



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση και χαρακτηρισμός υβριδικών τρισυσταδικών
συμπολυμερών και σχηματισμός νανοσωματιδίων χρυσού
μέσω αυτών**

**ΚΛΕΙΔΕΡΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΗΣ 2022

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση και χαρακτηρισμός υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυμερών και σχηματισμός
νανοσωματιδίων χρυσού μέσω αυτών

ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΛΕΙΔΕΡΗΣ

A.M.: 202306

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πισικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

20/10/2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση μιας σειράς υβριδικών αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG, με διαφορετική αναλογία μονομερικών μονάδων, και η αυτο-οργάνωση τους σε μικυλλιακές δομές. Η σύνθεσή τους πραγματοποιήθηκε μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των προστατευμένων N-καρβοξυ ανυδριτών (μονομερή), με χρήση του mPEO-NH₂ ως μακροαπαρχητή. Για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων, τον καθαρισμό των διαλυτών, αλλά και για τη λήψη καλά καθορισμένων πολυμερών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού. Η επιτυχής σύνθεση όλων των πολυμερών επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές της Χρωματογραφίας Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC), του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού πρωτονίου (¹H-NMR) και της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου (FT-IR). Χρησιμοποιήθηκε, επίσης, η τεχνική Φασματοσκοπίας Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis), καθώς και η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS) προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα αυτο-οργάνωσης και το μέγεθος των συντιθέμενων νανοσωματιδίων. Τέλος παρουσιάζεται μια νέα, απλή και έξυπνη στρατηγική για τη σύνθεση υβριδικών νανοσωματιδίων που περιέχουν νανοκελύφη χρυσού (AuNSs) και έχουν την ικανότητα να απορροφούν στην εγγύς υπέρυθρη ακτινοβολία (NIR). Το υβριδικό συμπολυμερές, PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG, έχει την ικανότητα να αυτο-οργανώνεται και να σχηματίζει μικύλλια, αποτελούμενα από το υδρόφιλο κέλυφος πολυ(αιθυλενοξειδίου), μεσαία συστάδα την pH-αποκρινόμενη πολυ(ιστιδίνη) και πυρήνα το υδρόφοβο πολυ(γλουταμικό). Αρχικά, σχηματίζονται τα σφαιρικά νανοσωματίδια (NPs) και στη συνέχεια ακολουθούν η προσθήκη του HAuCl₄ και η θέρμανση του, που έχουν ως αποτέλεσμα την αναγωγή του Au(III) από την PHis, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό νανοσωματιδίων χρυσού μόνο στο στρώμα της PHis, με αποτέλεσμα το σχηματισμό νανοκελύφους χρυσού. Ελέγχοντας το πάχος του AuNS και τη διάμετρο του πυρήνα από τα μοριακά χαρακτηριστικά των πρόδρομων πολυμερών, καθώς και την αναλογία PHis/Au(III), οι οπτικές ιδιότητες των AuNSs μπορούν να ρυθμιστούν για να απορροφούν σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Πολυπεπτίδια, N-καρβοξυ ανυδρίτες, πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου, τεχνικές υψηλού κενού, νανοκελύφη χρυσού, φωτοθερμική θεραπεία

ABSTRACT

In the present research project, the synthesis of a series of hybrid responsive block tripolymers of the type PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG, with different ratios of monomeric units, and their ability to self-assemble in aqueous solutions and form micelles, is presented. The synthesis of these polymers was conducted via Ring Opening Polymerization of the corresponding protected N-Carboxy Anhydrides and mPEO-NH₂ was used as the macroinitiator. High Vacuum Techniques were used for the synthesis of N-carboxy anhydrides, the purification of solvents and the isolation of well-defined polymers. The successful synthesis of the polymers was confirmed by Size Exclusion Chromatography (SEC), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). In addition, Ultraviolet-Visible Spectrophotometry (UV-Vis) and Dynamic Light Scattering were used, in order to investigate the ability of the polypeptides to self-assemble into micelles, as well as their size. Finally, a new facile strategy for the synthesis of hybrid nanoparticles containing gold nanoshells (AuNSs) that absorb at near-infrared is presented. The hybrid copolymer, PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG, has the ability to self-assemble and form micelles, consisting of the hydrophilic poly(ethylene oxide) shell, the pH-responsive poly(histidine) middle block, and the hydrophobic poly(glutamate) core. Spherical nanoparticles (NPs) are initially formed, followed by the addition of HAuCl₄ and heating, resulting in the reduction of the Au(III) by PHis, leading to the formation of gold nanoparticles only at the layer of PHis, thus forming a nanoshell within the preformed NPs. By controlling the AuNS thickness and the core diameter by the molecular characteristics of the polymeric precursors, as well as the PHis/Au(III) ratio, the optical properties of the AuNSs can be fine-tuned to absorb at a specific wavelength.

SUBJECT AREA: Polymers

KEYWORDS: Polypeptides, N-Carboxy anhydrides, Ring Opening Polymerization, high vacuum techniques, gold nanoshells, photothermal therapy

**Στην οικογένεια και τους φίλους μου
που είναι δίπλα μου...**

“Τα ενάντια τοις εναντίοις εισίν ιάματα”
Ιπποκράτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Αρχικά, για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Ερμόλαο Ιατρού για τη συνεργασία, την καθοδήγηση, την επιστημονική και ηθική υποστήριξη και εν γένει την πολύτιμη συμβολή του, στην ολοκλήρωση της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Μαρίνο Πισικάλη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Σακελλαρίου, για τις άρτιες και υψηλού επιπέδου γνώσεις που μας μετέδωσαν στα πλαίσια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης, για τη βοήθεια και καθοδήγηση τους στην εργασία, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Ακόμα, ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Ηρώ Κύρογλου, για τη σημαντική και καθοριστική βοήθειά της και σε εργαστηριακό και σε ψυχολογικό επίπεδο, την εμπιστοσύνη της και για τη χαρούμενη διάθεση της. Ένα ακόμα ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία Κασιμάτη για την ουσιαστική της αρωγή στην εκπόνηση της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ερευνητική ομάδα του κ. Ιατρού για την αμέριστη συμβολή τους και βέβαια όλους τους μεταπτυχιακούς και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου για τις πολύτιμες γνώσεις και για το οικογενειακό κλίμα που μου προσέφεραν από την πρώτη στιγμή.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τις βαθιές μου ευχαριστίες στους φίλους μου και στην οικογένεια μου, που ήταν και είναι δίπλα μου. Όλα αυτά τα χρόνια μου παρέχουν τόσο ηθική όσο και συναισθηματική στήριξη και με βοηθούν να πραγματοποιώ κάθε μου όνειρο και στόχο. Τους ευχαριστώ ειλικρινά και τους ευγνωμονώ για ό,τι μου έχουν προσφέρει.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	18
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
2.1 Δομή των πεπτιδίων	21
2.1.1 Πεπτιδικός δεσμός	21
2.1.2 Τα τέσσερα διαφορετικά επίπεδα μιας πρωτεΐνης.....	23
2.2 Πεπτιδική σύνθεση	27
2.2.1 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με συγκεκριμένη αλληλουχία 27	
2.2.2 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση, (Μέθοδος Merrifield).....	27
2.2.3 Σύνθεση σε διάλυμα.....	29
2.3 Σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους.....	30
2.3.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου, (Ring Opening Polymerization, ROP)30	
2.3.2 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων.....	33
2.3.3 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση πρωτοταγών αμινών και τεχνικών υψηλού κενού	40
2.4 Σύνθεση N-καρβόξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων (NCAs)	42
2.5 Νανοτεχνολογία και στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων	45
2.5.1 Νανοτεχνολογία και οι εφαρμογές της.....	45
2.5.2 Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων μέσω πολυμερικών υλικών	47
2.5.3 Πολυπεπτιδικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποκρινόμενα σε εξωτερικά ερεθίσματα	51
2.5.4 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν	57
2.6 Νανοσωματίδια χρυσού [AuNPs, Gold (Au) Nanoparticles].....	63
2.6.1 Ιδιότητες και εφαρμογές των AuNPs	63

2.6.2	Μηχανισμός σχηματισμού AuNPs και AuNSs	65
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	68
3.1	Εισαγωγή.....	68
3.2	Φασματοσκοπία Υπερύθρου, (IR)	68
3.3	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών, (SEC)	70
3.4	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, (NMR)	74
3.5	Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού, (UV-Vis).....	78
3.6	Δυναμική Σκέδαση Φωτός, (DLS).....	80
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ	82
4.1	Τεχνική Υψηλού Κενού	82
4.2	Καθαρισμός διαλυτών.....	84
4.3	Σύνθεση τροποποιημένου απαρχητή mPEO-NH ₂	88
4.4	Σύνθεση και καθαρισμός μονομερών (N-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων) 91	
4.4.1	Σύνθεση και καθαρισμός του N-καρβοξυ ανυδρίτη της N ^(im) -Trityl-(L)- Histidine (N ^(im) -Trt-(L)-His NCA).....	91
4.4.2	Σύνθεση και καθαρισμός του N-καρβοξυ ανυδρίτη του γ-βενζυλο-(L)- γλουταμικού οξέος, (BLG NCA).....	97
4.5	Σύνθεση υβριδικών πολυπεπτιδικών πολυμερών	99
4.5.1	Σύνθεση κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO- <i>b</i> -P(Trt-His) _n - <i>b</i> - PBLG ₂₀ με χρήση PEO-NH ₂ ως μακροαπαρχητή.....	99
4.5.2	Εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της πολυ(Ιστιδίνης), (PHis) 105	
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	109
5.1	Χαρακτηρισμός του N ^(im) -Trityl-L-Histidine N-Carboxy Anhydride, (N ^(im) -Trt-L-His NCA) 109	
5.2	Χαρακτηρισμός του γ-Benzyl-L-Glutamate N-Carboxy Anhydride (BLG NCA) 111	

5.3	Αποτελέσματα δοκιμαστικού πολυμερισμού με τροποποιημένο μακροαπαρχητή PEO-NH ₂	113
5.4	Χαρακτηρισμός των κατά συστάδων συμπολυμερών του τύπου poly(ethyleneoxide) ₂₂₈ - <i>b</i> -poly(L-Histidine) _n - <i>b</i> -poly(γ-benzyl-glutamate) ₂₀ , (PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis _n - <i>b</i> -PBLG ₂₀)	117
5.5	Μελέτη Νανοσωματιδίων Χρυσού	126
5.6	Μελέτη των Νανοσωματιδίων Χρυσού με φασματοσκοπία UV-Vis	128
5.7	Μελέτη Νανοσωματιδίων Χρυσού με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)	131
5.8	Αποδοτικότητα φωτοθερμικής μετατροπής των AuNPs.....	134
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	137
7.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	139
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	142

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού, ευνοείται η υδρόλυση.	21
Σχήμα 2: α) Ο πεπτιδικός δεσμός έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού. β) Γωνίες στροφής αμινοξέος.	22
Σχήμα 3: Στάδια σύνθεσης με την τεχνική Merrifield.....	28
Σχήμα 4: Αντίδραση AROP.....	32
Σχήμα 5: Γενική αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs.	33
Σχήμα 6: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM).	35
Σχήμα 7: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του απαρχητή στο καρβονύλιο στη θέση 2.....	36
Σχήμα 8: Στάδια έναρξης και διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό Blout.....	37
Σχήμα 9: Στάδια ενεργοποίησης και έναρξης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-Καρβόξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM).....	38
Σχήμα 10: Στάδιο διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-Καρβόξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM).	39
Σχήμα 11: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών.....	43
Σχήμα 12: Τα νανοσωματίδια με πολυαιθυλενοξειδίο μπορούν να αποφύγουν την απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία του αίματος, απωθώντας την απορρόφηση πρωτεϊνών, παρατείνοντας έτσι την παραμονή των νανοσωματιδίων στο αίμα.	58
Σχήμα 13: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης).	60
Σχήμα 14: Μέθοδοι για τη σύνθεση πολυμερικών νανοσωματιδίων χρυσού.	65
Σχήμα 15: Πορεία σύνθεσης των νανοκελυφών χρυσού (AuNSs).....	67
Σχήμα 16: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης SEC.....	71
Σχήμα 17: Διάταξη φασματοφωτόμετρου απλής δέσμης.....	80
Σχήμα 18: Αντίδραση χημικής τροποποίησης του mPEO-OH σε mPEO-NH ₂	88

