



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 ιδιότητες
ομοπολυμερών πολυφαινυλαλανίνης και υβριδικών
συμπολυμερών πολυαιθυλενοξειδίου, πολυϊστιδίνης
και πολυφαινυλαλανίνης**

**ΡΟΥΜΕΛΙΩΤΗ ΝΙΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση, χαρακτηρισμός και ιδιότητες ομοπολυμερών πολυφαινυλαλανίνης και υβριδικών συμπολυμερών πολυαιθυλενοξειδίου, πολύϊστιδίνης και πολυφαινυλαλανίνης

ΡΟΥΜΕΛΙΩΤΗ ΝΙΚΗ

A.M.: 171008

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

28/06/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση δύο ομοπολυμερών φαινυλαλανίνης με πέντε και δέκα δομικές μονάδες φαινυλαλανίνης αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας ως απαραίτητη πολυμερισμού την απλούστερη δευτεροταγή αμίνη, την διμεθυλαμίνη. Επίσης πραγματοποιήθηκε η σύνθεση δύο τρισυσταδικών συμπολυμερών τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με διαφορετικές ποσότητες φαινυλαλανίνης στο άκρο της αλυσίδας και συγκεκριμένα πέντε και δέκα αντίστοιχα. Η σύνθεση τόσο των ομοπολυμερών όσο και των συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των αντίστοιχων προστατευμένων N-καρβοξυ ανυδριτών (μονομερή) με χρήση αμινο-τελικού πολυαιθυλενοξειδίου (m-PEO-NH₂) ως μακροαπάρχητη για τα δύο συμπολυμερή. Για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών, τον καθαρισμό των διαλυτών, αλλά και των τελικών συμπολυμερών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού, εξασφαλίζοντας υψηλή καθαρότητα στο σύστημα. Η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR), και της φασματοσκοπίας υπεριώθρου (FT-IR), όπως επίσης μέσω φασματοφωτομέτρου ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) για τα δύο συμπολυμερή. Επιπλέον μελετήθηκε η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων από το pH και τη θερμοκρασία με την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού (CD). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα αυτό-οργάνωσης και το μέγεθος των συντιθέμενων πολυμερών. Απώτερος στόχος είναι η δημιουργία σταθερών και αποκρίσιμων σε καρκινικό περιβάλλον νανοδομών που θα χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές στοχευμένης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων στους καρκινικούς ιστούς.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

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

ABSTRACT

In the present research project is presented the synthesis of two homopolymers, pentapolymer and decapolymer, based on L-phenylalanine, that synthesized through the ring opening polymerization (ROP) of the corresponding N-carboxyanhydride. For the synthesis of the well-defined homopolymers, the initiators were the secondary amine, dimethylamine. Furthermore, two copolymers PEO-*b*-PHis-*b*-Phe, with different amount of phenylalanine was achieved, using an amine end-functionalized poly (ethylene oxide) m-PEO-NH₂ as macroinitiator. High-vacuum techniques were used for the synthesis of N-carboxy anhydrides of α -amino acids, for the purification of solvents and for the isolation of well-defined polymers as well, ensuring the high purity of the system. The successful synthesis of the polymers was confirmed by size exclusion chromatography (SEC), proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) and infrared spectroscopy (FT-IR), as well as phasmatophotometer ultraviolet-visible (UV-Vis). In addition, the relation between the secondary structure of the polypeptides and the pH and temperature was studied, using the technique of circular dichroism (CD). Finally, dynamic light scattering (DLS) were used, in order to investigate the ability of the polypeptides to self-assemble into micelles, as well as their size. The ultimate goal is to create novel hybrid drug delivery systems, which will be used for targeted and controlled drug release applications to treat cancer cells.

SUBJECT AREA: Polymers

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

Στην οικογένεια μου που πάντα στέκεται σαν βράχος δίπλα μου και στους ανθρώπους που πιστεύουν σε εμένα...

Η επίτευξη ενός στόχου είναι η αφετηρία του επόμενου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Αρχικά, για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Ερμόλαο Ιατρού για τη συνεργασία, την καθοδήγηση, την επιστημονική και ηθική υποστήριξη και τις συμβουλές που πάντα πρόθυμα μου παρείχε κατά την διάρκεια αυτών των δύο χρόνων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τους καθηγητές κ. Μαρίνο Πιτσικάλη και κ. Γεώργιο Σακελλαρίου, για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν στα πλαίσια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς επίσης και για την βοήθεια τους, την καθοδήγηση τους όποτε αυτή ήταν απαραίτητη και την καθημερινή παρουσία τους στο εργαστήριο που συνέβαλε στην δημιουργία ενός εξαιρετικού κλίματος.

Ευχαριστώ ακόμη τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Ιωάννη Χοινόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές, αλλά και την πρακτική βοήθειά του σε πολλά θέματα, καθώς και την κα. Julie Stain που ήταν πάντα δίπλα μας σε ότι κι αν χρειαστήκαμε.

Μέσα από την καρδιά μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω και έναν έναν όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου, υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές, για την άψογη συνεργασία και το όμορφο κλίμα που δημιουργήθηκε αυτά τα δύο χρόνια.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στους: Υποψήφιο Διδάκτορα Παναγιώτη Χριστακόπουλο, Υποψήφια Διδάκτορα Δήμητρα Σταυρουλάκη, Υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Κασιμάτη, Υποψήφια Διδάκτορα Φωτεινή Αρφαρα, Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια Ντιάνα Καζαριάν που συνεργαστήκαμε στην ίδια ερευνητική ομάδα και μου παρείχαν απλόχερα τις γνώσεις και τις εμπειρίες τους. Ακόμη πιο ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στην Υποψήφια Διδάκτορα Βαρβάρα Αθανασίου που ήταν δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια των δυο αυτών χρόνων, μου έδινε αμέριστο κουράγιο και στήριξη, μου έδειχνε απεριόριστη

εμπιστοσύνη και η εκπόνηση της παρούσας εργασίας ήταν ακόμα πιο ευχάριστη χάρη σε εκείνη. Ευχαριστώ επίσης την υποψήφια διδάκτορα Λήδα Μπήτση και την Κατερίνα Μαθιανάκη, οι οποίες με υπομονή, με «διαφώτισαν» σε πολλές επιστημονικής φύσεως απορίες μου και η βοήθεια τους αποδείχτηκε πολύτιμη κατά τη συγγραφή αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου όλους τους φίλους μου για την υπομονή κατά την διάρκεια αυτής της εργασίας και την αληθινή στήριξη τους, χωρίς την οποία δεν θα ήμουν ευτυχισμένη και ολοκληρωμένη. Επιπλέον, τον σύντροφό μου, Γιάννη, που η κατανόηση και η αγάπη που μου δείχνει τα τελευταία οκτώ χρόνια με γεμίζει δύναμη για να πραγματοποιήσω τα όνειρα μου.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να φτάσω ποτέ μέχρι εδώ χωρίς να έχω δίπλα μου την οικογένειά μου που σε κάθε μου βήμα ήταν παρούσα, με γέμιζε αγάπη και με στήριζε με κάθε τρόπο, συναισθηματικό και υλικό. Τους ευχαριστώ βαθύτατα γιατί μου δίνουν την δύναμη να κυνηγάω τα όνειρά μου και να υλοποιώ τους στόχους μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ	22
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
2.1 Επίπεδα οργάνωσης των πρωτεϊνών	24
2.1.1 Πρωτοταγής δομή	24
2.1.2 Δευτεροταγής δομή	24
2.1.3 Τριτοταγής δομή	27
2.1.4 Τεταρτοταγής δομή	27
2.2 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους και με καθορισμένη αλληλουχία	28
2.3 Σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους.....	30
2.3.1 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP).....	31
2.3.2 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων	32
2.3.2.1 Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)	33
2.3.2.2 Μηχανισμός του Blout	36
2.3.2.3 Μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM)	37
2.3.2.4 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση Συμπλόκων των Στοιχείων Μετάπτωσης	38
2.3.2.5 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με υδροχλωρικά άλατα πρωτοταγών αμινών.....	40
2.3.3. Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση Πρωτοταγών Αμινών και Τεχνικών Υψηλού Κενού.....	41
2.4 Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs).....	45
2.5 Συστήματα αποκρινόμενων πολυπεπτιδίων.....	48
2.5.1 pH-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα	51
2.5.2 Θέρμο-αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα.....	51
2.5.3 Φωτο-αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα	52
2.5.4 Ηλεκτρο-αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα	53
2.5.5 Ιοντικής-αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα.....	53
2.5.6 Οξειδοαναγωγικώς-αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα	53
2.6 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	54

2.6.1 Πολυαιθυλενοξειδίο (PEO).....	54
2.6.2 Πολυ(Ιστιδίνη) (PHis)	55
2.6.3 Φαινυλαλανίνη (Phe)	57
2.6.3.1 Πολυφαινυλαλανίνη (PPhe).....	58
2.6.4 Νανοσωματίδια Χρυσού [AuNPs, Gold (Au) Nanoparticles]	59
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ...	61
3.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR).....	61
3.2 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR).....	64
3.3 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC)	68
3.4 Κυκλικός Διχρωϊσμός Πολυπεπτιδίων (CD)	72
3.5 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	75
3.6 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).....	76
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	80
4.1 Τεχνική Υψηλού Κενού (High Vacuum Technique, HVT)	80
4.2 Καθαρισμός Διαλυτών	83
4.2.1 Οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc)	83
4.2.2 Εξάνιο (C ₆ H ₁₄).....	84
4.2.3 Βενζόλιο (C ₆ H ₆).....	84
4.2.4 Διχλωρομεθάνιο - DCM (CH ₂ Cl ₂)	85
4.2.5 Διμέθυλοφορμαμίδιο - DMF (C ₃ H ₇ NO).....	85
4.2.6 Τετραϋδροφουράνιο - THF (C ₄ H ₈ O)	86
4.3 Καθαρισμός Απαρχητών και Αντιδραστηρίων	87
4.3.1 Καθαρισμός Διμεθυλαμίνης (DMA)	87
4.3.2 Καθαρισμός Τριαιθυλαμίνης	89
4.4 Σύνθεση και καθαρισμός των Ν-καρβοξυανυδριτών	89
4.4.1 Σύνθεση του Ν-καρβοξυανυδρίτη της L-Phenylalanine (Phe NCA)·	89
4.4.2 Σύνθεση του Ν-καρβοξυανυδρίτη της L-Histidine (N ^{im} -Trt-His NCA)	93
4.4.2.1 Σύνθεση N ^{im} -Trityl-L-Histidine NCA*HCl	94
4.4.2.2 Σύνθεση N ^{im} -Trityl-L-Histidine NCA.....	97
4.4 Σύνθεση γραμμικών ομοπολυμερών φαινυλαλανίνης με πέντε και δέκα δομικές μονάδες	98
4.5 Σύνθεση γραμμικών κατά συστάδες συμπολυμερών mPEO- <i>b</i> -Poly(L- Histidine)- <i>b</i> -Poly(L-Phenylalanine) (PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe).....	103

4.5.1	Σύνθεση γραμμικού κατά συστάδες συμπολυμερούς mPEO- <i>b</i> -Poly(Trt-L-Histidine) ₂₉ - <i>b</i> -Poly(L-Phenylalanine) ₅	104
4.5.2	Εκλεκτική αποπροστασία μονομερικών μονάδων πολυϊστιδίνης (PTrtHis) για την σύνθεση του mPEO- <i>b</i> -Poly(L-Histidine) ₂₉ - <i>b</i> -Poly(L-Phenylalanine) ₅	108
4.5.3	Σύνθεση γραμμικού κατά συστάδες συμπολυμερούς mPEO- <i>b</i> -Poly(L-Histidine) ₂₉ - <i>b</i> -Poly(L-Phenylalanine) ₁₀	113
4.5.4	Σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού.....	113
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	115
5.1	Χαρακτηρισμός του N-καρβοξυανυδρίτη της L-Phenylalanine (Phe NCA)	115
5.2	Χαρακτηρισμός του N-καρβοξυανυδρίτη της Nim-Trityl-L-Histidine (Nim-Trt-L-His NCA).....	118
5.3	Χαρακτηρισμός των δύο ομοπολυμερών φαινυλαλανίνης.....	121
5.3.1	Ομοπολυμερές φαινυλαλανίνης με πέντε δομικές μονάδες	122
5.3.2	Ομοπολυμερές φαινυλαλανίνης με δέκα δομικές μονάδες.....	124
5.4	Χαρακτηρισμός των δύο συμπολυμερών PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe.....	126
5.4.1	Χαρακτηρισμός του συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -(PPhe) ₅	127
5.4.2	Χαρακτηρισμός του συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -(PPhe) ₁₀	131
5.5	Μελέτη των δύο συμπολυμερών του τύπου PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe με φασματοφωτομετρία UV-Vis	136
5.6	Μελέτη των δύο συμπολυμερών με την τεχνική του Κυκλικού Διχρωϊσμού (CD).....	138
5.7	Μελέτη αυτοοργάνωσης των δύο συμπολυμερών με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	142
5.7.1	Μελέτη αυτοοργάνωσης του συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅	143
5.7.2	Μελέτη αυτοοργάνωσης του συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀	147
5.7.3	Μελέτη αυτοοργάνωσης του συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis	151
5.8	Νανοσωματίδια Χρυσού	154
5.9	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	162
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	165
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	167

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs. .	33
Σχήμα 2: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM).	34
Σχήμα 3: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή.....	36
Σχήμα 4: Τα στάδια έναρξης και διάδοσης στον Μηχανισμό του Blout.	36
Σχήμα 5: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.	38
Σχήμα 6: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs με σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως.	40
Σχήμα 7: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.	41
Σχήμα 8: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνει χλωρίδιο και μετέπειτα N-χλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη.	43
Σχήμα 9: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών.....	46
Σχήμα 10: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης).	56
Σχήμα 11: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού (HVL).....	81
Σχήμα 12: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου...	82
Σχήμα 13: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF.	85
Σχήμα 14: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής για την παραλαβή ενώσεων χαμηλού σημείου ζέσεως.	88
Σχήμα 15: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής αραίωσης του απαρχητή.	88
Σχήμα 16: Αντίδραση σύνθεσης του ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης.	89
Σχήμα 17: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ανακρυσταλλώσεων των NCA's.....	92

Σχήμα 18: Αντίδραση σύνθεσης του προστατευμένου ανυδρίτη της L-Ιστιδίνης (N ^{im} -Trt-L-His NCA).....	94
Σχήμα 19: Αντίδραση πολυμερισμού της Phe-NCA.....	98
Σχήμα 20: Αντίδραση ROP για τον σχηματισμού του προστετευμένου συμπολυμερούς τύπου mPEO-b-PTrtHis-b-PPhe.	104
Σχήμα 21: Αντίδραση της αποπροστασίας των μονομερικών μονάδων της πολυϊστιδίνης.....	108

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Πρωτοταγής δομή πρωτεΐνης.....	24
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α έλικας και της β πτυχωτής επιφάνειας.....	25
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της β στροφής.....	26
Εικόνα 4: Τα επίπεδα οργάνωσης των πρωτεϊνών.	28
Εικόνα 5: Μερικοί χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά.....	48
Εικόνα 6: Αποκρινόμενα πολυπεπτίδια.	50
Εικόνα 7: Μέθοδοι για την σύνθεση πολυμερικών νανοσωματιδίων χρυσού. ⁶⁵	60
Εικόνα 8: Δονήσεις τάσης και κάμψης των μοριακών δεσμών.	62
Εικόνα 9: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία ¹ H-NMR.	68
Εικόνα 10: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε διαμόρφωση α-έλικας (κόκκινη καμπύλη), β-φύλλου (πράσινη καμπύλη), δομή τυχαίου σπειράματος (μπλε καμπύλη) και στροφής (πορτοκαλί καμπύλη)...	74
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση φασματοφωτομέτρου ορατού και υπεριώδους.	78
Εικόνα 12: Πρόδρομο αμινοξύ H-Phe-OH σε EtOAc πριν την προσθήκη τριφωσγενίου.	90
Εικόνα 13: Πρόδρομο αμινοξύ H-Phe-OH μετά από τρεισήμισι ώρες αντίδρασης προς σχηματισμό του L-Phe NCA.	91
Εικόνα 14: Η συσκευή ανακρυσταλλώσεων που χρησιμοποιήθηκε στον σχηματισμό του L-Phe NCA.....	93
Εικόνα 15: Αριστερά: Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(Trt)-OH σε THF αμέσως μετά την προσθήκη SOCl ₂ . Δεξιά: Μετά από 1.5 ώρα αντίδρασης προς σχηματισμό του N ^{im} -Trt-L-His-NCA*HCl.	95
Εικόνα 16: Το αρχικό προϊόν N ^{im} -trt-(L)-His*HCl NCA	96
Εικόνα 17: Απόσταξη διαλύτη στην συσκευή ομοπολυμερισμού.....	100
Εικόνα 18: Διάλυση του μονομερούς της φαινυλαλανίνης στην αμπούλα πριν τον πολυμερισμό.....	100

Εικόνα 19: Αριστερά: πρώτη ημέρα πολυμερισμού φαινυλαλανίνης. Δεξιά: τρίτη ημέρα πολυμερισμού φαινυλαλανίνης.	102
Εικόνα 20: Καταβύθιση του πολυμερούς και διήθηση υπό κενό με συσκευή διηθήσεως Buchner.	108
Εικόνα 21: Αριστερά το PEO- <i>b</i> -PTrt-His- <i>b</i> -PPhe σε διχλωρομεθάνιο. Δεξιά μετά την προσθήκη (iPr) ₃ SiH.	110
Εικόνα 22: Απομάκρυνση των διαλυτών από το πολυμερές με “short-path”.	110
Εικόνα 23: Διαδικασία διαπίδυσης (dialysis).	112
Εικόνα 24: Αριστερά η διαδικασία της λυοφιλοποίησης και δεξιά το τελικό αποπροστατευμένο πολυμερές.....	112
Εικόνα 25: Φάσματα FT-IR. Α γράφημα: Πρόδρομο αμινοξύ H-Phe-OH, Β γράφημα: Τελικός Phe NCA.....	115
Εικόνα 26: Φάσμα ¹ HNMR σε CDCl ₃ για τον Phe NCA.	117
Εικόνα 27: Φάσματα FT-IR κατά την πορεία σύνθεσης του N ^{im} -Trt-L-His NCA. Α γράφημα: Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(trt)-OH, Β γράφημα: Σχηματισμός N ^{im} -Trt-L-His NCA*HCl 1 ώρα μετά την προσθήκη SOCl ₂ , C γράφημα: Τελικός N ^{im} -Trt-L-His.....	118
Εικόνα 28: Φάσματα FT-IR κατά την πορεία σύνθεσης του N ^{im} -Trt-L-His NCA*HCl μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου χλωρίωσης.	120
Εικόνα 29: Φάσμα ¹ HNMR σε CDCl ₃ για τον τελικό N ^{im} -Trt-L-His NCA.	120
Εικόνα 30: Φάσμα FT-IR του Phe NCA (μωβ γράφημα) και του πενταμερούς φαινυλαλανίνης (κόκκινο γράφημα).	122
Εικόνα 31: Φάσμα ¹ HNMR σε d-benzene + 5% TFA για το πενταμερές φαινυλαλανίνης.	123
Εικόνα 32: Φάσμα FT-IR του Phe NCA (ροζ γράφημα) και του δεκαμερούς φαινυλαλανίνης (πράσινο γράφημα).	124
Εικόνα 33: Φάσμα ¹ HNMR σε d-benzene + 5% TFA για το δεκαμερές φαινυλαλανίνης.	125
Εικόνα 34: Φάσματα FT-IR για το συμπολυμερές. Μετά την προσθήκη της συστάδας His(PEO- <i>b</i> -PTrt-His) (γαλάζιο γράφημα), Μετά την προσθήκη της συστάδας Phe (PEO- <i>b</i> -trtHis- <i>b</i> -Phe) (μπλε γράφημα), Τελικό αποπροστατευμένο συμπολυμερές (μωβ γράφημα).....	127

Εικόνα 35: Φάσμα ^1H NMR πλήρως αποπροστατευμένου συμπολυμερές PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ σε D ₂ O/DCl.	129
Εικόνα 36: Χρωματογράφημα GPC για το συμπολυμερές PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅	130
Εικόνα 37: Φάσματα FT-IR για το συμπολυμερές. Μετά την προσθήκη της συστάδας His(PEO- <i>b</i> -P _{trt} -His) (μπλε γράφημα), Μετά την προσθήκη της συστάδας Phe (PEO- <i>b</i> -trtHis- <i>b</i> -Phe) (μωβ γράφημα), Τελικό αποπροστατευμένο συμπολυμερές (κίτρινο γράφημα).	132
Εικόνα 38: Φάσμα ^1H NMR πλήρως αποπροστατευμένου συμπολυμερές PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε D ₂ O/DCl.	133
Εικόνα 39: Χρωματογράφημα GPC για το συμπολυμερές PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀	135
Εικόνα 40: Χρωματογράφημα GPC για τα συμπολυμερή PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ και PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀	136
Εικόνα 41: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis για το πολυμερές PEO- <i>b</i> -PHis και τα συμπολυμερή PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ και PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀	137
Εικόνα 42: Γράφημα CD του πολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ σε T=25°C.	139
Εικόνα 43: Γράφημα CD του πολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε T=25°C.	140
Εικόνα 44: Γράφημα CD του πολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis σε T=25°C.....	141
Εικόνα 45: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ σε pH=7.4 και θερμοκρασία 25°C.	145
Εικόνα 46: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ σε pH=6.5 και θερμοκρασία 25°C.	145
Εικόνα 47: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ σε pH=5 και θερμοκρασία 25°C.	146
Εικόνα 48: Σχηματική αναπαράσταση του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ σε pH=7.4, pH=6.5 και pH=5.	147
Εικόνα 49: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε pH=7.4 και θερμοκρασία 25°C.	149
Εικόνα 50: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε pH=6.5 και θερμοκρασία 25°C.	149

Εικόνα 51: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε pH=5 και θερμοκρασία 25°C.....	150
Εικόνα 52: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis σε pH=7.4 και θερμοκρασία 25°C.	152
Εικόνα 53: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis σε pH=6.5 και θερμοκρασία 25°C.	153
Εικόνα 54: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis σε pH=5 και θερμοκρασία 25°C.	154
Εικόνα 55: Μεταβολή των οπτικών ιδιοτήτων των διαλυμάτων των νανοσωματιδίων χρυσού σε διάφορες αναλογίες mol His/mol Au.....	155
Εικόνα 56: Συγκεντρωτικό φάσμα UV-Vis των διαλυμάτων των νανοσωματιδίων χρυσού σε διάφορες αναλογίες mol His/mol Au.....	155
Εικόνα 57: Σχηματική αναπαράσταση του νανοσωματιδίου χρυσού του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe συντιθέμενου από την αναγωγή του AuHCl ₄ από την πολυ(ιστιδίνη) στους 80°C.	156
Εικόνα 58: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ AuNP με αναλογία 9 mol His/1 mol Au.	158
Εικόνα 59: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ AuNP με αναλογία 10 mol His/1 mol Au.	159
Εικόνα 60: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀ AuNP με αναλογία 9 mol His/1 mol Au.	159
Εικόνα 61: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀ AuNP με αναλογία 10 mol His/1 mol Au.	160
Εικόνα 62: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis AuNP με αναλογία 5 mol His/1 mol Au.	160
Εικόνα 63: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO- <i>b</i> -PHis AuNP με αναλογία 10 mol His/1 mol Au.	161

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1}	64
Πίνακας 2: Απορροφήσεις των τριών διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στον κυκλικό διχρωϊσμό.	73
Πίνακας 3: Συνοπτική παρουσίαση των ποσοτήτων των δύο ομοπολυμερισμών.	102
Πίνακας 4: Ποσότητες αντιδραστηρίων και τελικές μάζες πολυμερών.	103
Πίνακας 5: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-b-PHis-b-PPhe ₅ σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 25°C.	144
Πίνακας 6: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-b-PHis-b-PPhe ₅ σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 40°C.	144
Πίνακας 7: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-b-PHis-b-PPhe ₁₀ σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 25°C.	148
Πίνακας 8: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-b-PHis-b-PPhe ₁₀ σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 40°C.	148
Πίνακας 9: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-b-PHis σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 25°C.	151
Πίνακας 10: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-b-PHis σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 40°C.	152
Πίνακας 11: Πίνακας μετρήσεων DLS για PEO-b-PHis-b-PPhe ₅ AuNPs σε θερμοκρασία 25°C και στις 90°.	157
Πίνακας 12: Πίνακας μετρήσεων DLS για PEO-b-PHis-b-PPhe ₁₀ AuNPs σε θερμοκρασία 25°C και στις 90°.	157
Πίνακας 13: Πίνακας μετρήσεων DLS για PEO-b-PHis AuNPs σε θερμοκρασία 25°C και στις 90°.	158

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Βιομηχανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη χρονική περίοδο 2018-2019, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ερμόλαου Ιατρού.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η μελέτη αποκρίσιμων ομοπολυμερών και συμπολυμερών και η μελέτη της αυτό-οργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα, με απώτερο σκοπό να αποτελέσουν έξυπνα νανοσυστήματα για τη μεταφορά και την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Το παρόν ερευνητικό θέμα προσφέρεται ως μελέτη για περαιτέρω διερεύνηση στο πεδίο των πολυπεπτιδικών νανοφορέων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς υδρόφοβων καρκινικών φαρμάκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

Μέχρι και σήμερα, η αποδοτικότερη και γρηγορότερη τεχνική για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, αποτελεί ο πολυμερισμός μέσω διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N-καρβοξυ-ανυδριτών των α-αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs). Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας για τη σύνθεση τόσο των δύο ομοπολυμερών όσο και των δύο τρισυσταδικών συμπολυμερών του γενικού τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe αφού πρώτα προηγήθηκε η σύνθεση των αντίστοιχων N-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs).

Ως μακροαπαρχητής χρησιμοποιήθηκε το PEO-NH₂ και το οποίο 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. Αντίστοιχα, ο πυρήνας των νανοδομών αποτελείται από την pH-αποκρίσιμη πολυϊστιδίνη. Η πολυϊστιδίνη, στην περιοχή pH=5.0-6.5 (όσο δηλαδή και το pH των καρκινικών ιστών), πρωτονιώνεται σε αντίθεση με τιμές του pH=7.4 (όσο δηλαδή του αίματος) που αποπρωτονιώνεται, εξαιτίας του ιμιδαζολικού δακτυλίου του μορίου.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί πως η επιτυχής σύνθεση πολυπεπτιδίων που μπορεί να προσεγγίσει επαρκέστερα τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών απαιτεί τη δυνατότητα ελέγχου της ακολουθίας των αμινοξέων καθώς επίσης και το ίδιο το μήκος αλυσίδων. Για το λόγο αυτό, παρά τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα αυτής της συνθετικής στρατηγικής, υπήρξαν και εξακολουθούν να υπάρχουν δυσκολίες στη σύνθεση αυτών των συστημάτων, όσον αφορά την εργαστηριακή προσέγγισή τους. Μερικές από αυτές είναι οι αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας κατά την διάρκεια του πολυμερισμού με αποτέλεσμα να μην είναι πάντα δυνατός ο έλεγχος του μοριακού βάρους και της κατανομής των πολυμερών που παράγονται. Επίσης, τα μονομερή είναι ανυδρίτες και είναι ευαίσθητοι στην υγρασία του αέρα και οι συνθήκες παρασκευής, καθαρισμού, φύλαξης και πολυμερισμού μέχρι τώρα με χρήση αδρανούς ατμόσφαιρας δεν επέτρεπαν τον πλήρη αποκλεισμό της υγρασίας.

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

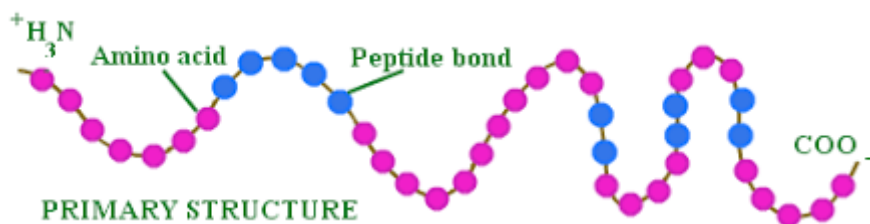
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Επίπεδα οργάνωσης των πρωτεϊνών

Στις πρωτεΐνες διακρίνονται τέσσερα επίπεδα οργάνωσης, η πρωτοταγής δομή, η δευτεροταγής δομή, η τριτοταγής δομή και η τεταρτοταγής δομή. Παρακάτω αναλύεται ξεχωριστά κάθε ένα από αυτά τα επίπεδα οργάνωσης.¹

2.1.1 Πρωτοταγής δομή

Το πρώτο επίπεδο οργάνωσης της δομής μιας πρωτεΐνης αναφέρεται ως πρωτοταγής δομή και περιλαμβάνει την αλληλουχία και τον αριθμό των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας καθώς και τις θέσεις των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ δύο καταλοίπων κυστεΐνης, εφόσον υπάρχουν (Εικόνα 1).

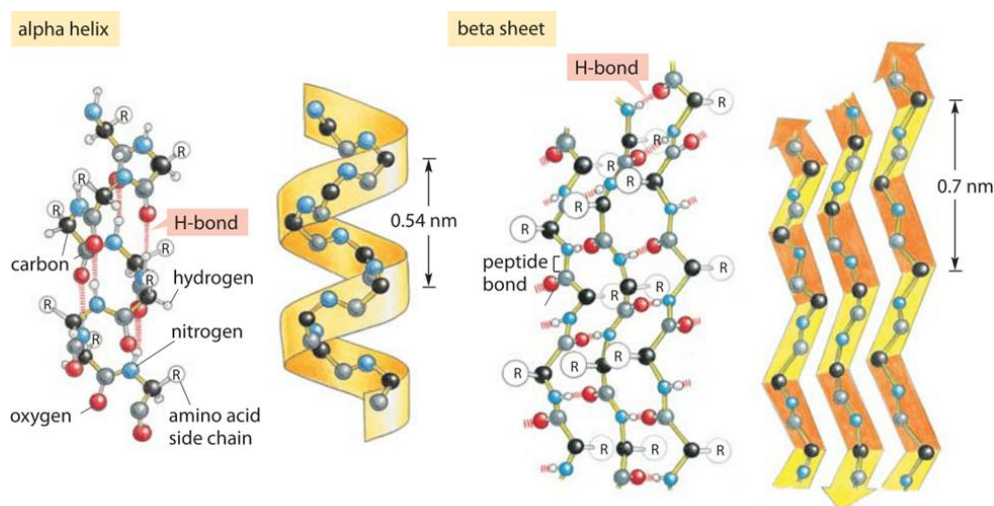


Εικόνα 1: Πρωτοταγής δομή πρωτεΐνης.

2.1.2 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 η οποία όπως προαναφέρθηκε αποκαλείται πρωτοταγής 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 (Εικόνα 2).



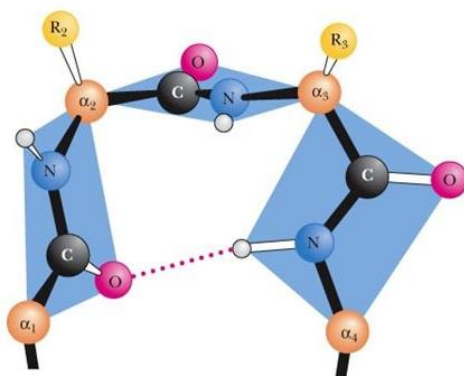
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α έλικας και της β πτυχωτής επιφάνειας.

Ειδικότερα, η α -έλικα είναι μία ραβδόμορφη δομή. Ο κορμός, που αποτελείται από την κύρια πολυπεπτιδική αλυσίδα, έχει σχήμα σπειράματος και σχηματίζει το εσωτερικό της ράβδου, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες εκτείνονται προς το εξωτερικό σε μία ελικοειδή διάταξη. Η α -έλικα, όπως προαναφέρθηκε, σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ομάδων $-NH$ και $-CO$ της κύριας αλυσίδας, οι οποίες απέχουν 4 κατάλοιπα η μία από την άλλη, με κάθε κατάλοιπο να απέχει από το επόμενο 1.5 \AA και να είναι περιστρεμμένο κατά 100° σε σχέση με τον κύριο άξονα, δίνοντας έτσι 3.6 κατάλοιπα αμινοξέων ανά στροφή της έλικας. Οι δεξιόστροφες έλικες είναι περισσότερο ευνοούμενες ενεργειακά διότι παρουσιάζουν λιγότερες στερεοχημικές παρεμποδίσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων και του κορμού. Έτσι λοιπόν, όλες οι α -έλικες που απαντούν στις πρωτεΐνες είναι δεξιόστροφες. Η δημιουργία α -έλικας διευκολύνεται κυρίως από το γλουταμικό οξύ, τη μεθειονίνη, τη λευκίνη, τη λυσίνη, την ιστιδίνη.

Το άλλο σύνηθες δομικό μοτίβο των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και των πρωτεϊνών είναι η β -πτυχωτή επιφάνεια (ή β -φύλλο). Είναι μία δομή ανοικτή και

επίπεδη με τους δεσμούς υδρογόνου να σχηματίζονται διαμοριακά μεταξύ $-NH$ και $-CO$ διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι 3.5 \AA (σε αντίθεση με το 1.5 \AA της α -έλικας), ενώ οι γειτονικές αλυσίδες σε μία β -πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλες). Τα β -φύλλα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλία από τις α -έλικες, μπορεί να είναι ευθεία ή να εμφανίζονται με την κάθε πτύχωση ελαφρά περιστρεμμένη. Δομές β -φύλλου διευκολύνονται κυρίως από την βαλίνη, την ισολευκίνη, την τυροσίνη και την φαινυλαλανίνη.

Άλλες περιοδικές δομές που σχηματίζονται είναι η β -στροφή (β -turn) και η ω -θηλιά (ω -loop). Η β -στροφή έχει δομή φουρκέτας, όπου σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου στην ίδια αλυσίδα μεταξύ της ομάδας $-CO$ της θέσης n ενός πολυπεπτιδίου και της ομάδας $-NH$ που απέχει 3 κατάλοιπα ($n+3$) από αυτή τη θέση. Με τον τρόπο αυτό μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάξει ξαφνικά την κατεύθυνσή της. Οι β -στροφές συχνά συνδέουν αντιπαράλληλες β -πτυχωτές επιφάνειες. Η ω -θηλιά αναφέρεται σε ένα μεγαλύτερο βρόγχο που συνδέει πρωτεϊνικά τμήματα και στον οποίο δεν σχηματίζονται ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου.²



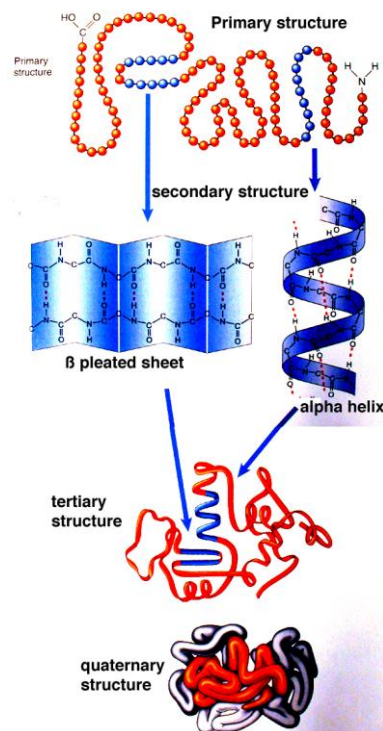
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της β στροφής.

2.1.3 Τριτοταγής δομή

Η εξέλιξη των μεθόδων κρυσταλλογραφίας με ακτίνες Χ οδήγησε στην ακριβέστερη μελέτη της διάταξης μίας πρωτεΐνης στο χώρο. Συγκεκριμένα, η ήδη αναδιπλωμένη έλικα μίας πρωτεϊνικής αλυσίδας αναδιπλώνεται σε διάφορα τμήματά της προσδίνοντας στο πρωτεϊνικό μόριο συνολικά, ένα συγκεκριμένο σχήμα. Ο τρόπος αναδίπλωσης για ολόκληρη την πρωτεϊνική αλυσίδα αποτελεί την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Αυτή η δομή είναι αποτέλεσμα ασθενών κυρίως δεσμών, όπως δεσμών υδρογόνου, ιοντικών δεσμών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις η στερεοδομή σταθεροποιείται με δισουλφιδικούς δεσμούς.

2.1.4 Τεταρτοταγής δομή

Όμοιες ή διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που έχουν αναδιπλωθεί μπορούν συχνά να συνενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μεγαλύτερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Το τελικό σχήμα που αποκτά το πρωτεϊνικό σύμπλοκο στο χώρο αποτελεί την τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης, ενώ οι ανεξάρτητες πεπτιδικές αλυσίδες που συνθέτουν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο αποτελούν τις υπομονάδες (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Τα επίπεδα οργάνωσης των πρωτεϊνών.

2.2 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους και 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 οι πιο αξιόπιστοι σε εργαστηριακή κλίμακα.³

Σύνθεση σε στερεά φάση (Μέθοδος Merrifield) ^{4,5}

Η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση περιλαμβάνει την πρόσδεση του N-προστατευμένου C-τελικού αμινοξέος, σε ένα αδιάλυτο δικτυωμένο πολυμερές-υποστήριγμα (ρητίνη), ακολουθούμενη από αποπροστασία και ακυλίωση της ελεύθερης πλέον αμινομάδας με το προτελευταίο αμινοξύ, και την συνέχιση της ίδιας πορείας με παρόμοιους κύκλους αποπροστασίας και εισαγωγής των υπόλοιπων αμινοξέων. Η περίσσεια των αρχικών πρώτων υλών και των αντιδραστηρίων όπως επίσης και τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων,

απομακρύνονται εύκολα με έκπλυση του πεπτιδίου-πολυμερούς που προκύπτει με κατάλληλα επιλεγμένους διαλύτες. Η ιδέα αυτή εισήχθη για πρώτη φορά από τον Merrifield το 1963 και η ρητίνη του Merrifield, που χρησιμοποίησε τότε ως αδιάλυτο υποστήριγμα, αποτελεί μέχρι σήμερα ένα από τα κύρια στηρίγματα για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση. Η ρητίνη του Merrifield είναι ένα χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρενίου-διβινυλοβενζολίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σε πολλές συνθέσεις αλλά αποτέλεσε επίσης βάση για την ανάπτυξη νέων ρητινών. Ως προστατευτική ομάδα των αμινοξέων χρησιμοποιείται η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (BOC), διότι μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα με χρήση οξέων. Η ενεργοποίηση του καρβονυλίου, γίνεται με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης όπως το *N,N'*-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC) ή το *N,N'*-διισοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC). Πλεονεκτήματα της σύνθεσης σε στερεά φάση είναι η μεγάλη ταχύτητα, η αποφυγή προβλημάτων διαλυτότητας, η αυξημένη απόδοση και η δυνατότητα αυτοματοποίησης της μεθόδου.

Σύνθεση σε διάλυμα

Ένα αμινοξύ προσκολλημένο σε ένα διαλυτό πολυμερές μέσω της καρβοξυλικής του ομάδας, μπορεί να ακυλωθεί από ένα κατάλληλα προστατευμένο και ενεργοποιημένο αμινοξύ, και να αρχίσει με αυτόν τον τρόπο η σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας. Τα ενδιάμεσα πεπτίδια καταβυθίζονται και εκπλένονται 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 α-προστατευτική ομάδα (αμινομάδα ή καρβοξυλομάδα) πρέπει να απομακρύνεται εύκολα πριν από κάθε σύζευξη. Επομένως, απαιτούνται δύο είδη προστατευτικών ομάδων που να έχουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς τα αντιδραστήρια αποπροστασίας. Μετά το τέλος της σύνθεσης, οι

προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται και λαμβάνεται το επιθυμητό πεπτίδιο, το οποίο στη συνέχεια καθαρίζεται από τα παραπροϊόντα. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μέγιστη προστασία όλων των 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.

2.3 Σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους

Τα συνθετικά πολυμερικά πεπτίδια δεν αποτελούν νέα υλικά, καθώς πολλά ομοπολυπεπτίδια είναι ήδη διαθέσιμα εδώ και δεκαετίες, βρίσκοντας όμως μόνο περιορισμένες εφαρμογές ως δομικά υλικά. Παρ' όλα αυτά, οι νέες μέθοδοι οι οποίες εφαρμόζονται για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων δίνουν τη δυνατότητα σύνθεσης πολυμερών με ελεγχόμενα μοριακά βάρη, μικρές κατανομές μοριακών βαρών και πολύ καλύτερες ιδιότητες σε σχέση με τα παλαιότερα ομοπολυπεπτίδια. Παρακάτω συνοψίζονται οι πρόσφατες εξελίξεις στη σύνθεση των ομο- και συμπολυμερών που πραγματοποιούνται με «ελεγχόμενους» πολυμερισμούς επιτρέποντας την προετοιμασία υλικών με άριστες ιδιότητες για τις εφαρμογές τους στην επιστήμη υλικών ή ως μεταφορείς φαρμάκων. Η επιτυχής σύνθεση πολυπεπτιδίων που μπορεί να μιμείται επαρκώς τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών απαιτεί τη δυνατότητα να ελεγχθεί η ακολουθία και σύνθεση των καταλοίπων αμινοξέος κατά μήκος της αλυσίδας. Είναι σημαντικό τα υλικά να καθορίζονται καλά με στενές κατανομές έτσι ώστε μπορούν να αυτό-οργανώνονται σε ακριβώς καθορισμένες μικροδομές, παρόμοιες με εκείνες που βρίσκονται στις πρωτεΐνες. Η δευτεροταγής δομή των πολυπεπτιδίων τους δίνει την δυνατότητα αναδίπλωσης και αυτό-οργάνωσης στο χώρο.

Η συμβατική μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων στερεής φάσης δε μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους (>100 κατάλοιπα) εξαιτίας των πολλαπλών σταδίων αποπροστασίας και σύζευξης. Η καλύτερη μέθοδος για τη σύνθεση καλά χαρακτηρισμένων πολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους είναι ο πολυμερισμός N-

καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCAs) μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον πολυμερισμό μιας μεγάλης ομάδας NCAs (>200) και τη σύνθεση πολυμερών περίπλοκης αρχιτεκτονικής με τις επιθυμητές ιδιότητες. Όλα τα πολυπεπτίδια και συμπολυμερή πολυπεπτιδίων που αναφέρονται στην παρούσα εργασία προετοιμάστηκαν μέσω του πολυμερισμού των αντίστοιχων NCAs.⁶

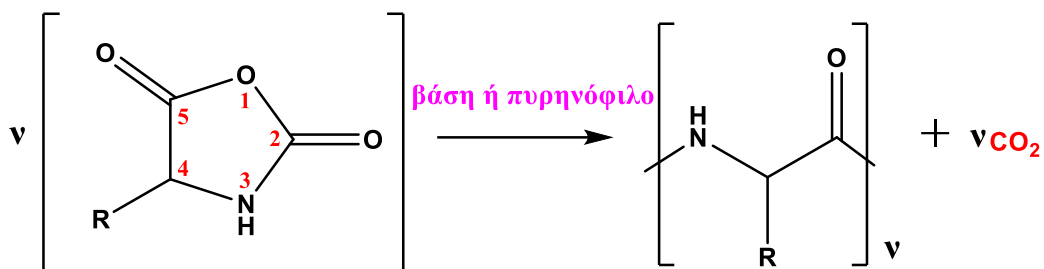
2.3.1 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)

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-καρβοξυανυδριτών (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. Η κινητήριος δύναμη στον ROP αποτελεί η αυξημένη τάση διάνοιξης δακτυλίου (ring strain) του μονομερούς και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να την συνοδεύουν, σε αντίθεση με τα άλλα είδη πολυμερισμού στα οποία το έναυσμα δίνεται από τη μετατροπή των πολλαπλών δεσμών σε απλούς. Όλοι οι τύποι πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου έχουν ως κοινό το γεγονός ότι τα μονομερή είναι κυκλικά μόρια, όμως ο λόγος που καθένα από αυτά μπορεί να πολυμεριστεί διαφέρει. Γενικότερα, τα μονομερή πρέπει να φέρουν μία κινητική δραστική ομάδα που να μπορεί να αντιδράσει εύκολα και επίσης η τάση διάνοιξης του δακτυλίου πρέπει να είναι μεγάλη. Δακτύλιοι που αποτελούνται από 3, 4 ή 8, 9 άτομα, έχουν μεγάλη τάση δακτυλίου και ευνοείται η διάνοιξή τους, εξαιτίας της απώλειας ενθαλπίας, η οποία συνδέεται με την απώλεια της τάσης του δακτυλίου. Οι εξαμελείς δακτύλιοι είναι θερμοδυναμικά σταθεροί και

κατά γενικό κανόνα δεν πολυμερίζονται, ενώ οι πενταμελείς και επταμελείς δακτύλιοι βρίσκονται ενδιάμεσα και τις περισσότερες φορές μπορούν να πολυμεριστούν. Επιπλέον, σε δακτυλίους που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς, καρβονύλιο ή ομάδες Si, ένα επιπρόσθετο φαινόμενο που οδηγεί στον πολυμερισμό τους μέσω διάνοιξης δακτυλίου είναι η αυξημένη ελευθερία περιστροφής αυτών των ομάδων στην τελική γραμμική αλυσίδα, η οποία οδηγεί σε αύξηση της εντροπίας. Ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο πραγματοποιείται ο πολυμερισμός ROP σε κάθε τύπο μονομερών, διακρίνονται τέσσερα είδη: ο ριζικός ROP (RROP), ο ανιοντικός ROP (AROP), ο κατιοντικός ROP (CROP) και ο πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου (ROMP), με τη χρήση καταλυτών μετάθεσης. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι πολλά πολυμερή βιομηχανικής σημασίας παρασκευάζονται μέσω του ROP, όπως για παράδειγμα το πολυαιθυλενοξειδίο, το πολυνορβορνένιο, η πολυσιλοξάνη κ.α.⁷

2.3.2 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβοξυανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος παρασκευής όμο- και συμπολυμερών πεπτιδίων αποτελεί ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων. Πλεονεκτήματά της η ευκολία, η ταχύτητα, οι μεγάλες αποδόσεις που λαμβάνονται και η αποφυγή ρακεμίωσης κατά την σύνθεση των πολυπεπτιδίων. Ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο αριθμό απαρχητών, περιλαμβάνοντας βάσεις όπως οι αμίνες, αλκοξείδια, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα και με θέρμανση. Η αντίδραση προχωρά με το σχηματισμό CO₂ και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους (Σχήμα 1).



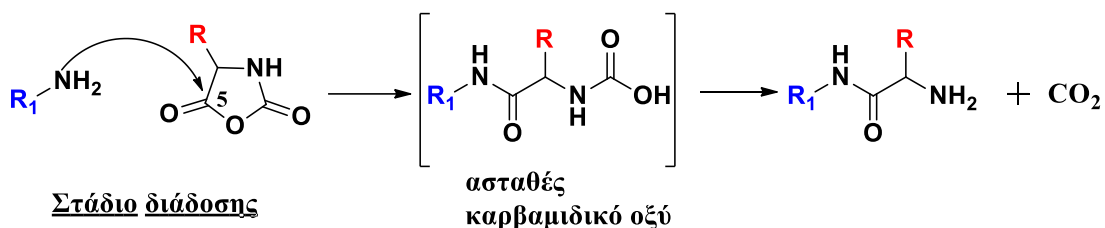
Σχήμα 1: Αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs.

