



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 του N-καρβόξυ ανυδρίτη
της N^ε-
φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλο-L-λυσίνης και των
προστατευμένων και
αποπροστατευμένων ομοπολυμερών Πολυ-(N^ε-Fmoc-
L-Λυσίνης) και Πολυ(L-
λυσίνης).**

**ΜΕΛΙΝΑ ΛΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2020

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση και Χαρακτηρισμός του Ν-καρβόξυ ανυδρίτη της Ν^ε-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλο -L-λυσίνης και των προστατευμένων και αποπροστατευμένων ομοπολυμερών Πολυ-(Ν^ε-Fmoc-L-Λυσίνης) και Πολυ(L-λυσίνης).

ΜΕΛΙΝΑ ΛΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ

A.M.: 181006

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

Σε αυτή τη διατριβή παρουσιάζεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του N^{ϵ} -Fmoc-L-Lys NCA και των ομοπολυμερών του poly-(N^{ϵ} -Fmoc-L-Lys)₃₂₅₀ και poly-(N^{ϵ} -Fmoc-L-Lys)₁₀₀₀₀ καθώς και η εκλεκτική αποπροστασία τους με απεσταγμένη πιπεριδίνη. Η σύνθεση των πολυμερών πραγματοποιήθηκε μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) του αντίστοιχου προστατευμένου N-καρβοξυ ανυδρίτη με χρήση ως απαρχητή την n-εξυλαμίνη. Για τη σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη, τον καθαρισμό των διαλυτών, αλλά και των τελικών ομοπολυμερών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού, εξασφαλίζοντας υψηλή καθαρότητα στο σύστημα και απουσία προσμίξεων που θα οδηγούσαν σε μη επιθυμητές αντιδράσεις. Η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR), και της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR). Απώτερος στόχος είναι η δημιουργία σταθερών (σε υδατικό περιβάλλον) και αποκρίσιμων σε καρκινικό περιβάλλον νανοδομών που θα χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές στοχευμένης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων σε καρκινικούς ιστούς.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: πολυπεπτίδια αποκρίσιμα σε ερεθίσματα, N-καρβοξυ ανυδρίτες, πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου, τεχνικές υψηλού κενού, αυτό-οργάνωση

ABSTRACT

In this dissertation is presented the synthesis and the characterization of N^ϵ -Fmoc-L-Lys NCA and poly-(N^ϵ -Fmoc-L-Lys)₃₂₅₀, poly-(N^ϵ -Fmoc-L-Lys)₁₀₀₀₀ copolymers, as well as their selective distillation with distilled piperidine. The synthesis of these polymers was conducted via Ring Opening Polymerization of the corresponding protected N-Carboxy Anhydride and n-hexylamine was used as the initiator. High Vacuum Techniques were used both for the purification of the solvents and the polymerizations, avoiding undesirable side reactions. The desirable polymers were characterized by Size Exclusion Chromatography (SEC/GPC), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Finally, the surface charge of nanoparticles was studied via zeta potential measurements. The ultimate goal of this study is the formation of stimuli responsive nanostructures that can incorporate anticancer drugs and selectively release them to desired destinations such as cancer tissues.

SUBJECT AREA: Polymers

KEYWORDS: stimuli responsive polypeptides, N-carboxy anhydrides, ring opening polymerization, high vacuum techniques, drug delivery

**«Δεν υπάρχει πεδίο άπαρτο γι'αυτόν που εργάζεται με ψυχή, ούτε πεδίο
σίγουρο γι'αυτόν που εργάζεται χωρίς ψυχή.»**

Μέγας Αλέξανδρος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την υλοποίηση της ερευνητικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα εκείνα τα άτομα που συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω προπαντός τον αξιότιμο επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ιατρού Ερμόλαο για την άψογη συνεργασία μας, την πολύτιμη βοήθειά του και επιστημονική καθοδήγηση, για την προθυμία του να μου επιλύσει οποιαδήποτε απορία, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Πιτσικάλη Μαρίνο και κ. Σακελλαρίου Γεώργιο για την άψογη διδασκαλία τους στα μαθήματα του μεταπτυχιακού προγράμματος, για την αστείρευτη όρεξη τους να μας μεταλαμπαδεύουν με το δικό τους αποτελεσματικό τρόπο τις γνώσεις τους και για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου τόσο σε προπτυχιακό όσο και σε μεταπτυχιακό επίπεδο.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την καταξιωμένη υποψήφια διδάκτωρα Βαρβάρα Αθανασίου, για την υποστήριξη, την ενθάρρυνση, την καθοδήγηση, και τις γνώσεις που μου μετέδωσε τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο και για την καθημερινή μας άριστη συνεργασία που πάντα ήταν με πνεύμα κατανόησης, σεβασμού και αλληλεγγύης. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας για το κλίμα συνεργασίας που υπήρχε και για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν ο καθένας με το δικό του τρόπο όταν τους χρειάστηκα.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου, στους γονείς μου και τα αδέρφια μου, για τη στήριξη, την υπομονή, την ενθάρρυνση και την πίστη τους σε μένα σε κάθε μου βήμα μέχρι και σήμερα. Ό,τι έχω καταφέρει το οφείλω σε αυτούς. Είναι σημαντικό να έχεις γερές ρίζες, γιατί όσοι δυνατοί άνεμοι και αν έρθουν δε θα καταφέρουν να σε «ξεριζώσουν».

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	25
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	29
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	29
1.1 Πρωτοταγής δομή πολυπεπτιδίων	29
1.2 Δευτεροταγής δομή	29
1.3 Ανώτερα επίπεδα οργάνωσης πρωτεϊνών.....	33
1.4 Σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους.....	34
1.5 Προστατευτικές ομάδες αμίνης και καρβοξυλίου.	34
1.5.1 Προστασία α-αμινομάδας.....	36
1.5.2 Προστασία καρβοξυλίου.....	42
1.6 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP) ^{13,14} 43	
1.7 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N - καρβοξυανυδριτών (NCA's) των α-αμινοξέων ^{15,16,17}	46
1.8 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση πρωτοταγών αμινών ως απαρχητών και τεχνικών υψηλού κενού ¹⁸	55
1.9 Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs) ^{10,19}	57
1.10 Παραλλαγές στην μέθοδο Fuchs-Farthing.....	61
1.11 Νανοτεχνολογία και Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων	63
1.11.1 Νανοτεχνολογία και Εφαρμογές της.....	63
1.11.2 Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων μέσω Πολυμερικών Υλικών.....	66
1.12 Πολυπεπτιδικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποκρίσιμα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες	72

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	75
ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ	75
2.1 Φασματοσκοπία υπέρυθρου (Infrared Spectroscopy, IR)	75
2.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) ^{42,43}	79
2.3 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) ^{44,45}	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	88
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	88
3.1 Τεχνική Υψηλού Κενού (High Vacuum Technique, HVT) ^{49,51}	88
3.2 Καθαρισμός Διαλυτών ^{49,51}	92
3.2.1 Οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc)	92
3.2.2 Τετραϋδροφουράνιο (THF)	93
3.2.3 Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)	94
3.2.4 Εξάνιο	96
3.3 Καθαρισμός Απαρχητή και Αντιδραστηρίων	96
3.3.1 n-εξυλαμίνη	96
3.3.2 Τριαιθυλαμίνη (Et ₃ N)	99
3.3.3 Σύνθεση και Καθαρισμός Μονομερών (N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων) ^{53,54}	100
3.3.4 Σύνθεση του N-καρβοξυανυδρίτη της N ^ε - 9-Φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλο -N ^α - Tert-βουτυλοξυκαρβόνυλο -L-λυσίνης (N ^ε -Fmoc-N ^α -Boc-L-Lysine)	100
3.4 Σύνθεση ομοπολυμερών Poly-(N ^ε -Fmoc-L-Lys)	106
3.4.1 Σύνθεση υβριδικού ομοπολυμερούς Poly(N ^ε -Fmoc-L-Lys) ₃₂₅₀	107
3.4.2 Σύνθεση υβριδικού ομοπολυμερούς Poly-(N ^ε -Fmoc-L-Lys) _{10.000}	115

3.5	Εκλεκτική αποπροστασία δομικών μονάδων πολυ(λυσίνης) (PLys).....	116
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....		122
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		122
4.1	Χαρακτηρισμός του πρόδρομου αμινοξέος του N ^ε - Fmoc-N ^α -Boc- L-Lysine και του N ^ε - Fluorenylmethoxycarbonyl- L-Lysine NCA (N ^ε -Fmoc-L-Lysine NCA).....	122
4.2	Χαρακτηρισμός των προστατευμένων poly-(N ^ε -Fmoc-L-Lysine) και αποπροστατευμένων ομοπολυμερών poly-(L-Lysine)	126
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....		134
Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια		135
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....		138
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		140

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 : Η δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού	29
Σχήμα 2 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α -έλικας και της β -πτυχωτής επιφάνειας.....	31
Σχήμα 3 : Μηχανισμός απομάκρυνσης της BOC ομάδας σε όξινες συνθήκες.	40
Σχήμα 4: : Ανιοντικός μηχανισμός ROP.....	46
Σχήμα 6 : Γενική αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs	47
Σχήμα 7 : Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM)	49
Σχήμα 8 : Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχηγή.....	50
Σχήμα 9 : Υδρολυτικοί μηχανισμοί των NCAs παρουσία υγρασίας.....	51
Σχήμα 10 : Στάδια έναρξης και διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό κατά Blout.....	52
Σχήμα 11 : <i>α) Προσβολή στον C(5), β) προσβολή στον C(2).</i>	52
Σχήμα 12: Στάδια ενεργοποίησης και έναρξης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM).....	54
Σχήμα 13: Στάδιο διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)	55
Σχήμα 14 : Μηχανισμός σύνθεσης NCA με χρήση SO ₂ (μέθοδος Leuchs)....	58
Σχήμα 15: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών.....	59

Σχήμα 16 : Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Roche για αμινοξέα με αλειφατική πλευρική αλυσίδα και προστασίες ανθεκτικές σε όξινο περιβάλλον.	62
Σχήμα 17: Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Mobashery, η μέθοδος είναι γενική και εφαρμόζεται και σε αμινοξέα με ευαίσθητες προστασίες σε οξέα.	63
Σχήμα 18: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης SEC	84
Σχήμα 19: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου...	91
Σχήμα 20: Αντιδράσεις σχηματισμού ιοντικών ζευγών THF/K	94
Σχήμα 21: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ	95
Σχήμα 22: Συσκευή για την απόσταξη ενώσεων υψηλού σημείου ζέσεως (short path distillation).....	98
Σχήμα 23: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής αραίωσης απαραίτητη	99
Σχήμα 25: Γενική αντίδραση σύνθεσης ομο-πολυπεπτιδίων με διμεθυλαμίνη	107
Σχήμα 26: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής πολυμερισμού για την σύνθεση ομο- πολυπεπτιδίων.....	109
Σχήμα 27: Πορεία σύνθεσης ομοπολυμερών τύπου Poly-(N ^ε -Fmoc-L-Lys) , με χρήση ως απαραίτητη εξυλαμίνη	114
Σχήμα 28: Στάδια αποπροστασίας των δομικών μονάδων της λυσίνης.....	119
Σχήμα 29: Αποπροστασία της ομάδας 9-φλουορένυλομεθοξυκαρβόνυλο (Fmoc) με βήτα-απόσπαση, με πιπεριδίνη που στη συνέχεια σχηματίζει ένα προϊόν προσθήκης. ⁶⁰	120
Σχήμα 30: Φάσματα IR πρόδρομου αμινοξέος N ^ε -Fmoc-N ^α -Boc-L-Lysine και του τελικού καθαρού N ^ε -Fmoc-L-Lysine NCA	124
Σχήμα 31: Φάσμα ¹ H-NMR του πρόδρομου αμινοξέος (N ^ε -Fmoc-N ^α -Boc-L-Lysine) σε CDCl ₃	125

Σχήμα 32: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του N-καρβοξυ ανυδρίτη της λυσίνης ($\text{N}^\epsilon\text{-Fmoc-L-Lysine NCA}$) σε CDCl_3	126
Σχήμα 33: Φάσματα IR του προστατευμένου $\text{poly-(N}^\epsilon\text{-Fmoc-L-Lysine)}_{3250}$ και αποπροστατευμένου ομοπολυμερούς $\text{poly-(L-Lysine)}_{3250}$	127
Σχήμα 34: Φάσματα IR του προστατευμένου $\text{poly-(N}^\epsilon\text{-Fmoc-L-Lysine)}_{10.000}$ και αποπροστατευμένου ομοπολυμερούς $\text{poly-(L-Lysine)}_{10.000}$	128
Σχήμα 35: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του προστατευμένου $\text{poly-(N}^\epsilon\text{-Fmoc-L-Lysine)}_{3250}$	129
Σχήμα 36: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του προστατευμένου $\text{poly-(N}^\epsilon\text{-Fmoc-L-Lysine)}_{10.000}$	130
Σχήμα 39 : Χρωματογράφημα Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC) για τα αποπροστατευμένα ομοπολυμερή $\text{poly-(L-Lysine)}_{10.000}$ και $\text{poly-(L-Lysine)}_{3.250}$	133

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των διαδικασιών εγκλωβισμού και ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης υδρόφοβων φαρμάκων μέσω πολλαπλά αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών νανοφορέων.....	28
Εικόνα 3: Η β-στροφή	32
Εικόνα 4 : Χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά.....	60
Εικόνα 5: Χαρακτηριστικά μεγέθη μορίων, νανοϋλικών και βιολογικών οντοτήτων	64
Εικόνα 6: Κυριότεροι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών βασισμένοι σε πολυμερικά υλικά και ανόργανα νανοσωματίδια.....	68
Εικόνα 7: Τα κυριότερα εξωτερικά ερεθίσματα που προκαλούν απόκριση στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες.....	70
Εικόνα 8: Χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών ενός μορίου.....	76
Εικόνα 9: Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών. Τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους εκλούνται πρώτα και να ακολουθούν κατόπιν μόρια κατά σειρά μειούμενου μεγέθους.	85
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση Γραμμής Υψηλού Κενού (High Vacuum Line, HVL) ^{62,63}	89
Εικόνα 11: Καθαρισμός εξανίου με υδρίδιο του ασβεστίου (CaH ₂) Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
Εικόνα 12: εξυλαμίνη με λειοτριβημένο υδρίδιο του ασβεστίου.....	97
Εικόνα 13: Συσκευή σύνθεσης του N ^ε -Fmoc-L-Lys NCA.	101

Εικόνα 14: Η πορεία της αντίδρασης μετά την προσθήκη τριφωσγενείου και τριαιθυλαμίνης που αφήνεται υπο ροή αργού σε παγόνερο. Παρατηρείται σταδιακή αλλαγή του χρώματος του διαλύματος όσο προχωράει η αντίδραση.	104
Εικόνα 15: Σχηματισμός εντυπωσιακού άσπρου αφρού πριν τη ξήρανση του N-καρβόξυ ανυδρίτη.	106
Εικόνα 16: Η συσκευή πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των ομο- πολυπεπτιδίων	110
Εικόνα 17: Το διάλυμα μετατρέπεται σταδιακά από διαυγές κίτρινο σε λευκό-υποκίτρινο και μη διαυγές, ένδειξη για την επιτυχή σύνθεση της πολυπεπτιδικής συστάδας.	112
Εικόνα 18: Καταβύθιση ομοπολυμερούς σε διαιθυλαιθέρα.....	113
Εικόνα 19: Συλλογή ομοπολυμερούς σε σφαιρική φιάλη.	115
Εικόνα 20: Πλήρως προστατευμένο πολυμερές πριν και μετά την προσθήκη απεσταγμένης πιπεριδίνης. Σχηματίζεται ένα θολό υποκίτρινο διάλυμα ύστερα από έντονη ανάδευση.	117
Εικόνα 21: Διαδικασία dialysis για την καθαρισμό του πολυμερούς από την προστατευτική ομάδα Fmoc.....	118

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Προστατευτικές ομάδες που αποπροστατεύονται με βάση.	41
Πίνακας 2: Προστατευτικές ομάδες καρβοξυλικού οξέος που αποπροστατεύονται με οξύ.	42
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικές ομάδες κυκλικών μονομερών και ο συνήθης μηχανισμός πολυμερισμού ROP για κάθε κατηγορία.	45
Πίνακας 4 : Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1}	78
Πίνακας 5: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (ppm)	81

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

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

Αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του Ν-καρβόξυ ανυδρίτη της N^{ϵ} -9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλο - N^{α} - tert- βουτυλοξυκαρβόνυλο- L -λυσίνης (N^{ϵ} -Fmoc- N^{α} -Boc- L -Lysine) και των προστατευμένων και αποπροστατευμένων ομοπολυμερών Poly-(N^{ϵ} -Fmoc- L -Lys) και Poly-(L -Lys) , με ιδιαίτερη έμφαση στην αποπροστασία της προστατευτικής ομάδας Fmoc με πιπεριδίνη. Οι Ν καρβόξυ ανυδρίτες που φέρουν τη συγκεκριμένη προστατευτική ομάδα , Fmoc, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ορθογωνική σύνθεση καθώς αποπροστατεύονται με ισχυρά βασικές συνθήκες. Συνεπώς μπορούν να δημιουργηθούν πολύπλοκες αρχιτεκτονικές πολυπεπτιδικών πολυμερών οι οποίες φέρουν προστατευτικές ομάδες που αποπροστατεύονται σε τελείως διαφορετικές συνθήκες με απώτερο σκοπό να αποτελέσουν έξυπνα νανοσυστήματα για τη μεταφορά και την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

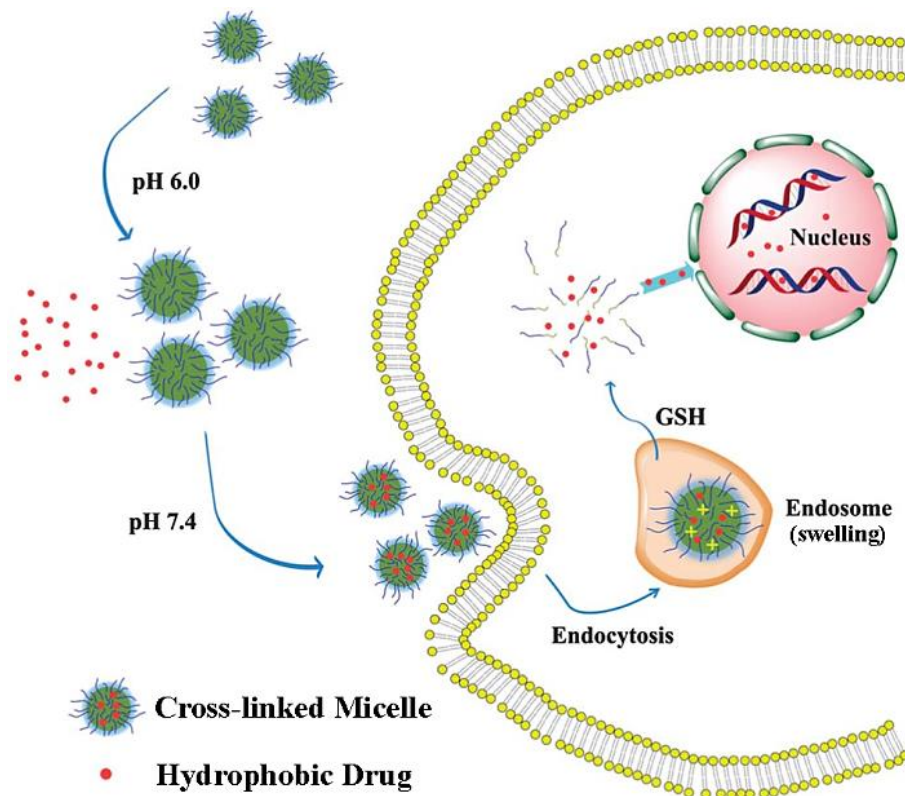
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αναπτύσσεται επίσης, τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο, για την παρασκευή βιοσυμβατών και βιοδιασπώμενων πολυμερών. Τα πολυπεπτίδια, είναι από τα κυριότερα πολυμερή αυτής της κατηγορίας, και πλήθος ερευνών έχουν διενεργηθεί πάνω στη σύνθεση, τη διαμόρφωση και τις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

Ήδη από τη δεκαετία του 50', αναπτύχθηκαν πολλές μέθοδοι για την σύνθεση πεπτιδίων. Όμως μέχρι και σήμερα, η αποδοτικότερη, γρηγορότερη και οικονομικότερη τεχνική για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, περιλαμβάνει τον πολυμερισμό μέσω διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N-καρβοξυ-ανυδριτών των α -αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs), μέθοδος που αναπτύσσεται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 3.3.3.³ Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για τη σύνθεση των γραμμικών ομοπολυπεπτιδίων (linear homopolymers) του γενικού τύπου poly-(N^F-Fmoc-L-Lys) που μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, αφού πρώτα συντέθηκε εργαστηριακά ο NCA.

Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πολυμερικοί νανοφορείς που έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν υδρόφοβα φάρμακα (π.χ. everolimus, paclitaxel, doxorubicin), αυξάνοντας τον χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα και οδηγώντας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου στον οργανισμό.^{4,5}

Το αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας διπλώματος ειδίκευσης, είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του N-καρβόξυ ανυδρίτη της N^{ϵ} -Fmoc- N^{α} -Boc-L-Lysine και των προστατευμένων και αποπροστατευμένων ομοπολυμερών Poly-(N^{ϵ} -Fmoc-L-Lys) και Poly-(L-Lys) , με ιδιαίτερη έμφαση στην αποπροστασία της προστατευτικής ομάδας Fmoc με πιπεριδίνη. Οι N- καρβόξυ ανυδρίτες που φέρουν τη συγκεκριμένη προστατευτική ομάδα , Fmoc, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ορθογωνική σύνθεση καθώς αποπροστατεύονται με ισχυρά βασικές συνθήκες. Συνεπώς μπορούν να δημιουργηθούν πολύπλοκες αρχιτεκτονικές πολυπεπτιδικών πολυμερών προς σχηματισμό ανώτερων δικτυωμένων υπερμοριακών δομών οι οποίες φέρουν προστατευτικές ομάδες που αποπροστατεύονται σε τελείως διαφορετικές συνθήκες με απώτερο σκοπό να αποτελέσουν έξυπνα ναοσυστήματα για την μεταφορά και την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Τέλος, τα πολυμερή αυτά μπορούν να εμβολιαστούν επιτυχώς σε ναοσωματίδια πυριτίας για την δημιουργία «έξυπνων» ναοσύνθετων υλικών για βιοϊατρικές εφαρμογές.

Όπως γίνεται σαφές, απώτερος σκοπός της ερευνητικής ομάδας του επιβλέποντος της παρούσας εργασίας κ. Ιατρού, είναι η στοχευμένη εναπόθεση φαρμάκων μέσω αυτών των πολλαπλά αποκρινόμενων ναομεταφορέων σε καρκινικούς στόχους, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι στην περιοχή κοντά στα καρκινικά κύτταρα το pH είναι χαμηλότερο του φυσιολογικού και η συγκέντρωση γλουταθειόνης (GSH) αρκετά υψηλότερη (Εικόνα 1), βελτιώνοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Με αυτό τον τρόπο εισάγεται μία πρωτότυπη ιδέα στον τομέα των Βιοπολυμερών και της Νανοϊατρικής, η οποία μπορεί να αναπτυχθεί με περαιτέρω έρευνα, οδηγώντας σε ελπιδοφόρα αποτελέσματα ικανά να δώσουν τέλος στη μάστιγα του καρκίνου.⁶



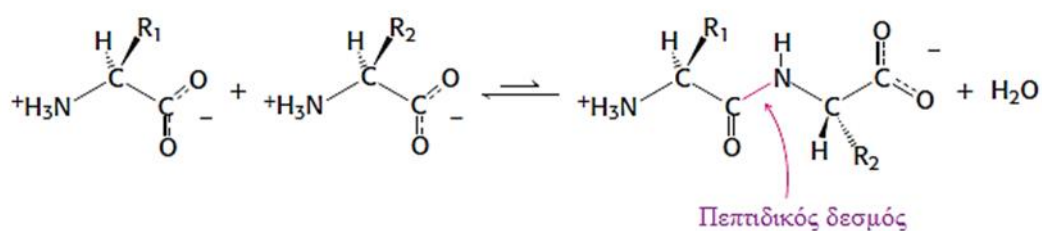
Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των διαδικασιών εγκλωβισμού και ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης υδρόφοβων φαρμάκων μέσω πολλαπλά αποκρινόμενων πολυτεπτιδικών νανοφορέων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Πρωτοταγής δομή πολυπεπτιδίων

Πολλά αμινοξέα ενώνονται διαδοχικά μέσω πεπτιδικών δεσμών δημιουργώντας μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ του καρβονυλίου και του αζώτου είναι άκαμπτος και επίπεδος, έχοντας χαρακτήρα μερικώς διπλού δεσμού (1.32 Å) λόγω απεντοπισμού των ηλεκτρονίων μέσω δομών συντονισμού. Το γεγονός αυτό εμποδίζει την ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον δεσμό αυτό και μειώνει την δραστηριότητά του, καθιστώντας τον κινητικά σταθερό.^{8,9}



Σχήμα 1 : Η δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού

Η βασική διαφορά μεταξύ των πολυπεπτιδίων και των πρωτεϊνών είναι ότι τα πολυπεπτίδια είναι βιοπολυμερή που δημιουργούνται από επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες (μονομερή) ενός μόνο είδους αμινοξέος, ενώ οι πρωτεΐνες είναι σύνολα διαφόρων αμινοξέων με αυστηρά καθορισμένη αλληλουχία (πρωτοταγή δομή).

1.2 Δευτεροταγής δομή

Παρόλο που τα συνθετικά πολυπεπτίδια χαρακτηρίζονται από πολυμοριακότητα, σε αντίθεση με τις φυσικές πρωτεΐνες, έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται και να αποκτούν δευτεροταγή δομή ανάλογη με αυτή των

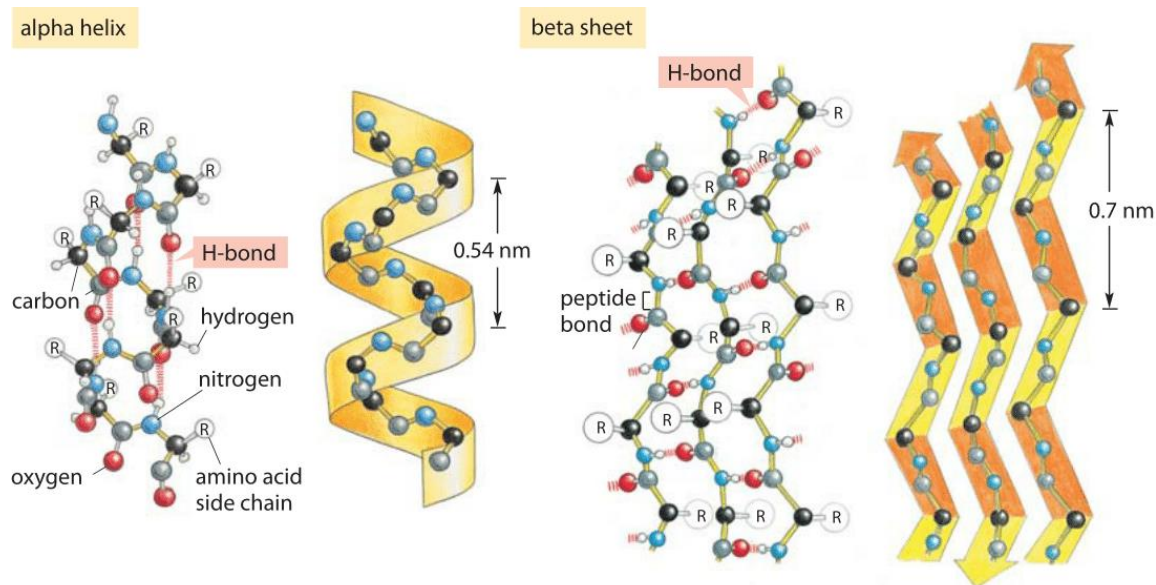
φυσικών πρωτεϊνών, όπως η α-έλικα που σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, τα β-φύλλα που αναπτύσσουν δεσμούς υδρογόνου διαμοριακά, η β-στροφή, η ω-θηλιά, το τυχαίο σπείραμα και άλλα, οι σημαντικότερες από τις οποίες αναλύονται παρακάτω.

• α-έλικα

Η δομή της α-έλικας (α-helix) προτάθηκε το 1951 από τους Linus Pauling και Robert Corey και αποδείχθηκε πειραματικά τον ίδιο χρόνο από τον Max Perutz. Η α-έλικα έχει μία ραβδόμορφη δομή. Ο κορμός, που αποτελείται από την κύρια πολυπεπτιδική αλυσίδα, έχει σχήμα σπειράματος και σχηματίζει το εσωτερικό της ράβδου, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες εκτείνονται προς το εξωτερικό σε μία ελικοειδή διάταξη. Η α-έλικα, όπως προαναφέρθηκε, σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ομάδων $-NH$ του καταλοίπου i και $-CO$ του καταλοίπου $i+4$ της κύριας πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Οι υδρογονικοί δεσμοί της α-έλικας είναι σχεδόν παράλληλοι μεταξύ τους και παράλληλοι με τον κύριο άξονα της έλικας. Το βήμα της α-έλικας είναι 5.4 \AA και αντιστοιχεί σε 3.6 κατάλοιπα ανά στροφή. Η α-έλικα είναι δεξιόστροφη για τα L-αμινοξέα διότι στις αριστερόστροφες έλικες υπάρχει σημαντική στερεοχημική παρεμπόδιση των $-CO$ και R ομάδων. Η φορά της έλικας παραμένει η ίδια ανεξάρτητα από τη θέση του παρατηρητή ως προς τον άξονα. Σε σπάνιες περιπτώσεις εμφανίζονται αριστερόστροφες έλικες 3-5 καταλοίπων. Έτσι λοιπόν, ως επί το πλείστον οι α-έλικες που απαντώνται στις πρωτεΐνες είναι δεξιόστροφες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι α-έλικες σε πολυπεπίδια μεγάλου μήκους δεν είναι απόλυτα τέλειες αλλά περιέχουν «σπασίματα» (ατέλειες). Η λυσίνη, η ιστιδίνη, το γλουταμικό, η αλανίνη και η λευκίνη είναι μερικά αμινοξέα που δημιουργούν δομή α-έλικας.^{7,8}

- **β-πτυχωτή επιφάνεια (ή β-φύλλο)**

Το β-φύλλο (β-sheet) είναι η δεύτερη δευτεροταγής δομή που προτάθηκε από τους Pauling και Corey. Είναι μία δομή ανοικτή και επίπεδη με τους δεσμούς υδρογόνου να σχηματίζονται διαμοριακά μεταξύ –NH και –CO της ίδιας ή και διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι 3.5 Å (σε αντίθεση με το 1.5 Å της α-έλικας), ενώ οι γειτονικές αλυσίδες σε μία β-πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλες). Τα β-φύλλα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλία από τις α-έλικες, μπορεί να είναι ευθεία ή να εμφανίζονται με την κάθε πτύχωση ελαφρά περιστραμμένη. Δομές β-φύλλου διευκολύνονται κυρίως από την βαλίνη, την ισολευκίνη, την τυροσίνη και την φαινυλαλανίνη.⁹

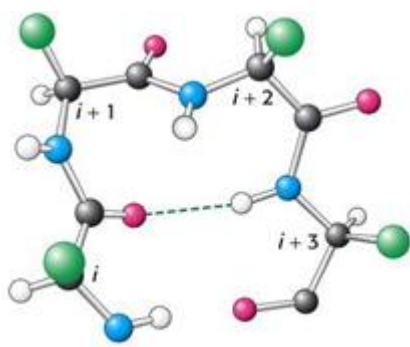


Σχήμα 2 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α-έλικας και της β-πτυχωτής επιφάνειας

- **β-στροφή**

Η β-στροφή (β-turn) ή κάμψη φουρκέτας ή στροφές αναστροφής, είναι μια δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών όπου σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου

στην ίδια αλυσίδα μεταξύ της ομάδας $-CO$ του i καταλοίπου του πολυπεπτιδίου και της ομάδας $-NH$ του $i+3$ καταλοίπου. Με τον τρόπο αυτό μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάξει ξαφνικά την κατεύθυνσή της. Οι β -στροφές συχνά συνδέουν αντιπαράλληλες β -πτυχωτές επιφάνειες. Τα αμινοξέα γλυκίνη και προλίνη έχουν την τάση να βρίσκονται σε στροφές.^{10,11}



Εικόνα 2: Η β -στροφή

- **ω -θηλιά**

Η ω -θηλιά (ω -loop) αναφέρεται σε ένα μεγαλύτερο βρόγχο που συνδέει πρωτεϊνικά τμήματα και στον οποίο δεν σχηματίζονται ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου. Οι ω -θηλιές αποτελούνται από εύκαμπτα τμήματα και συνήθως υδρόφιλα αμινοξέα, βρίσκονται κυρίως στην επιφάνεια των πρωτεϊνών σε επαφή με τον διαλύτη, όμως δεν έχουν κανονικές περιοδικές δομές όπως οι α -έλικες και οι β -επιφάνειες. Είναι πιο πολύπλοκες δομές, μέσω των οποίων επίσης επιτυγχάνεται αναστροφή της αλυσίδας.

