



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Σύνθεση αμφίφιλων συμπολυμερών βασισμένα στα
πολυπεπτίδια με ομάδες για στοχοποίηση
καρκινικών κυττάρων**

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΧΡΙΣΤΑΚΟΠΟΥΛΟΣ
ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2021

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σύνθεση αμφίφιλων συμπολυμερών βασισμένα στα πολυπεπτίδια με ομάδες για στοχοποίηση καρκινικών κυττάρων

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

A.M.: 001511

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ερμόλαος Ιατρού, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Ερμόλαος Ιατρού, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μαρίνος Πιτσικάλης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Δήμας, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανε/μιο Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ερμόλαος Ιατρού, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μαρίνος Πιτσικάλης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Δήμας, Αναπληρωτής Καθηγητής Παν/μιο Θεσσαλίας

Απόστολος Αυγερόπουλος, Καθηγητής Παν/μιο Ιωαννίνων

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Σακελλαρίου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μαργαρίτα Χατζηχρηστίδη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 27/07/2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών του τύπου GA-PEG-PH_{is}, με σκοπό τη χρήση τους ως φορείς αντικαρκινικών φαρμάκων. Επίσης μελετήθηκε η συμπεριφορά αυτών των πολυμερών σε υδατικά διαλύματα διαφόρων pH, με σκοπό την εξακρίβωση φαινομένων συσσωμάτωσης.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του υδρόφιλου τμήματος του συμπολυμερούς, το οποίο αποτελείται από την πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του ανιοντικού πολυμερισμού, κατά την οποία λήφθησαν πολυμερή με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή της δραστικής ουσίας 18β-γλυκυρρητινικό οξύ, το οποίο αποτελεί ομάδα-στοχευτή καρκινικών κυττάρων. Επίσης πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του α-άκρου του PEG, προκειμένου να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες, για τον πολυμερισμό του NCA της Nim(trt)-Ιστιδίνης.

Ο πολυμερισμός του NCA της Ιστιδίνης πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες υψηλού κενού με την τεχνική του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP). Ακολούθησε η αποπροστασία των τρίτυλο προστατευτικών ομάδων που βρίσκονται στον ιμιδαζολικό δακτύλιο της Ιστιδίνης, δίνοντας τα τελικά πολυμερή GA-PEG-PH_{is}.

Οι τεχνικές χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του βαθμού συσσωμάτωσης, περιλαμβάνουν κυκλικό διχρωισμό (CD), ζ-δυναμικό (PALS) και δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Πολυμερή, Αμφίφιλα Συμπολυμερή, Πολυπεπτίδια, N-Καρβοξυανυδρίτες, Πολυ(ιστιδίνη), Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων.

ABSTRACT

Synthesis and characterization of the amphiphilic block copolymer GA-PEG-PHis was conducted in this thesis, in order to make an efficient drug delivery system. For this purpose, the aggregation rate was also studied for these polymers.

The synthesis of the hydrophilic block was conducted at first, which consist of the polymer polyethylene glycol. For this synthesis the technique of anionic polymerizations was used, giving polymers, of well defined molecular characteristics.

The addition of the 18 β -glycyrrhetic acid was then occurred, which constitutes the targeting agent to the cancer cells. In addition the a-end of the PEG was modified in order to use it as the macroinitiaton, for the polymerization of the Nim(trt) Histidine NCA.

The polymerization of the NCA was conducted via the ring opening polymerization (ROP) technique, under high vaccum, using a high vaccum line. Furthermore, the PHis block was deprotected from the trityl groups, resulting the final amphiphilic block copolymers GA-PEG-PHis.

The study for the aggregation was then occurred. For this purpose, cyclic dichroism (CD), ζ -potential (PALS) and dynamic light scattering were the methods used in order to determine the aggregation rate.

SUBJECT AREA: Polymers.

KEYWORDS: Polymers, Amphiphilic Block Copolymers, Polypeptides, N-Carboxyanhydrides (NCAs), Poly(L-histidine), Drug Delivery Systems.

Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου πρωτίστως στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ερμόλαο Ιατρού για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διατριβή μου στο Εργαστήριο Πολυμερών και για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Ακολούθως θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον καθηγητή Πιτσικάλη Μαρίνο και τον αναπληρωτή καθηγητή Δήμα Κωνσταντίνο για τις χρήσιμες πληροφορίες και εργαστηριακές συμβουλές που μου παρείχαν.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Σακελλαρίου Γεώργιο, για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο της Επιστήμης Πολυμερών, για το ιδιαίτερα ευχάριστο και φιλικό κλίμα που δημιούργησαν όλα τα χρόνια της παρουσίας μου στο Εργαστήριο Πολυμερών. Ειδικότερα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Ιατρού, καθώς και το διδάκτορα Μυγιάκη Εμμανουήλ και τον υποψήφιο διδάκτορα Πανταζίδα Χρήστο για την ουσιαστική συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων και των μετρήσεων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
1. Ανιοντικός Πολυμερισμός	21
1.1. Κατά συστάδες πολυμερή με ανιοντικό πολυμερισμό.....	24
1.2. Σύνθεση ακροδραστικών πολυμερών με ανιοντικό πολυμερισμό.....	25
2. Σύνθεση πολυαμινοξέων	26
2.1. Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των N- καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων (NCA's)	26
2.2. Κανονικός μηχανισμός αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM) ..	27
2.3. Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (Active Monomer, AM) ..	28
2.4. Πολυμερισμός μέσω πρωτοταγών αμινών	30
2.5. Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCAs).....	34
2.5.1. Φωσγενίωση ελεύθερων αμινοξέων (Fuchs-Farthing method).....	35
2.5.2. Παραλλαγές στην μέθοδο Fuchs-Farthing.....	36
3. Υβριδικά κατά συστάδες συμπολυμερή	39
3.1. Συμβατικές μέθοδοι σύνθεσης υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών	39
3.2. Ελεγχόμενα συστήματα για τη σύνθεση υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών	45
4. Αποκρινόμενα πολυμερικά μικύλλια	50
4.1. Μικύλλια που αποκρίνονται σε αλλαγές του pH.....	51
4.2. Μικύλλια που αποκρίνονται σε αλλαγές της θερμοκρασίας	51
4.3. Μικύλλια που αποκρίνονται σε φαινόμενα οξειδωσης/αναγωγής	52
4.4. Μικύλλια που αποκρίνονται σε περιβάλλον με μαγνητικό πεδίο	54
4.5. Μικύλλια που αποκρίνονται σε πολλαπλά ερεθίσματα	55

4.6.	Μικύλλια που φέρουν ακραίες ομάδες-στοχευτές	55
5.	Μοριακός χαρακτηρισμός	56
5.1.	Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR).....	56
5.2.	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR)	57
5.3.	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)	60
5.4.	Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)	63
5.5.	Κυκλικός διχρωσμός (CD).....	68
5.6.	ζ – δυναμικό (ζ – potential)	70
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	73
6.	Τεχνική υψηλού κενού (HVT).....	73
7.	Καθαρισμός μονομερών, απαρχητών και αντιδραστηρίων	76
7.1.	Αιθυλενοξειδίο.....	76
7.2.	Αλλυλική αλκοόλη.....	77
7.3.	3 - άζιδο - 1 - προπανόλη	77
7.4.	Τριαθυλαμίνη	78
7.5.	Προπαργυλαμίνη	78
7.6.	Ναφθαλίνιο	79
8.	Καθαρισμός Διαλυτών	79
8.1.	Διμέθυλο Φορμαμίδιο (DMF)	79
8.2.	Οξικός Αιθυλεστέρας (EtAc).....	80
8.3.	Εξάνιο	80
8.4.	Τετραϋδροφουράνιο (THF)	80
8.5.	Βενζόλιο.....	81
8.6.	Μεθανόλη	81
9.	Σύνθεση και καθαρισμός των N- Καρβοξυανυδριτών (NCAs) των αμινοξέων.....	82

9.1.	Σύνθεση του NCA του γ-βένζυλο L- γλουταμικού οξέος (BLG – NCA)	83
9.2.	Σύνθεση του NCA της τρίτυλο L- ιστιδίνης (N ^{im} -trityl-(L)-His NCA) ...	85
10.	Σύνθεση μακροαπαρχητών.....	88
10.1.	Σύνθεση mPEG–NH ₂ από εμπορικώς διαθέσιμο mPEG-OH	88
10.2.	Σύνθεση διδραστικού N ₃ -PEG-NH ₂ με ανιοντικό πολυμερισμό	89
10.3.	Σύνθεση διδραστικού NH ₂ -PEG-OH με ανιοντικό πολυμερισμό ...	93
11.	Σύνθεση υβριδικών δισυσταδικών συμπολυμερών PEG- <i>b</i> -P(L-His).	94
12.	Εισαγωγή βιομορίων στο ω-άκρο του συνθετικού πολυμερούς.....	97
12.1.	Σύζευξη φολικού οξέος.....	97
12.2.	Σύζευξη γλυκυρρητινικού οξέος.....	99
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....		100
13.	Σύνθεση των NCAs των α-αμινοξέων.....	100
13.1.	Σύνθεση BLG-NCA.....	100
13.2.	Σύνθεση (trt)His-NCA	102
13.3.	Σύνθεση μακροαπαρχητών	107
13.4.	Εισαγωγή βιομορίων στο ω-άκρο των μακροαπαρχητών.....	114
13.5.	Σύνθεση υβριδικών δισυσταδικών συμπολυμερών	119
13.6.	Μελέτη συσσωμάτωσης των αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών	139
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		157
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ABBREVIATIONS		160
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		163

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Στάδιο έναρξης και διάδοσης του ανιοντικού πολυμερισμού..	22
Σχήμα 2: Γενική αντίδραση των NCAs.....	26
Σχήμα 3: Στάδιο έναρξης και διάδοσης στον NAM	27
Σχήμα 4: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.	29
Σχήμα 5: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.	31
Σχήμα 6: Μέθοδος του Leuchs για τον σχηματισμό των N-Καρβοξυανυδριτών, όπου X=Cl ή Br.	35
Σχήμα 7: α) Σχηματισμός N-Καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs-Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, β) απόδειξη αυτού με την προσθήκη ανιλίνης.....	36
Σχήμα 8: Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Roche για αμινοξέα με αλειφατική πλευρική αλυσίδα και προστασίες ανθεκτικές σε όξινο περιβάλλον.....	38
Σχήμα 9: Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Mobashery, η μέθοδος είναι γενική και εφαρμόζεται και σε αμινοξέα με ευαίσθητες προστασίες σε οξέα.....	38
Σχήμα 10: Χρήση ακροδραστικών μακροαπαρχητών με αμινομάδα για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs και την παρασκευή υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών.	40
Σχήμα 11: Αντιδράσεις παρασκευής υβριδικού δισυσταδικού συμπολυμερούς πολυστυρένιο-πολυ(γ-βενζυλεστέρας του L-γλουταμικού οξέος) (PS-PBLG) από την ομάδα του Klok ^{108, 109}	44

Σχήμα 12: Σύνθεση τρισυσταδικών υβριδικών συμπολυμερών με χρήση νικελοκυκλικού απαρχητή. [R= -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R'= -CH ₂ CH ₂ CO ₂ CH ₂ C ₆ H ₅ , HOSu= N-υδροξυηλεκτριμίδιο].	47
Σχήμα 13: Σύνθεση δισυσταδικού υβριδικού συμπολυμερούς μέσω σύζευξης της ακροδραστικής πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG-NCO) με ζωντανό PBLG	48
Σχήμα 14: Σύνθεση δισυσταδικού υβριδικού συμπολυμερούς PBLG-πολυισοκυανιδίου με διαδοχική προσθήκη των μονομερών και χρήση αμιδο-αμιδικού νικελοκυκλικού απαρχητή (bpy= 2,2'-διπυριδυλο).	49
Σχήμα 15: Συνθετική πορεία του συζευγμένου με FA, αστεροειδούς συμπολυμερούς (star-PCLss-FA)	54
Σχήμα 16: Αντίδραση σύνθεσης των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων.	82
Σχήμα 17: Στάδια σύνθεσης του NCA της Ιστιδίνης.	88
Σχήμα 18: Σύνθεση mPEG-NH ₂	89
Σχήμα 19: Σύνθεση μακροαπαρχητή N ₃ -PEG-NH ₂	93
Σχήμα 20: Σύνθεση NH ₂ -PEG-OH	94
Σχήμα 21: Σύνθεση υβριδικού δισυσταδικού συμπολυμερούς PEG-b-P(L-His)	97
Σχήμα 22: Αντίδραση εισαγωγής τριπλού δεσμού στο γ-καρβοξύλιο του φολικού οξέος	98
Σχήμα 23: Αντίδραση κυκλοπροσθήκης μεταξύ του τριπλού δεσμού του FA και του αζιδίου του συμπολυμερούς	98
Σχήμα 24: Σύζευξη 18β-γλυκυρρητινικού οξέος με τον μακροαπαρχητή allyl-PEG-OH μέσω εστεροποίησης	99
Σχήμα 25: Σύνθεση μακροαπαρχητή GA-PEG-NH ₂	116

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Το ελλειπτικά πολωμένο φως (μωβ), αποτελείται από τις συνεισφορές του δεξιόστροφου (μπλε) και αριστερόστροφου (κόκκινο) πολωμένου φωτός.....	69
Εικόνα 2: Πιθανές διαμορφώσεις της πολυ(L-Λυσίνης).....	70
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της ιοντικής συγκέντρωσης και της διαφοράς δυναμικού ως συνάρτηση της απόστασης από τη φορτισμένη επιφάνεια του νανοσωματιδίου, το οποίο βρίσκεται διεσπαρμένο σε υδατικό διάλυμα.....	71
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση γραμμής υψηλού κενού.....	73
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση αντλίας διαχύσεως υδραργύρου .	74
Εικόνα 6: Σπινθηριστής ελέγχου κενού και μικροοπών (Tesla coil).....	76
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής καθαρισμού αιθυλενοξειδίου	77
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση αμπουλοσυσκευής για την αραίωση απαρχητών ανιοντικού πολυμερισμού	78
Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής καθαρισμού ναφθαλινίου	79
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση αμπουλοσυσκευής για την λήψη απαερωμένης μεθανόλης.....	82
Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής ανακρυσταλλώσεων για τον καθαρισμό των NCAs	84
Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής σύνθεσης ναφθαλινοκαλίου	90
Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής ενεργοποίησης αλκοόλης με ναφθαλινοκάλιο	91
Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμερισμό των μακροαπαρχητών	92

Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής πολυμερισμού των NCAs	95
Εικόνα 16: Φάσμα υπερύθρου του γ-βενζυλεστέρα του γλουταμικού οξέος	100
Εικόνα 17: Φάσμα υπερύθρου του BLG-NCA. Μεγέθυνση στην περιοχή του καρβονυλίου	101
Εικόνα 18: Φάσμα ¹ H-NMR του γ-benzyl-L-Glutamate NCA σε CDCl ₃ ...	102
Εικόνα 19: Φασματοσκοπία IR για τα στάδια σύνθεσης του N _{im} (trt)-L-His NCA. (α) Πρόδρομο αμινοξύ Nim-trt-HIS. (β) 1h μετά την προσθήκη SOCl ₂ . (γ) 3h μετά την προσθήκη SOCl ₂ . (δ) trt-HIS NCA*HCl. (ε) trt-HIS NCA	105
Εικόνα 20: Φάσμα ¹ H-NMR της N _{im} -trityl-(L)-His-NCA*HCl σε d ₆ -DMSO	106
Εικόνα 21: Φάσμα ¹ H-NMR της N _{im} -trityl-(L)-His-NCA σε CDCl ₃	107
Εικόνα 22: Χρωματογράφημα SEC του mPEG-PBLG συγκριτικά με το μακροαπαρχητή mPEG-NH ₂ , σε φέρων διαλύτη DMF	108
Εικόνα 23: Χρωματογράφημα SEC του N ₃ -PEG-OH, σε φέρων διαλύτη DMF, όπου φαίνεται η ύπαρξη διμερούς	109
Εικόνα 24: Χρωματογράφημα GPC του Allyl-PEG-OH, M _n =3300 g/mol, σε φέροντα διαλύτη DMF	111
Εικόνα 25: Χρωματογράφημα GPC του Allyl-PEG-OH, M _n =6700 g/mol, σε φέροντα διαλύτη DMF	111
Εικόνα 26: Φάσμα ¹ H-NMR του μακροαπαρχητή allyl-PEG-OH (M _n =3400g/mol) σε CDCl ₃	112
Εικόνα 27: Φάσμα ¹ H-NMR του μακροαπαρχητή allyl-PEG-OH (M _n =6400g/mol) σε CDCl ₃	113
Εικόνα 28: Φάσμα ¹ H-NMR του 18β-glycyrrhetic acid σε CDCl ₃	116
Εικόνα 29: Φάσμα ¹ H-NMR του Allyl-PEG-GA 3400 g/mol (n=77) με έμφαση στις κορυφές του GA σε CDCl ₃	117
Εικόνα 30: Φάσμα ¹ H-NMR του Allyl-PEG-GA 6400 g/mol (n=145) με έμφαση στις κορυφές του GA σε CDCl ₃	118

Εικόνα 31: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του GA-PEG-NH₂ Mn=3400 g/mol (n=77)....	120
Εικόνα 32: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του GA-PEG-NH₂ Mn=6400 g/mol (n=145)..	121
Εικόνα 33: Χρωματογραφία SEC για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ 3400 g/mol και το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 3400-900 g/mol	124
Εικόνα 34: Χρωματογραφία SEC για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ 3400 g/mol και το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 3400-3100 g/mol	124
Εικόνα 35: Χρωματογραφία SEC για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ 6400 g/mol και το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 6400-1100 g/mol	125
Εικόνα 36: Χρωματογραφία SEC για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ 6400 g/mol και το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 6400-3200 g/mol	125
Εικόνα 37: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis Mn = 3400-900 g/mol	127
Εικόνα 38: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis Mn = 3400-3100 g/mol	128
Εικόνα 39: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis Mn = 6400-1100	129
Εικόνα 40: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis Mn = 6400-3200	130
Εικόνα 41: Μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 3400-900 g/mol.....	132
Εικόνα 42: Μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 3400-3100 g/mol.....	132
Εικόνα 43: Μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 6400-1100 g/mol.....	133
Εικόνα 44: Μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 6400-3200 g/mol.....	133

Εικόνα 45: Διάγραμμα PALS για το πολυμερές PEG-PHIs Mn=3500-3500 g/mol σε pH = 5, 6.5 και 7.4	136
Εικόνα 46: Διάγραμμα PALS για το πολυμερές GA-PEG-PHIs Mn=3400-900 g/mol σε pH = 5, 6.5 και 7.4	137
Εικόνα 47: Διάγραμμα PALS για το πολυμερές GA-PEG-PHIs Mn=3400-3100 g/mol σε pH = 5, 6.5 και 7.4	138
Εικόνα 48: Διάγραμμα PALS για το πολυμερές GA-PEG-PHIs Mn=6400-1100 g/mol σε pH = 5, 6.5 και 7.4	138
Εικόνα 49: Διάγραμμα PALS για το πολυμερές GA-PEG-PHIs Mn=6400-3200 g/mol σε pH = 5, 6.5 και 7.4	139
Εικόνα 50: Διαγράμματα συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης, Intensity/Diameter και Number/Diameter για το συμπολυμερές GA-PEG-NH ₂ 6400 g/mol (T=25°C)	142
Εικόνα 51: Διαγράμματα συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης, Intensity/Diameter και Number/Diameter για το συμπολυμερές GA-PEG-NH ₂ 6400 g/mol (T=60°C).....	143
Εικόνα 52: Διαγράμματα συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης, Intensity/Diameter και Number/Diameter για το συμπολυμερές PEG-PHIs 3500-3500 g/mol (T=25°C).....	145
Εικόνα 53: Διαγράμματα συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης, Intensity/Diameter και Number/Diameter για το συμπολυμερές PEG-PHIs 3500-3500 g/mol (T=60°C).....	146
Εικόνα 54: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHIs (3400-900) g/mol (T=25°C).....	148
Εικόνα 55: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHIs (3400-3100) g/mol (T=25°C).....	149

Εικόνα 56: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (6400-1100) g/mol (T=25°C).....	151
Εικόνα 57: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEO-PHis (6400-3200) g/mol (T=25°C)	152
Εικόνα 58: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (3400-900) g/mol (T=60°C).....	153
Εικόνα 59: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (3400-3100) g/mol (T=60°C).....	154
Εικόνα 60: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (6400-1100) g/mol (T=60°C).....	155
Εικόνα 61: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (6400-3200) g/mol (T=60°C).....	156

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Παραδείγματα υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών που έχουν παρασκευαστεί με χρήση ακροδραστικών μακροαπαρχητών με πρωτοταγείς αμινομάδες ^{88, 96} , όπου Α είναι η πολυπεπτιδική συστάδα και Β το τμήμα του μακροαπαρχητή	42
Πίνακας 2: Φασματικές περιοχές υπερύθρου	57
Πίνακας 3: Απορροφήσεις των τριών διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.....	69
Πίνακας 4: Μοριακά χαρακτηριστικά μακροαπαρχητών Allyl-PEG-OH 110	
Πίνακας 5: Μοριακά χαρακτηριστικά μακροαπαρχητών GA-PEG-NH ₂ και συμπολυμερών GA-PEG-PHis μέσω SEC με φέρων διαλύτη μίγμα 79.9% H ₂ O, 20% MeCN, 0.1% TFA.....	122
Πίνακας 6: Αποτελέσματα μετρήσεων ζ-δυναμικού για τα αμφίφιλα δισυσταδικά συμπολυμερή του τύπου GA-PEG-PHis.....	135
Πίνακας 7: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH ₂ σε θερμοκρασίες T=25°C και T=60°C.....	141
Πίνακας 8: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEG-PHis σε θερμοκρασίες T=25°C και T=60°C	144
Πίνακας 9: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για τα συμπολυμερή του τύπου GA-PEG-PHis σε T=25°C και T=60°C.....	147

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η έρευνα που περιλαμβάνεται στην διδακτορική αυτή διατριβή διενεργήθηκε στο Πανεπιστήμιο Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ερμόλαου Ιατρού. Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) και από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ), στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛΙΔΕΚ Υποψηφίων Διδασκόντων»

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με την αρχαία ελληνική μυθολογία, από τη σύζευξη του Τυφώνα και της Έχιδνας προέκυψε το φοβερό τέρας, η Χίμαιρα. Πρόκειται για ένα μυθολογικό ζώο, που εξέπνεε φωτιά, είχε σώμα κατσίκας, κεφάλι λιονταριού, και η ουρά του κατέληγε σε φίδι. Πρόκειται δηλαδή για μία ένωση διάφορων ετερόκλητων στοιχείων μεταξύ τους. Δανειζόμενη η επιστημονική κοινότητα τον όρο “Χίμαιρα”, ονομάτισε προϊόντα σύνδεσης ετερόκλητων στοιχείων μεταξύ τους βάσει του ονόματος αυτού. Τέτοιες μορφές αποτελούν στην επιστήμη της Γενετικής, ζωντανοί οργανισμοί που έχουν περισσότερους από έναν Γενετικούς κώδικες και στην επιστήμη της Χημείας των Πολυμερών, πολυμερή που αποτελούνται από ένα συνθετικό πολυμερές και από ένα βιολογικό πολυμερές, όπως είναι τα πολυπεπτίδια.¹

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αναφέρεται στη σύνθεση τέτοιων πολυμερικών συστημάτων, που σκοπό έχουν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντικαρκινικών φαρμάκων. Η σύνθεση τέτοιων υλικών αποτελεί μεγάλη πρόκληση διαχρονικά σε ένα μεγάλο αριθμό συνθετικών χημικών ανά τον κόσμο. Τα βασικότερα πλεονεκτήματα των υλικών αυτών, είναι η ελεγχόμενη δοσολογία και η στοχευμένη απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας στα καρκινικά κύτταρα. Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο, αφορά κυρίως στην ικανότητα κάποιων μορίων να αντιδρούν σε εξωτερικά ερεθίσματα και να αλλάζουν χημική συμπεριφορά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα πολυμερή της ιστιδίνης, όπου σε φυσιολογικό pH είναι υδρόφοβα, ενώ σε pH ελαφρώς όξινο, όπως αυτό στο εσωτερικό και το εξωτερικό των κυττάρων γίνονται υδρόφιλα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μερική εκλεκτικότητα στη διάθεση του φαρμάκου στον οργανισμό του ασθενή.

Για την επίτευξη ακόμα μεγαλύτερης εκλεκτικότητας, έχουν επιλεγθεί ομάδες που λειτουργούν ως ανιχνευτές των καρκινικών κυττάρων. Οι ομάδες αυτές, συνήθως αφορούν οργανικά μόρια, όπως το φολικό οξύ και το 18β-γλυκυρρητινικό οξύ, των οποίων οι υποδοχείς υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα. Έτσι, ομάδες όπως αυτές μπορούν να δημιουργήσουν γέφυρα μεταξύ του κυττάρου και του υλικού, που είναι προσκολλημένες.

Ο συνδυασμός, άρα, αυτών των δύο χαρακτηριστικών, μπορεί να αποτελέσει ένα μεγάλο βήμα για τη βελτίωση της ζωής των ασθενών, με αποτέλεσμα η έρευνα πάνω στο πεδίο αυτό, να έχει αυξηθεί εκθετικά τα τελευταία χρόνια, με πλήθος δημοσιεύσεων σε επιστημονικά περιοδικά.

Έχοντας κατά νου, ότι η επιστήμη προσπαθεί να μιμηθεί τη φύση, καθώς αυτή δημιουργεί τα τελειότερα συστήματα, γίνεται συνεχώς προσπάθεια εύρεσης αποτελεσματικότερων συστημάτων χρησιμοποιώντας τις λειτουργίες της φύσης. Σε αυτό το πλαίσιο κινείται και η παρούσα διατριβή.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

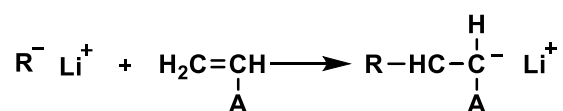
1. Ανιοντικός Πολυμερισμός

Η σύνθεση πρότυπων πολυμερών με καθορισμένο μοριακό βάρος, στενή κατανομή μοριακών βαρών και προκαθορισμένη μακρομοριακή αρχιτεκτονική έχει αποτελέσει έναν από τους κυριότερους στόχους των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια. Ο ανιοντικός πολυμερισμός² μονομερών, με τη χρήση οργανολιθιακών απαρχητών, βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στη σύνθεση τέτοιων πρότυπων πολυμερών, κυρίως λόγω της απουσίας αυτόματου τερματισμού, γεγονός που τον έχει χαρακτηρίσει και ως ζωντανό πολυμερισμό. Μειονέκτημα αποτελεί η μεγάλη του ευαισθησία στις προσμείξεις και ειδικότερα στα συστατικά του ατμοσφαιρικού αέρα (O₂, CO₂ και υγρασία), γιατί μπορούν να διαδραματίσουν το ρόλο αντιδραστηρίων τερματισμού. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται οι τεχνικές υψηλού κενού.

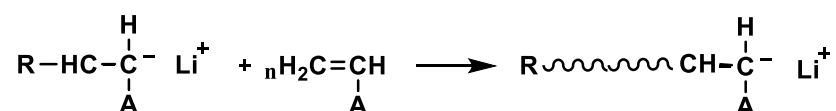
Ως ανιοντικό πολυμερισμό ονομάζουμε το είδος του πολυμερισμού που οι ακραίες δομικές μονάδες της αναπτυσσόμενης πολυμερικής αλυσίδας είναι αρνητικά φορτισμένες. Μονομερή που πολυμερίζονται ανιοντικά είναι αυτά που σχηματίζουν σταθερά καρβανιόντα. Χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες³. Τα βινυλικού τύπου (CH₂=CHA, όπου A η ομάδα που σταθεροποιεί το ανιοντικό κέντρο, π.χ. στυρένιο), τα διενικού τύπου (ισοπρένιο, βουταδιένιο) και τα κυκλικά (αιθυλενοξειδίο, σιλοξάνη).

Στον ανιοντικό πολυμερισμό διακρίνουμε δύο στάδια, το στάδιο της έναρξης και το στάδιο της διάδοσης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.

ΣΤΑΔΙΟ ΕΝΑΡΞΗΣ



ΣΤΑΔΙΟ ΔΙΑΔΟΣΗΣ



Σχήμα 1: Στάδιο έναρξης και διάδοσης του ανιοντικού πολυμερισμού

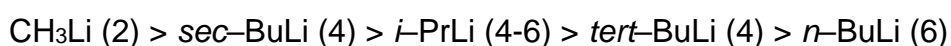
Το βασικότερο πλεονέκτημα του ανιοντικού πολυμερισμού, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι η απουσία σταδίου τερματισμού (ζωντανός πολυμερισμός), γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα πλήρους ελέγχου των προϊόντων, ως προς το μοριακό βάρος, αλλά και την κατανομή μοριακών βαρών. Το μέσο μοριακό βάρος κατ' αριθμό των πολυμερών προκαθορίζεται με ακρίβεια από τις ποσότητες του μονομερούς και του απαρχητή, σύμφωνα με τη σχέση:

$$\overline{M}_n = g_{\text{μονομερούς}} / \text{mol}_{\text{απαρχητή}} \quad (1.1)$$

Η μικρή κατανομή μοριακών βαρών (<1.1) εξασφαλίζει την ομοιογένεια των μακρομορίων που συντίθενται με τη μέθοδο του ανιοντικού πολυμερισμού και διασφαλίζεται από την επιλογή του συστήματος διαλύτη, μονομερούς, απαρχητή, στον οποίο η ταχύτητα έναρξης του πολυμερισμού πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάδοσής του. Αυτό συνεπάγεται ότι ουσιαστικά όλες οι μονομερικές μονάδες θα εκκινούν ταυτόχρονα τον πολυμερισμό τους και ότι περίπου ίδιος αριθμός μονομερικών μονάδων θα προστίθεται πάντα σε κάθε αναπτυσσόμενη αλυσίδα.

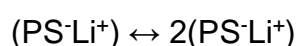
Η ταχύτητα έναρξης στους μη πολικούς διαλύτες εξαρτάται από τον οργανολιθιακό απαρχητή και τη φύση του διαλύτη (αρωματικός ή αλειφατικός), αφού οι οργανολιθιακές ενώσεις σχηματίζουν συσσωματώματα που βρίσκονται

σε ισορροπία με τη μη συσσωματωμένη μορφή^{4, 5}, η οποία και ευθύνεται για την έναρξη του πολυμερισμού. Τόσο ο βαθμός συσσωμάτωσης όσο και η θέση ισορροπίας εξαρτώνται από τη φύση του διαλύτη και τη δομή της οργανολιθιακής ένωσης. Συγκεκριμένα, όσο μικρότερος είναι ο βαθμός συσσωμάτωσης του οργανολιθιακού απαρχητή τόσο μεγαλύτερη είναι η δραστηριότητά του. Η σειρά δραστηριότητας διάφορων οργανολιθιακών απαρχητών για τον πολυμερισμό των διενίων, σε υδρογονανθρακικούς διαλύτες (σε παρένθεση δίνεται ο βαθμός συσσωμάτωσής τους), είναι η παρακάτω⁴:



Για τον πολυμερισμό του στυρενίου, σε υδρογονοανθρακικούς διαλύτες, η σειρά δραστηριότητας είναι η ίδια, εκτός από μία αλλαγή που παρατηρείται στους δύο τελευταίους οργανολιθιακούς απαρχητές ($n\text{-BuLi} > \text{tert-BuLi}$).

Όμως, συσσωματώματα σχηματίζουν και τα μακροανιόντα κατά το στάδιο της διάδοσης. Ο βαθμός συσσωμάτωσης του πολυστυρολιθίου σε αρωματικούς και αλειφατικούς υδρογονανθρακικούς διαλύτες υπολογίστηκε ίσος με δύο. Αυτό σημαίνει ότι κατά το στάδιο της διάδοσης παρατηρείται ισορροπία μεταξύ των ελεύθερων και συσσωματωμένων αναπτυσσόμενων αλυσίδων.



Μόνο τα ελεύθερα μακροανιόντα διαδίδουν τον πολυμερισμό και όχι τα συσσωματωμένα. Για τον λόγο αυτό και η παρατηρούμενη ταχύτητα πολυμερισμού είναι ανάλογη τόσο της συγκέντρωσης του μονομερούς όσο και της συγκέντρωσης των μακροανιόντων. Ο βαθμός συσσωμάτωσης του πολυισοπρενυλολιθίου είναι τέσσερα με έξι.

Προσθήκη πολικών μέσων στα υπό πολυμερισμό συστήματα οδηγεί στη μείωση του βαθμού συσσωμάτωσης τόσο του οργανολιθιακού απαρχητή όσο και των μακροανιόντων. Έτσι, ο βαθμός συσσωμάτωσης του πολυστυρολιθίου σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο βρέθηκε ίσος με ένα αντί για δύο. Η προσθήκη

μικρής ποσότητας πολικού συστατικού κατευθύνει την ισορροπία μεταξύ ελεύθερων και συσσωματωμένων μακροανιόντων προς τις ελεύθερες αλυσίδες, επιδιαλυτώνοντας τις συσσωματωμένες.

Σύμφωνα λοιπόν με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι ο ανιοντικός πολυμερισμός αποτελεί ιδανική μέθοδο για τη σύνθεση πολυμερών με πολύπλοκες μακρομοριακές αρχιτεκτονικές, όπως δισυσταδικά^{3, 6-15}, τρισυσταδικά¹⁶⁻³³, αστεροειδή³⁴⁻³⁹, εμβολιασμένα^{40, 41}, κυκλικά⁴²⁻⁴⁴ και δενδριτικά πολυμερή^{45, 46}.

1.1. Κατά συστάδες πολυμερή με ανιοντικό πολυμερισμό

Ο ανιοντικός πολυμερισμός αποτελεί μία από τις κυριότερες μεθόδους για τη σύνθεση συμπολυμερών κατά συστάδες. Λόγω της απουσίας του σταδίου αυτόματου τερματισμού, ο συμπολυμερισμός κατά συστάδες πραγματοποιείται με τη διαδοχική προσθήκη ενός δεύτερου μονομερούς σε διάλυμα που περιέχει ζωντανά μακροανιόντα, δηλαδή μακρομοριακές αλυσίδες που διαθέτουν δραστικές οργανομεταλλικές ομάδες στο άκρο τους και οι οποίες έχουν προκύψει από τον ομοπολυμερισμό του πρώτου μονομερούς. Τον ρόλο του απαρχητή για το δεύτερο μονομερές παίζει το καρβανιόν του πρώτου. Θα πρέπει, όμως, η σειρά προσθήκης των μονομερών να γίνεται με βάση τις σχετικές δραστηριότητές τους, ώστε να εξασφαλιστεί μικρή κατανομή μοριακών βαρών και για τη δεύτερη συστάδα. Έτσι, η ταχύτητα έναρξης του πολυμερισμού του δεύτερου μονομερούς από το μακροανιόν του πρώτου, πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάδοσης του πολυμερισμού της δεύτερης συστάδας.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι έχει μεγάλη σημασία η σειρά προσθήκης των μονομερών. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η ταχύτητα έναρξης του πολυμερισμού του ισοπρενίου από το πολυστυρυλολίθιο είναι γρήγορη και σε μη πολικούς διαλύτες. Στην αντίθετη περίπτωση η ταχύτητα έναρξης πολυμερισμού του στυρενίου από το πολυισοπρενυλολίθιο σε διαλύτη π.χ. βενζόλιο είναι πιο αργή από την ταχύτητα διάδοσής του. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε ευρεία κατανομή μοριακών βαρών για τη δεύτερη συστάδα του πολυστυρενίου όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός. Στις περιπτώσεις αυτές προσθήκη μικρής ποσότητας πολικού συστατικού, για παράδειγμα

τετραϋδροφουρανίου (THF), καταστρέφει τα συσσωματώματα των πολυισοπρενυλολιθίων και καθιστά ταχύτερη την έναρξη του πολυμερισμού του στυρενίου. Το μειονέκτημα της προσθήκης του πολικού συστατικού έγκειται στη μεταβολή της μικροδομής του διενίου, για τον λόγο αυτό γίνεται μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού του και πριν την έναρξη του πολυμερισμού του δεύτερου μονομερούς.

1.2. Σύνθεση ακροδραστικών πολυμερών με ανιοντικό πολυμερισμό

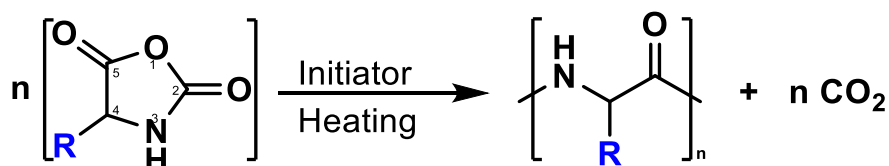
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ο ανιοντικός πολυμερισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία για τη σύνθεση πολυμερών με ακραίες δραστικές ομάδες. Έτσι μπορούν να συντεθούν τόσο μονοδραστικά όσο και πολυδραστικά πολυμερή^{47, 48}. Η προσθήκη της δραστικής ομάδας γίνεται είτε μέσω του απαρχητή, όπου είναι προσαρμοσμένη, είτε με αντιδραστήρια τερματισμού, είτε με συνδυασμό και των δύο όταν πρόκειται για πολυδραστικά πολυμερή^{49, 50}. Σε κάθε περίπτωση η λειτουργική ομάδα πρέπει να είναι προστατευμένη, ώστε να μην προκαλέσει αντιδράσεις τερματισμού ή παράπλευρες αντιδράσεις πολυμερισμού. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος απαρχητής πολυμερισμού για τη σύνθεση αμινοδραστικών πολυμερών, τα οποία με τη σειρά τους αποτελούν μακροαπαρχητές για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων. Πιο συγκεκριμένα ως απαρχητής χρησιμοποιήθηκε η αλλυλική αλκοόλη η οποία μετατρέπεται σε αμινοτελική ομάδα με τη ριζική προσθήκη του υδροχλωρικού άλατος της 2- αμινοαιθανοθιόλης. Επίσης ως τερματικό μέσο χρησιμοποιήθηκε οξινισμένη μεθανόλη, μέσω της οποίας δημιουργείται μία ακραία ομάδα υδροξυλίου. Στη συνέχεια με μια αντίδραση εστεροποίησης γίνεται η προσθήκη των ακραίων δραστικών ομάδων του γλυκυρρητινικού οξέος, το οποίο έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι λειτουργεί ως ομάδα “στοχευτής” καρκινικών κυττάρων, καθώς οι υποδοχείς του υπερεκφράζονται σε τέτοια κύτταρα. Μία ακόμα συνθετική πορεία που δοκιμάστηκε για τη σύνθεση πολυμερών πολυ(αιθυλενογλυκόλης) με αμινοτελικό άκρο ήταν μέσω της χρήσης της 3 - άζιδο -1- προπανόλης ως απαρχητής, τα στάδια της οποίας θα περιγραφτούν αναλυτικότερα στη συνέχεια.

2. Σύνθεση πολυαμινοξέων

Βασικά συστατικά για τη λειτουργία όλων των έμβιων συστημάτων αποτελούν δομές όπως είναι οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα. Τα συστατικά αυτά ανήκουν στην κατηγορία των βιολογικών πολυμερών. Στην προσπάθεια της, η επιστημονική κοινότητα, να αντιγράψει και να μιμηθεί τα χαρακτηριστικά και τη λειτουργία αυτών των μορίων, έχει καταφέρει τη σύνθεση καλά καθορισμένων βιοπολυμερών, όπως είναι τα πολυπεπτίδια, με αμέτρητες εφαρμογές στην ιατρική (ως φορείς φαρμάκων) και στη βιοτεχνολογία.

2.1. Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των N- καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων (NCA's)

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος σύνθεσης όμο- και συμπολυμερικών πεπτιδίων αποτελεί ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων. Πλεονεκτήματά της μεθόδου αυτής είναι η ευκολία, η ταχύτητα, οι μεγάλες αποδόσεις που λαμβάνονται και η αποφυγή ρακεμίωσης κατά τη σύνθεση των πολυπεπτιδίων. Ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών μπορεί να προκληθεί από έναν μεγάλο αριθμό απαρχητών, όπως αμίνες, αλκοξείδια, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα, και με θέρμανση (Σχήμα 2). Η αντίδραση προχωρά με τον σχηματισμό CO₂ και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους.



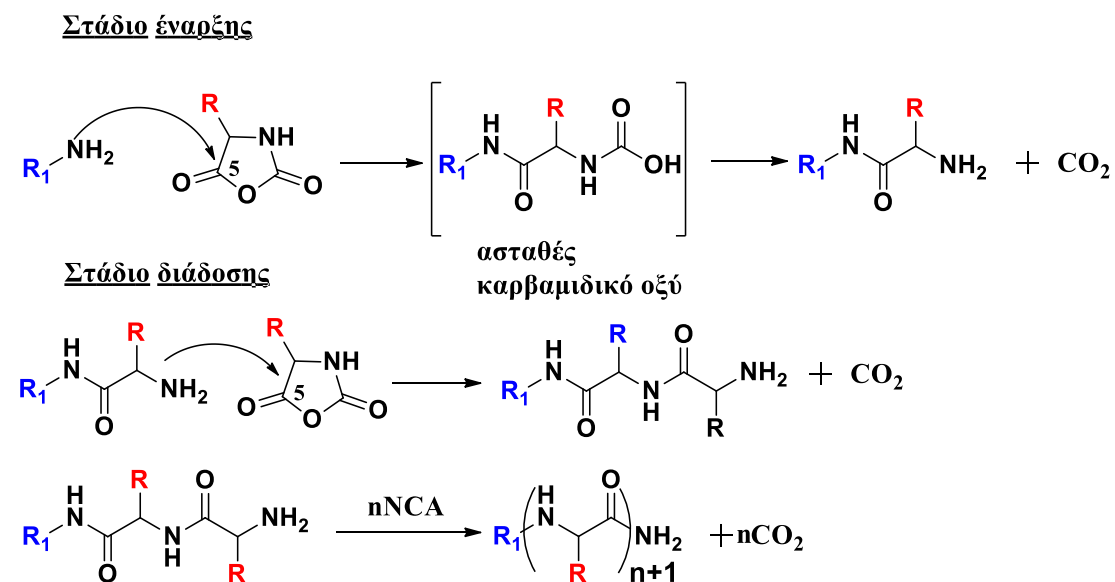
Σχήμα 2: Γενική αντίδραση των NCAs

Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs. Στην πραγματικότητα όμως οι δύο αυτοί μηχανισμοί συνυπάρχουν σε διαφορετικό βαθμό σε κάθε περίπτωση^{51, 52} και ο λόγος πυρηνοφιλικότητα/βασικότητα του απαρχητή καθορίζει κάθε φορά ποιος θα υπερισχύσει. Όταν ο απαρχητής δρα ως πυρηνόφιλο επικρατεί ο λεγόμενος κανονικός μηχανισμός (normal route) ή μηχανισμός αμίνης (amine route), ενώ

όταν δρα ως βάση ο μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (activated monomer mechanism).

2.2. Κανονικός μηχανισμός αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)

Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται γενικά σε πολυμερισμούς που εκκινούνται από μη ιοντικούς απαρχητές που έχουν τουλάχιστον ένα βασικό υδρογόνο, όπως οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες, οι αλκοόλες και το νερό⁵³⁻⁵⁷. Οι απαρχητές αυτοί δρουν ως πυρηνόφιλα με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται κατάλοιπά τους στα τελικά προϊόντα. Η αντίδραση είναι μια πυρηνόφιλη προσβολή (Σχήμα 3) πολλών σταδίων από την τελική αμινομάδα στο καρβονύλιο της θέσης 5 του NCA, ακολουθούμενη από διάνοιξη του δακτυλίου. Το καρβαμιδικό οξύ, που παράγεται, είναι θερμοδυναμικώς μη σταθερό, με αποτέλεσμα να αποκαρβοξυλιώνεται. Στο στάδιο της διάδοσης η τελική αμινομάδα συμπεριφέρεται κατά τον ίδιο τρόπο, προσβάλλοντας το καρβονύλιο της θέσης 5 ενός δεύτερου NCA. Ο κύκλος της αναγέννησης της αμινομάδας και της προσβολής του καρβονυλίου της θέσης 5 των NCAs συνεχίζεται μέχρι την πλήρη κατανάλωση του μονομερούς.



Σχήμα 3: Στάδιο έναρξης και διάδοσης στον NAM

Κατά τον μηχανισμό αυτό κάθε μόριο απαρχητή εκκινεί μια πολυμερική αλυσίδα, έτσι ώστε ο κατά αριθμόν βαθμός πολυμερισμού να δίνεται από τον μοριακό λόγο μονομερούς προς τον απαρχητή. Η συγκέντρωση των

αμινομάδων παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού και είναι ίδια με την αρχική του απαρχητή. Όταν η δραστηριότητα του απαρχητή είναι συγκρίσιμη με αυτή του τελικού άκρου της αναπτυσσόμενης αλυσίδας τότε η ταχύτητα πολυμερισμού ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης $-d[M]/dt=k[M][I]_0$, κατά την οποία η σταθερά ταχύτητας παραμένει σταθερή για το κάθε επιμέρους στάδιο⁵⁸. Υπό τις συνθήκες αυτές τόσο τα θεωρητικά αλλά και πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η κατανομή του μοριακού βάρους θα είναι πολύ στενή (κατανομή Poisson)^{55, 59, 60}.

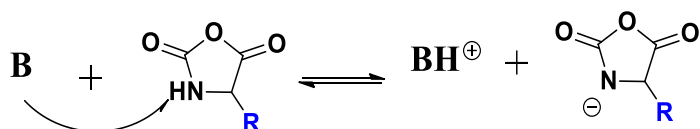
Αποκλίσεις από τη γενική κινητική πρώτης τάξης συμβαίνουν με αλλαγή του διαλύτη και της διαμόρφωσης του πολυμερούς, δύο εννοιών που συνδέονται μεταξύ τους, όπως και έχει αποδειχθεί. Κατά την αλλαγή από ισχυρό πολικό διαλύτη, (διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), ο-νιτροανισόλη και νιτροβενζόλιο), σε άπολο, (τετραυδροφουράνιο (THF), 1,4-διοξάνιο), εμφανίζεται κινητική δύο σταδίων με το δεύτερο στάδιο να είναι πέντε φορές γρηγορότερο. Η αντίδραση γίνεται αυτοκαταλυόμενη και η κατανομή μοριακών βαρών μεγαλώνει. Η αλλαγή της κινητικής συμβαίνει σε μετατροπή 20-40%, όταν ο βαθμός πολυμερισμού είναι της τάξης 6-12, για τον πολυμερισμό του NCA του γ-βενζυλεστέρα του γλουταμικού οξέος σε διοξάνιο. Οι Idelson και Blout πρότειναν⁵⁷ ότι η αύξηση στην ταχύτητα της αντίδρασης οφείλεται στην εκκίνηση της ελικοειδούς δομής της αναπτυσσόμενης αλυσίδας, γεγονός που αποδεικνύει ότι η διαμόρφωση της αλυσίδας έχει επίδραση στην ταχύτητα της αντίδρασης. Περαιτέρω πειράματα εδραίωσαν την πρόταση αυτή. Βρέθηκε ότι το κρίσιμο μήκος για την διαμόρφωση της α-έλικας είναι της τάξης των επτά μονάδων γλουταμικού οξέος⁶¹.

2.3. Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (Active Monomer, AM)

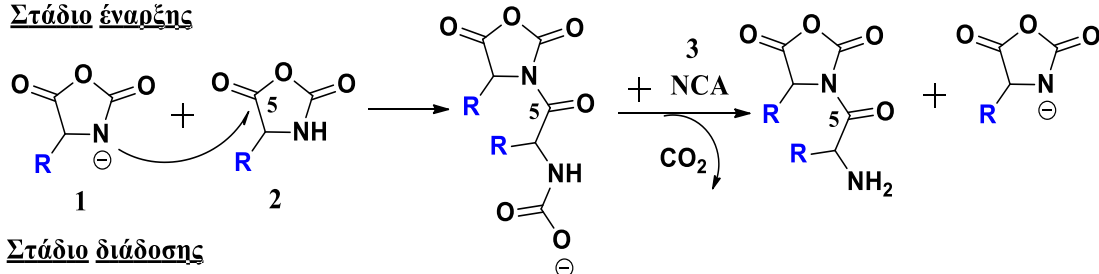
Ο μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς⁵⁷ προτάθηκε αρχικά από τους Ballard και Bamford^{62, 63} για τις τριτοταγείς αμίνες και τις ισχυρές βάσεις. Σε αυτόν, ο βασικός απαρχητής δε δρα μέσω της πυρηνοφιλικότητάς του με προσβολή στο καρβονύλιο της θέσης 5 του NCA, αλλά ως καταλύτης μέσω της βασικότητάς του. Το μονομερές ιοντίζεται προς σχηματισμό ανιόντος ανυδρίτη, το οποίο δρα ως πυρηνόφιλο. Στην περίπτωση αυτή ο πολυμερισμός των NCAs είναι αυτοεκκινούμενος (Σχήμα 4).

Αρχικά ο απαρχηγής δρα ως βάση (καταλύτης) και το μονομερές ιοντίζεται. Στη συνέχεια το ενεργοποιημένο μονομερές δρα ως πυρηνόφιλο προσβάλλοντας το καρβονύλιο της θέσης 5 ενός άλλου NCA. Το προκύπτον καρβαμιδικό οξύ είναι ασταθές και αποκαρβοξυλιώνεται, όπως αναφέρθηκε για τον κανονικό μηχανισμό. Στην περίπτωση αυτή υφίσταται το άλας του καρβαμιδικού οξέος, το οποίο είναι θερμοδυναμικώς σταθερό και σχηματίζεται εύκολα. Η σταθερότητά του εξαρτάται από τη φύση του αντισταθμιστικού κατιόντος και τη φύση των υποκαταστατών του αζώτου στον ανυδρίτη. Επομένως οι καρβαμιδικές ομάδες δεν αποκαρβοξυλιώνονται, αλλά αντιδρούν ως βάσεις ενεργοποιώντας ένα ακόμα μονομερές και στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνονται δίνοντας ένα N-αμινοακυλο NCA. Κατόπιν, το ενεργοποιημένο μονομερές μπορεί να προσβάλλει ένα νέο NCA ή ένα N-αμινοακυλο NCA διαδίδοντας τον πολυμερισμό.

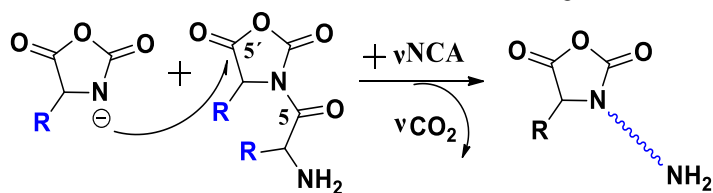
Στάδιο προέναρξης



Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



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

Ο μηχανισμός αυτός είναι τουλάχιστον 100 φορές γρηγορότερος από τον κανονικό μηχανισμό και οδηγεί σε πολυτεπίδια με υψηλά μοριακά βάρη, αλλά και με ευρεία κατανομή μοριακών βαρών. Το ενεργοποιημένο μονομερές που αναγεννάται κάθε φορά δεν παρουσιάζει καμία εκλεκτικότητα καθώς μπορεί να

αντιδράσει είτε με την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε με ένα άλλο μονομερές με αποτέλεσμα η ετερογένεια του τελικού προϊόντος να είναι αυξημένη. Επιπλέον, λόγω του μεγάλου πλήθους ενεργών κέντρων και πιθανών συνδυασμών, πολλαπλασιάζονται οι πιθανότητες αντίδρασης τερματισμού. Για παράδειγμα, από τα τρία καρβονύλια του N-αμινοακυλο NCA, μόνο αυτό που βρίσκεται στη θέση 5 προάγει τον πολυμερισμό, ενώ τα άλλα δύο τον τερματίζουν. Επίσης, αυξημένες είναι οι πιθανότητες παράπλευρων αντιδράσεων διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας, ακόμα και ενδομοριακής κυκλοποίησης.

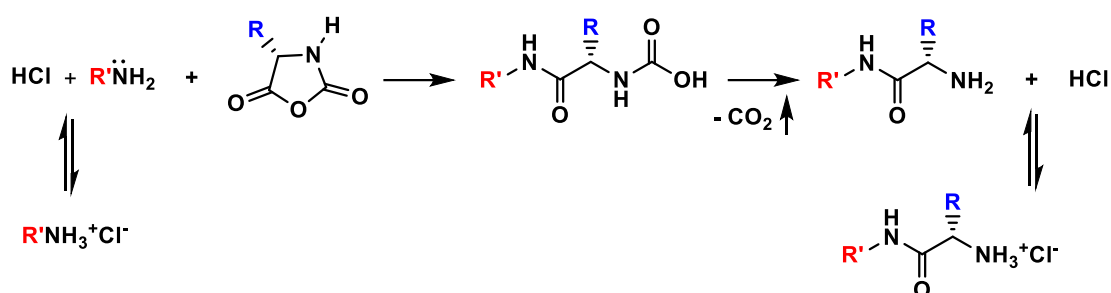
Συμπερασματικά, ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των NCAs με συμβατικές μεθόδους αντιμετωπίζει πλήθος προβλημάτων και δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως ζωντανός. Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί νέοι τρόποι πολυμερισμού των NCAs, ενώ έχουν πραγματοποιηθεί βελτιώσεις στις ήδη υπάρχουσες μεθόδους για την επίτευξη ελεγχόμενων πολυμερισμών των NCAs. Στη συνέχεια του κεφαλαίου γίνεται αναφορά στις νέες μεθόδους και τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί.

2.4. Πολυμερισμός μέσω πρωτοταγών αμινών

Τα τελευταία χρόνια ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των NCAs με χρήση πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή έχει εξελιχθεί. Πολλές εργασίες έχουν δημοσιευθεί, στις οποίες χρησιμοποιούνται διάφορες συνθήκες ώστε να εξαιρεθούν τα προβλήματα που έχουν ήδη αναφερθεί και να επιτευχθεί ελεγχόμενος πολυμερισμός.

Το 2003 η ομάδα του Schlaad⁶⁴⁻⁶⁷ χρησιμοποίησε ως απαρχητές υδροχλωρικά άλατα πρωτοταγών αμινών. Η δραστηριότητα των υδροχλωρικών αμινών με τους NCAs είχε ήδη μελετηθεί από την ομάδα του Knobler⁶⁸, η οποία είχε διαπιστώσει την προσθήκη ενός μοναδικού NCA. Τα υδροχλωρικά άλατα σε σχέση με τις αντίστοιχες ελεύθερες πρωτοταγείς αμίνες παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα ως πυρηνόφιλα με αποτέλεσμα να προκαλούν προσωρινή παύση του πολυμερισμού όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5. Η δραστηριότητα των υδροχλωρικών αλάτων προκύπτει από τον σχηματισμό μικρής ποσότητας της ελεύθερης αμίνης μέσω αντιστρεπτής αποδέσμευσης υδροχλωρίου. Αυτή η ισορροπία, η οποία βρίσκεται κυρίως προς την πλευρά

των αλάτων, επιτρέπει την ύπαρξη ενεργών κέντρων για μικρό χρονικό διάστημα. Επομένως, από τη στιγμή που η ελεύθερη αμίνη θα αντιδράσει με ένα NCA, η προκύπτουσα αμίνη πρωτονιώνεται κατευθείαν με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η περαιτέρω αντίδραση. Ακόμα, οι όξινες συνθήκες που επικρατούν στο μίγμα της αντίδρασης, διευκολύνουν την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα από το ενδιάμεσο καρβαμιδικό οξύ και κυρίως αποτρέπουν τον σχηματισμό των ανιόντων των NCAs, τα οποία οδηγούν στον μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς με τις ανεπιθύμητες συνέπειες που αναφέρθηκαν παραπάνω.



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

Για να επιτευχθεί ελεγχόμενος πολυμερισμός και όχι απλώς προσθήκη ενός μοναδικού NCA, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 40 °C έως 80 °C, ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση ισορροπίας της ελεύθερης αμίνης, επομένως και των ενεργών κέντρων που εκκινούν ή διαδίδουν τον πολυμερισμό. Με τη μέθοδο αυτή, η ομάδα του Schlaad παρασκεύασε υβριδικά κατά συστάδες συμπολυμερή με αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά, τα οποία αναλύονται στο Κεφάλαιο 3. Γενικά, η σκέψη της αντιστρεπτής απενεργοποίησης των κέντρων που προάγουν τον πολυμερισμό, ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος του, είναι αποδεκτή στη χημεία των πολυμερών και βρίσκει εφαρμογή σε όλες τις μεθόδους ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού⁶⁹, μέσω των λανθανουσών ριζών.

Το 2004 η ομάδα του Gianì^{5, 70} μελέτησε συναρτήσει της θερμοκρασίας τον πολυμερισμό του NCA της ε-τριφθοροακέτυλο-L-λυσίνης σε DMF με χρήση της *n*-εξυλαμίνης ως απαρχητή υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά την πλήρη κατανάλωση του μονομερούς, τα ακατέργαστα μίγματα αναλύθηκαν με

χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών και με μη-υδατική τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Η πρωτοτυπία αυτής της εργασίας ήταν η χρήση της μη-υδατικής τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό της ποσότητας των πολυαμινοξέων με διαφορετικά άκρα αλυσίδας, τα οποία αντιστοιχούν σε ζωντανές αλυσίδες (άκρα με αμινομάδες) και αλυσίδες που δεν προάγουν τον πολυμερισμό (καρβοξυλικά ή φόρμυλο άκρα) από την αντίδραση με ανιόντα των NCAs και με τον διαλύτη DMF, αντίστοιχα .

Στους 20 °C, τα πολυμερικά προϊόντα περιείχαν μόλις 22% ζωντανές αλυσίδες, ενώ το 78% αντιπροσώπευε τις αλυσίδες που δεν ήταν δυνατό να συνεχίσουν τον πολυμερισμό, γεγονός το οποίο καταδεικνύει την αφθονία των παράπλευρων αντιδράσεων όταν ο πολυμερισμός πραγματοποιείται υπό κανονικές συνθήκες. Στους 0 °C όμως παρατηρήθηκε ένα τελείως διαφορετικό αποτέλεσμα, όπου οι ζωντανές αλυσίδες κυμαίνονταν σε ποσοστό 99%, ενώ μόλις το 1% των αναπτυσσόμενων αλυσίδων δεν είχε την ικανότητα για περαιτέρω πολυμερισμό. Για να πιστοποιηθεί ο ζωντανός χαρακτήρας του πολυμερισμού των NCAs υπό αυτές τις συνθήκες προστέθηκε επιπλέον μονομερές στο μίγμα της αντίδρασης στους 0 °C. Το αποτέλεσμα ήταν η αύξηση του μοριακού βάρους των αλυσίδων, ενώ δεν παρατηρήθηκε καθόλου αύξηση του ποσοστού των απενεργοποιημένων αλυσίδων, γεγονός που υπαγορεύει την ύπαρξη ελεγχόμενου πολυμερισμού.

Από τη στιγμή που η εργασία της ομάδας του Gianí ήταν προκαταρκτική, χρειάζονται περαιτέρω έρευνες, ώστε να ισχυροποιηθεί αυτή η μέθοδος. Είναι σημαντικό πάντως το γεγονός ότι οι παράπλευρες αντιδράσεις του πολυμερισμού των NCAs εξουδετερώθηκαν με τη μείωση της θερμοκρασίας. Η επίδραση της θερμοκρασίας αποτελεί ένα σύνηθες φαινόμενο και παρόμοιες τάσεις για το σύστημα πολυμερισμού αναφέρονται για βινυλικά μονομερή που πολυμερίζονται με ανιοντικό ή κατιοντικό πολυμερισμό⁵. Σε συνήθεις θερμοκρασίες, οι παράπλευρες αντιδράσεις έχουν φραγμούς ενεργοποίησης παρόμοιους με αυτούς της αντίδρασης διάδοσης. Όταν ελαττώνεται η θερμοκρασία, φαίνεται από τα παραπάνω δεδομένα ότι οι ενεργειακοί φραγμοί της αντίδρασης διάδοσης μειώνονται σε σχέση με τους αντίστοιχους των παράπλευρων αντιδράσεων, με αποτέλεσμα η διάδοση του πολυμερισμού να

είναι κινητικώς ευνοούμενη. Επίσης, οι διάφορες προσμείξεις, λόγω της μη πλήρους καθαρότητας των αντιδραστηρίων δεν φαίνεται να επηρεάζουν τις αναπτυσσόμενες αλυσίδες, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η καθαρότητα των αντιδρώντων και η αδρανής ατμόσφαιρα δεν αποτελούν κύριους παράγοντες για την επίτευξη ζωντανού πολυμερισμού.