Για την πραγματοποίηση της διάνοιξης του δακτυλίου χρησιμοποιούνται ως απαρχητές, όπως προαναφέρθηκε, είτε πρωτοταγείς αμίνες που είναι ισχυρότερα πυρηνόφιλα παρά βάσεις, ή τριτοταγείς αμίνες και αλκοξειδία μετάλλων που είναι ισχυρότερες βάσεις και έτσι μπορούν να δώσουν πολυπεπίδια μεγάλου μοριακού βάρους. Με βάση το είδος του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί, υπάρχουν δύο κύριες μηχανιστικές πορείες ώστε να συντεθούν τα πολυπεπίδια. 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).^{7,8,9,10,11}

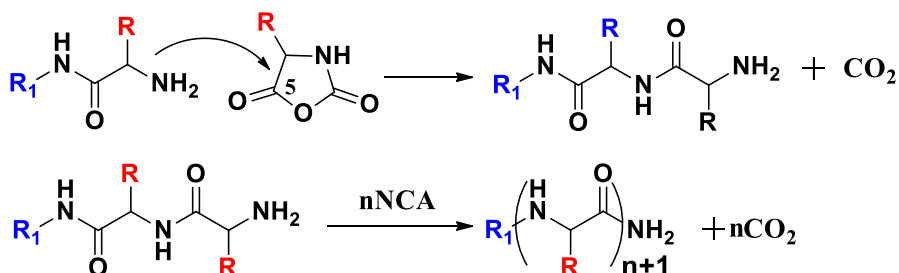
2.3.2.1 Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)¹²

Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται γενικά σε πολυμερισμούς που εκκινούνται από μη ιοντικούς απαρχητές που έχουν τουλάχιστον ένα βασικό υδρογόνο, όπως οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες, οι αλκοόλες και το νερό. Η αντίδραση είναι μια πυρηνόφιλη προσβολή (Σχήμα 2) πολλών σταδίων από την τελική αμινομάδα στον C(5) του NCA, ακολουθούμενη από διάνοιξη του δακτυλίου, αποκαρβοξυλίωση και αναγέννηση του αμινοτελικού άκρου.

Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 2: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM).

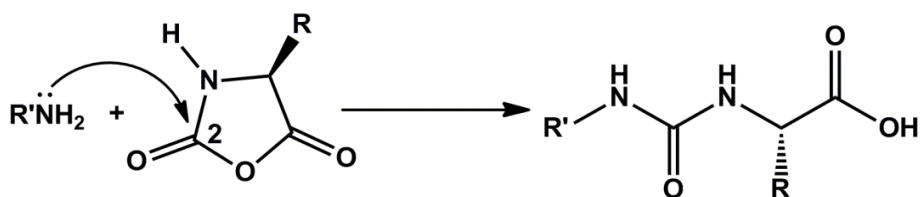
Όπως φαίνεται, κατά το στάδιο της έναρξης ο πυρηνόφιλος απαρηχτής προσβάλλει το καρβονύλιο στη θέση C(5) του ανυδρίτη. Το ενδιάμεσο καρβαμδικό οξύ που παράγεται είναι θερμοδυναμικά ασταθές και συνεπώς αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια ελεύθερη αμινομάδα, η οποία είναι ικανή να προάγει τον πολυμερισμό. 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 οξέος (Σχήμα 3). 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 CO₂, η επιλογή διαλύτη, η θερμοκρασία της αντίδρασης και η ύπαρξη υγρασίας ή άλλων προσμίξεων (υδρόλυση του μονομερούς).

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

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

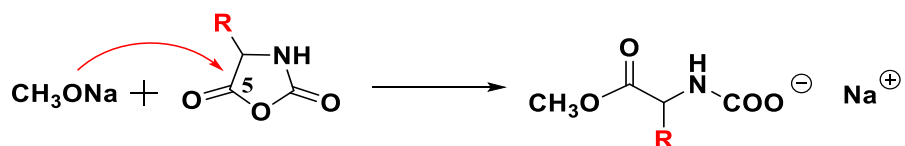


Σχήμα 3: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή.

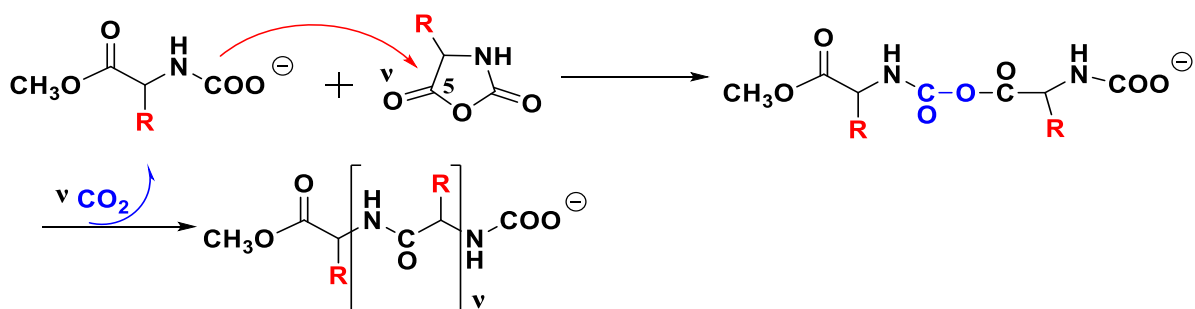
2.3.2.2 Μηχανισμός του Blout

Σύμφωνα με αυτό τον μηχανισμό των Idelson και Blout, μια ισχυρή βάση όπως το μεθοξειδίο του νατρίου αντιδρά με το μονομερές μέσω πυρηνόφιλης προσβολής στον C(5) του ανυδρίτη (Σχήμα 4). Διάνοιξη του δακτυλίου επέρχεται προς σχηματισμό του καρβαμιδικού ανιόντος το οποίο είναι υπεύθυνο για την διάδοση του πολυμερισμού. Η αλυσίδα αναπτύσσεται με την προσθήκη του καρβαμιδικού ανιόντος σε ένα νέο μόριο ανυδρίτη προς σχηματισμό ενδιάμεσου καρβαμικού - καρβόξυλο μικτού ανυδρίτη. Εν συνεχεία απελευθερώνεται CO₂ προς σχηματισμό ενός νέου καρβαμιδικού ανιόντος.

Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 4: Τα στάδια έναρξης και διάδοσης στον Μηχανισμό του Blout.

Παρ' ότι υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι ο μηχανισμός του Blout, «δουλεύει» κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, είναι γενικά αποδεκτό ότι ο πολυμερισμός των NCAs, με ισχυρές βάσεις, όπως το μεθοξειδίο του νατρίου, προχωρά μέσω του μηχανισμού του ενεργοποιημένου μονομερούς.¹³

2.3.2.3 Μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM)

Ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς βρίσκει εφαρμογή στους πολυμερισμούς όπου εκκινούνται από ισχυρές βάσεις ή τριτοταγείς αμίνες. Στον μηχανισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς ο βασικός απαρχητής δεν δρα ως απαρχητής αλυσίδας μέσω της πυρηνοφιλικότητας του αλλά ως καταλύτης μέσω της βασικότητάς του για τον ιοντισμό του μονομερούς σε αντίδραση οξέος βάσεως προς σχηματισμό ανιόντος ανυδρίτη που δρα ως πυρηνόφιλο (Σχήμα 5). Στην περίπτωση αυτή η πολυμερική αλυσίδα είναι αυτοεκκινούμενη. Να σημειωθεί πως αυτός ο μηχανισμός εφαρμόζεται σε N-μη υποκατεστημένους NCAs.

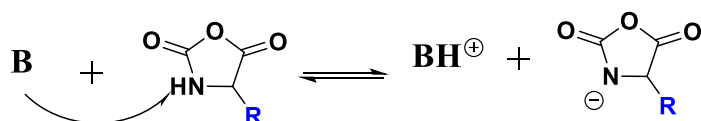
Στην προέναρξη ο απαρχητής δρα ως βάση αποσπώντας το πρωτόνιο του N του NCA, οπότε προκύπτει το αντίστοιχο ανιόν. Στο στάδιο της έναρξης, ο ενεργός απαρχητής είναι το σχηματιζόμενο ανιόν του NCA, το οποίο δρα ως πυρηνόφιλο προσβάλλοντας τον 5-C ενός μονομερούς NCA, οπότε λαμβάνεται ένα διμερές και απελευθερώνεται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

Η παρουσία της καρβαμιδικής ομάδας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την αντίδραση. Το ελεύθερο καρβαμιδικό οξύ είναι πολύ ασταθές για να απομονωθεί και αποκαρβοξυλιώνεται γρήγορα, όμως τα καρβαμιδικά άλατα είναι σταθερά και σχηματίζονται εύκολα. Η σταθερότητα των καρβαμιδικών αλάτων εξαρτάται από την φύση του αντισταθμιστικού κατιόντος και από την φύση των υποκαταστατών του άζωτου στον ανυδρίτη. Στη περίπτωση που χρησιμοποιούνται ισχυρές βάσεις ως απαρχητές το αντισταθμιστικό ιόν εξασφαλίζει την σταθερότητα τους. Επίσης όση μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα έχει το άζωτο τόσο πιο σταθερό είναι το καρβαμίδιο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι καρβαμιδικές ομάδες δεν έχουν κανένα λόγο να αποκαρβοξυλιωθούν συστηματικά αλλά διατηρούνται μέχρι μια ορισμένη συγκέντρωση που σχετίζεται με την βασικότητα του μίγματος.

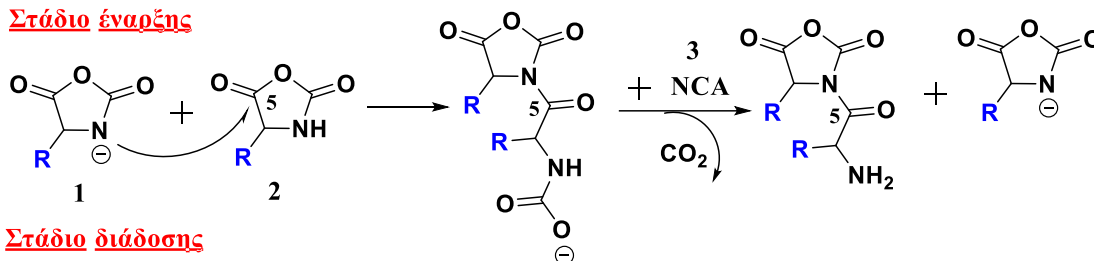
Ο μηχανισμός αυτός είναι πάρα πολύ γρήγορος, τουλάχιστον 100 φορές γρηγορότερος από τον κανονικό μηχανισμό. Επίσης παρατηρούμε ότι το τμήμα

του απαραίτητη δεν ενσωματώνεται στην τελική αλυσίδα. Τα πολυπεπτίδια που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο έχουν υψηλό μοριακό βάρος και μεγάλη μοριακή πολυδιασπορά. Το ανιόν NCA που αναγεννάται δεν έχει καμία εκλεκτικότητα καθώς μπορεί να αντιδράσει είτε με την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε με ένα άλλο μονομερές με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στο τελικό προϊόν. Επίσης υπάρχουν πλήθος συνδυασμών και πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων που μπορούν να τερματίσουν τον πολυμερισμό.

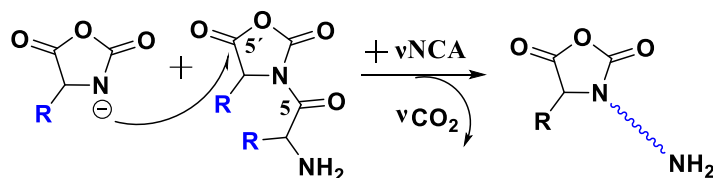
Στάδιο προέναρξης



Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 5: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.

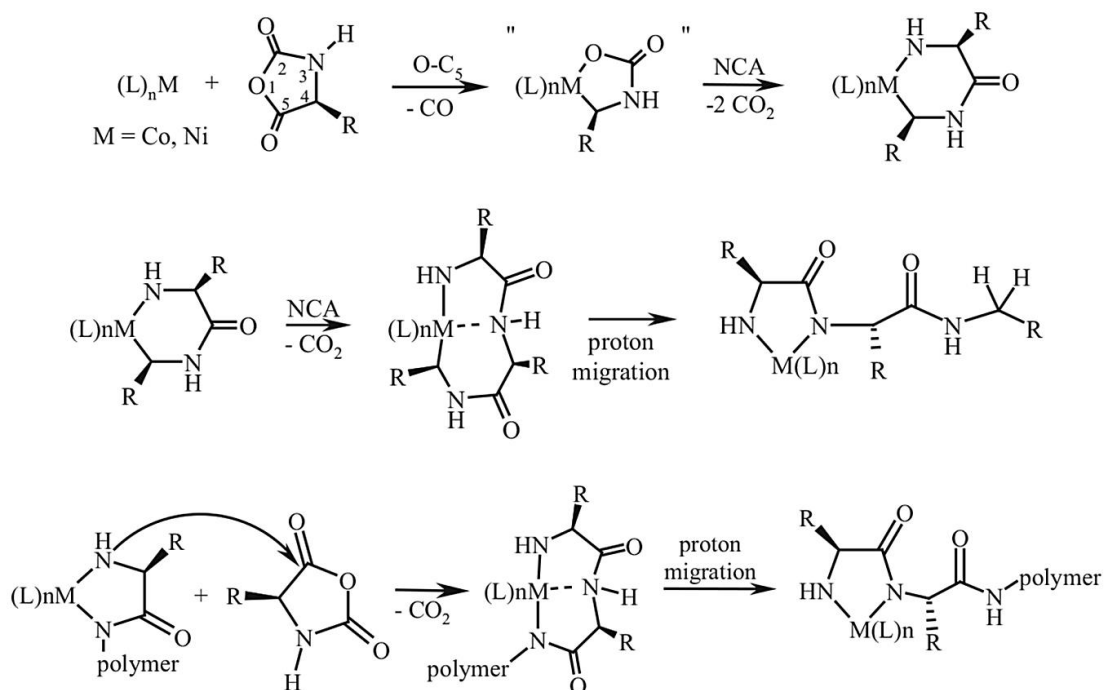
2.3.2.4 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση Συμπλόκων των Στοιχείων Μετάπτωσης

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 απαραίτητων, 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.

Αναπτύχθηκαν δραστικοί απαρχητές νικελίου και κοβαλτίου μηδενικού σθένους (π.χ. $\text{bipyNi}(\text{COD})$, όπου $\text{bipy}=2,2'$ -διπυριδίνη, $\text{COD}=1,5$ -κυκλοοκταδιένιο, και $(\text{PMe}_3)_4\text{Co}$), οι οποίοι επιτρέπουν το «ζωντανό» πολυμερισμό των NCAs δίνοντας πολυτεππίδια υψηλού μοριακού βάρους. Τα μεταλλικά ιόντα μπορούν στη συνέχεια να απομακρυνθούν από τα παραγόμενα πολυμερή με απλή καταβύθιση ή μέσω 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 συμπολυτεππίδια 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_2 . 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 6). Ο σχηματισμός αυτών των χηλικών μεταλλοκυκλικών ενδιάμεσων κρίνεται απαραίτητος για να χαρακτηρίζεται «ζωντανός» ένας πολυμερισμός που χρησιμοποιεί μέταλλα μετάπτωσης.



Σχήμα 6: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs με σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως.

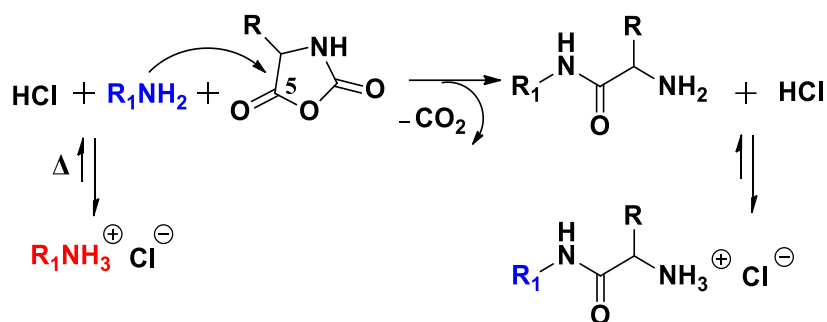
Το κυριότερο μειονέκτημα αυτού του μηχανισμού, είναι η παρουσία ιχνών των μετάλλων στα τελικά πολυπεπτίδια, καθιστώντας τα τοξικά και άρα αδύνατο να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικές εφαρμογές. Επιπλέον, ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται μόνο σε μη N-υποκατεστημένους NCAs, καθώς απαιτείται το πρωτόνιο στο 3-N.^{14,15,16}

2.3.2.5 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με υδροχλωρικά άλατα πρωτοταγών αμινών

Είχε διαπιστωθεί ότι μόνο ένα μόριο NCA αντιδρά με το υδροχλωρικό άλας της αμίνης, χωρίς διάδοση, εξαιτίας της μειωμένης πυρηνοφιλίας του άλατος σε σχέση με την ελεύθερη αμίνη. Σε αυτή την ισορροπία, ευνοείται η ανενεργή μορφή των υδροχλωρικού άλατος της αμίνης, επομένως οι ελεύθερες αμίνες μπορούν να δράσουν για πολύ μικρό χρονικό διάστημα και άρα η εκτεταμένη διάδοση από αυτές δεν είναι εφικτή. Ο Kober^{17,18} παρατήρησε ότι η συγκέντρωση στο διάλυμα των ελεύθερων αμινών αυξάνεται συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως επίσης και ο ρυθμός ανταλλαγής μεταξύ ενεργών

(ελεύθερες υδροχλωρικές αμίνες) και ανενεργών ειδών (υδροχλωρικά άλατα αμινών).

Έχοντας ως βάση τα παραπάνω ο Schlaad¹⁹, χρησιμοποίησε υδροχλωρικά άλατα αμινοτελικών μακροαπαρχητών, με την σκέψη ότι τα επιπλέον πρωτόνια του συστήματος θα εμπόδιζαν τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς, εφόσον η επαναπρωτονίωση του μονομερούς θα ήταν γρηγορότερη από την πυρηνόφιλη προσβολή σε ένα άλλο μονομερές (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.

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

2.3.3. Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση Πρωτοταγών Αμινών και Τεχνικών Υψηλού Κενού

Ο στόχος των ερευνητικών ομάδων που ασχολούνταν με τη σύνθεση πεπτιδίων ήταν να βρουν ένα καλό σύστημα πολυμερισμού το οποίο θα τους οδηγούσε στη σύνθεση καλά καθορισμένων κατά συστάδων πολυμερών ή και εκείνων με πιο περίπλοκη αρχιτεκτονική.

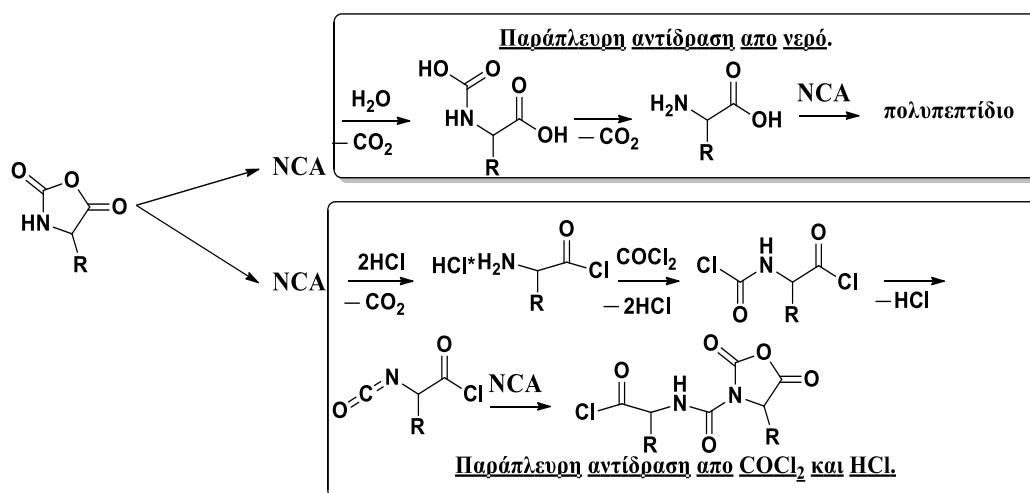
Το 2004 η επιστημονική ομάδα των Iatrou, Hadjichristidis, Aliferis²⁰ ανέφερε το πρώτο ‘ζωντανό’ σύστημα πολυμερισμού μέσω πρωτοταγών αμινών, με σκοπό να ακολουθείται αποκλειστικά ο κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού

εξαιτίας της μεγάλης πυρηνοφιλικότητας των απαρχητών, με τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού High Vacuum Technique (HVT). Η χρήση υψηλού κενού είναι απαραίτητη για τον καθαρισμό όλων των αντιδραστηρίων (διαλυτών, μονομερών, απαρχητών) άλλα και κατά την αντίδραση πολυμερισμού, κάτω από αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται η λήψη προϊόντων υψηλού βαθμού καθαρότητας. Αυτό σημαίνει ότι το ποσοστό των παράπλευρων και ανεπιθύμητων αντιδράσεων τερματισμού περιορίζεται σημαντικά σε σχέση με άλλες τεχνικές και υπάρχει η δυνατότητα σύνθεσης πολυμερών με καθορισμένων χαρακτηριστικών. Η χρήση υψηλού κενού έχει στόχο την πλήρη απομάκρυνση των μορίων νερού και άλλων προσμίξεων καθώς οι καρβοξυανυδρίτες είναι αρκετά ευαίσθητα μόρια.^{21,22,23}

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

Οι N-καρβοξυ ανυδρίτες, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζουν εξαιρετική ευαισθησία σε θέρμανση, νερό και βάσεις. Αντιδρούν ταχύτατα ακόμα και σε στερεή φάση δίνοντας πολυτεπτιδικά προϊόντα μέχρι την τελική τους κατανάλωση. Ακόμα και κατά την σύνθεσή τους αν δεν τηρηθούν τα πρότυπα καθαρότητας δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις (Σχήμα 8). Έτσι, απαιτούνται προσεκτικές επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις υπό κενό (για να

αποφύγουν την μόλυνση από την ατμοσφαιρική υγρασία) για τον καθαρισμό των NCAs, οι οποίες πρέπει να προηγούνται του πολυμερισμού. Επιπλέον, μετά το πέρας της αντίδρασης, για να αποφευχθούν οι παράπλευρες αντιδράσεις, γίνεται ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου υδροχλωρίου αλλά και του τριφωσγενίου, που δεν αντέδρασε με το πρόδρομο αμινοξύ, με τη χρήση του υψηλού κενού.



Σχήμα 8: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνει χλωρίδιο και μετέπειτα N-χλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη.

Επιπλέον, με την χρήση υψηλού κενού επιτυγχάνεται η συνεχής απομάκρυνση του παραγόμενου CO_2 , 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 εκλούμενο διοξείδιο του άνθρακα, αποφεύγεται ο σχηματισμός καρβαμιδικών αλάτων με τα αμινοτελικά άκρα της

πολυπεπτιδικής αλυσίδας, λόγω της γρηγορότερης αποκαρβοξυλίωσης που συμβαίνει στο σύστημα.

Με τη εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων και τεχνικών, η ομάδα των Iatrou, Aliferis, Hadjichristidis κατάφερε για πρώτη φορά να επιτύχει ζωντανό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων και να συνθέσει πολυπεπτίδια με τις μικρότερες κατανομές μοριακών βαρών που έχουν αναφερθεί ως τώρα στη βιβλιογραφία. Επίσης με αυτή την τεχνική, επετεύχθη η σύνθεση καλά καθορισμένων όμο- και συμπολυπεπτιδίων με πολύπλοκη μακρομοριακή αρχιτεκτονική, όπως για παράδειγμα γραμμικά πολυσυσταδικά πολυμερή, αστεροειδή πολυμερή, αστεροειδή κατά συστάδες συμπολυμερή κ.α., ανοίγοντας το δρόμο για τη δημιουργία πολύπλοκων δομών με πολλές βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές.

Το 2009 η ομάδα του Avgeropoulos²⁴, μια ομάδα εξοικειωμένη τόσο με τις τεχνικές υψηλού κενού όσο και με τις παραδοσιακές, κατάφερε να ενισχύσει ακόμη περισσότερο τα πλεονεκτήματα από τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού, έναντι των συμβατικών μεθόδων, αναλύοντας για πρώτη φορά τις ακραίες ομάδες των λαμβανόμενων πολυμερών. Η ομάδα διεξήγαγε παράλληλους πολυμερισμούς υπό συνθήκες υψηλού κενού αλλά και υπό αδρανή ατμόσφαιρα σε glovebox και τα πολυμερή που ελήφθησαν χαρακτηρίστηκαν φασματοσκοπικά (¹³C-NMR, MALDI-TOF-MS). Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι πολυμερισμοί σε υψηλό κενό ακολουθούσαν πλήρως τον κανονικό μηχανισμό, ενώ αντίδραση τερματισμού πραγματοποιήθηκε μόνο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό. Αντίθετα, τα πολυπεπτίδια που παρασκευάστηκαν στο glovebox ακολουθούσαν τόσο τον κανονικό μηχανισμό αμινών, όσο και τον μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς, ενώ πολλαπλές αντιδράσεις τερματισμού έλαβαν χώρα. Έτσι, απέδειξαν ότι μόνο με την τεχνική υψηλού κενού μπορούν να συντεθούν πολυπεπτίδια που να προσομοιάζουν στη δομή και τις ιδιότητες τα φυσικά ανάλογα τους, ενώ ταυτόχρονα το άμινο-τελικό τους άκρο να παραμένει ενεργό για περαιτέρω διάδοση του πολυμερισμού και δημιουργία πολύπλοκων αρχιτεκτονικών.

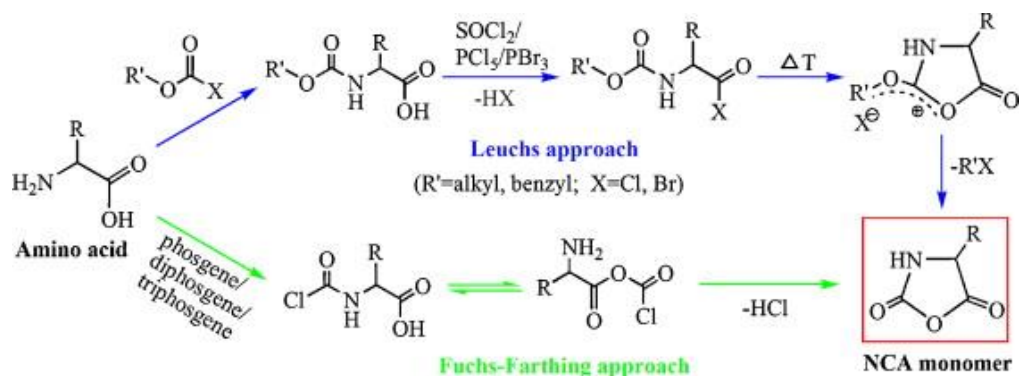
2.4 Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs)

Οι N-καρβοξυ ανυδρίτες των α-αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Leuchs, το 1906. Επίσης ο Leuchs παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και κατάφερε να απομονώσει το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος, περιλαμβάνει την αντίδραση κυκλοποίησης των προστατευμένων N-αλκοξυκαρβονυλοαμινοαλογονιδίων, υπό παρατεταμένη θερμοκρασία 70-90 °C (Σχήμα 9). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες μπορεί να πραγματοποιηθεί αποσύνθεση των NCAs και διάνοιξη του δακτυλίου.

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

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την σύνθεση των NCAs σήμερα, είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον Fuchs το 1922 για την παρασκευή του NCA της N-φαινυλογλυκίνης και τροποποιήθηκε ακολούθως από τους Farthing, Coleman και Levy ώστε να εφαρμοστεί στη σύνθεση ενός μεγάλου εύρους NCAs. Η ονομασία που έχει

επικρατήσει βιβλιογραφικά για την προσέγγιση αυτή είναι μέθοδος “Fuchs-Farthing”. Η συγκεκριμένη διαδικασία περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο, όπου στο πρώτο βήμα της αντίδρασης το ελεύθερο αμινοξύ αντιδρά με το φωσγένιο, σχηματίζοντας πολύ γρήγορα το ενδιάμεσο N-χλωροφορμυλο αμινοξύ (συνήθως δεν απομονώνεται), το οποίο ακολούθως μετατρέπεται σε N-καρβοξυ ανυδρίτη, ενώ πραγματοποιείται και ταυτόχρονη παραγωγή HCl (Σχήμα 9)



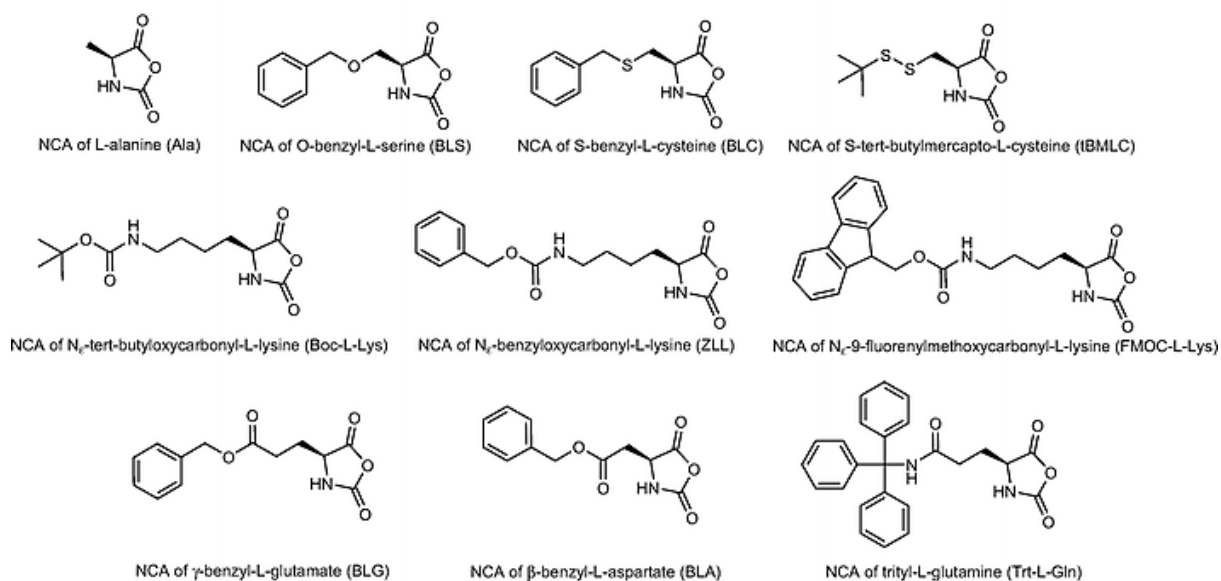
Σχήμα 9: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών. ²⁵

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

Το φωσγένιο, όμως, είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό και τοξικό αντιδραστήριο, η μεταχείρισή του ακόμα και σε εργαστηριακή κλίμακα χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Επιπλέον είναι δύσκολο, λόγω της αέριας φύσης του, να τηρηθεί απόλυτα η στοιχειομετρία στις αντιδράσεις που συμμετέχει. Για το λόγο αυτό

έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί στην οργανική σύνθεση ως πηγές φωσγενίου, το τριχλωρομέθυλο- χλωροφορμικό (ή διφωσγένιο) και το δις(τριχλωρομέθυλο)-ανθρακικό (ή τριφωσγένιο). Το διφωσγένιο είναι υγρό ενώ αντίστοιχα το τριφωσγένιο είναι κρυσταλλικό στερεό, γεγονός που επιτρέπει την ευκολότερη και ασφαλέστερη χρησιμοποίησή τους, ως πρόδρομες ενώσεις δυο και τριών μορίων φωσγενίου. Στην σύνθεση των NCAs έχει επικρατήσει η χρήση του τριφωσγενίου, δίνοντας μονομερή υψηλής απόδοσης και καθαρότητας.

Οι παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη σύνθεση ενός NCA περιλαμβάνουν κυρίως την διάνοιξη του δακτυλίου του τελικού προϊόντος και λαμβάνουν χώρα λόγω αυξημένης θερμοκρασίας, αυξημένου χρόνου αντίδρασης ή υψηλής συγκέντρωσης παραγόμενου υδροχλωρίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις χαμηλής απόδοσης ανυδρίτη, το παραγόμενο HCl πρωτονιώνει την αμινομάδα κάποιων αμινοξέων, σχηματίζοντας άλας και εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο το κλείσιμο του δακτυλίου. Ακόμα όμως και να σχηματιστεί ο δακτύλιος είναι πιθανό να επέλθει διάνοιξή του σε αυξημένες συγκεντρώσεις HCl. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται βάσεις (όπως η Et₃N), ή ενώσεις της οικογένειας των πινενίων (όπως το D,L-λιμονένιο) ως αντιδραστήρια δέσμευσης του παραγόμενου HCl για την διευκόλυνση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Τα τελευταία χρόνια, έχει συντεθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός NCAs όλων των βασικών αμινοξέων αλλά και αρκετών παραγώγων τους (Εικόνα 5). 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. ^{26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39}



Εικόνα 5: Μερικοί χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά.

2.5 Συστήματα αποκρινόμενων πολυπεπτιδίων

Οι προκλήσεις που αντιμετωπίζει σήμερα η ιατρική περιλαμβάνουν την αυξανόμενη ζήτηση για ευαίσθητα, αποτελεσματικά συστήματα που θα βελτιώσουν την θεραπεία των ασθενών. Από την άποψη αυτή, υπάρχει ανάγκη για νέα υλικά που θα αυξήσουν την ευαισθησία ενώ ταυτόχρονα οι συγκεντρώσεις τους στο σώμα θα είναι μειωμένες για να αποφευχθεί η συσσώρευση και οι παρενέργειες. Τέτοια υλικά θα μπορούν να ανιχνεύουν αποτελεσματικά τις παθολογικές καταστάσεις στα αρχικά στάδια, ή να διακρίνουν μικρές αλλαγές στις περιοχές όπου έχει γίνει εγχείρηση, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την πρόγνωση πολύπλοκων ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο HIV και άλλων εκφυλιστικών ασθενειών. Ο σχεδιασμός νέων συστημάτων και προσεγγίσεων πρέπει να ανταποκρίνεται στις προκλήσεις που συνδέονται με τη χορήγηση στο σώμα: 1) απλή οδός χορήγησης, 2) αποτελεσματική παράδοση στο επιθυμητό βιολογικό διαμέρισμα, 3) προσαρμοσμένη απόκριση στο παθολογικό συμβάν, 4) χρήση μη τοξικών, βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων συστημάτων.

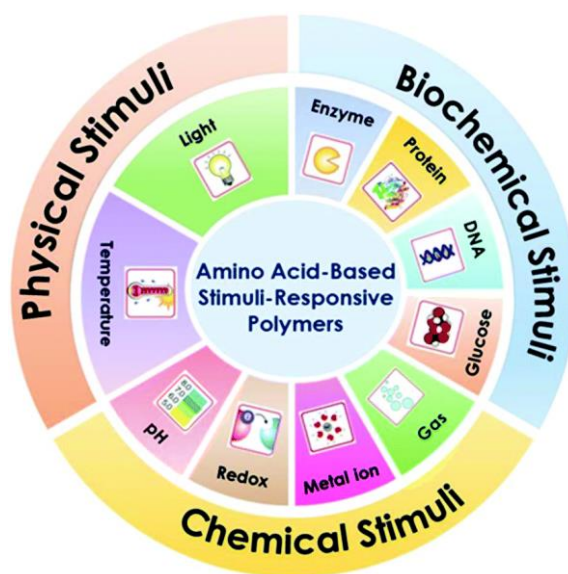
Η τρέχουσα τεχνολογία στη νανοτεχνολογία καθιστά δυνατούς νέους τρόπους για την καταπολέμηση μεγάλου αριθμού ασθενειών. Ο διαρκώς αναπτυσσόμενος τομέας της νανοϊατρικής χρησιμοποιεί νανοδομές για τη

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

Η στρατηγική στην οποία βασίζεται η απόκριση των πολυμερών είναι μια δραματική φυσικοχημική αλλαγή που προκαλείται από κάποιο ερέθισμα. Σε μακρομοριακό επίπεδο, οι αλυσίδες των πολυμερών μπορούν να μεταβάλλονται με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στην υδρόφιλη-προς-υδρόφοβη ισορροπία, στη διαμόρφωση, τη διαλυτότητα,

την αποικοδόμηση και τη διάσπαση του δεσμού, οι οποίες, με τη σειρά τους, προκαλούν ανιχνεύσιμες αλλαγές Η απόκριση μπορεί να είναι αναστρέψιμη ή όχι, ανάλογα σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη στρατηγική.

Τα αποκρινόμενα πολυμερή ταξινομούνται συνήθως σε τρεις κατηγορίες: 1) Τα φυσικώς αποκρινόμενα (φως, θερμοκρασία, υπερήχους, μαγνητικά, μηχανικά, ηλεκτρικά), τα οποία συνήθως τροποποιούν τη δυναμική της αλυσίδας, δηλαδή το επίπεδο ενέργειας του συστήματος πολυμερούς/ διαλύτη. 2) Τα χημικώς αποκρινόμενα (διαλύτης, ιοντική ισχύς, ηλεκτροχημικά, pH), τα οποία διαμορφώνουν μοριακές αλληλεπιδράσεις, είτε μεταξύ πολυμερών και μορίων διαλύτη, ή μεταξύ αλυσίδων πολυμερούς. 3) Τα βιολογικώς αποκρινόμενα (ένζυμα, υποδοχείς), τα οποία σχετίζονται με την πραγματική λειτουργία των μορίων: ενζυματικές αντιδράσεις, αναγνώριση μορίων (Εικόνα 6). Τέλος, υπάρχουν τα διπλά αποκρινόμενα πολυμερή (dual stimuli-responsive), τα οποία ανταποκρίνονται ταυτόχρονα σε περισσότερα από ένα ερεθίσματα. ^{40,41,42,43,44,45,46,47,48,49}



Εικόνα 6: Αποκρινόμενα πολυπεπτίδια. ⁵⁰

2.5.1 pH-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα

Τα πολυπεπτίδια 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 ωσμωτική 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 αμινομάδες 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 πολύ (γ-βενζυλο-L-γλουταμικό οξύ) και η πολύ (L-λυσίνη) έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε pH-αποκρινόμενα συστήματα, ενώ εξέχουσα θέση κατέχει η πολύ (L-ιστιδίνη) (PHis), η οποία διαθέτει έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο ανά δομική μονάδα που μπορεί να πρωτονιώνεται και να αποπρωτονιώνεται λόγω του ιμιδαζολικού δακτυλίου της.^{51,52}

2.5.2 Θέρμο-αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα

Τα πολυμερή που αποκρίνονται στην θερμοκρασία έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον στις εφαρμογές βιοτεχνολογίας, επειδή ορισμένες ασθένειες

εμφανίζουν αλλαγές θερμοκρασίας. Κανονικά, αυτά τα συμπολυμερή χαρακτηρίζονται από μια κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος, γύρω από την οποία οι υδρόφοβες και υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων και του υδατικού μέσου μεταβάλλονται απότομα μέσα σε ένα μικρό εύρος θερμοκρασίας. Αυτό προκαλεί τη διακοπή των ενδο- και διαμοριακών ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και οδηγεί σε κατάρρευση ή επέκταση αλυσίδας. Τυπικά, αυτά τα πολυμερικά διαλύματα διαθέτουν ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος (upper critical solution temperature, UCST), πάνω από την οποία υπάρχει μία φάση πολυμερούς και κάτω από την οποία υπάρχει ένας διαχωρισμός φάσεων. Εναλλακτικά, διαλύματα πολυμερών που εμφανίζονται ως μονοφασικά κάτω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία και διφασικά πάνω από αυτή, γενικά έχουν μια λεγόμενη χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος (lower critical solution temperature, LCST). Ανάλογα με τον μηχανισμό και τη χημεία των ομάδων, έχουν αναφερθεί διάφορα θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή: πολυ(N-αλκύλιο υποκατεστημένα ακρυλαμίδια), π.χ. πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (PNiPAAm), πολυ(N-βινυλαλκυλαμίδια), π.χ. πολυ(N-βινυλοκαπρολακτάμη) (PNVC) και συμπολυμερή όπως πολυ(L-γαλακτικό οξύ) - πολυ(αιθυλενογλυκόλη) - πολυ(L-γαλακτικό οξύ) (PLLA-PEG-PLLA) και πολυ(αιθυλενοξειδίου) - πολυ(προπυλενοξειδίου) - πολυ(αιθυλενοξειδίου) (PEO-PPO-PEO). Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η ερευνητική ομάδα του κυρίου Ιατρού ανέφερε τη σύνθεση του συμπολυμερούς πολυ(αιθυλενοξειδίου)-πολυ(L-ιστιδίνη) (PEO-PHis), το οποίο βρέθηκε ότι αποκρίνεται και σε μεταβολές της θερμοκρασίας εκτός των μεταβολών του pH. 40,41,42,43,44,45,46,47,48,49

2.5.3 Φωτο-αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα

Επειδή το φως μπορεί να εφαρμοστεί στιγμιαία και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες με υψηλή ακρίβεια, τα φώτο-αποκρινόμενα πολυμερή εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα. Το φως μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στην επιφάνεια του πολυμερούς ή μπορεί να μεταδοθεί σε απομακρυσμένες τοποθεσίες χρησιμοποιώντας οπτικές ίνες. Τα περισσότερα

φώτο-ευαίσθητα πολυμερή περιέχουν χρωμοφόρες ομάδες όπως ομάδες αζοβενζολίου, σπιροπυρανικές ομάδες, ή νιτροβενζυλομάδες.
40,41,42,43,44,45,46,47,48,49

2.5.4 Ηλεκτρο-αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα

Τα ηλεκτρικώς και ηλεκτροχημικώς αποκρινόμενα πολυμερή χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα και τις εφαρμογές της, λόγω των πλεονεκτημάτων τους από την ακρίβεια του ελέγχου μέσω της έντασης του ρεύματος, της διάρκειας ενός ηλεκτρικού παλμού ή του διαστήματος μεταξύ παλμών. Τυπικά ηλεκτρικά αποκρινόμενα πολυμερή είναι αγωγιμα πολυμερή, όπως για παράδειγμα το πολυθειοφαίνιο (PT), ή το σουλφονωμένο πολυστυρόλιο (PSS), το οποίο μπορεί να εμφανίσει διόγκωση, συρρίκνωση ή κάμψη σε απόκριση εξωτερικού πεδίου. 40,41,42,43,44,45,46,47,48,49

2.5.5 Ιοντικώς-αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα

Η απόκριση στην ιοντική ισχύ είναι μια τυπική ιδιότητα των πολυμερών που περιέχουν ιονιζόμενες ομάδες. Αυτά τα πολυμερικά συστήματα παρουσιάζουν ασυνήθιστη ρεολογική συμπεριφορά ως αποτέλεσμα των ελκτικών αλληλεπιδράσεων Coulomb μεταξύ των αντίθετα φορισμένων ειδών, τα οποία μπορεί να καθιστούν το πολυμερές αδιάλυτο σε απιονισμένο νερό, αλλά διαλυτό παρουσία κρίσιμης συγκέντρωσης των προστιθέμενων ηλεκτρολυτών. Επομένως, οι μεταβολές της ιοντικής ισχύος προκαλούν αλλαγές στο μήκος των πολυμερικών αλυσίδων, την διαλυτότητα και τον φθορισμό των πολυμερών. 40,41,42,43,44,45,46,47,48,49

2.5.6 Οξειδοαναγωγικώς-αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα

Πολυμερή που περιέχουν ευκίνητες ομάδες έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσουν βιοδιασπώμενα ή βιοαποικοδομήσιμα συστήματα που ανταποκρίνονται στην οξειδοαναγωγή. Όξινια, ευκίνητα τμήματα μέσα στους πολυανυδρίτες, πολυ(γαλακτικό/γλυκολικό οξύ) (PLGA), και πολυ (β-αμινο

εστέρες) (PbAEs) προκαλούν οξειδοαναγωγή αποκρισιμότητα. Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί ομάδες δισουλφιδίου, οι οποίες επάγουν οξειδοαναγωγική απόκριση, επειδή είναι ασταθείς σε αναγωγικό περιβάλλον, και έτσι διασπώνται στις αντίστοιχες ομάδες θειόλης. Πολυμερή με δισουλφιδικούς δεσμούς αποικοδομούνται όταν εκτίθενται σε κυστεΐνη ή γλουταθειόνη, τα οποία είναι αναγωγικά μόρια προερχόμενα αμινοξέα. ^{40,41,42,43,44,45,46,47,48,49}

2.6 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

2.6.1 Πολυαιθυλενοξειδίο (PEO)

Η πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (polyethylene glycol, PEG) είναι ένας γραμμικός ή διακλαδισμένος πολυαιθέρας, με ποικιλία μοριακών βαρών. Η PEG είναι γνωστή και ως πολυ(αιθυλενοξειδίο) (polyethylene oxide, PEO), και ως πολυ(οξυαιθυλένιο) (polyoxyethylene, POE) ανάλογα με το μοριακό της βάρος. Οι τρεις διαφορετικές ονομασίες είναι χημικά συνώνυμες, αλλά η ονομασία PEG προτιμάται στον βιοϊατρικό κλάδο, ενώ το όνομα PEO χρησιμοποιείται κυρίως στην χημεία των πολυμερών. Επιπλέον, το όνομα PEG αναφέρεται σε πολυμερή με μοριακά βάρη κάτω των 20.000 g/mol, το PEO σε πολυμερή με μοριακά βάρη άνω των 20.000 g/mol, ενώ το POE σε πολυμερή οποιουδήποτε μοριακού βάρους. Τα PEG και PEO, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος είναι υγρά ή στερεά χαμηλού σημείου τήξεως. Πιο συγκεκριμένα σε μοριακό βάρος μικρότερο από 1000 g/mol είναι ιξώδη και άχρωμα υγρά ενώ σε υψηλότερα μοριακά βάρη τα PEG είναι κηρώδη και λευκά στερεά. Το σημείο τήξεως είναι ανάλογο του μοριακού βάρους προσεγγίζοντας ένα όριο περίπου στους 67 °C. Η PEG παράγεται από τον ανιοντικό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου του οξειδίου του αιθυλενίου. Η έναρξη του πολυμερισμού λαμβάνει χώρα με την πυρηνόφιλη προσβολή ενός υδροξυλίου στον εποξειδικό δακτύλιο. Διαφορετικά είδη PEG μπορούν να συντεθούν, ανάλογα με το είδος του χρησιμοποιούμενου απαρχητή. Η πιο χρήσιμη μορφή της είναι η μονομεθόξυ-PEG (monomethoxy PEG, mPEG) με δομή $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$. Η PEG είναι διαλυτή στο νερό, τη μεθανόλη, την αιθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το

βενζόλιο και το διχλωρομεθάνιο και είναι αδιάλυτη στον διαιθυλαιθέρα και το εξάνιο.

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

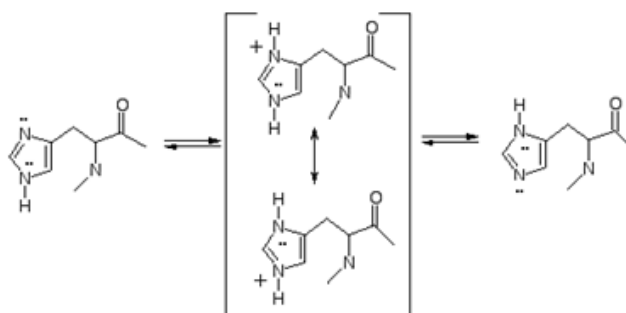
Στην παρούσα εργασία το πολυαιθυλενοξειδίο αποτέλεσε τον μακροαπαραχητή για τον πολυμερισμό των δύο συμπολυμερών που θα αναφερθούν εκτενώς στην συνέχεια.^{53,54,55,56,57,58,59}

2.6.2 Πολυ(Ιστιδίνη) (PHis)

Η L-ιστιδίνη (L- His) ως αμινοξύ κατέχει μια μοναδική ιδιότητα που το καθιστά ξεχωριστό ανάμεσα στα 20 φυσικά αμινοξέα. Λόγω αυτής της ιδιότητας, το πολυμερές της ιστοιδίνης (Poly(L-His), PHis) αποτελεί ένα πολυδύναμο εργαλείο με αξιοσημείωτες δυνατότητες, καθώς επίσης και ιδανικό πολυπεπτίδιο ως συστατικό σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η ξεχωριστή ιδιότητα που διαθέτει είναι η ομάδα ιμιδαζολίου, ένας αρωματικός δακτύλιος που μπορεί να φορτιστεί (Σχήμα 10). Στον ιμιδαζολικό δακτύλιο το μη υποκατεστημένο άζωτο φέρει ένα μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων, και μπορεί να πρωτονιωθεί σε $pK_a \sim 6.5$. Έτσι, η ομάδα του ιμιδαζολίου μπορεί να είναι είτε φορτισμένη θετικά,

είτε αφόρτιστη σε ουδέτερο pH, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο θα βρεθεί, προσδίδοντας στο μόριο pH-αποκρισιμότητα.