Σχήμα 19: Αντιδράσεις σύνθεσης του προστατευμένου ανυδρίτη της L-ιστιδίνης N ^(im) -Trityl-(L)-His NCA.	92
Σχήμα 20: Αντίδραση σύνθεσης του ανυδρίτη του γ-Benzyl-L-Glutamate BLG NCA. ...	99
Σχήμα 21: Αντίδραση πολυμερισμού του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(Trt-His) _n - <i>b</i> -PBLG ₂₀ με χρήση PEO-NH ₂ ως μακροαπαρχηγή.	105
Σχήμα 22: Αντίδραση εκλεκτικής αποπροστασίας των δομικών μονάδων της P(Trt-His) προς σχηματισμό του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis _n - <i>b</i> -PBLG ₂₀	108
Σχήμα 23: Φάσματα IR του πρόδρομου αμινοξέος, του υδροχλωρικού άλατος του NCA και του τελικού καθαρού N ^(im) -Trityl-L-His NCA.....	110
Σχήμα 24: Φάσμα ¹ H-NMR του N ^(im) -Trityl-L-His NCA σε διαλύτη CDCl ₃	111
Σχήμα 25: Φάσματα IR του πρόδρομου αμινοξέος, μετά την προσθήκη του τριφωσγενίου και του τελικού BLG NCA.	112
Σχήμα 26: Φάσμα ¹ H-NMR του BLG NCA σε διαλύτη CDCl ₃	113
Σχήμα 27: Φάσμα ¹ H-NMR του μακροαπαρχηγή PEO-NH ₂ σε διαλύτη CDCl ₃	114
Σχήμα 28: Φάσμα IR του δοκιμαστικού πολυμερούς PEO- <i>b</i> -PBLG ₂₀	115
Σχήμα 29: Φάσμα ¹ H-NMR του PEO- <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε CDCl ₃	116
Σχήμα 30: Χρωματογράφημα SEC των PEO-NH ₂ και PEO- <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε διαλύτη DMF.	117
Σχήμα 31: Φάσματα IR πριν την προσθήκη του BLG και του τελικού προστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(Trt-His) ₅ - <i>b</i> -PBGL ₂₀	118
Σχήμα 32: Φάσμα IR του προστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(Trt-His) ₅ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ και του αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis ₅ - <i>b</i> -PBLG ₂₀	118
Σχήμα 33: Φάσματα IR πριν την προσθήκη του BLG NCA και του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(Trt-His) ₁₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ ,	119
Σχήμα 34: Φάσμα IR του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis ₁₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ (κάτω).	120
Σχήμα 35: Φάσματα IR πριν την προσθήκη του BLG NCA και του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(Trt-His) ₃₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀	120

Σχήμα 36: Φάσμα IR του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis ₃₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ (κάτω).....	121
Σχήμα 37: Φάσμα ¹ H-NMR του αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis ₅ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε d-TFA.....	122
Σχήμα 38: Φάσμα ¹ H-NMR του αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis ₁₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε d-TFA.....	122
Σχήμα 39: Φάσμα ¹ H-NMR του αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO- <i>b</i> -PHis ₃₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε d-TFA.....	123
Σχήμα 40: Διαγράμματα SEC για τον μακροαπαρχητή PEO-NH ₂ και τα συμπολυμερή PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(Trt-His) ₁₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ και PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(Trt-His) ₅ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε διαλύτη DMF.	124
Σχήμα 41: Διαγράμματα SEC για το PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(Trt-His) ₃₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε DRI και UV ανιχνευτή.	125
Σχήμα 42: Φάσματα IR του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₃₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ (μαύρο) και του ίδιου πολυμερούς μετά το σχηματισμό των νανοσφαιρών χρυσού (κόκκινο).	127
Σχήμα 43: Φάσματα UV-Vis των νανοσωματιδίων χρυσού για το PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₅ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε διάφορες αναλογίες PHis/Au(III).	129
Σχήμα 44: Φάσματα UV-Vis των νανοσωματιδίων χρυσού για το PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₁₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε διάφορες αναλογίες PHis/Au(III).	130
Σχήμα 45: Φάσματα UV-Vis των νανοσωματιδίων χρυσού για το PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₃₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε διάφορες αναλογίες PHis/Au(III).	131
Σχήμα 46: Μελέτη αυτο-οργάνωσης με Δυναμική Σκέδαση Φωτός του PEO- <i>b</i> -PHis ₃₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ πριν την προσθήκη H ₂ AuCl ₄ , στους 25 °C.	133
Σχήμα 47: Διαγράμματα DLS έντασης συναρτήσει της διαμέτρου των PEO- <i>b</i> -PHis ₃₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ AuNPs για τις διάφορες αναλογίες PHis/Au(II).	134
Σχήμα 48: Μεταβολή της θερμοκρασίας των AuNPs αναλογίας PHis ₃₀ /Au(III) : 7/1 και του milli-Q μετά από ακτινοβόληση από πηγή μονάδας λέιζερ (808nm) για 25 min. ...	136

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Πορεία σχηματισμού νανοκελυφών χρυσού με βάση το πολυμερές PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PBLG.	20
Εικόνα 2: Κατεύθυνση πεπτιδικού δεσμού.	22
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α έλικας και της β πτυχωτής επιφάνειας.	24
Εικόνα 4: Τριτοταγής δομή.	26
Εικόνα 5: Τα επίπεδα οργάνωσης των πρωτεϊνών.	27
Εικόνα 6: Μερικοί χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά.	45
Εικόνα 7: Χαρακτηριστικά μεγέθη μορίων, νανοϋλικών και βιολογικών οντοτήτων.	46
Εικόνα 8: Κυριότεροι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών.	49
Εικόνα 9: Απεικόνιση ενός πολυμερικού νανοσωματιδίου.	50
Εικόνα 10: Τα κυριότερα εξωτερικά ερεθίσματα που προκαλούν απόκριση στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες.	52
Εικόνα 11: Χημική δομή Γλουταθειόνης.	56
Εικόνα 12: Χημική δομή PEO.	57
Εικόνα 13: Χημική δομή Ιστιδίνης.	59
Εικόνα 14: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα.	61
Εικόνα 15: Χημική δομή του πολυ(γ-βένζυλο-L-γλουταμικού οξέος).	62
Εικόνα 16: Διαγράμματα των επιφανειακών πλασμονίων. (Α) Πολλαπλασιαστική ενέργεια πλασμονίου (SPP) που παράγεται στη μεταλλική-διηλεκτρική διεπαφή. (Β) εντοπισμένος συντονισμός επιφανειακού πλασμονίου (LSPR) που παράγονται στα μεταλλικά νανοσωματίδια. (Γ) Διάσπαση με τρεις διαφορετικούς τρόπους (ηλεκτρόνιο σε φωτόνιο, ηλεκτρόνιο σε ηλεκτρόνιο και ηλεκτρόνιο σε φωτόνιο) και παραγωγή τοπικής θέρμανσης. ^[80]	64
Εικόνα 17: Διαχωρισμός μακρομορίων διαφορετικού υδροδυναμικού όγκου.	73

Εικόνα 18: Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.	78
Εικόνα 19: Απεικόνιση της γραμμής υψηλού κενού.	83
Εικόνα 20: Απόσταξη βενζολίου για απομάκρυνση υγρασίας.....	88
Εικόνα 21: Κατάλληλη διάταξη για μετατροπή PEO-OH σε PEO-NH ₂	90
Εικόνα 22: Διάλυμα της Boc-His(Trt)-OH σε THF πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την αντίδραση με το SOCl ₂	93
Εικόνα 23: N ^(im) -Trt-His-NCA*HCl	95
Εικόνα 24: N ^(im) -Trt-(L)-His-NCA*HCl σε EtOAc.	96
Εικόνα 25: Ειδικά σχεδιασμένη συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των συμπολυμερών PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PBLG.	101
Εικόνα 26: Απόσταξη διαλύτη DMF.....	102
Εικόνα 27: Πορεία του πολυμερισμού του συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(Trt-His)- <i>b</i> -PBLG.	104
Εικόνα 28: Διάλυμα του πολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(Trt-His)- <i>b</i> -PBLG σε TFA πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την προσθήκη ποσότητας (iPr) ₃ SiH, αντίστοιχα.	106
Εικόνα 29: Διαδικασία διαπίδυσης για την απομάκρυνση των τρίτυλο-προστατευτικών ομάδων.....	107
Εικόνα 30: Πειραματική διάταξη για σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού.	126
Εικόνα 31: Αναπαράσταση σχηματισμού ναοκελυφών χρυσού.	128
Εικόνα 32: Πειραματική διάταξη για τη μελέτη απόδοσης της φωτοθερμικής μετατροπής των AuNPs.	135
Εικόνα 33: Μεταβολή των οπτικών ιδιοτήτων των διαλυμάτων των νανοσωματιδίων χρυσού σε διάφορες αναλογίες mol His/mol Au(III).	138

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σχετικές συχνότητες εμφάνισης αμινοξέων στη δευτεροταγή δομή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.	25
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά παραδείγματα ROP μονομερών.....	32
Πίνακας 3: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1} . ..	70
Πίνακας 4: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (ppm).	76
Πίνακας 5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των συμπολυμερών που παρασκευάστηκαν.	108
Πίνακας 6: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS στο συμπολυμερές $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{30}\text{-}b\text{-PBLG}_{20}$ πριν και μετά την προσθήκη χρυσού.	132

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Βιομηχανικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την χρονική περίοδο 2020-2022, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ερμόλαου Ιατρού.

Στόχος της παρούσας εργασίας, είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός αποκρίσιμων συμπολυμερών, καθώς και η μελέτη αυτο-οργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα, με απώτερο σκοπό το σχηματισμό νανοσωματιδίων χρυσού και την απορρόφησή τους στο NIR, μέσω του ελέγχου των μοριακών χαρακτηριστικών των πολυμερών. Το παρόν ερευνητικό θέμα προσφέρει ευκαιρία περαιτέρω διερεύνησης του πεδίου των πολυπεπτιδικών νανοσωματιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς καρκινικών φαρμάκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

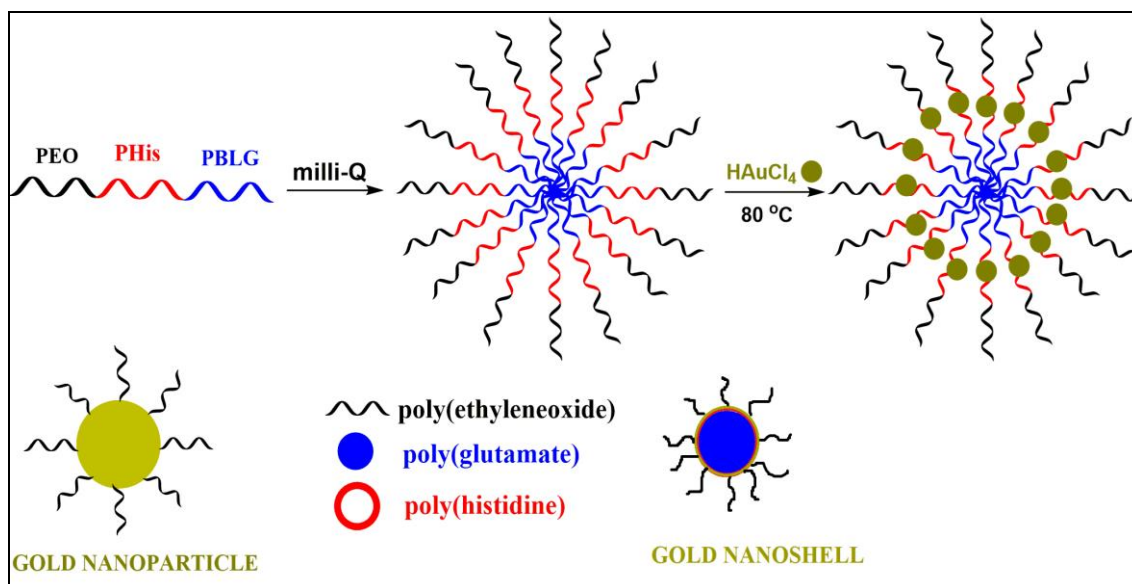
Τις προηγούμενες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί τεράστια ανάπτυξη στη χημεία των πεπτιδίων, όχι μόνο όσον αφορά την απομόνωση, τη σύνθεση, την ταυτοποίηση δομής και τη διαλεύκανση του τρόπου δράσης τους, αλλά και την εφαρμογή τους ως εργαλεία στο πλαίσιο των επιστημών υγείας. Τα πεπτίδια παρουσιάζουν ενδιαφέρον όχι μόνο στη βιοχημεία, αλλά και στη φαρμακευτική και τη γονιδιακή θεραπεία.