Το 2004 άλλη μία εργασία από την ομάδα του Hadjichristidis⁷¹ εμφανίζεται στη βιβλιογραφία, η οποία έρχεται σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω συμπεράσματα. Η τεχνική του υψηλού κενού χρησιμοποιήθηκε από την ομάδα αυτή τόσο για την παρασκευή και τον καθαρισμό των NCAs των αμινοξέων και των αντιδραστηρίων, όσο και για τον πολυμερισμό τους με *n*-εξυλαμίνη σε διαλύτη DMF σε θερμοκρασία δωματίου. Η υψηλή καθαρότητα των αντιδραστηρίων, του διαλύτη, αλλά και η συνεχής ύπαρξη υψηλού κενού κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού είχε ως αποτέλεσμα την επίτευξη ζωντανού πολυμερισμού των NCAs, γεγονός που επέτρεψε την παρασκευή καλά καθορισμένων ομοπολυπεπτιδίων, συμπολυπεπτιδίων κατά συστάδες, ακόμα και αστεροειδών πολυμερών⁷². Τα ελεγχόμενα μοριακά βάρη και οι στενές κατανομές μοριακών βαρών (<1.1) προσδίδουν στον πολυμερισμό τον χαρακτήρα του ελεγχόμενου, ενώ η ικανότητα σύνθεσης συμπολυμερών κατά συστάδες με διαδοχική προσθήκη των μονομερών στο μίγμα της αντίδρασης υπαγορεύει την ύπαρξη ζωντανών αλυσίδων. Επιπλέον, η συνεχής απομάκρυνση μέσω της γραμμής κενού του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται, ευνοεί τον πολυμερισμό των NCAs μέσω του κανονικού μηχανισμού, ο οποίος οδηγεί σε επιθυμητές δομές σε αντίθεση με τον μηχανισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

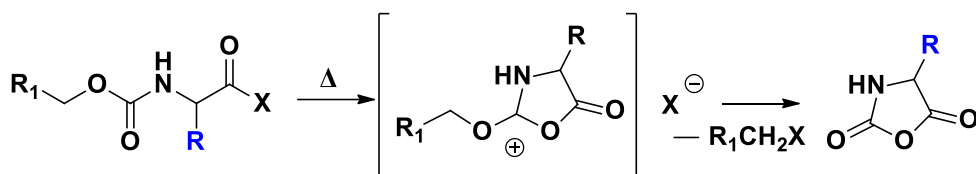
Στο πειραματικό μέρος γίνεται εκτενής ανάλυση της μεθόδου, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των πολυπεπτιδίων αυτής της εργασίας. Αναφέρονται οι τρόποι καθαρισμού των αντιδραστηρίων και οι συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιούνται οι πολυμερισμοί. Είναι γεγονός ότι την τεχνική υψηλού κενού διακρίνει η απαίτηση χρόνου και άριστης γνώσης υαλουργίας, αλλά δεν παύει να αποτελεί μία εξειδικευμένη διαδικασία για τη σύνθεση πρότυπων πολυμερών.

Τέλος, στην παράγραφο αυτή θα πρέπει να αναφερθεί και η εργασία της ομάδας του Cheng⁷³, στην οποία αναπτύσσεται η επίτευξη ελεγχόμενου πολυμερισμού των NCAs με τη μεσολάβηση εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS), Στην περίπτωση αυτή, το εξαμεθυλοδισιλαζάνιο δεν είναι απαραίτητος, αλλά φαίνεται να μεσολαβεί μέσω μίας ασυνήθιστης ομάδας διάδοσης, αυτής του καρβαμιδικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα. Ο μηχανισμός αυτός διαφέρει τόσο από τον κανονικό μηχανισμό, όσο και από τον μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς που αναφέρθηκαν παραπάνω για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs, ενώ παρουσιάζει ομοιότητες με τον μηχανισμό που ακολουθείται στους πολυμερισμούς μεταφοράς ομάδας των ακρυλικών μονομερών.

Με το σύστημα αυτό η ομάδα του Cheng παρασκεύασε ομοπολυτεππίδια (PBLG) και δισυσταδικά συμπολυτεππίδια (PZLL-PBLG) με ελεγχόμενα μοριακά βάρη, με ικανοποιητικές κατανομές μοριακών βαρών (~1.2) και υψηλές αποδόσεις (>99%). Ο έλεγχος του πολυμερισμού των NCAs από το εν λόγω σύστημα αποδόθηκε πρωτίστως στην υψηλότερη βασικότητα του HMDS ($pK_a = 14$) σε σχέση με τις υπόλοιπες αλειφατικές αμίνες που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί ($pK_a = 10-12$), αλλά κυρίως στις τριμεθυλοσίλυλο ομάδες που φέρει στο μόριο του, οι οποίες μεσολαβούν κατά τα στάδια της έναρξης και της διάδοσης του πολυμερισμού των NCAs.

2.5. Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCAs).

Οι N-καρβοξυανυδρίτες των α-αμινοξέων περιγράφηκαν πρώτα από τον Leuchs^{74, 75} περισσότερο από εκατό χρόνια πριν. Η ανακάλυψή τους ήταν συμπτωματική, κατά την προσπάθεια του να απομονώσει σε καθαρότερη μορφή τα N-αλκοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων (Σχήμα 6) μέσω απόσταξης. Επίσης παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και απομόνωσε το πρώτο συνθετικό πολυτεππίδιο, σε μια εποχή που δεν ήταν ακόμη αποδεκτή η ύπαρξη των μακρομορίων.



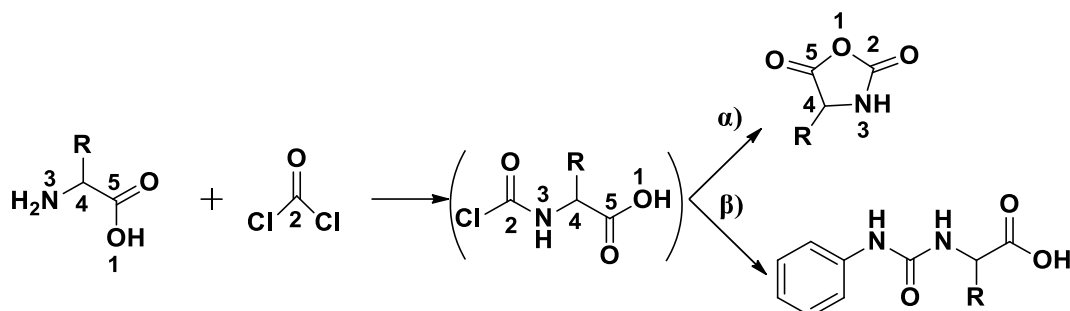
Σχήμα 6: Μέθοδος του Leuchs για τον σχηματισμό των N-Καρβοξυανυδριτών, όπου X=Cl ή Br.

Κατά τη μεθοδολογία του Leuchs η παρατεταμένη θέρμανση στους 70-90°C οδηγεί στον σχηματισμό του ανυδρίτη. Υπό τις συνθήκες αυτές όμως οι NCAs αρχίζουν να αποσυντίθενται και το υδροχλώριο προκαλεί άνοιγμα του δακτυλίου. Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια, όπου η δημιουργία του χλωριδίου οξέος θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο από τον ίδιο τον Leuchs⁷⁵. Εν συνεχεία ο πενταχλωριούχος φωσφόρος⁷⁶, που ήταν δραστικότερος, αλλά έδινε ως παραπροϊόν το αντίστοιχο οξείδιο και είχε επίδραση στην κρυστάλλωση του ανυδρίτη. Το ισχυρότερο μέσω αλογόνωσης είναι το τριβρωμίδιο του φωσφόρου⁷⁷. Επιπλέον, λόγω του γεγονότος ότι το ανιόν του βρωμίου είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το αντίστοιχο του χλωρίου, στο στάδιο της κυκλοποίησης, αλλά και ισχυρότερο πυρηνόφιλο για το τελικό στάδιο, η συνολική αντίδραση προχωράει γρηγορότερα και σε θερμοκρασίες μικρότερες των 25 βαθμών. Όσον αφορά τον υποκαταστάτη R₁ ο Leuchs είχε παρατηρήσει ότι τα μεθόξυ παράγωγα αντιδρούσαν πιο εύκολα από τα αντίστοιχα αιθοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων αποδεικνύοντας ότι το καθοριστικό στάδιο της ταχύτητας είναι η αλκυλίωση του ιόντος αλογόνου. Άλλοι ερευνητές βρήκαν ότι η βένζυλο⁷⁸ ομάδα οδηγεί σε ακόμα πιο γρήγορες και λιγότερο απαιτητικές αντιδράσεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος του Leuchs δεν είναι μόνο ιστορικής σημασίας, αλλά χρησιμοποιείται ακόμη με τις παραλλαγές της, για τον σχηματισμό διαφόρων NCAs.

2.5.1. Φωσγενίωση ελεύθερων αμινοξέων (Fuchs-Farthing method).

Η φωσγενίωση των ελεύθερων αμινοξέων (Σχήμα 7) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για τη σύνθεση των NCAs σήμερα. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε πρώτα από τον Fuchs⁷⁹ το 1922 για την παρασκευή της N-φαινυλο γλυκίνης NCA και αργότερα επεξεργάστηκε λεπτομερώς από τους

Coleman⁸⁰, Farthing⁸¹ και Levy⁸² για μεγάλη πληθώρα N-Καρβοξυανυδριτών. Στη βιβλιογραφία έχει επικρατήσει ως η “μέθοδος Fuchs-Farthing”. Το πρώτο στάδιο της φωσγενίωσης φαίνεται να είναι ο σχηματισμός του N-χλωροφορμυλο αμινοξέος επειδή η προσθήκη ανιλίνης^{83, 84} οδηγεί στον σχηματισμό του 5-φαινυλο-υδαντοϊκού οξέος.



Σχήμα 7: α) Σχηματισμός N-Καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs-Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, β) απόδειξη αυτού με την προσθήκη ανιλίνης.

Το τετραυδροφουράνιο (THF) και το 1,4-διοξάνιο είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, ωστόσο δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις όταν κατεργάζονται με υδροχλώριο για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Σε γενικές αρχές, όλοι οι διαλύτες που είναι αδρανείς ως προς το φωσγένιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα αντίδρασης, αλλά οι λιγότερο πολικοί, όπως το χλωροφόρμιο, ο τετραχλωράνθρακας και ο οξικός αιθυλεστέρας, αυξάνουν τους χρόνους της αντίδρασης κατά ένα παράγοντα 10-30. Από τους πιο πολικούς διαλύτες μόνο το ακετονιτρίλιο είναι αδρανές αρκετά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και προτιμάται για τη σύνθεση του NCA της γλυκίνης. Οι παράπλευρες αντιδράσεις που συνοδεύουν τη σύνθεση των NCAs με τη μέθοδο αυτή περιεγράφηκαν στην παράγραφο 2.4.

2.5.2. Παραλλαγές στην μέθοδο Fuchs-Farthing.

Το φωσγένιο είναι ένα υψηλής δραστηριότητας αντιδραστήριο που έχει χρησιμοποιηθεί από τις πρώιμες μέρες της χημικής βιομηχανίας⁸⁴, 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(τριχλωρομεθυλο)-ανθρακικό ή τριφωσγένιο (BTC) έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί στην οργανική σύνθεση ως πηγές φωσγενίου. Το διφωσγένιο και το τριφωσγένιο είναι υγρό και κρυσταλλικό στερεό αντίστοιχα, γεγονός που επιτρέπει την πρακτικότερη και ασφαλέστερη χρησιμοποίησή τους, ως πρόδρομα δυο και τριών μορίων φωσγενίου. Στη σύνθεση των NCAs έχουν χρησιμοποιηθεί και τα δυο, αλλά το τριφωσγένιο έχει επικρατήσει.

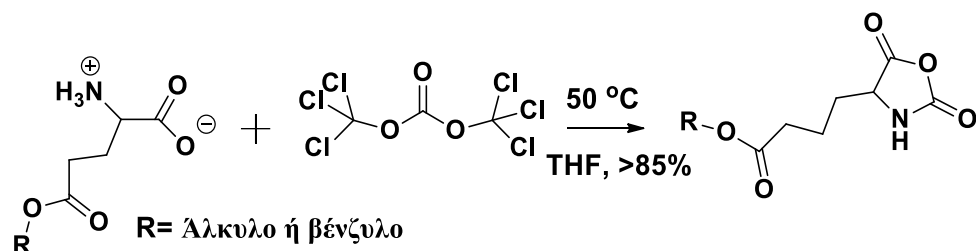
Το τριφωσγένιο⁸⁵ συντέθηκε πρώτη φορά από τον Councier το 1880, ενώ η δομή του έγινε γνωστή μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ το 1971. Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχει βρει μεγάλη αναγνώριση παρά το γεγονός ότι ήταν γνωστό για πάνω από έναν αιώνα.

Ο Eckert το 1987 πρότεινε μια κυκλική πορεία για τις πυρηνόφιλες αντιδράσεις του BTC. Σύμφωνα με την οποία το 1/3 του BTC αντιδρά με 1/3 από το πυρηνόφιλο προς σχηματισμό 1/3 mol 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 Roche⁸⁶ το 1988 και αποτελεί σήμερα μια από τις πιο δημοφιλείς πορείες. Επιλέχτηκε το τριφωσγένιο, διότι ήταν διαλυτό στα διάφορα μέσα που μετέχουν στη σύνθεση (THF) και στον 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 ομάδα (Bz). Σε μια τυπική πορεία (Σχήμα 8) αντιδρά 1/3 τριφωσγενίου σε αιώρημα του αμινοξέος σε THF (10g για κάθε 100ml) στους 40-50 °C μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές (το αμινοξύ είναι 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

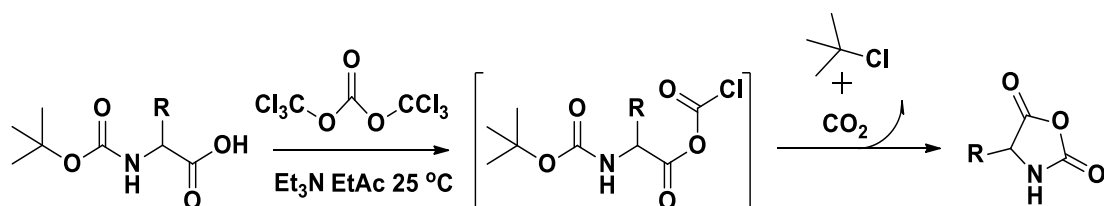
η αλανίνη και η λευκίνη οι αποδόσεις ελαττώνονται γύρω στο 50%. Βρίσκει

τέλεια εφαρμογή στις περιπτώσεις του γ-βενζυλογλουταμικού, της ο-βενζυλοτυροσίνης, της φαινυλαλανίνης της βαλίνης και σε όλους τους αλκυλοεστέρες του γλουταμικού οξέος.



Σχήμα 8: Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Roche για αμινοξέα με αλειφατική πλευρική αλυσίδα και προστασίες ανθεκτικές σε όξινο περιβάλλον.

Τρία χρόνια αργότερα ο Mobashery⁸⁷ 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 στον σχηματισμό ενδιαμέσου (Σχήμα 9). 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 τη 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 9: 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 σχηματισμό του ενδιαμέσου, λειτουργεί ως αποχωρούσα ομάδα και επιτρέπει στην αμινομάδα να προσβάλλει πυρηνόφιλα το καρβονύλιο της χλωροφόρμυλο ομάδας προς

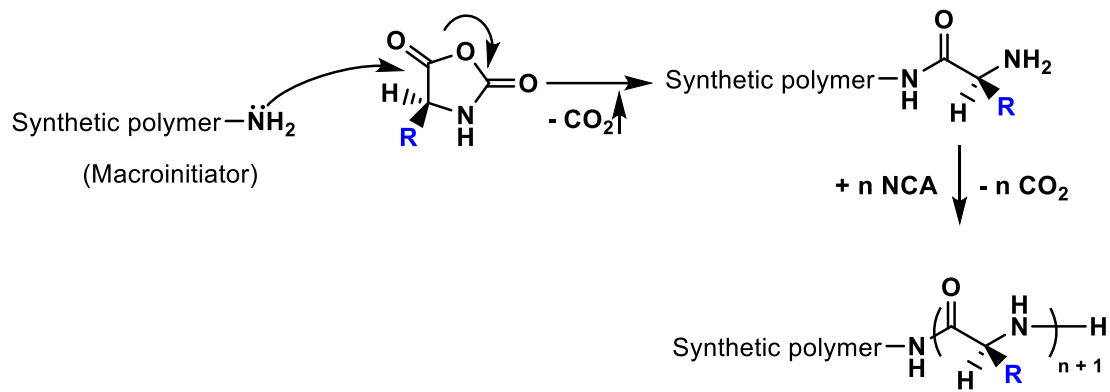
ενδομοριακή κυκλοποίηση και σχηματισμό του NCA. Οι αποδόσεις σε αυτή την πορεία είναι χαμηλότερες και προσδίδονται στη μικρότερη διαλυτότητα των NCAs στον οξικό αιθυλεστέρα από ότι στο τετραυδροφουράνιο. Επίσης οι αντιδράσεις διαρκούν περισσότερο και υπάρχει κίνδυνος ύπαρξης του άλατος της τριαιθυλαμίνης στον ανυδρίτη.

3. Υβριδικά κατά συστάδες συμπολυμερή

Τα υβριδικά κατά συστάδες συμπολυμερή αποτελούνται από μία συνθετική συστάδα και ένα συνθετικό ή μη πεπτιδικό τμήμα. Η ιδιότητά τους αυτή τα καθιστά σημαντικά υλικά, διότι ανήκουν στα συμπολυμερή τύπου ράβδου-σπειράματος (rod-coil) με μη συμβατικές πρωτότυπες δομές και με ενδιαφέρουσες μορφολογικές ιδιότητες⁸⁸⁻⁹³. Επίσης, εφόσον η συνθετική συστάδα είναι βιοσυμβατή, όπως στις περιπτώσεις της πολυαιθυλενογλυκόλης ή της πολυ(*N*-βινυλοπυρρολιδόνης) προκύπτουν υλικά με αξιόλογες ιδιότητες σε οργανικό ή υδατικό διάλυμα, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς φαρμάκων και σε πλήθος βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

3.1. Συμβατικές μέθοδοι σύνθεσης υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών

Η πρώτη αναφορά για τη σύνθεση των υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών εμφανίζεται στα μέσα της δεκαετίας του 1970 από τις ομάδες του Gallo⁹⁴ και του Yamashita⁹⁵. Αυτές τις αρχικές μελέτες ακολούθησαν πλήθος αναφορών, οι οποίες συνεχίζονται μέχρι σήμερα και έχουν ως κύριο στόχο τη σύνθεση δισυσταδικών AB και τρισυσταδικών ABA συμπολυμερών, όπου A είναι η συστάδα του πολυπεπτιδίου και B το συνθετικό τμήμα^{88, 96}. Η συντριπτική πλειοψηφία αυτών των συμπολυμερών παρασκευάστηκε με χρήση μίας διεργασίας δύο σταδίων, διότι οι πορείες σύνθεσης των δύο διαφορετικών τμημάτων είναι τυπικώς μη συμβατές. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση ενός συνθετικού ακροδραστικού μακροαπαρχητή, ο οποίος είτε στο ένα είτε στα δύο του άκρα εμφανίζει ομάδα πρωτοταγούς αμίνης. Αυτοί οι μακροαπαρχητές χρησιμοποιούνται στη συνέχεια στο δεύτερο στάδιο για τον πολυμερισμό των NCAs και τη δημιουργία της πολυπεπτιδικής συστάδας, όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.



Σχήμα 10: Χρήση ακροδραστικών μακροαπαρχητών με αμινομάδα για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs και την παρασκευή υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών.

Η παραπάνω διεργασία χαρακτηρίζεται από σημαντικά πλεονεκτήματα, αλλά και ένα κύριο μειονέκτημα. Τα πλεονεκτήματα αναφέρονται κυρίως στο πλήθος των διαφορετικών συμπολυμερών που μπορούν να παρασκευαστούν. Σύμφωνα με το πρώτο στάδιο, οι μακροαπαρχητές, οι οποίοι αποτελούν και τη συνθετική συστάδα των υβριδικών συμπολυμερών, μπορούν να προκύψουν από οποιαδήποτε από τις γνωστές συνθετικές μεθόδους. Διάφορα μονομερή μπορούν να πολυμεριστούν σύμφωνα με τους γνωστούς τρόπους πολυμερισμού και να προκύψουν ακροδραστικά πολυμερή με πρωτοταγείς αμίνες. Για παράδειγμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η γνώση της τεχνικής του ανιοντικού πολυμερισμού για να παρασκευαστούν πολυμερή με μικρή κατανομή μοριακών βαρών, ελεγχόμενα μοριακά βάρη και μήκη αλυσίδων, όπως και με υψηλό ποσοστό προσθήκης (~100%) της πρωτοταγούς αμινομάδας στα άκρα των αλυσίδων των εν λόγω πολυμερών. Κατά το δεύτερο στάδιο, από τη χρήση ενός μοναδικού μακροαπαρχητή μπορούν να προκύψουν διάφορα υβριδικά συμπολυμερή πολυμερίζοντας κάθε φορά διαφορετικό NCA.

Το κύριο μειονέκτημα της παραπάνω διαδικασίας είναι η ύπαρξη πλευρικών αντιδράσεων κατά το στάδιο του πολυμερισμού των NCAs που έχει ως αποτέλεσμα τα τελικά προϊόντα να χαρακτηρίζονται από υψηλή κατανομή μοριακών βαρών στο πεπτιδικό τμήμα. Επίσης, στα τελικά προϊόντα εμφανίζονται και προσμείξεις ομοπολυμερούς του πολυπεπτιδίου με αποτέλεσμα η εκχύλιση με εκλεκτικούς διαλύτες και στη συνέχεια η

κλασματοποίηση με εκλεκτική καταβύθιση να κρίνεται αναγκαία^{88, 96}. Όπως τονίστηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, ο πολυμερισμός των NCAs αποτελεί αντικείμενο μελέτης για πολλές δεκαετίες και οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί εμφανίζουν τόσο μειονεκτήματα όσο και πλεονεκτήματα. Στην προκειμένη περίπτωση, τα μειονεκτήματα της εκάστοτε μεθόδου οξύνονται από τη στιγμή που ο απαραίτητος είναι ένα πολυμερές, το οποίο είναι δυνατόν να περιέχει ανεπιθύμητες προσμείξεις, ικανές να εκκινήσουν τον πολυμερισμό του NCA ή να τον τερματίσουν.

Παρόλα τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου, όταν εκτελείται προσεκτικά παρέχει πολυμερή με ικανοποιητικά χαρακτηριστικά. Στον Πίνακα 1 παρατίθενται δείγματα των δισυσταδικών και τρισυσταδικών υβριδικών συμπολυμερών που έχουν εμφανιστεί στη βιβλιογραφία και παρασκευάστηκαν με την παραπάνω μέθοδο. Παρατηρείται πλουραλισμός στα μονομερή και στις μεθόδους πολυμερισμού που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των μακροαπαρχητών και του πολυπεπτιδικού τμήματος. Βινυλικά μονομερή, όπως το στυρένιο και διενικά, όπως το βουταδιένιο πολυμερίστηκαν με χρήση του ανιοντικού πολυμερισμού, ενώ ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου χρησιμοποιήθηκε για τις περιπτώσεις του αιθυλενοξειδίου και της ε-καπρολακτόνης. Στα περισσότερα παραδείγματα, το πολυπεπτιδικό τμήμα αποτελείται κυρίως από παράγωγα είτε της λυσίνης, είτε του γλουταμικού οξέος, καθώς αυτά σχηματίζουν δομές α -έλικας με επιθυμητά χαρακτηριστικά διαλυτότητας στους κοινούς οργανικούς διαλύτες. Επιπλέον, όταν αποπροστατευθούν δίνουν υδατοδιαλυτές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, των οποίων η διαμόρφωση μεταβάλλεται ανάλογα με το pH και τη θερμοκρασία^{97, 98}.

Πίνακας 1: Παραδείγματα υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών που έχουν παρασκευαστεί με χρήση ακροδραστικών μακροαπαρχητών με πρωτοταγείς αμινομάδες^{88, 96}, όπου A είναι η πολυπεπτιδική συστάδα και B το τμήμα του μακροαπαρχητή

Ακροδραστικός μακροαπαρχητής	Πολυπεπτιδικά τμήματα (Αρχιτεκτονική)
Πολυστυρένιο	PBLG (AB), PZLL (AB), PMDG (ABA)
Πολυβουταδιένιο	PZLL (AB, ABA), PBLG (AB, ABA), PBL/DG (ABA), PML/DG (ABA)
Πολυίσοπρένιο	PBLG (ABA)
Πολυδιμεθυλοσιλοξάνη	PBLG (AB, ABA), P(L/D-Phe) (AB)
Πολυαιθυλενογλυκόλη	PZLL (AB, ABA), PBLG (AB, ABA), P(L-Pro) (ABA), PBLA (AB, ABA), PHis (AB) ⁹⁹
Πολυπροπυλενοξείδιο	PBLG(ABA)
Πολυ(2-μεθυλοοξαζολίνη)	PBLG (AB), P(L-Phe) (AB) ¹⁰⁰
Πολυ(2-φαινυλοοξαζολίνη)	PBLG (AB), P(L-Phe) (AB) ¹⁰⁰
Πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)	PZLL (AB), PBLG (AB), PMLG (AB)
Πολυ(ακρυλικός μεθυλεστέρας)	PBLG (AB)
Πολυαιθυλένιο	PBLG (ABA)
Πολυφερροκενυλοσιλάνιο	PBLG (AB) ¹⁰¹
Πολυ(9,9-διεξυλοφλουορένιο)	PBLG (ABA) ¹⁰²
Πολυ(ε-καπρολακτόνη)	PBLG (ABA), P(L-Phe) (ABA), P(Gly) (ABA,), P(L-Ala) (ABA) ¹⁰³

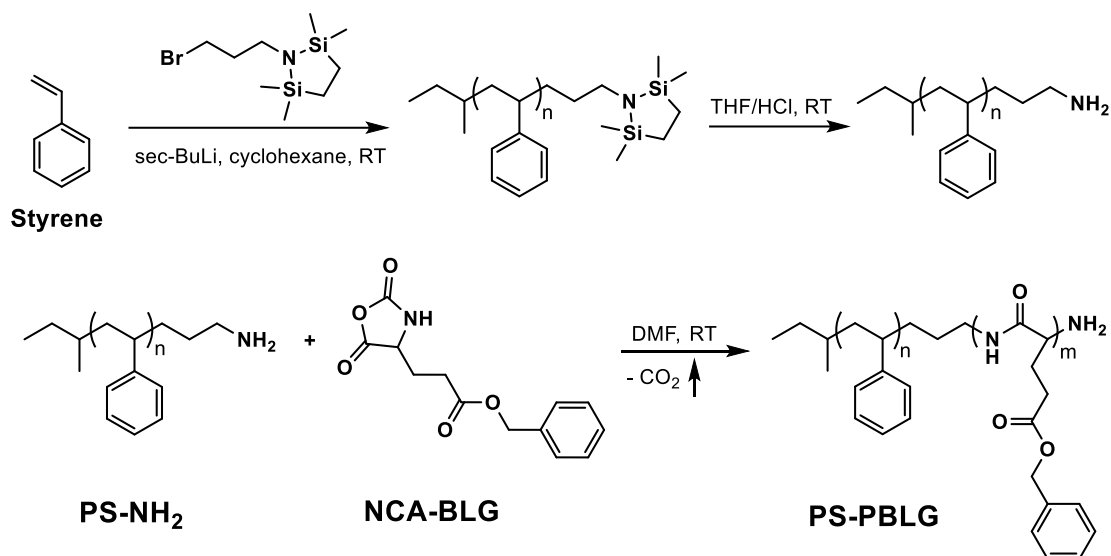
Η γενικότητα της παραπάνω διαδικασίας πιστοποιήθηκε με την παρασκευή υβριδικού κατά συστάδες συμπολυμερούς με τον πολυμερισμό του NCA της σαρκοσίνης (*N*-μεθυλογλυκίνης) από ένα συνθετικό, ακροδραστικό δενδριτικό πυρήνα με 64 πρωτοταγείς αμίνες¹⁰⁴. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι όλες οι τελικές αμινομάδες εκκίνησαν τον πολυμερισμό του NCA και πως η δραστηριότητα των πρωτοταγών αμινών στο στάδιο της εκκίνησης είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τις δευτεροταγείς αμίνες (λόγω της μεθυλο ομάδας της *N*-μεθυλογλυκίνης) του σταδίου διάδοσης. Η παρασκευή αυτή ενίσχυσε την άποψη ότι οι πρωτοταγείς αμίνες αποτελούν ιδανικούς απαρχητές για τον πολυμερισμό των NCAs και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών.

Εκτός της παραπάνω διαδικασίας έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες μέθοδοι για την παρασκευή τέτοιου είδους συμπολυμερών. Η ομάδα του Inoue¹⁰⁵ χρησιμοποίησε αμινο-δραστικά παράγωγα του στυρενίου για να πολυμερίσει τον NCA του γ-βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος (BLG) και στη συνέχεια συμπολυμέρισε αυτά τα ακροδραστικά πολυπεπτίδια με στυρένιο ή μεθακρυλικό μεθυλεστέρα με χρήση ριζικών απαρχητών για να ληφθούν υβριδικά συμπολυμερή χτενοειδούς αρχιτεκτονικής. Σε μία παρόμοια εργασία, η ομάδα του Imanishi¹⁰⁶ μετέτρεψε τις αμινο-τελικές ομάδες των πολυπεπτιδίων σε αλογονοακετυλο ομάδες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως απαρχητές για τον πολυμερισμό με ελεύθερες ρίζες του στυρενίου ή του μεθακρυλικού μεθυλεστέρα. Και στις δύο περιπτώσεις δεν υπήρχε αναφορά στο αν η πολυπεπτιδική αλυσίδα παρεμπόδιζε τον πολυμερισμό των ελεύθερων ριζών, ενώ τα τελικά προϊόντα αποτελούσαν μίγματα τόσο των συμπολυμερών όσο και των αρχικών ομοπολυμερών και η κλασματοποίησή ή η εκχύλισή τους ήταν αναγκαία.

Επιπλέον, η ομάδα του Uchida¹⁰⁷ παρασκεύασε μία γραμμική πολυουρεθάνη με ομάδες ισοκυανικού εστέρα και στις δύο άκρες της. Αυτό το μακρομονομερές αναμίχθηκε στη συνέχεια με NCAs και απαρχητή υδραζίνης, ο οποίος σχεδιάστηκε, ώστε να παραγάγει *in situ* ένα πολυπεπτίδιο με πρωτοταγείς αμίνες στα δύο του άκρα. Αυτό το διδραστικό πολυπεπτίδιο στη συνέχεια συμπυκνώθηκε με την πολυουρεθάνη για να σχηματίσει ένα πολυσυσταδικό υβριδικό συμπολυμερές του τύπου (AB)_n. Παρόλο που το προκύπτον υλικό δε μελετήθηκε διεξοδικά, παρατηρήθηκε η παρουσία ολιγομερικών προϊόντων συμπύκνωσης.

Σε μία τελευταία αναφορά, η ομάδα του Klok^{108, 109} παρασκεύασε υβριδικά συμπολυμερή πολυστυρενίου και πολυβουταδιενίου με μικρές συστάδες πολυπεπτιδίων. Ο σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη, μέσω της φασματοσκοπίας IR, των μεταβολών της διαμόρφωσής τους συναρτήσει του μοριακού βάρους, της πολυπεπτιδικής συστάδας και της θερμοκρασίας. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 11, αρχικά πραγματοποιήθηκε ο πολυμερισμός του στυρενίου με *sec*-BuLi, ο οποίος τερματίστηκε με κατάλληλο αντιδραστήριο που έφερε στο μόριό του μία προστατευμένη πρωτοταγή αμινομάδα. Στη συνέχεια

και μετά την αποπροστασία της τελικής αμινομάδας ακολούθησε ο πολυμερισμός των NCAs.



Σχήμα 11: Αντιδράσεις παρασκευής υβριδικού δισυσταδικού συμπολυμερούς πολυστυρένιο-πολυ(γ-βενζυλεστέρας του L-γλουταμικού οξέος) (PS-PBLG) από την ομάδα του Klok^{108, 109}

Και σε αυτή την περίπτωση το δεύτερο στάδιο δεν μπορεί να κριθεί ως απολύτως ελεγχόμενο, διότι η αύξηση των μονομερικών μονάδων στο πολυπεπτιδικό τμήμα συνοδεύεται από σημαντική αύξηση στην κατανομή μοριακών βαρών του υβριδικού συμπολυμερούς. Επίσης, η απόδοση του δεύτερου σταδίου δεν ήταν 100%, ενώ στο τέλος του πολυμερισμού των NCAs ανιχνευόταν ποσότητα του μακροαπαρχητή που δεν είχε αντιδράσει, γεγονός που καθιστούσε επιτακτική την κλασματοποίηση του τελικού προϊόντος.

Συνολικά, γίνεται κατανοητό ότι ένα πλήθος υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών, με ποικιλία αρχιτεκτονικών, μπορεί να παρασκευαστεί με χρήση συμβατικής χημείας. Τα συνθετικά πολυμερή που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το πολυστυρένιο^{89, 102, 108-112}, τα πολυδιένια^{94, 105, 113-119}, η πολυαιθυλενογλυκόλη^{48, 49, 120-128}, η πολυκαπρολακτόνη^{103, 129, 130}, τα σάκχαρα^{100, 131, 132}, οι πολυ(μεθακρυλικοί εστέρες)¹³³ και άλλα πολυμερή^{134, 135}. Ωστόσο, οι αποδόσεις των πολυμερισμών, η κατανομή μοριακών βαρών των τελικών προϊόντων καθώς και το ποσοστό του μακροαπαρχητή που εκκινεί τον πολυμερισμό των NCAs, στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν είναι ικανοποιητικές. Για τον λόγο αυτό γίνονται προσπάθειες αποφυγής των

παράπλευρων αντιδράσεων, ειδικά κατά το στάδιο της σύνθεσης του πολυπεπτιδικού τμήματος, ώστε τα τελικά προϊόντα να παρουσιάζουν ελεγχόμενα μοριακά βάρη και πιο στενές κατανομές μοριακών βαρών. Στην επόμενη παράγραφο παρουσιάζονται οι πρόοδοι που έχουν γίνει στη σύνθεση των υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών για την επίτευξη ελεγχόμενων πολυμερισμών.

3.2. Ελεγχόμενα συστήματα για τη σύνθεση υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές βελτιώσεις στον πολυμερισμό των NCAs μέσω απαρχητών πρωτοταγούς αμίνης. Ωστόσο, οι τεχνικές του υψηλού κενού και οι συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας, παράγοντες που βελτιστοποιούν τον πολυμερισμό των NCAs μέσω των απαρχητών αμινομάδας, δεν έχουν ακόμα χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών. Οι πρόοδοι στο εν λόγω πεδίο έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως από τις ομάδες των Schlaad και Deming με αποτελέσματα που προσεγγίζουν την επίτευξη ελεγχόμενων πολυμερισμών, οι οποίοι διεξάγονται σε αδρανή ατμόσφαιρα.

Η ομάδα του Schlaad χρησιμοποίησε ακροδραστικό μακροαπαρχητή πολυστυρενίου 52 μονάδων ($X_n=52$) με υδροχλωρική και ελεύθερη αμίνη για να πολυμερίσει τον NCA της ε-βενζυλοξυκαρβονυλο-L-λυσίνης⁶⁴⁻⁶⁷ σε διαλύτη DMF στους 40-80 °C υπό ατμόσφαιρα αργού. Σημαντικό ήταν το αποτέλεσμα ότι στα τελικά δείγματα απουσίαζαν προσμείξεις ομοπολυμερούς του πολυπεπτιδίου, αλλά υπήρχε μακροαπαρχητής που δεν είχε αντιδράσει και έπρεπε να απομακρυνθεί με εκχύλιση με κυκλοεξάνιο, ενώ και η απόδοση της αντίδρασης ήταν περίπου 70%. Ακόμα, τα μοριακά βάρη των πολυπεπτιδικών τμημάτων βρέθηκαν να είναι περίπου 20 με 30% μεγαλύτερα από τα στοιχειομετρικώς υπολογιζόμενα, αποτέλεσμα που οδηγεί στο συμπέρασμα του τερματισμού ποσότητας μακροαπαρχητή από ίχνη ανεπιθύμητων προσμείξεων. Το κύριο όμως χαρακτηριστικό ήταν η μικρή κατανομή μοριακών βαρών (< 1.03) στην περίπτωση του μακροαπαρχητή με την υδροχλωρική αμίνη. Χωρίς να έχουν γίνει κινητικές μελέτες, απέδωσαν τις μειωμένες τιμές της κατανομής μοριακών βαρών στην ισορροπία μεταξύ της υδροχλωρικής και

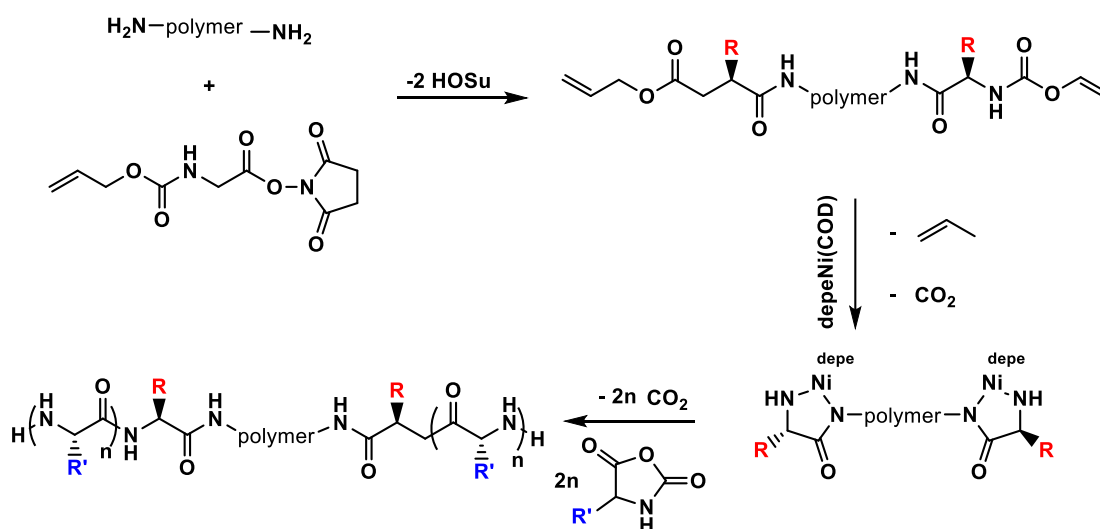
ελεύθερης αμίνης. Η λανθάνουσα κατάσταση της αλυσίδας με την υδροχλωρική αμίνη καθιστούσε το αναπτυσσόμενο μακρομόριο ανενεργό, ενώ κατά την αποπρωτονίωσή του η διάδοση του πολυμερισμού συνεχιζόταν. Συγχρόνως, η πρωτονίωση οποιουδήποτε ενεργοποιημένου μονομερούς (NCA⁻) στο σύστημα ενίσχυε το μηχανισμό μέσω της αμίνης και απέτρεπε την αύξηση της αλυσίδας μέσω του μηχανισμού του ενεργοποιημένου μονομερούς, ο οποίος ευθύνεται για την ύπαρξη των παράπλευρων αντιδράσεων. Η ταχύτερη πρόσληψη ενός πρωτονίου από το ενεργοποιημένο μονομερές αντί της πυρηνόφιλης προσβολής του σε ένα άλλο μόριο NCA εξάλειψε τον ανεπιθύμητο μηχανισμό μέσω του ενεργοποιημένου μονομερούς με αποτέλεσμα ο πολυμερισμός να είναι εν μέρει ελεγχόμενος.

Την ίδια τεχνική ακολούθησε και η ομάδα του Lutz¹³⁶, η οποία πραγματοποίησε πολυμερισμό των NCAs του γ-βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος και του β-βενζυλεστέρα του L-ασπαριγινικού οξέος με τους ίδιους μακροαπαρχητές όπως παραπάνω, αλλά αντί για πολυστυρένιο χρησιμοποίησε πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Και στην περίπτωση αυτή οι κατανομές μοριακών βαρών των υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών ήταν στενές (< 1.05) όταν χρησιμοποιήθηκε το υδροχλωρικό άλας του μακροαπαρχητή, αλλά τα τελικά προϊόντα χρειάστηκαν να εκχυλιστούν πρώτα με DMF, λόγω της παρουσίας και ποσότητας ομοπολυμερούς του πολυπεπτιδίου. Η ταχύτητα όμως του πολυμερισμού ήταν κατά πολύ μικρότερη σε σύγκριση με αυτήν που επιτυγχάνεται όταν οι μακροαπαρχητές δεν είναι φορτισμένοι με αποτέλεσμα ακόμα και μετά από τρεις ημέρες στους 40 °C να επιτυγχάνεται μόνο η δημιουργία ολιγοπεπτιδίων (10 μονάδες). Ωστόσο, ο χρόνος της αντίδρασης μειώθηκε με αύξηση της θερμοκρασίας ή με τη χρήση συστήματος απαρχητή PEG-NH₃⁺Cl⁻/PEG-NH₂ 1:1.

Οι απαρχητές μετάλλων μετάπτωσης που χρησιμοποιήθηκαν από την ομάδα του Deming για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs εφαρμόστηκαν και στην περίπτωση της σύνθεσης υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών με μία διαφοροποίηση όμως. Ο πολυμερισμός των NCAs με χρήση συμπλόκων μετάλλου μηδενικού σθένους επιτυγχάνεται από δραστικά ενδιάμεσα τα οποία ενεργοποιούνται in situ, όπου το C-τελικό άκρο του πολυπεπτιδίου προέρχεται

από το πρώτο NCA μονομερές. Επομένως, αυτή η μεθοδολογία δεν θα επέτρεπε τη σύνδεση ενός αμινοτελικού συνθετικού πολυμερούς.

Για τον λόγο αυτό η ομάδα του Deming ανέπτυξε μία εναλλακτική μέθοδο με χρήση αλλυλοξυκαρβονυλαμινοαμιδίων ως καθολικά πρόδρομα για τους αμιδο-αμιδικούς νικελοκυκλικούς δακτυλίους. Αυτά τα απλά παράγωγα των αμινοξέων υποβάλλονται σε διπλή οξειδωτική προσθήκη σε μηδενικού σθένους νικέλιο για να δώσουν δραστικούς απαρχητές για τον πολυμερισμό των NCAs¹³⁷ (Σχήμα 12). Τα πολυπεπτίδια που λαμβάνονται από τα σύμπλοκα αυτά χαρακτηρίζονται από καλά καθορισμένα μοριακά βάρη και στενές κατανομές μοριακών βαρών.



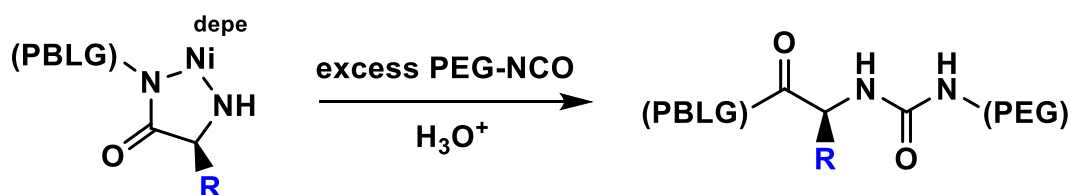
Σχήμα 12: Σύνθεση τρισυσταδικών υβριδικών συμπολυμερών με χρήση νικελοκυκλικού απαρχητή. [R= -CH₂CH(CH₃)₂, R'= -CH₂CH₂CO₂CH₂C₆H₅, HOSu= N-υδροξυηλεκτριμίδιο].

Τα τελικά προϊόντα χαρακτηρίζε ο ικανοποιητικός έλεγχος των μοριακών βαρών της συστάδας του πολυπεπτιδίου και η απουσία τόσο του προδρόμου ομοπολυμερούς που δεν είχε αντιδράσει όσο και της δημιουργίας του ομοπολυπεπτιδίου. Επιπλέον, με αυτή τη μεθοδολογία παρασκευάστηκαν δισυσταδικά υβριδικά συμπολυμερή πολυ(ακρυλικού μεθυλεστέρα)-PBLG (PMA-PBLG) χρησιμοποιώντας αμινο ακροδραστικό PMA που παράχθηκε με ελεγχόμενο ριζικό πολυμερισμό¹³⁸. Η μετατροπή δύο σταδίων της αμινομάδας του συνθετικού πολυμερούς σε νικελοκυκλικό απαρχητή επέτρεψε τον

ελεγχόμενο πολυμερισμό του NCA λαμβάνοντας τελικά προϊόντα με στενές συνολικά κατανομές μοριακών βαρών (< 1.2).

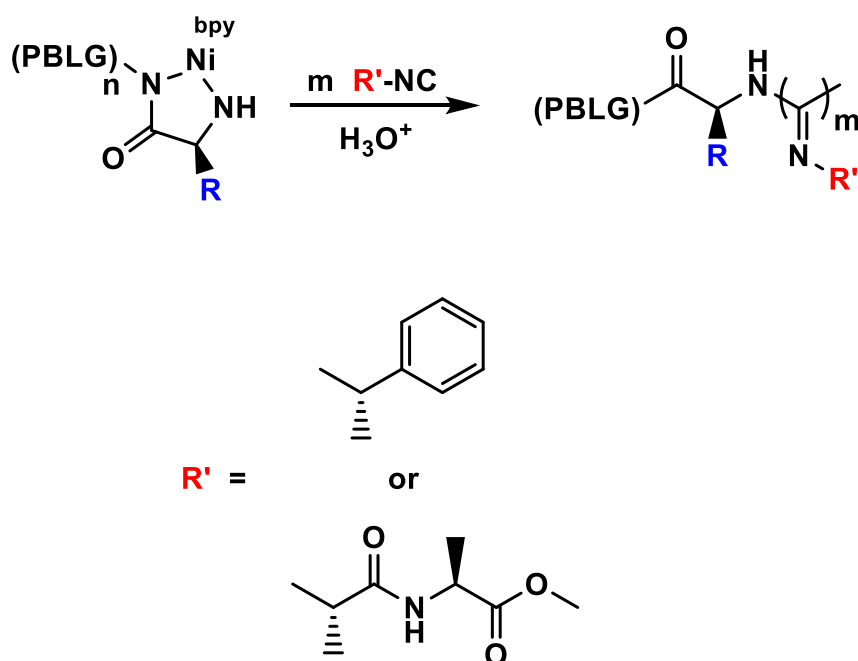
Ως επέκταση της παραπάνω μεθόδου, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε πλήθος αμινο-τελικών πολυμερών, η ομάδα του Deming ανέπτυξε έναν τρόπο σύζευξης των ζωντανών πολυπεπτιδικών αλυσίδων με ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια. Είναι γνωστό στον πολυμερισμό των NCAs ότι τα ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια, όπως οι ισοκυανικοί εστέρες, δρουν ως αντιδραστήρια τερματισμού μέσω αντίδρασης με το N-τελικό άκρο της αναπτυσσόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Και στην περίπτωση όμως των νικελοκυκλικών πολυπεπτιδικών άκρων αυτό είναι εφικτό, όπως αναφέρει η ομάδα του Deming και μάλιστα ποσοτικώς. Όταν δε χρησιμοποιηθεί ένα μακρομοριακό ηλεκτρονιόφιλο, το προκύπτον προϊόν είναι ένα υβριδικό συμπολυμερές.

Σύμφωνα με την εν λόγω μέθοδο, παρασκευάστηκαν δισυσταδικά υβριδικά συμπολυμερή PBLG-PEG. Αρχικά παράχθηκε μία πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), η οποία στην άκρη της περιείχε μία ομάδα ισοκυανικού εστέρα. Στη συνέχεια, αυτό το πολυμερές αντέδρασε σε περίσσεια με ζωντανό PBLG για να ληφθούν τα υβριδικά δισυσταδικά συμπολυμερή, όπως φαίνεται στο Σχήμα 13. Επίσης, από την αντίδραση της ίδιας ακροδραστικής πολυαιθυλενογλυκόλης με τα ζωντανά τρισυσταδικά υβριδικά συμπολυμερή που αναφέρθηκαν παραπάνω προέκυψαν τα αντίστοιχα υβριδικά πεντασυσταδικά συμπολυμερή¹³⁹. Από τη στιγμή βέβαια που χρησιμοποιείται περίσσεια της ακροδραστικής PEG για να συζευχθεί με τα άκρα των ζωντανών πολυπεπτιδικών αλυσίδων, είναι αναγκαία η απομάκρυνσή της μετά την ολοκλήρωση της σύζευξης. Ο καθαρισμός αυτός επιτυγχάνεται με συνεχείς καταβυθίσεις των τελικών προϊόντων σε μεθανόλη, διαλύτης στον οποίο είναι διαλυτή η PEG.



Σχήμα 13: Σύνθεση δισυσταδικού υβριδικού συμπολυμερούς μέσω σύζευξης της ακροδραστικής πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG-NCO) με ζωντανό PBLG

Τέλος, ακόμα μία σημαντική εφαρμογή των απαρχητών μετάλλων μετάπτωσης προέκυψε από την ομάδα του Cornelissen, η οποία κατάφερε, όπως φαίνεται στο Σχήμα 14, να πολυμερίσει ισοκυανίδια χρησιμοποιώντας για απαρχητή ζωντανό PBLG, το οποίο είχε παρασκευαστεί σύμφωνα με τη μέθοδο των νικελοκυκλικών δακτυλίων¹⁴⁰. Είναι αξιόλογο το γεγονός ότι μέσω των απαρχητών νικελίου είναι δυνατός ο πολυμερισμός δύο διαφορετικών μη συμβατών μονομερών με τη διαδοχική προσθήκη τους στο μίγμα της αντίδρασης.



Σχήμα 14: Σύνθεση δισυσταδικού υβριδικού συμπολυμερούς PBLG-πολυισοκυανιδίου με διαδοχική προσθήκη των μονομερών και χρήση αμιδο-αμιδικού νικελοκυκλικού απαρχητή (bpy= 2,2'-διπυριδύλο).

Συμπερασματικά, η χρήση των μεθόδων ελεγχόμενου πολυμερισμού των NCAs οδηγεί στο σχηματισμό καλά προσδιορισμένων πολύπλοκων υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών. Κυρίως η χημεία των νικελοκυκλικών απαρχητών και γενικά των μετάλλων μετάπτωσης έχει αποδώσει έως τώρα τα ικανοποιητικότερα αποτελέσματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτός των άλλων για τη σύνδεση διαφόρων μορίων, όπως πεπτιδίων, ολιγοσακχαριτών ή άλλων υποκαταστατών σε ένα πολυπεπτίδιο μέσω του ισχυρού αμιδικού δεσμού, ενώ έχει καταστεί δυνατή ακόμα και η ανάπτυξη πολυπεπτιδίων από επιφάνειες¹⁴¹. Κύριο όμως μειονέκτημα των

μεθόδων αυτών παραμένει η επιτακτική απομάκρυνση του βιοτοξικού μετάλλου από το τελικό προϊόν, διαδικασία που ούτε εύκολη κρίνεται αλλά ούτε και ποσοτική. Από τη στιγμή δε που μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές των υβριδικών συμπολυμερών είναι η χρήση τους σε βιοτεχνολογικές μελέτες, γίνεται κατανοητό ότι η βιοσυμβατότητα των εν λόγω πολυμερών αποτελεί απολύτως απαραίτητη προϋπόθεση. Επιπλέον, οι ελάχιστες αναφορές σε υβριδικές δομές πολύπλοκης μακρομοριακής αρχιτεκτονικής, όπως μικτόκλινα αστέρια ή εμβολιασμένα συμπολυμερή, μαρτυρούν πως το πεδίο των υβριδικών πολυμερών δεν είναι κορεσμένο, αντιθέτως αναζητώνται νέες ευέλικτες μέθοδοι παρασκευής τους που θα ανταποκρίνονται στις προϋποθέσεις που έχουν ήδη τεθεί και θα επιτρέπουν τον σχηματισμό πιο ιδιαίτερων αρχιτεκτονικών.

4. Αποκρινόμενα πολυμερικά μικύλλια

Η θεραπεία του καρκίνου παραμένει μια σημαντική πρόκληση στην ιατρική. Ενώ οι περιπτώσεις καρκίνου εμφανίζουν μια συνεχόμενη αύξηση, η πρόοδος που έχει σημειωθεί στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων καθώς και στις θεραπευτικές μεθόδους, δεν είναι ανάλογη, όπως φαίνεται από τα ποσοστά θνησιμότητας που εξακολουθούν να παρατηρούνται για ορισμένους τύπους καρκίνων. Για τον λόγο αυτό η επιστημονική κοινότητα που ασχολείται με την παραγωγή φαρμάκων προσπαθεί να μετατοπιστεί από τις παραδοσιακές τεχνικές σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων εφαρμόζοντας τη νανοτεχνολογία και ειδικότερα τους πολυμερικούς φορείς. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών, έχει σημειωθεί τεράστια πρόοδος στον σχεδιασμό υλικών σε επίπεδο νανοκλίμακας που έχει ανοίξει το δρόμο σε ένα νέο κλάδο της ιατρικής, τη νανοϊατρική. Η νανοϊατρική περιλαμβάνει τον χειρισμό υλικών που βρίσκονται στην κλίμακα των νανομέτρων και την εκμετάλλευση των ιδιοτήτων τους, προκειμένου να σχεδιαστούν προϊόντα που μπορούν να βελτιώσουν τις υπάρχουσες τεχνολογίες. Ενώ οι παραδοσιακές τεχνικές δεν έχουν βελτιωθεί ικανοποιητικά όσον αφορά τη δραστικότητα των θεραπευτικών παραγόντων, ως προς την κατανομή και τη διάρκεια παραμονής τους στο σώμα, με την νανοϊατρική επιτεύχθηκε σημαντική πρόοδος στη βελτιστοποίηση της βιοσυμβατότητας, της βιοδιανομής και της φαρμακοκινητικής. Αν και η έρευνα για τον εντοπισμό πιο αποτελεσματικών φαρμάκων εξελίσσεται με

ταχείς ρυθμούς, η ανακάλυψη νέων υλικών με την απαιτούμενη λειτουργικότητα της στοχευμένης και αποτελεσματικής χορήγησης φαρμάκων στα καρκινικά κύτταρα δεν εξελίσσεται με τον ίδιο ρυθμό. Παρ' όλα αυτά μια νέα κατηγορία υλικών έρχεται να λύσει αυτό το πρόβλημα. Τα υλικά αυτά συνήθως αφορούν δομές μικυλλίων που έχουν την ιδιότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα και στην αλλαγή του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Τέτοια ερεθίσματα είναι η αλλαγή στο pH, στη θερμοκρασία και στο φως. Στη συνέχεια περιγράφονται τέτοια υλικά, τα οποία δημιουργούν μικύλλια και των οποίων η δομή διαμορφώνεται ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

4.1. Μικύλλια που αποκρίνονται σε αλλαγές του pH

Τα μικύλλια που αποκρίνονται σε αλλαγές του pH έχουν γίνει αντικείμενο εκτενούς μελέτης, όσον αφορά τη δράση τους ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων (drug delivery systems). Η ικανότητα των υλικών αυτών να αντιδρούν στις αλλαγές του pH, έγκειται στην παρουσία ομάδων που μπορούν να ιοντιστούν και έτσι να αλλάξει η διαλυτότητά τους. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να ελεγχθεί η αποδέσμευση της φαρμακευτικής ουσίας που βρίσκεται στο εσωτερικό των μικυλλίων.

Η ιστιδίνη, που αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής, είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μορίου, που, λόγω του ιμιδαζολικού δακτυλίου που φέρει, είναι αποκρίσιμη σε τέτοια ερεθίσματα. Αναλυτικότερα, σε τιμές $\text{pH} < 6$ το ιμιδαζόλιο είναι θετικά φορτισμένο, καθώς και τα δύο άτομα αζώτου είναι πρωτονιομένα, ενώ σε περιβάλλον με $\text{pH} > 6$ υπάρχει μόνο ένας δεσμός N-H. Το γεγονός αυτό καθιστά την ιστιδίνη, πολύ ευαίσθητη σε μικρές αλλαγές του pH και κατάλληλη για χρήση ως σύστημα μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων, αφού το pH στο εξωτερικό αυτών των κυττάρων είναι ~ 6.5 , ενώ στο εσωτερικό του οι τιμές του pH διαμορφώνονται στο $5.5 - 6.5$ στα ενδοσώματα και $4.5 - 5.5$ στα λυσοσώματα⁹⁹.

4.2. Μικύλλια που αποκρίνονται σε αλλαγές της θερμοκρασίας

Μια επίσης μεγάλη κατηγορία μικυλλίων, που αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα, είναι αυτά που αλληλοεπιδρούν με τις αλλαγές στο θερμοκρασιακό περιβάλλον. Η θερμοκρασία έχει χρησιμοποιηθεί ως εξωτερικό ερέθισμα σε μεγάλο βαθμό¹⁴²⁻¹⁴⁷ εξαιτίας της αποτελεσματικότητας που παρουσιάζει και της

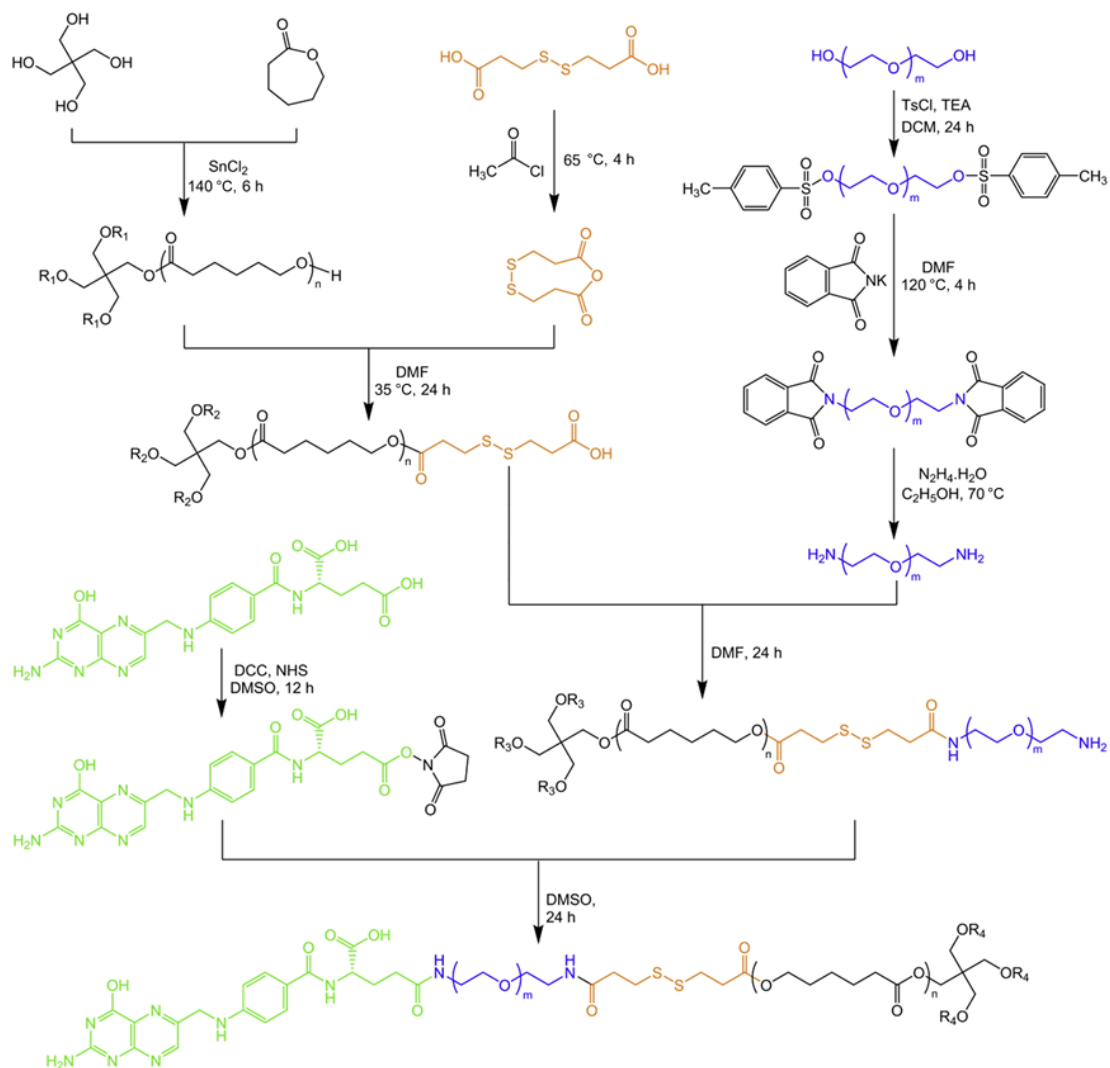
ευκολίας στον έλεγχο της. Τα συστήματα που αποκρίνονται σε αλλαγές της θερμοκρασίας, μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, οι οποίες βασίζονται στα σημεία ελάχιστης κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος (low critical solution temperature, LCST) και μέγιστης κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος (upper critical solution temperature, UCST).