Αυτό για ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων, πρακτικά σημαίνει ότι σε pH~6.5, το pH ενός καρκινικού κυττάρου δηλαδή, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της ιστιδίνης θα πρωτονιωθεί και θα προκληθεί διόγκωση στο σύστημα που μεταφέρει το φάρμακο -άρα και απελευθέρωση του φαρμάκου- , λόγω της αλλαγής της δευτεροταγούς δομής του πολυπεπτιδίου. Αντίθετα, σε pH=7.4, στους υγιείς ιστούς δηλαδή, το μόριο θα είναι απολύτως σταθερό.



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

Η ιδιότητα αυτή της πολυ-ιστιδίνης την κάνει να πλεονεκτεί έναντι των περισσότερων pH-αποκρινόμενων μεταφορέων φαρμάκων, οι οποίοι επικεντρώνονται στην ενδοσωματική απόκριση του pH με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν το φάρμακο έξω από τα καρκινικά κύτταρα εξαιτίας του χαμηλού όξινου περιβάλλοντος, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Είναι φανερό, ότι η PHis συνδυάζει εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ιδιότητες, σχηματίζοντας μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, γεγονός το οποίο την καθιστά ένα ιδανικό μέσο για να χρησιμοποιηθεί σε βιολογικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς και πολλά υποσχόμενο εργαλείο στην αντικαρκινική θεραπεία. Παρόλο όμως τις ποικίλες ιδιότητες της, η ιστιδίνη παρουσιάζει ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα αυτό της ρακεμείωσης. Καθοριστικό παράγοντα στη μείωση της ρακεμείωσης αποτελεί η προστατευτική ομάδα. Οι προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση της PHis είναι είτε η benzyl προστατευτική ομάδα, είτε η 2,4-dinitrophenyl προστατευτική ομάδα (DNP), όμως καμία δεν προσδίδει έλεγχο

στη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών. Η benzyl προστατευτική ομάδα αποπροστατεύεται κάτω από πολύ δραστικές συνθήκες όπου μπορεί να προκαλέσει σπάσιμο του πεπτιδικού δεσμού ή ρακεμείωση ενώ η 2,4-dinitrophenyl προστατευτική ομάδα (DNP) δεν συνδυάζεται με δισουλφιδικούς δεσμούς αφού ο δεσμός αυτός σπάει κατά τη διάρκεια της αποπροστασίας του DNP με θειόλυση. Το 2014 η ερευνητική ομάδα του κ. Ιατρού ανέφερε τη σύνθεση της PHis με τρίτυλο προστατευτική ομάδα. Τα πλεονεκτήματα της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας είναι ότι εμφανίζει τη μικρότερη ρακεμείωση κατά την αποπροστασία και μπορεί να αποπροστατευτεί εύκολα με ασθενή οξέα. Επίσης, υπάρχει εκλεκτικότητα κατά την αποπροστασία της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας αφού οι άλλες προστατευτικές ομάδες δεν θα επηρεαστούν και μόνο η τρίτυλο θα φύγει. Άλλο ένα χαρακτηριστικό της είναι ότι είναι πολύ σταθερή απέναντι σε ουδέτερα, αλκαλικά μέσα και ως προς τα πυρηνόφιλα. Για τους ανωτέρω 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.⁵²

2.6.3 Φαινυλαλανίνη (Phe)

Η φαινυλαλανίνη είναι ένα από τα α-αμινοξέα με σύντομο συντακτικό τύπο $\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ και αποτελεί ένα από τα είκοσι αμινοξέα που υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό. Κανονικά, η ονομασία της κατά IUPAC θα ήταν: 2-αμινο-3-φαινυλοπροπανικό οξύ, αλλά το φαινυλαλανίνη αποτελεί επίσης αποδεκτή ονομασία από την IUPAC. Το L-στερεοϊσομερές της είναι ένα από τα 24 πρωτεϊνικά αμινοξέα (δομικές μονάδες των πρωτεϊνών) και παρουσιάζει S διαμόρφωση ως προς τον α-άνθρακα. Είναι ταξινομημένο ως ουδέτερο, μη πολικό (ή υδρόφοβο) αμινοξύ λόγω της πλευρικής του ομάδας η οποία είναι υδρόφοβη.

Σπουδαίος είναι ο ρόλος της φαινυλαλανίνης ως βιολογικός ρυθμιστής εκ της μετατροπής της σε άλλα σπουδαία αμινοξέα του οργανισμού όπως είναι η ντοπαμίνη, η νοραντοπαπίνη, η επινεφρίνη, η μελανίνη κ.ά.

Η φαινυλαλανίνη βρίσκεται φυσιολογικά στο γάλα των θηλαστικών, ενώ χρησιμοποιείται για την παραγωγή τροφών και αναψυκτικών και παράλληλα πωλείται και ως ένα διατροφικό πρόσθετο για τα φημισμένα αναλγητικά και αντικαταθλιπτικά αποτελέσματά της. Ακόμη, είναι ένα άμεσος πρόδρομος για το νευροδιαβιβαστή φαινυλαιθυλαμίνη, που επίσης είναι συνηθισμένο συμπλήρωμα διατροφής.^{60,61}

2.6.3.1 Πολυφαινυλαλανίνη (PPhe)

Η πολυφαινυλαλανίνη είναι ένα πολυμερές το οποίο, λόγω της εξαιρετικά άκαμπτης χημικής δομής του μορίου της, είναι ένα από τα πιο υδρόφοβα πολυμερή σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αντίστοιχα τα οποία έχουν συντεθεί αποκλειστικά από αμινοξέα.

Η πολυφαινυλαλανίνη έχει εξαιρετική σταθερότητα τόσο σε όξινες όσο και σε βασικές συνθήκες. Η γεωμετρία και οι ελκτικές δυνάμεις των αρωματικών δακτυλίων παρέχουν προσανατολισμό στο μόριο, όπως επίσης και την ενέργεια που χρειάζεται για τον σχηματισμό πολύ καλά καθορισμένων δομών. Συγκεκριμένα, το διμερές της φαινυλαλανίνης αποτελεί ένα ευρέως μελετημένο αρωματικό διπεπτιδίο που σχηματίζει δομές νανοσωλήνα.⁶²

Η δομή του μορίου της έχει επιτρέψει την παρασκευή ζελατινών πολυφαινυλαλανίνης, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ως μόρια για μεταφορά φαρμάκων, ως εξωκυτταρική μήτρα για προσομοίωση ανθρώπινων ιστών. Το 2009, δημοσιεύτηκε ένα άρθρο, το οποίο αναφερόταν στην σύνθεση ενός συμπολυμερούς πολυγλουταμικού οξέος-πολυφαινυλαλανίνης [poly(L-glutamic acid)-block-poly-(L-phenylalanine)]. Η pH αποκρισιμότητα την οποία εμφάνισε το προαναφερόμενο συμπολυμερές οφείλεται στις αλλαγές της ιονικής ισχύος του πολυγλουταμικού οξέος και αυτό το χαρακτηριστικό το καθιστά ένα εν δυνάμει σύστημα μεταφοράς φαρμάκων.⁶³ Το 2014, μάλιστα, δημοσιεύθηκε ένα ακόμη άρθρο σχετικά με το αμφίφιλο συμπολυμερές πολυφαινυλαλανίνη-πολυσερίνη [poly(L-phenylalanine)-b-poly(L-serine)], το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, εξίσου, ως μεταφορέας φαρμάκου για την θεραπεία του καρκίνου.

Γεγονός, όμως, είναι πως οι ιδιότητές του πολυμερούς της φαινυλαλανίνης δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, λόγω της χαμηλής της διαλυτότητας τόσο σε υδατικούς όσο και σε οργανικούς διαλύτες.⁶⁴

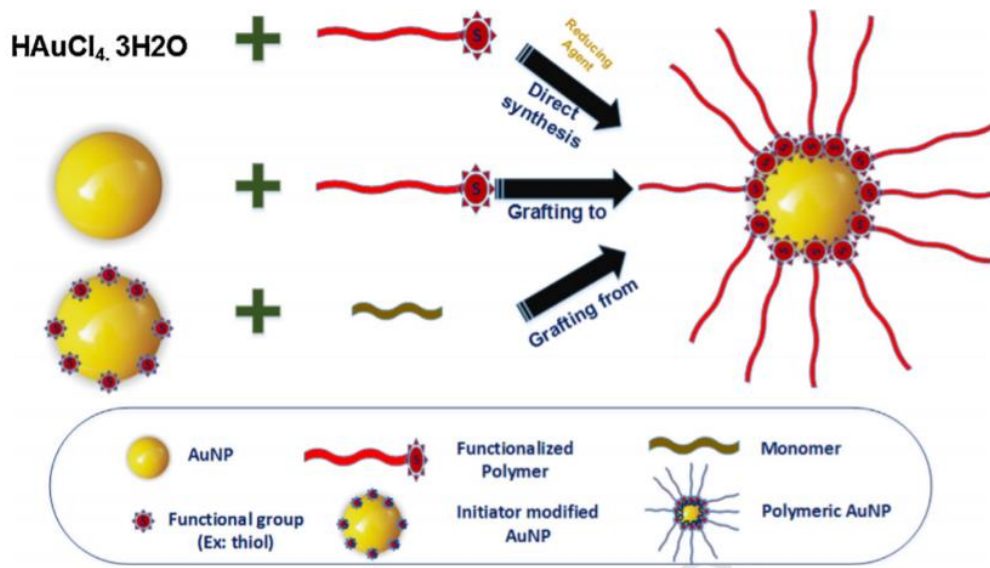
2.6.4 Νανοσωματίδια Χρυσού [AuNPs, Gold (Au) Nanoparticles]

Τα νανοσωματίδια χρυσού αναδεικνύονται ως ένα νέο υλικό, που μπορεί ταυτόχρονα να χρησιμοποιηθεί στη στοχευμένη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων αλλά και στην απεικόνιση, αυτή η εφαρμογή είναι γνωστή ως «theranostics». Έχουν αρκετές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως είναι η χημική αδράνεια, η ικανότητα προσαρμογής λειτουργικών ομάδων στην επιφάνειά τους καθώς και οπτικές ιδιότητες που τα κάνουν κατάλληλα, να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες απεικόνισης.

Σε ότι αφορά τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού, μπορούν να συνδεθούν πολυμερή, τα οποία είναι τα ίδια μεταφορείς φαρμάκων. Με τη σύνδεση αυτή, επιτυγχάνεται η αύξηση του χρόνου ζωής του πολυμερούς στο αίμα, άρα και του φαρμάκου που μεταφέρει, βελτιώνεται η σταθερότητα του πολυμερικού νανοσωματιδίου και μειώνεται η κυτταροτοξικότητα που πιθανώς να υπάρχει σε κάποια τέτοια μόρια.

Εκτός από αυτή την εφαρμογή τα νανοσωματίδια χρυσού μπορούν ταυτόχρονα να χρησιμοποιηθούν ως απεικονιστικοί παράγοντες, ή ως βιοαισθητήρες, για τη διάγνωση του καρκίνου λόγω της ικανότητάς τους να εκπέμπουν φωτόνια κατά την ακτινοβολήση.

Έχουν αναπτυχθεί τρεις τρόποι για τη σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού που είναι συνδεδεμένα με πολυμερικά νανοσωματίδια: i) με την απευθείας αναγωγή του άλατος του χρυσού σε στοιχειακό χρυσό, με τη χρήση πολυμερούς που έχει την ικανότητα να λειτουργήσει ως αναγωγικό ή άλλου αναγωγικού, ii) με την σύνδεση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων χρυσού με λειτουργικές ομάδες, οι οποίες φέρουν συνδεδεμένη πολυμερική αλυσίδα, iii) με την τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων χρυσού με λειτουργικές ομάδες, πάνω στις οποίες μπορούν έπειτα να συντεθούν πολυμερικές αλυσίδες (Εικόνα 7).⁶⁵



Εικόνα 7: Μέθοδοι για την σύνθεση πολυμερικών νανοσωματιδίων χρυσού. ⁶⁵

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

Το κεφάλαιο αυτό αναφέρεται στις βασικές αρχές των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό και την μελέτη των μορίων και των ομοπολυμερών και συμπολυμερών που συντέθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ειδικότερα πρόκειται να αναλυθούν οι τεχνικές της φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (SEC), του κυκλικού διχρωϊσμού (CD), της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και της φασματοφωτομετρίας υπεριώδους (UV).

3.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (infrared, IR) αποτελεί μία από τις καλύτερες τεχνικές για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε είδους ουσίας και βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία και στην ανάλυση φαρμάκων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κλπ. Η υπέρυθρη φασματοσκοπία είναι μία φασματοσκοπική τεχνική που αφορά τη λήψη φασμάτων στην περιοχή υπερύθρου της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στην υπέρυθρη περιοχή συμβαίνουν απορροφήσεις που οφείλονται στις δονήσεις τάσης και κάμψης δεσμών των μορίων που είναι χαρακτηριστικές σε συγκεκριμένες συχνότητες (Εικόνα 8).

Στη φασματοσκοπία υπερύθρου μελετάμε την απορρόφηση υπέρυθρου φωτός από το δείγμα συναρτήσει της συχνότητας. Το μόριο απορροφά ενέργεια $\Delta E = h\nu$ από την IR πηγή (που εκπέμπει ακτινοβολία έντασης I) σε κάθε δονητική μετάβαση. Η διαπερατότητα T ορίζεται: $T=I/I_0$.

Η διέλευση μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή μεταξύ του 0 και του 1 και συχνά εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό (οπότε οι τιμές που μπορεί να πάρει βρίσκονται μεταξύ του 0 και του 100%). Η απορρόφηση και η διέλευση σχετίζονται επομένως ως εξής:

$$P=P_0 \text{Exp}[-a b]$$

Όπου:

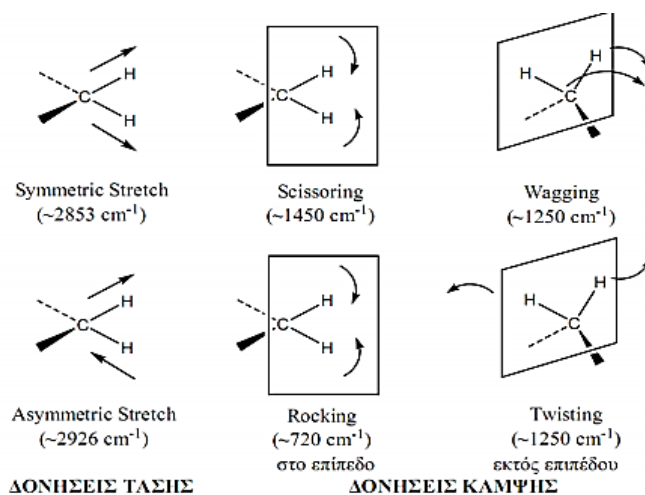
P: Ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας μετά τη διέλευση δείγματος

P₀ : Ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας

a: σταθερά απορρόφησης

b: πάχος δείγματος

Η πλέον χρήσιμη σχέση στην φασματοφωτομετρία απορρόφησης προκύπτει από τον συνδυασμό του νόμου του Lambert (κάθε στρώμα, ίσης επιφάνειας, ενός απορροφητικού μέσου απορροφά ίσο ποσοστό της ακτινοβολίας που το διασχίζει) και του νόμου του Beer (η απορρόφηση ενός διαλύματος είναι ανάλογη προς την συγκέντρωση της απορροφητικής ουσίας. Το φάσμα απορρόφησης και ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης σε μήκος κύματος λ είναι παράμετροι που χαρακτηρίζουν μοναδικά συγκεκριμένα μόρια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ποσοτικοποίηση, όσο και για χαρακτηρισμό δειγμάτων.



Εικόνα 8: Δονήσεις τάσης και κάμψης των μοριακών δεσμών. ⁶⁶

Να σημειωθεί εδώ πως κάθε χημικός δεσμός παρουσιάζει μια θέση και ένταση απορρόφησης που είναι χαρακτηριστική για αυτόν με βάση τις δονήσεις που λαμβάνουν χώρα στο μόριο. Η χρήσιμη περιοχή του IR είναι από 4000 cm⁻¹ μέχρι 400 cm⁻¹. Το φάσμα στην υπέρυθη περιοχή χωρίζεται σε τέσσερα τμήματα ώστε να μας διευκολύνει στην ερμηνεία του.

1. Η πρώτη περιοχή κυμαίνεται από τα 4000 μέχρι 2500 cm^{-1} και αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης των χημικών δεσμών N-H, O-H, C-H. Οι πρώτοι δύο δεσμοί απορροφούν στα 3300-3600 cm^{-1} και ο άλλος δεσμός απορροφά περίπου στα 3000 cm^{-1} .
2. Η δεύτερη περιοχή όπου αντιστοιχεί στα 2500-2000 cm^{-1} είναι δόνηση τάσης τριπλών δεσμών των $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$.
3. Έπειτα η τρίτη περιοχή είναι από 2000 μέχρι 1500 cm^{-1} και απορροφούν όλοι οι διπλοί δεσμοί. Πιο αναλυτικά οι καρβονυλικές ομάδες απορροφούν μεταξύ 1680 και 1750 cm^{-1} και για τα αλκένια ισχύει ότι κυμαίνονται από 1640 έως 1680 cm^{-1} .
4. Τέλος, το τέταρτο τμήμα του φάσματος καλείται περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος αποτελείται από πολλές περιοχές λόγω της ποικιλίας των απλών χημικών δεσμών.

Γενικά, αυτό που πρέπει να γνωρίζουμε είναι ότι οι βραχείς και ισχυροί δεσμοί δονούνται σε υψηλότερη συχνότητα και με μικρότερο μήκος κύματος σε σχέση με τους ασθενείς χημικούς δεσμούς και για τους δεσμούς που δονούνται ταχύτερα πάλλονται σε υψηλή συχνότητα.

Στη χημεία των πολυπεπτιδίων η χρήση του IR είναι πολύ σημαντική, τόσο για την ποιοτική εξακρίβωση σύνθεσης του εκάστοτε N-καρβοξυ ανυδρίτη των α-αμινοξέων (συνήθεις δονήσεις έκτασης στα 1785 cm^{-1} και 1855 cm^{-1}) όσο και για την επιτυχή σύνθεση των πολυπεπτιδίων (χαρακτηριστική δόνηση του αμιδικού δεσμού στα 1650 cm^{-1}).^{67,68}

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

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

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

3.2 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδος που έχουν στη διάθεσή τους οι χημικοί. Είναι η πρώτη μέθοδος προσδιορισμού της δομής των μορίων, προς την οποία στρέφονται για την άντληση πληροφοριών, γιατί παρέχει ένα "χάρτη" του όλου ανθρακικού σκελετού με τα άτομα υδρογόνου σε ένα μόριο. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα χρήσιμο

εργαλείο, γιατί με τη βοήθειά της προσδιορίζουμε τη στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) του πολυμερούς καθώς και τη γεωμετρική ισομέρεια, τη δομή και τη σύσταση των συμπολυμερών, ενώ επίσης πραγματοποιείται η μελέτη της δυναμικής των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση.

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

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

Όλοι οι πυρήνες στα μόρια περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά

τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό.

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

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

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

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

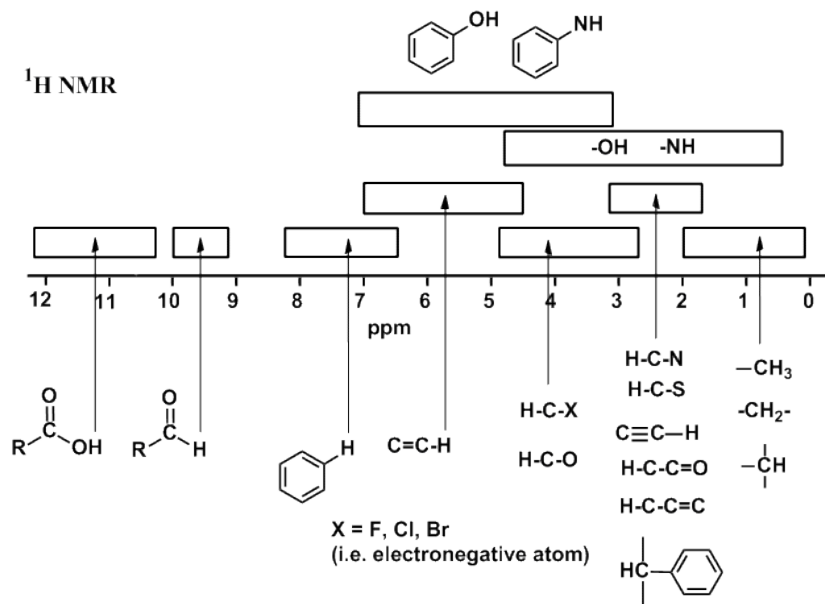
$$\delta = (\nu_{\alpha} - \nu_{\delta}) / \nu_{\alpha} \times 10^6 \text{ ppm}$$

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

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

Στη φασματοσκοπία ^1H -NMR και όχι στη ^{13}C -NMR (λόγω του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, NOE) το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι δυνατό να μετρήσουμε το σχετικό αριθμό των κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο. Με τον τρόπο αυτό εξάγονται ποσοτικά συμπεράσματα συγκρίνοντας το εμβαδόν χαρακτηριστικών κορυφών πρωτονίων ενός μορίου (π.χ. αν μία δραστική ομάδα έχει αντιδράσει με όλες τις μακρομοριακές αλυσίδες).^{69,70}

Οι μετρήσεις της φασματοσκοπίας ^1H -NMR πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Bruker 600 MHz.



Εικόνα 9: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία ¹H-NMR.

3.3 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC)

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

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

αυτής της μεθόδου είναι να είναι πολύ καλά διαλυτή στον διαλύτη που χρησιμοποιείται στη διάταξη, να μην αντιδρά με αυτόν και να μην αντιδρά με το μέσο διαχωρισμού.

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

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

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

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

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών δεν είναι μία απόλυτη μέθοδος και ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση του χρωματογράφου με πρότυπα δείγματα. Αυτά περιλαμβάνουν συνήθως ομοπολυμερή πολυστυρενίου

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

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

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

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

Ο ανιχνευτής UV χρησιμοποιείται όταν τα προς ανάλυση πολυμερή διαθέτουν κάποια χρωμοφόρο ομάδα η οποία απορροφά σε αυτήν την περιοχή (συνήθως δουλεύουν μεταξύ 190 και 400 nm). Σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή DRI, δίνουν από κοινού πληροφορίες για τη σύσταση ενός συμπολυμερούς που διαθέτει κάποια συστάδα που απορροφά στην περιοχή του υπεριώδους.

Ο ανιχνευτής DRI (Differential Refractometer Index), θεωρείται παγκόσμιος ανιχνευτής αφού είναι ευαίσθητος στις διαφορές του δείκτη διάθλασης του διαλύτη και της διαλυμένης προς προσδιορισμό πολυμερικής ουσίας.

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

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

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

Τέλος, όσο αφορά στον ιξωδομετρικό ανιχνευτή, αυτός χρησιμοποιείται συνήθως σε σειρά με κάποιο ανιχνευτή μάζας-συγκέντρωσης από αυτούς που προαναφέρθηκαν και μπορεί να δώσει πολύ καλές πληροφορίες για την απόλυτη μέση μοριακή μάζα, το εσωτερικό ιξώδες και το βαθμό διακλάδωσης. Το μεγάλο πλεονέκτημα του ιξωδομετρικού ανιχνευτή είναι η δυνατότητα λήψης μέσων μοριακών βαρών με βάση την παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης για διαφορετικής σύστασης πολυμερή ανεξαρτητοποιώντας τον υδροδυναμικό όγκο από τον παράγοντα αρχιτεκτονική.

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί μία εύχρηστη και γρήγορη μέθοδο με τη βοήθεια της οποίας μπορεί να σχηματιστεί μία πρώτη εικόνα για το πολυμερές που παρασκευάστηκε, ως προς το μέσο μοριακό του βάρος, αλλά κυρίως προς την κατανομή μοριακών βαρών του και να εξαχθούν

συμπεράσματα για την επίτευξη ή όχι της σύνθεσης του επιθυμητού μακρομορίου.^{71,72,73}

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας όργανο αποτελούμενο από αντλία της Waters μοντέλο 510 και ανιχνευτές διαφορικού διαθλασιμέτρου της Waters μοντέλο 401 και διοδική διάταξη UV-Vis. Η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στο 1 mL/min και ως φέρον διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το milliQ : TFA 2% : MeCN 10 %. Για την παρασκευή των δειγμάτων, ζυγίστηκαν 6 mgr πολυμερούς σε μπουκαλάκι (vial) και διαλύθηκαν στον φέροντα διαλύτη σε ποσότητα περίπου 1mL.

3.4 Κυκλικός Διχρωϊσμός Πολυπεπτιδίων (CD)

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

δισουλφιδικούς δεσμούς (αδύναμες ευρείες ζώνες απορρόφησης με κεντρικό άξονα γύρω από τα 260 nm). Τέλος, μπορεί να προκύψουν σήματα από υποκαταστάτες, οι οποίοι δεν έχουν ενδογενή χειρομορφία αλλά αποκτούν χειραλικότητα όταν συνδέονται σε ένα ασύμμετρο περιβάλλον, όπως αυτό που παρέχεται από μια πρωτεΐνη.

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

$$[\theta] = \frac{\tan^{-1} \epsilon_R - \epsilon_L}{\epsilon_R - \epsilon_L} = 3298 * (\epsilon_R - \epsilon_L)$$

$$\epsilon_R - \epsilon_L$$

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

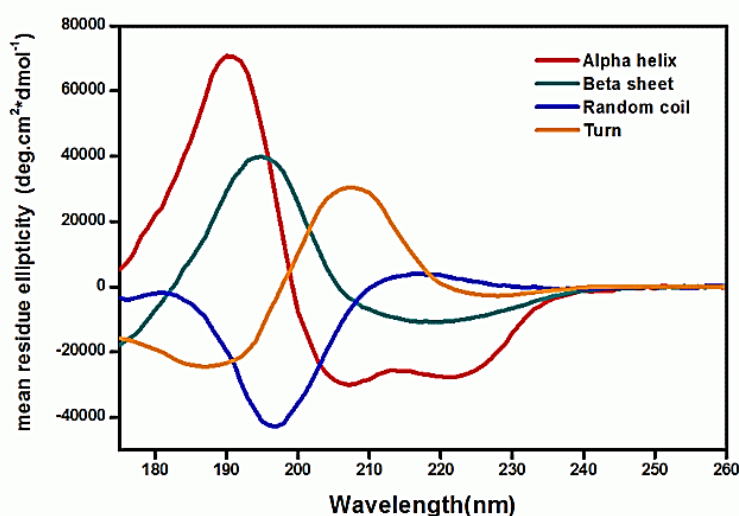
Πίνακας 2: Απορροφήσεις των τριών διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στον κυκλικό διχρωϊσμό.

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

Οι πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από τη μελέτη των πρωτεϊνών με τον κυκλικό διχρωϊσμό είναι οι εξής: 1) Η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών (% έλικα, φύλλο, στροφές, κτλ.), η οποία ταυτοποιείται από την περιοχή του πεπτιδικού δεσμού. Η απορρόφηση στην περιοχή αυτή (240 nm και κάτω) οφείλεται κυρίως στον πεπτιδικό δεσμό. Υπάρχει μια αδύναμη αλλά ευρεία $n \rightarrow \pi^*$ μετατόπιση γύρω από τα 220 nm και μια πιο έντονη $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάβαση γύρω στα 190 nm. 2) Η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών.

Τα φάσματα στην περιοχή 260-320 nm προκύπτουν από το αρωματικά αμινοξέα. Κάθε ένα από τα αμινοξέα τείνει να έχει ένα χαρακτηριστικό προφίλ μήκους κύματος. 3) Οι θέσεις δέσμευσης των συμπαραγόντων των πρωτεϊνών. 4) Συμπέρασμα σχετικά με τα χαρακτηριστικά της συνολικής δομής των πρωτεϊνών. 5) Μεταβολικές αλλαγές στις πρωτεΐνες. 6) Αναδίπλωση πρωτεϊνών.

Οι χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των τεσσάρων συνηθέστερων διαμορφώσεων μίας πολυπεπτιδικής δομής (α-έλικα, β-φύλλο, τυχαίο σπειράμα και στροφή) δίνονται παρακάτω (Εικόνα 10).⁷⁴



Εικόνα 10: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε διαμόρφωση α-έλικας (κόκκινη καμπύλη), β-φύλλου (πράσινη καμπύλη), δομή τυχαίου σπειράματος (μπλε καμπύλη) και στροφής (πορτοκαλί καμπύλη).

Οι μετρήσεις του κυκλικού διχρωϊσμού έγιναν με χρήση φασματοφωτομέτρου Jasco J-815 CD, εξοπλισμένο με λάμπα Xe 150 W και σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας Jasco Peltier PTC-423S/15 στην περιοχή 180-260 nm, σε ειδικά κατασκευασμένες κυψελίδες. Επειδή οι μετρήσεις του κυκλικού διχρωϊσμού γίνονται σε διάλυμα, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην επιλογή του διαλύτη, ώστε να μην απορροφά αυτός στις μετρούμενες περιοχές. Τέτοιοι διαλύτες είναι το ακετονιτρίλιο και το νερό. Στην παρούσα μελέτη ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το νερό.

3.5 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

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

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

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

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

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

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

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

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

$$D_{t,o} = KM^{-b}$$

που είναι ανάλογη της σχέσης Mark-Houwink-Sakurada για το εσωτερικό ιξώδες. Οι σταθερές K , b έχουν συγκεκριμένες τιμές για δεδομένο σύστημα πολυμερούς - διαλύτη - θερμοκρασίας. Για εύκαμπτα μακρομόρια σε θ διαλύτες $b=0,5$, ενώ για καλούς διαλύτες $b=0,55-0,58$.^{75,76,77}

Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός, πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλο φασματοφωτόμετρο της εταιρίας Brookhaven Instruments (μοντέλο NanoBrook Omni), το οποίο διαθέτει laser που λειτουργεί στα 640 nm και μονάδα ελέγχου θερμοκρασίας τύπου relier. Η κυψελίδα εισαγωγής του δείγματος αποτελείται από πολυστυρένιο.

3.6 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Η φασματοφωτομετρία απορρόφησης αποτελεί αναμφίβολα μια από τις χρησιμότερες τεχνικές για τον προσδιορισμό μορίων. Πάρα πολλές ενώσεις απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, ιδιαίτερα στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος, και με τη χρησιμοποίηση του κατάλληλου οργάνου και τεχνικής είναι δυνατή η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός μίας χημικής ένωσης σε ένα σκεύασμα, σε ένα αντιδρών μίγμα ή σε ένα βιολογικό σύστημα. Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, καλείται χρωμοφόρο και η εμφάνιση των χαρακτηριστικών ταινιών απορρόφησης των διαφόρων χρωμοφόρων ομάδων σε ένα φάσμα απορρόφησης είναι ενδεικτική για την ύπαρξη των ομάδων αυτών στο μόριο. Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (~200-800 nm) χρησιμοποιείται κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών, με συσχέτιση του ποσοστού απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας προς τη συγκέντρωση της ουσίας που είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση.

Η βασική αρχή από την οποία διέπεται η φασματοφωτομετρία είναι ο νόμος του Beer ο οποίος αναφέρει το εξής: Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από διάλυμα, που περιέχει την ουσία X, η οποία απορροφά, η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά κατά μήκος της διαδρομής, λόγω απορροφήσεως της από την ουσία X. Η ελάττωση της ισχύος ($P < P_0$) εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας X και από την απόσταση που διάνυσε η ακτίνα μέσα στο διάλυμα.

$$A = \log(P_0/P) = -\log T = \log(100/\%T) = abc_{g/L} = \epsilon bc_{mol/L}$$

όπου:

A= απορρόφηση (absorbance) ή απόσβεση (extinction, E). Είναι καθαρός αριθμός αφού εξαρτάται από το λόγο ομοίων μεγεθών.

P_0 = ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

P= ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας, μετά τη διέλευση από το διάλυμα

T= διαπερατότητα (transmittance), ίση με P/P_0 που εκφράζεται και στα εκατό (%T) και είναι καθαρός αριθμός

a= σταθερά αναλογίας, όταν η c εκφράζεται σε g/L, που καλείται απορροφητικότητα (absorptivity). Έχει μονάδες $g^{-1} Lcm^{-1}$

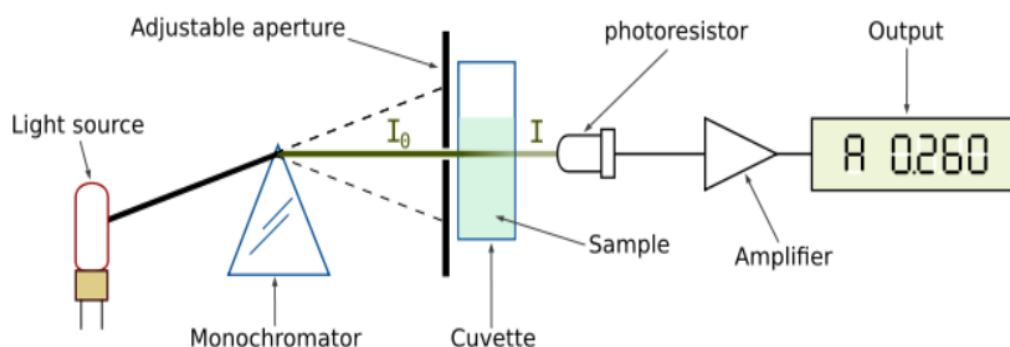
b= μήκος διαδρομής που διανύθηκε μέσα σε διάλυμα και εκφράζεται συνήθως σε cm (αναφέρεται και ως πάχος στοιβάδας ή εσωτερικό πάχος κυψελίδας και παλιότερα συμβολιζόταν και με l ή d)

ϵ = σταθερά αναλογίας, όταν η c εκφράζεται σε mol/L, που καλείται μοριακή απορροφητικότητα (molar absorptivity). Έχει μονάδες $mol^{-1} Lcm^{-1}$ και συνδέεται με την απορροφητικότητα a με τη σχέση $\epsilon = a MB$, όπου MB=μοριακό βάρος ουσίας που απορροφά.

Η απορροφητικότητα χρησιμοποιείται, όταν είναι άγνωστη φύση της ουσίας X, που απορροφά, και επομένως και το μοριακό της βάρος, ενώ η μοριακή απορροφητικότητα ϵ προτιμάται, όταν θέλουμε να συγκρίνουμε ποσοτικά την απορρόφηση διαφόρων ουσιών γνωστού μοριακού βάρους. Στην πράξη, η συγκέντρωση εκφράζεται και σε άλλες μονάδες, π.χ. mg/mL (ppm), οπότε η σταθερά αναλογίας στον τύπο του Beer έχει διαφορετική τιμή από την a ή και την ϵ . Απεικόνιση της A ή της T ως συνάρτηση του μήκους κύματος λ ή του

κυματάρηθου ν παρέχει το φάσμα απορροφήσεως, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαπίστωση της υπάρξεως χαρακτηριστικών ομάδων, για τη διευκρίνιση της δομής της ουσίας που απορροφά και για την ταυτοποίηση της. Τα χαρακτηριστικά ενός φάσματος είναι το $\lambda_{\text{μεγ}}$ και το αντίστοιχο $\epsilon_{\text{μεγ}}$. Από την απορρόφηση A μπορεί να προσδιορισθεί η συγκέντρωση c της ουσίας που απορροφά με βάση την εξίσωση του Beer.

Τα φασματοφωτόμετρα ταξινομούνται ποικιλότροπα παρ' όλα αυτά ανεξάρτητα από τις επιμέρους διαφορές, όλα τα φασματοφωτόμετρα περιέχουν τις ίδιες βασικές δομικές μονάδες, δηλαδή μία πηγή ακτινοβολίας σταθερής ισχύος, που αναφέρεται και ως πηγή φωτός ή απλώς πηγή, ένα επιλογέα μήκους κύματος για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας, μια κυψελίδα για την τοποθέτηση του δείγματος, ένα ανιχνευτή ακτινοβολίας, που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό (μεταλλάκτης) και ένα σύστημα μετρήσεως το οποίο συνήθως περιλαμβάνει ενισχυτή του σήματος και όργανο αναγνώσεως.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση φασματοφωτομέτρου ορατού και υπεριώδους.

Στη φασματοσκοπία υπεριώδους και ορατού χρησιμοποιούνται αραιά διαλύματα του δείγματος. Ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης για την παρασκευή του δείγματος δεν πρέπει να απορροφά στην περιοχή του φάσματος, όπου και μετράται η απορρόφηση του δείγματος. Ο διαλύτης είναι δυνατό να επιδράσει στη διαλυμένη ουσία και να μεταβάλει το φάσμα απορροφήσεως της. Οι πολικοί διαλύτες αυξάνουν το εύρος των κορυφών απορροφήσεως και μετατοπίζουν τη θέση του $\lambda_{\text{μεγ}}$. Η οξύτητα επίσης του διαλύτη (που ρυθμίζεται με τη προσθήκη ισχυρού οξέος ή βάσεως) επηρεάζει δραστικά το φάσμα απορροφήσεως πολλών ουσιών.⁷⁸

Οι μετρήσεις της φασματοσκοπίας πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis της εταιρίας PerkinElmer (μοντέλο Lambda 650), το οποίο διαθέτει δύο λάμπες και συγκεκριμένα μία λάμπα πυράκτωσης για το ορατό φάσμα και μία λυχνία δευτερίου για το υπεριώδες. Οι κυψελίδες εισαγωγής του δείγματος είναι κατασκευασμένες από γυαλί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

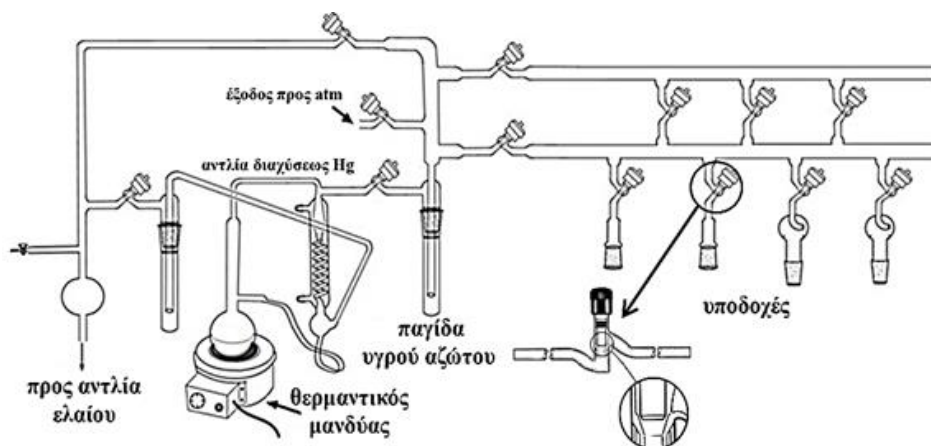
4.1 Τεχνική Υψηλού Κενού (High Vacuum Technique, HVT)

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 ίχνη υγρασίας τα οποία 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 παρακάτω (Σχήμα 11). 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). Η αντλία ελαίου δημιουργεί κενό της τάξης των 10^{-2} – 10^{-3} mm Hg. Το προκαταρκτικό αυτό κενό είναι απαραίτητο για να αποστάξει ο υδράργυρος, που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως, σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία. Ο υδράργυρος θερμαίνεται με τη βοήθεια ενός θερμαντικού μανδύα και καθώς τα μόρια του υδραργύρου κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξηση της ταχύτητάς τους με ταυτόχρονη ελάττωση της πίεσής τους, σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli.

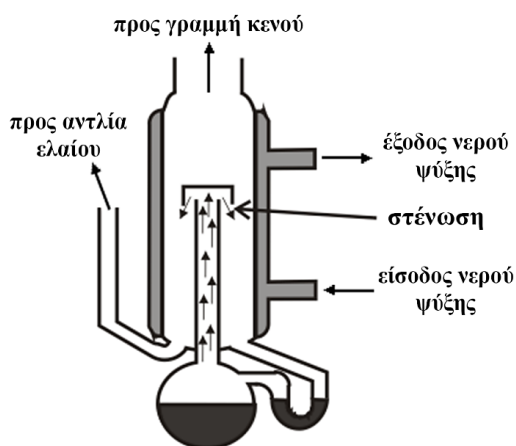


Σχήμα 11: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού (HVL).

Σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli, όταν ένα ασυμπίεστο ρευστό ρέει κατά μήκος ενός σωλήνα ροής που δεν έχει σταθερή διατομή, η παροχή (ρυθμός ροής) του δεν πρέπει να αλλάζει. Όταν ένα στοιχείο του ασυμπίεστου ρευστού επιταχύνεται, θα πρέπει να κινείται από μία περιοχή υψηλής πίεσης προς μία άλλη χαμηλής πίεσης, ώστε να υπάρχει συνισταμένη δύναμη που να το επιταχύνει προς τα εμπρός. Όταν η διατομή του σωλήνα ροής μεταβάλλεται, θα πρέπει να αλλάζει και η πίεση ακόμα και αν δεν υπάρχει διαφορά στο ύψος. Έτσι, κατά τη δίοδο των μορίων του υδραργύρου μέσα από τη στένωση

προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς τους και λόγω της μείωσης της πίεσης που αυτό προκαλεί, δημιουργείται διαφορά πίεσης (υποπίεση) στα άκρα της στήλης. Κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα, ο υδράργυρος συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη, όπου και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Έτσι επιτυγχάνεται το τελικό κενό που είναι της τάξης των 10^{-6} mm Hg, ίσο με την τάση ατμών του υδραργύρου (Σχήμα 12).

Πριν χρησιμοποιηθεί η γραμμή κενού για απαέρωση, πρέπει να τεθεί σε λειτουργία η αντλία ελαίου, να προσαρμοστεί σ' αυτήν η κενή συσκευή πολυμερισμού και να ανιχνευθεί τυχόν ύπαρξη μικροοπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla. Το κενό της γραμμής ελέγχεται με τη βοήθεια πηνίου Tesla, όταν ο θόρυβος κατά την επαφή του πηνίου με τα γυάλινα τμήματα της γραμμής είναι αμελητέος, μόνο τότε η γραμμή έχει απαερωθεί σωστά. Ο χειρισμός της γραμμής υψηλού κενού, ελλοχεύει πολλούς κινδύνους, γι' αυτό κάθε φορά πρέπει να λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα προστασίας, όπως χρήση προστατευτικών γυαλιών κ.ά.



Σχήμα 12: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου.

Μόνο όταν εξασφαλιστεί απόλυτη στεγανότητα η γραμμή είναι έτοιμη για τη διεξαγωγή της διαδικασίας απομάκρυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα από οποιοδήποτε προς πολυμερισμό σύστημα. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται εύκολα, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο (-196 °C) ή λουτρό ισοπροπανόλης – ξηρού πάγου (-78 °C). Ο χειρισμός της γραμμής κενού και οι απαραίτητες

προφυλάξει, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε αποτελούν πολύ σημαντικό κομμάτι, αναφέρονται εκτενώς στη βιβλιογραφία.^{79,80}

4.2 Καθαρισμός Διαλυτών

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις πολυμερισμού, όπως επίσης και στις περισσότερες οργανικές αντιδράσεις, είναι απαραίτητο να μην περιέχουν ίχνη υγρασίας και οξυγόνου, αλλά και να έχουν απομακρυνθεί ανεπιθύμητες προσμείξεις που μπορεί να περιέχουν. Οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την πορεία των αντιδράσεων όπως προαναφέρθηκε και ανάλογα τις συνθήκες μπορούν να δράσουν ως απαρχητές, επιβραδυντές ή αναστολείς πολυμερισμού, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα όπως είναι η ευρεία κατανομή μοριακών βαρών. Γι' αυτό το λόγο οι εμπορικά διαθέσιμοι διαλύτες υπόκεινται σε περαιτέρω διαδικασίες καθαρισμού, όπου στην πλειονότητά τους περιλαμβάνουν την αντίδραση τους με κάποιο ξηραντικό μέσο προς απομάκρυνση της υγρασίας, και εν συνεχεία την απαέρωση και απόσταξή τους υπό κενό. Ακολούθως παρατίθενται οι διαδικασίες καθαρισμού των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.⁷⁹

4.2.1 Οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc)

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

4.2.2 Εξάνιο (C₆H₁₄)

Το εξάνιο χρησιμοποιείται ως μη διαλύτης κατά τη διαδικασία των ανακρυσταλλώσεων για τον καθαρισμό των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs). Ο καθαρισμός του εμπορικώς διαθέσιμου εξανίου (>99%, Merck Millipore) περιλαμβάνει αρχικά την κατεργασία του με μικρή ποσότητα λεπτότατα διαμερισμένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH₂) για μια ημέρα σε σφαιρική φιάλη 2L, για την απομάκρυνση ιχνών υγρασίας. Ακολούθως, πραγματοποιείται απαέρωση και απόσταξη του διαλύτη στη γραμμή υψηλού κενού σε γειτονική καθαρή σφαιρική φιάλη 2L, που περιέχει μικρή ποσότητα κανονικού βουτυλολιθίου (*n*-BuLi) ~10 mL, το οποίο αντιδρά με τυχόν προσμίξεις και έχει εισαχθεί μέσω ένεσης. Μετά το τέλος της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση και το καθαρό εξάνιο φυλάσσεται υπό κενό. Η ποσότητα CaH₂ της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

4.2.3 Βενζόλιο (C₆H₆)

Το βενζόλιο λόγω της ιδιότητας του να σχηματίζει αζεοτροπικό μίγμα με το νερό, χρησιμοποιείται στην έκλυση των συσκευών πολυμερισμού πριν από την αντίδραση, προς απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας. Κατά τον καθαρισμό του αφήνεται υπό ανάδευση για μια μέρα σε σφαιρική φιάλη με λεπτότατα λειοτριβημένο CaH₂, ώστε να απομακρυνθούν ίχνη υγρασίας από τον εμπορικά διαθέσιμο διαλύτη. Στη συνέχεια, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, με χρήση ειδικού αντάπτορα, και το διάλυμα απαερώνεται και αποστάζεται σε φιάλη που περιέχει ~10mL κανονικού βουτυλολιθίου *n*-BuLi. Το βενζόλιο, αφήνεται υπό ανάδευση για μία μέρα με το *n*-BuLi, ώστε να αντιδράσουν και τα τελευταία ίχνη προσμίξεων που μπορεί να περιέχει. Με την ολοκλήρωση της απόσταξης το καθαρό βενζόλιο απέκτησε κίτρινο χρώμα (ένδειξη υψηλής καθαρότητας) και φυλάχθηκε υπό κενό.

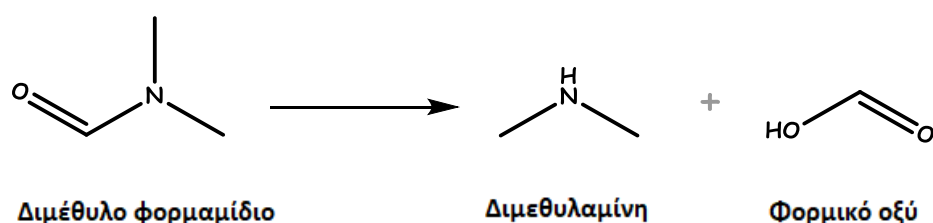
4.2.4 Διχλωρομεθάνιο - DCM (CH₂Cl₂)

Το διχλωρομεθάνιο αποτέλεσε το διαλύτη του πολυμερισμού του Ν-καρβοξυ ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης, παρότι ως διαλύτης των περισσότερων Ν-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων χρησιμοποιείται το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Η επιθυμητή ποσότητα εμπορικά διαθέσιμου DCM τοποθετήθηκε σε φιάλη με λεπτόκοκκα διαμερισμένο CaH₂ και αφέθηκε υπό ανάδευση για μία ημέρα, ώστε να δεσμευτούν τυχόν ίχνη υγρασίας από το ξηραντικό μέσο. Στη συνέχεια, έπειτα από ενδεδειγμένη απαέρωση, το DCM αποστάχθηκε στην γραμμή κενού σε δεύτερη καθαρή φιάλη που περιείχε προξηραμένα μοριακά κόσκινα 3 Å και φυλάχθηκε υπό κενό μέχρι τη χρήση του.

4.2.5 Διμεθυλοφορμαμίδιο - DMF (C₃H₇NO)

Το DMF αποτελεί τον συνηθέστερο διαλύτη του πολυμερισμού των Ν-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων, όπως προαναφέρθηκε. Ωστόσο στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά και μόνο για την αραίωση του απαρχητή και όχι για τον πολυμερισμό. Το DMF υπόκειται σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση για αυτό ο χειρισμός του απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή. 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 καθ' ότι το καθαρό DMF είναι άοσμο (Σχήμα 13).

