής κορυφές <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O/DCl, δ, ppm): 3.32 (4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 8.28 (1H, -CH- του δακτυλίου της πολυιστιδίνης που βρίσκεται μεταξύ των δύο αζώτων), 6.92 (1H, -CH- του δακτυλίου της πολυιστιδίνης), 4.32 (1H, -CH- της πολυιστιδίνης που βρίσκεται δίπλα στον πεπτιδικό δεσμό) και τέλος στα 2.81 (2H, -CH<sub>2</sub>- της πολυιστιδίνης). Η κορυφή που παρατηρείται στα 4.5 ppm είναι του διαλύτη.



Σχήμα 30: Φάσμα NMR του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis (9 K- 6 K) μετά την αποπροστασία της PHis σε D<sub>2</sub>O και DCI.

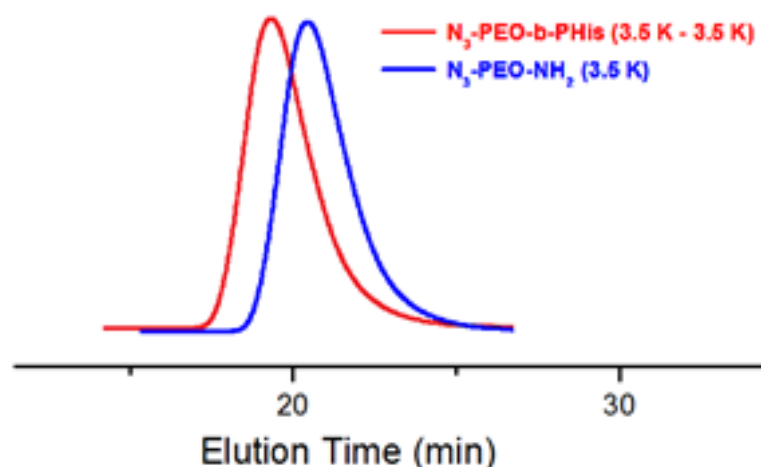
Όπως και στο προηγούμενο φάσμα παρατηρούμε πως όλες οι κορυφές αντιστοιχούν στα υδρογόνα του συμπολυμερούς, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες, φανερώνοντας έτσι την επιτυχία της σύνθεσης αλλά και την καθαρότητα του συστήματος. Και εδώ απουσιάζουν οι κορυφές που αντιστοιχούν στα υδρογόνα του NCA ενώ διακρίνονται μόνο οι επιθυμητές κορυφές του συμπολυμερούς. Συγκεκριμένα παρατηρούνται οι εξής κορυφές <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O/DCI, δ, ppm): 3.32 (4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 8.28 (1H, -CH- του δακτυλίου της πολυιστιδίνης που βρίσκεται μεταξύ των δύο αζώτων), 6.92 (1H, -CH- του δακτυλίου της πολυιστιδίνης), 4.32 (1H, -CH- της πολυιστιδίνης που βρίσκεται δίπλα στον πεπτιδικό δεσμό και τέλος στα 2.80 (2H, -CH<sub>2</sub>- της πολυιστιδίνης). Η κορυφή που παρατηρείται στα 4.5 ppm είναι του διαλύτη.

Τα συμπολυμερή χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) προκειμένου να ελεγχθεί η κατανομή μοριακών βαρών αλλά και η επιτυχία του πολυμερισμού. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη νερό. Τα ληφθέντα χρωματογραφήματα (Σχήματα 31, 32) παρατίθενται και σχολιάζονται παρακάτω.



Σχήμα 31: Χρωματογραφήματα SEC του συμπολυμερούς  $N_3$ -PEO-*b*-PHIs (9K– 6K) μετά την αποπροστασία της PHIs και του μακροαπαρχητή  $N_3$ -PEO-NH<sub>2</sub> (9K) σε διαλύτη νερό.

Από το παραπάνω χρωματογράφημα παρατηρούμε ότι οι καμπύλες είναι ομοιόμορφες με στενή στενή κατανομή μοριακών βαρών. Οι κατανομές βρέθηκαν, για το συμπολυμερές και τον μακροαπαρχητή,  $I=1.15$  και  $I=1.07$  αντίστοιχα. Επίσης όπως είναι το λογικό το συμπολυμερές που έχει και το μεγαλύτερο μοριακό βάρος απαιτεί μικρότερο χρόνο έκλουσης σε σχέση με τον απαρχητή που έχει μικρότερο μοριακό βάρος και άρα κατακρατείται περισσότερο χρόνο στη στήλη.