Καινοτόμα υπήρξε η εργασία της ομάδας του Okano¹⁴⁷, κατά την οποία έγινε η σύνθεση του θερμοαποκρινόμενου συμπολυμερούς πολυ(*N*-ισοπρόπυλο ακρυλαμίδιο-*b*-μεθακρυλικός βουτυλετέρας) (PIPAAm-*b*-PBMA). Το PIPAAm παρουσιάζει σημείο ελάχιστης κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος στους 32 °C. Κάτω από τη συγκεκριμένη θερμοκρασία είναι υδρόφιλο, ενώ καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται αλλάζει η συμπεριφορά του και γίνεται υδρόφοβο. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αλληλεπίδρασή του με βιολογικά συστατικά (κύτταρα, πρωτεΐνες), με την ταυτόχρονη αποδέσμευση της φαρμακευτικής ουσίας που βρίσκεται στο εσωτερικό του μικυλλίου (υδρόφοβη συστάδα). Αντίστροφη πορεία ακολούθησε η ομάδα του Yang¹⁴³, αφού χρησιμοποίησε ως υδρόφοβο τμήμα του μικυλλίου το PIPAAm και ως υδρόφιλο την πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG). Με τη μέθοδο αυτή η φαρμακευτική ουσία δεσμεύτηκε στο υδρόφοβο τμήμα, στο οποίο όταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντός του ελλατώθηκε κάτω από το LCST, παρουσιάστηκε αλλαγή στην υδροφιλικότητα με αποτέλεσμα την ελεγχόμενη αποδέσμευσή της.

4.3. Μικύλλια που αποκρίνονται σε φαινόμενα οξειδωσης/αναγωγής

Αυξανόμενο ενδιαφέρον παρουσιάζουν πολυμερή τα οποία αποκρίνονται σε φαινόμενα οξειδωσης/αναγωγής (redox responsive), κυρίως με τη χρήση δισουλφιδικών δεσμών. Το χαρακτηριστικό αυτό, προσφέρει στα πολυμερικά μικύλλια πολλές δυνατότητες, καθώς αυξάνει την εξωκυτταρική σταθερότητα τους, ενώ στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων οι δεσμοί αυτοί σπάνε χάρη στην ύπαρξη ενός τριπεπτιδίου, της γλουταθιόνης (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές για τη χρήση δισουλφιδικών δεσμών σε συμπολυμερή με σκοπό να λειτουργήσουν ως μέσο απόκρισης σε οξειδοαναγωγικό περιβάλλον¹⁴⁸⁻¹⁵⁷. Η ομάδα του Ren παρουσίασε σε μια εργασία τη σύνθεση ενός δισυσταδικού συμπολυμερούς

μεθοξυ πολυ(αιθυλενογλυκόλη)-SS-*b*-πολυ(D,L-λευκίνη) (mPEG-SS-PLeu), όπου έδειξε ότι τα μικύλλια αποδιοργανωνόνταν, παρουσία του αναγωγικού μέσου της διθειοθρεϊτόλης (DTT) εξαιτίας της διάνοιξης των δισουλφιδικών δεσμών, με αποτέλεσμα την εκλεκτική αποδέσμευση της φαρμακευτικής ουσίας. Σε μια αντίστοιχη εργασία η ομάδα του Chen¹⁵⁶ παρουσίασε τη σύνθεση του πολυμερικού μικυλλίου, poly(ethylene glycol)-SS-*b*-poly(ε-benzyloxycarbonyl-l-lysine), στο οποίο έγινε εισαγωγή της φαρμακευτικής ουσίας δοξορουβικίνη. Σύμφωνα με τις μελέτες που έγιναν στο πολυμερικό μικύλλιο, εμφανίστηκε μεγάλη συμβατότητα σε κύτταρα και σε ιστούς. Επίσης τα μικύλλια αυτά αποδιοργανώθηκαν στο εσωτερικό των κυττάρων, παρουσία GSH. Ενδιαφέρον προκαλεί και η εργασία των Zhou et al¹⁵⁷, όπου γίνεται αναφορά στη σύνθεση τετράκλωνου πολυμερικού αστεριού με τη χρήση πενταερυθριτόλης ως απαρχηγή. Ο κάθε κλάδος του πολυμερικού αστεριού αποτελούταν από μία συστάδα ε-καπρολακτόνης ενωμένης με δισουλφιδικούς δεσμούς με μία συστάδα πολυ(αιθυλενογλυκόλης), το οποίο έφερε ένα μόριο φολικού οξέος (Σχήμα 15). Το ενδιαφέρον στην συγκεκριμένη εργασία έγκειται στη διπλή δραστηριότητα του μορίου. Αρχικά λόγω της αποκρισιμότητας σε οξειδοαναγωγικές συνθήκες, εξαιτίας των δισουλφιδικών δεσμών και κατά δεύτερον λόγω της παρουσίας του φολικού οξέος, το οποίο λειτουργεί ως ομάδα στοχευτής των καρκινικών κυττάρων, κάτι στο οποίο θα γίνει εκτενής αναφορά παρακάτω.



Σχήμα 15: Συνθετική πορεία του συζευγμένου με FA, αστεροειδούς συμπολυμερούς (star-PCLss-FA)

4.4. Μικύλλια που αποκρίνονται σε περιβάλλον με μαγνητικό πεδίο

Ξεχωριστή κατηγορία αποκρινόμενων μικυλίων θα πρέπει να θεωρηθεί η ομάδα μικυλίων που έχουν μαγνητικές ιδιότητες¹⁵⁸⁻¹⁶⁰, παρά το γεγονός ότι οι ιδιότητες αυτές δεν προέρχονται από τα ίδια τα πολυμερή, αλλά από τοποθετημένα μόρια μεταλλικών στοιχείων μέσα σε αυτά. Επίσης η χρήση τέτοιων υλικών βρίσκει εφαρμογή κυρίως στη διάγνωση, αφού όπως φαίνεται από την εργασία των Novosad et al¹⁶⁰, τέτοια υλικά αποτελούν χρήσιμο εργαλείο στη μαγνητική τομογραφία (MRI).

4.5. Μικύλλια που αποκρίνονται σε πολλαπλά ερεθίσματα

Πρωτοποριακές θεωρούνται οι μελέτες που στοχεύουν στη σύνθεση πολυμερικών μικυλλίων που εκμεταλλεύονται δύο ή και περισσότερα εξωτερικά ερεθίσματα για τη στοχευμένη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών στο εσωτερικό των κυττάρων. Στην προσπάθεια της, η επιστημονική κοινότητα, να συνθέσει έξυπνα υλικά έχει καταφέρει τη σύνθεση τέτοιων υλικών που αποκρίνονται ταυτόχρονα σε διαφορετικά ερεθίσματα, όπως σε αλλαγές του pH και σε απουσία οξειδοαναγωγικών παραγόντων^{157-159, 161-168}. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εργασία των Guo et al¹⁶⁵, όπου συνέθεσαν επιτυχώς πολυμερή μεθόξυ πολυ(αιθυλενογλυκόλης) -*b*- πολυ(L- λακτιδίου) -SS- πολυ(αιθυλενιμίνης) / FA-2,3-διμέθυλο μηλεϊνικού ανυδρίτη). Η αποκρισιμότητα του πολυμερικού μικυλλίου έγινε εμφανής σε pH 5.0 και 10mM GSH, όπου η δομή του μικυλλίου αποδιοργανώθηκε, εξαιτίας της πρωτονίωσης των αμινομάδων της πολύ(αιθυλενιμίνης) και στην αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών. Αντίστοιχη εργασία είναι αυτή των Yang et al¹⁶², όπου πραγματοποιήθηκε σύνθεση του πολυμερικού μικυλλίου μεθόξυ πολυ(αιθυλενογλυκόλη)-SS-πολύ(L-γλουταμικό οξύ-*g*-2-διβουτυλαμίνη).

4.6. Μικύλλια που φέρουν ακραίες ομάδες-στοχευτές

Σε μια προσπάθεια να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των υλικών αυτών, πληθώρα μελετών έχει δημοσιευτεί, αναφορικά με μικύλλια που φέρουν στην επιφάνεια τους ομάδες-στοχευτές. Οι ομάδες αυτές περιλαμβάνουν οργανικά μόρια, τα οποία μπορούν να εντοπίσουν ασθενή κύτταρα και να προσδεθούν σε αυτά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το Φολικό Οξύ (Folic Acid, FA)¹⁶⁹⁻¹⁷², οι υποδοχείς του οποίου, υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα, ενώ αντίστοιχες ιδιότητες φέρεται να έχουν το Γλυκυρρητινικό Οξύ (18β-Glycyrrhetic acid, GA)¹⁷³⁻¹⁷⁷ και το Γαλλικό Οξύ (GaA)^{178, 179}. Το γεγονός ότι βρίσκονται τέτοιες ομάδες στις επιφάνειες των μικυλλίων λειτουργεί προσθετικά στις ιδιότητες των μικυλλίων, αφού μπορεί να γίνει συνδυασμός των ιδιοτήτων τους αναφορικά με την επίδραση των εξωτερικών ερεθισμάτων στην υδροφιλικότητα τους. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η αποτελεσματικότητα στη μεταφορά και αποδέσμευση της φαρμακευτικής ουσίας που φέρουν. Μια ενδιαφέρουσα εργασία στο θέμα αυτό,

αποτελεί η εργασία των Bae et al¹⁸⁰, όπου συνδυάζουν την pH-αποκρισιμότητα της πολυ(ιστιδίνης) με τη στοχοποίηση καρκινικών κυττάρων με το φολικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα σχηματίστηκαν μικύλλια με δύο ειδών πολυμερή, πολυ(αιθυλενογλυκόλης)-*b*-πολυ(L-ιστιδίνης) (PEG-*b*-PHis) και πολυ(αιθυλενογλυκόλης)-*b*-πολυ(L-λακτικού οξέος) (PEG-*b*-PLLA) στα οποία είχαν προσκολληθεί μόρια φολικού οξέος. Σε *in vitro* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, φάνηκε pH-αποκρισιμότητα σε τιμές pH 6.6-7.2, ενώ η παρουσία του φολικού οξέος προσέδωσε στα μικύλλια μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην καταστροφή καρκινικών κυττάρων. Ένα ακόμη μόριο που έχει χρησιμοποιηθεί ως ομάδα-στοχευτής, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι το γλυκυρρητινικό οξύ. Αυτό μπορεί να διαπιστωθεί από την εργασία των Zhi et al¹⁸¹, όπου συνέθεσαν GA-τροποποιημένα μικύλλια πολυ(αιθυλενογλυκόλης)-*b*-πολυ(γ-βένζυλο-γλουταμικού οξέος), στα οποία είχε εισαχθεί η φαρμακευτική ουσία δοξορουβικίνη (DOX). Μελέτες *in vivo* και μελέτες κυτταροτοξικότητας, έδειξαν pH-αποκρισιμότητα των μικυλλίων αυτών. Το σημαντικότερο αποτέλεσμα όμως ήταν η μεγάλη συγκέντρωση της φαρμακευτικής ουσίας δοξορουβικίνης στα κύτταρα, σε σχέση με τη χορήγηση καθαρής δοξορουβικίνης (περίπου πέντε φορές μεγαλύτερη). Σημαντικό αποτέλεσμα αποτελεί και η διπλάσια κυτταροτοξικότητα στην περίπτωση των μικυλλίων σε σύγκριση με την καθαρή ουσία, καθώς και το γεγονός ότι η κυτταροτοξικότητα βρέθηκε να είναι εξαρτώμενη τόσο από τον χρόνο, όσο και από τη δοσολογία. Όλα αυτά συνηγορούν στη δημιουργία ενός «έξυπνου» μοντέλου για την ελεγχόμενη και στοχευμένη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών.

5. Μοριακός χαρακτηρισμός

5.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR)

Η υπέρυθη περιοχή του φάσματος περιλαμβάνει ακτινοβολίες, των οποίων οι κυματάρηθοι κυμαίνονται από 12.800 έως 10 cm⁻¹ ή τα μήκη κύματος τους από 0.78 έως 1000 μm. Από την πλευρά τόσο των εφαρμογών όσο και της οργανολογίας, το φάσμα υπέρυθρου χωρίζεται σε εγγύς, μέσο και άπω υπέρυθρο. Τα όρια της κάθε περιοχής παρέχονται προσεγγιστικά στον Πίνακα,

ενώ η περιοχή υπερέθρου που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι περιοχή κυματαριθμών από 670 έως 4000 cm^{-1} .

Πίνακας 2: Φασματικές περιοχές υπερέθρου

Περιοχή	Περιοχή μήκους κύματος (λ), μm	Περιοχή κυματαριθμών (ν) cm^{-1}	Περιοχή συχνοτήτων (ν), Hz
Εγγύς (near)	0,78 – 2,5	12800 – 4000	$3,8 \times 10^{14}$ – $1,2 \times 10^{14}$
Μέση (middle)	2,5 – 50	4000 – 200	$1,2 \times 10^{14}$ – $6,0 \times 10^{14}$
Άπω (far)	50 – 1000	200 – 10	$6,0 \times 10^{14}$ – $3,0 \times 10^{14}$
Περισσότερο χρησιμοποιούμενη	2,5 – 15	4000 – 670	$1,2 \times 10^{14}$ - $2,0 \times 10^{14}$

Στα πολυπεπτίδια η χρήση του IR είναι πολύ σημαντική, τόσο για την ποιοτική εξακρίβωση σύνθεσης του ανυδρίτη των αμινοξέων (συνήθεις δονήσεις έκτασης στα 1785 cm^{-1} και 1855 cm^{-1}) όσο και για την σύνθεση των πολυμερικών πεπτιδίων (δόνηση του αμιδικού δεσμού στα 1650 cm^{-1}). Χαρακτηριστικά, οι δεσμοί N-H, O-H απορροφούν στην περιοχή $3600\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$, ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα 3000 cm^{-1} . Οι καρβονυλικές ομάδες απορροφούν μεταξύ $1750\text{-}1680 \text{ cm}^{-1}$, ενώ η περιοχή σε τιμές μικρότερες από τα 1500 cm^{-1} χαρακτηρίζεται ως περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος, με τις απορροφήσεις να οφείλονται σε ποικιλία δεσμών C-C, C-O, C-N, C-X. Οι μετρήσεις έγιναν σε επιστημονικό όργανο Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR, αναμειγνύοντας για τον σχηματισμό του μετρούμενου δισκίου (πελέτα), 1 mg ουσίας και 0.15 gr KBr.

5.2. Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)^{182, 183} είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδος που έχουν στη διάθεσή τους οι χημικοί. Είναι η πρώτη μέθοδος προσδιορισμού της δομής των μορίων, προς την οποία στρέφονται για την άντληση πληροφοριών, γιατί παρέχει ένα “χάρτη” του όλου ανθρακικού σκελετού με τα άτομα υδρογόνου σε ένα μόριο. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα

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

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

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

Όλοι οι πυρήνες στα μόρια περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία

δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό.

$$H_{\text{πραγματικό}} = H_{\text{εφαρμοζόμενο}} - H_{\text{τοπικό}} \quad (5.1)$$

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

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

$$\delta = (H_{\alpha} - H_{\delta})/H_{\alpha} \times 10^6 \text{ppm} \quad (5.2)$$

$$\delta = (\nu_{\alpha} - \nu_{\delta})/\nu_{\alpha} \times 10^6 \text{ppm} \quad (5.3)$$

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

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι κάθε διαφορετικός πυρήνας (π.χ. ^1H) θα σχηματίζει μία απλή κορυφή. Συχνό φαινόμενο αποτελεί, ωστόσο, η

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

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

5.3. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

Μετά τις πρώτες προσπάθειες του Moore^{184, 185} στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) ή αλλιώς χρωματογραφία μέσω πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC), η τεχνική αναπτύχθηκε σημαντικά και σήμερα αποτελεί την ευρύτερα αναγνωρισμένη μέθοδο¹⁸² για τον προσδιορισμό του μέσου μοριακού βάρους, αλλά κυρίως της κατανομής μοριακών βαρών και την καθαρότητα των πολυμερών. Πρόκειται ουσιαστικά για μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας

υψηλής απόδοσης, προσαρμοσμένης για την ανάλυση μεγαλομορίων, όπως τα πολυμερή. Ο διαχωρισμός γίνεται μέσα σε στήλες στις οποίες μεταφέρεται το δείγμα από το φέροντα διαλύτη (για στυρενικά και διενικά πολυμερή ο πιο κοινός διαλύτης είναι το THF σε θερμοκρασία 40 °C). Οι στήλες περιέχουν κατάλληλα συσκευασμένο πορώδες υλικό με μεγάλο εύρος διαστάσεων πόρων ($10^2 - 10^6$ Å). Το υλικό πλήρωσης των στηλών μπορεί να είναι οργανικής φύσεως (π.χ. δικτυωμένο πολυστυρένιο με διβινυλοβενζόλιο) ή ανόργανο (silica gel ή πορώδες γυαλί). Συνήθως προτιμάται υλικό πλήρωσης από πολυστυρένιο, επειδή δε δημιουργούνται δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις (προσρόφηση, ασυμβατότητα) που θα οδηγούσαν σε δευτερογενείς διαδικασίες κατανομής. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις αυξάνουν τον χρόνο έκλουσης με αποτέλεσμα να δίνουν μοριακό βάρος μικρότερο του πραγματικού για το άγνωστο δείγμα. Σε ιδανικές στήλες ο διαχωρισμός οφείλεται μόνο στο μοριακό μέγεθος (υδροδυναμικό όγκο) και δεν υπάρχει κανενός άλλου είδους αλληλεπίδραση μεταξύ πορώδους υλικού και μακρομορίων. Ο μηχανισμός διαχωρισμού (αποκλεισμός λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης) επιτρέπει στα μεγαλύτερα μόρια να περάσουν μέσα από ένα μικρό ποσοστό πόρων, ενώ τα μικρότερα μόρια διέρχονται από περισσότερους πόρους. Κατά συνέπεια οι πολυμερικές αλυσίδες διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, αφού τα μεγαλύτερα μακρομόρια διανύουν μικρότερη απόσταση και εκλούνται σε συντομότερους χρόνους από τα μικρότερα. Ο διαχωρισμός εξαρτάται από την ταχύτητα του φέροντος διαλύτη, το εύρος του πορώδους των στηλών, τη θερμοκρασία και την ποιότητα του διαλύτη σε σχέση με τα διαχωριζόμενα μόρια.

Η ανίχνευση των εκλουόμενων μορίων πραγματοποιείται με κατάλληλο ανιχνευτή που βρίσκεται στην έξοδο των στηλών. Οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές βασίζονται στη μέτρηση της σκέδασης φωτός σε μικρές γωνίες, του ιξώδους του διαλύματος, των διαφορών στον δείκτη διάθλασης και τέλος στη μέτρηση των μεταβολών στην απορρόφηση των συστατικών του διαλύματος σε μήκη κύματος στην περιοχή του υπεριώδους (UV – Vis), εφόσον το πολυμερές απορροφά σε αυτή την περιοχή (π.χ. πολυστυρένιο).

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί έμμεση μέθοδο για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών. Για τον λόγο αυτό απαιτείται

βαθμονόμηση των στηλών, που πραγματοποιείται με μέτρηση του χρόνου έκλουσης δειγμάτων προτύπων γραμμικών πολυμερών, δηλαδή πολυμερών με γνωστό μοριακό βάρος και μικρή κατανομή μοριακών βαρών (π.χ. πρότυπα πολυστυρένια). Με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων κατασκευάζεται καμπύλη βαθμονόμησης. Η απευθείας αντιστοίχιση του μοριακού βάρους στον όγκο έκλουσης μπορεί να γίνει μόνο στην περίπτωση που τα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του οργάνου και τα άγνωστα δείγματα είναι ομοειδή. Η παράμετρος κλειδί για τον διαχωρισμό των διαφόρων μακρομορίων του πολυμερούς είναι ο υδροδυναμικός τους όγκος V_h . Ο υδροδυναμικός όγκος εξαρτάται εκτός από το μοριακό βάρος και από τη χημική σύσταση και τη δομή (αρχιτεκτονική) των μακρομορίων. Για τον λόγο αυτό στην περίπτωση μιγμάτων ομοπολυμερών, συμπολυμερών και διακλαδισμένων ή αστεροειδών ομοπολυμερών ή συμπολυμερών θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι:

- Για δεδομένο μοριακό βάρος ο υδροδυναμικός όγκος των διακλαδισμένων πολυμερών είναι μικρότερος του αντίστοιχου γραμμικού.
- Σε ένα συμπολυμερές, ο μερικός μοριακός όγκος M_i/V_h είναι διαφορετικός για κάθε μία από τις επαναλαμβανόμενες μονάδες.

Συνεπώς, ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους πολυμερών, με διαφορετική χημική σύσταση ή αρχιτεκτονική από αυτή των πολυμερών με τα οποία έγινε η βαθμονόμηση, απαιτεί τη χρησιμοποίηση μίας παγκόσμιας καμπύλης αναφοράς της μορφής $\log([\eta]M) = f(V_e)$ ¹⁸⁶ όπου $[\eta]$ είναι το εσωτερικό ιξώδες του πολυμερούς με μοριακό βάρος M και V_e ο όγκος έκλουσής του. Σύμφωνα με την εξίσωση ιξώδους του Einstein $[\eta]M = 0,025N_A V_h$, όπου N_A η σταθερά Avogadro, το γινόμενο $[\eta]M$ είναι ανάλογο του υδροδυναμικού όγκου και η παγκόσμια καμπύλη αναφοράς θα είναι η ίδια ανεξάρτητα από το είδος και τη μακρομοριακή αρχιτεκτονική του πολυμερούς.

Συγκεκριμένα, λόγω της διαφοροποίησης στον υδροδυναμικό όγκο είναι αναγκαία η μετατροπή του “φαινομένου” μοριακού βάρους, που λαμβάνεται από την καμπύλη βαθμονόμησης, μέσω κατάλληλων συντελεστών. Για παράδειγμα, το πραγματικό μοριακό βάρος των γραμμικών πολυισοπρενίων προκύπτει με πολλαπλασιασμό του “φαινομένου” μοριακού βάρους με τον συντελεστή μετατροπής 0,625 αν η βαθμονόμηση έχει γίνει με πρότυπα πολυστυρένια. Στην περίπτωση πολύπλοκων αρχιτεκτονικών (π.χ. μικτόκλινα αστεροειδή συμπολυμερή) δεν καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός του ακριβούς μοριακού βάρους και τα αποτελέσματα είναι μόνο ποιοτικά. Αυτό οφείλεται στο ότι ο υδροδυναμικός όγκος των συμπολυμερών αυτών εξαρτάται και από τη δομή και από τη σύσταση.

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

5.4. Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Για τον προσδιορισμό των διαστάσεων ενός πολυμερούς σε διάλυμα χρησιμοποιείται η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)¹⁸⁷⁻¹⁹¹.

Σε ένα διάλυμα πολυμερούς τα μόριά του βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση που προκαλείται από τη θερμική ενέργεια που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown). Εξαιτίας των συγκρούσεων τα μόρια του πολυμερούς εκτελούν μεταφορική, αλλά και περιστροφική κίνηση. Η πιθανότητα $P(X,t)$ να βρεθεί ένα μόριο στη θέση X στη χρονική στιγμή t , αν υποθεθεί ότι βρισκόταν στην αρχή των αξόνων τη χρονική στιγμή $t=0$ δίνεται από τη σχέση:

$$\partial P(X,t)/\partial t = D_t \partial^2 P(X,t)/\partial X^2 \quad (5.4)$$

όπου D_t είναι ο συντελεστής διάχυσης μεταφορικής κίνησης του μορίου. Αντίστοιχα αν ένα μόριο κυλινδρικού σχήματος υπόκειται σε κίνηση Brown η

πιθανότητα να βρεθεί στις σφαιρικές συντεταγμένες θ, φ στο χρόνο t είναι $P(\theta\varphi/\theta_0\varphi_0,t)$ με θ_0, φ_0 τις συντεταγμένες σε $t=0$ και δίνεται από τη σχέση:

$$\partial P/\partial t = (\Omega/\sin^2 \theta)[(\partial \sin \theta/\partial \theta)^2 + (\partial^2/\partial \varphi^2)]P \quad (5.5)$$

με Ω το συντελεστή διάχυσης περιστροφικής κίνησης. Από τις παραπάνω σχέσεις 5.4 και 5.5 φαίνεται ότι οι συντελεστές διάχυσης των μακρομορίων συνδέονται άμεσα με την κίνησή τους. Αφού τα κινούμενα μόρια σκεδάζουν φως με τρόπο που συνδέεται ποσοτικά με την κίνησή τους, είναι δυνατόν, χρησιμοποιώντας πειράματα σκέδασης φωτός, να προσδιοριστούν οι συντελεστές διάχυσης των μορίων. Οι συντελεστές αυτοί συνδέονται άμεσα με χαρακτηριστικές ιδιότητες των μορίων, όπως το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθός τους καθώς και με αλληλεπιδράσεις πολυμερούς – διαλύτη.

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

Τα σκεδαζόμενα μακρομόρια σε ένα διάλυμα κινούνται με παρόμοιες ταχύτητες, αλλά σε τυχαίες κατευθύνσεις. Εξαιτίας της ομοιότητας στην κίνησή τους το σκεδαζόμενο φως από τα μόρια αυτά λέγεται ότι έχει συσχέτιση στο χρόνο. Γενικά μία συνάρτηση συσχέτισης χρόνου (time correlation function) μεταξύ δύο σημάτων A και B έχει την μορφή:

$$g(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} (1/T) \int_{t_0}^{t_0+T} A(t)B(t-\tau)dt \quad (5.6)$$

όπου τ ο χρόνος καθυστέρησης (ή χρόνος δειγματοληψίας, delay time or sample time), t_0 ο αρχικός χρόνος και T ο χρόνος διεξαγωγής της μέτρησης. Αν το B είναι μία “αργοπορημένη” μορφή του A τότε η Σχέση 5.6 ισοδυναμεί με μία συνάρτηση αυτοσυσχέτισης. Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης αποτελεί πραγματική ποσότητα και μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλες διατάξεις.

Μία στενά συνδεδεμένη με την $g(\tau)$ συνάρτηση είναι το φάσμα ισχύος (power spectrum) $I(\omega)$ που δίνεται από τη σχέση:

$$I(\omega) = 1/2\pi \int_{-\lambda}^{\infty} e^{-i\omega t} \langle A(t)A(t - \tau) \rangle dt \quad (5.7)$$

Η Σχέση 5.7 αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier της $g(\tau)$, οπότε ο πειραματικός προσδιορισμός της μίας οδηγεί στην άλλη. Η μέθοδος σκεδάσεως φωτός που περιγράφεται παραπάνω ονομάζεται φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων ή δυναμική σκέδαση φωτός.

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

$$g(\tau) = A_0 + A \exp(-\Gamma\tau) \quad (5.8)$$

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

$$I(\omega) = (2D_t q^2) / \omega / [\omega^2 + (2D_t q^2)^2] \quad (5.9)$$

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

$$D_t = D_{t,0}(1 + k_D c + \dots) \quad (5.10)$$

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

$$k_D = 2A_2M - k_f - (N_A V_2/M) = 2A_2M - k_f - u_2 \quad (5.11)$$

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

$$D_t = kT/f \quad (5.12)$$

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

$$f = 3\pi\eta d \quad (5.13)$$

όπου η το ιξώδες του ρευστού σε θερμοκρασία T και d η διάμετρος του σωματιδίου. Έτσι για την πιο απλή περίπτωση είναι δυνατόν με τη δυναμική σκέδαση φωτός να εξαχθεί το μέγεθος των σωματιδίων – μορίων στο διάλυμα. Για μη σφαιρικά σωματίδια, το d από τη Σχέση 5.13 γίνεται μία μέση τιμή. Στη γενική περίπτωση:

$$f = 6\pi\eta F(r^2)^{1/2} \quad (5.14)$$

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

$$R_h = kT/6\pi\eta D_{t,0} \quad (5.15)$$

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

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

$$D_{t,0} = KM^{-b} \quad (5.16)$$

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

Όλα τα πολυμερή που εξετάζονται αποτελούνται συνήθως από μόρια με μία κατανομή μοριακών βαρών με αποτέλεσμα οι μετρούμενες συναρτήσεις συσχέτισης να αποτελούν άθροισμα εκθετικών όρων:

$$g(\tau) = \int G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \quad (5.17)$$

όπου $G(\Gamma)$ η κατανομή των χρόνων παρακμής. Η $G(\Gamma)$ εξαρτάται από την κατανομή μοριακών βαρών, αλλά και από τους παράγοντες σκέδασης των μορίων $P(q,M)$. Γενικά $\Gamma/q^2 = \text{σταθερό}$ και $\mu_2/\Gamma^2 < 0,1$ [μ_2 είναι η δεύτερη ροπή της κατανομής $G(\Gamma)$] αποτελούν κριτήρια σχεδόν μονομοριακής κατανομής και μικρού μεγέθους σκεδαστών. Αν $\Gamma/q^2 = \text{σταθερό}$ και $\mu_2/\Gamma^2 > 0,2$ έχουμε πλατιά κατανομή και μικρό μέγεθος, ενώ όταν $\Gamma/q^2 = f(q)$ οι σκεδαστές είναι μεγάλοι και έχουμε πιθανές συνεισφορές στη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης από ενδομοριακές κινήσεις. Επομένως, αν τα δεδομένα αναλυθούν με κάποια μαθηματική διαδικασία, μπορούν να αποκτηθούν πληροφορίες για την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων στο διάλυμα. Πολλές μαθηματικές διαδικασίες έχουν αναπτυχθεί για την αντιμετώπιση του προβλήματος της πολυδιασποράς. Οι δύο πιο διαδεδομένες μέθοδοι ανάλυσης συναρτήσεων συσχέτισης είναι αυτή των αθροισμάτων (cumulants method) και οι τεχνικές κανονικοποίησης (regularization methods) με χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο το πρόγραμμα CONTIN.

Το πιο συνηθισμένο αποτέλεσμα από μία μέτρηση δυναμικής σκέδασης φωτός είναι η κατανομή μεγεθών βάσει της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (intensity). Το βασικό όμως πρόβλημα σε αυτά τα αποτελέσματα είναι ότι γραφική παράσταση που προκύπτει εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος των σωματιδίων που σκεδάζουν παρά από τον απόλυτο αριθμό τους. Για τον λόγο

αυτό έχουν δημιουργηθεί κάποια μαθηματικά μοντέλα για τον προσδιορισμό της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας βάσει του αριθμού των σωματιδίων που υπάρχουν στο διάλυμα.

5.5. Κυκλικός διχρωσμός (CD)

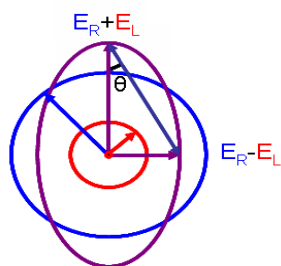
Οι πρωτεΐνες (οπτικά ενεργές ενώσεις) και γενικότερα τα μόρια, απορροφούν κβάντα φωτός, προάγοντας τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερες διεγερμένες καταστάσεις. Το εξερχόμενο φως έχει την ίδια συχνότητα, αλλά έχει επιβραδυνθεί, εισάγοντας μια διάφορα φάσης, που είναι ανάλογη της ποσότητας του υλικού. Στην τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού, μετράται η διαφορά της μοριακής απορροφητικότητας ($\epsilon_R - \epsilon_L$), κατά την απορρόφηση από την πρωτεΐνη, κυκλικά πολωμένης (αριστερόστροφα ή δεξιόστροφα) μονοχρωματικής ακτινοβολίας φωτός στην περιοχή του far-UV, που οδηγεί σε π-π* ηλεκτρονιακές μεταβάσεις. Αυτές αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς των πεπτιδίων (χρωμοφόρα) και επηρεάζονται σημαντικά από τη δευτεροταγή δομή.

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

$$[\theta] = 3298.2 \Delta\epsilon \quad (5.18)$$

όπου $\Delta\epsilon = \epsilon_R - \epsilon_L$ και ϵ_R , ϵ_L τα διανύσματα του δεξιόστροφου και αριστερόστροφου, αντίστοιχα, πολωμένου φωτός. Από την εξίσωση 5.18 ορίζεται η ελλειπτικότητα της πόλωσης μέσω της σχέσης

$$\tan \theta = \frac{(\epsilon_R - \epsilon_L)}{(\epsilon_R + \epsilon_L)} \quad (5.19)$$



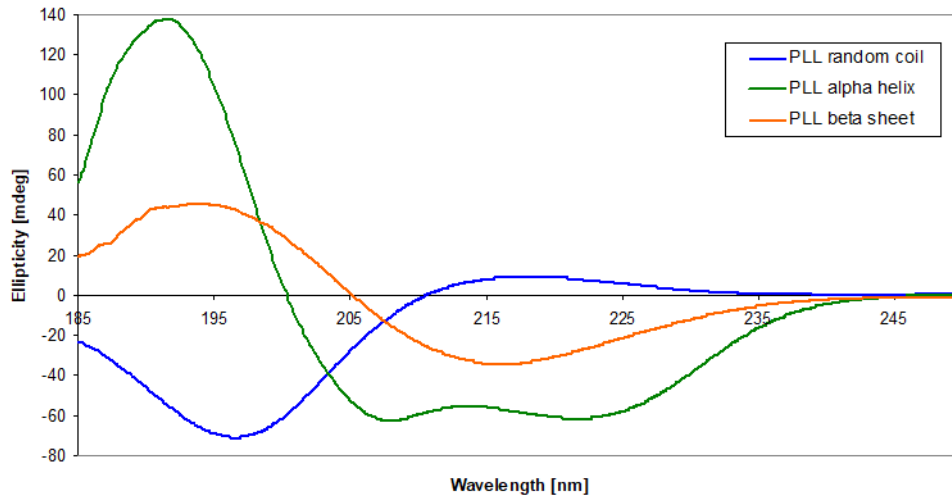
Εικόνα 1: Το ελλειπτικά πολωμένο φως (μωβ), αποτελείται από τις συνεισφορές του δεξιόστροφου (μπλε) και αριστερόστροφου (κόκκινο) πολωμένου φωτός

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

Πίνακας 3: Απορροφήσεις των τριών διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

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

Οι μετρήσεις έγιναν σε μηχάνημα Perkin-Elmer, σε ειδικά κατασκευασμένες κυψελίδες. Επειδή οι μετρήσεις του κυκλικού διχρωϊσμού γίνονται σε διάλυμα, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην επιλογή του διαλύτη, ώστε να μην απορροφά αυτός στις μετρούμενες περιοχές. Τέτοιοι διαλύτες είναι το ακετονιτρίλιο και το νερό. Παρακάτω δίνεται χαρακτηριστικό φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού των διαφορετικών διαμορφώσεων της πολυ(L-λυσίνης) σε νερό (Εικόνα 3). Η συγκέντρωση διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκε είναι της τάξης των 0,3 mg/mL.

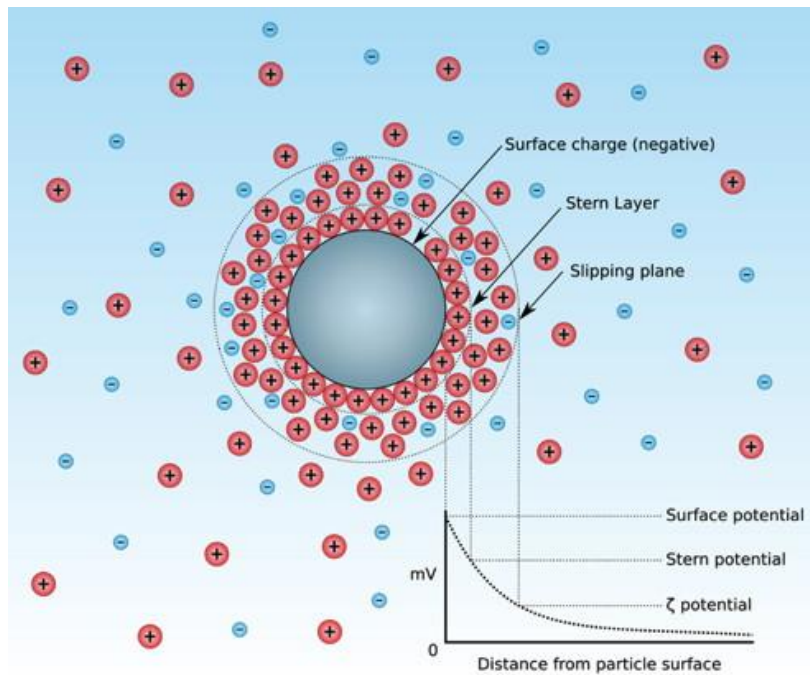


Εικόνα 2: Πιθανές διαμορφώσεις της πολυ(L-Λυσίνης)

5.6. ζ – δυναμικό (ζ – potential)

Οι φυσικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση και την έκταση της μεσεπιφάνειας μεταξύ σωματιδίων-διαλύτη. Η συμπεριφορά των νανοσωματιδίων σε υδατικά διαλύματα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην ιοντική και ηλεκτρική δομή της μεσεπιφάνειας τους. Το ζ-δυναμικό είναι μία παράμετρος, που μετρά την ηλεκτροχημική ισορροπία στη μεσεπιφάνεια αυτή. Μέσω του ζ-δυναμικού, υπολογίζεται το μέγεθος της ηλεκτροστατικής άπωσης / έλξης μεταξύ σωματιδίων και έτσι, έχει γίνει μια από τις θεμελιώδεις παραμέτρους που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη σταθερότητα των κολλοειδών σωματιδίων. Ο όρος σταθερότητα, όταν αναφέρεται τη διασπορά των νανοσωματιδίων, αφορά την αντίσταση στην αλλαγή της διασποράς με το χρόνο. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται η βασική ιδέα για τη λειτουργία του ζ-δυναμικού.

Με βάση τη θεωρία, το ζ-δυναμικό αντιπροσωπεύει το ηλεκτρικό δυναμικό, που δημιουργείται στο διπλό στρώμα, μεταξύ της επιφάνειας του νανοσωματιδίου και του διαλύτη (slipping plane), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4 και μετράται σε millivolts.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της ιοντικής συγκέντρωσης και της διαφοράς δυναμικού ως συνάρτηση της απόστασης από τη φορτισμένη επιφάνεια του νανοσωματιδίου, το οποίο βρίσκεται διεσπαρμένο σε υδατικό διάλυμα.*

(* Η εικόνα αποτελεί μέρος του άρθρου της σελίδας https://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential)

Για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού πειραματικά, υπάρχουν αρκετές τεχνικές, οι οποίες έχουν, ως κοινό παρονομαστή, τον έμμεσο προσδιορισμό του ζ-δυναμικού μέσω της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (electrophoretic mobility), η οποία με τη σειρά της υπολογίζεται από την ηλεκτροφορητική ταχύτητα (electrophoretic velocity), μέσω της εξίσωσης

$$\vec{V}_{ep} = \mu_{ep} \cdot \vec{E}$$

όπου μ_{ep} η ηλεκτροφορητική κινητικότητα και \vec{E} το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο στο διάλυμα. Για τη σχέση που συνδέει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα με το ζ-δυναμικό, έχουν προταθεί αρκετά μοντέλα, με τον πιο κοινό να είναι εκείνο του Smoluchowski.

$$\mu_{ep} = \frac{\varepsilon \varepsilon_0}{\eta} \zeta$$

όπου ε και η , η σχετική διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος και το ιξώδες, αντίστοιχα και ε_0 η σταθερά επιτρεπτότητας ελεύθερου χώρου που ισούται με $\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12}$ Farad/m.

Οι περισσότεροι αναλυτές ζ-δυναμικού είναι βασισμένοι στη σκέδαση φωτός προσδιορίζοντας το δυναμικό είτε μέσω της ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS) είτε μέσω της ανάλυσης φάσης σκέδασης φωτός (PALS). Με τη μέθοδο ELS μετράται μια συχνότητα Doppler από την οποία υπολογίζεται η ηλεκτροφορητική ταχύτητα, ενώ με τη μέθοδο PALS μετράται η διαφορά φάσης η οποία υπολογίζεται από τη σχέση

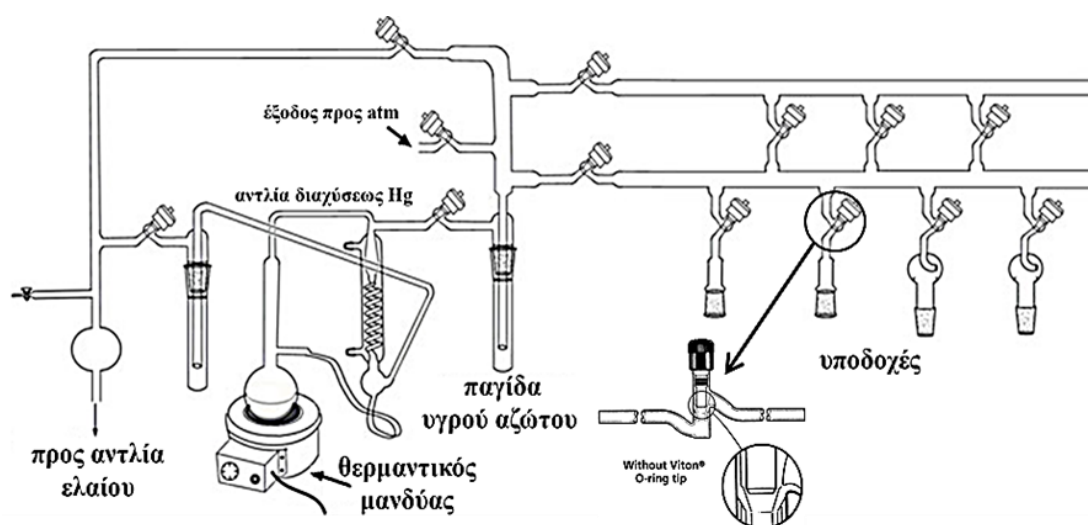
$$\Phi = \langle A \rangle \int \vec{q} \cdot (\mu_{ep} \vec{E}) dt$$

όπου $\langle A \rangle$ είναι ο μέσος όρος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας,

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. Τεχνική υψηλού κενού (HVT).

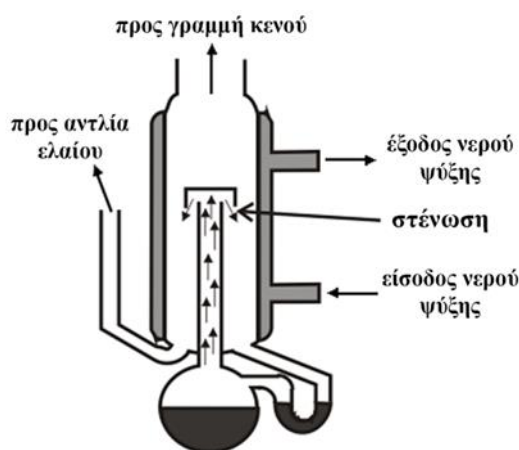
Η σύνθεση των πολυμερών, που αποτελούν το αντικείμενο στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό τεχνικών υψηλού κενού και πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs. Ο συνδυασμός αυτός αποτελεί ιδανική μέθοδο για τη σύνθεση μακρομορίων με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά. Για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα όμως, απαιτούνται αυστηρά καθορισμένες συνθήκες. Για τον λόγο αυτόν, ειδικά σχεδιασμένες συσκευές πολυμερισμού και κατάλληλες τεχνικές υψηλού κενού χρησιμοποιούνται για να απομακρυνθούν από το περιβάλλον των αντιδράσεων όλες εκείνες οι ανεπιθύμητες προσμείξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε παράπλευρες αντιδράσεις. Αρχικά, με την επίτευξη υψηλού κενού στον αντιδραστήρα πολυμερισμού απομακρύνεται ο ατμοσφαιρικός αέρας που περιέχει πλήθος ανεπιθύμητων προσμείξεων, όπως οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, υγρασία, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με τους χρησιμοποιούμενους απαρχητές και τις αναπτυσσόμενες αλυσίδες. Στη συνέχεια, με κατάλληλες τεχνικές καθαρισμού αντιδραστηρίων και διαλυτών επιτυγχάνεται η απομάκρυνση από το σύστημα ανεπιθύμητων ουσιών, όπως αλκοόλες, αμίνες και οξέα, δραστικές προσμείξεις περιεχόμενες στα αντιδραστήρια που διατίθενται στο εμπόριο.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση γραμμής υψηλού κενού

Όλες οι διαδικασίες καθαρισμού των αντιδραστηρίων, διαλυτών, απαρχητών και των πολυμερών έγιναν με τη βοήθεια της γραμμής υψηλού κενού, σχηματική αναπαράσταση της οποίας φαίνεται στην Εικόνα 5. Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από γυάλινους σωλήνες (Pyrex), στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (Rotaflo HP 10 mm, 10^{-8} mm Hg), μία αντλία ελαίου και μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου (Εικόνα 6).

Η αντλία ελαίου δημιουργεί κενό της τάξης των $10^{-2} - 10^{-3}$ mm Hg. Το προκαταρκτικό αυτό κενό είναι απαραίτητο για να ξεκινήσει η απόσταξη του υδραργύρου, που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως, σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία. Καθώς τα μόρια του υδραργύρου κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξηση της ταχύτητάς τους με ταυτόχρονη ελάττωση της πίεσής τους, σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση αντλίας διαχύσεως υδραργύρου

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

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

Οι αντλίες ελαίου και διαχύσεως υδραργύρου προστατεύονται από πτητικά συστατικά με τη χρήση παγίδας υγρού αζώτου. Με τις στρόφιγγες, το κενό εφαρμόζεται στα επιθυμητά τμήματα της γραμμής, ενώ τα υπόλοιπα τμήματα μένουν απομονωμένα. Η γραμμή κενού περιλαμβάνει πολλές εξόδους με εσφυρίσματα, μέσω των οποίων συνδέονται οι διάφορες συσκευές και γίνεται η εισαγωγή και η απόσταξη των αντιδραστηρίων (διαλύτες, μονομερή).

Ο έλεγχος για την επίτευξη του υψηλού κενού γίνεται με τη βοήθεια ενός πηνίου Tesla (Tesla coil) (Εικόνα 7). Το πηνίο Tesla είναι απαραίτητο εργαλείο για τον έλεγχο του υψηλού κενού καθώς και για την ύπαρξη μικροοπών σε συσκευές που συνδέονται με τη γραμμή υψηλού κενού και έχουν κατασκευαστεί με υαλουργία. Αρχικά το πηνίο είναι θορυβώδες καθώς λειτουργεί μόνο η αντλία ελαίου, ενώ όταν αρχίσει να δουλεύει η αντλία διαχύσεως υδραργύρου ο θόρυβος ελαττώνεται μέχρι που σταματάει εντελώς όταν επιτευχθεί το κενό της τάξεως 10^{-6} mm Hg. Ακολουθώντας, όταν προσαρτάται μία συσκευή στη γραμμή υψηλού κενού το πηνίο γίνεται θορυβώδες μέχρι να απομακρυνθούν όλα τα αέρια και πτητικά στοιχεία που περιέχει, όπου σταματάει ξανά ο θόρυβος. Είναι επίσης δυνατό να καθοριστεί αν ο θόρυβος προκύπτει από αέρια ή από άλλα πτητικά στοιχεία. Αυτό καθίσταται δυνατό τοποθετώντας το πηνίο πριν και μετά την παγίδα του υγρού αζώτου. Η παγίδα υγρού αζώτου είναι ικανή να κατακρατεί όλα τα πτητικά στοιχεία αλλά όχι και τα αέρια. Έτσι αν το πηνίο είναι θορυβώδες πριν και μετά την παγίδα, τότε πρόκειται για αέριο, ενώ αν είναι θορυβώδες μόνο πριν τότε πρόκειται για κάποιο πτητικό στοιχείο. Τέλος, ακολουθώντας με την άκρη του πηνίου, μία υαλουργημένη συσκευή, είναι δυνατό να προσδιοριστεί η ύπαρξη μικροοπής, η οποία δεν είναι εμφανής με γυμνό μάτι. Στην περίπτωση που υπάρχει τέτοια μικροοπή εκτός από τον θόρυβο που παράγει το πηνίο, θα εμφανιστεί επίσης ένας σπινθήρας από την άκρη του πηνίου μέχρι το σημείο όπου βρίσκεται η μικροοπή.¹⁹²

Μόνο όταν εξασφαλιστεί απόλυτη στεγανότητα η γραμμή είναι έτοιμη για τη διεξαγωγή της διαδικασίας απομάκρυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα από οποιοδήποτε προς πολυμερισμό σύστημα. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται εύκολα, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο (-196°C) ή λουτρό ισοπροπανόλης – ξηρού πάγου (-78°C). Ο χειρισμός της γραμμής κενού και οι απαραίτητες προφυλάξεις αναφέρονται εκτενώς στη βιβλιογραφία^{3, 192}

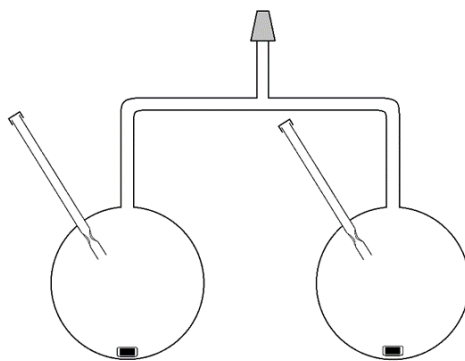


Εικόνα 6: Σπινθηριστής ελέγχου κενού και μικροσπών (Tesla coil)

7. Καθαρισμός μονομερών, απαρχητών και αντιδραστηρίων

7.1. Αιθυλενοξείδιο

Το αιθυλενοξείδιο (ethylene oxide, EO) είναι ένα αέριο μονομερές με χαμηλό σημείο ζέσης (σ.ζ.: 11 °C), το οποίο είναι εξαιρετικά τοξικό. Για τον λόγο αυτό ο χειρισμός του απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή. Για τον καθαρισμό του αρχικά προσαρμόζεται η οβίδα που περιέχει το μονομερές στη γραμμή υψηλού κενού, καθώς και μια σφαιρική φιάλη που περιέχει CaH_2 , ώστε να απαερωθούν. Στη συνέχεια αποστάζεται από την οβίδα στη σφαιρική φιάλη η επιθυμητή ποσότητα του μονομερούς και αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση στους 0°C για μισή ώρα. Ακολουθεί μία ακόμα απαέρωση και στη συνέχεια το μονομερές αποστάζεται σε ειδική συσκευή που αποτελείται από δύο σφαιρικές φιάλες, στις οποίες περιέχεται βουτυλολίθιο (*n*-BuLi) έκαστη.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής καθαρισμού αιθυλενοξειδίου

Το αιθυλενοξείδιο αφήνεται να αντιδράσει σε κάθε μια από τις σφαιρικές για μισή ώρα υπό ανάδευση στους 0 °C και τέλος αποστάζεται σε βαθμονομημένες αμπούλες όπου και φυλάσσεται στους -20 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί.¹⁹²

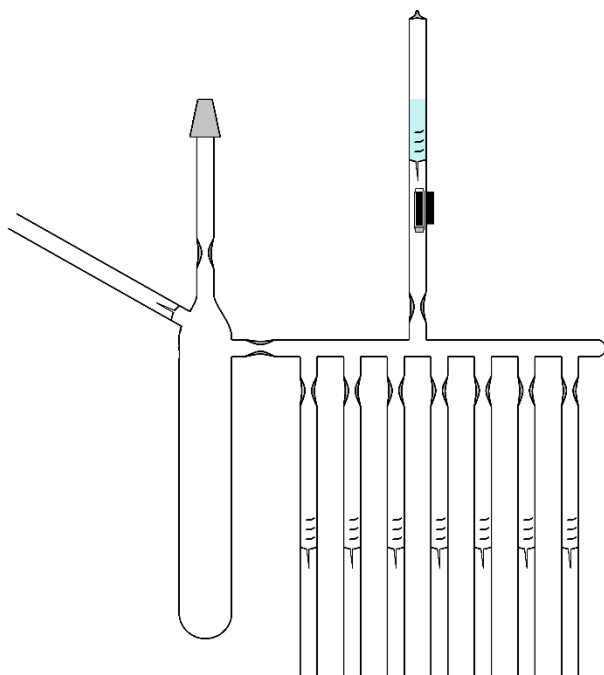
7.2. Αλλυλική αλκοόλη

Η αλλυλική αλκοόλη χρησιμοποιήθηκε ως απαραίτητης για τον ανιοντικό πολυμερισμό του αιθυλενοξειδίου. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο καθαρισμός της, ώστε να μην υπάρχουν προσμίξεις που θα οδηγήσουν σε τερματισμό του πολυμερισμού. Αρχικά τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη παρουσία υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2) και αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση για μία μέρα. Στη συνέχεια μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού απαερωθεί, αποστάζεται σε αμπουλοσυσσκευή με βαθμονομημένες αμπούλες. Στη συνέχεια, οι αμπούλες τοποθετούνται σε ειδικά διαμορφωμένες αμπουλοσυσσκευές προκειμένου να αραιωθεί η ποσότητα του καθαρού απαραίτητη. Αυτό συμβαίνει, ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερος έλεγχος, ως προς τον αριθμό των moles που θα εισαχθούν, για να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός και έτσι να συντεθούν πολυμερή με μεγάλη ακρίβεια στο μοριακό τους βάρος. Η αμπουλοσυσσκευή φυλάσσεται στους -20 °C.

7.3. 3 - άζιδο - 1 - προπανόλη

Η 3 - άζιδο - 1 - προπανόλη χρησιμοποιήθηκε, όπως και η αλλυλική αλκοόλη για τον ανιοντικό πολυμερισμό του αιθυλενοξειδίου. Ο καθαρισμός της περιλαμβάνει τα ίδια στάδια με την αλλυλική αλκοόλη. Συνοπτικά, η 3- άζιδο - 1

- προπανόλη τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη που περιέχει υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2) και αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση για μία μέρα. Στη συνέχεια μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού απαερωθεί αποστάζεται σε αμπουλοσυσσκευή με βαθμονομημένες αμπούλες και οι αμπούλες αυτές τοποθετούνται σε ειδικές αμπουλοσυσσκευές, όπως στην περίπτωση της αλλυλική αλκοόλης και φυλάσσονται στους -20°C .



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση αμπουλοσυσσκευής για την αραίωση απαρχητών ανιοντικού πολυμερισμού

7.4. Τριαιθυλαμίνη

Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται κατά τη σύνθεση των NCAs ως μέσο δέσμευσης του υδροχλωρίου. Ο καθαρισμός της γίνεται τοποθετώντας τη σε φιάλη που περιέχει υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2) για μια μέρα. Στη συνέχεια ακολουθεί απαέρωση στη γραμμή υψηλού κενού και απόσταξη σε φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει μεταλλικό νάτριο.

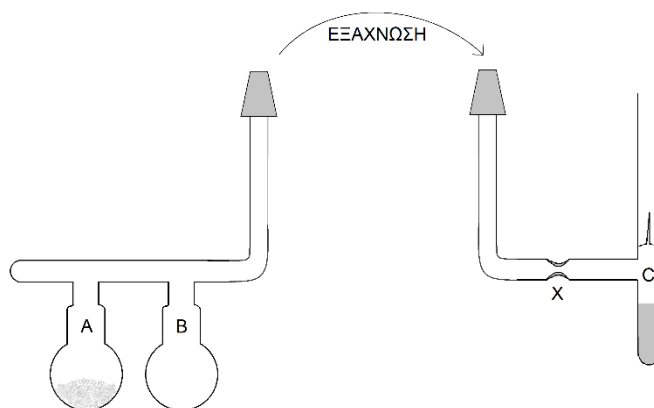
7.5. Προπαργυλαμίνη

Η προπαργυλαμίνη χρησιμοποιείται για την εισαγωγή του τριπλού δεσμού στα αντιδραστήρια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στις αντιδράσεις “click”. Ο

καθαρισμός της περιλαμβάνει ανάδευση σε φιάλη που περιέχει CaH_2 και απόσταξη σε νέα φιάλη υπό κενό. Ιδανικά χρησιμοποιείται άμεσα μετά την απόσταξή της. Σε διαφορετική περίπτωση αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20°C

7.6. Ναφθαλίνιο

Το ναφθαλίνιο χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του διδραστικού απαρχητή κάλιο-ναφθαλίνιο. Για τον καθαρισμό του, το ναφθαλίνιο εξαχνώνεται 2 φορές υπό κενό, διαδοχικά από την αμπούλα A στην αμπούλα B και τέλος σε προζυγισμένη αμπούλα Γ με εσμύρισμα. Η αμπούλα Γ αποκόπτεται από τη γραμμή κενού με σύντμηση στο σημείο X με χρήση φλόγας. Τέλος ζυγίζεται η αποκομμένη αμπούλα μαζί με το εσμύρισμα και υπολογίζεται το απόβαρο, που είναι το καθαρό βάρος του ναφθαλινίου.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής καθαρισμού ναφθαλινίου

8. Καθαρισμός Διαλυτών

8.1. Διμέθυλο Φορμαμίδιο (DMF)

Το DMF αποτελεί τον βασικό διαλύτη για τον πολυμερισμό των NCAs των αμινοξέων. Το DMF υπόκειται τόσο σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική παράγεται διμεθυλαμίνη αλλά και μονοξείδιο του άνθρακα. Επίσης υδρολύεται αργά παρουσία νερού παράγοντας διμεθυλαμίνη και μυρμηκικό οξύ¹⁴⁸, συστατικά που του αποδίδουν και την χαρακτηριστική οσμή του, ενώ συγκεκριμένα η διμεθυλαμίνη δρα ως απαρχητής των NCAs. Για τον λόγο αυτόν, το DMF φυλάσσεται υπό αδρανή

ατμόσφαιρα στο glove box, μεταγγίζεται σε φιάλη με στρόφιγγα, που πριν έχει ξηρανθεί στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται και αποστάζεται σε διπλανή φιάλη με στρόφιγγα κλασματικά, κρατώντας μόνο τα μεσαία κλάσματα. Στη συνέχεια το DMF, που αποστάχθηκε, φυλάσσεται σε χαμηλή θερμοκρασία και προστατευμένο από το φως.

(διηλ. σταθερά $\epsilon_r = 36.71$ στους 25°C , $\Sigma.Z. = 153^\circ\text{C}$)

8.2. Οξικός Αιθυλεστέρας (EtAc)

Ο Οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται ως διαλύτης τόσο για τη σύνθεση των μονομερών, όσο και για τις ανακρυσταλλώσεις τους. Ο διαλύτης αρχικά αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε φιάλη με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5) για μια μέρα. Στη συνέχεια τοποθετείται στη γραμμή κενού, απαερώνεται και εν συνεχεία αποστάζονται τα μεσαία κλάσματα σε φιάλη που περιέχει λεπτόκοκκα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2) και αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση για μια μέρα. Τέλος απαερώνεται και αποστάζονται τα μεσαία κλάσματα σε φιάλη με στρόφιγγα, όπου απαερώνεται για τελευταία φορά.

