



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση και χαρακτηρισμός N^ε-FMOC-
προστατευμένου N-Καρβόξυ Ανυδρίτη L-Λυσίνης και
εμβολιασμένου συμπολυμερούς πολυ(L-λυσίνης) και
πολυ(L-ιστιδίνης)**

ΘΥΜΗ ΠΑΝΤΟΡΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2020

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση και χαρακτηρισμός N^ε-FMOC-προστατευμένου N-Καρβόξυ Ανυδρίτη L-Λυσίνης και εμβολιασμένου συμπολυμερούς πολυ(L-λυσίνης) και πολυ(L-ιστιδίνης)

ΘΥΜΗ ΠΑΝΤΟΡΑ

A.M.: 181003

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

13/07/2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας ερευνητικής εργασίας επετεύχθη η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός προστατευμένων N-καρβόξυ ανυδριτών (μονομερών) καθώς και pH-αποκρινόμενου συμπολυμερούς του τύπου PLL₇₈-*b*-(PLL₁₀-*g*-PHis₁₅). Η σύνθεση του πολυμερούς πραγματοποιήθηκε με πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των αντίστοιχων N-καρβόξυ ανυδριτών με απαραίτητη την εξυλαμίνη. Για την επίτευξη της σύνθεσης του πολυμερούς, ήταν απαραίτητη η χρήση προστατευμένων N-καρβοξυ ανυδριτών με δυνατότητα αποπροστασίας σε διαφορετικές συνθήκες για την εκλεκτική αποπροστασία τους. Για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών, τον καθαρισμό των διαλυτών, αλλά και τη λήψη καλά καθορισμένων πολυμερών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού, εξασφαλίζοντας υψηλή καθαρότητα στο σύστημα και απουσία προσμίξεων που θα οδηγούσαν σε μη ελεγχόμενες διαδικασίες πολυμερισμού. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του πολυμερούς για την επιβεβαίωση της επιτυχής σύνθεσης αλλά και για τη μελέτη των χαρακτηριστικών του με τεχνικές χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR) και της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR). Τέλος χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), η μέτρηση ζ-δυναμικού αλλά και ο κυκλικός διχρωσμός (CD) για να μελετηθεί η ικανότητα της αυτό-οργάνωσης σε διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος. Απώτερος σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η μελέτη της Fmoc προστατευτικής ομάδας, η οποία μπορεί να συνδυαστεί με την BOC προστατευτική ομάδα δίνοντας έτσι την δυνατότητα για σύνθεση πολυμερών με διάφορες αρχιτεκτονικές.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: πολυπεπτίδια, πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου, N-καρβοξυ ανυδρίτες, προστατευτικές ομάδες, αποκρινόμενα πολυμερή

ABSTRACT

During the present research work, the synthesis and characterization of protected N-carboxy anhydrides (monomers) as well as pH-responsive hybrid copolymers of the type PLL₇₈-*b*- (PLL₁₀-*g*-PHis₁₅) were achieved. The polymer was synthesized by ring-opening polymerization of the corresponding N-carboxy anhydrides with the use of hexylamine as initiator. In order to achieve the synthesis of well-defined polymer it was necessary to use N-carboxy anhydrides with different protective groups so that there was the possibility of selective deprotection in different conditions. In order to achieve the synthesis of well-defined polymers, ensure the purity of the solvents and therefore the purity of the whole system so to avoid non controlled polymerization and termination reactions, high vacuum techniques were applied. The characterization of the polymer in order to confirm the successful synthesis as well as to define its molecular characteristics was carried out by size exclusion chromatography (SEC), proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) and infrared spectroscopy (FT-IR). Finally, dynamic light scattering (DLS), z-potential technique and the technique of circular dichroism (CD) were used, in order to investigate the ability of the polypeptide to self-assemble in different environmental conditions. The ultimate goal of this research work was to study the Fmoc protective group, which can be combined with the BOC protective group, providing us the possibility to synthesize polymers with different architectures.

SUBJECT AREA: Polymers

KEYWORDS: polypeptides, ring-opening polymerization, N-carboxy anhydrides, protective groups, stimuli-responsive polymers

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας αυτή την ερευνητική εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα εκείνα τα πρόσωπα, που με τη συμπαράστασή και την κατανόησή τους, με βοήθησαν στην υλοποίηση της εργασίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον προσωπικό μου επιβλέποντα, Καθηγητή Ερμόλαο Ιατρού, για τη συνεργασία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την πολύτιμη καθοδήγησή του, τις συμβουλές και τη βοήθειά του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον Καθηγητή Μαρίνο Πιτσικάλη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιο Σακελλαρίου για την άριστη διδασκαλία τους στα μαθήματα του μεταπτυχιακού προγράμματος, τις συμβουλές τους, το χρόνο που μου διέθεταν πάντα και για την καθημερινή συναναστροφή μας, που έκανε σίγουρα αυτά τα 2 χρόνια ξεχωριστά και αξέχαστα.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες όλου του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία τους και βοήθεια τους όλο το χρονικό διάστημα εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα να πω ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στους συναδέλφους μου από την ερευνητική ομάδα του κ. Ιατρού για την εξαιρετική μας συνεργασία και τη στήριξη που προσφέραμε ο ένας στον άλλον.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την αστείρευτη αγάπη και υπομονή τους και που πιστεύουν πάντα σε μένα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	16
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
1.1. Επίπεδα οργάνωσης πρωτεϊνών	19
1.2. Πεπτιδική σύνθεση.....	24
1.2.1. Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με καθορισμένη αλληλουχία.....	24
1.2.2. Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους	26
1.2.3. Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)	26
1.2.4. Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβοξυανυδριτών (NCAs) των α- αμινοξέων.....	28
1.3. Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs)	38
1.4. Νανοτεχνολογία και στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων μέσω πολυμερικών υλικών	41
1.5. Πολυπεπτιδικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποκρινόμενα σε εξωτερικά ερεθίσματα.....	44
1.5.1. Θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή	46
1.5.2. pH-αποκρινόμενα πολυμερή	47
1.5.3. Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε Οξειδοαναγωγικούς Παράγοντες.....	50
1.6. Προστατευτικές ομάδες.....	51
1.6.1. Προστασία της α-αμινομάδας.....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	59
2.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR)	59

2.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)	62
2.3. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC)	66
2.4. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	70
2.5. Κυκλικός Διχρωσμός (Circular Dichroism, CD)	71
2.6. Ζ-Δυναμικό (Zeta Potential)	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
3.1. Τεχνική Υψηλού Κενού (High Vacuum Technique, HVT).....	77
3.2. Καθαρισμός διαλυτών.....	79
3.3. Καθαρισμός αναρχητών και αντιδραστηρίων	82
3.4. Σύνθεση και Καθαρισμός Μονομερών (N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων)	84
3.4.1. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N ^ε - tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-L-Λυσίνης (N ^ε -BOC-L-Lys NCA).....	85
3.4.2. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N ^ε -9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ L-Λυσίνης (N ^ε -FMOC-L-Lys NCA).....	89
3.4.3. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N ^{im} -τρίτυλο-L-Ιστιδίνης (N ^{im} -Trt-L-His NCA)	92
3.5. Σύνθεση κατά συστάδες εμβολιασμένου πεπτιδίου του τύπου Poly(L-Lysine)- <i>b</i> -(Poly(L-Lysine)- <i>g</i> -Poly(L-Histidine)) (PLL- <i>b</i> -(PLL- <i>g</i> -PHis)).....	96
3.5.1. Σύνθεση πρόδρομου δισυσταδικού πολυμερούς του τύπου Poly(N ^ε -BOC-L-Lysine)- <i>b</i> -poly(N ^ε -FMOC-L-Lysine) (PBLL ₇₈ - <i>b</i> -PFLL ₁₀) .	97
3.5.2. Εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της 2 ^{ης} συστάδας στο προστατευμένο συμπολυμερές του τύπου PBLL ₇₈ - <i>b</i> -PFLL ₁₀	101
3.5.3. Σύνθεση κατά συστάδες εμβολιασμένου πεπτιδίου του τύπου Poly(L-Lysine)- <i>b</i> -(Poly(L-Lysine)- <i>g</i> -Poly(L-Histidine)) (PLL- <i>b</i> -(PLL- <i>g</i> -PHis))	104

3.5.4. Αποπροστασία των δομικών μονάδων της λυσίνης (Poly-(N ^ε -BOC-L-Lys)) και της ιστιδίνης (Poly-(N ^{im} -Trt-L-His)) στο συμπολυμερές του τύπου (PBLL- <i>b</i> -(PLL- <i>g</i> -PTrt-His))	108
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	111
4.1. Χαρακτηρισμός των N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs)	111
4.1.1. Χαρακτηρισμός του N ^ε -BOC-L-Lys NCA	111
4.1.2. Χαρακτηρισμός του N ^ε -FMOC-L-Lys NCA	113
4.1.3. Χαρακτηρισμός του N ^{im} -Trt-L-His NCA.....	116
4.2. Χαρακτηρισμός του εμβολιασμένου πεπτιδίου Poly(L-Lysine)- <i>b</i> -(poly(L-Lysine)- <i>g</i> -poly(Histidine)) (PLL- <i>b</i> -(PLL- <i>g</i> -PHis))	118
4.2.1. Σύνθεση πρόδρομου δισυσταδικού πολυμερούς του τύπου Poly(N ^ε -BOC-L-Lysine)- <i>b</i> -poly(N ^ε -FMOC-L-Lysine) (PBLL ₇₈ - <i>b</i> -PFLL ₁₀)	119
4.2.2. Εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της 2 ^{ης} συστάδας στο προστατευμένο συμπολυμερές του τύπου PBLL ₇₈ - <i>b</i> -PFLL ₁₀	121
4.2.3. Χαρακτηρισμός του εμβολιασμένου πεπτιδίου Poly(N ^ε -BOC-L-Lysine)- <i>b</i> -(poly(L-Lysine)- <i>g</i> -poly(Histidine)), PBLL- <i>b</i> -(PLL- <i>g</i> -PHis).....	123
4.3. Μελέτη της δευτεροταγούς δομής του εμβολιασμένου πεπτιδίου με τη τεχνική του Κυκλικού Διχρωισμού (CD).....	127
4.4. Μέτρηση ζ-δυναμικού του εμβολιασμένου πολυπεπτιδίου	129
4.5. Μελέτη αυτό-οργάνωσης του εμβολιασμένου πεπτιδίου με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).....	130
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	135
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	137
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	144
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	147

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs. .	30
Σχήμα 2: Στάδια έναρξης και διάδοσης πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού.	31
Σχήμα 3: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή.....	32
Σχήμα 4: Στάδια έναρξης και διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό κατά Blout.	33
Σχήμα 5: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.	35
Σχήμα 6: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και στη συνέχεια πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνει ισοκυανάτο χλωρίδιο και μετέπειτα N-χλωροφορμυλοκαρβοξυ-ανυδρίτη.	37
Σχήμα 7: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών.....	40
Σχήμα 8: Μηχανισμός απομάκρυνσης της BOC ομάδας σε όξινες συνθήκες.	56
Σχήμα 9: Μηχανισμός απομάκρυνσης της FMOC ομάδας με την χρήση πιπεριδίνης	57
Σχήμα 10: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης SEC.	67
Σχήμα 11: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ.	80
Σχήμα 12: Συσκευή αμπουλών για την παραλαβή απαρχητή.	83
Σχήμα 13: Συσκευή αραίωσης απαρχητή.	83
Σχήμα 14: Απελευθέρωση της πρόδρομης ένωσης Boc-Lys(Boc)-OH από το άλας Boc-Lys(Boc)-OH ⁺ DCHA.....	86
Σχήμα 15: Συνθετική πορεία του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N ^ε - tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-L-Λυσίνης (N ^ε -BOC-L-Lys NCA).	89

Σχήμα 16: Συνθετική πορεία του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N ^ε -9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ L-Λυσίνης (N ^ε -FMOC-L-Lys NCA).....	92
Σχήμα 17: Συνθετική πορεία του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N ^{im} -τρίτυλο-L-Ιστιδίνης (N ^{im} -Trt-L-His NCA).....	96
Σχήμα 18: Αντίδραση πολυμερισμού (ROP) για το πλήρως προστατευμένο συμπολυμερές του τύπου PBLL ₇₈ -b-PFLL ₁₀	101
Σχήμα 19: Αντίδραση αποπροστασίας των δομικών μονάδων της 2 ^{ης} συστάδας του συμπολυμερούς PBLL ₇₈ -b-PFLL ₁₀	103
Σχήμα 20: Αντίδραση πολυμερισμού (ROP) για το μερικώς προστατευμένο συμπολυμερές του τύπου (PBLL-b-(PLL-g-PTrt-His)).....	107
Σχήμα 21: Αντίδραση αποπροστασίας των δομικών μονάδων της λυσίνης (Poly-(N ^ε -BOC-L-Lys)) και της ιστιδίνης (Poly-(N ^{im} -Trt-L-His)) στο πολυμερές του τύπου (PBLL-b-(PLL-g-PTrt-His)).....	110
Σχήμα 22: Φάσμα IR (A): της πρόδρομης ένωσης BOC-Lys(BOC)-OH, (B): μετά από 2.5 ώρες αντίδρασης, (C): του τελικού προϊόντος N ^ε -BOC-L-Lys NCA μετά τις ανακρυσταλλώσεις.....	112
Σχήμα 23: Φάσμα ¹ H-NMR σε CDCl ₃ για τον τελικό N ^ε -BOC-L-Lys NCA. ...	113
Σχήμα 24: Φάσμα IR (A): της πρόδρομης ένωσης N ^ε -FMOC-N ^α -BOC-L-Lys, (B): μετά από 4 ώρες αντίδρασης, (C): του τελικού προϊόντος N ^ε -FMOC-L-Lys NCA μετά τις ανακρυσταλλώσεις.	114
Σχήμα 25: Φάσμα ¹ H-NMR σε CDCl ₃ για το πρόδρομο N ^ε -FMOC-N ^α -BOC-L-Lys NCA.....	115
Σχήμα 26: Φάσμα ¹ H-NMR σε CDCl ₃ για τον τελικό N ^ε -FMOC-L-Lys NCA..	116
Σχήμα 27: Φάσμα IR (A): της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH, (B): μετά από 2.5 ώρες αντίδρασης μετά την προσθήκη SOCl ₂ , (C) του τελικού προϊόντος N ^{im} -Trt-His NCA μετά τις ανακρυσταλλώσεις.	117
Σχήμα 28: Φάσμα ¹ H-NMR σε CDCl ₃ για τον τελικό N ^{im} -Trt-L-His NCA.....	118
Σχήμα 29: Φάσμα IR (A): του μονομερούς N ^ε -BOC-L-Lysine NCA, (B) μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της 1 ^{ης} συστάδας του PBLL ₇₈ -b-PFLL ₁₀	120

Σχήμα 30: Φάσμα IR (A): μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της 1 ^{ης} συστάδας του PBLL ₇₈ -b-PFLL ₁₀ , (B) του μονομερούς N ^ε -Fmoc-L-Lysine NCA, (C) μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της 2 ^{ης} συστάδας.....	120
Σχήμα 31: Φάσμα ¹ H-NMR σε CDCl ₃ για το μερικώς αποπροστατευμένο (PBLL ₇₈ -b-PLL ₁₀).....	122
Σχήμα 32: Χρωματογράφημα SEC σε διαλύτη DMF του δισυσταδικού πολυμερούς PBLL ₇₈ -b-PLL ₁₀	123
Σχήμα 33: Φάσμα IR (A): του μονομερούς N ^{im} -Trt-L-His NCA, (C) μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού.	124
Σχήμα 34: Φάσμα IR (A): του προστατευμένου εμβολιασμένου πολυπεπτιδίου PBLL-b-(PLL-g-P(Trt)His), (B): του πλήρως αποπροστατευμένου εμβολιασμένου πολυπεπτιδίου PLL-b-(PLL-g-PHis).....	125
Σχήμα 35: Φάσμα ¹ H-NMR σε διαλύτη d-TFA του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς.	126
Σχήμα 36: Χρωματογράφημα SEC σε διαλύτη H ₂ O του PLL-b-(PLL-g-PHis).	127
Σχήμα 37: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του πολυμερούς PLL ₇₈ -b-(PLL ₁₀ -g-PHis ₁₅) σε διαφορετικά pH στους 25 °C.	128
Σχήμα 38: Διάγραμμα ζ-δυναμικού του εμβολιασμένου πολυμερούς.	129
Σχήμα 39: Σχηματική αναπαράσταση της εξάρτησης του μεγέθους του νανοσωματιδίου από το pH (90 deg, 25 °C).	134

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Πρωτοταγής δομή πρωτεϊνών.....	19
Εικόνα 2: Δευτεροταγής δομή πρωτεϊνών: μπλε σχέδιο: β-πτυχωτή επιφάνεια, πράσινο σχέδιο: α-έλικα.....	21
Εικόνα 3: Η β-στροφή.	22
Εικόνα 4: Το τυχαίο σπείραμα.	23
Εικόνα 5: Τριτοταγής Δομή.	23
Εικόνα 6: Τεταρτοταγής Δομή.	24
Εικόνα 7: Κυριότεροι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών βασισμένοι σε πολυμερικά υλικά και ανόργανα νανοσωματίδια.....	43
Εικόνα 8: Ταξινόμηση των αποκρινόμενων πολυπεπτιδίων.	46
Εικόνα 9: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης).....	49
Εικόνα 10: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα ("proton sponge effect").	50
Εικόνα 11: Χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών ενός μορίου.....	60
Εικόνα 12: Διαχωρισμός μακρομορίων διαφορετικού υδροδυναμικού όγκου.....	69
Εικόνα 13: Το ελλειπτικά πολωμένο φως (βιολετί) προέρχεται από την άνιση απορρόφηση του δεξιά (μπλε) και αριστερά (κόκκινο) κυκλικά πολωμένου φωτός.....	72
Εικόνα 14: Πρότυπο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού.....	74
Εικόνα 15: Το δυναμικό των νανοσωματιδίων συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια τους.....	75
Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση Γραμμής Υψηλού Κενού (High Vacuum Line, HVL).....	78
Εικόνα 17: Η Na ₂ Ne-diBOC-L-Lys μετά την συμπύκνωση.....	86
Εικόνα 18: Συσκευή πολυμερισμού που περιλαμβάνει την αμπούλα του απαρχητή και τις αμπούλες των μονομερών (αριστερά), το διάλυμα του	

απαρχητή και του μονομερούς μετά την θραύση των γυάλινων υμένων (δεξιά).
.....99

Εικόνα 19: Συσκευή πολυμερισμού που περιλαμβάνει την αμπούλα του μονομερούς (αριστερά), το διάλυμα του μακροαπαρχητή και του μονομερούς μετά την θραύση του γυάλινου υμένα (δεξιά). 106

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικές ομάδες κυκλικών μονομερών και ο συνήθης μηχανισμός πολυμερισμού ROP για κάθε κατηγορία.....	28
Πίνακας 2: Κυριότερες προστατευτικές ομάδες της α-αμινομάδας.....	54
Πίνακας 3: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1}	62
Πίνακας 4: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (ppm).	65
Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS για το εμβολιασμένο πολυμερές PLL ₇₈ -b-(PLL ₁₀ -g-PHis ₁₅).	131
Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας παραμέτρων στις 90 deg για το εμβολιασμένο πολυμερές.....	132

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας (Εργαστήριο Πολυμερών) του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβλέποντα των Καθηγητή Ερμόλαο Ιατρού.

Αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας είναι η σύνθεση pH-αποκρινόμενου εμβολιασμένου συμπολυμερούς και η μελέτη της συσσωμάτωσής του σε υδατικά διαλύματα, καθώς επίσης και της δευτεροταγούς δομής του. Σημαντικό κομμάτι της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η χρήση N-καρβοξυ ανυδριτών της L-Lysine με διαφορετικές προστατευτικές ομάδες με στόχο την εκλεκτική αποπροστασία για σύνθεση πολυμερών με σύνθετες αρχιτεκτονικές.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αστείρευτη πηγή έμπνευσης για τον άνθρωπο είναι η φύση και ειδικότερα η αρμονία που διέπει τους κανόνες και τους νόμους λειτουργίας της. Οι περισσότερες επιστήμες αναπτύχθηκαν για να μελετήσουν και να κατανοήσουν αυτό το τόσο περίπλοκο σύστημα που όμως, λόγω της τελειότητάς του, φαντάζει απλό και εύληπτο. Ειδικότερα η επιστήμη της χημείας είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την παρατήρηση του φυσικού κόσμου και των μετασχηματισμών του. Μιμούμενη τις διεργασίες που ακολουθεί η ίδια η φύση, η επιστημονική-ερευνητική κοινότητα εξελίσσει τις ήδη υπάρχουσες τεχνικές και συνθέτει νέα υλικά με πρωτότυπες ιδιότητες και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά με πλήθος εφαρμογών στην καθημερινότητά μας.

Έντονη κινητικότητα παρατηρείται τα τελευταία χρόνια από τις ομάδες επιστημόνων στον τομέα των πολυμερών, και ειδικότερα σε ό,τι αφορά τη χημεία των πολυπεπτιδίων, τα οποία είναι από τα κυριότερα βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα πολυμερή. Πλήθος ερευνών έχουν διενεργηθεί πάνω στη σύνθεση, τη διαμόρφωση και τις ιδιότητές τους. Το γεγονός αυτό δεν είναι τυχαίο, αν αναλογιστεί κανείς ότι οι πρωτεΐνες είναι τα πιο διαδεδομένα πολυμερή στη φύση, με την εξαιρετική ικανότητα που διαθέτουν, να οργανώνονται σε περίπλοκες τρισδιάστατες δομές. Τα πεππίδια παρουσιάζουν ενδιαφέρον όχι μόνο στη βιοχημεία, αλλά και στη βιολογία, τη φαρμακευτική χημεία, τη βιοτεχνολογία και τη γονιδιακή τεχνολογία και πραγματοποιείται πληθώρα ερευνών για την εφαρμογή τους ως εργαλεία στο πλαίσιο των επιστημών υγείας.^{1, 2}

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).³ Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για τη σύνθεση του εμβολιασμένου συμπολυμερούς (graft copolymer) του γενικού τύπου PLL-*b*-(PLL-*g*-PHis) που μελετήθηκε στη

συγκεκριμένη εργασία, αφού πρώτα προηγήθηκε η σύνθεση των αντίστοιχων προστατευμένων N-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs).

Τα εμβολιασμένα κατά συστάδες συμπολυμερή, έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν συσσωματώματα σε υδατικά διαλύματα, και να οργανώνονται σε διάφορες δομές (π.χ. μικκύλια), ανάλογα με το μέγεθος του υδρόφοβου και υδρόφιλου τμήματός τους. Λόγω του σχηματισμού τέτοιων δομών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πολυμερικοί νανομεταφορείς υδρόφοβων φαρμάκων, αυξάνοντας έτσι τον χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα.

Το αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας διπλώματος ειδίκευσης, βασίζεται στην εκμετάλλευση των παραπάνω ιδιοτήτων των πολυπεπτιδίων και στη περαιτέρω μελέτη αυτών. Σε πρώτο στάδιο κατά τη διάρκεια της εργασίας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του εμβολιασμένου συμπολυμερούς PLL-*b*- (PLL-*g*-PHis). Σημαντικό κομμάτι της σύνθεσης αποτέλεσε η χρήση N-καρβοξυ ανυδριτών της L-Lysine με διαφορετικές προστατευτικές ομάδες. Έτσι ήταν δυνατή η εκλεκτική αποπροστασία της μίας ομάδας, με την άλλη ομάδα να παραμένει ανέπαφη λόγω των διαφορετικών συνθηκών που απαιτούνται για την αποπροστασία της.

Σε δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε η διαδικασία της συσσωμάτωσης του σε υδατικά διαλύματα σε διάφορες τιμές pH και η ικανότητά του να αποκρίνονται στις αλλαγές των τιμών.

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

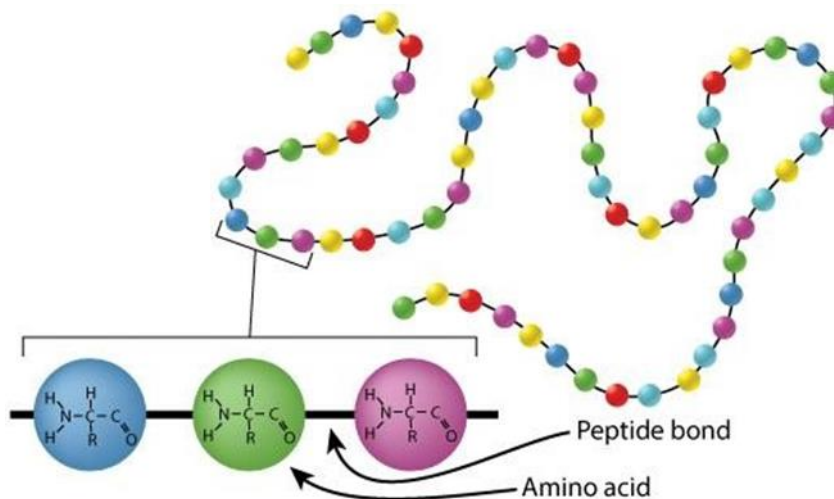
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Επίπεδα οργάνωσης πρωτεϊνών

Στις πρωτεΐνες διακρίνονται τέσσερα επίπεδα οργάνωσης, η πρωτοταγής δομή, η δευτεροταγής δομή, η τριτοταγής δομή και η τεταρτοταγής δομή. Παρακάτω αναλύεται ξεχωριστά κάθε ένα από τα επίπεδα οργάνωσης.⁴

- **Πρωτοταγής Δομή**

Το πρώτο επίπεδο οργάνωσης της δομής μια πρωτεΐνης αναφέρεται ως πρωτοταγής δομή και περιλαμβάνει την αλληλουχία και τον αριθμό των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, είναι δηλαδή ο τρόπος με τον οποίο τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Πρωτοταγής δομή πρωτεϊνών.

- **Δευτεροταγής δομή**

Η ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ γειτονικών αμινοξέων ή περιοχών της ίδιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας ή παραπλήσιων πεπτιδικών αλυσίδων και η επακόλουθη τοπική αναδίπλωσή της συνιστά τη δευτεροταγή δομή. Η

δευτεροταγής δομή καθορίζεται τοπικά, δηλαδή πολλά διαφορετικά είδη αναδιπλώσεων μπορούν να συνυπάρχουν στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα.

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

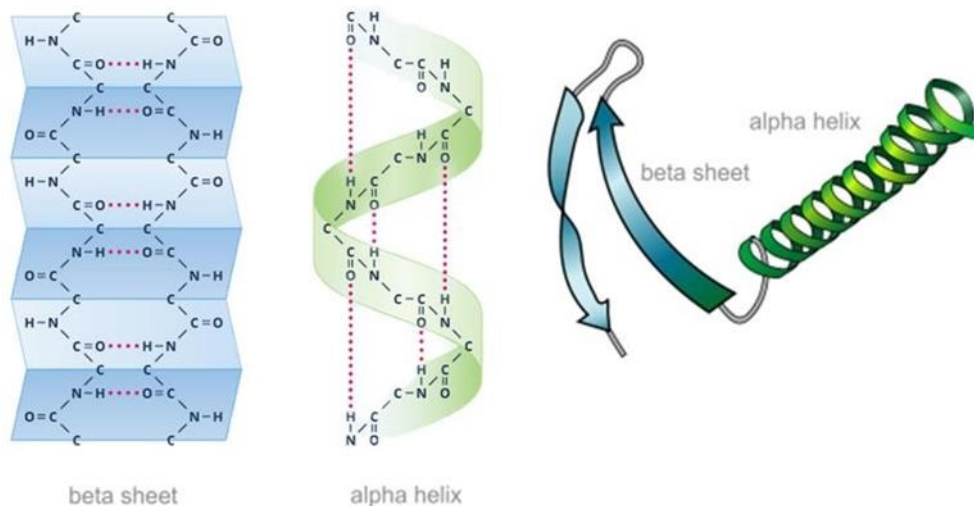
➤ Η α-έλικα

Στην α-έλικα (α-helix) ο κορμός της πολυπεπτιδικής αλυσίδας έχει σχήμα σπειράματος και οι πλευρικές ομάδες εκτείνονται προς τα έξω σε μια ελικοειδή διάταξη. Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται, είναι ενδομοριακοί και σχεδόν παράλληλοι προς τον κύριο άξονα της έλικας, σταθεροποιώντας έτσι τη δομή και κρατώντας σε σταθερή θέση τις περιστροφές της έλικας. Η έλικα κάνει μία περιστροφή κάθε 3,6 αμινοξέα, φέρνοντας κοντά τους πεπτιδικούς δεσμούς κάθε τέταρτου αμινοξέος. Στη δομή αυτή όλες οι ομάδες CO και NH του πολυπεπτιδικού κορμού συνδέονται με υδρογονικούς δεσμούς, εκτός από εκείνες που βρίσκονται στα άκρα της έλικας. Η στροφή της έλικας μπορεί να είναι δεξιόστροφη ή αριστερόστροφη (Εικόνα 2). Οι δεξιόστροφες έλικες είναι πιο ευνοούμενες ενεργειακά λόγω των περιορισμένων στερικών συγκρούσεων μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων και του κορμού. Όλες οι α-έλικες που απαντούν στις πρωτεΐνες είναι δεξιόστροφες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι α-έλικες σε πολυπεπτίδια μεγάλου μήκους δεν είναι απόλυτα τέλειες αλλά περιέχουν «σπασίματα» (ατέλειες). Η λυσίνη, η ιστιδίνη, το γλουταμικό οξύ, η αλανίνη και η λευκίνη είναι μερικά αμινοξέα που δημιουργούν δομή α-έλικας.

➤ Η β-πτυχωτή επιφάνεια

Μια β-επιφάνεια ή β-φύλλο (β-sheet) δημιουργείται, όταν δύο ή περισσότερες β-πτυχώσεις συνδεθούν με δεσμούς υδρογόνου. Οι υδρογονικοί δεσμοί αναπτύσσονται είτε ενδομοριακά είτε μεταξύ κοντινών πολυπεπτιδικών

αλυσίδων ή ομάδων τους. Η β-επιφάνεια είναι σχεδόν απόλυτα απλωμένη σε σύγκριση με το σφιχτό σπείραμα της α-έλικας. Οι διαδοχικές β-πτυχώσεις μπορεί να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλη β-επιφάνεια) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλη β-επιφάνεια). Στην αντιπαράλληλη β-επιφάνεια οι ομάδες NH και CO ενός αμινοξέος συνδέονται αντίστοιχα με δεσμούς υδρογόνου με τις ομάδες CO και NH του αμινοξέος της γειτονικής β-πτυχώσης (Εικόνα 2). Στην παράλληλη β-επιφάνεια η ομάδα NH κάθε αμινοξέος συνδέεται στο CO του αμινοξέος της γειτονικής β-πτυχώσης, ενώ η ομάδα CO συνδέεται στο NH του αμινοξέος που βρίσκεται δύο κατάλοιπα πιο κάτω στην αλυσίδα (Εικόνα 2). Οι β-επιφάνειες μπορεί να είναι καθαρά παράλληλες, αντιπαράλληλες ή και μικτές. Παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλία από τις α-έλικες και μπορεί να είναι σχετικά ευθείες, αν και οι περισσότερες εμφανίζονται με την κάθε πτύχωση ελαφρά στριμμένη. Η βαλίνη, η ισολευκίνη, η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη είναι μερικά από τα αμινοξέα που δημιουργούν δομή β-φύλλου.

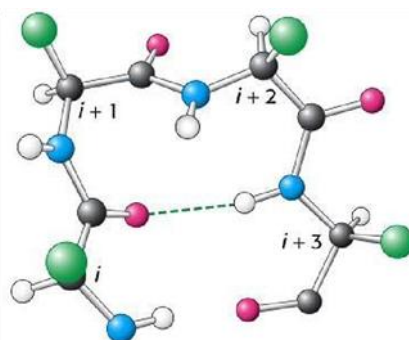


Εικόνα 2: Δευτεροταγής δομή πρωτεϊνών: μπλε σχέδιο: β-πτυχωτή επιφάνεια, πράσινο σχέδιο: α-έλικα.

➤ Η β-στροφή

Η β-στροφή (β-turn), γνωστή και ως στροφή αναστροφής ή κάμψη φουρκέτας, είναι η διάταξη εκείνη που έχει η πρωτεΐνη, στις περιπτώσεις εκείνες όπου η

πολυπεπτιδική αλυσίδα πρέπει να καμπυλωθεί για να αλλάξει κατεύθυνση. Έτσι, υπάρχουν τέσσερα αμινοξέα που διευθετούνται στο χώρο κατάλληλα, ώστε να αντιστραφεί η αρχική κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας κατά 180° . Η δομή αυτή σταθεροποιείται με μία γέφυρα υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ του πρώτου και του τέταρτου αμινοξέος (Εικόνα 3). Τα αμινοξέα γλυκίνη, ασπαραγίνη και προλίνη έχουν την τάση να βρίσκονται σε στροφές.



Εικόνα 3: Η β-στροφή.

➤ Η ω-θηλιά

Οι ω-θηλιές (ω-loops) είναι πιο πολύπλοκες δομές, μέσω των οποίων επίσης επιτυγχάνεται αναστροφή της αλυσίδας. Οι στροφές και οι θηλιές βρίσκονται κυρίως στην επιφάνεια των πρωτεϊνών και έχουν σταθερές και απόλυτα καθορισμένες δομές, όμως δεν έχουν κανονικές περιοδικές δομές όπως οι α-έλικες και οι β-επιφάνειες.

➤ Τυχαίο σπείραμα

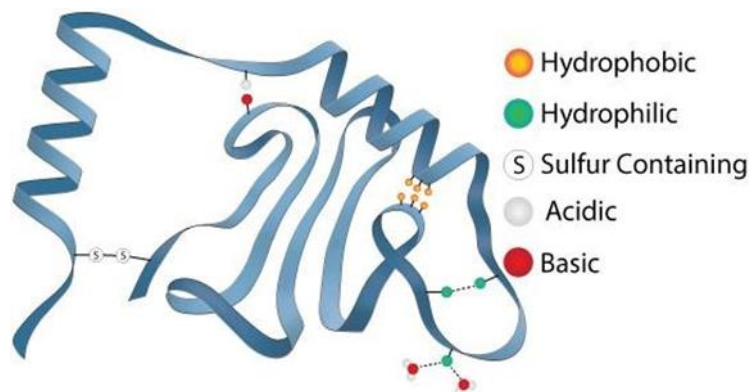
Στη δομή τυχαίου σπειράματος (random coil) (Εικόνα 4) η πολυπεπτιδική αλυσίδα αποκτά μία τυχαία διαμόρφωση. Απουσία συγκεκριμένων σταθεροποιητικών παραγόντων ο πρωτεϊνικός κορμός μπορεί να λάβει τυχαία οποιαδήποτε πιθανή δομή.



Εικόνα 4: Το τυχαίο σπείραμα.

- **Τριτοταγής δομή**

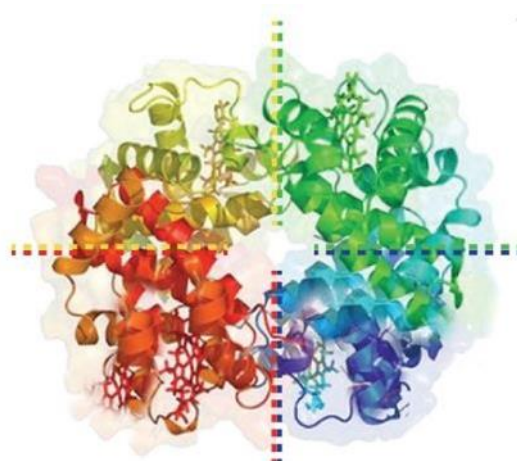
Η τριτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης αναφέρεται στη συνολική διαμόρφωση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο χώρο, ώστε να σχηματιστεί η συμπαγής δομή της. Αυτή η δομή είναι αποτέλεσμα ασθενών κυρίως δεσμών, όπως δεσμών υδρογόνου, ιοντικών δεσμών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πλευρικών ομάδων των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



Εικόνα 5: Τριτοταγής Δομή.

- **Τεταρτοταγής δομή**

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



Εικόνα 6: Τεταρτοταγής Δομή.

1.2. Πεπτιδική σύνθεση

1.2.1. Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με καθορισμένη αλληλουχία

Η σύνθεση των πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων, είναι πολύ σημαντική γιατί βρίσκει εφαρμογές σε μελέτες με φαρμακευτικό και ιατρικό ενδιαφέρον. Η σύνθεση αυτού του είδους των πεπτιδίων είναι δύσκολη, απαιτητική και δαπανηρή διαδικασία, εντούτοις λαμβάνει χώρα μέσω των ακόλουθων επικρατέστερων μεθόδων.⁵

- **Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση (Μέθοδος Merrifield)**

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

με κατάλληλα επιλεγμένους διαλύτες. Η ιδέα αυτή εισάχθηκε από τον Merrifield το 1963, και η ρητίνη του Merrifield, αυτή που χρησιμοποίησε τότε ως αδιάλυτο υποστήριγμα, αποτελεί ακόμη ένα από τα κύρια στηρίγματα για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση. Η ρητίνη του Merrifield, είναι το χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρολίου- διβινυλοβενζολίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σε πολλές συνθέσεις αλλά αποτέλεσε το ίδιο βάση, για ανάπτυξη των ρητινών. Ως προστατευτική ομάδα των αμινοξέων χρησιμοποιείται η Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (BOC), για να μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα με οξέα. Η ενεργοποίηση του καρβονυλίου, γίνεται με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης όπως το δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC) ή το N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (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, από την καρβοξυλική του ομάδα 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 για να απομακρυνθούν όσα από τα αντιδρώντα δεν αντέδρασαν, και παραπροϊόντα. Το καθαρό προϊόν επαναδιαλύεται, αποπροστατεύεται, ακυλιώνεται ξανά σε διάλυμα κ.ο.κ. Μετά από τη σύζευξη, η πεπτιδική σύνθεση μπορεί να συνεχιστεί με απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων. Όταν χρησιμοποιούνται αμινοξέα με τρεις λειτουργικές ομάδες, θεωρείται απαραίτητη η προστασία της 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.

1.2.2. Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους

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

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους με καθορισμένο βαθμό πολυμερισμού, μοριακή σύσταση και άρα συγκεκριμένες ιδιότητες, που να μπορούν να μιμηθούν επαρκώς τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών, περιλαμβάνει τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N-καρβοξυ ανυδριτών (N-carboxy anhydrides, NCAs) των α-αμινοξέων. Η συμβατική μέθοδος σύνθεσης σε στερεά φάση δεν μπορεί να εφαρμοστεί στη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, εξαιτίας των πολλών σταδίων αποπροστασίας και σύζευξης που την καθιστούν εξαιρετικά δύσκολη. Ακόμα, είναι σημαντικό να μπορούν να επιτευχθούν στενές κατανομές ($I \leq 1.2$), έτσι ώστε τα πολυπεπτίδια να αυτοοργανώνονται σε καλά καθορισμένες νανοδομές, μεταφέροντας με αυτό τον τρόπο τις επιθυμητές ιδιότητες στη μακρο-κλίμακα.^{3, 6, 7, 8}

1.2.3. Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)^{9, 10}

Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP), μαζί με το ριζικό και τον ανιοντικό πολυμερισμό, θεωρούνται τα πιο διαδεδομένα είδη πολυμερισμού για τη σύνθεση καλά καθορισμένων μακρομορίων. Ο ROP αποτελεί το είδος

πολυμερισμού κατά το οποίο η τελική μακρομοριακή αλυσίδα προέρχεται από ένα κυκλικό πρόδρομο μονομερές, κατόπιν διάνοιξης του δακτυλίου του. Αν και ο ROP θεωρείται ως επί το πλείστον αλυσωτός πολυμερισμός (προσθήκη του μονομερούς σε μία αναπτυσσόμενη αλυσίδα), υπάρχουν αρκετές πιο περίπλοκες περιπτώσεις που περιλαμβάνουν ενεργοποιημένα μονομερή. Εκτός συγκεκριμένων εξαιρέσεων, όπως είναι ο ROP των N-καρβοξυ ανυδριτών (ή ανυδρίτες Leuchs), ο ROP δε συνοδεύεται από την παραγωγή μικρών μορίων κατά τη διάδοση του πολυμερισμού, τα όποια πρέπει να απομακρύνονται, ώστε να προάγεται η αντίδραση.