Σχήμα 32: Χρωματογραφήματα SEC του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHIs (3.5K–3.5K) μετά την αποπροστασία της PHIs και του μακροαπαρχητή  $N_3$ -PEO-NH<sub>2</sub> (3.5K) σε διαλύτη νερό.

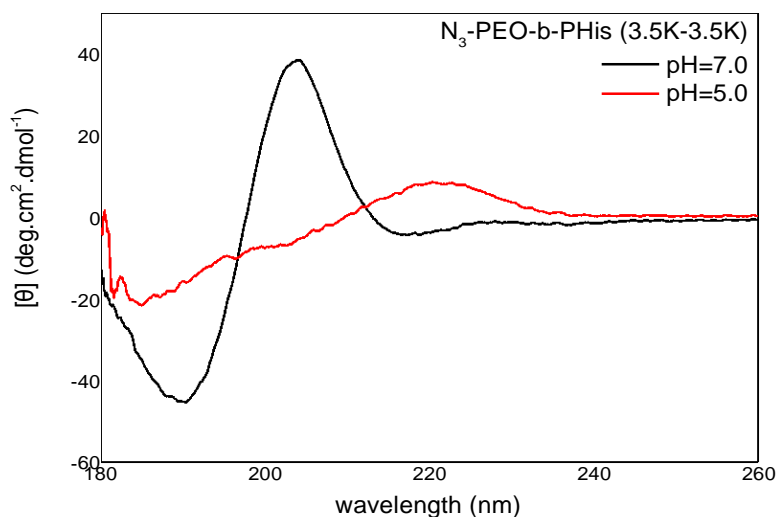
Και σε αυτό το χρωματογράφημα παρατηρούμε ότι οι καμπύλες είναι ομοιόμορφες με στενή στενή κατανομή μοριακών βαρών. Οι κατανομές βρέθηκαν, για το συμπολυμερές και τον μακροαπαρχητή,  $I=1.18$  και  $I=1.06$  αντίστοιχα. Επίσης και εδώ το συμπολυμερές που έχει και το μεγαλύτερο μοριακό βάρος απαιτεί μικρότερο χρόνο έκλουσης σε σχέση με τον απαρχητή που έχει μικρότερο μοριακό βάρος και άρα κατακρατείται περισσότερο χρόνο στη στήλη.

Συνεπώς και από τα χρωματογραφήματα SEC φαίνεται η επιτυχία στη σύνθεση και η καθαρότητα του συστήματος.

## **4.2 Μελέτη Αυτο-Οργάνωσης των pH-Αποκρινόμενων Συμπολυμερών N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHis**

### **Μελέτη δευτεροταγούς δομής μέσω του κυκλικού διχρωισμού (CD)**

Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής του συμπολυμερούς N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHis (3.5K -3.5K) σε τιμές pH 7.0, 6.5 και 5.0 πραγματοποιήθηκε μέσω μετρήσεων κυκλικού διχρωϊσμού. Η επιλογή των συγκεκριμένων τιμών pH είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη συμπεριφορά της πολυιστιδίνης σε συνθήκες ζωντανού οργανισμού. Η ρύθμιση του pH επετεύχθη ξεκινώντας από νερό Milli-Q και με επακόλουθη προσθήκη σταγόνων υδατικού διαλύματος HCl 0.1N, το οποίο μετρήθηκε με ψηφιακό πεχάμετρο, έτσι ώστε να μειώνεται σταδιακά το pH και να λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα σε κάθε ενδιάμεση τιμή. Τα ληφθέντα φάσματα παρατίθενται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 33).

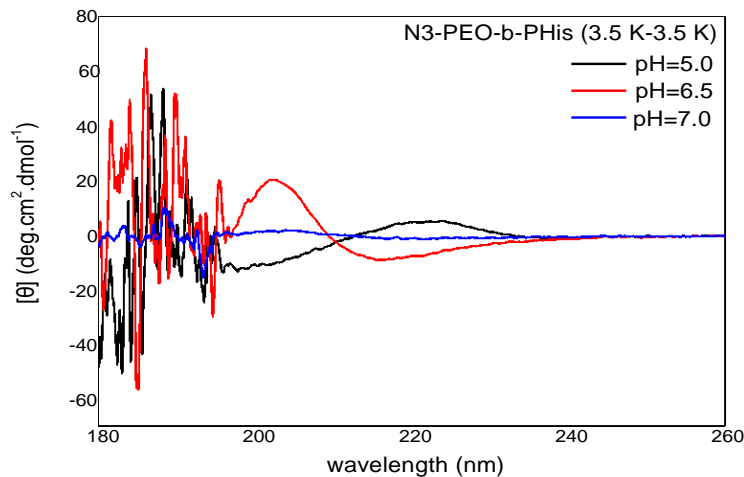


**Σχήμα 33: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού του πολυμερούς N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHis (3.5 K - 3.5 K) σε pH 7.0 και 5.0 αντίστοιχα.**