(διηλ. σταθερά $\epsilon_r = 6.02$, στους 25°C , $\Sigma.Z. = 77^\circ\text{C}$)

8.3. Εξάνιο

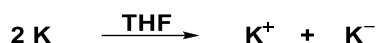
Το εξάνιο αποτελεί τον μη διαλύτη κατά τη διαδικασία ανακρυσταλλώσεων για τον καθαρισμό των NCAs. Αρχικά τοποθετείται σε φιάλη με λεπτόκοκκα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2) και αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση για μια ημέρα. Στη συνέχεια απαερώνεται και αποστάζεται σε φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει βουτυλολίθιο ($n\text{-BuLi}$), όπου απαερώνεται μία ακόμα φορά.

(διηλ. σταθερά $\epsilon_r = 1.89$ στους 20°C , $\Sigma.Z. = 69^\circ\text{C}$)

8.4. Τετραϋδροφουράνιο (THF)

Το τετραϋδροφουράνιο χρησιμοποιείται ως διαλύτης για τη σύνθεση του NCA της ισιδίνης, καθώς και για τη σύνθεση των μακροαπαρχητών του αιθυλενοξειδίου. Αρχικά τοποθετείται σε φιάλη, που περιέχει λεπτόκοκκα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2) και αφήνεται για μια μέρα να

αντιδράσει υπό ισχυρή ανάδευση. Στη συνέχεια απαερώνεται και αποστάζεται σε νέα σφαιρική φιάλη που περιέχει μεταλλικό νάτριο και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ακόμα μέρα. Τέλος απαερώνεται και αποστάζεται σε σφαιρική φιάλη με στρόφιγγα όπου περιέχει κράμα μεταλλικού καλίου και νατρίου σε αναλογία 3:1, που και φυλάσσεται παράγοντας παράλληλα ένα χαρακτηριστικό κυανό χρώμα, ένδειξη της καθαρότητας του διαλύτη. Όπως είναι γνωστό, το αρνητικό ιόν καλίου επιδιαλυτώνεται στο THF και σχηματίζει διάλυμα με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Έχει προταθεί ότι το χρώμα αυτό, προέρχεται από σύμπλοκα του καθαρού διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια) σύμφωνα με την αντίδραση :



(διηλ. σταθερά $\epsilon_r = 7.60$ στους 20°C , $\Sigma.Z = 66^\circ\text{C}$)

8.5. Βενζόλιο

Το βενζόλιο χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των μακροαπαρχητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολυμερισμό των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Αρχικά αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε φιάλη που περιέχει λεπτόκοκκα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2) για μία μέρα. Στη συνέχεια απαερώνεται και αποστάζεται σε φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει βουτυλολίθιο ($n\text{-BuLi}$) και στυρένιο, όπου και αποθηκεύεται, αφού απαερωθεί μία ακόμα φορά. Το στυρένιο με την παρουσία του βουτυλολίου πολυμερίζεται δίνοντας στο διάλυμα ένα ανοιχτό κόκκινο χρώμα το οποίο δημιουργείται, λόγω του φαινομένου συντονισμού στους φαινυλικούς δακτυλίους του στυρενίου. Η ύπαρξη του χρώματος αυτού υποδηλώνει την καθαρότητα του διαλύτη.

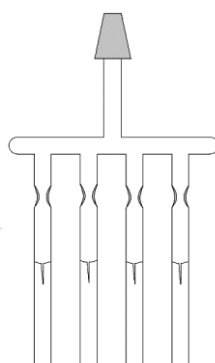
(διηλ. σταθερά $\epsilon_r = 2.3$ στους 25°C , $\Sigma.Z = 80^\circ\text{C}$)

8.6. Μεθανόλη

Η μεθανόλη χρησιμοποιείται ως μέσο τερματισμού αντιδράσεων ανιοντικού πολυμερισμού. Για τη χρήση της αυτή απαιτείται απαέρωση, ώστε να μην λαμβάνουν χώρα παράπλευρες αντιδράσεις με αέρια, όπως το διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο λειτουργεί ως μέσο σύζευξης για την παραγωγή διμερών

των μακρομοριακών αλυσίδων. Η υγρασία, η οποία πιθανώς περιέχεται δεν αποτελεί πρόβλημα, αφού θα έχει παρόμοια δράση ως δότης πρωτονίων. Για το λόγο αυτό η μεθανόλη τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη, η οποία προσαρτάται στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται τρεις φορές. Στη συνέχεια αποστάζεται σε αμπούλες των 1-2 ml, οι οποίες αποκόπτονται από την αμπουλοσυσσκευή με χρήση φλόγας.

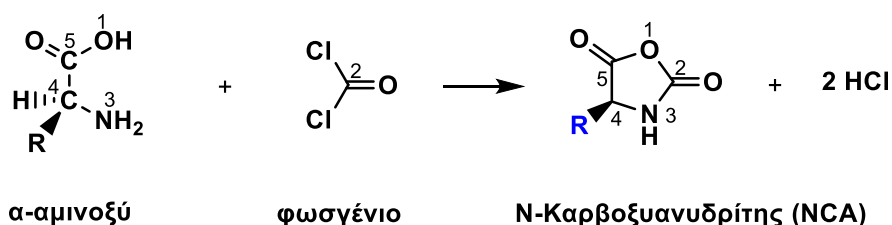
(διηλ. σταθερά $\epsilon_r = 32.7$ στους 25°C , $\Sigma.Z = 65^\circ\text{C}$)



Εικόνα 10: Σχηματική αναπράσταση αμπουλοσυσσκευής για την λήψη απαερωμένης μεθανόλης

9. Σύνθεση και καθαρισμός των N- Καρβοξυανυδριτών (NCAs) των αμινοξέων

Οι N- καρβοξυανυδρίτες δεν είναι εμπορικά διαθέσιμοι και συντίθενται από τα αντίστοιχα αμινοξέα. Η σύνθεση αυτή είναι γνωστή στη διεθνή βιβλιογραφία και πραγματοποιείται στις περισσότερες των περιπτώσεων με την αντίδραση του φωσγενίου με το αμινοξύ.



Σχήμα 16: Αντίδραση σύνθεσης των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων.

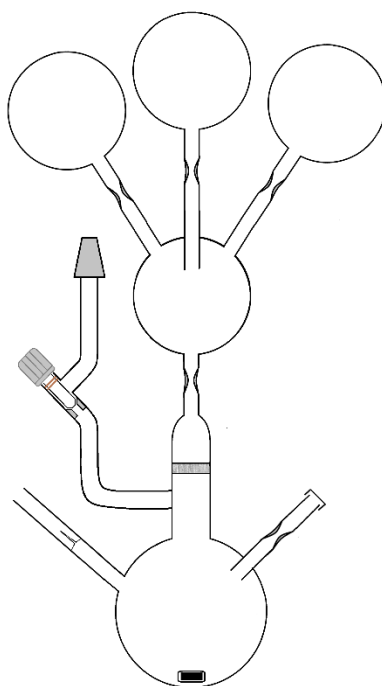
9.1. Σύνθεση του NCA του γ-βένζυλο L- γλουταμικού οξέος (BLG – NCA)

Η σύνθεση του NCA του γλουταμικού οξέος, όπως και των περισσότερων αμινοξέων, γίνεται σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα στους 70°C υπό ισχυρή ανάδευση και σε αδρανή ατμόσφαιρα. Πιο συγκεκριμένα το πρόδρομο αμινοξύ (γ - βένζυλο γλουταμικό οξύ) τοποθετείται σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη, η οποία στη συνέχεια προσαρτάται στη γραμμή υψηλού κενού και αφήνεται για ξήρανση για μία μέρα. Στη συνέχεια αποστάζεται η επιθυμητή ποσότητα του διαλύτη (περίπου 300mL / 10g αμινοξέος). Η φιάλη έπειτα απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού διατηρώντας το κενό με τη βοήθεια στρόφιγγας υψηλού κενού και μεταφέρεται σε απαγωγό, όπου θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Για την αντίδραση η φιάλη εφοδιάζεται με ψυκτήρα και με συνεχή ροή αδρανούς αερίου (Αργόν). Από τα ελεύθερα στόμια γίνεται εισαγωγή ισομοριακής ποσότητας τριφωσγενίου με το αμινοξύ και η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά μέχρι τους 70°C. Αφήνεται να αντιδράσει υπό έντονη ανάδευση για 4 ώρες. Το πρόδρομο αμινοξύ αρχικά είναι αδιάλυτο στον οξικό αιθυλεστέρα, ενώ καθώς δημιουργείται ο NCA αρχίζει να διαλυτοποιείται. Εφόσον δεν έχει παρατηρηθεί καμία αλλαγή στη διαλυτότητα μετά από 1,5 ώρα προστίθεται ανά μισή ώρα μικρή ποσότητα τριφωσγενίου έως ότου επιτευχθεί πλήρης διαλυτότητα. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση το διάλυμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί ο καθαρισμός του παραχθέντος NCA.

Αρχικά το διάλυμα ψύχεται με παγόνερο στους 0°C. Ακολουθούν εκχυλίσσεις, αρχικά με παγωμένο καθαρό υδατικό διάλυμα NaHCO₃ 0.5% κ.β και κατόπιν με παγωμένο υδατικό διάλυμα NaCl 5% w/v, έως ότου το pH γίνει ουδέτερο. Με τον τρόπο αυτό, απομακρύνουμε την περίσσεια του τριφωσγενίου, το HCl, υδροχλωρικά άλατα του αμινοξέος καθώς και υπολείμματα αμινοξέος που δεν έχουν αντιδράσει. Το στάδιο αυτό κρίνεται ιδιαίτερα κρίσιμο καθώς δεν πρέπει να αυξηθεί η θερμοκρασία του διαλύματος καθώς θα οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο πολυμερισμό του NCA. Αφού ολοκληρωθούν οι εκχυλίσσεις λαμβάνεται η οργανική στιβάδα, η οποία ξηραίνεται με θειικό μαγνήσιο (MgSO₄).

Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται με διήθηση σε ειδικά υαλορυγημένη συσκευή ανακρυσταλλώσεων (Εικόνα 12) υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου. Η συσκευή προσαρτάται στη γραμμή υψηλού κενού και με χρήση υαλοργιάς απομονώνεται από την ατμόσφαιρα και απεαerώνεται. Μετά την

απαέρωση απομακρύνεται ένα μέρος του διαλύτη σε γειτονική φιάλη έως ότου το διάλυμα αρχίσει να γίνεται κορεσμένο (~ 50mL / 10g). Επίσης αυτό το στάδιο κρίνεται κρίσιμο όσον αφορά στην απόδοση του τελικού προϊόντος, καθώς αραιά διαλύματα απαιτούν πολύ μεγάλες ποσότητες μη διαλύτη, για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης και το μέγεθος των κρυστάλλων είναι πολύ μικρό, με αποτέλεσμα να υπάρχουν απώλειες κατά την διήθηση, όπως θα εξηγηθεί παρακάτω.



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής ανακρυσταλλώσεων για τον καθαρισμό των NCAs

Το επόμενο στάδιο για τον καθαρισμό του NCA απαιτεί ξηρό εξάνιο, το οποίο έχει καθαριστεί με τον τρόπο που αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Πιο συγκεκριμένα εξάνιο, που βρίσκεται σε φιάλη με *n*-BuLi, αποσπάζεται στη συσκευή ανακρυσταλλώσεων που περιέχει το διάλυμα με το μονομερές. Η διαδικασία της απόσταξης γίνεται σχετικά αργά χωρίς να θερμαίνεται το εξάνιο και οι ατμοί του συμπυκνώνονται με παγόνη. Συνολικά αποσπάεται ποσότητα 4 - 5 μεγαλύτερη από αυτή του διαλύματος του μονομερούς. Αφού αποσταχθεί η επιθυμητή ποσότητα εξανίου, η συσκευή απομακρύνεται από τη

γραμμή υψηλού κενού και αφήνεται σε θερμοκρασία -20°C για μία μέρα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο καλός σχηματισμός κρυστάλλων του μονομερούς. Ακολουθεί διήθηση μέσω του φίλτρου που είναι τοποθετημένο στη συσκευή ανακρυσταλλώσεων, σε μία από τις 3 σφαιρικές φιάλες που βρίσκονται στο πάνω μέρος της συσκευής. Αφού συλλεχθεί το μίγμα διαλυτών, ακολουθεί πάγωμα της φιάλης και απομάκρυνση αυτής με σύμπτυξη με χρήση φλόγας. Η συσκευή ανακρυσταλλώσεων στη συνέχεια, επανατοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού και αφήνεται προς ξήρανση του μονομερούς. Έπειτα αποστάζεται η ελάχιστη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα, προκειμένου να διαλυτοποιήσει τον NCA και επαναλαμβάνεται η διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως με την απόσταξη του εξανίου και τη διήθησή των διαλυτών σε μία από τις σφαιρικές που βρίσκονται στο πάνω μέρος της συσκευής ανακρυσταλλώσεων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται συνολικά 3 φορές προκειμένου να επιτευχθεί ο καλός καθαρισμός του NCA. Το προκύπτον μονομερές αποθηκεύεται σε κατάλληλο χώρο με αδρανή ατμόσφαιρα (glove box).

Απόδοση_{συνολική}>90%

9.2. Σύνθεση του NCA της τρίτυλο L- ιστιδίνης ($\text{N}^{\text{im}}\text{-trityl-(L)-His NCA}$)

Η σύνθεση για το μονομερές $\text{N}^{\text{im}}\text{-trityl-(L)-His NCA}$ ⁹⁹ πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο παραλαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας του $\text{N}^{\text{im}}\text{-trityl-(L)-His NCA}$ και στη συνέχεια απομακρύνοντας το HCl παραλαμβάνεται το καθαρό μονομερές $\text{N}^{\text{im}}\text{-trityl-(L)-His NCA}$. Για τη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε θειόνυλο χλωρίδιο αντί του τριφωσγενίου, όπως έγινε στην περίπτωση της σύνθεσης του NCA του γ-βενζυλο L-γλουταμικού οξέος, αλλά και των περισσότερων NCAs.

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

Αρχικά το πρόδρομο αμινοξύ (Boc-His(trt)-OH) τοποθετείται σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, η οποία προσαρτάται στη γραμμή υψηλού κενού και αφήνεται για ξήρανση για μία μέρα. Στη συνέχεια αποστάζεται η κατάλληλη ποσότητα του διαλύτη, που στην προκειμένη περίπτωση είναι το THF, σε αντίθεση με τα περισσότερα αμινοξέα όπου ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι ο EtAc,

(~80mL / 10g). Αφού ολοκληρωθεί η απόσταξη, το διάλυμα αφήνεται για κάποια ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου το αμινοξύ να διαλυθεί πλήρως στο THF. Η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και τοποθετείται σε παγόλουτρο, έτσι ώστε να ελαττωθεί ο κίνδυνος παράπλευρων αντιδράσεων. Υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου (αργόν) γίνεται στάγδην η προσθήκη του θειονυλοχλωριδίου, το οποίο βρίσκεται σε μικρή περίσσεια (~1.2 : 1) και είναι αραιωμένο σε THF, σε διάρκεια ~20min. Η αντίδραση αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για περίπου 3 ώρες. Καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης λαμβάνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα φάσματα υπέρυθρου (FT-IR) προκειμένου να ελέγχεται η πορεία της αντίδρασης. Το βασικό στοιχείο που επιβεβαιώνει την επιτυχή σύνθεση είναι η ελάττωση της κορυφής που οφείλεται στην καρβοξυλική ομάδα του πρόδρομου αμινοξέος με την ταυτόχρονη παρουσία δύο νέων κορυφών που οφείλονται στα παραγόμενα καρβονύλια του NCA. Η αντίδραση θεωρείται ότι έχει ολοκληρωθεί, όταν η κορυφή που αντιστοιχεί στο καρβοξύλιο έχει απομακρυνθεί εντελώς. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση, το διάλυμα καταβυθίζεται σε μεγάλη περίσσεια διαιθυλαιθέρα με κύριο προϊόν το υδροχλωρικό αλάτι του αμινοξέος, αλλά και αμινοξύ που δεν αντέδρασε καθώς και καθαρό NCA. Ακολουθεί διήθηση με συνεχή παροχή αδρανούς αερίου, έτσι ώστε να μην έρθει το προϊόν σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα και εκκινήσει ανεξέλεγκτος πολυμερισμός του NCA. Το προκύπτον στερεό συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία μέρα.

Ακολουθεί ο καθαρισμός του υδροχλωρικού άλατος του NCA από τον καθαρό NCA και το πρόδρομο αμινοξύ που δεν αντέδρασε. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την απόσταξη οξικού αιθυλεστέρα στη φιάλη με το στερεό (~150mL / 10g). Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι καλός διαλύτης για τον πρόδρομο αμινοξύ και τον καθαρό NCA, αλλά κακός για το υδροχλωρικό άλας του NCA. Έτσι δημιουργείται ένα υποκίτρινο γαλάκτωμα και αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για περίπου μια ώρα στους 40°C προκειμένου να διαλυθούν επαρκώς τα προς διάλυση προϊόντα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο, ώστε να καταβυθιστεί ποσοτικά το κύριο προϊόν, το οποίο είναι η Trt-His NCA*HCl. Ακολουθεί διήθηση, υπό συνεχή ροή αδρανούς αερίου, για να συλλεχθεί αποκλειστικά το υδροχλωρικό άλας το NCA, καθώς οι υπόλοιπες

προσμίξεις είναι διαλυτές στον οξικό αιθυλεστέρα. Το στερεό συλλέγεται και τοποθετείται σε νέα σφαιρική φιάλη, όπου αφήνεται στη γραμμή υψηλού κενού για ξήρανση για μία μέρα.

Σύνθεση του N^{im}-trityl-His NCA

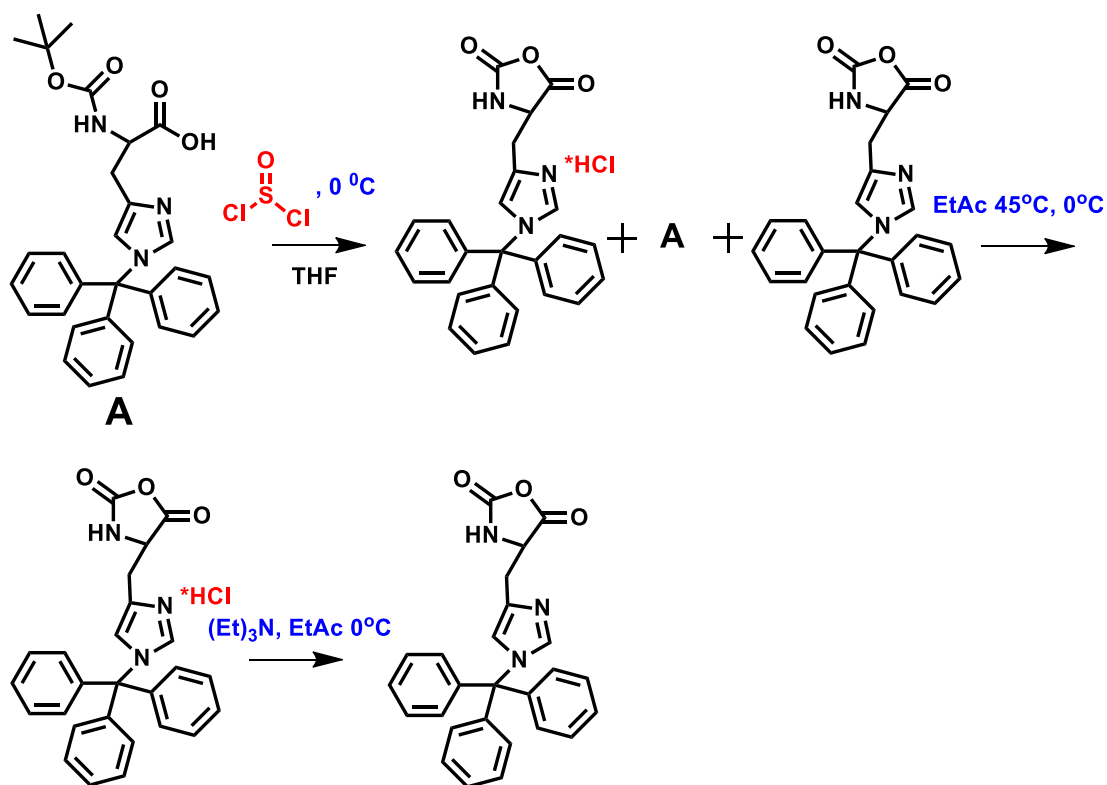
Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο σύνθεσης του N-καρβοξυανυδρίτη (L)-ιστιδίνης, το οποίο απαιτεί εξαιρετική προσοχή καθώς υπάρχει ο κίνδυνος έναρξης ανεπιθύμητου πολυμερισμού.

Στη σφαιρική φιάλη που περιέχει το υδροχλωρικό άλας του NCA αποστάζεται ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα (~200mL / 10g), όπου δημιουργείται ένα υποκίτρινου χρώματος γαλάκτωμα και αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου μία ώρα ούτως ώστε το στερεό να διαμοιραστεί καλά σε όλο τον διαλύτη. Εν συνεχεία η φιάλη τοποθετείται στον απαγωγό, γεμίζεται με αδρανές αέριο και τοποθετείται μέσα σε παγόλουτρο, όπου θα γίνει η αντίδραση απομάκρυνσης του HCl.

Σε αυτό το στάδιο προστίθεται ισομοριακή ποσότητα απεσταγμένης τριαιθυλαμίνης (TEA), η οποία έχει αραιωθεί σε EtAc, ώστε να δεσμευθεί ποσοτικά το HCl. Η προσθήκη γίνεται στάγδην στους 0°C σε χρονικό διάστημα 20min και υπό έντονη ανάδευση, ώστε να μην γίνει έναρξη πολυμερισμού καθώς δημιουργείται τοπική περίσσεια τριαιθυλαμίνης. Η αντίδραση αφήνεται για περίπου μισή ώρα ακόμα υπό έντονη ανάδευση. Μετά το τέλος της αντίδρασης παρατηρείται η δημιουργία του στερεού άλατος της τριαιθυλαμίνης (TEA *HCl), ενώ παράλληλα η διαλυτότητα του NCA αλλάζει καθώς δημιουργείται πλέον ο καθαρός NCA (N^{im}-trityl-His NCA) που είναι διαλυτός στον οξικό αιθυλεστέρα.

Το διάλυμα διηθείται υπό συνεχή ροή αδρανούς αερίου προς εκδίωξη του άλατος ενώ παράλληλα το διήθημα καταβυθίζεται σε καθαρό εξάνιο, για να κρυσταλλωθεί και να δημιουργηθεί N^{im}-trityl-His NCA. Ακολουθεί εκ νέου διήθηση για να συλλεχθεί το τελικό προϊόν N^{im}-trityl-His NCA, το οποίο αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού. Τέλος το στερεό συλλέγεται και αποθηκεύεται σε κατάλληλο χώρο με αδρανή ατμόσφαιρα (glove box).

Απόδοσησυνολική=67%



Σχήμα 17: Στάδια σύνθεσης του NCA της Ιστιδίνης

10. Σύνθεση μακροαπαρχητών

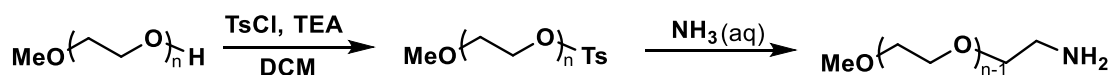
Για τη σύνθεση των υβριδικών πολυπεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν αμινο-τελικά συνθετικά πολυμερή, τα οποία συντέθηκαν με την τεχνική του ανιοντικού πολυμερισμού, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα πολυμερή που χρειάστηκαν τροποποίηση της ακραίας τους ομάδας. Το συνθετικό πολυμερές που επιλέχθηκε ήταν η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), καθώς είναι διαλυτό στο νερό και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, συμπεριλαμβανομένου και του DMF, στον οποίο έγιναν οι πολυμερισμοί των πολυπεπτιδίων. Ένας ακόμη λόγος που επιλέχθηκε η πολυαιθυλενογλυκόλη, είναι ότι παρουσιάζει καθόλου έως πολύ μικρή ανοσογονικότητα, όπως επίσης το γεγονός ότι δεν παρουσιάζει τοξικότητα απέναντι σε κύτταρα και πρωτεΐνες.¹⁹³

10.1. Σύνθεση mPEG-NH₂ από εμπορικά διαθέσιμο mPEG-OH

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται εμπορικά διαθέσιμο mPEG-OH γίνεται ξήρανση με λυοφιλοποίηση (freeze drying) με βενζόλιο και στη συνέχεια διαλυτοποιείται

σε διχλωρομεθάνιο (60mL / 10g). Υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται 3.8g *p*-τολουνοσουλφονυλο χλωριδίου και 2.8 mL τριαιθυλαμίνης. Η αντίδραση αφήνεται υπό επαναρροή και υπό ατμόσφαιρα αργού για όλη τη νύχτα. Κατόπιν το πολυμερές καταβυθίζεται σε διαιθυλαιθέρα και διηθείται. Η απομάκρυνση της περίσσειας του *p*-τολουοσουλφόνυλο χλωριδίου πραγματοποιείται με διαλυτοποίηση και καταβύθιση σε σύστημα διχλωρομεθάνιο/αιθέρας 3 φορές. Αφού ολοκληρωθούν οι ανακρυσταλλώσεις το πολυμερές ξηραίνεται σε φούρνο κενού.

Το ξηρό στερεό διαλυτοποιείται σε περίπου 60 ml διαλύματος αμμωνίας 25% και αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για 10 μέρες. Το διάλυμα συμπυκνώνεται στη γραμμή κενού και στη συνέχεια προστίθεται υδατικό διάλυμα NaOH, ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 50 mL. Στο υδατικό διάλυμα προστίθεται και NaCl (διαλυτοποιημένο σε νερό ~1g/10mL). Ακολουθούν 2 εκχυλίσεις με διχλωρομεθάνιο (DCM) περίπου 60 mL κάθε φορά και οι συνενωμένες οργανικές στιβάδες ξηραίνονται με θειικό μαγνήσιο. Το πολυμερές καταβυθίζεται σε διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται στον φούρνο κενού, αφού πρώτα διηθηθεί.¹⁹⁴

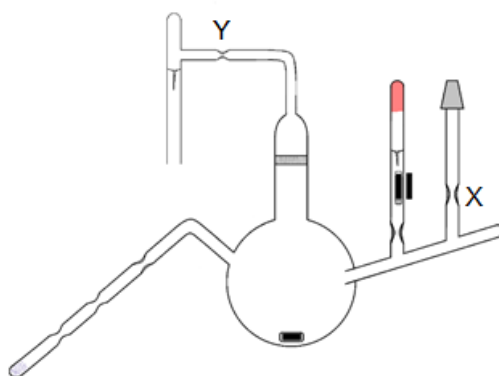


Σχήμα 18: Σύνθεση mPEG-NH₂

10.2. Σύνθεση διδραστικού N₃-PEG-NH₂ με ανιοντικό πολυμερισμό

Για τη σύνθεση του πολυμερούς N₃-PEG-NH₂ χρησιμοποιήθηκε ως απαρχητής η 3-άζιδο-1-προπανόλη, καθώς με αυτό τον τρόπο η προσθήκη του αζιδίου θα γίνει ποσοτικά. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός της, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 7.3. Από την αμπουλοσυσσκευή αποκόπτεται μία αμπούλα με συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό μοριακό βάρος του πολυμερούς (Σχέση 1.1) και τοποθετείται σε ειδικά διαμορφωμένη συσκευή (Εικόνα 13).

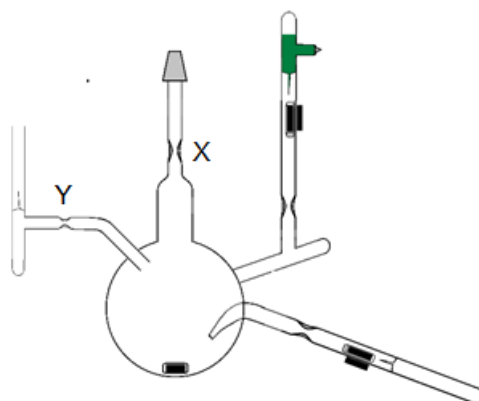
Στη συνέχεια γίνεται η ενεργοποίηση της αλκοόλης με μεταλλικό κάλιο μέσω του ναφθαλινοκάλιου. Το ναφθαλινοκάλιο είναι ένα οργανικό αλάτι, πράσινου χρώματος (THF), το οποίο πρέπει να καταναλωθεί άμεσα (~4h) από τη σύνθεση του¹⁹⁵, καθώς αποσυντίθεται πολύ εύκολα. Για τη σύνθεση του, το ναφθαλίνιο, καθαρίζεται αρχικά με τον τρόπο που αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 7.6. και συλλέγεται σε ειδική αμπούλα. Έπειτα η αμπούλα τοποθετείται σε ειδική συσκευή με φίλτρο (Εικόνα 12). Η συσκευή αυτή περιέχει επίσης εσμύρισμα για να τοποθετηθεί στη γραμμή υψηλού κενού και ειδική αμπούλα με μεταλλικό κάλιο, προκειμένου να σχηματιστεί το κάτοπτρο Καλίου. Αφού προσαρτηθεί στη γραμμή κενού, ακολουθεί απαέρωση, ούτως ώστε να απομακρυνθούν προσμίξεις που μπορεί να απενεργοποιήσουν τα ενεργά κέντρα. Στη συνέχεια με χρήση σχετικά χαμηλής σε ένταση φλόγας, θερμαίνεται η αμπούλα με το κάλιο, το οποίο εξαχνώνεται στα ψυχρά μέρη της συσκευής, σχηματίζοντας έτσι το κάτοπτρο Καλίου. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού με σύντμηση στο σημείο “X” με χρήση φλόγας. Έπειτα γίνεται θραύση του υάλινου υμένα, που συγκρατεί το ναφθαλίνιο, και γίνεται η εισαγωγή του στον αντιδραστήρα. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση για 30 min στους 0 °C. Έπειτα το διάλυμα διηθείται *in situ* και συλλέγεται εκ νέου σε αμπούλα η οποία απομακρύνεται από την υπόλοιπη συσκευή με σύντμηση στο σημείο “Y” με χρήση φλόγας.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής σύνθεσης ναφθαλινοκάλιου

Η αμπούλα με το ναφθαλινοκάλιο τοποθετείται στη συνέχεια στην ειδικά διαμορφωμένη συσκευή, η οποία περιέχει την αμπούλα με το διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης της 3-αζιδο-1-προπανόλης. Η συσκευή προσαρτάται στη

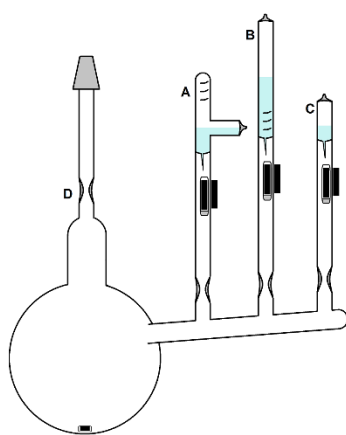
γραμμή υψηλού κενού, προκειμένου να απομακρυνθούν ανεπιθύμητες προσμίξεις, και απομακρύνεται με σύντμηση στο σημείο “X” με χρήση φλόγας. Στη συνέχεια θραύεται ο υάλινος υμένας της αμπούλας που περιέχει το ναφθαλινοκάλιο, το οποίο εισάγεται στον αντιδραστήρα. Έπειτα γίνεται θραύση και του υάλινου υμένα της αμπούλας που περιέχει την αλκοόλη, η οποία εισάγεται στον αντιδραστήρα με το ναφθαλινοκάλιο, στάγδην. Παρατηρείται, ότι όταν εισαχθεί ισομοριακή ποσότητα της αλκοόλης στο διάλυμα με το ναφθαλινοκάλιο, εκείνο αποχρωματίζεται, δείγμα της επιτυχούς αντίδρασης. Αφού ολοκληρωθεί η εισαγωγή όλης της ποσότητας της αλκοόλης, το διάλυμα αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση για 30 min. Τελικά η ενεργοποιημένη αλκοόλη συλλέγεται σε αμπούλα, η οποία αποκόπτεται από τη συσκευή με σύντμηση στο σημείο “Y” με χρήση φλόγας και φυλάσσεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής ενεργοποίησης αλκοόλης με ναφθαλινοκάλιο

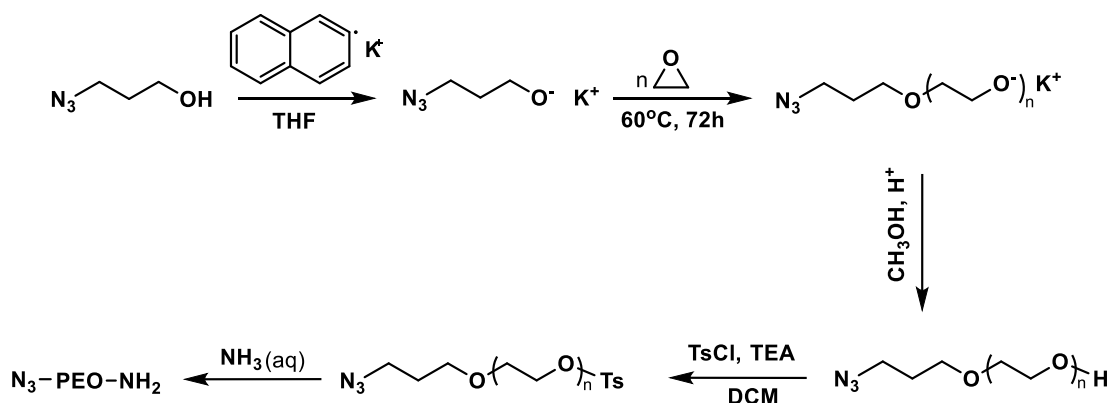
Για τον πολυμερισμό του αιθυλενοξειδίου, τοποθετούνται σε συσκευή πολυμερισμού (Εικόνα 14) η αμπούλα του μονομερούς (A), η αμπούλα με τον απαρχητή 3-αζιδο-1-προπανόλη (B) και η αμπούλα με το τερματικό μέσο του πολυμερισμού, το οποίο στην προκειμένη περίπτωση είναι η οξινισμένη μεθανόλη (C). Η συσκευή τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω εσφυρίσματος και αφήνεται προς ξήρανση. Έπειτα η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού με σύντμηση στο σημείο “D” με χρήση φλόγας και τοποθετείται σε ελαιόλουτρο στους $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Θραύονται διαδοχικά οι υάλινοι υμένες της αμπούλας του απαρχητή και του μονομερούς. Στην περίπτωση του

αιθυλενοξειδίου απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, καθώς πρόκειται για αέριο με μεγάλη τάση ατμών και υπάρχει κίνδυνος κατά την θραύση της αμπούλας, στην οποία βρίσκεται, να γίνει έντονη εκτόνωση. Αφού γίνει η εισαγωγή των αντιδραστηρίων στον αντιδραστήρα, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση για 72h και στη συνέχεια ο πολυμερισμός τερματίζεται με τη θραύση του υάλινου υμένα της αμπούλας της μεθανόλης και την εισαγωγή της στο “ζωντανό” πολυμερές. Το διάλυμα καταβυθίζεται σε μεγάλη περίσσεια ψυχρού διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια διηθείται προκειμένου να συλλεχθεί το καθαρό λευκό στερεό N₃-PEG-OH.



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμερισμό των μακροαπαρχητών

Για την τροποποίηση του ω-άκρου του πολυμερούς σε αμινομάδα, η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 10.1. συνοπτικά, το πολυμερές N₃-PEG-OH, τοποθετείται σε φιάλη που περιέχει 25% w/w NH₃ και αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για 10 μέρες. Έπειτα το διάλυμα συμπυκνώνεται μερικώς και εκχυλίζεται με DCM. Ακολουθούν 2 διαδοχικές καταβυθίσεις σε διαιθυλαιθέρα και το στερεό συλλέγεται μέσω διήθησης.



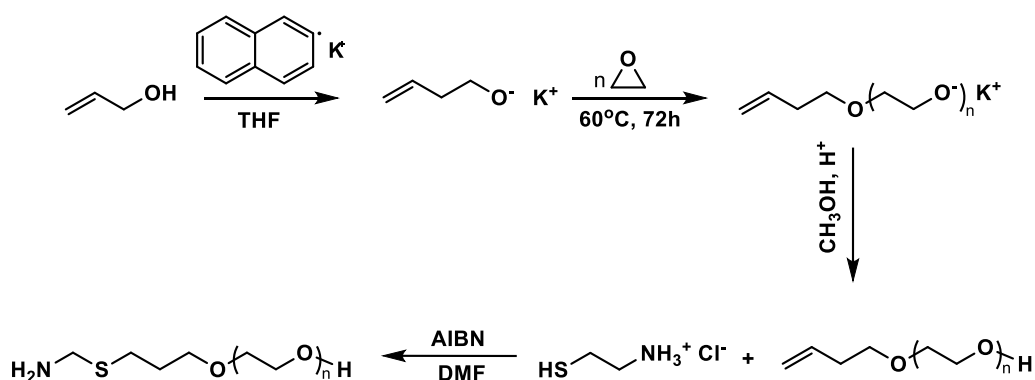
Σχήμα 19: Σύνθεση μακροαπαρχητή N₃-PEG-NH₂

10.3. Σύνθεση διδραστικού NH₂-PEG-OH με ανιοντικό πολυμερισμό

Η σύνθεση του NH₂-PEG-OH πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που έγινε και η σύνθεση του N₃-PEG-OH. Ως απαρχητής για τον ανιοντικό πολυμερισμό του αιθυλενοξειδίου χρησιμοποιήθηκε η αλλυλική αλκοόλη. Συνοπτικά ή αλλυλική αλκοόλη ενεργοποιήθηκε με ναφθαλινοκάλιο και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε συσκευή πολυμερισμού, αντίστοιχη με αυτή της Εικόνας 14. Η αντίδραση με το αιθυλενοξείδιο πραγματοποιήθηκε στους 50 °C για 72h και ο πολυμερισμός τερματίστηκε με οξιτισμένη μεθανόλη. Το διάλυμα του πολυμερισμού καταβυθίστηκε σε μεγάλη περίσσεια ψυχρού διαιθυλαιθέρα και διηθήθηκε, ώστε να προκύψει το καθαρό στερεό πολυμερές allyl-PEG-OH.

Η αμινοποίηση του άλλυλο-άκρου του πολυμερούς πραγματοποιήθηκε με την ριζική προσθήκη του υδροχλωρικού άλατος της 2-αμινοαιθανοθιόλης. Πιο αναλυτικά, στο πολυμερές που συλλέχθηκε έπειτα από διήθηση, πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση μέσω βενζολίου, προκειμένου να απομακρυνθεί κάθε ίχνος υγρασίας. Στη συνέχεια σε σφαιρική φιάλη που περιείχε περίσσεια 20:1 κατά mol υδροχλωρικού άλατος της 2-αμινοαιθανοθιόλης και 1:1 AIBN, προστέθηκε το πολυμερές. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση στους 65 °C για 24h, υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου. Στη συνέχεια το πολυμερές καταβυθίστηκε δις σε μεγάλη περίσσεια διαιθυλαιθέρα και το προκύπτον στερεό διαλυτοποιήθηκε με μεθανόλη. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε νέα σφαιρική φιάλη, στην οποία έγινε προσθήκη ισομοριακής ποσότητας τριαιθυλαμίνης. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση

για 4h και στη συνέχεια η μεθανόλη απομακρύνθηκε μερικώς, ενώ το διάλυμα αραιώθηκε με απιοντισμένο και απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε διαχωριστική χοάνη, όπου εκχυλίστηκε από διχλωρομεθάνιο 5 φορές. Οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις αναμίχθηκαν και ξηράθηκαν με θειικό μαγνήσιο, ενώ το διάλυμα συμπυκνώθηκε, ούτως ώστε να είναι σε συγκέντρωση ~10%. Έπειτα το διάλυμα καταβυθίστηκε σε περίσσεια διαιθυλαιθέρα και το προκύπτον στερεό λυοφιλοποιήθηκε μέσω βενζολίου, δίνοντας τελικά το πολυμερές NH₂-PEG-OH.



Σχήμα 20: Σύνθεση NH₂-PEG-OH

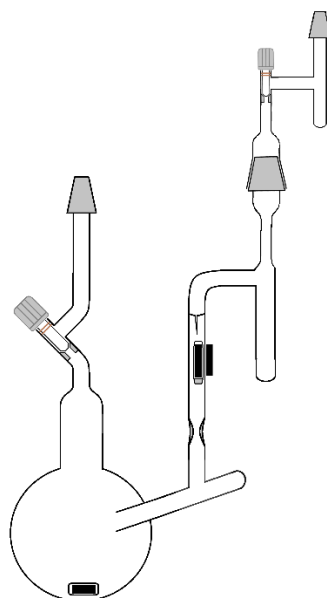
11. Σύνθεση υβριδικών δισυσταδικών συμπολυμερών PEG-*b*-P(L-His)

Για τη σύνθεση των υβριδικών δισυσταδικών πολυμερών χρησιμοποιήθηκαν οι μακροαπαρχητές που περιγράφηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, με συνδυασμό του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου και της τεχνικής υψηλού κενού. Με τον τρόπο αυτό λήφθηκαν πολυμερή με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και στενές μοριακές κατανομές.

Πιο συγκεκριμένα σε ειδικά υαλοφυγμένη συσκευή (Εικόνα 15) πολυμερισμού τοποθετήθηκε η απαιτούμενη ποσότητα του μακροαπαρχητή, ο οποίος ξηράθηκε στη γραμμή υψηλού κενού με λυοφιλοποίηση (freeze-drying), μέσω βενζολίου. Στη συνέχεια, αποστάχθηκε στη συσκευή DMF, έτσι ώστε η συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 10%^{w/v}. Με τη βοήθεια στρόφιγγας υψηλού κενού, ούτως ώστε το εσωτερικό της συσκευής να μην έρθει σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα, η συσκευή μεταφέρθηκε σε θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας (glove box). Σε ειδική αμπούλα, που φέρει η συσκευή, η οποία εξαιτίας ενός ειδικού επιθέματος με στρόφιγγα βρίσκεται υπό κενό, προστίθεται

η ποσότητα του NCA της τριτυλο προστατευμένης ιστιδίνης. Στη συνέχεια η αμπούλα ασφαρίζεται και πάλι με το επίθεμα και η συσκευή μεταφέρεται εκ νέου στη γραμμή υψηλού κενού και προσαρτάται από το εσμύρισμα που φέρει το επίθεμα. Αποστάζεται DMF, έτσι ώστε το διάλυμα να έχει συγκέντρωση 10% w/v και η συσκευή απομακρύνεται με σύντμηση με χρήση φλόγας. Στη συνέχεια, γίνεται θραύση του υάλινου υμένα της αμπούλας και το διάλυμα, που περιέχει τον NCA, μεταφέρεται στον αντιδραστήρα με το μακροαπαρχητή. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται τακτικά μέσω φασματοσκοπίας FT-IR έως ότου καταναλωθεί όλη η ποσότητα του NCA. Παρατηρείται, από πολύ νωρίς κιόλας, ετερογένεια στο διάλυμα, η οποία οφείλεται στη δευτεροταγή δομή της πολυ(ιστιδίνης) η οποία θα μελετηθεί διεξοδικά σε επόμενα κεφάλαια.

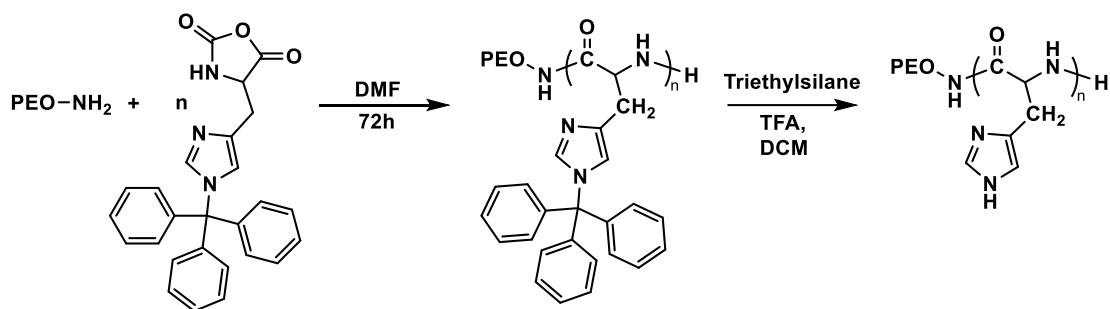
Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού η ποσότητα του CO₂ που παράγεται απομακρύνεται στη γραμμή υψηλού κενού. Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση φυσαλίδων στο διάλυμα κατά την απαέρωση, δείγμα του παραχθέντος CO₂ και άρα της διάδοσης του πολυμερισμού. Τελικά το διάλυμα καταβυθίζεται σε μεγάλη περίσσεια ψυχρού διαιθυλαιθέρα και διηθείται, ώστε να συλλεχθεί το καθαρό πολυμερές PEG-*b*-P(L-(trt) His).



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής πολυμερισμού των NCAs

Για την απομάκρυνση των τρίτυλο προστατευτικών ομάδων από τις δομικές μονάδες της ιστιδίνης απαιτούνται όξινες συνθήκες. Αναλυτικότερα, το συμπολυμερές μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως, που περιέχει διαλύτη DCM. Παρατηρείται ότι το διάλυμα είναι ετερογενές. Στη συνέχεια προστίθεται σε περίσσεια τριφθοροξικό οξύ (TFA) και το διάλυμα γίνεται ομογενές, ενώ παράλληλα παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του διαλύματος σε καφέ. Το διάλυμα αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση για 1h και στη συνέχεια προστίθεται ισομοριακή ποσότητα με τους κλάδους της ιστιδίνης, τριαιθυλοσιλανίου, το οποίο δεσμεύει τις ελεύθερες τρίτυλο ομάδες και τις αποτρέπει από τα να επαναπροσδεθούν στο άζωτο του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης. Όταν η ποσότητα του τριαιθυλοσιλανίου φτάσει στο ισοδύναμο σημείο, παρατηρείται αποχρωματισμός του διαλύματος σε ανοιχτό υποκίτρινο, ένδειξη της επιτυχούς δέσμευσης των τρίτυλο ομάδων. Στη συνέχεια το διάλυμα καταβυθίζεται σε περίσσεια ψυχρού διαιθυλαιθέρα και διηθείται.

Ακολουθεί η απομάκρυνση των ιόντων του TFA, το οποίο έχει προσκολληθεί στο βασικό άζωτο του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη διαδικασία της διαπίδυσης. Πιο συγκεκριμένα το στερεό πολυμερές τοποθετείται σε υδατικό διάλυμα, που περιέχει φιλτραρισμένο (miliQ) νερό, στο οποίο προστίθεται διάλυμα ανθρακικού καλίου (K_2CO_3), έως ότου το pH γίνει 5. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε ημιπερατή μεμβράνη η οποία με τη σειρά της τοποθετείται σε οξιμισμένο με υδροχλωρικό οξύ (pH 5) υδατόλουτρο (miliQ). Η διαδικασία αυτή γίνεται αφενός, γιατί το υδροχλώριο είναι ισχυρότερο οξύ από το TFA και αφετέρου, γιατί δεν είναι τοξικό. Η μεμβράνη αφήνεται στο υδατόλουτρο για 24h με 2 διαδοχικές αλλαγές του υδατόλουτρου ανά 3h. Στη συνέχεια επανατοποθετείται σε υδατόλουτρο στο οποίο έχει προσαρμοστεί το pH του με καυστικό νάτριο (NaOH). Ακολουθούν 2 αλλαγές του λουτρού ανά 3 ώρες και τελικά η μεμβράνη αφήνεται για ακόμα 24h. Η διαδικασία θεωρείται λήξασα, όταν το pH στο εξωτερικό της μεμβράνης είναι $pH \geq 7.4$. Τέλος, το διάλυμα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη και ξηραίνεται με λυοφιλοποίηση (freeze drying). Το προκύπτον στερεό συλλέγεται και τοποθετείται στους $-20^\circ C$.



Σχήμα 21: Σύνθεση υβριδικού δισυσταδικού συμπολυμερούς PEG-*b*-P(L-His)

12. Εισαγωγή βιομορίων στο ω -άκρο του συνθετικού πολυμερούς

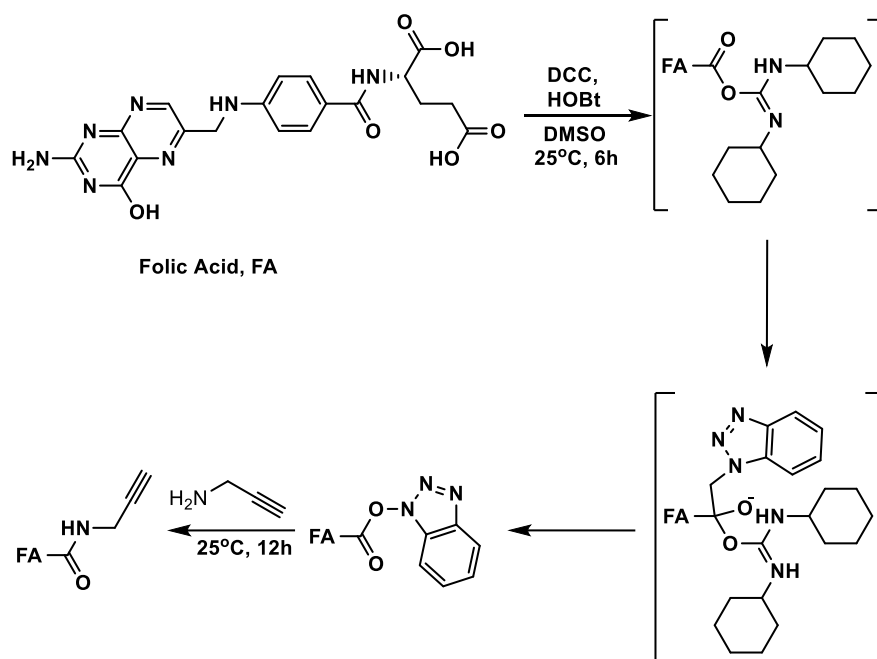
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ορισμένα βιομόρια μπορούν να λειτουργήσουν ως ομάδες στοχευτές των καρκινικών κυττάρων, καθώς αυτά εμφανίζουν στην κυτταρική τους μεμβράνη υποδοχείς των βιομορίων αυτών. Με τον τρόπο αυτό ένα σύστημα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών μπορεί να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και μεγαλύτερη δραστικότητα απέναντι σε τέτοια κύτταρα. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν το φολικό και το γλυκυρρητινικό οξύ και η σύζευξή τους με το πολυμερές έγινε είτε με τη μέθοδο της “click” χημείας, είτε με εστεροποίηση.

12.1. Σύζευξη φολικού οξέος

Η σύζευξη του φολικού οξέος με το πολυμερές έγινε με τη χρήση της χημείας “click”. Η κλικ χημεία εμφανίστηκε στη βιβλιογραφία το 2001 από τον Sharpless^{196, 197} και από τότε έχει αποτελέσει αναπόσπαστο εργαλείο για όλους του συνθετικούς χημικούς. Ένα από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι οι υψηλές αποδόσεις στις αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ως μέθοδος σύζευξης του FA και πιο συγκεκριμένα η αντίδραση κυκλοπροσθήκης μεταξύ αζιδίου και τριπλού δεσμού.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η αμιδοποίηση του γ-καρβοξυλίου του φολικού οξέος με την προπαργουλαμίνη. Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του γ-καρβοξυλίου του FA με τη χρήση του 1,3-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιου (DCC) και του 1-υδροξυβενζοτριάζολιου (HOBT). Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει DMSO τοποθετούνται το φολικό οξύ, το DCC και το HOBT σε αναλογία 10:10:1 κατά mol και η αντίδραση αφήνεται υπό

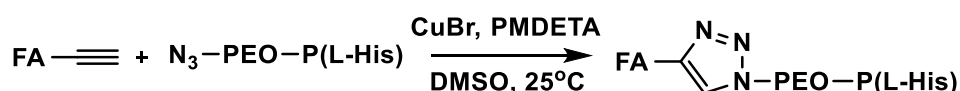
ανάδευση για 6h. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση ενεργοποίησης του φολικού οξέος, προστίθεται η προπαργylaμίνη σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1 με το φολικό οξύ και η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση για ακόμα 12h.



Σχήμα 22: Αντίδραση εισαγωγής τριπλού δεσμού στο γ-καρβοξύλιο του φολικού οξέος

Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση του ενεργοποιημένου φολικού οξέος με την προπαργylaμίνη, προστίθεται σε σφαιρική φιάλη που περιέχει το συμπολυμερές που συντέθηκε με απαραίτητη την 3-άζιδο-1-προπανόλη, N₃-PEG-P(L-His), βρωμιούχο χαλκό (CuBr) και N,N,N',N'',N''' πενταμεθυλδιαιθυλενετριαμίνη (PMDETA) σε αναλογία 1:10 και αφήνεται υπό ανάδευση για 12h.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, το συμπολυμερές καθαρίζεται με στήλη, που περιέχει πυριτική πηκτή (silica gel) με διάμετρο πόρων 0.063-0.2mm, ώστε να απομακρυνθεί ο βρωμιούχος χαλός. Τέλος το διάλυμα καταβυθίζεται σε διαιθυλαιθέρα και διηθείται με τελικό προϊόν το FA-PEG-P(L-His).

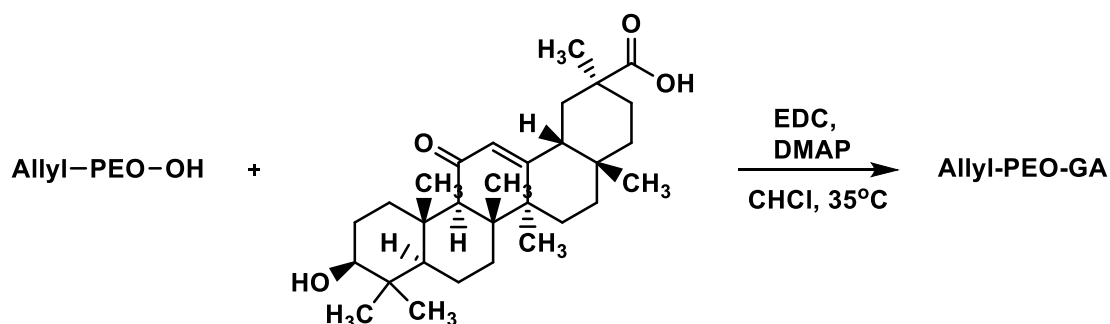


Σχήμα 23: Αντίδραση κυκλοπροσθήκης μεταξύ του τριπλού δεσμού του FA και του αζιδίου του συμπολυμερούς

12.2. Σύζευξη γλυκουρρητινικού οξέος

Η εισαγωγή του γλυκουρετινικού οξέος στα συμπολυμερή έγινε με τη μέθοδο της εστεροποίησης. Αντίθετα με την περίπτωση του φολικού οξέος, το οποίο συνδέθηκε απευθείας στο συμπολυμερές, το γλυκουρρητινικό οξύ προσδέθηκε αρχικά στην πολυαιθυλενογλυκόλη και στη συνέχεια έγινε ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου του NCA της ιστιδίνης. Η σύζευξη πραγματοποιήθηκε μέσω της ακραίας υδρόξυλ-ομάδας της πολυαιθυλενογλυκόλης που συντέθηκε με απαρχητή την αλλυλική αλκοόλη (allyl-PEG-OH). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με συζευκτικά μέσα το *N*-(3-διμεθυλαμινοπρόπυλ)-*N*-αιθυλκαρβοδιιμίδιο (EDC) και την 4-διμεθυλάμινο πυριδίνη (DMAP).¹⁹⁸

Σε διάλυμα 10% w/v γλυκουρρητινικού οξέος σε χλωροφόρμιο υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου, γίνεται προσθήκη ισομοριακής ποσότητας του DMAP και 2.2 φορές περίσσειας του EDC, και αφήνονται υπό ανάδευση, ώσπου να διαλυτοποιηθούν πλήρως. Στη συνέχεια γίνεται η προσθήκη της πολυαιθυλενογλυκόλης σε αναλογία 1:2 και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση και επαναροή για 24h. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση το πολυμερές καταβυθίζεται σε ψυχρό διαιθυλαιθέρα και διηθείται. Το προκύπτον στερεό διαλυτοποιείται σε νερό και εκχυλίζεται 5 φορές με DCM. Οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις συμπυκνώνονται και ξηραίνονται με MgSO₄. Το ξηραντικό απομακρύνεται με διήθηση και το διάλυμα καταβυθίζεται εκ νέου σε διαιθυλαιθέρα, δίνοντας το τελικό προϊόν allyl-PEG-GA.



Σχήμα 24: Σύζευξη 18β-γλυκουρρητινικού οξέος με τον μακροαπαρχητή allyl-PEG-OH μέσω εστεροποίησης

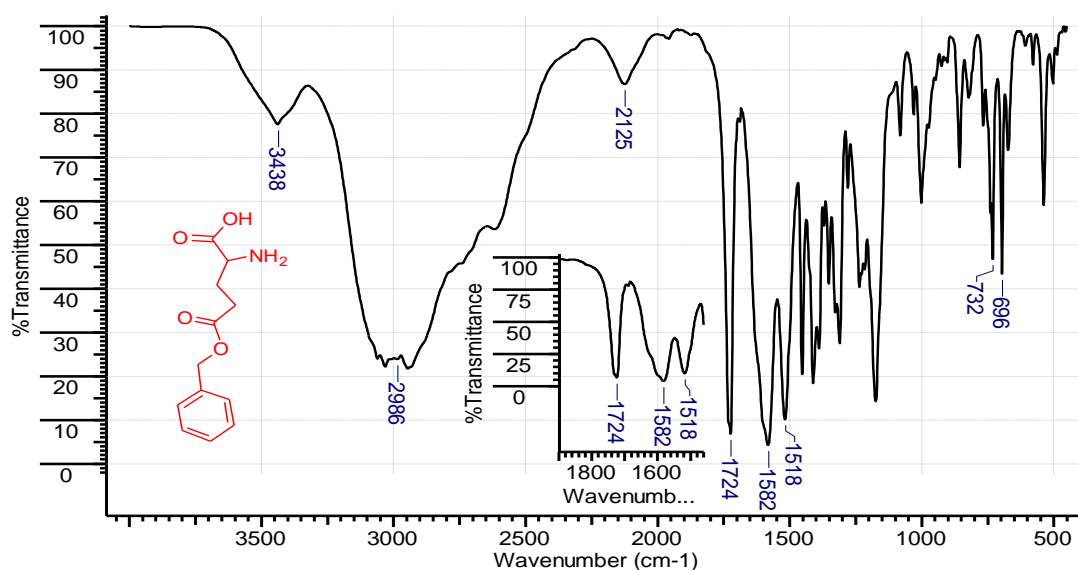
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

13. Σύνθεση των NCAs των α-αμινοξέων

Η σύνθεση των N-Καρβοξυανυδριτών αποτελεί το πρώτο στάδιο για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδικών δομών. Στην παρούσα εργασία η σύνθεση των NCAs ελέγχθηκε με φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), τόσο στα πρόδρομα αμινοξέα όσο και στα τελικά προϊόντα.