Στα περισσότερα είδη πολυμερισμού, η κινητήρια δύναμη για να προαχθεί ο πολυμερισμός είναι η μετατροπή ενός πολλαπλού δεσμού σε απλό. Αντιθέτως, στον ROP κινητήρια δύναμη αποτελεί η αυξημένη τάση διάνοιξης δακτυλίου (ring strain) του μονομερούς και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να την συνοδεύουν. Ωστόσο, δεν μπορούν να πολυμεριστούν όλες οι κυκλικές ενώσεις. Για να γίνει αυτό εφικτό, θα πρέπει ο πολυμερισμός να ευνοείται τόσο κινητικά όσο και θερμοδυναμικά. Αφενός μεν τα μονομερή πρέπει να φέρουν μία κινητικά δραστική ομάδα που να μπορεί να αντιδράσει εύκολα και αφετέρου η τάση διάνοιξης του δακτυλίου πρέπει να είναι μεγάλη. Δακτύλιοι που περιέχουν 3, 4 ή 8, 9 άτομα έχουν μεγάλη τάση δακτυλίου και ευνοείται η διάνοιξή τους λόγω της μείωσης της ενθαλπίας που την συνοδεύει. Οι εξαμελείς δακτύλιοι είναι θερμοδυναμικά σταθεροί και κατά γενικό κανόνα δεν πολυμερίζονται, ενώ οι πενταμελείς και επταμελείς δακτύλιοι βρίσκονται ενδιάμεσα και τις περισσότερες φορές μπορούν να πολυμεριστούν. Τα συνηθέστερα κυκλικά μονομερή που πολυμερίζονται με διάνοιξη δακτυλίου περιέχουν κάποιο ετεροάτομο στο δακτύλιό τους, όπως O, S ή N, και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διάφορες οικογένειες ανάλογα με τις χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες που φέρουν. Επιπλέον, ανάλογα με το μηχανισμό με τον οποίο διαδίδεται ο πολυμερισμός ROP σε κάθε τύπο μονομερών διακρίνονται τέσσερα είδη: ο ριζικός ROP (RROP), ο ανιοντικός ROP (AROP), ο κατιοντικός ROP (CROP) και ο πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου (ROMP). Πιο συγκεκριμένα, οι κυριότερες ομάδες κυκλικών μονομερών, το μέγεθος του δακτυλίου τους, καθώς και το είδος του μηχανισμού με τον οποίο προάγεται ο ROP σε κάθε περίπτωση συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικές ομάδες κυκλικών μονομερών και ο συνήθης μηχανισμός πολυμερισμού ROP για κάθε κατηγορία.

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

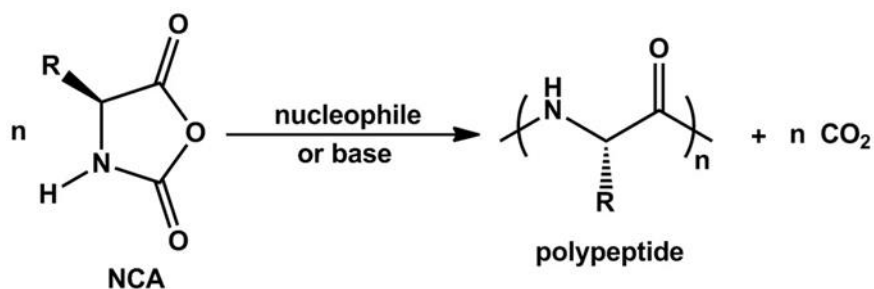
1.2.4. Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβοξυ-ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων ^{3, 6, 7, 8}

Τα τελευταία χρόνια έχει εκδηλωθεί μεγάλο ενδιαφέρον για τη σύνθεση πολυπεπτιδικών πολυμερών. Τα συνθετικά πολυπεπτίδια, ως μιμητές των φυσικών αναλόγων τους των πρωτεϊνών, έχουν τη δυνατότητα να αποκτούν σταθερές δευτεροταγείς δομές σε διάλυμα (β-πτυχωτή δομή, α-έλικα, κ.α.) εξαιτίας των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται. Αυτές οι δευτεροταγείς

δομές, σε συνδυασμό με τις υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων, συνεισφέρουν σημαντικά στην ικανότητα αυτοοργάνωσης των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Αυτή η ικανότητα των πολυπεπτιδίων να αυτο-οργανώνονται σε διάλυμα έχει ανοίξει νέους ορίζοντες για βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές αυτών των υλικών, όπως η χρήση τους ως μεταφορείς φαρμάκων, ως βιοαισθητήρες, ως διαγνωστικά μέσα, στη μηχανική ιστών κ.α.

Η σύνθεση πολυπεπτιδικών αλυσίδων μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλές μεθόδους, κάθε μία από τις οποίες παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η απευθείας σύνθεση πολύπλοκων συμπολυπεπτιδίων από μονομερή αμινοξέων αποτελεί μία απλή διαδικασία, όμως δεν μπορεί να αποδώσει πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους. Η καλύτερη, γρηγορότερη και πιο οικονομική τεχνική για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία και χωρίς ρακεμίωση των χειρόμορφων κέντρων αποτελεί ο πολυμερισμός των Νκαρβοξυ ανυδριτών (N-carboxy anhydrides NCAs) των α-αμινοξέων. Επιπλέον, ο μεγάλος αριθμός των NCAs (>200) που έχει συντεθεί, αντανακλά και στην εξαιρετική ποικιλία των διαφορετικών πολυπεπτιδικών δομών που μπορούν να παρασκευαστούν.

Ο πολυμερισμός των NCAs μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο αριθμό απαρχητών, όπως πρωτοταγείς αμίνες που είναι ισχυρότερα πυρηνόφιλα παρά βάσεις, τριτοταγείς αμίνες και αλκοξειδία μετάλλων που είναι ισχυρότερες βάσεις και μπορούν να δώσουν πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα, αλλά μπορεί επίσης να εκκινήσει με θέρμανση. Μέχρι σήμερα, έχει χρησιμοποιηθεί ένα μεγάλο εύρος μονομερών (και παραγώγων τους) για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων, ανάλογα με τις επιθυμητές ιδιότητες που επιλέγονται για τα τελικά πολυμερή. Η αντίδραση συνοδεύεται από την παραγωγή αερίου CO₂, και κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους. Μελέτες ιχνηθετημένων μονομερών με ¹⁴C αποδεικνύουν ότι το παραγόμενο CO₂ προέρχεται αποκλειστικά από τον άνθρακα C(2). Η γενική αντίδραση πολυμερισμού των NCAs για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων δίνεται στο Σχήμα 1.



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

Βέβαια, για να επιτευχθεί ο πολυμερισμός των NCAs των α-αμινοξέων απαιτείται όλα τα αντιδραστήρια και κυρίως τα μονομερή, τα οποία βρίσκονται σε στερεή μορφή, να καθαριστούν ενδελεχώς από προσμίξεις με επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις κάτω από υψηλό κενό (high-vacuum techniques). Χρησιμοποιώντας τις τεχνικές υψηλού κενού ο πολυμερισμός χαρακτηρίζεται ως ζωντανός (απαραίτητη προϋπόθεση για τη διατήρηση του ζωντανού χαρακτήρα του πολυμερισμού είναι η ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂) και τα πολυπεπίδια που λαμβάνονται διαθέτουν καλά καθορισμένες ιδιότητες.

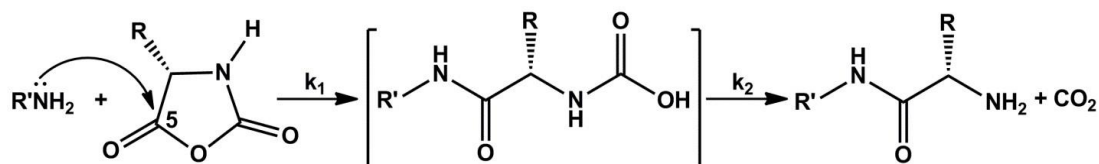
Με βάση το είδος του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί, υπάρχουν δύο κύριες μηχανιστικές πορείες ώστε να συντεθούν τα πολυπεπίδια. Ο πρώτος μηχανισμός είναι γνωστός ως “κανονικός μηχανισμός αμινών” (“normal amine mechanism”, NAM), ενώ ο δεύτερος είναι ο “μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς” (“activated monomer mechanism”, AMM).^{3, 7, 11, 12}

1.2.4.1. Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)

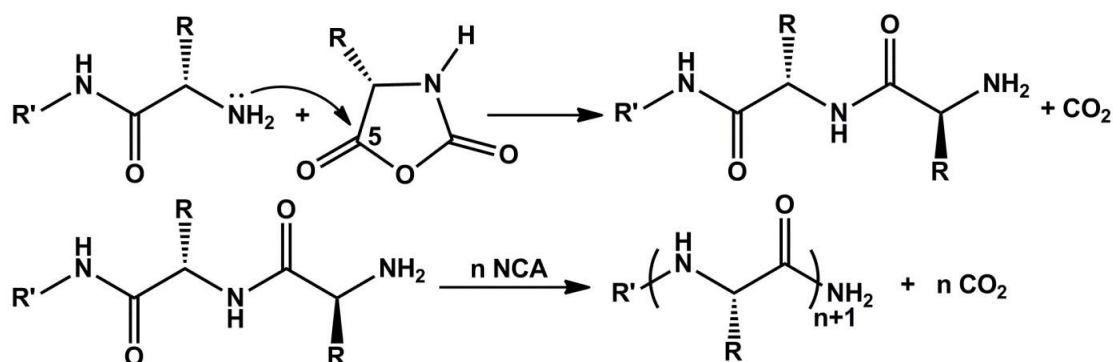
Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται γενικά για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση μη ιοντικών απαρχητών που διαθέτουν τουλάχιστον ένα ευκίνητο άτομο υδρογόνου, το οποίο μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα (του τύπου βάση-H), όπως είναι οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες (π.χ. *n*-εξυλαμίνη, διμεθυλαμίνη), οι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

και της διάδοσης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού φαίνονται στο Σχήμα 2.

Στάδιο Έναρξης:



Στάδιο Διάδοσης:



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

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2, κατά το στάδιο της έναρξης ο πυρηνόφιλος απαρχητής προσβάλλει το καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Το ενδιάμεσο καρβαμιδικό οξύ που παράγεται είναι θερμοδυναμικά ασταθές και συνεπώς αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια ελεύθερη αμινομάδα, η οποία είναι ικανή να προάγει τον πολυμερισμό. Στο στάδιο της διάδοσης η τελική αμινομάδα λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο, προσβάλοντας 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.

Ωστόσο, διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν διαπιστώσει ότι εκτός από την επιθυμητή αντίδραση που παίρνουμε με τις πρωτοταγείς αμίνες, υπάρχουν αποκλίσεις από το ζωντανό χαρακτήρα του ROP των NCAs, καθώς επίσης και από τη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλων μοριακών βαρών. Οι αποκλίσεις μπορεί να προκύψουν αν εκτός της προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 5' κατά το στάδιο της έναρξης, πραγματοποιηθεί παράπλευρη αντίδραση με προσβολή στη θέση 2' προς σχηματισμό ενός ακραίου ουρείδο οξέος (Σχήμα 3). Με αυτό τον τρόπο επέρχεται πρόωρος τερματισμός του πολυμερισμού, καθώς η αμίνη δεν μπορεί να αναγεννηθεί.



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

Η πιθανότητα πραγματοποίησης της αντίδρασης τερματισμού μειώνεται όσο ισχυρότερο πυρηνόφιλο είναι ο απαρχητής που θα χρησιμοποιηθεί. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν αποκλίσεις από το «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).

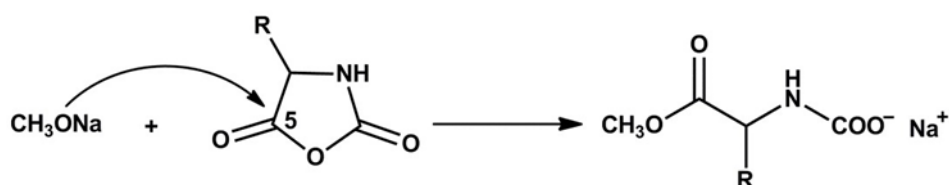
1.2.4.2. Μηχανισμός του Blout

Ο μηχανισμός του Blout (“Blout mechanism”) είναι μια «ιοντική» μορφή του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM). Το 1958 οι Idelson και Blout, μελέτησαν

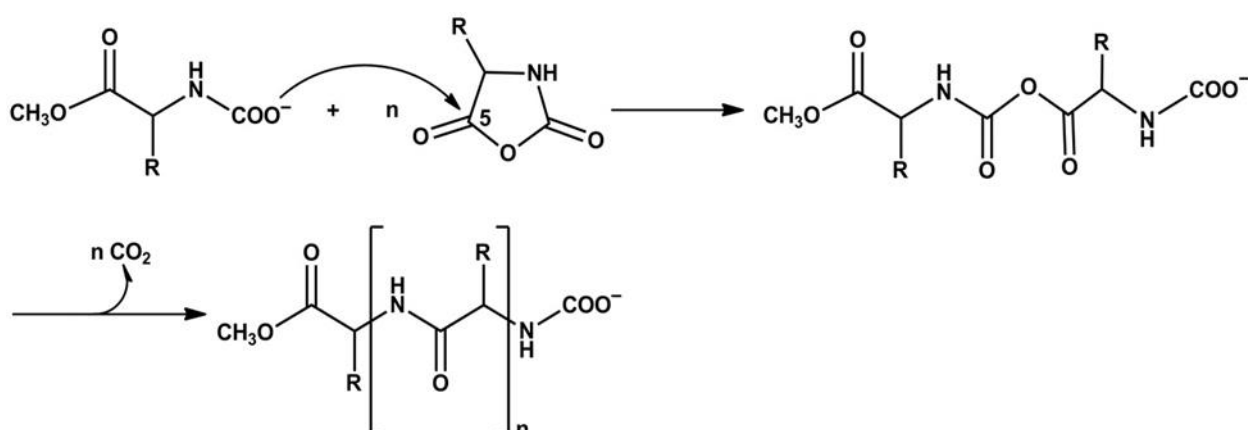
τον πολυμερισμό των NCAs μέσω ισχυρών βάσεων, χρησιμοποιώντας μεθοξείδιο του νατρίου.¹³

Κατά το στάδιο της έναρξης, το μεθοξείδιο του νατρίου προσβάλλει πυρηνόφιλα τον C(5) του N-καρβοξυ ανυδρίτη προκαλώντας διάνοιξη δακτυλίου. Στο στάδιο έναρξης του πολυμερισμού δε λαμβάνει χώρα παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα. Η διάνοιξη του δακτυλίου επέρχεται προς σχηματισμό του καρβαμιδικού ανιόντος, το οποίο είναι υπεύθυνο για την διάδοση του πολυμερισμού. Η αλυσίδα αναπτύσσεται με την προσθήκη του καρβαμιδικού ανιόντος σε ένα νέο μόριο ανυδρίτη προς σχηματισμό ενός ενδιάμεσου καρβαμικού-καρβόξυλο μικτού ανυδρίτη. Στη συνέχεια, απελευθερώνεται CO₂ προς σχηματισμό ενός νέου καρβαμιδικού ανιόντος (Σχήμα 4). Επειδή όμως τα ενεργά καρβαμιδικά άκρα είναι ασθενέστερα πυρηνόφιλα σε σχέση με τα αντίστοιχα αμινο-τελικά, ο μηχανισμός αυτός είναι λιγότερο πιθανός.

Στάδιο Έναρξης



Στάδιο Διάδοσης



Σχήμα 4: Στάδια έναρξης και διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό κατά Blout.

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

1.2.4.3. Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM)

Ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς βρίσκει εφαρμογή στους πολυμερισμούς που εκκινούνται από ισχυρές βάσεις ή τριτοταγείς αμίνες. Στο μηχανισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς, ο βασικός απαρχητής δε δρα ως απαρχητής αλυσίδας μέσω της πυρηνοφιλικότητάς 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. Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση είναι ότι το άζωτο στη θέση 3 του NCA πρέπει να μην είναι υποκατεστημένο και να διαθέτει ένα ευκίνητο υδρογόνο.

Στο στάδιο της προέναρξης ο απαρχητής δρα ως βάση δεσμεύοντας το όξινο Η του αζώτου στο δακτύλιο του μονομερούς. Ουσιαστικά, ο μηχανισμός έναρξης περιλαμβάνει την αποπρωτονίωση του δεσμού N-H του NCA από τον απαρχητή-βάση και την πυρηνόφιλη προσβολή του σχηματισθέντος ανιόντος σε ένα δεύτερο μόριο μονομερούς στον άνθρακα 5', ανοίγοντας το δακτύλιο και δίνοντας ένα διμερές. Το καρβαμιδικό ανιόν που σχηματίζεται πρωτονιώνεται από ένα τρίτο μόριο μονομερούς, σχηματίζοντας το ασταθές καρβαμιδικό οξύ, το οποίο και αποκαρβοξυλιώνεται, παράγοντας ενεργές αμινομάδες, ενώ αναγεννάται ο καταλύτης (NCA-) και εκλύεται CO₂.

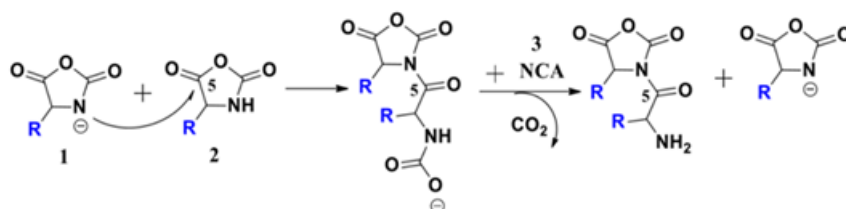
Κατά το στάδιο της διάδοσης το διμερές που σχηματίστηκε προσβάλλεται από ένα άλλο ανιόν NCA⁻ για να δώσει ένα τριμερές, κ.ο.κ., με τον NCA⁻ να αναγεννάται σε κάθε βήμα της αντίδρασης (Σχήμα 5). Όπως γίνεται αντιληπτό

ο AMM δεν περιλαμβάνει ενσωμάτωση τμήματος του απαραίτητη στην τελική αλυσίδα.

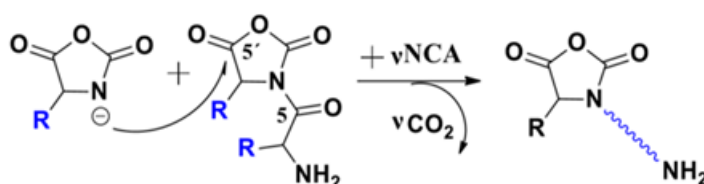
Στάδιο Προέναρξης:



Στάδιο Έναρξης:



Στάδιο Διάδοσης:



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

Επειδή ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM) διαδίδεται μέσω ανιόντων, έχει αποδειχθεί ότι είναι τουλάχιστον 100 φορές ταχύτερος από τον αντίστοιχο κανονικό μηχανισμό αμινών (NAM) και τα λαμβανόμενα πολυπεπτίδια έχουν υψηλό μοριακό βάρος. Επιπλέον, όμως, τα πολυμερή που συντίθενται μέσω αυτού του μηχανισμού έχουν μεγαλύτερη κατανομή μοριακών βαρών, λόγω του ότι το ανιόν NCA^- που αναγεννάται δεν έχει εκλεκτικότητα και μπορεί να αντιδράσει τόσο με τη μακρομοριακή αλυσίδα όσο και με ένα νέο μονομερές, δίνοντας έτσι προϊόντα με μεγάλη ανομοιογένεια. Τέλος, πληθώρα παράπλευρων αντιδράσεων, όπως αντιδράσεις διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας, ακόμα και ενδομοριακής κυκλοποίησης μπορούν να προκαλέσουν τερματισμό της πολυμερικής αλυσίδας. Είναι, λοιπόν, εμφανές

ότι ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν είναι επιθυμητός, καθώς ο πολυμερισμός αυτός ελέγχεται δύσκολα και απέχει πολύ από το να μπορεί χαρακτηριστεί ως ζωντανός.

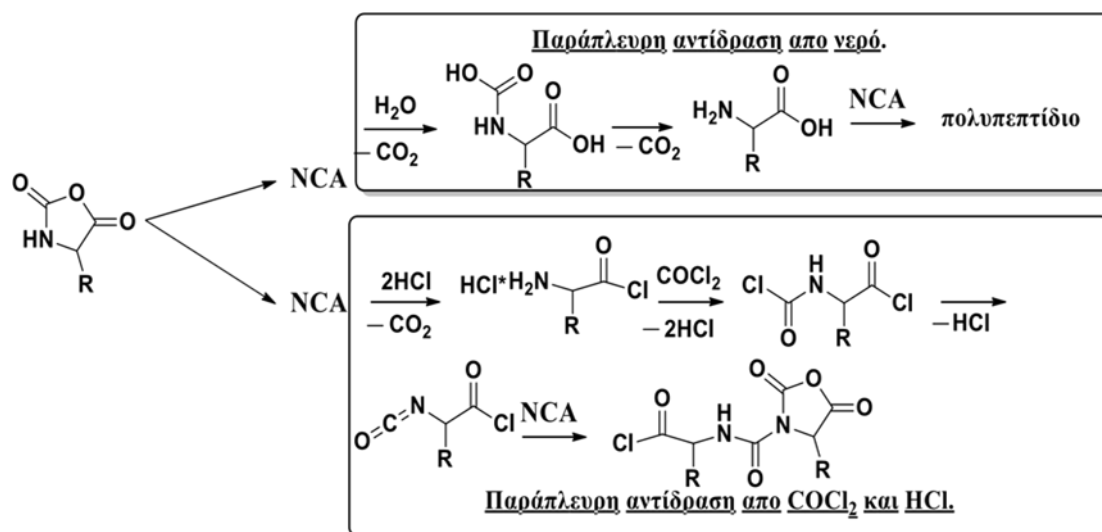
1.2.4.4. Σύνθεση πολυπεπτιδίων με πρωτοταγείς αμίνες και χρήση τεχνικών υψηλού κενού

Το 2004 η ομάδα των Iatrou, Aliferis, Hadjichristidis παρουσίασε το πρώτο ζωντανό σύστημα πολυμερισμού με πρωτοταγείς αμίνες ως απαρχητές με τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού (high vacuum techniques, HVT)^{3, 11, 12, 14, 15}. Οι τεχνικές αυτές είναι αναγκαίες εξαιτίας της ευαισθησίας των χρησιμοποιούμενων απαρχητών (π.χ. sec-Buli) και των μακροανιόντων που δημιουργούνται στα ίχνη του νερού, του CO₂, του οξυγόνου και άλλων δραστικών προσμίξεων. Η χρήση αυτών των τεχνικών είναι επίσης αποτελεσματική σε περιπτώσεις που η διάρκεια της αντίδρασης είναι αρκετά μεγάλη (π.χ. μερικές μέρες, ή λίγες εβδομάδες). Σε εναλλακτικές συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας, η καθαρότητα του συστήματος δεν είναι επαρκής ώστε να ληφθούν τα επιθυμητά πολυπεπτίδια.

Η τεχνική αυτή είναι γενική και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον πολυμερισμό υποκατεστημένων όσο και μη υποκατεστημένων μονομερών. Με χρήση πρωτοταγών αμινών ευνοείται αποκλειστικά ο κανονικός μηχανισμός αμινών NAM, 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 παραπάνω, 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 παρουσιάζουν εξαιρετική ευαισθησία σε θέρμανση, νερό και βάσεις. Αντιδρούν ταχύτατα ακόμα και σε στερεή φάση δίνοντας πολυπεπτιδικά προϊόντα μέχρι την τελική τους κατανάλωση. Αν δεν τηρηθούν τα πρότυπα καθαρότητας ακόμα και κατά τη σύνθεσή τους, δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις (Σχήμα 6). Έτσι, απαιτούνται προσεκτικές επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις υπό κενό (για να αποφευχθεί η μόλυνση από την ατμοσφαιρική υγρασία) για τον καθαρισμό των NCAs, οι οποίες πρέπει να προηγούνται του πολυμερισμού. Επιπλέον, μετά το πέρας της αντίδρασης, για να αποφευχθούν οι παράπλευρες αντιδράσεις, γίνεται ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου υδροχλωρίου αλλά και του τριφωσγενίου που δεν αντέδρασε με το πρόδρομο αμινοξύ, με τη χρήση του υψηλού κενού.



Σχήμα 6: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και στη συνέχεια πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνει ισοκυανάτο χλωρίδιο και μετέπειτα N-χλωροφορμυλοκαρβοξυ-ανυδρίτη.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μία παράμετρος κλειδί για τον επιτυχή ζωντανό πολυμερισμό των NCAs των α -αμινοξέων αποτελεί η απομάκρυνση του CO_2 που παράγεται κατά το στάδιο της διάδοσης. Η χρήση τεχνικών υψηλού κενού

προσφέρει τη συνεχή απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂, οδηγώντας την αντίδραση του πολυμερισμού προς τα προϊόντα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιάμεσου. Λόγω της μικρής διαλυτότητας του διοξειδίου του άνθρακα σε διαλύτες όπως το DMF, η αποκαρβοξυλίωση του καρβαμιδικού οξέος δε 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 τη χρήση ειδικών αντιδραστήρων πολυμερισμού, με όγκο τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερο από το εκλούόμενο διοξείδιο του άνθρακα, αποφεύγεται ο σχηματισμός καρβαμιδικών αλάτων με τα αμινο-τελικά 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-καρβοξυ ανυδριτών 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.

1.3. Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs)

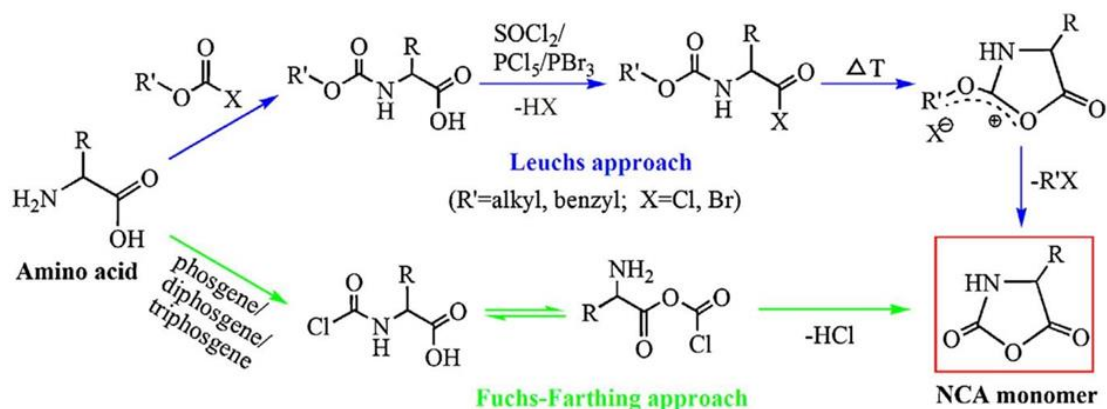
Οι N-καρβοξυ ανυδρίτες των α-αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Leuchs το 1906. Επίσης, ο Leuchs παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και κατάφερε να απομονώσει το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος περιλαμβάνει την αντίδραση κυκλοποίησης των προστατευμένων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

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

Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια με τα οποία η δημιουργία του αλογονιδίου οξέος θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο (SOCl_2) από τον ίδιο τον Leuchs. Μετέπειτα, δοκιμάστηκε το πενταχλωρίδιο του φωσφόρου (PCl_5), που ήταν δραστικότερο αλλά έδινε ως παραπροϊόν το αντίστοιχο οξειδίο και είχε επίδραση στην κρυστάλλωση του ανυδρίτη, ενώ το ισχυρότερο μέσο 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 $25\text{ }^\circ\text{C}$. 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 παραλλαγές της για το σχηματισμό διαφόρων NCAs.

Ωστόσο, η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την προετοιμασία των NCAs είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον Fuchs για την παρασκευή του NCA της N-φαινυλογλυκίνης και τροποποιήθηκε ακολούθως από τους Farthing, Coleman και Levy, ώστε να εφαρμοστεί στη σύνθεση ενός μεγάλου εύρους NCAs. Η ονομασία που έχει επικρατήσει βιβλιογραφικά για την προσέγγιση αυτή είναι μέθοδος “Fuchs-Farthing”. 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-χλωροκαρβόνυλο- αμινοξύ (συνήθως δεν απομονώνεται), το οποίο ακολούθως μετατρέπεται σε N-καρβοξυ ανυδρίτη, ενώ πραγματοποιείται και ταυτόχρονη παραγωγή HCl (Σχήμα 7). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται, διότι οι ανυδρίτες είναι διαλυτοί στους περισσότερους απρωτικούς πολικούς διαλύτες, ενώ τα ελεύθερα αμινοξέα είναι αδιάλυτα. Καθοριστικό ρόλο στην αντίδραση διαδραματίζουν ο διαλύτης, η

θερμοκρασία αλλά και ο χρόνος της αντίδρασης. Το 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 αρκετά αδρανές ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και προτιμάται για τη σύνθεση του NCA της γλυκίνης.



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

Το φωσγένιο όμως είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό και τοξικό αντιδραστήριο, επομένως η χρήση 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 δύο και τριών μορίων φωσγενίου. Στη 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 τη 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 τη διευκόλυνση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Τα τελευταία 15 χρόνια, έχει συντεθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός NCAs όλων των βασικών αμινοξέων αλλά και αρκετών παραγώγων τους. Αναγκαία κρίνεται η χρησιμοποίηση διάφορων προστατευτικών ομάδων για τις δραστικές πλευρικές ομάδες των αμινοξέων, έτσι ώστε να αποφεύγονται παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των μονομερών και του πολυμερισμού¹⁶⁻²⁸.

1.4. Νανοτεχνολογία και στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων μέσω πολυμερικών υλικών

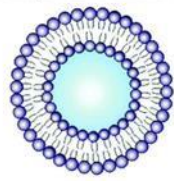
Η νανοτεχνολογία αναφέρεται στην επιστήμη και τεχνολογία που αναπτύσσεται σε κλίμακα μορίων και υπερμοριακών συστημάτων (νανοκλίμακα), καθώς και σε επιστημονικές αρχές και νέες ιδιότητες με στόχο την εις βάθος κατανόηση των λειτουργιών και των δυνατοτήτων της ύλης σε αυτή την κλίμακα μεγέθους. Ταυτόχρονα με την εξέλιξη και άλλων επιστημών, η νανοτεχνολογία αναμένεται να σημειώσει σημαντική πρόοδο την επόμενη δεκαετία στην ανάπτυξη βιοϊατρικών εφαρμογών, όπως για παράδειγμα τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων (drug delivery).^{29, 30, 31}

Πιο συγκεκριμένα, η ανάγκη που οδήγησε τους ερευνητές στη δημιουργία «μορίων-οχημάτων», που θα μεταφέρουν μία φαρμακευτική ουσία και θα την απελευθερώνουν στοχευμένα σε πάσχοντες ιστούς και κύτταρα, ξεπερνώντας τα εμπόδια που βάζει ο οργανισμός σε οτιδήποτε ξένο προς τον ίδιο, είναι η μη εκλεκτική κυτταροτοξικότητα που εμφανίζουν τα αντικαρκινικά φάρμακα, που

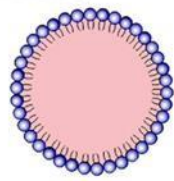
είναι η αιτία για τις σοβαρές παρενέργειες και τη χαμηλή ποιότητα ζωής των ασθενών. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζει το γεγονός ότι όλες οι νέες μοριακές οντότητες που εισάγονται στη φαρμακοβιομηχανία κρίνονται όχι για την ισχυρή τους δραστηριότητα, που είναι και το ζητούμενο, αλλά για τη διαλυτότητά τους στο νερό ή το χρόνο ζωής τους στο αίμα, καθώς όσο μεγάλη κι αν είναι η δραστηριότητα ενός μορίου, είναι πρακτικά άχρηστη όταν αυτό δεν μπορεί να κυκλοφορήσει στο αίμα. Η μεταφορά ενός φαρμάκου (drug delivery) μέσω ειδικά σχεδιασμένων υπερμοριακών δομών επιδιώκει να εξασφαλίσει την αύξηση του χρόνου παραμονής του στο αίμα, τη βελτίωση της διαλυτότητάς του, όταν πρόκειται για υδρόφοβο φάρμακο, τη μείωση της ανοσογονικότητας και τη μεταφορά του σε συγκεκριμένο στόχο. Η κυκλοφορία των δραστικών ουσιών για μακρό χρονικό διάστημα στο αίμα μπορεί να συντελέσει στην καλύτερη στόχευση, εφόσον αυξάνει τη συνολική ποσότητα του φορέα που συναντά το στόχο και τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκου και περιοχής δράσης του. Έτσι ο όρος «drug delivery» περιλαμβάνει το σχεδιασμό και τη σύνθεση μορίων με χημικά χαρακτηριστικά τέτοια, που να μπορέσουν να τα φέρουν όσο πιο κοντά στο κύτταρο-στόχο, αλλά και να τα καταστήσουν ικανά να εγκλωβίσουν ένα φάρμακο.^{32, 33, 34, 35, 36}

Το 1960 ήταν η πρώτη φορά που περιγράφηκαν τα λιπосώματα και προτάθηκαν ως μεταφορείς φαρμάκων και πρωτεϊνών. Σήμερα, η νανοτεχνολογία έχει κάνει άλματα στην ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων. Συγκεκριμένα, για το σκοπό αυτό έχουν σχεδιαστεί ανόργανα νανοσωματίδια, νανοσυσσωματώματα, πολυμερικά μικκύλια, κυστίδια, δενδριμερή κ.ά. (Εικόνα 7). Τα νανοσωματίδια ή τα μακρομοριακά συσσωματώματα μακράς κυκλοφορίας, όταν διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς, συσσωρεύονται σταδιακά στις παθολογικές θέσεις (καρκινικοί όγκοι, φλεγμονές κλπ) και βελτιώνουν ή ενισχύουν την αποδέσμευση των φαρμάκων στις περιοχές αυτές.³⁷

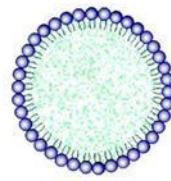
A Lipid-based Carriers



Liposome



Microemulsion



Solid-Lipid
Nanoparticle

B Polymeric Carriers



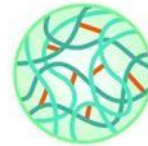
Linear chain



Solid Micro/ Nanoparticle



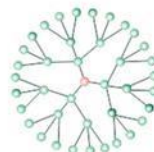
Micro/Nanogel



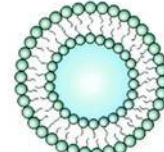
Micelle



Layer-by-Layer



Dendrimer



Polymersome

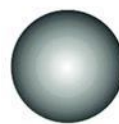
C Inorganic Carriers



Gold
Nanoparticle



Mesoporous Silica
Nanoparticle



Magnetic
Particle



Carbon
Spheres

Εικόνα 7: Κυριότεροι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών βασισμένοι σε πολυμερικά υλικά και ανόργανα νανοσωματίδια.

Ειδικότερα τα υλικά που δομούνται από πολυπεπτίδια, είναι ιδανικά για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων χάρη στη βιοσυμβατότητά τους, την αρχιτεκτονική της δομής τους και διότι είναι ικανά να σχηματίζουν χαρακτηριστικές δευτεροταγείς δομές. Τα αμφίφιλα πολυπεπτιδικά υλικά μπορούν να αυτο-οργανώνονται σε μια πληθώρα από διαφορετικές αρχιτεκτονικές μέσα από ετεροπολικές αλληλεπιδράσεις, έχοντας την ικανότητα να εγκλωβίζουν και να μεταφέρουν φάρμακα. Υιοθετώντας συγκεκριμένες διαμορφώσεις, όπως η α -έλικα ή το β -φύλλο, είναι πιο πιθανό να σχηματίσουν συγκεκριμένες επιθυμητές νανοδομές. Η αυτο-οργάνωση των αμφίφιλων πολυμερών μπορεί να καθοριστεί, αν ελεγχθούν παράγοντες όπως η αναλογία των υδρόφοβων-υδρόφιλων συστατικών, το μοριακό βάρος και η χημική φύση των πολυμερών.^{38, 39}

Ένα παράδειγμα νανοδομής που σχηματίζεται κατά την αυτο-οργάνωση συνθετικών ή φυσικών αμφιφιλικού τύπου μορίων σε υδατικά διαλύματα, είναι τα μικκύλια (micelles), τα οποία είναι δομές της μορφής κορώνας/πυρήνας και έχουν πάχος μόνο μερικά νανόμετρα. Έχουν αναδειχθεί ως δυνητικοί φορείς φαρμακευτικών ουσιών αδιάλυτων στο νερό εξαιτίας της ικανότητάς τους να εγκλωβίζουν τις ουσίες αυτές στο υδρόφοβο τμήμα τους λόγω χημικής συγγένειας, ενώ ταυτόχρονα τις προστατεύουν με τις εξωτερικές υδατοδιαλυτές πολυμερικές αλυσίδες που διαθέτουν, αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Επιπλέον, έχουν μικρό σχετικά μέγεθος (έως 200 nm), οπότε αποτρέπουν την καταστροφή τους από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και μπορούν να παραμείνουν στο αίμα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα παρέχοντας σταδιακή συσσωμάτωση της δραστικής ουσίας στην επιθυμητή περιοχή. Επίσης, είναι δυνατό να παρασκευασθούν σε σχετικά μεγάλες ποσότητες εύκολα και επαναλήψιμα. Ωστόσο, η πιο σημαντική εφαρμογή τους είναι η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων χωρίς την εκδήλωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών που μπορεί να εκδηλωθούν στον ανθρώπινο οργανισμό, αν αυτά εισαχθούν ελεύθερα στο κυκλοφορικό σύστημα. Η ενσωμάτωση των φαρμάκων στις μικκυλιακές δομές πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της διαπίδωσης (dialysis), είτε με τη μέθοδο της διαλυτοποίησης-εξάτμισης ή μέσω της μεθόδου σχηματισμού λεπτών υμενίων (thin-film).^{40, 41}

1.5. Πολυπεπτιδικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποκρινόμενα σε εξωτερικά ερεθίσματα⁴²⁻⁴⁴

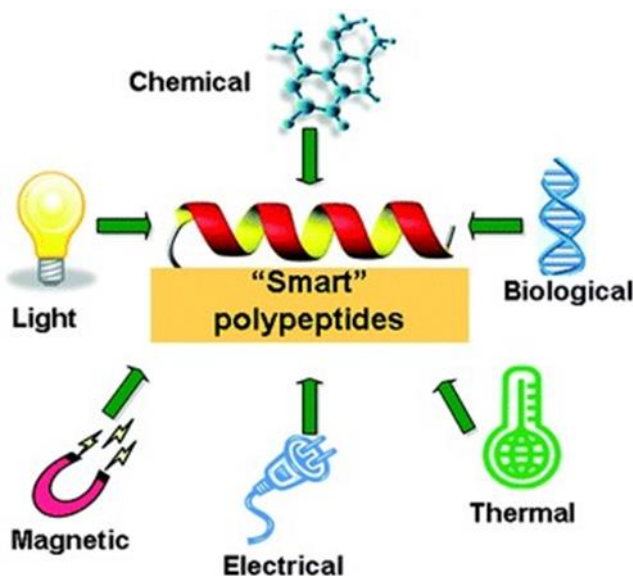
Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη πολυμερών έχει στραφεί σε υλικά τα οποία μπορούν και αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (π.χ. pH, θερμοκρασία, δυναμικό οξειδοαναγωγής, φως, ιοντική ισχύς), με αποτέλεσμα να υφίστανται σημαντικές και άμεσες φυσικές ή χημικές μεταβολές και να δημιουργούν πολυμοριακά συσσωματώματα, όπως σφαιρικά και κυλινδρικά μικκύλια, κυστιδιακές δομές (vesicles), σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών και «σχιζοφρενικά» μικκύλια. Το ενδιαφέρον για αυτά τα πολυμερή έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια λόγω των δυνητικών εφαρμογών στη

βιομηχανία των χρωμάτων, των καλλυντικών, τον καθαρισμό του νερού, αλλά κυριότερα στο πεδίο της βιοϊατρικής.

Σε αυτά τα πολυμερή έχουν δοθεί διάφορες ονομασίες όπως αποκρίσιμα, έξυπνα και περιβαλλοντικά ευαίσθητα (ενώ στα αγγλικά επικρατεί ο όρος “stimuli-responsive”). 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 δεσμών, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν ανιχνεύσιμες αλλαγές. Η απόκριση μπορεί να είναι αναστρέψιμη ή όχι, ανάλογα σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη στρατηγική.

Υπάρχουν πολλά διαφορετικά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την απόκριση των πολυμερών και μπορούν να ταξινομηθούν σε φυσικά ερεθίσματα (physical stimuli) (θερμοκρασία, φως), χημικά ερεθίσματα (chemical stimuli) (διάφορα μόρια σηματοδότησης) ή βιολογικά ερεθίσματα (biological stimuli). Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και η μηχανική τάση, επηρεάζουν τους θερμοδυναμικούς παράγοντες (ενθαλπία και εντροπία) και μεταβάλουν τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Τα χημικά ερεθίσματα, όπως το pH και η ιοντική ισχύς, αλλάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων ή μεταξύ των αλυσίδων και του διαλύτη σε μοριακό επίπεδο. Τα βιολογικά αποκρινόμενα πολυμερή (ένζυμα, υποδοχείς) σχετίζονται με την πραγματική λειτουργία των μορίων: π.χ. ενζυμικές αντιδράσεις, αναγνώριση μορίων. Επιπλέον, ορισμένα πολυμερικά συστήματα έχουν την ικανότητα να είναι πολλαπλά αποκρίσιμα (multi-stimuli responsive), καθώς συνδυάζουν την αποκρισιμότητα σε δύο (dual stimuli-responsive) ή περισσότερα εξωτερικά ερεθίσματα, για παράδειγμα είναι θερμο-ευαίσθητα αλλά και αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH. Η μεγάλη ποικιλομορφία των πλευρικών ομάδων των πολυπεπτιδίων, τα καθιστά άριστα πολυμερή που διαθέτουν την ικανότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Για το λόγο αυτό βρίσκουν τεράστια απήχηση σε εφαρμογές που απαιτείται η χρήση «έξυπνων» αποκρινόμενων υλικών, επιλέγοντας αντίστοιχα αμινοξέα που να εξυπηρετούν τις εκάστοτε ανάγκες (Εικόνα 8).