- **Τυχαίο σπείραμα**

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

Η τάση ενός πεπτιδίου για δευτεροταγή δομή, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύστασή του σε αμινοξέα. Οι δευτεροταγείς δομές συμβάλλουν σημαντικά στην αυτο-οργάνωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, οδηγώντας σε νέες υπερμοριακές δομές με πιθανές βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Τα πολυπεπτίδια έχουν αποτελέσει αντικείμενο εντατικών μελετών λόγω του θεμελιώδη ρόλου τους στον εγκλωβισμό και στην ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών που έχουν σχεδιαστεί για χρήση στη γονιδιακή και αντικαρκινική θεραπεία.

1.3 Ανώτερα επίπεδα οργάνωσης πρωτεϊνών

- **Τριτοταγής δομή**

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

- **Τεταρτοταγής δομή**

Η τεταρτοταγής δομή είναι ένα επιπλέον επίπεδο οργάνωσης αρκετών πρωτεϊνών και αναφέρεται στις πρωτεΐνες που αποτελούνται από δύο ή

περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες (υπομονάδες) και στο πώς αυτές διατάσσονται στο χώρο.

1.4 Σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρασκευής συνθετικών πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με απόλυτα καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων (πρωτοταγή δομή), όπως η σύνθεση Merrifield σε στερεά φάση, ωστόσο δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους. Την τελευταία εικοσαετία παρουσιάζει ενδιαφέρον η δημιουργία πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία. Το ενδιαφέρον αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα πολυμερή έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται και να αποκτούν δευτεροταγή δομή ανάλογη με αυτή των φυσικών πρωτεϊνών που προάγει την αυτο-οργάνωσή τους, ενώ επίσης είναι βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα και συνεπώς βρίσκουν μεγάλο αριθμό εφαρμογών στον τομέα της υγείας.

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους με καθορισμένο βαθμό πολυμερισμού, μοριακή σύσταση και άρα συγκεκριμένες ιδιότητες που να μπορούν να μιμηθούν επαρκώς τις ιδιότητες των φυσικών πρωτεϊνών, συμβαίνει με 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 πολυπεπτιδία να αυτο-οργανώνονται σε καλά καθορισμένες νανοδομές, μεταφέροντας με αυτό τον τρόπο τις επιθυμητές ιδιότητες στη μακρο-κλίμακα.

1.5 Προστατευτικές ομάδες αμίνης και καρβοξυλίου.

Στη συνθετική οργανική χημεία απαιτείται η χρήση 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 στη 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 ρακεμίσωση.

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 τη 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

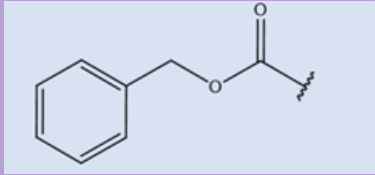
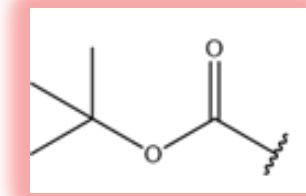
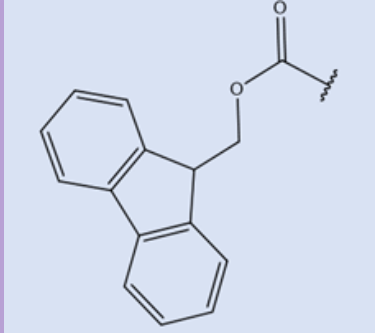
Σε αυτή την παράγραφο αναφέρονται οι κυριότερες προστατευτικές ομάδες με ιδιαίτερη έμφαση σε αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Κατά την σύνθεση απαιτείται ορθογωνικότητα στις διάφορες προστασίες που χρησιμοποιούνται. Ορθογωνικότητα σημαίνει ότι κάθε τύπος προστασίας λύεται ανεξάρτητα από τον άλλον.

1.5.1 Προστασία 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 ακόμη 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 παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1 : Κυριότερες προστατευτικές ομάδες της α-αμινομάδας

Όνομασία	Χημικός Τύπος	Συνθήκες Αποπροστασίας
Βενζυλοξυκαρβόνυλ-ομάδα (Z)		<ol style="list-style-type: none"> 1) H_2 / Pd 2) $HBr / AcOH$ 3) $Na / liq. NH_3$
tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-ομάδα (BOC)		<ol style="list-style-type: none"> 1) TFA, DCM 2) 4M HCl σε διοξάνη 3) 2M $MeSO_4$ 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) NH_3

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. 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 πεπτίδια 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.

- **9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλο (Fmoc)**

Το 1970 παρουσιάστηκε μια νέα ουρεθανικού τύπου ομάδα, η 9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ-ομάδα (FMOC) από τους Caripino & 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.

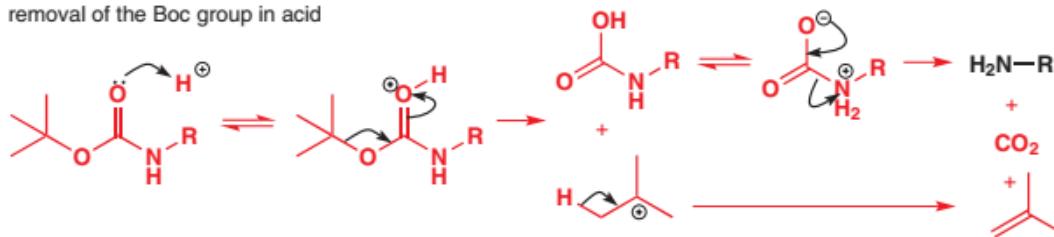
- **Αλλυλοξυκαρβόνυλο (Alloc)**

Η ομάδα αυτή είναι σταθερή τόσο σε όξινες αλλά και βασικές συνθήκες γεγονός που την καθιστά ορθογωνική με τις ομάδες Boc, Fmoc. Το στάδιο αποπροστασίας περιλαμβάνει μεταλλικό παλλάδιο και κάποιο πυρηνόφιλο.

- **tert-Βουτυλοξυκαρβόνυλο (Boc)**

Η Boc ομάδα είναι από τις πιο σημαντικές στην πεπτιδική σύνθεση. 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-βουτυλεστέρες του διπτανθρακικού οξέος (BOC_2O). 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.

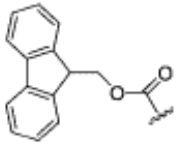
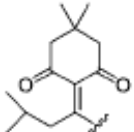

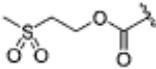
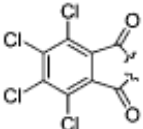
removal of the Boc group in acid




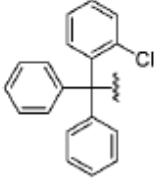
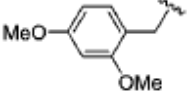
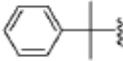
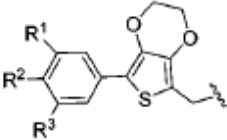
Σχήμα 3 : Μηχανισμός απομάκρυνσης της BOC ομάδας σε όξινες συνθήκες.

Σε γενικές αρχές μια αμινομάδα μπορεί να προστατευτεί αντιστρεπτά με ακυλίωση, αλκυλίωση και αλκυλο-ακυλίωση. Μερικές εκατοντάδες έχουν αναφερθεί και εξελιχθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Ταξινόμηση μπορεί να γίνει με βάση τις συνθήκες αποπροστασίας: όξινη υδρόλυση, βασική, οξειδωση/αναγωγή, πυρηνόφιλη προσθήκη και φωτόλυση.

Πίνακας 2: Προστατευτικές ομάδες που αποπροστατεύονται με βασικές συνθήκες.¹²

Name and Structure	Removal conditions	Stability to the removal of
<p>9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)</p> 	<p>1) 20% piperidine-DMF 2) 1-5% DBU-DMF (See also α-amino)</p>	<p>Boc, Z,^a Trt Alloc, <i>p</i>NZ^a</p>
<p>1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl (ivDde)</p> 	<p>2% N₂H₄·H₂O-DMF</p>	<p>Boc, Fmoc, Z,^a Trt, Alloc</p>
<p>Trifluoroacetyl (tfa)</p> 	<p>1) 0.2N NaOH_(aq) 2) 1 M piperidine_(aq) 3) NaBH₄ in EtOH</p>	<p>Boc, Z,^a Trt, Alloc</p>
<p>2-(Methylsulfonyl)ethoxycarbonyl (Msc)</p> 	<p>1) 0.025-0.5 M Ba(OH)₂ 2) 4N NaOH_(aq)-dioxane-MeOH (0.25:7.5:0.25)</p>	<p>Boc, Z,^b Trt, Alloc</p>
<p>Tetrachlorophthaloyl (TCP)</p> 	<p>Ethylenediamine-DMF (1:200), 1 h, 40°C</p>	<p>Boc, Fmoc, Trt, Alloc</p>

Πίνακας 3: Προστατευτικές ομάδες καρβοξυλικού οξέος που αποπροστατεύονται με όξινες συνθήκες.¹²

Name and Structure	Removal conditions	Stability to the removal of
<p><i>tert-Butyl</i> (<i>t</i>Bu)</p> 	90% TFA-DCM (solid phase and solution) or 4 M HCl in dioxane (solution)	Fmoc, Z, ³ Trt Alloc, <i>p</i> NZ,
<p><i>2-Chlorotrityl</i> (<i>2-Cl-Trt</i>)</p> 	1% TFA-DCM	Fmoc, Alloc
<p><i>2,4-Dimethoxybenzyl</i> (<i>Dmb</i>)</p> 	1% TFA-DCM	Fmoc, Alloc
<p><i>2-Phenylisopropyl</i> (<i>2-Ph¹Pr</i>)</p> 	4% TFA-DCM	Fmoc, Alloc
<p><i>5-Phenyl-3,4-ethylenedioxythienyl</i> (<i>Phenyl-EDOTn</i>)</p>  <p>R¹=R²=R³= OMe; R¹=R²= OMe, R³= H; R¹=R²= H, R³= OMe or R¹=R²=R³= H.</p>	0.01%-0.5% TFA-DCM and scavengers	Fmoc

1.5.2 Προστασία καρβοξυλίου.

Η συνηθέστερη προστασία της καρβοξυλομάδας του ασπαρτικού και του γλουταμικού οξέος είναι η βενζυλική. Η προστασία γίνεται τοποεκλεκτικά ως προς το καρβοξύλιο του αμινοξέος με βενζυλική αλκοόλη και θειικό οξύ σε μεγάλες αποδόσεις. Οι περισσότερες προστασίες είναι εστερικού τύπου με διάφορες ανθεκτικότητες σε οξέα και βάσεις.

- **Μέθυλ, αίθυλ εστέρες .**

Η γενική διαδικασία για να αφαιρεθούν οι μεθυλικοί ή αιθυλικοί εστέρες είναι να προστεθεί ένα διάλυμα υδροξειδίου του λιθίου, του νάτριου, ή υδροξειδίου του καλίου σε έναν οργανικό διαλύτη για μια 1 h ή με ενζυματική υδρόλυση.




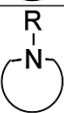
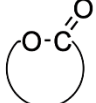
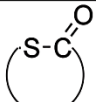
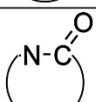

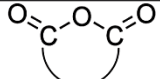
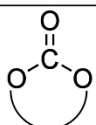
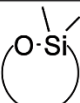
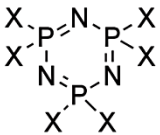
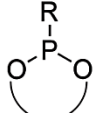
1.6 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)^{13,14}

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

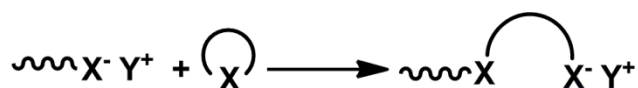
Στα περισσότερα είδη πολυμερισμού, η κινητήρια δύναμη για να προαχθεί ο πολυμερισμός είναι η μετατροπή ενός πολλαπλού δεσμού σε απλό. Αντιθέτως, στον ROP κινητήρια δύναμη αποτελεί η αυξημένη τάση διάνοιξης δακτυλίου (ring strain) του μονομερούς και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να την συνοδεύουν. 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 ετεροατόμο στο δακτύλιο τους, όπως O, S ή N, και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διάφορες οικογένειες ανάλογα με τις χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες που φέρουν. Επιπλέον, ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο διαδίδεται ο πολυμερισμός ROP σε κάθε τύπο μονομερών, διακρίνονται τέσσερα είδη: ο ριζικός ROP (RROP), ο ανιοντικός ROP (AROP), ο κατιοντικός ROP (CROP) και ο πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου (ROMP). Ειδικότερα, οι κυριότερες ομάδες κυκλικών μονομερών, το μέγεθος του δακτυλίου τους καθώς και το είδος του μηχανισμού με τον οποίο προάγεται ο ROP σε κάθε περίπτωση συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4: 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
Phosponite		3,5–7	Anionic

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



Σχήμα 4: : Ανιοντικός μηχανισμός ROP

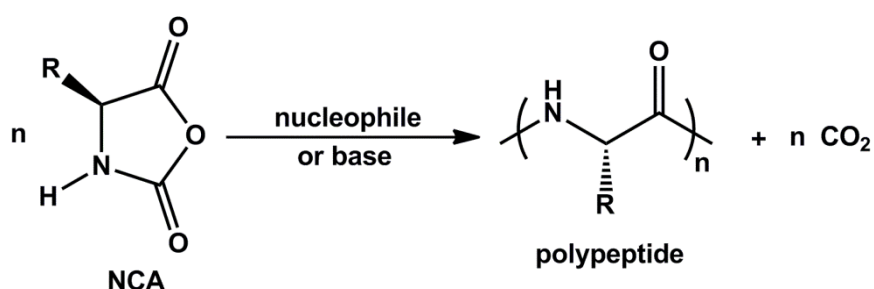
Τα κυριότερα μονομερή που πολυμερίζονται μέσω AROP είναι το αιθυλενοξειδίο, το προπυλενοξειδίο, το λακτίδιο και η εξαμεθυλ(κυκλοτρισιλοξάνη) (D3), από την οποία προκύπτει το γνωστό PDMS, ενώ οι σημαντικότεροι απαρχητές που χρησιμοποιούνται για την έναρξη του πολυμερισμού είναι οργανομεταλλικές ενώσεις των αλκαλίων (Li, Na, K) και διάφορες αμίνες.

1.7 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N - καρβοξυανυδριτών (NCA's) των α -αμινοξέων^{15,16,17}

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

Ο πολυμερισμός των NCAs μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο αριθμό απαρχητών, περιλαμβάνοντας βάσεις όπως αμίνες, αλκοξειδία, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα, αλλά μπορεί επίσης να εκκινήσει με θέρμανση. Μέχρι σήμερα, έχει χρησιμοποιηθεί ένα μεγάλο εύρος μονομερών (και

παραγώγων τους) για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων, ανάλογα με τις επιθυμητές ιδιότητες που επιλέγονται για τα τελικά πολυμερή. Η αντίδραση συνοδεύεται από την παραγωγή αερίου 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 την σύνθεση πολυπεπτιδίων δίνεται στο ακόλουθο σχήμα



Σχήμα 5 : Γενική αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs

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

Για να χαρακτηριστεί τώρα ένας πολυμερισμός «ζωντανός», πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια:

- Να γίνεται πλήρης μετατροπή του μονομερούς σε πολυμερές. Μετά το πέρας του πολυμερισμού όλη η ποσότητα του μονομερούς πρέπει να έχει καταναλωθεί δηλαδή η απόδοση να είναι 100%.
- Να υπάρχει γραμμική εξάρτηση του μέσου μοριακού βάρους M_n με την πάροδο του χρόνου. Για να γίνει αυτό, πρέπει να μην υπάρχουν

παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και ο πολυμερισμός να προχωρά ομαλά και σταδιακά.

- Το τελικό μοριακό βάρος M_n να είναι ελεγχόμενο και να καθορίζεται από την στοιχειομετρία της αντίδρασης. Το μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό των πολυμερών προκαθορίζεται με ακρίβεια από τις ποσότητες του μονομερούς και του απαρχητή, σύμφωνα με την σχέση:

$$\overline{M}_n = \frac{g_{\text{μονομερούς}}}{\text{moles}_{\text{απαρχητή}}}$$

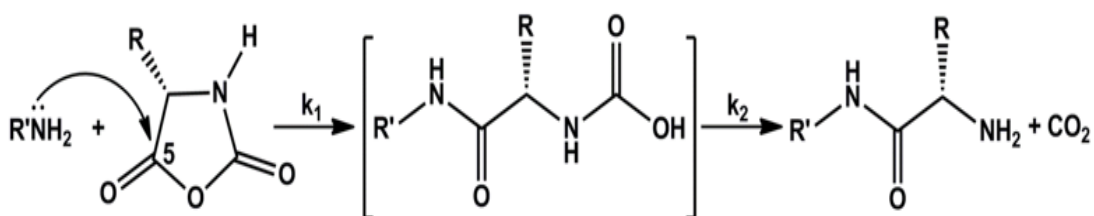
- Να είναι εφικτή η σύνθεση συμπολυμερών κατά συστάδες με διαδοχική προσθήκη μονομερών. Δηλαδή όλες οι αλυσίδες να παραμένουν ενεργές μετά το πέρας του πολυμερισμού του πρώτου μονομερούς και ταυτόχρονα το δεύτερο μονομερές να είναι τόσο καθαρό ώστε να μην περιέχει προσμίξεις που μπορούν να προκαλέσουν τερματισμό. Αν ο πολυμερισμός είναι «ζωντανός» και η ταχύτητα έναρξης πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάδοσης, τότε είναι η δυνατή η παρασκευή πολυμερών με μικρή κατανομή μοριακών βαρών ($I=M_w/M_n < 1,1$).

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

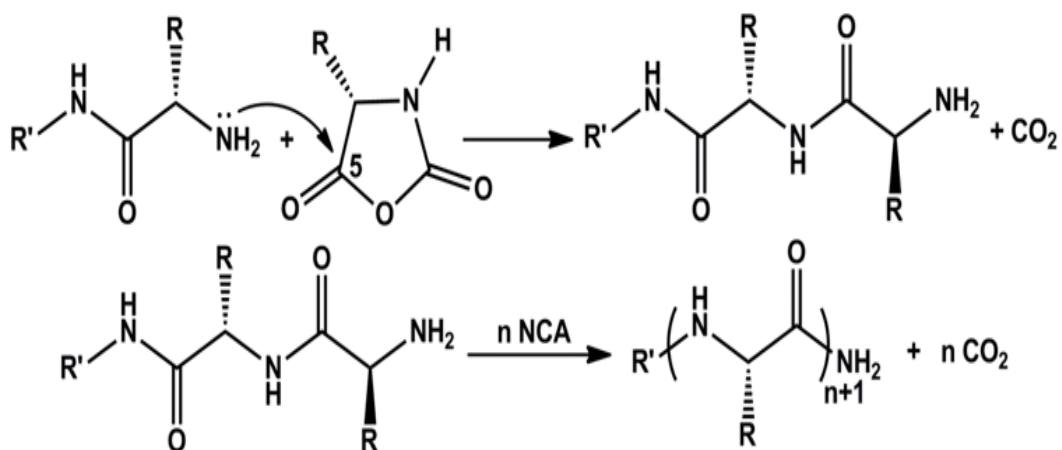
- **Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)**

Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται γενικά για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση μη ιοντικών απαρχητών που διαθέτουν τουλάχιστον ένα άτομο υδρογόνου, το οποίο μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα (του τύπου βάση-H), όπως είναι οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες (π.χ. η-εξυλαμίνη, διμεθυλαμίνη), οι αλκοόλες και το νερό. Οι απαρχητές αυτοί δρουν ως ισχυρότερα πυρηνόφιλα παρά βάσεις, με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται κατάλοιπα τους στις τελικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Τα στάδια της έναρξης και της διάδοσης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού δείχνονται στο Σχήμα 6.

Στάδιο Έναρξης:



Στάδιο Διάδοσης:



Σχήμα 6 : Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM)

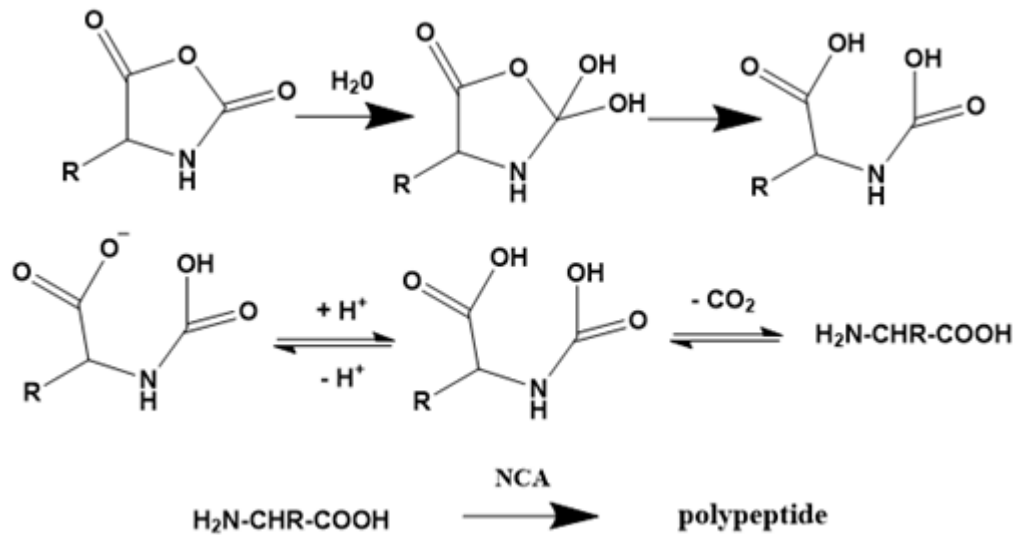
Όπως φαίνεται, κατά το στάδιο της έναρξης ο πυρηνόφιλος απαρχητής προσβάλλει το καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Το ενδιάμεσο καρβαμιδικό οξύ που παράγεται είναι θερμοδυναμικά ασταθές και συνεπώς

αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια ελεύθερη αμινομάδα, η οποία είναι ικανή να προάγει τον πολυμερισμό. Στο στάδιο της διάδοσης η τελική αμινομάδα λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο, προσβάλλοντας το καρβονύλιο της θέσης 5' ενός δεύτερου μορίου NCA και η πορεία συνεχίζεται μέχρι πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς. Οι πρωτοταγείς αμίνες δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα, λαμβάνοντας υπόψη τη συμφωνία μεταξύ των πειραματικά παρατηρούμενων μοριακών βαρών και αυτών που αναμένονται θεωρητικά. Δεδομένου ότι οι πρωτοταγείς αμίνες είναι περισσότερο πυρηνόφιλες από τις ακραίες αμινομάδες που βρίσκονται στις αναπτυσσόμενες αλυσίδες, ο ρυθμός έναρξης είναι πολύ μεγαλύτερος από το ρυθμό διάδοσης. Αυτό αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του «ζωντανού πολυμερισμού», και συνεπώς οι κατανομές των πολυπεπτιδίων που λαμβάνονται είναι ιδιαίτερα στενές.

Βέβαια, εκτός της προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 5' κατά το στάδιο της έναρξης, μπορεί να πραγματοποιηθεί παράπλευρη αντίδραση με προσβολή στη θέση 2', προς σχηματισμό ενός ακραίου ουρείδο οξέος (Σχήμα 8). Με αυτό τον τρόπο επέρχεται πρόωρος τερματισμός του πολυμερισμού καθώς η αμίνη δεν μπορεί να αναγεννηθεί. Η πιθανότητα πραγματοποίησης της αντίδρασης τερματισμού μειώνεται όσο ισχυρότερο πυρηνόφιλο είναι ο απαρχητής που θα χρησιμοποιηθεί. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν αποκλίσεις από τον «ζωντανό» χαρακτήρα του ROP είναι η ισορροπία μεταξύ καρβαμιδικού οξέος και CO₂, η επιλογή διαλύτη, η θερμοκρασία της αντίδρασης και η ύπαρξη υγρασίας ή άλλων προσμίξεων (υδρόλυση του μονομερούς).



Σχήμα 7 : Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή

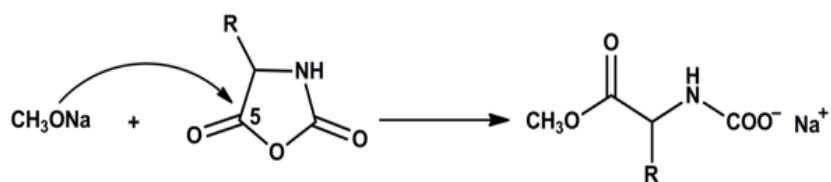


Σχήμα 8 : Υδρολυτικοί μηχανισμοί των NCAs παρουσία υγρασίας

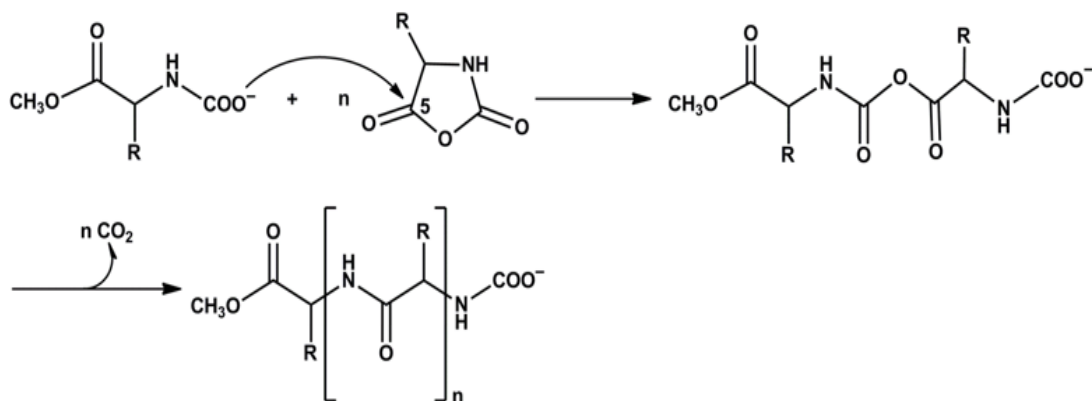
- **Μηχανισμός του Blout**

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.²² Κατά το στάδιο της έναρξης, το μεθοξείδιο του νατρίου προβάλλει πυρηνόφιλα τον C(5) του N-καρβοξυανυδρίτη προκαλώντας διάνοιξη δακτυλίου. Στο στάδιο έναρξης του πολυμερισμού δεν λαμβάνει χώρα παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα. Η διάνοιξη του δακτυλίου επέρχεται προς σχηματισμό του καρβαμιδικού ανιόντος, το οποίο είναι υπεύθυνο για την διάδοση του πολυμερισμού. Η αλυσίδα αναπτύσσεται με την προσθήκη του καρβαμιδικού ανιόντος σε ένα νέο μόριο ανυδρίτη, προς σχηματισμό ενός ενδιάμεσου καρβαμικού-καρβόξυλο μικτού ανυδρίτη. Εν συνεχεία, απελευθερώνεται CO₂ προς σχηματισμό ενός νέου καρβαμιδικού ανιόντος (Σχήμα 9). Επειδή όμως τα ενεργά καρβαμιδικά άκρα είναι ασθενέστερα πυρηνόφιλα σε σχέση με τα αντίστοιχα αμινο-τελικά, ο μηχανισμός αυτός είναι λιγότερο πιθανός.

Στάδιο Έναρξης:

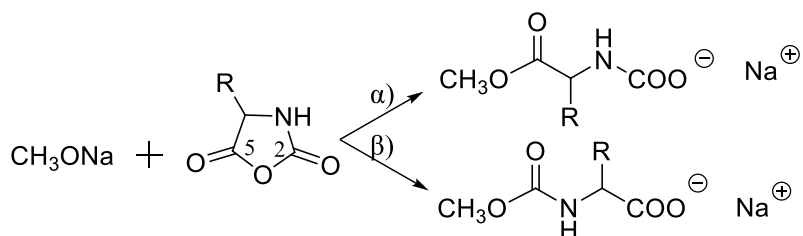


Στάδιο Διάδοσης:



Σχήμα 9 : 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 μεθοξειδίο του νατρίου, προχωρά μέσω του "μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς".