Από το παραπάνω φάσμα φαίνεται ότι σε pH 7.0 η επικρατούσα δευτεροταγής δομή ήταν η β-στοφή καθώς παρατηρήθηκε στο φάσμα μια θετική κορυφή γύρω στα 200 nm και μια αρνητική γύρω στα 220 nm. Σε χαμηλότερα pH πραγματοποιείται μετάβαση της δευτεροταγούς δομής του πολυμερούς από β-στροφή, η οποία επικρατεί σε υψηλές τιμές pH, σε δομή τυχαίου σπειράματος όσο η τιμή του pH ελαττώνεται. Έτσι σε pH 5.0 το πολυμερές έχει αποκλειστικά τη μορφή τυχαίου σπειράματος παρουσιάζοντας μια αρνητική κορυφή στα 190 nm και μια θετική γύρω στα 220 nm.

Σε pH 7.4 οι δομικές μονάδες της πολυ(L-ιστιδίνης) είναι αποπρωτονιωμένες και άρα είναι ακόμα υδρόφοβες, όσο όμως το pH ελαττώνεται, η PHis πρωτονιώνεται χάνοντας σταδιακά τον υδρόφοβο χαρακτήρα της. Η πρωτονίωση αυτή δημιουργεί απωστικές δυνάμεις μεταξύ των αλυσίδων, αποτρέποντας έτσι την οργάνωση σε β-στροφή.

Επίσης προκειμένου να γίνουν οι συνθήκες παρόμοιες με του ζωντανού οργανισμού έγιναν μετρήσεις και στα δείγματα τα οποία προήλθαν από τη διάλυση του πολυμερούς σε buffers αντί για νερό. Για το pH 7.0 χρησιμοποιήθηκε PBS buffer 10 mM και NaCl 150 mM, για το pH 6.5 MES buffer 10 mM και NaCl 150 mM ενώ για το pH 5.0 χρησιμοποιήθηκε Acetate buffer 10 mM και NaCl 150 mM. Τα προκύπτοντα φάσματα φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



**Σχήμα 34: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού του πολυμερούς N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHis (3.5 K - 3.5 K) σε pH 5.0, 6.5 και 7.0 αντίστοιχα.**

Και από αυτά τα φάσματα προκύπτει ότι σε pH 7.0 και 6.5 το πολυμερές έχει τη δομή β-στροφής παρουσιάζοντας μια θετική κορυφή γύρω στα 200 nm και μια αρνητική γύρω στα 220 nm, ενώ σε pH 5.0 έχει τη δομή τυχαίου σπειράματος παρουσιάζοντας μια αρνητική κορυφή στα 190 nm και μια θετική γύρω στα 220 nm. Ο θόρυβος που παρατηρείται μεταξύ 180 – 190 nm πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία NaCl.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι υψίστης σημασίας καθώς φανερώνουν την pH-αποκρισιμότητα των κατά συστάδων συμπολυμερών N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHis, η οποία γίνεται αντιληπτή με την αλλαγή της δευτεροταγούς δομής του συμπολυμερούς σε μεταβολή του pH. Συγκεκριμένα σε pH γύρω στο 7.4 δηλαδή στο pH του αίματος το συμπολυμερές είναι σταθερό έχοντας τη δομή β-στροφής, ενώ σε μικρότερα pH μεταβάλλει τη δομή του σε τυχαίο σπείραμα. Το φαινόμενο αυτό εξυπηρετεί πλήρως τον εγκλωβισμό και την εκλεκτική απελευθέρωση φαρμάκων.