Αυτές οι αποκρίσεις των πολυμερικών, και ειδικότερα των πολυπεπτιδικών συστημάτων, είναι πολύ χρήσιμες σε βιολογικές εφαρμογές, όπως στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, στη βιοτεχνολογία και στη χρωματογραφία.



Εικόνα 8: Ταξινόμηση των αποκρινόμενων πολυπεπτιδίων.

1.5.1. Θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή

Τα πολυμερή που αποκρίνονται στη θερμοκρασία έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον στις εφαρμογές βιοτεχνολογίας, επειδή ορισμένες ασθένειες εμφανίζουν αλλαγές θερμοκρασίας. Τα πολυμερή αυτά 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. Η θερμοκρασία αυτή είναι γνωστή ως θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου (volume phase transition temperature, VPTT), όπου προκαλείται ξαφνική αύξηση ή μείωση του μεγέθους του σωματιδίου, καθώς προκαλείται η διακοπή των ενδο- και διαμοριακών ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, που οδηγεί σε κατάρρευση ή επέκταση αλυσίδας. Είναι απαραίτητο η θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου των πολυμερικών νανοσωματιδίων να είναι μεγαλύτερη από τη φυσιολογική θερμοκρασία του οργανισμού (37 °C), όπως η θερμοκρασία που αναπτύσσουν τα καρκινικά

κύτταρα που φλεγμαίνουν (41 °C), έτσι ώστε τα κύτταρα αυτά να αποτελέσουν στόχο.⁴²

Χαρακτηριστικά παραδείγματα θερμοαποκρινόμενων πολυπεπτιδίων αποτελούν μία σειρά από αμφίφιλα υβριδικά συμπολυμερή που συντέθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Jeong του γενικού τύπου PEO-*b*-P(Ala-co-Phe), PEO-*b*-PPhe και PEO-*b*-PAla.^{45, 46} Από τις συγκεκριμένες μελέτες βρέθηκε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας οι δομές αυτές υφίστανται μεταβολή από διάλυμα σε gel. Η συσσωμάτωση των μικκυλίων και η αλλαγή της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων, είναι πιθανώς οι λόγοι που οδηγούν σε αυτή τη μετατροπή. Η εμφάνιση τέτοιων ιδιοτήτων σε συστήματα πολυπεπτιδίων, αποτέλεσε έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη μιας πληθώρας συστημάτων.

Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η ερευνητική ομάδα του κ. Ιατρού συνέθεσε και διαπίστωσε ότι το τριπολυμερές πολυ(αιθυλενοξειδίο)-*b*-πολυ(L-ιστιδίνη) (PEO-*b*-PHis) αποκρίνεται και σε μεταβολές της θερμοκρασίας εκτός των μεταβολών του pH.

1.5.2. pH-αποκρινόμενα πολυμερή

Το pH είναι μια σημαντική περιβαλλοντική παράμετρος για τις βιοϊατρικές εφαρμογές, επειδή οι αλλαγές στο pH συμβαίνουν σε πολλά παθολογικά διαμερίσματα. Για παράδειγμα, οι περισσότεροι καρκινικοί ιστοί, καθώς είναι ιστοί που φλεγμαίνουν, παρουσιάζουν όξινο pH και αρκετά χαμηλότερο από αυτό που έχουν οι φυσιολογικοί ιστοί. Συγκεκριμένα, το pH στο εξωτερικό περιβάλλον ενός καρκινικού κυττάρου είναι περίπου 6.5, συνεπώς πιο όξινο από τους γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς που έχουν pH=7.4. Το pH στο εσωτερικό του καρκινικού κυττάρου, και συγκεκριμένα στα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα, είναι 5.0 έως 5.5, άρα πιο χαμηλό σε σχέση με το pH του κυτταρίου. Επομένως, έχει μεγάλη πρακτική σημασία αυτός ο παράγοντας για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, που θα αποκρίνονται στις αλλαγές του pH. Δηλαδή, πιθανώς θα παρουσιάζουν αύξηση του μεγέθους τους σε συγκεκριμένη τιμή pH, ώστε να

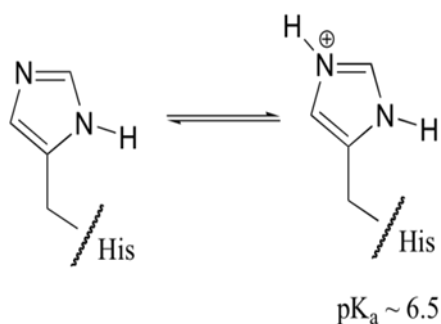
αποδεσμεύουν σε συγκεκριμένο σημείο του σώματος το φάρμακο που μεταφέρουν.^{47, 48, 49}

Τα πολυπεπτίδια που εμφανίζουν ευαισθησία στο pH αποτελούνται από μονομερή των οποίων οι πλευρικές ομάδες μπορούν να ιοντιστούν, 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 ($pKa = -\log K_a$). 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. αμινομάδες), 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.^{48, 50}

Αξίζει να αναφερθεί η L-ιστιδίνη, καθώς παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον ως αμινοξύ. Το πολυμερές πολυ(L-ιστιδίνη) (PHis) αποτελεί ιδανικό πολυπεπτίδιο ως συστατικό σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, καθώς εκτός από τη θερμοκρασία αποκρίνεται και σε μεταβολές του pH. Η ξεχωριστή ιδιότητα που διαθέτει είναι το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων στο μη υποκατεστημένο άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου, το οποίο προσδίδει στο μόριο $pKa \sim 6.5$ και κατά συνέπεια pH-αποκρισιμότητα. Επομένως, ανάλογα με τις μεταβολές του pH μπορεί να πρωτονιώνεται ή να αποπρωτονιώνεται. Πρακτικά, αυτό για ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων σημαίνει ότι σε $pH \sim 6.5$, δηλαδή το pH των

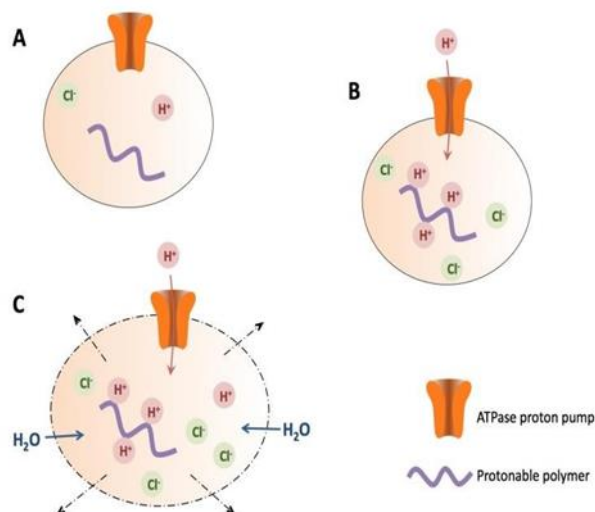
καρκινικών κυττάρων, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της ιστοιδίνης πρωτονιώνεται και προκαλείται διόγκωση στο σύστημα λόγω της αλλαγής της δευτεροταγούς δομής του πολυπεπτιδίου και της μετατροπής του από υδόφοβο σε υδρόφιλο συστατικό, πράγμα που οδηγεί στην αποδιοργάνωση της δομής και άρα στην απελευθέρωση του φαρμάκου (Εικόνα 9). Αντίθετα, στους υγιείς ιστούς που έχουν τιμή $\text{pH}=7.4$, το μόριο είναι αποπρωτονιωμένο (υδόφοβο) και απολύτως σταθερό. Επιπλέον, η πολυ(L-ιστιδίνη) μπορεί να φτιάχνει σταθερά πολυϊονικά συμπλέγματα με αρνητικά φορτισμένα μόρια, όπως είναι το DNA ή διάφορα ένζυμα, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Το γεγονός ότι σχηματίζει μη τοξικά πολυμερή, την κάνει ένα ιδανικό μέσο για να χρησιμοποιηθεί για βιολογικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς.^{48, 51}



Εικόνα 9: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης).

Μια ακόμη πολύ ενδιαφέρουσα ιδιότητα που εμφανίζει τόσο η ιστοιδίνη όσο και η πολυ(L-ιστιδίνη), είναι το λεγόμενο “proton sponge effect”, κατά το οποίο ένα πολυμερές εισέρχεται στο κύτταρο με τη διαδικασία της ενδοκύτωσης και στη συνέχεια παγιδευεται στο ενδόσωμα. Με τη μεμβράνη των ενδοσωμάτων είναι συνδεδεμένη μία αντλία πρωτονίων, η οποία τα εφοδιάζει συνεχώς με πρωτόνια, ειδικά όταν αντιληφθεί την ύπαρξη ξένου σώματος μέσα σε αυτά. Ένα πολυμερές όπως η πολυ(L-ιστιδίνη), που έχει τη δυνατότητα να πρωτονιωθεί, λαμβάνει αυτά τα πρωτόνια και έτσι η αντλία συνεχίζει να στέλνει πρωτόνια, μέχρι να επιτευχθεί μείωση του pH . Η δράση αυτή της αντλίας, συνοδεύεται από παθητική είσοδο ιόντων χλωρίου, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ιόντων άρα και την εισροή νερού. Η υψηλή ωσμωτική πίεση

οδηγεί σε διόγκωση και τελικά σε ρήξη των ενδοσωμάτων, απελευθερώνοντας όλο το περιεχόμενο στο κυτταρόσολιο (Εικόνα 10).⁵²



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

1.5.3. Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε Οξειδοαναγωγικούς Παράγοντες

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

Τα νανοσωματίδια μπορούν να είναι δικτυωμένα, είτε στον πυρήνα, είτε στο κέλυφός τους, ή και στα δύο. Τα νανοσωματίδια που είναι δικτυωμένα και στο κέλυφος, ουσιαστικά ενισχύουν ακόμα περισσότερο τη σταθερότητα του συστήματος, σχηματίζοντας ένα διπλό αμυντικό σύστημα. Η δικτύωση μπορεί να επιτευχθεί είτε χρησιμοποιώντας μικρά μόρια μέσω των οποίων

δημιουργείται το δίκτυο, είτε προκαλώντας τη δικτύωση μέσω UV ακτινοβολίας σε συγκεκριμένα συστήματα που έχουν αυτή τη δυνατότητα.

Βέβαια, υπάρχουν και ορισμένα μειονεκτήματα που συνδέονται με τη δικτύωση, όπως είναι η περιπλοκότητα των τρόπων με τους οποίους λαμβάνει χώρα, όσο και η αποδοτικότητα της αντίδρασης.⁵³

Μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους δικτύωσης είναι η χρήση δισουλφιδικών δεσμών. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί (S–S) είναι ομοιοπολικοί δεσμοί, οι οποίοι προκύπτουν από την οξειδωση δύο σουλφυδριλομάδων (ή θειόλες, –SH). Τα δύο βασικότερα χαρακτηριστικά του δισουλφιδικού δεσμού, που τον καθιστούν ελκυστικό για πολλά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, είναι η υψηλή σταθερότητά του στο πλάσμα του αίματος και η αντιστρεψιμότητά του. Τα δικτυωμένα συστήματα που φέρουν δισουλφιδικούς δεσμούς, καθίστανται αυτόματα αποκρίσιμα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες (redox-responsive), λόγω της ιδιότητας των δεσμών αυτών να οξειδώνονται και να ανάγονται ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν.⁵⁴

Στην περίπτωση των «έξυπνων» συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, βασικός στόχος είναι οι δισουλφιδικοί δεσμοί να ανάγονται και συνεπώς να καταστρέφονται μέσα ή κοντά στο κύτταρο-στόχο, έτσι ώστε να επηρεαστεί η αυτο-οργάνωσή τους και να απελευθερώσουν εκλεκτικά το φάρμακο στη συγκεκριμένη περιοχή.^{55, 56}

1.6. Προστατευτικές ομάδες

Η συνθετική οργανική χημεία βασίζεται στην χρήση αντιδραστηρίων και καταλυτών για την επίτευξη του σχηματισμού νέων δεσμών και απαιτείται η χρήση των κατάλληλων προστατευτικών ομάδων, για την αποφυγή σχηματισμού παραπροϊόντων και παράπλευρων αντιδράσεων. Μια στρατηγική σύνθεσης μπορεί να αποτύχει εάν δεν επιλεγθούν οι σωστές προστατευτικές ομάδες.

Η πρώτη προστατευτική ομάδα που εισάχθηκε στην σύγχρονη χημεία είναι η βενζυλοξυκαρβόνυλ- (Z), που αναπτύχθηκε από τους Ζέρβα και Bergmann το

1932. Η Z ομάδα ικανοποιεί τα κύρια χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει μια προστατευτική ομάδα:

- Να αντιδρά εύκολα και με μεγάλη απόδοση κάτω από συνθήκες που δεν προκαλούν χημικές ή στερεοχημικές μεταβολές στο μόριο.
- Να παρουσιάζει σταθερότητα στις συνθήκες της πεπτιδικής σύνθεσης.
- Να μπορεί να αφαιρεθεί εύκολα και εκλεκτικά και με τρόπο που δεν προκαλεί δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις στο πεπτίδιο, να μην πραγματοποιείται ρακεμίωση.

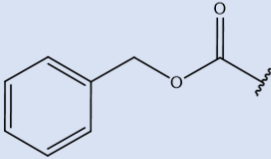
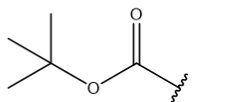
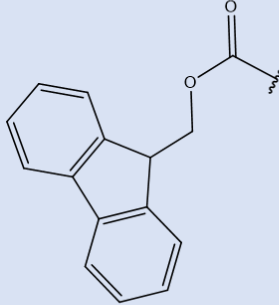
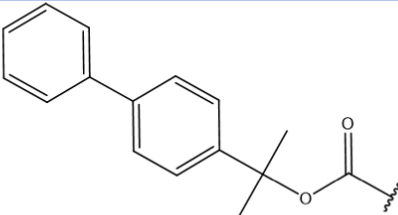
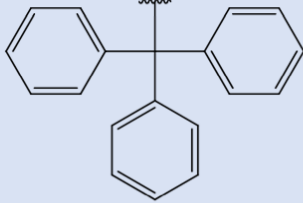
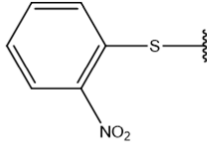
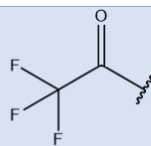
Θεμελιώδης ήταν και η συνεισφορά του Barany και των συνεργατών του, όταν περιέγραψαν την έννοια της ορθογωνικότητας. Όταν δύο ή περισσότερες προστατευτικές ομάδες ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες και απομακρύνονται με διαφορετικούς μηχανισμούς και άρα μπορούν να απομακρυνθούν με οποιαδήποτε σειρά και παρουσία των υπολοίπων, αναφερόμαστε σε ορθογωνική προστασία. Αυτού του τύπου η προστασία είναι πιο ήπια, καθώς η αποπροστασία κατευθύνεται από διαφορετικούς μηχανισμούς απομάκρυνσης παρά από τις ταχύτητες αντίδρασης. Μετά το πρωτοπόρο έργο των Ζέρβα και Bergmann, η ανάπτυξη νέων προστατευτικών ομάδων συνδέθηκε με την συνθετική χημεία. Έτσι, οι προστατευτικές ομάδες που αρχικά αναπτύχθηκαν για την πεπτιδική σύνθεση, γρήγορα υιοθετήθηκαν για την προστασία δομικών ομάδων που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση μη πεπτιδικών μορίων.

Οι προστατευτικές ομάδες, οι οποίες παραμένουν μέχρι να ολοκληρωθεί η σύνθεση χαρακτηρίζονται ως μόνιμες, ενώ εκείνες που απομακρύνονται νωρίτερα παροδικές. Στην πεπτιδική σύνθεση διακρίνονται σε αμινοπροστατευτικές, καρβοξυπροστατευτικές και εκείνες που χρησιμοποιούνται για την προστασία των πλευρικών λειτουργικών ομάδων των αμινοξέων. Η επιλογή των προστατευτικών ομάδων είναι πρωταρχικής σημασίας για την επιτυχία της σύνθεσης.^{57, 58, 59, 60}

1.6.1. Προστασία της α-αμινομάδας

Η παραλαβή του επιθυμητού πεπτιδίου, αλλά και η ικανοποιητική απόδοση της πεπτιδικής σύνθεσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προστασία της α-αμινομάδας. Οι αμινο-προστατευτικές ομάδες μειώνουν τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα του αζώτου της αμινομάδας, ώστε να αποφεύγεται η συμμετοχή της σε διάφορες παράπλευρες αντιδράσεις. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με μηχανισμούς έλξης ηλεκτρονίων μέσω μεσομέρειας (όπως συμβαίνει στις ουρεθανικού τύπου ομάδες), είτε μέσω επαγωγικού φαινομένου, είτε με στερεοχημική παρεμπόδιση (όπως συμβαίνει στις τριφαινυλο-μέθυλο τύπου ομάδες, π.χ. τριτυλομάδα). Η επιλογή της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας της α-αμινομάδας ενός αμινοξέος είναι πολύ σημαντική για την πεπτιδική σύνθεση. Ειδικά στη σύνθεση σε στερεή φάση, η αναγκαιότητα της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας είναι πολύ σημαντική αφού εκεί είναι δύσκολος ο διαχωρισμός του επιθυμητού πεπτιδίου από τα πεπτιδικής φύσεως παραπροϊόντα. Η προστασία της α-αμινομάδας πρέπει να είναι παροδική και η αποπροστασία της εκλεκτική. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η προστασία της α-αμινομάδας πρέπει να είναι παροδική και να απομακρύνεται εύκολα, γρήγορα και εκλεκτικά όταν η σύζευξη ολοκληρωθεί, έτσι ώστε να προκύψει η ελεύθερη αμινομάδα, με την οποία θα αντιδράσει η καρβοξυλομάδα του επομένου αμινοξέος. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που παίζει ρόλο στην επιλογή είναι η σταθερότητα της προστατευτικής ομάδας, έτσι ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών ή ολιγομερών του εκάστοτε προς σύζευξη αμινοξέος, με αποτέλεσμα τη σύζευξη ολιγομερών στην πεπτιδική αλυσίδα. Οι κυριότερες αμινοπροστατευτικές ομάδες αναγράφονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Κυριότερες προστατευτικές ομάδες της α-αμινομάδας.

Όνομασία	Χημικός τύπος	Συνθήκες αποπροστασίας
Βενζυλοξυκαρβόνυλ-ομάδα (Z)		<ol style="list-style-type: none"> 1) H₂/Pd 2) HBr/AcOH 3) Na/liq. NH₃
tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-ομάδα (BOC)		<ol style="list-style-type: none"> 1) TFA, DCM 2) 4M HCl σε διοξάνη 3) 2M MeSO₄ σε διοξάνη 4) 1M TMS-Cl, 1M φαινόλη, DCM
9-Φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ-ομάδα (FMOC)		<ol style="list-style-type: none"> 1) 20% πιπεριδίνη, DMF 2) 1-5% DBU, DMF 3) Μορφολίνη 4) NH₃
2-(4-διφαινυλ)-ισοπροποξυκαρβόνυλ-ομάδα (BPOC)		0.2-0.5% TFA
Τριφαινυλομεθυλ-ομάδα (τρίτυλο-ομάδα) (Ttt)		<ol style="list-style-type: none"> 1) 1% TFA, DCM 2) 0.1% HOBT, TFE 3) 0.2% TFA, 1% H₂O, DCM 4) 3% TCA, DCM
2-νιτροφαινυλοσουλφενυλ-ομάδα (Nps)		<ol style="list-style-type: none"> 1) Αραιά δ/ματα HCl-CHCl₃-AcOH 2) 2-μερκαπτοπυριδίνη-AcOH-MeOH 3) Ni Raney στήλη, DMF
Τρίφθορο-ακέτυλ-ομάδα (TFA)		20:1 MeOH/H ₂ O K ₂ CO ₃ , NaOH

Οι ομάδες «ουρεθανικού τύπου» είναι μια μεγάλη κατηγορία προστατευτικών ομάδων, οι οποίες όταν προσδένονται στην αμινοομάδα, την μετατρέπουν σε αλκοξυκαρβόνυλ-αμινο παράγωγα που ονομάζονται ουρεθάνες ή καρβαμίδια. Τα παράγωγα αυτά είναι και αμίδια και εστέρες. Ως αμίδια έχουν μειωμένο πυρηνόφιλο χαρακτήρα στο άζωτο, ενώ σαν εστέρες μπορούν να μετατραπούν σε καρβαμιδικά οξέα. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει η tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-ομάδα (BOC) και η 9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ-ομάδα (FMOC). Οι ομάδες FMOC και BOC είναι από τις πλέον χρησιμοποιούμενες ουρεθανικού τύπου, ενώ από τις μη ουρεθανικές σημαντικότερη είναι η τριφαίνυλομεθυλ-ομάδα, ή αλλιώς τρίτυλο-ομάδα (Ttt). Πολύ σημαντική είναι, όπως προαναφέρθηκε, και η βενζυλοξυκαρβόνυλ (Z) ομάδα, που εισάχθηκε από τους Ζέρβα και Bergmann το 1932.

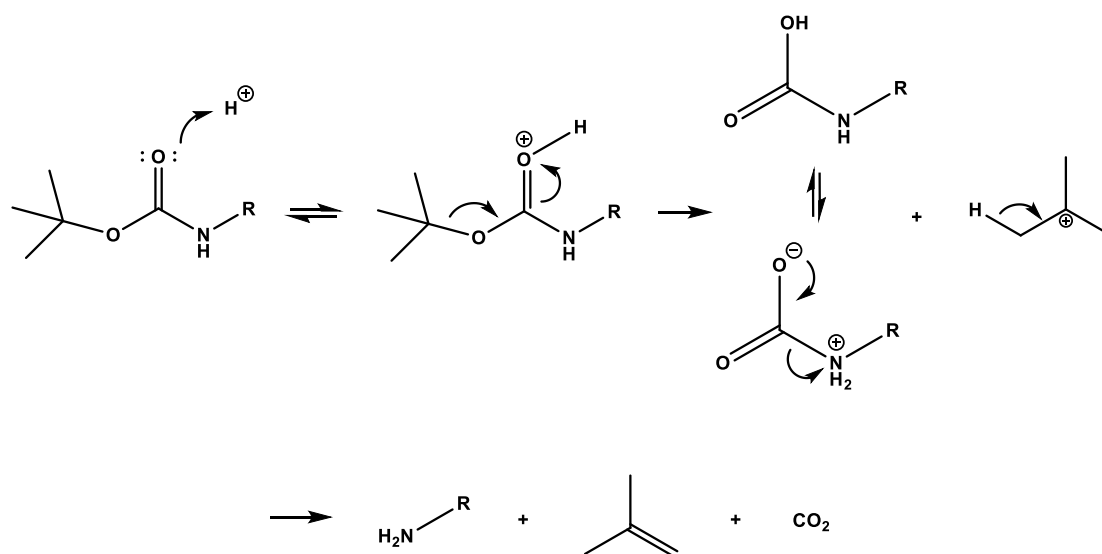
- **Βενζυλοξυκαρβόνυλ-ομάδα (Z)**

Η πρώτη ουρεθανικού τύπου ομάδα που χρησιμοποιήθηκε από τους Bergmann και Ζέρβα το 1932 είναι η βενζυλοξυκαρβόνυλ-ομάδα (Z). Εισάγεται εύκολα με επίδραση βενζυλοξυκαρβονυλοχλωριδίου (Z-Cl) σε αλκαλικές συνθήκες. Απομακρύνεται εύκολα με καταλυτική υδρογόνωση και επίδραση ισχυρών οξέων όπως HF και HBr/AcOH. Μειονεκτήματα στη χρήση της είναι ότι δεν μπορεί να απομακρυνθεί με καταλυτική υδρογόνωση σε πεπτιδία που περιέχουν κυστεΐνη και μεθειονίνη, διότι το θείο που περιέχουν αυτά τα αμινοξέα δηλητηριάζει τον καταλύτη, ενώ κατά την απομάκρυνσή της με ισχυρά οξέα, τα βενζυλοκατιόντα που δημιουργούνται προσβάλλουν τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων τυροσίνη, τριπτοφάνη και μεθειονίνη.

- **Tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-ομάδα (BOC)**

Το 1957 παρουσιάστηκε από τους McKay και Albertson και χρησιμοποιήθηκε ως κύρια προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας στα χρόνια που ακολούθησαν, κατά την ανάπτυξη της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση. Η BOC-ομάδα εισάγεται εύκολα κυρίως με δι-tert-βουτυλεστέρα του διπτανθρακικού οξέος (BOC₂O). Η BOC ομάδα είναι σταθερή κατά την

καταλυτική υδρογόνωση και απομακρύνεται πιο εύκολα με επίδραση οξέων σε σχέση με τη Z ομάδα. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην πεπτιδική σύνθεση σε συνδυασμό με ομάδες που απομακρύνονται σε αυτές τις συνθήκες. Η απομάκρυνσή της γίνεται με επίδραση οξέων όπως TFA ή HCl σε διάφορους οργανικούς διαλύτες. Ο μηχανισμός απομάκρυνσης της BOC ομάδας παρουσιάζεται στο παρακάτω Σχήμα.

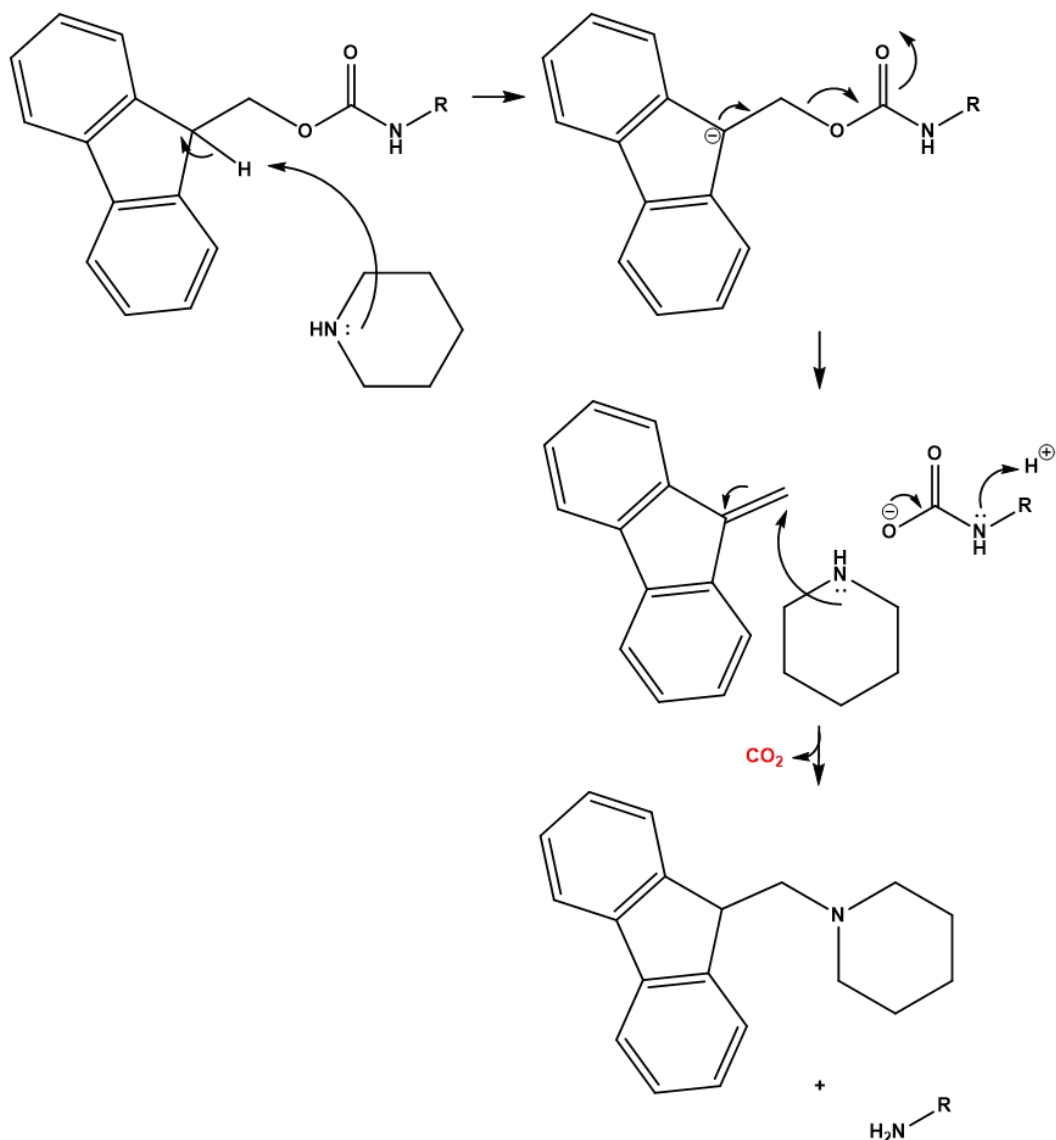


Σχήμα 8: Μηχανισμός απομάκρυνσης της BOC ομάδας σε όξινες συνθήκες.

- **9-Φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ-ομάδα (FMOC)**

Το 1970 παρουσιάστηκε μια νέα ουρεθανικού τύπου ομάδα, η 9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ-ομάδα (FMOC) από τους Carpino & Han. Η FMOC ομάδα είναι σταθερή στα οξέα και απομακρύνεται με την επίδραση βάσεων. Επομένως, η προστασία πλευρικών ομάδων FMOC-αμινοξέων απαιτεί προστατευτικές ομάδες που είναι σταθερές σε βάσεις και απομακρύνονται σε όξινες συνθήκες (π.χ. TFA). Η αποπροστασία της FMOC ομάδας γίνεται γρήγορα με πρωτοταγείς αμίνες (π.χ. κυκλοεξυλαμίνη) και μερικές δευτεροταγείς (πιπεριδίνη, πιπεραζίνη) και πιο αργά με τριτοταγείς αμίνες (π.χ. TEA). Η FMOC ομάδα είναι μια σημαντική προστατευτική ομάδα και μπορεί να συνδυαστεί με τις ομάδες BOC και Z, αφού αυτές απομακρύνονται σε όξινες συνθήκες. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι μετά την

απομάκρυνσή της, η αμινομάδα που απελευθερώνεται είναι ελεύθερη και όχι πρωτονιωμένη όπως συμβαίνει με την επίδραση οξέων. Ο μηχανισμός απομάκρυνσης της FMOC ομάδας παρουσιάζεται στο παρακάτω Σχήμα.



Σχήμα 9: Μηχανισμός απομάκρυνσης της FMOC ομάδας με την χρήση πιπεριδίνης

- **Τριφαίνυλομεθυλ-ομάδα (τρίτυλο-ομάδα) (Trt)**

Η σημαντικότερη άλκυλο-τύπου ομάδα είναι τριφαίνυλομεθυλ-ομάδα ή αλλιώς τρίτυλο-ομάδα (Trt). Η χρήση της ως αμινοπροστατευτική ομάδα καθιερώθηκε

από τους Ζέρβα και Θεοδωρόπουλο το 1955 και η τριτυλίωση των αμινοξέων γίνεται με χρήση τριτυλοχλωριδίου. Η προστατευτική Trt-ομάδα είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στα οξέα και μπορεί πολύ εύκολα να απομακρυνθεί ύστερα από απλή θέρμανση με αραιό διάλυμα (~5%) οξικού οξέος. Αντίθετα, αξιοσημείωτη είναι η σταθερότητά της έναντι των αλκαλίων και της υδραζίνης. Η τριτυλίωση των α-αμινοξέων γίνεται με τη χρήση τρίτυλο-χλωριδίου. Τα τρίτυλο-αμινοξέα έχουν μερικώς βασικό χαρακτήρα και η ελάττωση της δραστηρότητας του αζώτου οφείλεται στη στερεοχημική παρεμπόδιση από την ογκώδη τρίτυλο-ομάδα.

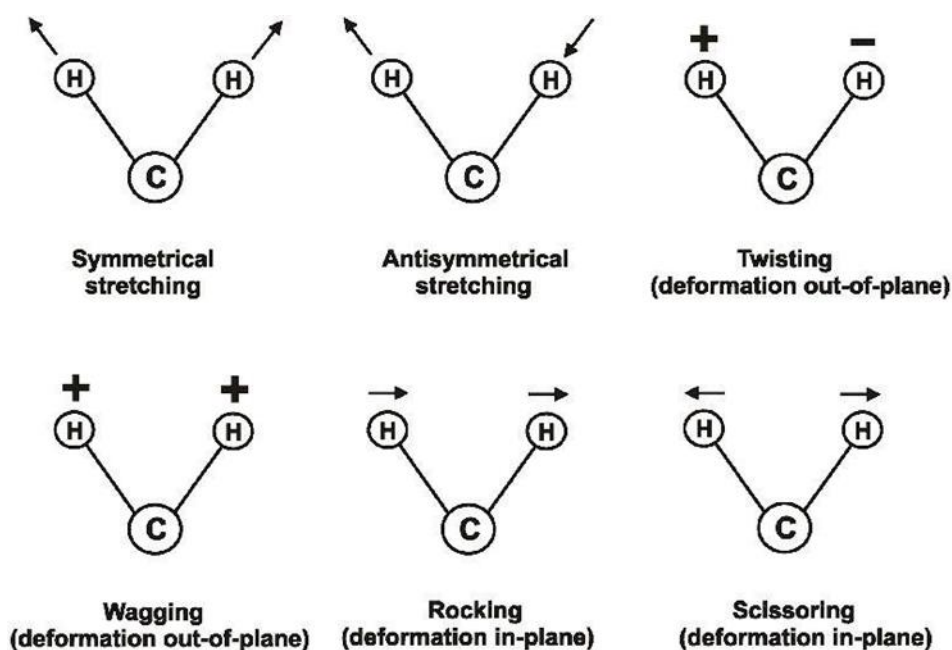
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται αναφορά στις τεχνικές μοριακού χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των πολυμερών δίνει πληροφορίες για τη μοριακή διασπορά, το μοριακό βάρος, την αρχιτεκτονική και τη σύσταση των πολυμερών. Επίσης, πιστοποιεί ότι η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση έδωσε το επιθυμητό προϊόν. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πειραματικές μέθοδοι: φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC), δυναμική σκέδαση φωτός (DLS), κυκλικός διχρωϊσμός (CD) και ζ-δυναμικό (zeta potential).

2.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR)^{61, 62}

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (infrared, IR) είναι μία από τις βασικές τεχνικές για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε είδους ουσίας και βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία για την ανάλυση φαρμάκων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κλπ. , λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Στην περιοχή υπερύθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ($\lambda=0.7 \mu\text{m}-1000 \mu\text{m}$) πραγματοποιούνται απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις ή κάμψεις των δεσμών των μορίων για ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή, που μεταβάλλεται κατά την παραμόρφωση του μορίου και απορροφούν ισχυρά στην περιοχή υπερύθρου. Εκτός από τις δονήσεις και τις κάμψεις υπάρχουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting) ή κάνει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), κλπ. (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών ενός μορίου.

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

Όταν το μόριο δέχεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφάται ενέργεια μόνο στην περίπτωση που η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίδια με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δυο δονητικών συχνοτήτων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίση με εκείνη

της ακτινοβολίας, αυξάνει το πλάτος της. Με άλλα λόγια, το «ελατήριο» που συνδέει τα δυο άτομα διαδοχικά, εκτείνεται και συμπιέζεται λίγο περισσότερο. Εφόσον κάθε συχνότητα που απορροφάται από ένα μόριο αντιστοιχεί σε μια προκαθορισμένη μοριακή κίνηση, μπορούν να διαπιστωθούν οι κινήσεις του μορίου, μελετώντας το φάσμα υπερύθρου. Από την ερμηνεία αυτών των κινήσεων, μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί και κατά συνέπεια ποιες λειτουργικές ομάδες υπάρχουν στην προς μελέτη ένωση. Οι δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων μίας ένωσης είναι ανεξάρτητες της υπόλοιπης δομής και συνήθως εμφανίζονται σε περιοχές του υπερύθρου φάσματος όπου δεν απορροφούν οι δονήσεις σκελετού (Πίνακας 3). Πιο συγκεκριμένα, η υπέρυθη περιοχή από 4000 cm^{-1} έως 400 cm^{-1} είναι δυνατό να χωριστεί σε τέσσερα τμήματα:

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

Πίνακας 3: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε 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			

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}). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε μηχάνημα Perkin-Elmer Spectrum One 100 FT-IR.

2.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)^{62, 63}

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

των συμπολυμερών, ενώ επίσης πραγματοποιείται μελέτη της κίνησης των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση.

Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εκδηλώνουν όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων. Μόνο οι πυρήνες με άρτιο αριθμό νετρονίων και πρωτονίων δεν εμφανίζουν μαγνητικές ιδιότητες και είναι αδρανείς στα πειράματα NMR (πυρηνικό spin $I=0$). Έτσι, οι πυρήνες πολλών ατόμων (^1H , ^{13}C) συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα ($I=1/2$). Δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 . Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου κατά τυχαίο τρόπο και συνεπώς όλοι οι προσανατολισμοί της πυρηνικής μαγνητικής ροπής είναι εκφυλισμένοι ενεργειακά. Όταν, όμως, ένα δείγμα που περιέχει αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, αίρεται ο εκφυλισμός και οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ο πυρήνας μπορεί να διαταχθεί έτσι ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να είναι παράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με κβαντικό μαγνητικό αριθμό spin $m_I=1/2$) ή αντιπαράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με $m_I=-1/2$) προς την κατεύθυνση του εξωτερικού πεδίου. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ειδικότερα, ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού. Στην περίπτωση που οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και μεταβάλλονται οι πληθυσμοί των πυρήνων στις δύο καταστάσεις (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, οι πυρήνες συντονίζονται με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία. Η ακριβής συχνότητα που απαιτείται για το συντονισμό εξαρτάται από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και από το είδος του πυρήνα.

Όλοι οι πυρήνες των μορίων περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν δικά τους τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα

προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό ($B_{\text{πραγ.}} = B_{\text{εφαρμ.}} - B_{\text{τοπικό}}$). Περιγράφοντας αυτό το φαινόμενο, συμπεραίνεται ότι οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Επειδή κάθε συγκεκριμένος πυρήνας ενός μορίου βρίσκεται σε κάπως διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, προστατεύεται και σε κάπως διαφορετική έκταση, με αποτέλεσμα το πραγματικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο να μην είναι ίδιο για κάθε πυρήνα και έτσι να απορροφούν διαφορετικής συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.

Συνέπεια των παραπάνω είναι ότι οι πυρήνες σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δίνουν διαφορετική γραμμή συντονισμού. Για να εκφραστούν με ενιαίο τρόπο οι μεταβολές των γραμμών συντονισμού στους διάφορους πυρήνες, χρησιμοποιούνται πρότυπες ουσίες αναφοράς και εισάγεται η έννοια της χημικής μετατόπισης. Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα είναι η διαφορά μεταξύ της συχνότητας συντονισμού του πυρήνα και μιας πρότυπης ουσίας αναφοράς. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο ($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, TMS), που έχει δώδεκα ισοδύναμα (δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

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

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

* Αφορούν σε ανταλλάξιμα πρωτόνια

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι κάθε διαφορετικός πυρήνας (π.χ. 1H) θα σχηματίζει μία απλή κορυφή. Ωστόσο, συχνό φαινόμενο αποτελεί η απορρόφηση ενός πυρήνα να διασπάται σε πολλαπλές κορυφές. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους κορυφών σε μία πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης (J). Η σταθερά σύζευξης είναι ίδια και για τους δύο πυρήνες, τα spin των οποίων συζεύγνυνται και δεν εξαρτάται από την ισχύ πεδίου του φασματοφωτομέτρου. Το φαινόμενο των πολλαπλών απορροφήσεων αποκαλείται σχάση spin-spin και προκαλείται από την αλληλεπίδραση ή σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών πυρήνων. Εκτός από την ηλεκτρονιακή προστασία, το μαγνητικό πεδίο που υφίσταται ένας πυρήνας επηρεάζεται επίσης από τους γειτονικούς μαγνητικούς πυρήνες. Σύμφωνα με ένα γενικό κανόνα, που αποκαλείται κανόνας n+1, πυρήνες με n γειτονικούς

πυρήνες με spin $I=1/2$ εμφανίζουν $n+1$ κορυφές στο φάσμα του NMR. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος $(1+x)^n$.

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

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

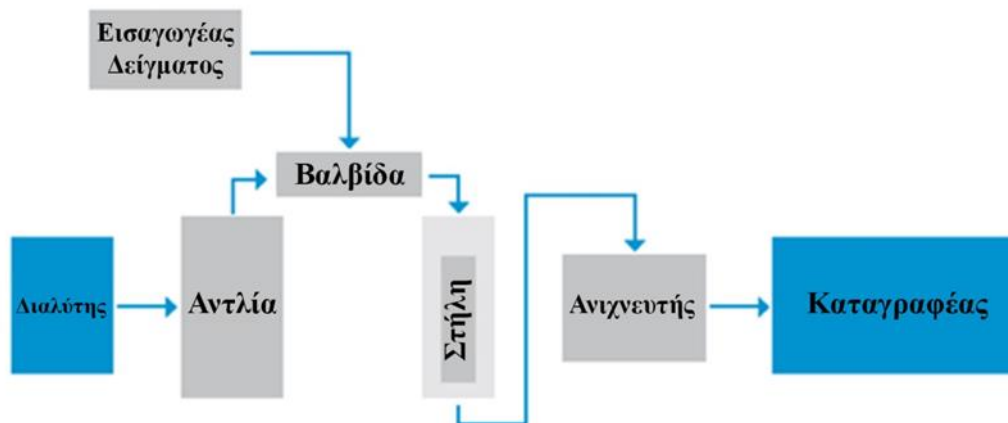
Οι μετρήσεις της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ πραγματοποιούνται σε συσκευή Bruker 400 MHz.