Η παραγωγή της 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.



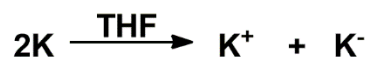
Σχήμα 13: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF.

Το DMF φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box. Κατά τον καθαρισμό του, περίπου 1 L του διαλύτη μεταγγίζεται σε φιάλη 2 L με στρόφιγγα που περιέχει ρητίνη, η οποία προηγουμένως έχει ξηραθεί στη γραμμή υψηλού κενού για περίπου 2 ώρες. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσα στο glove box, και το DMF αφήνεται κλειστό στη φιάλη, και υπό ανάδευση με τη ρητίνη για μία νύχτα, αποκτώντας ένα υποκίτρινο χρώμα. Την επόμενη μέρα, η φιάλη με το διαλύτη προσαρμόζεται στην γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται ενδεδειχώς. Στη συνέχεια πραγματοποιείται κλασματική απόσταξη του DMF σε διπλανή σφαιρική φιάλη 1 L που φέρει στρόφιγγα. Τα πρώτα και τα τελευταία κλάσματα του διαλύτη απορρίπτονται, και συλλέγονται μόνο τα μεσαία κλάσματα. Η φιάλη με το καθαρό πλέον DMF φυλάσσεται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 3°C. Επίσης πρέπει να καταναλωθεί το συντομότερο δυνατόν από την ημέρα καθαρισμού του.

4.2.6 Τετραϋδροφουράνιο - THF (C₄H₈O)

Το τετραϋδροφουράνιο αποτελεί βασικό διαλύτη κατά τη σύνθεση των μονομερών και στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης για την σύνθεση του NCA της ιστιδίνης. Σε σφαιρική φιάλη 1 L, που περιέχει καλά λειοτριβημένο υδρίδιο του ασβεστίου (CaH₂) μεταφέρονται περίπου 500 ml του εμπορικώς διαθέσιμου THF, και αφήνονται υπό ανάδευση για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα, η φιάλη με το διαλύτη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται ενδεδειχώς, και έπειτα ο διαλύτης αποστάζεται σε γειτονική σφαιρική που περιέχει μεταλλικό νάτριο (Na), και αφήνεται υπό ανάδευση για ένα βράδυ. Αφού έχει αντιδράσει για αρκετές ώρες, ακολουθεί απαέρωση και εκ νέου απόσταξη του διαλύτη σε γειτονική σφαιρική φιάλη 1 L, που φέρει στρόφιγγα, και περιέχει κράμα μεταλλικού καλίου-νατρίου (alloy) σε αναλογία 3:1. Μετά το πέρας της απόσταξης, ο διαλύτης αφήνεται υπό ανάδευση με το alloy, και μετά από λίγες ώρες παρατηρείται η εμφάνιση κυανού χρώματος, που αποτελεί ένδειξη της καθαρότητας του THF. Όπως είναι γνωστό, το αρνητικό ιόν καλίου επιδιαλυτώνεται στο THF και σχηματίζει διάλυμα με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Έχει προταθεί ότι το χρώμα αυτό, προέρχεται από σύμπλοκα του καθαρού διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου, λόγω

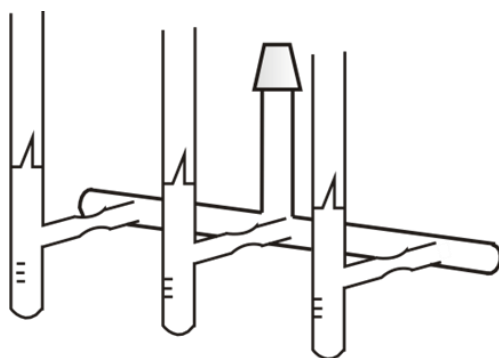
μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια) σύμφωνα με την αντίδραση:



4.3 Καθαρισμός Απαραχητών και Αντιδραστηρίων ⁷⁹

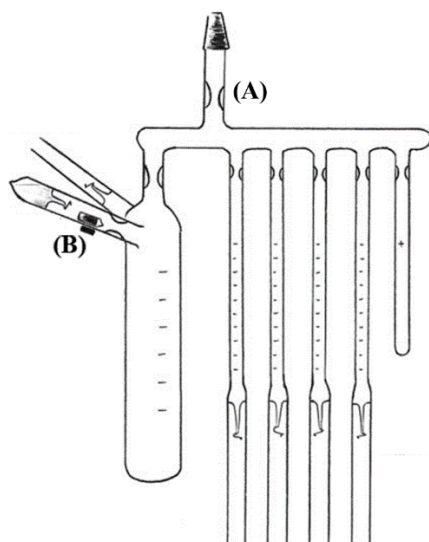
4.3.1 Καθαρισμός Διμεθυλαμίνης (DMA)

Η διμεθυλαμίνη είναι η απλούστερη δευτεροταγής αμίνη και χρησιμοποιείται σαν απαραχητής στον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως απαραχητής για την σύνθεση των δύο ομοπολυμερών της φαινυλαλανίνης. Καθώς σε θερμοκρασία δωματίου βρίσκεται σε αέρια μορφή, εξαιτίας του χαμηλού σημείου ζέσης (σ.ζ.=7°C) και της υψηλής τάσης ατμών της (170,3 kPa στους 20 °C), πρέπει να υγροποιηθεί προκειμένου να ακολουθήσει η διαδικασία καθαρισμού. Για την υγροποίηση της προσαρμόζεται η οβίδα του αερίου στην γραμμή υψηλού κενού και πραγματοποιείται διεξοδικός έλεγχος με την βοήθεια του πηνίου Tesla για τυχόν διαρροές. Σε γειτονική υποδοχή προσαρμόζεται σφαιρική φιάλη των 100 mL που έχει απαερωθεί και περιέχει κάτοπτρο νατρίου. Η φιάλη εν συνεχεία ψύχεται με την βοήθεια λουτρού ισοπροπανόλης/ξηρού πάγου στους -78 °C. Τέλος ανοίγεται η στρόφιγγα της οβίδας σιγά και με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην συμπυκνωθεί μεγαλύτερος όγκος αερίου από αυτόν της φιάλης. Όταν έχουν συμπυκνωθεί περίπου 10 mL DMA, το λουτρό ισοπροπανόλης/ξηρού πάγου ανταλλάσσεται γρήγορα με παγόνερο και αφήνεται το υγροποιημένο πλέον αέριο να αντιδράσει με το νάτριο για δύο ώρες. Περιοδικά συμπληρώνεται πάγος στο λουτρό, ώστε καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης η θερμοκρασία να μην υπερβεί το σημείο ζέσεως της DMA. Ακολούθως, η επιθυμητή ποσότητα DMA αποσπάζεται σε κατάλληλη συσκευή που διαθέτει βαθμονομημένες αμπούλες (Σχήμα 14).



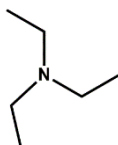
Σχήμα 14: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής για την παραλαβή ενώσεων χαμηλού σημείου ζέσεως.

Η κάθε αμπούλα του πυκνού απαρχητή ψύχεται με υγρό άζωτο, απαιερώνεται, συντήκεται στην στένωση που φέρει και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Μία από τις αμπούλες αυτές προσαρμόζεται σε συσκευή αραιώσης, η οποία μέσω του εσφυρίσματος που διαθέτει τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού (Σχήμα 15). Ακολουθεί προσεκτική απαέρωση και ξήρανση της συσκευής (flame-drying) πριν την απόσταξη ποσότητας διαλύτη (DMF) ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του απαρχητή. Κατόπιν, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού με σύντηξη στο σημείο (A) και προστίθεται ο απαρχητής με θραύση του γυάλινου υμένα (break-seal) της αμπούλας στο σημείο (B). Η συσκευή αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.



Σχήμα 15: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής αραιώσης του απαρχητή.

4.3.2 Καθαρισμός Τριαιθυλαμίνης

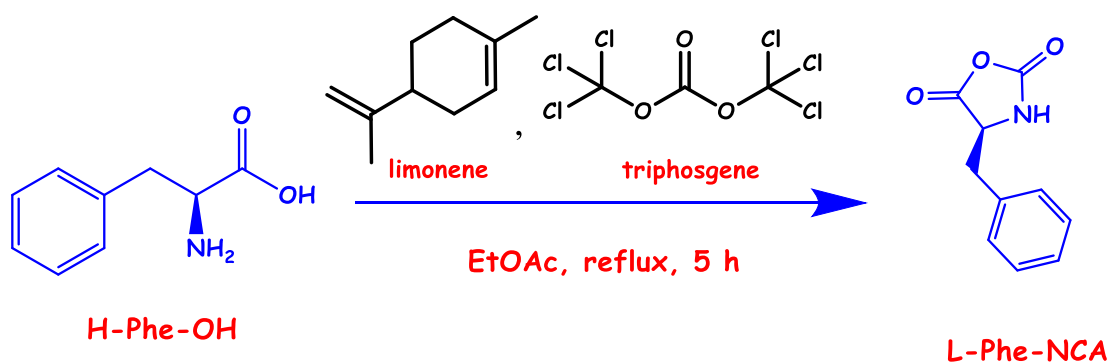


Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται κατά την σύνθεση του N(im)-Trt-His NCA ως μέσο δέσμευσης του παραγόμενου υδροχλωρίου. Για τον καθαρισμό της, η απαραίτητη ποσότητα Et₃N τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 250 mL που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH₂ και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Έπειτα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

4.4 Σύνθεση και καθαρισμός των N-καρβοξυανυδριτών

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

4.4.1 Σύνθεση του N-καρβοξυανυδρίτη της L-Phenylalanine (Phe NCA)^{30,81}



Σχήμα 16: Αντίδραση σύνθεσης του ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης.

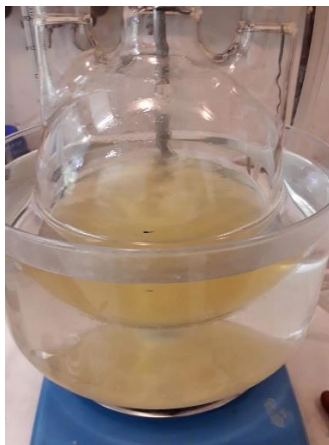
Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν αρχικά 10 g (60.536 mmol) πρόδρομο αμινοξέος H-Phe-OH. Η φιάλη μέσω ειδικού επιθέματος με στρόφιγγα προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και το αμινοξύ αφήνεται για ξήρανση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα αποστάχθηκαν στη φιάλη 200-250 mL οξικού αιθυλεστέρα και παρατηρήθηκε η δημιουργία λευκού γαλακτώματος λόγω του ότι το πρόδρομο αμινοξύ δεν διαλύεται σε EtOAc (Εικόνα 12). Έπειτα, η φιάλη απομακρύνθηκε από τη γραμμή όπου ακολούθησε η προετοιμασία της διάταξης για την υπόλοιπη πειραματική πορεία. Προσαρμόστηκαν στη συσκευή είσοδος και έξοδος για παροχή αργού καθώς και ψυκτήρας με προσθετική χοάνη για τη διαδοχική προσθήκη των αντιδραστηρίων. Σε $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ και υπό ροή αργού προστέθηκαν στη φιάλη 19,6 mL (0,121 mol) (R)-(+)-limonene (αντιδραστήριο δέσμευσης του παραγόμενου υδροχλωρίου) σε μία δόση με την βοήθεια κατάλληλης πιπέτας.



Εικόνα 12: Πρόδρομο αμινοξύ H-Phe-OH σε EtOAc πριν την προσθήκη τριφωσγενίου.

Στη συνέχεια, σε καθαρή σφαιρική φιάλη αποστάχθηκαν μέσω της γραμμής υψηλού κενού 40 mL καθαρού οξικού αιθυλεστέρα. Η φιάλη πληρώθηκε με αργό και μέσα προστέθηκαν 8.98 g (30.262 mmol) τριφωσγενίου. Η προσθήκη του διαλύματος του τριφωσγενίου στη φιάλη με το διάλυμα του πρόδρομου αμινοξέου γίνεται στάγδην και υπό συνεχή έντονη ανάδευση σε χρόνο περίπου 20 min, στους 40°C . Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του αντιδραστηρίου, το σταγονομετρικό χωνί αποσπάται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να επιτευχθεί επαναρροή του διαλύτη με χρήση υδατόλουτρου ($70-75^{\circ}\text{C}$). Το διάλυμα διατηρείται υπό επαναρροή για 4,5 ώρες, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται

λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδος της. Πρώτη ένδειξη σχηματισμού του N-καρβοξυ ανυδρίτη αποτέλεσε η αλλαγή από λευκό γαλάκτωμα σε υποκίτρινο διαυγές διάλυμα κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της αντίδρασης (Εικόνα 13).

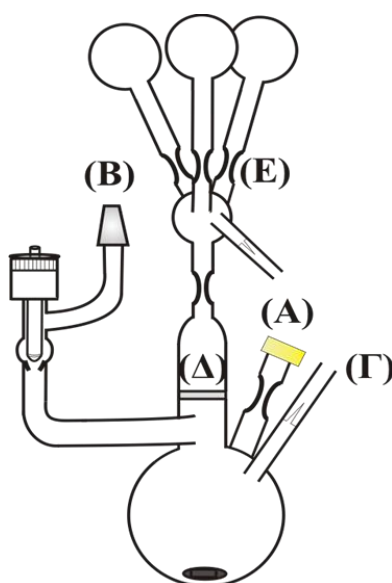


Εικόνα 13: Πρόδρομο αμινοξύ H-Phe-OH μετά από τρεισήμισι ώρες αντίδρασης προς σχηματισμό του L-Phe NCA.

Μετά το πέρας των 4,5 ωρών και εφόσον επιβεβαιώνεται από το IR πως η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί, η φιάλη ψύχεται με παγόνερο στους 0°C και ακολουθεί το στάδιο καθαρισμού μέσω εκχυλίσεων προς απομάκρυνση του παραγόμενου HCl, της πρόδρομης ένωσης που δεν έχει αντιδράσει αλλά και του υδροχλωρικού άλατος του αρχικού αμινοξέος που έχει σχηματισθεί. Το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη των 2L. Αρχικά εκχυλίζεται με παγωμένο (0°C) υδατικό διάλυμα NaCl 6% και έπειτα με υδατικό διάλυμα NaCl 6% και K₂CO₃ 0.5% (500 mL) έως ότου επιτευχθεί ουδέτερο pH. Στη συνέχεια, λαμβάνεται η οργανική στιβάδα και ξηραίνεται με μικρή ποσότητα (50g) ενεργοποιημένου MgSO₄ το οποίο προηγουμένως είχε μπει στον φούρνο στους 150°C. Η συσκευή ανακρυσταλλώσεων ξηραίνεται στη γραμμή υψηλού κενού, μέσω του επιθέματος στη θέση (B). Στην συνέχεια, και ενώ η συσκευή έχει στατικό κενό, πραγματοποιείται διήθηση του διαλύματος μέσα στη συσκευή, μέσω ηθμού πεφρυγμένης υάλου στη θέση (A). Το διάλυμα ψύχεται με υγρό άζωτο και με σύντηξη στη στένωση απομακρύνεται το τμήμα (A) από το οποίο έγινε η διήθηση. Ο διαλύτης αποστάζεται σε γειτονική φιάλη και το μονομερές αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού όλη νύχτα.

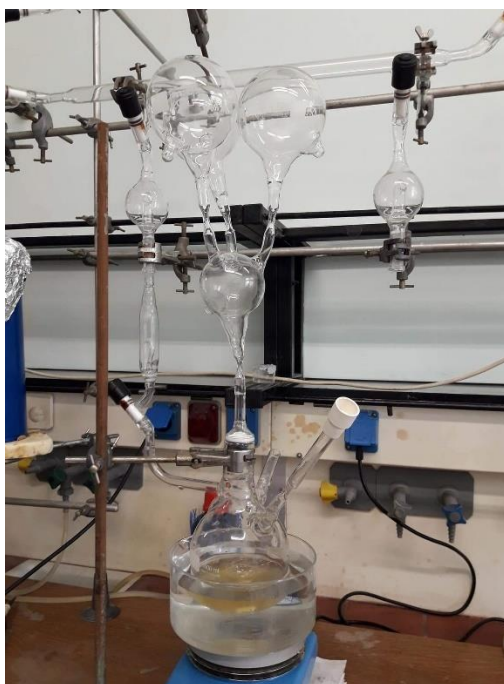
Καθαρισμός Phe-NCA

Την επόμενη μέρα ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού του N-καρβοξυανυδρίτη με σύστημα διαλύτη/μη διαλύτη. Συγκεκριμένα, στο στερεό προστίθεται ελάχιστη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα (διαλύτη) μέσω της γραμμής υψηλού κενού, περίπου 80 mL, ικανής να διαλύσει το μονομερές. Εφόσον ο N-καρβόξυ ανυδρίτης της φαινυλαλανίνης διαλυθεί πραγματοποιείται απόσταξη εξανίου (μη διαλύτη), μέσω της γραμμής, ποσότητα πενταπλάσια (ή μεγαλύτερη) της ποσότητας του διαλύτη (~400 mL). Το μονομερές καταβυθίζεται κατά την ολοκλήρωση της απόσταξης και η συσκευή τοποθετείται σε θερμοκρασία -20 °C για μία νύχτα για ποσοτική καταβύθιση. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται διήθηση, μέσω του ηθμού πεφρυγμένης υάλου στη θέση (Δ) της συσκευής, σε παρακείμενη φιάλη η οποία διατηρείται παγωμένη με την βοήθεια υγρού αζώτου και έπειτα απομακρύνεται με σύντηξη στη στένωση στο σημείο (E).



Σχήμα 17: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ανακρυστάλλωσης των NCA's.

Η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και το μονομερές αφήνεται για ξήρανση για περίπου δύο ώρες. Η ανακρυστάλλωση επαναλαμβάνεται για ακόμη δύο φορές μέσα στις επόμενες δύο ημέρες και κάθε φορά απομακρύνεται μία φιάλη με σύντηξη.

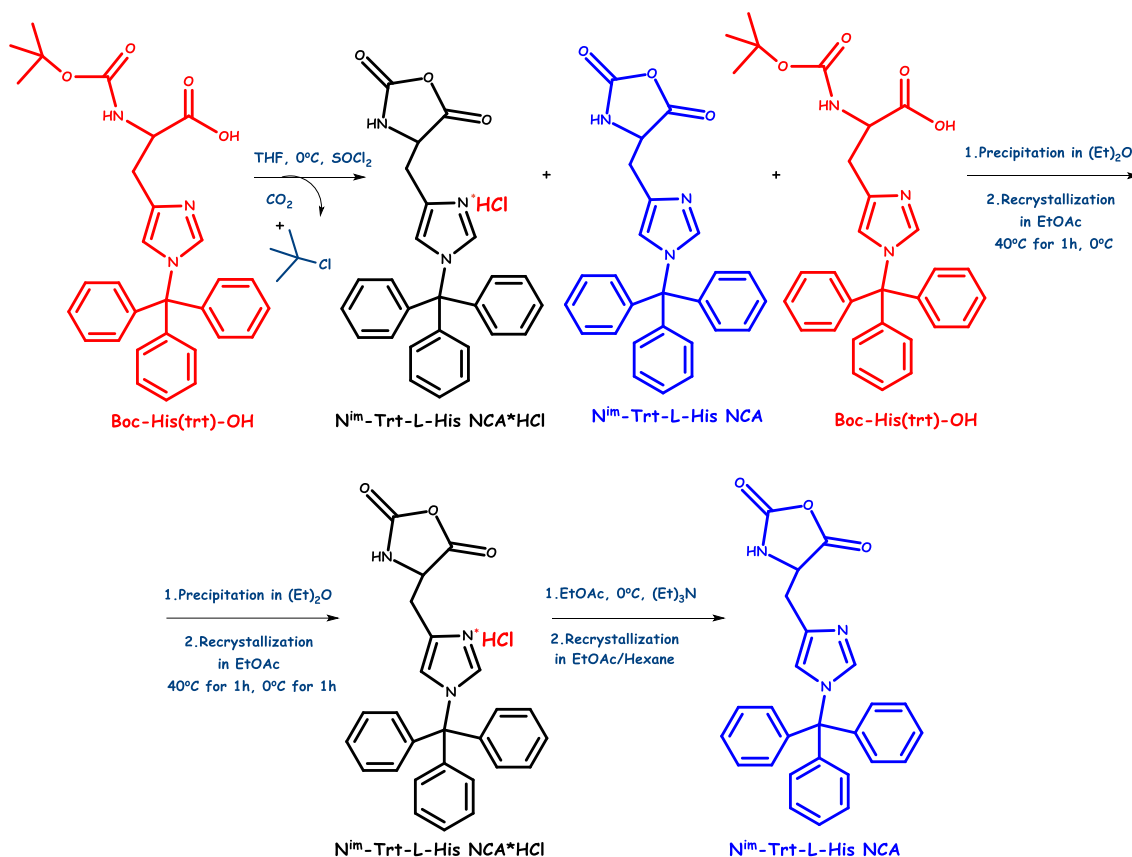


Εικόνα 14: Η συσκευή ανακρυσταλλώσεων που χρησιμοποιήθηκε στον σχηματισμό του L-Phe NCA.

Μόλις η διαδικασία των ανακρυσταλλώσεων ολοκληρωθεί η συσκευή μεταφέρεται στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας (glove box), όπου ζυγίζεται το στερεό και φυλάσσεται ο τελικός Phe NCA. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR). Η συνολική ποσότητα που ζυγίστηκε ήταν 7,7 gr (40.27 mmol) και η απόδοση της αντίδρασης είναι 66%.

4.4.2 Σύνθεση του N-καρβοξυανυδρίτη της L-Histidine (N^{im} -Trt-His NCA) ⁵¹

Η πειραματική πορεία της σύνθεσης του N-καρβοξυ ανυδρίτη της N^{im} -Τριτυλο-L-Ιστιδίνης (N^{im} -Trt-His NCA) αποτελείται από δύο κύρια στάδια. Στο πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα η σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της N^{im} -Τριτυλο-L-Ιστιδίνης (N^{im} -Trityl-L-Histidine-NCA*HCl) με χρήση θειονυλοχλωριδίου ($SOCl_2$) ως μέσο χλωρίωσης (αντί για τριφωσγένιο) κατά την αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου του N-καρβοξυ ανυδρίτη. Στο δεύτερο και τελικό στάδιο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του HCl με χρήση ισομοριακής ποσότητας τριαιθυλαμίνης (Et_3N) καταλήγοντας στο επιθυμητό προϊόν του N^{im} -Trt-His NCA.



Σχήμα 18: Αντίδραση σύνθεσης του προστατευμένου ανυδρίτη της L-Ιστιδίνης ($N^{im}\text{-Trt-L-His NCA}$).

4.4.2.1 Σύνθεση $N^{im}\text{-Trityl-L-Histidine NCA*HCl}$

Σε δίκλιμη σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 20 g (40.194 mmol) πρόδρομου αμινοξέος Boc-His(trt)-OH και αφέθηκαν για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα αποστάζονται στο αμινοξύ περίπου 200 mL καθαρού διαλύτη τετραϋδροφουρανίου (THF) και έπειτα πραγματοποιήθηκε απαέρωση. Το στερεό πρέπει να διαλυθεί καλά στο THF, για αυτό το λόγο η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή, αφήνεται να ξεπαγώσει και τοποθετείται υπό ανάδευση μέσα σε υδρόλουτρο, με το νερό να είναι ελαφρώς ζεστό ($\sim 45^\circ\text{C}$), ώστε να διαλυτοποιηθεί το στερεό (το διάλυμα είναι ελαφρώς θολό και υποκίτρινο). Στη συνέχεια ακολουθεί η προετοιμασία της διάταξης για την υπόλοιπη πειραματική πορεία η οποία αποτελείται από είσοδο και έξοδο αργού στο σύστημα και προσθετική χοάνη για τη στάγδην προσθήκη των αντιδραστηρίων. Ταυτόχρονα, στη γραμμή υψηλού κενού προσαρμόστηκε καθαρή φιάλη, φιάλη που περιείχε SOCl_2 και βαθμονομημένη

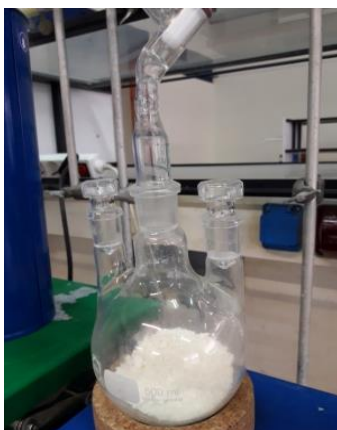
αμπούλα για τη συλλογή του. Έπειτα από εκτενή ξήρανση (flame-drying) των συσκευών αποστάχθηκαν 30 mL καθαρού THF στην καθαρή φιάλη και 3.25 mL (44.801 mmol) SOCl_2 στη βαθμονομημένη αμπούλα και τελικά το SOCl_2 μεταφέρθηκε μέσω απόσταξης στη φιάλη με το THF. Η φιάλη με το διάλυμα του αμινοξέος τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο ώστε να επιβραδυνθούν πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις και υπό ροή αργού μεταφέρθηκε στην προσθετική χοάνη της διάταξης το διάλυμα του SOCl_2/THF . Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στάγδην και υπό ροή αργού η προσθήκη του SOCl_2 σε THF στην φιάλη της αντίδρασης σε διάρκεια 30 λεπτών. Παρατηρήθηκε ότι με το πέρας της προσθήκης το διάλυμα είχε αποκτήσει ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα με αυξημένο, σε σχέση με το αρχικό, ιξώδες. Έπειτα από 1 ώρα αντίδρασης του πρόδρομου αμινοξέος με το SOCl_2 παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση του ιξώδους και τελικά σχηματισμός λευκού συμπαγούς ιζήματος σε όλη την έκταση του αρχικού διαλύματος (Εικόνα 15). Η αντίδραση παρακολουθείται μέσω IR, λαμβάνοντας φάσματα στη 1 ώρα και στις 2 ώρες.



Εικόνα 15: Αριστερά: Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(Trt)-OH σε THF αμέσως μετά την προσθήκη SOCl_2 . Δεξιά: Μετά από 1.5 ώρα αντίδρασης προς σχηματισμό του $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-L-His-NCA}\cdot\text{HCl}$.

Μετά το τέλος της αντίδρασης στο διάλυμα προστίθεται περίπου 1.5 L διαιθυλαιθέρα, ο οποίος είναι παγωμένος. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται η καταβύθιση του $\text{N}^{\text{im}}\text{-trt-(L)-His}\cdot\text{HCl}$ NCA ως κύριο προϊόν, ενώ παράλληλα καταβυθίζονται και άλλες προσμίξεις οι οποίες ήταν διαλυτές στο THF, όπως το ενδιάμεσο χλωρίδιο και το αρχικό αμινοξύ. Πραγματοποιείται θραύση του στερεού με τη βοήθεια σπάτουλας και με χρήση ανάδευσης, υπό

συνεχή ροή αργού, έτσι ώστε να δημιουργηθεί κίτρινο αιώρημα στο διάλυμα με τον διαιθυλαιθέρα. Το διάλυμα φιλτράρεται από Buchner, ενώ παράλληλα πάνω από το διάλυμα το οποίο φιλτράρεται 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 τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 500 ml. Η φιάλη εφαρμόζεται στη γραμμή του κενού με αντάπτορα με στρόφιγγα και αφήνεται προς ξήρανση για μια νύχτα. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται η 1^η ανακρυστάλλωση με τη θερμοκρασία. Στην τρίλαιμη φιάλη με το στερεό αποστάζονται ~300 ml EtAc και το γαλάκτωμα αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου μία ώρα μέσα σε υδρόλουτρο στους ~40 °C, αφού πρώτα έχει κορεστεί με αργό. Μετά το πέρας μίας ώρας δεν παρατηρείται διαύγαση. Εν συνεχεία το διάλυμα ψύχεται σε παγόλουτρο στους 0 °C (~1 ώρα), έως ότου καταβυθιστεί ποσοτικά το στερεό N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCl. Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο πως 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 N^{im}-trt-(L)-His. Το διάλυμα διηθείται μέσω Buchner και έτσι παραλαμβάνεται ως μοναδικό προϊόν το N^{im}-trt-(L)-His*HCl NCA. Το στερεό συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέα προζυγισμένη τρίλαιμη φιάλη και ξηραίνεται στη γραμμή κενού όλο το βράδυ. Η μάζα του τελικού προϊόντος N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCl ήταν ίση με 14.621 g (31.79 mmol) και η απόδοση της αντίδρασης 79%.



Εικόνα 16: Το αρχικό προϊόν N^{im}-trt-(L)-His*HCl NCA

4.4.2.2 Σύνθεση N^{im}-Trityl-L-Histidine NCA

Στο επόμενο στάδιο της πειραματικής πορείας αποστάχθηκαν στη φιάλη που περιείχε το N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCl περίπου 250 mL οξικού αιθυλεστέρα καταλήγοντας σε λευκό γαλάκτωμα. Στη συνέχεια η φιάλη απομακρύνθηκε από τη γραμμή, πληρώθηκε με αργό, τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο στους 0 °C με συνεχή ροή αργού και προετοιμάστηκε η διάταξη για την υπόλοιπη πειραματική διαδικασία. Η διάταξη αποτελούνταν από είσοδο και έξοδο αργού και προσθετική χοάνη για τη στάγδην προσθήκη των αντιδραστηρίων. Ταυτόχρονα παρασκευάστηκε διάλυμα Et₃N, 4.21 mL (30.205 mmol) Et₃N σε 40 mL EtOAc, όπως ακριβώς προαναφέρθηκε και για το SOCl₂. Αφού η φιάλη με το διάλυμα Et₃N σε EtOAc πληρώθηκε με αργό, το διάλυμα μεταφέρθηκε στην προσθετική χοάνη της διάταξης και ξεκίνησε η στάγδην προσθήκη του στο γαλάκτωμα του N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCl υπό ισχυρή ανάδευση και ροή αργού στους 0 °C. Είναι κρίσιμης σημασίας να διατηρηθούν οι συγκεκριμένες συνθήκες αφού η Et₃N δρα και ως απαρχητής για την έναρξη πολυμερισμού του ανυδρίτη. Επομένως, με τη χρήση παγόλουτρου και ισχυρής ανάδευσης αποφεύγεται η τοπική περίσσεια Et₃N και επιτυγχάνεται μόνο η ποσοτική. Η προσθήκη στο διάλυμα διήρκεσε περίπου 1,5 ώρα και μετά το τέλος της αφήνεται άλλα 30 min, να αντιδράσει πλήρως η τριαιθυλαμίνη. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση δημιουργείται το στερεό άλας της τριαιθυλαμίνης, ενώ το διάλυμα δεν διαυγάζει. Στην συνέχεια, το διάλυμα διηθείται με φίλτρο por 3 υπό κενό και ροή αργού προς εκδίωξη του άλατος ενώ παράλληλα το διήθημα πέφτει σε καθαρό εξάνιο ~1,5 L, το οποίο βρίσκεται σε 2Lαιμη φιάλη 2L, για να κρυσταλλωθεί και να δημιουργηθεί ο N^{im}-trityl-His NCA. Μετά τη διήθηση γίνεται λήψη φάσματος IR από το φίλτρο που έχει το άλας για να διαπιστωθεί πως απομακρύνθηκε. Το διάλυμα που προκύπτει επαναδιηθείται σε Buchner και το καθαρό λευκό στερεό συλλέγεται υπό ροή αργού σε φιάλη 500 ml και αφήνεται προς ξήρανση στην γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Μετά τη διήθηση γίνεται λήψη φάσματος IR από το Buchner που έχει τον His-NCA.

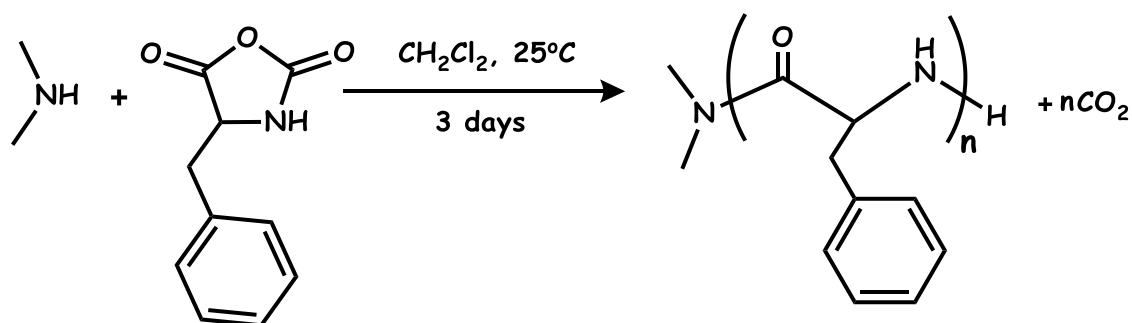
Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε ξανά ανακρυστάλλωση. Πιο συγκεκριμένα, αποστάχθηκαν 400 mL EtOAc (διαλύτης) στη φιάλη με το στερεό

και παρατηρήθηκε η δημιουργία υποκίτρινου γαλακτώματος. Στη συνέχεια το γαλάκτωμα διηθήθηκε υπό κενό και ροή αργού από γυάλινο φίλτρο por. 4 και ταυτόχρονα το διήθημα καταβυθίστηκε σε 1.5 L καθαρό διαλύτη εξάνιο (μη διαλύτης). Έπειτα ακολούθησε διήθηση σε χωνί Buchner και ο στερεός ανυδρίτης συλλέχθηκε σε σφαιρική και αφέθηκε ξανά για ξήρανση στη γραμμή για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε η τελική ανακρυστάλλωση όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω με χρήση 500 mL EtOAc και 1.5 L εξάνιο, διήθηση υπό κενό και ροή αργού από χωνί Buchner και τελικά ξήρανση του καθαρού ανυδρίτη στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Τέλος, ο ανυδρίτης συλλέχθηκε και φυλάχθηκε εντός glove box σε αδρανή ατμόσφαιρα. Η τελική μάζα του N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA ήταν ίση με 8.553 g (20.197 mmol) και η απόδοση της αντίδρασης ήταν 64%.

4.4 Σύνθεση γραμμικών ομοπολυμερών φαινυλαλανίνης με πέντε και δέκα δομικές μονάδες

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) του NCA της φαινυλαλανίνης με χρήση της απλούστερης δευτεροταγούς αμίνης (DMA) ως απαρχητή, για τη σύνθεση των αντίστοιχων γραμμικών ομοπολυπεπτιδίων poly(phenylalanine) (PPhe) με πέντε και δέκα μονομερικές μονάδες αντίστοιχα.

Σύνθεση του ομοπολυμερούς φαινυλαλανίνης με πέντε μονομερικές μονάδες (MB=736 g/mol).



Σχήμα 19: Αντίδραση πολυμερισμού της Phe-NCA.

Η αμπουλοσυσσκευή με την διμεθουλαμίνη (DMA) αραιωμένη σε διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF) συγκέντρωσης $3,4 \cdot 10^{-4}$ mol/mL παραλαμβάνεται από την κατάψυξη και αποχύνονται περίπου 2 ml σε κάθε αμπούλα. Λαμβάνεται με σύντηξη στη στένωση μία από τις αμπούλες που φέρει, η οποία στην συνέχεια προσκολλάται μέσω υαλουργικών τεχνικών σε κατάλληλη συσκευή πολυμερισμού των 250 mL, που είναι εφοδιασμένη με στρόφιγγα υψηλού κενού και περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα και μια επιπλέον αμπούλα με γυάλινο υμένα για την προσθήκη του μονομερούς. Στη συνέχεια, η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω του εσφυρίσματος, ελέγχεται διεξοδικά για την ύπαρξη μικροσπών με χρήση του πηνίου Tesla και ξηραίνεται ενδεδειχώς (flame-drying).

Έπειτα, 10 mL διχλωρομεθανίου αποστάζονται στη σφαιρική φιάλη (Εικόνα 17). Ακολούθως, η συσκευή απομονώνεται μέσω της στρόφιγγας και μεταφέρεται από το υψηλό κενό, στο glove box μαζί με έναν ειδικό αντάπτορα σχήματος π με στρόφιγγα. Στο glove box φυλάσσονται τα μονομερή (NCA) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Μετά την εισαγωγή της συσκευής στον κύριο θάλαμο, ζυγίζονται συνολικά 0,65 gr NCA-Phe και μεταφέρονται με τη βοήθεια χωνιού στην αμπούλα. Η συσκευή απομονώνεται μέσω της στρόφιγγας του αντάπτορα και εξέρχεται από το glove box, ενώ ύστερα μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού. Στη συνέχεια αποστάζονται περίπου 5 mL διχλωρομεθανίου στην αμπούλα που βρίσκεται το μονομερές της φαινυλαλανίνης, ενώ ο διαλύτης έχει προηγουμένως καθαρισθεί με απόσταξη απορρίπτοντας τα πρώτα κλάσματα (~12 mL) στην παγίδα αζώτου.



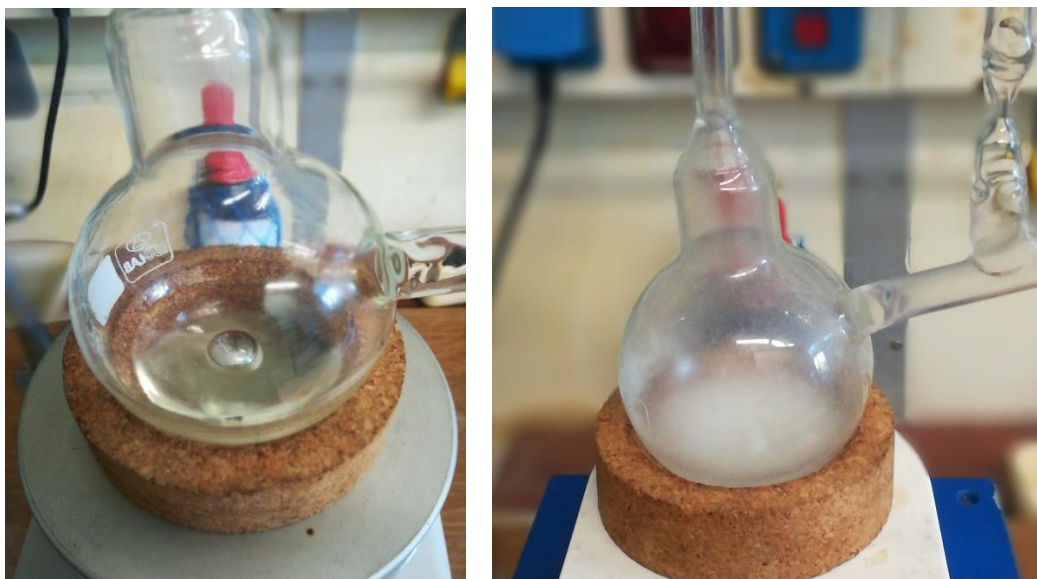
Εικόνα 17: Απόσταξη διαλύτη στην συσκευή ομοπολυμερισμού.

Αφού διαλυθεί το στερεό, η αμπούλα που το περιέχει ψύχεται με υγρό άζωτο και ακολουθεί απομάκρυνση της συσκευής από την γραμμή μέσω σύντηξης στην αμπούλα (Εικόνα 18). Αφού ξεπαγώσει το διάλυμα, πραγματοποιείται θραύση του υάλινου υμένα της αμπούλας του στερεού ακολουθούμενη από ανάδευση. Αμέσως μετά, πραγματοποιείται θραύση του υάλινου υμένα της αμπούλας της DMA και το περιεχόμενο αποχύνεται ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη πολυμερισμού, ώστε να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές και να αποφευχθεί τοπική περίσσεια που δυνητικά θα οδηγούσε σε διαφορετικούς χρόνους έναρξης πολυμερισμού των αλυσίδων.



Εικόνα 18: Διάλυση του μονομερούς της φαινυλαανίνης στην αμπούλα πριν τον πολυμερισμό.

Η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού υπό ανάδευση και μια ώρα αργότερα πραγματοποιείται εκτόνωση, κρατώντας την φιάλη του πολυμερισμού παγωμένη με υγρό άζωτο λόγω της μεγάλης πτητικότητας του διχλωρομεθανίου. Η έναρξη του πολυμερισμού συνοδεύεται από έντονη έκλυση διοξειδίου του άνθρακα από το διάλυμα, το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για την διάδοση του πολυμερισμού. Την επόμενη ημέρα, παγώνοντας πάλι την φιάλη του πολυμερισμού ανοίγουμε για μικρό χρονικό διάστημα τη στρόφιγγα ώστε να εκτονωθεί και να απομακρυνθεί ξανά το υπερκείμενο αέριο διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί. Έτσι η ισορροπία της αντίδρασης μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Το διάλυμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 ημέρες μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το μονομερές, ενώ η πορεία του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. Παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών το διάλυμα μετατρέπεται σταδιακά από διαυγές που ήταν αρχικά σε μη διαυγές (θολό), γεγονός που αποδεικνύει την επιτυχή σύνθεση του πολυπεπτιδίου (Εικόνα 22). Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός (γεγονός που επιβεβαιώνεται μέσω του IR), η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού. Στη συνέχεια το περιεχόμενο της φιάλης αποχύνεται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 200 ml παγωμένου διαιθυλαιθέρα (-20°C) και αφήνεται στους -20°C για μία ημέρα για να ολοκληρωθεί η καταβύθιση. Την επόμενη ημέρα, το περιεχόμενο του ποτηριού διηθείται σε Buchner, συλλέγεται το στερεό από το φίλτρο και τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη των 50 ml, η οποία προσαρμόζεται στη γραμμή κενού και αφήνεται προς ξήρανση για μια ημέρα. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε ζύγιση του ομοπολυμερούς και η ποσότητα του ήταν 0,208 gr.



Εικόνα 19: Αριστερά: πρώτη ημέρα πολυμερισμού φαινυλαλανίνης. Δεξιά: τρίτη ημέρα πολυμερισμού φαινυλαλανίνης.

Σύνθεση του ομοπολυμερούς φαινυλαλανίνης με δέκα μονομερικές μονάδες (MB=1470 g/mol).

Σαν απαρχητής του πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε αμπούλα διμεθυλαμίνης (DMA) 1 ml αραιωμένη σε διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF) και όπως και στο προηγούμενο ομοπολυμερές ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία. Η ποσότητα του Ν-καρβόξυ ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης που ζυγίστηκε στον θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας ήταν 0,65 g (NCA-Phe). Ο πολυμερισμός διήρκεσε τρεις ημέρες και τελικά ζυγίστηκαν 0,285 gr καθαρού ομοπολυμερούς Poly-Phe, τα οποία παραλήφθηκαν έπειτα από καταβύθιση σε 200 ml διαιθυλαιθέρα, διήθηση υπό κενό και ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού.

Πίνακας 3: Συνοπτική παρουσίαση των ποσοτήτων των δύο ομοπολυμερισμών.

Μονομερές	gr NCA	gr πολυμερους	MB πολυμερούς (g/mol)	Απόδοση	mL DMA	c DMA (mol/mL)
L-Phe NCA	0.65	0.208	735.9	32%	2	$3,4 \cdot 10^{-4}$
L-Phe NCA	0.65	0.285	1471.8	43,8%	1	$3,4 \cdot 10^{-4}$

4.5 Σύνθεση γραμμικών κατά συστάδες συμπολυμερών mPEO-*b*-Poly(L-Histidine)-*b*-Poly(L-Phenylalanine) (PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe)

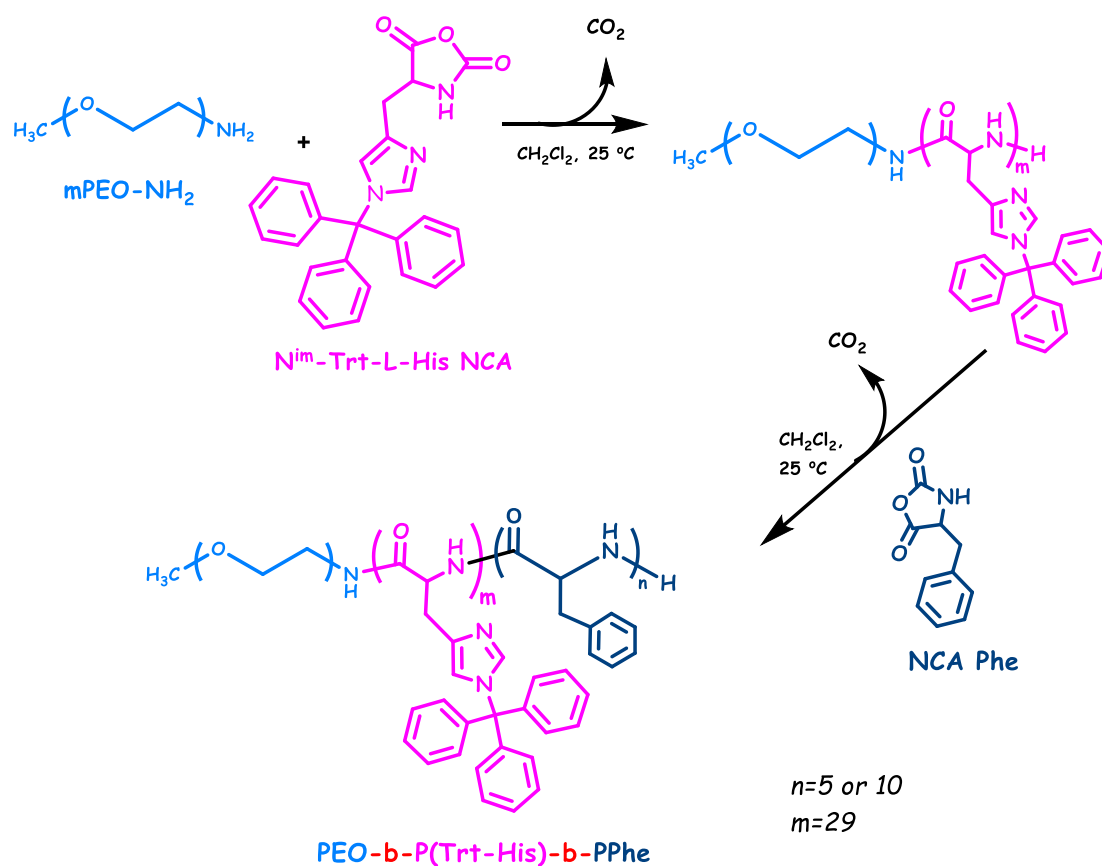
Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση δύο κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με διαφορετικό μοριακό βάρος πολυφαινυλαλανίνης κάθε φορά και συγκεκριμένα με πέντε μονομερικές μονάδες στο πρώτο πολυμερές και δέκα στο δεύτερο. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP). Το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας αποτέλεσε ο διαδοχικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) του κατάλληλα προστατευμένου ανυδρίτη N^{im}-Trt-His NCA. Ως μακροαπαρχητής για την πρώτη πολυπεπτιδική συστάδα χρησιμοποιήθηκε το mPEO-NH₂ (M_w=10000 g/mol) ενώ μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού του mPEO-*b*-P(N^{im}-Trt-His) προστέθηκε στη φιάλη το δεύτερο μονομερές για το οποίο ως απαρχητής δρα η τελική αμινομάδα της συστάδας P(N^{im}-Trt-His). Τα προστατευμένα πολυμερή PEO-*b*-P(Trt-His)-*b*-PPhe που προκύπτουν, υπόκεινται σε διαδοχικές αντιδράσεις αποπροστασίας των δομικών μονάδων της PHis ώστε να ληφθούν τελικά τα πλήρως αποπροστατευμένα συμπολυμερή. Οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθούνται για τον πολυμερισμό και την αποπροστασία των πολυμερών περιγράφονται λεπτομερώς παρακάτω.

Πίνακας 4: Ποσότητες αντιδραστηρίων και τελικές μάζες πολυμερών.