### **Μελέτη της αυτοοργάνωσης και του μεγέθους των συμπολυμερών μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)**

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

Για την μέτρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη κυψελίδα. Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα με γωνία σκέδασης 90° και θερμοκρασία 37°C. Οι μετρήσεις έγιναν αρχικά σε pH 7.4 και 5.0 για να διερευνηθεί η μεταβολή στη δομή που προκαλείται από την αλλαγή του pH. Τα δείγματα αυτά προέρχονται από διάλυση του πολυμερούς σε νερό από milliQ. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν και στα δείγματα τα οποία προήλθαν από τη διάλυση του πολυμερούς σε buffers αντί για νερό. Για το pH 7.4 χρησιμοποιήθηκε PBS buffer 10 mM και NaCl 150 mM, για το pH 6.5 χρησιμοποιήθηκε MES buffer 10 mM και NaCl 150 mM ενώ για το pH 5.0 χρησιμοποιήθηκε Acetate buffer 10 mM και NaCl 150 mM.

Παρακάτω απεικονίζονται σε πίνακες τα αποτελέσματα του DLS και SLS για το πολυμερές N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHis (3.5 K – 3.5 K) σε pH 7.4 και 5.0 σε νερό milliQ καθώς και σε pH 7.4, 6.5 και 5.0 στα αντίστοιχα buffers. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν σε θερμοκρασία 37°C γωνία 90°.

**Πίνακας 6: Μετρήσεις DLS για πολυμερές N<sub>3</sub>-PEO-*b*-PHis (3.5 K – 3.5 K) σε θερμοκρασία 37°C και γωνία 90°**

Δείγμα	pH	Int	pdi	Contin Rh (nm)	Wp%
N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis σε milliQ	7.4	680	0.381	55.93	98.54
N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis σε milliQ	5.0	77	0.463	124.3	91
N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis σε PBS buffer/NaCl 150 mM	7.4	1011	0.461	135	24.87
				728.5	39.54
N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis σε MES buffer/NaCl 150 mM	6.5	843	0.369	1) 286.5	1) 62
				2) 4.725	2) 25
N <sub>3</sub> -PEO- <i>b</i> -PHis σε ACETATE buffer/NaCl 150 mM	5.0	680	0.460	1) 268.8	1) 43
				2) 3.850	2) 49



Όπου **Intensity** είναι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, **pdi** είναι η πολυδιασπορά του συστήματος, **Rh** είναι η υδροδυναμική ακτίνα η οποία υπολογίζεται με τη χρήση του αλγόριθμου contin και το **wp%** υποδηλώνει το ποσοστό του πληθυσμού.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι με τη μείωση του pH η υδροδυναμική ακτίνα (Rh) αυξάνεται και αυτό συμβαίνει, γιατί φορτίζονται οι αλυσίδες της πολυιστιδίνης με αποτέλεσμα τα συσσωματώματα να φουσκώνουν επειδή οι αλυσίδες απωθούνται και θέλουν να είναι πιο υδατοδιαλυτές. Γενικότερα για τιμή της Rh κάτω από 70-80 nm μπορούμε να συμπεράνουμε ότι έχουμε **μικκύλια**, ενώ για πάνω από 70-80 nm έχουμε **κυστίδια**. Πολύ μεγαλύτερες τιμές της Rh από αυτές μας δείχνουν συσσωμάτωμα, ενώ τιμές πάνω από 300 nm μας δείχνουν **συσσωμάτωμα συσσωματωμάτων**.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Από τη συγκεκριμένη πειραματική προσπάθεια διεξήχθησαν κάποια συμπεράσματα. Αρχικά διαπιστώθηκε ότι η σύνθεση του  $N^{(im)}$ -Trt-His NCA καθώς και των συμπολυμερών  $N_3$ -PEO-*b*-PHis ολοκληρώθηκε με επιτυχία σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τα φάσματα NMR και IR καθώς και από τη SEC. Επίσης από τα αποτελέσματα του κυκλικού διχρωισμού διαπιστώθηκε ότι το συμπολυμερές  $N_3$ -PEO-*b*-PHis έχει διαμόρφωση β-στροφής σε pH 7.4 ενώ όσο χαμηλώνει το pH και συγκεκριμένα σε τιμή 5.0 λαμβάνει τη διαμόρφωση του τυχαίου σπειράματος. Τα αποτελέσματα αυτά είναι υψίστης σημασίας καθώς φαίνεται η pH-αποκριμότητα της πολυιστιδίνης. Έτσι το πολυμερές αυτό έχει την ικανότητα να μεταβάλλει τη δευτεροταγή δομή του με μεταβολή του pH. Συγκεκριμένα σε τιμή pH 7.4 διατηρεί σταθερή τη δομή του ενώ σε pH 6.5 που βρίσκεται στα καρκινικά κύτταρα μεταβάλλει τη δομή του ώσπου τελικά σε pH 5.0 λαμβάνει τη μορφή τυχαίου σπειράματος. Επιπροσθέτως, από μετρήσεις που έγιναν με DLS διαπιστώθηκε ότι το πολυμερές έχει μικκυλιακές και κυστιδιακές δομές ενώ όσο μικραίνει το pH το  $R_h$  αυξάνει λόγω της πρωτονίωσης της ιστιδίνης, καταστροφής της δευτεροταγούς δομής του και συνεπώς αύξησης της υδροφιλικότητας, φαινόμενο το οποίο εξυπηρετεί την εκλεκτική απελευθέρωση των φαρμάκων.