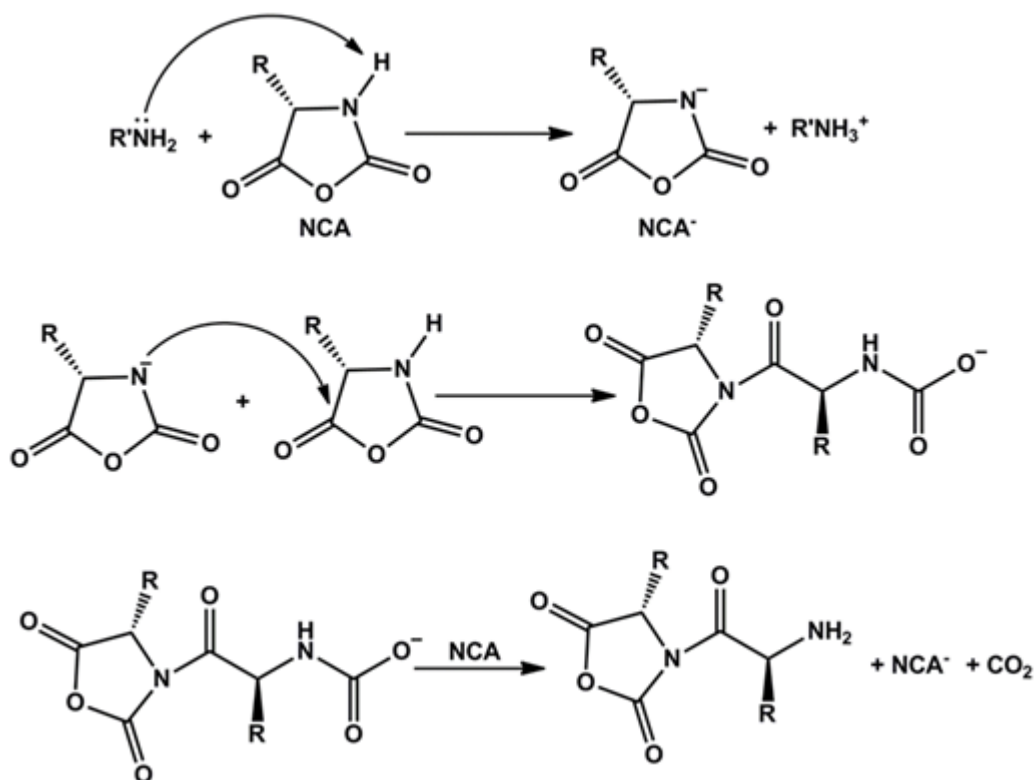


Σχήμα 10 : α) Προσβολή στον C(5), β) προσβολή στον C(2).

- **Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM)**

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

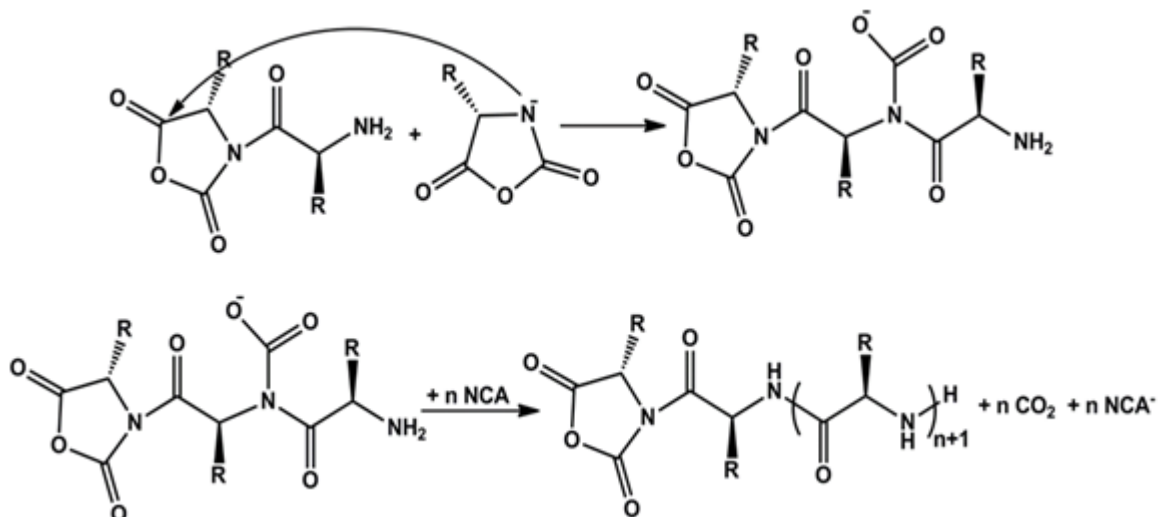
Επειδή ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM) διαδίδεται μέσω ανιόντων, έχει αποδειχθεί ότι είναι ταχύτερος από τον αντίστοιχο κανονικό μηχανισμό αμινών (NAM) και τα πολυπεπτίδια που παράγονται έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Επιπλέον, όμως, τα πολυμερή που συντίθενται μέσω αυτού του μηχανισμού έχουν μεγαλύτερη κατανομή μοριακών βαρών, λόγω του ότι το ανιόν NCA^- δεν έχει εκλεκτικότητα και μπορεί να αντιδράσει τόσο με την μακρομοριακή αλυσίδα όσο και με ένα νέο μονομερές, δίνοντας έτσι προϊόντα με μεγάλη ανομοιογένεια. Τα στάδια της ενεργοποίησης του μονομερούς και της έναρξης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού δείχνονται στο Σχήμα 12.



Σχήμα 11: Στάδια ενεργοποίησης και έναρξης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)

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

Κατά το στάδιο της διάδοσης το διμερές που σχηματίστηκε προσβάλλεται από ένα άλλο ανιόν NCA^- για να δώσει ένα τριμερές, κ.ο.κ., με τον NCA^- να αναγεννάται σε κάθε βήμα της αντίδρασης (Σχήμα 11). Όπως γίνεται αντιληπτό ο AMM δεν περιλαμβάνει ενσωμάτωση τμήματος του απαρχητή στην τελική αλυσίδα.



Σχήμα 12:Στάδιο διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)

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

1.8 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση πρωτοταγών αμινών ως απαρχητών και τεχνικών υψηλού κενού¹⁸

Ο πρώτος «ζωντανός πολυμερισμός» των NCAs πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα των Ιατρού και Χατζηχρηστίδη, χρησιμοποιώντας πρωτοταγείς αμίνες ως απαρχητές ROP και τεχνικές υψηλού κενού (HVT). Η αναγκαιότητα αυτών των τεχνικών οφείλεται στην ευαισθησία των απαρχητών και των μακροανιόντων που δημιουργούνται, στα ίχνη του νερού, του διοξειδίου του άνθρακα, του οξυγόνου και άλλων δραστικών προσμίξεων. Η χρήση αυτών των τεχνικών είναι επίσης αποτελεσματική σε περιπτώσεις που η διάρκεια της αντίδρασης είναι αρκετά μεγάλη.

Η τεχνική του υψηλού κενού, αντιμετωπίζει επαρκώς όλες εκείνες τις αδυναμίες του μηχανισμού NAM που προαναφέρθηκαν. Οι περιορισμοί του NAM έγκεινται κυρίως στην ευαισθησία του σε προσμίξεις, όπως τα υδροχλωρικά άλατα και ακυλοχλωρίδια που προέρχονται από τη σύνθεση των NCAs, που οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού, όπως επίσης και στην ύπαρξη άλλων ειδών που μπορούν δυνητικά να εκκινήσουν τον πολυμερισμό (νερό και άλλες αμίνες), δίνοντας έτσι πολυμερικά υλικά με μεγάλες κατανομές μοριακών βαρών. Συνεπώς, ο ενδεδειγμένος καθαρισμός των μονομερών κρίνεται απαραίτητος και είναι δυνατό να επιτευχθεί τηρώντας αυστηρά τα πρωτόκολλα καθαρισμού για όλα τα επιμέρους αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεσή τους. Οι περισσότεροι NCAs βρίσκονται σε στερεή μορφή και απαιτούν προσεκτικές επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις υπό κενό για τον καθαρισμό τους, οι οποίες πρέπει να προηγούνται του πολυμερισμού. Μετά το πέρας της αντίδρασης, σύμφωνα με τα παραπάνω, κρίνεται αναγκαία η ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου υδροχλωρίου αλλά και του τριφωσγενίου, που δεν αντέδρασε με το πρόδρομο αμινοξύ, γεγονός που επιτυγχάνεται με τη χρήση του υψηλού κενού.

Επιπλέον, με την χρήση υψηλού κενού επιτυγχάνεται η συνεχής απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂, οδηγώντας την αντίδραση του πολυμερισμού προς τα προϊόντα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιαμέσου. Λόγω της μικρής διαλυτότητας του διοξειδίου του άνθρακα σε διαλύτες όπως το DMF, η αποκαρβοξυλίωση του καρβαμιδικού οξέος δεν συμβαίνει ακαριαία, με αποτέλεσμα ορισμένα ενεργά κέντρα να παραμένουν όπως είναι και άλλα να δημιουργούν άλατα με τις ενεργές αμινομάδες. Και στις δυο περιπτώσεις οι δομές που δημιουργούνται είναι απενεργοποιημένες, και οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού και σε μη ολοκληρωμένο πολυμερισμό. Με την χρήση ειδικών αντιδραστήρων πολυμερισμού, με όγκο τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερο από το εκλούμενο διοξείδιο του άνθρακα, αποφεύγεται ο σχηματισμός καρβαμιδικών αλάτων με τα αμινοτελικά άκρα της πολυεπιπιδικής αλυσίδας, λόγω της γρηγορότερης αποκαρβοξυλίωσης που συμβαίνει στο σύστημα.

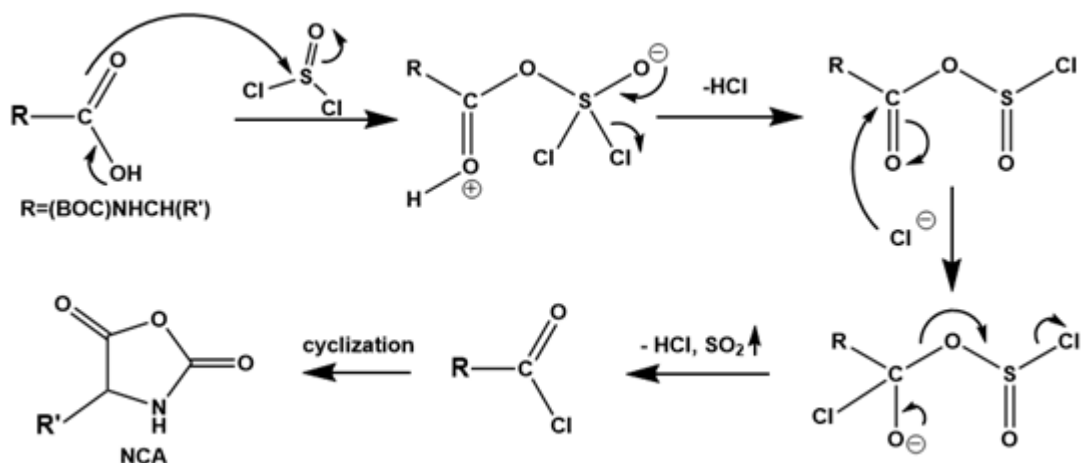
Η τεχνική αυτή είναι γενική και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον πολυμερισμό υποκατεστημένων όσο και μη υποκατεστημένων μονομερών. Με χρήση πρωτοταγών αμινών ευνοείται αποκλειστικά ο κανονικός μηχανισμός αμινών, ενώ τα προϊόντα έχουν μεγάλη συνθετική ομοιογένεια και υψηλές αποδόσεις. Επίσης μέσω αυτής της τεχνικής μπορούν να συντεθούν πολυπεπτιδικά πολυμερή από μία πληθώρα μονομερών που διαθέτουν πολύπλοκη μακρομοριακή αρχιτεκτονική (συμπολυμερή, αστεροειδή αλλά και υβριδικά πολυπεπτίδια). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η παρούσα πειραματική μελέτη βασίστηκε πάνω στην τεχνική του υψηλού κενού και στην εφαρμογή της στο πεδίο των πολυπεπτιδίων. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί επίσης και ορισμένες πιο πρόσφατες αλλά λιγότερο διαδεδομένες μεθοδολογίες για τη σύνθεση πολυπεπτιδικών δομών, όπως ο πολυμερισμός με χρήση τριμεθυλοπυριτικών αμινών ή με χρήση υδροχλωρικών αλάτων πρωτοταγών αμινοτελικών μακροαπαρχητών (μέθοδος Schlaad), που ουσιαστικά αποτελούν παραλλαγές των μηχανισμών που αναλύθηκαν.

1.9 Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α -Αμινοξέων (NCAs)^{10,19}

Οι N-καρβοξυ ανυδρίτες των α -αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Leuchs, το 1906. Επίσης ο Leuchs παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και κατάφερε να απομονώσει το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος, περιλαμβάνει την αντίδραση κυκλοποίησης των προστατευμένων N-αλκοξυκαρβονυλοαμινοαλογονιδίων, υπό παρατεταμένη θερμοκρασία 70-90 °C (Σχήμα 14). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες μπορεί να πραγματοποιηθεί αποσύνθεση των NCAs και διάνοιξη του δακτυλίου.¹⁹

Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια, με τα οποία θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η δημιουργία του αλογονιδίου οξέος. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο (SOCl₂) από τον ίδιο τον Leuchs. Εν συνεχεία, δοκιμάστηκε το πενταχλωρίδιο του φωσφόρου, που

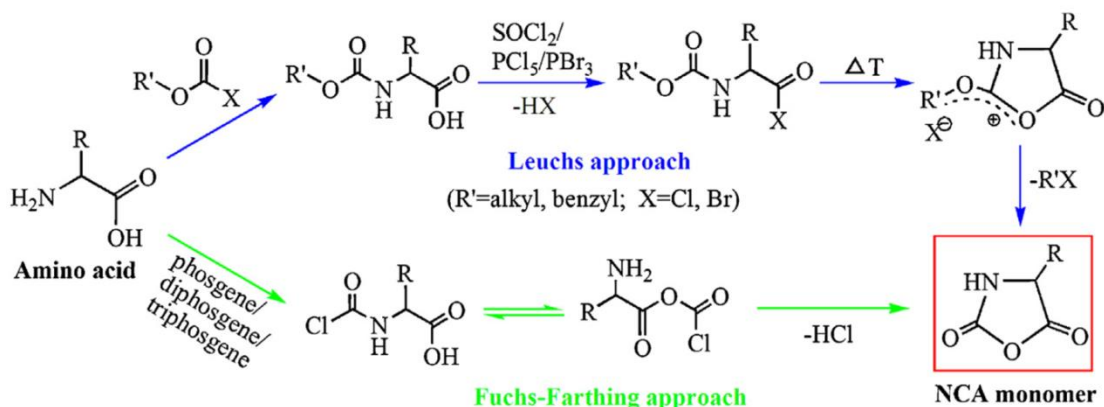
ήταν δραστικότερο αλλά έδινε ως παραπροϊόν το αντίστοιχο οξείδιο και είχε επίδραση στην κρυστάλλωση του ανυδρίτη, ενώ το ισχυρότερο μέσω αλογόνωσης της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το τριβρωμίδιο του φωσφόρου (PBr₃). Επιπλέον, στην τελευταία περίπτωση το ανιόν του βρωμίου είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το αντίστοιχο του χλωρίου στο στάδιο της κυκλοποίησης, αλλά και καλύτερο πυρηνόφιλο για το τελικό στάδιο. Συνεπώς η συνολική αντίδραση προχωράει γρηγορότερα και σε θερμοκρασίες μικρότερες από 25 °C. Όσον αφορά τον υποκαταστάτη R', ο Leuchs είχε παρατηρήσει ότι τα μεθόξυ- αντιδρούσαν πιο εύκολα από τα αντίστοιχα αιθοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων, αποδεικνύοντας ότι το καθοριστικό (αργό) στάδιο της αντίδρασης είναι η αλκυλίωση του ιόντος αλογόνου.



Σχήμα 13 : Μηχανισμός σύνθεσης NCA με χρήση SO₂ (μέθοδος Leuchs)

Ωστόσο, η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την προετοιμασία των NCAs, είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο (ή τριφωσγένιο)²⁰. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον Fuchs για την παρασκευή του NCA της Ν-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 Ν-

χλωροφόρμυλο αμινοξύ (συνήθως δεν απομονώνεται), το οποίο ακολούθως μετατρέπεται σε N-καρβοξυ ανυδρίτη, ενώ πραγματοποιείται και ταυτόχρονη παραγωγή HCl (Σχήμα 15). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται διότι οι ανυδρίτες είναι διαλυτοί στους περισσότερους απρωτικούς πολικούς διαλύτες, ενώ τα ελεύθερα αμινοξέα είναι αδιάλυτα. Καθοριστικό ρόλο στην αντίδραση διαδραματίζουν ο διαλύτης, η θερμοκρασία αλλά και ο χρόνος της αντίδρασης.

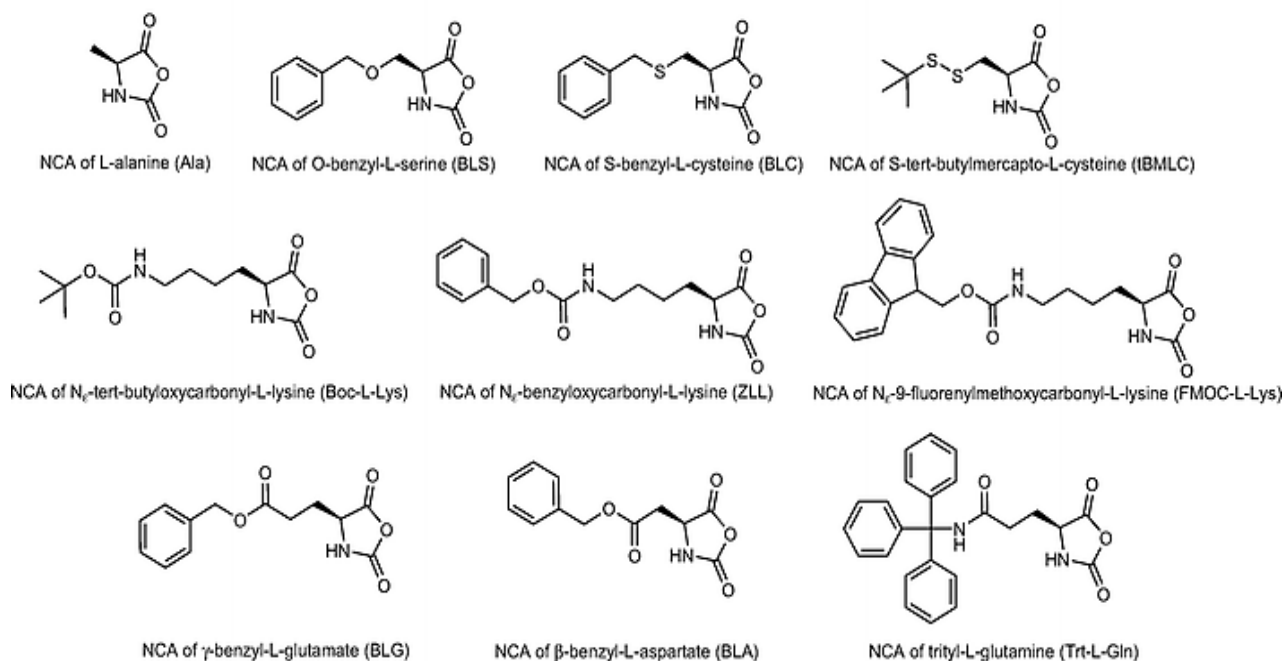


Σχήμα 14: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών

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

Οι παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη σύνθεση ενός NCA περιλαμβάνουν κυρίως την διάνοιξη του δακτυλίου του τελικού προϊόντος και

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



Εικόνα 3 : Χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά

1.10 Παραλλαγές στην μέθοδο Fuchs-Farthing.

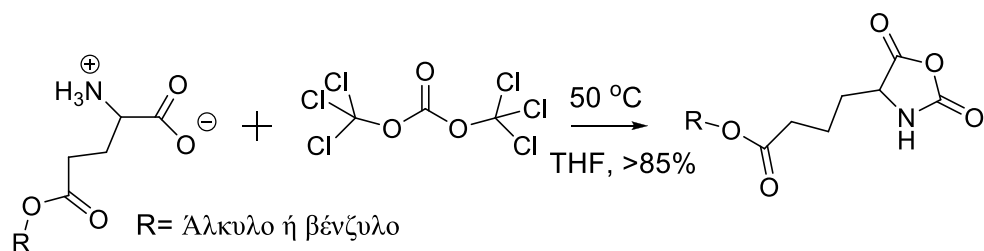
Το φωσγένιο είναι ένα υψηλής δραστηριότητας αντιδραστήριο που έχει χρησιμοποιηθεί από τις πρώιμες μέρες της χημικής βιομηχανίας[73], αλλά και ως όπλο κατά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο. Εξαιτίας της υψηλής τοξικής του φύσης, η μεταχείρισή του, ακόμα και σε μικρή εργαστηριακή κλίμακα χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Επιπλέον είναι δύσκολο, λόγω της αέριας φύσης του, να τηρηθεί η στοιχειομετρία στις αντιδράσεις που συμμετέχει. Ολιγομερή του φωσγενίου έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις φωσγενίωσης ώστε να παράγουν *in situ* το τοξικό αέριο. Το τριχλωρομέθυλο χλωροφορμικό ή αλλιώς διφωσγένιο και το δις(τριχλωρομέθυλο)-ανθρακικό ή τριφωσγένιο(BTC) έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί στην οργανική σύνθεση ως πηγές φωσγενίου. Το διφωσγένιο και το τριφωσγένιο είναι υγρά και κρυσταλλικό στερεό αντίστοιχα, γεγονός που επιτρέπει την πρακτικότερη και ασφαλέστερη χρησιμοποίησή τους, ως πρόδρομα δυο και τριών μορίων φωσγενίου. Στην σύνθεση των NCAs έχουν χρησιμοποιηθεί και τα δυο αλλά το τριφωσγένιο έχει επικρατήσει.

Το τριφωσγένιο συντέθηκε πρώτη φορά από τον Councier το 1880, ενώ η δομή του έγινε γνωστή μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών X το 1971. Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχει βρει μεγάλη αναγνώριση παρά το γεγονός ότι ήταν γνωστό για πάνω από έναν αιώνα.

Ο Eckert το 1987 πρότεινε μια κυκλική πορεία για τις πυρηνόφιλες αντιδράσεις του BTC. Σύμφωνα με το σχήμα 2.14 1/3 του BTC αντιδρά με 1/3 από το πυρηνόφιλο προς σχηματισμό 1/3 mole φωσγενίου. Στο επόμενο βήμα ένα δεύτερο και ένα τρίτο mole φωσγενίου δημιουργούνται, όπου αντιδρούν με 2/3 του πυρηνόφιλου προς σχηματισμό του τελικού προϊόντος.

Πρώτος που χρησιμοποίησε το BTC στην σύνθεση των NCAs ήταν ο Roche^[76] το 1988 και αποτελεί σήμερα μια από τις πιο δημοφιλείς πορείες. Επιλέχτηκε το τριφωσγένιο διότι ήταν διαλυτό στα διάφορα μέσα που

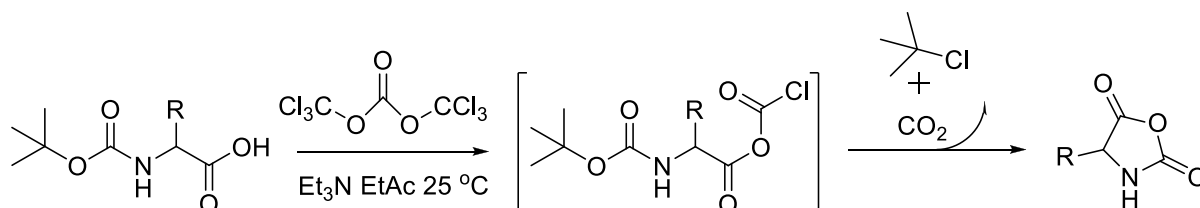
μετέχουν στην σύνθεση (THF) και καθαρισμό (εξάνιο) και έτσι θα ήταν εύκολο να εκδιωχθεί μέσω ανακρυσταλλώσεων του ανυδρίτη. Η πορεία που πρότεινε ο Roche ήταν ιδιαίτερα αποδοτική για NCAs με μακριές αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες και προστασίες που δεν είναι ευαίσθητες σε όξινα περιβάλλοντα όπως η άλκυλο και βενζυλοξυκαρβόνυλο(Bz). Σε μια τυπική πορεία(σχήμα 15) αντιδρά 1/3 τριφωσγενίου σε αιώρημα του αμινοξέος σε THF(10g για κάθε 100ml) στους 40-50 βαθμούς μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές(το αμινοξύ αδιάλυτο σε THF ενώ ο ανυδρίτης όχι). Η αντίδραση αυτή είναι αρκετά εκλεκτική όταν ικανοποιούνται οι παραπάνω προϋποθέσεις αλλά για αμινοξέα με μικρότερες πλευρικές ομάδες όπως η αλανίνη και η λευκίνη οι αποδόσεις πέφτουν γύρω στο 50%. Βρίσκει τέλεια εφαρμογή στις περιπτώσεις του γ-βενζυλογλουταμικού, της ο-βενζυλοτυροσίνης, της φαινυλαλανίνης της βαλίνης και σε όλους τους άλκυλοεστέρες του γλουταμικού οξέος.



Σχήμα 15 : Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Roche για αμινοξέα με αλειφατική πλευρική αλυσίδα και προστασίες ανθεκτικές σε όξινο περιβάλλον.

Τρία χρόνια αργότερα ο Mobashery αναφέρει μια τροποποιημένη πορεία όπου ξεκινώντας από το N-BOC αμινοξύ και παρουσία τριαιθυλαμίνης ως δέκτη του υδροχλωρίου καταλήγει σε NCA με ηπιότερες συνθήκες σε ένα στάδιο. Σε ένα τυπικό πείραμα το N-BOC αμινοξύ και το τριφωσγένιο αναδεύονται σε οξικό αιθυλεστέρα(EtAc). Έπειτα προσθήκη τριαιθυλαμίνης στο διάλυμα με ταυτόχρονη καταβύθιση του υδροχλωρικού της άλατος οδηγεί στο σχηματισμό ενδιαμέσου (σχήμα 16). Η αντίδραση μπορεί να ελεγχθεί από το παραγόμενο CO₂ απλά με ένα συνδεδεμένο μανόμετρο στη φιάλη της αντίδρασης. Η διάρκειά της ποικίλει από δυο ως είκοσι ώρες ανάλογα με την φύση του αμινοξέος. Ο οξικός αιθυλεστέρας επιλέχτηκε καθώς σε αυτόν το

σχηματιζόμενο άλας είναι τελείως αδιάλυτο και μπορεί να διαχωριστεί με απλή διήθηση ποσοτικά.



Σχήμα 16: Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Mobashery, η μέθοδος είναι γενική και εφαρμόζεται και σε αμινοξέα με ευαίσθητες προστασίες σε οξέα.

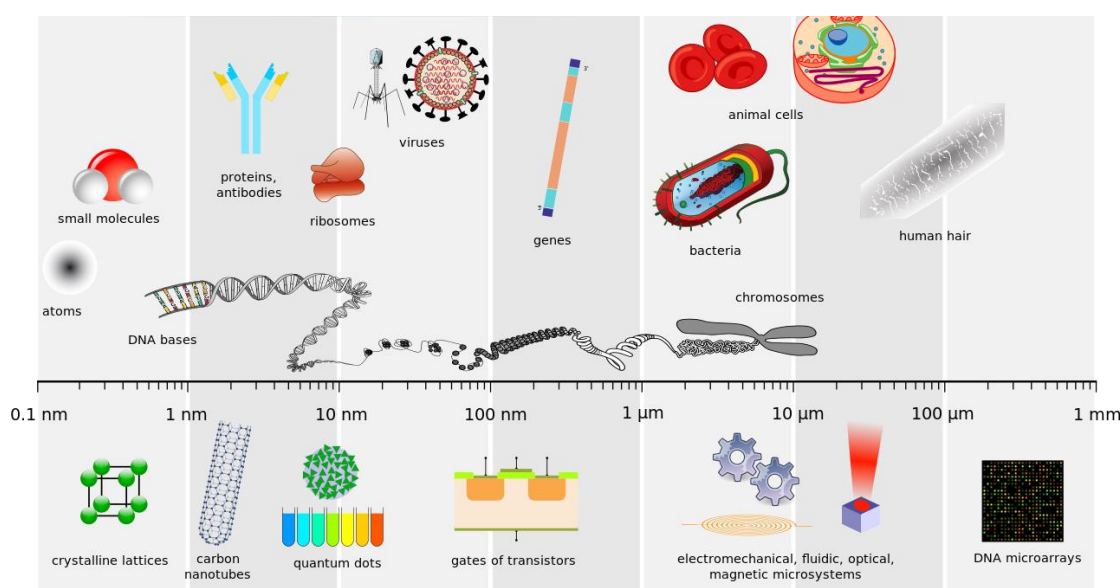
Κλειδί στην αντίδραση αποτελεί ότι η BOC κατά τον σχημασμό του ενδιάμεσου, λειτουργεί ως αποχωρούσα ομάδα και επιτρέπει στην αμινομάδα να προσβάλλει πυρηνόφιλα το καρβονύλιο της χλωροφόρμυλο ομάδας προς ενδομοριακή κυκλοποίηση και σχηματισμό του NCA. Οι αποδόσεις σε αυτή την πορεία είναι χαμηλότερες και προσδίδονται στην χαμηλότερη διαλυτότητα των NCAs στον οξικό αιθυλεστέρα από ότι στο τετραϋδροφουράνιο. Επίσης οι αντιδράσεις διαρκούν περισσότερο και υπάρχει κίνδυνος ύπαρξης του άλατος της τριαιθυλαμίνης στον ανυδρίτη.

1.11 Νανοτεχνολογία και Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων

1.11.1 Νανοτεχνολογία και Εφαρμογές της

Με τον όρο «νανοτεχνολογία» περιγράφεται ο τομέας της επιστήμης που αφορά την ανάπτυξη και χρήση υλικών με τα οποία μπορούν να παρασκευασθούν και να χρησιμοποιηθούν συσκευές και προϊόντα τα οποία να έχουν διαστάσεις της τάξης του δισεκατομμυριοστού του μέτρου (διαστάσεις τάξης μεγέθους μερικών δεκάδων ατόμων), δηλαδή δομές που δεν υπακούουν στους νόμους της Κλασσικής Μηχανικής, αλλά της

Κβαντομηχανικής (Εικόνα 4).^{21,22} Τα νανοσωματίδια και τα νανοϋλικά παρουσιάζουν καινοτόμες ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθός τους. Στην επιστήμη και την τεχνολογία, το πρόθεμα «nano-» (από την ελληνική λέξη νάνος) σημαίνει 10^{-9} (=0.000000001). Ένα νανόμετρο (nm) ισούται με ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου. Στην παρούσα εργασία ο όρος νανοτεχνολογία χρησιμοποιείται ως περιληπτικός όρος, καλύπτοντας τους διάφορους κλάδους νανοεπιστημών που σχετίζονται με την χημεία των πολυμερών.



Εικόνα 4: Χαρακτηριστικά μεγέθη μορίων, νανοϋλικών και βιολογικών οντοτήτων

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

η στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων και η ανακάλυψη νέων καινοτόμων φαρμακευτικών ουσιών.