ΠΟΛΥΜΕΡΗ	PEO-NH ₂	N ^{im} -trt-His NCA	Phe NCA	CH ₂ Cl ₂	Τελική μάζα πολυμερών
PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe (MB=14730)	0.3 g	0.3705 g	0.0285 g	30 mL	0.248 g
PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe (MB=15470)	0.3 g	0.3705 g	0.0576 g	30 mL	0.222 g

4.5.1 Σύνθεση γραμμικού κατά συστάδες συμπολυμερούς mPEO-*b*-Poly(Trt-L-Histidine)₂₉-*b*-Poly(L-Phenylalanine)₅⁵¹

Για τη σύνθεση του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με πέντε μονομερικές μονάδες φαινυλαλανίνης χρησιμοποιούνται 0.3 g μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ (MB = 10.000 g/mol), με ακραία αμινομάδα ικανή να εκκινήσει τον πολυμερισμό των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων της ιστοιδίνης. Δεδομένης της γνωστής ποσότητας του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί και του συνολικού μοριακού βάρους της δεύτερης συστάδας (PHis = 4000 g/mol), αρχικά γίνονται υπολογισμοί για την εύρεση των ποσοτήτων των δύο μονομερών Nim-Trt-His NCA και PPhe NCA που θα χρησιμοποιηθούν, οι οποίες φαίνονται στον Πίνακα 4.



Σχήμα 20: Αντίδραση ROP για τον σχηματισμού του προστετευμένου συμπολυμερούς τύπου mPEO-*b*-PTrtHis-*b*-PPhe.

Αρχικά κατασκευάστηκε ειδική συσκευή με χρήση υαλουργικών τεχνικών για τη διεξαγωγή της αντίδρασης πολυμερισμού. Η συσκευή αποτελούνταν από σφαιρική φιάλη των 250 mL και δύο αμπούλες με γυάλινους υμένες (break-seals) για την προσθήκη των δύο μονομερών και στη συνέχεια ελέγχθηκε για μικροοπές με χρήση πηνίου Tesla. Τοποθετήθηκαν στη φιάλη 0.3 g μακροαπαρχητή mPEO-NH₂ (M_w=10000 g/mol) και αφέθηκαν για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για ένα βράδυ.

Την επόμενη μέρα λαμβάνει χώρα απόσταξη περίπου 10-15 ml βενζολίου στη φιάλη που βρίσκεται ο απαρχητής μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Μετά την απόσταξη, η φιάλη με το διάλυμα βενζολίου- m-PEO-NH₂ ξεπαγώνει με ζεστό νερό, οπότε παρατηρείται πλήρης διάλυση του απαρχητή στο βενζόλιο. Το διαυγές διάλυμα αφήνεται για μία ώρα υπό ανάδευση και έπειτα η συσκευή προσαρμόζεται πάλι στη γραμμή κενού, προκειμένου να απομακρυνθεί μέσω απόσταξης, σε μία άδεια σφαιρική φιάλη 250 ml, το βενζόλιο. Τέλος, ο απαρχητής αφήνεται πάλι προς ξήρανση για μία νύχτα στη γραμμή κενού. Σκοπός αυτού του βήματος είναι η πλήρης απομάκρυνση έστω και ιχνών υγρασίας του απαρχητή, με τη λογική ότι το βενζόλιο δημιουργεί αζεοτροπικό μίγμα με την υγρασία, επομένως κατά την απομάκρυνσή του μέσω απόσταξης συμπαρασύρει και τα ίχνη υγρασίας του απαρχητή. Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται απόσταξη περίπου 20 ml διαλύτη διχλωρομεθάνιο, στη φιάλη που φέρει τον απαρχητή, μέσω της γραμμής κενού. Το διχλωρομεθάνιο αποτελεί τον διαλύτη του πολυμερισμού, καθώς σε αυτόν διαλυτοποιούνται καλά τόσο ο απαρχητής, όσο και τα μονομερή. Η χρησιμοποιούμενη ποσότητα του πρέπει να είναι τόση, ώστε να διαλυθεί το m-PEO-NH₂ και ταυτόχρονα, να μην είναι μεγάλη για να μην αυξηθεί ο χρόνος πολυμερισμού. Ακολούθως, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή, και ο παγωμένος διαλύτης με τον απαρχητή ξεπαγώνει, αρχικά κάτω από νερό βρύσης και έπειτα σε υδρόλουτρο (~ 45 °C). Ταυτόχρονα, το διάλυμα ανακινείται προσεκτικά, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του απαρχητή στο διχλωρομεθάνιο. Ακολούθως, με τη βοήθεια ειδικού συνδέσμου προσαρμόζεται το τμήμα της αμπούλας της συσκευής πολυμερισμού στη γραμμή υψηλού κενού. Η αμπούλα ελέγχεται για την ύπαρξη τυχόν μικροοπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla και εν συνεχεία απαερώνεται και υφίσταται ξήρανση (flame drying) για απομάκρυνση της υγρασίας. Στο

επόμενο στάδιο η συσκευή μεταφέρεται στο glove box, όπου γίνεται η προσθήκη του μονομερούς της ιστιδίνης. Συγκεκριμένα, αφαιρείται ο ειδικός σύνδεσμος που διατηρεί υπό κενό την αμπούλα, ζυγίζονται και προστίθενται σε αυτήν με τη βοήθεια χωνιού 0.3705 g N^(im)-trt-His-NCA. Μετά την προσθήκη του NCA προσαρμόζεται πάλι ο ειδικός σύνδεσμος στην αμπούλα και η συσκευή πολυμερισμού απομακρύνεται από το glove box. Ακολούθως, το τμήμα της αμπούλας προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω του συνδέσμου και απαερώνεται προκειμένου να απομακρυνθεί το αδρανές αέριο Ar που εισήχθη κατά την παραμονή της αμπούλας στο glove box για περίπου 30 λεπτά. Ακολούθως αποστάχθηκαν κλασματικά 5 mL καθαρού διχλωρομεθανίου στην αμπούλα με το μονομερές και όσο ήταν ακόμα παγωμένη, η συσκευή απομακρύνθηκε από τη γραμμή μέσω σύντηξης από την πλευρά της αμπούλας ώστε να παραμείνει υπό αδρανή συνθήκες καθ' όλη τη διάρκεια του πολυμερισμού. Μετά την πλήρη διάλυση του μονομερούς, 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 και να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές. Η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και μετά το πέρας μίας ώρας από την έναρξη του πολυμερισμού, η αντίδραση απαερώθηκε, διατηρώντας τη φιάλη του πολυμερισμού παγωμένη με υγρό άζωτο λόγω του χαμηλού σημείου ζέσεως του διαλύτη. Πραγματοποιούνταν απαέρωση του συστήματος καθημερινά με σκοπό την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα που δρα ως κινητήρια δύναμη για τη διάδοση του πολυμερισμού. Λόγω του γεγονότος πως το διάλυμα διατηρούνταν παγωμένο κατά την διάρκεια των απαερώσεων δεν μπορούσαν να παρατηρηθούν οι χαρακτηριστικές φασαλίδες που αποδεικνύουν την επιτυχία του. Συνεπώς, ήταν απαραίτητος ο σχεδόν καθημερινός έλεγχος της πορείας με την τεχνική της φασματοσκοπίας FT-IR. Η αντίδραση αφέθηκε υπό έντονη ανάδευση συνολικά 5 μέρες ώστε να καταναλωθεί το πρώτο μονομερές.

Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού του PEO-*b*-P(N^(im)-trt-His) πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του δεύτερου μονομερούς (Phe NCA) στο διάλυμα του πολυμερισμού χωρίς να προηγηθεί διαδικασία απομόνωσης. Πιο συγκεκριμένα, η συσκευή προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού από την

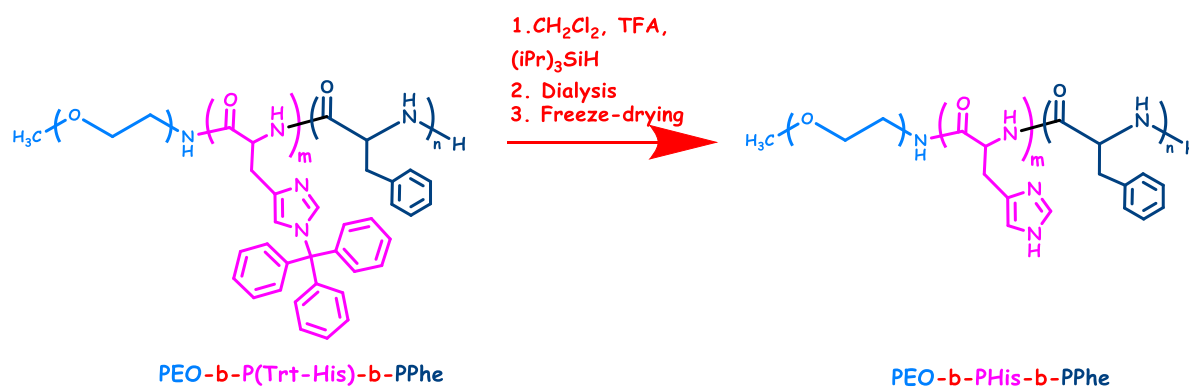
πλευρά της αμπούλας του δεύτερου μονομερούς, πραγματοποιήθηκε ενδεδειγμένη ξήρανση (flame-drying) στο συγκεκριμένο τμήμα και έπειτα μεταφέρθηκε στο glovebox όπου ζυγίστηκαν 0.0285 g Phe NCA και μεταφέρθηκαν στην αμπούλα της συσκευής με την βοήθεια χωνιού. Εν συνεχεία, η συσκευή προσαρμόστηκε στη γραμμή από την πλευρά της αμπούλας του μονομερούς μέσω κατάλληλου προσαρμογέα που διατηρεί αδρανή ατμόσφαιρα μετά την εξαγωγή από το glove box και το μονομερές αφέθηκε για απαέρωση για 30 λεπτά. Στη συνέχεια αποστάχθηκαν κλασματικά 5 mL καθαρού διχλωρομεθανίου στην αμπούλα με τον NCA της φαινυλαλανίνης και ενώ το διάλυμα ήταν παγωμένο, η συσκευή απομακρύνθηκε από τη γραμμή μέσω σύντηξης στη στένωση που φέρει η αμπούλα. Μετά την πλήρη διάλυση του μονομερούς, το διαυγές κίτρινο διάλυμα του Phe NCA προστέθηκε ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη του πολυμερισμού με θραύση του γυάλινου υμένα. Με την προσθήκη του δεύτερου μονομερούς στη φιάλη, το κίτρινο χρώμα της αντίδρασης ενισχύθηκε. Μετά το πέρας 1 ώρας από την έναρξη του πολυμερισμού το σύστημα απαερώθηκε, κρατώντας και πάλι την φιάλη της αντίδρασης παγωμένη. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 3 μέρες έως ότου ολοκληρώθηκε. Η πορεία του πολυμερισμού ελεγχόταν καθημερινά με φασματοσκοπία FT-IR, λόγω της αδυναμίας να παρατηρηθούν οι φουσαλίδες όπως προαναφέρθηκε.

Η απομόνωση του τελικού συμπολυμερούς *m*-PEO-*b*-P(trt-His)-*b*-PPhe πραγματοποιείται με καταβύθισή του σε περίπου 500mL κρύου διαιθυλαιθέρα (ποσότητα περίπου δεκαπλάσια σε σύγκριση με εκείνη του διχλωρομεθανίου) και στη συνέχεια το στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner (Εικόνα 20). Το στερεό συλλέγεται και αφήνεται για ξήρανση στην γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.



Εικόνα 20: Καταβύθιση του πολυμερούς και διήθηση υπό κενό με συσκευή διηθήσεως Buchner.

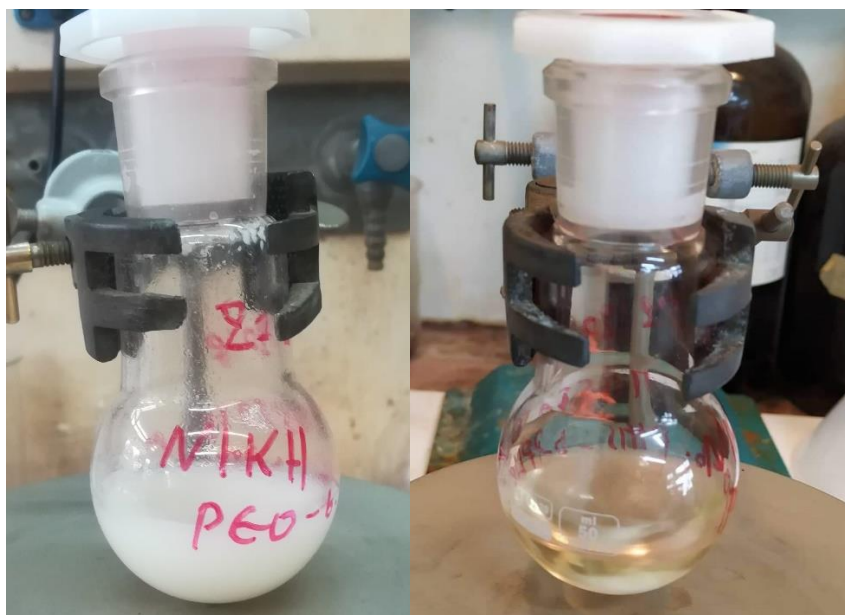
4.5.2 Εκλεκτική αποπροστασία μονομερικών μονάδων πολυϊστιδίνης (PTrtHis) για την σύνθεση του mPEO-*b*-Poly(L-Histidine)₂₉-*b*-Poly(L-Phenylalanine)₅



Σχήμα 21: Αντίδραση της αποπροστασίας των μονομερικών μονάδων της πολυϊστιδίνης.

Ακολούθως περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της PHis στο συμπολυμερές PEO-*b*-P(Trt-His)-*b*-PPhe που συντέθηκε παραπάνω.

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθενται η ποσότητα που λήφθηκε από το πλήρως προστατευμένο πολυμερές PEO-*b*-PTtt-His-*b*-PPhe και στην συνέχεια προστίθενται 20 mL διχλωρομεθανίου (CH₂Cl₂, DCM). Το πολυμερές αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για 30-40 min, ώστε να διασπαρθεί πλήρως στο διχλωρομεθάνιο και να διογκωθούν όσο το δυνατόν περισσότερο οι πολυμερικές αλυσίδες (καλός διαλύτης για το πολυμερές το DCM). Έπειτα, στη φιάλη προστίθενται 10 mL τριφθοροξικού οξέος (CF₃COOH, TFA, ≥99.5%, Fischer) και το έντονο κίτρινο και διαυγές διάλυμα που προκύπτει αφήνεται υπό ανάδευση για 1h. 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 προστίθεται 0.14mL (μερικές σταγόνες) τριαιθυλοσιλανίου μέχρι πλήρους αποχρωματισμού του διαλύματος ((iPr)₃SiH, 99%, Sigma-Aldrich), το οποίο σχηματίζει σταθερό δεσμό μαζί τους και τις καθιστά ανενεργές (Εικόνα 21). Η ποσότητα του (iPr)₃SiH που απαιτείται είναι πολύ μικρή, έτσι, εξασφαλίζεται ότι δεν θα επηρεαστούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί που υπάρχουν στο πολυμερές. Στη συνέχεια η φιάλη της αντίδρασης προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού σε ειδική διάταξη “short-path” προς απομάκρυνση των DCM και TFA σε κενή γειτονική φιάλη και αφήνεται για ξήρανση για μία νύχτα. (Εικόνα 22).



Εικόνα 21: Αριστερά το PEO-*b*-PTrt-His-*b*-PPhe σε διχλωρομεθάνιο. Δεξιά μετά την προσθήκη $(iPr)_3SiH$.



Εικόνα 22: Απομάκρυνση των διαλυτών από το πολυμερές με “short-path”.

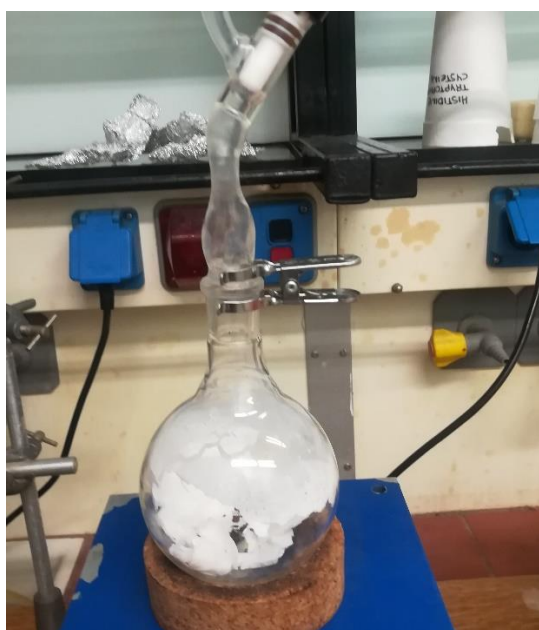
Την επόμενη ημέρα, στη φιάλη παραμένει μόνο το πολυμερές, το οποίο διαλύεται σε 20 mL νερό Milli-Q και αφήνεται υπό ανάδευση για 10-15 min με τις τρίτυλο- ομάδες να καθιζάνουν στη φιάλη και το αιώρημα διηθήθηκε υπό κενό με χρήση γυάλινου φίλτρου por. 3. Το διήθημα συλλέχθηκε και

ακολούθησε μέτρηση του pH του που ήταν ίσο με 1.48. Στη συνέχεια, με χρήση ~1.2 mL υδατικού διαλύματος K_2CO_3 20%, το pH προσαρμόστηκε στο 5.6 και το διήθημα μεταφέρθηκε με την βοήθεια πιπέτας σε μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis, MWCO=3.5k), η οποία με τη σειρά της τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 2L νερό Milli-Q υπό ανάδευση (Εικόνα 23). Η διαδικασία της διαπίδυσης λαμβάνει χώρα για την απομάκρυνση των δεσμευμένων τριτυλοομάδων από το πολυμερές διαμέσου των πόρων της μεμβράνης. Το pH του εξωτερικού διαλύματος ρυθμίζεται δύο φορές ανά 3 ώρες στο 3-4 με προσθήκη σταγόνων HCl 1N. Στην συνέχεια, γίνεται ρύθμιση του pH στο 9-10 με προσθήκη σταγόνων NaOH 1N. 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 9-10. 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 4 ημέρες και στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της λυοφιλοποίησης (freeze-drying) για την εκδίωξη του νερού από το πολυμερές. Το περιεχόμενο της μεμβράνης (πολυμερές διαλυμένο σε νερό) αποχύνεται σε σφαιρική φιάλη των 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.



Εικόνα 23: Διαδικασία διαπίδυσης (dialysis).

Η διαδικασία του freeze-drying διαρκεί 10 ώρες περίπου και εξαρτάται από τον όγκο του διαλύματος που συλλέγεται μετά από το dialysis. Μετά την ξήρασή του, το αποπροστατευμένο πολυμερές N_3 -PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ έχει λευκό χρώμα, ζυγίζεται και φυλάσσεται σε φιαλίδιο στην κατάψυξη, στους -20°C (Εικόνα 24). Η μάζα του συμπολυμερούς που ζυγίστηκε ήταν ίση με 0.248 g.



Εικόνα 24: Αριστερά η διαδικασία της λυοφιλοποίησης και δεξιά το τελικό αποπροστατευμένο πολυμερές.

4.5.3 Σύνθεση γραμμικού κατά συστάδες συμπολυμερούς mPEO-*b*-Poly(L-Histidine)₂₉-*b*-Poly(L-Phenylalanine)₁₀

Για τη σύνθεση του γραμμικού συμπολυμερούς mPEO-*b*-Poly(L-Histidine)₂₉-*b*-Poly(L-Phenylalanine)₁₀ με δέκα μονομερικές μονάδες φαινυλαλανίνης στο πολυμερές χρησιμοποιούνται 0.3 g μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ (MB = 10000 g/mol), με ακραία αμινομάδα ικανή να εκκινήσει τον πολυμερισμό του N-καρβοξυανυδρίτη του α-αμινοξέος της ιστοιδίνης. Δεδομένης της γνωστής ποσότητας του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί και του μοριακού βάρους της δεύτερης συστάδας (PHis = 4000 g/mol), τα οποία είναι ίδια με το προηγούμενο πολυμερές που συντέθηκε, γίνονται υπολογισμοί για την εύρεση των ποσοτήτων των δύο μονομερών N(im)-Trt-His NCA και Phe NCA που θα χρησιμοποιηθούν. Οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες των μονομερών σε αυτόν τον πολυμερισμό είναι 0.3705 g Nim-trt-His-NCA και 0.0576 g Phe NCA. Η πειραματική πορεία που ακολουθείται για τον πολυμερισμό είναι ακριβώς η ίδια με εκείνη που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.5.1 για τη σύνθεση του συμπολυμερούς mPEO-*b*-Poly(L-Histidine)₂₉-*b*-Poly(L-Phenylalanine)₅ με πέντε μονομερικές μονάδες φαινυλαλανίνης στο μόριο και ίδες ποσότητες απαρχητή και πολυϊστοιδίνης. Ο πολυμερισμός και σε αυτήν την περίπτωση διαρκεί 8 ημέρες σύνολο και ακολουθεί η αποπροστασία των μονομερικών μονάδων της πολυϊστοιδίνης όπως ακριβώς αναφέρεται στο κεφάλαιο 4.5.2. Στο τέλος όλης της πειραματικής διαδικασίας λαμβάνονται 0.222 g συμπολυμερούς. Η επιτυχής σύνθεση του πολυμερούς ελέγχεται σε κάθε σχεδόν στάδιο της συνθετικής πορείας με λήψη φασμάτων FT-IR και τελικά επιβεβαιώνεται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).

4.5.4 Σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού

Για την σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού με τα δύο συμπολυμερή τύπου PEO-*b*-Poly(L-Histidine)-*b*-Poly(L-Phenylalanine) που συντέθηκαν παραπάνω, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Ζυγίζεται πολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ 10 mg σε διαφορετικά φιαλίδια με πώμα τα οποία διαλύονται σε milli g και αφήνονται υπό ανάδευση όλη την νύχτα. Την επόμενη μέρα γίνεται η προσθήκη

ποσότητας $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ στα φιαλίδια με διαφορετικές αναλογίες ιστιδίνης-χρυσού σε καθένα από αυτά και αφήνονται μία μέρα ώστε να γίνει η δέσμευση του χρυσού. Τα φιαλίδια την επόμενη ημέρα, τοποθετούνται σε ελαιόλουτρο και η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 80°C . Αρχικά τα διαλύματα είναι άχρωμα και αφήνονται υπό ανάδευση μέχρι να χρωματιστούν. Με την έναρξη της αντίδρασης τα διαλύματα γίνονται μωβ (χαρακτηριστικό χρώμα που δίνουν τα νανοσωματίδια χρυσού).

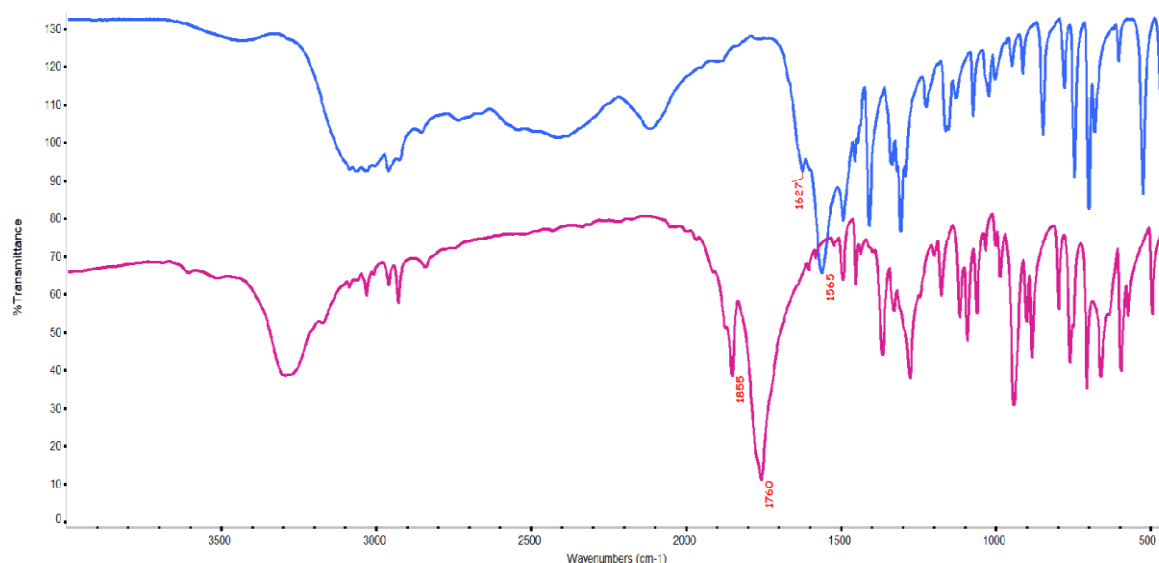
Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και για το συμπολυμερές $\text{PEO-}b\text{-PHis-}b\text{-PPhe}_{10}$. Παρατηρήθηκε πως ανάλογα με την ποσότητα του χρυσού που προστέθηκε στο κάθε φιαλίδιο αλλάζει ο χρόνος στον οποίο συντελείται η αντίδραση. Οι αναλογίες ιστιδίνης-χρυσού που μελετήθηκαν για τα δύο συμπολυμερή είναι οι εξής: 10 mol ιστιδίνη/1 mol Au, 9 mol ιστιδίνη/1 mol Au, 8 mol ιστιδίνη/1 mol Au, 7 mol ιστιδίνη/1 mol Au, 5 mol ιστιδίνη/1 mol Au.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Χαρακτηρισμός του N-καρβοξυανυδρίτη της L-Phenylalanine (Phe NCA)

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



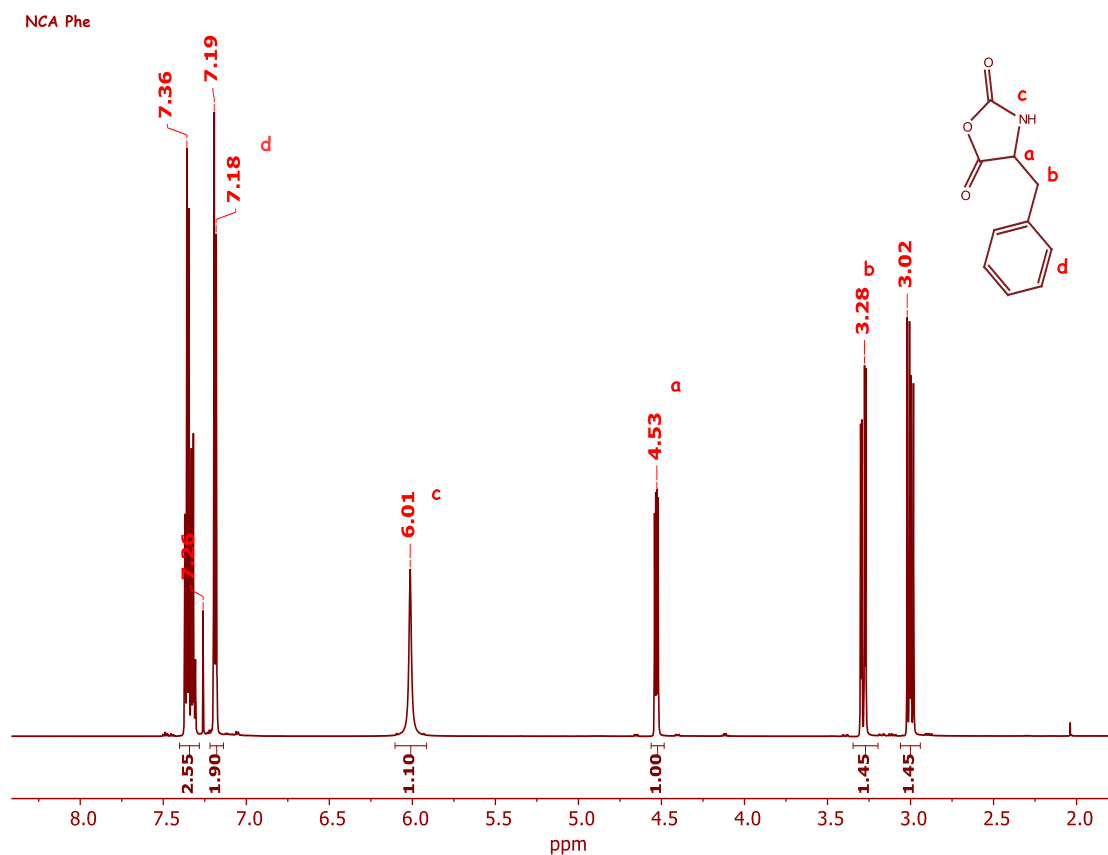
Εικόνα 25: Φάσματα FT-IR. Α γράφημα: Πρόδρομο αμινοξύ Η-Phe-OH, Β γράφημα: Τελικός Phe NCA.

Σε ό,τι αφορά το φάσμα Phe NCA, αρχικά, προηγείται η λήψη φάσματος IR της πρόδρομης ένωσης L-Φαινυλαλανίνης (Εικόνα 25, μπλε γράφημα). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1565 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου (C=O) του αμινοξέος της φαινυλαλανίνης. Επίσης παρατηρείται και η κορυφή στα 1627 cm^{-1} , που οφείλεται στη δόνηση κάμψης του δεσμού της ελεύθερης αμινομάδας ($-\text{NH}_2$). Η αντίστοιχη δόνηση έκτασης

του δεσμού $-NH_2$ εμφανίζεται στην ευρεία περιοχή $2500-3300\text{ cm}^{-1}$ σε συνδυασμό με την υδροξυλομάδα του καρβοξυλίου. Τα καρβοξυλικά οξέα απαντώνται ως διμερή όταν βρίσκονται σε στερεά φάση μέσω δεσμών υδρογόνου, αποδίδοντας ευρείες κορυφές στα φάσματα IR.

Στο φάσμα IR του τελικού Phe-NCA παρατηρείται ότι το αρχικό αμινοξύ της φαινυλαλανίνης έχει καταναλωθεί πλήρως, καθώς απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές της ελεύθερης αμινομάδας και του καρβοξυλίου (Εικόνα 25, μωβ γράφημα). Επιπλέον, παρατηρούνται δύο νέες ταινίες που υποδηλώνουν την επιτυχή σύνθεση του NCA. Η απορρόφηση στα 1760 cm^{-1} αφορά τη δόνηση έκτασης του καρβονυλίου που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του ανυδρίτη (δηλ. του C_2), και η δεύτερη στα 1855 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση έκτασης του καρβονυλίου που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C_5). Επίσης, απουσιάζει η χαρακτηριστική ταινία του αμιδικού δεσμού στα 1650 cm^{-1} , γεγονός που αποδεικνύει ότι η τεχνική υψηλού κενού διασφαλίζει όλα τα συνθετικά στάδια.

Η επιτυχής σύνθεση του Phe NCA επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος 1H -NMR του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο $CDCl_3$.



Εικόνα 26: Φάσμα ^1H NMR σε CDCl_3 για τον Phe NCA.

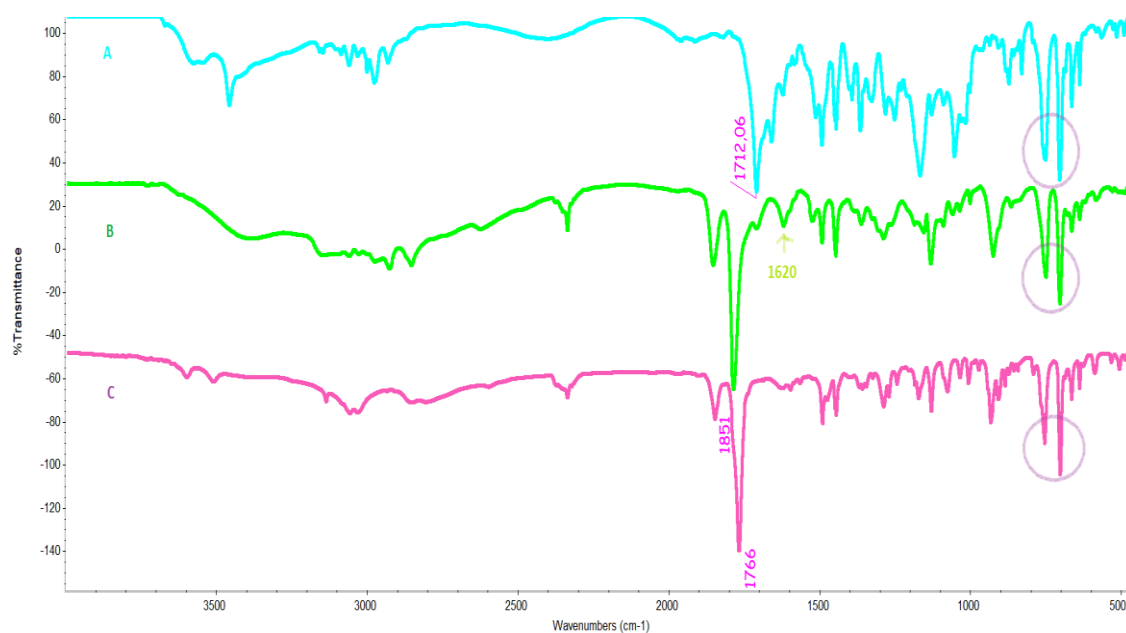
Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 26 ταυτοποιήθηκαν ένα προς ένα τα υδρογόνα για το μόριο του Phe NCA. Πιο συγκεκριμένα, οι αναμενόμενες χαρακτηριστικές κορυφές για τον Phe NCA εμφανίζονται στα 6.01 ppm για το υδρογόνο **c** (HN-C=O-), 4.53 ppm για το υδρογόνο **a** ($-\text{Ph-CH}_2-\text{CH-}$) του C_α , στα 3.02-3.28 ppm για τα υδρογόνα **b** ($-\text{Ph-CH}_2-\text{CH-}$) και τέλος στα 7.18, 7.19, 7.36 ppm για τα υδρογόνα **d** του βενζολικού δακτυλίου. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 7.26 ppm είναι του δευτεριωμένου χλωροφορμίου που αποτέλεσε τον διαλύτη για την λήψη του φάσματος.

Αξίζει να τονιστεί ότι οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν με τις θεωρητικά αναμενόμενες τιμές όχι όμως επακριβώς όπως θα αναμέναμε. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω πιστοποιήθηκε η σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης.

5.2 Χαρακτηρισμός του N-καρβοξυανυδρίτη της Nim-Trityl-L-Histidine (Nim-Trt-L-His NCA)

Για τον πλήρη έλεγχο της συνθετικής πορείας του N^{im} -Trt-L-His NCA κάθε στάδιο ελέγχθηκε με φασματοσκοπία FT-IR πριν την έναρξη του επόμενου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σύνθεση του N^{im} -Trt-L-His NCA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά στο πρόδρομο αμινοξύ προστέθηκε το αντιδραστήριο χλωρίωσης $SOCl_2$ και μετά το πέρας μίας ώρας σχηματίστηκε σε υψηλή απόδοση το N^{im} -Trt-L-His NCA*HCl. Από την Εικόνα 27 είναι ορατή η διαφορά ανάμεσα στα φάσματα του πρόδρομου αμινοξέος και του τελικού N^{im} -Trt-L-His NCA*HCl έπειτα από 5 ώρες αντίδρασης του αμινοξέος και του $SOCl_2$.



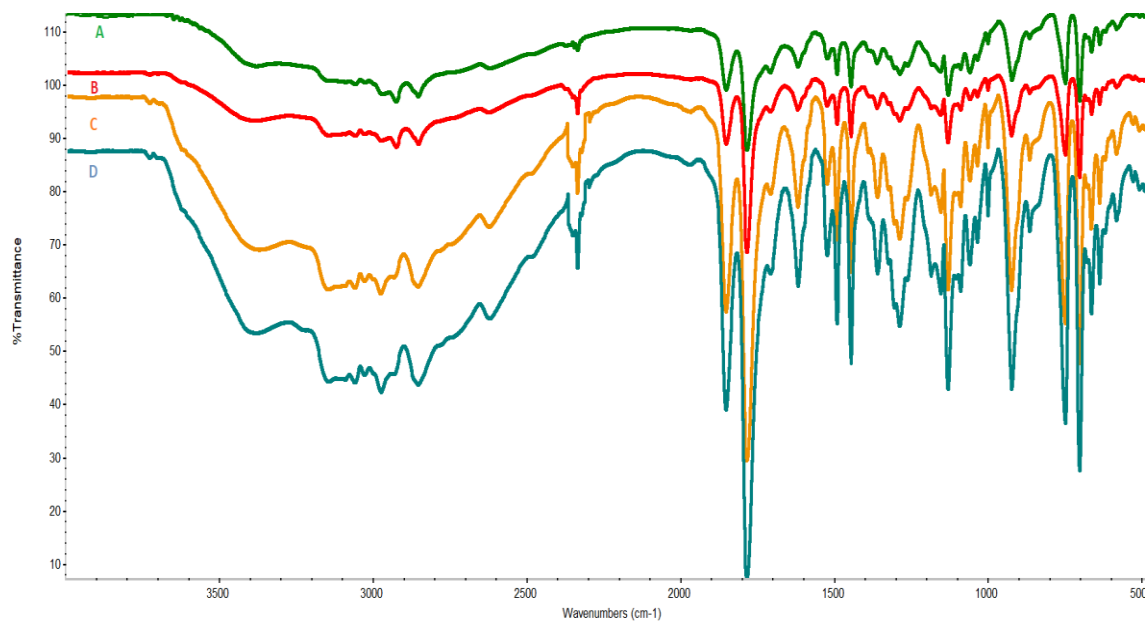
Εικόνα 27: Φάσματα FT-IR κατά την πορεία σύνθεσης του N^{im} -Trt-L-His NCA. A γράφημα: Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(trt)-OH, B γράφημα: Σχηματισμός N^{im} -Trt-L-His NCA*HCl 1 ώρα μετά την προσθήκη $SOCl_2$, C γράφημα: Τελικός N^{im} -Trt-L-His.

Χαρακτηριστική είναι η παρουσία της κορυφής στα 1710 cm^{-1} (Φάσμα A, Εικόνα 27) στο πρόδρομο αμινοξύ που αντιστοιχεί στη δόνηση του δεσμού $C=O$. Μετά την προσθήκη του $SOCl_2$, η κορυφή στα 1710 cm^{-1} εξαφανίζεται καθώς

πραγματοποιείται κυκλοποίηση του πρόδρομου αμινοξέος προς σχηματισμό του N^{im} -Trt-L-His NCA*HCl και αρχίζουν να εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές για τις δονήσεις των C=O του N-καρβοξυ ανυδρίτη. Πιο συγκεκριμένα, στα 1851 cm^{-1} (Φάσμα B, Εικόνα 27) για τη δόνηση του C=O δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA και στα 1766 cm^{-1} για τη δόνηση του C=O δίπλα στο άζωτο του NCA. Επίσης, χαρακτηριστική είναι και η εμφάνιση κορυφής στα 1620 cm^{-1} (Φάσμα B, Εικόνα 27) που αντιστοιχεί στην έκταση του δεσμού N-H στο υδροχλωρικό άλας της Ιστιδίνης N^{im} -Trt-L-His NCA*HCl.

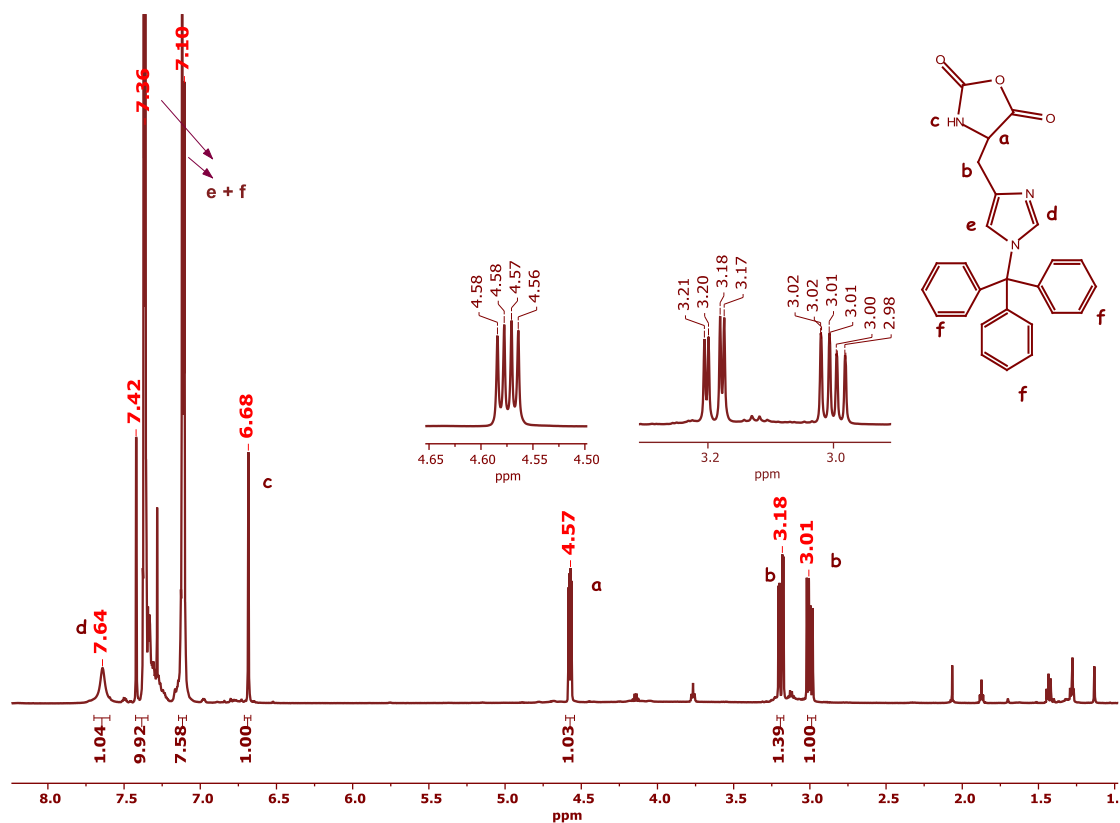
Στη συνέχεια, με χρήση ισομοριακής ποσότητας Et_3N πραγματοποιήθηκε η ποσοτική απομάκρυνση του HCl από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο και ακολουθώντας μία διαδικασία ανακρυσταλλώσεων συλλέχθηκε ο τελικός N^{im} -Trt-L-His NCA. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 27 (Φάσμα C), έπειτα από την προσθήκη της Et_3N και των ανακρυσταλλώσεων, ο τελικός N-καρβοξυ ανυδρίτης δεν εμφανίζει πια την κορυφή στα 1620 cm^{-1} που αντιστοιχεί στο άλας και διατηρεί τις δονήσεις των καρβονυλίων του δακτυλίου στους 1851 cm^{-1} (δόνηση δεσμού C=O δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA) και στους 1766 cm^{-1} (Δόνηση δεσμού C=O δίπλα στο άζωτο του NCA). Ακόμη απουσιάζει η κορυφή στα 1710 cm^{-1} , που υποδηλώνει ότι το αρχικό αμινοξύ της ιστοιδίνης έχει καταναλωθεί πλήρως, όπως επίσης και η κορυφή στα 1650 cm^{-1} , που θα οφειλόταν στη δόνηση του πεπτιδικού δεσμού λόγω πιθανής έναρξης του πολυμερισμού από τυχόν περίσσεια της Et_3N . Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι καθ' όλη την πειραματική πορεία, όπως φαίνεται από τα φάσματα (κυκλωμένες περιοχές), δεν έχει επηρεαστεί η τρίτυλο-προστατευτική ομάδα του ανυδρίτη καθώς οι κορυφές για τις δονήσεις των δεσμών -C=C- παραμένουν αμετάβλητες στα 700 cm^{-1} και στα 750 cm^{-1} .

Στην Εικόνα 28 φαίνεται η αύξηση των δύο χαρακτηριστικών κορυφών του N-καρβοξυ ανυδρίτη (1850 cm^{-1} και 1766 cm^{-1}) με το πέρασμα της ώρας μετά την προσθήκη του $SOCl_2$. Τα εν λόγω φάσματα ελήφθησαν 1 ώρα, 2 ώρες, 3 ώρες και 4 ώρες αντίστοιχα μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου χλωρίωσης. Στα τέσσερα αυτά φάσματα φαίνεται ξεκάθαρα και η κορυφή στα 1620 cm^{-1} που αντιστοιχεί στο υδροχλωρικό άλας της ιστοιδίνης (N^{im} -Trt-L-His NCA*HCl).



Εικόνα 28: Φάσματα FT-IR κατά την πορεία σύνθεσης του N^{im} -Trt-L-His NCA*HCl μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου χλωρίωσης.

Ακολούθησε χαρακτηρισμός και με φασματοσκοπία 1H NMR με τη βοήθεια της οποίας εντοπίστηκαν όλα τα αναμενόμενα υδρογόνα του τελικού N^{im} -Trt-L-His NCA.



Εικόνα 29: Φάσμα 1H NMR σε $CDCl_3$ για τον τελικό N^{im} -Trt-L-His NCA.

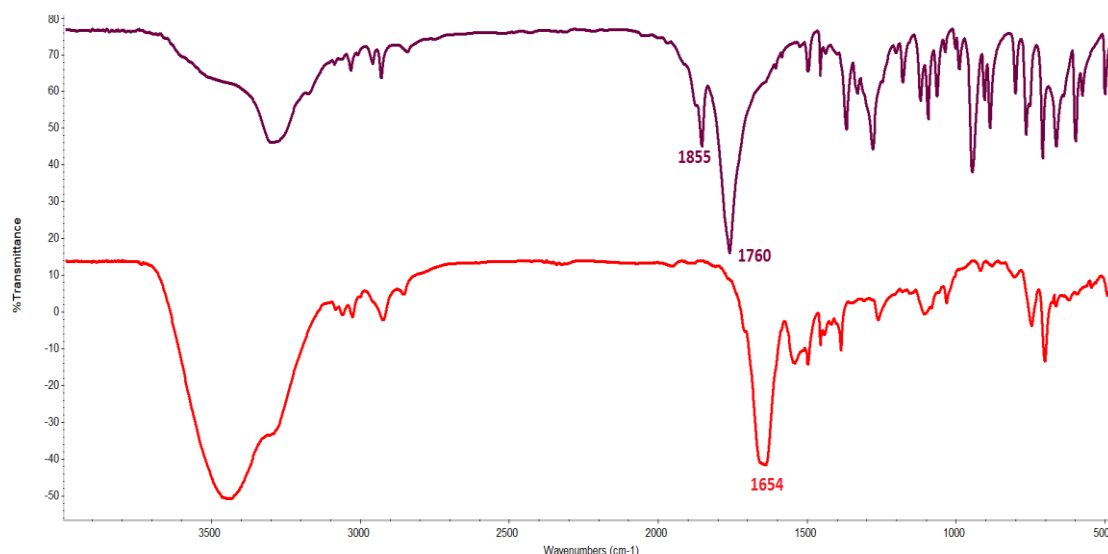
Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 29 ταυτοποιήθηκαν όλες οι κορυφές στο φάσμα του N^{im}-Trt-L-His NCA επιβεβαιώνοντας έτσι τη σύνθεση του μονομερούς. Για τον N-καρβοξυ ανυδρίτη της τρίτυλο-Ιστιδίνης εντοπίστηκαν οι κορυφές στα 7.64 ppm για το υδρογόνο *d* (-N=C*H*-N), στα 7.36 και στα 7.10 ppm για το υδρογόνο *e* (-C=C*H*-N) και για τα υδρογόνα *f* (-C=C*H*-C=) των αρωματικών δακτυλίων, στα 6.68 ppm για το υδρογόνο *c* (-*H*N-C=O-), στα 4.56-4.58 ppm για το υδρογόνο *a* (Im-CH₂-C*H*-) του C_α και τέλος στα 2.98-3.21 ppm για τα υδρογόνα *b* (Im-C*H*₂-CH-) του C_β. Αξίζει επιπλέον να τονιστεί ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση, η αναλογία των εμβαδών συμπίπτει με τις θεωρητικά προβλεπόμενες, με μικρές διαφορές οι οποίες οφείλονται στους διαφορετικούς χρόνους χαλάρωσης των N-καρβοξυ ανυδριτών.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω λοιπόν αποδείχθηκε τόσο με φασματοσκοπία FT-IR όσο και με φασματοσκοπία ¹HNMR η επιτυχής σύνθεση του N^{im}-Trt-L-His NCA.