Παρά τα θετικά και ελπιδοφόρα αποτελέσματα το παραπάνω σύστημα επιδέχεται σημαντικές βελτιώσεις. Επόμενος λοιπόν στόχος θα είναι η πρόσδεση ομάδων που θα ενισχύουν την αποκρισιμότητα του πολυμερούς έναντι του καρκινικού στόχου πέρα από την απόκριση που έχει στο pH. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εισαγωγή φολικού οξέος στα άκρα των αλυσίδων του πολυαιθυλενοξειδίου, καθώς υποδοχείς του φολικού οξέος υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα. Άλλος μελλοντικός στόχος είναι ο εγκλωβισμός κάποιου αντικαρκινικού φαρμάκου στο πολυμερές και η εξεύρεση του κατάλληλου πολυμερικού συστήματος και συνθηκών για όσο το δυνατόν καλύτερη δέσμευση αλλά και εκλεκτική αποδέσμευση του φαρμάκου.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

**Πίνακας Α:** Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος Όρος	Ελληνικός Όρος
$\beta$ -Turn	$\beta$ -Στροφή
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
Nuclear Overhauser effect	Πυρηνικό φαινόμενο Overhauser
Size exclusion chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Gel permeation chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Stern layer	Στρώμα Stern
Diffuse layer	Διάχυτη στιβάδα
Backscattered	Οπισθοσκεδαζόμενος
Condenser lens	Φακός συμπίκνωσης
Spot size	Διάμετρος δέσμης
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
Na/K alloy	Κράμα μεταλλικού νατρίου και καλίου
Break-seal	Υάλινος υμένας αμπούλας
“Click” reactions	Αντιδράσεις κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκινίου
Milli-Q	Απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό υψηλής καθαρότητας
Freeze-drying	Λυοφιλοποίηση
Mesoporous silica nanoparticles	Μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίας
Grafting to	Εμβολιασμός σε
Grafting from	Εμβολιασμός από

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

**Πίνακας Β:** Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

ρI	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
D <sub>3</sub>	Εξαμεθυλ(κυκλοτρισιλοξάνη)
PDMS	Πολυ(διμεθυλοσιλοξάνη)
HVT	Τεχνικές υψηλού κενού
NAM	Κανονικός μηχανισμός αμινών
AMM	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
bi <sub>2</sub> y	2,2'-Διπυριδίνη
COD	1,5-Κυκλοοκταδιένιο
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
SOCl <sub>2</sub>	Θειονυλοχλωρίδιο
Et <sub>3</sub> N	Τριαθυλαμίνη
GSH	Γλουταθειόνη
IR	Υπέρυθρη ακτινοβολία
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
SEC (ή GPC)	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
CD	Κυκλικός διχρωϊσμός
cm <sup>-1</sup>	Κυμματάρια
J	Σταθερά σύζευξης
NOE	Nuclear Overhauser effect
UV-Vis	Υπεριώδες-ορατό