Η νανοτεχνολογία βρίσκει εφαρμογή σε ένα ευρύ πεδίο επιστημών όπως είναι η ενέργεια, η μικροηλεκτρονική και η μηχανική. Στην παρούσα εργασία θα μελετηθούν οι βιολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές της.³³⁻³⁵ Συγκεκριμένα, οι τομείς της ιατρικής και φαρμακευτικής που μπορεί να βρει εφαρμογή η νανοτεχνολογία είναι οι ακόλουθοι:

- Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων (Drug delivery): Τα οχήματα μεταφοράς φαρμάκων, που το μέγεθος τους βρίσκεται στη νανοκλίμακα, μπορούν: α) να ενισχύσουν τη θεραπευτική ικανότητα ενός φαρμάκου, μειώνοντας τις παρενέργειες, που σχετίζονται με τα ήδη διαθέσιμα φάρμακα, β) να προωθήσουν την επαναδιερεύνηση νέων μοριακών οντοτήτων, που δεν μπορούν να χορηγηθούν απευθείας στον άνθρωπο, λόγω των μη βέλτιστων φαρμακολογικών ιδιοτήτων, που όμως, είναι βιολογικά ενεργές αλλά μέχρι στιγμής θεωρούνται μη αναπτύξιμες.²⁵
- Διαγνωστική: Οι νανο-«αισθητήρες» (όπως νανοσωλήνες άνθρακα ή άλλα νανοσωματίδια), μπορούν να επιτρέψουν τη γρήγορη και αποδοτική ανίχνευση των βιοδεικτών μίας νόσου, με πολύ μεγάλη ευαισθησία και με απαίτηση μικρής ποσότητας δείγματος. Επιπλέον, η νανοτεχνολογία δίνει ελπίδα για την έγκαιρη διάγνωση ιών, βακτηρίων αλλά και καρκινικών κυττάρων.
- Θεραπευτικές τεχνικές: Ορισμένα νανοϋλικά, έχουν μοναδικές θεραπευτικές ιδιότητες, που διαφέρουν από τα συνηθισμένα φάρμακα, όπως τα νανοσωματίδια χρυσού που μπορούν να ενισχύσουν την ακτινοθεραπεία, οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα μαγνητικά νανοσωματίδια που μπορούν να προκαλέσουν υπερθερμία και να καταστρέψουν καρκινικά κύτταρα, ή τα νανοσωματίδια αργύρου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες.
- In vivo απεικόνιση: Η χρήση μορίων-στοχευμένων «διερευνητών», όπως είναι τα μαγνητικά νανοσωματίδια, μπορεί να παρέχει έγκυρο και ακριβή τρόπο διάγνωσης ασθενειών όπως ο καρκίνος καθώς και δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης μίας νόσου.

- Βιοϋλικά: Βιοσυμβατά νανοϋλικά που έχουν πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιατρικά εμφυτεύματα, στην οδοντιατρική ή ως υποκατάστατα οστών και εμφυτεύματα ιστών.

1.11.2 Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων μέσω Πολυμερικών Υλικών

Η τεχνολογία ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών αποτελεί μία από τις ταχύτερα αναπτυσσόμενες επιστημονικές περιοχές, εξαιτίας των πολλαπλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους δόσολογίας. Η μη εκλεκτική κυτταροτοξικότητα που εμφανίζουν τα αντικαρκινικά φάρμακα, που είναι η αιτία για τις σοβαρές παρενέργειες και τη χαμηλή ποιότητα ζωής των ασθενών, είναι αυτή που οδήγησε να στραφούν οι ερευνητές στη δημιουργία «μορίων-οχημάτων», που θα μεταφέρουν μία φαρμακευτική ουσία και θα την απελευθερώνουν στοχευμένα στους πάσχοντες ιστούς και κύτταρα.³⁷

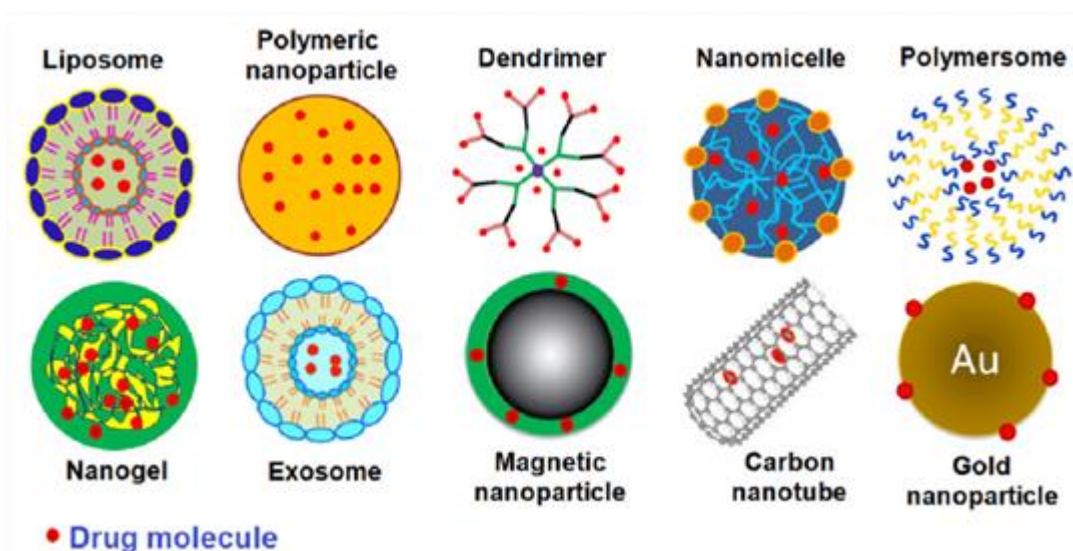
Επιπλέον, όλες οι νέες μοριακές οντότητες που εισάγονται στη φαρμακοβιομηχανία, κρίνονται όχι για την ισχυρή τους δραστηριότητα, που είναι και το ζητούμενο, αλλά για τη διαλυτότητά τους στο νερό ή το χρόνο ζωής τους στο αίμα. Αυτό συμβαίνει διότι όσο μεγάλη κι αν είναι η δραστηριότητα ενός μορίου, είναι πρακτικά άχρηστη όταν αυτό δεν μπορεί να κυκλοφορήσει στο αίμα. Έτσι, λιγότερο δραστικές ουσίες, αλλά με χαρακτηριστικά που να μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό, προτιμούνται για εξέλιξη και περαιτέρω διερεύνηση. Σε κάθε περίπτωση, υπάρχει πάντα ένα επίπεδο συμβιβασμού, που μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή μη ιδανικών φαρμάκων. Έτσι, η ανάγκη να μεταφέρονται στοχευμένα σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς, φαρμακευτικές ουσίες, ξεπερνώντας τα εμπόδια που βάζει ο οργανισμός σε οτιδήποτε ξένο προς τον ίδιο, αποτέλεσε το κίνητρο για την εκτενή έρευνα στο πεδίο που ονομάζεται “drug delivery”. Οι νανοφορείς φαρμάκων μακράς κυκλοφορίας χρησιμοποιούνται για να διατηρήσουν το απαιτούμενο επίπεδο της φαρμακευτικής ουσίας στο αίμα για εκτεταμένα χρονικά διαστήματα με σκοπό την αποτελεσματικότερη δράση του φαρμάκου.^{21,22,23}

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

Η μεταφορά ενός φαρμάκου μέσω ειδικά σχεδιασμένων υπερμοριακών δομών, επιδιώκει να εξασφαλίσει την αύξηση του χρόνου παραμονής του στο αίμα, τη βελτίωση της διαλυτότητας του όταν πρόκειται για υδρόφοβο φάρμακο, τη μείωση της ανοσογονικότητας και τη μεταφορά του σε συγκεκριμένο στόχο. Η κυκλοφορία των δραστικών ουσιών για μακρό χρονικό διάστημα μπορεί να συντελέσει στην καλύτερη στόχευση, εφόσον αυξάνει τη συνολική ποσότητα του φορέα που συναντά το στόχο και τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκου και περιοχής δράσης του. Έτσι ο όρος «drug delivery», περιλαμβάνει το σχεδιασμό και τη σύνθεση μορίων με χημικά χαρακτηριστικά τέτοια που να μπορέσουν να τα φέρουν όσο πιο κοντά στο κύτταρο-στόχο, αλλά και να τα καταστήσουν ικανά να εγκλωβίσουν ένα φάρμακο.^{24,25}

Για τη βελτίωση της εξειδικευμένης αποδέσμευσης των φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί διάφοροι φορείς, όπως τα λιποσώματα, τα ανόργανα νανοσωματίδια, τα νανοσυσσωματώματα και τα πολυμερικά μικκύλια και κυστίδια (Εικόνα 6).⁴³ Πρόσφατα τα πολυμερικά μικκύλια (micelles) αποτέλεσαν το αντικείμενο έντονης ερευνητικής απασχόλησης. Τα μικκύλια είναι δομές της μορφής κορώνα/πυρήνας που συνήθως σχηματίζονται από αμφίφιλα κατά συστάδες πολυμερή και έχουν πάχος μόνο μερικά νανόμετρα, οι οποίες μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο ως “νανομεταφορείς”. Έχουν αναδειχθεί ως δυνητικοί φορείς φαρμακευτικών ουσιών αδιάλυτων στο νερό, εξαιτίας της ικανότητάς τους να εγκλωβίζουν τις ουσίες αυτές στο υδρόφοβο τμήμα τους λόγω χημικής συγγένειας, προστατεύοντας τις με τις εξωτερικές

υδατοδιαλυτές πολυμερικές αλυσίδες που διαθέτουν. Η ενσωμάτωση των φαρμάκων στις μικκυλιακές δομές πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της διαπίδυσης (dialysis), με τη μέθοδο της διαλυτοποίησης–εξάτμισης ή μέσω της μεθόδου σχηματισμού λεπτών υμενίων (thin-film).²⁶

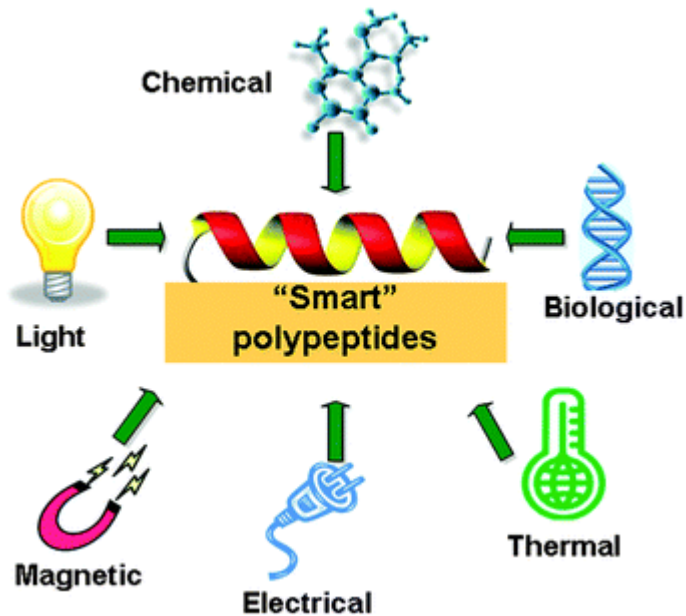


Εικόνα 5: Κυριότεροι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών βασισμένοι σε πολυμερικά υλικά και ανόργανα νανοσωματίδια

Οι μικκυλιακές δομές, ως φορείς φαρμάκων προσφέρουν μερικά πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα. Έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν μη υδατοδιαλυτά φάρμακα, αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα τους και έχουν μικρό σχετικά μέγεθος (έως 200 nm) αποτρέποντας την καταστροφή τους από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι μπορούν να παραμείνουν στο αίμα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα παρέχοντας σταδιακή συσσωμάτωση της δραστικής ουσίας στην επιθυμητή περιοχή. Επιπλέον είναι δυνατό να παρασκευασθούν σε σχετικά μεγάλες ποσότητες εύκολα και επαναλήψιμα. Ωστόσο, η πιο σημαντική εφαρμογή τους είναι η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων χωρίς την εκδήλωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών που μπορεί να εκδηλωθούν στον ανθρώπινο οργανισμό αν αυτά εισαχθούν ελεύθερα στο κυκλοφορικό σύστημα.²⁷

Τα υλικά που δομούνται από πολυπεπτίδια είναι ιδανικά για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, χάρη στη βιοσυμβατότητα και τη βιοαποικοδομησιμότητά 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. Μέχρι στιγμής έχει δημοσιευτεί μία σειρά από νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων που βασίζονται στα πολυπεπτίδια, ενώ ήδη πολλά από αυτά τα συστήματα βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές.^{10,25}

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



Εικόνα 6: Τα κυριότερα εξωτερικά ερεθίσματα που προκαλούν απόκριση στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες

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

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

αλυσίδας με άμεση απόκριση. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την απόκριση των πολυμερών και μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως χημικά είτε ως φυσικά. Τα χημικά ερεθίσματα, όπως το pH και η ιοντική ισχύς, αλλάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων ή μεταξύ των αλυσίδων και του διαλύτη σε μοριακό επίπεδο. Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και η μηχανική τάση, επηρεάζουν τους θερμοδυναμικούς παράγοντες (ενθαλπία και εντροπία) και μεταβάλλουν τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Η μεγάλη ποικιλομορφία των πλευρικών ομάδων των πολυπεπτιδίων, τα καθιστά άριστα πολυμερή που διαθέτουν την ικανότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Για το λόγο αυτό βρίσκουν τεράστια απήχηση σε εφαρμογές που απαιτείται η χρήση «έξυπνων» αποκρίσιμων υλικών, επιλέγοντας αντίστοιχα αμινοξέα που να εξυπηρετούν τις εκάστοτε ανάγκες (Εικόνα 7).

- **pH-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων**

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

pH, ώστε να αποδεσμεύουν σε συγκεκριμένο σημείο του σώματος το φάρμακο που μεταφέρουν.^{27,28}

Τα πολυπεπτίδια που εμφανίζουν ευαισθησία στο pH αποτελούνται από μονομερή των οποίων οι πλευρικές ομάδες μπορούν να ιονιστούν, δηλαδή έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν ή να παρέχουν πρωτόνια σε εξάρτηση με τη μεταβολή του pH. Καθώς το pH αλλάζει, ο βαθμός ιοντισμού του πολυμερούς αλλάζει δραματικά γύρω από μια συγκεκριμένη τιμή pH, που ονομάζεται pKa και δίδεται από τον αρνητικό λογάριθμο της σταθεράς ισορροπίας ασθενούς οξέος ($pK_a = -\log K_a$). 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 οσμωτική πίεση που προκαλούν τα αντισταθμιστικά ιόντα των φορτίων των αλυσίδων.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ένας μεγάλος αριθμός pH-αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών νανοσυστημάτων, τα οποία συντίθενται από πολυμερή που φέρουν ασθενώς όξινες ομάδες (π.χ. καρβοξυλικές) ή ασθενώς βασικές (π.χ. αμινομαδές), και μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως δέκτες είτε ως δότες πρωτονίων (ή ως συνδυασμός των δύο). Οι μεταβολές του pH του περιβάλλοντος προάγουν την πρωτονίωση-αποπρωτονίωση των πολυπεπτιδίων που διαθέτουν αμινομαδές ή καρβοξυλικά οξέα στην πλευρική τους αλυσίδα. Τα πολυπεπτίδια οδηγούνται σε αντιστρεπτές μεταβολές στη διαμόρφωσή τους και στη συμπεριφορά της αυτο-οργάνωσής τους, κατά συνέπεια και της διαλυτότητας και της συσσωμάτωσής τους.

Η πολυ(L-λυσίνη) έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε pH- αποκρίσιμα συστήματα, ενώ εξέχουσα θέση κατέχει η πολυ(L-ιστιδίνη) (PHis), η οποία διαθέτει έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο ανά δομική μονάδα που μπορεί να πρωτονιώνεται και να αποπρωτονιώνεται.²⁸⁻²⁹

1.12 Πολυπεπτιδικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποκρίσιμα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες

Πέρα από τη βιοσυμβατότητα, από τις βασικότερες απαιτήσεις ενός συστήματος μεταφοράς φαρμάκων, είναι η σταθερότητα του συστήματος μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Εάν ένα σύστημα δεν είναι σταθερό στα βιολογικά υγρά, υπάρχει πιθανότητα να οδηγηθεί σε πρόωρη απελευθέρωση του φορτίου του συστήματος (στη 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)^{32,37}

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.

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 (-SH). Τα δύο βασικότερα χαρακτηριστικά αυτού του δεσμού, που τον καθιστούν ελκυστικό για πολλά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, είναι η υψηλή σταθερότητά του στο πλάσμα του αίματος και η αναστρεψιμότητά του. Τα δικτυωμένα συστήματα που φέρουν δισουλφιδικούς δεσμούς, καθίστανται αυτόματα αποκρίσιμα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες (redox-responsiveness), λόγω της ιδιότητας των δεσμών αυτών να οξειδώνονται και να ανάγονται ανάλογα τις συνθήκες που επικρατούν.

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.

- **Θερμο-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων**

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

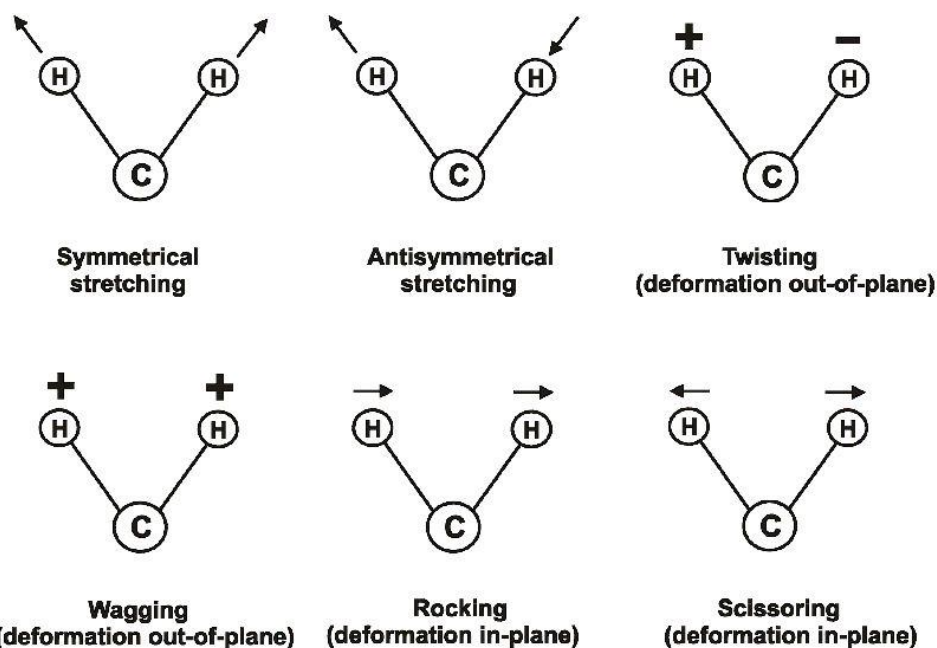
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

Το κεφάλαιο αυτό αναφέρεται στην κατανόηση των βασικών αρχών των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των μακρομορίων και των υπερμοριακών δομών που συντέθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ειδικότερα πρόκειται να αναλυθούν οι τεχνικές της φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC).

2.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου (Infrared Spectroscopy, IR)

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία (IR) θεωρείται σημαντική φασματοσκοπική τεχνική στην Οργανική Χημεία, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Στην περιοχή 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), κ.λπ. (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών ενός μορίου

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

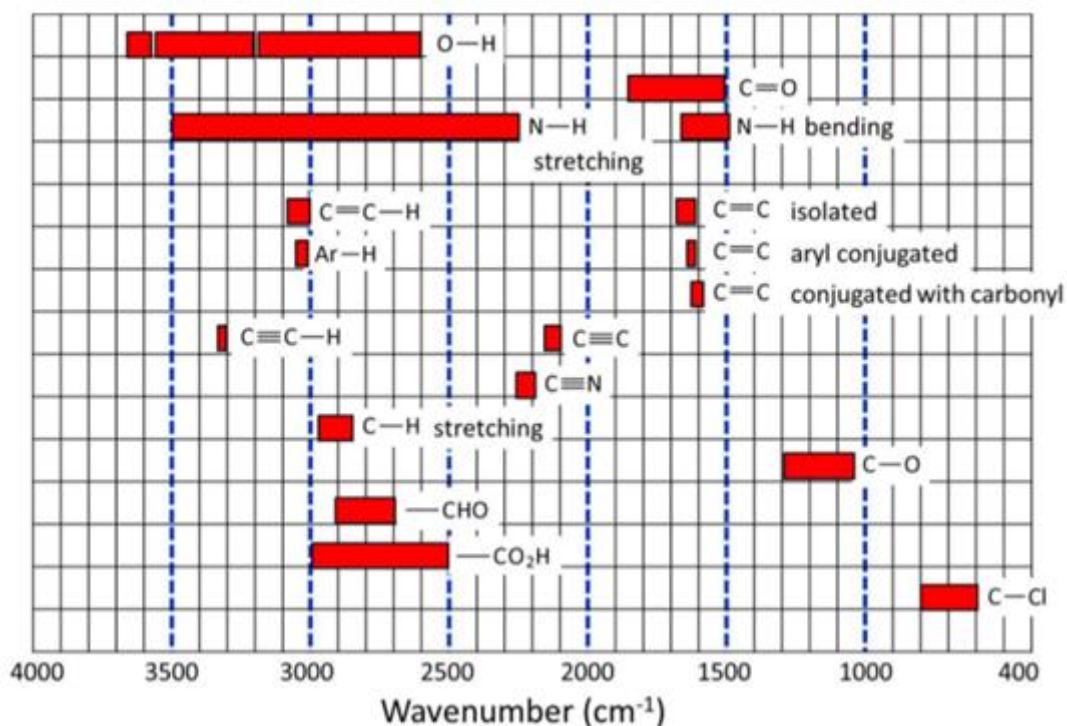
Όταν το μόριο δέχεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφάται ενέργεια μόνο στην περίπτωση που η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίδια με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δύο δονητικών ενεργειακών επιπέδων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίση με εκείνη της ακτινοβολίας, 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 υπέρυθρου. Από την ερμηνεία αυτών των κινήσεων, μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί και κατά συνέπεια ποιες λειτουργικές ομάδες υπάρχουν στην προς μελέτη ένωση. Οι δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων μίας ένωσης είναι ανεξάρτητες της υπόλοιπης δομής και συνήθως εμφανίζονται σε περιοχές του υπέρυθρου φάσματος όπου δεν απορροφούν οι δονήσεις σκελετού.

Πιο συγκεκριμένα, η υπέρυθρη 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 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 5 : Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1}



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

του φάσματος και η ταυτοποίηση της ένωσης με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

2.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)^{42,43}

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χρησιμοποιείται ευρέως σχεδόν σε όλους τους κλάδους της χημείας και είναι η σημαντικότερη 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 H_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 $m_l = -1/2$) 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 (Ηπραγ.=Ηεφαρμ.-Ητοπικό). 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 (δ). Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα είναι η διαφορά μεταξύ της συχνότητας συντονισμού του πυρήνα και μιας πρότυπης ουσίας αναφοράς και μετριέται σε ppm. 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. Η χημική μετατόπιση ορίζεται από τις σχέσεις: $\delta = (H\alpha - H\delta) / H\alpha * 10^6 \text{ ppm}$ $\delta = (v_\alpha - v_\delta) / v_\alpha * 10^6 \text{ ppm}$, όπου $H\alpha$ και $H\delta$ τα πεδία συντονισμού των πυρήνων της ουσίας αναφοράς και δείγματος αντίστοιχα, ενώ v_α και v_δ οι συχνότητες συντονισμού της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα. Όπως ορίζεται το δ στις σχέσεις είναι αδιάστατο και ανεξάρτητο του H_e εφαρμοζόμενο. Από τις ίδιες εξισώσεις φαίνεται ότι όσο πιο θωρακισμένος είναι ένας πυρήνας τόσο ο συντονισμός θα επιτυγχάνεται σε υψηλότερα εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία, όταν σαρώνεται το μαγνητικό πεδίο, αλλά σε χαμηλότερη συχνότητα, όταν μεταβάλλεται η ραδιοσυχνότητα.

Πίνακας 6: 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
	3.3-4.3	Αιθερικά πρωτόνια	RCOOH	10-13*	Καρβοξυλικά οξέα
	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).

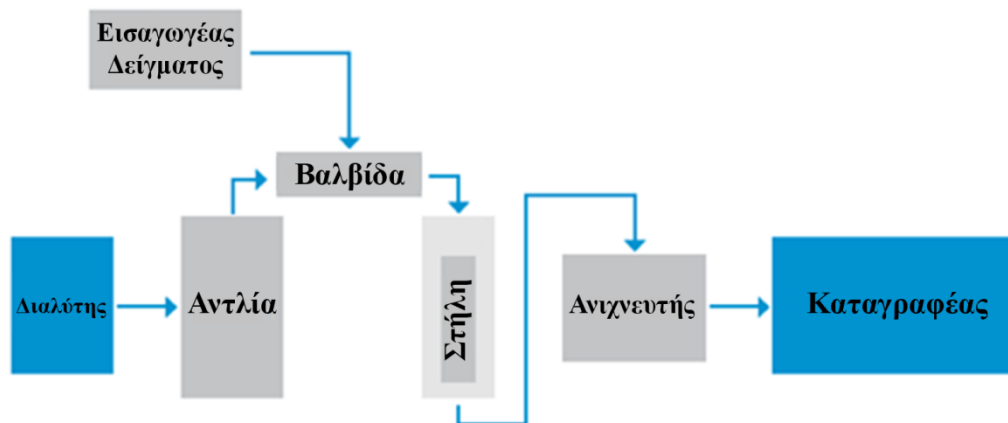
Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν δύο είδη φασματοφωτομέτρων NMR, τα συνεχούς κύματος και τα παλμικά (ή μετασχηματισμού Fourier). Τα φασματοφωτόμετρα συνεχούς κύματος διέπονται από την ίδια αρχή που ισχύει και για τα οπτικά φασματοφωτόμετρα, στα οποία το σήμα απορρόφησης καταγράφεται σαν συνάρτηση 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 $^1\text{H-NMR}$ πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Bruker 400 MHz

2.3 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC)^{44,45}

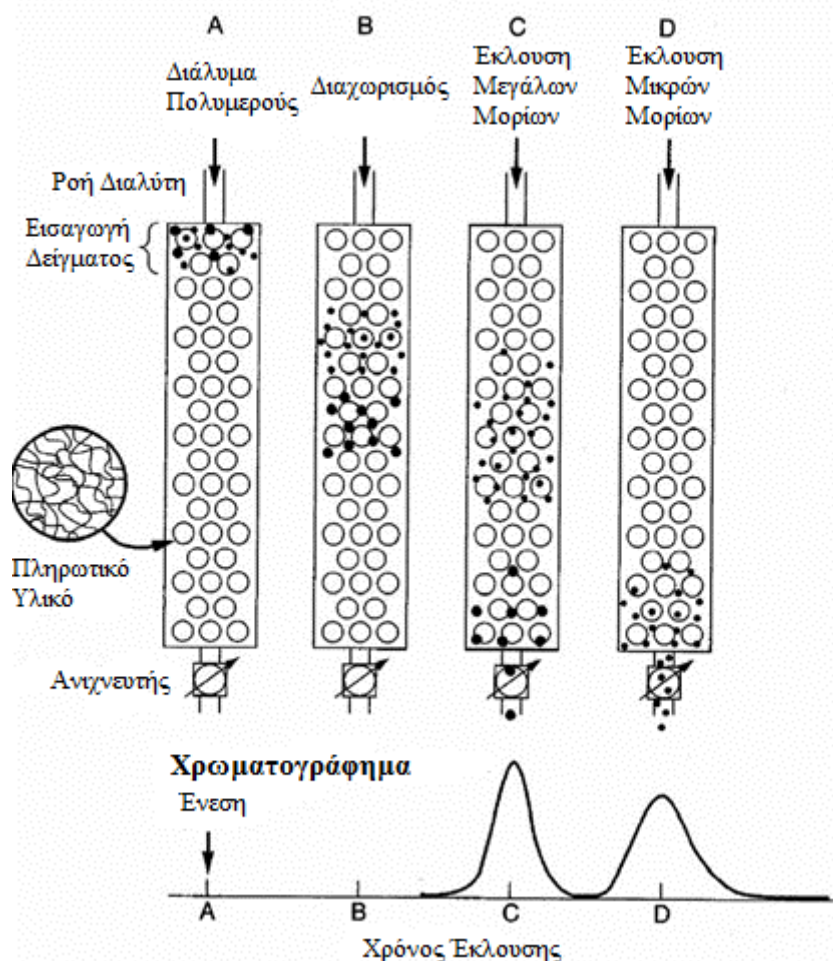
Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (size exclusion chromatography, SEC) ή χρωματογραφία διαπερατότητας μέσω πηκτής (gel permeation chromatography, GPC) αποτελεί μία από τις δυναμικότερες μεθόδους χαρακτηρισμού των πολυμερών τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα, όσο και στη βιομηχανία. Πρόκειται ουσιαστικά για 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 18.⁷⁶



Σχήμα 17: 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 Å). 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, δε 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 8).^{77,78}

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 εκλούόμενα 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.^{77,78}



Εικόνα 8: Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών. Τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους εκλούνται πρώτα και να ακολουθούν κατόπιν μόρια κατά σειρά μειούμενου μεγέθους.

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 εκλουόμενα 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.

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί έμμεση και όχι απόλυτη μέθοδο για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών, εξαιτίας της σύνδεσης μεταξύ μεγέθους (υδροδυναμικού όγκου) και μοριακού βάρους. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση των στηλών, η οποία πραγματοποιείται με μέτρηση του χρόνου έκλουσης δειγμάτων γνωστού μοριακού βάρους (π.χ. πρότυπα πολυστυρένια). Επειδή όμως ο όγκος έκλουσης 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 έκλουσης σε όλα τα δείγματα να γίνονται υπό τις ίδιες ακριβώς πειραματικές συνθήκες. Ο όγκος έκλουσης V_e κάθε μακρομορίου του πολυμερούς δίνεται από την εξίσωση: $V_e = V_o + K_{SEC} V_E$, όπου V_o 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 ($K_{SEC}=0$) $V_e=V_o$ και για μακρομόρια που μπορούν να περάσουν όλους τους πόρους ($K_{SEC}=1$) $V_e=V_o+V_E$. ΣΤΙΣ

περιπτώσεις αυτές δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός και πρέπει να αλλαχθούν οι στήλες. Καλό διαχωρισμό έχουμε όταν η K_{SEC} για όλα τα μακρομόρια που υπάρχουν στο πολυμερές κυμαίνεται μεταξύ 0 και 1.