5.3 Χαρακτηρισμός των δύο ομοπολυμερών φαινυλαλανίνης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας συντέθηκαν δύο ομοπολυμερή φαινυλαλανίνης (ολιγομερή) με πέντε και δέκα δομικές μονάδες μονομερούς αντίστοιχα. Για τη σύνθεση των επιθυμητών ολιγομερών πραγματοποιήθηκε πολυμερισμός του Phe NCA χρησιμοποιώντας ως απαρχητή τη δευτεροταγή αμίνη διμεθυλαμίνη. Η κατανάλωση των μονομερών ελέγχθηκε με φασματοσκοπία FT-IR και η επιτυχής σύνθεσή τους με φασματοσκοπία ¹HNMR. Σε αυτό το σημείο να σημειωθεί ότι ο χαρακτηρισμός τους με την μέθοδο χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών ήταν αδύνατος, διότι τα δύο ολιγομερή ήταν πλήρως αδιάλυτα, όπως διαπιστώθηκε μετά από δοκιμές, στους διαλύτες της SEC καθώς επίσης και στο μεγαλύτερο αριθμό διαλυτών που δοκιμάστηκαν στα πλαίσια του εργαστηρίου.

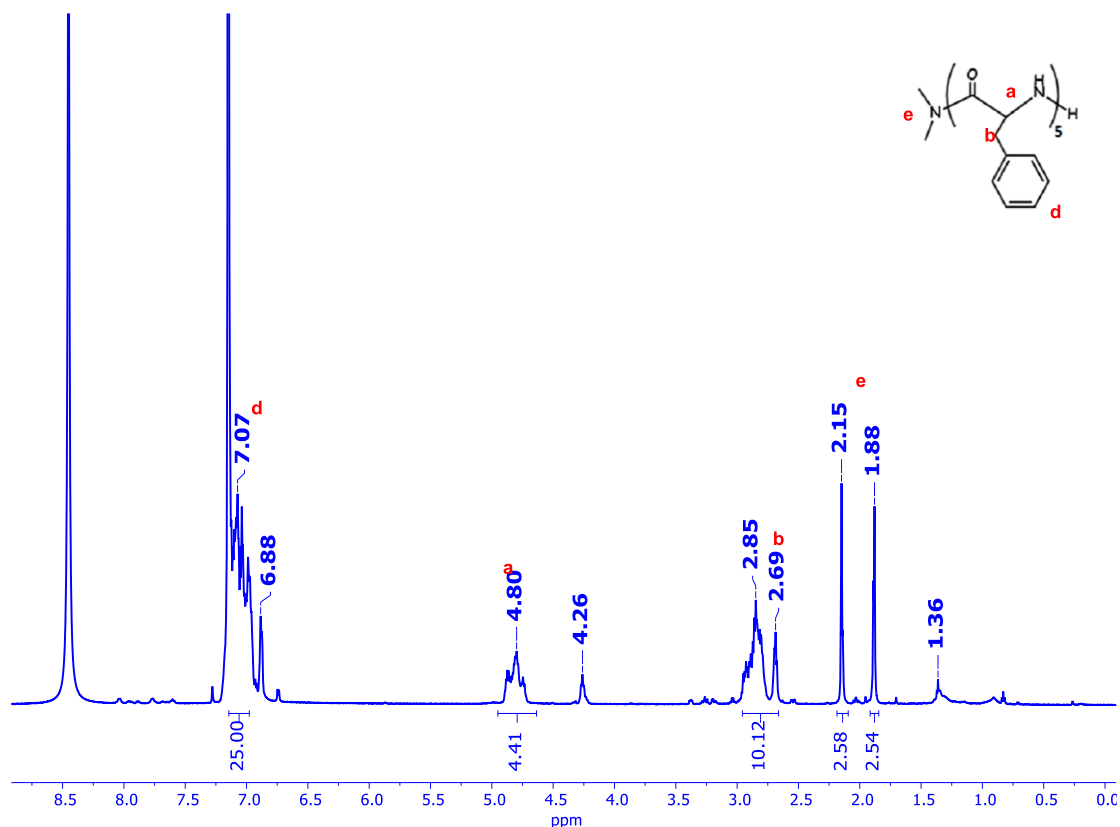
5.3.1 Ομοπολυμερές φαινυλαλανίνης με πέντε δομικές μονάδες



Εικόνα 30: Φάσμα FT-IR του Phe NCA (μωβ γράφημα) και του πενταμερούς φαινυλαλανίνης (κόκκινο γράφημα).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 30, χαρακτηριστική είναι η παρουσία των δονήσεων για τον πεπτιδικό δεσμό στα 1654 cm^{-1} (κόκκινο γράφημα) που σε συνδυασμό με την εξαφάνιση των χαρακτηριστικών δονήσεων του Phe NCA στα 1855 cm^{-1} και 1760 cm^{-1} (μωβ γράφημα) υποδηλώνεται ο πολυμερισμός της από τη διμεθυλαμίνη. Σε αυτό τον πολυμερισμό δεν υπήρχαν προστατευτικές ομάδες, επομένως δεν ελήφθησαν άλλα φάσματα IR κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του πολυμερισμού.

Ακολούθησε χαρακτηρισμός και με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$ σε διαλύτη δευτεριωμένο βενζόλιο και 5% TFA. Για τη λήψη του εν λόγω φάσματος δοκιμάστηκαν πολλοί διαλύτες, αλλά αποδείχτηκε πως ο παραπάνω έδωσε το καλύτερο αποτέλεσμα συγκριτικά με τους υπόλοιπους.

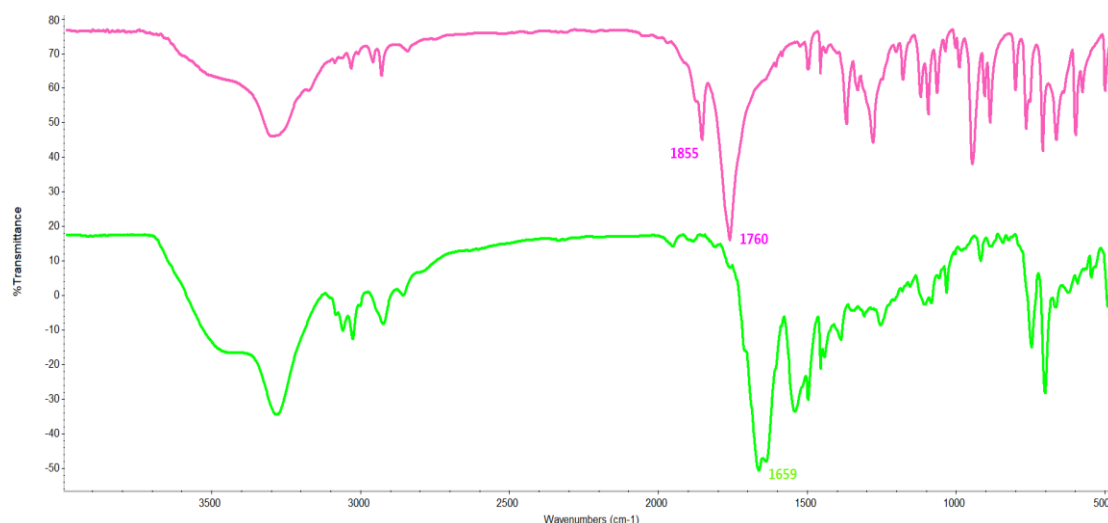


Εικόνα 31: Φάσμα ^1H NMR σε d -benzene + 5% TFA για το πενταμερές φαινυλαλανίνης.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 31 ταυτοποιήθηκαν όλες οι κορυφές στο φάσμα της πολυφαινυλαλανίνης με πέντε μονομερικές μονάδες επιβεβαιώνοντας έτσι τη σύνθεση του ολιγομερούς. Για το πενταμερές της φαινυλαλανίνης εντοπίστηκαν οι κορυφές στα 7.07-7.15 ppm για τα υδρογόνα d του βενζολικού δακτυλίου ($\text{C}=\text{CH}-\text{C}=\text{}$), στα 4.80 για το υδρογόνο α ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{NH}$), στα 2.69 και 2.85 ppm για τα υδρογόνα b ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$) και στα 1.88 και 2.15 ppm για τα υδρογόνα e ($(\text{CH}_3)_2-\text{N}-$) του απαρχητή της διμεθυλαμίνης. Αξίζει επιπλέον να τονιστεί ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση, η αναλογία των εμβαδών συμπίπτει με τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές με κάποιες μικρές διαφορές. Οι κορυφές οι οποίες δεν έχουν ολοκληρωθεί αντιστοιχούν στους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάλυση του πολυμερούς (στα 8.5 ppm εμφανίζεται η κορυφή του TFA και στα 7.15 ppm η κορυφή του βενζολίου) όσο και σε κάποιους που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω λοιπόν αποδείχθηκε τόσο με φασματοσκοπία FT-IR όσο και με φασματοσκοπία ^1H NMR η επιτυχής σύνθεση του πενταμερούς της φαινυλαλανίνης.

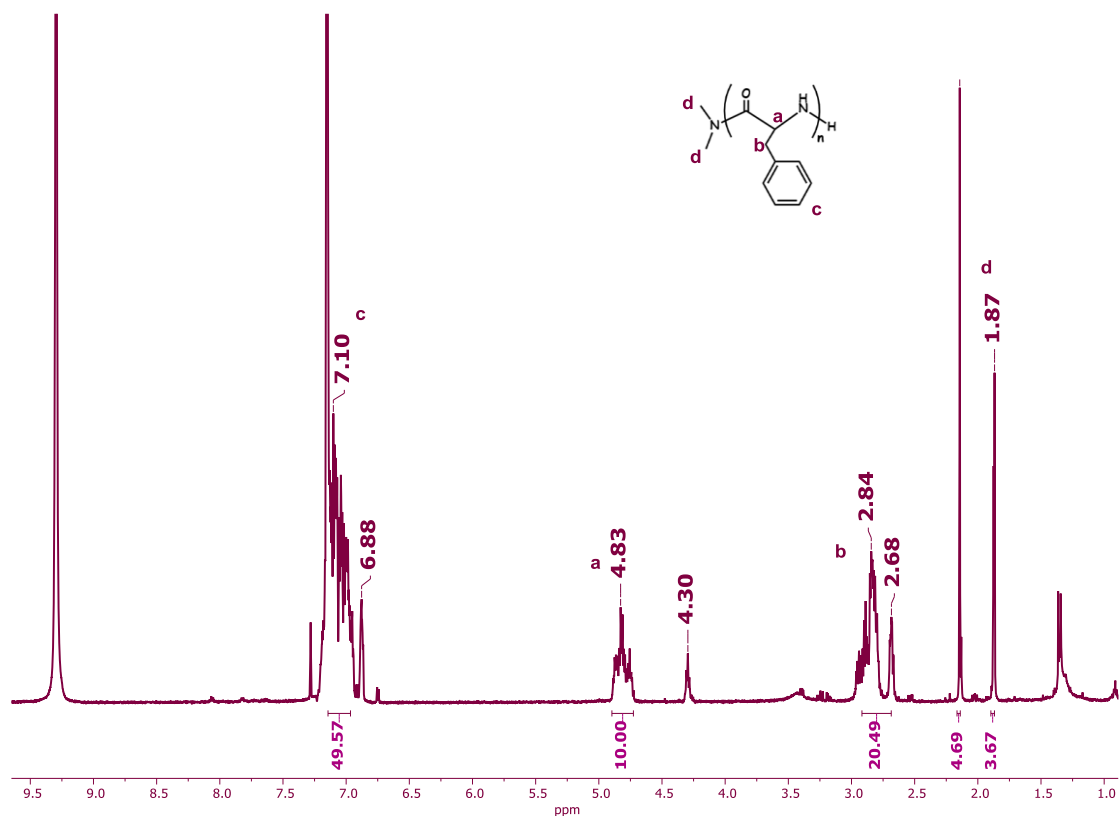
5.3.2 Ομοπολυμερές φαινυλαλανίνης με δέκα δομικές μονάδες



Εικόνα 32: Φάσμα FT-IR του Phe NCA (ροζ γράφημα) και του δεκαμερούς φαινυλαλανίνης (πράσινο γράφημα).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 32, χαρακτηριστική είναι η παρουσία των δονήσεων για τον πεπτιδικό δεσμό στα 1659 cm⁻¹ (πράσινο γράφημα) που σε συνδυασμό με την εξαφάνιση των χαρακτηριστικών δονήσεων του Phe NCA στα 1855 cm⁻¹ και 1760 cm⁻¹ (ροζ γράφημα) υποδηλώνεται ο πολυμερισμός της από την διμεθυλαμίνη. Σε αυτό τον πολυμερισμό δεν υπήρχαν προστατευτικές ομάδες, επομένως δεν ελήφθησαν άλλα φάσματα IR κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του πολυμερισμού.

Ακολούθησε χαρακτηρισμός και με φασματοσκοπία ¹HNMR σε διαλύτη δευτεριωμένο βενζόλιο και 5% TFA. Για την λήψη και του εν λόγω φάσματος, όπως και για το πενταμερές αντιμετωπίστηκε δυσκολία διάλυσης του στους κοινούς διαλύτες. Έτσι μετά από πολλές δοκιμές αποδείχτηκε πως ο παραπάνω έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τους υπόλοιπους.



Εικόνα 33: Φάσμα $^1\text{H NMR}$ σε $d\text{-benzene} + 5\% \text{ TFA}$ για το δεκαμερές φαινυλαλανίνης.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 33 ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές στο φάσμα της πολυφαινυλαλανίνης με δέκα μονομερικές μονάδες επιβεβαιώνοντας έτσι τη σύνθεση του ολιγομερούς. Για το δεκαμερές της φαινυλαλανίνης εντοπίστηκαν οι κορυφές στα 7.06-7.15 ppm για τα υδρογόνα d του βενζολικού δακτυλίου ($\text{C}=\text{C}\text{H}-\text{C}=\text{}$), στα 4.83 για το υδρογόνο a ($\text{O}=\text{C}-\text{C}\text{H}-\text{NH}$), στα 2.84 και 2.68 ppm για τα υδρογόνα b ($-\text{CH}-\text{C}\text{H}_2-\text{Ph}$) και στα 1.87 και 2.14 ppm για τα υδρογόνα e ($(\text{C}\text{H}_3)_2\text{-N}-$) του απαρχητή της διμεθυλαμίνης. Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση, η αναλογία των εμβαδών δεν συμπίπτει επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές, ωστόσο είναι σχετικά κοντά σε αυτές. Οι κορυφές, οι οποίες δεν έχουν ολοκληρωθεί, αντιστοιχούν στους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάλυση του πολυμερούς (στα 8.5 ppm εμφανίζεται η κορυφή του TFA και στα 7.15 ppm η κορυφή του βενζολίου) όσο και σε κάποιους που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού.

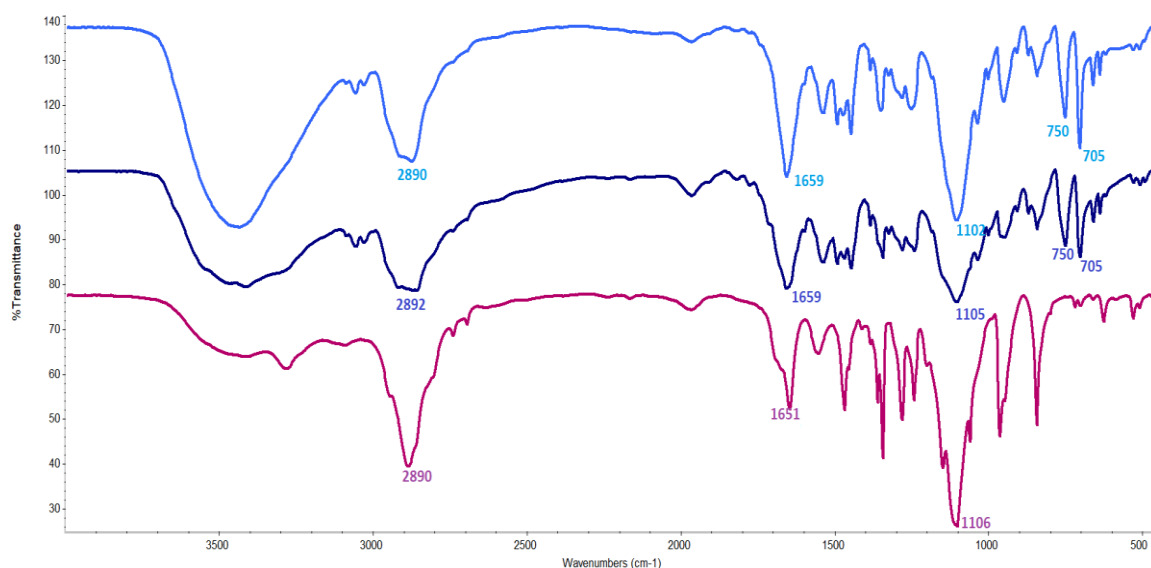
Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω λοιπόν αποδείχθηκε τόσο με φασματοσκοπία FT-IR όσο και με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$ η επιτυχής σύνθεση του δεκαμερούς της φαινυλαλανίνης.

5.4 Χαρακτηρισμός των δύο συμπολυμερών PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας συντέθηκαν δύο τρισταδιακά συμπολυμερή τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με διαφορετικό μοριακό βάρος φαινυλαλανίνης κάθε φορά και συγκεκριμένα με πέντε και δέκα μονομερικές μονάδες Phe αντίστοιχα. Για τη σύνθεση των επιθυμητών συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε διαδοχικός πολυμερισμός των N^{im}-Trt-L-His NCA και Phe NCA χρησιμοποιώντας ως απαρχητή της πρώτης πολυπεπτιδικής συστάδας το PEO-NH₂ 10K. Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της πρώτης πολυπεπτιδικής συστάδας (ιστιδίνης) προστέθηκε στο σύστημα το δεύτερο μονομερές (Phe NCA), χωρίς να προηγηθεί στάδιο απομόνωσης του πολυμερισμού. Η κατανάλωση των μονομερών ελέγχθηκε με φασματοσκοπία FT-IR.

Αρχικά συντέθηκαν τα προστατευμένα συμπολυμερή στη συστάδα της ιστιδίνης καθώς η φαινυλαλανίνη δεν περιέχει προστατευτική ομάδα και στη συνέχεια με εκλεκτική αποπροστασία των μονομερικών μονάδων της ιστιδίνης δημιουργήθηκαν τα πλήρως αποπροστατευμένα συμπολυμερή. Τα στάδια της σύνθεσης και της αποπροστασίας ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και ¹HNMR για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία τους.

5.4.1 Χαρακτηρισμός του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-(PPhe)₅

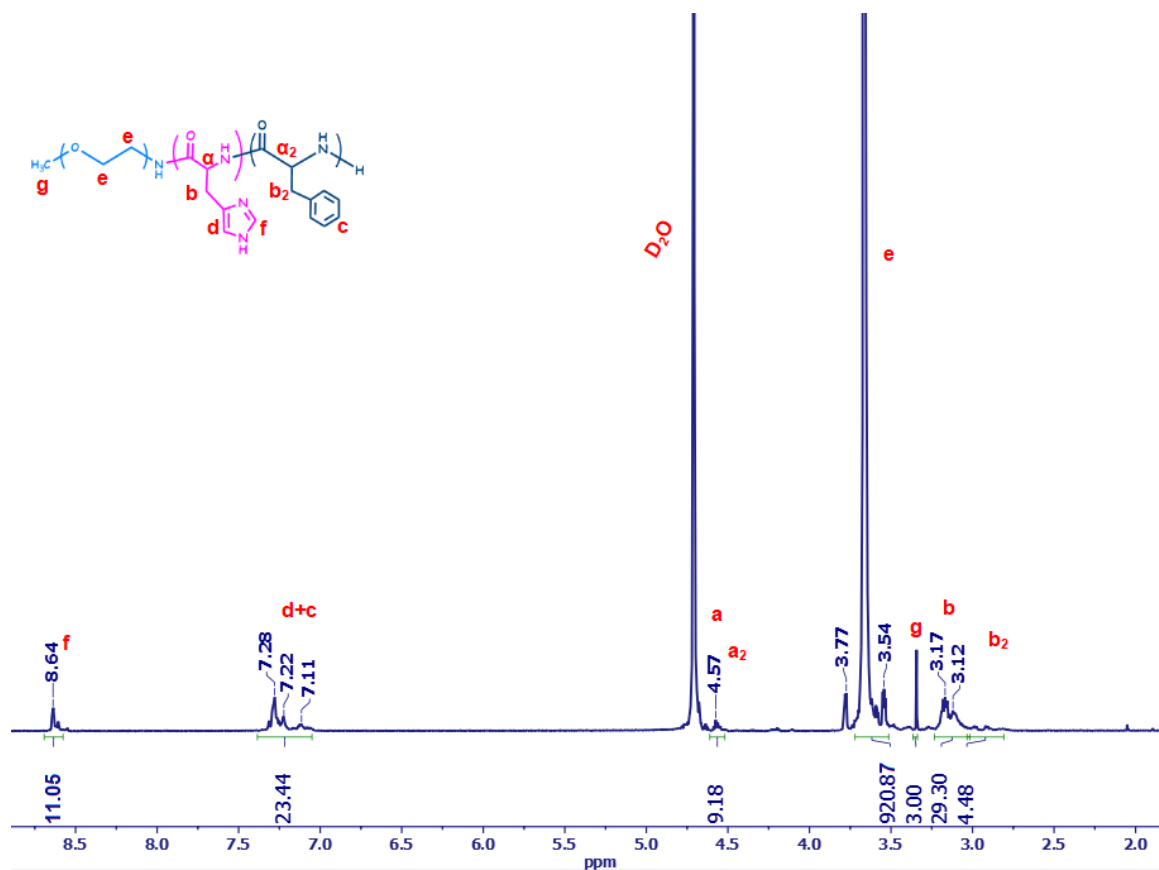


Εικόνα 34: Φάσματα FT-IR για το συμπολυμερές. Μετά την προσθήκη της συστάδας His(PEO-*b*-P_{trt}-His) (γαλάζιο γράφημα), Μετά την προσθήκη της συστάδας Phe (PEO-*b*-*trt*His-*b*-Phe) (μπλε γράφημα), Τελικό αποπροστατευμένο συμπολυμερές (μωβ γράφημα).

Από τη φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR ταυτοποιήθηκαν αρχικά οι χαρακτηριστικές αναμενόμενες δονήσεις για κάθε στάδιο της συνθετικής πορείας του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 34, χαρακτηριστική είναι η παρουσία των δονήσεων για τον πεπτιδικό δεσμό στα 1659 cm^{-1} που σε συνδυασμό με τη μείωση των χαρακτηριστικών δονήσεων του *trt*-His NCA στα 1851 cm^{-1} και 1766 cm^{-1} υποδηλώνεται ο πολυμερισμός της από το μακροαπαρχητή (PEO-NH₂). Επίσης εντοπίζονται και οι χαρακτηριστικές δονήσεις για τον μακροαπαρχητή του αιθερικού δεσμού C–O–C του πολυ(αιθυλενοξειδίου) στα 2890 cm^{-1} και στα 1102 cm^{-1} . Με την πλήρη κατανάλωση του *trt*-His NCA προστέθηκε στο διάλυμα ο L Phe NCA και μετά το τέλος του πολυμερισμού πάρθηκε δείγμα για τον έλεγχο της πορείας του (μπλε γράφημα). Εκτός τις αναμενόμενες δονήσεις για τον πεπτιδικό δεσμού στα 1659 cm^{-1} και για το PEO-NH₂ στα 2892 cm^{-1} και 1105 cm^{-1} είναι εμφανής η ύπαρξη δονήσεων στα 750 cm^{-1} και 705 cm^{-1} που αντιστοιχούν στις δονήσεις των τρίτυλο-προστατευτικών ομάδων της ισιδίνης. Τέλος, συγκρίνοντας τα δύο πρώτα φάσματα με αυτό του αποπροστατευμένου τελικού

συμπολυμερούς (μωβ γράφημα) πέραν των αναμενόμενων δονήσεων για τον πεπτιδικό δεσμό στα 1651 cm^{-1} και το μακροαπαρχητή είναι εμφανής η απουσία των δονήσεων για τις τρίτυλο-προστατευτικές ομάδες σε σχέση με το πλήρως προστατευμένο (γαλάζιο και μπλε γράφημα). Λόγω του μικρού μοριακού της βάρους, η συστάδα της φαινυλαλανίνης δεν εμφανίζει χαρακτηριστικές δονήσεις στα συγκεκριμένα φάσματα.

Το επόμενο βήμα για το χαρακτηρισμό του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ αποτέλεσε η μέτρηση δείγματος με φασματοσκοπία ¹HNMR. Διερευνήθηκαν διάφορες συνθήκες παρασκευής δείγματος ώστε τελικά να γίνει δυνατός ο εντοπισμός όλων των αναμενόμενων κορυφών. Ωστόσο σε καμία περίπτωση η 100% ταυτοποίηση όλων των συστάδων του συμπολυμερούς δεν ήταν δυνατή. Αρχικά λήφθηκαν φάσματα για το ¹HNMR με διαλύτες: DMSO-*d*₆, DMSO και TFA-*d*₄ 1%, D₂O και TFA 1%, 2% και 15% και τέλος D₂O και DCI 1% και 1,5%. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η περιεκτικότητα του διαλύτη δευτεριωμένο νερό (D₂O) στο δευτεριωμένο υδροχλώριο (DCI) κυμαίνεται αυστηρά στο 1% λόγω του ότι σε πολύ υψηλότερες περιεκτικότητες τα φορτία που δημιουργούνται λόγω του DCI καθιστούν τη μέτρηση αδύνατη

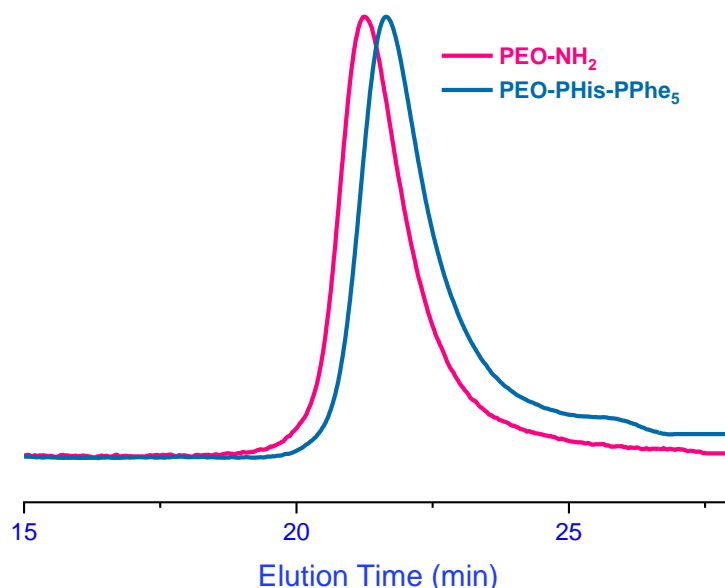


Εικόνα 35: Φάσμα ¹HNMR πλήρως αποπροστατευμένου συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ σε D₂O/DCI.

Έπειτα από διάφορες μετρήσεις με διαφορετικά συστήματα διαλυτών παρατηρήθηκε ότι το μείγμα D₂O/DCI 1% κατέληξε στα καλύτερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν τα τέσσερα υδρογόνα της μονομερικής μονάδα του πολυαιθυλενοξειδίου (-O-CH₂-CH₂-) στα 3.5-3.7 ppm. Επίσης, ανιχνεύτηκαν όλες οι αναμενόμενες κορυφές για τη συστάδα της πολυϊστιδίνης όπως για παράδειγμα η κορυφή στα 4.57 ppm για το υδρογόνο **a** του C_a (Im-CH₂-CH-), η κορυφή στα 3.12-3.17 ppm για τα δύο υδρογόνα **b** του C_b (Im-CH₂-) και η κορυφή στα 8.64 ppm για το υδρογόνο **f** ιμιδαζολικού δακτυλίου (-NH-CH=N-). Ακόμη, στα 7.1-7.3 ppm εντοπίζεται το υδρογόνο **d** του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης (N-CH=C) η κορυφή του οποίου όμως συμπίπτει με τα αρωματικά υδρογόνα **c** του βενζολικού δακτυλίου της φαινυλαλανίνης. Τα πρωτόνια του C_β (**b**₂) και C_a (**a**₂) για την πολυφαινυλαλανίνη ήταν αδύνατο να ταυτοποιηθούν, λόγω του ότι οι αναμενόμενες τιμές τους συμπίπτουν με τα αντίστοιχα υδρογόνα (**a** και **b**) της πολυϊστιδίνης.

Όπως είναι γνωστό, στα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού θα πρέπει να εμφανίζονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές ώστε να ταυτοποιείται κάθε είδους μόριο ή μακρομόριο. Παρόλα αυτά, στη συγκεκριμένη περίπτωση, αυτό δεν είναι δυνατό λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα των συμπολυμερών και της δυσκολίας εύρεσης του κατάλληλου μείγματος διαλυτών, ώστε να εμφανίζονται ξεκάθαρα όλες οι κορυφές. Επίσης, αξίζει να τονιστεί ότι τα εμβαδά δεν συμπίπτουν επακριβώς με τα θεωρητικά αναμενόμενα, πράγμα που απαντάται στη βιβλιογραφία για συμπολυμερή που περιέχουν πολυϊστιδίνη. Το παραπάνω γεγονός πιθανά οφείλεται στην ισχυρή συσσωμάτωση των δομικών μονάδων της πολυϊστιδίνης. Ωστόσο, να σημειωθεί πως θα μπορούσε να γίνει λήψη φασμάτων σε διαφορετικούς διαλύτες ικανούς να διαλύσουν ξεχωριστά την κάθε συστάδα και έπειτα να γίνει χρήση εσωτερικού προτύπου.

Το τελικό πολυπεπτίδιο χαρακτηρίστηκε και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 36).

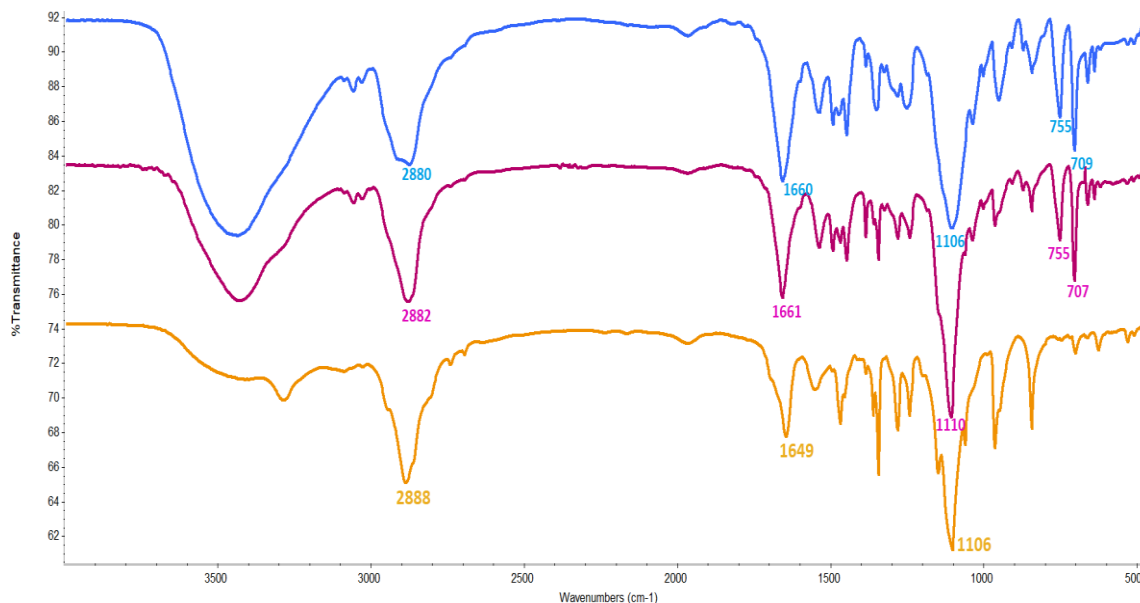


Εικόνα 36: Χρωματογράφημα GPC για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅.

Το χρωματογράφημα SEC του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ που συντέθηκε, παρατίθενται σε άμεση συσχέτιση με το αντίστοιχα του μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ που χρησιμοποιήθηκε. Παρατηρούμε ότι η κορυφή που αντιστοιχεί στο πολυμερές εμφανίζεται λίγο μετά την κορυφή που αντιστοιχεί στο μακροαπαρχητή. Το γεγονός αυτό, έρχεται σε αντίθεση με το γράφημα το οποίο αναμέναμε, στο οποίο η κορυφή του πολυμερούς θα έπρεπε να εμφανίζεται σε μικρότερο χρόνο έκλουσης, καθώς το μοριακό του βάρος είναι μεγαλύτερο (14,730) από αυτό του μακροαπαρχητή (10,000). Αυτό το φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός πως υπάρχει ισχυρή προσρόφηση στις στήλες, λόγω της ιστιδίνης, η οποία καθυστερεί την έκλουση. Από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων προέκυψε ότι το τελικό πολυμερές εκλύεται σε χρόνο 21.64 min και έχει κατανομή μοριακών βαρών $I=1.55$, η οποία δεν είναι πλήρως ικανοποιητική. Αυτό συμβαίνει πιθανόν λόγω των φαινομένων συσσωμάτωσης που παρουσιάζουν τα πολυπεπτίδια με ιστιδίνη. Αν και η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών δεν μπορεί να γίνει εμφανής μέσω της SEC, ωστόσο μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα ότι πραγματοποιήθηκε εξαιτίας των αποτελεσμάτων που συγκεντρώνουμε από την χρήση των υπόλοιπων τεχνικών μοριακού χαρακτηρισμού.

5.4.2 Χαρακτηρισμός του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-(PPhe)₁₀

Για το δεύτερο συμπολυμερές που συντέθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, έλαβε χώρα ο χαρακτηρισμός με τις μεθόδους της φασματοσκοπίας IR, ¹HNMR και της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC). Λόγω του ότι το εν λόγω συμπολυμερές διαφέρει με το προηγούμενο μόνο στις δομικές μονάδες της φαινυλαλανίνης που προστέθηκαν στην αλυσίδα (πέντε και δέκα αντίστοιχα) δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαφορές στα φάσματα που ελήφθησαν.

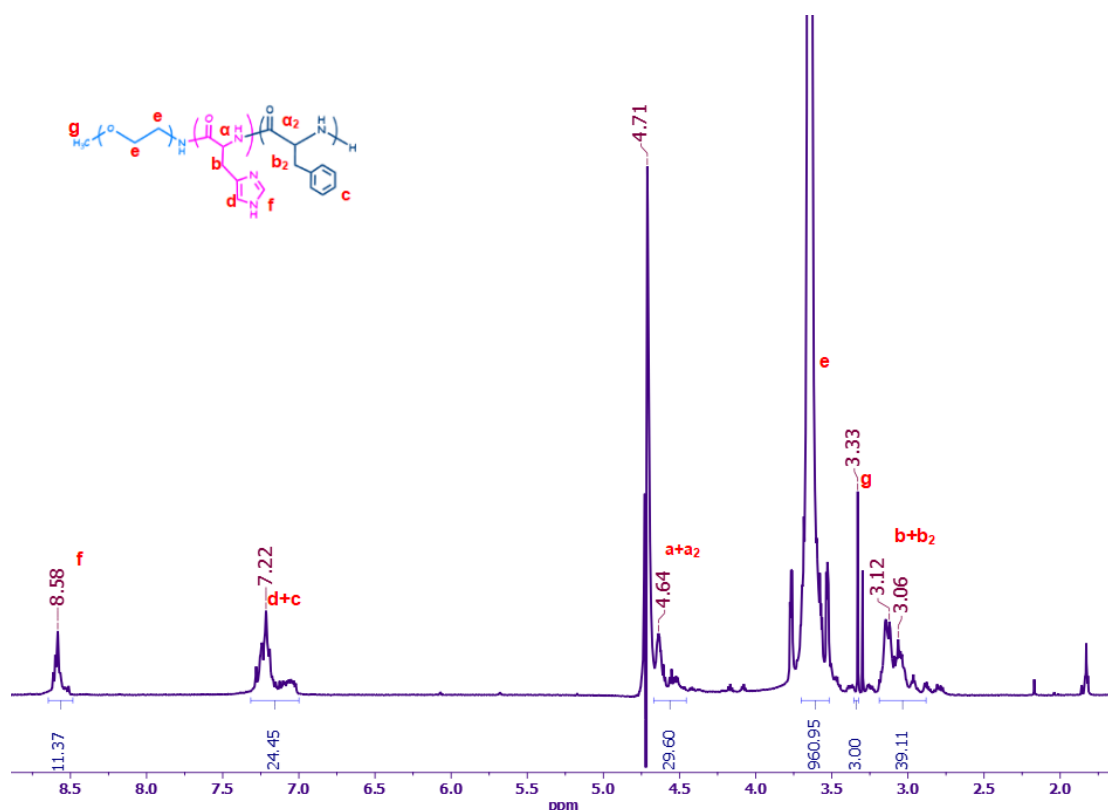


Εικόνα 37: Φάσματα FT-IR για το συμπολυμερές. Μετά την προσθήκη της συστάδας His(PEO-*b*-P_{trt}-His) (μπλε γράφημα), Μετά την προσθήκη της συστάδας Phe (PEO-*b*-trtHis-*b*-Phe) (μωβ γράφημα), Τελικό αποπροστατευμένο συμπολυμερές (κίτρινο γράφημα).

Από τη φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR ταυτοποιήθηκαν αρχικά οι χαρακτηριστικές αναμενόμενες δονήσεις για κάθε στάδιο της συνθετικής πορείας του συμπολυμερούς PEO-*b*-P_{His}-*b*-P_{Phe}₁₀. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 37, χαρακτηριστική είναι η παρουσία των δονήσεων για τον πεπτιδικό δεσμό στα 1660 cm⁻¹ που σε συνδυασμό με τη μείωση των χαρακτηριστικών δονήσεων του trt-His NCA στα 1851 cm⁻¹ και 1766 cm⁻¹ υποδηλώνεται ο πολυμερισμός της από το μακροαπαρχητή (PEO-NH₂). Επίσης εντοπίζονται και οι χαρακτηριστικές δονήσεις για το μακροαπαρχητή του αιθερικού δεσμού C–O–C του πολυ(αιθυλενοξειδίου) στα 2880 cm⁻¹ και στα 1106 cm⁻¹. Με την πλήρη κατανάλωση του trt-His NCA προστέθηκε στο διάλυμα ο L Phe NCA και μετά το τέλος του πολυμερισμού λήφθηκε δείγμα για τον έλεγχο της πορείας του (μωβ γράφημα). Εκτός τις αναμενόμενες δονήσεις για τον πεπτιδικό δεσμό στα 1661 cm⁻¹ και για το PEO-NH₂ στα 2882 cm⁻¹ και 1110 cm⁻¹ είναι εμφανής η ύπαρξη δονήσεων στα 755 cm⁻¹ και 707 cm⁻¹ που αντιστοιχούν στις δονήσεις των τρίτυλο-προστατευτικών ομάδων της ιστιδίνης. Τέλος, συγκρίνοντας τα δύο πρώτα φάσματα με αυτό του αποπροστατευμένου τελικού συμπολυμερούς (κίτρινο γράφημα) πέραν των αναμενόμενων δονήσεων για τον πεπτιδικό

δεσμό στα 1649 cm^{-1} και τον μακροαπαρχητή είναι εμφανής η απουσία των δονήσεων για τις τρίτυλο-προστατευτικές ομάδες σε σχέση με το πλήρως προστατευμένο (μπλε και μωβ γράφημα). Λόγω του μικρού μοριακού της βάρους, η συστάδα της φαινυλαλανίνης δεν εμφανίζει χαρακτηριστικές δονήσεις στα συγκεκριμένα φάσματα.

Ακολούθησε η μέτρηση δείγματος με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$. Διερευνήθηκαν διάφορες συνθήκες παρασκευής δείγματος όπως και στο συμπολυμερές PEO-PHis-PPhe₅ ώστε τελικά να γίνει δυνατός ο εντοπισμός όλων των αναμενόμενων κορυφών. Ωστόσο σε καμία περίπτωση η 100% ταυτοποίηση όλων των συστάδων του συμπολυμερούς δεν ήταν δυνατή. Αρχικά λήφθηκαν φάσματα για το $^1\text{H NMR}$ με διαλύτες: DMSO-d, DMSO και TFA-d 1%, D₂O και TFA 1%, 2% και 15% και τέλος D₂O και DCI 1% και 1,5%. Έπειτα από τις διάφορες μετρήσεις με αυτά τα συστήματα διαλυτών παρατηρήθηκε ότι το μείγμα D₂O/DCI 1% κατέληξε στα καλύτερα αποτελέσματα, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση συμπολυμερούς.

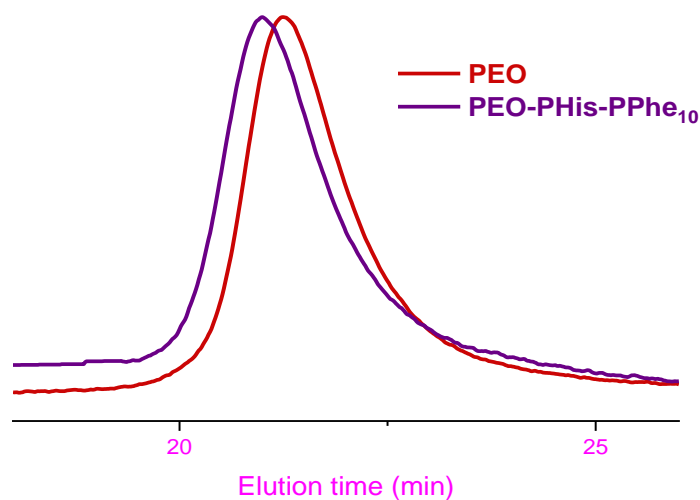


Εικόνα 38: Φάσμα $^1\text{H NMR}$ πλήρως αποπροστατευμένου συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ σε D₂O/DCI.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω φάσμα ανιχνεύθηκαν τα τέσσερα υδρογόνα της μονομερικής μονάδα του πολυαιθυλενοξειδίου (-O-CH₂-CH₂-) στα 3.66 ppm. Επίσης, ανιχνεύτηκαν όλες οι αναμενόμενες κορυφές για τη συστάδα της πολυϊστιδίνης όπως για παράδειγμα η κορυφή στα 4.64 ppm για το υδρογόνο **a** του C_a (Im-CH₂-CH-), η κορυφή στα 3.06-3.12 ppm για τα δύο υδρογόνα **b** του C_b (Im-CH₂-) και η κορυφή στα 8.58 ppm για το υδρογόνο **f** ιμιδαζολικού δακτυλίου (-NH-CH=N-). Ακόμη, στα 7.22-7.28 ppm εντοπίζεται το υδρογόνο **d** του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης (N-CH=C) η κορυφή του οποίου όμως συμπίπτει με τα αρωματικά υδρογόνα **c** του βενζολικού δακτυλίου της φαινυλαλανίνης. Τα πρωτόνια του C_β (**b**₂) και C_a (**a**₂) για την πολυφαινυλαλανίνη ήταν αδύνατο να ταυτοποιηθούν, λόγω του ότι οι αναμενόμενες τιμές τους συμπίπτουν με τα αντίστοιχα υδρογόνα (**a** και **b**) της πολυϊστιδίνης.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, όπως και στο φάσμα του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅, η ταυτοποίηση των κορυφών δεν είναι απολύτως δυνατή λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα των συμπολυμερών και της δυσκολίας εύρεσης του κατάλληλου μείγματος διαλυτών, ώστε να εμφανίζονται ξεκάθαρα όλες οι κορυφές. Επίσης, αξίζει να τονιστεί ότι τα εμβαδά δεν συμπίπτουν με τα θεωρητικά αναμενόμενα πράγμα που απαντάται στη βιβλιογραφία για συμπολυμερή που περιέχουν πολυϊστιδίνη. Το παραπάνω γεγονός πιθανόν να οφείλεται στην ισχυρή συσσωμάτωση των δομικών μονάδων της πολυϊστιδίνης. Η ολοκλήρωση των κορυφών και στα δύο φάσματα NMR των συμπολυμερών έγινε έχοντας ως σημείο αναφοράς τα τρία H (**g**) της τελικής ομάδας του πολυαιθυλενοξειδίου (-CH₃-O-).

Το τελικό πολυπεπτίδιο χαρακτηρίστηκε και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC), όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 39).

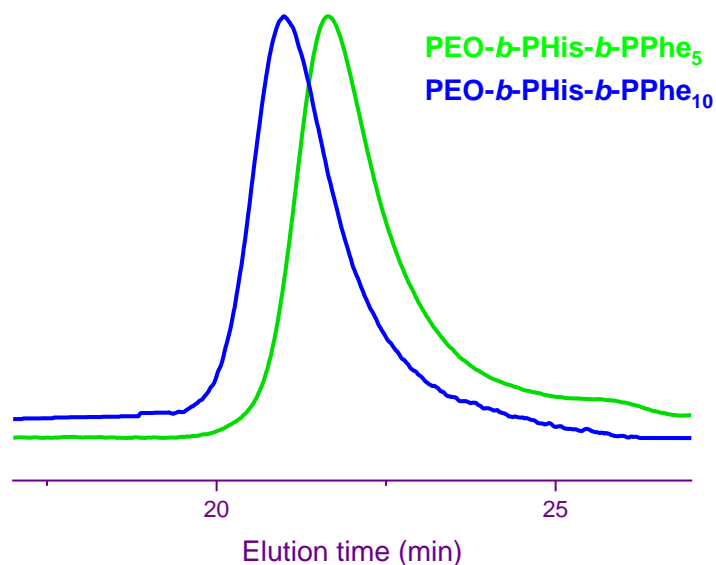


Εικόνα 39: Χρωματογράφημα GPC για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀.

Το χρωματογράφημα SEC του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ που συντέθηκε, παρατίθενται σε άμεση συσχέτιση με το αντίστοιχα του μακροαπαρχητή *m*-PEO-NH₂ που χρησιμοποιήθηκε. Παρατηρούμε ότι η κορυφή που αντιστοιχεί στο πολυμερές εμφανίζεται πριν την κορυφή που αντιστοιχεί στον μακροαπαρχητή. Αυτό σημαίνει ότι το συμπολυμερές εκλούεται σε μικρότερο χρόνο από τον μακροαπαρχητή (PEO-NH₂). Αυτό είναι το αναμενόμενο καθώς ο διαχωρισμός στις στήλες γίνεται με βάση τον υδροδυναμικό όγκο των πολυμερών, και κατά συνέπεια το πολυμερές με το μεγαλύτερο υδροδυναμικό όγκο εκλούεται σε μικρότερο χρόνο.

Από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων προέκυψε ότι το τελικό πολυμερές εκλούεται σε χρόνο 20.99 min και έχει κατανομή μοριακών βαρών $I=1.66$, η οποία δεν είναι πλήρως ικανοποιητική. Αυτό συμβαίνει πιθανόν λόγω των φαινομένων συσσωμάτωσης που παρουσιάζουν τα πολυπεπτίδια με ιστιδίνη.

Στην Εικόνα 40 παρατίθενται συγκριτικά τα δύο χρωματογράφημα GPC των δύο συμπολυμερών που συντέθηκαν.



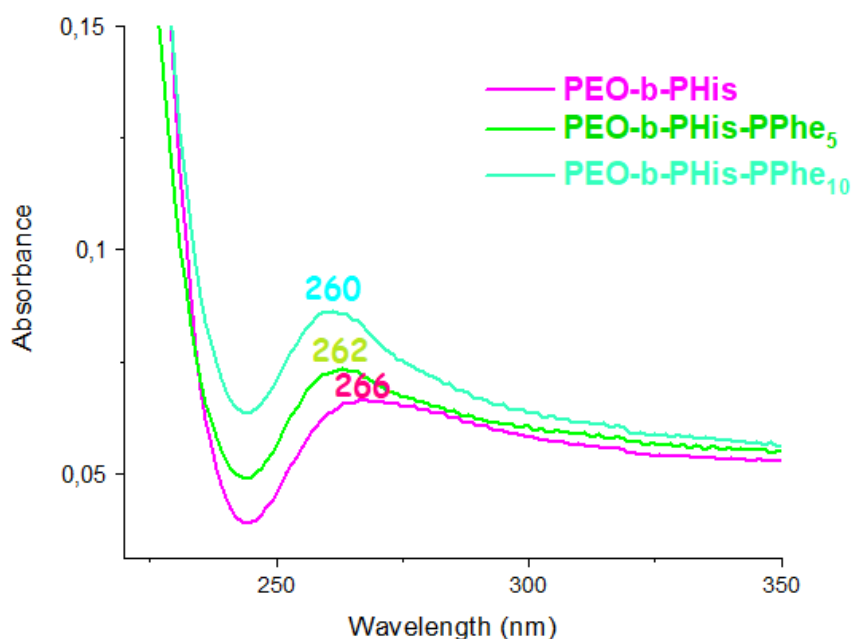
Εικόνα 40: Χρωματογράφημα GPC για τα συμπολυμερή PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ και PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀.