13.1. Σύνθεση BLG-NCA

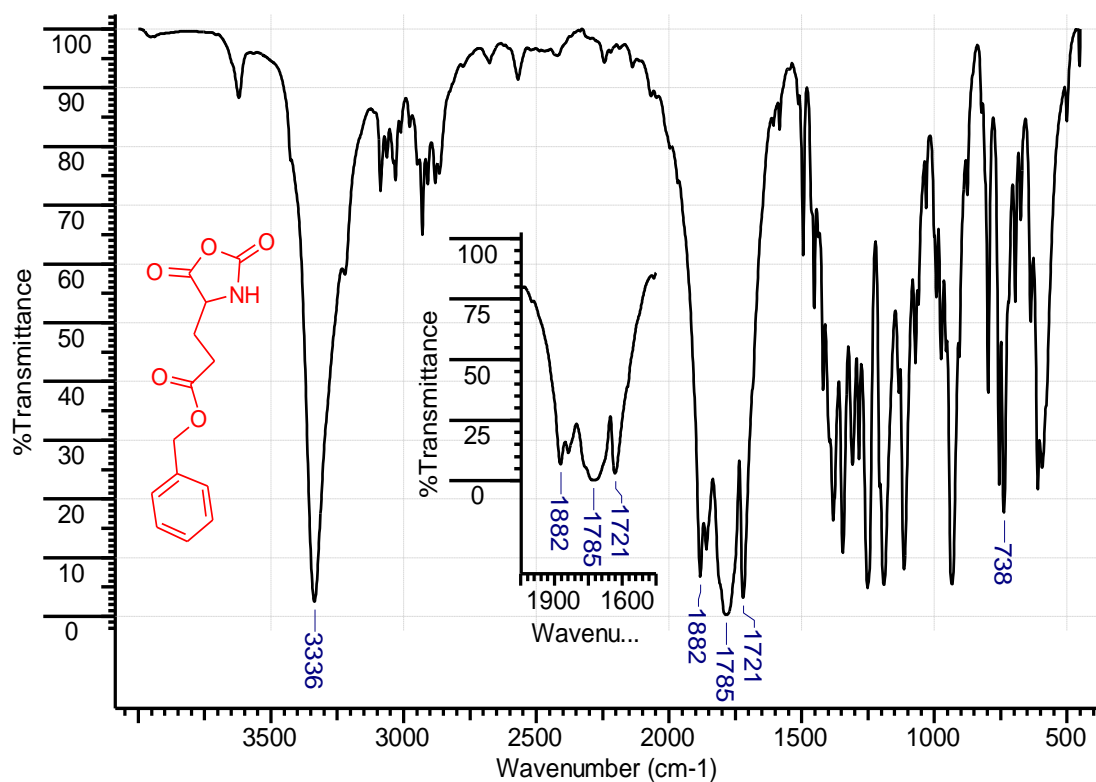
Η σύνθεση του NCA του γ-βένζυλο γλουταμικού οξέος, αρχικά ελέγχθηκε με φασματοσκοπία υπέρυθρου. Στο ακόλουθο φάσμα φαίνονται οι απορροφήσεις του α-αμινοξέος του γ-βένζυλο γλουταμικού οξέος με ιδιαίτερη έμφαση στην περιοχή των καρβονυλίων.



Εικόνα 16: Φάσμα υπέρυθρου του γ-βενζυλεστέρα του γλουταμικού οξέος

Η ευρεία κορυφή από τα $2500\text{-}3300\text{cm}^{-1}$ αντιστοιχεί στη δόνηση της πρωτοταγούς αμίνης σε συνδυασμό με την υδροξυλομάδα του καρβοξυλίου. Τα καρβοξυλικά οξέα απαντώνται ως διμερή, όταν βρίσκονται σε στερεά φάση μέσω δεσμών υδρογόνου, αποδίδοντας ευρείες κορυφές στα φάσματα IR. Στα 1724 cm^{-1} εμφανίζεται η απορρόφηση του αρωματικού εστέρα στην πλευρική

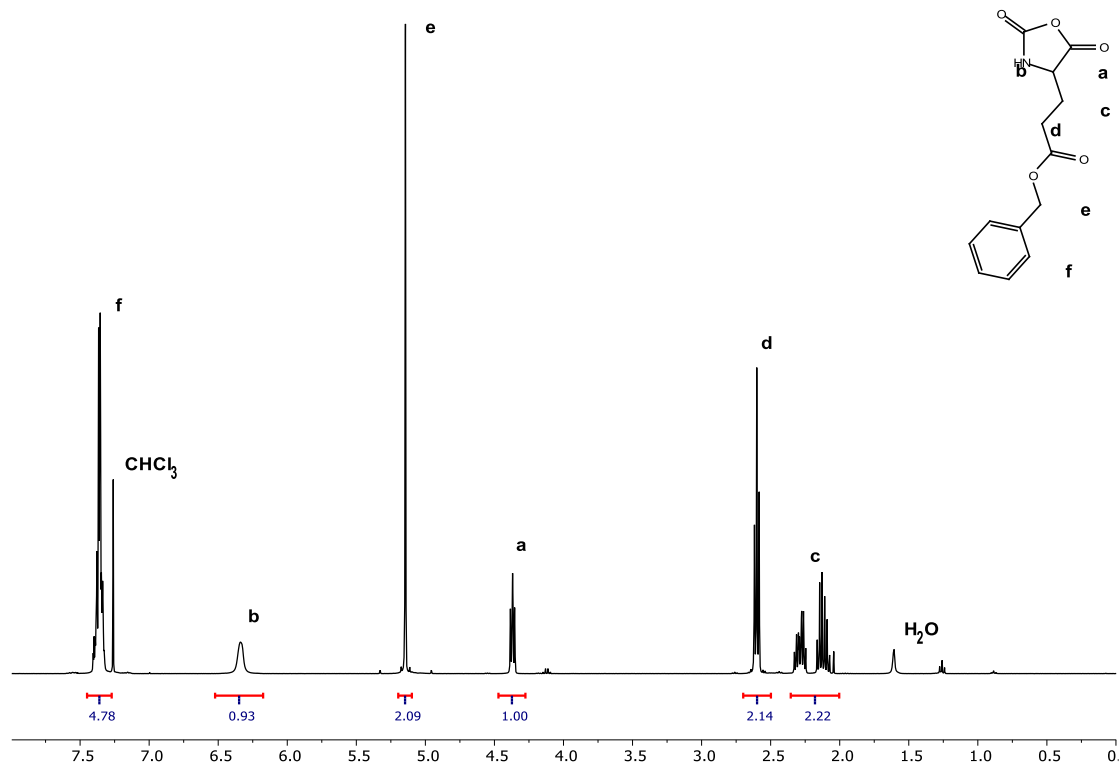
ομάδα του αμινοξέος, ενώ στην περιοχή $600-800\text{cm}^{-1}$ εμφανίζονται οι ταινίες του αρωματικού δακτυλίου της προστασίας. Στον ανυδρίτη του γλουταμικού (BLG-NCA) η περιοχή του καρβονυλίου αποδίδεται στο παρακάτω φάσμα.



Εικόνα 17: Φάσμα υπέρυθρου του BLG-NCA. Μεγέθυνση στην περιοχή του καρβονυλίου

Στην περιοχή του καρβονυλίου εμφανίζονται δυο νέες ταινίες που υποδηλώνουν την επιτυχή σύνθεση του ανυδρίτη. Μία στα 1785cm^{-1} που αφορά στο καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του ανυδρίτη, δηλαδή του (C2), και η δεύτερη στα 1882cm^{-1} για το καρβονύλιο του (C5) άνθρακα. Επιπλέον στην περιοχή του καρβονυλίου απουσιάζει η ταινία στα 1650cm^{-1} (αμιδικός δεσμός), γεγονός που αποδεικνύει ότι η τεχνική του υψηλού κενού διασφαλίζει υψηλή καθαρότητα σε όλα τα συνθετικά στάδια των NCAs. Η φύλαξη των NCAs σε συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας και σε στερεή μορφή επιτρέπει την λήψη φασμάτων IR περιοδικά, ώστε να γίνεται αποτίμηση σχετικά με τη διατήρηση της δομής τους. Σε περίπτωση που στο φάσμα εμφανιστεί απορρόφηση λόγω αμιδικού δεσμού, ο NCA θεωρείται ακατάλληλος προς χρήση. Για το λόγο αυτό η χρήση τους πρέπει να γίνεται σχετικά γρήγορα από τη μέρα σύνθεσής τους.

Για την εξακρίβωση της επιτυχούς σύνθεσης του BLG-NCA χρησιμοποιήθηκε επίσης φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$. Από το φάσμα που ακολουθεί είναι φανερό ότι η σύνθεση του NCA ήταν επιτυχής, καθώς οι κορυφές αντιστοιχούν ακριβώς στις μετατοπίσεις των πρωτονίων του μορίου του NCA (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του γ -benzyl-L-Glutamate NCA σε CDCl_3

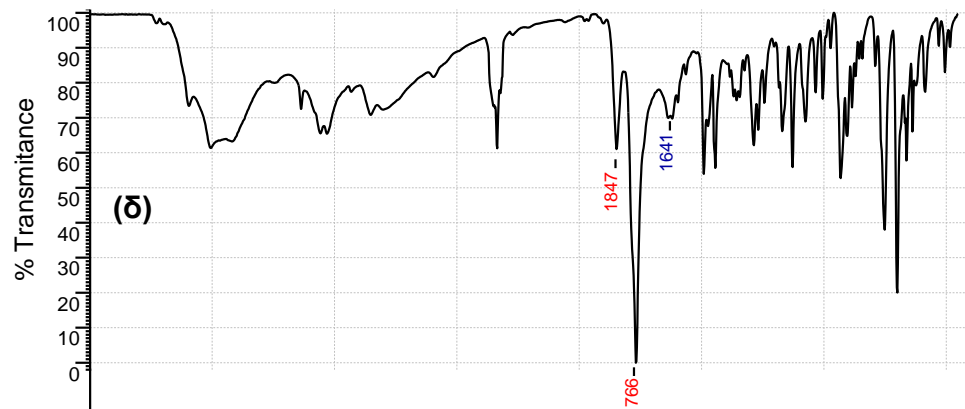
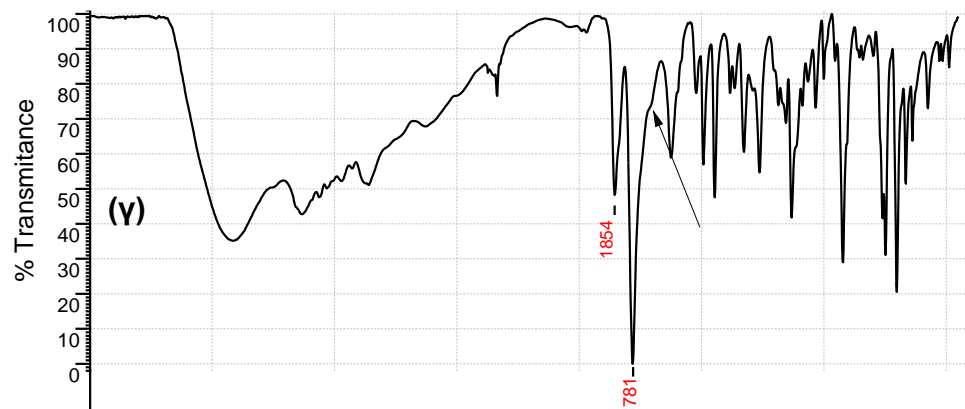
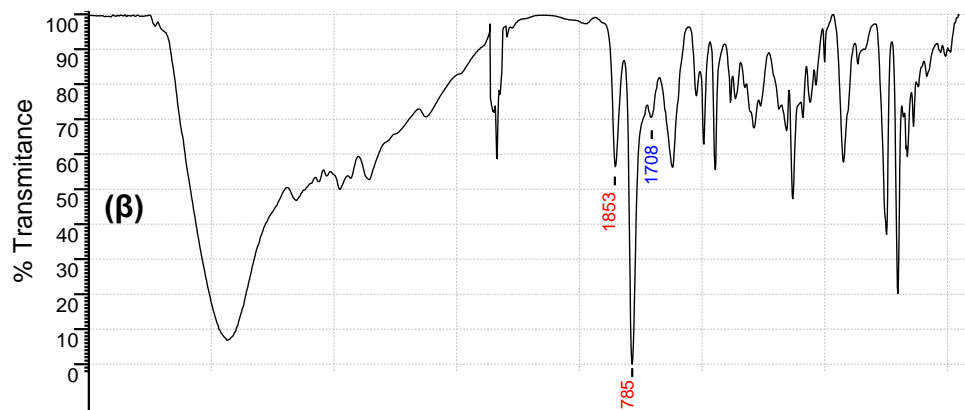
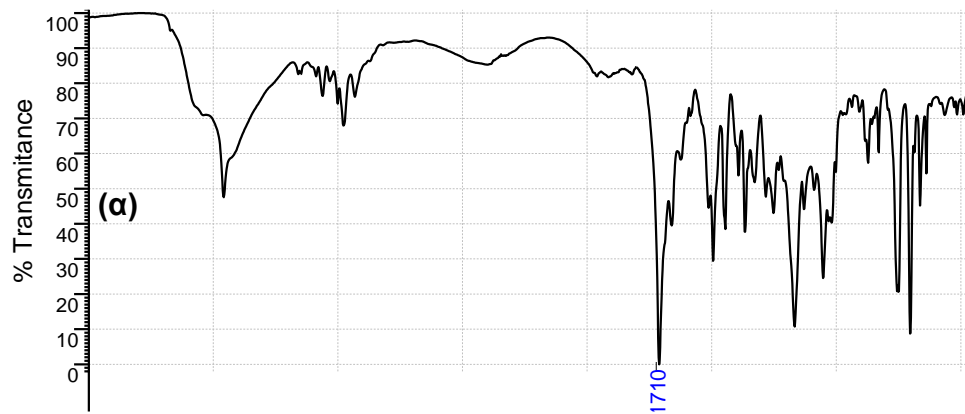
$^1\text{H-NMR}$ μετατοπίσεις των πρωτονίων του γ -benzyl-L-Glutamate NCA σε ppm (300MHz): 2.07-2.35 (c: CH_2), 2.56-2.69 (d: CH_2), 4.39 (a: CH), 5.17 (e: CH_2), 6.36 (b: NH), 7.33-7.45 (f: C_6H_5)

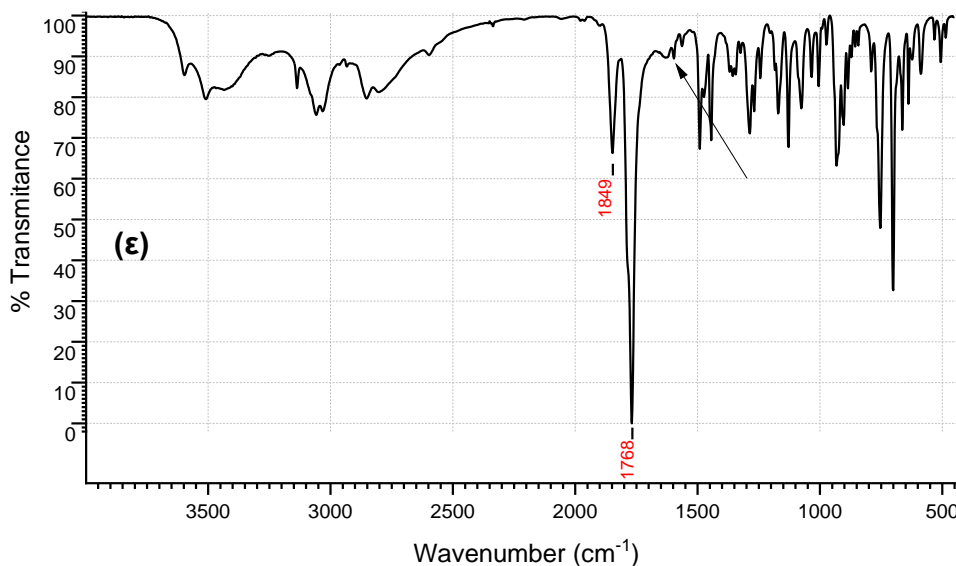
13.2. Σύνθεση (trt)His-NCA

Όπως αναφέρθηκε και στο πειραματικό μέρος η σύνθεση του (trt)His-NCA έγινε σε δύο στάδια. Αρχικά παρελήφθη ως κύριο προϊόν της κυκλοποίησης το υδροχλωρικό άλας του NCA και τελικά με προσθήκη ισομοριακής ποσότητας τριαιθυλαμίνης, έγινε η απομάκρυνση του υδροχλωρίου.

Κατά τη διάρκεια της κυκλοποίησης του α-αμινοξέος παρελήφθησαν φάσματα IR ανά τακτά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να προσδιοριστεί το ποσοστό κυκλοποίησης. Στο φάσμα που ακολουθεί είναι εμφανής η μετατροπή του καρβοξυλίου του αμινοξέος στα καρβονύλια του NCA, αφού η απορρόφηση στα 1710 cm^{-1} δίνει τη θέση της στις χαρακτηριστικές για τους ανυδρίτες κορυφές στα 1780 cm^{-1} και 1850 cm^{-1} . Η εμφάνιση αυτών των δύο κορυφών υποδηλώνει την επιτυχή σύνθεση του N-καρβοξυανυδρίτη, αφού η κορυφή στα 1785 cm^{-1} αφορά το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του ανυδρίτη, δηλαδή του (C2), και η δεύτερη στα 1882 cm^{-1} το καρβονύλιο του (C5) άνθρακα. Επιπλέον η απουσία ταινίας στα 1650 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στην παρουσία αμιδικού δεσμού, αποδεικνύει πως οι συνθήκες υψηλού κενού, κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του N-καρβοξυανυδρίτη, παρέχουν τις κατάλληλες προϋποθέσεις για τη σύνθεση NCAs υψηλής καθαρότητας. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση σύνθεσης του N-καρβοξυανυδρίτη, και μετά την καταβύθιση του NCA σε διαιθυλαιθέρα, στο φάσμα IR εμφανίζεται μία νέα ταινία απορρόφησης στα 1620 cm^{-1} , η οποία οφείλεται σε έκταση δόνησης του δεσμού N-H με το HCl στον ιμιδαζολικό δακτύλιο του N-καρβοξυανυδρίτη της ιστιδίνης. Με τις ανακρυσταλλώσεις που ακολούθησαν στη συνέχεια για τον καθαρισμό του NCA, παρατηρείται η πλήρης εξαφάνιση της ταινίας στα 1710 cm^{-1} , γεγονός που υποδηλώνει ότι το υδροχλωρικό άλας του NCA είναι το μοναδικό προϊόν της αντίδρασης.

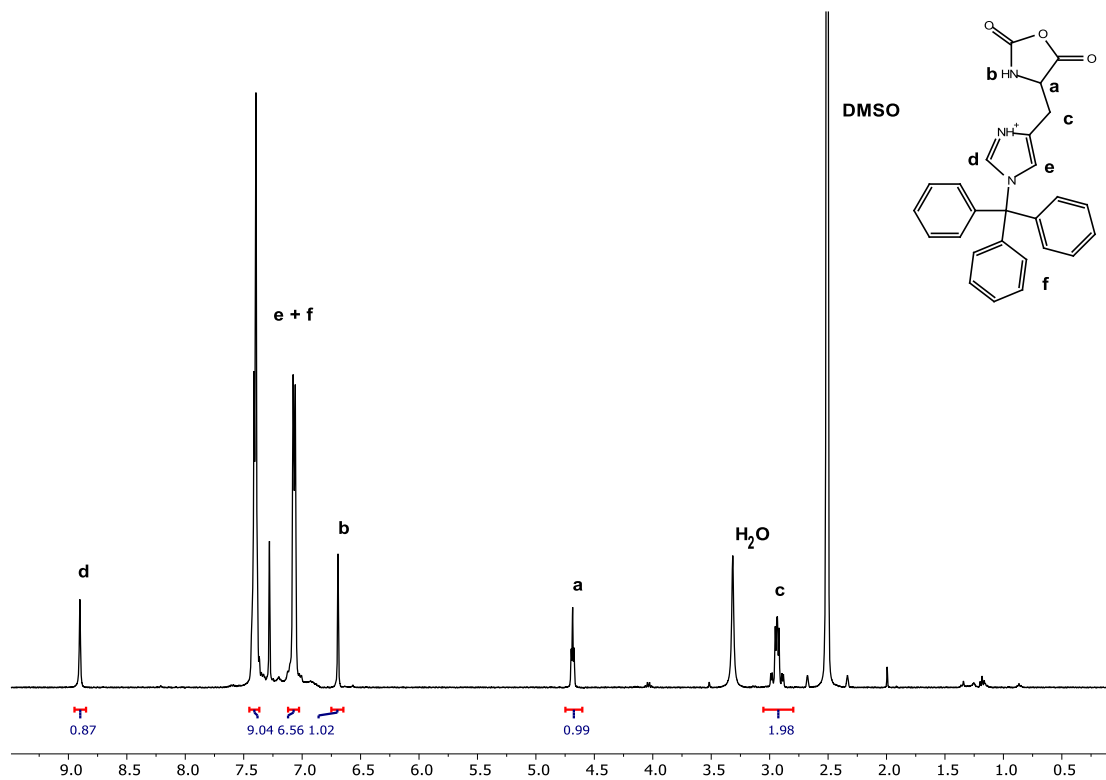
Τέλος, λήφθηκε ένα ακόμα φάσμα IR μετά την προσθήκη ισομοριακής ποσότητας τριαιθυλαμίνης και την πλήρη δέσμευση και απομάκρυνση του HCl, γεγονός που αποδεικνύεται με τη πλήρη εξαφάνιση της ταινίας στα 1620 cm^{-1} .





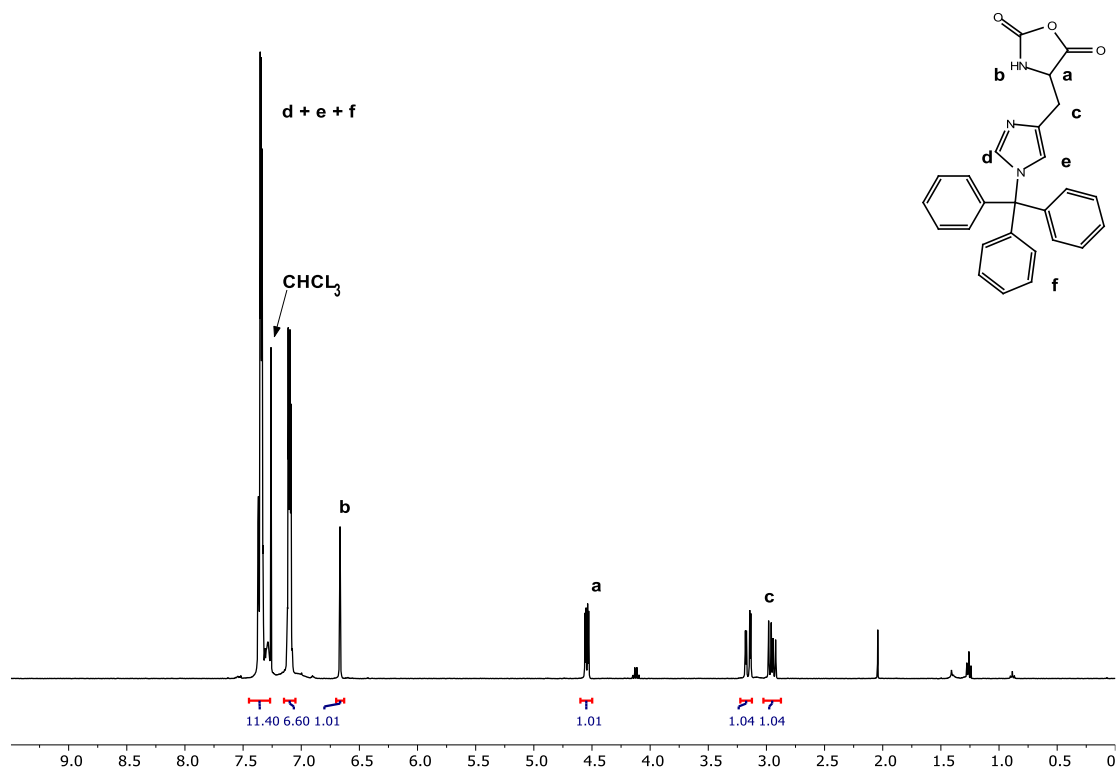
Εικόνα 19: Φασματοσκοπία IR για τα στάδια σύνθεσης του $N_{im}(trt)$ -L-His NCA. (α) Πρόδρομο αμινοξύ N_{im} -trt-HIS. (β) 1h μετά την προσθήκη $SOCl_2$. (γ) 3h μετά την προσθήκη $SOCl_2$. (δ) trt-HIS NCA·HCl. (ε) trt-HIS NCA

Η επιτυχής σύνθεση και η καθαρότητα του NCA πιστοποιήθηκε και με την τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού 1H -NMR. Οι κορυφές στα φάσματα των Σχημάτων 40 και 41 αντιστοιχούν ακριβώς στις μετατοπίσεις των πρωτονίων του μορίου του NCA, απόδειξη της επιτυχούς σύνθεσης του NCA.



Εικόνα 20: Φάσμα ¹H-NMR της N_{im}-trityl-(L)-His-NCA*HCl σε d₆-DMSO

¹H-NMR μετατοπίσεις των πρωτονίων του N_{im}-trityl-(L)-His NCA*HCl σε ppm (600MHz): 2.87-3.00 (c: CH₂), 4.66-4.71 (a: CH), 6.69 (b: NH), 7.00-7.45 (e: CH + f: C₆H₅), 8.90 (d: CH)



Εικόνα 21: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της Nim-trityl-(L)-His-NCA σε CDCl_3

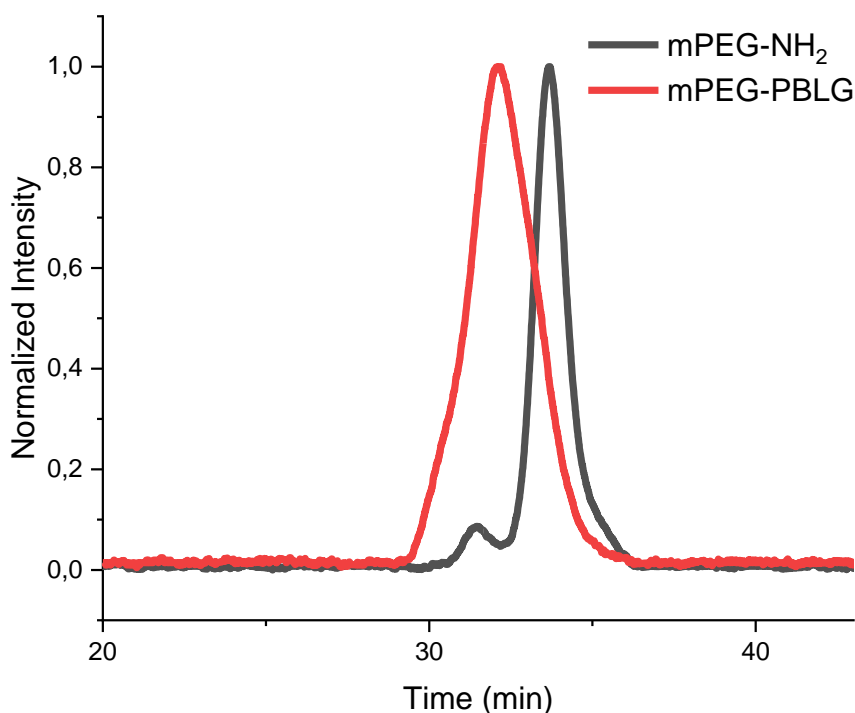
$^1\text{H-NMR}$ μετατοπίσεις των πρωτονίων του Nim-trityl-(L)-His NCA σε ppm (600MHz): 2.92-3.18 (c: CH_2), 4.53-4.55 (a: CH), 6.66 (b: NH), 7.28-7.37 (d: $\text{CH} + \text{e: CH} + \text{f: C}_6\text{H}_5$)

Εμφανής είναι η μετατόπιση της κορυφής (d), η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του ημιδαζολικού δακτυλίου που βρίσκεται σε γειτονική θέση με το άζωτο και η οποία οφείλεται στην απομάκρυνση του HCl .

13.3. Σύνθεση μακροαπαρχητών

Η σύνθεση μακροαπαρχητών με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα βήματα για τη σύνθεση πρότυπων αμφίφιλων συμπολυμερών. Το σημαντικότερο βήμα, όμως, εντοπίζεται στη σύνθεση του αμινο-τελικού άκρου. Η ποσοτική μετατροπή των ακραίων ομάδων των μακροαπαρχητών σε αμινο-τελικά αποτέλεσε μεγάλο μέρος της έρευνας της παρούσης διατριβής. Για τις εν λόγω μετατροπές ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές πορείες με εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Στην πρώτη περίπτωση έγινε μετατροπή της ακραίας ομάδας υδροξυλίου σε αμίνη, όπως αναφέρθηκε εκτενώς στο κεφάλαιο 10.1. Ο έλεγχος της μετατροπής έγινε με πιλοτικό πολυμερισμό του NCA του γ-βένζυλο γλουταμικού οξέος. Μέσω χρωματογραφήματος GPC εξάγεται το συμπέρασμα, ότι ο πολυμερισμός του NCA πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, καθώς η κορυφή του εκλουόμενου πολυμερούς εμφανίζεται σε μικρότερους χρόνους σε σχέση με του μακροαπαρχητή. Το σημαντικότερο όμως είναι, ότι δεν εμφανίζεται η κορυφή του μακροαπαρχητή στο χρωματογράφημα του δισυσταδικού συμπολυμερούς, το οποίο σημαίνει ότι όλες οι αλυσίδες του μακροαπαρχητή εκκίνησαν τον πολυμερισμό του NCA (Εικόνα 22).

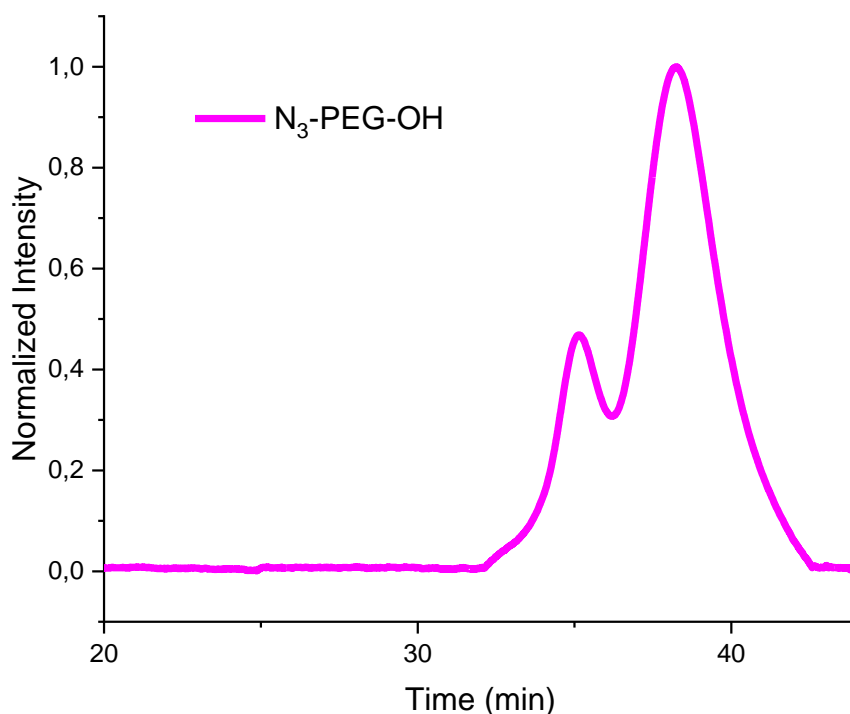


Εικόνα 22: Χρωματογράφημα SEC του mPEG-PBLG συγκριτικά με το μακροαπαρχητή mPEG-NH₂, σε φέρων διαλύτη DMF

Από τη στιγμή που η συνθετική πορεία για τη μετατροπή της ομάδας υδροξυλίου σε αμίνη κρίθηκε επιτυχής, το επόμενο βήμα ήταν η σύνθεση διδραστικών μακροαπαρχητών, ούτως ώστε να εισαχθεί η δραστική ομάδα στο τελικό δισυσταδικό συμπολυμερές. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε η τεχνική του

ανιοντικού πολυμερισμού για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών, με χρήση της 3-άζιδο-1-προπανόλης ως απαρχητή, ώστε το α-άκρο του μακροαπαρχητή να φέρει ομάδα αζιδίου ικανή να αντιδράσει με ένα αλκίνιο μέσω της χημείας “click”.

Η χρήση του απαρχητή της 3-άζιδο-1-προπανόλης, όπως διαπιστώθηκε πειραματικά αλλά και βιβλιογραφικά⁴⁷, παρουσιάζει κάποια απροσπέλαστα εμπόδια στη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών. Αρχικά, ο απαρχητής αυτός παρουσίασε ετερογένεια λίγες μέρες μετά τη σύνθεση του, καθιστώντας άγνωστη τη συγκέντρωση του κατά τον πολυμερισμό, με απρόβλεπτα αποτελέσματα για το μοριακό βάρος του πολυμερούς. Επίσης όπως φαίνεται από το χρωματογράφημα τα πολυμερή που συντέθηκαν με τη χρήση του συγκεκριμένου απαρχητή παρουσίασαν φαινόμενα διμερισμού (Εικόνα 23). Τα προβλήματα αυτά φαίνεται πως οφείλονται στην εξουδετέρωση του αζιδίου εξαιτίας της βάσης (κάλιο) που χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση του απαρχητή⁴⁷.

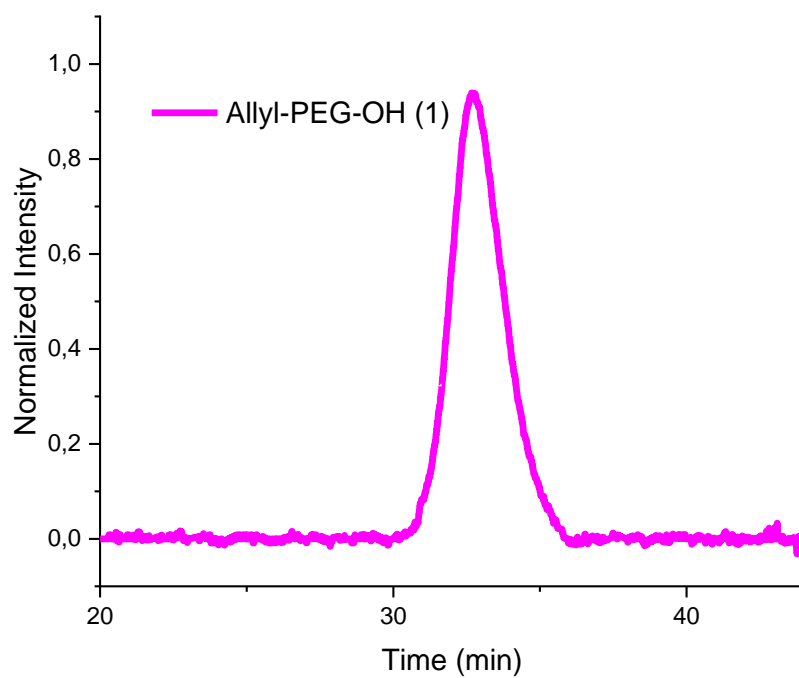


Εικόνα 23: Χρωματογράφημα SEC του N₃-PEG-OH, σε φέρων διαλύτη DMF, όπου φαίνεται η ύπαρξη διμερούς

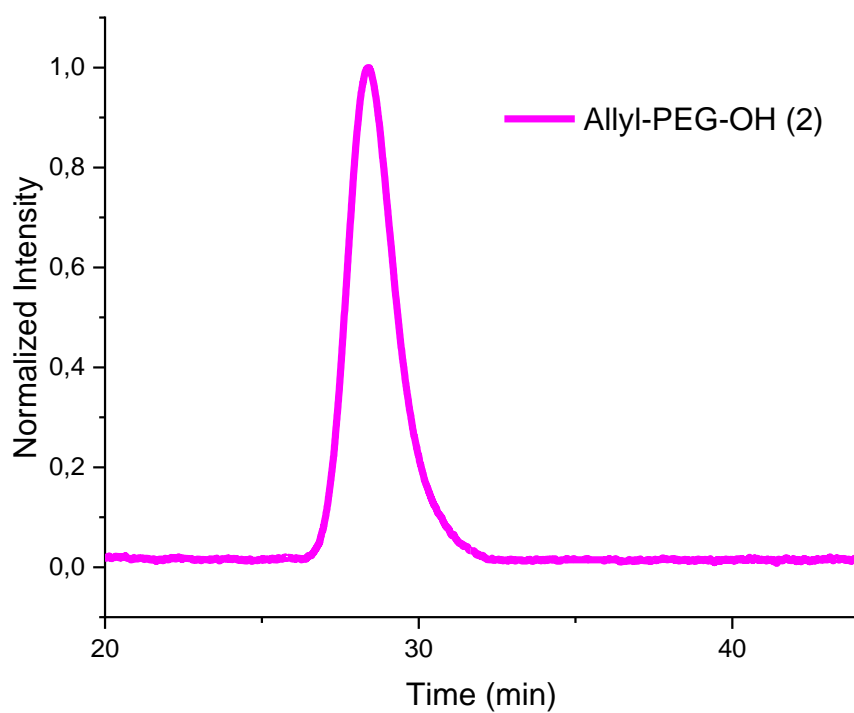
Για τους παραπάνω λόγους, κρίθηκε απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί διαφορετικός απαρχητής για τη σύνθεση των μακροαπαρχητών PEG. Ο απαρχητής που επιλέχθηκε ήταν η αλλυλική αλκοόλη, καθώς με τη ριζική προσθήκη μιας αμινοθειόλης μπορεί να δώσει το άμινο-τελικό άκρο που απαιτείται για τον πολυμερισμό των NCAs⁴⁹. Με τη χρήση του συγκεκριμένου απαρχητή συντέθηκαν πολυμερή PEG με μοριακά βάρη $M_n=3400\text{g/mol}$ και $M_n=6400\text{g/mol}$. Στον Πίνακα 4 παρατίθενται τα μοριακά χαρακτηριστικά τους όπως εξήχθησαν από την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών. Οι στενές κατανομές (<1.1) καθώς και το μοριακό τους βάρος, το οποίο αντιστοιχεί στο θεωρητικώς υπολογιζόμενο, καταδεικνύουν την επιτυχή σύνθεσή τους. Επίσης από τα χρωματογραφήματα (Εικόνες 24 και 25) δεν φαίνεται η ύπαρξη φαινομένων διμερισμού, ούτε φαινόμενα ανεπιθύμητων τερματισμών του πολυμερισμού, αφού η καμπύλη εμφανίζεται ισοσκελής.

Πίνακας 4: Μοριακά χαρακτηριστικά μακροαπαρχητών Allyl-PEG-OH

Δείγμα	M_n (g/mol)	Polydispersity
Allyl-PEG-OH (1)	3500	1.05
Allyl-PEG-OH (2)	6500	1.03

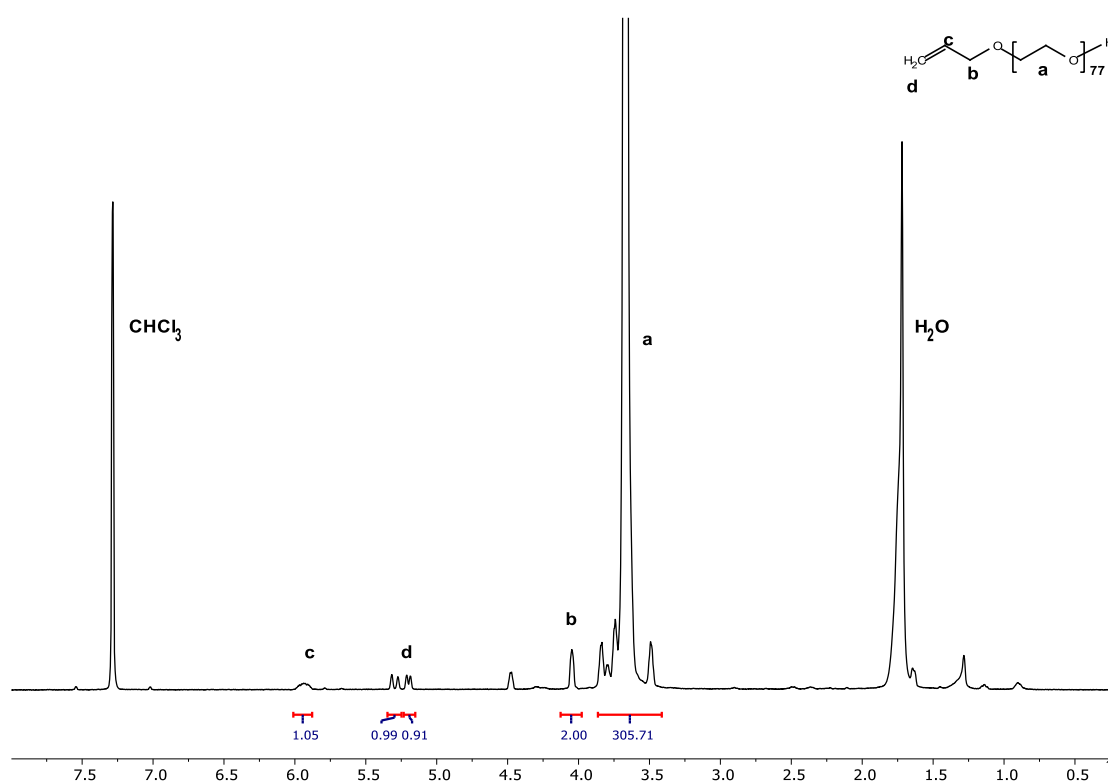


Εικόνα 24: Χρωματογράφημα GPC του Allyl-PEG-OH, $M_n=3300$ g/mol, σε φέροντα διαλύτη DMF



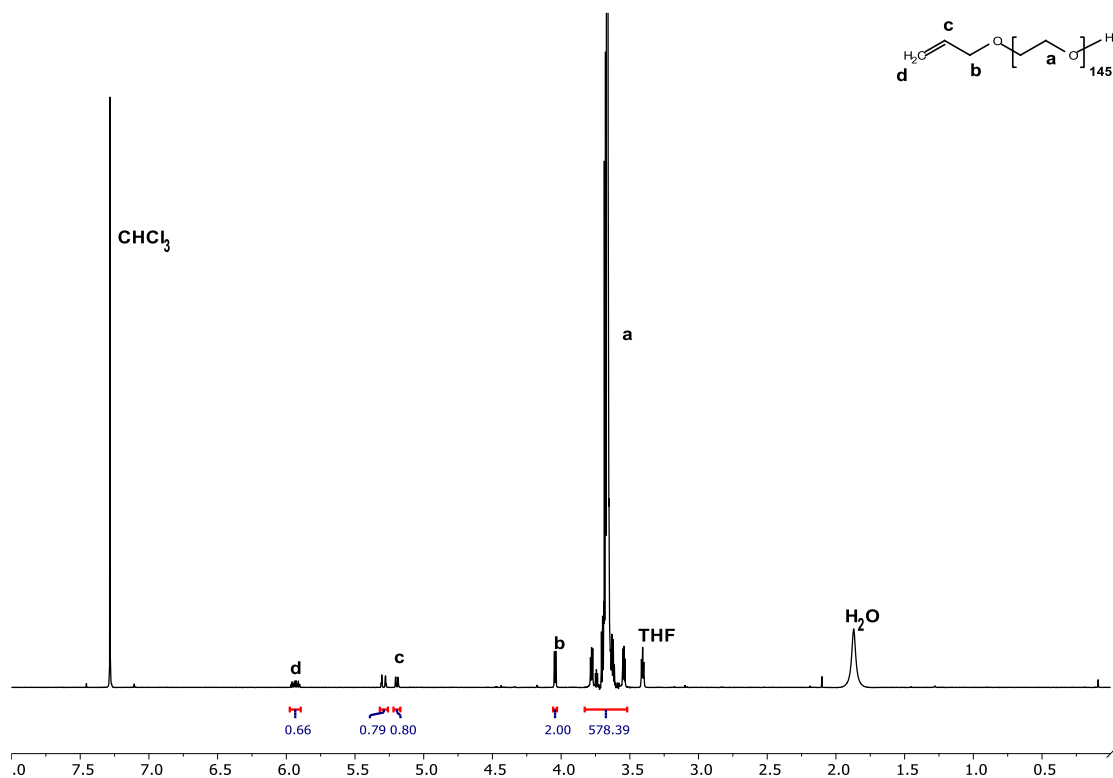
Εικόνα 25: Χρωματογράφημα GPC του Allyl-PEG-OH, $M_n=6700$ g/mol, σε φέροντα διαλύτη DMF

Μια ακόμα τεχνική, που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των μοριακών χαρακτηριστικών των πολυμερών αυτών, είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$. Από τα φάσματα των σχημάτων διακρίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των πολυμερών, καθώς και στα πρωτόνια που αντιστοιχούν στον απαρχητή του πολυμερισμού, αλλυλική αλκοόλη. Από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ σε συνδυασμό με τα χρωματογραφήματα GPC μπορούν επίσης να εξαχθούν συμπεράσματα για το μοριακό βάρος των πολυμερών.



Εικόνα 26: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μακροαπαρχητή allyl-PEG-OH ($M_n=3400\text{g/mol}$) σε CDCl_3

$^1\text{H-NMR}$ μετατοπίσεις των πρωτονίων του μακροαπαρχητή allyl-PEG-OH ($M_n=3400\text{g/mol}$) σε ppm (600MHz): 3.66 (a: $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 4.04 (b: $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ of allyl group), 5.18-5.31 (d: $=\underline{\text{C}}\text{H}_2$ of allyl group), 5.90-5.96 (c: $\underline{\text{C}}\text{H}$ of allyl group)



Εικόνα 27: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μακροαπαρχητή allyl-PEG-OH ($M_n=6400\text{g/mol}$) σε CDCl_3

$^1\text{H-NMR}$ μετατοπίσεις των πρωτονίων του μακροαπαρχητή allyl-PEG-OH ($M_n=6400\text{g/mol}$) σε ppm (600MHz): 3.66 (a: $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 4.04 (b: CH_2 of allyl group), 5.18-5.31 (d: $=\text{CH}_2$ of allyl group), 5.90-5.96 (c: CH of allyl group)

Όπως γίνεται αντιληπτό από τις ολοκληρώσεις των κορυφών, και για τα δύο φάσματα, συγκρίνοντας την κορυφή που αντιστοιχεί στις μετατοπίσεις των πρωτονίων του PEG και αυτές της άλλυλο-ομάδας, προκύπτει ότι το μοριακό βάρος για το πρώτο είναι 3200 g/mol και για το δεύτερο είναι 6400 g/mol.

Να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν ενδείκνυται για τον υπολογισμό μοριακών βαρών στα πολυμερή, ιδίως μεγάλου μοριακού βάρους, καθώς με μια μικρή διαφοροποίηση στην ολοκλήρωση των κορυφών, μπορούν να αλλάξουν σε μεγάλο βαθμό τα αποτελέσματα. Παρόλα αυτά παραμένει μια πολύ χρήσιμη και αξιόπιστη μέθοδος για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό των πολυμερών.

13.4. Εισαγωγή βιομορίων στο ω-άκρο των μακροαπαρρητών

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η σύνθεση πρότυπων υλικών, τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντικαρκινικών φαρμάκων εξαλείφοντας έτσι ανεπιθύμητες παρενέργειες, που προκαλούνται από την απευθείας χορήγηση του φαρμάκου στον ασθενή. Το πρώτο βήμα για τη σύνθεση τέτοιων υλικών ήταν επιλογή pH-αποκρίσιμων πολυμερών, τα οποία σε φυσιολογικό pH θα σχηματίζουν μικυλλιακές δομές, ενώ σε τιμές pH που συναντώνται στα καρκινικά κύτταρα, θα χάνουν τη δομή τους.

Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να ελεγχθεί η στοχευμένη αποδέσμευση της φαρμακευτικής ουσίας τοπικά στα καρκινικά κύτταρα. Ένα μεγάλο όμως πρόβλημα, που κρίνεται απαραίτητο να λυθεί, είναι ο εντοπισμός των καρκινικών κυττάρων από τα νανοσωματίδια αυτά. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν βιομόρια, τα οποία λειτουργούν ως ομάδες στοχευτές κατά των καρκινικών κυττάρων. Τα βιομόρια αυτά μπορούν να εντοπίζουν τα καρκινικά κύτταρα και να προσκολλώνται σε αυτά, δημιουργώντας έτσι ιδανικότερες συνθήκες για την ελεγχόμενη αποδέσμευση του φαρμάκου. Κρίνεται λοιπόν καίρια η παρουσία τέτοιων μορίων σε ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων.

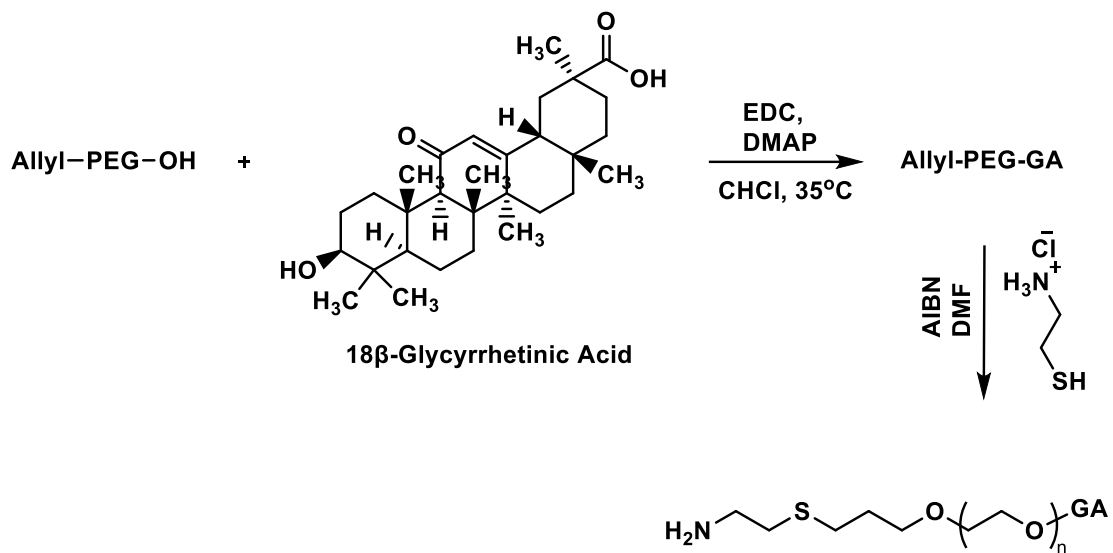
Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο η εισαγωγή των βιομορίων έγινε με τη χρήση της χημείας “click” και μέσω εστεροποίησης. Συγκρίνοντας τις δύο αυτές πορείες, τελικά προτιμήθηκε η μέθοδος της εστεροποίησης με τη χρήση του 18β-γλυκυρρητινικού οξέος ως δραστική ομάδα. Ο κυριότερος λόγος που προτιμήθηκε η συγκεκριμένη ομάδα έχει να κάνει με τη διαλυτότητα του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEG-PHis. Εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητας της PHis σε όλους τους οργανικούς διαλύτες η εισαγωγή του βιομορίου πρέπει να γίνει πριν το πολυμερισμό της Ιστιδίνης.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να γίνει κατανοητό ότι το 18β-γλυκυρρητινικό οξύ παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι του φολικού οξέος. Το πρώτο βασικό πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι η διαλυτότητα του φολικού οξέος το οποίο είναι μερικώς διαλυτό σε διαλύτη DMF ενώ έχει πολύ μεγάλη διαλυτότητα σε DMSO. Οι υπόλοιποι κοινοί διαλύτες δεν είναι ικανοί να

το διαλυτοποιήσουν. Αντίθετα το 18β-γλυκυρρητινικό οξύ παρουσιάζει μεγάλη διαλυτότητα στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες (DMF, CHCl₃, CH₂Cl₂).

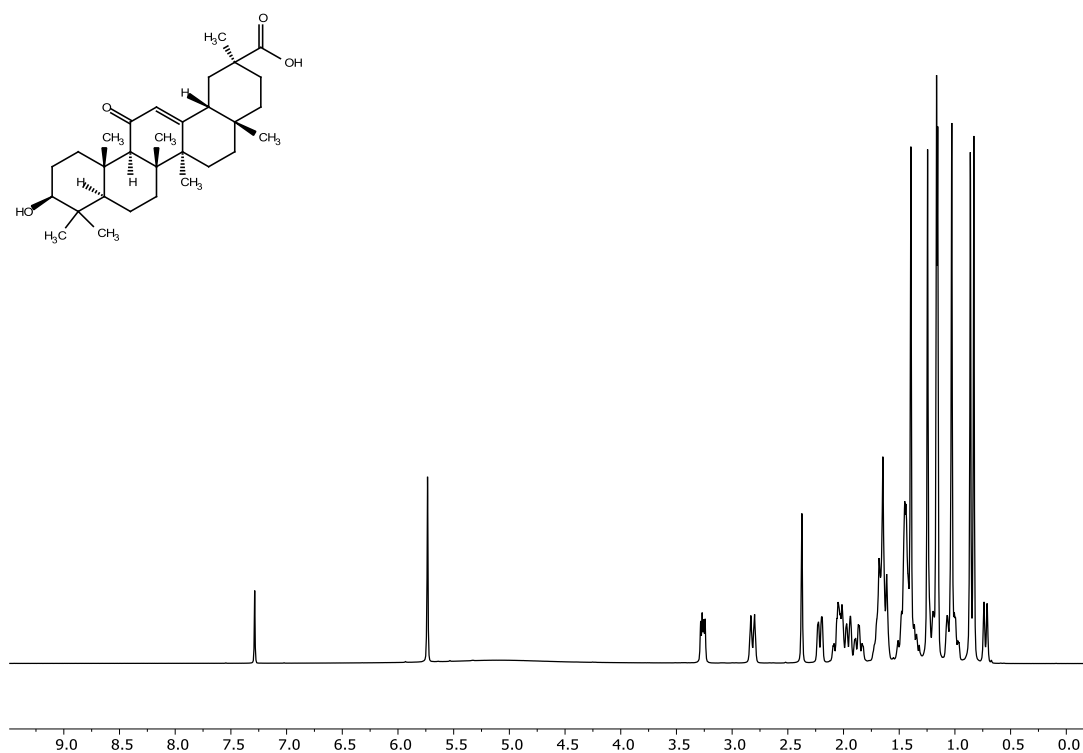
Το σημαντικότερο όμως πρόβλημα έγκειται στην παρουσία των αμινών που βρίσκονται στο φολικό οξύ, οι οποίες είναι ικανές να εκκινήσουν τον πολυμερισμό των NCAs. Συνεπώς η ασφαλέστερη λύση για την επιτυχή σύνθεση των τελικών αμφίφιλων συμπολυμερών, αποτελεί το 18β-γλυκυρρητινικό οξύ. Το επόμενο δίλημμα που πρέπει να απαντηθεί είναι ο τρόπος με τον οποίο θα γίνει η σύζευξη της δραστικής ομάδας με τον μακροαπαρχητή δηλαδή αν θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της click χημείας ή αν θα πρέπει να βρεθεί κάποια άλλη μέθοδος. Σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν σε προηγούμενα κεφάλαια η click χημεία παρουσιάζει ορισμένα πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς έχει υψηλές αποδόσεις, τα προϊόντα της είναι πολύ σταθερά και είναι σχετικά γρήγορη μέθοδος. Παρ' όλα αυτά η χρήση του χαλκού σε βιολογικά συστήματα αντενδείκνυται, καθώς ο χαλκός παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα. Επίσης λόγω της ύπαρξης ακραίας υδροξυλομάδας στο 18β-γλυκυρρητινικό οξύ, δεν μπορεί να γίνει η σύζευξη σε πολυμερή του τύπου N₃-PEG-OH, αφού κατά τη διαδικασία της μετατροπής της ακραίας υδροξυλομάδας του μακροαπαρχητή σε αμίνη, θα γίνει το ίδιο και σε αυτή του 18β-γλυκυρρητινικού οξέος.

Για τους λόγους αυτούς επιλέχθηκε να γίνει η σύζευξη μέσω εστεροποίησης, σε πολυμερές του τύπου allyl-PEG-OH, όπου η άλλυλο-ομάδα στη συνέχεια με μία ριζική αναγωγή μέσω μιας αμινοθειόλης θα μετατραπεί σε αμίνη. Τα αποτελέσματα από τη συγκεκριμένη προσέγγιση παρουσιάζονται στα παρακάτω φάσματα ¹H-NMR.

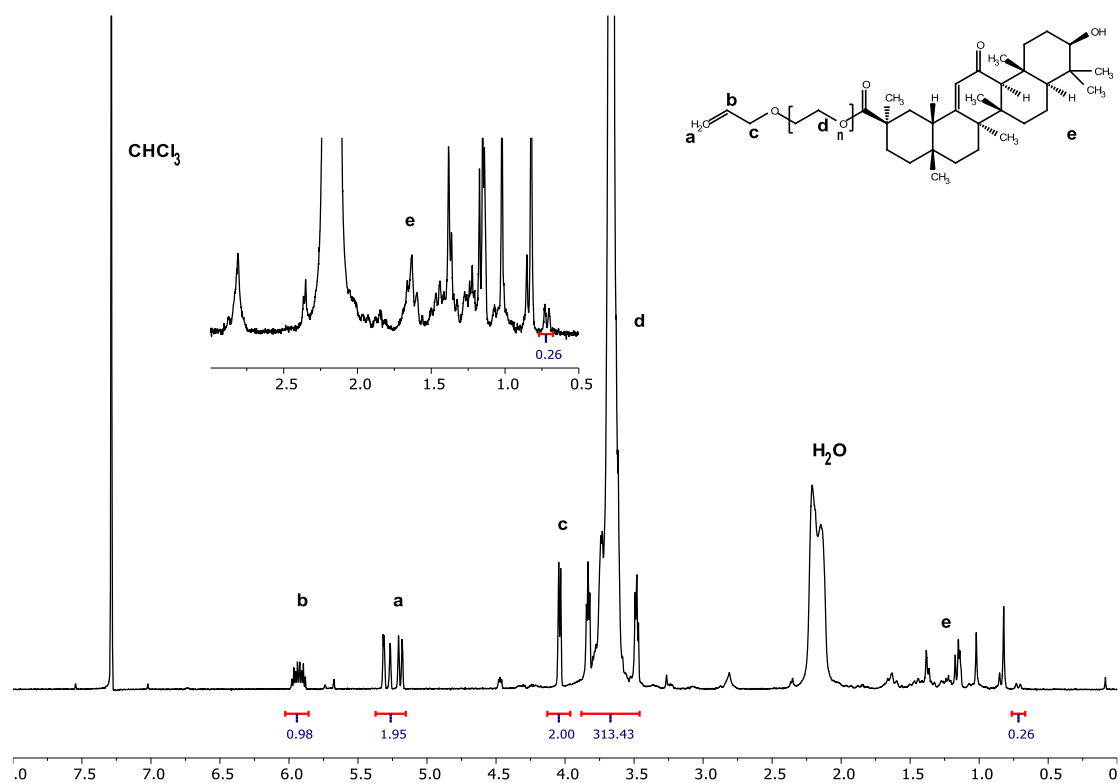


Σχήμα 25: Σύνθεση μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂

Αρχικά παρουσιάζεται το φάσμα ¹H-NMR για το 18β-γλυκυρρητινικό οξύ και στη συνέχεια τα φάσματα όπου είναι προσκολλημένο στον μακροαπαρχητή.