Αντίθετα, για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους πολυμερών διαφορετικής χημικής σύστασης ή αρχιτεκτονικής από αυτή των πολυμερών με τα οποία έγινε η βαθμονόμηση, απαιτείται η χρήση μιας παγκόσμιας καμπύλης αναφοράς της μορφής $\log([\eta]M)=f(V_E)$, όπου $[\eta]$ είναι το εσωτερικό ιξώδες του πολυμερούς με μοριακό βάρος M και όγκο έκλουσης V_E . Το γινόμενο $[\eta]M$ είναι ανάλογο του υδροδυναμικού όγκου, όπως προκύπτει από τη σχέση του Einstein $[\eta]M = 0.025N_A V_h$, όπου N_A η σταθερά Avogadro και V_h ο υδροδυναμικός όγκος. Επομένως, αυτή η καμπύλη βαθμονόμησης συσχετίζει το μέγεθος (και όχι το μοριακό βάρος) με τον όγκο έκλουσης, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους ανεξαρτήτου αρχιτεκτονικής.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

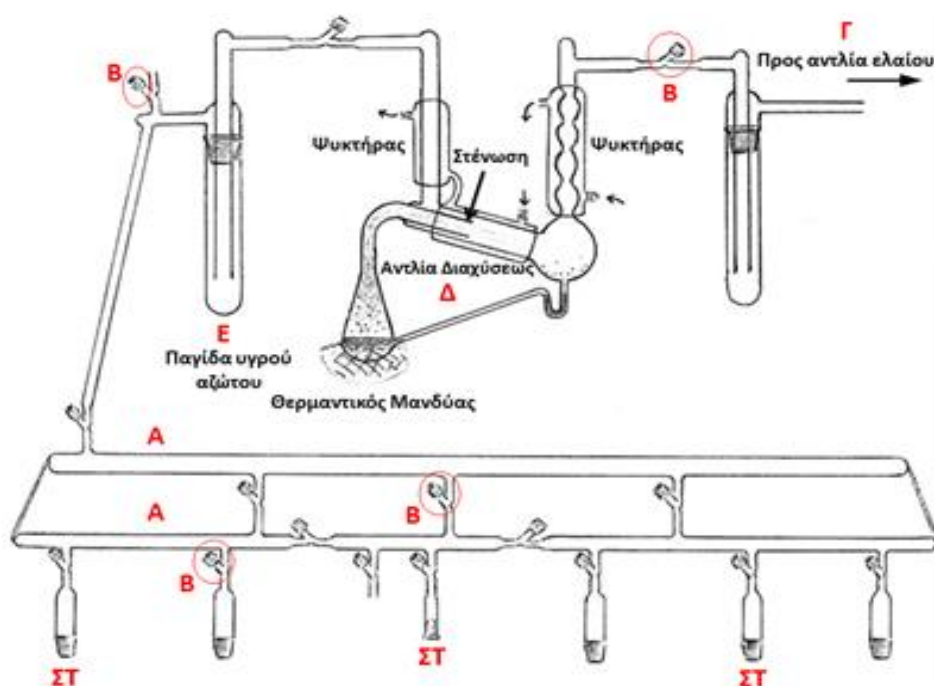
3.1 Τεχνική Υψηλού Κενού (High Vacuum Technique, HVT)^{49,51}

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 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), η τεχνική υψηλού κενού συμβάλλει στην απομάκρυνση πιθανών προσμείξεων από τα αντιδραστήρια όπως ο ατμοσφαιρικός αέρας και η υγρασία που όπως ήδη έχει αναφερθεί¹¹ προκαλούν διάσπαση (υδρόλυση) του δακτυλίου είτε ανεπιθύμητη εκκίνηση πολυμερισμού. Επίσης επιτυγχάνεται η απομάκρυνση προσμείξεων 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**) (Εικόνα 9) κατασκευάστηκε στο εργαστήριο μας με χρήση υαλουργίας. Αποτελείται από γυάλινους σωλήνες τύπου Pyrex (Α, Εικόνα 9), στρόφιγγες τεφλόν υψηλού κενού ώστε να απομονώνεται το σύστημα από τον ατμοσφαιρικό αέρα (Β, Εικόνα 9), αντλία ελαίου (Γ, Εικόνα 9), αντλία διαχύσεως υδραργύρου (Δ,

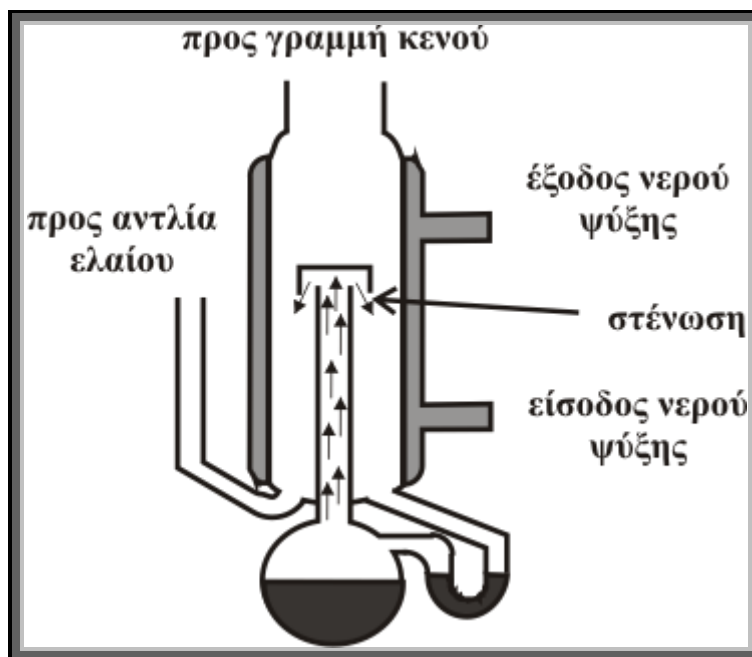
Εικόνα 9) και παγίδα υγρού αζώτου (E, Εικόνα 9). Η εφαρμογή κενού στις επιθυμητές συσκευές πραγματοποιείται με την προσαρμογή τους στη γραμμή υψηλού κενού σε μία από τις πιθανές εξόδους ΣΤ (Εικόνα 9). Χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες στρόφιγγες, είναι δυνατή η απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων της γραμμής 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 την εξασφάλιση των επιθυμητών συνθηκών.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση Γραμμής Υψηλού Κενού (High Vacuum Line, HVL)^{62,63}

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 απόσταση 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 9). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται το τελικό κενό που είναι της τάξης των 10^{-6} mm Hg, ίσο με την τάση ατμών του υδραργύρου.



Σχήμα 18: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου

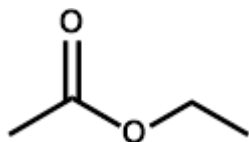
Πριν χρησιμοποιηθεί η γραμμή υψηλού κενού πρέπει να τεθεί σε λειτουργία η αντλία ελαίου, να προσαρμοστεί σ' αυτήν η επιθυμητή κενή συσκευή και να ανιχνευθεί τυχόν ύπαρξη μικροσπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla. Μόνο όταν εξασφαλιστεί απόλυτη στεγανότητα, η γραμμή είναι έτοιμη για τη διεξαγωγή της διαδικασίας απομάκρυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα από οποιοδήποτε σύστημα. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται με σχετική ευκολία, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο (-196 °C).

Ο χειρισμός της γραμμής υψηλού κενού, ελλοχεύει πολλούς κινδύνους, γι' αυτό πριν χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να είμαστε πλήρως ενημερωμένοι για τον τρόπο λειτουργίας της και κάθε φορά πρέπει να λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα προστασίας, όπως χρήση προστατευτικών γυαλιών, γαντιών, εργαστηριακής ρόμπας κ.ά.

3.2 Καθαρισμός Διαλυτών ^{49,51}

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η υψηλή καθαρότητα των αντιδραστηρίων είναι υψίστης σημασίας για την ομαλή διεξαγωγή των αντιδράσεων και τη λήψη επιθυμητών αποτελεσμάτων. Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις πολυμερισμού είναι απαραίτητο να μην περιέχουν ίχνη υγρασίας και οξυγόνου, αλλά και να έχουν απομακρυνθεί 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. Γι' αυτό το λόγο, 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 εν συνεχεία την απαέρωση και απόσταξη τους υπό κενό. Ακολούθως παρατίθενται οι διαδικασίες καθαρισμού των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

3.2.1 Οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc)



Ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται ως διαλύτης τόσο για τη σύνθεση των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs) από τα αντίστοιχα α-αμινοξέα, όσο και για τις ανακρυσταλλώσεις τους. Ο εμπορικά διαθέσιμος διαλύτης (1400

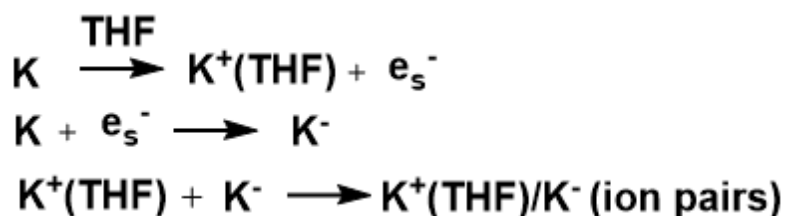
mL, >99.5%, Merck Millipore) αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε σφαιρική φιάλη 2L με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5) για μια ημέρα για απομάκρυνση της υγρασίας, οπότε ο διαλύτης αποκτά ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα. Στη συνέχεια, η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται δύο φορές και εν συνεχεία τα μεσαία κλάσματα του διαλύτη αποστάζονται σε διπλανή σφαιρική φιάλη 2L με στρόφιγγα. Μετά το πέρας της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση του διαλύτη. Η ποσότητα του οξικού αιθυλεστέρα που έχει απομείνει με το ξηραντικό στην αρχική φιάλη απενεργοποιείται με νερό. (διηλ.σταθερά $\epsilon_f = 6.02$ στους $25^\circ C$, $\Sigma.Z = 77^\circ C$)

3.2.2 Τετραϋδροφουράνιο (THF)



Το εμπορικά διαθέσιμο τετραϋδροφουράνιο (1200 mL, max 0.005% H_2O , Merck Millipore) χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης για τη σύνθεση των μονομερών. Για τον καθαρισμό του, αρχικά αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση για μία μέρα σε σφαιρική φιάλη 1L η οποία περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH_2 . Την επόμενη μέρα, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και η ποσότητα του THF πρώτα απαερώνεται ενδελεχώς δύο φορές και έπειτα αποστάζεται σε νέα σφαιρική φιάλη 1L που περιέχει κομματάκια μεταλλικού νατρίου (Na), απαερώνεται άλλη μια φορά και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα προς αντίδραση με το ξηραντικό. Ακολούθως, το THF αφού απαερωθεί ξανά, αποστάζεται σε γειτονική φιάλη 1L που περιέχει κράμα μεταλλικού νατρίου και καλίου (Na/K alloy) σε αναλογία 1:3 κατά βάρος, όπου αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Η εμφάνιση χαρακτηριστικού έντονου κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη υψηλής καθαρότητας του συγκεκριμένου

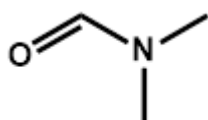
διαλύτη. Έχει προταθεί ότι το χρώμα αυτό, προέρχεται από σύμπλοκα του διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου (K⁻), λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια).



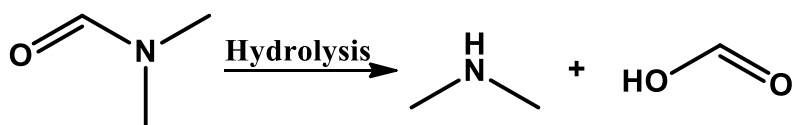
Σχήμα 19: Αντιδράσεις σχηματισμού ιοντικών ζευγών THF/K

Τέλος, πραγματοποιείται μια τελική απαέρωση. Πριν τη χρήση του διαλύτη συνίσταται να είναι υπό ανάδευση για μία ημέρα. (διηλ.σταθερά $\epsilon_r = 7.60$ στους 20°C, $\Sigma.Z = 66^\circ\text{C}$)

3.2.3 Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)



Το διμεθυλοφορμαμίδιο αποτελεί τον διαλύτη του πολυμερισμού των N-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων, αλλά χρησιμοποιείται και σε διάφορες οργανικές αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα αντιδράσεις αποπροστασίας των πολυπεπτιδίων. Το DMF υπόκειται σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική του αποικοδόμηση παράγεται διμεθυλαμίνη (DMA) και μονοξείδιο του άνθρακα. Επίσης υδρολύεται αργά παρουσία νερού, παράγοντας DMA και φορμικό οξύ, συστατικά που του αποδίδουν και την χαρακτηριστική οσμή του (Σχήμα 21).



Σχήμα 20: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ

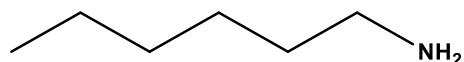
Η παραγωγή της διμεθυλαμίνης είναι μία διαδικασία που πρέπει να αποφεύγεται, καθώς κατά την διάρκεια του πολυμερισμού των NCAs μπορεί να δράσει ως απαρχητής, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, το εμπορικά διαθέσιμο DMF (99.9+% με <50 ppm προσμίξεις, Fischer Scientific) φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box. Κατά τον καθαρισμό του, περίπου 700 mL του διαλύτη μεταγγίζονται σε σφαιρική φιάλη 1L που φέρει στρόφιγγα, η οποία προηγουμένως έχει υποστεί ξήρανση σε φούρνο 500°C και στη γραμμή υψηλού κενού με φλόγα (flame-drying). Η φιάλη με τον διαλύτη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται ενδελεχώς δύο φορές. 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, προστατευμένο από το φως. Επίσης, είναι καλό να καταναλωθεί το συντομότερο δυνατόν από την ημέρα καθαρισμού του. (διηλ.σταθερά $\epsilon_r=36.71$ στους 25°C, $\Sigma.Z = 153^\circ\text{C}$)

3.2.4 Εξάνιο

Το εξάνιο χρησιμοποιείται ως μη διαλύτης κατά τη διαδικασία των ανακρυσταλλώσεων για τον καθαρισμό των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs). Ο καθαρισμός του εμπορικώς διαθέσιμου εξανίου (>99%, Merck Millipore) περιλαμβάνει αρχικά την κατεργασία του με μικρή ποσότητα λεπτότατα διαμερισμένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2) για μια ημέρα σε σφαιρική φιάλη 2L, για την απομάκρυνση ιχνών υγρασίας. Ακολούθως, πραγματοποιείται απαέρωση και απόσταξη του διαλύτη στη γραμμή υψηλού κενού σε γειτονική σφαιρική φιάλη 2L, που περιέχει μικρή ποσότητα κανονικού βουτυλολιθίου (*n*-BuLi), το οποίο αντιδρά με τυχόν προσμίξεις, ενώ μετά το τέλος της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση. Η ποσότητα CaH_2 της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

3.3 Καθαρισμός Απαρχητή και Αντιδραστηρίων

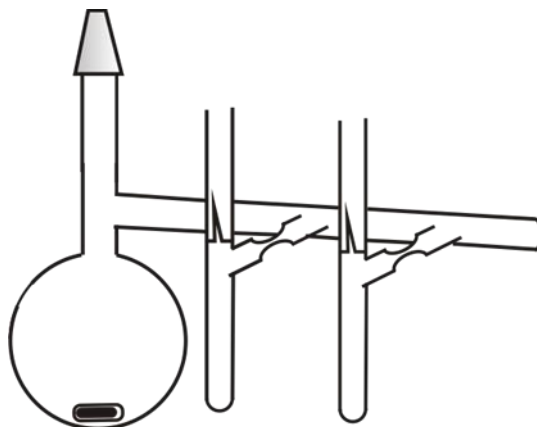
3.3.1 n-εξυλαμίνη





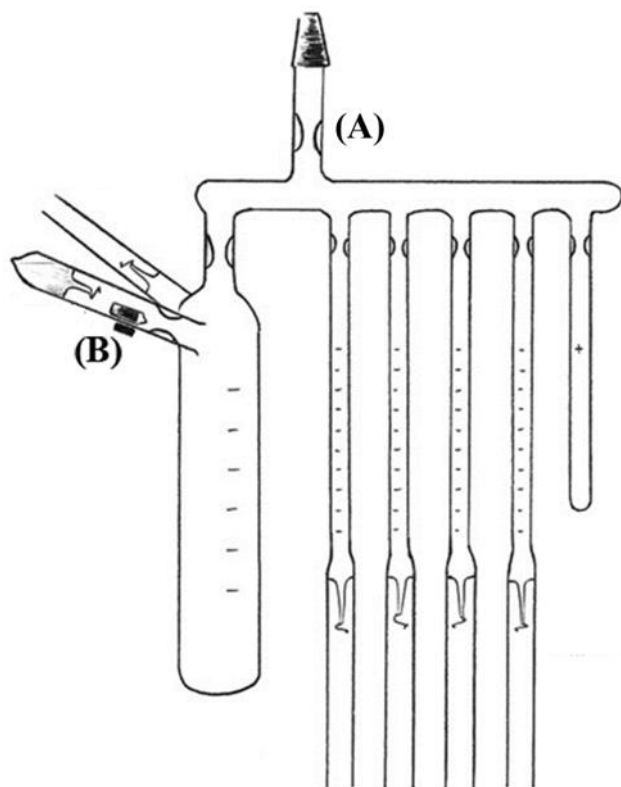
Εικόνα 10: εξυλαμίνη με λειοτριβημένο υδρίδιο του ασβεστίου

Η n-εξυλαμίνη χρησιμοποιήθηκε ως απαρχητής για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs. Ποσότητα της n-εξυλαμίνης προστίθεται σε σφαιρική φιάλη που περιέχει λειοτριβημένο υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2) (εικόνα 12) και προσαρμόζεται στη γραμμή κενού. Απαερώνεται και αφήνεται υπό ανάδευση για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα αποστάζεται μέσω της γραμμής κενού σε συσκευή (σχήμα 22), η οποία έχει υποστεί ξήρανση (flame drying) και περιέχει μεταλλικό νάτριο. Αφήνεται για άλλη μία νύχτα υπό ανάδευση. Τελικά αποστάζεται στις βαθμονομημένες αμπούλες, οι οποίες απομακρύνονται με σύντηξη από τη συσκευή.



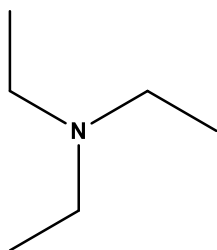
Σχήμα 21: Συσσκευή για την απόσταξη ενώσεων υψηλού σημείου ζέσεως (short path distillation).

Μία από τις αμπούλες αυτές προσαρμόζεται σε συσκευή αραίωσης, η οποία μέσω του εσφυρίσματος που διαθέτει τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού (Σχήμα 23). Ακολουθεί προσεκτική απαέρωση και ξήρανση της συσκευής (flame-drying) πριν την απόσταξη ποσότητας διαλύτη (DMF ή THF) ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του απαρχητή. Κατόπιν, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού με σύντηξη στο σημείο (A) και προστίθεται ο απαρχητής με θραύση του γυάλινου υμένα (break-seal) της αμπούλας στο σημείο (B).



Σχήμα 22: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής αραίωσης απαρχητή

3.3.2 Τριαιθυλαμίνη (Et_3N)



Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται στη σύνθεση του NCA της πρόδρομης ένωσης N^{ϵ} -Fmoc- N^{α} -Boc-L-Lysine ως μέσο δέσμευσης του παραγόμενου υδροχλωρίου. Για τον καθαρισμό της, η απαραίτητη ποσότητα Et_3N ($>99\%$,

Acros Organics) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 250 mL που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH_2 και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Έπειτα η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα απαερωθεί η ποσότητα της Et_3N , ακολουθεί απόσταξη σε σφαιρική φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει λεπτά κομματάκια μεταλλικού νατρίου και φυλάσσεται υπό κενό. (δηλ. σταθερά $\epsilon_r=2.42$ στους 25°C , $\Sigma.Z = 89^\circ\text{C}$)

3.3.3 Σύνθεση και Καθαρισμός Μονομερών (N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α -Αμινοξέων)^{53,54}

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. Απαιτούν υψηλή καθαρότητα και απουσία υγρασίας προκειμένου να δώσουν επιθυμητά τελικά προϊόντα, γι' αυτό η σύνθεση και ο καθαρισμός τους πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή. Η σύνθεση του NCA που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά στο εργαστήριο μας.

3.3.4 Σύνθεση του N-καρβοξυανυδρίτη της N^ϵ - 9-Φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλο - N^α - Tert-βουτυλοξυκαρβόνυλο - L-λυσίνης (N^ϵ -Fmoc- N^α -Boc-L-Lysine)

. Κατά την πειραματική πορεία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση NCA(σχήμα 24) με πλευρικές προστασίες εκ των οποίων η μία είναι ευαίσθητη σε όξινο και η άλλη σε βασικό περιβάλλον.

Σε δίλαιο σφαιρική φιάλη 100 mL, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται 7.6 g της πρόδρομης ένωσης N^ϵ -Fmoc- N^α -Boc-L-Lys (16.22 mmol, MB=468.55). Η φιάλη προσαρμόζεται στην HVL και το στερεό αφήνεται προς ξήρανση για μια ημέρα. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιείται ξήρανση

με φλόγα (flame-drying) στη γραμμή για απομάκρυνση υγρασίας και τυχόν διαλυτών με την ποσότητα της N^{ϵ} -Fmoc- N^{α} -Boc-L-Lys όπου και αποστάζονται περίπου 150 mL καθαρού THF. Εν συνεχεία, η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό υπό ροή αργού. Παράλληλα, στη γραμμή υψηλού κενού (HVL), ανεβάζουμε φιάλη των 50ml και αφού πραγματοποιηθεί ξήρανση της φιάλης με φλόγα αποστάζονται περίπου 30ml THF.



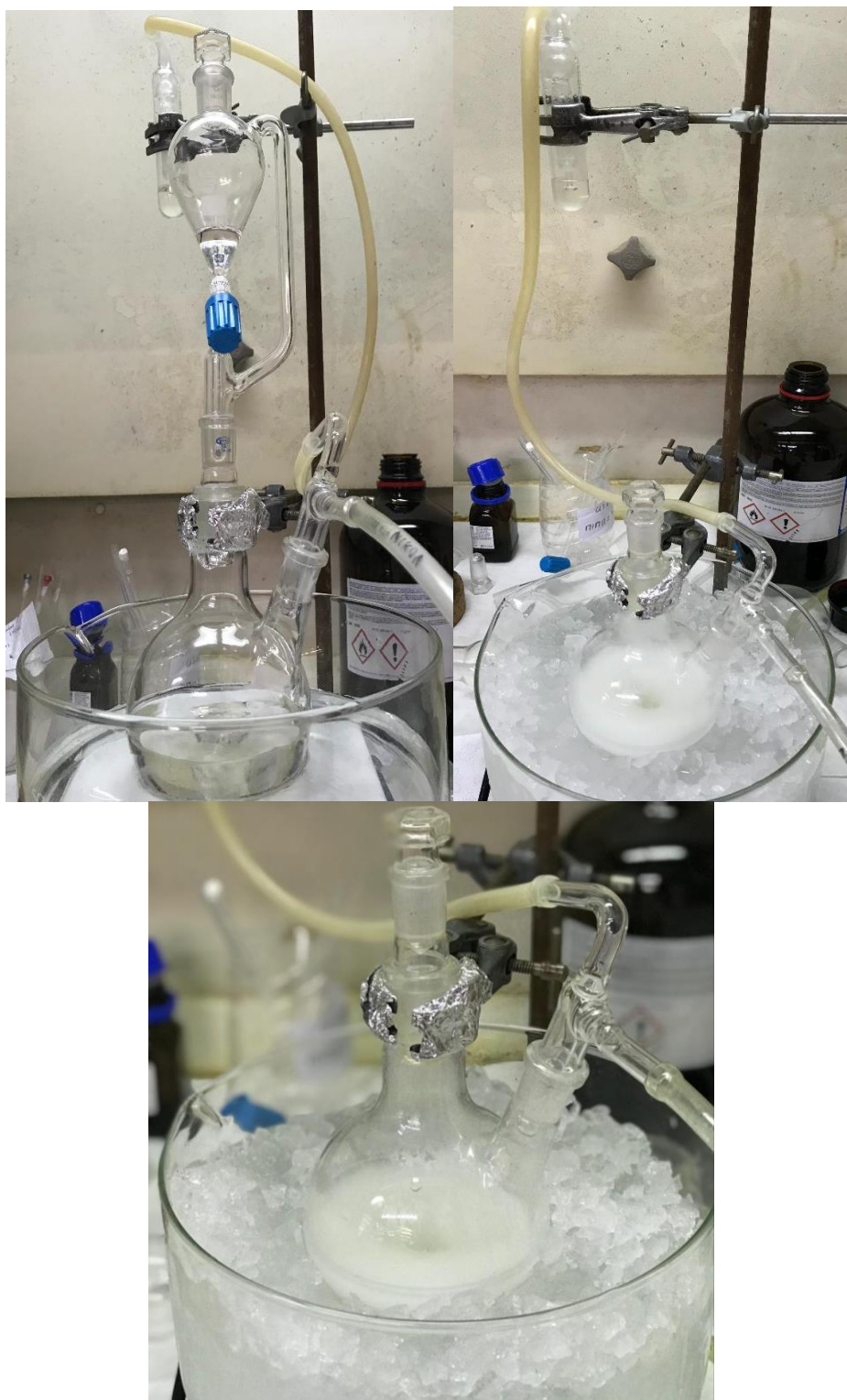
Εικόνα 11: Συσκευή σύνθεσης του N^{ϵ} -Fmoc-L-Lys NCA.

Στη μία είσοδο της φιάλης προσαρμόζεται κατάλληλο επίθεμα για συνεχή παροχή αργού και bubbler για έλεγχο της ροής του, ενώ στη δεύτερη είσοδο της φιάλης τοποθετείται κατακόρυφος ψυκτήρας και γυάλινο σταγονομετρικό

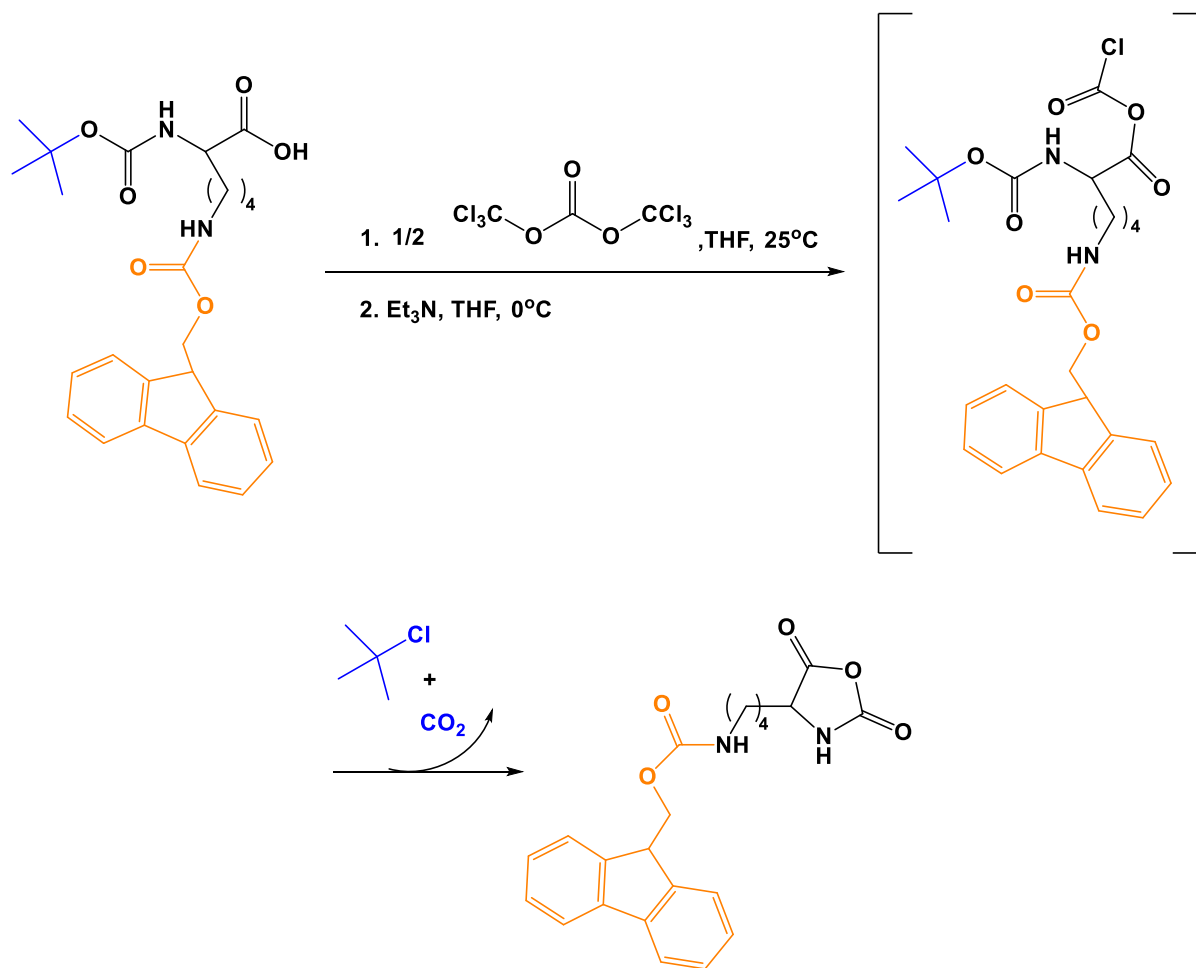
χωνί που διαθέτει στρόφιγγα, το οποίο έχει πρώτα ξηρανθεί σε φούρνο. Αφού ζυγιστούν 2.41g τριφωσγενίου (8.11 mmol, MB=296.748) προστίθενται στη φιάλη 50ml που περιείχε καθαρό THF. Ρίχνεται το τριφωσγένιο μέσω σταγονομετρικού χωνιού, στη φιάλη με σταθερή ροή αργού ώστε να έχει ολοκληρωθεί μέσα σε 30 λεπτά και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Με την προσθήκη τριφωσγενίου θα επιτευχθεί η κυκλοποίηση της Boc ομάδας με αμινομάδα. 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, ώστε να μειωθεί η διαλυτότητα της υδροχλωρικής τριαιθυλαμίνης. 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 του αντιδραστήριου, το σταγονομετρικό χωνί αποσπάται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και το διάλυμα διατηρείται υπό επαναροή σε παγόνερο, για 5 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Παρατηρείται σταδιακή αλλαγή του χρώματος του διαλύματος όσο προχωράει η αντίδραση, το οποίο από λευκό και μη διαυγές μετατρέπεται σε ελαφρώς υποκίτρινο

(Εικόνα 13), γεγονός που αποτελεί ένδειξη της επιτυχούς σύνθεσης του NCA της *N^ε*-Fmoc-*N^α*-Boc-L-Lys. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδος της. Μετά το πέρας των 5 ωρών, το περιεχόμενο της φιάλης διηθείται υπό κενό σε φίλτρο πεφρυγμένης υάλου (por3) προς απομάκρυνση τυχόν στερεών προσμίξεων. Το διήθημα του NCA μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη προκειμένου να απομακρύνουμε το διαλύτη σε γειτονική σφαιρική φιάλη. Με αυτόν τον τρόπο στη φιάλη μας μένει μόνο το στερεό το οποίο αφήνεται για ξήρανση όλη τη νύχτα στη γραμμή υψηλού κενού. Το επόμενο πρωί, ακολούθησε η ανακρυστάλλωση του μονομερούς με οξικό αιθυλεστέρα και εξάνιο για απομάκρυνση των προσμίξεων. Αποστάξαμε περίπου 200 mL καθαρού EtOAc στη φιάλη που περιέχει το στερεό προς διαλυτοποίησή του. Το υδροχλωρικό άλας της τριαιθυλαμίνης ($\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$) που προκύπτει είναι αδιάλυτο στον EtOAc (σχηματισμός ιζήματος), ενώ ο *N^ε*-Fmoc-L-Lys NCA παραμένει διαλυτός. Συνεπώς, ο διαχωρισμός των δύο ενώσεων πραγματοποιείται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με φίλτρο πεφρυγμένης υάλου por4. Ταυτόχρονα, το διήθημα που περιέχει τον καθαρό πλέον *N^ε*-Fmoc-L-Lys NCA, καταβυθίζεται σε 2L εξανίου και διηθείται ξανά από γυάλινο φίλτρο por 4 και το στερεό που παραμένει στο φίλτρο συλλέγεται σε σφαιρική 250mL και αφήνεται για ξήρανση στη HVL για μία ημέρα. Οι διηθήσεις πραγματοποιούνται υπό συνεχή παροχή αργού. Η διαδικασία ανακρυστάλλωσης επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά και την επόμενη ημέρα, η φιάλη απομακρύνεται από την HVL και μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και φυλάσσεται ο τελικός NCA. Τελικά, προκύπτουν (5.03 g, 12.75 mmol) (απόδοση=78.6%) ξηρού *N^ε*-Fmoc-L-Lys. Η πορεία των αντιδράσεων που ακολουθείται για τη σύνθεση του *N^ε*-Fmoc-L-Lys NCA συνοψίζεται στο Σχήμα 24.