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

Από τα μέσα του προηγούμενου κιόλας αιώνα αναπτύχθηκαν πολλές μέθοδοι για τη σύνθεση πεπτιδίων. Όμως, μέχρι και σήμερα, η πιο γρήγορη, η πιο αποδοτική και η οικονομικότερη τεχνική για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, είναι ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (Ring Opening Polymerization, ROP) των N-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων. Αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε για τη σύνθεση των τρισυσταδικών συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG της παρούσας εργασίας, τα οποία και μελετήθηκαν.

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα και να οργανωθούν σε διάφορες δομές, όπως μικύλλια, σε υδατικά διαλύματα. Αυτό το γεγονός τα καθιστά ικανά να χρησιμοποιηθούν σαν νανομεταφορείς που μπορούν να διαλυτοποιούν υδρόφοβα φάρμακα, αυξάνοντας το χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα και οδηγώντας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στον οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, στα πολυμερή που συντέθηκαν

το πολυ(αιθυλενοξείδιο) PEO αποτελεί το υδρόφιλο εξωτερικό τμήμα των νανοσωματιδίων, είναι βιοσυμβατό, αποικοδομήσιμο και εγκεκριμένο από τον FDA, ενώ ταυτόχρονα δεν αντιδρά με τις πρωτεΐνες του ορού του αίματος, που θα το αναγνώριζαν ως αντιγόνο, δίνοντας στο σύστημα “stealth” ιδιότητες. Το ενδιάμεσο τμήμα του μικυλλίου αποτελεί η πολυ(ιστιδίνη), η οποία εξαιτίας του μη υποκατεστημένου αζώτου στον ιμιδαζολικό της δακτύλιο, το οποίο μπορεί να πρωτονιώνεται σε χαμηλότερο pH (5.0-6.5), δηλαδή το pH που κυριαρχεί στους καρκινικούς ιστούς, μετατρέπεται από υδρόφοβη σε υδρόφιλη. Τέλος, σαν πυρήνας του μικυλλίου χρησιμοποιείται το υδρόφοβο και πολύ σταθερό πολυ(γ-βένζυλο-L-γλουταμικό οξύ). Επίσης, τα πολυμερή αυτά έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν νανοκελύφη χρυσού (AuNPs), τα οποία είναι δυνατόν να απορροφούν στο εγγύς υπεριώδες και έτσι να χρησιμοποιούνται για φωτοθερμική θεραπεία. Με το σύστημα αυτό εισάγεται μια καινοτόμα ιδέα στον τομέα των Βιοπολυμερών και της Νανοϊατρικής, η οποία μπορεί να αναπτυχθεί με περαιτέρω έρευνα, οδηγώντας σε ελπιδοφόρα αποτελέσματα ικανά και υποσχόμενα να δώσουν ένα οριστικό τέλος στη μάστιγα του καρκίνου.



Εικόνα 1: Πορεία σχηματισμού νανοκελυφών χρυσού με βάση το πολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG.

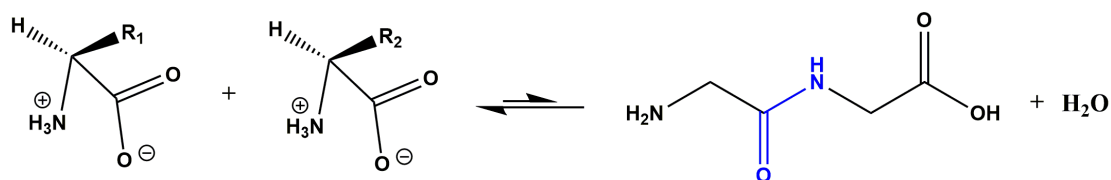
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Δομή των πεπτιδίων

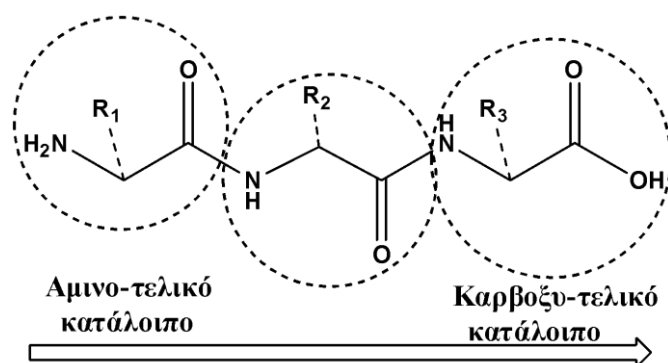
2.1.1 Πεπτιδικός δεσμός

Τα μονομερικά στοιχεία των πρωτεϊνών (ως πολυμερή) είναι τα αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικό ή αλλιώς αμιδικό δεσμό. Ο πεπτιδικός δεσμός είναι ομοιοπολικός και σχηματίζεται όταν δυο αμινοξέα τοποθετούνται το ένα δίπλα στο άλλο κατά τρόπο ώστε η καρβοξυλομάδα του ενός να βρίσκεται ακριβώς δίπλα στην αμινομάδα του άλλου και να ενώνονται με την αντίδραση πολυσυμπύκνωσης, κατά την οποία αφαιρείται ένα μόριο νερού. Όταν αυτή η διαδικασία επαναληφθεί πολλές φορές, προκύπτει ένα πολυπεπτίδιο, δηλαδή ένα πολυμερές από πολλά αμινοξέα που συνδέονται με πεπτιδικό δεσμό. Στο ένα άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας υπάρχει πάντοτε μια ελεύθερη αμινομάδα, ενώ στο αντίθετο άκρο υπάρχει μια ελεύθερη καρβοξυλομάδα. Έτσι, η αλυσίδα έχει ένα αμινοτελικό άκρο (άκρο N) και ένα καρβοξυτελικό άκρο (άκρο C). Πολλά αμινοξέα ενώνονται διαδοχικά μέσω πεπτιδικών δεσμών δημιουργώντας μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ του καρβονυλίου και του αζώτου είναι άκαμπτος και επίπεδος, έχοντας χαρακτήρα μερικώς διπλού δεσμού (1.32 Å) λόγω απεντοπισμού των ηλεκτρονίων μέσω δομών συντονισμού. Το γεγονός αυτό εμποδίζει την ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον δεσμό αυτό και μειώνει την δραστηρότητα του, καθιστώντας τον κινητικά σταθερό.^{[1][2]} Η ισορροπία της αντίδρασης ευνοείται προς την υδρόλυση παρά προς το διπεπτίδιο.



Σχήμα 1: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού, ευνοείται η υδρόλυση.

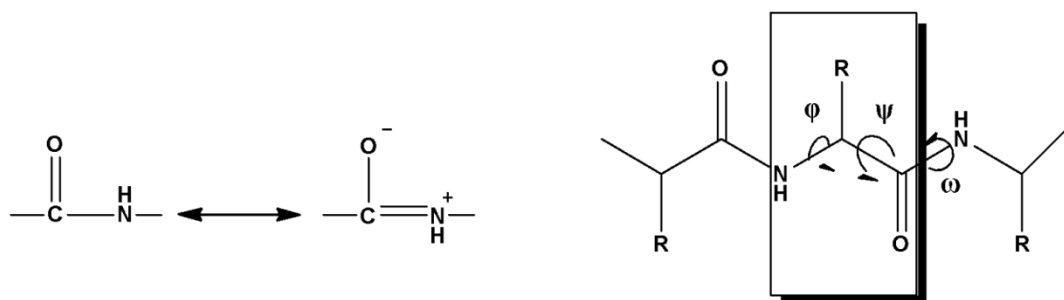
Επιπλέον, κάθε αλυσίδα έχει κατεύθυνση καθώς τα δομικά της στοιχεία έχουν διαφορετικά άκρα (Εικόνα 2). Από χημικής πλευράς δεν υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων.



Εικόνα 2: Κατεύθυνση πεπτιδικού δεσμού.

Το 1951, οι Pauling και Corey απέδειξαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αμινοξέων, αμιδίων τους και απλών πεπτιδίων ότι ο δεσμός C-N είναι βραχύτερος από τον απλό δεσμό. Η απεντόπιση λόγω συντονισμού προσδίδει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού. Η διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας χαρακτηρίζεται από τρεις γωνίες στροφής (την ϕ {C(=O)-N-Ca-C(=O)}, την ψ {N-Ca-C(=O)-N} και την ω {Ca-C(=O)-N-C-}).

Η ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον C-N αμιδικό δεσμό περιορίζεται δραστικά με ένα φράγμα περιστροφής $\sim 105 \text{ kJ mol}^{-1}$. Αντίθετα οι δεσμοί μεταξύ ενός ατόμου α-άνθρακα και του αζώτου και του άνθρακα του καρβονυλίου είναι καθαρά απλοί. Επομένως υπάρχει μεγάλη ελευθερία περιστροφής γύρω από αυτούς τους δεσμούς και προς τις δυο πλευρές της άκαμπτης πεπτιδικής ομάδας. Οι διαμορφώσεις που λαμβάνονται είναι η trans ($\omega=180^\circ$) και η cis ($\omega=0^\circ$).^[3]



Σχήμα 2: α) Ο πεπτιδικός δεσμός έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού. β) Γωνίες στροφής αμινοξέος.