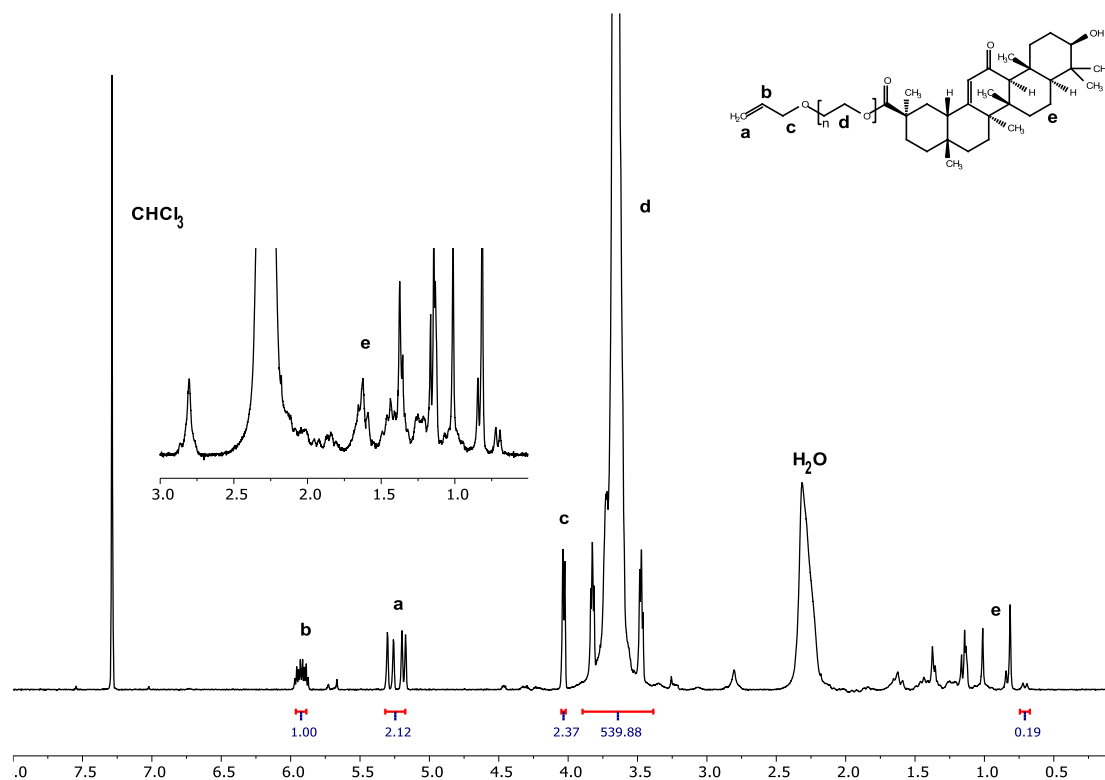


Εικόνα 28: Φάσμα ¹H-NMR του 18β-glycyrrhetic acid σε CDCl₃



Εικόνα 29: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του Allyl-PEG-GA 3400 g/mol ($n=77$) με έμφαση στις κορυφές του GA σε CDCl_3

$^1\text{H-NMR}$ μετατοπίσεις των πρωτονίων του μακροαπαρχητή allyl-PEG-GA ($M_n=3400\text{g/mol}$) σε ppm (600MHz): 5.15-5.37 (a: CH_2), 5.85-6.02 (b: CH), 3.96-4.12 (c: CH_2), 3.45-3.88 (d: O- CH_2 - CH_2), 0.67-2.8 (e: GA)



Εικόνα 30: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του Allyl-PEG-GA 6400 g/mol ($n=145$) με έμφαση στις κορυφές του GA σε CDCl_3

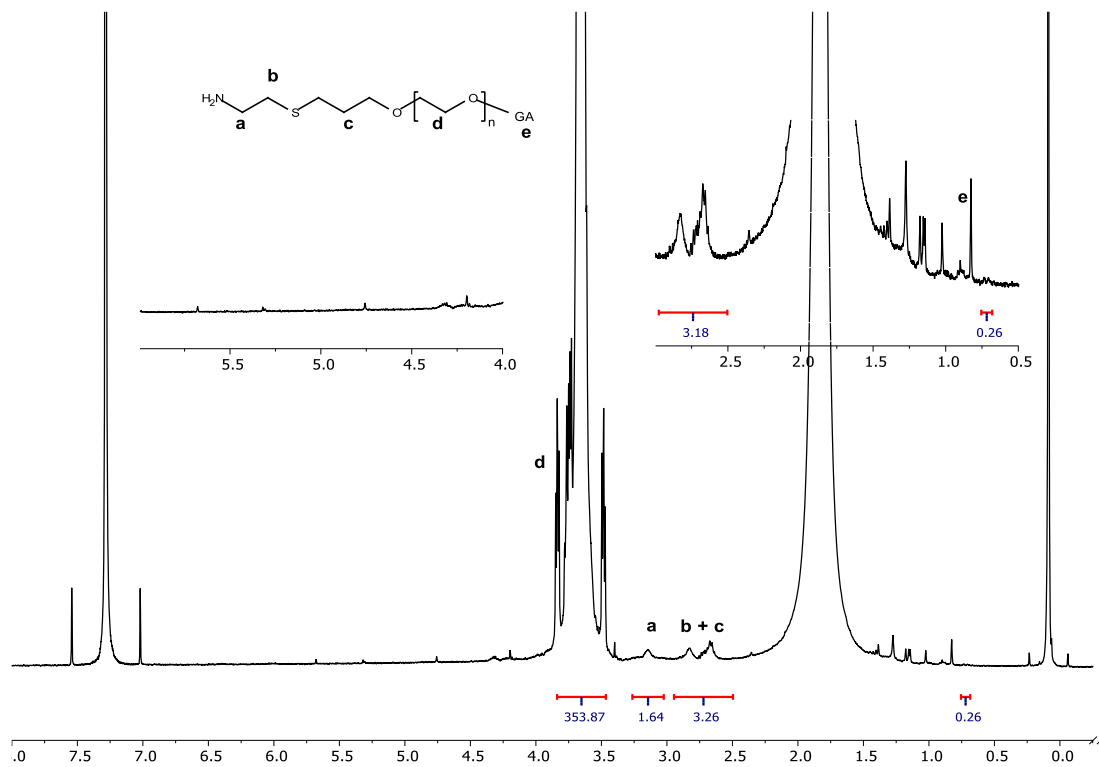
$^1\text{H-NMR}$ μετατοπίσεις των πρωτονίων του μακροαπαρρητή allyl-PEG-GA ($M_n=6400\text{g/mol}$) σε ppm (600MHz): 5.15-5.37 (a: CH_2), 5.85-6.02 (b: CH), 3.96-4.12 (c: CH_2), 3.45-3.88 (d: O- CH_2 - CH_2), 0.67-2.8 (e: GA)

Παρατηρείται ότι ορισμένες κορυφές του 18β-γλυκυρρητινικού οξέος, υπερκαλύπτονται από την υγρασία που υπάρχει στον δευτεριωμένο διαλύτη. Για αυτό το λόγο καθίσταται αδύνατο να υπολογιστεί η απόδοση της αντίδρασης με ακρίβεια. Επιπλέον οι μετατοπίσεις που αφορούν το GA, αντιστοιχούν σε ένα πολύ μικρό ποσοστό σε σχέση με αυτές των πρωτονίων του πολυμερούς. Συνεπώς οι ολοκληρώσεις έχουν και αυτές μεγάλο ποσοστό σφάλματος. Παρόλα αυτά, προσεγγιστικά, μπορεί έστω και έτσι να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για την αντίδραση. Σύμφωνα λοιπόν με τις ολοκληρώσεις, το ποσοστό της δραστικής ομάδας, που έχει συζευχθεί με το allyl-PEG-OH $M_n=3.400\text{ g/mol}$ και allyl-PEG-OH $M_n=6400\text{ g/mol}$, είναι της τάξης του 25%.

Το συγκεκριμένο συμπέρασμα πάντως δεν αποτελεί τροχοπέδη στη σύνθεση των αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών. Αν μη τι άλλο για τη χρήση των συγκεκριμένων πολυμερών ως έξυπνα υλικά που θα μεταφέρουν στοχευμένα τη φαρμακευτική ουσία σε καρκινικά κύτταρα, δεν απαιτεί την ισομοριακή ποσότητα της δραστικής ομάδας σε κάθε μακρομόριο.

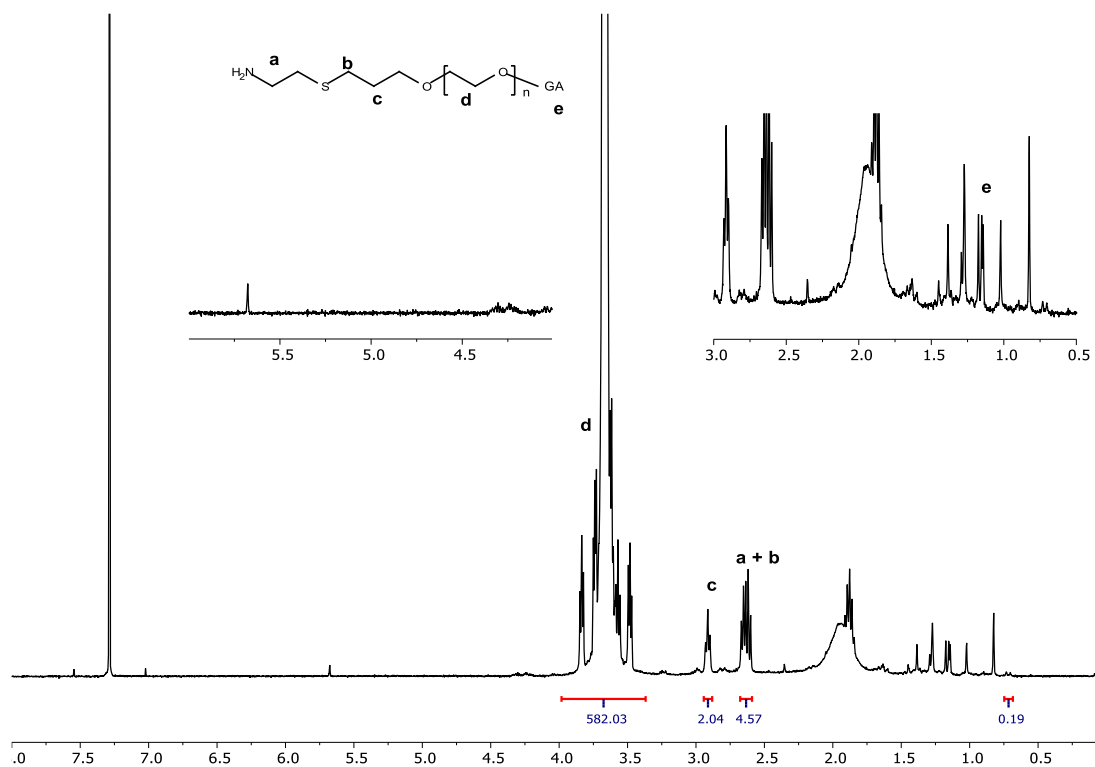
13.5. Σύνθεση υβριδικών δισυσταδικών συμπολυμερών

Για τη σύνθεση των υβριδικών συμπολυμερών του τύπου PEG-PHis, με τη μέθοδο του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου, απαιτείται ένα πυρηνόφιλο προκειμένου να εκκινήσει ο πολυμερισμός των NCAs της Ιστιδίνης. Αυτό επετεύχθη με τη μετατροπή της άλλυλο-ομάδας του PEG σε αμινο-ομάδα με τη ριζική προσθήκη της 2-άμινο-αιθαναιθιόλης. Από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ που παρουσιάζονται στις Εικόνες 31 και 32 παρατηρείται η εξάλειψη των κορυφών που αντιστοιχούν στις μετατοπίσεις των πρωτονίων της άλλυλο-ομάδας, κάτι που αποδεικνύει την επιτυχή εισαγωγή της αμινομάδας μέσω της αντίδρασης ριζικής προσθήκης. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό της, καθώς οι μετατοπίσεις των πρωτονίων από την 2-άμινο-αιθαναιθιόλη αλληλεπικαλύπτονται από τις κορυφές του GA. Σημαντικό είναι βεβαίως ότι οι κορυφές του GA εμφανίζονται στα φάσματα αυτά με αντίστοιχες ολοκληρώσεις με αυτές των φασμάτων πριν την τροποποίηση της άλλυλο-ομάδας.



Εικόνα 31: Φάσμα ¹H-NMR του GA-PEG-NH₂ M_n=3400 g/mol (n=77)

¹H-NMR μετατοπίσεις των πρωτονίων του μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ (M_n=3400g/mol) σε ppm (600MHz): 3.14 (a: CH₂), 2.82 (b: CH₂), 2.67 (c: CH₂), 3.45-3.88 (d: O-CH₂-CH₂), 0.67-2.8 (e: GA)



Εικόνα 32: Φάσμα ¹H-NMR του GA-PEG-NH₂ Mn=6400 g/mol (n=145)

¹H-NMR μετατοπίσεις των πρωτονίων του μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ (M_n=6400g/mol) σε ppm (600MHz): 3.14 (a: CH₂), 2.82 (b: CH₂), 2.67 (c: CH₂), 3.45-3.88 (d: O-CH₂-CH₂), 0.67-2.8 (e: GA)

Η σύνθεση των αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών έγινε με τη μέθοδο του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs των α-αμινοξέων. Με τη μέθοδο αυτή έχει συντεθεί ένας μεγάλος αριθμός πολυπεπτιδίων με καλά μοριακά χαρακτηριστικά (Μοριακό Βάρος, Κατανομή Μοριακών Βαρών). Η φαινομενικά επιτυχημένη εισαγωγή της αμινομάδας στον πολυμερές allyl-PEG-GA και τη μετατροπή του σε GA-PEG-NH₂, οδήγησε στη χρησιμοποίηση των πολυμερών αυτών ως μακροαπαρχητές για τη σύνθεση δισυσταδικών συμπολυμερών ιστιδίνης. Στον Πίνακα 6 που ακολουθεί, παρατίθενται τα μοριακά χαρακτηριστικά των συμπολυμερών που συντέθηκαν με μακροαπαρχητή το GA-PEG-NH₂. Οι μετρήσεις έγιναν σε χρωματογραφία με φέροντα διαλύτη H₂O 79.9%, MeCN 20% και TFA 0.1% ούτως ώστε το pH να είναι όξινο και να διαλυτοποιούνται τα συμπολυμερή που συντέθηκαν.

Από τα χρωματογραφήματα GPC μπορούν να εξαχθούν αρκετά χρήσιμα συμπεράσματα, κυρίως ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των πολυμερών αυτών. Φαίνεται αρχικά ότι τα εκλουόμενα συμπολυμερή εμφανίζονται σε μικρότερους χρόνους από ότι οι μακροαπαρχητές, συνεπώς υπάρχει η ένδειξη ότι πολυμερισμός πραγματοποιήθηκε επιτυχώς. Πάρα ταύτα δεν μπορεί να υπολογιστεί το ακριβές μοριακό βάρος, καθώς η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί μη απόλυτη μέθοδο χαρακτηρισμού και απαιτεί βαθμονόμηση με πρότυπα πολυμερή, τα οποία δεν είναι δυνατό να προμηθευτούν.

Πίνακας 5: Μοριακά χαρακτηριστικά μακροαπαρχητών GA-PEG-NH₂ και συμπολυμερών GA-PEG-Phis μέσω SEC με φέρων διαλύτη μίγμα 79.9% H₂O, 20% MeCN, 0.1% TFA

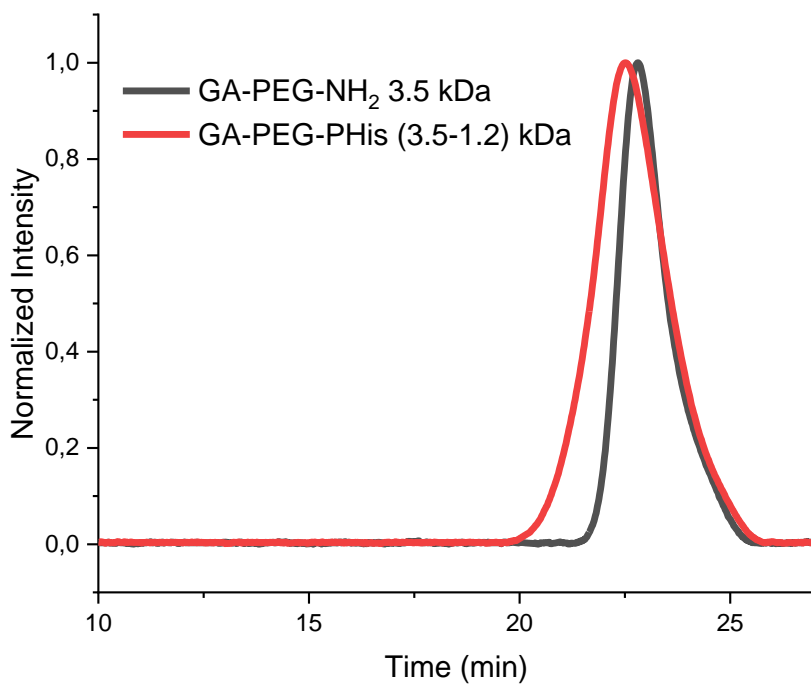
Δείγμα	Mn (g/mol)	Polydispersity
GA-PEG-NH ₂ (1)	2200	1.98
GA-PEG-Phis (1.1)	3000	3.14
GA-PEG-Phis (1.2)	4100	3.19
GA-PEG-NH ₂ (2)	7800	1.84
GA-PEG-Phis (2.1)	7000	2.42
GA-PEG-Phis (2.2)	7400	2.86

Το πρώτο στοιχείο που προκαλεί ενδιαφέρον, είναι οι κατανομές οι οποίες είναι πολύ μεγαλύτερες του 1.1, ακόμα και για τους μακροαπαρχητές που συντέθηκαν με τη μέθοδο του ανιοντικού πολυμερισμού, όπου με τη χρωματογραφία με φέροντα διαλύτη DMF οι κατανομές μοριακών βαρών βρέθηκαν πολύ μικρές (<1.1). Συνυπολογίζοντας το γεγονός, ότι, ειδικά για το PEG μικρού μοριακού βάρους, οι στήλες δεν κάνουν καλό διαχωρισμό και μάλιστα το μοριακό βάρος υπολογίζεται εκτός της καμπύλης βαθμονόμησης, το

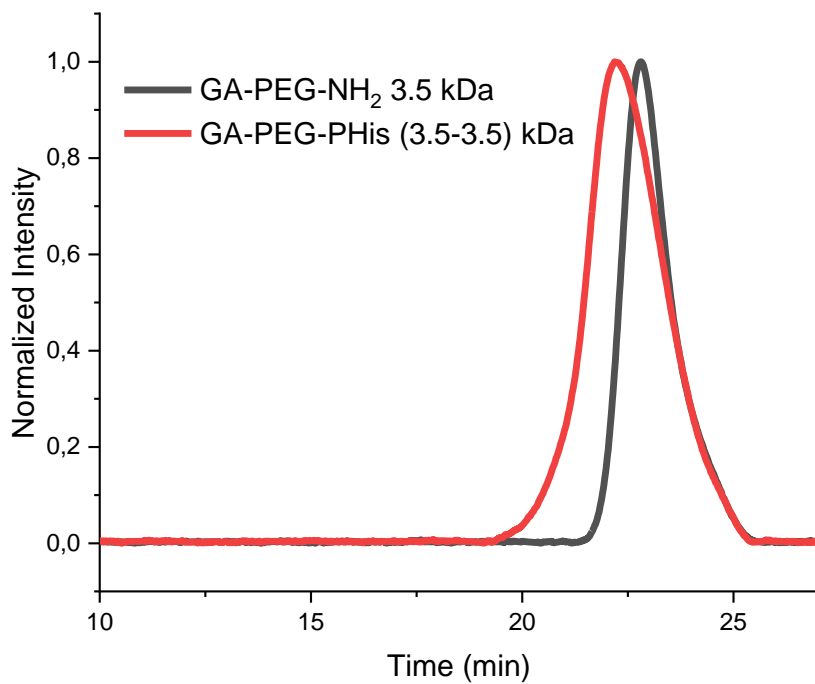
αναμενόμενο αποτέλεσμα θα ήταν μία κατανομή που θα έτεινε στη μονάδα. Αντιθέτως, το αποτέλεσμα που λαμβάνεται είναι η κατανομή $I=1.98$ για το GA-PEG-NH₂ (1) και $I=1.84$ για το GA-PEG-NH₂ (2). Η μόνη εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι οι μεγάλες αυτές κατανομές οφείλονται σε μερική κατακράτηση των πολυμερών, λόγω αλληλεπίδρασης των αμινομάδων που φέρουν τα πολυμερή με τις στήλες της χρωματογραφίας.

Ένα ακόμα ενδιαφέρον αποτέλεσμα είναι το φαινομενικό μοριακό βάρος του μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ (1), το οποίο είναι αρκετά μικρότερο από το θεωρητικώς υπολογισμένο και μετρημένο με χρωματογραφία με φέροντα διαλύτη DMF, αλλά και με φασματοσκοπία ¹H-NMR. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα οφείλεται στο γεγονός ότι το πολυμερές αυτό βρίσκεται στα όρια της καμπύλης βαθμονόμησης του χρωματογράφου με αποτέλεσμα να μη λαμβάνονται έγκυρες πληροφορίες σε αυτή την περιοχή μοριακών βαρών. Ο ισχυρισμός αυτός επαληθεύεται για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ (2), ο οποίος βρίσκεται εντός ορίων της καμπύλης βαθμονόμησης και συμπίπτει με τις προηγούμενες μετρήσεις και το θεωρητικώς υπολογισμένο μοριακό βάρος.

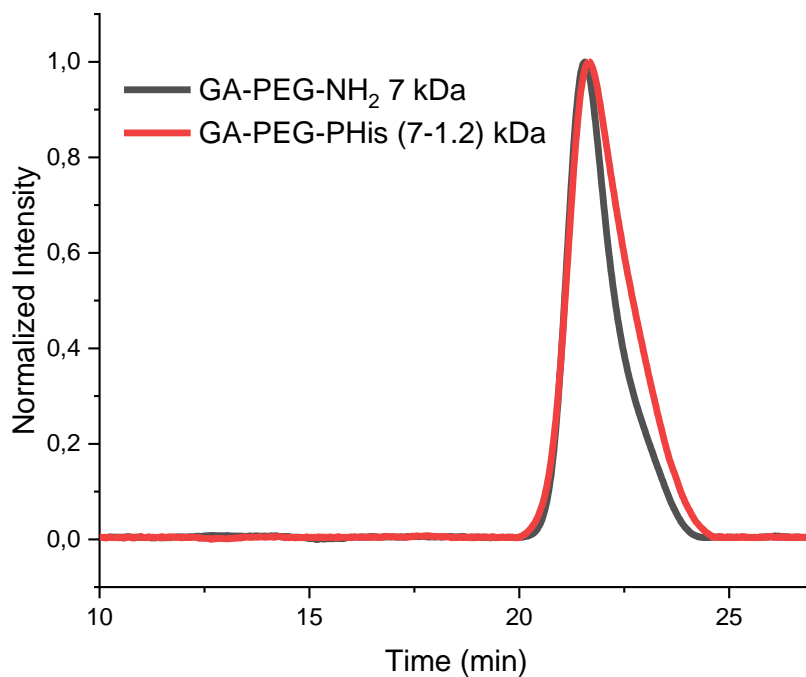
Τέλος παρατηρείται, μικρή διαφοροποίηση στα συμπολυμερή που συντέθηκαν με τους εν λόγω μακροαπαρχητές, όπως φαίνεται και στα χρωματογραφήματα των σχημάτων που ακολουθούν. Η εξήγηση για το φαινόμενο αυτό θα γίνει περισσότερο κατανοητή στο επόμενο κεφάλαιο που ασχολείται με τη μελέτη συσσωμάτωσης των πολυμερών αυτών. Συνοπτικά, τα συμπολυμερή του τύπου GA-PEG-PH_{is}, δημιουργούν συσσωματώματα, με αποτέλεσμα ο υδροδυναμικός όγκος των πολυμερών να είναι πολύ μικρότερος από αυτόν που θα δημιουργούταν αν τα πολυμερή βρίσκονταν σε κατάσταση πλήρους διαλυτοποίησης στον εκάστοτε διαλύτη.



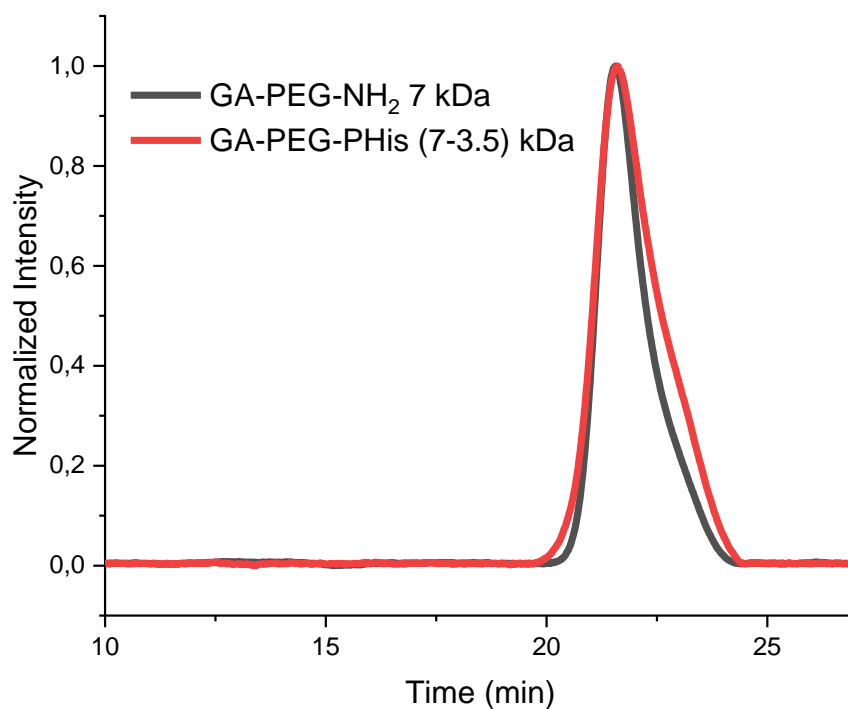
Εικόνα 33: Χρωματογραφία SEC για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ 3400 g/mol και το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 3400-900 g/mol



Εικόνα 34: Χρωματογραφία SEC για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ 3400 g/mol και το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 3400-3100 g/mol



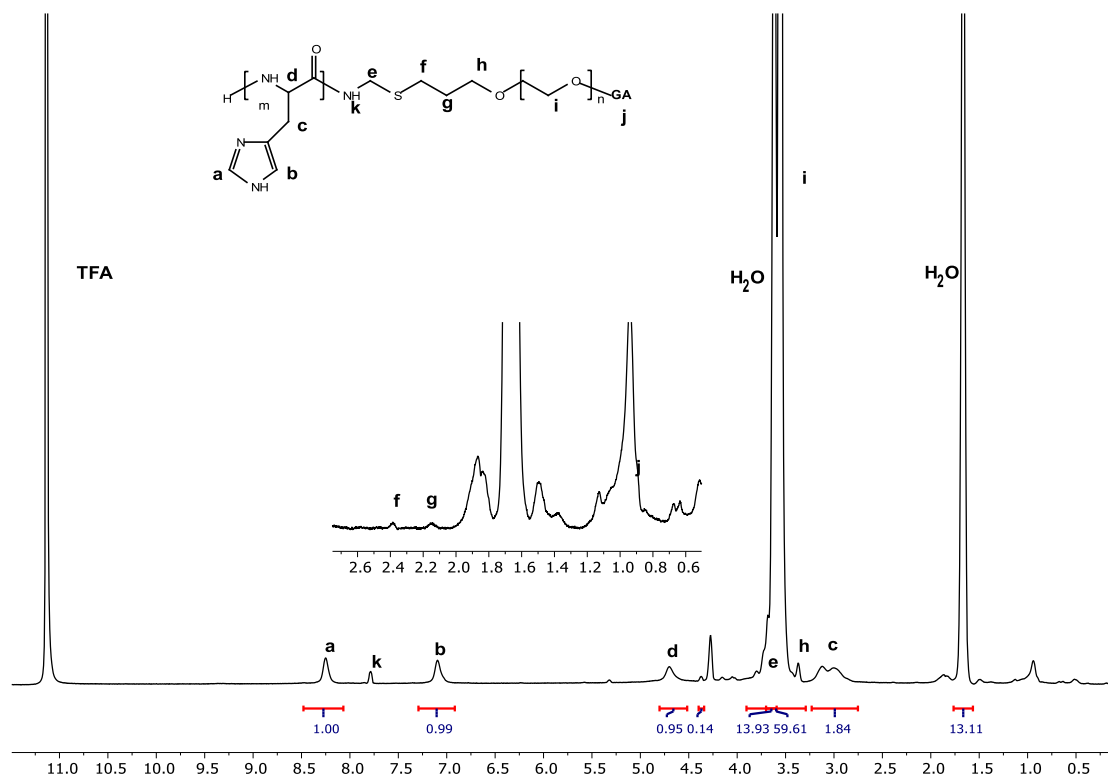
Εικόνα 35: Χρωματογραφία SEC για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ 6400 g/mol και το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 6400-1100 g/mol



Εικόνα 36: Χρωματογραφία SEC για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ 6400 g/mol και το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 6400-3200 g/mol

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παρατηρείται πολύ μικρή μετατόπιση των κορυφών των εκλούμενων συμπολυμερών σε σχέση με τους μακροαπαρχητές τους, ενώ στην περίπτωση των συμπολυμερών GA-PEG-NH₂ (2.1) και GA-PEG-NH₂ (2.2) παρατηρείται μέχρι και μετατόπιση σε μεγαλύτερους χρόνους (μικρότερα μοριακά βάρη). Τέλος παρατηρείται διεύρυνση των κορυφών, άρα αύξηση της κατανομής μοριακών βαρών, το οποίο είναι απολύτως φυσιολογικό, καθώς ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου δεν αποτελεί μέθοδο πολυμερισμού, όπου προκύπτουν πολυμερή με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά, όπως ο ανιοντικός πολυμερισμός. Ο συνδυασμός των δύο αυτών αποτελεσμάτων προκαλεί επίσης προβληματισμό σχετικά με την ύπαρξη αλυσίδων μακροαπαρχητή που δεν εκκίνησαν τον ROP. Όπως φαίνεται από τα χρωματογραφήματα, η καμπύλη που αντιστοιχεί στο συμπολυμερές, υπερκαλύπτει αυτή του μακροαπαρχητή, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για την πορεία του πολυμερισμού. Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων δεν αποτελούν κριτήριο για ασφαλή συμπεράσματα ως προς τα μοριακά βάρη των συμπολυμερών και την κατανομή των μοριακών βαρών τους.

Περαιτέρω χαρακτηρισμός όσον αφορά το μοριακό βάρος των συμπολυμερών αλλά και τον επιτυχή πολυμερισμό της δεύτερης συστάδας, πραγματοποιήθηκε με τη φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού πρωτονίου (¹H-NMR). Από τις ολοκληρώσεις των κορυφών, που αντιστοιχούν στις δονήσεις των πρωτονίων και σε συνδυασμό με τα φάσματα που ελήφθησαν μετά την αντίδραση της ριζικής προσθήκης της 2-αμινο-αιθανεθιόλης (Εικόνα 31, 32), μπορούν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για τις αναλογίες της μίας συστάδας ως προς την άλλη και άρα το συνολικό μοριακό βάρος του πολυμερούς.

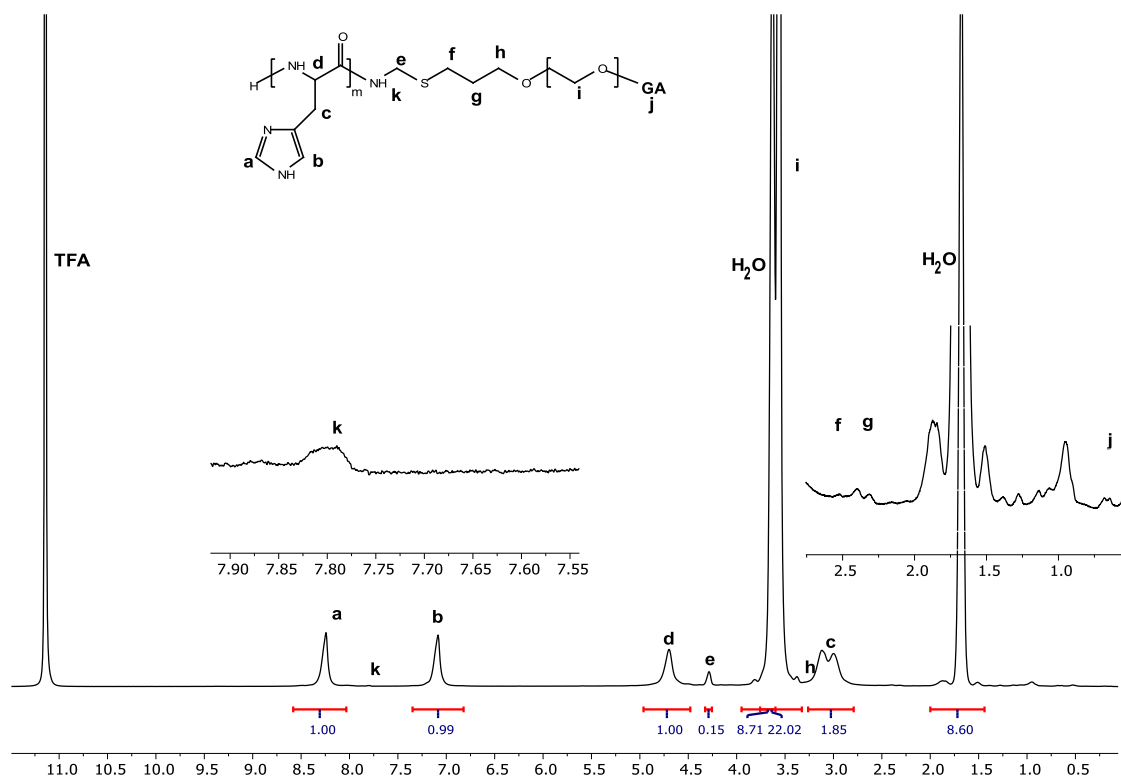


**Εικόνα 37: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis
Mn = 3400-900 g/mol**

$^1\text{H-NMR}$ μετατοπίσεις των πρωτονίων του του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis (Mn=3400-900 g/mol) σε ppm (600MHz): 8.06-8.47 (a: CH), 6.91-7.29 (b: CH), 2.75-3.23 (c: CH_2), 4.51-4.79 (d: CH), 4.33-4.39 (e: CH_2), 2.35-2.42 (f: CH_2), 2.09-2.19 (g: CH_2), 3.29 (h: CH_2), 3.36-3.81 (i: $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$), 0.43-0.59 (j: GA), 7.75-7.81 (k: NH)

Σύμφωνα με το φάσμα της Εικόνας 37, για το πολυμερές GA-PEG-PHis Mn = 3400-900 g/mol, μπορεί να γίνει υπολογισμός του μοριακού βάρους της συστάδας της PHis, αφού είναι γνωστό το Mn του PEG. Προκύπτει ότι η συστάδα της PHis έχει Mn = 900, το οποίο βρίσκεται σε μερική αντιστοιχία με το μοριακό βάρος που υπολογίστηκε θεωρητικά. Εν συνεχεία γίνεται αποτίμηση των κορυφών, οι οποίες βρίσκονται σε πλήρη αντιστοιχία με τα πρωτόνια του συμπολυμερούς. Έμφαση δίνεται στην περιοχή 0.5 - 2.8 ppm, όπου αντιστοιχεί στις μετατοπίσεις των πρωτονίων του GA. Παρατηρείται μία, μάλλον παραμορφωμένη εικόνα, στην οποία δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το ποσοστό του GA, το οποίο είναι προσκολλημένο στο

συμπολυμερές. Εντούτοις, μπορεί να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του στο συμπολυμερές, αφού εμφανίζονται οι μετατοπίσεις των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε αυτό, σε εκείνη την περιοχή.

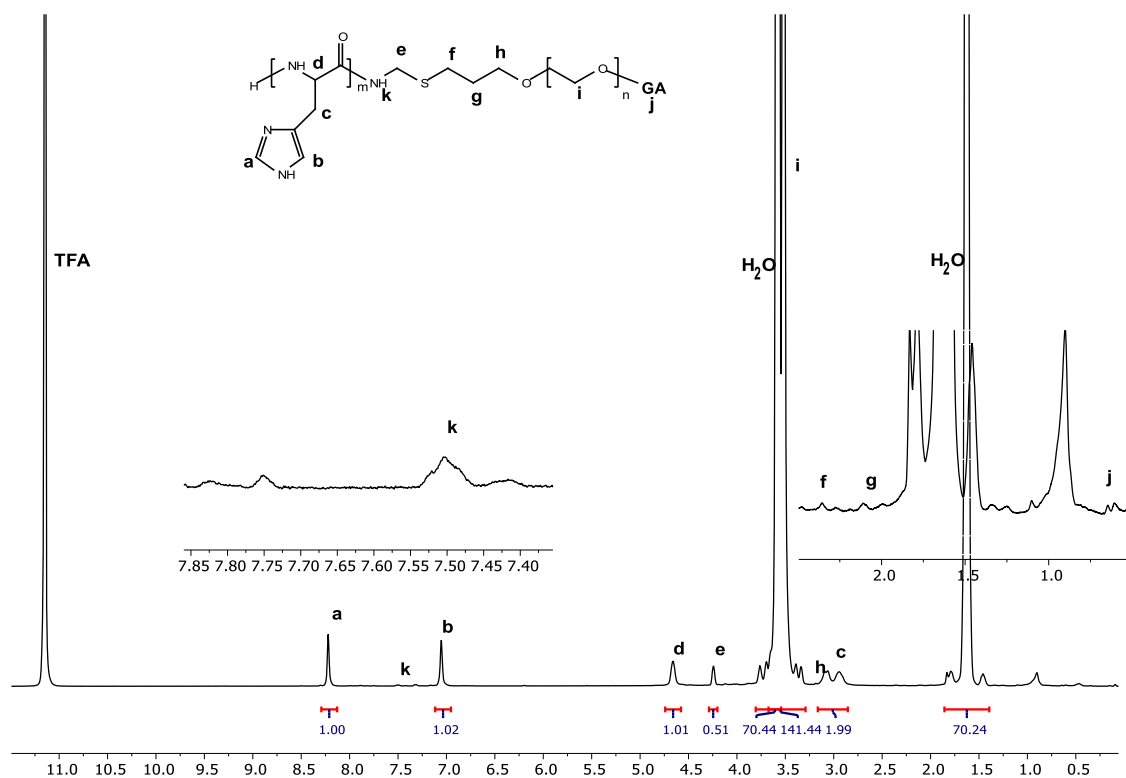


**Εικόνα 38: Φάσμα ¹H-NMR του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis
Mn = 3400-3100 g/mol**

¹H-NMR μετατοπίσεις των πρωτονίων του του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis (Mn=3400-3100 g/mol) σε ppm (600MHz): 8.06-8.47 (a: CH), 6.91-7.29 (b: CH), 2.75-3.23 (c: CH₂), 4.51-4.79 (d: CH), 4.33-4.39 (e: CH₂), 2.35-2.42 (f: CH₂), 2.09-2.19 (g: CH₂), 3.29 (h: CH₂), 3.36-3.81 (i: -O-CH₂-CH₂), 0.43-0.59 (j: GA), 7.75-7.81 (k: NH)

Αντίστοιχα μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος της συστάδας της PHis, για το δεύτερο κατά σειρά συμπολυμερές που συντέθηκε. Από τις ολοκληρώσεις των κορυφών του φάσματος, υπολογίστηκε ότι το μοριακό βάρος της PHis είναι Mn = 3100 g/mol. Παρόμοια είναι και εικόνα για την περιοχή τιμών, όπου βρίσκονται οι μετατοπίσεις των πρωτονίων του GA.

Αναφορικά με τα συμπολυμερή που συντέθηκαν με απαρχηγή το GA-PEG-NH₂, με μοριακό βάρος $M_n = 6400$ g/mol, η εικόνα των φασμάτων ¹H-NMR, παρουσιάζεται στις Εικόνες 39 και 40.

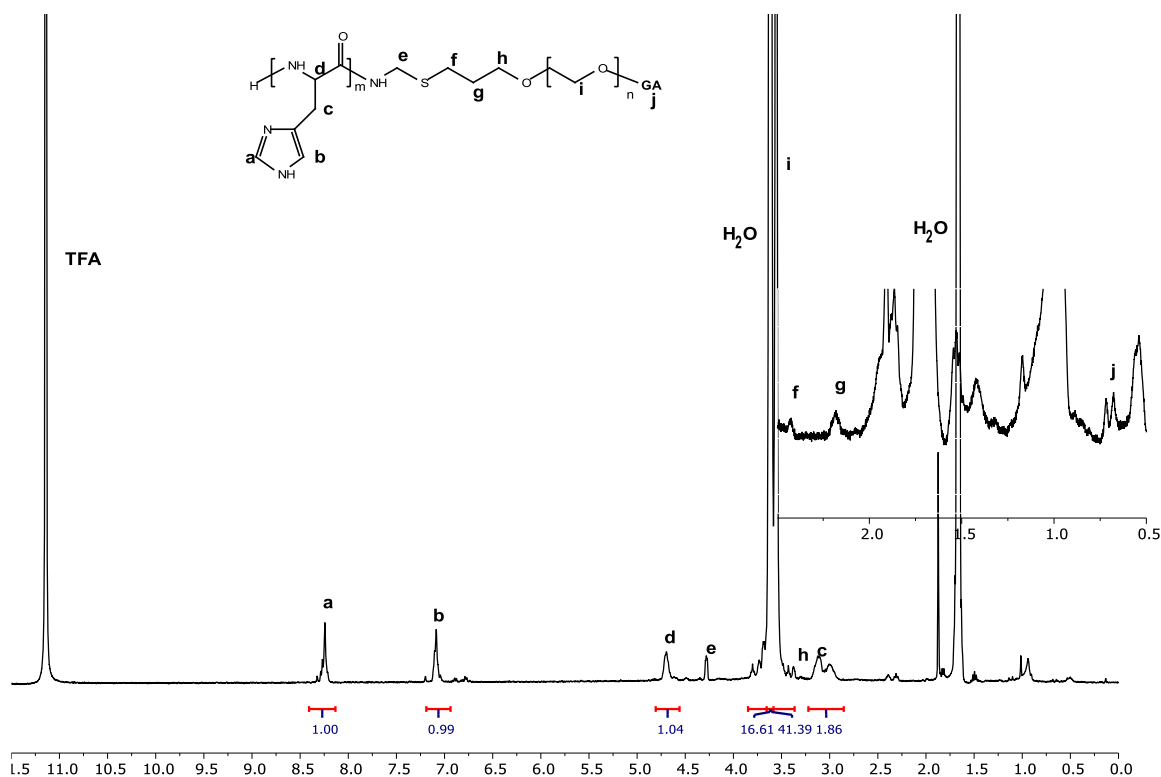


Εικόνα 39: Φάσμα ¹H-NMR του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis $M_n = 6400-1100$

¹H-NMR μεταοπίσεις των πρωτονίων του του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis ($M_n=6400-1100$ g/mol) σε ppm (600MHz): 8.06-8.47 (a: CH), 6.91-7.29 (b: CH), 2.75-3.23 (c: CH₂), 4.51-4.79 (d: CH), 4.33-4.39 (e: CH₂), 2.35-2.42 (f: CH₂), 2.09-2.19 (g: CH₂), 3.29 (h: CH₂), 3.36-3.81 (i: -O-CH₂-CH₂), 0.43-0.59 (j: GA), 7.75-7.81 (k: NH)

Όπως και προηγουμένως, έγινε αποτίμηση όλων των κορυφών που προκύπτουν από τη φασματοσκοπία και υπολογίστηκε το μοριακό βάρος της PHis, το οποίο είναι $M_n = 1100$ g/mol, ενώ το μοριακό βάρος που είχε υπολογιστεί θεωρητικά ήταν $M_n = 1200$ g/mol. Όσον αφορά τα πρωτόνια του GA, παρατηρείται ότι η αποτίμηση των κορυφών του γίνεται δυσκολότερη,

καθώς αυξάνεται το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς. Παρόλα αυτά οι χαρακτηριστικές κορυφές που προκύπτουν από τις μετατοπίσεις των πρωτονίων του είναι εμφανείς.



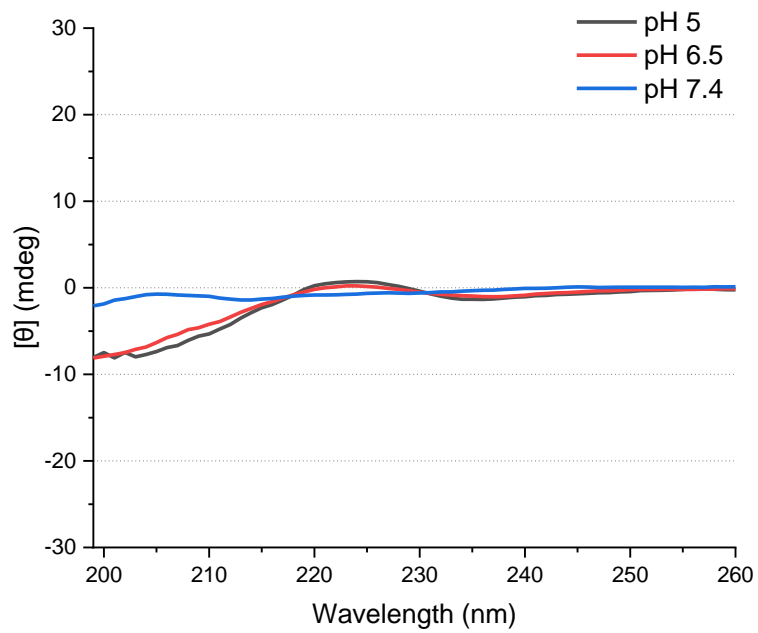
**Εικόνα 40: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis
Mn = 6400-3200**

$^1\text{H-NMR}$ μετατοπίσεις των πρωτονίων του του αμφίφιλου συμπολυμερούς GA-PEG-PHis (Mn=6400-3200 g/mol) σε ppm (600MHz): 8.06-8.47 (a: CH), 6.91-7.29 (b: CH), 2.75-3.23 (c: CH_2), 4.51-4.79 (d: CH), 4.33-4.39 (e: CH_2), 2.35-2.42 (f: CH_2), 2.09-2.19 (g: CH_2), 3.29 (h: CH_2), 3.36-3.81 (i: $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$), 0.43-0.59 (j: GA), 7.75-7.81 (k: NH)

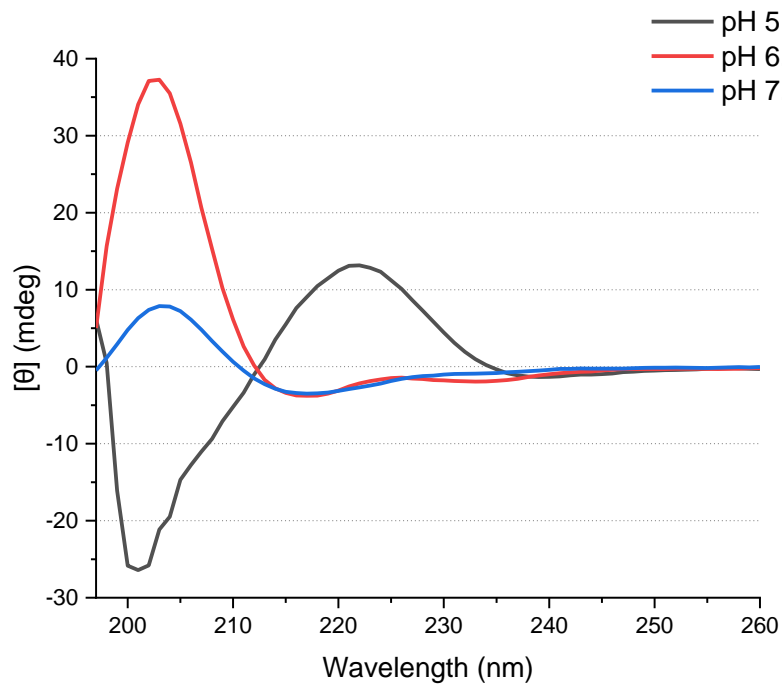
Τέλος, για το τέταρτο κατά σειρά συμπολυμερές που συντέθηκε, παρατηρείται αντίστοιχη εικόνα με τα προηγούμενα φάσματα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το μοριακό βάρος της συστάδας της PHis υπολογίστηκε Mn = 3200 g/mol, το οποίο, βρίσκεται εξίσου σε αντιστοιχία με το μοριακό βάρος που είχε υπολογιστεί θεωρητικά (Mn = 3500 g/mol).

Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα SEC και τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$, εντοπίζεται μεγάλη απόκλιση στα μοριακά βάρη των συμπολυμερών. Αυτό οφείλεται στα συσσωματώματα που δημιουργούν τα πολυμερή αυτά σε υδατικά διαλύματα, όπως θα συζητηθεί σε επόμενο κεφάλαιο. Να τονιστεί ότι η εικόνα από τα χρωματογραφήματα, είναι απολύτως φυσιολογική, στην περίπτωση που δημιουργούνται συσσωματώματα. Καθώς το πολυμερές δεν βρίσκεται σε κατάσταση πλήρους διαλυτοποίησης στον εκάστοτε διαλύτη, ο υδροδυναμικός του όγκος ελαττώνεται, με αποτέλεσμα η ανάλυση από τη χρωματογραφία να υπολογίζει μικρότερο μοριακό βάρος από το πραγματικό.

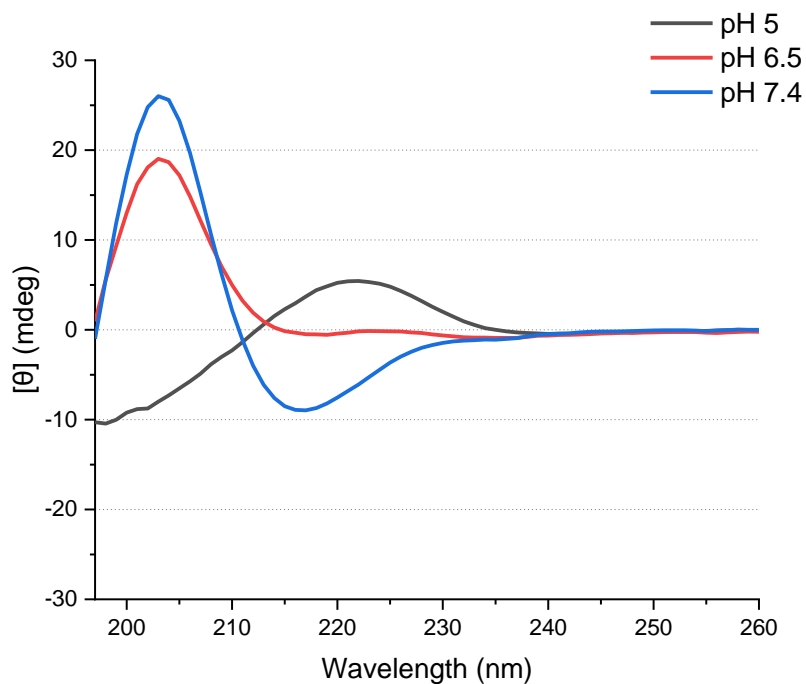
Μετά τον χαρακτηρισμό των συμπολυμερών ως προς τα μοριακά τους χαρακτηριστικά και την επιβεβαίωση της επιτυχούς σύνθεσής τους, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής της πολυπεπτιδικής συστάδας, ούτως ώστε να γίνει κατανοητή η συμπεριφορά των μορίων αυτών σε αλλαγές του pH και να κριθεί αν είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων με ικανότητα δέσμησης και αποδέσμησης της φαρμακευτικής ουσίας αναλόγως το pH στο περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Στα παρακάτω διαγράμματα εμφανίζονται οι διαμορφώσεις που προκύπτουν στα συμπολυμερή για τρεις διαφορετικές τιμές του pH.



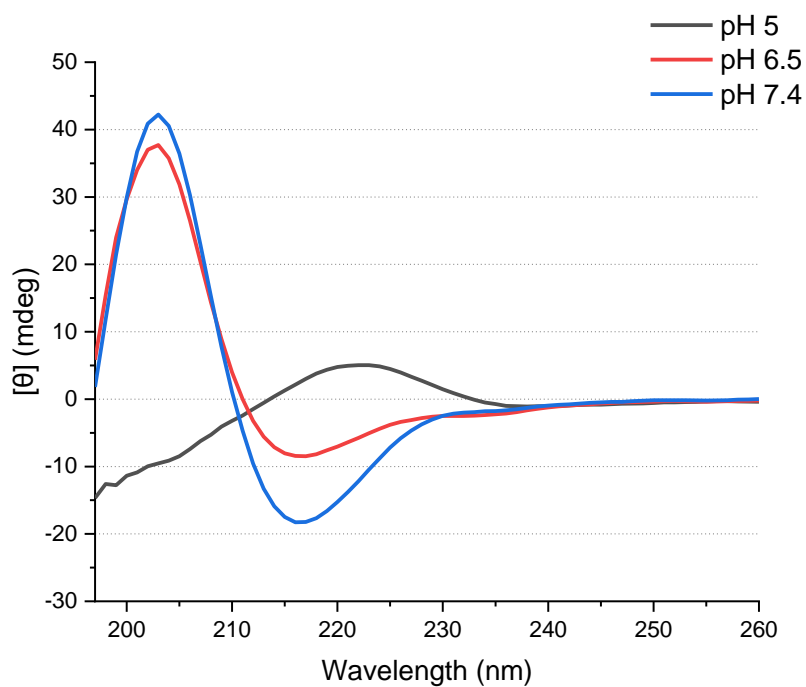
Εικόνα 41: Μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 3400-900 g/mol



Εικόνα 42: Μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 3400-3100 g/mol



Εικόνα 43: Μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 6400-1100 g/mol



Εικόνα 44: Μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για το αμφίφιλο συμπολυμερές GA-PEG-PHis 6400-3200 g/mol

Σύμφωνα με τα διαγράμματα, παρατηρείται μια επαναλαμβανόμενη συμπεριφορά για όλα τα δείγματα, με εξαίρεση το χαμηλού μοριακού βάρους συμπολυμερές. Πιο συγκεκριμένα τα συμπολυμερή GA-PEG-Phis σε τιμές pH= 5 σχηματίζουν δομή που αντιστοιχεί σε τυχαίο σπείραμα, ενώ σε υψηλότερες τιμές pH (pH= 6.5 και pH= 7.4) εμφανίζουν μορφή β-πτυχωτής. Επίσης εμφανής είναι και η μετάβαση από το τυχαίο σπείραμα στη β-πτυχωτή, όπως πολύ χαρακτηριστικά φαίνεται από τα αποτελέσματα των διαλυμάτων με pH= 6.5. Όπως είναι γνωστό στην περιοχή αυτή η Ιστιδίνη αρχίζει να πρωτονιώνεται/αποπρωτονιώνεται, εξηγώντας έτσι τη μέση τιμή που λαμβάνουμε από τα φάσματα. Γίνεται λοιπόν εύκολα αντιληπτό λοιπόν ότι υπάρχει pH αποκρισιμότητα, όπως άλλωστε είχε φανεί και σε προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί.⁹⁹

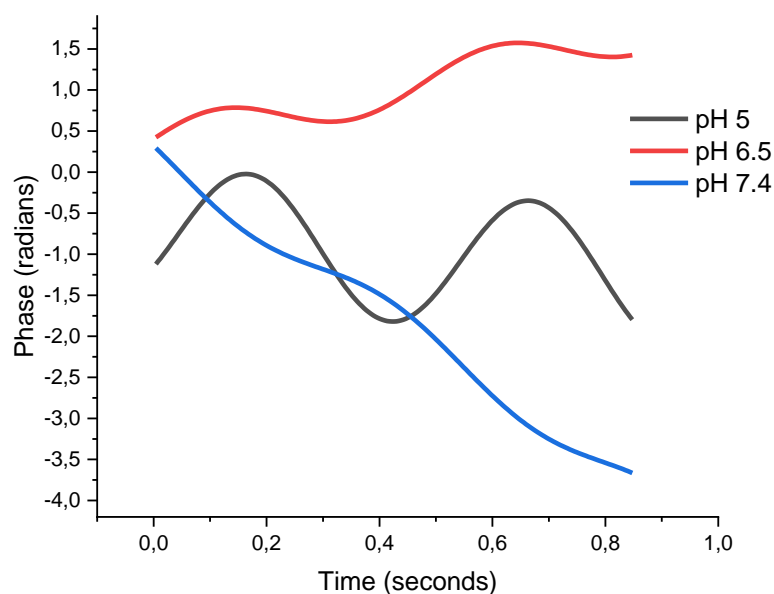
Αναφορικά με το συμπολυμερές μικρού μοριακού βάρους GA-PEG-Phis $M_n = 3400-900$ g/mol, οι μετρήσεις κυκλικού διχρωσισμού δεν έδειξαν κάποια διαμόρφωση. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι πολυμερή μικρού μοριακού βάρους δεν ευνοούν το σχηματισμό δευτεροταγούς δομής.

Από τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, όπως φάνηκε στα διαγράμματα των Σχημάτων 60-63, δεν ήταν δυνατή η αποτίμηση των κορυφών για το GA. Συνεπώς, κρίθηκε σκόπιμο, να ελεγχθεί, εκ νέου, η παρουσία των βιομορίων αυτών στο συμπολυμερές. Αυτό επετεύχθη με μετρήσεις ζ-δυναμικού, όπου μετρήθηκε το φορτίο των πολυμερών για τρεις διαφορετικές τιμές pH (pH = 5, 6.5 και 7.4). Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα μετρήσεων ζ-δυναμικού για τα αμφίφιλα δισυσταδικά συμπολυμερή του τύπου GA-PEG-PHis

Δείγμα (Mn) kDa	pH	ζ-Δυναμικό (mV)
PEG-PHis (3.5-3.5) kDa	5	17,62
	6.5	6,04
	7.4	-3,78
GA-PEG-PHis (3.4-0.9) kDa	5	3,72
	6.5	-10,63
	7.4	-11,39
GA-PEG-PHis (3.4-3.1) kDa	5	0,75
	6.5	-13,55
	7.4	-9,12
GA-PEG-PHis (6.4-1.1) kDa	5	6
	6.5	-11,42
	7.4	-10,54
GA-PEG-PHis (6.4-3.2) kDa	5	3,19
	6.5	-11,99
	7.4	-11,95

Αρχικά έγιναν μετρήσεις για το πολυμερές PEG-PHis, για να μετρηθεί το ζ-δυναμικό χωρίς το GA και έπειτα να διαπιστωθεί η επίδραση του στα σωματίδια που συμμετέχει.



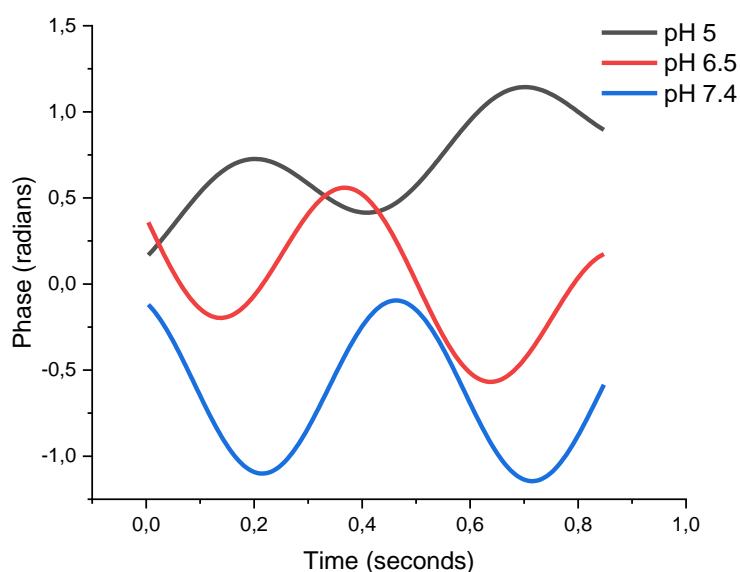
Εικόνα 45: Διάγραμμα PALS για το πολυμερές PEG-PHis Mn=3500-3500 g/mol σε pH = 5, 6.5 και 7.4

Παρατηρείται, ότι για pH = 5 το δυναμικό είναι θετικό (17,62 mV), που οφείλεται στο φορτίο της PHis, η οποία σε όξινο pH είναι διαλυτή. Καθώς το pH αυξάνεται η PHis δημιουργεί νανοσωματίδια με το PEG, όπως θα φανεί από το χαρακτηρισμό με Δυναμική Σκέδαση Φωτός. Η PHis όντας στον πυρήνα του νανοσωματιδίου, δε συνεισφέρει πλέον στο συνολικό δυναμικό με αποτέλεσμα το δυναμικό αρχικά να ελαττώνεται στα 6,04 mV (pH = 6.5) και τελικά να διαμορφώνεται στα -3,78 mV (pH = 7.4).