2.3. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (size exclusion chromatography, SEC) ή χρωματογραφία διαπερατότητας μέσω πηκτής (gel permeation chromatography, GPC) αποτελεί μία από τις δυναμικότερες μεθόδους

χαρακτηρισμού των πολυμερών τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα, όσο και στη βιομηχανία. Πρόκειται ουσιαστικά για μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προσαρμοσμένης για την ανάλυση μακρομορίων. Η σχετική απλότητα της μεθόδου, η ταχύτητα με την οποία πραγματοποιούνται οι αναλύσεις, η δυνατότητα εύρεσης οποιασδήποτε μέσης τιμής μοριακού βάρους και της κατανομής μοριακών βαρών ($I=M_w/M_n$), αλλά και η δυνατότητα διασύνδεσης με άλλες μεθόδους χαρακτηρισμού (όπως η ιξωδομετρία τριχοειδούς σωλήνα) για τη λήψη περισσότερων πληροφοριών είναι ενδεικτικά της σπουδαιότητας της μεθόδου και εξηγεί την ευρεία χρήση της.

Σχηματικά η διάταξη της οργανολογίας σε μία συσκευή SEC φαίνεται στο Σχήμα 10.⁶⁴



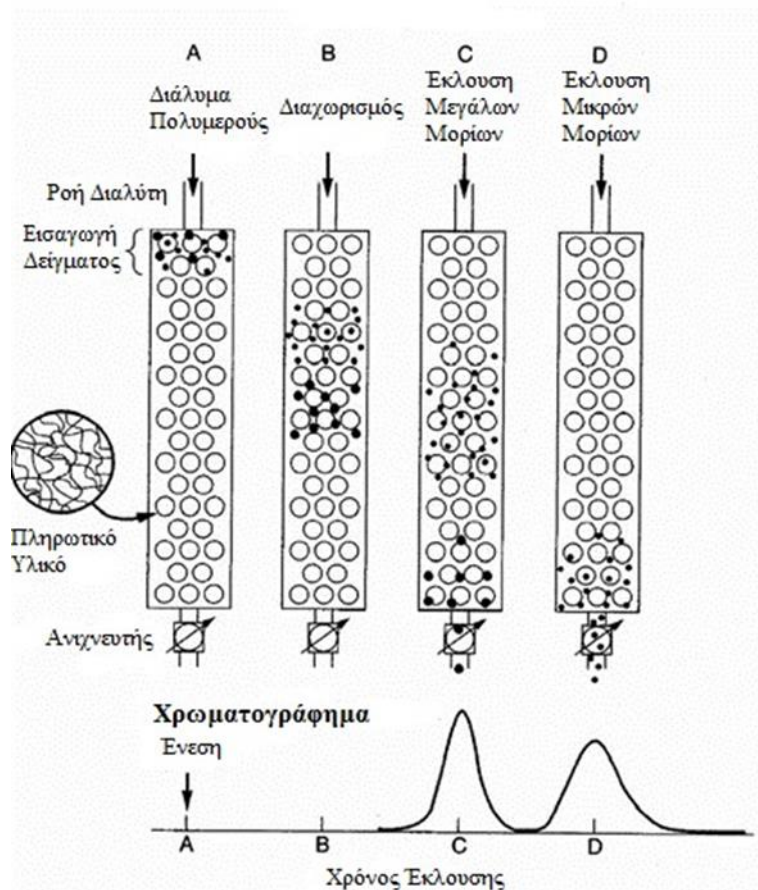
Σχήμα 10: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης SEC.

Αραιό διάλυμα πολυμερούς ενίεται σε ποσότητα διαλύτη που κινείται με σταθερή ροή, η οποία εξασφαλίζεται από κατάλληλη αντλία. Το πολυμερές παρασύρεται από το διαλύτη στις στήλες του οργάνου, όπου πραγματοποιείται η διαδικασία διαχωρισμού. Οι στήλες περιέχουν τη στατική φάση, δηλαδή κόκκους από ένα πορώδες πληρωτικό υλικό (με εύρος διαστάσεων πόρων 10^2 - 10^6\AA). Το υλικό πλήρωσης των στηλών μπορεί να είναι οργανικής φύσεως (π.χ. δικτυωμένο πολυστυρένιο) ή ανόργανο (π.χ. silica gel ή πορώδες γυαλί). Τα μικρά μόρια του πολυμερούς (μικρότερος υδροδυναμικός όγκος) μπορούν να περνούν τόσο μεταξύ των κόκκων, όσο και να εισχωρούν μέσα στους πόρους του πληρωτικού υλικού με αποτέλεσμα να καθυστερεί η έκλουσή τους από τη

στήλη. Αντίθετα τα μεγάλα σωματίδια, με διαστάσεις μεγαλύτερες από το μέγεθος των πόρων, δεν μπορούν να διέλθουν μέσα από αυτούς, με συνέπεια να κινούνται μόνο μεταξύ των κόκκων και να εκλούνται σε μικρότερους χρόνους. Μόρια με ενδιάμεσο μέγεθος μπορούν να εισχωρούν σε μερικούς από τους πόρους του κοκκώδους υλικού εμφανίζοντας διαφορετικό βαθμό καθυστέρησης στο υλικό της στήλης. Έτσι τελικά ο διαχωρισμός των διαλυμένων στην κινητή φάση υλικών επιτυγχάνεται ανάλογα με το μέγεθος τους, με τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους να εκλούνται πρώτα και να ακολουθούν κατόπιν μόρια κατά σειρά μειούμενου μεγέθους (Εικόνα 12).^{65, 66}

Η πορεία του διαχωρισμού παρακολουθείται συνεχώς μέσω κατάλληλων ανιχνευτών, που συνδέονται σε σειρά με τις στήλες. Οι χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές πρέπει να χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία και να αποκρίνονται στη συγκέντρωση του διαλυμένου συστατικού. Η πιο κοινή περίπτωση είναι η χρήση διαφορικού διαθλασιμέτρου, που μετρά συνεχώς τη διαφορά στο δείκτη διάθλασης μεταξύ του διαλύτη και του διαλύματος που περιέχει τα εκλούμενα συστατικά. Άλλοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στηρίζονται σε διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους, όπως η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) ή η υπέρυθη ακτινοβολία (IR). Τέλος, το επιθυμητό χρωματογράφημα αποτυπώνεται με τη βοήθεια ενός καταγραφέα.^{65,}

66



Εικόνα 12: Διαχωρισμός μακρομορίων διαφορετικού υδροδυναμικού όγκου.

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί έμμεση, και όχι απόλυτη, μέθοδο για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών, εξαιτίας της σύνδεσης μεταξύ μεγέθους και μοριακού βάρους. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση των στηλών, η οποία πραγματοποιείται με μέτρηση του χρόνου έκλυσης δειγμάτων γνωστού μοριακού βάρους (π.χ. πρότυπα πολυστυρένια). Επειδή όμως ο όγκος έκλυσης δεν εξαρτάται άμεσα από το μοριακό βάρος, αλλά από το μέγεθος των μακρομορίων, θα πρέπει τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και τα αγνώστου μοριακού βάρους δείγματα να έχουν την ίδια χημική σύσταση και την ίδια αρχιτεκτονική (π.χ. γραμμικά ή κυκλικά ή αστεροειδή με ίδιο αριθμό κλάδων κλπ.) και οι μετρήσεις των όγκων έκλυσης σε όλα τα δείγματα να γίνονται υπό τις ίδιες ακριβώς πειραματικές συνθήκες. Ο όγκος έκλυσης V_e κάθε μακρομορίου του πολυμερούς δίνεται από την εξίσωση:

$$V_e = V_0 + K_{SEC} V_E,$$

όπου V_0 είναι ο νεκρός όγκος, ο όγκος δηλαδή της στήλης που δεν καταλαμβάνεται από το πορώδες υλικό, K_{SEC} είναι το ποσοστό του πολυμερούς που μπορεί να περάσει από τους πόρους (μπορεί να θεωρηθεί και ως η σταθερά κατανομής ενός συστατικού μεταξύ κινητής και στατικής φάσης), και V_E είναι ο συνολικός εσωτερικός όγκος όλων των πόρων. Για μακρομόρια που δεν μπορούν να περάσουν κανένα πόρο της στήλης ($K_{SEC}=0$) $V_e=V_0$ και για μακρομόρια που μπορούν να περάσουν όλους τους πόρους ($K_{SEC}=1$) $V_e=V_0+V_E$. Στις περιπτώσεις αυτές δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός και πρέπει να αλλαχθούν οι στήλες. Καλό διαχωρισμό έχουμε όταν ο K_{SEC} για όλα τα μακρομόρια που υπάρχουν στο πολυμερές κυμαίνεται μεταξύ 0 και 1.⁶⁵

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας όργανο αποτελούμενο από αντλία της Waters μοντέλο 510 και ανιχνευτές διαφορικού διαθλασίμετρου της Waters μοντέλο 401 και UV-Vis.

2.4. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

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

Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία στο ορατό φάσμα προσπίπτει σε ένα διάλυμα, το φως σκεδάζεται λόγω διακυμάνσεων συγκέντρωσης. Οι διακυμάνσεις αυτές συνδέονται με την κίνηση Brown. Τα σκεδαζόμενα μακρομόρια σε ένα διάλυμα κινούνται με παρόμοιες ταχύτητες αλλά σε τυχαίες κατευθύνσεις. Εξαιτίας της ομοιότητας της κίνησής τους, το σκεδαζόμενο φως, δηλαδή ο αριθμός των σκεδαζόμενων φωτονίων, εμφανίζει συσχέτιση με το

χρόνο. Μια συνάρτηση χρονικής συσχέτισης μεταξύ δύο σημάτων A και B δίνεται από την σχέση:

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

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

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

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

όπου $\Gamma = D_t q^2$ είναι η σταθερά παρακμής της συνάρτησης όπου χάνεται, δηλαδή η συσχέτιση των σημάτων, D_t ο συντελεστής διάχυσης και q το διάνυσμα σκέδασης.^{67, 68, 69}

Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε όργανο της Brookhaven Instruments με γωνιόμετρο BI-200SM, laser 40mW που εκπέμπει στα 640nm, συσχετιστή TurboCorr με 514 κανάλια μνήμης και δυνατότητα λήψης μετρήσεων σε πολλές γωνίες.

2.5. Κυκλικός Διχρωισμός (Circular Dichroism, CD)⁷⁰

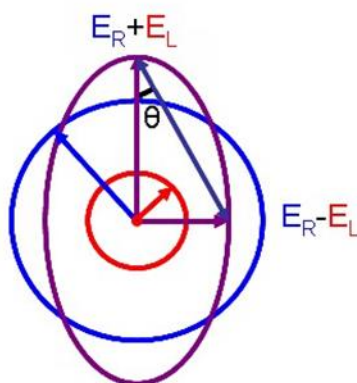
Τα μόρια και ειδικότερα οι πρωτεΐνες (οπτικά ενεργές ενώσεις), απορροφούν κβάντα φωτός, προάγοντας τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερες διεγερμένες καταστάσεις. Το εξερχόμενο φως έχει την ίδια συχνότητα αλλά έχει επιβραδυνθεί, εισάγοντας μια διάφορα φάσης, που είναι ανάλογη της ποσότητας του υλικού.

Στην τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού (CD) μετράται η διαφορά της μοριακής απορροφητικότητας ($\Delta\epsilon = \epsilon_R - \epsilon_L$), κατά την απορρόφηση από την πρωτεΐνη (ή το πολυπεπτιδίο), μίας κυκλικά πολωμένης (αριστερόστροφα ή δεξιόστροφα)

μονοχρωματικής ακτινοβολίας φωτός στην περιοχή του far-UV, που οδηγεί σε π-π* ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Αυτές οι μεταβάσεις αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς των πεπτιδίων (χρωμοφόρα) και επηρεάζονται σημαντικά από την δευτεροταγή δομή τους. Η άνιση απορρόφηση των δύο συνιστώντων ανυσμμάτων οδηγεί το συνιστάμενο άνυσμα να ιχνογραφεί μια έλλειψη. Το εξερχόμενο φως χαρακτηρίζεται ως ελλειπτικά πολωμένο, ενώ το φαινόμενο καλείται κυκλικός διχρωϊσμός (Εικόνα 13). Αποτελεί το άθροισμα της συνεισφοράς των αμινοξέων του πολυπεπτιδίου και της συνεισφοράς από την αναδίπλωση της κάθε αλυσίδας. Μπορεί να μετρηθεί μέσω της ελλειπτικότητας θ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$), που αντιστοιχεί στην γωνία της οποίας η εφαπτομένη ισούται με το λόγο του μικρού προς το μεγάλο άξονα της έλλειψης.

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

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



Εικόνα 13: Το ελλειπτικά πολωμένο φως (βιολετί) προέρχεται από την άνιση απορρόφηση του δεξιά (μπλε) και αριστερά (κόκκινο) κυκλικά πολωμένου φωτός.

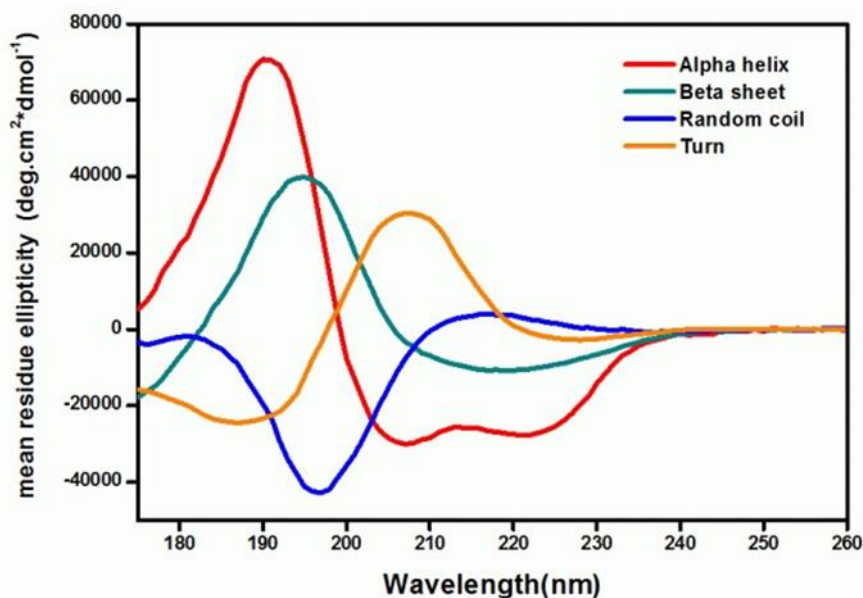
Η στροφή του επιπέδου μιας πολωμένης ακτινοβολίας, που προκαλείται από ένα οπτικά ενεργό υλικό, ποικίλει με το μήκος κύματος. Η μέτρηση της οπτικής στροφής συναρτήσει του μήκους κύματος είναι η οπτική στροφική διασπορά (ORD), ενώ όπως προαναφέρθηκε κυκλικός διχρωϊσμός (CD) είναι η μέτρηση της άνισης απορρόφησης του δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένου φωτός.

Τα δύο φαινόμενα σχετίζονται μεταξύ τους κατά τον ίδιο τρόπο που η διασπορά σχετίζεται με την απορρόφηση. Συνοπτικά θα μπορούσε να γραφεί:

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

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

Οι πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από τη μελέτη των πρωτεϊνών με κυκλικό διχρωϊσμό είναι οι εξής: 1) Η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών (% έλικα, φύλλο, στροφές, κτλ.), η οποία ταυτοποιείται από την περιοχή του πεπτιδικού δεσμού. Η απορρόφηση στην περιοχή αυτή (240 nm και κάτω) οφείλεται κυρίως στον πεπτιδικό δεσμό. Υπάρχει μια αδύναμη αλλά ευρεία $n \rightarrow \pi^*$ μετατόπιση γύρω από τα 220 nm και μια πιο έντονη $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάβαση γύρω στα 190 nm. 2) Η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών. Τα φάσματα στην περιοχή 260-320 nm προκύπτουν από το αρωματικά αμινοξέα. Καθένα 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.



Εικόνα 14: Πρότυπο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού.

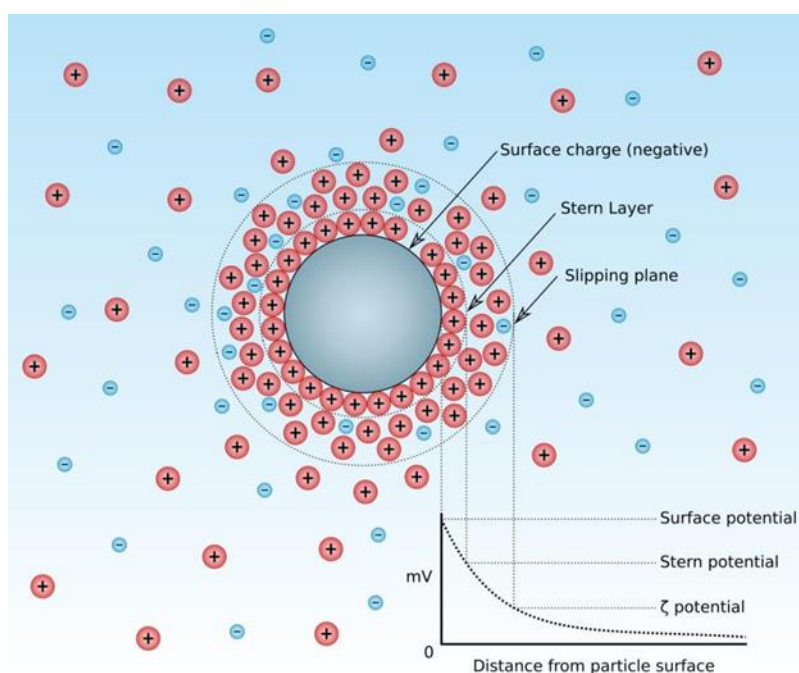
Οι μετρήσεις έγιναν σε φασματοπολωσίμετρο JASCO J-815.

2.6. Ζ-Δυναμικό (Zeta Potential)^{41, 71}

Όταν μια στερεή επιφάνεια έρθει σε επαφή με ένα υδατικό διάλυμα, η ύπαρξη φορτίων στη μεσεπιφάνεια μεταξύ τους προκαλεί αναδιάταξη των τοπικών ελευθέρων ιόντων στο διάλυμα και έτσι δημιουργείται μια λεπτή περιοχή με μη μηδενική καθαρή πυκνότητα φορτίου. Η αναδιάταξη αυτή των φορτίων στη μεσεπιφάνεια μεταξύ στερεού-υγρού μαζί με τα αντισταθμιστικά ιόντα του διαλύματος σχηματίζουν μία ηλεκτρική διπλοστιβάδα.

Ακριβώς δίπλα από τη φορτισμένη στερεή επιφάνεια υπάρχει ένα λεπτό στρώμα από αντισταθμιστικά ιόντα, που ονομάζεται συμπαγές στρώμα ή στρώμα Stern (Stern layer). Το συμπαγές αυτό στρώμα αντισταθμιστικών ιόντων είναι ακίνητο λόγω της ισχυρής ηλεκτροστατικής έλξης με την επιφάνεια των σωματιδίων. Τα αντισταθμιστικά ιόντα έξω από το συμπαγές στρώμα είναι ασθενέστερα συνδεδεμένα και συνεπώς κινητά. Αυτό το μέρος της διπλοστιβάδας καλείται διάχυτη στιβάδα (diffuse layer ή slipping plane) και το ηλεκτροστατικό δυναμικό που αντιστοιχεί σε αυτό το στρώμα ονομάζεται ζ-δυναμικό (zeta potential) (Εικόνα 15).

Το ζ-δυναμικό σχετίζεται ποσοτικά με την ύπαρξη ή μη φορτίων στην επιφάνεια των σωματιδίων και επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων των κολλοειδών συστημάτων, όπως είναι η σταθερότητα τους, η αλληλεπίδραση τους με βιοδραστικές ενώσεις, καθώς επίσης και οι ρεολογικές ιδιότητες των εναιωρημάτων. Η τιμή του ζ-δυναμικού αποτελεί ένδειξη για την εκτίμηση της σταθερότητας των κολλοειδών διασπορών και είναι παράμετρος χαρακτηρισμού των βιοϊατρικών πολυμερών και υβριδικών συστημάτων, ενώ εξαρτάται άμεσα από το pH. Γενικά, διασπορές με μεγάλη τιμή ζ-δυναμικού (θετική ή αρνητική) παρουσιάζουν απωστικές δυνάμεις που εμποδίζουν την συσσωμάτωση και κατακρήμνιση των σωματιδίων τους.



Εικόνα 15: Το δυναμικό των νανοσωματιδίων συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια τους.

Οι ηλεκτρικές ιδιότητες της επιφάνειας των νανοσωματιδίων μπορούν να μελετηθούν μέσω μικροηλεκτροφόρησης, κατά την οποία προκαλείται κίνηση των σωματιδίων αυτών μέσα σε στάσιμο υγρό υπό την επίδραση εξωτερικά εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού. Η κίνηση αυτή μετρείται με τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) σε ειδικό μηχάνημα (Zetasizer 3000HSA) και βασίζεται στη μετατόπιση Doppler που προκαλείται από την πρόσπτωση

μονοχρωματικής ακτινοβολίας (laser He-Ne, 5 mW, 633 nm) στα κινούμενα σωματίδια. Γενικά, δύο είναι οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν την επιφάνεια των σωματιδίων και μπορούν να υπολογισθούν από τις μετρούμενες κινητικότητες: το δυναμικό στο επίπεδο ολίσθησης (ή ζ-δυναμικό) και η πυκνότητα επιφανειακού φορτίου (surface charge density). Η τιμή του ζ-δυναμικού υπολογίζεται βάσει της εξίσωσης Helmholtz-Smoluchowski:

$$Z = \frac{u \cdot \eta}{E \cdot \varepsilon} = \frac{\mu_e \cdot \eta}{\varepsilon}$$

όπου u (cm/sec) είναι η ταχύτητα μετακίνησης του νανοσωματιδίου στην κυψελίδα της ηλεκτροφόρησης, η (dyne·sec/cm²) είναι το ιξώδες του μέσου, E (mV/cm) η ένταση του εφαρμοζόμενου δυναμικού, ε είναι η διηλεκτρική σταθερά του μέσου, ενώ ο λόγος u/E καλείται κινητικότητα της ηλεκτροφόρησης (μ_e).

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

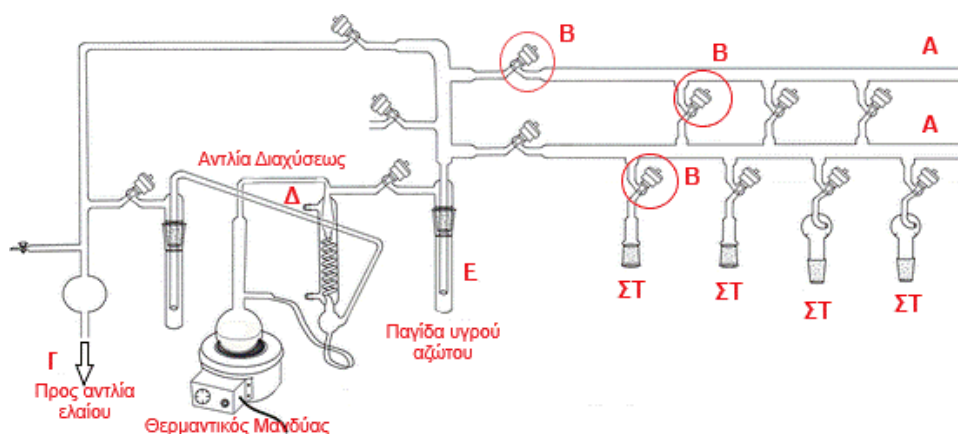
3.1. Τεχνική Υψηλού Κενού (High Vacuum Technique, HVT)⁷²

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού τόσο για τη σύνθεση των επιθυμητών μονομερών και πολυμερών, όσο και για τον καθαρισμό των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Αξίζει να τονιστεί ότι είναι αναγκαία η υψηλή καθαρότητα όλων των αντιδραστηρίων προκειμένου να αποφευχθούν παράπλευρες ανεπιθύμητες αντιδράσεις, όπως μη ελεγχόμενος πολυμερισμός ή η ύπαρξη παραπροϊόντων στα μονομερή. Ο συνδυασμός τεχνικών υψηλού κενού και κατασκευής ειδικών συσκευών πολυμερισμού με χρήση υαλουργίας εξασφαλίζει τον ελεγχόμενο χαρακτήρα των αντιδράσεων και ως εκ τούτου τη σύνθεση καλά καθορισμένων μακρομορίων.

Όσον αφορά τη σύνθεση των επιθυμητών μονομερών (N-καρβοξυ ανυδριτών), μέσω της τεχνικής υψηλού κενού απομακρύνονται πιθανές προσμίξεις από τα αντιδραστήρια, όπως ο ατμοσφαιρικός αέρας και η υγρασία, που όπως ήδη έχει αναφερθεί, προκαλούν διάσπαση (υδρόλυση) του δακτυλίου ή ανεπιθύμητη εκκίνηση πολυμερισμού. Επίσης, επιτυγχάνεται η απομάκρυνση προσμίξεων όπως αμίνες, αλκοόλες, οξέα ή σταθεροποιητές που εμπεριέχονται στους εμπορικά διαθέσιμους διαλύτες και έχουν την ικανότητα να δρουν είτε ως απαρχητές στο ROP N-καρβοξυ ανυδριτών είτε να προκαλούν πρόωρο τερματισμό των μακρομορίων.

Η γραμμή υψηλού κενού (High Vacuum Line, HVL)^{72, 73, 74} (Εικόνα 16) κατασκευάστηκε στο εργαστήριο με χρήση υαλουργίας. Αποτελείται από γυάλινους σωλήνες τύπου Pyrex (Α, Εικόνα 16), στρόφιγγες τεφλόν υψηλού κενού, ώστε να απομονώνεται το σύστημα από τον ατμοσφαιρικό αέρα (Β, Εικόνα 16), αντλία ελαίου (Γ, Εικόνα 16), αντλία διαχύσεως υδραργύρου (Δ, Εικόνα 16) και παγίδα υγρού αζώτου (Ε, Εικόνα 16). Η εφαρμογή κενού στις επιθυμητές συσκευές πραγματοποιείται με την προσαρμογή τους στη γραμμή

υψηλού κενού σε μία από τις πιθανές εξόδους ΣΤ (Εικόνα 16). Χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες στρόφιγγες, είναι δυνατή η απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων της γραμμής ώστε τελικά οι διεργασίες να πραγματοποιούνται υπό κενό και ελεγχόμενα. Η παγίδα υγρού αζώτου είναι καθοριστικής σημασίας αφού συμπυκνώνει οτιδήποτε πτητικό εντοπίζεται στη γραμμή αποφεύγοντας έτσι τη διαρροή του προς την απόσταξη υδραργύρου ή την αντλία ελαίου. Για τον έλεγχο ύπαρξης κενού, πτητικών ουσιών, ατμοσφαιρικού αέρα ή υγρασίας χρησιμοποιείται πηνίο Tesla το οποίο δρα ως οπτικοακουστικό μέσο για τη εξασφάλιση των επιθυμητών συνθηκών.



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση Γραμμής Υψηλού Κενού (High Vacuum Line, HVL).

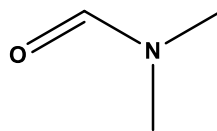
Η λειτουργία της γραμμής υψηλού κενού βασίζεται στην απόσταξη υδραργύρου και παρέχει κενό της τάξης των 10^{-6} mm Hg. Σε πρώτο στάδιο, η αντλία ελαίου δημιουργεί ένα προκαταρκτικό τυπικό κενό της τάξης των 10^{-2} - 10^{-3} mm Hg, το οποίο είναι απαραίτητο, ώστε να επιτευχθεί η απόσταξη του υδραργύρου. Ο υδράργυρος θερμαίνεται με τη βοήθεια θερμομανδύα και καθώς τα μόρια του κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση της αντλίας διαχύσεως, όπου προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς του και ελάττωση της πίεσής τους. Το παραπάνω φαινόμενο οφείλεται στην αρχή Bernoulli κατά την οποία ο ρυθμός ροής ενός ασυμπίεστου ρευστού δεν πρέπει να αλλάζει, όταν το ρευστό ρέει κατά μήκος σωλήνα που δεν έχει σταθερή διατομή. Όταν επιταχύνεται ένα στοιχείο του ασυμπίεστου ρευστού, θα πρέπει να κινείται από μία περιοχή

υψηλής πίεσης σε περιοχή χαμηλής πίεσης, ώστε τελικά να υπάρχει συνισταμένη δύναμη που 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 διέλευση του υδραργύρου από τη στένωση, προκαλείται αύξηση της ταχύτητας και λόγω της ταυτόχρονης ελάττωσης της πίεσης δημιουργείται διαφορά πίεσης στα άκρα της στήλης. Ο υδράργυρος κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη, όπου επαναλαμβάνεται όλη η διαδικασία (Εικόνα 16). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται το τελικό κενό που είναι της τάξης των 10^{-6} mm Hg, ίσο με την τάση ατμών του υδραργύρου.

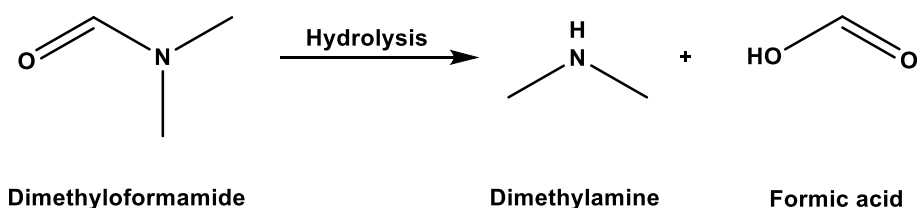
3.2. Καθαρισμός διαλυτών

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις πολυμερισμού, όπως επίσης και στις περισσότερες οργανικές αντιδράσεις, είναι απαραίτητο να μην περιέχουν ίχνη υγρασίας και οξυγόνου αλλά και να έχουν απομακρυνθεί από αυτούς ανεπιθύμητες προσμίξεις που μπορεί να υπάρχουν. Οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την πορεία των αντιδράσεων και ανάλογα τις συνθήκες μπορούν να δράσουν ως απαρχητές, επιβραδυντές ή αναστολείς πολυμερισμού, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα, όπως είναι η ευρεία κατανομή μοριακών βαρών. Για το λόγο αυτό, οι εμπορικά διαθέσιμοι διαλύτες υπόκεινται σε περαιτέρω διαδικασίες καθαρισμού, που στις περισσότερες των περιπτώσεων περιλαμβάνουν την αντίδρασή τους με κάποιο ξηραντικό μέσο για απομάκρυνση της υγρασίας και στη συνέχεια την απαέρωση και απόσταξη τους υπό κενό. Ακολούθως παρατίθενται οι διαδικασίες καθαρισμού των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:

- **Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)**



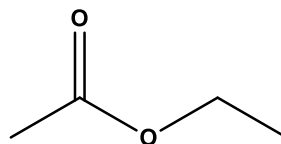
Το DMF αποτελεί το διαλύτη του πολυμερισμού των N-καρβοξυ ανυδριτών (N-carboxy anhydrides, NCAs) των α-αμινοξέων, ενώ χρησιμοποιείται επίσης για την αραίωση των απαρχητών κατά τη σύνθεση των πολυπεπτιδίων αλλά και σε διάφορες οργανικές αντιδράσεις (π.χ. αντιδράσεις αποπροστασίας των πολυπεπτιδίων, αντιδράσεις χημείας “click”). Το DMF υπόκειται σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική του αποικοδόμηση παράγεται διμεθυλαμίνη (DMA) και μονοξείδιο του άνθρακα. Επίσης, υδρολύεται αργά παρουσία νερού, παράγοντας DMA και φορμικό οξύ, συστατικά που του αποδίδουν και τη χαρακτηριστική οσμή του (Σχήμα 11).



Σχήμα 11: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ.

Η παραγωγή DMA είναι μία διαδικασία που πρέπει να αποφεύγεται, καθώς κατά την διάρκεια του πολυμερισμού των NCAs μπορεί να δράσει ως απαρχητής, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, το εμπορικώς διαθέσιμο DMF φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box. Κατά τον καθαρισμό του, η επιθυμητή ποσότητα του διαλύτη μεταγγίζεται σε σφαιρική φιάλη που φέρει στρόφιγγα, η οποία προηγουμένως έχει υποστεί ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού (flame-drying). Στη συνέχεια, η φιάλη με το διαλύτη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται ενδεδειγμένα. Έπειτα, το DMF αποστάζεται κλασματικά σε διπλανή σφαιρική φιάλη, δηλαδή το πρώτο και το τελευταίο κλάσμα του διαλύτη απορρίπτονται πάντα κατά την απόσταξη και συλλέγονται μόνο τα μεσαία κλάσματα. Το απεσταγμένο DMF που λαμβάνεται, φυλάσσεται στους 3 °C, προστατευόμενο από το φως.

- **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 με πεντοξειδίο του φωσφόρου (P₂O₅) για μία ημέρα, οπότε ο διαλύτης αποκτά ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα. Την επόμενη ημέρα, η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται και στη συνέχεια, τα μεσαία κλάσματα του διαλύτη αποστάζονται σε διπλανή σφαιρική φιάλη με στρόφιγγα. Μετά το πέρας της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση του διαλύτη και τέλος φυλάσσεται υπό κενό.

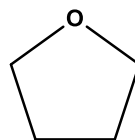
- **Εξάνιο**



Το εξάνιο αποτελεί τον μη διαλύτη στο σύστημα ανακρυσταλλώσεων διαλύτη-μη διαλύτη για τον καθαρισμό των N-Καρβοξυανυδριτών ενώ χρησιμοποιείται επίσης για την αραίωση των απαρχητών. Το εμπορικά διαθέσιμο εξάνιο τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με λεπτόκοκκα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου (CaH₂) και αφήνεται υπό ανάδευση για μία νύχτα. Στη συνέχεια, ο διαλύτης, έπειτα από ενδεδειγμένη απαέρωση, αποστάζεται σε καθαρή φιάλη που έχουν προηγουμένως εισαχθεί μέσω ένεσης ~10 mL n-BuLi και τέλος φυλάσσεται υπό κενό.

(διηλ.σταθερά $\epsilon_r = 1.89$ στους 20 °C , $\Sigma.Z = 69$ °C)

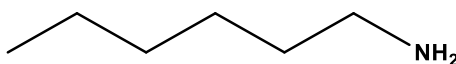
- **Τετραϋδροφουράνιο (THF)**



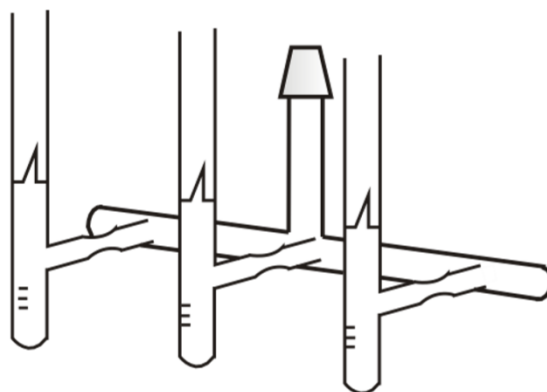
Το εμπορικά διαθέσιμο τετραϋδροφουράνιο τοποθετείται σε φιάλη και αφήνεται υπό ανάδευση με λεπτόκοκκα διαμερισμένο CaH_2 για μία νύχτα. Στη συνέχεια, έπειτα από εκτενή απαέρωση, το THF μεταφέρεται μέσω απόσταξης σε καθαρή φιάλη που περιέχει κομμάτια μεταλλικού νατρίου, απαερώνεται και αφήνεται υπό ανάδευση στη γραμμή για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται ξανά ενδεδειγμένη απαέρωση και το THF αποστάζεται σε καθαρή φιάλη που περιέχει κράμα νατρίου/καλίου σε αναλογία 1/3, απαερώνεται και αφήνεται υπό ανάδευση. Έπειτα από μερικές ώρες ο διαλύτης αποκτά χαρακτηριστικό μπλε χρώμα πράγμα που αποδεικνύει την υψηλή καθαρότητά του. Ο διαλύτης φυλάσσεται υπό κενό.

3.3. Καθαρισμός απαρχητών και αντιδραστηρίων

- **Εξυλαμίνη**

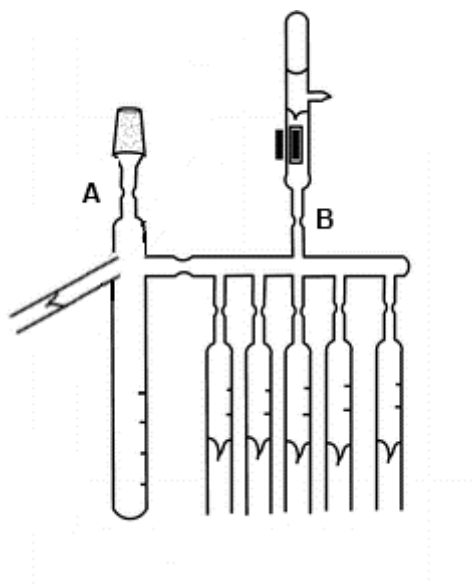


Η εξυλαμίνη χρησιμοποιείται ως απαρχητής για τον πολυμερισμό των NCAs. Η εμπορικά διαθέσιμη εξυλαμίνη τοποθετείται σε φιάλη και αφήνεται υπό ανάδευση με λεπτόκοκκα διαμερισμένο CaH_2 για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα, έπειτα από ενδεδειγμένη απαέρωση, αποστάζεται σε συσκευή (Σχήμα 12) που περιέχει βαθμονομημένες αμπούλες η επιθυμητή ποσότητα κάθε φορά. Η κάθε αμπούλα παγώνεται με υγρό άζωτο, απαερώνεται, συντήκεται στην στένωση και φυλάσσεται στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$.



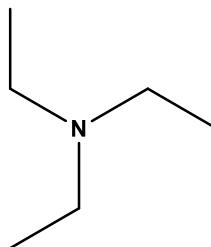
Σχήμα 12: Συσκευή αμπουλών για την παραλαβή απαρχητή.

Μία από τις αμπούλες αυτές προσαρμόζεται σε συσκευή αραίωσης (Σχήμα 13), η οποία μέσω του εσφυρίσματος τοποθετείται στη γραμμή κενού. Ακολουθεί προσεκτική απαέρωση και ξήρανση της συσκευής (flame drying) πριν την απόσταξη ποσότητας διαλύτη ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του απαρχητή. Κατόπιν, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού με σύντηξη στο σημείο A και προστίθεται ο απαρχητής με θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας (σημείο B).



Σχήμα 13: Συσκευή αραίωσης απαρχητή.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση της εξυλαμίνης ήταν το εξάνιο.



- **Τριαιθυλαμίνη (Et₃N)**

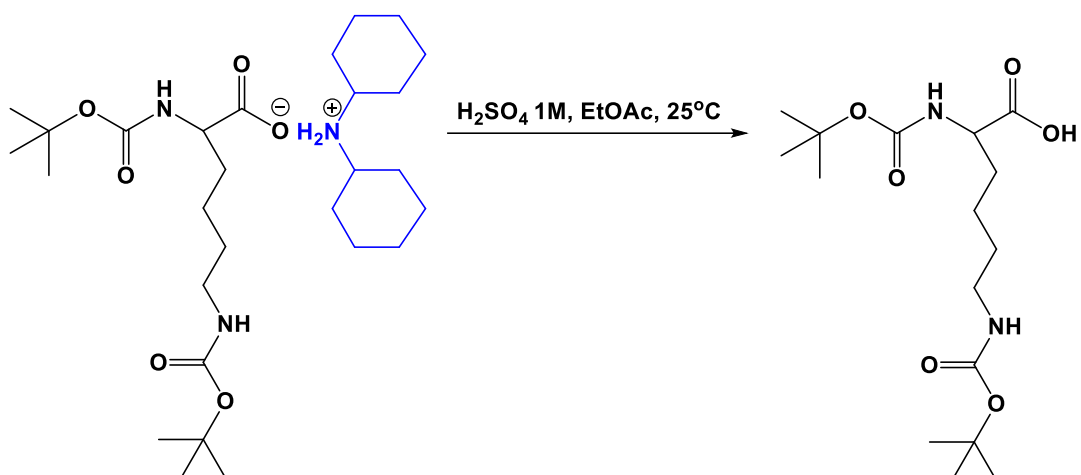
Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται κατά τη σύνθεση των NCAs. Για τον καθαρισμό της, η απαραίτητη ποσότητα Et₃N τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH₂ και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Έπειτα, η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα απαερωθεί η ποσότητα της Et₃N, ακολουθεί απόσταξη σε σφαιρική φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει λεπτότατα κομμένες πλάκες μεταλλικού νατρίου και αποθηκεύεται υπό κενό.