2.1.2 Τα τέσσερα διαφορετικά επίπεδα μιας πρωτεΐνης

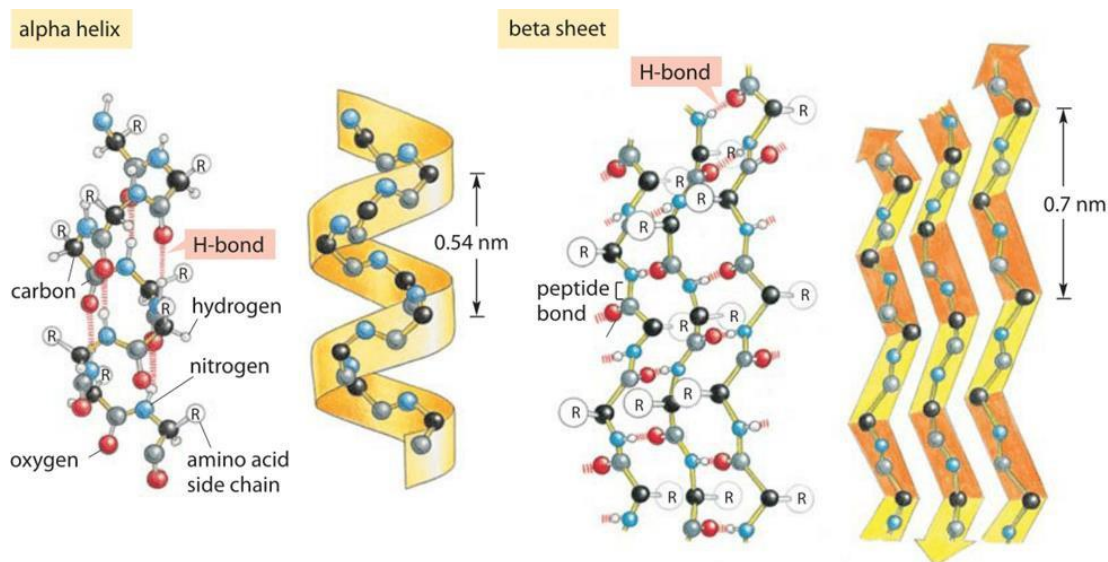
Η **πρωτοταγής δομή** μιας πρωτεΐνης είναι η γραμμική αλληλουχία των αμινοξέων σε πεπτιδίο, η οποία καθορίζεται από τα γονίδια και πληροφορεί για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η πρωτοταγής δομή είναι η πιο σημαντική καθώς ακόμα και μια μικρή αλλαγή σε αυτή μπορεί να επηρεάσει το σχήμα και τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.^[1]

Η **δευτεροταγής δομή** αφορά τον τρόπο με τον οποίο η πρωτεϊνική αλυσίδα (πρωτοταγής δομή) αναδιπλώνεται έτσι ώστε η πρωτεΐνη να έχει τη μεγαλύτερη σταθερότητα (δομή ελάχιστης ενέργειας). Οι κυριότεροι παράγοντες που καθορίζουν τη δευτεροταγή δομή είναι: οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου με αμινομάδες άλλων αμινοξέων και η διευθέτηση των πλευρικών αλυσίδων που θα πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να αποφεύγεται η στερεοχημική παρεμπόδιση και η άπωση μεταξύ των φορτισμένων ομάδων. Έτσι, ο όρος δευτεροταγής δομή αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο τμήματα μιας πεπτιδικής αλυσίδας προσανατολίζονται, λόγω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων.^[3]

- α έλικα

Η α-έλικα έχει δομή ράβδου. Η σφιχτά ελιγμένη πολυπεπτιδική κύρια αλυσίδα σχηματίζει το εσωτερικό μέρος της ράβδου, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες εκτείνονται προς το εξωτερικό σε μία ελικοειδή διαμόρφωση (Εικόνα 3).^[3] Η α-έλικα σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ομάδων NH και CO της κύριας αλυσίδας. Η ομάδα CO είναι ενωμένη με δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH του αμινοξέος που βρίσκεται 4 μονάδες μπροστά από αυτή στη γραμμική αλληλουχία. Επομένως, όλες οι ομάδες -CO και -NH της κύριας αλυσίδας συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Κάθε κατάλοιπο απέχει από το προηγούμενο 0,15 nm (1,5 Å) κατά μήκος του άξονα της έλικας και έχει περιστραφεί σε σχέση με αυτό κατά 100°, δίνοντας έτσι 3,6 αμινοξέα ανά στροφή της έλικας. Επομένως, αμινοξέα που απέχουν τρεις ή τέσσερις θέσεις στη γραμμική αλληλουχία βρίσκονται πολύ κοντά σε μία α-έλικα. Αντιθέτως, αμινοξέα που απέχουν δύο θέσεις στη γραμμική αλληλουχία βρίσκονται απέναντι στην έλικα και επομένως δεν είναι δυνατόν να συναντηθούν. Το

βήμα της έλικας είναι 0,54 nm, δηλαδή το γινόμενο της μετατόπισης (0,15 nm) και του αριθμού των καταλοίπων ανά στροφή (3,6). Η φορά στροφής μπορεί να είναι είτε προς τα δεξιά είτε προς τα αριστερά. Οι α-έλικες στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες είναι δεξιόστροφες, γιατί η αριστερόστροφη ευνοείται λιγότερο ενεργειακά.^{[4][5]}



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α έλικας και της β πτυχωτής επιφάνειας.

- β-ΠΤΥΧΩΤΗ

Η β-φυλλοειδής διαμόρφωση είναι εξίσου σημαντική και συχνά απαντώμενη σε πολλές πρωτεΐνες.^[6] Είναι δομή ανοικτή και επίπεδη με τους δεσμούς υδρογόνου να σχηματίζονται διαμοριακά μεταξύ –NH και –CO διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων στην ίδια αλυσίδα ενός β-φύλλου είναι περίπου 0,35 nm και μεταξύ γειτονικών αλυσίδων περίπου 0,6 nm. Γειτονικές αλυσίδες σε μία β-πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες)^{[7][8][9]} ή αντίθετη (αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες). Η βαλίνη, η ισολευκίνη, η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη είναι μερικά από τα αμινοξέα που δημιουργούν δομή β-φύλλου.^[1]

Άλλες περιοδικές δομές που σχηματίζονται είναι η β-στροφή (β-turn) και η ω-θηλιά (ω-loop). Η β-στροφή έχει δομή φουρκέτας, όπου σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου στην ίδια αλυσίδα μεταξύ της ομάδας –CO της θέσης n ενός πολυπεπτιδίου και της ομάδας –NH που απέχει 3 κατάλοιπα (n+3) από

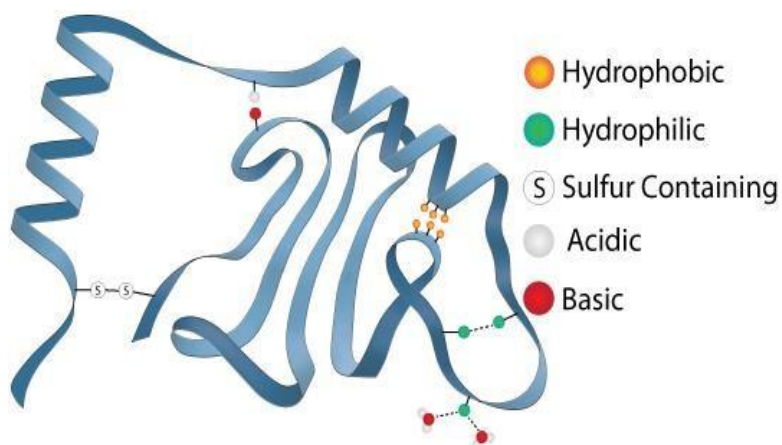
αυτή τη θέση. Με τον τρόπο αυτό μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάξει ξαφνικά την κατεύθυνσή της. Η ω-θηλιά αναφέρεται σε ένα μεγαλύτερο βρόγχο που συνδέει πρωτεϊνικά τμήματα και στον οποίο δεν σχηματίζονται ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου.^[9]

Πίνακας 1: Σχετικές συχνότητες εμφάνισης αμινοξέων στη δευτεροταγή δομή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.

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

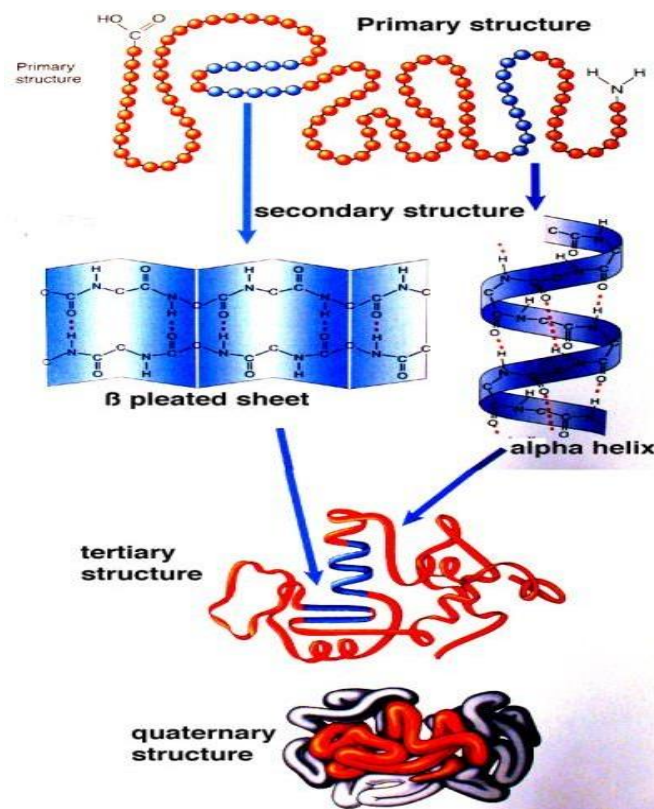
Η **τριτοταγής δομή** περιγράφει τον τρόπο περιέλιξης ολόκληρου του μορίου συνολικά στον χώρο και πληροφορεί για τις αναδιπλώσεις των περιοχών

μεταξύ α -ελικών και β -πτυχωτών επιφανειών. Χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ μακρινών κατάλοιπων της ίδιας πρωτεΐνης, καθώς και από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις όπως οι ομοιοπολικοί δεσμοί, η ηλεκτροστατική έλξη, οι δεσμοί υδρογόνου και οι δυνάμεις Van der Waals. Η δομή αυτή καθορίζεται κατά κύριο λόγο από την πρωτοταγή δομή, αφού αυτή είναι υπεύθυνη για τα μόρια που εμπεριέχονται και τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται.^{[1][3]}



Εικόνα 4: Τριτοταγής δομή.

Η **τεταρτοταγής δομή** περιγράφει τον τρόπο αλληλεπίδρασης πολλών πρωτεϊνικών μορίων (υπομονάδων) μεταξύ τους, ο οποίος πραγματοποιείται μη ομοιοπολικώς, με τον σχηματισμό μεγάλων δομικών συσσωματωμάτων. Πρωτεΐνη με μια υπομονάδα (η οποία συνεπώς στερείται τεταρτοταγούς δομής) χαρακτηρίζεται ως μονομερής, με δυο διμερής και κατ' αντιστοιχία τριμερής, τετραμερής κλπ.^{[3][10]} Οι περιοχές επαφής μεταξύ των υπομονάδων έχουν πολλές φορές λειτουργική σημασία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τεταρτοταγούς δομής είναι η αιμοσφαιρίνη.



Εικόνα 5: Τα επίπεδα οργάνωσης των πρωτεϊνών.

2.2 Πεπτιδική σύνθεση

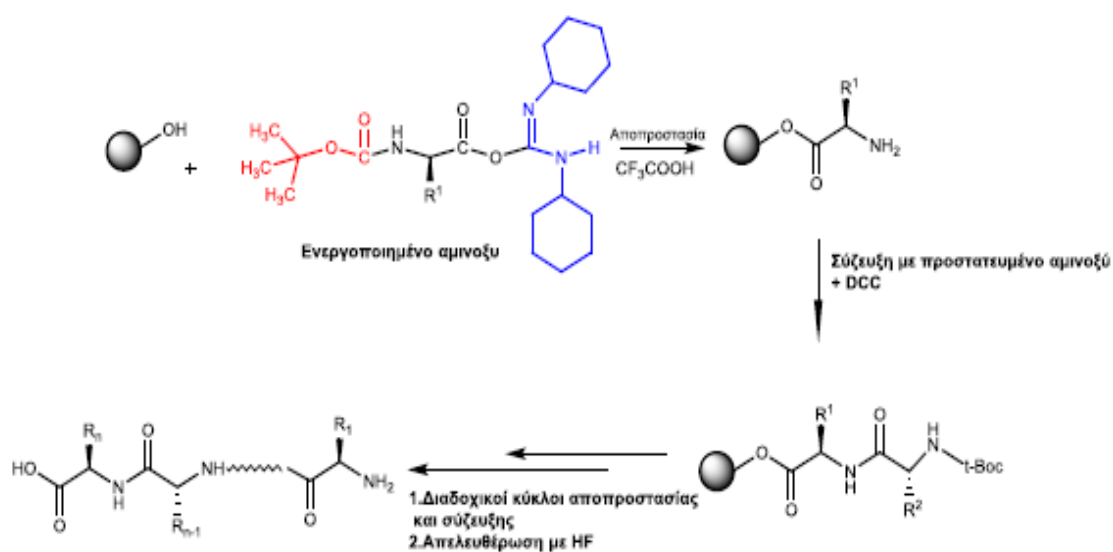
2.2.1 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με συγκεκριμένη αλληλουχία

Η σύνθεση των πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων, είναι πολύ σημαντική γιατί βρίσκει εφαρμογές σε μελέτες με φαρμακευτικό και ιατρικό ενδιαφέρον. Η σύνθεση αυτού του είδους των πεπτιδίων είναι δύσκολη, απαιτητική και δαπανηρή διαδικασία, εντούτοις λαμβάνει χώρα μέσω των ακόλουθων επικρατέστερων μεθόδων.^[11]

2.2.2 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση, (Μέθοδος Merrifield)

Τα προβλήματα που εμφανίζονται στην σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων, όπως η δυσδιαλυτότητα και ο αυξημένος χρόνος αντίδρασης, ξεπεράστηκαν με την σύζευξη σε στερεή φάση που εισήχθη και αναπτύχθηκε από τον Bruce Merrifield το 1963 (βραβείο Nobel το 1984).^[12] Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, η αναπτυσσόμενη πεπτιδική αλυσίδα είναι ενωμένη με χημικό δεσμό σε

υπόστρωμα αδιάλυτο στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες της σύνθεσης. Έτσι, είναι δυνατή η απομάκρυνση της περίσσειας των αντιδραστηρίων και των παραπροϊόντων με απλή διήθηση (filtration) και εκπλύσεις. Οι μέθοδοι προστασίας και σύζευξης παραμένουν οι ίδιες με αυτές της σύνθεσης σε διάλυμα (προστασία όλων των δυνατών θέσεων αντίδρασης), με επιπλέον την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης, όπως το δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC), και την αντίδραση μιας ελεύθερης αμινομάδας με το ενεργό καρβοξύλιο για την δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού.