Από το παραπάνω χρωματογράφημα των δύο συμπολυμερών φαίνεται πως το συμπολυμερές που περιέχει δέκα μονομερικές μονάδες φαινυλαλανίνης εκλούεται σε μικρότερο χρόνο από το συμπολυμερές με τις πέντε μονομερικές μονάδες φαινυλαλανίνης. Αυτό είναι το αναμενόμενο καθώς ο διαχωρισμός στις στήλες γίνεται με βάση τον υδροδυναμικό όγκο των πολυμερών, και κατά συνέπεια το πολυμερές με το μεγαλύτερο υδροδυναμικό όγκο εκλούεται σε μικρότερο χρόνο. Συγκεκριμένα, ο χρόνος έκλουσης του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ είναι 21.64 min, ενώ του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ είναι 20.99, όπως έχει προαναφερθεί.

5.5 Μελέτη των δύο συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με φασματοφωτομετρία UV-Vis

Η μελέτη της απορρόφησης των συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με διαφορετικά μοριακά βάρη πολυφαινυλαλανίνης πραγματοποιήθηκε

μέσω μετρήσεων με φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους. Για τη λήψη του φάσματος χρησιμοποιήθηκε γυάλινη κυψελίδα πάχους 1 cm, η οποία περιείχε το τυφλό διάλυμα (σκέτο milliQ) και ονομάζεται κυψελίδα αναφοράς και μία γυάλινη κυψελίδα, η οποία πληρώθηκε με τα υδατικά διαλύματα των πολυμερών ίδιας συγκέντρωσης της τάξης των 10^{-4} g/ml.



Εικόνα 41: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis για το πολυμερές PEO-*b*-PHis και τα συμπολυμερή PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ και PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω φάσμα, η απορρόφηση των δειγμάτων δεν είναι μηδέν, πράγμα το οποίο είναι λογικό καθώς τα τελευταία παρουσιάζουν μία θολότητα, η οποία οφείλεται στο γεγονός πως τα συμπολυμερή δεν είναι απολύτως διαλυτά σε milliQ σε pH=7.4 και σχηματίζουν νανοσωματίδια, τα οποία αυξάνουν την απορρόφηση σε όλα τα μήκη κύματος. Το PEO-*b*-PHis παρουσιάζει μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης στα 266 nm, το PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ στα 262 nm και το PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ στα 260 nm. Το παραπάνω φάσμα απορρόφησης αποτελεί απόδειξη πως η φαινυλαλανίνη παρουσιάζει απορρόφηση, η οποία μάλιστα αυξάνεται όσο περισσότερες είναι οι δομικές της μονάδες στο μόριο του πολυμερούς. Όπως διαπιστώνεται η φαινυλαλανίνη απορροφά σε χαμηλότερα μήκη κύματος σε σχέση με την

ιστιδίνη και επηρεάζει το φάσμα όλου του μορίου. Δυστυχώς, τα ομοπολυμερή φαινυλαλανίνης που συντέθηκαν είναι αδιάλυτα στο νερό και έτσι η μέτρησή τους καθίσταται αδύνατη.

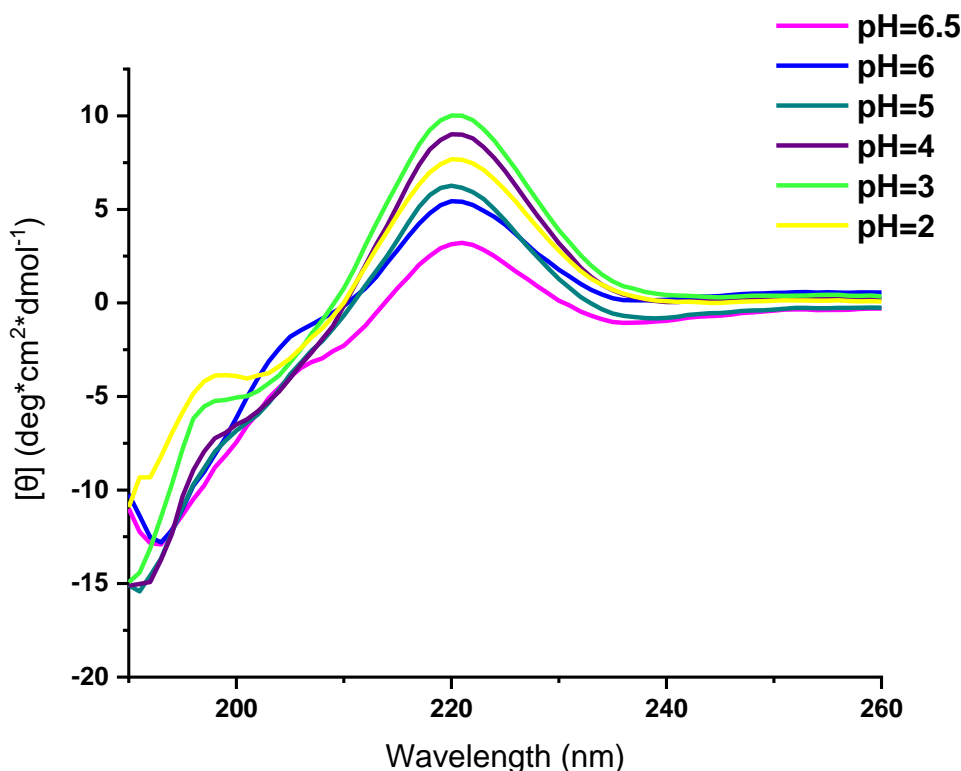
5.6 Μελέτη των δύο συμπολυμερών με την τεχνική του Κυκλικού Διχρωϊσμού (CD)

Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής των συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με διαφορετικό μοριακό βάρος της συστάδας της φαινυλαλανίνης πραγματοποιήθηκε μέσω μετρήσεων κυκλικού διχρωϊσμού σε διάφορες τιμές pH. Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής αυτών των συμπολυμερών παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς οι μεταβολές της δομής εξαρτώνται άμεσα από τις μεταβολές του pH, επομένως μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την ικανότητα απόκρισης των συντιθέμενων πολυμερών σε αλλαγές του pH. Η μεταβολή του pH, αλλάζει την αυτοοργάνωση των πολυμερών, καθιστώντας τα εν δυνάμει συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, με δυνατότητες εκλεκτικής αποδέσμευσης αυτών. Επιπλέον αξιοσημείωτη είναι η επίδραση των μονομερικών μονάδων της φαινυλαλανίνης στη δευτεροταγή δομή της ιστιδίνης. Συμπεράσματα για αυτό εξάχθηκαν από τη σύγκριση των μεταπτώσεων της δευτεροταγούς δομής των υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με το κατά συστάδες συμπολυμερές του τύπου PEO-*b*-PHis (10K-3K) στις ίδιες συνθήκες.

Για τη λήψη του φάσματος χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο JASCO J-815. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα διαστάσεων 0,1 cm, η οποία πληρώθηκε με τα υδατικά διαλύματα των πολυμερών συγκέντρωσης 10^{-4} g/ml. Η ρύθμιση του pH επετεύχθη ξεκινώντας από νερό Milli-Q και με επακόλουθη προσθήκη σταγόνων υδατικού διαλύματος HCl 0.01 N, έτσι ώστε να μειώνεται σταδιακά το pH και να λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα σε κάθε ενδιάμεση τιμή. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ψηφιακού πεχάμετρου. Ομοίως πραγματοποιήθηκε σταδιακή αύξηση του pH με προσθήκη σταγόνων υδατικού διαλύματος 0.01 N NaOH. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 25°C (θερμοκρασία περιβάλλοντος) έλαβε χώρα με τη χρήση ειδικής ψηφιακής συσκευής θερμοστάτησης. Επιπλέον, η παροχή του αζώτου ρυθμίστηκε στα 6

l/min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σάρωση του δείγματος στην περιοχή μηκών κύματος 260-190 nm και οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν από το όργανο τέσσερις φορές ώστε να μειωθεί ο θόρυβος.

Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ με μοριακό βάρος πολυφαινυλαλανίνης 735 g/mol από το pH σε σταθερή θερμοκρασία 25°C παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 42).

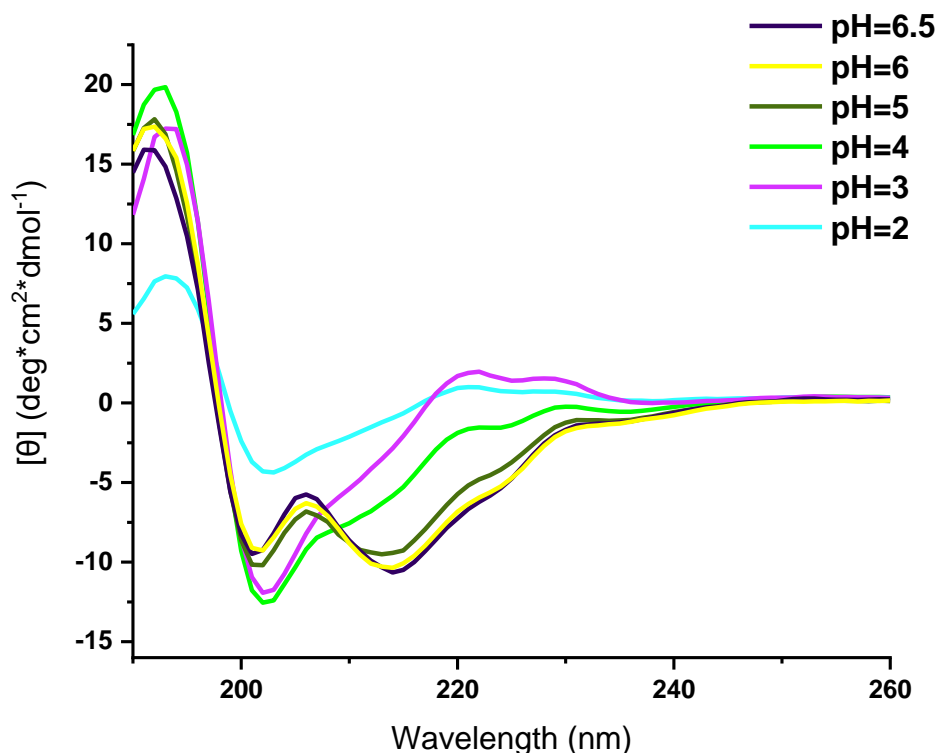


Εικόνα 42: Γράφημα CD του πολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ σε T=25°C.

Από το παραπάνω φάσμα προκύπτει ότι η δευτεροταγής δομή του πολυμερούς που κυριαρχεί είναι το τυχαίο σπείραμα σε pH μικρότερο του 6.5. Λόγω των λίγων μονομερικών μονάδων της φαινυλαλανίνης στο συμπολυμερές, η δομή δεν προλαβαίνει να οργανωθεί σε α έλικα, όπως αναμέναμε και έτσι κυριαρχεί η δομή της ιστιδίνης σε pH μικρότερα του 6.5 που είναι το τυχαίο σπείραμα. Ωστόσο από το φάσμα μπορούμε να διακρίνουμε πως υπάρχει απόκριση στις τιμές του pH καθώς η δομή του τυχαίου σπειράματος γίνεται πιο έντονη όσο αυτό μειώνεται με προσθήκη HCl (αύξηση της χαρακτηριστικής θετικής κορυφής στα 217 nm). Στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως υποθετικά με

αύξηση του pH πάνω από το 7.5 θα ήταν ορατή η δομή της β στροφής στο συμπολυμερές.

Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ με μοριακό βάρος πολυφαινυλαλανίνης 1470 g/mol από το pH σε σταθερή θερμοκρασία 25°C φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 43).

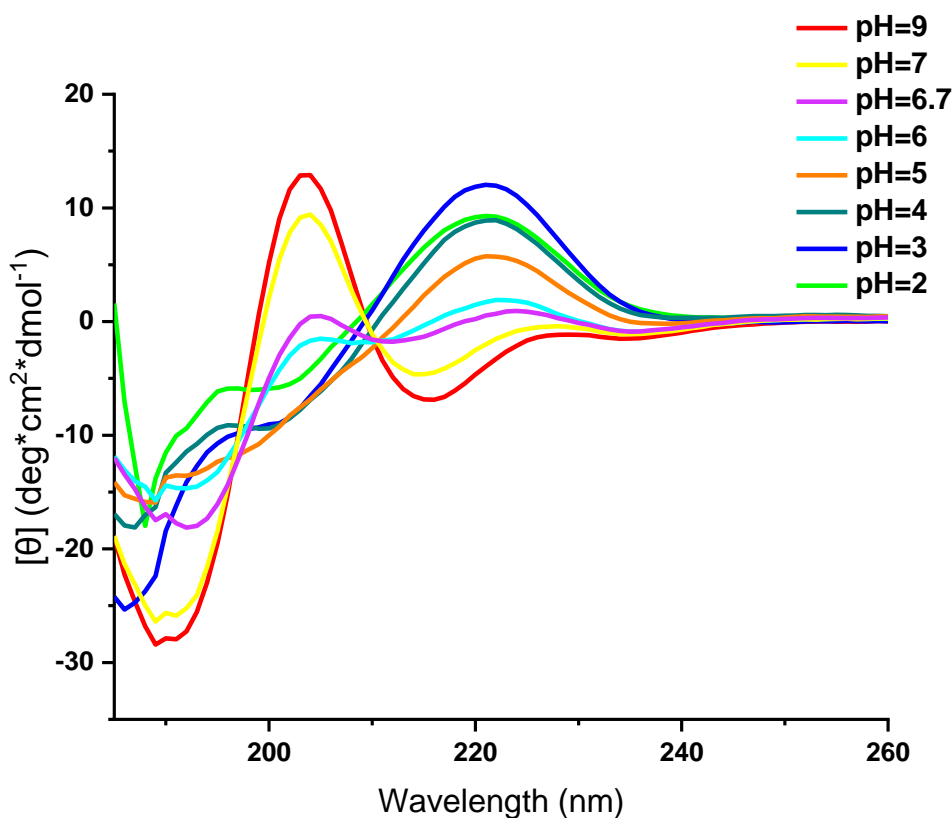


Εικόνα 43: Γράφημα CD του πολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ σε T=25°C.

Από το παραπάνω φάσμα προκύπτει ότι πραγματοποιείται μετάβαση της δευτεροταγούς δομής του πολυμερούς από α έλικα και β φύλλο σε τυχαίο σπείραμα. Πιο συγκεκριμένα, λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας φαινυλαλανίνης σε σχέση με το προηγούμενο συμπολυμερές, έχει σχηματιστεί η δομή της α έλικας, η οποία είναι πιο έντονη σε υψηλά pH (μεγαλύτερα από pH=5). Χαρακτηριστικές αυτής της δομής είναι οι αρνητικές κορυφές στα 225 nm και στα 215 nm. Ακόμη, λόγω της θετικής κορυφής στα 195 nm αλλά και της αρνητικής στα 217 nm διαπιστώνουμε ότι υπάρχει και ποσοστό β φύλλου. Όσο το pH μειώνεται γίνεται έντονη και η παρουσία του τυχαίου σπειράματος (εξαφάνιση των προαναφερόμενων αρνητικών κορυφών, μετατόπιση της

θετικής κορυφής της α έλικας στα 191 nm, εμφάνιση της θετικής κορυφής στα 220 nm) το οποίο οφείλεται στην ισιδίνη, χωρίς να εξαφανίζεται εντελώς η δομή της α έλικας και του β φύλλου σε κανένα από τα pH που μετρήθηκαν.

Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis από το pH σε σταθερή θερμοκρασία 25°C παρουσιάζεται στην Εικόνα 44. Οι μετρήσεις του κυκλικού διχρωϊσμού για το εν λόγω συμπολυμερές έγιναν στις ίδιες συνθήκες με τα δύο προηγούμενα για να μπορεί να επιτευχθεί η σύγκριση.



Εικόνα 44: Γράφημα CD του πολυμερούς PEO-*b*-PHis σε T=25°C.

Από την Εικόνα 44 φαίνεται πως η μεταβολή της δευτεροταγούς δομής που παρατηρείται για το PEO-*b*-PHis από το pH σε σταθερή θερμοκρασία 25°C, σε σχέση με την μεταβολή της δευτεροταγούς δομής των πολυμερών που εξετάστηκαν παραπάνω, παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Αυτό οφείλεται στην επίδραση των υδρόφοβων μονομερικών μονάδων της φαινυλαλανίνης στη δευτεροταγή δομή της υδρόφοβης ισιδίνης. Όπως παρατηρείται η χαρακτηριστική θετική κορυφή στα 220-230 nm του τυχαίου σπειράματος

εξαφανίζεται εντελώς σε pH μεγαλύτερο από 6.7, και η πολυπεπτιδική αλυσίδα υιοθετεί διαμόρφωση β-στροφής (χαρακτηριστική η θετική κορυφή στα 210 nm και η αρνητική στα 190 nm) και σε πολύ μικρότερο ποσοστό β-φύλλο.

Σε χαμηλά pH, σε τιμές κάτω από 5, παρατηρείται αύξηση της θετικής κορυφής στα 220 nm και μια αρνητική κορυφή στα 200 nm όπου σηματοδοτεί πιο ξεκάθαρα την ύπαρξη ποσοστού τυχαίου σπειράματος στη διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. 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.

5.7 Μελέτη αυτοοργάνωσης των δύο συμπολυμερών με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός χρησιμοποιείται προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα αυτοοργάνωσης και το μέγεθος των συντιθέμενων συμπολυμερών. Έτσι, πραγματοποιούνται μετρήσεις για τα δύο πολυμερή του τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με διαφορετικό μοριακό βάρος της συστάδας της φαινυλαλανίνης. Οι μετρήσεις λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά pH και θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται σε pH= 7.4 (pH του αίματος), σε pH= 6.5 (pH εξωτερικά ενός καρκινικού κυττάρου) και pH= 5 (pH καρκινικού κυττάρου). Σε κάθε pH γίνονται μετρήσεις σε δύο θερμοκρασίες: 25 °C που είναι η θερμοκρασία δωματίου και στους 40 °C που είναι κατά προσέγγιση η θερμοκρασία της φλεγμονής που κάνουν τα καρκινικά κύτταρα. Σε κάθε pH και θερμοκρασία μετριέται η διάμετρος των σωματιδίων σε τρεις γωνίες 15°, 90°, 173° για να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το πως σκεδάζουν τα μικρά σωματίδια και πως τα μεγάλα, καθώς και αν υπάρχει γωνιακή εξάρτηση.

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις με την τεχνική αυτή, αρχικά παρασκευάζονται διαλύματα των πολυμερών με DMSO. Συγκεκριμένα διαλύονται 30 mg πολυμερούς σε 9 ml DMSO και αφήνονται μία μέρα υπό ανάδευση με το DMSO, το οποίο χρησιμοποιείται προκειμένου να «σπάσει» τη

συσσωμάτωση των πολυμερών. Την επόμενη μέρα, το κάθε διάλυμα πολυμερούς χωρίζεται σε τρία μέρη και προστίθενται σε αυτά 2 ml από το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο θα ρυθμίσει το επιθυμητό κάθε φορά pH. Για το pH 7.4 χρησιμοποιήθηκε tris buffer 10 mM και NaCl 150 mM, για το pH 6.5 χρησιμοποιήθηκε PBS buffer 10 mM και NaCl 150 mM ενώ για το pH 5.0 χρησιμοποιήθηκε Acetate buffer 10 mM και NaCl 150 mM. Τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη διαπύδησης και πραγματοποιήθηκε διαδικασία “dialysis” με ρύθμιση του pH στην επιθυμητή τιμή. Μετά από τρεις αλλαγές ρυθμιστικών διαλυμάτων ανά τρεις ώρες αφέθηκαν overnight και η διαδικασία της μέτρησης με δυναμική σκέδαση φωτός έλαβε χώρα την επόμενη μέρα κατόπιν φιλτραρίσματος του δείγματος με υδρόφιλο φίλτρο, ώστε να ελαχιστοποιηθεί το ποσοστό της σκόνης. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως η παραπάνω διαδικασία και οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης πραγματοποιήθηκαν και για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis (10K-3K), που είχε συντεθεί από προηγούμενη συνάδελφο στο εργαστήριο, προκειμένου να γίνει σύγκριση και να ληφθούν συμπεράσματα για την επίδραση της φαινυλαλανίνης στο συμπολυμερές.

5.7.1 Μελέτη αυτοοργάνωσης του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅

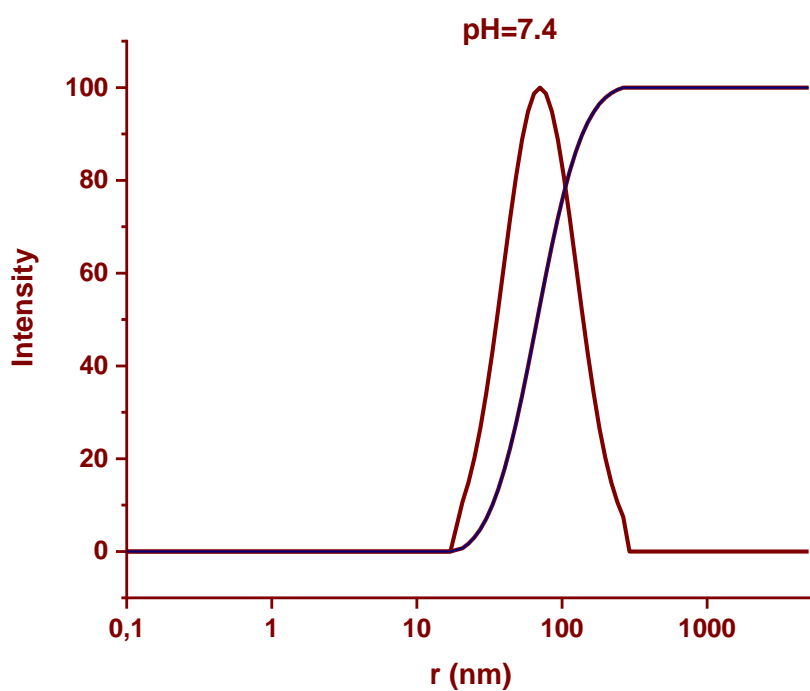
Στους παρακάτω συγκεντρωτικούς πίνακες απεικονίζονται οι μετρήσεις της υδροδυναμικής ακτίνας για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ σε pH= 7.4, 6.5, 5.0, στις δύο θερμοκρασίες T=25 °C και T=40 °C, καθώς και σε τρεις διαφορετικές γωνίες 90°, 15° και 173°. Έπειτα παρατίθενται αναλυτικά τα διαγράμματα των μετρήσεων στις 90° και στους 25 °C καθώς, όπως φαίνεται από τους πίνακες δεν παρουσιάζεται αποκρισιμότητα από τη θερμοκρασία και έτσι κρίθηκε πως είναι οι πιο αντιπροσωπευτικές.

Πίνακας 5: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 25°C.

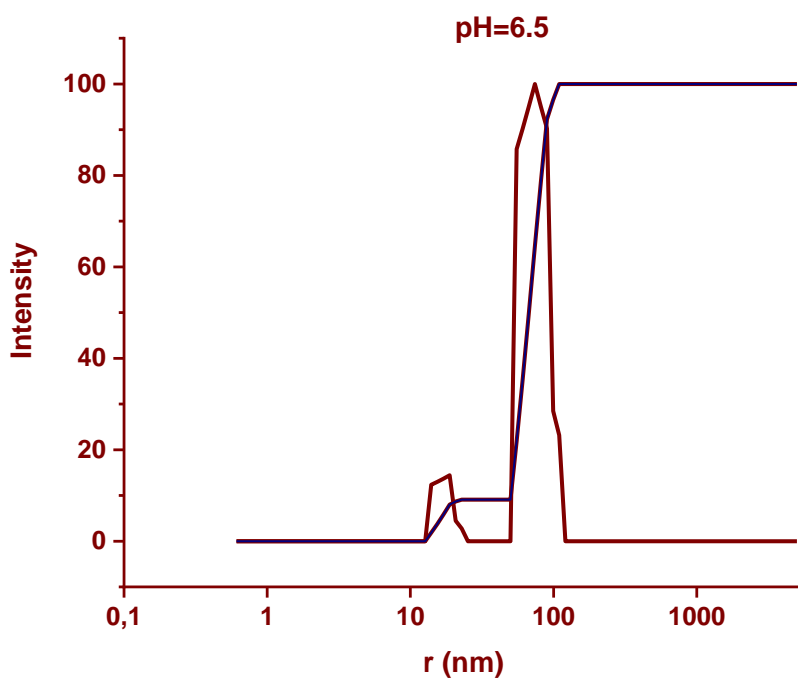
25°C								
pH	Angle	Eff. Rad. (nm)	Polydispersity	Count Rate (kcps)	PEAK 1	%PEAK 1	PEAK 2	%PEAK 2
7.4	90°	63.49	0.239	492.6	63.49	100	-	-
	15°	226.34	0.200	469.0	226.34	100	-	-
	173°	49.43	0.241	452.8	49.43	100	-	-
6,5	90°	62.61	0.203	452.3	73.99	91	17.02	9
	15°	200.84	0.446	754.8	291.69	92	27.77	8
	173°	55.09	0.183	481.9	55.09	100	-	-
5	90°	65.42	0.178	314.8	65.42	100	-	-
	15°	152.21	0.320	748.1	197.11	92	25.18	8
	173°	56.14	0.176	530.3	56.14	100	-	-

Πίνακας 6: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 40°C.

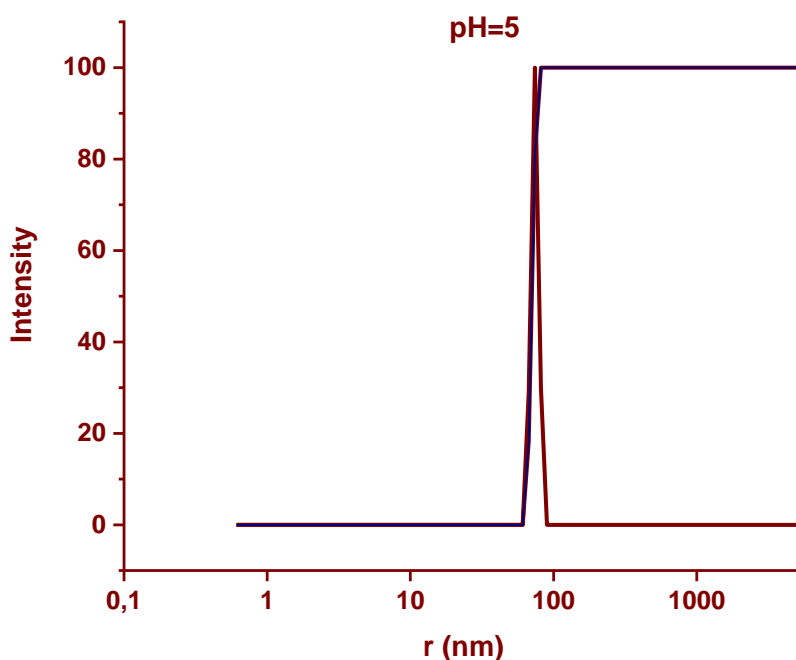
40°C								
pH	Angle	Eff. Rad. (nm)	Polydispersity	Count Rate (kcps)	PEAK 1	%PEAK 1	PEAK 2	%PEAK 2
7.4	90°	60.31	0.214	457.8	60.31	100	-	-
	15°	145.01	0.141	421.3	145.01	100	-	-
	173°	48.97	0.219	505.7	48.97	100	-	-
6,5	90°	61.27	0.204	434.0	90.01	78	27.77	22
	15°	160.25	0.108	625.3	160.25	100	-	-
	173°	57.02	0.195	657.5	57.02	100	-	-
5	90°	65.63	0.215	299.1	65.63	100	-	-
	15°	147.94	0.121	676.6	147.94	100	-	-
	173°	54.29	0.188	503.9	54.29	100	-	-



Εικόνα 45: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ σε pH=7.4 και θερμοκρασία 25°C.

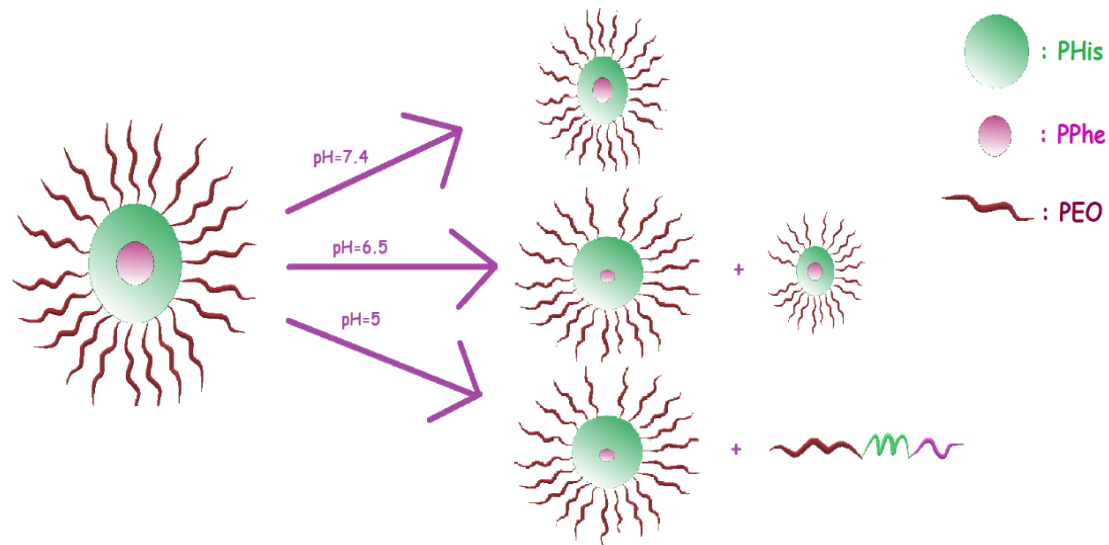


Εικόνα 46: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ σε pH=6.5 και θερμοκρασία 25°C.



Εικόνα 47: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis-*b*-PPh₅ σε pH=5 και θερμοκρασία 25°C.

Όπως φαίνεται από τους παραπάνω πίνακες με μείωση του pH (από 7.4 σε 6.5) παρατηρείται η δημιουργία δύο κορυφών εκ των οποίων η μια έχει μεγαλύτερη ακτίνα σε σχέση με την ακτίνα στο pH=7.4 και η δεύτερη έχει πολύ μικρότερη ακτίνα, αλλά και ποσοστό, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από το ότι ορισμένα μικκύλια αποσυσσωματώθηκαν με την μείωση του pH. Αντίθετα η αύξηση της ακτίνας στο μεγαλύτερο ποσοστό συμβαίνει, γιατί φορτίζονται οι αλυσίδες του μορίου με αποτέλεσμα τα συσσωματώματα να φουσκώνουν, επειδή θέλουν να είναι πιο υδατοδιαλυτά. Με περαιτέρω μείωση του pH στην τιμή 5 παρατηρείται αισθητή μείωση του αριθμού count rate, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει το σπάσιμο των αλυσίδων του μορίου και η τιμή της ακτίνας να μην ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Να αναφερθεί στο σημείο αυτό πως παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και σε θερμοκρασία 40 °C χωρίς ωστόσο να εμφανίζεται αποκρισιμότητα στη θερμοκρασία (ελάχιστη διαφορά μεγέθους στις δύο θερμοκρασίες), ωστόσο όπως φαίνεται υπάρχει ξεκάθαρη γωνιακή εξάρτηση.



Εικόνα 48: Σχηματική αναπαράσταση του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ σε pH=7.4, pH=6.5 και pH=5.

5.7.2 Μελέτη αυτοοργάνωσης του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀

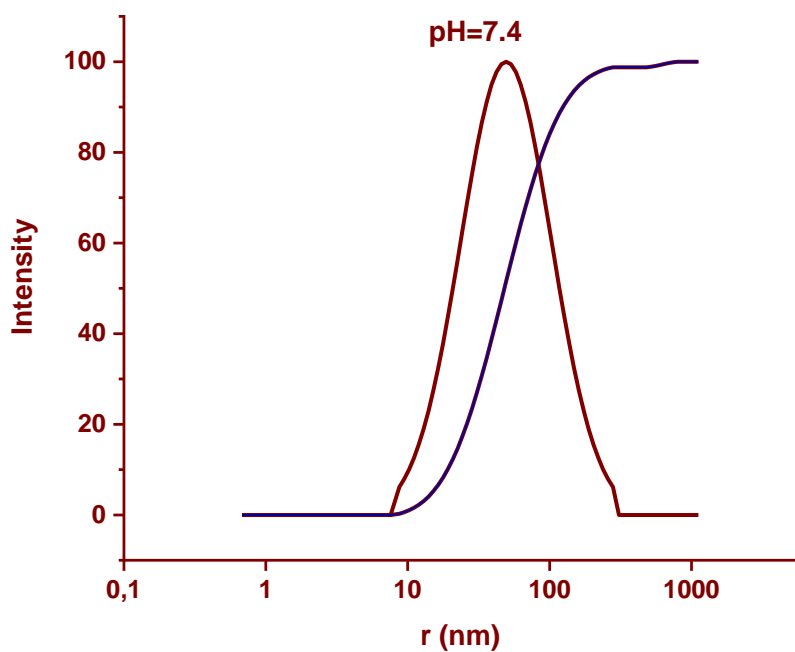
Στους παρακάτω συγκεντρωτικούς πίνακες απεικονίζονται οι μετρήσεις της υδροδυναμικής ακτίνας για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ σε pH= 7.4, 6.5, 5.0, στις δύο θερμοκρασίες T=25 °C και T=40 °C, καθώς και σε τρεις διαφορετικές γωνίες 90°, 15° και 173°. Έπειτα παρατίθενται αναλυτικά τα διαγράμματα των μετρήσεων στις 90° και στους 25 °C καθώς όπως φαίνεται από τους πίνακες δεν παρουσιάζεται αποκρισιμότητα από τη θερμοκρασία και έτσι κρίθηκε πως είναι οι πιο αντιπροσωπευτικές, όπως συνέβη και για το προηγούμενο συμπολυμερές που μελετήθηκε.

Πίνακας 7: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 25°C.

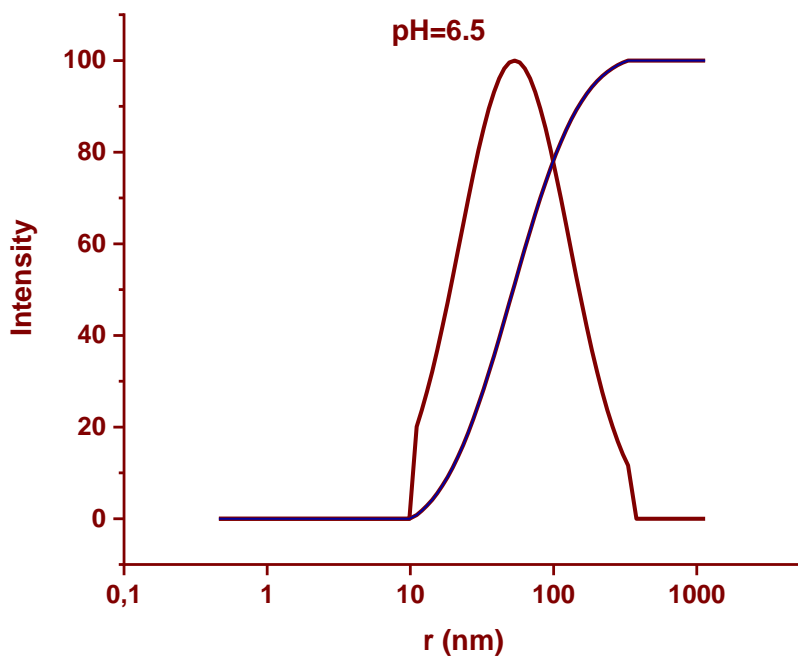
25°C								
pH	Angle	Eff. Rad. (nm)	Polydispersity	Count Rate (kcps)	PEAK 1	%PEAK 1	PEAK 2	%PEAK 2
7.4	90°	46.63	0.219	488.8	46.63	100	-	-
	15°	191.73	0.141	424.2	191.73	100	-	-
	173°	37.94	0.239	428.5	37.94	100	-	-
6,5	90°	47.63	0.272	475.0	47.63	100	-	-
	15°	116.48	0.313	629.0	60.63	52	492.79	48
	173°	33.75	0.210	442.1	33.75	100	-	-
5	90°	37.67	0.269	466.9	114.02	45	24.46	55
	15°	89.38	0.329	602.6	124.08	90	17.35	10
	173°	32.89	0.208	469.9	56.14	100	-	-

Πίνακας 8: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 40°C.

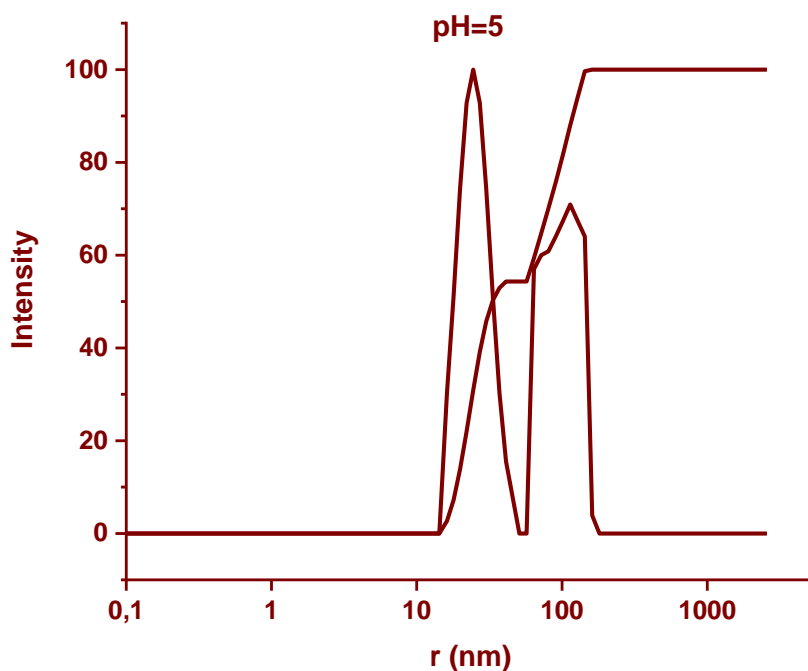
40°C								
pH	Angle	Eff. Rad. (nm)	Polydispersity	Count Rate (kcps)	PEAK 1	%PEAK 1	PEAK 2	%PEAK 2
7.4	90°	46.71	0.263	531.8	46.71	100	-	-
	15°	196.12	0.272	573.8	196.12	100	-	-
	173°	37.95	0.231	491.5	37.95	100	-	-
6,5	90°	48.27	0.228	454.0	79.87	32	26.5	68
	15°	96.21	0.326	422.8	487.9	23	68.75	77
	173°	33.14	0.214	437.7	33.14	100	-	-
5	90°	37.09	0.269	462.2	82.50	52	20.05	48
	15°	95.13	0.391	553.2	192.61	72	29.3	28
	173°	32.62	0.204	494.1	32.62	100	-	-



Εικόνα 49: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ σε pH=7.4 και θερμοκρασία 25°C.



Εικόνα 50: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ σε pH=6.5 και θερμοκρασία 25°C.



Εικόνα 51: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ σε pH=5 και θερμοκρασία 25°C.

Όπως φαίνεται από τους παραπάνω πίνακες η μείωση του pH (από 7.4 σε 6.5) δεν επιφέρει κάποια αλλαγή στην ακτίνα του συμπολυμερούς. Με περαιτέρω μείωση του pH στην τιμή 5 παρατηρούνται δύο κορυφές εκ των οποίων η μία δείχνει να υπάρχουν σωματίδια με μεγάλη ακτίνα που σημαίνει πως τα συσσωματώματα φούσκωσαν γιατί φορτίστηκαν οι αλυσίδες του μορίου και παράλληλα σε παρόμοιο ποσοστό φαίνεται να έχουν αποσυσσωματωθεί τα μικκύλια του συμπολυμερούς λόγω τις μικρής ακτίνας που μας δείχνει η δεύτερη κορυφή. Σε αυτή την περίπτωση τα count rate μένουν σχεδόν σταθερά. Να αναφερθεί στο σημείο αυτό πως παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και σε θερμοκρασία 40 °C χωρίς ωστόσο να εμφανίζεται αποκρισιμότητα στη θερμοκρασία (ελάχιστη διαφορά μεγέθους στις δύο θερμοκρασίες), ωστόσο όπως φαίνεται υπάρχει γωνιακή εξάρτηση, η οποία βέβαια μπορεί να οφείλεται και στην πολυδιασπορά των μικκυλίων. Συγκριτικά με το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ που μελετήθηκε παραπάνω αξίζει να σημειωθεί πως το PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀, δηλαδή το συμπολυμερές με τις περισσότερες δομικές μονάδες φαινυλαλανίνης παρουσιάζει μικρότερες ακτίνες σε όλες τις τιμές του

pH και στις δύο θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Η σύγκριση αυτή είναι εφικτή, λόγω του ότι οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης έγιναν στις ίδιες συνθήκες και με ίδιες συγκεντρώσεις συμπολυμερών.

5.7.3 Μελέτη αυτοοργάνωσης του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis

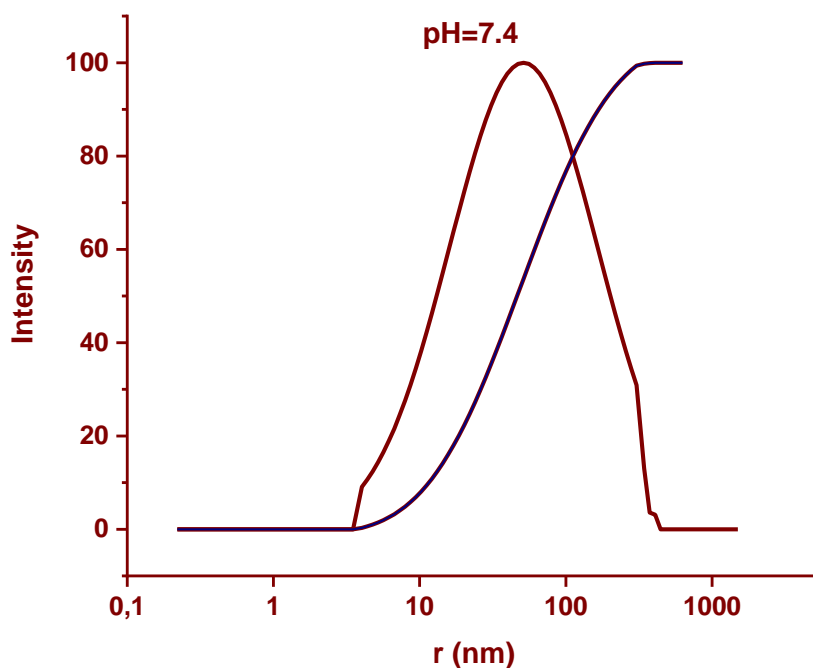
Προκειμένου να γίνει αντιληπτή η επίδραση της συστάδας της φαινυλαλανίνης στο συμπολυμερές PEO-*b*-PHis (10K-4K) με ίδιο μοριακό βάρος των δύο αυτών συστάδων με τα συμπολυμερή που μελετήθηκαν παραπάνω πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω μετρήσεις δυναμικής σκέδασης. Στους συγκεντρωτικούς πίνακες απεικονίζονται οι μετρήσεις της υδροδυναμικής ακτίνας για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis σε pH= 7.4, 6.5, 5.0, στις δύο θερμοκρασίες T=25 °C και T=40 °C, καθώς και σε τρεις διαφορετικές γωνίες 90°, 15° και 173°. Έπειτα παρατίθενται αναλυτικά τα διαγράμματα των μετρήσεων στις 90° και στους 25 °C.

Πίνακας 9: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 25°C.

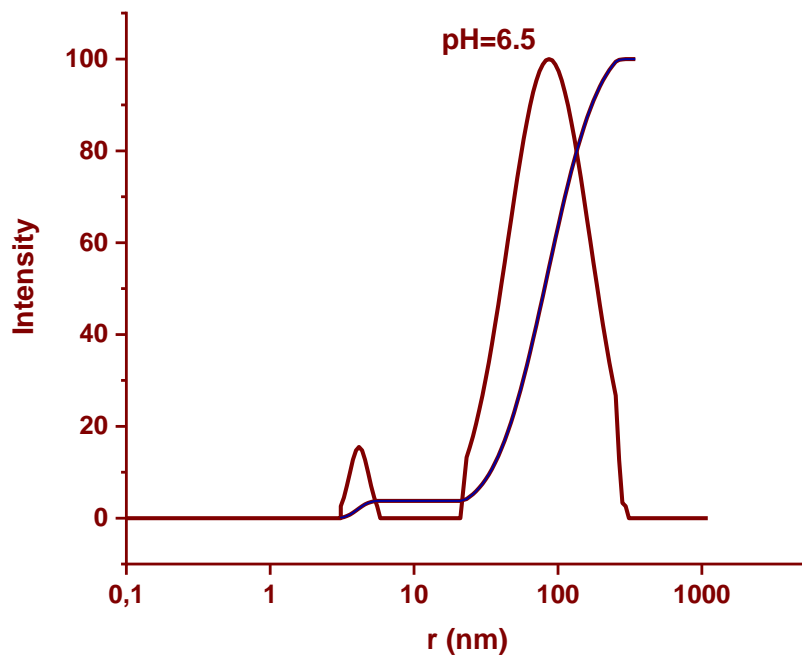
25°C								
pH	Angle	Eff. Rad. (nm)	Polydispersity	Count Rate (kcps)	PEAK 1	%PEAK 1	PEAK 2	%PEAK 2
7.4	90°	42.13	0.328	232.5	42.13	100	-	-
	15°	217.72	0.212	809	217.72	100	-	-
	173°	29.16	0.262	311.9	29.16	100	-	-
6,5	90°	70.13	0.297	211.4	86.71	96	4.14	4
	15°	560.93	0.306	592.2	698.45	95	37.61	5
	173°	52.31	0.268	468.3	52.21	100	-	-
5	90°	120.15	0.739	0.6	120.15	100	-	-
	15°	290.42	0.168	3.9	290.42	100	-	-
	173°	60.96	0.552	1.7	60.96	100	-	-

Πίνακας 10: Πίνακας μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis σε διαφορετικά pH και θερμοκρασία 40°C.

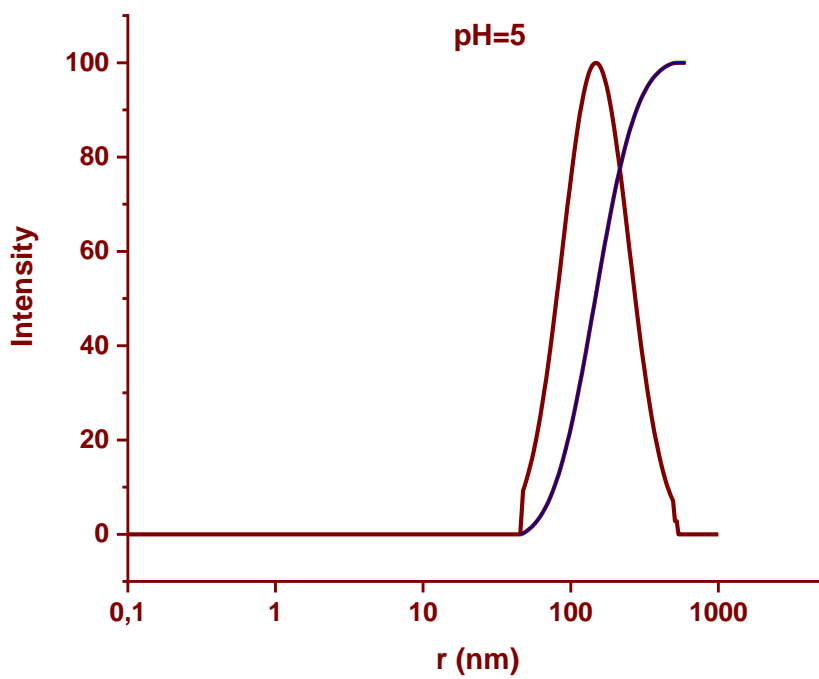
40°C								
pH	Angle	Eff. Rad. (nm)	Polydispersity	Count Rate (kcps)	PEAK 1	%PEAK 1	PEAK 2	%PEAK 2
7.4	90°	52.03	0.209	219.6	52.03	100	-	-
	15°	194.26	0.164	745.8	194.26	100	-	-
	173°	30.74	0.292	462.8	30.74	100	-	-
6,5	90°	72.20	0.299	7.7	89.44	96	4.23	4
	15°	165.65	0.575	2.9	165.65	100	-	-
	173°	67.37	0.144	55.1	50.44	81	902.4	19
5	90°	148.28	0.954	0.6	148.28	100	-	-
	15°	286.47	0.241	3.8	286.47	100	-	-
	173°	60.96	0.552	1.7	60.96	100	-	-



Εικόνα 52: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis σε pH=7.4 και θερμοκρασία 25°C.