3.4. Σύνθεση και Καθαρισμός Μονομερών (N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων)

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

3.4.1. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N^ε-tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-L-Λυσίνης (N^ε-BOC-L-Lys NCA)

Η σύνθεση του μονομερούς N^ε-BOC-L-Lys NCA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την απελευθέρωση της πρόδρομης ένωσης Boc-Lys(Boc)-OH (32.21 mmol, MB=527.75) από το άλας της Boc-Lys(Boc)-OH·DCHA. Έτσι, σε σφαιρική φιάλη 500 mL, που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, ζυγίζονται 17 g της πρόδρομης ένωσης και προστίθενται 150 mL οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc). Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 min και παρατηρείται η δημιουργία αιωρήματος. Παράλληλα παρασκευάζεται διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 1M σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Ειδικότερα, 2.8 mL πυκνού διαλύματος θειικού οξέος προστίθενται σε 47.2 mL απεσταγμένο δις-απιονισμένο νερό (milli-Q). Το διάλυμα του οξέος προστίθεται στάγδην στη φιάλη της αντίδρασης έως ότου το προκύπτον διάλυμα γίνει διαυγές, ένδειξη της απελευθέρωσης της Boc-Lys(Boc)-OH από το άλας. Στην συνέχεια προστίθενται ακόμα 50 mL EtOAc και 50 mL νερού και το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη 2 L όπου συλλέγεται η οργανική στιβάδα και η υδατική εκχυλίζεται άλλες δυο φορές με EtOAc 2×50 mL. Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες εκχυλίζονται άλλη μια φορά με 100 mL νερό και συλλέγεται η οργανική στιβάδα. Στην οργανική φάση είναι διαλυμένη η πρόδρομη ένωση ενώ η δικυκλοεξυλαμίνη παραμένει στην υδατική φάση. Η τελική οργανική στιβάδα ξηραίνεται με θειικό μαγνήσιο (MgSO₄), το οποίο έχει πρώτα αφεθεί στον φούρνο (150 °C) για 30 min για την απομάκρυνση της υγρασίας. Ακολουθεί διήθηση του διαλύματος για την απομάκρυνση του MgSO₄ μέσω γυάλινου φίλτρου por. 3. Το διάλυμα που προκύπτει από την διήθηση συλλέγεται σε προζυγισμένη δίλαιμη σφαιρική φιάλη 500 mL, που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, και προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, μέσω προσαρμογέα με στρόφιγγα από τη μία είσοδο, και η άλλη είσοδος πωματίζεται με γυάλινο πώμα. Ακολουθεί απαέρωση και απόσταξη του διαλύτη μέχρι ξηρού σε γειτονική σφαιρική φιάλη. Παρατηρείται ο σχηματισμός λευκού αφρού N^α,N^ε-diBOC-L-Lys και η φιάλη αφήνεται στην γραμμή υψηλού κενού για ένα βράδυ.



Σχήμα 14: Απελευθέρωση της πρόδρομης ένωσης Boc-Lys(Boc)-OH από το άλας Boc-Lys(Boc)-OH·DCHA



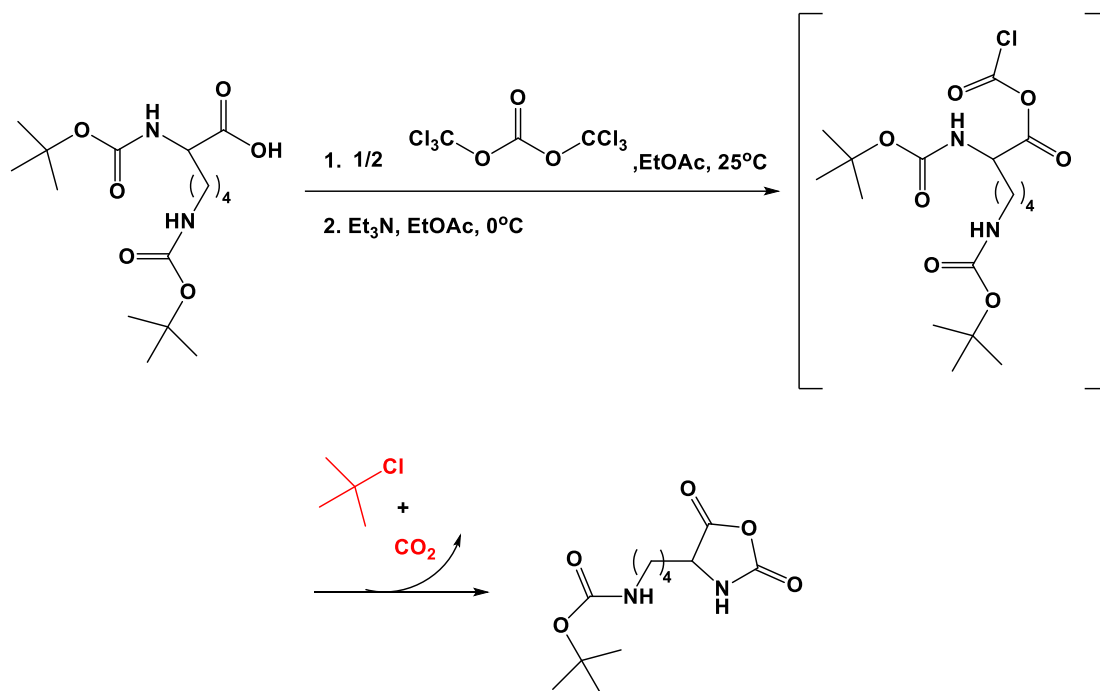
Εικόνα 17: Η N^{α}, N^{ϵ} -diBOC-L-Lys μετά την συμπύκνωση.

Την επόμενη μέρα, η φιάλη με το στερεό ζυγίζεται (10 g, 28.87 mmol, MB=346.42), αποστάζονται 250 mL καθαρού EtOAc και στο τέλος της απόσταξης πραγματοποιείται απαέρωση. Μετά το τέλος της απόσταξης το διάλυμα είναι πλήρως διαυγές. Η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό και προετοιμάζεται η διάταξη για την αντίδραση. Στη μία είσοδο τοποθετείται

κατάλληλο επίθεμα για συνεχή ροή αργού και στην κεντρική είσοδο της φιάλης γυάλινο σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα. Η φιάλη τοποθετείται σε υδρόλουτρο. Παράλληλα, στη γραμμή υψηλού κενού προσαρμόζεται φιάλη των 50 mL με προσαρμογέα με στρόφιγγα και ύστερα από εκτενή ξήρανση (flame-drying) αποστάζονται περίπου 30 mL καθαρού EtOAc. Η σφαιρική φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού, πληρώνεται με αργό και διαλύονται 4.28 g τριφωσγενίου (14.43 mmol, MB=296.748) υπό συνεχή ροή αργού. Το περιεχόμενο της φιάλης αποχύνεται υπό συνεχή ροή αργού στο σταγονομετρικό χωνί. Η προσθήκη του τριφωσγενίου/ EtOAc πραγματοποιείται στάγδην σε διάρκεια 25 λεπτών υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη, το σταγονομετρικό χωνί απομακρύνεται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και η αντίδραση διατηρείται υπό συνεχή ανάδευση για 10 λεπτά. Παράλληλα, στη γραμμή υψηλού κενού προσαρμόζονται βαθμονομημένη αμπούλα για τη συλλογή της τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και σφαιρική φιάλη των 50 mL με προσαρμογέα με στρόφιγγα. Ύστερα από εκτενή ξήρανση (flame-drying) όλων των συσκευών αποστάζονται στην αμπούλα 4.0 mL Et₃N (28.87 mmol, MB=101.19, d=0.726 g/mL) και περίπου 30 mL καθαρού EtOAc στη φιάλη με τον προσαρμογέα. Τέλος, η Et₃N μεταφέρεται μέσω απόσταξης στη φιάλη με τον EtOAc, οπότε η ποσότητα της τριαιθυλαμίνης αραιώνεται, ώστε να μη δημιουργηθεί τοπική περίσσεια κατά την προσθήκη της στη φιάλη της αντίδρασης. Παράλληλα, στην διάταξη της αντίδρασης προσαρμόζεται γυάλινο σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα και η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο. Η σφαιρική φιάλη με το διάλυμα της Et₃N απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και το περιεχόμενό της αποχύνεται υπό συνεχή ροή αργού στο σταγονομετρικό χωνί. Η προσθήκη στο διάλυμα πραγματοποιείται στάγδην σε διάρκεια 15 λεπτών υπό έντονη ανάδευση. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη, το σταγονομετρικό χωνί απομακρύνεται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και η αντίδραση διατηρείται για 2.5 ώρες σε παγόλουτρο, υπό ανάδευση και υπό συνεχή ροή αργού. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδός της. Μετά το πέρας των 2.5 ωρών παρατηρείται ο σχηματισμός του άλατος της τριαιθυλαμίνης ως λευκό ίζημα. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και ροή αργού με χρήση γυάλινου φίλτρου por. 3 προς απομάκρυνση του άλατος της τριαιθυλαμίνης και το διήθημα συλλέγεται

σε δίλαιμη σφαιρική 500 mL που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα. Στην συνέχεια, προσαρμόζεται στην φιάλη προσαρμογέας με στρόφιγγα, μεταφέρεται στην γραμμή υψηλού κενού και αποστάζεται όλη η ποσότητα του διαλύτη μέχρι ξηρού. Το προκύπτον στερεό, που έχει την μορφή αφρού αφήνεται για ξήρανση όλο το βράδυ στην γραμμή υψηλού κενού. Την επόμενη ημέρα, αποστάζονται στη φιάλη με το στερεό 200 mL καθαρού EtOAc και παρατηρείται πλήρης διαλυτοποίηση του στερεού. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη 2 L ώστε να πραγματοποιηθούν εκχυλίσσεις για την απομάκρυνση του υδροχλωρικού άλατος που έχει παραχθεί κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Πραγματοποιείται μία εκχύλιση με 100 mL παγωμένο υδατικό διάλυμα 6% χλωριούχο νάτριο (NaCl) (30 g NaCl σε 500 mL milli-Q) και μετρίεται το pH της υδατικής στιβάδας, που είναι ~4. Ακολουθούν 2 εκχυλίσσεις της οργανικής στιβάδας με παγωμένο υδατικό διάλυμα 0.5% όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃) και 6% χλωριούχο νάτριο (NaCl) (2.5 g NaHCO₃ + 30 g NaCl σε 500 mL milli-Q) όπου το pH του διαλύματος μετά τις εκχυλίσσεις φτάνει ~7. Τα διαλύματα των αλάτων είναι απαραίτητο να είναι σε χαμηλή θερμοκρασία διότι σύμφωνα με τη μέθοδο του Posche και του Daly εμποδίζουν την διάνοιξη του δακτυλίου του N-καρβόξυ ανυδρίτη από το νερό, καθώς επίσης και για τη μείωση της αναμιξιμότητας του οξικού αιθυλεστέρα με το νερό. Ύστερα, η οργανική φάση συλλέγεται σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη 500 mL, που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, και προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω προσαρμογέα με στρόφιγγα από τη μία είσοδο και η άλλη είσοδος πωματίζεται με γυάλινο πώμα. Ακολουθεί απαέρωση και μερική απομάκρυνση του διαλύτη σε γειτονική σφαιρική φιάλη μέχρι ~100 mL. Η φιάλη απομακρύνεται από την γραμμή υψηλού κενού, πληρώνεται με αργό και πραγματοποιείται καταβύθιση σε ~1 L εξάνιο, που προηγουμένως είχε ξηρανθεί με MgSO₄ και διηθηθεί, υπό συνεχή ροή αργού. Παρατηρείται ο σχηματισμός λευκού ιζήματος και ακολουθεί διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner, υπό συνεχή ροή αργού, για την παραλαβή του N^ε-BOC-L-Lys NCA. Το λευκό στερεό που προκύπτει, συλλέγεται σε ξηρή σφαιρική φιάλη 250 mL που φέρει προσαρμογέα και στρόφιγγα και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία, αυτή της ανακρυστάλλωσης, για να επιτευχθεί η υψηλή καθαρότητα

του μονομερούς. Την επόμενη ημέρα, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και φυλάσσεται ο ξηρός πλέον N^ε-BOC-L-Lys NCA (3.17 g, 11.64 mmol) (απόδοση=40.3%). Η πορεία των αντιδράσεων που ακολουθείται για τη σύνθεση του N^ε-BOC-L-Lys NCA συνοψίζεται στο παρακάτω Σχήμα.



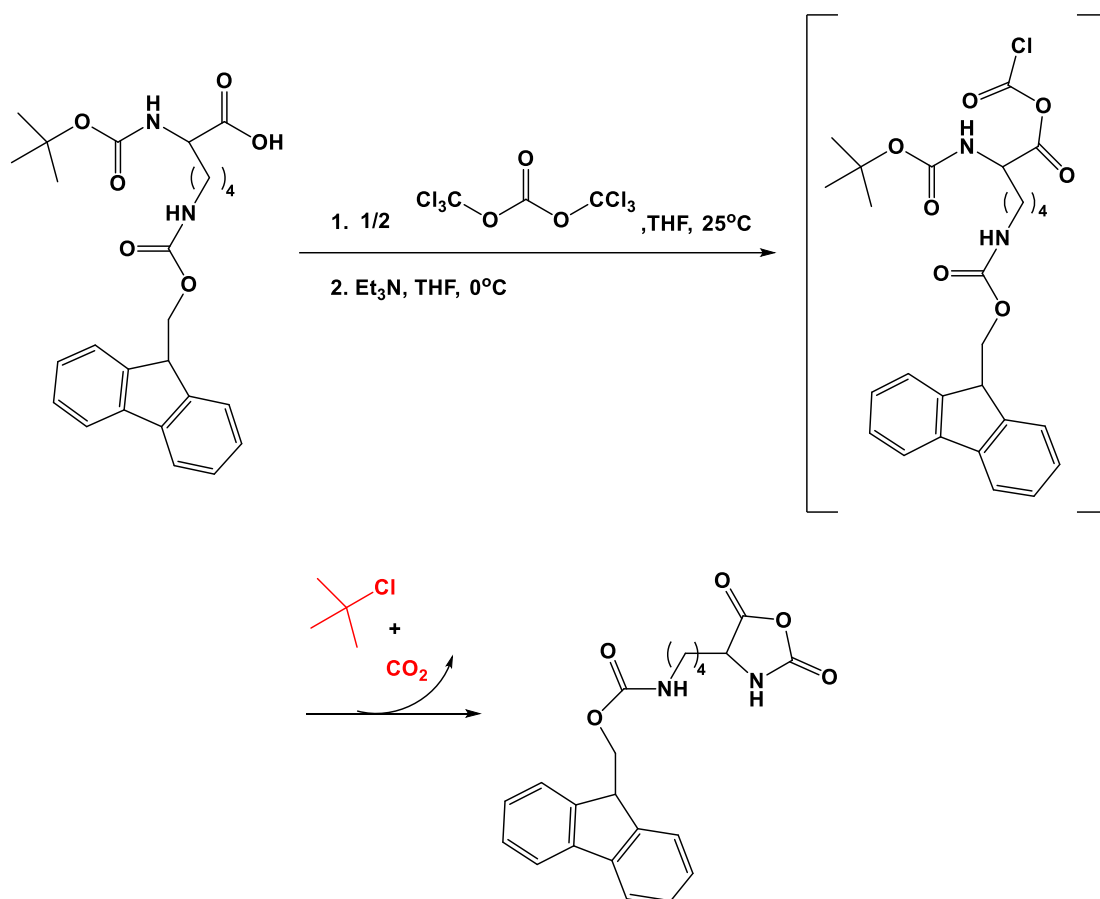
Σχήμα 15: Συνθετική πορεία του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N^ε- tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-L-Λυσίνης (N^ε-BOC-L-Lys NCA).

3.4.2. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N^ε-9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ L-Λυσίνης (N^ε-FMOC-L-Lys NCA)

Σε δίκλιμη σφαιρική φιάλη 500 mL, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, τοποθετούνται 7.6 g της πρόδρομης ένωσης N^ε-FMOC-N^α-BOC-L-Lys (16.22 mmol, MB=468.55). Η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, μέσω προσαρμογέα με στρόφιγγα από τη μία είσοδο, η άλλη είσοδος πωματίζεται με γυάλινο πώμα και το στερεό αφήνεται για ξήρανση για μια μέρα. Μετά το πέρας 24 ωρών, αποστάζονται στη φιάλη ~150 mL καθαρού THF και στο τέλος της απόσταξης πραγματοποιείται απαέρωση. Μετά το τέλος της απόσταξης το διάλυμα είναι πλήρως διαυγές. Η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό και

προετοιμάζεται η διάταξη για την αντίδραση. Στη μία είσοδο τοποθετείται κατάλληλο επίθεμα για συνεχή ροή αργού και στην κεντρική είσοδο της φιάλης γυάλινο σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα. Η φιάλη τοποθετείται σε υδρόλουτρο. Παράλληλα, στη γραμμή υψηλού κενού προσαρμόζεται φιάλη των 50 mL με προσαρμογέα με στρόφιγγα και ύστερα από εκτενή ξήρανση (flame-drying) αποστάζονται περίπου 30 mL καθαρού THF. Η σφαιρική φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού, πληρώνεται με αργό και διαλύονται 2.41 g τριφωσγενίου (8.11 mmol, MB=296.748) υπό συνεχή ροή αργού. Το περιεχόμενο της φιάλης αποχύνεται υπό συνεχή ροή αργού στο σταγονομετρικό χωνί. Η προσθήκη του τριφωσγενίου/THF πραγματοποιείται στάγδην σε διάρκεια 30 λεπτών υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη, το σταγονομετρικό χωνί απομακρύνεται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και η αντίδραση διατηρείται υπό συνεχή ανάδευση για 30 λεπτά. Παράλληλα, στη γραμμή υψηλού κενού προσαρμόζονται βαθμονομημένη αμπούλα για τη συλλογή της τριαιθυλαμίνης (Et_3N) και σφαιρική φιάλη των 50 mL με προσαρμογέα με στρόφιγγα. Ύστερα από εκτενή ξήρανση (flame-drying) όλων των συσκευών αποστάζονται στην αμπούλα 2.26 mL Et_3N (16.22 mmol, MB=101.19, $d=0.726$ g/mL) και περίπου 30 mL καθαρού THF στη φιάλη με τον προσαρμογέα. Τέλος, η Et_3N μεταφέρεται μέσω απόσταξης στη φιάλη με το THF, οπότε η ποσότητα της τριαιθυλαμίνης αραιώνεται, ώστε να μη δημιουργηθεί τοπική περίσσεια κατά την προσθήκη της στη φιάλη της αντίδρασης. Παράλληλα στην διάταξη της αντίδρασης προσαρμόζεται γυάλινο σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα και η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο. Η σφαιρική φιάλη με το διάλυμα της Et_3N απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και το περιεχόμενό της αποχύνεται υπό συνεχή ροή αργού στο σταγονομετρικό χωνί. Η προσθήκη στο διάλυμα πραγματοποιείται στάγδην σε διάρκεια 30 λεπτών υπό έντονη ανάδευση. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη, το σταγονομετρικό χωνί απομακρύνεται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και η αντίδραση διατηρείται για 4 ώρες σε παγόλουτρο, υπό ανάδευση και υπό συνεχή ροή αργού. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδός της. Μετά το πέρας των 4 ωρών παρατηρείται ο σχηματισμός του άλατος της τριαιθυλαμίνης ως λευκό ίζημα. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και ροή αργού με χρήση γυάλινου φίλτρου por. 3

προς απομάκρυνση του άλατος της τριαιθυλαμίνης και το διήθημα συλλέγεται σε δίλαιο σφαιρική 500 mL. Στην συνέχεια, προσαρμόζεται στην φιάλη προσαρμογέας με στρόφιγγα, μεταφέρεται στην γραμμή υψηλού κενού και αποστάζεται όλη η ποσότητα του διαλύτη μέχρι ξηρού. Το προκύπτον στερεό, που έχει την μορφή αφρού αφήνεται για ξήρανση όλο το βράδυ στην γραμμή υψηλού κενού. Την επόμενη ημέρα, αποστάζονται στη φιάλη με το στερεό ~200 mL καθαρού EtOAc και παρατηρείται μερική διαλυτοποίηση του στερεού. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό με φίλτρο por. 3. Στο φίλτρο παραμένει το στερεό άλας Et₃N·HCl, ενώ το διήθημα οδηγείται σε ~1.5 L εξάνιο, που προηγουμένως είχε ξηρανθεί με MgSO₄ και διηθηθεί, και καταβυθίζεται ο καθαρός N^ε-FMOC-L-Lys NCA. Όταν ολοκληρωθεί η καταβύθιση, η φιάλη τοποθετείται στους -20 °C μέχρι την επόμενη μέρα, αφού πρώτα έχει κορεστεί με αργό. Την επόμενη ημέρα διηθείται υπό κενό και συνεχή ροή αργού σε δίλαιο σφαιρική φιάλη 2 L με προσαρμοσμένο γυάλινο φίλτρο por. 4, οπότε η ποσότητα του N^ε-FMOC-L-Lys NCA παραμένει στο φίλτρο. Το στερεό συλλέγεται υπό ροή αργού σε σφαιρική φιάλη 250 mL με κατάλληλο προσαρμογέα και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία, αυτή της ανακρυστάλλωσης, για να επιτευχθεί η υψηλή καθαρότητα του N^ε-FMOC-L-Lys NCA και αφήνεται στην γραμμή υψηλού κενού για μια νύχτα. Την επόμενη ημέρα, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και φυλάσσεται ο ξηρός πλέον N^ε-FMOC-L-Lys NCA (5.03 g, 12.75 mmol) (απόδοση=78.6%). Η πορεία των αντιδράσεων που ακολουθείται για τη σύνθεση του N^ε-FMOC-L-Lys NCA συνοψίζεται στο παρακάτω Σχήμα.



Σχήμα 16: Συνθετική πορεία του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N^ε-9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ L-Λυσίνης (N^ε-FMOC-L-Lys NCA).

3.4.3. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N^{im}-τρίτυλο-L-Ιστιδίνης (N^{im}-Trt-L-His NCA)

Η σύνθεση του μονομερούς N^{im}-Trt-L-His NCA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο παραλαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας του N^{im}-Trt-L-His NCA και στη συνέχεια απομακρύνοντας το HCl παραλαμβάνεται το καθαρό μονομερές N^{im}-Trt-L-His NCA. Για την σύνθεση χρησιμοποιήθηκε θειόνυλο-χλωρίδιο αντί του τριφωσγενίου σε μια τροποποιημένη πορεία από αυτήν της λυσίνης.

A) Σύνθεση N^{im}-Trt-L-His NCA*HCl

Σε δίκλιμη σφαιρική φιάλη 1 L, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, τοποθετούνται 10 g της πρόδρομης ένωσης Boc-His(Trt)-OH (20.1 mmol, MB=497.60). Η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, μέσω προσαρμογέα με στρόφιγγα από τη μία είσοδο, η άλλη είσοδος πωματίζεται με γυάλινο πώμα και το στερεό αφήνεται για ξήρανση για μια μέρα. Μετά το πέρας 24 ωρών, αποστάζονται στη φιάλη ~150 mL καθαρού THF και στο τέλος της απόσταξης πραγματοποιείται απαέρωση. Μετά το τέλος της απόσταξης το διάλυμα είναι πλήρως διαυγές και κιτρινωπό. Η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό και προετοιμάζεται η διάταξη για την αντίδραση. Στη μία είσοδο τοποθετείται κατάλληλο επίθεμα για συνεχή ροή αργού και στην κεντρική είσοδο της φιάλης γυάλινο σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα. Η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο, ώστε να επιβραδυνθούν πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις. Παράλληλα, στη γραμμή υψηλού κενού προσαρμόζεται φιάλη των 100 mL η οποία περιέχει θειονυλο-χλωρίδιο (SOCl₂) και ακολουθεί απαέρωση. Προσαρμόζονται επιπλέον βαθμονομημένη αμπούλα για τη συλλογή του SOCl₂ και σφαιρική φιάλη των 100 mL με προσαρμογέα με στρόφιγγα. Ύστερα από εκτενή ξήρανση (flame-drying) όλων των συσκευών αποστάζονται στην αμπούλα 1.7 mL SOCl₂ (23.44 mmol, MB=118.96, d=1.64 g/mL) και περίπου 50 mL καθαρού THF στη φιάλη με τον προσαρμογέα. Τέλος, το SOCl₂ μεταφέρεται μέσω απόσταξης στη φιάλη με το THF. Η σφαιρική φιάλη με το διάλυμα SOCl₂/THF απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και το περιεχόμενό της αποχύνεται υπό συνεχή ροή αργού στο σταγονομετρικό χωνί. Η προσθήκη του SOCl₂/THF πραγματοποιείται στάγδην σε διάρκεια 25 λεπτών υπό συνεχή ανάδευση. Παρατηρείται ότι με το πέρας της προσθήκης το διάλυμα έχει αποκτήσει ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα και το ιξώδες έχει αυξηθεί. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη, το σταγονομετρικό χωνί απομακρύνεται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και η αντίδραση διατηρείται για 2.5 ώρες σε παγόλουτρο, υπό ανάδευση και υπό συνεχή ροή αργού. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδος της. Μετά το πέρας των 2.5 ωρών από την προσθήκη του SOCl₂ παρατηρείται έντονη αύξηση του ιξώδους και σχηματισμός λευκού στερεού ιζήματος.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστίθενται ~2 L διαιθυλαιθέρα προς απομάκρυνση ενδιάμεσων παραπροϊόντων. Σαν ίζημα παραμένει το N^{im} -Trt-L-His*HCl NCA. Για τη σωστή καταβύθιση του N^{im} -Trt-L-His*HCl NCA πραγματοποιείται θραύση του στερεού με τη βοήθεια σπάτουλας, υπό συνεχή ροή αργού, έτσι ώστε να δημιουργηθεί κίτρινο αιώρημα στο διάλυμα με τον διαιθυλαιθέρα. Το διάλυμα διηθείται υπό κενό σε φίλτρο por. 4, συλλέγεται το στερεό N^{im} -Trt-L-His*HCl σε καθαρή και ξηρή σφαιρική φιάλη 1 L με κατάλληλο προσαρμογέα και αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

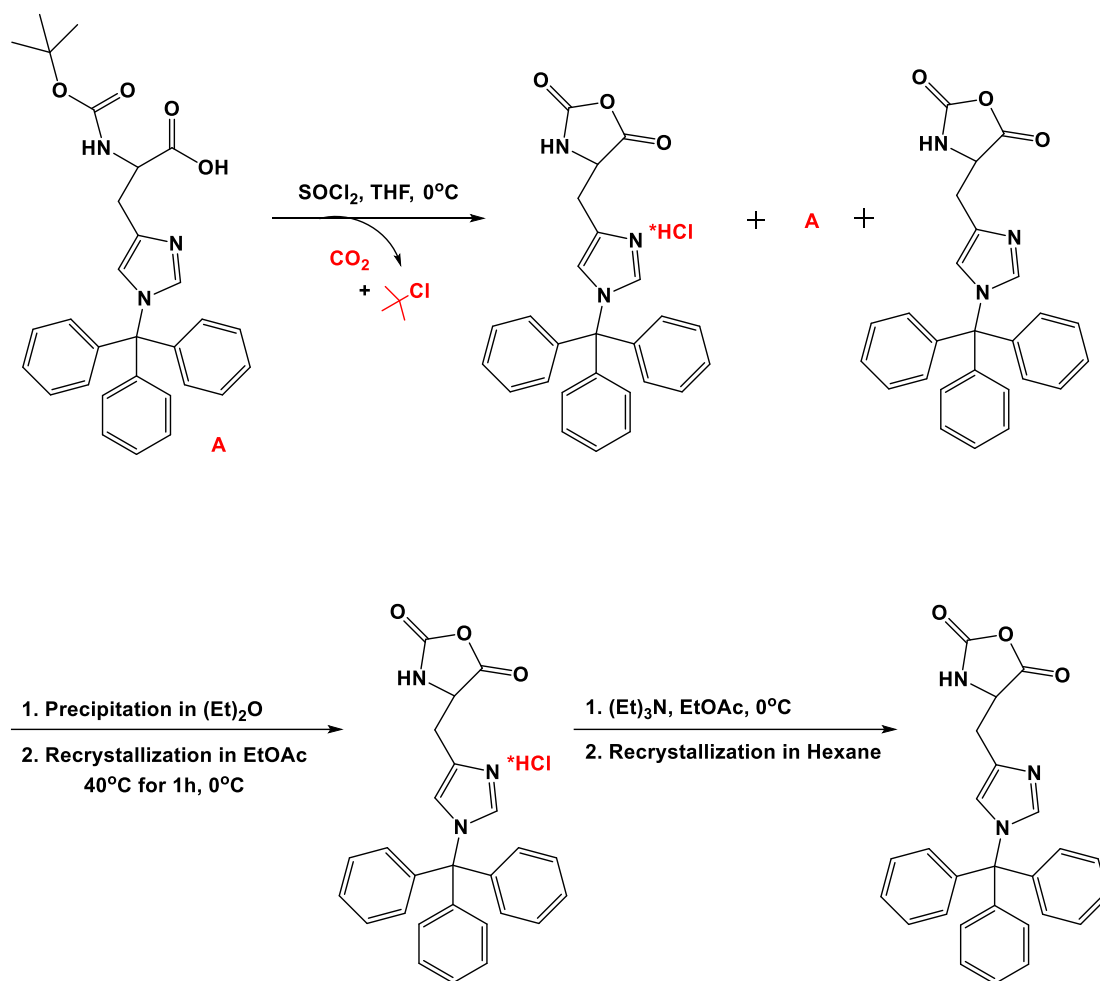
Την επόμενη ημέρα, αποστάζονται στη φιάλη με το στερεό ~250 mL καθαρού οξικού αιθυλεστέρα και το γαλακτώδες και κιτρινωπό διάλυμα που προκύπτει, αφήνεται υπό ανάδευση στη γραμμή υψηλού κενού σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 1 ώρα. Μετά το πέρας της 1 ώρας, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και το διάλυμα ψύχεται σε λουτρό με παγόνερο (0 °C) για περίπου 30 λεπτά, αφού πρώτα έχει κορεστεί με αργό, οπότε καταβυθίζεται με τη μορφή ιζήματος το N^{im} -Trt-L-His*HCl NCA. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι καλός διαλύτης για το πρόδρομο αμινοξύ, το ενδιάμεσο χλωρίδιο αλλά και το ελεύθερο μονομερές, ενώ αποτελεί κακό διαλύτη για το άλας της N^{im} -Trt-L-His. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό με φίλτρο por. 4 υπό συνεχή ροή αργού για να παραλάβουμε το στερεό N^{im} -Trt-L-His*HCl NCA. Το στερεό, που είναι υποκίτρινο και έχει υφή πούδρας, συλλέγεται υπό ροή αργού σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη 100 mL με κατάλληλο προσαρμογέα και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

B) Σύνθεση του N^{im} -Trt-L-His NCA

Αφού ολοκληρωθεί η σύνθεση του N^{im} -Trt-L-His*HCl NCA ακολουθεί το επόμενο στάδιο που περιλαμβάνει την προσθήκη ισομοριακής ποσότητας τριαιθυλαμίνης στο N^{im} -Trt-L-His*HCl NCA με σκοπό την απομάκρυνση του HCl ώστε τελικά να συλλεχθεί σαν τελικό προϊόν ο N^{im} -Trt-L-His NCA.

Η σφαιρική φιάλη 100 mL με το ξηρό πλέον στερεό ζυγίζεται (6.22 g, 13.52 mmol) και η ποσότητα του στερεού μεταφέρεται υπό συνεχή ροή αργού σε ξηρή δίλιμη σφαιρική φιάλη 500 mL, η οποία προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού

κενού και αποστάζονται σε αυτή περίπου 200 mL καθαρού οξικού αιθυλεστέρα. Στη συνέχεια, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού, μεταφέρεται στον απαγωγό και τοποθετείται σε λουτρό με παγόνερο (0 °C), ενώ προσαρμόζονται σε αυτή κατάλληλο επίθεμα για συνεχή παροχή αργού και γυάλινο σταγονομετρικό χωνί με στρόφιγγα. Παράλληλα, στη γραμμή υψηλού κενού προσαρμόζονται βαθμονομημένη αμπούλα για τη συλλογή της τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και σφαιρική φιάλη των 50 mL με προσαρμογέα με στρόφιγγα. Ύστερα από εκτενή ξήρανση (flame-drying) όλων των συσκευών αποστάζονται στην αμπούλα 1.88 mL Et₃N (13.52 mmol, MB=101.19, d=0.726 g/mL) και περίπου 30 mL καθαρού οξικού αιθυλεστέρα στη φιάλη με τον προσαρμογέα. Τέλος, η Et₃N μεταφέρεται μέσω απόσταξης στη φιάλη με τον οξικό αιθυλεστέρα, οπότε η ποσότητα της τριαιθυλαμίνης αραιώνεται, ώστε να μη δημιουργηθεί τοπική περίσσεια κατά την προσθήκη της στη φιάλη της αντίδρασης. Η σφαιρική φιάλη με το διάλυμα της Et₃N απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και το περιεχόμενό της αποχύνεται υπό συνεχή ροή αργού στο σταγονομετρικό χωνί. Η προσθήκη στο διάλυμα του N^{im}-Trt-L-His*HCl NCA πραγματοποιείται στάγδην σε διάρκεια 20 λεπτών υπό έντονη ανάδευση. Μετά το τέλος της αντίδρασης δημιουργείται το υδροχλωρικό άλας της τριαιθυλαμίνης και είναι αδιάλυτο στον οξικό αιθυλεστέρα (σχηματισμός ιζήματος), ενώ ο N^{im}-Trt-L-His NCA παραμένει διαλυτός. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των δύο ενώσεων όπου πραγματοποιείται μέσω διήθησης υπό κενό με φίλτρο por. 4. Στο φίλτρο παραμένει το στερεό άλας Et₃N·HCl, ενώ το διήθημα οδηγείται σε ~1.5 L εξάνιο, που προηγουμένως είχε ξηραθεί με MgSO₄ και διηθηθεί, και καταβυθίζεται ο πλέον καθαρός N^{im}-Trt-L-His NCA. Αμέσως διηθείται υπό κενό και συνεχή ροή αργού σε δίκλιμη σφαιρική φιάλη 2 L με προσαρμοσμένο φίλτρο por. 4, οπότε η ποσότητα του N^{im}-Trt-L-His NCA παραμένει στο φίλτρο. Το λευκό στερεό που προκύπτει, συλλέγεται σε ξηρή σφαιρική φιάλη 250 mL που φέρει προσαρμογέα και στρόφιγγα και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και φυλάσσεται ο ξηρός πλέον N^{im}-Trt-L-His NCA (4.9 g, 11.57 mmol) (απόδοση=58%). Η πορεία των αντιδράσεων που ακολουθείται για τη σύνθεση του N^{im}-Trt-L-His NCA συνοψίζεται στο παρακάτω Σχήμα.



Σχήμα 17: Συνθετική πορεία του N-Καρβόξυ Ανυδρίτη της N^{im}-τρίτυλο-L-Ιστιδίνης (N^{im}-Trt-L-His NCA).

3.5. Σύνθεση κατά συστάδες εμβολιασμένου πεπτιδίου του τύπου Poly(L-Lysine)-*b*-(Poly(L-Lysine)-*g*-Poly(L-Histidine)) (PLL-*b*-(PLL-*g*-PHis))

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση κατά συστάδες εμβολιασμένου πεπτιδίου του τύπου PLL₇₈-*b*-(PLL₁₀-*g*-PHis₁₅). Αρχικά πραγματοποιείται η σύνθεση του πρόδρομου δισυσταδικού πολυμερούς poly(N^ε-BOC-L-Lysine)-*b*-poly(N^ε-FMOC-L-Lysine) (PBL₇₈-*b*-PFLL₁₀) και ακολουθεί η αποπροστασία των πλευρικών ομάδων της δεύτερης συστάδας ώστε οι ελεύθερες πλέον αμινομάδες να είναι ικανές να εκκινήσουν τον πολυμερισμό του N-καρβόξυ ανυδρίτη της ιστοδίνης (N^{im}-Trt-L-His NCA). Τέλος πραγματοποιείται η αποπροστασία των πλευρικών ομάδων της λυσίνης

και της ιστιδίνης. Οι παραπάνω διαδικασίες περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

3.5.1. Σύνθεση πρόδρομου δισυσταδικού πολυμερούς του τύπου **Poly(N^ε-BOC-L-Lysine)-*b*-poly(N^ε-FMOC-L-Lysine) (PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀)**

Από συσκευή αραίωσης απαραίτητη αποχύνεται 1 mL σε μία από τις αμπούλες που φέρει και λαμβάνεται με σύντηξη στη στένωση, η οποία περιέχει τον απαραίτητη εξυλαμίνη αραιωμένο σε εξάνιο. Η αμπούλα προσκολλάται μέσω υαλουργικών τεχνικών σε ειδική συσκευή πολυμερισμού των 250 mL, που περιλαμβάνει επίθεμα για τη προσαρμογή της στη γραμμή υψηλού κενού με στρόφιγγα και περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα και δύο επιπλέον αμπούλες με εσμύρισματα και με γυάλινους υμένες (break-seals) για την προσθήκη των μονομερών.

Στη συνέχεια, η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω του εσμυρίσματος, ελέγχεται διεξοδικά για την ύπαρξη μικροσπών με χρήση του πηνίου Tesla και ξηραίνεται ενδεδειχώς (flame-drying) για την απομάκρυνση της υγρασίας. Αποστάζονται ~15 mL καθαρού διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF) στη συσκευή του πολυμερισμού μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Ο διαλύτης αποστάζεται κλασματικά, καθώς τα πρώτα mL απορρίπτονται στην παγίδα αζώτου. Έπειτα, η συσκευή απομακρύνεται από την γραμμή υψηλού κενού και επανατοποθετείται σε αυτή από την πλευρά της αμπούλας και αφού απαερωθεί το συγκεκριμένο τμήμα της και ξηραθεί ενδεδειχώς (flame-drying), μεταφέρεται στο glove box, όπου φυλάσσονται τα μονομερή (NCAs) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά την εισαγωγή της συσκευής στον κύριο θάλαμο, ανοίγεται και αφαιρείται ο προσαρμογέας ώστε να εξισορροπηθεί η πίεση εντός της αμπούλας της συσκευής και ακολούθως προστίθενται 1.27 g από τον N^ε-BOC-L-Lys NCA (4.66 mmol, MB=272.3). Η αμπούλα απομονώνεται πρώτα μέσω της στρόφιγγας του προσαρμογέα και η συσκευή εξέρχεται από το glove box, και ύστερα μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού.

Στη συνέχεια, αποστάζονται στην αμπούλα ~10 mL καθαρού DMF, ώστε να διαλυτοποιηθεί το μονομερές. Όσο ακόμα το διάλυμα του μονομερούς σε DMF

είναι παγωμένο, η αμπούλα συντήκεται στη στένωση που φέρει ώστε να παραμείνει υπό κενό και η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού. Ακολουθεί θραύση του γυάλινου υμένα (break-seal) της αμπούλας του απαρχητή, θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας του μονομερούς και γίνεται ποσοτική απόχυση του διαλύματος στην φιάλη ώστε να αντιδράσουν ταυτοχρόνως όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές και να αποφευχθεί τοπική περίσσεια, που δυνητικά θα οδηγούσε σε διαφορετικούς χρόνους έναρξης των πολυμερικών αλυσίδων.

Η συσκευή προσαρμόζεται στην γραμμή υψηλού κενού και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα. Μετά το πέρας της 1 ώρας πραγματοποιείται απαέρωση και παρατηρείται έκλυση διοξειδίου του άνθρακα από το διάλυμα υπό μορφή φυσαλίδων, το οποίο υποδηλώνει την έναρξη του πολυμερισμού και αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη διάδοση του πολυμερισμού. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η αντίδραση απαερώνεται με σκοπό να εκτονωθεί και να απομακρυνθεί το υπερκείμενο αέριο διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί και έτσι η ισορροπία της αντίδρασης να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Το διάλυμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ημέρες μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το μονομερές, ενώ η πορεία του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. Παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών που διεξάγεται ο πολυμερισμός αυξάνεται το ιξώδες του διαλύματος και μετατρέπεται σταδιακά από διαυγές σε λευκό και μη διαυγές (θολό), γεγονός που αποτελεί ένδειξη της επιτυχής σύνθεσης του πολυμερούς.