Σχήμα 3: Στάδια σύνθεσης με την τεχνική Merrifield.

Συνήθως ως στερεά φάση χρησιμοποιείται δικτυωμένο πολυστυρένιο με μια δραστική ομάδα ανά εκατό αρωματικούς δακτυλίους (Σχήμα 3). Το προστατευμένο αμινοξύ συνδέεται στο υπόστρωμα με εστερικό δεσμό. Στην συνέχεια απομακρύνεται η προστατευτική ομάδα, γίνεται έκπλυση του αντιδραστηρίου και προστίθεται νέο αμινοξύ και αντιδραστήριο σύζευξης. Ακολουθούν εν συνεχεία τόσο κύκλοι όσοι είναι τα αμινοξέα που θέλουμε να προσθέσουμε στην αλυσίδα, ενώ στο τέλος της σύνθεσης τα πεπτίδια απελευθερώνονται με προσθήκη HF, που διασπά τον καρβοξυλικό εστέρα, ενώ την ίδια στιγμή απομακρύνονται και προστατευτικές ομάδες σε πιθανές πλευρικές αλυσίδες. Ως αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε αρχικά το N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC), αλλά σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως

το N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC), διότι είναι πιο διαλυτό στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες και απομακρύνεται ευκολότερα.^{[12][13]}

Πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η μεγάλη ταχύτητα, ο αυτοματισμός, η αποφυγή δυσδιαλυτότητας και η αυξημένη απόδοση. Η μεγάλη σπουδαιότητα της μεθόδου οφείλεται στο ότι είναι η μοναδική μέχρι σήμερα που εξασφαλίζει καθορισμένη αλληλουχία στα πεπτίδια. Από την άλλη, μειονεκτήματα αποτελούν τα πολλά στάδια αποπροστασίας και σύζευξης. οι ισχυρά όξινες συνθήκες που απαιτούνται για την απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη που μπορεί να προκαλέσουν ζημιά στην πεπτιδική αλυσίδα και τέλος και το πιο βασικό ότι το τελικό προϊόν είναι της τάξης των mg.

2.2.3 Σύνθεση σε διάλυμα

Ένα αμινοξύ προσκολλημένο σε ένα διαλυτό πολυμερές, από την καρβοξυλική του ομάδα μπορεί να ακυλιωθεί από ένα κατάλληλα προστατευμένο και ενεργοποιημένο αμινοξύ, και να αρχίσει με αυτόν τον τρόπο η σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας. Τα ενδιάμεσα πεπτίδια, καταβυθίζονται και εκπλένονται για να απομακρυνθούν όσα από τα αντιδρώντα δεν αντέδρασαν, και παραπροϊόντα. Το καθαρό προϊόν επαναδιαλύεται, αποπροστατεύεται, ακυλιώνεται ξανά σε διάλυμα κ.ο.κ. Μετά από τη σύζευξη, η πεπτιδική σύνθεση μπορεί να συνεχιστεί με απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων. Όταν χρησιμοποιούνται αμινοξέα με τρεις λειτουργικές ομάδες, θεωρείται απαραίτητη η προστασία της δραστικής πλευρικής ομάδας. Ενώ όμως οι πλευρικές ομάδες πρέπει να παραμένουν προστατευμένες καθ' όλη την διάρκεια της σύνθεσης, η α-προστατευτική ομάδα (αμινομάδα ή καρβοξυλομάδα) πρέπει να απομακρύνεται εύκολα πριν από κάθε σύζευξη. Επομένως, απαιτούνται δύο είδη προστατευτικών ομάδων που να έχουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς τα αντιδραστήρια αποπροστασίας. Μετά το τέλος της σύνθεσης, οι προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται και λαμβάνεται το επιθυμητό πεπτίδιο, το οποίο στη συνέχεια καθαρίζεται από τα παραπροϊόντα.^[11] Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μέγιστη προστασία όλων των δραστικών ομάδων που μειώνει τις πιθανότητες πραγματοποίησης παράπλευρων αντιδράσεων, ενώ βασικά μειονεκτήματα είναι η δυσκολία απομάκρυνσης των προστασιών στο τέλος

της σύνθεσης καθώς και η αυξημένη δυσδιαλυτότητα που εμφανίζουν τα μεγαλύτερα πεπτιδία. Για τον λόγο αυτό στην σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων προτιμάται η ελάχιστη προστασία.

2.3 Σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους με καθορισμένο βαθμό πολυμερισμού, μοριακή σύσταση και άρα συγκεκριμένες ιδιότητες που να μπορούν να μιμηθούν επαρκώς τις ιδιότητες των φυσικών πρωτεϊνών, συμβαίνει με τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP) των N-καρβοξυ ανυδριτών (N-Carboxy Anhydrides, NCAs) των α-αμινοξέων. Η συμβατική μέθοδος σύνθεσης σε στερεά φάση δεν μπορεί να εφαρμοστεί στη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, εξαιτίας των πολλών σταδίων αποπροστασίας και σύζευξης που την καθιστούν εξαιρετικά δύσκολη. Ακόμα, είναι σημαντικό να μπορούν να επιτευχθούν στενές κατανομές ($I \leq 1.2$), έτσι ώστε τα πολυπεπτιδία να αυτοοργανώνονται σε καλά καθορισμένες νανοδομές, μεταφέροντας με αυτό τον τρόπο τις επιθυμητές ιδιότητες στη μακρο-κλίμακα.^{[6][15][16][17]}

2.3.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου, (Ring Opening Polymerization, ROP)

Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) μαζί με τον ριζικό και τον ανιοντικό πολυμερισμό, θεωρούνται τα πιο διαδεδομένα είδη πολυμερισμού για τη σύνθεση καλά καθορισμένων μακρομορίων. Ο ROP αποτελεί το είδος πολυμερισμού κατά το οποίο η τελική μακρομοριακή αλυσίδα προέρχεται από ένα κυκλικό πρόδρομο μονομερές, κατόπιν διάνοιξης του δακτυλίου του. Αν και ο ROP θεωρείται ως επί το πλείστον αλυσωτός πολυμερισμός (προσθήκη του μονομερούς σε μία αναπτυσσόμενη αλυσίδα), υπάρχουν αρκετές πιο περίπλοκες περιπτώσεις που περιλαμβάνουν ενεργοποιημένα μονομερή. Εκτός συγκεκριμένων εξαιρέσεων, όπως είναι ο ROP των N-καρβοξυ ανυδριτών (ή ανυδρίτες Leuchs), ο ROP δεν συνοδεύεται από την παραγωγή μικρών μορίων κατά τη διάδοση του πολυμερισμού, τα όποια πρέπει να απομακρύνονται ώστε να προάγεται η αντίδραση.^[18]

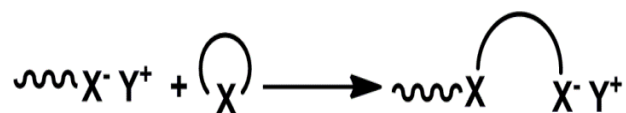
Στα περισσότερα είδη πολυμερισμού, η κινητήρια δύναμη για να προαχθεί ο πολυμερισμός είναι η μετατροπή ενός πολλαπλού δεσμού σε απλό.

Αντιθέτως, στον ROP κινητήρια δύναμη αποτελεί η αυξημένη τάση διάνοιξης δακτυλίου (ring strain) του μονομερούς και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να την συνοδεύουν. Ωστόσο, δεν μπορούν να πολυμεριστούν όλες οι κυκλικές ενώσεις. Για να γίνει αυτό εφικτό, θα πρέπει ο πολυμερισμός να ευνοείται τόσο κινητικά όσο και θερμοδυναμικά. Αφενός μεν τα μονομερή πρέπει να φέρουν μία κινητικά δραστική ομάδα που να μπορεί να αντιδράσει εύκολα και αφετέρου η τάση διάνοιξης του δακτυλίου πρέπει να είναι μεγάλη. Δακτύλιοι που περιέχουν 3, 4 ή 8, 9 άτομα, έχουν μεγάλη τάση δακτυλίου και ευνοείται η διάνοιξή τους, λόγω της μείωσης της ενθαλπίας που την συνοδεύει. Οι εξαμελείς δακτύλιοι είναι θερμοδυναμικά σταθεροί και κατά γενικό κανόνα δεν πολυμερίζονται, ενώ οι πενταμελείς και επταμελείς δακτύλιοι βρίσκονται ενδιάμεσα και τις περισσότερες φορές μπορούν να πολυμεριστούν. Τα συνηθέστερα κυκλικά μονομερή που πολυμερίζονται με διάνοιξη δακτυλίου περιέχουν κάποιο ετεροατόμο στο δακτύλιο τους, όπως O, S ή N, και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διάφορες οικογένειες ανάλογα με τις χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες που φέρουν. Επιπλέον, ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο διαδίδεται ο πολυμερισμός ROP σε κάθε τύπο μονομερών, διακρίνονται τέσσερα είδη: ο ριζικός ROP (RROP), ο ανιοντικός ROP (AROP), ο κατιοντικός ROP (CROP) και ο πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου (ROMP).^[19] Ειδικότερα, οι κυριότερες ομάδες κυκλικών μονομερών, το μέγεθος του δακτυλίου τους καθώς και το είδος του μηχανισμού με τον οποίο προάγεται ο ROP σε κάθε περίπτωση συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά παραδείγματα ROP μονομερών.

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

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



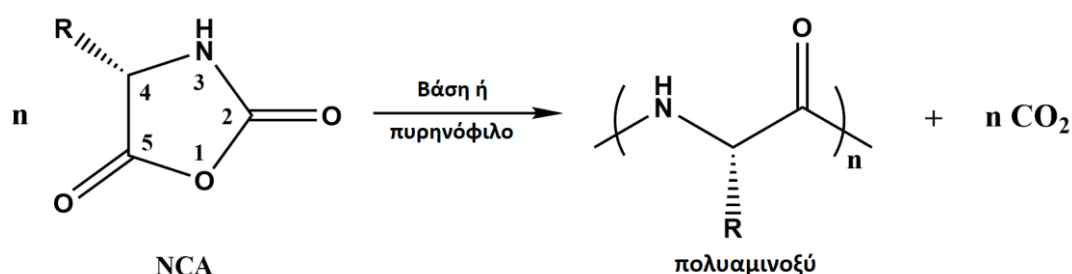
Σχήμα 4: Αντίδραση AROP.