Εικόνα 53: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis σε pH=6.5 και θερμοκρασία 25°C.



Εικόνα 54: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis σε pH=5 και θερμοκρασία 25°C.

Όπως φαίνεται από τους παραπάνω πίνακες, στους 25°C με μείωση του pH από 7.4 σε 6.5 παρατηρείται αισθητή αύξηση της ακτίνας και αυτό συμβαίνει, γιατί φορτίζονται οι αλυσίδες της πολυϊστιδίνης με αποτέλεσμα τα συσσωματώματα να φουσκώνουν καθώς οι αλυσίδες απωθούνται και θέλουν να είναι πιο υδατοδιαλυτές. Με περαιτέρω μείωση του pH=5 παρατηρούμε ότι ο αριθμός count rate μειώνεται σε μεγάλο βαθμό απότομα γεγονός που πιθανόν σημαίνει πως τα μικκύλια αποσυσσωματώνονται. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στους 40°C όπου με μείωση του pH υπάρχει αύξηση της ακτίνας. Ωστόσο σε pH=6.5 και pH=5 πάλι ο αριθμός count rate μειώνεται αισθητά πολύ. Και στο συγκεκριμένο πολυμερές δεν φαίνεται να υπάρχει αποκρισιμότητα στη θερμοκρασία. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως σε σύγκριση με τα δύο συμπολυμερή που περιέχουν φαινυλαλανίνη, οι αλλαγές της ακτίνας με το pH στο εν λόγω πολυμερές είναι μεγαλύτερες. Ωστόσο, λόγω του μικρού αριθμού count rate σε μικρότερα pH δε μπορούν να ληφθούν ασφαλή συμπεράσματα.

5.8 Νανოსωματίδια Χρυσού

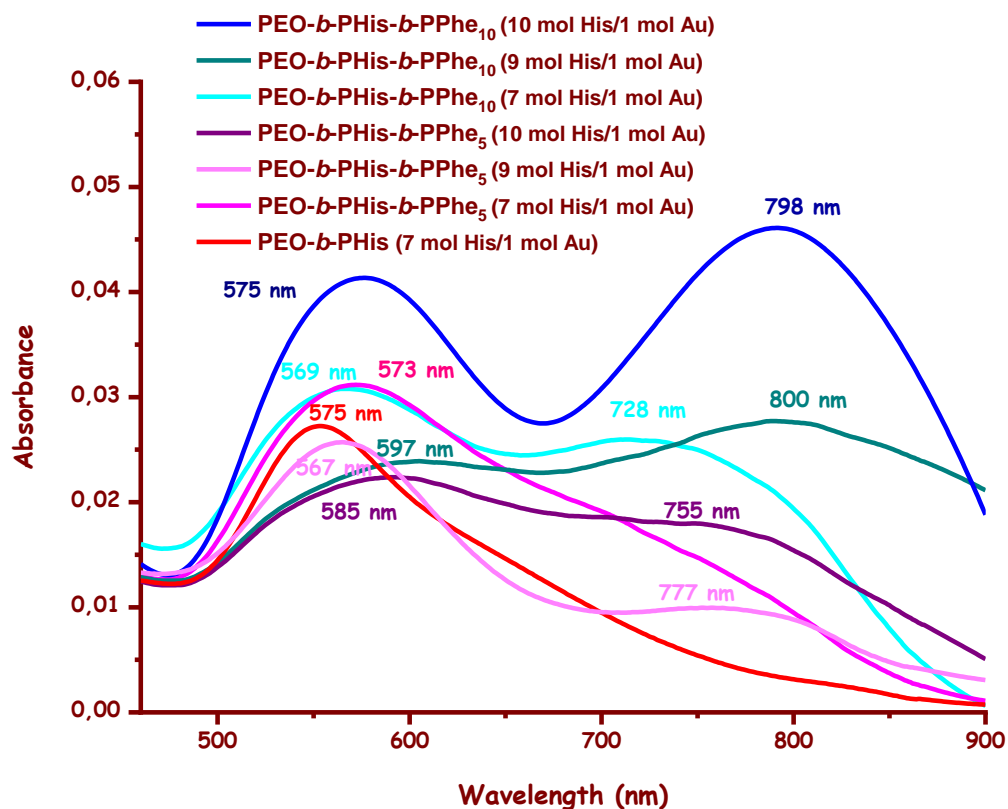
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο χρυσός συμπλέκεται με το άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου που βρίσκεται στην πλευρική ομάδα της ιστιδίνης και ανάγεται. Όταν η απορρόφηση του νανოსωματιδίου είναι πάνω από 800 nm, ακτινοβολώντας το σύστημα αυτό θερμαίνεται και έτσι είναι δυνατή η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, ενώ σε αυτό το μήκος κύματος και πάνω δεν επηρεάζονται ούτε τα υγιή κύτταρα. Όταν οι απορροφήσεις των νανოსωματιδίων είναι κάτω από 800 nm μπορούν τα καρκινικά κύτταρα να ανιχνευθούν, αλλά όχι να καταστραφούν.^{82,83}

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, όπως προαναφέρθηκε, έγινε προσπάθεια σύνθεσης νανοςωματιδίων χρυσού χρησιμοποιώντας τα δύο συμπολυμερή που συντέθηκαν. Την πρώτη απόδειξη επιτυχούς σύνθεσης αποτέλεσε η αλλαγή χρώματος μετά τη θέρμανση στους 80°C στα διαλύματα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 55.



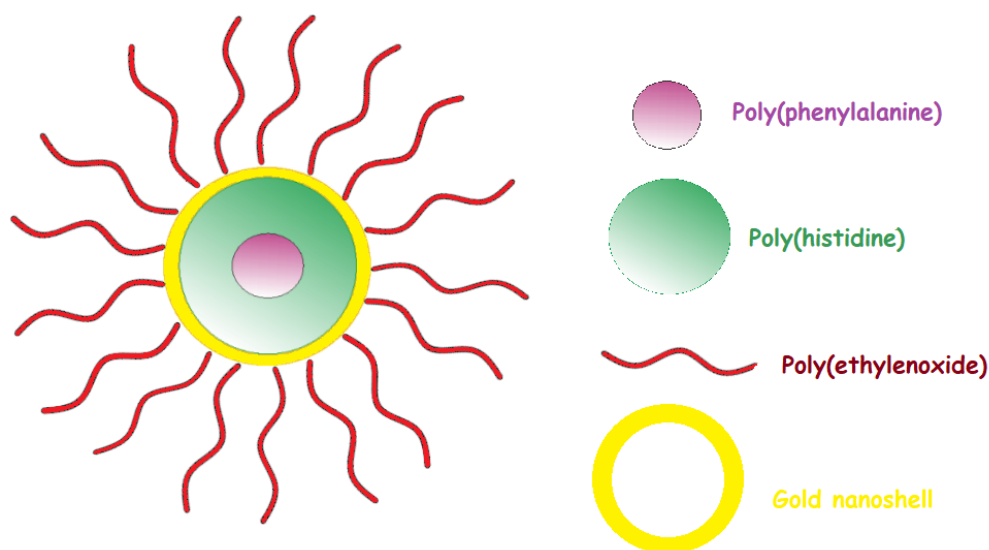
Εικόνα 55: Μεταβολή των οπτικών ιδιοτήτων των διαλυμάτων των νανοσωματιδίων χρυσού σε διάφορες αναλογίες mol His/mol Au.

Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν, μετά την εμφάνιση του χαρακτηριστικού χρώματος που φαίνεται παραπάνω, χαρακτηρίστηκαν με τη βοήθεια φασματοφωτομετρίας UV-Vis.



Εικόνα 56: Συγκενρωτικό φάσμα UV-Vis των διαλυμάτων των νανοσωματιδίων χρυσού σε διάφορες αναλογίες mol His/mol Au.

Από τα παραπάνω φάσματα παρατηρήθηκε η μετατόπιση του μήκους κύματος με αλλαγή του χρώματος, η οποία, όπως φαίνεται εξαρτάται από την αναλογία της ιστοιδίνης με το χρυσό στα διαλύματα. Πιο συγκεκριμένα, όσο λεπτότερο είναι το στρώμα του χρυσού που σχηματίζεται γύρω από το συμπολυμερές (αναλογία 9 mol His/1 mol Au και 10 mol His/1 mol Au) τόσο μεγαλύτερο είναι το μήκος κύματος που απορροφά (800 nm και 798 nm αντίστοιχα). Τα μπλε διαλύματα που δημιουργήθηκαν απορροφούν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, ενώ τα μωβ σε μικρότερα. Στο παραπάνω φάσμα φαίνεται και η απορρόφηση του νανοσωματιδίου με PEO-*b*-PHis, όπου δεν υπάρχει κορυφή σε μεγαλύτερο μήκος κύματος από αυτό στα 575 nm (κόκκινη γραμμή).



Εικόνα 57: Σχηματική αναπαράσταση του νανοσωματιδίου χρυσού του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe συντιθέμενου από την αναγωγή του AuHCl₄ από την πολυ(ιστιδίνη) στους 80°C.

Στη συνέχεια, ακολούθησε χαρακτηρισμός των συντιθέμενων νανοσωματιδίων με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός ώστε να γίνει μελέτη της δομής τους και του τρόπου αυτοοργάνωσής τους σε σύγκριση με τα συμπολυμερή που δεν περιέχουν χρυσό.

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τα νανοσωματίδια που συντέθηκαν και με τα δύο συμπολυμερή τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με όλες τις προαναφερόμενες αναλογίες πολυ(ιστιδίνης)/χρυσού σε θερμοκρασία 25 °C και σε γωνία 90°. Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τις

αναλογίες: 10 mol His/1 mol Au, 9 mol His/1 mol Au, 8 mol His/1 mol Au, 7 mol His/1 mol Au και 5 mol His/1 mol Au.

Πίνακας 11: Πίνακας μετρήσεων DLS για PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ AuNPs σε θερμοκρασία 25°C και στις 90°.

PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₅ AuNPs							
mol His/mol Au	Eff. Rad. (nm)	Polydispersity	Count Rate (kcps)	PEAK 1	%PEAK 1	PEAK 2	%PEAK 2
5/1	49.15	0.225	440	60.82	93	10.43	7
7/1	53.92	0.195	469.4	53.92	100	-	-
8/1	48.13	0.156	534.5	55.15	96	5.25	4
9/1	43.97	0.203	430	43.97	100	-	-
10/1	43.71	0.227	461.2	50	95	5.79	5

Πίνακας 12: Πίνακας μετρήσεων DLS για PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ AuNPs σε θερμοκρασία 25°C και στις 90°.

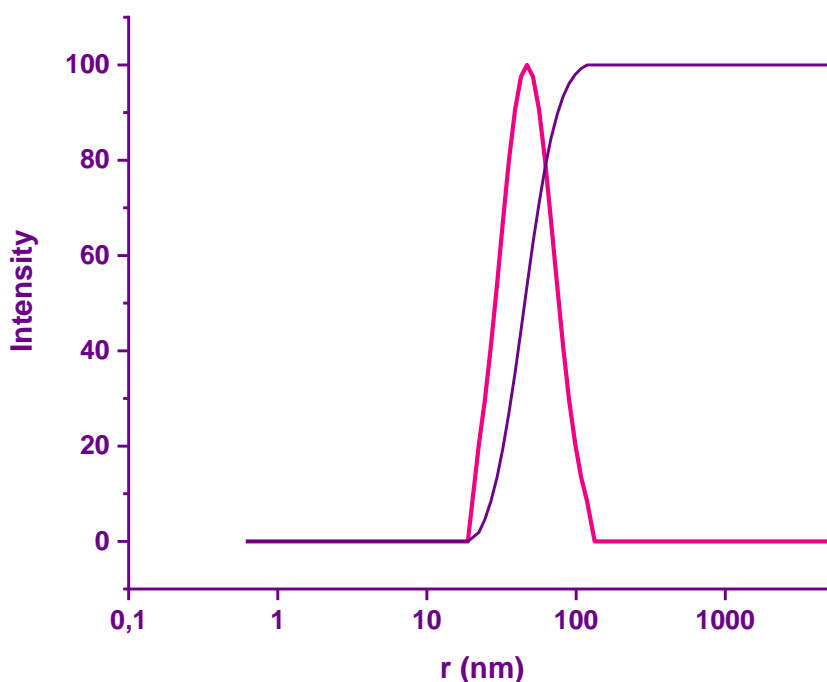
PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe ₁₀ AuNPs							
mol His/mol Au	Eff. Rad. (nm)	Polydispersity	Count Rate (kcps)	PEAK 1	%PEAK 1	PEAK 2	%PEAK 2
5/1	35.51	0.258	547.7	50	92	5.25	8
7/1	18.46	0.347	516.6	29.2	76	1.96	24
8/1	23.22	0.353	485.4	41.10	80	3.2	20
9/1	20.15	0.352	445	33.07	78	2.55	22
10/1	26.28	0.313	489.3	35.85	88	2.99	12

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις DLS για το σκέτο PEO-*b*-PHis AuNP σε αναλογίες 5 mol His/1 mol Au και 10 mol His/1 mol Au, οι οποίες φαίνονται στον Πίνακα 13.

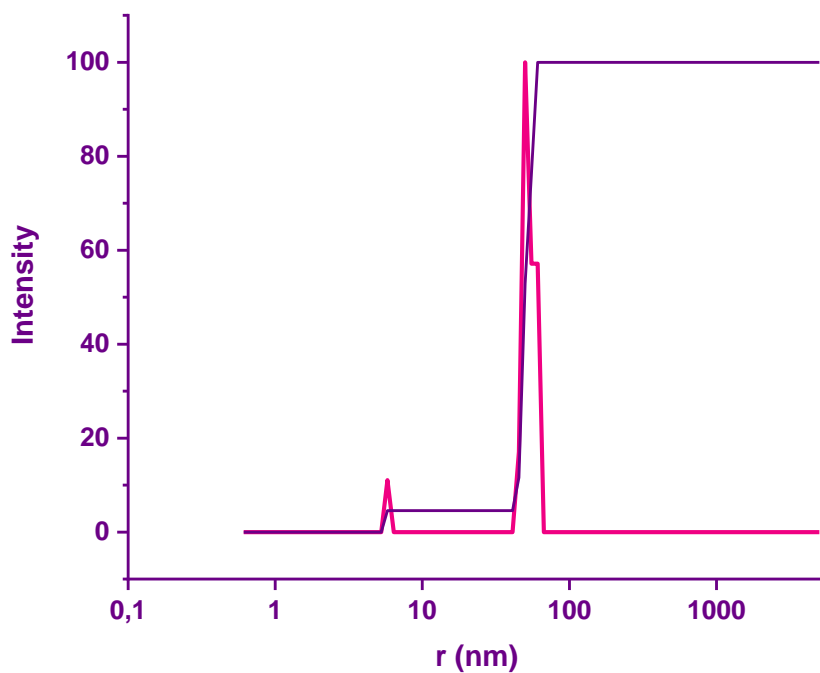
Πίνακας 13: Πίνακας μετρήσεων DLS για PEO-*b*-PHis AuNPs σε θερμοκρασία 25°C και στις 90°.

PEO- <i>b</i> -PHis AuNPs							
mol His/mol Au	Eff. Rad. (nm)	Polydispersity	Count Rate (kcps)	PEAK 1	%PEAK 1	PEAK 2	%PEAK 2
5/1	53.18	0.171	462.6	53.18	100	-	-
10/1	50.33	0.341	93.9	82.22	86	18.52	11

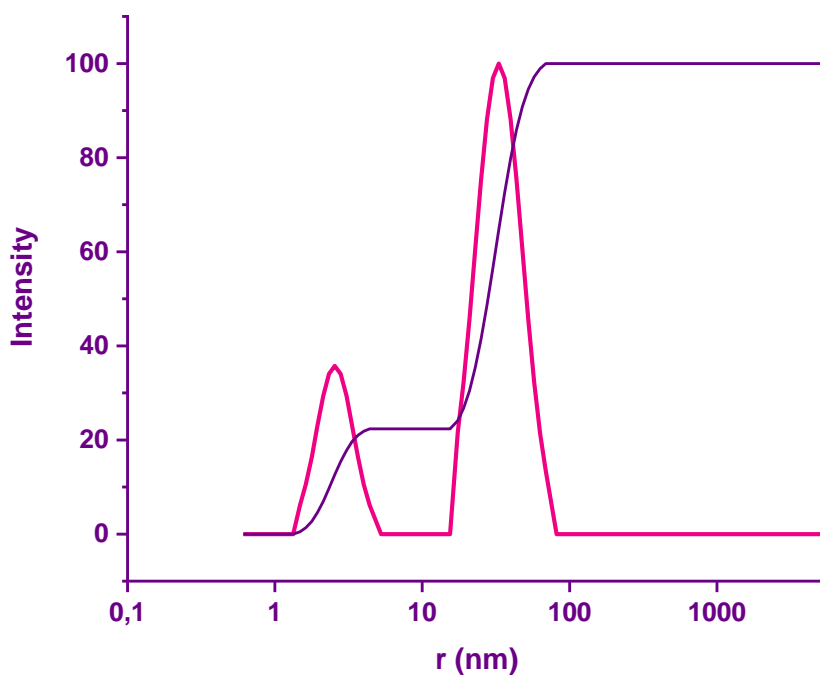
Στην συνέχεια, παρατίθενται τα διαγράμματα DLS για τα PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ AuNPs και PEO-PHis-PPhe₁₀ AuNPs σε αναλογίες 10 mol His/1 mol Au και 9 mol His/1 mol Au, καθώς και για το σκέτο PEO-*b*-PHis AuNPs σε αναλογίες 10 mol His/1 mol Au και 5 mol His/1 mol Au.



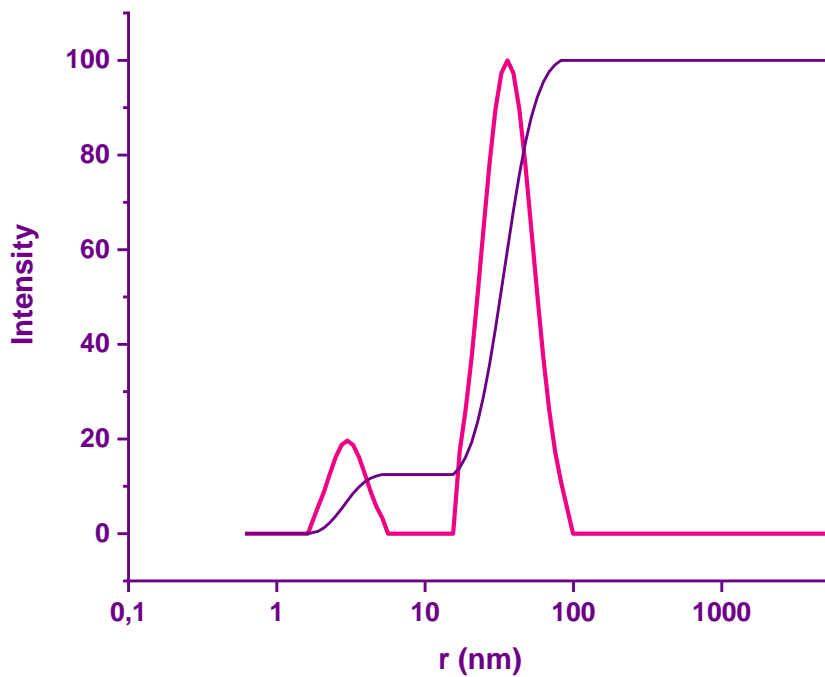
Εικόνα 58: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₅ AuNP με αναλογία 9 mol His/1 mol Au.



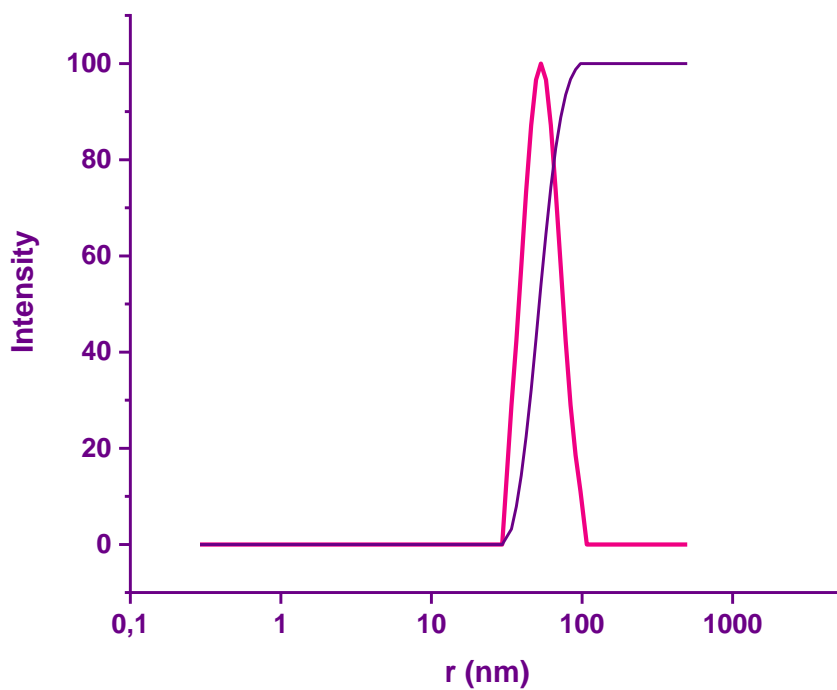
Εικόνα 59: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis-*b*-PPh₅ AuNP με αναλογία 10 mol His/1 mol Au.



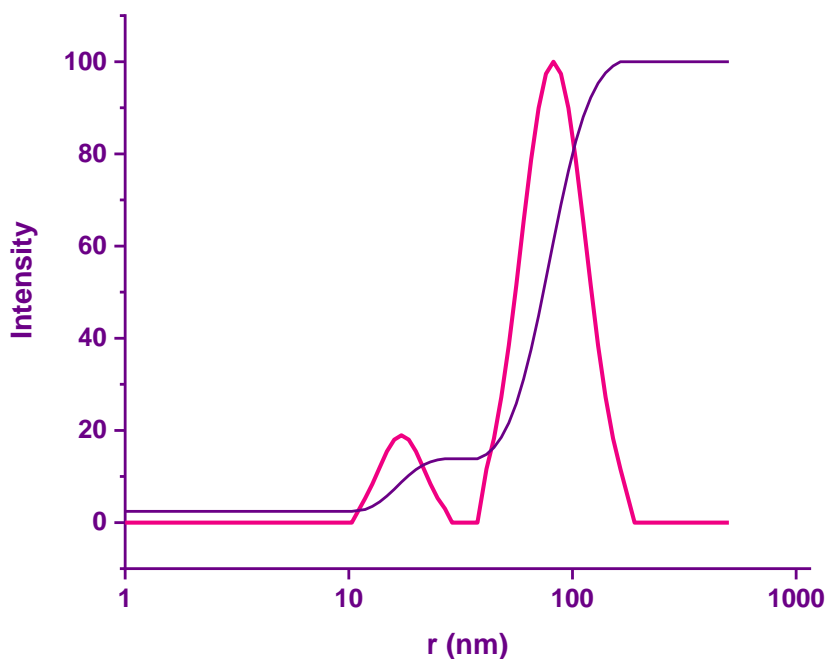
Εικόνα 60: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis-*b*-PPh₁₀ AuNP με αναλογία 9 mol His/1 mol Au.



Εικόνα 61: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe₁₀ AuNP με αναλογία 10 mol His/1 mol Au.



Εικόνα 62: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis AuNP με αναλογία 5 mol His/1 mol Au.



Εικόνα 63: Διάγραμμα έντασης σε συνάρτηση με την ακτίνα του PEO-*b*-PHis AuNP με αναλογία 10 mol His/1 mol Au.

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω μετρήσεις, τα νανοσωματίδια χρυσού τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe που αποτελούνται από δέκα μονομερικές μονάδες φαινυλαλανίνης έχουν μικρότερη ακτίνα σε σύγκριση με αυτά με τις πέντε μονομερικές μονάδες, γεγονός που δηλώνει πως πιθανόν οργανώνονται καλύτερα. Η ύπαρξη δύο κορυφών σχεδόν σε όλες τις αναλογίες mol ιστιδίνης και χρυσού δηλώνει το «σπάσιμο» ορισμένων δομών, ωστόσο τα ποσοστά αυτά φαίνεται να είναι πολύ μικρά. Όπως προαναφέρθηκε ο χρυσός αλληλεπιδρά μόνο με το άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου που βρίσκεται στην πλευρική ομάδα της ιστιδίνης και έτσι αυτή γίνεται υδρόφοβη με αποτέλεσμα να συρρικνώνεται. Αυτό μπορεί να διαπιστωθεί αν συγκριθούν οι υδροδυναμικές ακτίνες των πολυμερών χωρίς τον χρυσό και μετά την δημιουργία του νανοσωματιδίου όπου παρατηρείται μία εμφανής μείωση στην υδροδυναμική ακτίνα των συντιθέμενων νανοσωματιδίων. Τέλος, όσον αφορά τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για το νανοσωματίδιο PEO-*b*-PHis παρατηρείται ότι στην αναλογία 10 mol His/1 mol Au ο αριθμός count rate μειώνεται αισθητά και πιθανόν τα νανοσωματίδια να έχουν «σπάσει».

5.9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν όπως έχει ήδη αναφερθεί η σύνθεση δυο ομοπολυμερών φαινυλαλανίνης με πέντε και δέκα δομικές μονάδες αντίστοιχα και υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυμερών τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe με δύο διαφορετικά μοριακά βάρη πολυφαινυλαλανίνης στο πολυπεπτιδικό τμήμα.

Αρχικά, το πρώτο στάδιο της πειραματικής πορείας αποτέλεσε η σύνθεση των κατάλληλα προστατευμένων N-καρβόξυ ανυδριτών (μονομερών) ώστε στη συνέχεια να ακολουθήσει ο ROP πολυμερισμός τους. Οι ανυδρίτες χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και φασματοσκοπία ¹HNMR όπου επιβεβαιώθηκε η επιτυχημένη σύνθεσή τους. Στη συνέχεια ακολούθησε ο διαδοχικός ROP πολυμερισμός του Phe NCA με απαρχητή την διμεθυλαμίνη για την σύνθεση των ομοπολυμερών και αντίστοιχα για τα δύο μονομερή χρησιμοποιώντας ως μακροαπαρχητή το PEO-NH₂ με χρήση τεχνικών υψηλού κενού και ειδικά κατασκευασμένης συσκευής πολυμερισμού με υαλουργία.

Τα πλήρως προστατευμένα συμπολυμερή PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe υπέστησαν επιτυχώς εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της συστάδας της ιστιδίνης και τα μερικώς και πλήρως αποπροστατευμένα συμπολυμερή χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και ¹HNMR καθώς και με την μέθοδο SEC. Ακόμη, τα δύο ομοπολυμερή χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και ¹HNMR.

Περαιτέρω μελέτη για τα δύο συμπολυμερή πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους (UV-Vis) όπου διαπιστώθηκε η απορρόφηση της φαινυλαλανίνης σε μικρότερα μήκη κύματος σε σχέση με της ιστιδίνης, ενώ αποτέλεσε απόδειξη για την ύπαρξη της φαινυλαλανίνης στο συμπολυμερές.

Σε επόμενο βήμα, μελετήθηκε η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων από το pH με την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού, καθώς επίσης και η συσσωμάτωσή τους με τις τεχνικές της δυναμικής σκέδασης φωτός. Τα αποτελέσματα του κυκλικού διχρωϊσμού για τα δύο συμπολυμερή έδειξαν πως η δομή τυχαίου σπειράματος ενισχύεται όσο το pH μειώνεται και διατηρείται σε μικρότερο ποσοστό ακόμα και στα βασικά pH. Σε μεγαλύτερες τιμές pH υπάρχει και η δομή της α έλικας η οποία είναι διακριτή στο

συμπολυμερές με τις περισσότερες δομικές μονάδες φαινυλαλανίνης. Για πιο ασφαλή συμπεράσματα θα ήταν χρήσιμο να γίνει μελέτη της δευτεροταγούς δομής των δύο συντιθέμενων ομοπολυμερών, γεγονός αδύνατον λόγω της χαμηλής διαλυτότητας τους στους κατάλληλους διαλύτες. Όσον αφορά την μελέτη της αυτοοργάνωσης των συμπολυμερών PEO₂₂₇-*b*-PHis₃₀-*b*-PPhe₅ και PEO₂₂₇-*b*-PHis₃₀-*b*-PPhe₁₀ με την δυναμική σκέδαση φωτός διαπιστώθηκε πως η μείωση του pH στα διαλύματα έχει ως συνέπεια την αύξηση της υδροδυναμικής ακτίνας των πολυμερών ή το «σπάσιμο» τους, σε μικρότερο ποσοστό. Ωστόσο όσον αφορά το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis φαίνεται ότι η μείωση του pH είχε σαν αποτέλεσμα την πλήρη διάσπαση του, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε με την ύπαρξη της φαινυλαλανίνης. Να σημειωθεί πως δεν υπήρξε ιδιαίτερη απόκριση στην θερμοκρασία κανενός από τα συμπολυμερή, ενώ αντίθετα παρουσίασαν γωνιακή εξάρτηση.

Τέλος, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε προσπάθεια σύνθεσης νανοσωματιδίων χρυσού τα οποία σχηματίστηκαν από τον πυρήνα της ιστιδίνης, επιβεβαιώνοντας έτσι την ικανότητα της να ανάγει τον υποχλωριώδη χρυσό και να σχηματίζει νανοσωματίδια χρυσού. Το συμπέρασμα αυτό είναι θετικό, καθώς οι οπτικές ιδιότητες που μελετήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους μπορούν να δώσουν τη δυνατότητα απεικόνισης, παράλληλα με την αντικαρκινική θεραπεία. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την παρούσα μελέτη ήταν αρκετά αισιόδοξα καθώς έγινε επιτυχώς η μετατόπιση του μήκους κύματος στα 800 nm που αποτελούσε το ζητούμενο στην παρούσα φάση, ενώ παράλληλα από τις μετρήσεις της δυναμικής σκέδασης φωτός φάνηκε τα νανοσωματίδια να αυτοοργανώνονται ικανοποιητικά.

Σαν μελλοντικοί στόχοι προτείνονται η περαιτέρω μελέτη αυτοοργάνωσης των συμπολυμερών, η μελέτη τους με τεχνικές μικροσκοπίας ώστε να εξακριβωθεί η δομή τους, η σύνθεση των ίδιων συμπολυμερών με διαφορετικές ποσότητες φαινυλαλανίνης και η περαιτέρω μελέτη των ιδιοτήτων αποκρισιμότητας των παρόντων συμπολυμερών. Λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από την παρούσα εργασία προτείνεται η περαιτέρω μελέτη των νανοσωματιδίων χρυσού που σχηματίστηκαν από τα συμπολυμερή και πως μπορούν να αποτελέσουν επιτυχή συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.

Υπάρχουν πολλά περιθώρια βελτίωσης, με την προσδοκία να αποτελέσει υλικό που θα μπορέσει να εισαχθεί σε κυτταρικές σειρές ή ακόμα και σε ζωντανούς οργανισμούς και δεν θα πρέπει να ξεχνάμε πως ο τομέας των βιοπολυμερών και η χημεία των πολυπεπτιδίων αναπτύσσονται τάχιστα τα τελευταία χρόνια δείχνοντας το σωστό μονοπάτι που πρέπει να στραφεί η επιστημονική έρευνα για την εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας ενάντια στον καρκίνο.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AMM	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
AROP	Ανιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
BOC	Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα
BOC-Hist(Trt)-OH	<i>N</i> _α -BOC- <i>N</i> ^m -Trityl-L-histidine
CaH ₂	Υδρίδιο του ασβεστίου
CD	Κυκλικός διχρωϊσμός
DCM (ή CH ₂ Cl ₂)	Διχλωρομεθάνιο
DCC	<i>N,N'</i> -δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο
CDCl ₃	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
DLS	Δυναμική σκέδαση φωτός
DMA	Διμεθυλαμίνη
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
GSH	Γλουταθειόνη
H ₂ SO ₄	Θειϊκό οξύ
H ₂ O ₂	Υπεροξειδίο του Υδρογόνου
HCl	Υδροχλώριο
HVL	Γραμμή υψηλού κενού
HVT	Τεχνικές υψηλού κενού
I	Κατανομή μοριακών βαρών
(iPr) ₃ SiH	Τρισσοπροπυλοσιλάνιο
IR	Υπέρυθρη ακτινοβολία
m-PEG	μονομεθόξυ- PEG
NaHCO ₃	Όξινο ανθρακικό νάτριο
NAM	Κανονικός μηχανισμός αμινών
n-BuLi	Κανονικό βουτυλολίθιο

NCA	N-Καρβοξυ ανυδρίτης
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
NOE	Nuclear Overhauser effect
P ₂ O ₅	Πεντοξείδιο του φωσφόρου
PBr ₃	Τριβρωμίδιο του Φωσφόρου
PEO (ή PEG)	Πολυ(αιθυλενοξείδιο) (ή Πολυ(αιθυλενογλυκόλη))
PEO-PHis	Πολυ(αιθυλενοξείδιο)-πολυ(L-ιστιδίνη)
PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PPhe	Πολυ(αιθυλενοξείδιο)-πολυ(L-ιστιδίνη)-πολύ(L-φαινυλαλανίνη)
Phe-NCA	N-καρβοξυ ανυδρίτης της φαινυλαλανίνης
PHis	Poly(L-Histidine)
pI	Ισοηλεκτρικό σημείο
PPhe	Πολυ(φαινυλαλανίνη)
ROMP	Πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου
ROP	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
RROP	Ριζικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
SEC (ή GPC)	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
SOCl ₂	Θειονυλοχλωρίδιο
TMSCl	Τριμεθυλοχλωροσιλάνιο
TFA	Τριφθοροοξικό οξύ
THF	Τετραϋδροφουράνιο
UV-Vis	Υπεριώδες-ορατό

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, I. Stryer, Βιοχημεία Τόμος 1, 2010, pp. 45-73.
2. Pauling L, Corey RB, Branson HR, The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain, 1951, Proc Natl Acad Sci USA, vol 37, pp 205–211.
3. M. Bodansky, A. Bodansky, The practice of peptide synthesis, 2nd ed. Springer-Verlag: New York, 1993.
4. Merrifield, R., Automated Synthesis of Peptides, Science 1965, 150, 178-185.
5. Merrifield, R. and Stewart, J., Automated Peptide Synthesis, Nature 1966, 207, 522-523.
6. T. J. Deming, Synthesis and self-assembly of well-defined block copolypeptides via controlled NCA polymerization, Adv. Polym. Sci., 2013, vol. 262, 1-38.
7. O. Nuyken, S. D. Pask, Ring-Opening Polymerization — An Introductory Review, *Polymers*, 2013, vol. 5, pp. 361-403.
8. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, Synthesis of Well-Defined Polypeptide-Based Materials via the Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, Chem. Rev., 2009, vol. 109, pp. 5528–5578.
9. T. J. Deming, Peptide-Based Materials, 1st ed. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2012.
10. T. J. Deming, Living Polymerization of α -Amino Acid-N-Carboxyanhydrides, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 2000, vol. 38, pp. 3011–3018.
11. H. R. Kricheldorf, Polypeptides and 100 Years of Chemistry of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, Angew. Chem. Int. Ed., 2006, vol. 45, pp. 5752 – 5784.
12. Junhua Liu, Jun Ling, DFT Study on Amine-Mediated Ring-Opening Mechanism of α -Amino Acid N-Carboxyanhydride and N-Substituted

Glycine N-Carboxyanhydride: Secondary Amine versus Primary Amine, *J. Phys. Chem. A*, 2015, 119, 27, pp. 7070-7074.

13. Blout, E. R. and Idelson, M., Polypeptides. XVIII.1 A Kinetic Study of the Polymerization of Amino Acid N-Carboxyanhydrides Initiated by Strong Bases, *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 2387-2393.

14. T. J. Deming, Facile synthesis of block copolypeptides of defined architecture, *Nature* 1997, 390, 386-389.

15. T. J. Deming, Amino acid derived nickelacycles: Intermediates in nickel-mediated polypeptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 4240-4241.

16. T. J. Deming, Cobalt and iron initiators for the controlled polymerization of α -amino acid-N-carboxyanhydrides, *Macromolecules* 1999, 32, 4500-4502.

17. Knobler, Y., Bittner, S. and Frankel, M., Reaction of N-carboxy- α -amino-acid anhydrides with hydrochlorides of hydroxylamine, O-alkylhydroxylamines, and amines; syntheses of amino-hydroxamic acids, amido-oxy-peptides, and α -amino-acid amides, *J. Chem. Soc.*, 1964, 3941.

18. Knobler, Y., Bittner, S., Virov, D. and Frankel, M., Reaction of N-carboxy- α -amino-acid anhydrides with hydrochlorides, *J. Chem. Soc.*, 1963, 1821.

19. Dimitrov, I. and Schlaad, H., Synthesis of Nearly Monodisperse Polystyrene-Polypeptide Block Copolymers via Polymerisation of N-Carboxyanhydrides, *Chem. Commun.*, 2003, 23, 2944-2945.

20. Aliferis, T., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., Living Polypeptides, *Biomacromolecules* 2004, 5, 1653-1656.

21. Aliferis, T., Iatrou, H., and Hadjichristidis, N., *Well-defined Linear Multiblock and Branched Polypeptides by Linking Chemistry*, *J. Polym. Sci.* 2005, Part A, 43, 4670-4673.

22. Aliferis, T., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Messman, J and Mays, J., *Synthesis and Characterization of 3- and 4- Arm Star-Block Copolypeptides using Multifunctional Amino Initiators and High Vacuum Techniques*, *L. Macromol. Symp.* 2006, 240, 12-17.

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

-
24. D. L. Pickel, N. Politakos, A. Avgeropoulos, J. M. Messman, A Mechanistic Study of α -(Amino acid)-N-carboxyanhydride Polymerization: Comparing Initiation and Termination Events in High-Vacuum and Traditional Polymerization Techniques, *Macromolecules*, 2009, vol. 42, pp. 7781–7788.
25. ChaoDeng, JintianWu, RuCheng, FenghuaMeng, Harm-AntonKlok. ZhiyuanZhong, Functional polypeptide and hybrid materials: Precision synthesis via α -amino acid N-carboxyanhydride polymerization and emerging biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 2014, Vol. 39, Issue 2, pp 330-364.
26. Δ. Μαυρογιώργης, Μακρομοριακή αρχιτεκτονική πολυπεπτιδίων, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2015, pp. 1-194.
27. H. Leuchs, Ueber die Glycin-Carbonsäure, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1906, vol. 39, pp. 857-861.
28. H. Leuchs, W. Geiger, Über die Anhydride von α -Amino-N-Carbonsäuren und die von α -Aminosäuren, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1908, vol. 41, pp. 1721-1726.
29. M. Bergmann, L. Zervas, W. Ross, On proteolytic enzymes VII. The synthesis of peptides of L-lysine and their behavior with papain, *J. Biol. Chem.*, 1935, vol. 111, pp. 245-260.
30. William H. Daly, Drew Poche, The preparation Of N-Carboxyanhydrides of α -amino acids using bis(trichloromethyl)carbonate, 1988, vol. 29, issue 46, pp. 5859-5862.
31. B. Ishai, D. Katchalski, Synthesis of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides from N-Carbalkoxy- α -amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, vol. 74, pp. 3688-3689.
32. M. Green, M. A. Stahmann, Synthesis and enzymatic hydrolysis of glutamic acid polypeptides, *J. Biol. Chem.*, 1952, vol. 197, pp 771-782.
33. F. Fuchs, ÜberN-Carbonsäure-Anhydride, *Chem. Ber.*, 1922, vol. 55, pp. 2943.

-
34. D. Coleman, A. C. Farthing, Synthetic Polypeptides. Part II. Properties of Oxazolid-2:5-diones and an Initial Study of the Preparation of Polypeptides There-From, *J. Chem. Soc.*, 1950, pp. 3218-3222.
35. C. J. Brown, D. Coleman, A. C. Farthing, Further Studies in Synthetic Polypeptides, *Nature*, 1949, vol. 163, pp. 834-835.
36. A. L. Levy, Anhydro-N-Carboxy-dl-beta-Phenylalanine, *Nature*, 1950, vol. 165, pp. 152-153.
37. A. C. Farthing, Synthetic polypeptides. Part I. Synthesis of Oxazolid-2:5-diones and a New Reaction of Glycine, *J. Chem. Soc.*, 1950, pp. 3213-3217.
38. L. Cotarca, H. Eckert, Phosgenations – A Handbook, Wiley, 2003, pp. 125-128.
39. L. Cotarca, Conversion of bis (trichloromethyl) carbonate to phosgene and reactivity of triphosgene, diphosgene, and phosgene with methanol, *Synthesis*, 1996, pp. 553-560.
40. C. H. Alarcon, S. Pennadam, C. Alexander, Stimuli responsive polymers for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, vol. 34, pp. 276–285.
41. S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, M. Amiji, A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 2008, vol. 126, pp. 187–204.
42. B. Jeong, A. Gutowska, Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, *Trends in Biotechnology*, 2002, vol. 20, pp. 305-311.
43. A. S. Hoffman, Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, vol. 65, pp. 10-16.
44. N. Rapoport, Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, vol. 32, pp. 962–990.
45. D. Schmaljohann, Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, vol. 58, pp. 1655–1670.

-
46. M. C. Stuart, W. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G Sukhorukov, I. Szleifer, V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. luzinov, S. Minko, Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials, *Nature Materials*, 2010, vol. 9, pp. 101-113.
47. X. He, J. Fan, K. L. Wooley, Stimuli-Triggered Sol–Gel Transitions of Polypeptides from α -Amino Acid N-Carboxyanhydride (NCA) Derived Polymerizations, *Chem. Asian J.*, 2016, vol. 11, pp. 437 – 447.
48. S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nature Materials*, 2013, vol. 12, pp. 991-1003.
49. E. Cabane, X. Zhang, K. Langowska, C. G. Palivan, W. Meier, Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine, *Biointerphases*, 2012, pp. 1-27.
50. Kamal Bauri, Mridula Nandi, Priyadarsi De, Amino acid-derived stimuli-responsive polymers and their applications, *Polymer Chemistry*, Issue 11, 2018.
51. Huang, A. Heise, Stimuli responsive synthetic polypeptides derived from N-carboxyanhydride (NCA) polymerization, *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 7373-7390.
52. 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.
53. J. M. Harrisa, Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly(Ethylene Glycol), *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, New York, 1992, vol. I, 1st Edition, pp. 1-14.
54. M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, Chemistry for peptide and protein PEGylation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, vol. 64, pp. 116-127.
55. F. E. Bailey, J. V. Koleske, Alkylene Oxides and Their Polymers, *New York*, 1976, vol. V, 3rd Edition.

-
56. R. Mahou, C. Wandrey, Versatile route to synthesize heterobifunctional poly(ethylene glycol) of variable functionality for subsequent pegylation, *Polymers*, 2012, vol. 4, pp. 561-589.
57. Y. Kim, Y. Nagasaki, K. Kataoka, M. Kato, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, Nanotechnology in Drug Delivery, *Polym. Bull*, 1994, vol. 60, pp. 33.
58. H. Iatrou, K. Dimas, M. Gkikas, C. Tsimblouli, S. Sofianopoulou, Polymersomes from Polypeptide Containing Triblock Co-and Terpolymers for Drug Delivery against Pancreatic Cancer: Asymmetry of the External Hydrophilic Blocks, *Macromolecular Bioscience*, 2014, vol. 14, pp. 1222-1238.
59. G. Lapienis, Star-shaped polymers having PEO arms, *Polymer Science*, 2009, vol. 34, pp. 852-892.
60. Lehmann, W. D.; Theobald, N.; Fischer, R.; Heinrich, H. C. Stereospecificity of phenylalanine plasma kinetics and hydroxylation in man following oral application of a stable isotope-labelled pseudo-racemic mixture of L- and D-phenylalanine. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 1983.
61. D-phenylalanine: Biological activity. The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, 2018.
62. Hiroaki Yoshida, Kazuhiro Yanagisawa, Creation of Superhydrophobic Poly(L-phenylalanine) Nonwovens by Electrospinning, 2018.
63. Min Sang Kim, Kasala Dayananda, Eun Kyung Choi, Heon Joo Park, Jin Seok Kim, Doo Sung Lee, Synthesis and characterization of poly(L-glutamic acid)-block-poly-(L-phenylalanine), Elsevier, 2009, 2252–2257.
64. Ziming Zhao, Yu Wang, Jin Han, Keli Wang, Dan Yang, Yihua Yang, Qian Du, Yuanjian Song, Xiaoxing Yin, Self-assembled micelles of amphiphilic poly(l-phenylalanine)-*b*-poly(l-serine) polypeptides for tumor-targeted delivery, *International Journal of Nanomedicine*, 2014.
65. Omkara Swami Muddineti , Balaram Ghosh, Swati Biswas, Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 484, Issues 1–2, 2015, pp. 252-267.

-
66. Vincent Hibou, *Infra-red Spectroscopy, Analytical Toxicology*, 2017.
67. Ε. Γκίκας, *Αμφίφιλα Πολυπεπτίδια: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Μελέτη Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2012, pp. 1-208.
68. J. McMurry, *Οργανική Χημεία Ι*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1998.
69. Vollhardt and Schore, *Organic Chemistry, Sixth edition*, 2010.
70. Μαυρομούστακος, Ι. Ματσούκας, *Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού*, Εκδόσεις Παρισιάνος, 2006, κεφάλαιο 1.
71. R. M. Wheaton, W. C. Bauman, *Non-Ionic Separations with Ion Exchange Resins*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1953, vol. 57, pp. 159-176.
72. G. H. Lathe, C. R. Ruthven, *The Separation of Substances and Estimation of their Relative Molecular Sizes by the Use of Columns of Starch in Water*, *Biochem. J.*, 1956, vol. 62, pp. 665-674.
73. J. C. Moore, *Gel Permeation Chromatography. I. A New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers*, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 1964, vol. 2, pp. 835-843.
74. S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, vol. 1751, pp. 119– 139.
75. E. Peggion, E. Scoffone, A. Cosani, A. Portolan, *Polymerization of gamma-benzyl-L-glutamate N-carboxyanhydride: effects of conditions of polymer precipitation on the molecular weight distribution*, *Biopolymers*, 1966, vol. 4, pp. 695-704.
76. B. Chu, *Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice*, USA, 1991 vol. 1, 2nd Edition.
77. R. Pecora, *Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy*, USA, 1985, vol. 1, 2nd Edition.
78. Ν. Καπάκογλου, *Ανάπτυξη Αναλυτικών Μεθόδων βασισμένων σε υπερμοριακά συστήματα πολυμερισμένων κυστιδίων επιφανειοδραστικών*

ενώσεων, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2009, pp. 138-159.

79. Hadjichristidis, N., Iatrou, H., Pispas, S. and Pitsikalis, M., Anionic polymerization: High vacuum techniques, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, 2000, 38, pp. 3211-3234.

80. D. Uhrig, J. W. Mays, Experimental techniques in high-vacuum anionic polymerization, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem*, 2005, Vol. 43, 6179-6222.

81. Wilder R, Mobashery S, The use of triphosgene in preparation of N-carboxy .alpha.-amino acid anhydrides, *J. Org. Chem.*, 1992, Vol. 57, pp. 2755-2756.

82. Xiaohua Huang, Mostafa A. El-Sayed, Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *Journal of Advanced Research*, 2010, Vol. 1, pp. 13–28.

83. Jibin Song, Xiangyu Yang, Zhen Yang, Lisen Lin, Yijing Liu, Zijian Zhou, Zheyu Shen, Guocan Yu, Yunlu Dai, Orit Jacobson, Jeeva Munasinghe, Bryant Yung, Gao-Jun Teng, Xiaoyuan Chen, Rational design of branched nanoporous gold nanoshells with enhanced physico-optical properties for optical imaging and cancer therapy, *ACS Nano*, 2017, Vol. 11, pp. 6102–6113.