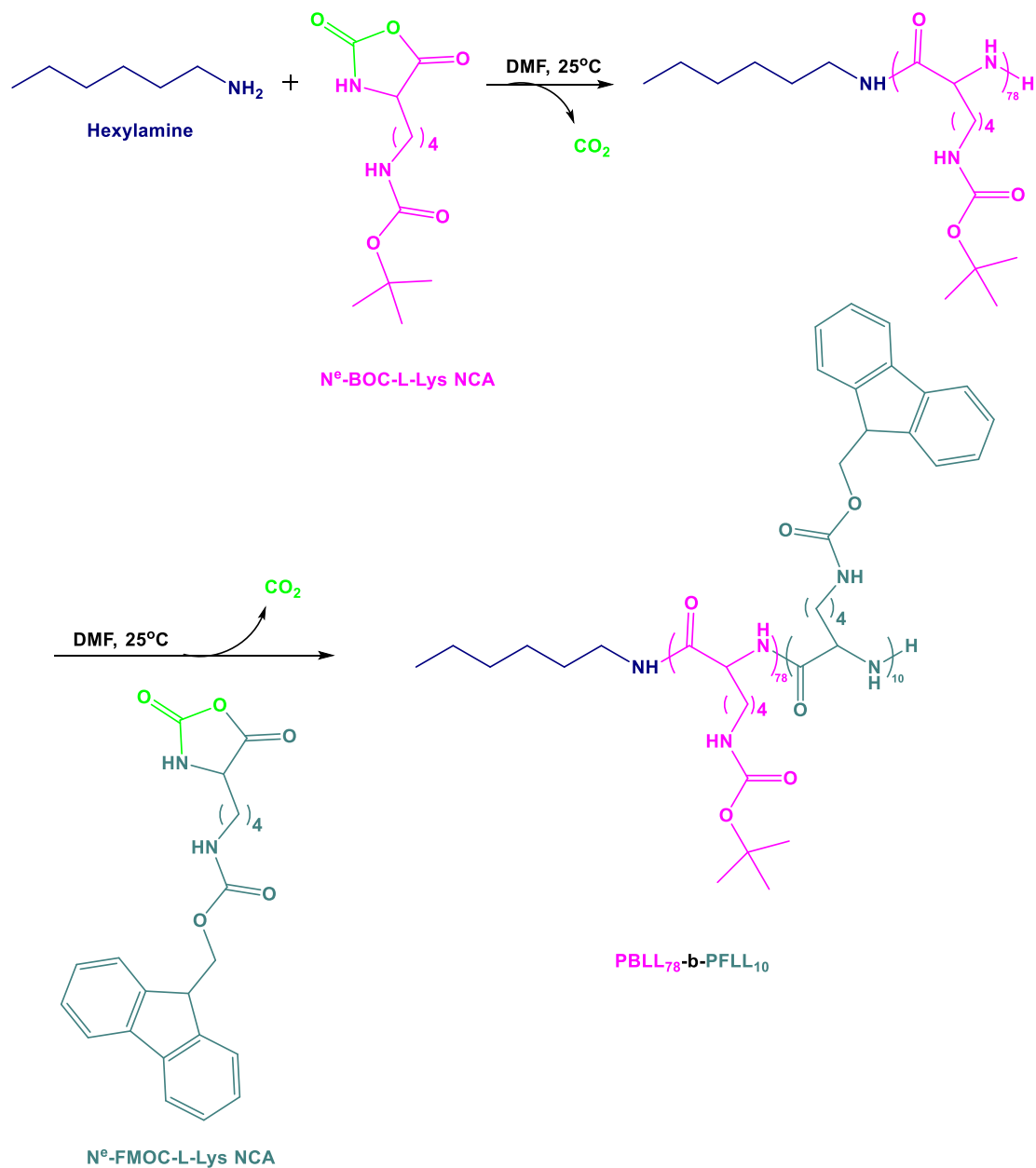
Εικόνα 18: Συσσκευή πολυμερισμού που περιλαμβάνει την αμπούλα του απαρχητή και τις αμπούλες των μονομερών (αριστερά), το διάλυμα του απαρχητή και του μονομερούς μετά την θραύση των γυάλινων υμένων (δεξιά).

Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού δεν παρατηρείται πλέον έκλυση διοξειδίου του άνθρακα και ακολούθως πραγματοποιείται η προσθήκη του δεύτερου μονομερούς (N^{ϵ} -FMOC-L-Lys NCA) στο διάλυμα του πολυμερισμού χωρίς να προηγηθεί διαδικασία απομόνωσης.

Πιο συγκεκριμένα, η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού από την πλευρά της αμπούλας του δεύτερου μονομερούς, πραγματοποιείται ενδεδειγμένη ξήρανση (flame-drying) στο συγκεκριμένο τμήμα και μεταφέρονται στην αμπούλα 0.237 g (0.6 mmol, MB=394.43) N^{ϵ} -FMOC-L-Lys NCA εντός glove box. Στη συνέχεια η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού από την πλευρά της αμπούλας του μονομερούς μέσω κατάλληλου προσαρμογέα που διατηρεί αδρανή ατμόσφαιρα μετά την εξαγωγή από το glove box. Στη συνέχεια αποστάζονται κλασματικά ~5 mL καθαρού DMF στον N^{ϵ} -FMOC-L-Lys NCA και ενώ το διάλυμα είναι παγωμένο, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή μέσω σύντηξης στη στένωση που φέρει η αμπούλα. Μετά την πλήρη διάλυση του μονομερούς, γίνεται ποσοτική προσθήκη στη φιάλη του πολυμερισμού με θραύση του γυάλινου υμένα, υπό συνεχή ανάδευση. Η συσκευή προσαρμόζεται στην γραμμή υψηλού κενού και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα. Μετά το πέρας της 1 ώρας πραγματοποιείται απαέρωση και παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές φυσαλίδες διοξειδίου του άνθρακα που υποδεικνύουν την

έναρξη και διάδοση του πολυμερισμού. 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. Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού και του δεύτερου μονομερούς δεν παρατηρείται πλέον έκλυση φυσαλίδων διοξειδίου του άνθρακα, στη φιάλη εισάγεται ατμοσφαιρικός αέρας ανοίγοντας τη στρόφιγγα της συσκευής και ακολουθεί καταβύθιση σε 300 mL κρύου διαιθυλαιθέρα. Το ποτήρι αφήνεται στο ψυγείο (-20°C) για μία μέρα ώστε να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερη καταβύθιση του πολυμερούς.

Την επόμενη ημέρα, το στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου. Το λευκό στερεό που συλλέγεται, μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Μετά την ξήρανσή του, το προστατευμένο πολυμερές φυλάσσεται σε βιάι στους 3 °C. Συνοπτικά, η γενική πορεία που ακολουθείται για τη σύνθεση του PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀ δίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



Σχήμα 18: Αντίδραση πολυμερισμού (ROP) για το πλήρως προστατευμένο συμπολυμερές του τύπου PBLL₇₈-b-PFLL₁₀.

3.5.2. Εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της 2^{ης} συστάδας στο προστατευμένο συμπολυμερές του τύπου PBLL₇₈-b-PFLL₁₀

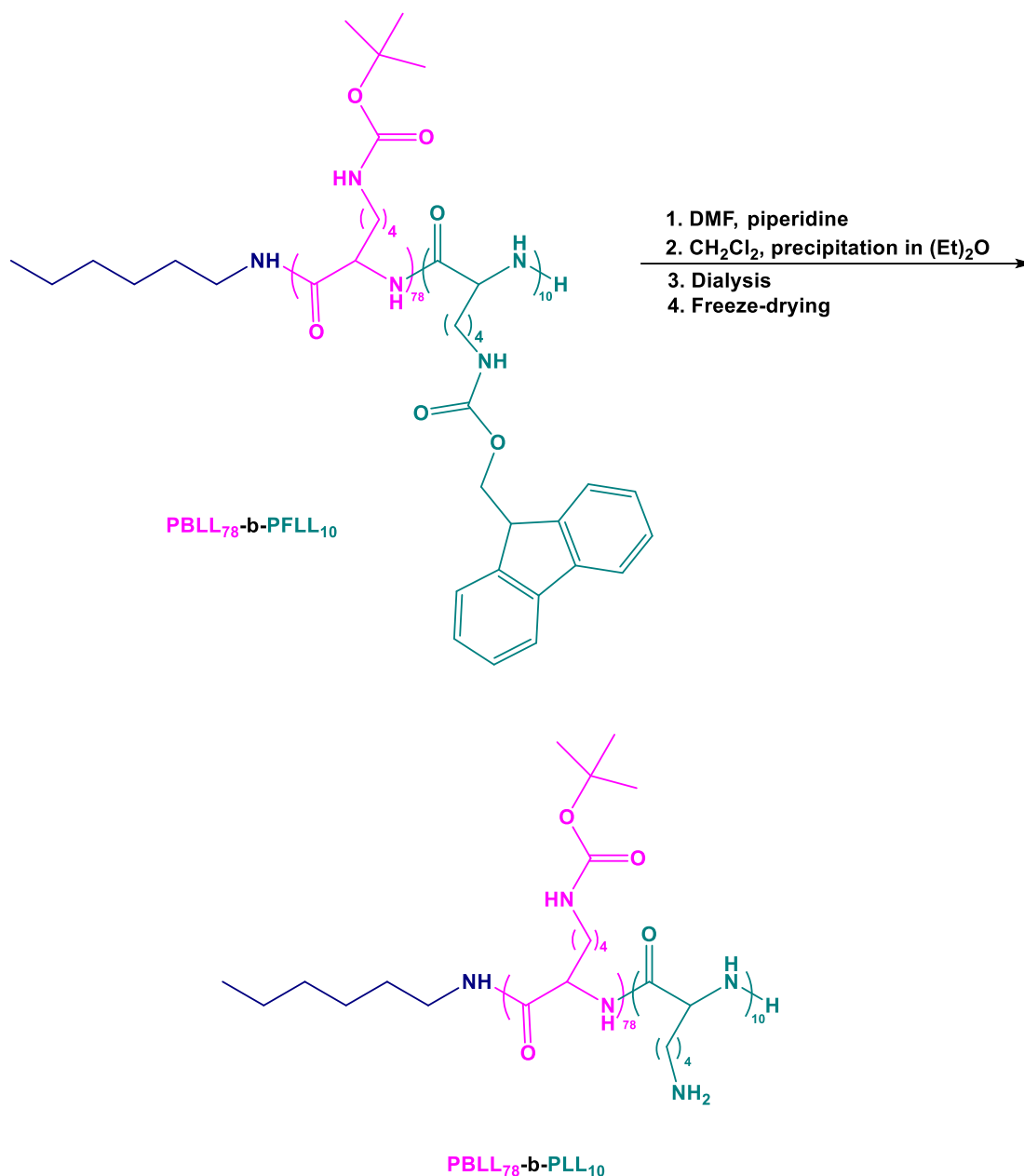
Ακολούθως περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για την εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της 2^{ης} συστάδας στο συμπολυμερές που συντέθηκε. Με αυτόν τον τρόπο οι ελεύθερες πλέον αμινομάδες είναι ικανές να εκκινήσουν τον πολυμερισμό του N-καρβόξυ

ανυδρίτη της ιστιδίνης (N^{im} -Trt-L-His NCA). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η FMOC ομάδα είναι μια σημαντική προστατευτική ομάδα και μπορεί να συνδυαστεί με την ομάδα BOC, αφού απομακρύνεται σε βασικές συνθήκες σε αντίθεση με την BOC που απαιτεί όξινες συνθήκες για την απομάκρυνση της. Έτσι είναι δυνατή η εκλεκτική αποπροστασία.

Πιο συγκεκριμένα, σε φιάλη των 50 mL που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα και το πλήρως προστατευμένο πολυμερές, προστίθενται 30 mL DMF και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του πολυμερούς. Στην συνέχεια η φιάλη προσαρμόζεται στην γραμμή υψηλού κενού μέσω προσαρμογέα με στρόφιγγα και αποστάζονται ~10 mL πιπεριδίνης και το διάλυμα αφήνεται για 1 ώρα υπό ανάδευση. Ακολουθεί απόσταξη της ποσότητας του διαλύτη σε γειτονική φιάλη μέχρι ξηρού και η φιάλη αφήνεται στην γραμμή υψηλού κενού για ξήρανση για μία νύχτα.

Την επόμενη ημέρα η φιάλη απομακρύνεται από την γραμμή υψηλού κενού, προστίθενται 30 mL διχλωρομεθανίου (CH_2Cl_2) και το διάλυμα αφήνεται σε υδρόλουτρο (30 °C), υπό ανάδευση για 1 ώρα. Στην συνέχεια ακολουθεί καταβύθιση σε ποτήρι που περιέχει 300 mL κρύο διαιθυλαιθέρα. Το ποτήρι αφήνεται στο ψυγείο (-20°C) για μία μέρα ώστε να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερη καταβύθιση του αποπροστατευμένου, ως προς την FMOC ομάδα, πολυμερούς. Την επόμενη ημέρα, το καταβυθισμένο στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου. Το λευκό στερεό που συλλέγεται, μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Μετά την ξήρανσή του ακολουθεί η διαδικασία της διαπίδυσης (dialysis), όπου η φιάλη του πολυμερούς απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και προστίθενται σε αυτή 10 mL milli-Q και αφήνεται υπό ανάδευση για μισή ώρα. Δεν παρατηρείται διαλυτοποίηση του στερεού. Ακολουθεί η διόρθωση του pH του διαλύματος με τη προσθήκη σταγόνων υδατικού διαλύματος NaOH 0.01 N μέχρι την αύξηση του pH από 8.5 σε 10. Το διάλυμα μεταφέρεται σε μεμβράνη (MWCO = 1K) για να καθαριστεί με διαπίδυση και τοποθετείται σε ποτήρι που περιέχει 2 L milli-Q. Το pH του εξωτερικού milli-Q προσαρμόζεται και αυτό στη τιμή 10 με προσθήκη υδατικού διαλύματος NaOH 1N και η μεμβράνη αφήνεται στο ποτήρι υπό ανάδευση για 1 μέρα. Την επόμενη μέρα ακολουθούν 2

αλλαγές στο νερό του συστήματος με σκέτο milli-Q ανά 3 ώρες. Το διάλυμα του πολυμερούς συλλέγεται από τη μεμβράνη σε μία φιάλη και ακολουθεί λυοφιλοποίηση (freeze-drying) για την απομάκρυνση του νερού. Το πολυμερές PBLL-*b*-PLL που συλλέγεται έχει λευκό χρώμα και μάζα ίση με 0.3738 g.



Σχήμα 19: Αντίδραση αποπροστασίας των δομικών μονάδων της 2^{ης} συστάδας του συμπολυμερούς PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀.

3.5.3. Σύνθεση κατά συστάδες εμβολιασμένου πεπτιδίου του τύπου Poly(L-Lysine)-*b*-(Poly(L-Lysine)-*g*-Poly(L-Histidine)) (PLL-*b*-(PLL-*g*-PHis))

Αφού ολοκληρώθηκε η σύνθεση και η εκλεκτική αποπροστασία του συμπολυμερούς PBL₇₈-*b*-PFLL₁₀, ακολούθησε η σύνθεση του εμβολιασμένου πολυπεπτιδίου με τη χρήση των αμινομάδων των πλευρικών ομάδων της 2^{ης} συστάδας της λυσίνης ως απαρχητές πολυμερισμού του μονομερούς της ιστοιδίνης (N^{im}-Trt-L-His NCA) για τη σύνθεση του PLL₇₈-*b*-(PLL₁₀-*g*-PHis₁₅).

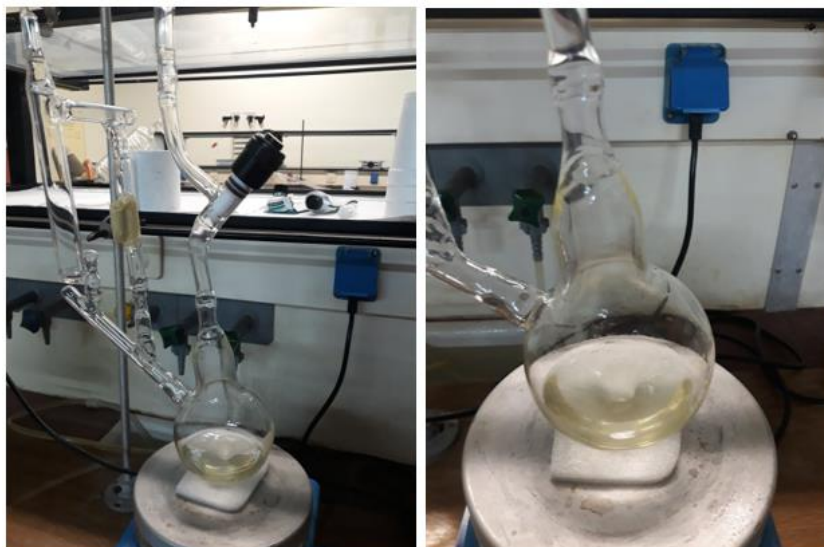
Σε ειδική συσκευή πολυμερισμού των 250 mL, που περιλαμβάνει επίθεμα για τη προσαρμογή της στη γραμμή υψηλού κενού με στρόφιγγα και περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα και αμπούλα με εσμύρισμα και γυάλινο υμένα (break-seals) για την προσθήκη του μονομερούς, προστίθεται η ποσότητα του μακροαπαρχητή (0.3738 g, 0.019 mmol, MB=19194). Η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφήνεται για ξήρανση για 1 νύχτα.

Την επόμενη ημέρα, γίνεται απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας από το πολυμερές με απόσταξη περίπου 40 mL καθαρού THF στη φιάλη του πολυμερισμού. Μόλις ληφθεί η απαραίτητη ποσότητα, η φιάλη τοποθετείται σε υδρόλουτρο (35-40 °C) υπό συνεχή ανάδευση, ώστε να διαλυθεί πλήρως το πολυμερές. Μετά τη διαλυτοποίηση του στερεού, το THF αποστάζεται σε γειτονική κενή σφαιρική φιάλη. Το THF έχει την ικανότητα να σχηματίζει αζεοτροπικό μείγμα με το H₂O και συνεπώς η υγρασία συμπαρασύρεται και απομακρύνεται εύκολα από το στερεό, όταν η ποσότητα του διαλύτη αποσταχθεί σε γειτονική φιάλη. Η υψηλή καθαρότητα τόσο του μακροαπαρχητή όσο και του μονομερούς κρίνεται απαραίτητη για τον ελεγχόμενο χαρακτήρα του πολυμερισμού και για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων. Το καθαρό από υγρασία συμπολυμερές PBL₇₈-*b*-PFLL₁₀ που απομένει στη συσκευή πολυμερισμού, αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για ένα βράδυ.

Την επόμενη ημέρα, αποστάζονται περίπου 25 mL καθαρού DMF στη συσκευή του πολυμερισμού που περιέχει την ποσότητα του μακροαπαρχητή μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Ο διαλύτης αποστάζεται κλασματικά, καθώς τα πρώτα

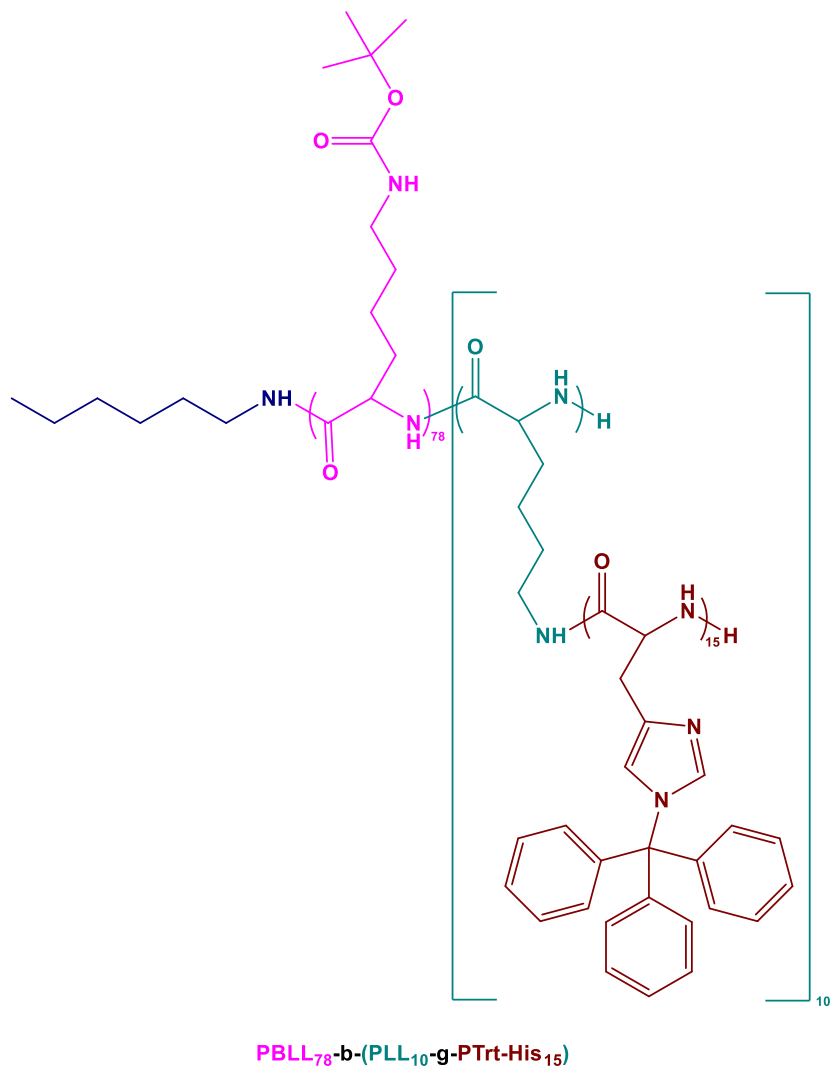
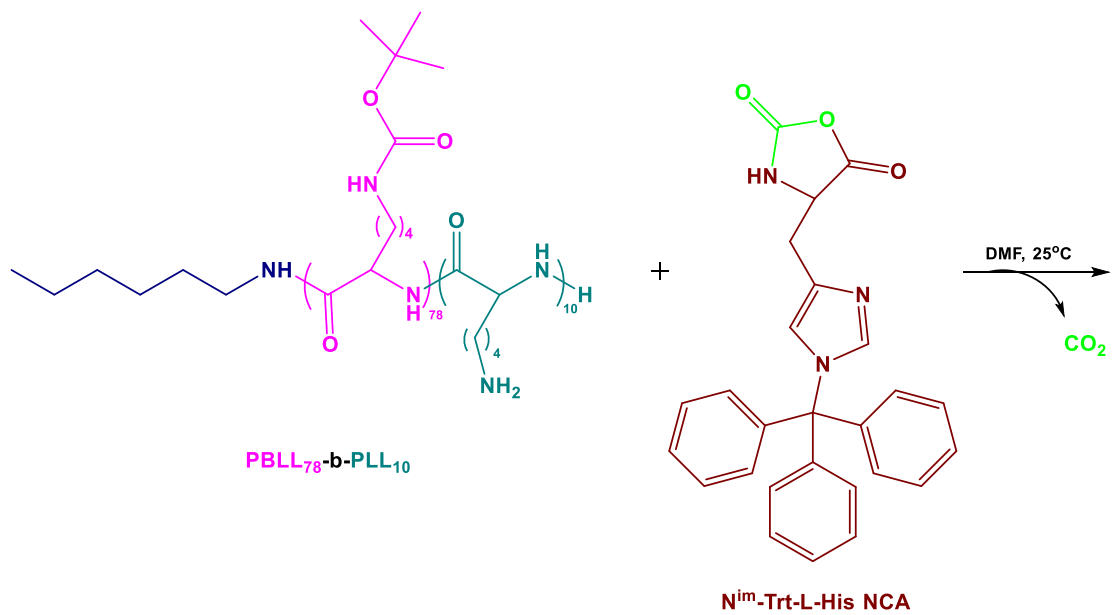
mL απορρίπτονται στη παγίδα αζώτου. Μόλις ληφθεί η απαραίτητη ποσότητα, η φιάλη τοποθετείται σε υδρόλουτρο (35 °C) υπό συνεχή ανάδευση, ώστε να διαλυθεί πλήρως το PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀ δίνοντας ένα διαυγές και άχρωμο διάλυμα. Έπειτα, η συσκευή αποσπάται από την γραμμή υψηλού κενού και επανατοποθετείται σε αυτή από την πλευρά της αμπούλας και αφού απαερωθεί το συγκεκριμένο τμήμα της και ξηρανθεί ενδελεχώς (flame-drying), μεταφέρεται στο glove box. Μετά την εισαγωγή της συσκευής στον κύριο θάλαμο, ανοίγεται και αφαιρείται ο προσαρμογέας ώστε να εξισορροπηθεί η πίεση εντός της αμπούλας της συσκευής και ακολούθως προστίθενται διαδοχικά 1.27 g (3.0 mmol, MB=423.47) από τον N^{im}-Trt-L-His NCA. Η αμπούλα απομονώνεται πρώτα μέσω της στρόφιγγας του προσαρμογέα και η συσκευή εξέρχεται από το glove box, και ύστερα μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού. Στη συνέχεια, αποσπάζονται στην αμπούλα περίπου 15 mL καθαρού DMF, ώστε να διαλυτοποιηθεί το μονομερές πριν γίνει η προσθήκη του στο διάλυμα του μακροαπαρχητή. Όσο ακόμα το διάλυμα του μονομερούς σε DMF είναι παγωμένο, η αμπούλα συντήκεται στη στένωση που φέρει ώστε να παραμείνει υπό κενό και η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού. Μετά την πλήρη διάλυση του μονομερούς στο DMF, πραγματοποιείται θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας και το περιεχόμενο διάλυμα αποχύνεται ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη πολυμερισμού, ώστε να εκκινήσει ο πολυμερισμός και να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και 1 ώρα μετά απαερώνεται, οπότε παρατηρείται έκλυση διοξειδίου του άνθρακα από το διάλυμα υπό μορφή φυσαλίδων, το οποίο υποδηλώνει την έναρξη του πολυμερισμού και αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη διάδοση του πολυμερισμού. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η αντίδραση απαερώνεται με σκοπό να εκτονωθεί και να απομακρυνθεί το υπερκείμενο αέριο διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί και έτσι η ισορροπία της αντίδρασης να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Το διάλυμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 ημέρες μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το μονομερές, ενώ η πορεία του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. Παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών που διεξάγεται ο πολυμερισμός το διάλυμα μετατρέπεται

σταδιακά από έντονο κίτρινο και διαυγές σε λευκό-κιτρινωπό και μη διαυγές (θολό), γεγονός που αποτελεί ένδειξη για την επιτυχή σύνθεση του πολυπεπτιδίου.



Εικόνα 19: Συσκευή πολυμερισμού που περιλαμβάνει την αμπούλα του μονομερούς (αριστερά), το διάλυμα του μακροαπαρχητή και του μονομερούς μετά την θραύση του γυάλινου υμένα (δεξιά).

Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του $PBLL-b-(PLL-g-P(Trt)-His)$ (δεν παρατηρείται πλέον έκλυση διοξειδίου του άνθρακα), η απομόνωση του πολυμερούς πραγματοποιείται με καταβύθισή του σε ποτήρι που περιέχει περίπου 400 mL κρύου διαιθυλαιθέρα, το οποίο αφήνεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για ένα βράδυ, ώστε να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερη καταβύθιση του στερεού πολυμερούς. Την επόμενη ημέρα, το στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου. Το κίτρινο στερεό που συλλέγεται, μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Μετά την ξήρασή του, το τελικό πολυμερές ζυγίζεται και φυλάσσεται σε vial στους $3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Συνοπτικά, η γενική πορεία που ακολουθείται για τη σύνθεση του $Poly(N^{\epsilon}\text{-BOC-L-Lysine})-b-(Poly(L-Lysine)-g-Poly(Trt-L-Histidine))$ ($PBLL-b-(PLL-g-PTrt-His)$) δίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



Σχήμα 20: Αντίδραση πολυμερισμού (ROP) για το μερικώς προστατευμένο συμπολυμερές του τύπου (PBL-b-(PLL-g-PTTrt-His)).

3.5.4. Αποπροστασία των δομικών μονάδων της λυσίνης (Poly-(N^ε-BOC-L-Lys)) και της ιστιδίνης (Poly-(N^{im}-Trt-L-His)) στο συμπολυμερές του τύπου (PBLL-b-(PLL-g-PTrt-His))

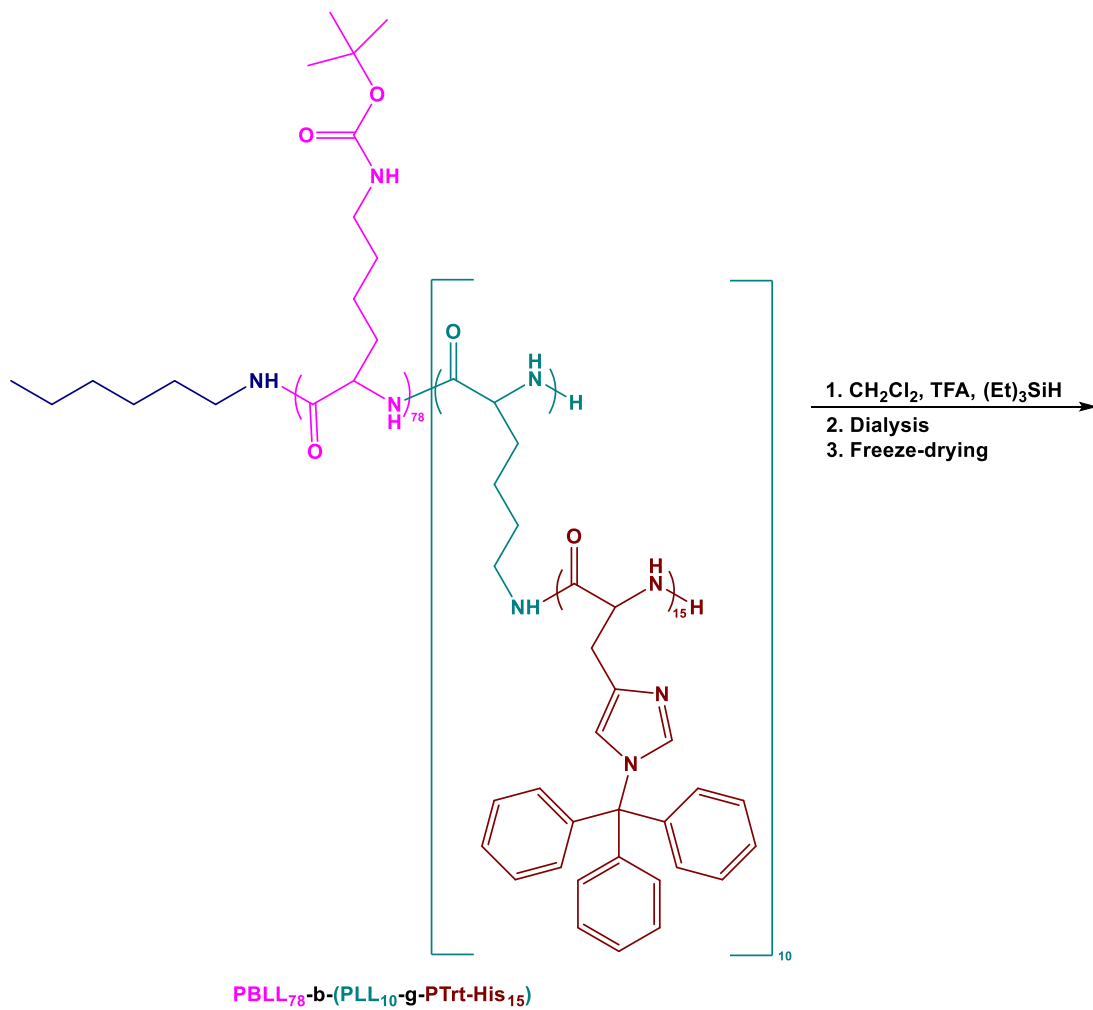
Ακολούθως περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για την αποπροστασία των δομικών μονάδων της λυσίνης (Poly-(N^ε-BOC-L-Lys)) και της ιστιδίνης (Poly-(N^{im}-Trt-L-His)) στο πολυμερές που συντέθηκε.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 21, η αποπροστασία των δομικών μονάδων της πολύ(λυσίνης) και της πολυ(ιστιδίνης) επιτυγχάνεται με τη διασπορά-διογκωση αρχικά του πολυμερούς σε διχλωρομεθάνιο (DCM), στη συνέχεια με χρήση τριφθοροξικού οξέος (TFA), το οποίο απομακρύνει τις προστατευτικές ε-(tert-βουτυλοξυκαρβόνυλο) (BOC) και τρίτυλο (Trt) ομάδες από κάθε δομική μονάδα λυσίνης και ιστιδίνης αντίστοιχα και τέλος με τη δέσμευση των ελεύθερων τρίτυλο-ομάδων από το τριαίθυλοσιλάνιο ((Et)₃SiH), ώστε να μην επανασυνδεθούν στην PHis, καθώς είναι καρβοκατιόντα.

Πιο συγκεκριμένα, σε φιάλη των 50 mL που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα και το προστατευμένο πολυμερές, προστίθενται 20 mL διχλωρομεθανίου, οπότε προκύπτει υποκίτρινο αιώρημα. Το αιώρημα αφήνεται υπό ισχυρή ανάδευση για 1 ώρα, ώστε να διαλυθεί πλήρως το στερεό και να διογκωθούν όσο το δυνατόν περισσότερο οι πολυμερικές αλυσίδες. Στη συνέχεια, προστίθενται υπό ανάδευση στη φιάλη τμηματικά 10 mL TFA (130.7 mmol) και το αιώρημα διαυγάζει και μετατρέπεται σε σκούρο κίτρινο διάλυμα. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ώρα και παρατηρείται σταδιακό θόλωμα του διαλύματος. Στη συνέχεια προστίθενται στάγδην περίσσεια ποσότητα (Et)₃SiH (1 mL, 6.26 mmol), έως ότου τελικά το διάλυμα αποχρωματιστεί ελαφρά σε ανοιχτό κίτρινο και το χρώμα σταθεροποιηθεί.

Ακολουθεί καταβύθιση σε ποτήρι που περιέχει περίπου 300 mL κρύου διαιθυλαιθέρα, το οποίο αφήνεται στους -20 °C για ένα βράδυ, ώστε να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερη καταβύθιση του αποπροστατευμένου πολυμερούς. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό με φίλτρο por. 4 και το στερεό που παραμένει στο φίλτρο συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη 50 mL με κατάλληλο προσαρμογέα και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Μετά την ξήρανσή του ακολουθεί η διαδικασία της

διαπίδυσης (dialysis), όπου η φιάλη του πολυμερούς απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και προστίθενται σε αυτή 15 mL milli-Q και αφήνεται υπό ανάδευση για μισή ώρα. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός υποκίτρινου γαλακτώματος. Ακολουθεί η διόρθωση του pH του διαλύματος με τη προσθήκη σταγόνων υδατικού διαλύματος K_2CO_3 10% w/w, μέχρι την αύξηση του pH από 1.5 σε 5 και το διάλυμα μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis, MWCO=3.5k). Η διαδικασία της διαπίδυσης λαμβάνει χώρα για την απομάκρυνση των ε-tert-βουτοξυκαρβονυλο ομάδων και των δεσμευμένων τρίτυλο-ομάδων από το πολυμερές διαμέσου των πόρων της μεμβράνης. Πραγματοποιείται 2 φορές dialysis σε 2 L milli-Q, με το pH να προσαρμόζεται στο 4 με χρήση υδατικού διαλύματος HCl 1N, και dialysis σε 2 L milli-Q με pH=10 (προσαρμογή pH με χρήση υδατικού διαλύματος NaOH 1M), έως ότου το pH του εξωτερικού διαλύματος παραμείνει σταθερό σε τιμή ≥ 7.4 . Έπειτα, πραγματοποιείται 2 φορές ακόμα dialysis σε 2 L milli-Q, ώστε να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια του NaOH. Η διαδικασία του dialysis διαρκεί 3 ημέρες και έπειτα, το διάλυμα μεταφέρεται σε φιάλη και πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση (freeze-drying), για την εκδίωξη του νερού από το πολυμερές. Το πολυμερές που συλλέγεται έχει λευκό χρώμα και μάζα ίση με 0.2258 g (0.007 mmol, MB=31954).



Σχήμα 21: Αντίδραση αποπροστασίας των δομικών μονάδων της λυσίνης (Poly-(N^ε-BOC-L-Lys)) και της ιστιδίνης (Poly-(N^{im}-Trt-L-His)) στο πολυμερές του τύπου (PBLl-b-(PLL-g-PTrt-His)).

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

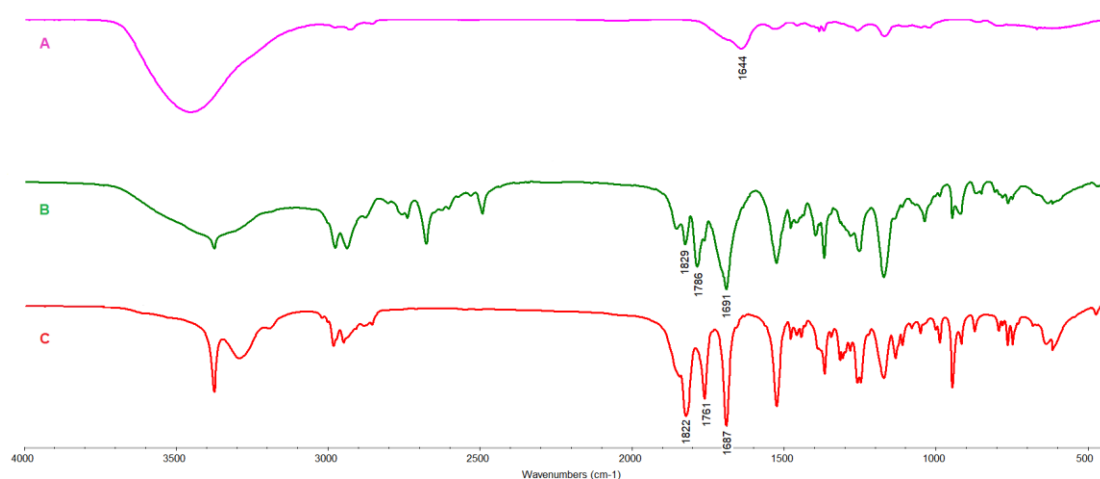
4.1. Χαρακτηρισμός των N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs)

Η σύνθεση των NCAs των α-αμινοξέων αποτελεί το πρώτο στάδιο της παρούσας εργασίας, καθώς αποτελούν τα μονομερή για τον επακόλουθο ROP προς σχηματισμό του πολυπεπτιδίου. Ο έλεγχος της επιτυχούς σύνθεσής τους πραγματοποιείται μέσω Φασματοσκοπίας Υπερύθρου (FT-IR) και Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$). Η Φασματοσκοπία Υπερύθρου επιτρέπει τη γρήγορη και αξιόπιστη αναγνώριση των NCAs, εφόσον διατίθεται βιβλιογραφικά πρότυπο φάσμα για σύγκριση. Επιπλέον, όταν οι NCAs αρχίζουν να πολυμερίζονται, οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των καρβονυλίων του δακτυλίου εξαφανίζονται σταδιακά και παίρνουν τη θέση τους οι χαρακτηριστικές δονήσεις των αμιδικών δεσμών, υποδηλώνοντας τον επιτυχή πολυμερισμό τους.

4.1.1. Χαρακτηρισμός του $\text{N}^\epsilon\text{-BOC-L-Lys NCA}$

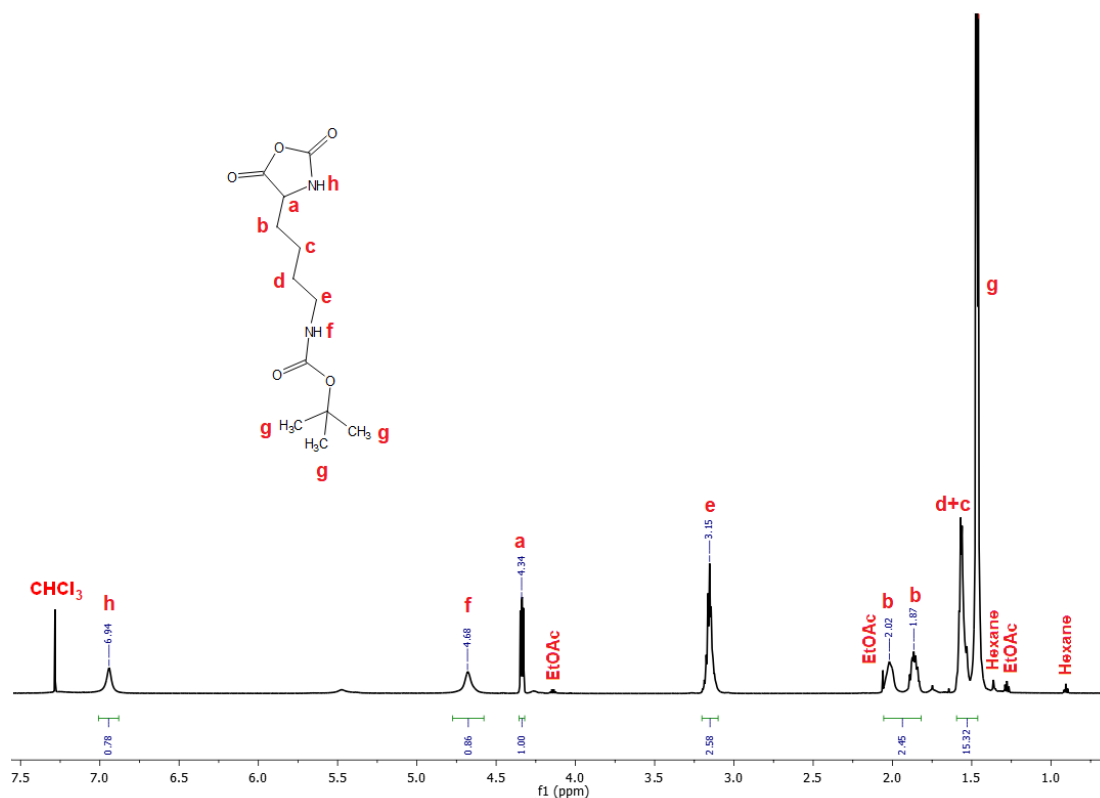
Για τον χαρακτηρισμό του $\text{N}^\epsilon\text{-BOC-L-Lys NCA}$ αρχικά προηγείται η λήψη του φάσματος FT-IR της πρόδρομης ένωσης του αμινοξέος BOC-Lys(BOC)-OH (Σχήμα 22A). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1644 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου (C=O) του αμινοξέος της λυσίνης. Η ευρεία κορυφή από τα $3300\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχεί στη δόνηση της πρωτοταγούς αμίνης σε συνδυασμό με την υδροξυλομάδα του καρβοξυλίου. Στη συνέχεια όπως έχει αναλυθεί στο κεφάλαιο της σύνθεσης των NCA's ακολουθεί η προσθήκη ποσότητας τριφωσγενίου ως μέσο κυκλοποίησης του $\text{N}^\epsilon\text{-BOC-L-Lys NCA}$ και επακόλουθη προσθήκη της τριαιθυλαμίνης για την απομάκρυνση του υδροχλωρίου που παράγεται στη διάρκεια της αντίδρασης. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με λήψη νέου φάσματος IR μετά την πάροδο 2.5 ωρών (Σχήμα 22B). Παρατηρείται η εξαφάνιση της κορυφής στα 1644 cm^{-1} και η εμφάνιση δυο νέων κορυφών στην περιοχή του

καρβονυλίου που δηλώνει επιτυχία στη σύνθεση του ανυδρίτη. Η πρώτη στα 1786 cm^{-1} αφορά το καρβονύλιο του (C2), ενώ η δεύτερη στα 1829 cm^{-1} αυτό στον (C5). Στο τελικό φάσμα του πλήρως σχηματισμένου N^ε-BOC-L-Lys NCA παρατηρείται η πλήρης εξαφάνιση της κορυφής στα 1644 cm^{-1} του υδροχλωρικού άλατος, που επιβεβαιώνει την επιτυχή σύνθεση του ανυδρίτη (Σχήμα 22C).