Τα κυριότερα μονομερή που πολυμερίζονται μέσω AROP είναι το αιθυλενοξείδιο, το λακτίδιο και η εξαμεθυλ(κυκλοτρισιλοξάνη) (D3), από την

οποία προκύπτει το γνωστό PDMS, ενώ οι σημαντικότεροι απαρχητές που χρησιμοποιούνται για την έναρξη του πολυμερισμού είναι οργανομεταλλικές ενώσεις των αλκαλίων (Li, Na, K) και διαφορές αμίνες.^[19]

2.3.2 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων

Η πιο διαδεδομένη και αποδοτική μέθοδος σύνθεσης πολυπεπτιδικών ομοκαί συμπολυμερών, αποτελεί ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων.^{[15][16][17]} Μάλιστα στην περίπτωση των NCAs αυτό το είδος πολυμερισμού είναι συντομότερο, οικονομικότερο και μπορεί να δώσει ένα μεγάλο αριθμό παραγώγων πολυπεπτιδίων, σε σχέση με άλλες συνθετικές πορείες, χωρίς την ανεπιθύμητη λήψη ρακεμικού μίγματος των δύο οπτικών αντιπόδων των αμινοξέων. Ο πολυμερισμός των NCAs μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο αριθμό απαρχητών, περιλαμβάνοντας βάσεις όπως αμίνες, αλκοξειδία, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα, αλλά μπορεί επίσης να εκκινήσει με θέρμανση. Μέχρι σήμερα, έχει χρησιμοποιηθεί ένα μεγάλο εύρος μονομερών (και παραγώγων τους) για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων, ανάλογα με τις επιθυμητές ιδιότητες που επιλέγονται για τα τελικά πολυμερή. Η αντίδραση συνοδεύεται από την παραγωγή αερίου CO₂, και κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους. Μελέτες ιχνηθετημένων μονομερών με ¹⁴C αποδεικνύουν ότι το παραγόμενο CO₂ προέρχεται αποκλειστικά από τον άνθρακα C(2). Η γενική αντίδραση πολυμερισμού των NCAs για την σύνθεση πολυπεπτιδίων δίνεται στο ακόλουθο σχήμα.



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

Βέβαια, για να επιτευχθεί ο πολυμερισμός των NCAs των α-αμινοξέων απαιτείται όλα τα αντιδραστήρια και κυρίως τα μονομερή, τα οποία βρίσκονται

σε στερεή μορφή, να καθαριστούν ενδελεχώς από προσμίξεις με επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις κάτω από υψηλό κενό (high-vacuum techniques). Χρησιμοποιώντας τις τεχνικές υψηλού κενού ο πολυμερισμός χαρακτηρίζεται ως ζωντανός (απαραίτητη προϋπόθεση για την διατήρηση του ζωντανού χαρακτήρα του πολυμερισμού είναι η ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂) και τα πολυτεπτίδια που λαμβάνονται διαθέτουν καλά καθορισμένες ιδιότητες. Για να χαρακτηριστεί τώρα ένας πολυμερισμός «ζωντανός», πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια:

- Να γίνεται πλήρης μετατροπή του μονομερούς σε πολυμερές. Μετά το πέρας του πολυμερισμού όλη η ποσότητα του μονομερούς πρέπει να έχει καταναλωθεί δηλαδή η απόδοση να είναι 100%.
- Να υπάρχει γραμμική εξάρτηση του μέσου μοριακού βάρους M_n με την πάροδο του χρόνου. Για να γίνει αυτό, πρέπει να μην υπάρχουν παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και ο πολυμερισμός να προχωρά ομαλά και σταδιακά.
- Το τελικό μοριακό βάρος M_n να είναι ελεγχόμενο και να καθορίζεται από την στοιχειομετρία της αντίδρασης. Το μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό των πολυμερών προκαθορίζεται με ακρίβεια από τις ποσότητες του μονομερούς και του απαρχητή, σύμφωνα με την σχέση:

$$M_n = \frac{g_{\text{μονομερώς}}}{\text{moles}_{\text{απαρχητή}}}$$

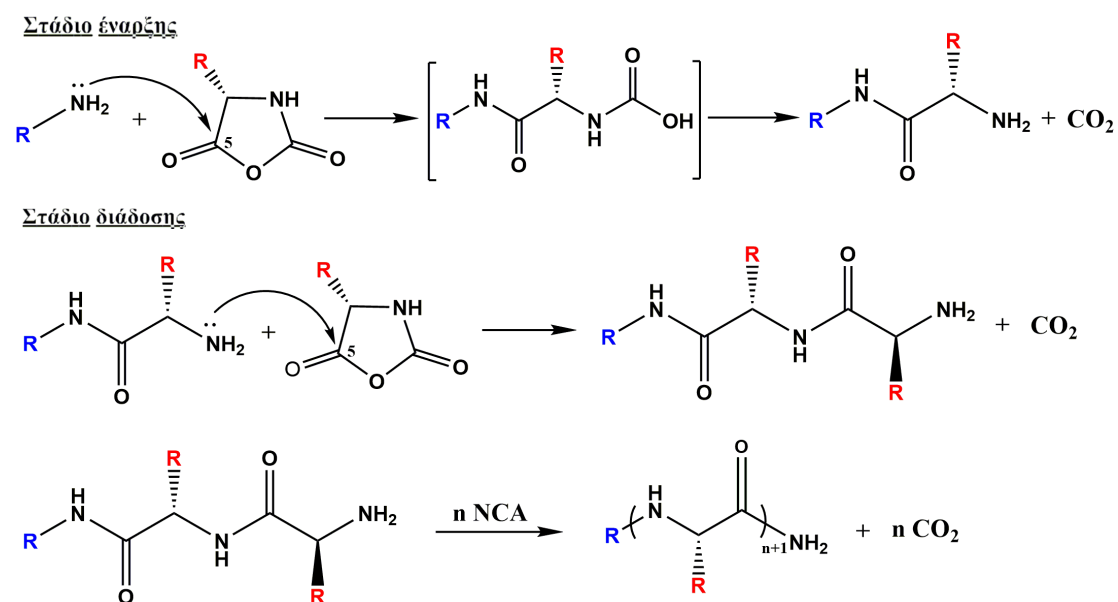
- Να είναι εφικτή η σύνθεση συμπολυμερών κατά συστάδες με διαδοχική προσθήκη μονομερών. Δηλαδή όλες οι αλυσίδες να παραμένουν ενεργές μετά το πέρας του πολυμερισμού του πρώτου μονομερούς και ταυτόχρονα το δεύτερο μονομερές να είναι τόσο καθαρό ώστε να μην περιέχει προσμίξεις που μπορούν να προκαλέσουν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

Συνήθως, για την πραγματοποίηση της διάνοιξης του δακτυλίου χρησιμοποιούνται ως απαρχητές είτε πρωτοταγείς αμίνες που είναι

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

2.3.2.1 Κανονικός μηχανισμός αμινών, (Normal Amine Mechanism, NAM)

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

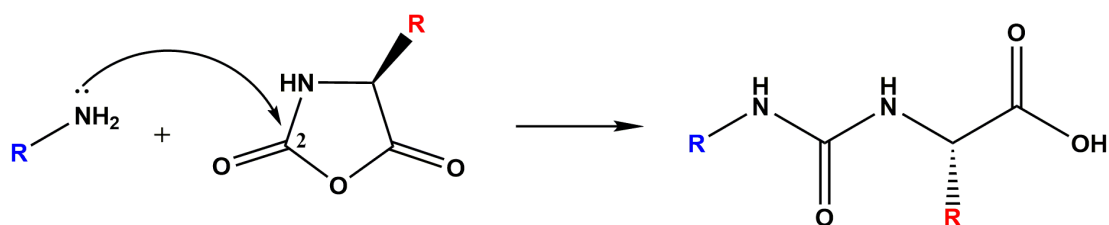


Σχήμα 6: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM).

Όπως φαίνεται, κατά το στάδιο της έναρξης ο πυρηνόφιλος απαρχητής προσβάλλει το καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Το ενδιαμέσο

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

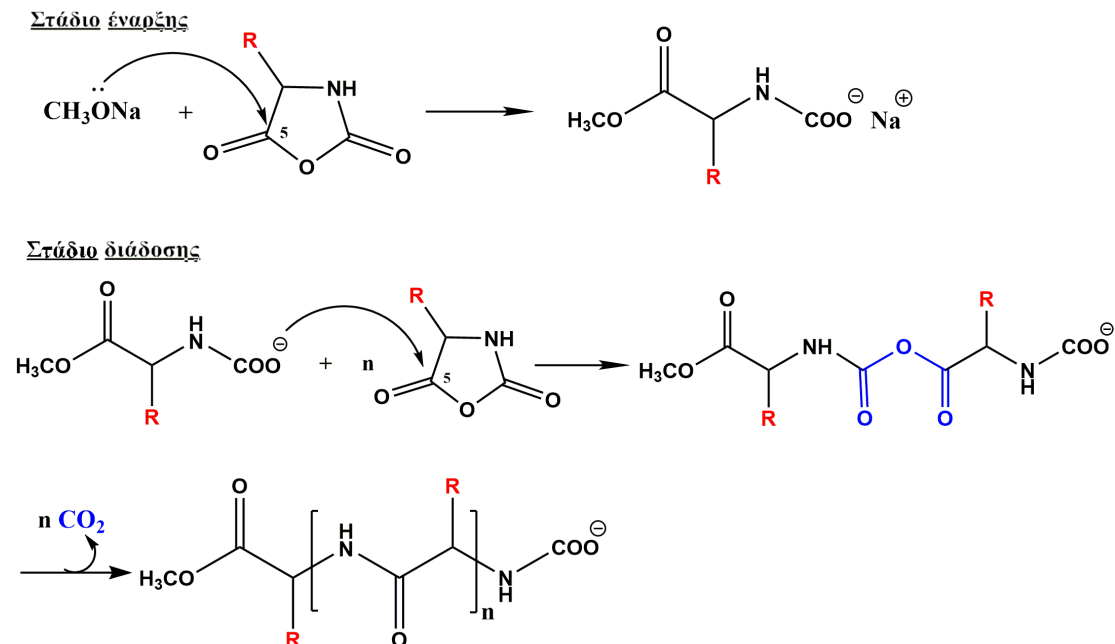
Βέβαια, εκτός της προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 5' κατά το στάδιο της έναρξης, μπορεί να πραγματοποιηθεί παράπλευρη αντίδραση με προσβολή στη θέση 2', προς σχηματισμό ενός ακραίου ουρείδο οξέος. Με αυτό τον τρόπο επέρχεται πρόωρος τερματισμός του πολυμερισμού καθώς η αμίνη δεν μπορεί να αναγεννηθεί. Η πιθανότητα πραγματοποίησης της αντίδρασης τερματισμού μειώνεται όσο ισχυρότερο πυρηνόφιλο είναι ο απαρχητής που θα χρησιμοποιηθεί. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν αποκλίσεις από τον «ζωντανό» χαρακτήρα του ROP είναι η ισορροπία μεταξύ καρβαμιδικού οξέος και CO₂, η επιλογή διαλύτη, η θερμοκρασία της αντίδρασης και η ύπαρξη υγρασίας ή άλλων προσμίξεων (υδρόλυση του μονομερούς).^[15]



Σχήμα 7: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του απαρχητή στο καρβονύλιο στη θέση 2.