HVL	Γραμμή υψηλού κενού
CaH <sub>2</sub>	Υδρίδιο του ασβεστίου
<i>n</i> -BuLi	Κανονικό βουτυλολίθιο
DCM (ή CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Διχλωρομεθάνιο
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
BOC-His(Trt)-OH	<i>N</i> <sub>α</sub> -BOC- <i>N</i> <sup>(im)</sup> -trityl-L-histidine
NaHCO <sub>3</sub>	Όξινο ανθρακικό νάτριο
PEO (ή PEG)	Πολυ(αιθυλενοξειδίο) (ή Πολυ(αιθυλενογλυκόλη))
PHis	Poly(L-Histidine)
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
( <i>i</i> Pr) <sub>3</sub> SiH	Τρισοππροπυλοσιλάνιο
CDCl <sub>3</sub>	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. N. Sewald, H.-D. Jakubke, Peptides: Chemistry and Biology, 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2002.
2. C. Alemán, A. Bianco, M. Venanzi, Peptide Materials: From Nanostructures to Applications, 1<sup>st</sup> ed. John Wiley & Sons, Ltd: United Kingdom, 2013.
3. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, Synthesis of well-defined polypeptide-based materials via the ring-opening polymerization of  $\alpha$ -amino acid N-carboxyanhydrides, Chem. Rev. 2009, 109, 5528-5578.
4. M. L. Adams, A. Lavasanifar, G. S. Kwon, Amphiphilic block copolymers for drug delivery, J. Pharm. Sci. 2003, 92, 1343-1355.
5. M. Lazzari, G. Liu, S. Lecommandoux, Block Copolymers in Nanoscience, 1<sup>st</sup> ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2006.
6. M. Li, Z. Tang, H. Sun, J. Ding, W. Song, X. Chen, pH and reduction dual-responsive nanogel cross-linked by quaternization reaction for enhanced cellular internalization and intracellular drug delivery, Polym. Chem. 2013, 4, 1199-1207.
7. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry, 6<sup>th</sup> ed. W. H. Freeman: New York, 2007
8. N. L. Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006
9. L. Stryer, J.M. Berg, and J.L. Tymoczko, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Τόμος Ι, 3η έκδοση, 2006
10. J. McMurry, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Τόμος Ι Ι, 5η έκδοση, 2006.
11. Sewald, N , Jakubke , H , Peptides: Chemistry and Biology, Wiley, 2002, pp. 62-67
12. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry, 6th ed. W. H. Freeman: New York, 2007.
13. Ε. Γκίκας, Αμφίφιλα Πολυπεπτίδια: Σύθεση, Χαρακτηρισμός και Μελέτη Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2012
14. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, Synthesis of well-defined polypeptide-based materials via the ring-opening polymerization of  $\alpha$ -amino acid N-carboxyanhydrides, Chem. Rev. 2009, 109, 5528-5578.

- 15.G. S. Kumbar, C. T. Laurencin, M. Deng, Natural and Synthetic Biomedical Polymers, 1<sup>st</sup> ed. Elsevier Inc.: Burlington, 2014.
- 16.B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine, 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier Academic Press: Oxford, 2013.
- 17.A. Καρατζάς, Μακρομοριακή Αρχιτεκτονική Πολυπεπτιδίων. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2007.
- 18.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, Macromol. Biosci. 2014, 14, 1222-1238.
- 19.C. Deng, J. Wu, R. Cheng, F. Meng, H.-A. Klok, Z. Zhong, Functional polypeptide and hybrid materials: Precision synthesis via  $\alpha$ -amino acid N-carboxyanhydride polymerization and emerging biomedical applications, Prog. Polym. Sci. 2014, 39, 330-364.
20. C. He, X. Zhuang, Z. Tang, H. Tian, X. Chen, Stimuli-sensitive synthetic polypeptide-based materials for drug and gene delivery, Adv. Healthcare Mater. 2012, 1, 48-78.
- 21.Creighton, T. E., Proteins: Structures and molecular properties, W. H. Freeman, 1983, p. 235
- 22.R. Merrifield, Science, 150, 178, 1965
- 23.R. Merrifield, J. Stewart, Nature, 207, 522, 1966
- 24.R. B. Merrifield, Biopolymer Synthesis on Solid Support, Pure and Appl. Chem., 1978, Vol. 50, pp 643-653
- 25.M. Bodansky, A. Bodansky, The practice of peptide synthesis, 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag: New York, 1993
- 26.Styer, L., Βιοχημεία, Έκδοση 5<sup>η</sup>, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2001, pp. 73-141.
- 27.Jackson, D. A, Symons, R. H. and Berg, P., Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia Coli, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1972, 69, pp. 2904-2909.
- 28.Bernfield, M. R. and Nirenberg, M. W., RNA Codewords and Protein Synthesis. The Nucleotide Sequences of Multiple Codewords for Phenylalanine, Serine, Leucine and Proline, Science 1965, 147, 479-484.