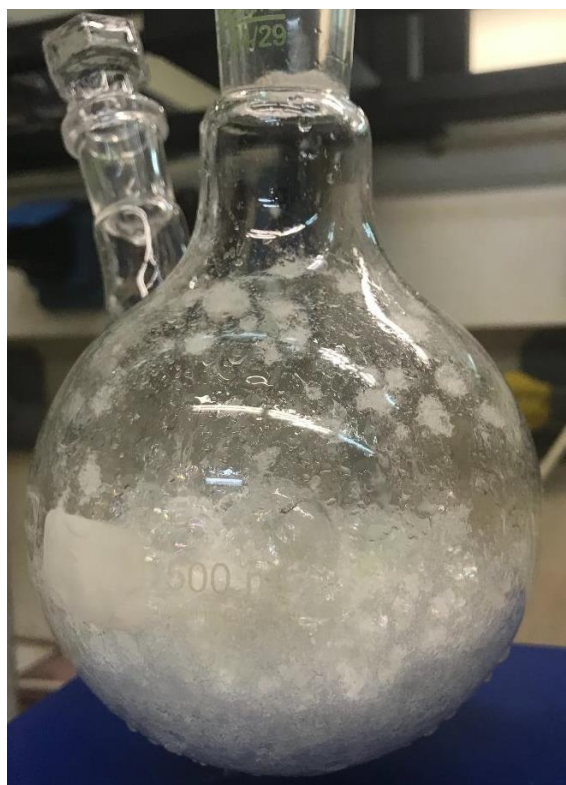
✓ **Απόδοση=78.6%**



Εικόνα 12: Η πορεία της αντίδρασης μετά την προσθήκη τριφωσγενείου και τριαιθυλαμίνης που αφήνεται υπο ροή αργού σε παγόνερο. Παρατηρείται σταδιακή αλλαγή του χρώματος του διαλύματος όσο προχωράει η αντίδραση.



Σχήμα 23: Πορεία σύνθεσης του NCA της N^ϵ -Fmoc- N^α -Boc-*L*-Lys.



Εικόνα 13: Σχηματισμός εντυπωσιακού άσπρου αφρού πριν τη ξήρανση του N-καρβοξυ ανυδρίτη.

3.4 Σύνθεση ομοπολυμερών Poly-(N^ε-Fmoc-L-Lys)

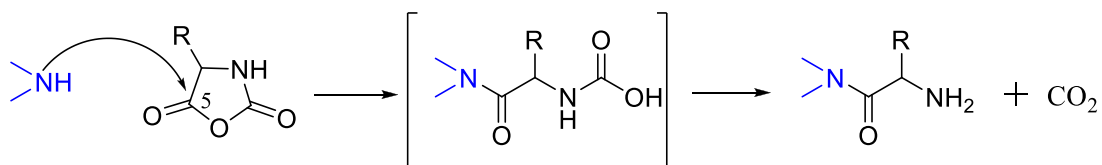
Στην παρούσα εργασία, όπως ήδη έχει αναφερθεί, επιτεύχθηκε για πρώτη φορά η σύνθεση του N^ε-Fmoc-L-Lys NCA και στη συνέχεια μελετήθηκε ο πολυμερισμός του NCA με απαραίτητη την εξυλαμίνη προς σχηματισμό δύο ομοπολυμερών με μοριακά βάρη 3.250 και 10.000 αντίστοιχα. Το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας αποτέλεσε ο διαδοχικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) του προστατευμένου N-καρβοξυ ανυδρίτη (N^ε-Fmoc-L-Lys NCA). Η χρήση προστατευτικών ομάδων στον N-καρβοξυ ανυδρίτη είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς έτσι αποφεύγονται ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της σύνθεσής του, αλλά και κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού. Έτσι, αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των πλήρως προστατευμένων πολυμερών Poly(N^ε-Fmoc-L-Lys)₃₂₅₀ και Poly(N^ε-Fmoc-L-Lys)₁₀₀₀₀ με τεχνικές υψηλού κενού και στη

συνέχεια ακολούθησε η εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της Fmoc, καταλήγοντας στα επιθυμητά ομοπολυμερή Poly(L-Lys)₃₂₅₀ και Poly(L-Lys)₁₀₀₀₀ αντίστοιχα. Για τη σύνθεση και των δύο ομοπολυμερών ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία και για το λόγο αυτό θα περιγραφεί αναλυτικά μόνο για το ομοπολυμερές Poly(N^ε-Fmoc-L-Lys)₃₂₅₀, ο πολυμερισμός του οποίου διήρκεσε 3 μέρες ενώ του Poly(N^ε-Fmoc-L-Lys)₁₀₀₀₀ 4 μέρες. Η πειραματική διαδικασία αναλύεται παρακάτω.

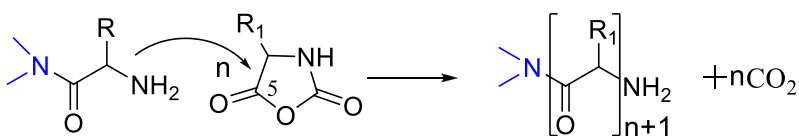
3.4.1 Σύνθεση υβριδικού ομοπολυμερούς Poly(N^ε-Fmoc-L-Lys)₃₂₅₀

Στο στάδιο αυτό εφαρμόστηκαν τεχνικές υψηλού κενού σε συνδυασμό με τεχνικές αργού.

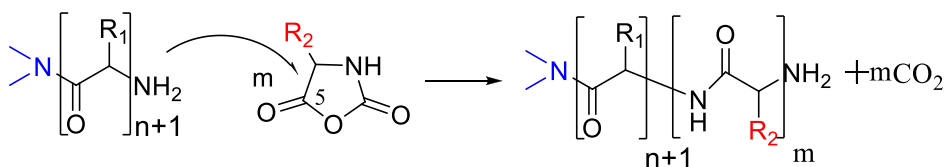
Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



Στάδιο συμπολυμερισμού



Σχήμα 24: Γενική αντίδραση σύνθεσης ομο-πολυπεπτιδίων με διμεθυλαμίνη

Για τη σύνθεση του ομοπολυμερούς Poly-(N^ε-Fmoc-L-Lys)₃₂₅₀ χρησιμοποιούνται 0.6gr NCA. Με δεδομένο τη γνωστή ποσότητα του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί και του μοριακού βάρους των επόμενων

συστάδων, γίνονται υπολογισμοί για την εύρεση των ποσοτήτων του μονομερούς N^{ϵ} -Fmoc- N^{α} -Boc-L-Lys και N^{ϵ} -Fmoc-L-Lys NCA που θα χρησιμοποιηθεί.

Συνολικό μοριακό βάρος του NCA = 394.

Μοριακό βάρος της Fmoc προστασίας = 223.25.

Μοριακό βάρος του CO₂, που εκλύεται λόγω της διάνοιξης του δακτυλίου = 44.

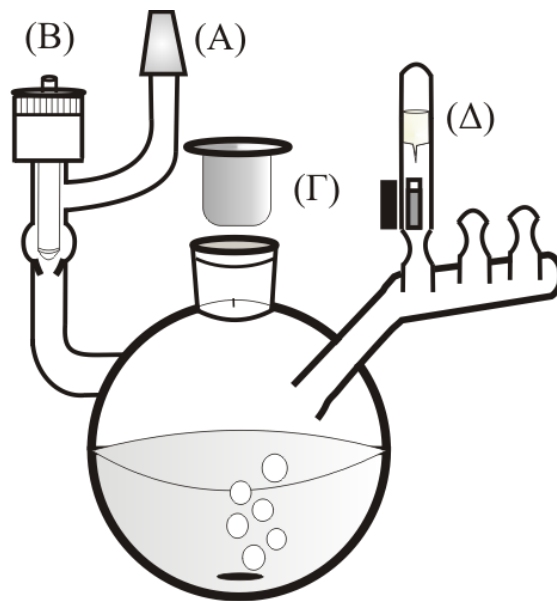
Μοριακό βάρος της μονομερικής μονάδας της αποπροστατευμένης Lys στο τελικό πολυμερές = $394 - 223.25 - 44 = 126.75$.

Μοί απαρχηγή (εξυλαμίνη) είναι: $n = m/Mr$, $n = 0.6 \text{ g}/10000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 0.00006 \text{ mol}$.

Ζυγίζεται όμως ο N^{ϵ} -Fmoc-L-Lys NCA, οπότε γίνεται διόρθωση ως προς το βάρος που ζυγίζω: $0.6\text{g}\cdot(394/126,75)\text{g/mol}=1.86\text{g } N^{\epsilon}\text{-Fmoc-L-Lys NCA}$.

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την κατασκευή ειδικά σχεδιασμένης συσκευής πολυμερισμού με τεχνικές υαλουργίας. Η συσκευή αυτή αποτελείται από μία σφαιρική φιάλη των 250 mL που διαθέτει στρόφιγγα υψηλού κενού, στην οποία πραγματοποιείται ο πολυμερισμός, και από δύο αμπούλες σχήματος «Π» που διαθέτουν γυάλινους υμένες (break seals) και μαγνήτες για τη θραύση τους (breakers), στις οποίες τοποθετούνται τα μονομερή. Η συσκευή πολυμερισμού προσαρμόζεται από το εσμύρισμα (A) στην γραμμή υψηλού κενού απασρώνεται και ξηραίνεται για μια ώρα με την χρήση φλόγας. Γίνεται διεξοδικός έλεγχος για ύπαρξη μικροσπών με την χρήση του πηνίου Tesla και όταν πιστοποιηθεί η ποιότητα του κενού απομονώνεται μέσω της στρόφιγγας (B). Εν συνεχεία μεταφέρεται στο glove-box(προθάλαμος) και ακολουθούν τρεις κύκλοι αργού-κενού, διαδικασία που πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον μισή ώρα. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για να μην εισέλθει στον κύριο θάλαμο υγρασία από το εξωτερικό περιβάλλον. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η υγρασία στο glove-box ,σε κατάσταση ορθής λειτουργίας,

είναι της τάξης των 0.1ppm ενώ του χρησιμοποιούμενου διαλύτη στους πολυμερισμούς 10ppm.



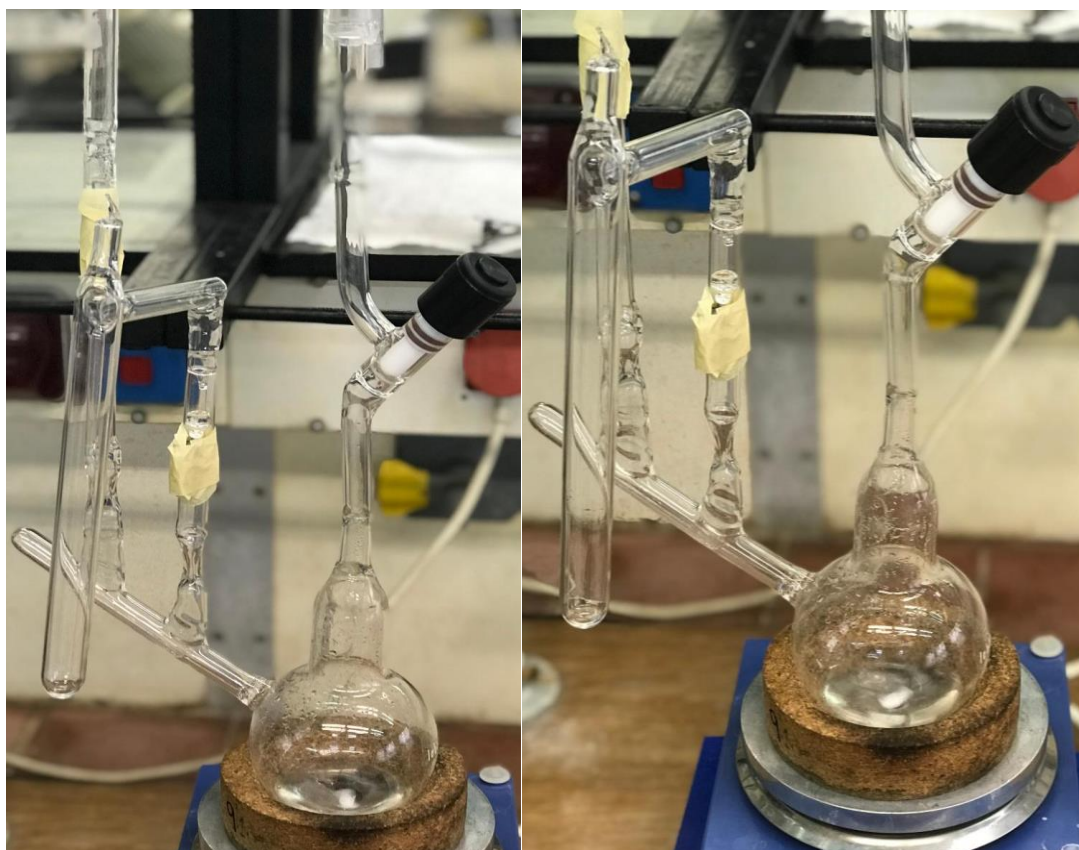
Σχήμα 25: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής πολυμερισμού για την σύνθεση ομο-πολυπεπτιδίων



Εικόνα 14: Η συσκευή πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των ομοπολυπεπτιδίων

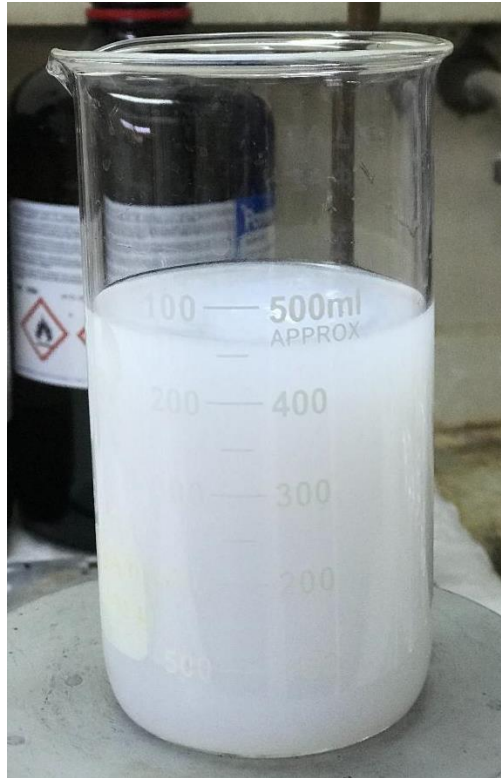
Με την εισαγωγή στον κύριο θάλαμο ανοίγεται η στρόφιγγα (B) για να εξισορροπηθεί η πίεση εντός της συσκευής και αφαιρείται το εσμύρισμα (Γ). Απομακρύνεται το λίπος σχολαστικά από όλα τα εσμυρίσματα με προσοχή. Εν συνεχεία ζυγίζεται ακριβώς η ποσότητα του μονομερούς που χρειάζεται, με ακρίβεια δυο δεκαδικών ψηφίων και μεταφέρεται εντός του αντιδραστήρα. Συγκεκριμένα ζυγίστηκαν 0.6gr μονομερούς. Ο αντιδραστήρας απομονώνεται από τα σημεία (B) και (Γ) και μεταφέρεται στην γραμμή του υψηλού κενού. Όταν απαερωθεί από το περιεχόμενο αργό παγώνεται με υγρό άζωτο για πέντε λεπτά πριν την απόσταξη του διμεθυλοφορμαμιδίου. Το DMF αποστάζεται κλασματικά. Μετά την πλήρη διάλυση του μονομερούς στο DMF, πραγματοποιείται θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας συμπυκνώνοντας μόνο τα μεσαία κλάσματα στον αντιδραστήρα, ώστε να

προκύψει διάλυμα με συγκέντρωση 10%w/v. Ακολούθως ο παγωμένος αντιδραστήρας μεταφέρεται γρήγορα σε λουτρό με παγόνη, για να υγροποιηθεί ο διαλύτης του πολυμερισμού και να διαλυθεί το μονομερές. Όταν προκύψει ομογενές διάλυμα με τη βοήθεια κατάλληλου μαγνήτη θραύεται γρήγορα ο γυάλινος υμένας της αμπούλας (Δ) που περιέχει την κατάλληλη ποσότητα του απαρχητή και το περιεχόμενό της αποχύνεται ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη πολυμερισμού, ώστε να εκκινήσει ο πολυμερισμός και να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές. Η έναρξη του πολυμερισμού συνοδεύεται με έντονη έκλυση φυσαλίδων CO₂ το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη διάδοση του πολυμερισμού. Έτσι, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η συσκευή απαερώνεται στη HVL ανοίγοντας τη στρόφιγγα με σκοπό να απομακρυνθεί το διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί και έτσι η ισορροπία της αντίδρασης να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Η συσκευή τοποθετείται πάλι στην γραμμή του κενού προσαρμόζοντας μαγνητικό αναδευτήρα. Έπειτα από μια ώρα απαερώνεται για πρώτη φορά από την στρόφιγγα (B) και μετά ξανά την επόμενη ημέρα. Το πέρας του πολυμερισμού εξαρτάται από το επιθυμητό μοριακό βάρος, την συγκέντρωση και το είδος του μονομερούς. Τη δεύτερη ημέρα κατά την απαέρωση παρατηρείται έντονη έκλυση φυσαλίδων CO₂ ενδεικτικό του πολυμερισμού. Το διάλυμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 ημέρες μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το πρώτο 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 διαυγές κίτρινο σε λευκό-υποκίτρινο και μη διαυγές, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για την επιτυχή σύνθεση της πολυπεπτιδικής συστάδας (Εικόνα 16).



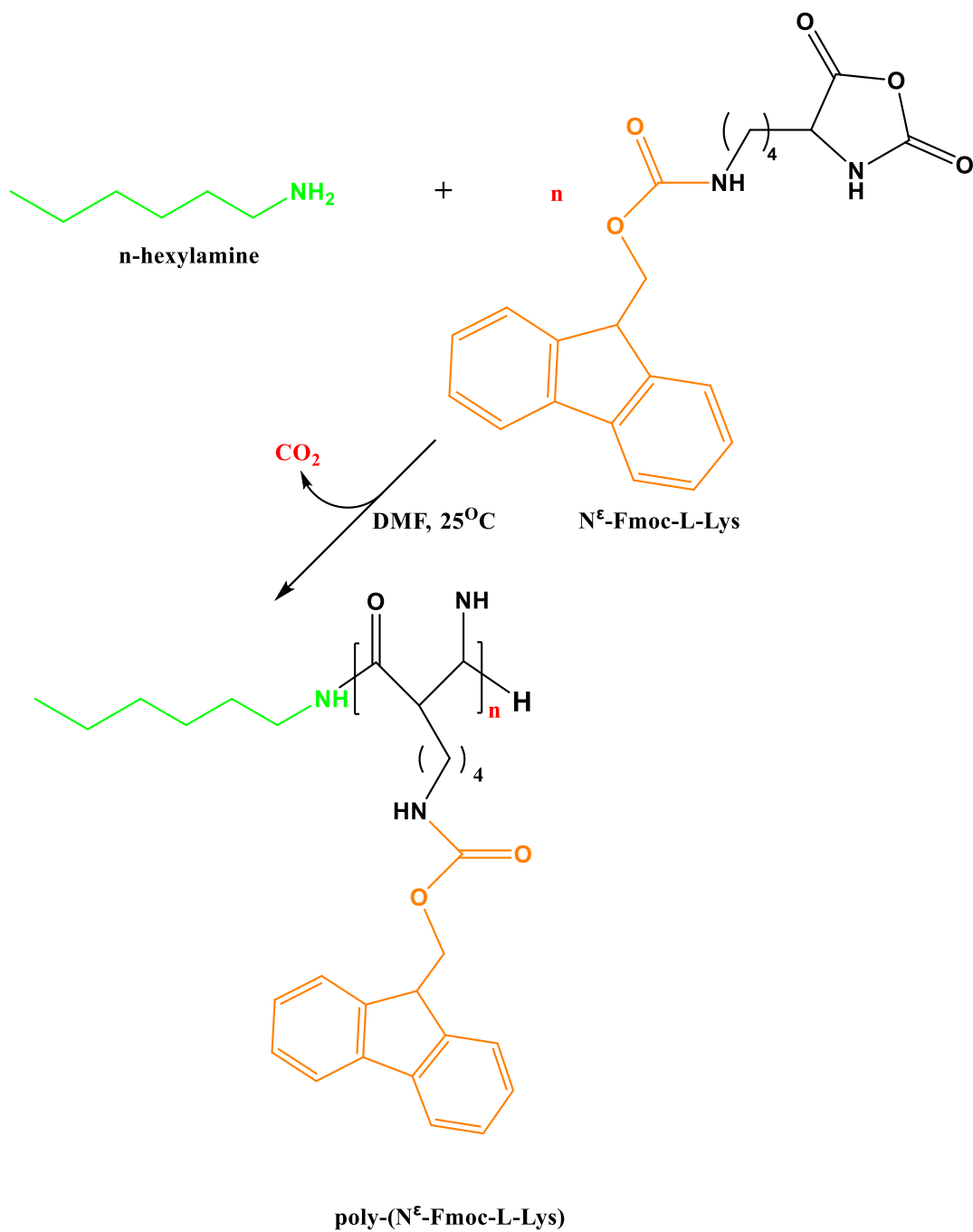
Εικόνα 15: Το διάλυμα μετατρέπεται σταδιακά από διαυγές κίτρινο σε λευκό-υποκίτρινο και μη διαυγές, ένδειξη για την επιτυχή σύνθεση της πολυπεπτιδικής συστάδας.

Με το πέρας του πολυμερισμού το προκύπτον διάλυμα ρίχνεται στάγδην σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει περίπου 500mL παγωμένο διαιθυλιθέρα. Αμέσως παρατηρείται καταβύθιση του πολυμερούς. (εικόνα 17) Αφαιρείται ο αναδευτήρας και το υπερκείμενο αποχύνεται και συμπληρώνεται ξανά με αιθέρα. Αυτό επαναλαμβάνεται δυο φορές και τέλος το πολυμερές διηθείται υπο κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου PTFE 0.45μm. Το λευκό στερεό που συλλέγεται, μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL (Εικόνα 18) και αφήνεται προς ξήρανση στη HVL για μία νύχτα. Μετά την ξήρασή του, το τελικό προστατευμένο πολυμερές φυλάσσεται στο ψυγείο.



Εικόνα 16: Καταβύθιση ομοπολυμερούς σε διαιθυλαιθέρα

Συνοπτικά, η πορεία για τη σύνθεση των ομοπολυμερών του τύπου Poly-(N^ε-Fmoc-L-Lys) , με χρήση ως απαρχητή εξυλαμίνη, δίνεται στο Σχήμα 27.



Σχήμα 26: Πορεία σύνθεσης ομοπολυμερών τύπου Poly-(N^ε-Fmoc-L-Lys) , με χρήση ως απαραίτητη εξυλαμίνη



Εικόνα 17: Συλλογή ομοπολυμερούς σε σφαιρική φιάλη.

3.4.2 Σύνθεση υβριδικού ομοπολυμερούς Poly-(N^ε-Fmoc-L-Lys)_{10.000}

Η σύνθεση του συγκεκριμένου πολυμερούς πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκαν 0.006g απαρχητή – εξυλαμίνης (MB= 101,19 g/mol) ($n = m/Mr$, $n = 0.6 \text{ g}/10000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 0.00006 \text{ mol}$), 1,2 g Poly(N^ε-Fmoc-L-Lys). Ο πολυμερισμός σε αυτήν την περίπτωση διήρκησε 4 ημέρες.

Τα ομοπολυμερή αυτά συντέθηκαν με στόχο τη μετέπειτα μελέτη των συνθηκών αποπροστασίας τους και του συστήματος ορθογωνικής σύνθεσης. Πιο συγκεκριμένα, ερευνήθηκε η αποπροστασία των δομικών μονάδων με

Fmoc έναντι της TFA. Αναλυτικότερα, το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα θέλει πολύ ισχυρά βασικές συνθήκες για να αποπροστατευτεί σε αντίθεση με αυτό της TFA που αποπροστατεύεται με ήπια βασικές συνθήκες. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα παράπλευρες απώλειες και δυσμενείς τερματισμούς του πολυμερισμού.

Η επιτυχής σύνθεση του πολυμερούς ελέγχεται σε κάθε σχεδόν στάδιο της συνθετικής πορείας με λήψη φασμάτων FT-IR και τελικά επιβεβαιώνεται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).

3.5 Εκλεκτική αποπροστασία δομικών μονάδων πολυ(λυσίνης) (PLys)

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL που περιέχει ποσότητα πλήρως προστατευμένου πολυμερούς, προστίθενται 10 mL διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF) προς διάλυση του πολυμερούς και στη συνέχεια προστίθεται ίδια ποσότητα απεσταγμένης πιπεριδίνης, η οποία αντιδρά με την Fmoc προστατευτική ομάδα, σχηματίζοντας ένα κίτρινο διάλυμα ύστερα από έντονη ανάδευση. (Εικόνα 19) Το έντονο κίτρινο και διαυγές διάλυμα που προκύπτει αφήνεται υπό ανάδευση για 40 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 20mL παγωμένου νερού, υπο ανάδευση ώστε να πραγματοποιηθεί η καταβύθιση της Fmoc προστατευτικής ομάδας. Η προσθήκη κρύου νερού κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να μην αλλάξει η διαμόρφωση της λυσίνης σε β' φύλλο. Στη συνέχεια η Fmoc διαχωρίζεται από το πολυμερές με διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner με γυάλινο φίλτρο por3. Το διήθημα μεταφέρεται σε φιάλη και από εκεί προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού σε ειδική διάταξη προς απομάκρυνση των διαλυτών σε κενή γειτονική φιάλη. Συνεπώς στη φιάλη παραμένει μόνο το πολυμερές, το οποίο διαλύεται σε 20 mL νερό Milli-Q και αφήνεται υπό ανάδευση για 10-15 min.



Εικόνα 18: Πλήρως προστατευμένο πολυμερές πριν και μετά την προσθήκη απεσταγμένης πιπεριδίνης. Σχηματίζεται ένα θολό υποκίτρινο διάλυμα ύστερα από έντονη ανάδευση.

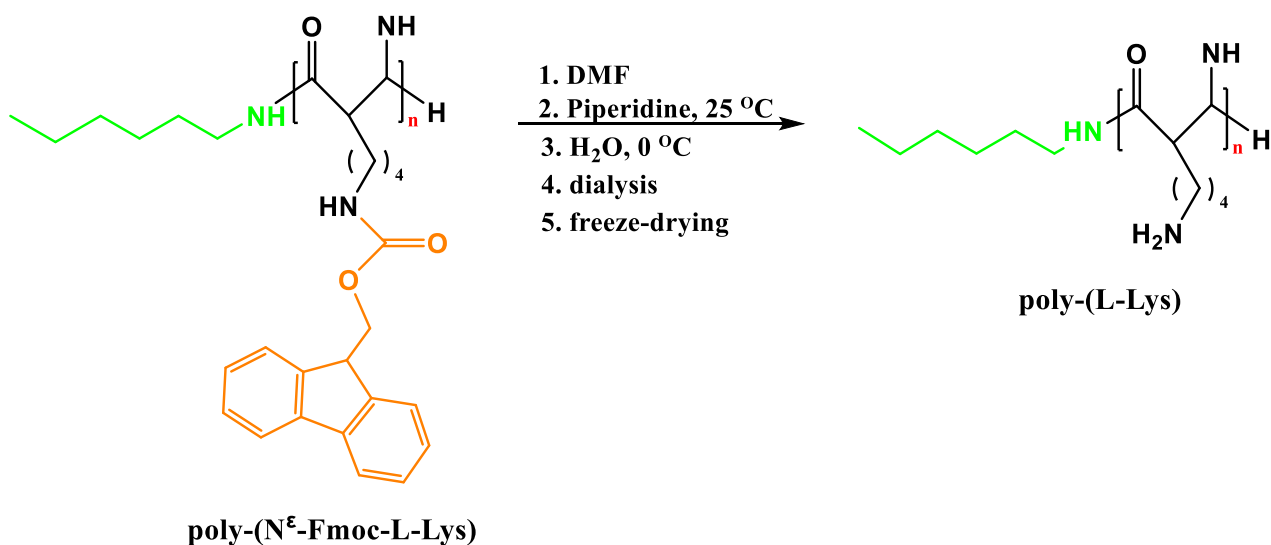
Στο διήθημα ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7-7.4 με διάλυμα HCL , διότι αρχικά είναι πολύ βασικό (pH περίπου 11) και δεν είναι στα όρια ανοχής της μεμβράνης. Θέλουμε το pH να είναι σχεδόν ουδέτερο διότι η λυσίνη σε πολύ αλκαλικό περιβάλλον αλλάζει διαμόρφωση σε β' φύλλο. Αμέσως μετά, το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετείται με την βοήθεια πιπέτας σε κατάλληλη μεμβράνη διαπίδωσης (dialysis) (όριο αποκλεισμού μοριακών βαρών MWCO=3.5kDa), η οποία με τη σειρά της τοποθετείται υπό ανάδευση σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 6L νερό Milli-Q (Εικόνα 20).