2.3.2.2 Μηχανισμός Blout

Ο μηχανισμός του Blout (“Blout mechanism”) είναι μια «ιοντική» μορφή του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM). Το 1958 οι Idelson και Blout, μελέτησαν τον πολυμερισμό των NCAs μέσω ισχυρών βάσεων, χρησιμοποιώντας μεθοξείδιο του νατρίου.^[20] Κατά το στάδιο της έναρξης, το μεθοξείδιο του νατρίου προβάλλει πυρηνόφιλα τον C(5) του N-καρβοξυανυδρίτη προκαλώντας διάνοιξη δακτυλίου. Στο στάδιο έναρξης του πολυμερισμού δεν λαμβάνει χώρα παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα. Η διάνοιξη του δακτυλίου επέρχεται προς σχηματισμό του καρβαμιδικού ανιόντος, το οποίο είναι υπεύθυνο για την διάδοση του πολυμερισμού. Η αλυσίδα αναπτύσσεται με την προσθήκη του καρβαμιδικού ανιόντος σε ένα νέο μόριο ανυδρίτη, προς σχηματισμό ενός ενδιάμεσου καρβαμικού-καρβόξυλο μικτού ανυδρίτη. Εν συνεχεία, απελευθερώνεται CO₂ προς σχηματισμό ενός νέου καρβαμιδικού ανιόντος. Επειδή όμως τα ενεργά καρβαμιδικά άκρα είναι ασθενέστερα πυρηνόφιλα σε σχέση με τα αντίστοιχα αμινο-τελικά, ο μηχανισμός αυτός είναι λιγότερο πιθανός.



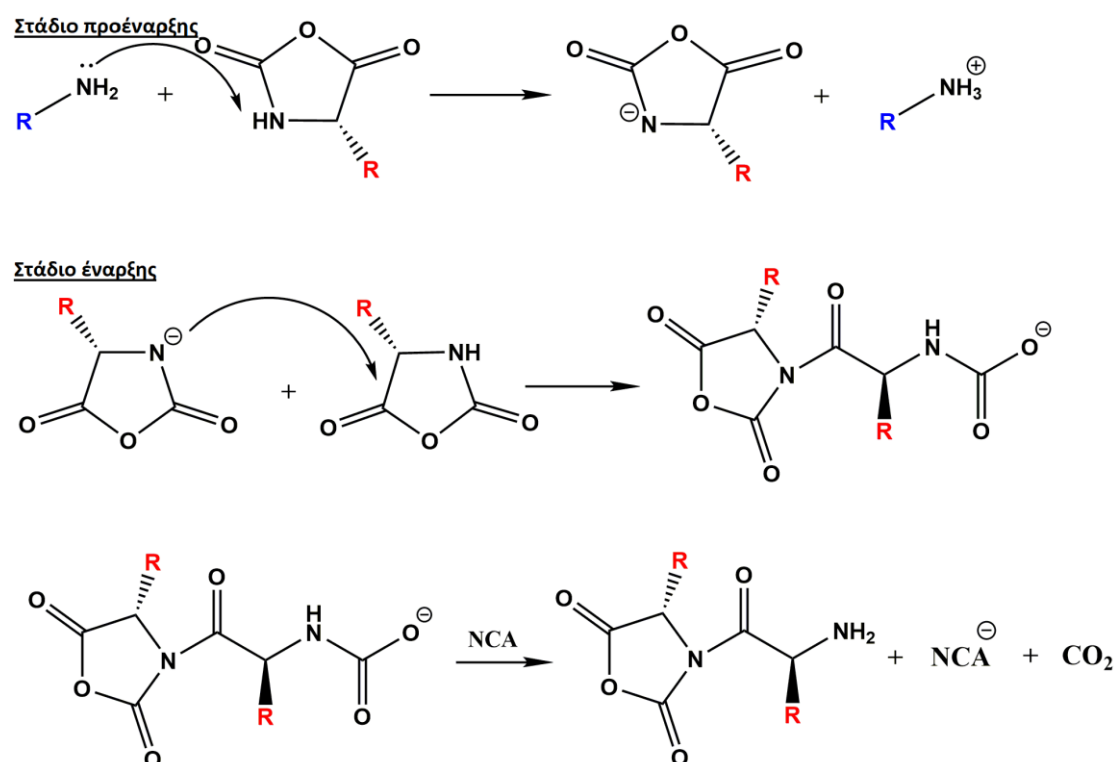
Σχήμα 8: Στάδια έναρξης και διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό Blout.

Ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν απαιτεί το πρωτόνιο από τον απαρχητή, και μπορεί να έχει εφαρμογή τόσο σε N-υποκατεστημένους NCAs, όσο και σε μη υποκατεστημένους. Παρ' ότι υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι ο

μηχανισμός του Blout μπορεί να εφαρμοστεί κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, είναι γενικά αποδεκτό ότι ο πολυμερισμός των NCAs με χρήση ισχυρών βάσεων, όπως το μεθοξείδιο του νατρίου, προχωρά μέσω του “μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς”.^[21]

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

Αυξάνοντας την βασικότητα του απαρχητή, χρησιμοποιώντας τριτοταγείς αμίνες καθώς και δευτεροταγείς υψηλής βασικότητας, το σύστημα ακολουθεί ένα διαφορετικό μηχανισμό πολυμερισμού. Σε αυτόν ο απαρχητής δεν δρα ως πυρηνόφιλο δίνοντας ζεύγος ηλεκτρονίων, αλλά ως καταλύτης ενεργοποιώντας ένα μόριο μονομερούς. Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση είναι ότι το άζωτο στη θέση 3 του NCA πρέπει να μην είναι υποκατεστημένο και να διαθέτει ένα ευκίνητο υδρογόνο.^[22]

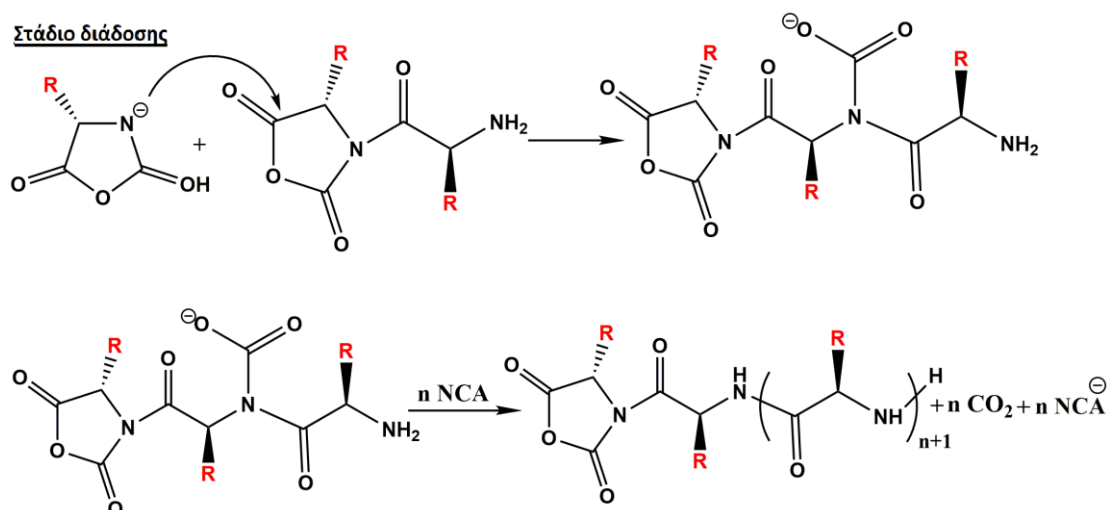


Σχήμα 9: Στάδια ενεργοποίησης και έναρξης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-Καρβόξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM).

Στο στάδιο της προέναρξης ο απαρχητής δρα ως βάση δεσμεύοντας το όξινο H του αζώτου στο δακτύλιο του μονομερούς. Ουσιαστικά, ο μηχανισμός έναρξης περιλαμβάνει την αποπρωτονίωση του δεσμού N-H του NCA από

τον απαρχητή-βάση και την πυρηνόφιλη προσβολή το σχηματισθέντος ανιόντος σε ένα δεύτερο μόριο μονομερούς στον άνθρακα 5', ανοίγοντας τον δακτύλιο και δίνοντας ένα διμερές. Το καρβαμιδικό ανιόν που σχηματίζεται πρωτονιώνεται από ένα τρίτο μόριο μονομερούς, σχηματίζοντας το ασταθές καρβαμιδικό οξύ, το οποίο και αποκαρβοξυλιώνεται, παράγοντας ενεργές αμινομάδες ενώ αναγεννάται ο καταλύτης (NCA^-) και εκλύεται CO_2 .^[23]

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



Σχήμα 10: Στάδιο διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-Καρβόξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM).

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

Τέλος, η καθαρότητα των μονομερών και του διαλύτη είναι κρίσιμοι παράγοντες για την έκβαση του AMM, ενώ υπάρχει επίσης πλήθος πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων που μπορούν να τερματίσουν τον πολυμερισμό,

όπως αντιδράσεις διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας, ισομερείωσης και ενδομοριακής κυκλοποίησης. Είναι, λοιπόν, εμφανές ότι ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν είναι επιθυμητός, καθώς ο πολυμερισμός αυτός ελέγχεται δύσκολα και απέχει πολύ από το να μπορεί χαρακτηριστεί ως ζωντανός.^[24]

2.3.3 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση πρωτοταγών αμινών και τεχνικών υψηλού κενού

Το 2004, η ερευνητική ομάδα των Iatrou και Hadjichristidis παρουσίασε τον πρώτο «ζωντανό πολυμερισμό» των NCAs, χρησιμοποιώντας πρωτοταγείς αμίνες ως απαρχητές ROP και τεχνικές υψηλού κενού (HVT).^[25] Η αναγκαιότητα αυτών των τεχνικών οφείλεται στην ευαισθησία των απαρχητών και των μακροανιόντων που δημιουργούνται, στα ίχνη του νερού, του διοξειδίου του άνθρακα, του οξυγόνου και άλλων δραστικών προσμίξεων. Η χρήση αυτών των τεχνικών είναι επίσης αποτελεσματική σε περιπτώσεις που η διάρκεια της αντίδρασης είναι αρκετά μεγάλη.

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

Επιπλέον, με την χρήση υψηλού κενού επιτυγχάνεται η συνεχής απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂, οδηγώντας την αντίδραση του πολυμερισμού προς τα προϊόντα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιάμεσου. Λόγω της μικρής διαλυτότητας του διοξειδίου του άνθρακα σε διαλύτες όπως το DMF, η αποκαρβοξυλίωση του καρβαμιδικού οξέος δεν συμβαίνει ακαριαία, με αποτέλεσμα ορισμένα ενεργά κέντρα να παραμένουν όπως είναι και άλλα να δημιουργούν άλατα με τις ενεργές αμινομάδες. Και στις δυο περιπτώσεις οι δομές που δημιουργούνται είναι απενεργοποιημένες, και οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού και σε μη ολοκληρωμένο πολυμερισμό. Με την χρήση ειδικών αντιδραστήρων πολυμερισμού, με όγκο τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερο από το εκλουόμενο διοξείδιο του άνθρακα, αποφεύγεται ο σχηματισμός καρβαμιδικών αλάτων με τα αμινοτελικά άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, λόγω της γρηγορότερης αποκαρβοξυλίωσης που συμβαίνει στο σύστημα.^{[25][26]}

Η τεχνική αυτή είναι γενική και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον πολυμερισμό υποκατεστημένων όσο και μη υποκατεστημένων μονομερών. Με χρήση πρωτοταγών αμινών ευνοείται αποκλειστικά ο κανονικός μηχανισμός αμινών, ενώ τα προϊόντα έχουν μεγάλη συνθετική ομοιογένεια και υψηλές αποδόσεις. Το 2009 η ομάδα του Avgeropoulos,^[27] μια ομάδα εξοικειωμένη τόσο με τις τεχνικές υψηλού κενού όσο και με τις παραδοσιακές, κατάφερε να ενισχύσει ακόμη περισσότερο τα πλεονεκτήματα από τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού, έναντι των συμβατικών μεθόδων, αναλύοντας για πρώτη φορά τις ακραίες ομάδες των λαμβανόμενων πολυμερών. Η ομάδα διεξήγαγε παράλληλους πολυμερισμούς υπό συνθήκες υψηλού κενού αλλά και υπό αδρανή ατμόσφαιρα σε glove box και τα πολυμερή που ελήφθησαν χαρακτηρίστηκαν φασματοσκοπικά (¹³C-NMR, MALDI-TOF-MS). Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι πολυμερισμοί σε υψηλό κενό ακολουθούσαν πλήρως τον κανονικό μηχανισμό, ενώ αντίδραση τερματισμού πραγματοποιήθηκε μόνο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό. Αντίθετα, τα πολυπεπτίδια που παρασκευάστηκαν στο glove box ακολουθούσαν τόσο τον κανονικό μηχανισμό αμινών, όσο και τον μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς, ενώ πολλαπλές αντιδράσεις τερματισμού έλαβαν χώρα. Έτσι, απέδειξαν ότι μόνο με την τεχνική υψηλού κενού μπορούν να συντεθούν

πολυπεπτίδια που να προσομοιάζουν στη δομή και τις ιδιότητες τα φυσικά ανάλογά τους, ενώ ταυτόχρονα το αμινο-τελικό τους άκρο να παραμένει ενεργό για περαιτέρω διάδοση του πολυμερισμού και δημιουργία πολύπλοκων αρχιτεκτονικών.