Σχήμα 22: Φάσμα IR (A): της πρόδρομης ένωσης BOC-Lys(BOC)-OH, (B): μετά από 2.5 ώρες αντίδρασης, (C): του τελικού προϊόντος N^ε-BOC-L-Lys NCA μετά τις ανακρυσταλλώσεις.

Στη συνέχεια ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του N^ε-BOC-L-Lys NCA μέσω λήψης φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl_3 (Σχήμα 23). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών προσεγγίζουν τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές. Συγκεκριμένα, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.46-1.60 (13H, 9H της προστατευτικής ομάδας $\text{BOC-C}(\underline{\text{CH}_3})_3$, 4H από την ομάδα -R, $-\text{HN-CH}_2-\underline{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.82-2.05 (2H, από την ομάδα -R, $-\text{HN-CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2-$), 3.11-3.19 (2H, από την ομάδα -R, $-\text{HN}-\underline{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 4.32-4.35 (1H, $\text{N}-\underline{\text{CH}}-\text{CO}$), 4.68 (1H, $\text{CH}-\underline{\text{NH}}-\text{CO}$ του δακτυλίου του NCA), 6.94 (1H, $-\text{CH}_2-\underline{\text{NH}}-\text{CO}-$ της ε-αμίνης). Μέσω ταυτοποίησης όλων των υδρογόνων του φάσματος επιβεβαιώθηκε η επιτυχής σύνθεση όσο και η καθαρότητα του τελικού N-καρβόξυ ανυδρίτη, N^ε-BOC-L-Lys NCA.

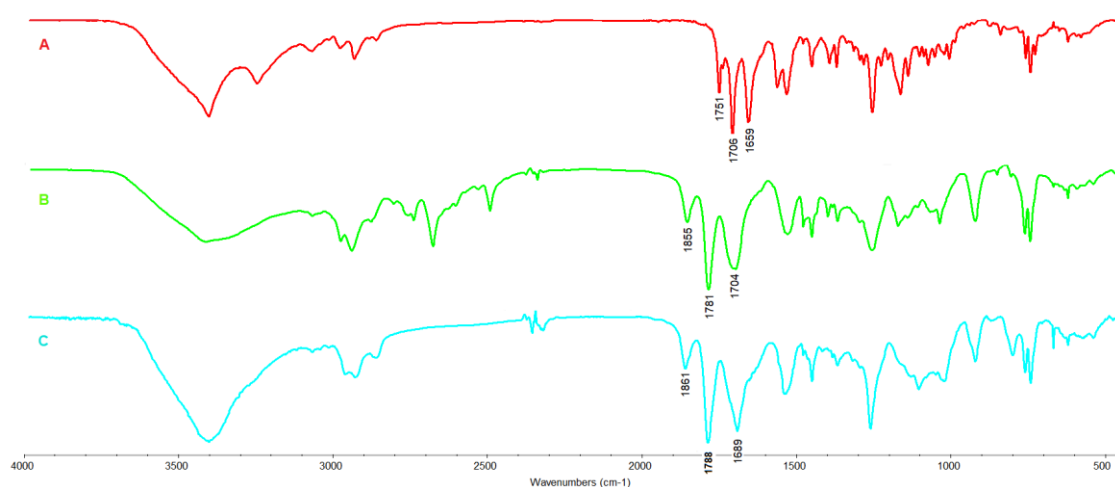


Σχήμα 23: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 για τον τελικό $\text{N}^\epsilon\text{-BOC-L-Lys NCA}$.

4.1.2. Χαρακτηρισμός του $\text{N}^\epsilon\text{-FMOC-L-Lys NCA}$

Για το χαρακτηρισμό του $\text{N}^\epsilon\text{-FMOC-L-Lys NCA}$ αρχικά προηγείται η λήψη του φάσματος FT-IR της πρόδρομης ένωσης του αμινοξέος $\text{N}^\epsilon\text{-FMOC-N}^\alpha\text{-BOC-L-Lys}$ (Σχήμα 24A). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1659 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου (C=O) του αμινοξέος της λυσίνης. Οι κορυφές στα 1706 cm^{-1} και 1751 cm^{-1} οφείλονται στην δόνηση των καρβονυλίων των προστατευτικών ομάδων FMOC και BOC αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη ποσότητας τριφωσγενίου ως μέσο κυκλοποίησης του $\text{N}^\epsilon\text{-FMOC-L-Lys NCA}$ και επακόλουθη προσθήκη της τριαιθυλαμίνης για την απομάκρυνση του υδροχλωρίου που παράγεται στη διάρκεια της αντίδρασης. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με λήψη νέου φάσματος IR μετά την πάροδο 4 ωρών (Σχήμα 24B). Παρατηρείται η μείωση της κορυφής στα 1659 cm^{-1} και η εμφάνιση δυο νέων κορυφών στην περιοχή του καρβονυλίου που δηλώνει επιτυχία στην σύνθεση του ανυδρίτη. Η

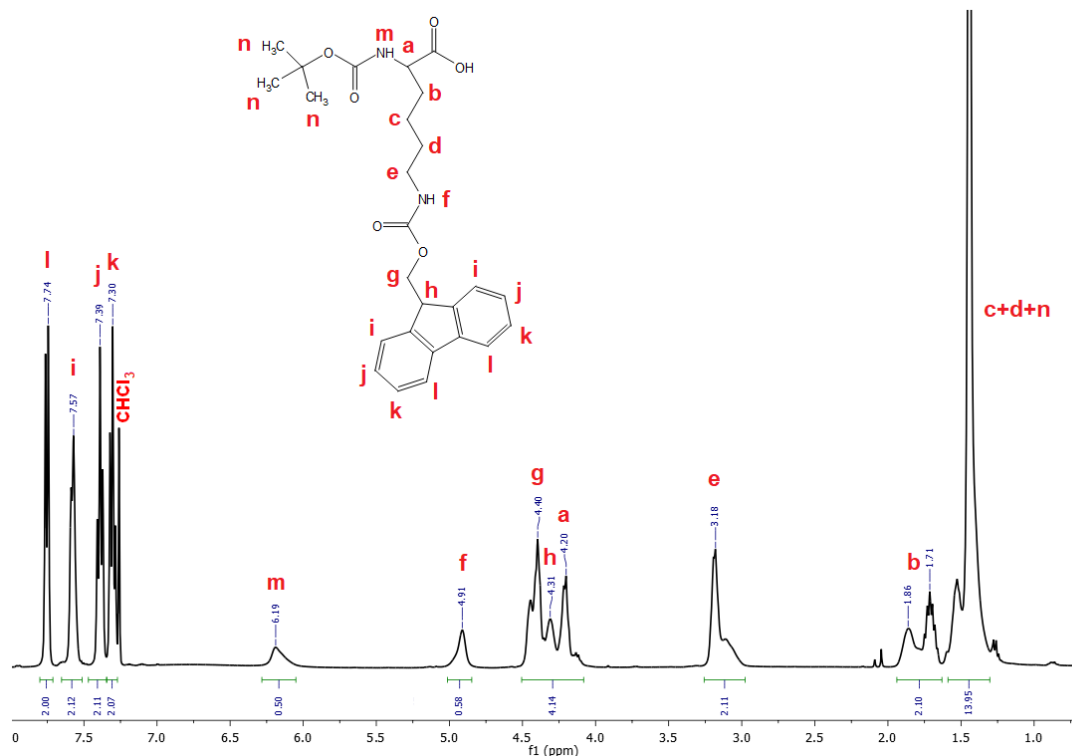
πρώτη στα 1781 cm^{-1} αφορά το καρβονύλιο του (C2) ενώ η δεύτερη στα 1855 cm^{-1} αυτό στον (C5). Στο τελικό φάσμα του πλήρως σχηματισμένου N^ε-BOC-L-Lys NCA παρατηρείται μερική εξαφάνιση της κορυφής στα 1659 cm^{-1} του υδροχλωρικού άλατος, που επιβεβαιώνει την επιτυχή σύνθεση του ανυδρίτη (Σχήμα 24C). Καθ' όλη τη διάρκεια της συνθετικής πορείας δεν παρατηρείται, επίσης, μεταβολή των χαρακτηριστικών κορυφών της προστατευτικής ομάδας FMOC στα 740 cm^{-1} και 760 cm^{-1} , που αντιστοιχούν στις δονήσεις των δεσμών $-\text{CH}=\text{CH}-$ των βενζολικών δακτυλίων.



Σχήμα 24: Φάσμα IR (A): της πρόδρομης ένωσης N^ε-FMOC-N^α-BOC-L-Lys, (B): μετά από 4 ώρες αντίδρασης, (C): του τελικού προϊόντος N^ε-FMOC-L-Lys NCA μετά τις ανακρυσταλλώσεις.

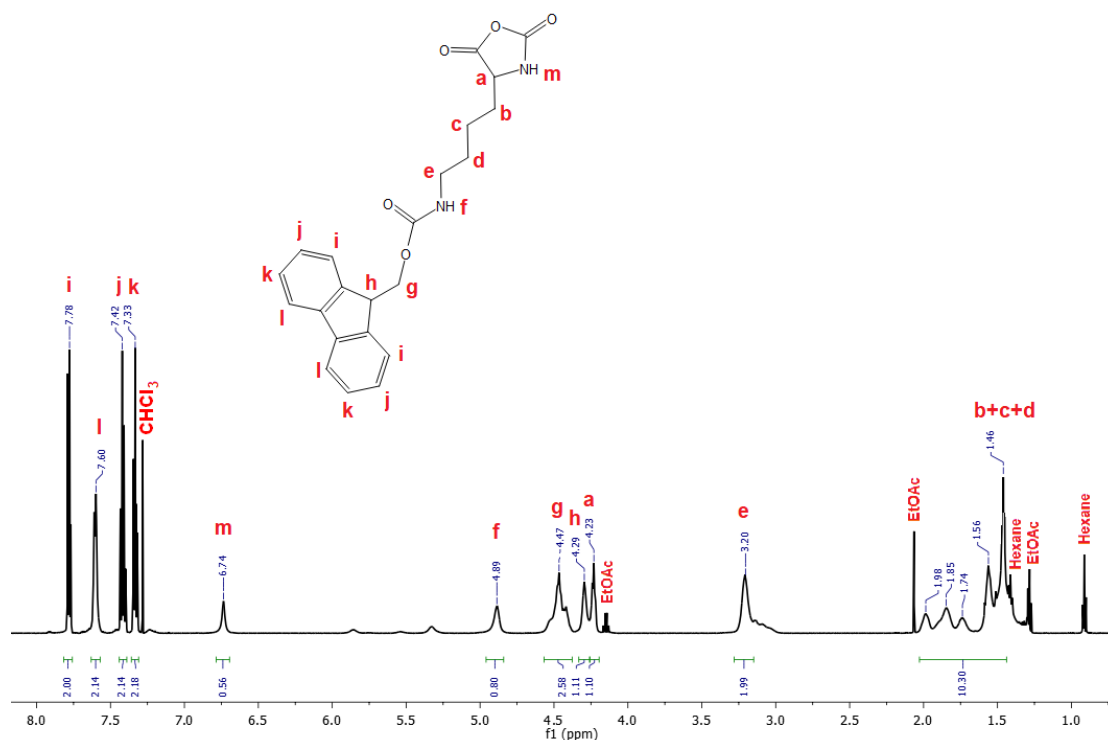
Στη συνέχεια ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του N^ε-FMOC-L-Lys NCA μέσω λήψης φάσματος ¹H-NMR. Αρχικά προηγήθηκε η λήψη φάσματος ¹H-NMR της πρόδρομης ένωσης N^ε-FMOC-N^α-BOC-L-Lys σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl₃ (Σχήμα 25). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα της ένωσης, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών προσεγγίζουν τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές. Συγκεκριμένα, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1.46 (4H από την ομάδα -R, -HN-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1.71-1.86 (2H, από την ομάδα -R, -HN-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 3.18 (2H, από την ομάδα -R, -HN-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 4.20 (1H, N-CH-CO), 4.31 (1H, -CH- του πενταμελούς δακτυλίου της προστατευτικής ομάδας), 4.40 (2H, -NH-

CO-O-CH₂-), 4.91 (1H, -CH₂-NH-CO- της ε-αμίνης), 6.19 (1H, CH-NH-CO), 7.30-7.75 (8H, ArH της προστατευτικής ομάδας).



Σχήμα 25: Φάσμα ¹H-NMR σε CDCl₃ για το πρόδρομο N^ε-FMOC-N^α-BOC-L-Lys NCA

Στη συνέχεια ακολούθησε λήψη φάσματος ¹H-NMR του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl₃ (Σχήμα 26). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών προσεγγίζουν τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές. Συγκεκριμένα, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1.43-2.03 (6H από την ομάδα -R, -HN-CH₂-CH₂-CH₂-), 3.15-3.28 (2H, από την ομάδα -R, -HN-CH₂-CH₂-CH₂-), 4.23 (1H, N-CH-CO), 4.29 (1H, -CH- του πενταμελούς δακτυλίου της προστατευτικής ομάδας), 4.47 (2H, -NH-CO-O-CH₂-), 4.89, (1H, -CH₂-NH-CO- της ε-αμίνης), 6.74 (1H, CH-NH-CO του δακτυλίου του NCA), 7.31-7.79 (8H, ArH της προστατευτικής ομάδας). Μέσω ταυτοποίησης όλων των υδρογόνων του φάσματος επιβεβαιώθηκε η επιτυχής σύνθεση του τελικού N-καρβόξυ ανυδρίτη, N^ε-FMOC-L-Lys NCA.

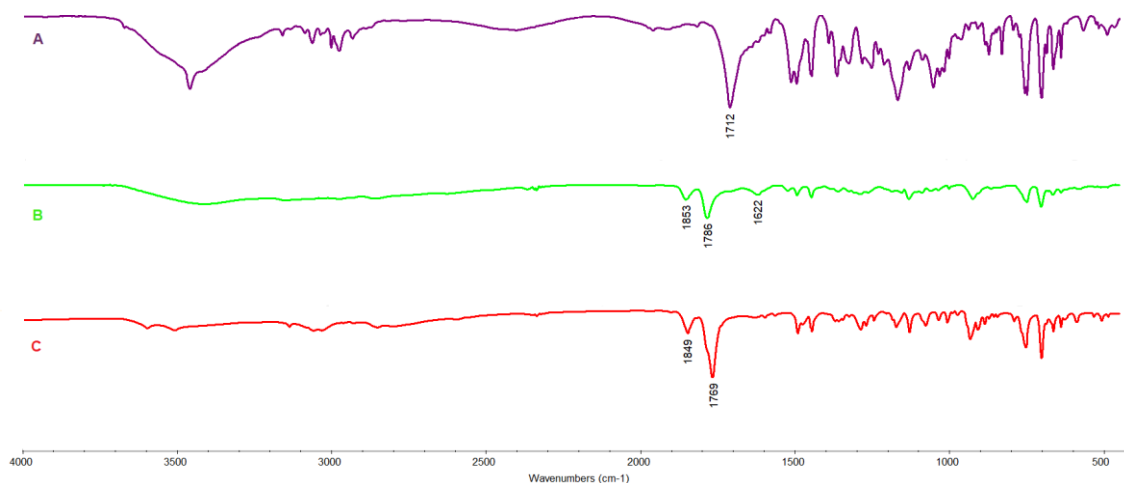


Σχήμα 26: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 για τον τελικό N^ϵ -FMOC-L-Lys NCA

4.1.3. Χαρακτηρισμός του N^{im} -Trt-L-His NCA

Αρχικά, προηγείται η λήψη φάσματος IR της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH (Σχήμα 27A). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1712 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβonyλίου ($\text{C}=\text{O}$) του αμινοξέος της ιστιδίνης. Ακολούθως, στο διάλυμα της ένωσης προστίθεται το SOCl_2 που χρησιμοποιείται ως μέσο χλωρίωσης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης κυκλοποίησης και η αντίδραση αφήνεται για 2.5 ώρες. Η προσθήκη του SOCl_2 πρέπει υποχρεωτικά να γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία, διότι σε υψηλές θερμοκρασίες ελλοχεύει ο κίνδυνος της απόσπασης των τρίτυλο-προστατευτικών ομάδων. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με λήψη νέου φάσματος IR μετά την πάροδο του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος (Σχήμα 27B). Σε αυτό το φάσμα είναι ορατή η μείωση της κορυφής του αρχικού αντιδρώντος στα 1712 cm^{-1} και η εμφάνιση δύο κορυφών στα 1786 cm^{-1} και 1853 cm^{-1} , οι οποίες υποδηλώνουν την επιτυχή σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη, καθώς αντιστοιχούν στη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση τάσης των καρβonyλίων του ανυδρίτη. Επιπλέον, είναι ορατή και μία κορυφή

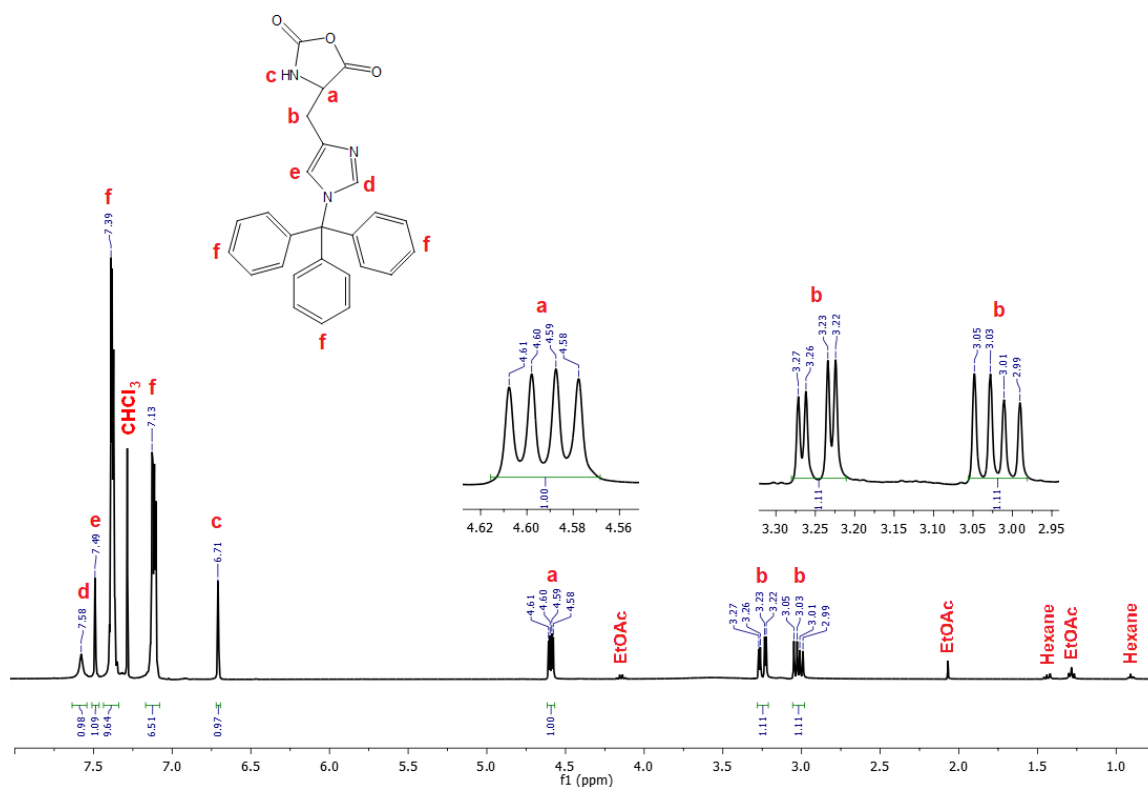
στα 1622 cm^{-1} , η οποία οφείλεται σε έκταση δόνησης του δεσμού N–H και αποδίδεται στο σχηματισθέν υδροχλωρικό άλας του NCA της ιστιδίνης. Η πλήρης δέσμευση του HCl από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο του NCA επιτυγχάνεται με χρήση ισομοριακής ποσότητας Et_3N προς σχηματισμό του άλατος $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ υπό μορφή ιζήματος, το οποίο απομακρύνεται από το επιθυμητό προϊόν μέσω διήθησης. Στο φάσμα IR του τελικού NCA απουσιάζουν οι κορυφές στα 1712 cm^{-1} , που υποδηλώνει ότι το αρχικό αμινοξύ της ιστιδίνης έχει καταναλωθεί πλήρως, και στα 1622 cm^{-1} , που δείχνει ότι δεσμεύτηκε ποσοτικά το HCl μετά την προσθήκη της ποσότητας τριαιθυλαμίνης, ενώ δεν εμφανίζεται κορυφή στα 1650 cm^{-1} , που θα οφειλόταν στη δόνηση του πεπτιδικού δεσμού λόγω πιθανής έναρξης του πολυμερισμού από τυχόν περίσσεια της Et_3N . Καθ' όλη τη διάρκεια της συνθετικής πορείας δεν παρατηρείται, επίσης, μεταβολή των χαρακτηριστικών κορυφών της προστατευτικής ομάδας στα 701 cm^{-1} και 751 cm^{-1} , που αντιστοιχούν στις δονήσεις των δεσμών $-\text{CH}=\text{CH}-$ των βενζολικών δακτυλίων.



Σχήμα 27: Φάσμα IR (A): της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH, (B): μετά από 2.5 ώρες αντίδρασης μετά την προσθήκη SOCl_2 , (C) του τελικού προϊόντος $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-His NCA}$ μετά τις ανακρυσταλλώσεις.

Επιπρόσθετα, η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-His NCA}$ επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε

διαλύτη CDCl_3 (Σχήμα 28). Παρατηρείται ότι οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.97-3.28 (2H, $-\text{CH}_2-$), 4.57-4.62 (1H, $-\text{CH}-$ του δακτυλίου του NCA), 6.68 (1H, $-\text{NH}-$ του δακτυλίου του NCA), 7.05-7.40 (16H, ArH των τρίτυλο-ομάδων), 7.43-7.60 (1H, $\text{N}-\text{CH}=\text{C}$ και 1H, $\text{N}-\text{CH}=\text{N}$ του ιμιδαζολικού δακτυλίου)



Σχήμα 28: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 για τον τελικό $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-L-His NCA}$

4.2. Χαρακτηρισμός του εμβολιασμένου πεπτιδίου $\text{Poly(L-Lysine)-b-}(\text{poly(L-Lysine)-g-poly(Histidine)})$ (PLL-*b*-(PLL-*g*-Phis))

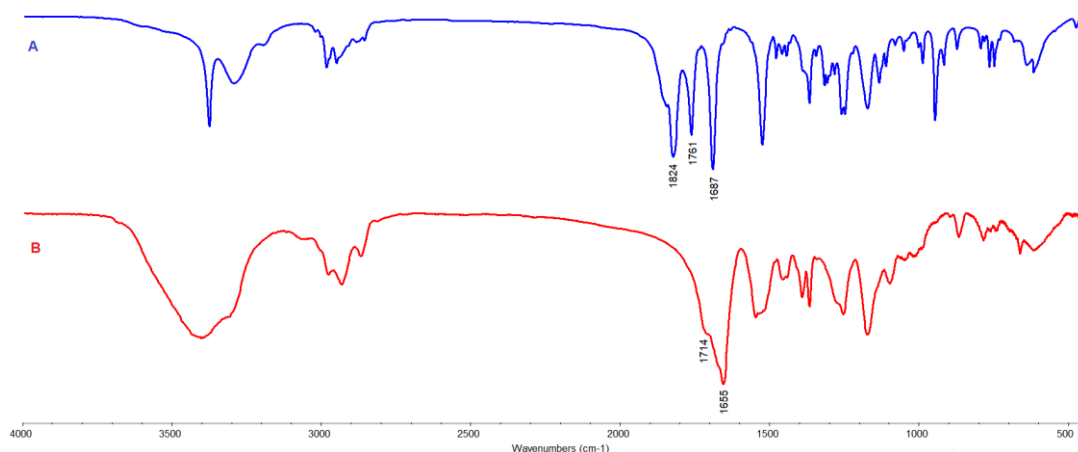
Όπως αναφέρθηκε στο συνθετικό τμήμα της εργασίας, το πρώτο βήμα για τη σύνθεση του εμβολιασμένου πολυπεπτιδίου του τύπου $\text{Poly(L-Lysine)-b-}(\text{poly(L-Lysine)-g-poly(Histidine)})$ είναι η σύνθεση του πρόδρομου δισυσταδικού πολυμερούς $\text{poly(N}^{\text{E}}\text{-BOC-L-Lysine)-b-poly(N}^{\text{E}}\text{-FMOC-L-Lysine)}$ (PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀) και ακολουθεί η αποπροστασία των πλευρικών ομάδων της

δεύτερης συστάδας, ώστε οι ελεύθερες πλέον αμινομάδες να είναι ικανές να εκκινήσουν τον πολυμερισμό ROP του N-καρβόξυ ανυδρίτη της ιστιδίνης. Τέλος πραγματοποιείται η αποπροστασία των πλευρικών ομάδων της λυσίνης και της ιστιδίνης.

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά οι διαδικασίες χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκαν για να ταυτοποιηθούν τα μοριακά χαρακτηριστικά του παραγόμενου πολυμερούς. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία FT-IR για την επιβεβαίωση της ολοκλήρωσης του πολυμερισμού αλλά και της αποπροστασίας των δομικών μονάδων. Περαιτέρω χαρακτηρισμοί έγιναν μέσω της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC), αλλά και μέσω της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ για την ταυτοποίηση της δομής του πολυμερούς.

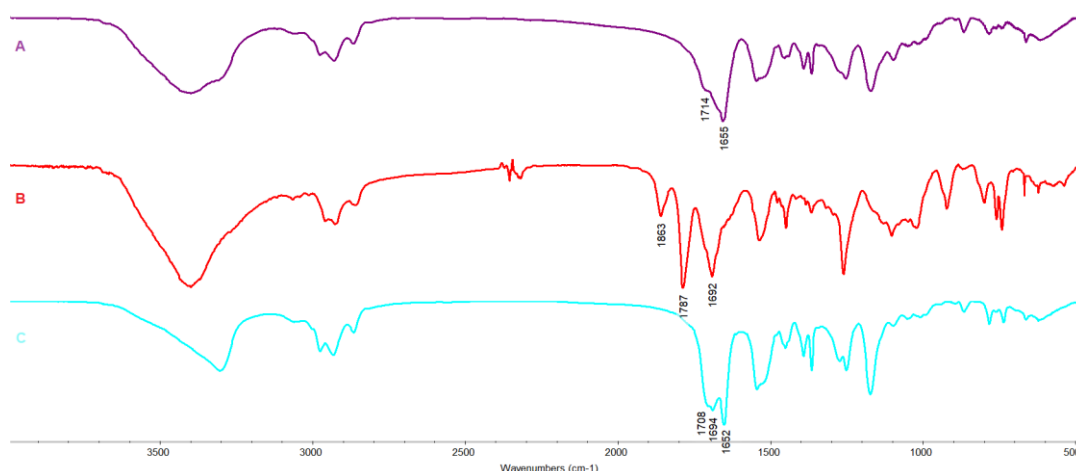
4.2.1. Σύνθεση πρόδρομου δισυσταδικού πολυμερούς του τύπου Poly(N^ε-BOC-L-Lysine)-*b*-poly(N^ε-FMOC-L-Lysine) (PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀)

Από τη φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR ταυτοποιήθηκαν αρχικά οι χαρακτηριστικές αναμενόμενες δονήσεις για κάθε στάδιο της συνθετικής πορείας του συμπολυμερούς PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀. Όπως φαίνεται και στο σχήμα ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί η ολοκλήρωση του πολυμερισμού της 1^{ης} συστάδας λόγω εμφάνισης της χαρακτηριστικής κορυφής για τον πεπτιδικό δεσμό στα 1655 cm⁻¹ (Σχήμα 29B) και της απουσίας των χαρακτηριστικών κορυφών του ανυδρίτη N^ε-BOC-L-Lysine στα 1824 και 1761 cm⁻¹ (Σχήμα 29A), ένδειξη της πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς.



Σχήμα 29: Φάσμα IR (A): του μονομερούς N^ε-BOC-L-Lysine NCA, (B) μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της 1^{ης} συστάδας του PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀.

Με την πλήρη κατανάλωση του N^ε-BOC-L-Lysine NCA προστέθηκε στο διάλυμα ο N^ε-FMOC-L-Lysine NCA. Η ολοκλήρωση του πολυμερισμού επιβεβαιώνεται από την εμφάνιση της χαρακτηριστικής κορυφής για τον πεπτιδικό δεσμό στα 1652 cm⁻¹ (Σχήμα 30C), και της απουσίας των χαρακτηριστικών κορυφών του ανυδρίτη N^ε-FMOC-L-Lysine στα 1863 και 1787 cm⁻¹ (Σχήμα 30B), ένδειξη της πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς στο τελικό προϊόν. Επιπλέον εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 1694 και 1708 cm⁻¹ που αντιστοιχούν στις δονήσεις των καρβονυλίων (C=O) των αμινοξέων N^ε-BOC-L-Lysine και N^ε-FMOC-L-Lysine αντίστοιχα.



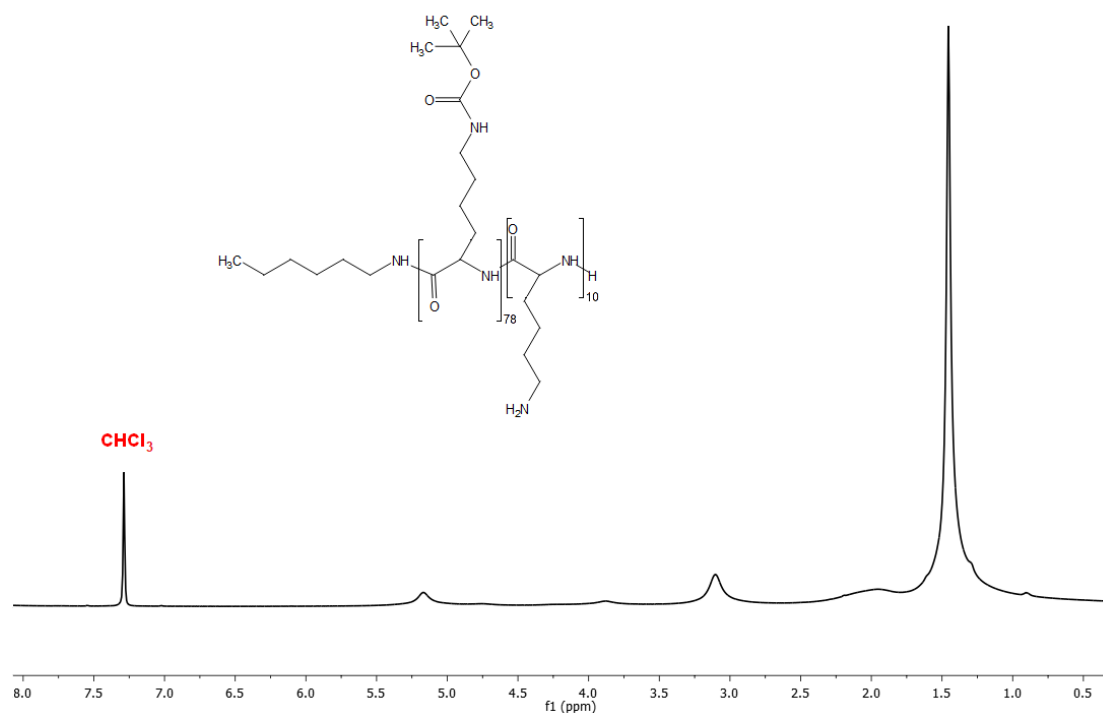
Σχήμα 30: Φάσμα IR (A): μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της 1^{ης} συστάδας του PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀, (B) του μονομερούς N^ε-FMOC-L-Lysine NCA, (C) μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της 2^{ης} συστάδας.

4.2.2. Εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της 2^{ης} συστάδας στο προστατευμένο συμπολυμερές του τύπου PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀

Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της εκλεκτικής αποπροστασίας της συστάδας της poly(N^ε-FMOC-L-Lysine) από την προστατευτική ομάδα 9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ-ομάδα (FMOC) μέσω της διαδικασίας που αναφέρθηκε στο θεωρητικό τμήμα. Ύστερα από το freeze-drying ακολούθησε χαρακτηρισμός του πολυμερούς με λήψη φάσματος ¹H-NMR και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).

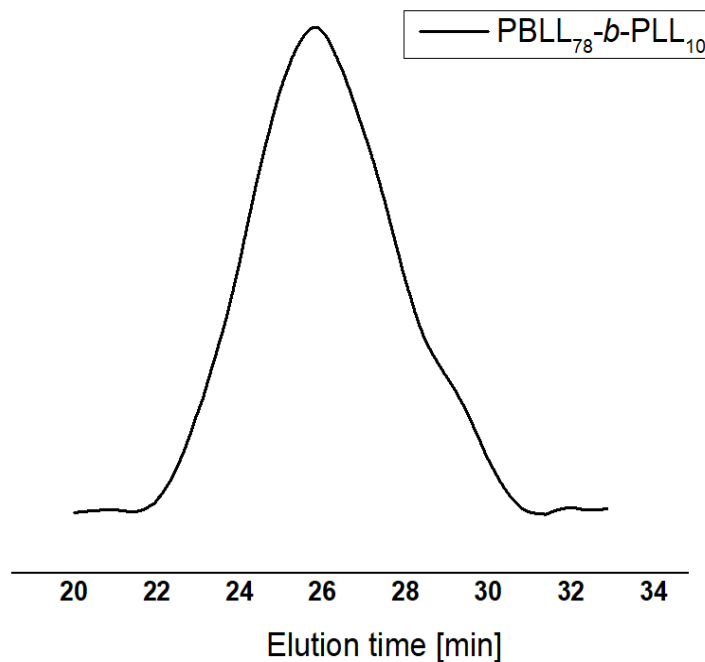
Στο Σχήμα 31 παρουσιάζεται το φάσμα ¹H-NMR του αποπροστατευμένου πολυμερούς. Η αποπροστασία των πλευρικών ομάδων της 2^{ης} συστάδας είναι φανερή μιας και δεν εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων που αντιστοιχούν στα άρυλο υδρογόνα των δακτυλίων της προστατευτικής ομάδας. Ωστόσο, ο διαλύτης αποδείχθηκε ακατάλληλος για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό και για την αντιστοίχιση των κορυφών στα υδρογόνα του πολυμερούς.

Διακρίνεται η απουσία των χαρακτηριστικών κορυφών στην περιοχή 7.30-7.80 ppm επομένως θεωρούμε ότι το (PBLL₇₈-*b*-PLL₁₀) έχει αποπροστατευθεί επιτυχώς.



Σχήμα 31: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 για το μερικώς αποπροστατευμένο ($\text{PBL}_{78}\text{-b-PLL}_{10}$)

Το πολυμερές χαρακτηρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



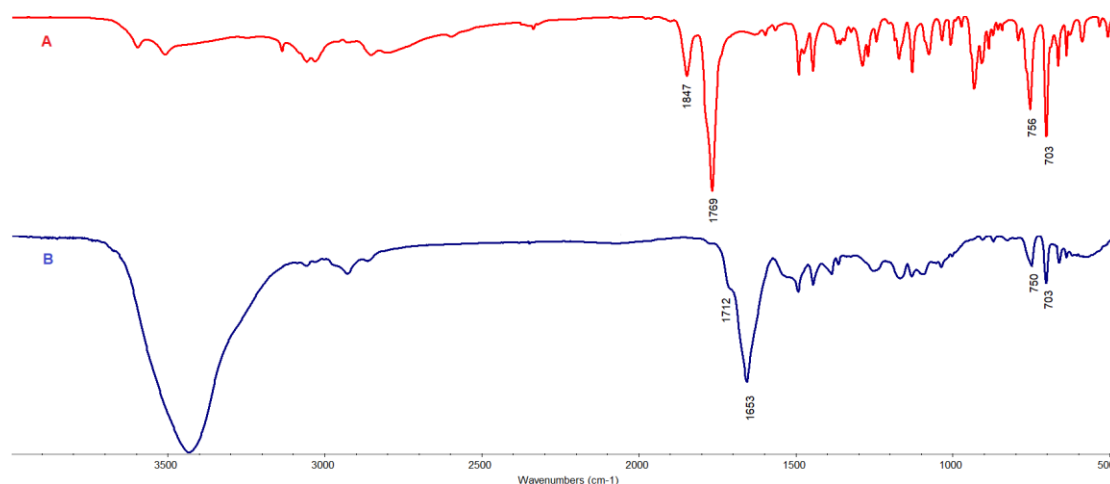
Σχήμα 32: Χρωματογράφημα SEC σε διαλύτη DMF του δισυσταδικού πολυμερούς PBL₇₈-*b*-PLL₁₀.

Το χρωματογράφημα λήφθηκε σε SEC με διαλύτη DMF. Η κατανομή μοριακών βαρών (*I*) του PBL₇₈-*b*-PLL₁₀ είναι ίση με 1.32 και $M_n=22.400$. Το θεωρητικά υπολογιζόμενο M_n είναι ~18.000. Η ουρά που εμφανίζεται στην κορυφή μπορεί να οφείλεται σε πρόωρες τερματισμένες αλυσίδες.

4.2.3. Χαρακτηρισμός του εμβολιασμένου πεπτιδίου Poly(N^ε-BOC-L-Lysine)-*b*-(poly(L-Lysine)-*g*-poly(Histidine)), PBL-*b*-(PLL-*g*-PHis)

Αφού ολοκληρώθηκε με επιτυχία η σύνθεση του PBL₇₈-*b*-PFL₁₀ καθώς και η διαδικασία της αποπροστασίας των πλευρικών ομάδων της 2^{ης} συστάδας, ακολούθησε ο πολυμερισμός της ιστιδίνης με απαραίτητες τις πλευρικές αμινομάδες της 2^{ης} συστάδας όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό κομμάτι της εργασίας. Αρχικά έγινε χαρακτηρισμός του προστατευμένου εμβολιασμένου συμπολυμερούς (*graft*), PBL-*b*-(PLL-*g*-P(Trt)His), ενώ στη συνέχεια ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του αποπροστατευμένου πλέον *graft*.

Αρχικά, μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί η ολοκλήρωση του πολυμερισμού λόγω εμφάνισης της χαρακτηριστικής κορυφής για τον πεπτιδικό δεσμό στα 1653 cm^{-1} , (Σχήμα 33B) και της απουσίας των χαρακτηριστικών κορυφών του ανυδρίτη $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-L-His NCA}$, στα 1847 και 1769 cm^{-1} (Σχήμα 33A), ένδειξη της πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς στο τελικό προϊόν.

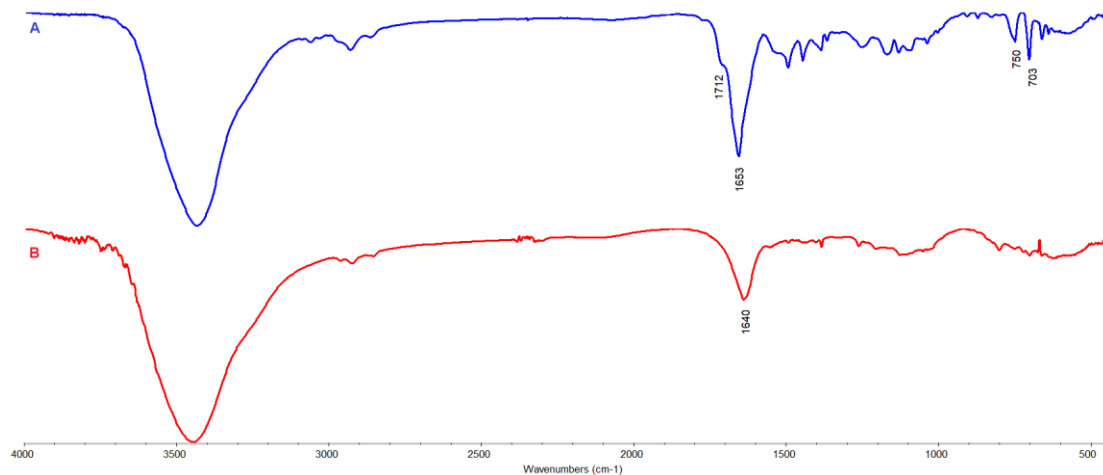


Σχήμα 33: Φάσμα IR (A): του μονομερούς $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-L-His NCA}$, (C) μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού.