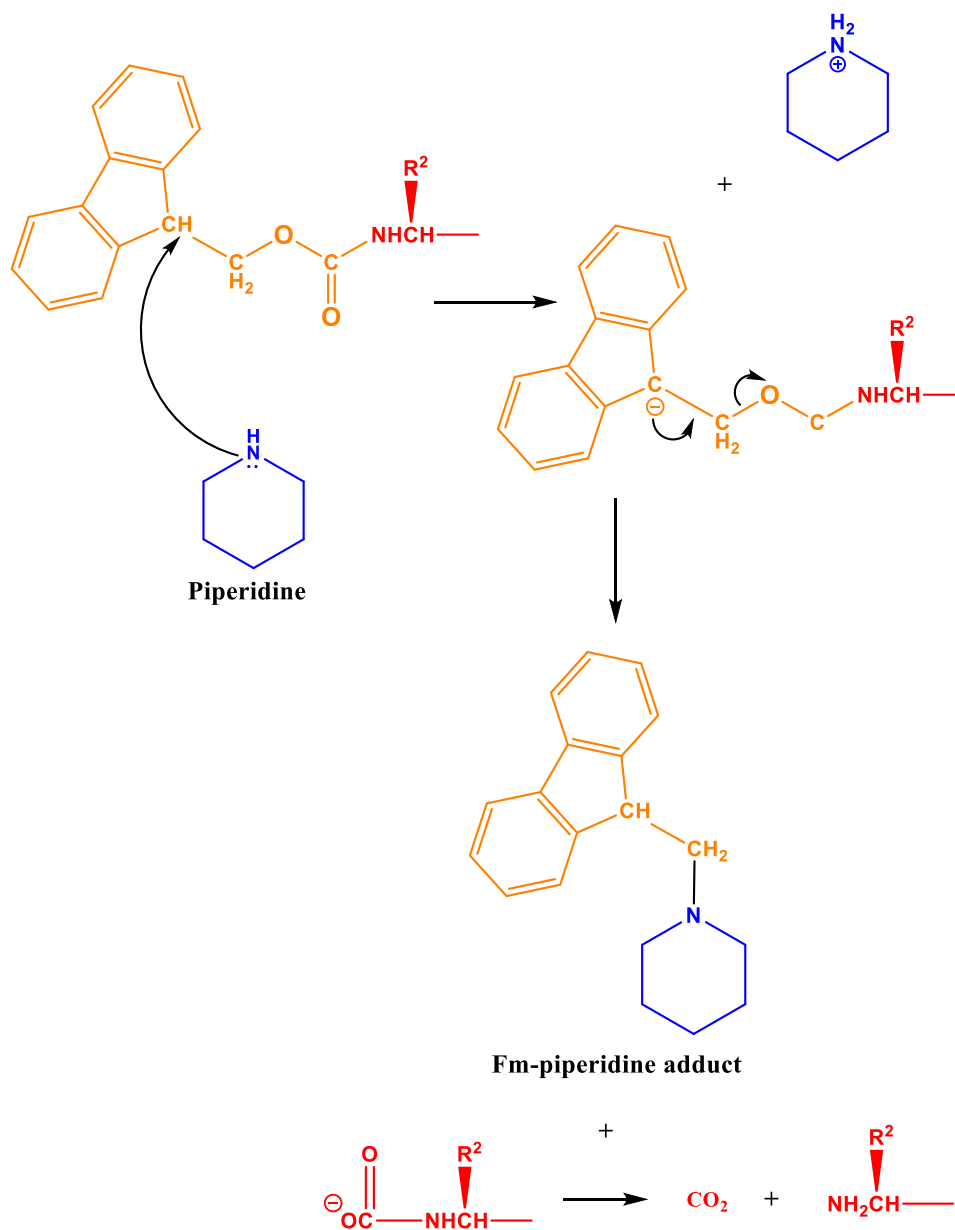
Εικόνα 19: Διαδικασία dialysis για την καθαρισμό του πολυμερούς από την προστατευτική ομάδα Fmoc

Η διαδικασία της διαπίδωσης λαμβάνει χώρα για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων από το DMF και της Fmoc από το πολυμερές διαμέσου των πόρων της μεμβράνης. Το pH του εξωτερικού διαλύματος ρυθμίζεται αρχικά στο 7.3 με προσθήκη 4-5 σταγόνων HCl 1N και με το πέρας 3h πραγματοποιείται αλλαγή του νερού με το ίδιο pH (7.3). Τις επόμενες ημέρες παρατηρείται μείωση του pH του νερού, οπότε πραγματοποιούνται διαδοχικές αλλαγές του ανά τακτές περιόδους με νέα ποσότητα και προσθήκη σταγόνων NaOH 1N, μέχρι να παρατηρηθεί σταθεροποίηση του pH στην περιοχή 7-7.4. Όταν το pH σταθεροποιηθεί, γίνονται ακόμα δύο αλλαγές νερού με σκέτο Milli-Q, ώστε να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια του NaOH. Η διαδικασία του dialysis διαρκεί 3 ημέρες και στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της λυοφιλοποίησης (freeze-drying), για την εκδίωξη του νερού από το πολυμερές. Το περιεχόμενο της μεμβράνης (πολυμερές διαλυμένο σε νερό) αποχύνεται σε σφαιρική φιάλη των 1000mL, η οποία παγώνεται με υγρό

άζωτο και προσαρμόζεται στον λυοφιλοποιοτή. Μετά την ξήρανσή του, το μερικώς αποπροστατευμένο ως προς την Fmoc πολυμερές, ζυγίζεται και φυλάσσεται στο ψυγείο. Συνοπτικά, τα στάδια που ακολουθούνται για την διαδικασία αποπροστασίας των δομικών μονάδων της πολυ(λυσίνης) δίνονται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 28).



Σχήμα 27:Στάδια αποπροστασίας των δομικών μονάδων της λυσίνης



Σχήμα 28: Αποπροστασία της ομάδας 9-φλουορένυλομεθοξυκαρβόνυλο (Fmoc) με βήτα-απόσπαση, με πιπεριδίνη που στη συνέχεια σχηματίζει ένα προϊόν προσθήκης.⁶⁰

Η αποπρωτονίωση της Fmoc επιτυγχάνεται με ανιόν υδροξειδίου που παράγει διβενζοφουλβένιο ή με πιπεριδίνη που στη συνέχεια σχηματίζει ένα προϊόν προσθήκης με το απελευθερωμένο τμήμα. Στο παραπάνω σχήμα πραγματοποιείται η αποπροστασία της ομάδας Fmoc με χρήση πιπεριδίνης⁵⁹. Τα τμήματα με βάση την ομάδα Fmoc είναι τα πιο κοινά προστατευτικά που

αφαιρούνται με β-απόσπαση. Είναι σταθερά σε όξινες συνθήκες αλλά ευαίσθητα σε ήπια υδατικές βασικές συνθήκες και δευτερογενείς αμίνες. Το H του C-9 εμφανίζει όξινο χαρακτήρα διότι το κυκλοπενταδιένυλο ανιόν που προκύπτει είναι αρωματικό και συνολικά προκύπτει αρωματικό σύστημα 14 π e. Η αποχωρούσα ομάδα είναι το καρβοξυλικό ανιόν (Σχήμα 28). Το προϊόν διβενζοφουλβένο έχει την τάση να πολυμερίζεται. Στην πράξη, χρησιμοποιείται δευτεροταγής αμίνη για την απομάκρυνση του πρωτονίου - το πυρηνόφιλο παγιδεύει επίσης το αποπρωτονιωμένο τμήμα που απελευθερώνεται. Η πιπεριδίνη είναι η αμίνη επιλογής για το σκοπό αυτό: Αποπρωτονιώνει και συνδυάζεται περαιτέρω με το προστατευτικό τμήμα στο τερματικό άτομο άνθρακα πριν σχηματιστεί ο διπλός δεσμός. Το προϊόν προσθήκης δεν είναι διαλυτό σε υδατικό οξύ, επομένως δεν μπορεί να απορριφθεί από εξαγωγή. Δεν παράγεται αέριο κατά τη διάρκεια της αποπροστασίας, έτσι το διοξείδιο του άνθρακα πρέπει να συνδέεται με την πιπεριδίνη ως αλάτι. Η 9-φλουορένυλομεθοξυκαρβόνυλο ομάδα είναι ανθεκτική στην όξινη λύση και, ως εκ τούτου, κάνει ορθογωνική σύνθεση με βάση βενζύλιο και τριτ-βουτύλιο. Ωστόσο, δεν είναι ορθογωνική προς βενζυλοπροστατευτικά εάν η μέθοδος διάσπασης είναι η απόσπαση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

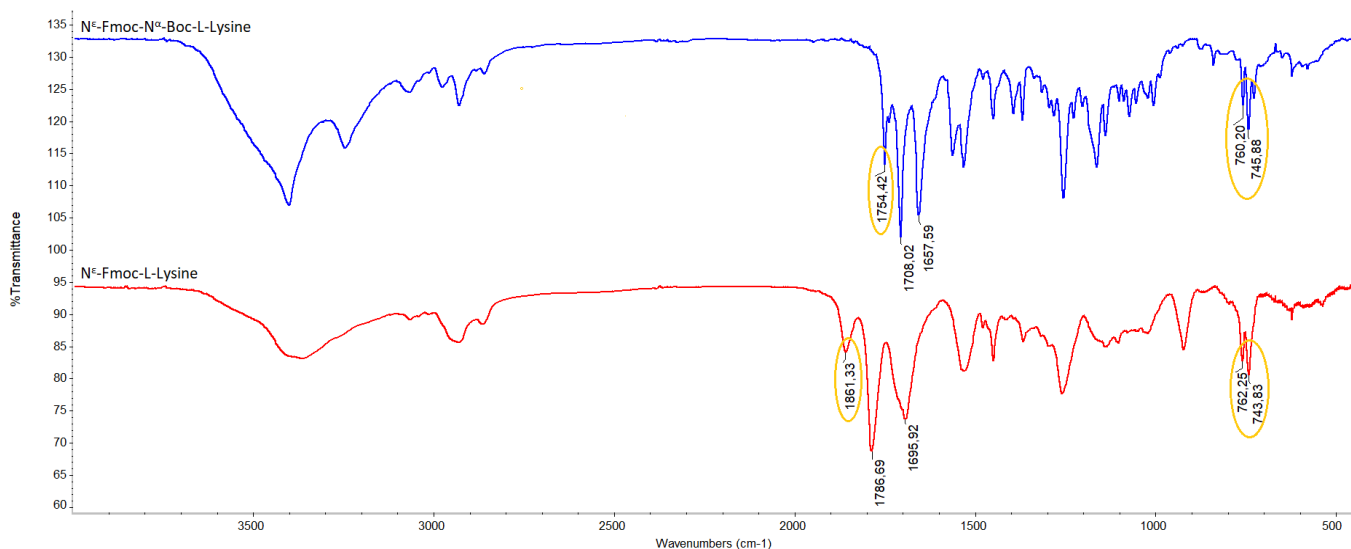
4.1 Χαρακτηρισμός του πρόδρομου αμινοξέος του N^{ϵ} -Fmoc- N^{α} -Boc- L-Lysine και του N^{ϵ} -Fluorenylmethoxycarbonyl- L-Lysine NCA (N^{ϵ} -Fmoc-L-Lysine NCA)

Η σύνθεση των N-Καρβοξυανυδριτών αποτελεί το πρώτο στάδιο στη σύνθεση καλά καθορισμένων δομών. Στην παρούσα εργασία η σύνθεση του NCA ελέγχθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου(IR) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού(NMR), τόσο στο πρόδρομο αμινοξύ αλλά και στα τελικά προϊόντα.

Η φασματοσκοπία υπερύθρου επιτρέπει τη γρήγορη και έγκυρη αναγνώριση των NCAs εφόσον υπάρχει πρότυπο φάσμα για σύγκριση. Επιπλέον όταν οι NCAs αρχίζουν να πολυμερίζονται κατά την παρατεταμένη αποθήκευσή τους, οι απορροφήσεις των καρβονυλίων σταδιακά εξαφανίζονται και παίρνουν την θέση τους οι χαρακτηριστικές των αμιδικών δεσμών.

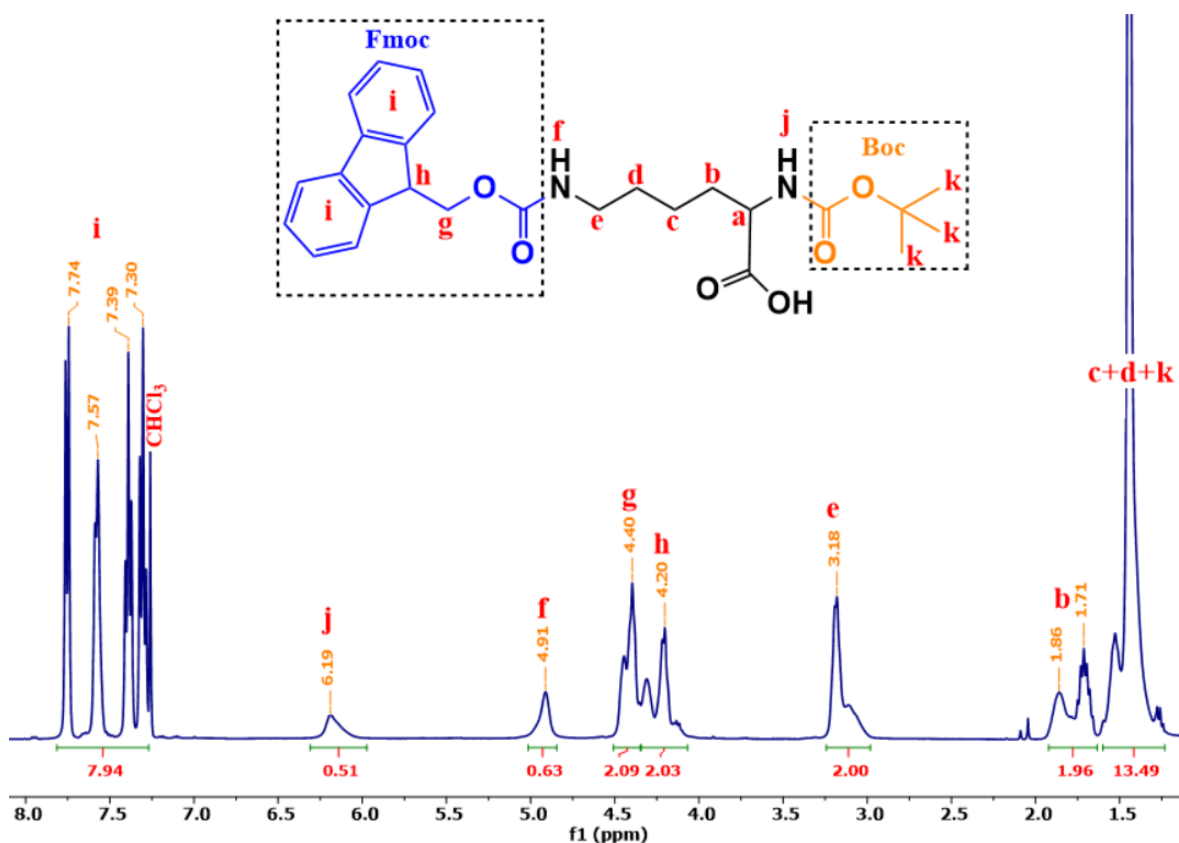
Στη σύνθεση του N^{ϵ} -Fmoc-L-Lysine NCA, κάθε στάδιο παρακολουθήθηκε ξεχωριστά με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Αρχικά, προηγείται η λήψη φάσματος IR της πρόδρομης ένωσης N^{ϵ} -Fmoc- N^{α} -Boc-L-Lysine. Παρατηρούνται τέσσερις χαρακτηριστικές κορυφές. Είναι εμφανής η χαρακτηριστική κορυφή στα d (1750 cm^{-1}) που αντιστοιχεί στην Boc προστατευτική ομάδα καθώς και οι κορυφές περίπου στα d (745 cm^{-1} , 760 cm^{-1}) και d (1705 cm^{-1}) οι οποίες οφείλονται στην Fmoc προστατευτική ομάδα, ενώ η κορυφή στα d (1655 cm^{-1}) αντιστοιχεί στη δόνηση του καρβονυλίου (C=O) του αμινοξέος της λυσίνης. Επίσης, στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος φαίνονται και οι απορροφήσεις των δονήσεων κάμψης των δεσμών =C-H οι οποίες παραμένουν μέχρι το τελικό στάδιο της διαδικασίας, πράγμα που δείχνει ότι δεν επηρεάζονται κατά τη σύνθεση του ανυδρίτη. Ακόμα, η δόνηση έκτασης του δεσμού -N-H εμφανίζεται στην ευρεία

περιοχή d (3000-3400 cm^{-1}). Σε επόμενο στάδιο, προστίθεται το τριφωσγένιο που χρησιμοποιείται ως μέσο χλωρίωσης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης κυκλοποίησης της Boc ομάδας. Εν συνεχεία, προστίθεται και τριαιθυλαμίνη η οποία λειτουργεί ως μέσο δέσμευσης του HCL. Μετά το τέλος της αντίδρασης (5h μετά), έχει δημιουργηθεί το υδροχλωρικό άλας του N-καρβοξυ ανυδρίτη της λυσίνης και παρατηρούνται διαφορές στο φάσμα IR της ένωσης. Στο φάσμα IR του τελικού *N*^F-Fmoc-L-Lys NCA, παρατηρείται ότι το αρχικό αμινοξύ της λυσίνης έχει μετατραπεί ποσοτικά σε ανυδρίτη, καθώς απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές δονήσεις στην περιοχή d (1650 cm^{-1}). Πιο συγκεκριμένα, απουσιάζει η κορυφή του αρχικού αμινοξέος στα d (1750 cm^{-1}), που επιβεβαιώνει τον σχηματισμό ανυδρίτη μεταξύ της Boc προστατευμένης α αμινομάδας και της α καρβοξυλομάδας αλλά και η κορυφή του υδροχλωρικού οξέος στα d (1655 cm^{-1}) που δείχνει ότι δεσμεύτηκε το HCl μετά την προσθήκη της τριαιθυλαμίνης. Ενώ οι κορυφές στα περίπου στα d (745 και 760 cm^{-1}) (δονήσεις των δεσμών $-\text{CH}=\text{CH}-$ των βενζολικών δακτυλίων) καθώς και d (1705 cm^{-1}) που αντιστοιχούν στην προστατευτική ομάδα Fmoc παραμένουν, πράγμα που δηλώνει ότι η προστατευτική ομάδα του μονομερούς παρέμεινε ανέπαφη καθ'όλη τη συνθετική πορεία. Παράλληλα, η εμφάνιση των δύο χαρακτηριστικών κορυφών στα d (1786 cm^{-1}) και d (1861 cm^{-1}), η πρώτη αφορά το καρβονύλιο του (C2) ενώ η δεύτερη αυτό στον (C5), αντιστοιχούν στη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση τάσης των καρβονυλίων του ανυδρίτη και υποδηλώνουν την επιτυχή σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη. Τέλος, απουσιάζει η κορυφή στους d (1650 cm^{-1}), που θα οφειλόταν στη δόνηση του καρβονυλίου του πεπτιδικού δεσμού, λόγω πιθανής έναρξης πολυμερισμού από την παρουσία υγρασίας, αν δεν διατηρούνταν αδρανείς συνθήκες σε όλα τα στάδια της συνθετικής πορείας.



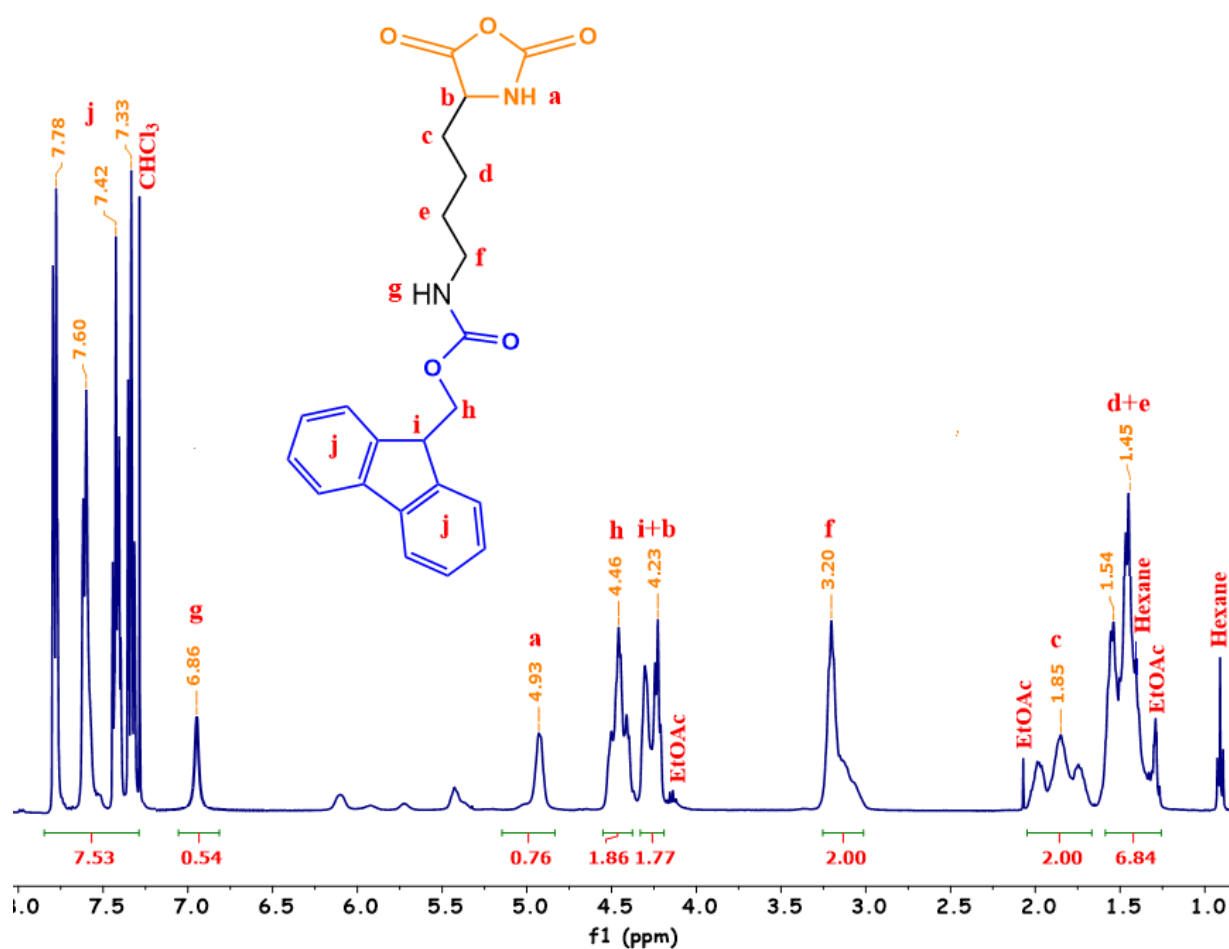
Σχήμα 29: Φάσματα IR πρόδρομου αμινοξέος N^ε-Fmoc-N^α-Boc-L-Lysine και του τελικού καθαρού N^ε-Fmoc-L-Lysine NCA

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της υψηλής καθαρότητάς του πρόδρομου αμινοξέος, έγινε λήψη φάσματος NMR σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃). Με φασματοσκοπία ¹H-NMR σε διαλύτη CDCl₃, εντοπίστηκαν όλα τα αναμενόμενα υδρογόνα του τελικού N^ε-Fmoc-N^α-Boc-L-Lysine. Όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα, ταυτοποιήθηκαν όλες οι κορυφές. Οι ολοκληρώσεις των κορυφών συμπίπτουν ακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1.4 (13H, -CH₂-), 1.71 (2H, -CH₂-), 3.18 (2H, -CH₂-NH), 4.20 (1H, -CH-), 4.40 (2H, -O-CH₂-, βενζυλικά), 4.91 (1H, -NH-), 6.19 (1H, -NH-), 7.30-7.74 (8H, τα αρωματικά H της προστατευτικής ομάδας).



Σχήμα 30: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του πρόδρομου αμινοξέος ($\text{N}^\epsilon\text{-Fmoc-N}^\alpha\text{-Boc-L-Lysine}$) σε CDCl_3

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της επιτυχούς σύνθεσης του προϊόντος, αλλά και της υψηλής καθαρότητάς του, έγινε λήψη φάσματος NMR σε διαλύτη CDCl_3 . Με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ σε διαλύτη CDCl_3 , εντοπίστηκαν όλα τα αναμενόμενα υδρογόνα του τελικού $\text{N}^\epsilon\text{-Fmoc-L-Lys NCA}$. Όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα, ταυτοποιήθηκαν όλες οι κορυφές, επιβεβαιώνοντας ολοκληρωτικά τη σύνθεση του N- καρβόξυ ανυδρίτη. Οι ολοκληρώσεις των κορυφών συμπίπτουν ακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.45 (2H, $-\text{CH}_2-$), 1.54 (2H, $-\text{CH}_2-$), 1.85 (2H, $-\text{CH}_2-$), 3.20 (2H, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$), 4.23 (1H, $-\text{CH-}$, του πενταμελούς δακτυλίου της προστατευτικής ομάδας), 4.46 (2H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$, βενζυλικά), 4.93 (1H, $-\text{NH-C=O-}$, της ε-αμίνης), 6.86 (1H, $-\text{NH-C=O-O-}$, βενζυλικά), 7.33-7.78 (8H, τα αρωματικά H της προστατευτικής ομάδας).



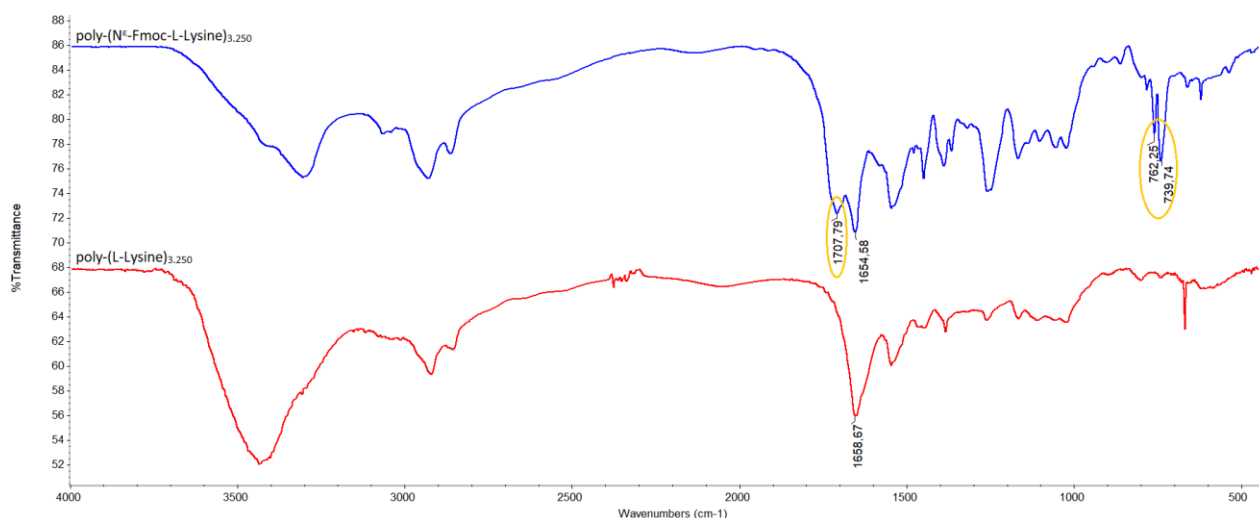
Σχήμα 31: Φάσμα ¹H-NMR του N-καρβοξυ ανυδρίτη της λυσίνης (N^ε-Fmoc-L-Lysine NCA) σε CDCl₃

4.2 Χαρακτηρισμός των προστατευμένων poly-(N^ε-Fmoc-L-Lysine) και αποπροστατευμένων ομοπολυμερών poly-(L-Lysine)

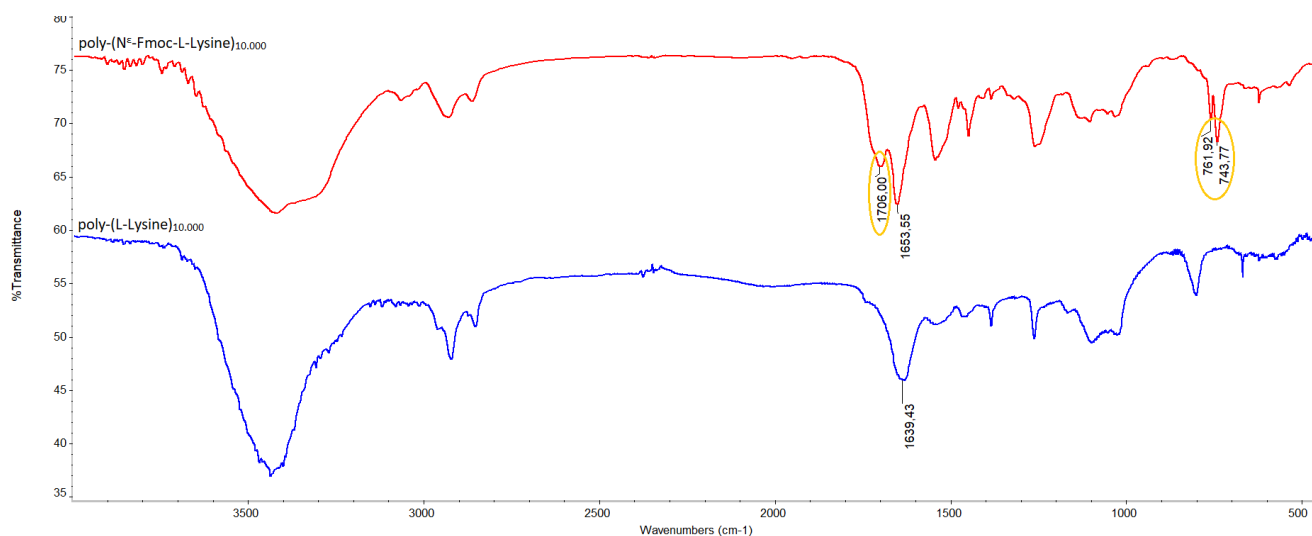
Για τη σύνθεση των συγκεκριμένων ομοπολυμερών πραγματοποιήθηκε πολυμερισμός του N^ε-Fmoc-L-Lysine NCA χρησιμοποιώντας ως απαρχητή εξυλαμίνη. Η εξέλιξη του πολυμερισμού και η κατανάλωση των μονομερών ελέγχθηκε σε πολλά στάδια με φασματοσκοπία FT-IR.

Αρχικά, συντέθηκαν τα πλήρως προστατευμένα ομοπολυμερή και στη συνέχεια με εκλεκτική αποπροστασία των μονομερικών μονάδων της πολυπεπτιδικής συστάδας δημιουργήθηκαν τα πλήρως αποπροστατευμένα ομοπολυμερή. Και τα στάδια της αποπροστασίας ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και $^1\text{H-NMR}$ για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία τους.

Πιο συγκεκριμένα, από τα φάσματα IR και των δύο ομοπολυμερών φαίνεται η ύπαρξη του πεπτιδικού δεσμού περίπου στα $d (1650\text{ cm}^{-1})$ καθώς και ότι μετά το στάδιο της αποπροστασίας των δομικών μονάδων της λυσίνης, στα φάσματα των πλήρως αποπροστατευμένων πολυμερών με μοριακά βάρη 3.250 και 10.000 απουσιάζει η κορυφή στην περιοχή $d (1700\text{ cm}^{-1})$ που οφείλεται στις δονήσεις κάμψης των δεσμών $=\text{C-H}$ της προστατευτικής ομάδας Fmoc καθώς και οι κορυφές της στα $d (739\text{ cm}^{-1})$ και $d (762\text{ cm}^{-1})$, πράγμα που υποδηλώνει την επιτυχία της αντίδρασης αποπροστασίας των δομικών μονάδων της λυσίνης. Ενώ παρατηρούμε σταθερά στην περιοχή περίπου στα $d (1650\text{ cm}^{-1})$ μια κορυφή που οφείλεται στον πεπτιδικό δεσμό.