29. M. Goodman, J. Hutchison, The mechanisms of polymerization of N-unsubstituted N-carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 3627-3630.
30. T. J. Deming, Synthesis and self-assembly of well-defined block copolypeptides via controlled NCA polymerization, *Adv. Polym. Sci.* 2013, 262, 1-38.
31. T. J. Deming, *Peptide-Based Materials*, 1<sup>st</sup> ed. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2012.
32. O. Nuyken, S. D. Pask, Ring-opening polymerization—An introductory review, *Polymers* 2013, 5, 361-403.
33. P. Dubois, O. Coulembier, J.-M. Raquez, *Handbook of Ring-Opening Polymerization*, 1<sup>st</sup> ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2009.
34. M. Idelson, E. R. Blout, Polypeptides XVII. A kinetic study of the polymerization of amino acid N-carboxyanhydrides initiated by strong bases, *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 2387-2393
35. T. J. Deming, Facile synthesis of block copolypeptides of defined architecture, *Nature* 1997, 390, 386-389.
36. T. J. Deming, Amino acid derived nickelacycles: Intermediates in nickel-mediated polypeptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 4240-4241.
37. T. J. Deming, Cobalt and iron initiators for the controlled polymerization of  $\alpha$ -amino acid-N-carboxyanhydrides, *Macromolecules* 1999, 32, 4500-4502.
38. T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, Living polypeptides, *Biomacromolecules* 2004, 5, 1653-1656
39. H. R. Kricheldorf,  *$\alpha$ -Aminoacid N-carboxyanhydrides and Related Heterocycles*, 1<sup>st</sup> ed. Springer-Verlag: New York, 1987.
40. H. R. Kricheldorf, Polypeptides and 100 years of chemistry of  $\alpha$ -amino acid N-carboxyanhydrides. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 5752-5784
41. A. L. Levy, Anhydro-N-carboxy-DL- $\beta$ -phenylalanine, *Nature*, 1950, 165, 152-153.
42. D. Coleman, A. C. Farthing, Synthetic polypeptides, Part I. Synthesis of oxazolid-2,5-diones and a new reaction of glycine, *J. Am. Chem. Soc.* 1950, 72, 3218-3222.
43. G. J. M. Habraken, M. Peeters, C. H. J. T. Dietz, C. E. Koning, A. Heise, How controlled and versatile is N-carboxy anhydride (NCA) polymerization at 0 °C? Effect of temperature on homo-, block- and graft (co)polymerization, *Polym. Chem.* 2010, 1, 514-524
44. J. Shi, A. R. Votruba, O. C. Farokhzad, R. Langer, Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications, *Nanolett.* 2010, 10, 3223-3230.

45. S. K. Sahoo, V. Labhasetwar, Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discovery Today* 2003, 8, 1112-1120.
46. O. C. Farokhzad, R. Langer, Impact of nanotechnology on drug delivery, *ACS Nano* 2009, 3, 16-20.
47. M. M. Amiji, *Nanotechnology for Cancer Therapy*, 1st ed. Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, 2007.
48. J. L. Arias, *Nanotechnology and Drug Delivery, Volume 1: Nanoplatfoms in Drug Delivery*, 1st ed. Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, 2015
49. E. P. Holowka, S. K. Bhatia, *Drug Delivery: Materials Design and Clinical Perspective*, 1st ed. Springer: New York, 2014
50. C. Demetzos, N. Pippa, Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): a mini-review, *Drug Deliv.* 2014, 21, 250-257.
51. D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* 2007, 2, 751-760.
52. R. Duncan, The drawing era of polymer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 2, 347-360.
53. D. Douroumis, A. Fahr, *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*, 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd: United Kingdom, 2013.
54. X. Chen, S. Wong, *Cancer Theranostics*, 1st ed. Elsevier Academic Press: San Diego, 2014.
55. U. Kedar, P. Phutane, S. Shidhaye, V. Kadam, Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting, *Nanomedicine* 2010, 6, 714-729.
56. Σ. Βάρλας, Εγκλωβισμός Φαρμάκων σε Πολυπεπτίδια. Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2014
57. T. J. Deming, Synthetic polypeptides for biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 858-875.
58. S. Salmaso, P. Caliceti, Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers, *J. Drug Deliv.* 2013, Article ID 374252, 19 pages
59. J. Huang, A. Heise, Stimuli responsive synthetic polypeptides derived from N-carboxyanhydride (NCA) polymerization, *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 7373-7390.
60. S. Zhang, Z. Li, Stimuli-responsive polypeptide materials prepared by ring-opening polymerization of  $\alpha$ -amino acid N-carboxyanhydrides, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 2013, 51, 546-555.