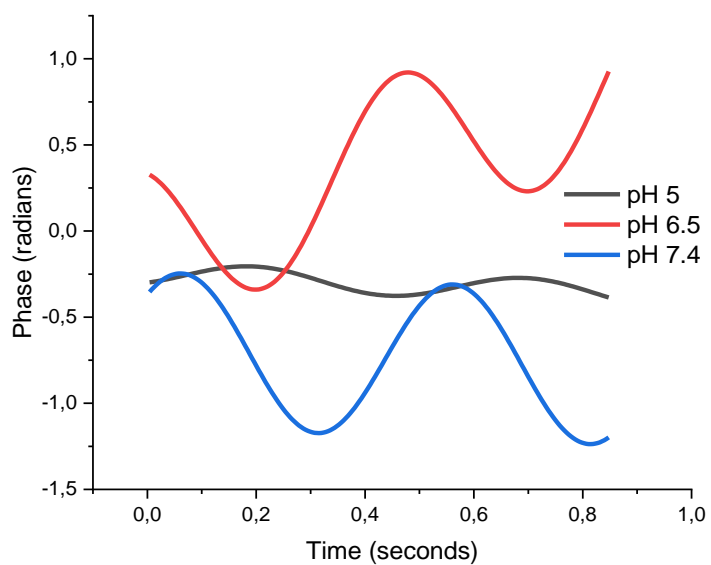
Αντιθέτως στα πολυμερή του τύπου GA-PEG-PHis παρατηρείται, ότι για pH = 5 το δυναμικό είναι πρακτικά μηδενικό. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το δυναμικό που λαμβάνεται, είναι το άθροισμα όλων των φορτίων που υπάρχουν στο διάλυμα. Έτσι, για pH = 5, όπου, όπως αποδείχθηκε από τα φάσματα του κυκλικού διχρωσισμού, η ιστιδίνη είναι υδρόφιλη, το θετικό φορτίο που λαμβάνεται από τις δομικές μονάδες της ιστιδίνης εξισορροπείται με το αρνητικό που λαμβάνεται από τα υδροξύλια του 18β-γλυκυρρηθινικού οξέος. Κατ' επέκταση, καθώς το pH γίνεται ουδέτερο και οι αλυσίδες της πολυιστιδίνης γίνονται υδρόφοβες, οι τιμές του ζ-δυναμικού εμφανίζονται αρνητικές. Το γεγονός αυτό αποτελεί, σε συνδυασμό με τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$, ισχυρή

απόδειξη της παρουσίας των βιομορίων πάνω στην αλυσίδα των συμπολυμερών. Να σημειωθεί στο σημείο αυτό, ότι για τιμές ζ-δυναμικού (ζ), όπου $10 < \zeta > 10$, το δυναμικό θεωρείται πρακτικά μηδενικό.

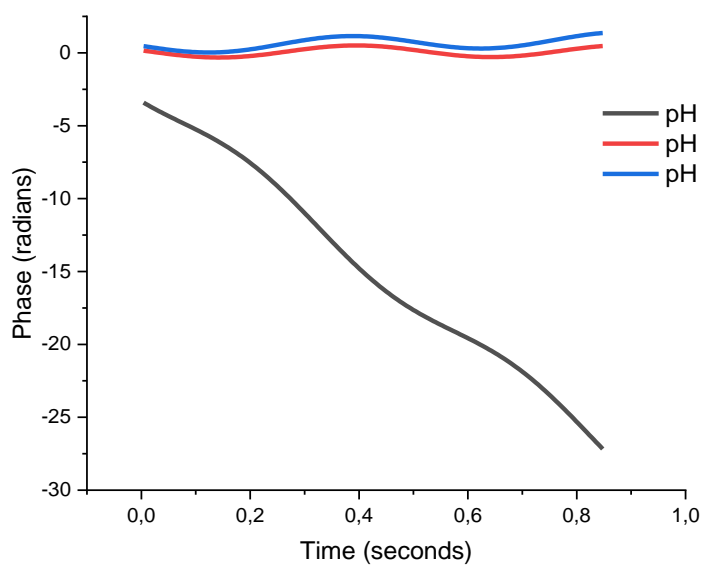
Παρακάτω εμφανίζονται τα διαγράμματα από τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού με τη μέθοδο PALS (Phase Analysis Light Scattering). Ο λόγος που επιλέχθηκε η μέθοδος αυτή είναι η δυνατότητα να προσδιορίζει το ζ-δυναμικό ακόμα και σε διαλύματα που περιέχουν αλάτια, όπως τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη ρύθμιση του pH.



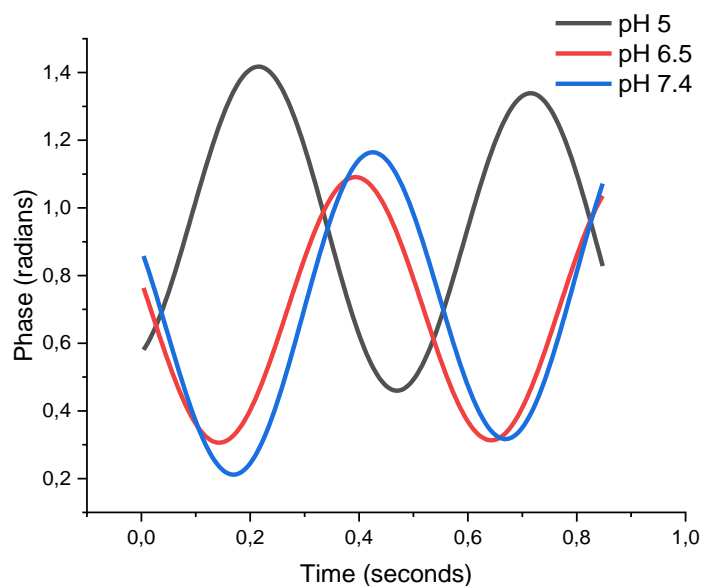
Εικόνα 46: Διάγραμμα PALS για το πολυμερές GA-PEG-PHIs $M_n=3400-900$ g/mol σε pH = 5, 6.5 και 7.4



Εικόνα 47: Διάγραμμα PALS για το πολυμερές GA-PEG-PHis $M_n=3400-3100$ g/mol σε pH = 5, 6.5 και 7.4



Εικόνα 48: Διάγραμμα PALS για το πολυμερές GA-PEG-PHis $M_n=6400-1100$ g/mol σε pH = 5, 6.5 και 7.4



Εικόνα 49: Διάγραμμα PALS για το πολυμερές GA-PEG-PHis $M_n=6400-3200$ g/mol σε pH = 5, 6.5 και 7.4

13.6. Μελέτη συσσωμάτωσης των αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών

Ο προσδιορισμός της ύπαρξης συσσωματωμάτων αποτελεί σημείο κλειδί για το κυρίως θέμα της παρούσας διατριβής, που δεν είναι άλλο από τη σύνθεση πολυμερικών υλικών, που θα μπορούν να δεσμεύουν και να αποδεσμεύουν τη φαρμακευτική ουσία εκλεκτικά κάτω από κατάλληλες συνθήκες.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), προκειμένου να κατανοηθεί η συμπεριφορά των πολυμερών σε αλλαγές του pH και της θερμοκρασίας. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων Acetate (pH = 5), PBS (pH = 6.5) και PBS (pH = 7.4). Στη συνέχεια έγινε η προσθήκη των πολυμερών στα διαλύματα σε συγκεντρώσεις 0.3 mg/mL και αφέθηκαν υπό ανάδευση για τουλάχιστον 3 ημέρες. Πριν την λήψη των μετρήσεων τα δειγμάτων τα διαλύματα διηθήθηκαν με φίλτρο με μέγεθος πόρων 0.45μm.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε όργανο NanoBrook Series με μήκος κύματος ακτινοβολίας 640nm της Brookhaven Instruments. Οι τιμές που ελήφθησαν από αυτές τις μετρήσεις αφορούν το Count Rate, δηλαδή τον

αριθμό των φωτονίων που λαμβάνονται από τον αισθητήρα κατά τη σκέδαση της ακτίνας από τα συσσωματώματα, τη διάμετρο όπως αυτή προκύπτει από το διάγραμμα χρόνου/έντασης, τη διάμετρο όπως αυτή προκύπτει από το διάγραμμα χρόνου/αριθμού, την πολυδιασπορά, δηλαδή την κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων και το Baseline Index.

Η τιμή του Baseline Index αναφέρεται στην καθαρότητα του δείγματος, όπως αυτή αναγνωρίζεται από τον αισθητήρα του οργάνου. Ένα δείγμα θεωρείται αξιόπιστο, όταν η τιμή αυτή προσεγγίζει το 10 ($BI \sim 10$). Για τιμές $0 < BI < 6$ η μέτρηση δεν θεωρείται αξιόπιστη και το δείγμα πρέπει να φιλτραριστεί ή το δείγμα δεν σχηματίζει συσσωματώματα με αποτέλεσμα ο αισθητήρας να μεταφράζει τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία ως σκόνη και προσμίξεις. Συνήθως ένα δείγμα με χαμηλό Count Rate εμφανίζει χαμηλή τιμή Baseline Index. Επίσης για να θεωρηθεί αξιόπιστη μια μέτρηση DLS θα πρέπει η τιμή του Count Rate να υπερβαίνει το 100 ($Kcps > 100$).

Τα πολυμερή που συντέθηκαν στην παρούσα διατριβή, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μελετήθηκαν σε τρεις διαφορετικές τιμές pH ώστε να προσδιοριστεί η συμπεριφορά τους σε αλλαγές του pH, ως προς τη δημιουργία νανοσωματιδίων, και πως αυτά επηρεάζονται σε διαφορετικές συνθήκες οξύτητας, καθώς και σε δύο θερμοκρασίες για να ελεγχθεί αν τα συσσωματώματα αυτά σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και κατά πόσο αυτοί επηρεάζουν το μέγεθος τους.

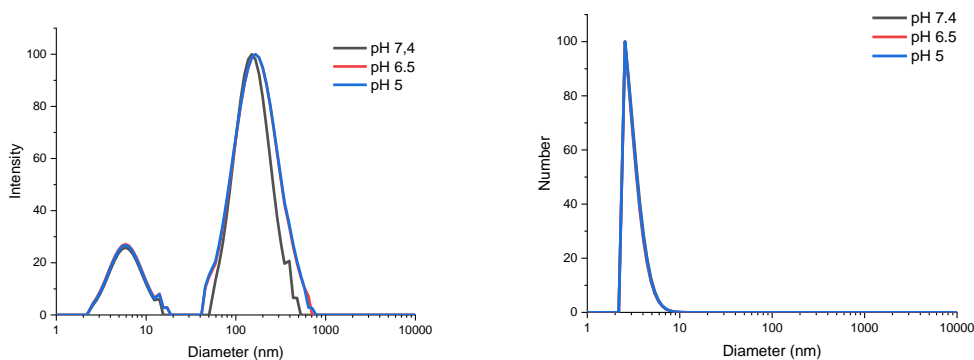
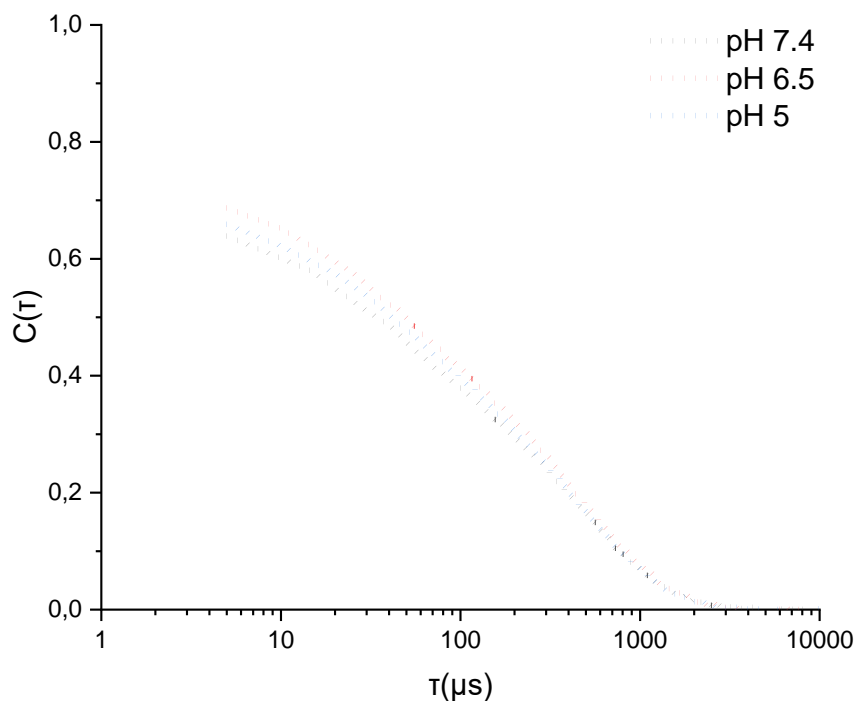
Για την κατανόηση των αποτελεσμάτων έγιναν μετρήσεις DLS και σε δείγματα που αποτελούν μέρος των τελικών αμφίφιλων συμπολυμερών. Έτσι πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για πολυμερή του τύπου GA-PEG-NH₂ και του τύπου PEG-PH_{is}.

Λόγω της χαμηλής διαλυτότητας του γλυκυρρητινικού οξέος σε υδατικά διαλύματα,¹⁹⁹ έγιναν αρχικά μετρήσεις DLS για τα πολυμερή PEG που φέρουν την ομάδα αυτή, χωρίς δηλαδή την πολυπεπτιδική συστάδα της PH_{is}, προκειμένου να διαπιστωθεί αν δημιουργούνται συσσωματώματα ανεξαρτήτως της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις αυτές παρατίθενται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για τον μακροαπαρχητή GA-PEG-NH₂ σε θερμοκρασίες T=25°C και T=60°C

<i>T = 25°C</i>	<i>pH</i>	<i>Count Rate</i> (<i>kcps</i>)	<i>Eff. Diam.</i> (<i>nm</i>)	<i>Polydispersity</i>	<i>Baseline Index</i>
GA-PEG-NH₂ 6.4 kDa	5	23,55	110,66	0,355	2,3
	6.5	23,18	115,43	0,335	3,6
	7.4	23,33	113,88	0,371	2,9
<i>T = 60°C</i>					
GA-PEG-NH₂ 6.4 kDa	5	17,20	117,13	0,338	0,0
	6.5	14,62	105,98	0,369	0,0
	7.4	14,22	119,80	0,332	0,0

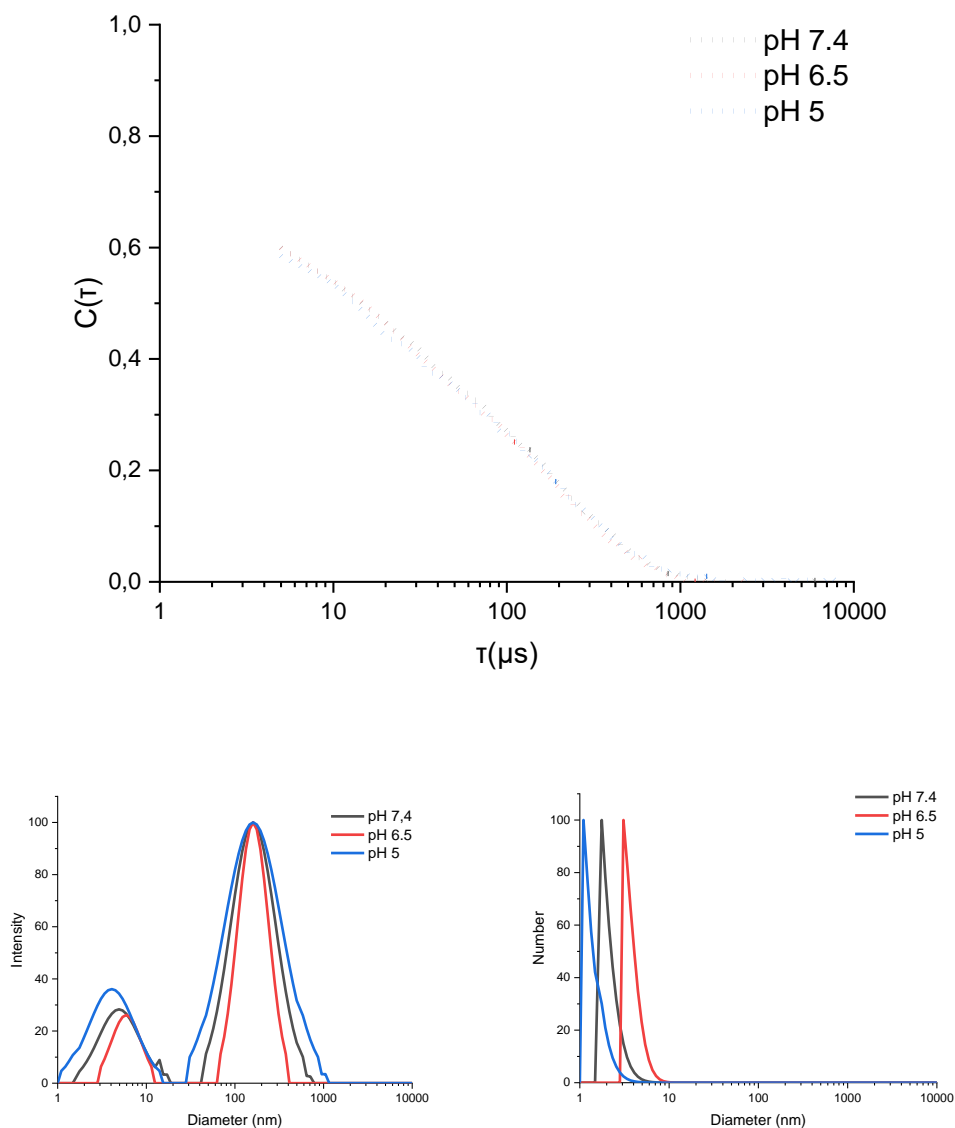
Όπως φαίνεται οι τιμές των Count Rate και Baseline Index είναι πολύ χαμηλές, γεγονός που υποδεικνύει την μη ύπαρξη νανοσωματιδίων, ή τουλάχιστον πολύ μικρό βαθμό συσσωμάτωσης. Αυτό μπορεί να διασταυρωθεί και από τα διαγράμματα των συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης (Correlation, Intensity και Number) που εξήχθησαν με τη μέθοδο CONTIN.



Εικόνα 50: Διαγράμματα συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης, Intensity/Diameter και Number/Diameter για το συμπολυμερές GA-PEG-NH₂ 6400 g/mol (T=25°C)

Παρατηρείται από τα διαγράμματα η εμφάνιση μιας παρόμοιας συνάρτησης αυτοσυσχέτισης, και για τις τρεις τιμές pH που δηλώνει τη μη ύπαρξη εξάρτησης των αποτελεσμάτων από το pH. Η χαμηλή τιμή Count Rate και Baseline Index μπορεί να εξηγηθεί από τις αναλύσεις CONTIN. Παρατηρείται ότι συναρτήσεις του Intensity εμφανίζονται δύο πληθυσμοί οι οποίοι εξηγούν τη μορφή της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης, η οποία είναι ευρεία. Η εικόνα όμως που

λαμβάνεται συναρτήσει του Number, αποτυπώνει την μη ύπαρξη νανοσωματιδίων, αλλά την παρουσία ελεύθερων αλυσίδων στο διάλυμα.



Εικόνα 51: Διαγράμματα συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης, Intensity/Diameter και Number/Diameter για το συμπολυμερές GA-PEG-NH₂ 6400 g/mol (T=60°C)

Όμοια εικόνα εμφανίζεται στα διαγράμματα των μετρήσεων στους 60 °C, όπου φαίνεται να υπάρχουν ελεύθερες αλυσίδες στο διάλυμα και ο πληθυσμός των συσσωματωμάτων που φαίνεται από το διάγραμμα Intensity/Diameter να είναι πολύ μικρός έως αμελητέος.

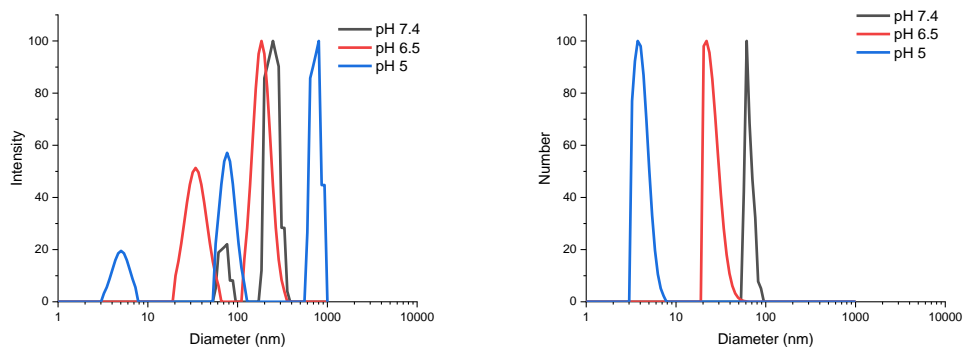
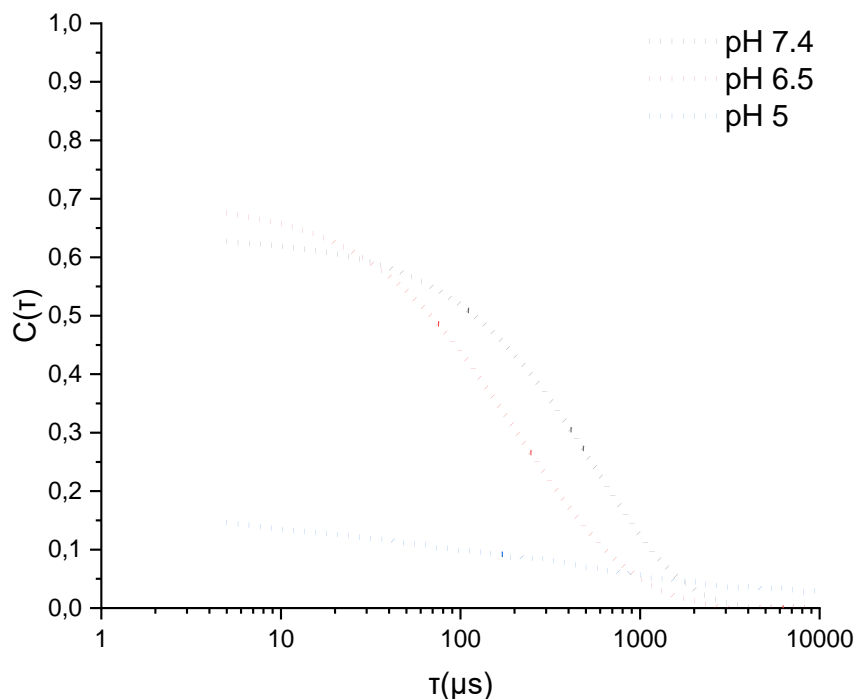
Ακολουθως, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις συμπολυμερών παρόμοιας σύστασης χωρίς την ακραία ομάδα ούτως ώστε να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων και να διαπιστωθεί αν επηρεάζονται τα συσσωματώματα από την ύπαρξη των ακραίων ομάδων. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PEG-PHis σε θερμοκρασίες T=25°C και T=60°C

	<i>pH</i>	<i>Count</i>	<i>Eff.</i>	<i>Diam.</i>	<i>Polydispersity</i>	<i>Baseline Index</i>
		<i>Rate</i> (<i>kcps</i>)	<i>Diam.</i> (<i>nm</i>)	<i>By Number</i> (<i>nm</i>)		
<i>T = 25°C</i>						
	5	34,45	185,35	2,98	0,349	0
	6.5	185,07	85,04	23,80	0,324	8,9
	7.4	421,26	184,80	63,70	0,221	9,8
<i>T = 60°C</i>						
	5	13,59	12271,53	2,15	0,540	0,0
	6.5	321,89	87,55	14,2	0,281	9,7
	7.4	459,16	204,71	21,9	0,205	10

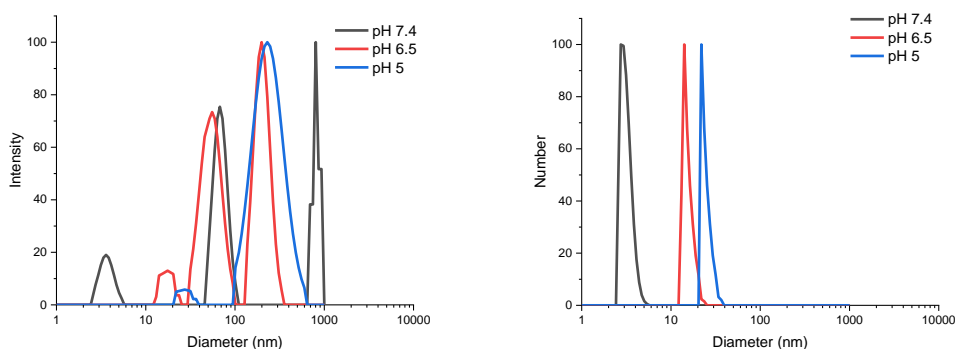
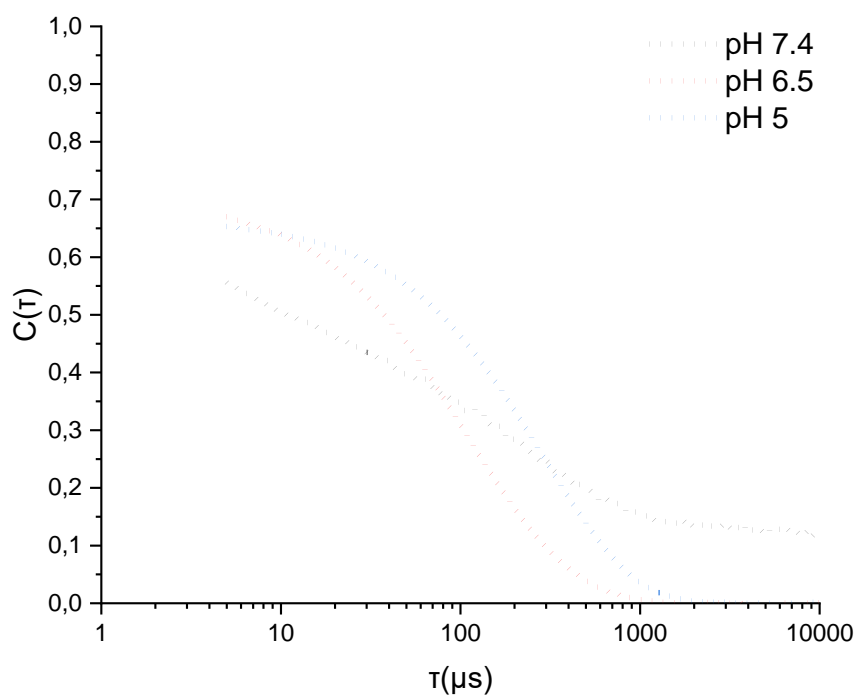
Παρατηρείται ότι για τιμές pH 5 οι τιμές των count rate και baseline index είναι πολύ χαμηλές, όπερ και σημαίνει ότι δεν δημιουργούνται νανοσωματίδια, ώστε να σκεδαστεί η ακτίνα laser. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο αν αναλογιστεί κανείς, ότι σε όξινο περιβάλλον η δομικές μονάδες της Ιστιδίνης πρωτονιώνονται και αλλάζει η υδροφιλικότητά της, με αποτέλεσμα να “σπάνε” τα συσσωματώματα που δημιουργούνται σε υψηλότερα pH. Τα συμπεράσματα αυτά αποτυπώνονται και στα διαγράμματα του Εικόνας 52 των συναρτήσεων

αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN για την ένταση και τον αριθμό των συσσωματωμάτων.



Εικόνα 52: Διαγράμματα συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης, Intensity/Diameter και Number/Diameter για το συμπολυμερές PEG-PHis 3500-3500 g/mol ($T=25^{\circ}\text{C}$)

Αντίστοιχη είναι και η εικόνα για τις μετρήσεις DLS σε θερμοκρασία $T=60^{\circ}\text{C}$. Σύμφωνα με τα διαγράμματα της Εικόνας 53, δεν εμφανίζεται μεγάλη διαφορά από εκείνα της Εικόνας 52, συνεπώς δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση του βαθμού συσσωμάτωσης με τη θερμοκρασία.



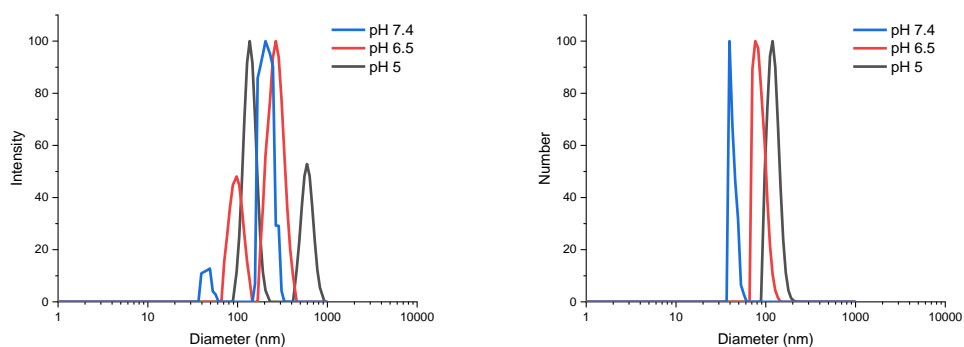
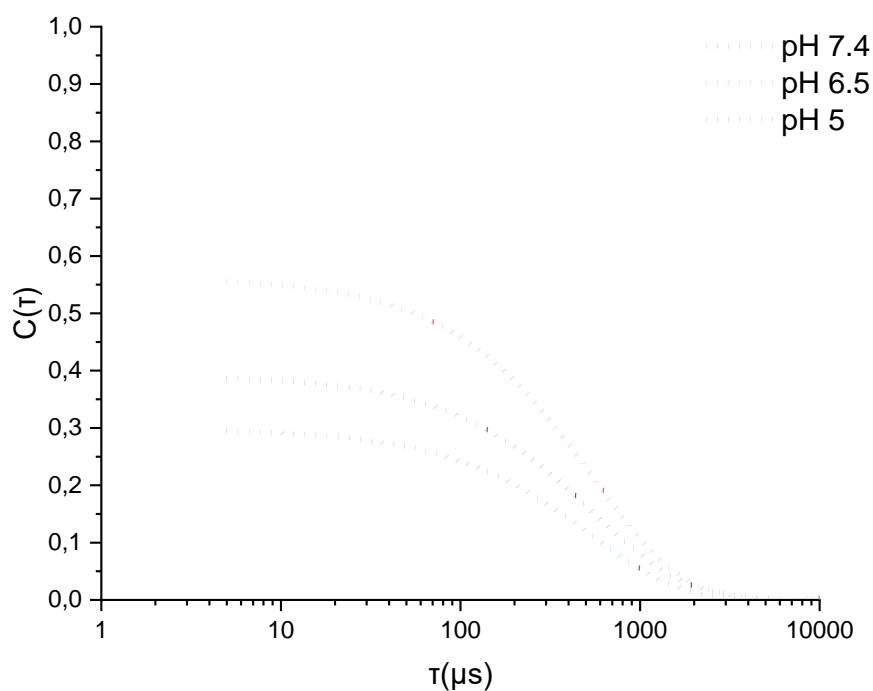
Εικόνα 53: Διαγράμματα συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης, Intensity/Diameter και Number/Diameter για το συμπολυμερές PEG-PHis 3500-3500 g/mol ($T=60^{\circ}\text{C}$)

Οι μετρήσεις DLS για τα αμφίφιλα δισυσταδικά συμπολυμερή GA-PEG-PHis, που αποτελούν το βασικότερο κομμάτι της παρούσας εργασίας, παρατίθενται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για τα συμπολυμερή του τύπου GA-PEG-PHIs σε T=25°C και T=60°C

	pH	Count Rate (kcps)	Eff. Diam. (nm)	Diam. by Number (nm)	Polydispersity	Baseline Index
T = 25°C						
GA-PEG-PHIs (3.4-0.9) kDa	5	436,57	185,84	119,00	0,254	9,6
	6.5	249,59	180,64	77,70	0,226	7,3
	7.4	263,21	177,12	39,80	0,207	8,0
T = 60°C						
	5	329,24	192,81	53,00	0,257	6,5
	6.5	122,14	169,49	31,80	0,190	0,0
	7.4	158,33	170,24	124,00	0,125	3,2
T = 25°C						
GA-PEG-PHIs (3.4-3.1) kDa	5	34,45	185,35	1,99	0,449	0,0
	6.5	185,07	85,04	23,40	0,324	8,9
	7.4	421,26	184,80	61,50	0,221	9,8
T = 60°C						
	5	14,09	X	5,89	0,254	0,0
	6.5	321,89	87,55	14,00	0,281	9,7
	7.4	483,92	202,06	71,30	0,207	9,4
T = 25°C						
GA-PEG-PHIs (6.4-1.1) kDa	5	98,06	311,31	4,16	0,377	2,1
	6.5	145,97	79,76	29,40	0,314	6,8
	7.4	574,57	141,78	30,40	0,204	8,8
T=60°C						
	5	29,50	446,32	1,17	0,171	0,0
	6.5	281,06	78,68	25,10	0,223	9,0
	7.4	677,30	184,25	52,60	0,191	8,5
T = 25°C						
GA-PEG-PHIs (6.4-3.2) kDa	5	10,22	114,88	1,28	0,415	0,0
	6.5	330,61	173,11	42,30	0,281	9,8
	7.4	480,98	137,04	32,20	0,343	9,6
T = 60°C						
	5	2,30	209,61	2,53	0,566	0,0
	6.5	270,06	169,06	31,30	0,240	8,9
	7.4	340,97	124,12	23,20	0,316	8,4

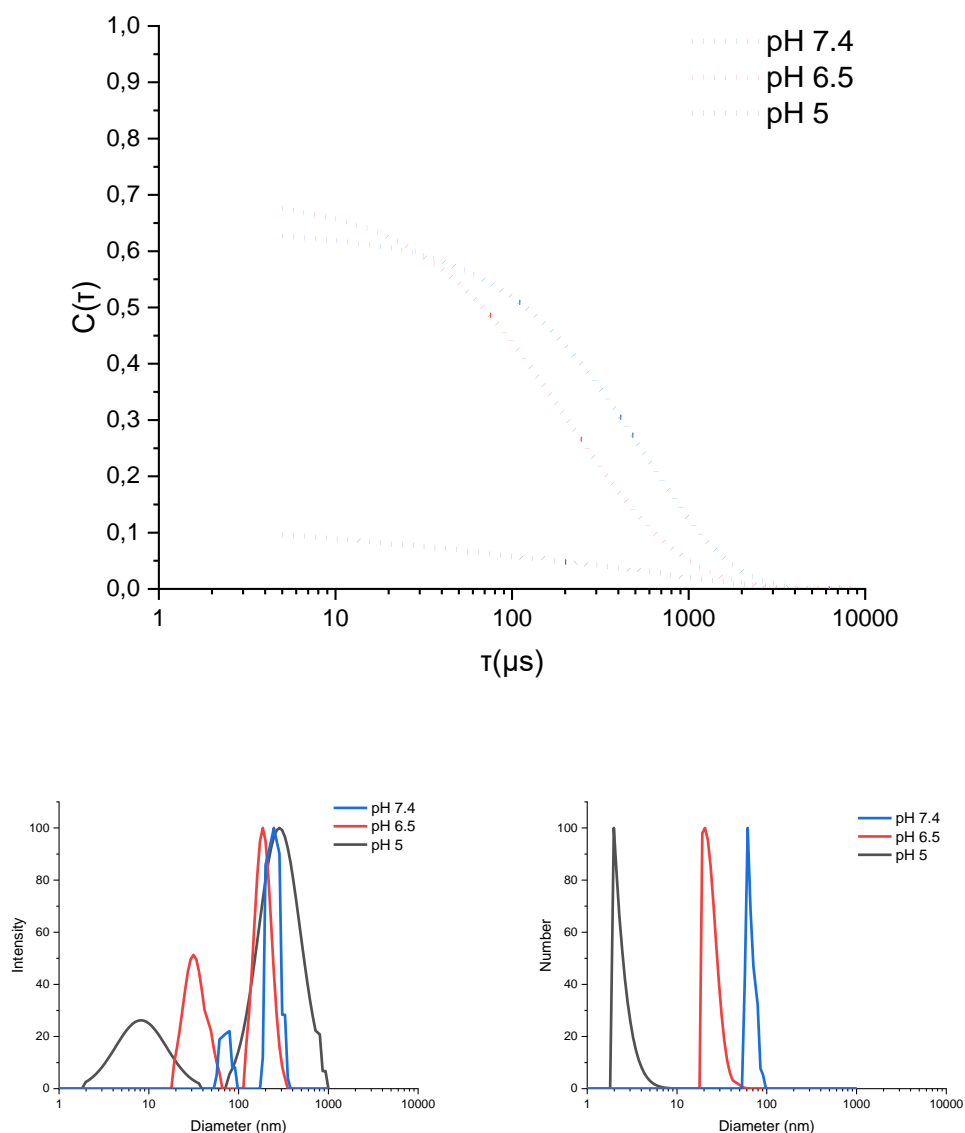
Ακολουθούν τα διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς την ένταση και τον αριθμό των νανοσωματιδίων των αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών για θερμοκρασία $T=25^{\circ}\text{C}$.



Εικόνα 54: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (3400-900) g/mol ($T=25^{\circ}\text{C}$)

Σύμφωνα με τον πίνακα 9 αλλά και τα διαγράμματα της Εικόνας 53, τα πολυμερή του τύπου GA-PEG-PHis με μοριακό βάρος 3400 g/mol για τη συστάδα του PEG και 900 g/mol για τη συστάδα της PHis σχηματίζουν

νανοσωματίδια τα οποία δείχνουν να έχουν μικρή αποκρισσιμότητα σε αλλαγές του pH. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με όσα έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής αναφορικά με την pH αποκρισσιμότητα των συμπολυμερών. Η εξήγηση που μπορεί να δοθεί για τη συμπεριφορά αυτή των πολυμερών έχει να κάνει με το μέγεθος της συστάδας της PHis. Τυπικά, πρόκειται για ολιγομερές ιστιδίνης (αριθμός δομικών μονάδων < 10), και σε αυτές τις περιπτώσεις η συστάδα της ιστιδίνης είναι άκαμπτη. Συνεπώς ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων δεν οφείλεται στην υδροφοβικότητα της συστάδας της ιστιδίνης, αλλά στη μορφή της ολιγομερικής αλυσίδας.



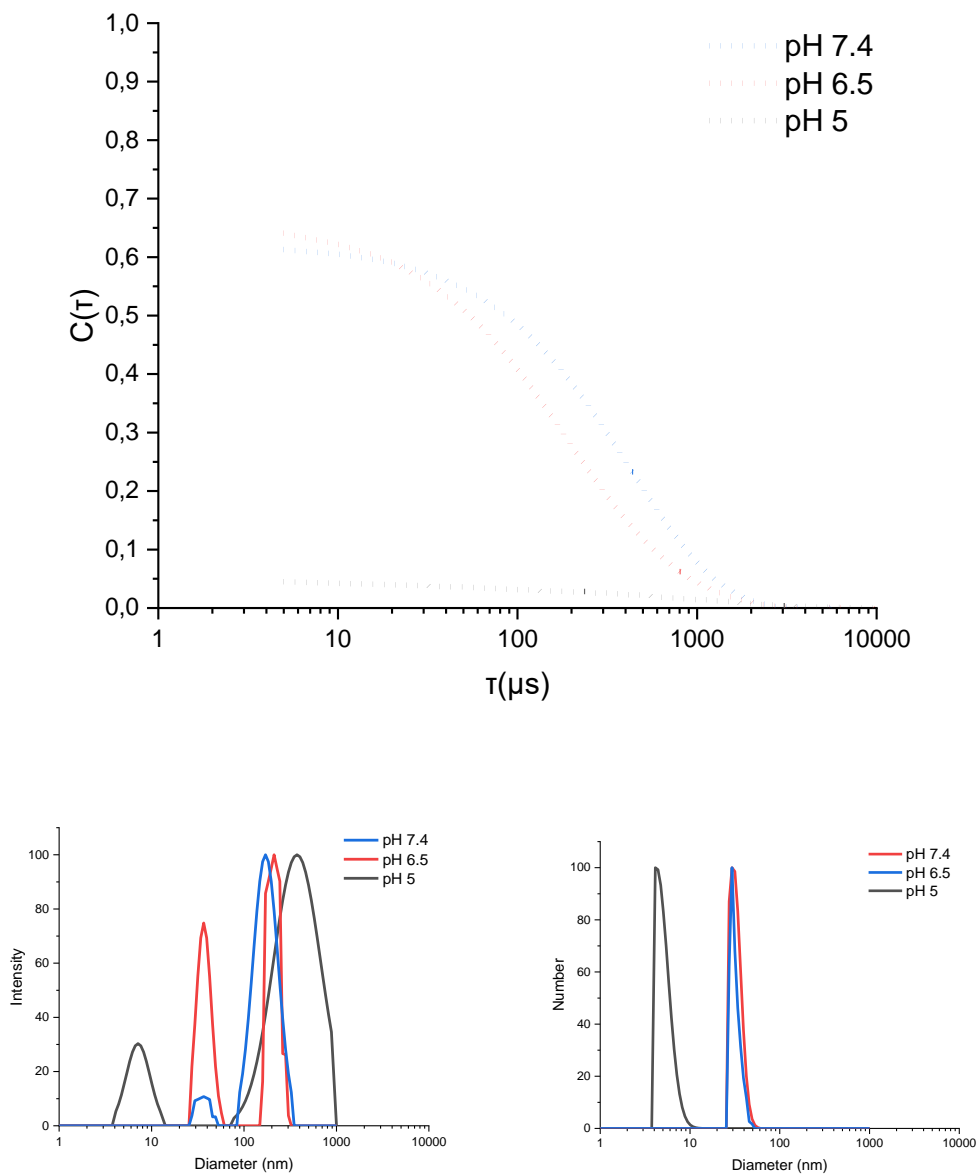
Εικόνα 55: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (3400-3100) g/mol ($T=25^\circ\text{C}$)

Αντιθέτως, όπως φαίνεται στα διαγράμματα της Εικόνας 54, η εικόνα που λαμβάνεται συνηγορεί στα προαναφερθέντα, σχετικά με τη δημιουργία νανοσωματιδίων σε φυσιολογικό pH και την αποσύνθεση τους σε όξινο. Πιο συγκεκριμένα στο διάγραμμα των συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης, παρατηρείται ότι για $\text{pH} = 5$ δε δημιουργείται καμπύλη αυτοσυσχέτισης. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα συμφωνεί και με τις τιμές Count Rate και Baseline Index του Πίνακα 9.

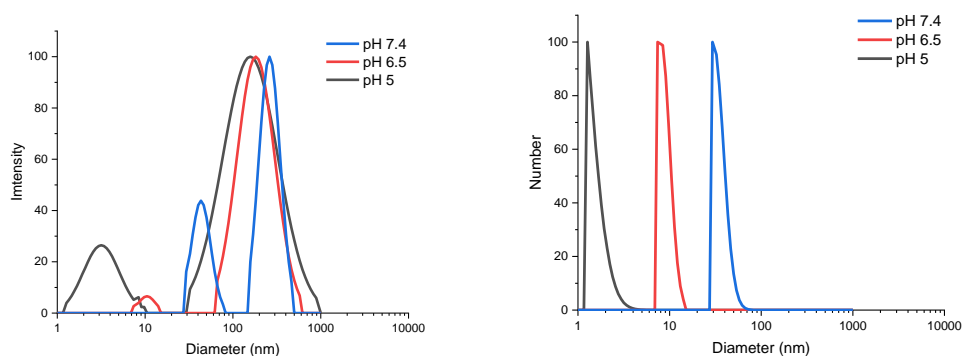
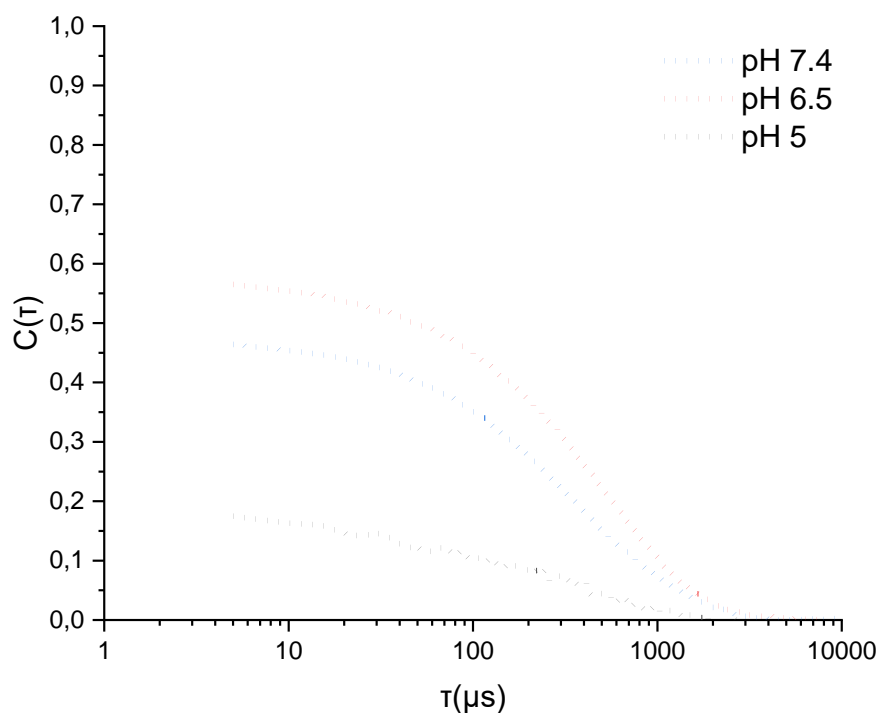
Επιπροσθέτως, η μορφή των διαγραμμάτων Intensity/Diameter και Number/Diameter, ενισχύει το συμπέρασμα ότι σε $\text{pH} = 5$ το νανοσωματίδιο έχει αποσυντεθεί και πλέον στο διάλυμα υπάρχουν κυρίως ελεύθερες αλυσίδες του αμφίφιλου δισυσταδικού συμπολυμερούς. Παρατηρείται ότι η κορυφές του διαγραμμάτων έχουν αντίστοιχη μορφή με αυτές των συμπολυμερών του τύπου PEG-PHis.

Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζεται στα διαγράμματα της Εικόνας 55, όπου δεν εμφανίζεται συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για $\text{pH} = 5$, ενώ η διάμετρος που προκύπτει από το διάγραμμα διαμέτρου/αριθμού προδίδει την ύπαρξη ελεύθερων αλυσίδων πολυμερούς και όχι νανοσωματιδίων. Τα αποτελέσματα αυτά προκαλούν αρκετό ενδιαφέρον, διότι το μοριακό βάρος της συστάδας της ιστιδίνης είναι παρόμοιο με αυτό του πρώτου συμπολυμερούς που μετρήθηκε, παρόλα αυτά παρουσιάζει μεγάλες διαφορές στην συμπεριφορά του ως προς τη συσσωμάτωση. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με δύο τρόπους. Αρχικά, το μοριακό βάρος της ιστιδίνης που συντέθηκε, πιθανό να βρίσκεται σε κρίσιμο σημείο όσον αφορά την ευκαμψία της αλυσίδας, με αποτέλεσμα 1 ή 2 μονομερικές μονάδες μεγαλύτερη, να παρουσιάζει εντελώς διαφορετική συμπεριφορά. Αυτό ίσως εξηγεί και τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του κυκλικού διχρωισμού, όπου στο πρώτο από τα δείγματα ($M_n = 3400-900 \text{ g/mol}$) δεν εμφανίζεται δευτεροταγής δομή. Η δεύτερη εξήγηση που μπορεί να δοθεί, έχει να κάνει με τη συστάδα τη PEG. Η PEG είναι ένα μόριο, που όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος της εργασίας αυτής, έχει την ικανότητα να μεταφέρει τα χαρακτηριστικά της όπως η διαλυτότητα σε μόρια, στα οποία είναι προσκολλημένη. Αυτή της η ικανότητα, δίνει μια ικανοποιητική εξήγηση στο φαινόμενο που παρατηρείται για τα πολυμερή μοριακού βάρους ($M_n =$

6400-1100 g/mol). ο συνδυασμός δε, των δύο αυτών εξηγήσεων, αποτελεί μια πιο ολοκληρωμένη απάντηση στον προβληματισμό αυτό.



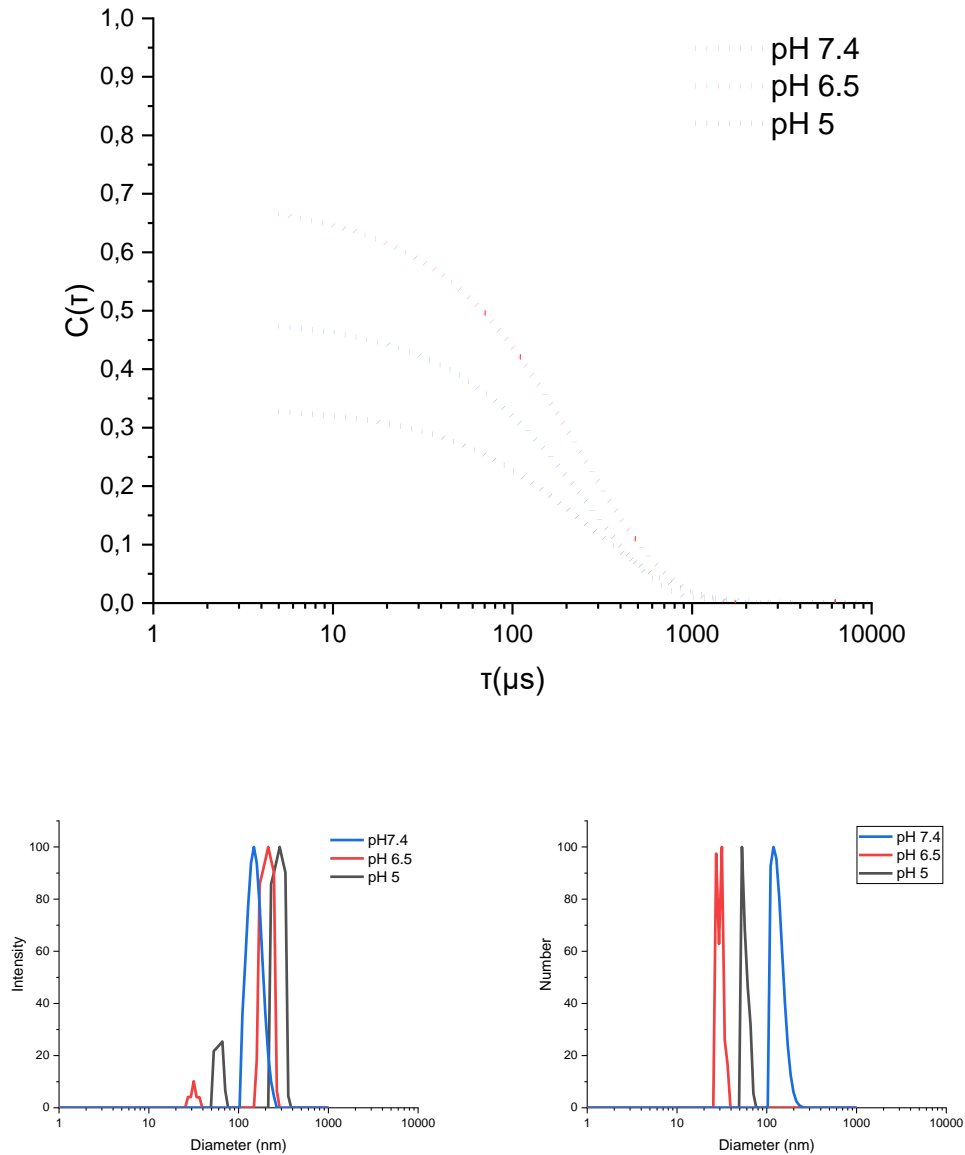
Εικόνα 56: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (6400-1100) g/mol (T=25°C)



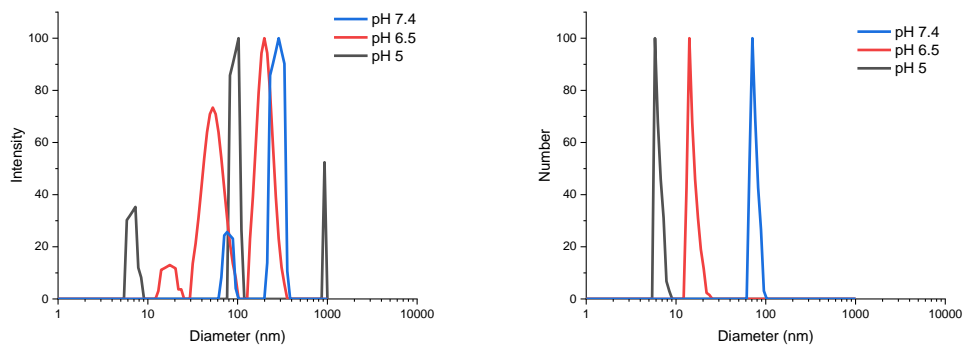
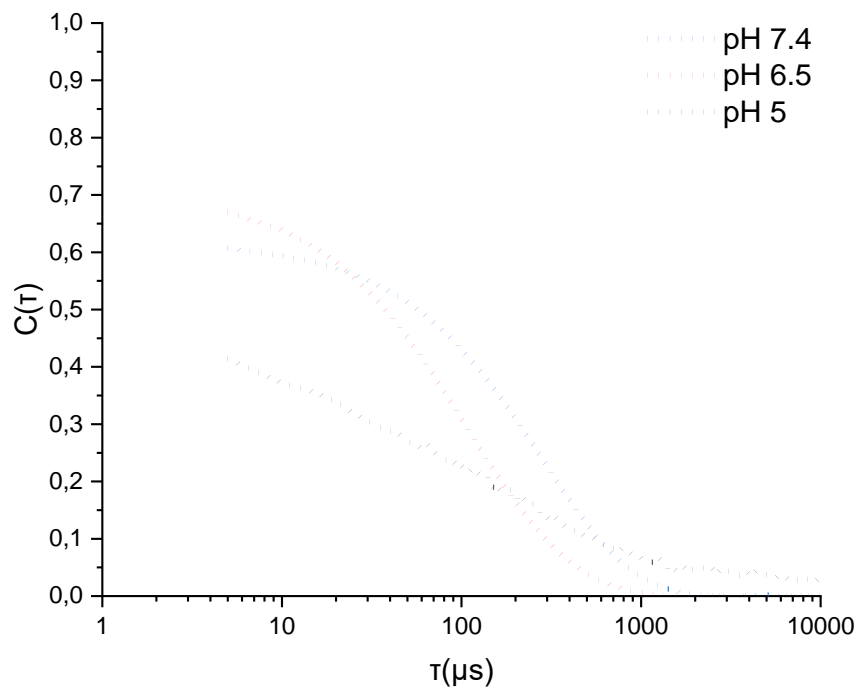
Εικόνα 57: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEO-PHis (6400-3200) g/mol (T=25°C)

Ακολουθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων DLS σε θερμοκρασία T=60°C. Ο λόγος που επιλέχθηκαν να γίνουν μετρήσεις στους 60°C, είναι για να προσδιοριστεί η επιρροή των δεσμών υδρογόνου στα νανοσωματίδια. Η εικόνα που εμφανίζεται στα διαγράμματα των Εικόνων 57-60, συνηγορούν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας έχει πολύ μικρή επιρροή στο σχηματισμό και το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Ο ισχυρισμός αυτός επιβεβαιώνεται και από τον

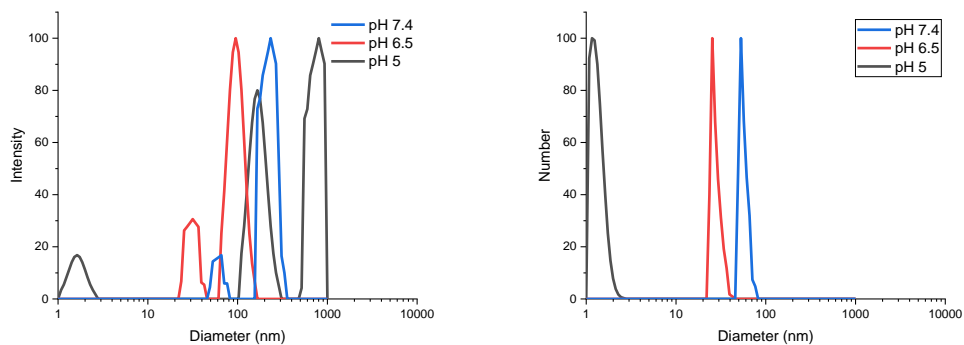
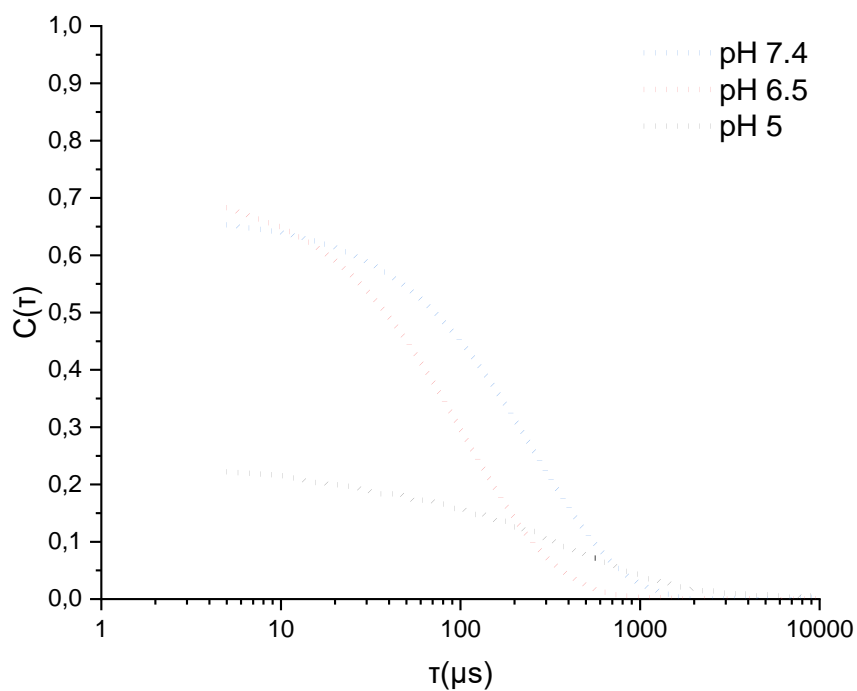
Πίνακα 9, όπου εμφανίζονται αναλυτικά οι διάμετροι των νανοσωματιδίων που προκύπτουν από τις μετρήσεις Intensity και Number.