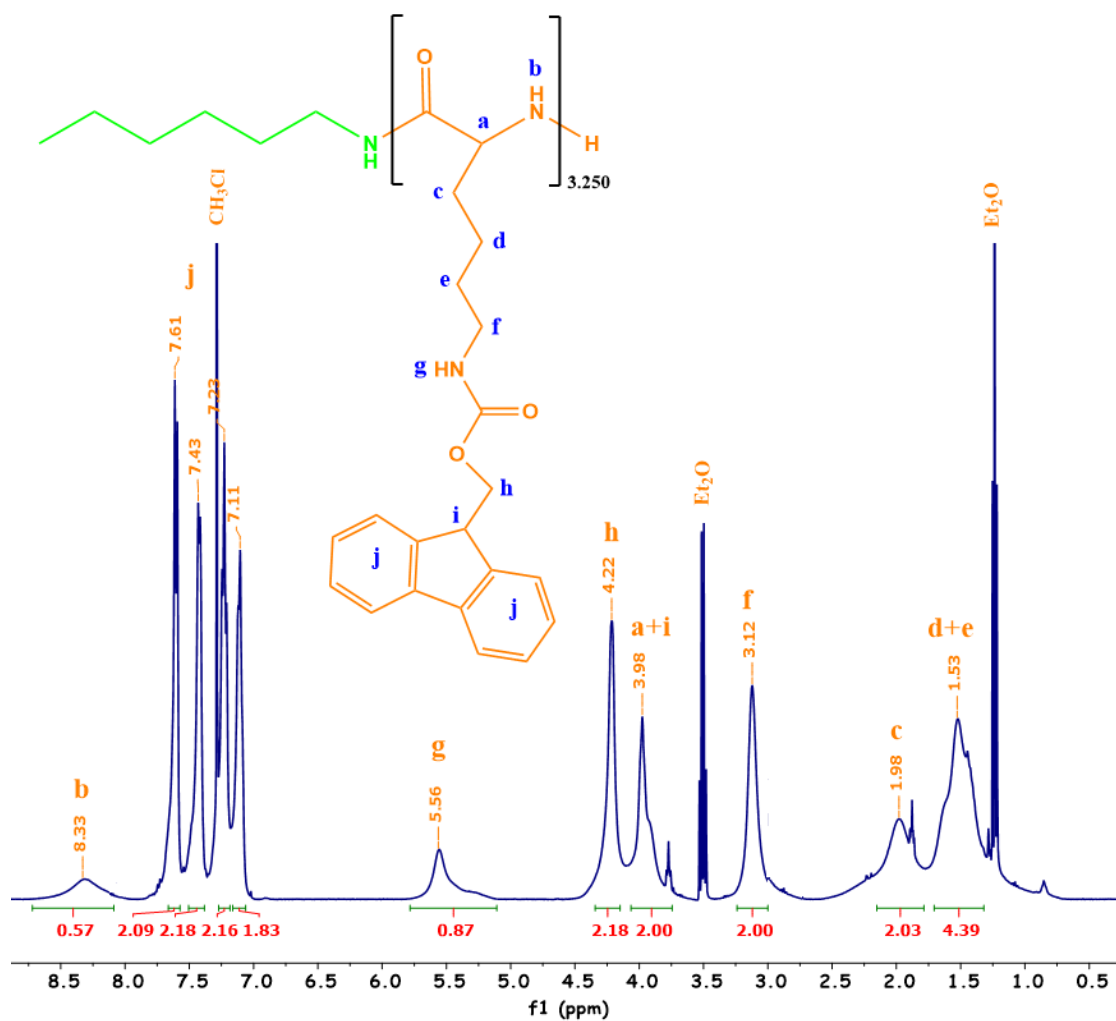


Σχήμα 32: Φάσματα IR του προστατευμένου poly-(N^E-Fmoc-L-Lysine)₃₂₅₀ και αποπροστατευμένου ομοπολυμερούς poly-(L-Lysine)₃₂₅₀

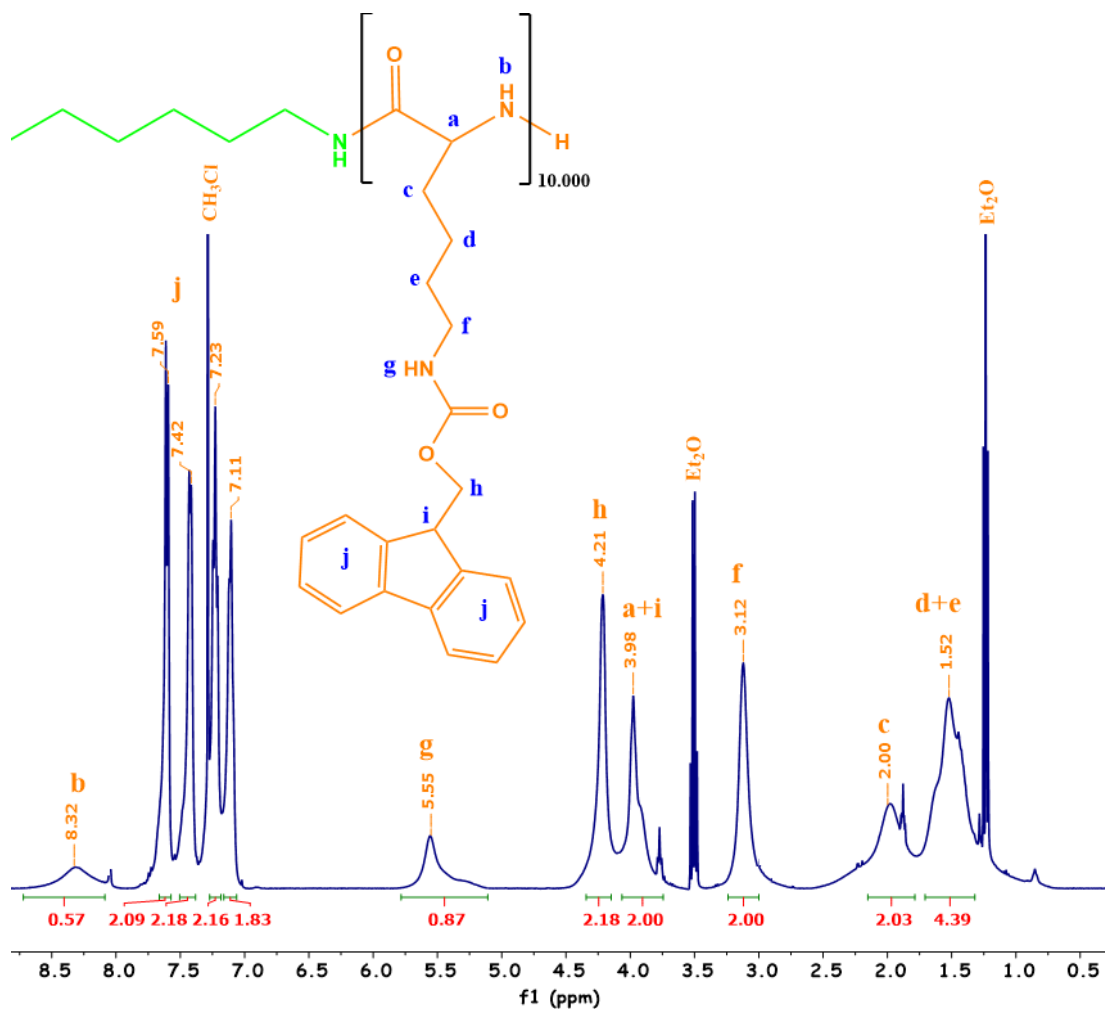


Σχήμα 33: Φάσματα IR του προστατευμένου poly-(N^ε-Fmoc-L-Lysine)_{10.000} και αποπροστατευμένου ομοπολυμερούς poly-(L-Lysine)_{10.000}

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της επιτυχούς σύνθεσης των προϊόντων, αλλά και της υψηλής καθαρότητάς του, έγινε λήψη φάσματος NMR σε διαλύτη CDCl₃. Παρατηρείται ότι οι ολοκληρώσεις των εμβαδών των κορυφών συμπίπτουν ακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1.53 (4H, (-CH₂-CH₂-), 1.98 (2H, -CH₂-), 3.12 (2H, -CH₂-), 3.98 (2H, -CH-), 4.22 (2H, -CH₂-O-C=O-, βενζυλικά), 5.56 (1H, -NH-) του backbone του πολυμερούς, ευκίνητο, 7.43-7.61 (8H, =C-H, τα αρωματικά υδρογόνα της προστατευτικής ομάδας), 8.33 (1H, -CH-NH-H-, ευκίνητο).

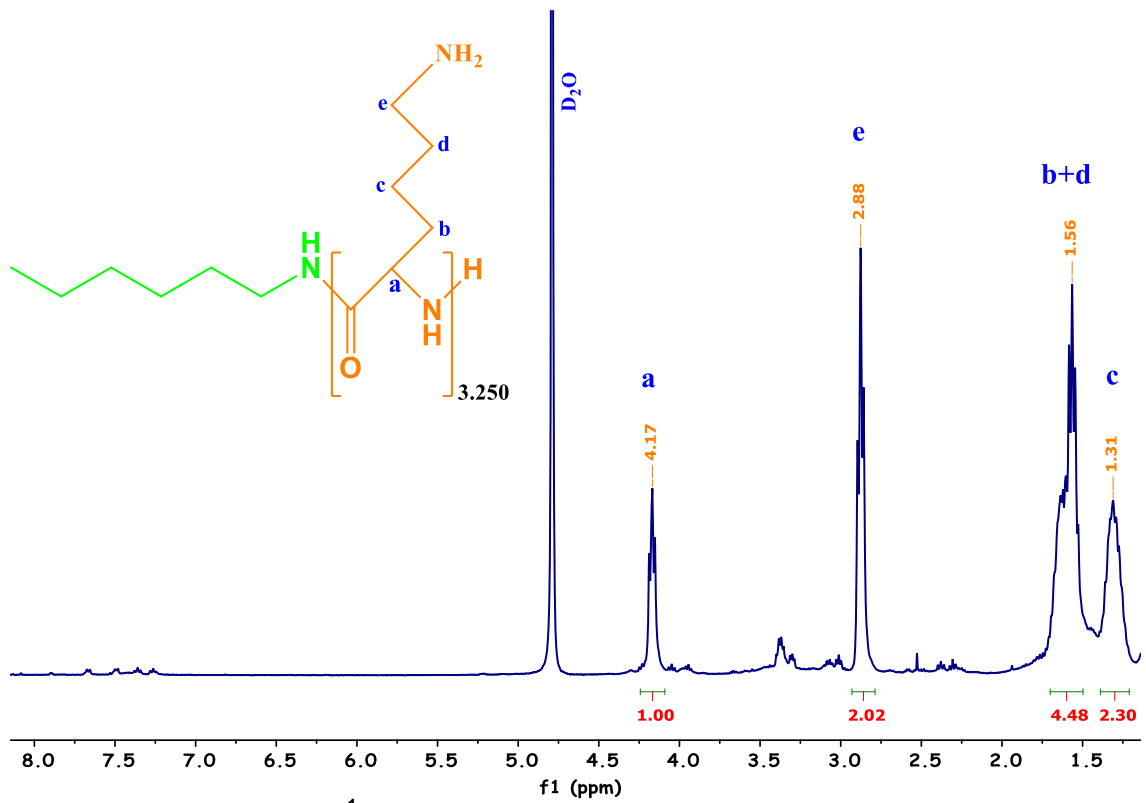


Σχήμα 34: Φάσμα ¹H-NMR του προστατευμένου poly-(N^ε-Fmoc-L-Lysine)₃₂₅₀

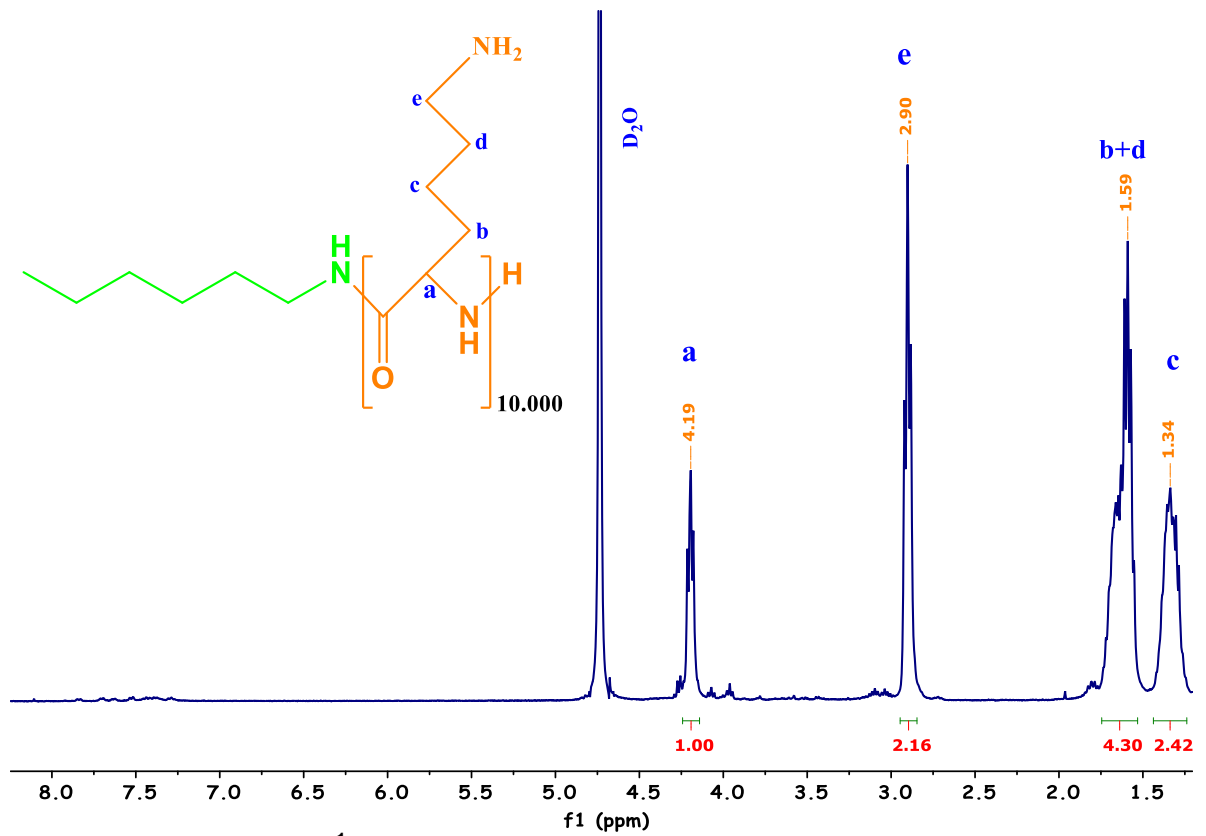


Σχήμα 35: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του προστατευμένου $\text{poly-(N}^\epsilon\text{-Fmoc-L-Lysine)}_{10.000}$

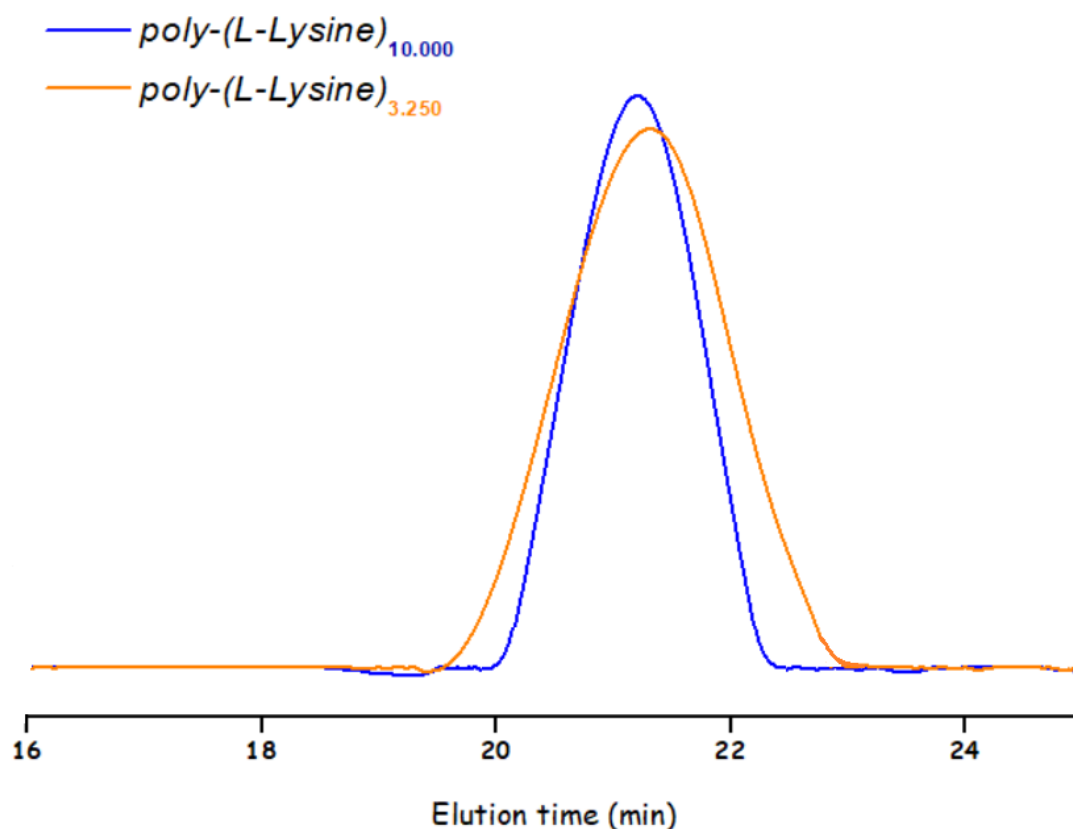
Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της επιτυχούς σύνθεσης των αποπροστατευμένων ομοπολυμερών, αλλά και της υψηλής καθαρότητάς του, έγινε λήψη φάσματος NMR σε διαλύτη D_2O . Παρατηρείται ότι οι ολοκληρώσεις των εμβαδών των κορυφών συμπίπτουν ακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. Επίσης, οι κορυφές στα (7.00-7.8)ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα αρωματικά H του δακτυλίου της προστατευτικής ομάδας Fmoc, απουσιάζουν και στα δύο φάσματα αποδεικνύοντας την επιτυχή αποπροστασία της Fmoc. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , δ , ppm): 1.31 (2H, $-\text{CH}_2-$), 1.56 (4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.88 (2H, $-\text{CH}_2-$), 4.17 (1H, $-\text{CH}-\text{NH}-$).



Σχήμα 36 : Φάσμα ¹H-NMR του αποπροστατευμένου poly-(L-Lysine)₃₂₅₀



Σχήμα 37: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του αποπροστατευμένου poly-(L-Lysine) $_{10.000}$



Σχήμα 38 : Χρωματογράφημα Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC) για τα αποπροστατευμένα ομοπολυμερή poly-(L-Lysine)_{10.000} και poly-(L-Lysine)_{3.250}

Τα μοριακά βάρη των πολυμερών δεν ανταποκρίνονται στα πραγματικά μοριακά βάρη αλλά σε συσσωματώματα αυτών. Παρατηρούμε από το χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγεθών SEC (σε διαλύτη H₂O) του αποπροστατευμένου ομοπολυμερούς με μοριακό βάρος 10.000 που παρατίθεται σε άμεση συσχέτιση με αυτό του αποπροστατευμένου ομοπολυμερούς με μοριακό βάρος 3.250, ότι το πρώτο εκλούεται σε μικρότερους χρόνους έκλουσης. Αυτό είναι αναμενόμενο, διότι στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών ο διαχωρισμός γίνεται με βάση τον υδροδυναμικό όγκο των πολυμερών, έτσι τα πολυμερή που έχουν μεγαλύτερο υδροδυναμικό όγκο εκλούνται σε μικρότερους χρόνους λόγω της μικρότερης κατακράτησής τους από τη στήλη.

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.

Πρώτα από όλα, διαπιστώθηκε η επιτυχής σύνθεση του N- καρβόξυ ανυδρίτη της N^{ϵ} -Fmoc- N^{α} -Boc-L-λυσίνης που πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά στα πλαίσια πειραμάτων του εργαστηρίου μας και η επιτυχής σύνθεση και καθαρισμός των προστατευμένων ομοπολυμερών poly-(N^{ϵ} -Fmoc-L-Lys). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των ομοπολυμερών και η αποπροστασία τους με πιπεριδίνη με σκοπό τη λήψη καλά καθορισμένων πλήρως αποπροστατευμένων πολυμερών poly-(N^{ϵ} -Fmoc-L-Lys)₃₂₅₀ και poly-(N^{ϵ} -Fmoc-L-Lys)₁₀₀₀₀. Οι N- καρβόξυ ανυδρίτες που φέρουν τη συγκεκριμένη προστατευτική ομάδα, Fmoc, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ορθογωνική σύνθεση καθώς αποπροστατεύονται με ισχυρά βασικές συνθήκες. Συνεπώς μπορούν να δημιουργηθούν πολύπλοκες αρχιτεκτονικές πολυπεπτιδικών πολυμερών προς σχηματισμό ανώτερων δικτυωμένων υπερμοριακών δομών οι οποίες φέρουν προστατευτικές ομάδες που αποπροστατεύονται σε τελείως διαφορετικές συνθήκες με απώτερο σκοπό να αποτελέσουν έξυπνα νανοσυστήματα για την μεταφορά και την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Τέλος, τα πολυμερή αυτά μπορούν να εμβολιαστούν επιτυχώς σε νανοσωματίδια πυριτίας για την δημιουργία «έξυπνων» νανοςύνθετων υλικών για βιοϊατρικές εφαρμογές. Η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών αλλά και του μονομερούς επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές της SEC, του NMR και του IR. Στο μέλλον, θα μπορούσε να γίνει δοκιμή εγκλωβισμού κάποιου φαρμάκου στο εσωτερικό αυτών των νανοδομών, καθώς και ο έλεγχος της αποδέσμευσης αυτού. Επίσης, θα μπορούσε να γίνει πρόσδεση ομάδων που θα ενισχύουν την αποκρισιμότητα του πολυμερούς έναντι κάποιου καρκινικού στόχου.

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

ROP	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
NCA	N-Καρβόξυ ανυδρίτης
HVL	Γραμμή υψηλού κενού
RROP	Ριζικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
AROP	Ανιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
CROP	Κατιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
ROMP	Πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου
PDMS	Πολυ(διμεθυλοσιλοξάνη)
HVT	Τεχνικές υψηλού κενού
NAM	Κανονικός μηχανισμός αμινών
AMM	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
Au-NPs	Νανোসωματίδια χρυσού
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
GSH	Γλουταθειόνη
IR	Υπέρυθρη ακτινοβολία
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

SEC (ή GPC)	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
FID	Ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή
NOE	Nuclear Overhauser effect
FDA	Αμερικανική υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων
N ^ε -Fmoc-N ^α -Boc-L-Lysine	N ^ε -9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ-N ^α -tert-βουτυλοξυκαρβόνυλ-L-Λυσίνη
N ^ε -Fmoc-L-Lysine NCA	N ^ε -9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ- L-Λυσίνη
Poly-(N ^ε -Fmoc-L-Lysine)	Poly-(N ^ε -9-φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλ-L-Λυσίνη)
LCST	Χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
HVL	Γραμμή υψηλού κενού
CaH ₂	Υδρίδιο του ασβεστίου
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DMA	Διμεθυλαμίνη
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
DCM	Διχλωρομεθάνιο
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
THF	Τετραϋδροφουράνιο
DNP	Δινιτροφαινυλο
DTT	1,4-διθειοθρεϊτόλη

n-hexylamine	Εξυλαμίνη
PLys	Poly(L-Lysine)
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
(iPr) ₃ SiH	Τρισοππροπυλοσιλάνιο
MWCO	Όριο αποκλεισμού μοριακών βαρών
H ₂ O ₂	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
CDCl ₃	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος
Tris	Τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο
PTFE	Πολυ(τετραφθοροαιθυλενιο)
Rg	Γυροσκοπική ακτίνα
Rh	Υδροδυναμική ακτίνα

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
Chiral	Χειρόμορφο
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
Vesicle	Κυστίδιο
Stimuli-responsive	Αποκρίσιμο σε εξωτερικά ερεθίσματα
Multi-responsive	Πολλαπλά αποκρίσιμο
Cross-linker	Μέσο δικτύωσης

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

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. M. L. Adams, A. Lavasanifar, G. S. Kwon, Amphiphilic block copolymers for drug delivery, *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 1343-1355.
5. M. Lazzari, G. Liu, S. Lecommandoux, *Block Copolymers in Nanoscience*, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2006**.
6. M. Li, Z. Tang, H. Sun, J. Ding, W. Song, X. Chen, pH and reduction dual-responsive nanogel cross-linked by quaternization reaction for enhanced cellular internalization and intracellular drug delivery, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 1199-1207.
7. G. S. Kumbar, C. T. Laurencin, M. Deng, *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, 1st ed. Elsevier Inc.: Burlington, **2014**.
8. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, *Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine*, 3rd ed. Elsevier Academic Press: Oxford, **2013**.
9. Α. Καρατζάς, *Μακρομοριακή Αρχιτεκτονική Πολυπεπτιδίων*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2007**.
10. 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.

11. C. He, X. Zhuang, Z. Tang, H. Tian, X. Chen, Stimuli-sensitive synthetic polypeptide-based materials for drug and gene delivery, *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, *1*, 48-78.
12. Amino Acid Protecting Groups, Albert Isidro-Llobet,† Mercedes A´ lvarez,* and Fernando Albericio,*r-Amino-Protecting Groups removed by Acid* Chemical Reviews, 2009, Vol 109, No 6459, April 28, **2008**
13. O. Nuyken, S. D. Pask, Ring-opening polymerization—An introductory review, *Polymers* **2013**, *5*, 361-403.
14. P. Dubois, O. Coulembier, J.-M. Raquez, Handbook of Ring-Opening Polymerization, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2009**.
15. M. Goodman, J. Hutchison, The mechanisms of polymerization of N-unsubstituted N-carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3627-3630.
16. T. J. Deming, Synthesis and self-assembly of well-defined block copolypeptides via controlled NCA polymerization, *Adv. Polym. Sci.* **2013**, *262*, 1-38.
17. T. J. Deming, *Peptide-Based Materials*, 1st ed. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2012**.
18. T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, Living polypeptides, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1653-1656.
19. H. R. Kricheldorf, *α -Aminoacid N-carboxyanhydrides and Related Heterocycles*, 1st ed. Springer-Verlag: New York, **1987**.
20. N. M. B. Smeets, P. L. J. van der Weide, J. Meuldijk, J. A. J. M. Vekemans, and L. A. Hulshof, A Scalable Synthesis of L-Leucine-N-carboxyanhydride, *Organic Process Research & Development* **2005**, *9*, 757-763
21. C. Demetzos, N. Pippa, Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): a mini-review, *Drug Deliv.* **2014**, *21*, 250-257.
22. 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.

23. M. Πιτσικάλης, M. Χατζηχρηστίδη, *Ειδικά Θέματα Επιστήμης Πολυμερών*, ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2010**.
24. U. Kedar, P. Phutane, S. Shidhaye, V. Kadam, Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting, *Nanomedicine* **2010**, *6*, 714-729.
25. Σ. Βάρλας, *Εγκλωβισμός Φαρμάκων σε Πολυπεπίδια*. Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2014**.
26. T. J. Deming, Synthetic polypeptides for biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 858-875.
27. 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.
28. 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.
29. Y. Li, D. Maciel, J. Rodrigues, X. Shi, H. Tomás, Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8564-8608.
30. J. Huang, A. Heise, Stimuli responsive synthetic polypeptides derived from N-carboxyanhydride (NCA) polymerization, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7373-7390.
31. 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.
32. 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.

33. 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.
34. 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.
35. R. L. McCarley, Redox-responsive delivery systems, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, 5, 391-411.
36. 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.
37. Meiwang Chen, Yu Yang, Ligeng Xu, Wenjun Zhu, One-pot synthesis of pH-responsive charge-switchable PEGylated nanoscale coordination polymers for improved cancer therapy, *Biomaterials* 156, **2018**, 121e133
38. Gijs J. M. Habraken, Cor E. Koning, Johan P. A. Heuts and Andreas Heise, Thiol chemistry on well-defined synthetic polypeptides, *Chem. Commun.*, **2009**, 3612-3614
39. Xuesi Chen, Jianxun Ding, Fenghua Shi, Chunsheng Xiao, One-step preparation of reduction-responsive poly(ethylene glycol)-poly (amino acid)s nanogels as efficient intracellular drug delivery platforms, *Polym. Chem.*, **2011**, 2, 2857
40. Kang Wang, Guo-Feng Luo, Yun Liu, Redox-sensitive shell cross-linked PEG-polypeptide hybrid micelles for controlled drug release, *Polym. Chem.*, **2012**, 3, 1084
41. B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1st ed. Wiley: Weinheim, **2004**.
42. J. McMurry, *Organic Chemistry*, 7th ed. Thomson Learning, Inc: Belmont, **2008**.
43. Ν. Χατζηχρηστίδης, Κ. Βύρας, Ε. Ιατρού, Σ. Πίσπας, Μ. Πιτσικάλης, Π. Πίσσης, *Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών*, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **1998**.

44. H. G. Barth, J. W. Mays, *Modern Methods of Polymer Characterization*, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1991**.
45. Ν. Χατζηχρηστίδης, Μ. Πιτσικάλης, Ε. Ιατρού, *Βιομηχανική Χημεία*, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2011**.
46. Ι. Teraoka, *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **2002**.
47. Α.-Γ. Πίππα, *Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία: Μελέτη της μορφολογίας χιμαιρικών συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2015**.
48. Δ. Σκουλάς, *Σύνθεση Συμπολυμερών Πολυαιθυλενοξειδίου και Ιστιδίνης με γ-Βενζυλεστέρα του Γλουταμικού Οξέος και Επίδραση του Εστέρα στο pKa της Πολυιστιδίνης*. Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2014**.
49. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, Anionic polymerization: High vacuum techniques, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2000**, 38, 3211-3234.
50. D. Uhrig, J. W. Mays, Experimental techniques in high-vacuum anionic polymerization, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 6179-6222.
51. N. Hadjichristidis, A. Hirao, *Anionic Polymerization: Principles, Practice, Strength, Consequences and Applications*, 1st ed. Springer: Japan, **2015**.
52. I. W. Hamley, S. Kirkham, A. Dehsorkhi, V. Castelletto, J. Adamcik, R. Mezzenga, J. Ruokolainen, C. Mazzuca, E. Gato, M. Venanzi, E. Placidi, P. Bilalis, H. Iatrou, Self-assembly of a model peptide incorporating a hexa-histidine sequence attached to an oligo-alanine sequence, and binding to gold NTA/nickel nanoparticles, *Biomacromolecules* **2014**, 15, 3412-3420.
53. G. J. M. Habraken, C. E. Koning, J. P. A. Heuts, A. Heise, Thiol chemistry on well-defined synthetic polypeptides, *Chem. Commun.* **2009**, 3612-3614.
54. B. J. Sparks, J. G. Ray, D. A. Savin, C. M. Stafford, D. L. Patton, Synthesis of thiol-clickable and block copolypeptide brushes via nickel-

- mediated surface initiated polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides (NCAs), *Chem. Commun.* **2011**, 47, 6245-6247.
55. N. V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, Reversible redox cleavage/coupling of polystyrene with disulfide or thiol groups prepared by atom transfer radical polymerization, *Macromolecules* **2002**, 35, 9009-9014.
56. X. Wu, L. Zhou, Y. Su, C.-M. Dong, An autoreduction method to prepare plasmonic gold-embedded polypeptide micelles for synergistic chemophotothermal therapy, *J. Mater. Chem. B* **2016**, 4, 2142-2152.
57. András Micsonai, Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2015** Jun , 154-159
58. Andras Micsonai, BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Research*, **2018**, Vol. 46, Web Server issue W315–W322
59. Henry S. Ashbaugh and Michael E. Paulaitis, Monomer Hydrophobicity as a Mechanism for the LCST Behavior of Poly(ethylene oxide) in Water, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, 45, 5531-5537
60. Albert Isidro-Llobet,† Mercedes A´lvarez,* and Fernando Albericio, α -Amino-Protecting Groups Removed by Acid, *Chemical Reviews*, 2009, Vol. 9, No. 6 2459, **2008**
61. LA Carpino, GY Han. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J Org Chem* 37, 3404, 1972. *Chemistry of Peptide Synthesis*, Protectors and Method Of Deprotection, Deprotection by beta-elimination: 9-fluorenylmethyl-based protectors, Vol. 76, **2006**.