61. Y. Shen, X. Fu, W. Fu, Z. Li, Biodegradable stimuli-responsive polypeptide materials prepared by ring opening polymerization, *Chem. Soc. Rev.* 2015, 44, 612-622.
62. P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review, *Cancer Res.* 1989, 49, 6449-6465.
63. 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, *Polym. Chem.* 2014, 5, 6256-6278.
64. Y. Li, D. Maciel, J. Rodrigues, X. Shi, H. Tomás, Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery, *Chem. Rev.* 2015, 115, 8564-8608.
65. P. Bilalis, S. Varlas, A. Kiafa, A. Velentzas, D. Stravopodis, H. Iatrou, Preparation of hybrid triple-stimuli responsive nanogels based on poly(L-histidine), *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2016, 54, 1278-1288
66. P. Midoux, C. Pichon, J.-J. Yaouanc, P. A. Jaffrès, Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers, *Br. J. Pharmacol.* 2009, 157, 166-178.
67. 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, *J. Control. Release*, 2009, 137, 25-30.
68. M. K. Joo, M. H. Park, B. G. Choi, B. Jeong, Reverse thermogelling biodegradable polymer aqueous solutions, *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 5891-5905.
69. J. Huang, C. L. Hastings, G. P. Duffy, H. M. Kelly, J. Raeburn, D. J. Adams, A. Heise, Supramolecular hydrogels with reverse thermal gelation properties from (oligo)tyrosine containing block copolymers, *Biomacromolecules* 2013, 14, 200-206.
70. R. K. O'Reilly, C. J. Hawker, K. L. Wooley, Cross-linked block copolymer micelles: functional nanostructures of great potential and versatility, *Chem. Soc. Rev.* 2006, 35, 1068-1083.
71. B. Gyarmati, Á. Némethy, A. Szilágyi, Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications, *Eur. Polym. J.* 2013, 49, 1268-1286.
72. R. L. McCarley, Redox-responsive delivery systems, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2012, 5, 391-411.

73. M. Huo, J. Yuan, L. Tao, Y. Wei, Redox-responsive polymers for drug delivery: from molecular design to applications, *Polym. Chem.* 2014, 5, 1519-1528.
74. R. Cheng, F. Feng, F. Meng, C. Deng, J. Feijen, Z. Zhong, Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery, *J. Control. Release* 2011, 152, 2-12.
75. X. Chang, L. Liu, Y. Guan, C.-M. Dong, Disulfide-centered star-shaped polypeptide-PEO block copolymers for reduction-triggered drug release, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2014, 52, 2000-2010.
76. G. Liu, L. Zhou, Y. Guan, C.-M. Dong, Multi-responsive polypeptidosome: characterization, morphology transformation, and triggered drug delivery, *Macromol. Rapid Commun.* 2014, 35, 1673-1678.
77. H. Zhu, C. Dong, H. Dong, T. Ren, X. Wen, J. Su, Y. Li, Cleavable PEGylation and hydrophobic histidylation of polylysine for siRNA delivery and tumor gene therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 10393-10407
78. B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1<sup>st</sup> ed. Wiley: Weinheim, 2004.
79. J. McMurry, *Organic Chemistry*, 7<sup>th</sup> ed. Thomson Learning, Inc: Belmont, 2008.
80. N. Χατζηχρηστίδης, Κ. Βύρας, Ε. Ιατρού, Σ. Πίσπας, Μ. Πιτσικάλης, Π. Πίσσης, Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, 1998.
81. Δ. Σκουλάς, Σύνθεση Συμπολυμερών Πολυαιθυλενοξειδίου και Ιστιδίνης με γ-Βενζυλεστέρα του Γλουταμικού Οξέος και Επίδραση του Εστέρα στο pKa της Πολυιστιδίνης. Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2014
82. Zimm, J., The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions, *J. Chem. Phys.*, 1948, 16, 1093
83. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, Anionic polymerization: High vacuum techniques, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2000, 38, 3211-3234.
84. D. Uhrig, J. W. Mays, Experimental techniques in high-vacuum anionic polymerization, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2005, 43, 6179-6222.
85. N. Hadjichristidis, A. Hirao, *Anionic Polymerization: Principles, Practice, Strength, Consequences and Applications*, 1<sup>st</sup> ed. Springer: Japan, 2015.
86. 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, 15, 3412-3420