Δεν έγινε περαιτέρω χαρακτηρισμός σε αυτό το στάδιο της αντίδρασης διότι η προστατευμένη συστάδα της ιστιδίνης δεν διαλυόταν επαρκώς για να ληφθεί φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και SEC. Ακολούθησε η αποπροστασία του εμβολιασμένου πολυμερούς και ο τελικός χαρακτηρισμός του.

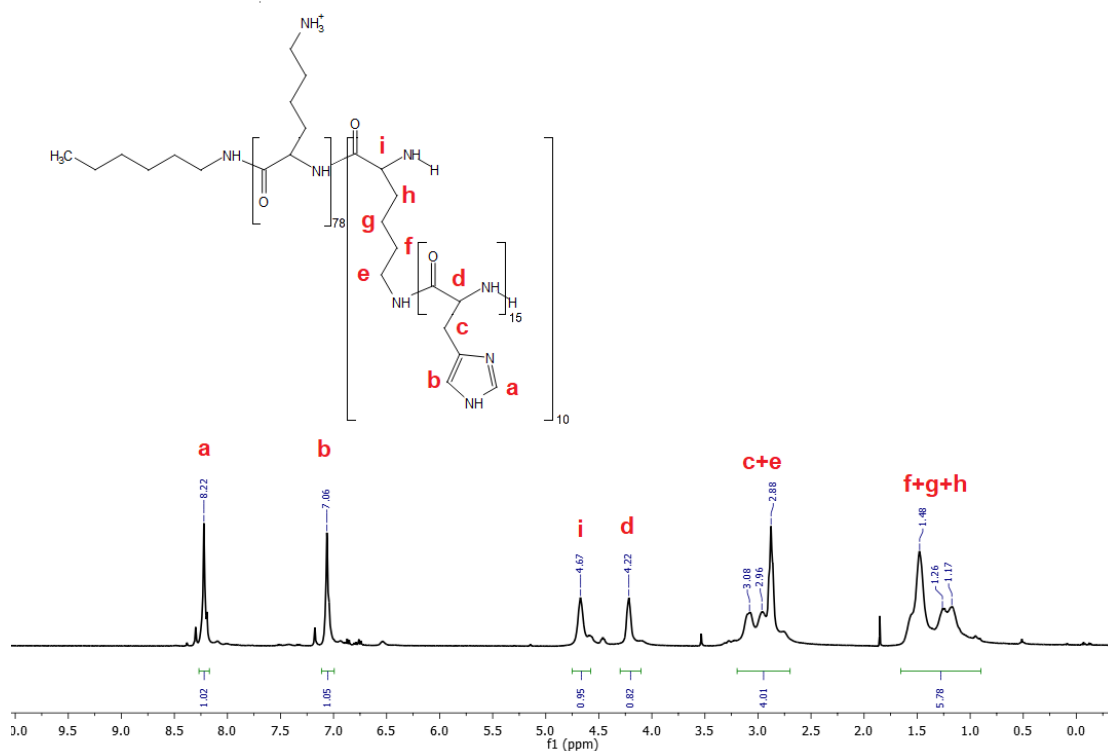
Μετά την ολοκλήρωση της αποπροστασίας που έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στο συνθετικό κομμάτι, λήφθηκε φάσμα FT-IR (Σχήμα 34) για την επιβεβαίωση της πλήρους απομάκρυνσης των προστατευτικών ομάδων της λυσίνης και της ιστιδίνης. Η χαρακτηριστική κορυφή του πεπτιδικού δεσμού είναι φανερή και στα δύο φάσματα πριν και μετά την αποπροστασία στα $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, ενώ είναι σημαντική η έλλειψη των χαρακτηριστικών κορυφών της προστατευτικής ομάδας της ιστιδίνης στα 703 cm^{-1} και 750 cm^{-1} , που οφείλεται σε έκταση του $-\text{CH}=\text{CH}-$ των βενζολίων (Σχήμα 34B). Επιπλέον δεν εμφανίζεται η χαρακτηριστική δόνηση της BOC

προστατευτικής ομάδας που οφείλεται στη δόνηση του -C=O στα 1712 cm^{-1} (Σχήμα 34B).



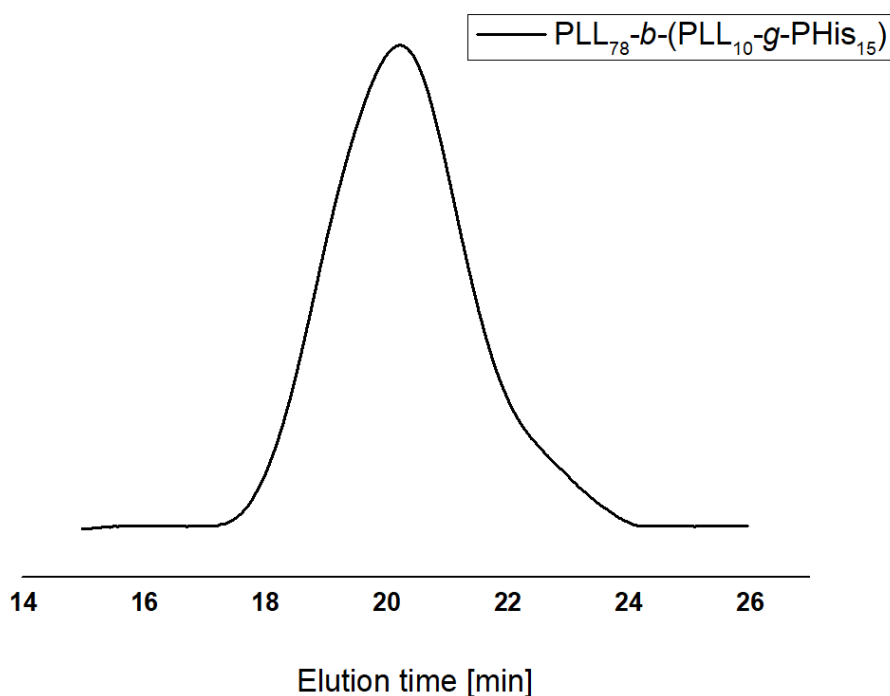
Σχήμα 34: Φάσμα IR (A): του προστατευμένου εμβολιασμένου πολυπεπτιδίου PBLL-*b*-(PLL-*g*-P(Trt)His), (B): του πλήρως αποπροστατευμένου εμβολιασμένου πολυπεπτιδίου PLL-*b*-(PLL-*g*-PHis).

Στη συνέχεια ακολούθησε χαρακτηρισμός του πλήρως αποπροστατευμένου πολυμερούς με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ για να επιβεβαιωθούν τα μοριακά χαρακτηριστικά του εμβολιασμένου πολυμερούς. Συγκεκριμένα, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d-TFA, δ , ppm): 1.10-1.60 (6H, από την ομάδα -R, $-\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.70-3.10 (2H, $-\text{CH}_2-\text{IM}$ και 2H, από την ομάδα -R, $-\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 4.22 (1H, $\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{IM})-\text{C=O}$), 4.67 (1H, $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-\text{C=O}$), 7.06 (1H, $\text{C}=\text{CH}-\text{N}-$), 8.22 (1H, $-\text{N}=\text{CH}-\text{N}-$). Οι ολοκληρώσεις ταιριάζουν με τη αναμενόμενη δομή του πολυμερούς.



Σχήμα 35: Φάσμα ¹H-NMR σε διαλύτη d-TFA του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς.

Περαιτέρω χαρακτηρισμός του εμβολιασμένου πολυμερούς έγινε με τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC). Το χρωματογράφημα λήφθηκε σε SEC με διαλύτη H₂O. Η κατανομή μοριακών βαρών (I) του PLL₇₈-b-(PLL₁₀-g-PHis₁₅) είναι ίση με 1.66 και M_n=25.700. Το θεωρητικά υπολογιζόμενο M_n είναι ~32.000. Η ουρά που εμφανίζεται στην κορυφή μπορεί να οφείλεται σε πρόωρες τερματισμένες αλυσίδες.



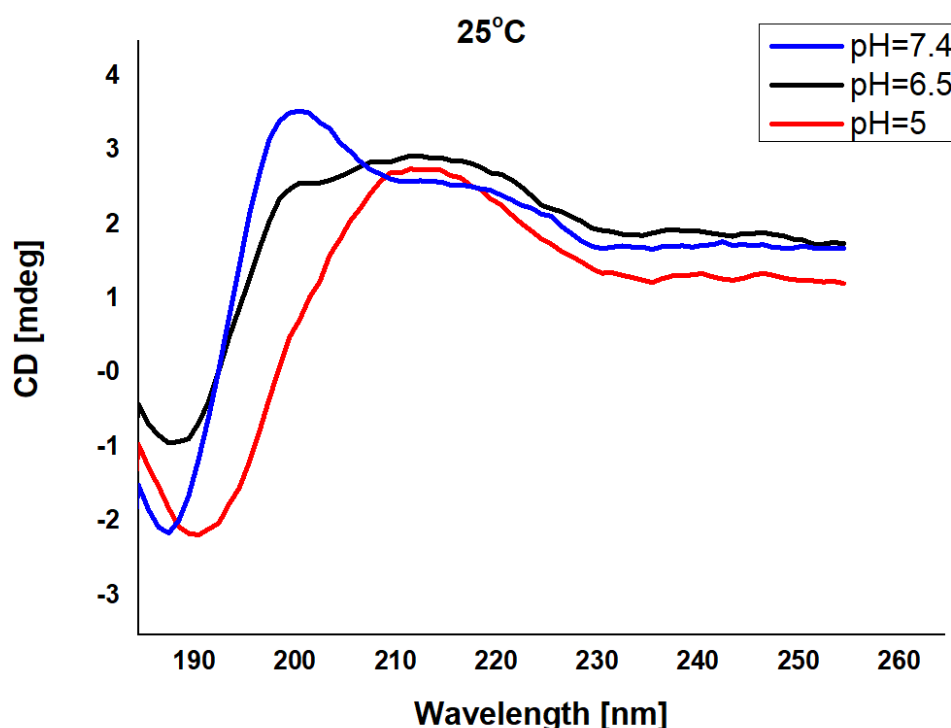
Σχήμα 36: Χρωματογράφημα SEC σε διαλύτη H_2O του $PLL-b-(PLL-g-PHis)$.

4.3. Μελέτη της δευτεροταγούς δομής του εμβολιασμένου πεπτιδίου με τη τεχνική του Κυκλικού Διχρωισμού (CD)

Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής του συμπολυμερούς του τύπου $PLL_{78}-b-(PLL_{10}-g-PHis_{15})$ πραγματοποιήθηκε μέσω μετρήσεων κυκλικού διχρωϊσμού σε διάφορες τιμές pH. Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής του συμπολυμερούς παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς οι μεταβολές της δομής εξαρτώνται άμεσα από τις μεταβολές του pH, επομένως μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την ικανότητα απόκρισης του συντιθέμενου πολυμερών σε αλλαγές του pH. Η μεταβολή του pH, αλλάζει την αυτοοργάνωση του πολυμερούς, καθιστώντας το εν δυνάμει σύστημα μεταφοράς φαρμάκων, με δυνατότητες εκλεκτικής αποδέσμευσης αυτών. Επιπλέον ενδιαφέρον ήταν να παρατηρηθεί αν η συστάδα της λυσίνης θα επηρέαζε τη δευτεροταγή δομή της ιστιδίνης.

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 1×10^{-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. 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 5 L/min.



Σχήμα 37: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του πολυμερούς PLL₇₈-*b*-(PLL₁₀-*g*-PHis₁₅) σε διαφορετικά pH στους 25 °C.

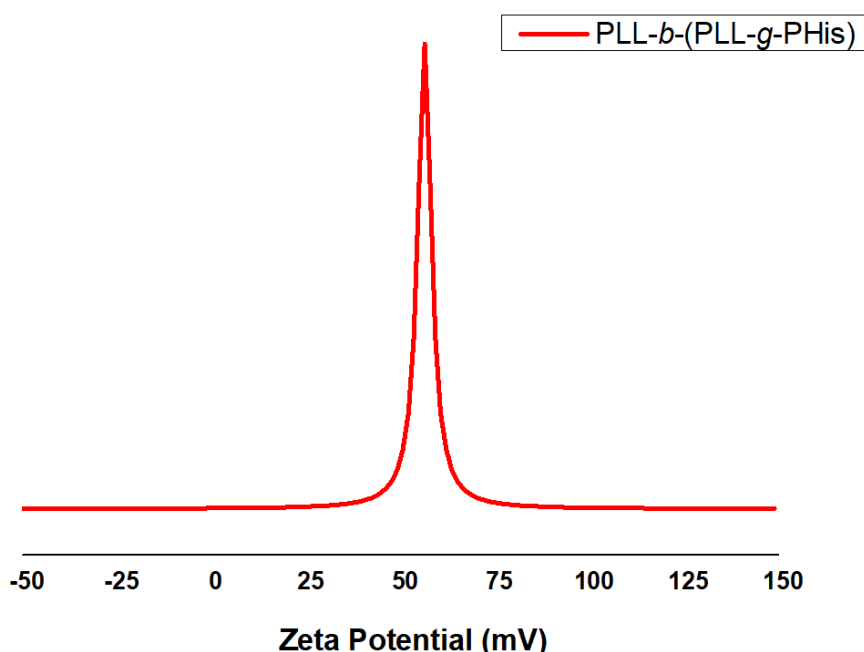
Είναι φανερό πως δεν κυριαρχεί μία μόνο δομή σε κάθε τιμή του pH, αφού σε κάθε φάσμα συνυπάρχουν αρκετές δομές και αυτή που επικρατεί είναι το τυχαίο σπειράμα με χαρακτηριστικές αρνητικές κορυφές στα 190 nm. Σε pH=7.4 οι δομικές μονάδες της πολυ(L-ιστιδίνης) είναι αποπρωτονιωμένες και άρα είναι ακόμα υδρόφοβες, όσο όμως το pH ελαττώνεται, η PHis πρωτονιώνεται χάνοντας σταδιακά τον υδρόφοβο χαρακτήρα της. Η πρωτονίωση αυτή δημιουργεί απωστικές δυνάμεις μεταξύ των αλυσίδων, αποτρέποντας έτσι την οργάνωση σε β-φύλλο. Με τη σταδιακή μείωση του pH, μειώνεται το ποσοστό του β-φύλλου και αυξάνεται το ποσοστό του τυχαίου σπειράματος.

4.4. Μέτρηση ζ-δυναμικού του εμβολιασμένου πολυπεπτιδίου

Το ζ-δυναμικό είναι μία ακόμα σημαντική παράμετρος που μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή των νανοσωματιδίων, και συγκεκριμένα για το επιφανειακό τους φορτίο.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση η πολυ(λυσίνη) διαθέτει θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες και η αναμενόμενη τιμή του ζ-δυναμικού σύμφωνα με τις προδιαγραφές του μηχανήματος, πρέπει να είναι αρκετά θετική. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί πως η ύπαρξη φορτίων εξαιτίας της πρωτονιωμένης poly(Histidine) οδηγεί σε αρκετά θετικότερες τιμές του ζ-δυναμικού.

Οι μετρήσεις του ζ-δυναμικού έγιναν με ELS (Electrophoretic Light Scattering) σε διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης 1 mg/mL σε milli-Q, σε ουδέτερο pH, με την μέθοδο Smoluchowski.



Σχήμα 38: Διάγραμμα ζ-δυναμικού του εμβολιασμένου πολυμερούς.

Όπως προκύπτει και από το σχήμα, η μέση τιμή του ζ-δυναμικού είναι ίση με 56,4 mV, οπότε τα νανοσωματίδια έχουν θετικό επιφανειακό φορτίο, όπως ήταν

αναμενόμενο. Επειδή η πολυ(λυσίνη) είναι στην εξωτερική επιφάνεια των νανοσωματιδίων, η πολυ(λυσίνη) είναι πάντα φορτισμένη στην περιοχή φυσιολογικών pH με συνέπεια να παίρνουμε αυτή την μεγάλη τιμή θετικού δυναμικού.

4.5. Μελέτη αυτό-οργάνωσης του εμβολιασμένου πεπτιδίου με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) χρησιμοποιείται, ώστε να μελετηθεί η ικανότητα αυτο-οργάνωσης των πολυμερών, καθώς και το μέγεθος των συντιθέμενων νανοσωματιδίων, σε υδατικά διαλύματα που προσομοιάζουν συνθήκες υγιούς και προσβεβλημένου από καρκίνο ανθρώπινου οργανισμού. Οι μετρήσεις λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά pH. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε διαλύματα του εμβολιασμένου πολυμερούς που έχουν προκύψει από dialysis σε pH=7.4 (pH του υγιούς ανθρώπινου αίματος), σε pH=6.5 (pH της εξωκυττάριας περιοχής των καρκινικών κυττάρων), σε pH=5 (pH του εσωτερικού των καρκινικών κυττάρων στην λειτουργία late endosomes). Σε κάθε pH η διάμετρος των νανοσωματιδίων μετριέται στις γωνίες 45 deg, 90 deg και 135 deg.

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις, αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα του πολυμερούς με DMSO. Συγκεκριμένα διαλύονται 2 mg πολυμερούς σε 1 mL DMSO και αφήνεται μία μέρα υπό ανάδευση με το DMSO, το οποίο είναι σχετικά καλός διαλύτης τόσο της πολύ(L-λυσίνης) όσο και της πολυ(L-ιστιδίνης) με συνέπεια να μην συσσωματώνεται το πολυμερές και να μην σχηματίζει νανοσωματίδιο. Την επόμενη μέρα, στο διάλυμα προστίθενται 6 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο θα ρυθμίσει το pH στην επιθυμητή τιμή. Για το pH 7.4 χρησιμοποιείται PBS buffer 10 mM και NaCl 150 mM. Το διάλυμα μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis, MWCO=3.5k) και πραγματοποιείται dialysis με ρύθμιση του pH στο 7.4. Μετά από τρεις αλλαγές ρυθμιστικών διαλυμάτων ανά τρεις ώρες και αφού αφέθηκε ολόκληρη τη βραδιά, η διαδικασία της μέτρησης με δυναμική σκέδαση φωτός έλαβε χώρα την επόμενη μέρα κατόπιν φιλτραρίσματος του δείγματος με υδρόφιλο φίλτρο

με πορώδες 0.45 μm , ώστε να ελαχιστοποιηθεί το ποσοστό της σκόνης. Αφού έγινε η μέτρηση, το διάλυμα χωρίζεται σε δύο μέρη, και το κάθε ένα μεταφέρεται εκ νέου σε μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis, MWCO=3.5k) και πραγματοποιείται dialysis με ρύθμιση του pH είτε στο 6.5 είτε στο 5 αντίστοιχα. Για το pH 6.5 χρησιμοποιείται PBS buffer 10 mM και NaCl 150 mM ενώ για το pH 5 χρησιμοποιείται Acetate buffer 10 mM και NaCl 150 mM. Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρθηκε παραπάνω.

Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός για το poly(L-Lysine)-*b*-(poly(L-Lysine)-*g*-poly(L-Histidine)) μαζί με τα αντίστοιχα συμπεράσματα.

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS για το εμβολιασμένο πολυμερές PLL₇₈-*b*-(PLL₁₀-*g*-PHis₁₅).

PLL₇₈-<i>b</i>-(PLL₁₀-<i>g</i>-PHis₁₅)			
	Angle		
	45 deg	90 deg	135 deg
pH	Diameter (nm)		
7.4	250	35	24
		240	182
6.5	389	32	52
		328	330
5	402	65	328
		336	

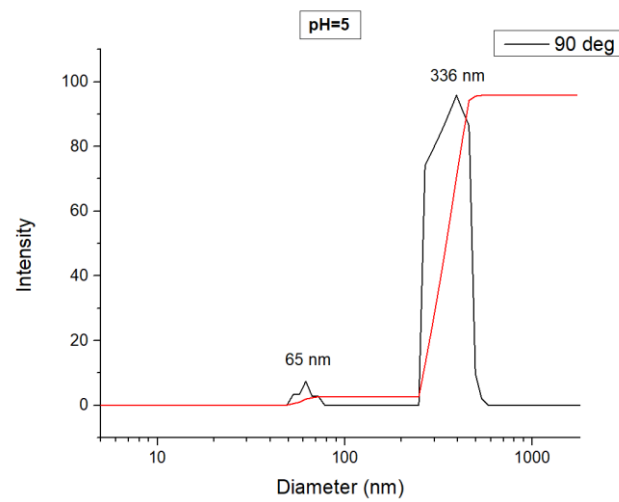
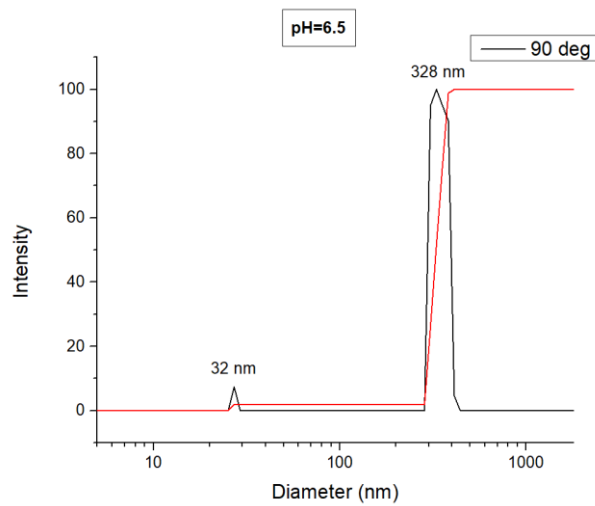
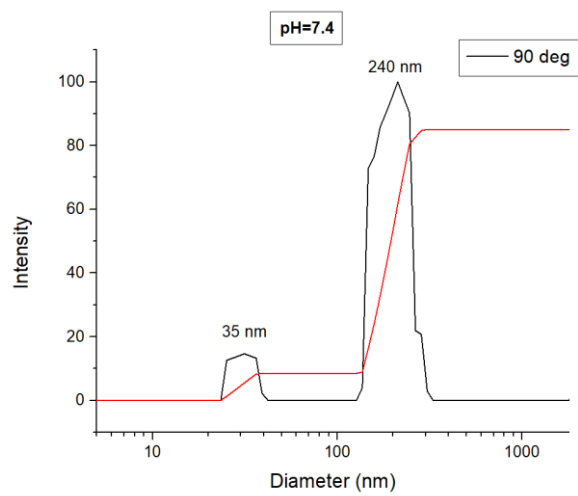
Από τα αποτελέσματα του DLS προκύπτουν τα εξής:

- Το μέγεθος του πληθυσμού μεταβάλλεται με την αλλαγή της γωνίας μέτρησης, πράγμα που υποδηλώνει ότι πιθανότατα τα σωματίδια δεν είναι εντελώς σφαιρικά.
- Με τη μείωση του pH από 7.4 σε 6.5 (για ίδια γωνία) παρατηρείται αύξηση της διαμέτρου των πληθυσμών, επομένως τα σωματίδια διογκώνονται ελαφρώς. Με τη μείωση του pH από 6.5 σε 5 παρατηρείται μία μικρή περαιτέρω διόγκωση των πληθυσμών. Παρατηρείται λοιπόν αυτό-οργάνωση του πολυμερούς σε pH=7.4 όπου η συστάδα της ιστιδίνης δρα ως το υδρόφοβο τμήμα, λόγω της αποπρωτονίωσης του αζώτου στον ιμιδαζολικό της δακτύλιο, ενώ η συστάδα της πολυ(λυσίνης) δρα ως το υδρόφιλο τμήμα σχηματίζοντας έτσι ένα είδος μικκυλίου. Όσο μειώνεται η τιμή του pH αρχίζει να παρατηρείται μία διόγκωση του μικκυλίου, που οφείλεται στη σταδιακή πρωτονίωση της ιστιδίνης που κάνει τη συστάδα ελαφρώς πιο υδρόφιλη.
- Παράλληλα εμφανίζεται μικρό ποσοστό ενός μικρότερου πληθυσμού με διάμετρο περίπου στα 30 nm που πιθανώς οφείλεται σε συσσωματώματα που δεν μπόρεσαν να διασπαστούν με την προσθήκη του DMSO.

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας παραμέτρων στις 90 deg για το εμβολιασμένο πολυμερές.

PLL₇₈-b-(PLL₁₀-g-PHis₁₅)			
	90 deg		
pH	Diameter (nm)	kcps	pinhole
7.4	35	225	200 μm
	240		
6.5	32	350	200 μm

	328		
5	65	200	200 μm
	336		



Σχήμα 39: Σχηματική αναπαράσταση της εξάρτησης του μεγέθους του νανοσωματιδίου από το pH (90 deg, 25 °C).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας, συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προκύπτουν.

Αρχικά για τη σύνθεση του πολυμερούς ήταν απαραίτητη η σύνθεση κατάλληλα προστατευμένων N-καρβόξυ ανυδριτών (μονομερών), συγκεκριμένα N^ε-BOC-L-Lys NCA, N^ε-FMOC-L-Lys NCA και N^{im}-Trt-His NCA. Οι N-καρβόξυ ανυδρίτες χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και φασματοσκοπία ¹H-NMR όπου επιβεβαιώθηκε η επιτυχημένη σύνθεσή τους.

Στη συνέχεια ακολούθησε ο διαδοχικός ROP πολυμερισμός των εκάστοτε μονομερών για τη σύνθεση του επιθυμητού πολυμερούς, με κατάλληλη χρήση απαρχητή και τεχνικών υψηλού κενού. Για την σύνθεση του PLL₇₈-*b*-(PLL₁₀-*g*-PHis₁₅) προηγήθηκε η σύνθεση ενός δισυσταδικού πολυμερούς του τύπου poly(N^ε-BOC-L-Lysine)-*b*-poly(N^ε-FMOC-L-Lysine), (PBLL₇₈-*b*-PFLL₁₀), και ακολούθησε η εκλεκτική αποπροστασία της 2^{ης} συστάδας. Σημαντικό είναι να τονιστεί πως η αποπροστασία που έλαβε μέρος, πραγματοποιήθηκε σε βασικές συνθήκες, κατά τις οποίες δεν επηρεάζεται η προστασία της 1^{ης} συστάδας του συμπολυμερούς. Στην συνέχεια ακολούθησε ο ROP πολυμερισμός της ιστιδίνης και τέλος η αποπροστασία των δομικών μονάδων της λυσίνης και της ιστιδίνης. Το παραγόμενο πολυμερές χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία FT-IR και ¹H-NMR, αλλά και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC), σε διάφορα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

Περαιτέρω, μελετήθηκε η δευτεροταγής δομή του PLL₇₈-*b*-(PLL₁₀-*g*-PHis₁₅) σε διάφορες τιμές pH. Τα αποτελέσματα του κυκλικού διχρωϊσμού έδειξαν ότι κυριαρχεί η δομή του τυχαίου σπειράματος όσο το pH μειώνεται.

Επιπλέον μελετήθηκε η εξάρτηση της αυτό-οργάνωσης του εμβολιασμένου πολυμερούς από το pH με τη τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Φανερώθηκε πως πράγματι υπάρχει εξάρτηση της δομής από τις τιμές του pH. Τέλος, από τη μέτρηση του ζ-δυναμικού είναι φανερό πως τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν θετικό επιφανειακό φορτίο, όπως είναι αναμενόμενο.

Ως μελλοντικός στόχος προτείνεται η σύνθεση πολυπεπτιδίων με περίπλοκες αρχιτεκτονικές με την χρήση μονομερών που φέρουν προστατευτικές ομάδες BOC και FMOC καθιστώντας έτσι δυνατή την εκλεκτική αποπροστασία τους. Τέλος, ενδιαφέρον θα είχε η χρήση άλλων προστατευτικών ομάδων για να είναι δυνατή η σύγκριση των συνθηκών αποπροστασίας καθώς και η επιτυχία της σύνθεσης των επιθυμητών πολυμερών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2002**.
2. C. Alemán, A. Bianco, M. Venanzi, *Peptide Materials: From Nanostructures to Applications*, 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd: United Kingdom, **2013**.
3. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, *Synthesis of well-defined polypeptide-based materials via the ring-opening polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides*, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 5528-5578.
4. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, I. Stryer, *Βιοχημεία Τόμος 1*, **2010**, pp. 45-73.
5. M. Bodansky, A. Bodansky, *The practice of peptide synthesis*, 2nd ed. Springer-Verlag: New York, **1993**.
6. M. Goodman, J. Hutchison, *The mechanisms of polymerization of N-unsubstituted N-carboxyanhydrides*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, vol. 88, pp. 3627-3630.
7. T. J. Deming, *Synthesis and self-assembly of well-defined block copolypeptides via controlled NCA polymerization*, *Adv. Polym. Sci.*, **2013**, vol. 262, 1-38.
8. T. J. Deming, *Peptide-Based Materials*, 1st ed. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2012**.
9. O. Nuyken, S. D. Pask, *Ring-opening polymerization—An introductory review*, *Polymers* **2013**, 5, 361-403.
10. P. Dubois, O. Coulembier, J.-M. Raquez, *Handbook of Ring-Opening Polymerization*, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2009**.
11. T. J. Deming, *Living Polymerization of α -Amino Acid-N-Carboxyanhydrides*, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2000**, vol. 38, pp. 3011–3018.

12. 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.
13. M. Idelson, E. R. Blout, *Polypeptides XVII. A kinetic study of the polymerization of amino acid N-carboxyanhydrides initiated by strong bases*, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2387-2393.
14. T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, *Living Polypeptides, Biomacromolecules*, **2004**, vol. 5, pp. 1653-1656.
15. 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.
16. Δ. Μαυρογιώργης, *Μακρομοριακή αρχιτεκτονική πολυπεπτιδίων*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, **2015**, pp. 1-194.
17. H. Leuchs, *Ueber die Glycin-Carbonsäure*, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1906**, vol. 39, pp. 857-861.
18. 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.
19. 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.
20. B. Ishai, D. Katchalski, *Synthesis of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides from N-Carboxy- α -amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, vol. 74, pp. 3688-3689.
21. M. Green, M. A. Stahmann, *Synthesis and enzymatic hydrolysis of glutamic acid polypeptides*, *J. Biol. Chem.*, **1952**, vol. 197, pp 771-782.

22. F. Fuchs, *Über N-Carbonsäure-Anhydride*, Chem. Ber., **1922**, vol. 55, pp. 2943.
23. 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.
24. C. J. Brown, D. Coleman, A. C. Farthing, *Further Studies in Synthetic Polypeptides*, Nature, **1949**, vol. 163, pp. 834-835.
25. A. L. Levy, *Anhydro-N-Carboxy-dl-beta-Phenylalanine*, Nature, **1950**, vol. 165, pp. 152-153.
26. 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.
27. L. Cotarca, H. Eckert, *Phosgenations – A Handbook*, Wiley, **2003**, pp. 125-128.
28. L. Cotarca, *Conversion of bis (trichloromethyl) carbonate to phosgene and reactivity of triphosgene, diphosgene, and phosgene with methanol*, Synthesis, **1996**, pp. 553-560.
29. S. K. Sahoo, V. Labhasetwar, *Nanotech approaches to drug delivery and imaging*, Drug Discovery Today **2003**, 8, 1112-1120.
30. O. C. Farokhzad, R. Langer, *Impact of nanotechnology on drug delivery*, ACS Nano **2009**, 3, 16-20.
31. M. M. Amiji, *Nanotechnology for Cancer Therapy*, 1st ed. Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, **2007**.
32. E. P. Holowka, S. K. Bhatia, *Drug Delivery: Materials Design and Clinical Perspective*, 1st ed. Springer: New York, **2014**.
33. C. Demetzos, N. Pippa, *Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): a mini-review*, Drug Deliv. **2014**, 21, 250-257.
34. D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*, Nat. Nanotechnol. **2007**, 2, 751-760.

35. M. Πιτσικάλης, M. Χατζηχρηστίδη, *Ειδικά Θέματα Επιστήμης Πολυμερών*, ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2010**.
36. D. Douroumis, A. Fahr, *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*, 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd: United Kingdom, **2013**.
37. R. Duncan, *The drawing era of polymer therapeutics*, Nat. Rev. Drug Discov. **2003**, 2, 347-360.
38. C. Deng, J. Wu, R. Cheng, F. Meng, H.-A. Klok, Z. Zhong, *Functional polypeptide and hybrid materials: Precision synthesis via α -amino acid N-carboxyanhydride polymerization and emerging biomedical applications*, Prog. Polym. Sci. **2014**, 39, 330-364.
39. T. J. Deming, *Synthetic polypeptides for biomedical applications*, Prog. Polym. Sci. **2007**, 32, 858-875.
40. U. Kedar, P. Phutane, S. Shidhaye, V. Kadam, *Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting*, Nanomedicine **2010**, 6, 714-729.
41. Σ. Βάρλας, *Εγκλωβισμός Φαρμάκων σε Πολυπεπτίδια*. Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2014**.
42. J. Huang, A. Heise, *Stimuli responsive synthetic polypeptides derived from N-carboxyanhydride (NCA) polymerization*, Chem. Soc. Rev. **2013**, 42, 7373-7390.
43. S. Zhang, Z. Li, *Stimuli-responsive polypeptide materials prepared by ring-opening polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides*, J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys. **2013**, 51, 546-555.
44. Y. Shen, X. Fu, W. Fu, Z. Li, *Biodegradable stimuli-responsive polypeptide materials prepared by ring opening polymerization*, Chem. Soc. Rev. **2015**, 44, 612-622.
45. Y. Jeong, M. K. Joo, K. H. Bahk, Y. Y. Choi, H. T. Kim, W. K. Kim, H. J. Lee, Y. S. Sohn, B. Jeong, *Enzymatically degradable temperature sensitive polypeptide as a new in situ gelling biomaterial*, J. Control. Release, **2009**, 137, 25-30.

46. M. K. Joo, M. H. Park, B. G. Choi, B. Jeong, *Reverse thermo gelling biodegradable polymer aqueous solutions*, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 5891-5905.
47. P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff, *Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review*, *Cancer Res.* **1989**, 49, 6449-6465.
48. 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.
49. Y. Li, D. Maciel, J. Rodrigues, X. Shi, H. Tomás, *Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery*, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 8564-8608.
50. J. Huang, C. L. Hastings, G. P. Duffy, H. M. Kelly, J. Raeburn, D. J. Adams, A. Heise, *Supramolecular hydrogels with reverse thermal gelation properties from (oligo)tyrosine containing block copolymers*, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 200-206.
51. P. Bilalis, S. Varlas, A. Kiafa, A. Velentzas, D. Stravopodis, H. Iatrou, *Preparation of hybrid triple-stimuli responsive nanogels based on poly(L-histidine)*, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2016**, 54, 1278-1288.
52. P. Midoux, C. Pichon, J.-J. Yaouanc, P. A. Jaffrès, *Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers*, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 157, 166-178.
53. R. K. O'Reilly, C. J. Hawker, K. L. Wooley, *Cross-linked block copolymer micelles: functional nanostructures of great potential and versatility*, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 1068-1083.
54. B. Gyarmati, Á. Némethy, A. Szilágyi, *Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications*, *Eur. Polym. J.* **2013**, 49, 1268-1286.

55. R. L. McCarley, *Redox-responsive delivery systems*, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, 5, 391-411.
56. M. Huo, J. Yuan, L. Tao, Y. Wei, *Redox-responsive polymers for drug delivery: from molecular design to applications*, *Polym. Chem.* **2014**, 5, 1519-1528.
57. Green T. W., Wuts P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, New York, **1999**.
58. Juan Rodríguez Hernández, Harm-Anton Klok, *Synthesis and Ring-Opening (Co)polymerization of L-Lysine N-Carboxyanhydrides Containing Labile Side-Chain Protective Groups*, *J. POLYM. SCI. PART A: POLYM. CHEM.* **2003**, VOL.4.
59. Peter G. M. Wuts, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 5th ed., **2014**.
60. N. Leo Benoiton, *Chemistry of Peptide Synthesis*, **2006**.
61. B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1st ed. Wiley: Weinheim, **2004**.
62. J. McMurry, *Organic Chemistry*, 7th ed. Thomson Learning, Inc: Belmont, **2008**.
63. N. Χατζηχρηστίδης, Κ. Βύρας, Ε. Ιατρού, Σ. Πίσπας, Μ. Πιτσικάλης, Π. Πίσσης, *Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών*, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **1998**.
64. H. G. Barth, J. W. Mays, *Modern Methods of Polymer Characterization*, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1991**.
65. N. Χατζηχρηστίδης, Μ. Πιτσικάλης, Ε. Ιατρού, *Βιομηχανική Χημεία*, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2011**.
66. I. Teraoka, *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **2002**.
67. 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.
68. B. Chu, *Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice*, USA, **1991** vol. 1, 2nd Edition.
69. R. Pecora, *Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy*, USA, **1985**, vol. 1, 2nd Edition.
70. 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.
71. Α. Γ. Πίππα, *Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία: Μελέτη της μορφολογίας χιμαιρικών συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2015**.
72. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, *Anionic Polymerization: High Vacuum Techniques*, J. POLYM. SCI. PART A: POLYM. CHEM., **2000**, VOL.38.
73. D. Uhrig, J. W. Mays, *Experimental techniques in high vacuum anionic polymerization*, J. POLYM. SCI. PART A: POLYM. CHEM, **2005**, Vol. 43, 6179-6222.
74. Ratkanthwar, K., Hadjichristidis, N., & Mays, J., *High Vacuum Techniques for Anionic Polymerization*. Anionic Polymerization, **2015** 19–59.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

pI	Ισοηλεκτρικό σημείο
BOC	Tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-ομάδα
FMOC	9-Φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ-ομάδα
DCC	N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο
ROP	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
NCA	N-Καρβόξυ ανυδρίτης
I	Κατανομή μοριακών βαρών
RROP	Ριζικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
AROP	Ανιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
CROP	Κατιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
ROMP	Πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου
HVT	Τεχνικές υψηλού κενού
NAM	Κανονικός μηχανισμός αμινών
AMM	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο

DMA	Διμεθυλαμίνη
SOCI ₂	Θειονυλοχλωρίδιο
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη
PLL	πολυ(λυσίνη)
IR	Υπέρυθρη ακτινοβολία
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
SEC (ή GPC)	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
CD	Κυκλικός διχρωισμός
DLS	Δυναμική σκέδαση φωτός
CaH ₂	Υδρίδιο του ασβεστίου
n-BuLi	Κανονικό βούτυλο-λιθιο
H ₂ SO ₄	Θειικό οξύ
DCHA	Δικυκλοεξυλαμίνης
P ₂ O ₅	Πεντοξειδίο του φωσφόρου
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
MgSO ₄	Θειικό μαγνήσιο

THF	Τετραϋδροφουράνιο
N ^α ,N ^ε -diBOC-L-Lys	N ^α ,N ^ε -δι-tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-L-Λυσίνη
N ^ε -BOC-L-Lys	N ^ε -tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-L-Λυσίνη
N ^ε -FMOC-N ^α -BOC-L-Lys	N ^ε -9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ-N ^α -tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-L-Λυσίνη
N ^ε -FMOC-L-Lys	N ^ε -9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ L-Λυσίνη
BOC-His(Trt)-OH	N ^α -tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-Nim-trityl-L-Histidine
N ^{im} -Trt-L-His	N ^{im} -Τρίτυλο-L-Ιστιδίνη
PLL-b-(PLL-g-PHis)	πολυ(L-Lysine)-b-(πολυ(L-Lysine)-g-πολυ(L-Histidine))
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
(Et) ₃ SiH	Τριαίθυλοσιλάνιο
CDCl ₃	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
DMSO	Διμέθυλο σουλφοξειδίο

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
Zwitterion	Αμφοτερικό ιόν
α -helix	α -έλικα
β -Turn	β -στροφή
ω -Loop	ω -θηλιά
Random coil	Τυχαίο σπείραμα
Ring-opening polymerization	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
N-Carboxy anhydride	N-Καρβοξυ ανυδρίτης
Ring strain	Τάση διάνοιξης δακτυλίου
High-vacuum techniques	Τεχνικές υψηλού κενού
Normal amine mechanism	Κανονικός μηχανισμός αμινών
Activated monomer mechanism	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
Dialysis	Διαπίδυση
Drug delivery	Μεταφορά φαρμάκων
Micelle	Μικκύλιο

Zeta-potential	ζ-Δυναμικό
High-vacuum line	Γραμμή υψηλού κενού
Flame-drying	Ξήρανση συσκευής στη γραμμή υψηλού κενού προς απομάκρυνση υγρασίας με χρήση φλόγας
Na/K alloy	Κράμα μεταλλικού νατρίου και καλίου
Break-seal	Υάλινος υμένας αμπούλας
Milli-Q	Απεσταγμένο, απιονισμένο και φιλτραρισμένο νερό υψηλής καθαρότητας
Freeze-drying	Λυοφιλοποίηση