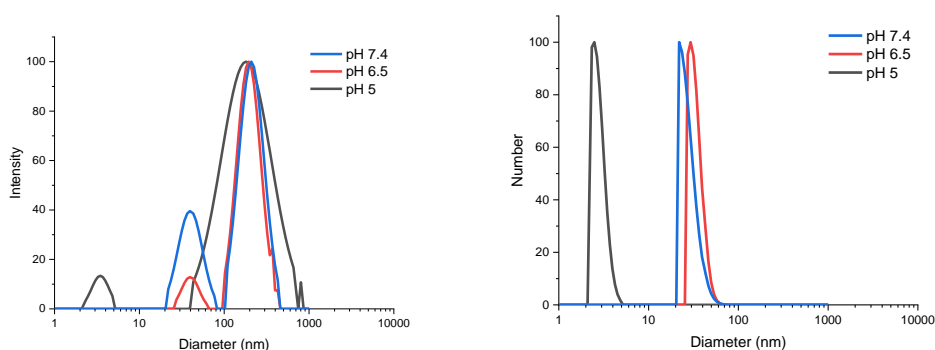
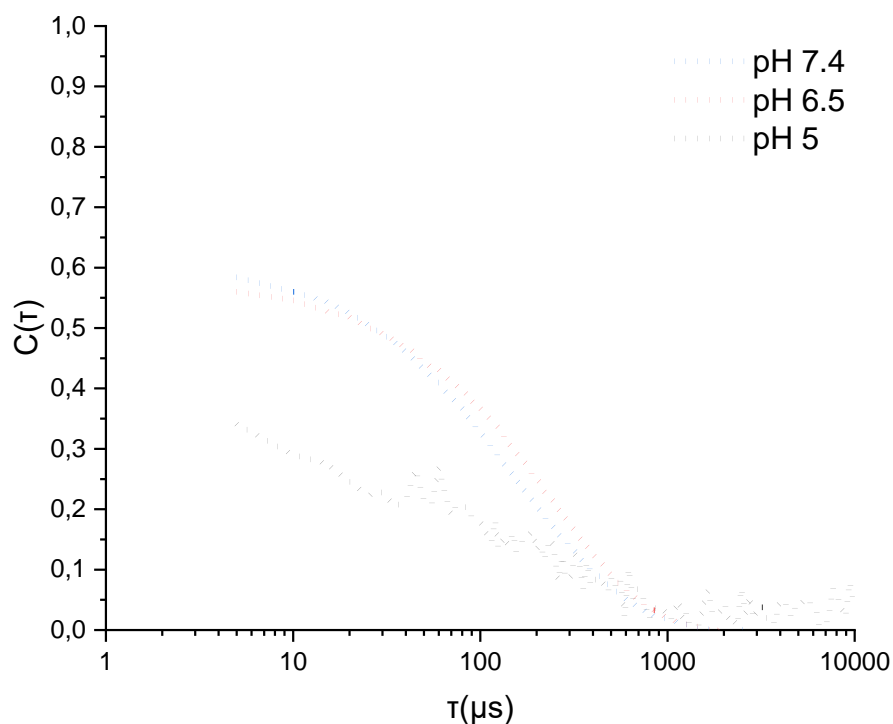
Εικόνα 58: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (3400-900) g/mol ($T=60^{\circ}\text{C}$)



Εικόνα 59: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (3400-3100) g/mol ($T=60^{\circ}\text{C}$)



Εικόνα 60: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHis (6400-1100) g/mol ($T=60^{\circ}\text{C}$)



Εικόνα 61: Διαγράμματα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και της ανάλυσης CONTIN ως προς το Intensity και το Number για το συμπολυμερές GA-PEG-PHIs (6400-3200) g/mol ($T=60^{\circ}\text{C}$)

Από τις συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης και τα διαγράμματα Intensity/Diameter και Number/Diameter, δεν εμφανίζεται κάποια διαφορά στη συμπεριφορά των συμπολυμερών με την αύξηση της θερμοκρασίας. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η επίδραση των δεσμών υδρογόνου στα συμπολυμερή αυτά, είναι αμελητέα και ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων προέρχεται αποκλειστικά από φαινόμενα αποκρισιμότητας στο pH.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα πολυμερή που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αποτελούν μέρος μελέτης σύνθεσης νανοσωματιδίων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων, για τη στοχευμένη αποδέσμευσή τους σε καρκινικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό συντέθηκαν pH-αποκρίσιμα, αμφίφιλα δισυσταδικά συμπολυμερή, τα οποία φέρουν μία ομάδα στοχευτή των καρκινικών κυττάρων, για μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στην αποδέσμευση του φαρμάκου. Όλα τα πολυμερή συντέθηκαν με συνδυασμό ανιοντικού πολυμερισμού και πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου.

Με ανιοντικό πολυμερισμό συντέθηκε η πρώτη συστάδα των συμπολυμερών, που αποτελεί το υδρόφιλο τμήμα της αλυσίδας και αφορά πολυμερή PEG. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών απαρχητές, η αλλυλική αλκοόλη και 3 άζιδο-1-προπανόλη, εκ των οποίων προτιμήθηκε τελικά η αλλυλική αλκοόλη, καθώς η 3 άζιδο-1-προπανόλη εμφάνισε φαινόμενα διμερισμού. Η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών PEG εξακριβώθηκε με τεχνικές χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC) και φασματοσκοπίας μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$).

Αντίστοιχα ακολουθήθηκαν δύο πειραματικές πορείες για την τροποποίηση του ω-άκρου της PEG σε αμίνη, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως απαρχητής για τον ROP. Η πρώτη πορεία αφορά την τροποποίηση του -OH άκρου σε NH_2 , ενώ η δεύτερη του άλλου-άκρου. Η επιτυχής μετατροπή της πρώτης περίπτωσης εξακριβώθηκε με πιλοτικό πολυμερισμό του γ-βένζυλο-L-γλουταμικού οξέος, όπου το χρωματογράφημα SEC δεν έδειξε υπολείμματα μακροαπαρχητή μετά το πέρας του πολυμερισμού. Στη δεύτερη περίπτωση η εισαγωγή του αμινο άκρου έγινε με την προσθήκη της 2-αμινοαιθανεθιόλης και η επιτυχής σύνθεση εξακριβώθηκε με $^1\text{H-NMR}$.

Για την σύνθεση νανοσωματιδίων με μεγάλη εκλεκτικότητα αποδέσμευσης φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν 2 ομάδες στοχευτές, το φολικό οξύ (FA) και το 18β-γλυκυρρητινικό οξύ (GA). Το FA προσκολλήθηκε στα πολυμερή που συντέθηκαν με απαρχητή την 3-άζιδο-1-προπανόλη, η οποία, όπως αναφέρθηκε, παρουσίασε φαινόμενα διμερισμού, συνεπώς δεν ακολουθήθηκε περαιτέρω χαρακτηρισμός. Το GA εισήχθη στα πολυμερή Allyl-

PEG-OH με μία αντίδραση εστεροποίησης. Η επιτυχής εισαγωγή του GA ελέγχθηκε με $^1\text{H-NMR}$ και με μετρήσεις ζ-δυναμικού.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι πολυμερισμοί για το υδρόφοβο τμήμα του συμπολυμερούς το οποίο αποτελείται από την πολυ(L-ιστιδίνη) PHis. Συνολικά συντέθηκαν 4 συμπολυμερή με διαφορετικές συστάσεις PEG/PHis. Ο χαρακτηρισμός των συγκεκριμένων πολυμερών είναι αρκετά περίπλοκος, καθότι η πολυπεπτιδική συστάδα είναι αδιάλυτη στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες και σε υδατικά διαλύματα δημιουργεί συσσωματώματα, όπως αποδείχθηκε από μετρήσεις DLS. Για τους λόγους αυτούς ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους και της σύστασης των πολυμερών αυτών πραγματοποιήθηκε με $^1\text{H-NMR}$. Από τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, το μοριακό βάρος για κάθε πολυπεπτιδική συστάδα υπολογίστηκε 900g/mol και 3100g/mol με χρήση του μακροαπαρχητή PEG 3400g/mol και 1100g/mol και 3200g/mol με χρήση του μακροαπαρχητή PEG 6400g/mol. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε πολύ καλή αντιστοιχία με τα μοριακά βάρη που υπολογίστηκαν θεωρητικά, γεγονός που αποδεικνύει το ζωντανό χαρακτήρα του ROP των NCAs.

Περαιτέρω χαρακτηρισμός για τις ιδιότητες των πολυμερών αυτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του κυκλικού διχρωσμού, για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής της PHis. Τα δεδομένα που εξήχθησαν, ήταν λίγο πολύ αναμενόμενα, καθώς φαίνεται σε pH = 5 η πολυπεπτιδική συστάδα έχει τη μορφή τυχαίου σπειράματος, ενώ με την αύξηση του pH σε 6.5 και 7.4, παρατηρείται αλλαγή της δομής σε β-πτυχωτή. Εξαιρετική παρουσίασε το συμπολυμερές με μοριακό βάρος GA-PEG-PHis (3200-900)g/mol. Το φαινόμενο αυτό προτείνεται ότι συμβαίνει εξαιτίας του μικρό μοριακού βάρους της PHis, καθιστώντας την άκαμπτη, αδυνατώντας έτσι να λάβει δευτεροταγή δομή.

Έχοντας πραγματοποιήσει τροποποιήσεις μετά την εισαγωγή του GA, κρίθηκε σκόπιμο να διαπιστωθεί, η περίπτωση να έχει αποκολληθεί από το συμπολυμερές. Ανεξάρτητα από το $^1\text{H-NMR}$, όπου συνεχίζουν να εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στις μετατοπίσεις των πρωτονίων του, πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις ζ-δυναμικού με την τεχνικά

PALS. Διαπιστώθηκε έτσι η παρουσία της ομάδας αυτής στο τελικό συμπολυμερές.

Τέλος πραγματοποιήθηκαν μελέτες συσσωμάτωσης μέσω DLS σε pH = 5, 6.5 και 7.4 για να διαπιστωθεί η δημιουργία νανοσωματιδίων και πως αυτά επηρεάζονται από τις αλλαγές στο pH. Η μελέτη αναπτύχθηκε περαιτέρω σε δύο θερμοκρασίες $T = 25^{\circ}\text{C}$ και $T = 60^{\circ}\text{C}$ για να ελεγχθεί αν επηρεάζεται η συσσωμάτωση από δεσμούς υδρογόνου. Παρατηρήθηκε ότι για pH = 5 τα πολυμερή δεν σχημάτιζαν νανοσωματίδια, γεγονός που επιβεβαιώνει την pH αποκρισιμότητα των συστημάτων αυτών, ενώ για pH = 6.5 και 7.4 παρατηρήθηκαν μορφές συσσωμάτωσης που δεν ξεπερνούσαν τα σε διάμετρο τα 70nm. Τα διαγράμματα που ελήφθησαν αφορούσαν το Intensity συναρτήσεως του Diameter και το Number συναρτήσεως του Diameter. Σε όλες τις περιπτώσεις τα διαγράμματα Intensity/Diameter εμφάνισαν δύο πληθυσμούς, κάτι που εξηγεί την καμπύλη της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης, η οποία είναι αρκετά ευρεία και υποδηλώνει νανοσωματίδια διαφόρων μεγεθών. Από την αναγωγή των αποτελεσμάτων του Intensity σε Number παρατηρήθηκε ένας κύριος πληθυσμός, ο οποίος για pH = 5 υποδηλώνει την παρουσία ελεύθερων αλυσίδων το διάλυμα. Σε όλα τα παραπάνω εξαίρεση αποτελεί το πολυμερές GA-PEG-PHis με μοριακό βάρος $M_n = 3200-900 \text{ g/mol}$. Στην προκειμένη περίπτωση δεν φάνηκε κάποια εξάρτηση από την αλλαγή του pH. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα, φανερώνει ακαμψία της PHis σε αυτό το μοριακό βάρος, με αποτέλεσμα να μην επηρεάζεται από τις αλλαγές στο pH κάτι που έγινε εμφανές και στις μετρήσεις CD, όπου δεν εμφάνισε δευτεροταγή δομή. Τέλος από τις μετρήσεις DLS σε υψηλότερες θερμοκρασίες ($T = 60^{\circ}\text{C}$), για τον προσδιορισμό της επίδρασης δεσμών υδρογόνου στον σχηματισμό νανοσωματιδίων, δεν παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά σε σύγκριση με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία $T = 25^{\circ}\text{C}$. Συνεπώς οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται δεν είναι ικανοί να επηρεάσουν στη διαμόρφωση των νανοσωματιδίων.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ABBREVIATIONS

<i>sec</i> -BuLi	Δευτεροταγές Βουτυλλίθιο
<i>i-Pr</i> -BuLi	Ισοπρόπυλο (τριτοταγές) Βουτυλλίθιο
<i>tert</i> -BuLi	Τεταρτοταγές Βουτυλλίθιο
<i>n</i> -BuLi	Κανονικό Βουτυλλίθιο
PS	Πολυ(στυρένιο)
THF	Τετραϋδροφουράνιο
NCA	N-καρβοξυανυδρίτης
NAM	Κανονικός Μηχανισμός Αμινών
DMF	Διμέθυλο Φορμαμίδιο
AM	Ενεργοποιημένο Μονομερές
HMDS	Εξαμεθυλοδισιλαζάνιο
PBLG	Πολυ(γ-βένζυλο-L-γλουταμικό οξύ)
PBDG	Πολυ(γ-βένζυλο-D-γλουταμικό οξύ)
PZLL	Πολυ(ε-βένζυλο καρβόνυλ-L-λυσίνη)
BTC	Τριφωσγένιο
BOC	Τεταρτοταγής βουτόξυ καρβόνυλο (προστατευτική ομάδα)
EtAc	Οξικός Αιθυλεστέρας
PMLG	Πολυ(γ-μέθυλ-L-γλουταμικό οξύ)
PMDG	Πολυ(γ-μέθυλ-D-γλουταμικό οξύ)
PLPhe	Πολυ(L-φαινυλαλανίνη)
PDPhe	Πολυ(D-φαινυλαλανίνη)
PHis	Πολυ(L-ιστιδίνη)
PGly	Πολυ(L-γλυκίνη)
PLAla	Πολυ(L-αλανίνη)
IR	Υπεριώδους (φασματοσκοπία)

PEG	Πολυ(αιθυλενογλυκόλη)
mPEG	Μέθυλο Πολυ(αιθυλενογλυκόλη)
PMA	Πολυ(ακρυλικός μεθυλεστέρας)
LCST	Ελάχιστη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
UCST	Μέγιστη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
PIPAAm	Πολυ(<i>N</i> -ισοπρόπυλο ακρυλαμίδιο)
PBMA	Πολυ(βούτυλο μεθυλεστέρας)
GSH	Γλουταθιόνη
PLeu	Πολυ(L-λευκίνη)
DTT	Διθειοθρεϊτόλης
SS	Δισουλφιδικός δεσμός
MRI	Μαγνητική τομογραφία
FA	Φολικό οξύ
GA	18β-γλυκυρρητινικό οξύ
GaA	Γαλλικό οξύ
PLLA	Πολυ(L-λακτικό οξύ)
DOX	Δοξορουβικίνη
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
SEC	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών
GPC	Χρωματογραφία μέσω πηκτής
UV-Vis	Υπεριώδες-Ορατό
DLS	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
CD	Κυκλικός Διχρωισμός
EO	Αιθυλενοξείδιο
TEA	Τριαιθυλαμίνη
DCM	Διχλωρομεθάνιο

AIBN	Αζω-δισ-ισοβουτύρυλο-νιτρίλιο
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
DCC	Δικυκλοεξυλο καρβοδιιμίδιο
EDC	<i>N</i> -(3-διμεθυλαμινοπρόπυλ)- <i>N'</i> -αιθυλκαρβοδιιμίδιο
HOBt	1-Υδροξυβενζοτριαζόλιο
DMAP	4-διμεθυλάμινο πυριδίνη
DMSO	Διμέθυλο σουλφοξειδίο
ROP	Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου
MeCN	Ακετονιτρίλιο
ELS	Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός
PALS	Ανάλυση Φάσης Σκέδαση Φωτός
PBS	Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα αλατότητας

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kakwere, H.; Chun, C. K.; Jolliffe, K. A.; Payne, R. J.; Perrier, S., Polymer-peptide chimeras for the multivalent display of immunogenic peptides. *Chemical communications* **2010**, 46 (13), 2188-2190.
2. Szwarc, M.; Levy, M.; Milkovich, R., Polymerization initiated by electron transfer to monomer. A new method of formation of block polymers¹. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, 78 (11), 2656-2657.
3. Hadjichristidis, N.; Iatrou, H.; Pispas, S.; Pitsikalis, M., Anionic polymerization: high vacuum techniques. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2000**, 38 (18), 3211-3234.
4. Young, R. N.; Quirk, R. P.; Fetters, L., Anionic polymerizations of non-polar monomers involving lithium. *Anionic Polymerization* **1984**, 1-90.
5. Odian, G., *Principles of polymerization*. John Wiley & Sons: 2004.
6. Ishizone, T.; Hirao, A.; Nakahama, S., Anionic polymerization of monomers containing functional groups. 6. Anionic block copolymerization of styrene derivatives para-substituted with electron-withdrawing groups. *Macromolecules* **1993**, 26 (25), 6964-6975.
7. Hsieh, H.; Quirk, R. P., *Anionic polymerization: principles and practical applications*. CRC Press: 1996.
8. Pispas, S.; Hadjichristidis, N., End-functionalized block copolymers of styrene and isoprene: synthesis and association behavior in dilute solution. *Macromolecules* **1994**, 27 (7), 1891-1896.
9. Pispas, S.; Hadjichristidis, N., Block copolymers with zwitterionic groups at specific sites: synthesis and aggregation behavior in dilute solutions. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2000**, 38 (20), 3791-3801.
10. Pispas, S.; Hadjichristidis, N.; Potemkin, I.; Khokhlov, A., Effect of architecture on the micellization properties of block copolymers: A2B miktoarm stars vs AB diblocks. *Macromolecules* **2000**, 33 (5), 1741-1746.
11. Schöps, M.; Leist, H.; DuChesne, A.; Wiesner, U., Salt-induced switching of microdomain morphology of ionically functionalized diblock copolymers. *Macromolecules* **1999**, 32 (8), 2806-2809.
12. Nakahama, S.; Hirao, A., Protection and polymerization of functional monomers: Anionic living polymerization of protected monomers. *Progress in polymer science* **1990**, 15 (2), 299-335.
13. Barker, M. C.; Vincent, B., The preparation and characterisation of polystyrene/poly(ethylene oxide) AB block copolymers. *Colloids and surfaces* **1984**, 8 (3), 289-295.
14. Hentze, H.-P.; Krämer, E.; Berton, B.; Förster, S.; Antonietti, M.; Dreja, M., Lyotropic mesophases of poly(ethylene oxide)-b-poly(butadiene) diblock copolymers and their cross-linking to generate ordered gels. *Macromolecules* **1999**, 32 (18), 5803-5809.
15. Bellas, V.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N., Controlled anionic polymerization of hexamethylcyclotrisiloxane. Model linear and miktoarm star

co-and terpolymers of dimethylsiloxane with styrene and isoprene. *Macromolecules* **2000**, 33 (19), 6993-6997.

16. Avgeropoulos, A.; Dair, B. J.; Hadjichristidis, N.; Thomas, E. L., Tricontinuous double gyroid cubic phase in triblock copolymers of the ABA type. *Macromolecules* **1997**, 30 (19), 5634-5642.

17. Guyot, P.; Favier, J.; Fontanille, M.; Sigwalt, P., New perfectly difunctional organolithium initiators for block copolymer synthesis: 2. Difunctional polymers of dienes and of their triblocks copolymers with styrene. *Polymer* **1982**, 23 (1), 73-76.

18. Tung, L.; Lo, G.-S., Studies on dilithium initiators. 1. Hydrocarbon-soluble initiators 1, 3-phenylenebis (3-methyl-1-phenylpentylidene) dilithium and 1, 3-phenylenebis [3-methyl-1-(methylphenyl) pentylidene] dilithium. *Macromolecules* **1994**, 27 (8), 2219-2224.

19. Yu, J. M.; Dubois, P.; Jérôme, R., Synthesis and properties of poly [isobornyl methacrylate (IBMA)-b-butadiene (BD)-b-IBMA] copolymers: New thermoplastic elastomers of a large service temperature range. *Macromolecules* **1996**, 29 (23), 7316-7322.

20. Yu, J. M.; Yu, Y.; Dubois, P.; Teyssié, P.; Jérôme, R., Synthesis and characterization of hydrogenated poly [alkylmethacrylate (-b-styrene)-b-butadiene-b-(styrene-b-) alkylmethacrylate] triblock and pentablock copolymers. *Polymer* **1997**, 38 (12), 3091-3101.

21. Tong, J.; Jérôme, R., Synthesis of poly (methyl methacrylate)-b-poly (n-butyl acrylate)-b-poly (methyl methacrylate) triblocks and their potential as thermoplastic elastomers. *Polymer* **2000**, 41 (7), 2499-2510.

22. Batra, U.; Russel, W.; Pitsikalis, M.; Sioula, S.; Mays, J.; Huang, J., Phase behavior and viscoelasticity of AOT microemulsions containing triblock copolymers. *Macromolecules* **1997**, 30 (20), 6120-6126.

23. Li, H.-J.; Tsiang, R. C.-C., Preparation and characterization of a linear poly (4-vinyl pyridine)-b-polybutadiene-b-poly (4-vinylpyridine) using a t-butyl lithium/m-diisopropenylbenzene diadduct as a dicarbanion initiator. *Polymer* **2000**, 41 (15), 5601-5610.

24. Long, T.; Broske, A.; Bradley, D.; McGrath, J., Synthesis and characterization of poly (t-butyl methacrylate-b-isoprene-b-t-butyl methacrylate) block copolymers by anionic techniques. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1989**, 27 (12), 4001-4012.

25. Dhoot, S.; Watanabe, H.; Tirrell, M., Measurement of forces in interactions between bimodal layers of diblock copolymer adsorbed on mica. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1994**, 86, 47-60.

26. Neumann, C.; Abetz, V.; Stadler, R., Phase behavior of ABC-triblock copolymers with two inherently miscible blocks. *Colloid and Polymer Science* **1998**, 276 (1), 19-27.

27. Avgeropoulos, A.; Paraskeva, S.; Hadjichristidis, N.; Thomas, E. L., Synthesis and microphase separation of linear triblock terpolymers of

polystyrene, high 1, 4-polybutadiene, and high 3, 4-polyisoprene. *Macromolecules* **2002**, 35 (10), 4030-4035.

28. Mogi, Y.; Kotsuji, H.; Kaneko, Y.; Mori, K.; Matsushita, Y.; Noda, I., Preparation and morphology of triblock copolymers of the ABC type. *Macromolecules* **1992**, 25 (20), 5408-5411.

29. Hückstädt, H.; Göpfert, A.; Abetz, V., Synthesis and morphology of ABC heteroarm star terpolymers of polystyrene, polybutadiene and poly (2-vinylpyridine). *Macromolecular Chemistry and Physics* **2000**, 201 (3), 296-307.

30. Watanabe, H.; Shimura, T.; Kotaka, T.; Tirrell, M., Synthesis, characterization, and surface structures of styrene-2-vinylpyridine-butadiene three-block polymers. *Macromolecules* **1993**, 26 (24), 6338-6345.

31. Krappe, U.; Stadler, R.; Voigt-Martin, I., Chiral assembly in amorphous ABC triblock copolymers. Formation of a helical morphology in polystyrene-block-polybutadiene-block-poly (methyl methacrylate) block copolymers. *Macromolecules* **1995**, 28 (13), 4558-4561.

32. Stadler, R.; Auschra, C.; Beckmann, J.; Krappe, U.; Voigt-Martin, I.; Leibler, L., Morphology and thermodynamics of symmetric poly (A-block-B-block-C) triblock copolymers. *Macromolecules* **1995**, 28 (9), 3080-3097.

33. Malhotra, S.; Bluhm, T.; Deslandes, Y., Synthesis and characterization of styrene-b-dimethylsiloxane diblock and styrene-b-isoprene-b-dimethylsiloxane triblock copolymers. *European polymer journal* **1986**, 22 (5), 391-397.

34. Iatrou, H.; Siakali-Kioulafa, E.; Hadjichristidis, N.; Roovers, J.; Mays, J., Hydrodynamic properties of model 3-miktoarm star copolymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **1995**, 33 (13), 1925-1932.

35. Avgeropoulos, A.; Hadjichristidis, N., Synthesis of model nonlinear block copolymers of A (BA)₂, A (BA)₃, and (AB)₃ A (BA)₃ type. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1997**, 35 (4), 813-816.

36. Velis, G.; Hadjichristidis, N., Synthesis of model PS (PI)₅ and (PI)₅PS (PI)₅ nonlinear block copolymers of styrene (S) and isoprene (I). *Macromolecules* **1999**, 32 (2), 534-536.

37. Zioga, A.; Sioula, S.; Hadjichristidis, N. In *Synthesis and morphology of model 3-miktoarm star terpolymers of styrene, isoprene and 2-vinyl pyridine*, Macromolecular Symposia, Wiley Online Library: 2000; pp 239-250.

38. Iatrou, H.; Hadjichristidis, N., Synthesis and characterization of model 4-miktoarm star co-and quaterpolymers. *Macromolecules* **1993**, 26 (10), 2479-2484.

39. Pispas, S.; Avgeropoulos, A.; Hadjichristidis, N.; Roovers, J., Hydrodynamic properties of A₈B₈ type miktoarm (Vergina) stars. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **1999**, 37 (12), 1329-1335.

40. Pitsikalis, M.; Pispas, S.; Mays, J. W.; Hadjichristidis, N., Nonlinear block copolymer architectures. *Blockcopolymers-Polyelectrolytes-Biodegradation* **1998**, 1-137.

41. Hong, K.; Uhrig, D.; Iatrou, H.; Poulos, Y.; Hadjichristidis, N.; Mays, J., Synthesis of model graft copolymers with regularly spaced trifunctional or tetrafunctional branch points. *American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry* **1999**, *40* (2), 104-105.
42. Beinart, S.; Schappacher, M.; Deffieux, A., Linear and semicyclic amphiphilic diblock copolymers. 1. Synthesis and structural characterization of cyclic diblock copolymers of poly (hydroxyethyl vinyl ether) and linear polystyrene and their linear homologues. *Macromolecules* **1996**, *29* (21), 6737-6743.
43. Cramail, S.; Schappacher, M.; Deffieux, A., Controlled synthesis and solution behavior of macrocyclic poly [(styrene)-b-(ethylene oxide)] copolymers. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2000**, *201* (17), 2328-2335.
44. Yin, R.; Hogen-Esch, T. E., Synthesis and characterization of narrow-molecular-weight-distribution polystyrene-poly (dimethylsiloxane) macrocyclic block copolymers and their isobaric precursors. *Macromolecules* **1993**, *26* (25), 6952-6957.
45. Taton, D.; Cloutet, E.; Gnanou, Y., Novel amphiphilic branched copolymers based on polystyrene and poly (ethylene oxide). *Macromolecular Chemistry and Physics* **1998**, *199* (11), 2501-2510.
46. Angot, S.; Taton, D.; Gnanou, Y., Amphiphilic stars and dendrimer-like architectures based on poly (ethylene oxide) and polystyrene. *Macromolecules* **2000**, *33* (15), 5418-5426.
47. Vojkovsky, T.; Sullivan, B.; Sill, K. N., Synthesis of heterobifunctional polyethylene glycols: Polymerization from functional initiators. *Polymer* **2016**, *105*, 72-78.
48. Hiki, S.; Kataoka, K., Versatile and selective synthesis of "click chemistry" compatible heterobifunctional poly (ethylene glycol) s possessing azide and alkyne functionalities. *Bioconjugate chemistry* **2010**, *21* (2), 248-254.
49. Hiki, S.; Kataoka, K., A facile synthesis of azido-terminated heterobifunctional poly (ethylene glycol) s for "click" conjugation. *Bioconjugate chemistry* **2007**, *18* (6), 2191-2196.
50. Edward Semple, J.; Sullivan, B.; Vojkovsky, T.; Sill, K. N., Synthesis and facile end-group quantification of functionalized PEG azides. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2016**, *54* (18), 2888-2895.
51. Penczek, S., *Models of biopolymers by ring-opening polymerization*. CRC press: 2018.
52. Deming, T. J., Living polymerization of α -amino acid-N-carboxyanhydrides. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2000**, *38* (17), 3011-3018.
53. Weingarten, H., Kinetics and Mechanisms of the Polymerization of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides1. *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80* (2), 352-355.

54. Doty, P.; Lundberg, R., Polypeptides. Xa. Additional comments of the amine-initiated polymerization. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79* (9), 2338-2339.
55. Lundberg, R. D.; Doty, P., Polypeptides. XVII. A study of the kinetics of the primary amine-initiated polymerization of N-carboxy-anhydrides with special reference to configurational and stereochemical effects. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79* (15), 3961-3972.
56. Blout, E.; Karlson, R., Polypeptides. III. The synthesis of high molecular weight poly- γ -benzyl-L-glutamates¹. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78* (5), 941-946.
57. Idelson, M.; Blout, E., Polypeptides. XV. 1 infrared spectroscopy and the kinetics of the synthesis of polypeptides: primary amine initiated reactions. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79* (15), 3948-3955.
58. Goodman, M.; Peggion, E., α -amino acid N-carboxyanhydride polymerizations-a mechanistic analysis. *Pure and Applied Chemistry* **1981**, *53* (3), 699-714.
59. Katchalski, E.; Shalitin, Y.; Gehatia, M., Theoretical Analysis of the Polymerization Kinetics of N-Carboxy- α -amino acid Anhydrides. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77* (7), 1925-1934.
60. Fessler, J.; Ogston, A., Studies of the sedimentation, diffusion and viscosity of some sarcosine polymers in aqueous solution. *Transactions of the Faraday Society* **1951**, *47*, 667-679.
61. Goodman, M.; Schmitt, E. E., Conformational transitions in polypeptides. *Journal of the American Chemical Society* **1959**, *81* (20), 5507-5508.
62. Ballard, D.; Bamford, C., The polymerization of α -benzyl-L-glutamate N-carboxy anhydride. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79* (9), 2336-2338.
63. Goodman, M.; Arnon, U., The Mechanism of Strong-Base-Initiated Polymerization of N-Carboxyanhydrides. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86* (16), 3384-3390.
64. Dimitrov, I.; Schlaad, H., Synthesis of nearly monodisperse polystyrene-polypeptide block copolymers via polymerisation of N-carboxyanhydrides. *Chemical communications* **2003**, (23), 2944-2945.
65. Kukula, H.; Schlaad, H.; Falkenhagen, J.; Krüger, R.-P., Improved synthesis and characterization of ω -primary amino-functional polystyrenes and polydienes. *Macromolecules* **2002**, *35* (18), 7157-7160.
66. Schlaad, H.; Smarsly, B.; Losik, M., The role of chain-length distribution in the formation of solid-state structures of polypeptide-based rod-coil block copolymers. *Macromolecules* **2004**, *37* (6), 2210-2214.
67. Schlaad, H.; Kukula, H.; Smarsly, B.; Antonietti, M.; Pakula, T., Solid-state morphologies of linear and bottlebrush-shaped polystyrene-poly (Zl-lysine) block copolymers. *Polymer* **2002**, *43* (19), 5321-5328.
68. Knobler, Y.; Bittner, S.; Frankel, M., 749. Reaction of N-carboxy- α -amino-acid anhydrides with hydrochlorides of hydroxylamine, O-

alkylhydroxylamines, and amines; syntheses of amino-hydroxamic acids, amido-oxy-peptides, and α -amino-acid amides. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1964**, 3941-3951.

69. Fischer, H., The persistent radical effect: a principle for selective radical reactions and living radical polymerizations. *Chemical reviews* **2001**, 101 (12), 3581-3610.

70. Vayaboury, W.; Giani, O.; Cottet, H.; Deratani, A.; Schué, F., Living Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides (NCA) upon Decreasing the Reaction Temperature. *Macromolecular rapid communications* **2004**, 25 (13), 1221-1224.

71. Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N., Living polypeptides. *Biomacromolecules* **2004**, 5 (5), 1653-1656.

72. Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N., Well-defined linear multiblock and branched polypeptides by linking chemistry. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2005**, 43 (19), 4670-4673.

73. Lu, H.; Cheng, J., Hexamethyldisilazane-mediated controlled polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (46), 14114-14115.

74. Leuchs, H., Ueber die Glycin-carbonsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1906**, 39 (1), 857-861.

75. Leuchs, H.; Geiger, W., Über die Anhydride von α -Amino-N-carbonsäuren und die von α -Aminosäuren. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1908**, 41 (2), 1721-1726.

76. Bergmann, M.; Zervas, L.; Ross, W. F., On proteolytic enzymes: VII. The synthesis of peptides of L-lysine and their behavior with papain. *Journal of Biological Chemistry* **1935**, 111 (1), 245-260.

77. Ben-Ishai, D.; Katchalski, E., Synthesis of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides from N-Carboxy- α -amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide. *Journal of the American Chemical Society* **1952**, 74 (14), 3688-3689.

78. Green, M.; Stahmann, M. A., Synthesis and enzymatic hydrolysis of glutamic acid polypeptides. *Journal of Biological Chemistry* **1952**, 197 (2), 771-782.

79. Fuchs, F., Über N-Carbonsäure-anhydride. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1922**, 55 (9), 2943-2943.

80. Coleman, D.; Farthing, A., 628. Synthetic polypeptides. Part II. Properties of oxazolid-2: 5-diones and an initial study of the preparation of polypeptides there-from. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1950**, 3218-3222.

81. Brown, C.; Coleman, D.; Farthing, A., Further studies in synthetic polypeptides. *Nature* **1949**, 163 (4152), 834-835.

82. Levy, A., Anhydro-N-Carboxy-DL- β -Phenylalanine. *Nature* **1950**, 165 (4187), 152-152.

83. Farthing, A., 627. Synthetic polypeptides. Part I. Synthesis of oxazolid-2: 5-diones and a new reaction of glycine. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1950**, 3213-3217.
84. Cotarca, L.; Eckert, H., *Phosgenations: a handbook*. John Wiley & Sons: 2006.
85. Pasquato, L.; Modena, G.; Cotarca, L.; Delogu, P.; Mantovani, S., Conversion of bis (trichloromethyl) carbonate to phosgene and reactivity of triphosgene, diphosgene, and phosgene with methanol. *The Journal of organic chemistry* **2000**, 65 (24), 8224-8228.
86. Daly, W. H.; Poché, D., The preparation of N-carboxyanhydrides of α -amino acids using bis (trichloromethyl) carbonate. *Tetrahedron Letters* **1988**, 29 (46), 5859-5862.
87. Wilder, R.; Mobashery, S., The use of triphosgene in preparation of N-carboxy. α -amino acid anhydrides. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, 57 (9), 2755-2756.
88. Schlaad, H.; Antonietti, M., Block copolymers with amino acid sequences: Molecular chimeras of polypeptides and synthetic polymers. *The European Physical Journal E* **2003**, 10 (1), 17-23.
89. Klok, H. A.; Lecommandoux, S., Supramolecular materials via block copolymer self-assembly. *Advanced Materials* **2001**, 13 (16), 1217-1229.
90. Lee, M.; Cho, B.-K.; Zin, W.-C., Supramolecular structures from rod-coil block copolymers. *Chemical reviews* **2001**, 101 (12), 3869-3892.
91. Vandermeulen, G. W.; Klok, H. A., Peptide/protein hybrid materials: enhanced control of structure and improved performance through conjugation of biological and synthetic polymers. *Macromolecular Bioscience* **2004**, 4 (4), 383-398.
92. Klok, H.-A.; Lecommandoux, S., Solid-State Structure, Organization and Properties of Peptide—Synthetic Hybrid Block Copolymers. *Peptide Hybrid Polymers* **2006**, 75-111.
93. Klok, H. A., Biological—synthetic hybrid block copolymers: Combining the best from two worlds. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2005**, 43 (1), 1-17.
94. Perly, B., Synthèse de copolymères séquences polybutadiène-poly L glutamate de benzyle et étude structurale de leurs mésophases. **1974**.
95. Yamashita, Y.; Iwaya, Y.; Ito, K., Block copolymerization, 9. Polymerization of the NCA of methyl D-glutamate by telechelic polystyrene having glycol groups as active chain ends. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics* **1975**, 176 (5), 1207-1216.
96. Gallot, B., Comb-like and block liquid crystalline polymers for biological applications. *Progress in polymer science* **1996**, 21 (6), 1035-1088.
97. Fasman, G. D., Monolayer studies of synthetic poly (α -amino acids). *MRS Online Proceedings Library (OPL)* **1990**, 218.

98. Prevelige, P.; Fasman, G. D., Chou-Fasman prediction of the secondary structure of proteins. In *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation*, Springer: 1989; pp 391-416.
99. Mavrogiorgis, D.; Bilalis, P.; Karatzas, A.; Skoulas, D.; Fotinogiannopoulou, G.; Iatrou, H., Controlled polymerization of histidine and synthesis of well-defined stimuli responsive polymers. Elucidation of the structure–aggregation relationship of this highly multifunctional material. *Polymer Chemistry* **2014**, *5* (21), 6256-6278.
100. Tsutsumiuchi, K.; Aoi, K.; Okada, M., Synthesis of polyoxazoline–(glyco) peptide block copolymers by ring-opening polymerization of (sugar-substituted) α -amino acid N-carboxyanhydrides with polyoxazoline macroinitiators. *Macromolecules* **1997**, *30* (14), 4013-4017.
101. Kim, K. T.; Vandermeulen, G. W.; Winnik, M. A.; Manners, I., Organometallic– Polypeptide Block Copolymers: Synthesis and Properties of Poly (ferrocenyldimethylsilane)-b-poly-(γ -benzyl-L-glutamate). *Macromolecules* **2005**, *38* (12), 4958-4961.
102. Kong, X.; Jenekhe, S. A., Block copolymers containing conjugated polymer and polypeptide sequences: Synthesis and self-assembly of electroactive and photoactive nanostructures. *Macromolecules* **2004**, *37* (22), 8180-8183.
103. Kricheldorf, H. R.; Hauser, K., Polylactones. 55. A– B– A Triblock Copolymers of Various Polypeptides. Syntheses Involving 4-Aminobenzoyl-Terminated Poly (ϵ -caprolactone) as B Block. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (4), 1110-1115.
104. Aoi, K.; Hatanaka, T.; Tsutsumiuchi, K.; Okada, M.; Imae, T., Synthesis of a novel star-shaped dendrimer by radial-growth polymerization of sarcosine N-carboxyanhydride initiated with poly (trimethyleneimine) dendrimer. *Macromolecular rapid communications* **1999**, *20* (7), 378-382.
105. Maeda, M.; Inoue, S., A novel synthetic method to polyvinyl-poly (amino acid) graft copolymer via poly (amino acid) with a terminal vinyl group (macromer). *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* **1981**, *2* (9-10), 537-542.
106. Imanishi, Y., Synthesis of Vinyl Polymer—Poly (α -Amino Acid) Block Copolymers by End-Reactive Oligomers. *Journal of Macromolecular Science—Chemistry* **1984**, *21* (8-9), 1137-1163.
107. Uchida, S.; Oohori, T.; Suzuki, M.; Shirai, H., Synthesis, characterization, and physical properties of new copolymers of poly (amino acid)–urethane–copolymers of γ -methyl-L-glutamate-N-carboxyanhydride and urethane prepolymer. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1999**, *37* (4), 383-389.
108. Lecommandoux, S.; Achard, M.-F.; Langenwalter, J. F.; Klok, H.-A., Self-assembly of rod– coil diblock oligomers based on α -helical peptides. *Macromolecules* **2001**, *34* (26), 9100-9111.
109. Klok, H.-A.; Langenwalter, J. F.; Lecommandoux, S., Self-assembly of peptide-based diblock oligomers. *Macromolecules* **2000**, *33* (21), 7819-7826.

110. Hayashi, T.; Walton, A.; Anderson, J., Block copolypeptides. 1. Synthesis and solid state conformational studies. *Macromolecules* **1977**, *10* (2), 346-351.
111. Nakajima, A.; Hayashi, T.; Kugo, K.; Shinoda, K., Synthesis and Structural Study of the ABA Type Block Copolymer Consisting of Poly (γ -benzyl L-glutamate) as the A Component and Polybutadiene as the B Component. *Macromolecules* **1979**, *12* (5), 840-843.
112. Yoda, R.; Hirokawa, Y.; Hayashi, T., Synthesis and molecular characterization of ABA type block copolymer consisting of poly (γ -benzyl L-glutamate) as the a component and polyisoprene as the B component. *European polymer journal* **1994**, *30* (12), 1397-1401.
113. Yoda, R.; Shimoda, M.; Komatsuzaki, S.; Hayashi, T.; Nishi, T., Morphology study of poly (γ -benzyl L-glutamate) and polyisoprene copolymer by pulsed proton NMR. *European polymer journal* **1997**, *33* (6), 815-821.
114. Nakajima, A.; Kugo, K.; Hayashi, T., Microheterophase Structure of the ABA Type Block Copolymer Consisting of α -Helical Poly (γ -benzyl L-glutamate) as the A Component and Polybutadiene as the B Component. *Macromolecules* **1979**, *12* (5), 844-848.
115. Billot, J. P.; Douy, A.; Gallot, B., Preparation, fractionation, and structure of block copolymers polystyrene-poly (carbobenzoxy-L-lysine) and polybutadiene-poly (carbobenzoxy-L-lysine). *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics* **1977**, *178* (6), 1641-1650.
116. Kugo, K.; Hayashi, T.; Nakajima, A., Synthesis, Structure, and Mechanical Properties of ABA Tri-Block Copolymers Consisting of Poly (ϵ -N-benzyloxy-carbonyl-L-lysine) as the A Component and Polybutadiene as the B Component. *Polymer Journal* **1982**, *14* (5), 391-399.
117. Yuan, M.; Deng, X., Synthesis and characterization of poly (ethylene glycol)-block-poly (amino acid) copolymer. *European polymer journal* **2001**, *37* (9), 1907-1912.
118. Kang, I.-K.; Ito, Y.; Sisido, M.; Imanishi, Y., Synthesis, Blood Compatibility, and Gas Permeability of Block Copolymers Consisting of Polyoxypopylene and Poly (γ -benzyl L-glutamate). *Polymer journal* **1987**, *19* (12), 1329-1339.
119. Tanaka, M.; Mori, A.; Imanishi, Y.; Bamford, C., Block copolymerization of α -amino acid N-carboxyanhydride initiated by vinyl polymers having a terminal amino group and the characterization of the block copolymers. *International Journal of Biological Macromolecules* **1985**, *7* (3), 173-181.
120. Cho, C.-S.; Nah, J.-W.; Jeong, Y.-I.; Cheon, J.-B.; Asayama, S.; Ise, H.; Akaike, T., Conformational transition of nanoparticles composed of poly (γ -benzyl L-glutamate) as the core and poly (ethylene oxide) as the shell. *Polymer* **1999**, *40* (24), 6769-6775.
121. Cho, I.; Kim, J.-B.; Jung, H.-J., Synthesis and characterization of di- and triblock copolymers of poly (ethylene oxide) and poly (DL-valine-co-DL-leucine). *Polymer* **2003**, *44* (19), 5497-5500.

122. Cho, C.-S.; Jeong, Y.-I.; Kim, S.-H.; Nah, J.-W.; Kubota, M.; Komoto, T., Thermoplastic hydrogel based on hexablock copolymer composed of poly (γ -benzyl L-glutamate) and poly (ethylene oxide). *Polymer* **2000**, *41* (14), 5185-5193.
123. Bikram, M.; Ahn, C.-H.; Chae, S. Y.; Lee, M.; Yockman, J. W.; Kim, S. W., Biodegradable Poly (ethylene glycol)-c o-poly (l-lysine)-g-histidine Multiblock Copolymers for Nonviral Gene Delivery. *Macromolecules* **2004**, *37* (5), 1903-1916.
124. Thünemann, A. F.; Beyermann, J.; Kukulka, H., Poly (ethylene oxide)-b-poly (L-lysine) complexes with retinoic acid. *Macromolecules* **2000**, *33* (16), 5906-5911.
125. Pechar, M.; Kopečková, P.; Joss, L.; Kopeček, J., Associative diblock copolymers of poly (ethylene glycol) and coiled-coil peptides. *Macromolecular Bioscience* **2002**, *2* (5), 199-206.
126. Tanaka, S.; Ogura, A.; Kaneko, T.; Murata, Y.; Akashi, M., Precise synthesis of ABA triblock copolymers comprised of poly (ethylene oxide) and poly (β -benzyl-l-aspartate): a hierarchical structure inducing excellent elasticity. *Macromolecules* **2004**, *37* (4), 1370-1377.
127. Vandermeulen, G. W.; Tziatzios, C.; Duncan, R.; Klok, H.-A., PEG-based hybrid block copolymers containing α -helical coiled coil peptide sequences: control of self-assembly and preliminary biological evaluation. *Macromolecules* **2005**, *38* (3), 761-769.
128. Vandermeulen, G. W.; Tziatzios, C.; Klok, H.-A., Reversible self-organization of poly (ethylene glycol)-based hybrid block copolymers mediated by a de novo four-stranded α -helical coiled coil motif. *Macromolecules* **2003**, *36* (11), 4107-4114.
129. Deng, M.; Wang, R.; Rong, G.; Sun, J.; Zhang, X.; Chen, X.; Jing, X., Synthesis of a novel structural triblock copolymer of poly (γ -benzyl-l-glutamic acid)-b-poly (ethylene oxide)-b-poly (ϵ -caprolactone). *Biomaterials* **2004**, *25* (17), 3553-3558.
130. Caillol, S.; Lecommandoux, S.; Mingotaud, A.-F.; Schappacher, M.; Soum, A.; Bryson, N.; Meyrueix, R., Synthesis and self-assembly properties of peptide- polylactide block copolymers. *Macromolecules* **2003**, *36* (4), 1118-1124.
131. Dong, C.-M.; Sun, X.-L.; Faucher, K. M.; Apkarian, R. P.; Chaikof, E. L., Synthesis and characterization of glycopolymer-polypeptide triblock copolymers. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (1), 224-231.
132. Fontaine, L.; Ménard, L.; Brosse, J.-C.; Sennyey, G.; Senet, J.-P., New polyurethanes derived from amino acids: Synthesis and characterization of α , ω -diaminooligopeptides by ring-opening polymerization of glutamate N-carboxyanhydrides. *Reactive and Functional Polymers* **2001**, *47* (1), 11-21.
133. Ul'yanova, N.; Baranovskaya, I.; Liubina, S. Y.; Bezrukova, M.; Rudkovskaya, G.; Sabsels, B.; Vlasov, G.; Eskin, V., Investigation of macromolecules exhibiting the structure of a once-broken rod by molecular optics. 2. Synthesis and investigation of three-block copolymers: poly (γ -benzyl

- L-glutamate)-poly (methyl methacrylate)-poly (γ -benzyl L-glutamate). *Macromolecules* **1991**, 24 (11), 3324-3327.
134. Cheon, J.-B.; Jeong, Y.-I.; Cho, C.-S., Effects of temperature on diblock copolymer micelle composed of poly (γ -benzyl L-glutamate) and poly (N-isopropylacrylamide). *Polymer* **1999**, 40 (8), 2041-2050.
135. Janssen, K.; Van Beylen, M.; Samyn, C., Block copolymerization of γ -benzyl-N-carboxyl-L-glutamate anhydride initiated by polystyrene having two terminal amino groups, fractionation and characterization of the block copolymers. *Polymer* **1988**, 29 (8), 1513-1515.
136. Lutz, J. F.; Schütt, D.; Kubowicz, S., Preparation of Well-Defined Diblock Copolymers with Short Polypeptide Segments by Polymerization of N-Carboxy Anhydrides. *Macromolecular rapid communications* **2005**, 26 (1), 23-28.
137. Curtin, S. A.; Deming, T. J., Initiators for end-group functionalized polypeptides via tandem addition reactions. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121 (32), 7427-7428.
138. Brzezinska, K. R.; Deming, T. J., Synthesis of AB Diblock Copolymers by Atom-Transfer Radical Polymerization (ATRP) and Living Polymerization of α -Amino Acid-N-Carboxyanhydrides. *Macromolecular bioscience* **2004**, 4 (6), 566-569.
139. Brzezinska, K. R.; Curtin, S. A.; Deming, T. J., Polypeptide end-capping using functionalized isocyanates: preparation of pentablock copolymers. *Macromolecules* **2002**, 35 (8), 2970-2976.
140. Kros, A.; Jesse, W.; Metselaar, G. A.; Cornelissen, J. J., Synthesis and Self-Assembly of Rod-Rod Hybrid Poly (γ -benzyl L-glutamate)-block-Polyisocyanide Copolymers. *Angewandte Chemie* **2005**, 117 (28), 4423-4426.
141. Witte, P.; Menzel, H., Nickel-Mediated Surface Grafting From Polymerization of α -Amino Acid-N-Carboxyanhydrides. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2004**, 205 (13), 1735-1743.
142. Xu, F.; Zhang, B.-X.; Luo, Y.-L., Thermosensitive P (NIPAM-co-AM)-b-PLA block copolymer micelles for applications in intracellular drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2014**, 24 (2), 136-142.
143. Qin, S.; Geng, Y.; Discher, D. E.; Yang, S., Temperature-Controlled Assembly and Release from Polymer Vesicles of Poly (ethylene oxide)-block-poly (N-isopropylacrylamide). *Advanced Materials* **2006**, 18 (21), 2905-2909.
144. Cheng, Y.; Hao, J.; Lee, L. A.; Biewer, M. C.; Wang, Q.; Stefan, M. C., Thermally controlled release of anticancer drug from self-assembled γ -substituted amphiphilic poly (ϵ -caprolactone) micellar nanoparticles. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (7), 2163-2173.
145. Lin, Y.-K.; Wang, S.-W.; Yu, Y.-C.; Lee, R.-S., Thermoresponsive and acid-cleavable amphiphilic copolymer micelles for controlled drug delivery. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2017**, 66 (18), 943-954.

146. Ding, J.; Zhao, L.; Li, D.; Xiao, C.; Zhuang, X.; Chen, X., Thermo-responsive “hairy-rod” polypeptides for smart antitumor drug delivery. *Polymer Chemistry* **2013**, *4* (11), 3345-3356.
147. Chung, J.; Yokoyama, M.; Yamato, M.; Aoyagi, T.; Sakurai, Y.; Okano, T., Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly (N-isopropylacrylamide) and poly (butylmethacrylate). *Journal of Controlled Release* **1999**, *62* (1-2), 115-127.
148. Biswas, D.; An, S. Y.; Li, Y.; Wang, X.; Oh, J. K., Intracellular delivery of colloiddally stable core-cross-linked triblock copolymer micelles with glutathione-responsive enhanced drug release for cancer therapy. *Molecular pharmaceutics* **2017**, *14* (8), 2518-2528.
149. Zhang, Y.; Qu, Q.; Li, M.; Zhao, Y., Intracellular Reduction-Responsive Sheddable Copolymer Micelles for Targeted Anticancer Drug Delivery. *Asian Journal of Organic Chemistry* **2015**, *4* (3), 226-232.
150. Li, Y.; Wang, S.; Zhu, D.; Shen, Y.; Du, B.; Liu, X.; Zheng, Y., Reversibly cross-linked poly (ethylene glycol)–poly (amino acid) s copolymer micelles: a promising approach to overcome the extracellular stability versus intracellular drug release challenge. *RSC Advances* **2015**, *5* (26), 20025-20034.
151. Wang, X.; He, C.; Yang, Q.; Tan, L.; Liu, B.; Zhu, Z.; Gong, B.; Shen, Y.-M., Dynamic covalent linked triblock copolymer micelles for glutathione-mediated intracellular drug delivery. *Materials Science and Engineering: C* **2017**, *77*, 34-44.
152. Li, L.; Shang, L.; Chen, K.; Wang, Q.; Luo, J.; Zhou, Q.; Lin, J., Redox-Sensitive Core Cross-Linked Polyethylene Glycol-Polypeptide Hybrid Micelles for Anticancer Drug Delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2017**, *17* (7), 4532-4541.
153. Koo, A. N.; Lee, H. J.; Kim, S. E.; Chang, J. H.; Park, C.; Kim, C.; Park, J. H.; Lee, S. C., Disulfide-cross-linked PEG-poly (amino acid) s copolymer micelles for glutathione-mediated intracellular drug delivery. *Chemical Communications* **2008**, (48), 6570-6572.
154. Wang, K.; Liu, Y.; Yi, W.-J.; Li, C.; Li, Y.-Y.; Zhuo, R.-X.; Zhang, X.-Z., Novel shell-cross-linked micelles with detachable PEG corona for glutathione-mediated intracellular drug delivery. *Soft Matter* **2013**, *9* (3), 692-699.
155. Ren, T.-B.; Xia, W.-J.; Dong, H.-Q.; Li, Y.-Y., Sheddable micelles based on disulfide-linked hybrid PEG-polypeptide copolymer for intracellular drug delivery. *Polymer* **2011**, *52* (16), 3580-3586.
156. Ding, J.; Chen, J.; Li, D.; Xiao, C.; Zhang, J.; He, C.; Zhuang, X.; Chen, X., Biocompatible reduction-responsive polypeptide micelles as nanocarriers for enhanced chemotherapy efficacy in vitro. *Journal of Materials Chemistry B* **2012**, *1* (1), 69-81.
157. Shi, C.; Guo, X.; Qu, Q.; Tang, Z.; Wang, Y.; Zhou, S., Actively targeted delivery of anticancer drug to tumor cells by redox-responsive star-shaped micelles. *Biomaterials* **2014**, *35* (30), 8711-8722.

158. Deng, L.; Ren, J.; Li, J.; Leng, J.; Qu, Y.; Lin, C.; Shi, D., Magneto-thermally responsive star-block copolymeric micelles for controlled drug delivery and enhanced thermo-chemotherapy. *Nanoscale* **2015**, *7* (21), 9655-9663.
159. Liu, T.; Qian, Y.; Hu, X.; Ge, Z.; Liu, S., Mixed polymeric micelles as multifunctional scaffold for combined magnetic resonance imaging contrast enhancement and targeted chemotherapeutic drug delivery. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22* (11), 5020-5030.
160. Kim, D.-H.; Rozhkova, E. A.; Rajh, T.; Bader, S. D.; Novosad, V., Synthesis of hybrid gold/iron oxide nanoparticles in block copolymer micelles for imaging, drug delivery, and magnetic hyperthermia. *IEEE Transactions on Magnetics* **2009**, *45* (10), 4821-4824.
161. Tian, K.; Jia, X.; Zhao, X.; Liu, P., pH/reductant dual-responsive core-cross-linked micelles via facile in situ ATRP for tumor-targeted delivery of anticancer drug with enhanced anticancer efficiency. *Molecular pharmaceuticals* **2016**, *13* (8), 2683-2690.
162. Yang, H. Y.; Jang, M.-S.; Gao, G. H.; Lee, J. H.; Lee, D. S., Construction of redox/pH dual stimuli-responsive PEGylated polymeric micelles for intracellular doxorubicin delivery in liver cancer. *Polymer Chemistry* **2016**, *7* (9), 1813-1825.
163. He, C.; Yang, Q.; Tan, L.; Liu, B.; Zhu, Z.; Gong, B.; Shen, Y.-M.; Shao, Z., Design and synthesis of redox and oxidative dual responsive block copolymer micelles for intracellular drug delivery. *European Polymer Journal* **2016**, *85*, 38-52.
164. Lin, S.; Feng, S.; Mo, Y.; Tu, Y.; Guo, Y.; Hu, J.; Liu, G.; Zhong, Z.; Miao, L.; Zou, H., Dual-responsive crosslinked micelles of a multifunctional graft copolymer for drug delivery applications. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2017**, *55* (9), 1536-1546.
165. Guo, X.; Shi, C.; Yang, G.; Wang, J.; Cai, Z.; Zhou, S., Dual-responsive polymer micelles for target-cell-specific anticancer drug delivery. *Chemistry of Materials* **2014**, *26* (15), 4405-4418.
166. Tian, K.; Jia, X.; Zhao, X.; Liu, P., Biocompatible Reduction and pH Dual-Responsive Core Cross-Linked Micelles Based on Multifunctional Amphiphilic Linear-Hyperbranched Copolymer for Controlled Anticancer Drug Delivery. *Molecular pharmaceuticals* **2017**, *14* (3), 799-807.
167. Hong, W.; Chen, D.; Jia, L.; Gu, J.; Hu, H.; Zhao, X.; Qiao, M., Thermo- and pH-responsive copolymers based on PLGA-PEG-PLGA and poly (L-histidine): synthesis and in vitro characterization of copolymer micelles. *Acta biomaterialia* **2014**, *10* (3), 1259-1271.
168. Johnson, R. P.; Jeong, Y. I.; John, J. V.; Chung, C.-W.; Kang, D. H.; Selvaraj, M.; Suh, H.; Kim, I., Dual stimuli-responsive poly (N-isopropylacrylamide)-b-poly (L-histidine) chimeric materials for the controlled delivery of doxorubicin into liver carcinoma. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (5), 1434-1443.

169. Leamon, C. P.; Reddy, J. A., Folate-targeted chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews* **2004**, *56* (8), 1127-1141.
170. Lu, Y.; Segal, E.; Leamon, C. P.; Low, P. S., Folate receptor-targeted immunotherapy of cancer: mechanism and therapeutic potential. *Advanced drug delivery reviews* **2004**, *56* (8), 1161-1176.
171. Lu, Y.; Low, P. S., Immunotherapy of folate receptor-expressing tumors: review of recent advances and future prospects. *Journal of Controlled Release* **2003**, *91* (1-2), 17-29.
172. Yoo, H. S.; Park, T. G., Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *Journal of controlled release* **2004**, *96* (2), 273-283.
173. ZHA, R.-T.; HE, X.-T.; DU, T.; YUAN, Z., Synthesis and Characterization of chitosan nanoparticles modified by glycyrrhetic acid as a liver targeting drug carrier. *Chemical Journal of Chinese Universities* **2007**, 06.
174. Tian, Q.; Wang, X.; Wang, W.; Zhang, C.; Liu, Y.; Yuan, Z., Insight into glycyrrhetic acid: the role of the hydroxyl group on liver targeting. *International journal of pharmaceutics* **2010**, *400* (1-2), 153-157.
175. Tian, Q.; Zhang, C.-N.; Wang, X.-H.; Wang, W.; Huang, W.; Cha, R.-T.; Wang, C.-H.; Yuan, Z.; Liu, M.; Wan, H.-Y., Glycyrrhetic acid-modified chitosan/poly (ethylene glycol) nanoparticles for liver-targeted delivery. *Biomaterials* **2010**, *31* (17), 4748-4756.
176. Sheng-Jun, M.; Yue-Qi, B.; Hui, J.; Da-Peng, W.; Ru, H.; Shi-Xiang, H., Preparation, characterization and uptake by primary cultured rat hepatocytes of liposomes surface-modified with glycyrrhetic acid. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *62* (8), 614-619.
177. Cha, R. t.; Du, T.; Li, J. h.; Yuan, Z., Synthesis and characterization of polypeptide containing liver-targeting group. *Polymer international* **2006**, *55* (9), 1057-1062.
178. Sourani, Z.; Pourgheysari, B.; Beshkar, P.; Shirzad, H.; Shirzad, M., Gallic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in lymphoblastic leukemia cell line (C121). *Iranian journal of medical sciences* **2016**, *41* (6), 525.
179. Liu, Z.; Li, D.; Yu, L.; Niu, F., Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Chemotherapy* **2012**, *58* (3), 185-194.
180. Lee, E. S.; Na, K.; Bae, Y. H., Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *Journal of Controlled Release* **2003**, *91* (1-2), 103-113.
181. Huang, W.; Wang, W.; Wang, P.; Zhang, C.-N.; Tian, Q.; Zhang, Y.; Wang, X.-H.; Cha, R.-T.; Wang, C.-H.; Yuan, Z., Glycyrrhetic acid-functionalized degradable micelles as liver-targeted drug carrier. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2011**, *22* (4), 853-863.
182. Barth, H. G.; Mays, J. W., *Modern methods of polymer characterization*. John Wiley & Sons: 1991; Vol. 115.

183. Yalcin, T.; Dai, Y.; Li, L., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for polymer analysis: solvent effect in sample preparation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9* (12), 1303-1310.
184. Moore, J. C., Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers. *Journal of Polymer Science Part A: General Papers* **1964**, *2* (2), 835-843.
185. Moore, J.; Hendrickson, J. In *Gel permeation chromatography. II. The nature of the separation*, Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia, Wiley Online Library: 1965; pp 233-241.
186. Grubisic, Z.; Rempp, P.; Benoit, H., A universal calibration for gel permeation chromatography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **1967**, *5* (9), 753-759.
187. Zimm, B. H., The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *The Journal of Chemical Physics* **1948**, *16* (12), 1093-1099.
188. Berne, B. J.; Pecora, R., *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation: 2000.
189. Chu, B., *Laser light scattering: basic principles and practice*. Courier Corporation: 2007.
190. Koppel, D. E., Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. *The Journal of Chemical Physics* **1972**, *57* (11), 4814-4820.
191. Provencher, S. W., Inverse problems in polymer characterization: direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics* **1979**, *180* (1), 201-209.
192. Ratkanthwar, K.; Hadjichristidis, N.; Mays, J., High vacuum techniques for anionic polymerization. In *Anionic Polymerization*, Springer: 2015; pp 19-59.
193. Harris, J. M., *Poly (ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*. Springer Science & Business Media: 1992.
194. Zalipsky, S., Functionalized poly (ethylene glycols) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjugate chemistry* **1995**, *6* (2), 150-165.
195. Connelly, N. G.; Geiger, W. E., Chemical redox agents for organometallic chemistry. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (2), 877-910.
196. Kolb, H. C.; Finn, M.; Sharpless, K. B., Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2004-2021.
197. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie* **2002**, *114* (14), 2708-2711.
198. He, G.; He, Z.; Zheng, X.; Li, J.; Liu, C.; Song, X.; Ouyang, L.; Wu, F., Synthesis, characterization and in vitro evaluation of self-assembled poly

(ethylene glycol)-glycyrrhetic acid conjugates. *Letters in Organic Chemistry* **2012**, 9 (3), 202-210.

199. Kowalska, A.; Kalinowska-Lis, U., 18 β -Glycyrrhetic acid: its core biological properties and dermatological applications. *International journal of cosmetic science* **2019**, 41 (4), 325-331.