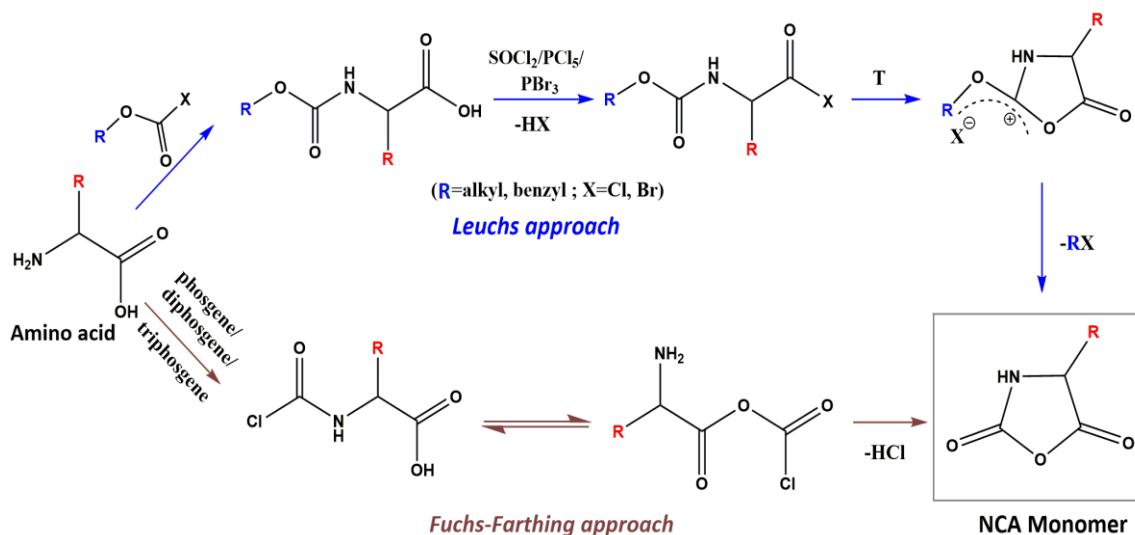
2.4 Σύνθεση N-καρβόξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων (NCAs)

Οι N-καρβόξυ ανυδρίτες των α-αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Leuchs, το 1906. Επίσης ο Leuchs παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και κατάφερε να απομονώσει το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος, περιλαμβάνει την αντίδραση κυκλοποίησης των προστατευμένων N-αλκοξυκαρβονυλοαμινοαλογονιδίων, υπό παρατεταμένη θερμοκρασία 70-90 °C (Σχήμα 11). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες μπορεί να πραγματοποιηθεί αποσύνθεση των NCAs και διάνοιξη του δακτυλίου.^{[28][29]}

Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια, με τα οποία θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η δημιουργία του αλογονιδίου οξέος. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο (SOCl_2) από τον ίδιο τον Leuchs. Εν συνεχεία, δοκιμάστηκε το πενταχλωρίδιο του φωσφόρου, που ήταν δραστικότερο αλλά έδινε ως παραπροϊόν το αντίστοιχο οξειδίο και είχε επίδραση στην κρυστάλλωση του ανυδρίτη, ενώ το ισχυρότερο μέσω αλογόνωσης της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το τριβρωμίδιο του φωσφόρου (PBr_3). Επιπλέον, στην τελευταία περίπτωση το ανιόν του βρωμίου είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το αντίστοιχο του χλωρίου στο στάδιο της κυκλοποίησης, αλλά και καλύτερο πυρηνόφιλο για το τελικό στάδιο. Συνεπώς η συνολική αντίδραση προχωράει γρηγορότερα και σε θερμοκρασίες μικρότερες από 25 °C. Όσον αφορά τον υποκαταστάτη R' , ο Leuchs είχε παρατηρήσει ότι τα μεθόξυ-αντιδρούσαν πιο εύκολα από τα αντίστοιχα αιθοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων, (ως ισχυρότεροι αλκυλιωτικοί παράγοντες) αποδεικνύοντας ότι το καθοριστικό (αργό) στάδιο της αντίδρασης είναι η αλκυλίωση του ιόντος αλογόνου.^{[30][31][32]}

Ωστόσο, η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την προετοιμασία των NCAs, είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον Fuchs για την παρασκευή του NCA της N-φαινυλογλυκίνης και

τροποποιήθηκε ακολούθως από τους Farthing, Coleman και Levy ώστε να εφαρμοστεί στη σύνθεση ενός μεγάλου εύρους NCAs. Η ονομασία που έχει επικρατήσει βιβλιογραφικά για την προσέγγιση αυτή είναι μέθοδος “Fuchs-Farthing”.^{[33][34]} Η συγκεκριμένη διαδικασία περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο, όπου στο πρώτο βήμα της αντίδρασης το ελεύθερο αμινοξύ αντιδρά με το φωσγένιο, σχηματίζοντας πολύ γρήγορα το ενδιάμεσο N-χλωροφόρμυλο αμινοξύ (συνήθως δεν απομονώνεται), το οποίο ακολούθως μετατρέπεται σε N-καρβοξυ ανυδρίτη, ενώ πραγματοποιείται και ταυτόχρονη παραγωγή HCl (Σχήμα 11). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται διότι οι ανυδρίτες είναι διαλυτοί στους περισσότερους απρωτικούς πολικούς διαλύτες, ενώ τα ελεύθερα αμινοξέα είναι αδιάλυτα. Καθοριστικό ρόλο στην αντίδραση διαδραματίζουν ο διαλύτης, η θερμοκρασία αλλά και ο χρόνος της αντίδρασης.



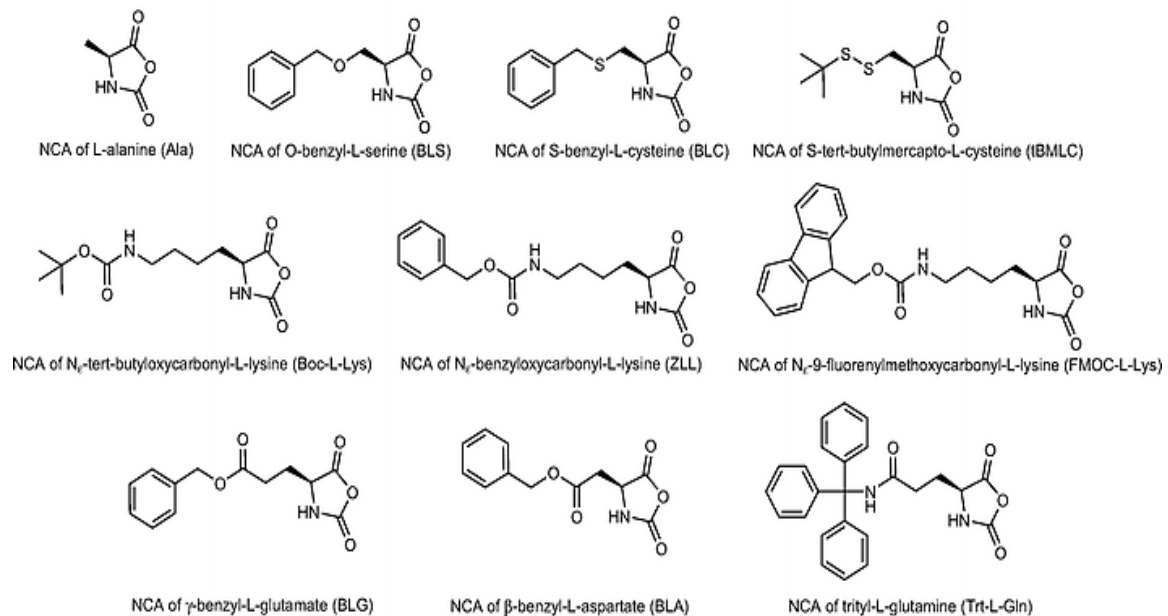
Σχήμα 11: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών.

Αρχικά, το τετραϋδροφουράνιο (THF) και το 1,4 διοξάνιο αποτέλεσαν τα πιο διαδεδομένα μέσα αντίδρασης. Ωστόσο, και οι δύο παραπάνω διαλύτες δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις παρουσία HCl σε πολύωρη διαδικασία αντίδρασης, γεγονός στο οποίο συμβάλει και η αυξημένη διαλυτότητα του οξέος σε αυτά τα μέσα αντίδρασης. Για να χρησιμοποιηθεί επομένως ένας διαλύτης ως μέσο αντίδρασης θεωρείται σκόπιμο να είναι ανενεργός ως προς το φωσγένιο. Σε λιγότερο πολικούς διαλύτες ωστόσο, όπως το χλωροφόρμιο, το τολουόλιο και ο οξικός αιθυλεστέρας, ο χρόνος αντίδρασης αυξάνεται. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε αλογονομένους υδρογονάνθρακες το HCl

παρουσιάζει μικρή διαλυτότητα και πολλές φορές χρησιμοποιείται μείγμα THF/CH₂Cl₂.

Το φωσγένιο, όμως, είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό και τοξικό αντιδραστήριο, η μεταχείρισή του ακόμα και σε εργαστηριακή κλίμακα χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Επιπλέον είναι δύσκολο, λόγω της αέριας φύσης του, να τηρηθεί απόλυτα η στοιχειομετρία στις αντιδράσεις που συμμετέχει. Για το λόγο αυτό έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί στην οργανική σύνθεση ως πηγές φωσγενίου, το τριχλωρομέθυλο-χλωροφορμικό (ή διφωσγένιο) και το δις(τριχλωρομέθυλο)-ανθρακικό (ή τριφωσγένιο).^[35] Το διφωσγένιο είναι υγρό ενώ αντίστοιχα το τριφωσγένιο είναι κρυσταλλικό στερεό, γεγονός που επιτρέπει την ευκολότερη και ασφαλέστερη χρησιμοποίησή τους, ως πρόδρομες ενώσεις δυο και τριών μορίων φωσγενίου. Στην σύνθεση των NCAs έχει επικρατήσει η χρήση του τριφωσγενίου, δίνοντας μονομερή υψηλής απόδοσης και καθαρότητας.

Οι παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη σύνθεση ενός NCA περιλαμβάνουν κυρίως την διάνοιξη του δακτυλίου του τελικού προϊόντος και λαμβάνουν χώρα λόγω αυξημένης θερμοκρασίας, αυξημένου χρόνου αντίδρασης ή υψηλής συγκέντρωσης παραγόμενου υδροχλωρίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις χαμηλής απόδοσης ανυδρίτη, το παραγόμενο HCl πρωτονιώνει την αμινομάδα κάποιων αμινοξέων, σχηματίζοντας άλας και εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο το κλείσιμο του δακτυλίου. Ακόμα όμως και να σχηματιστεί ο δακτύλιος είναι πιθανό να επέλθει διάνοιξή του σε αυξημένες συγκεντρώσεις HCl. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται βάσεις (όπως η Et₃N), ή ενώσεις της οικογένειας των πινενίων (όπως το D,L-λιμονένιο) ως αντιδραστήρια δέσμευσης του παραγόμενου HCl για την διευκόλυνση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Τα τελευταία 15 χρόνια, έχει συντεθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός NCAs όλων των βασικών αμινοξέων αλλά και αρκετών παραγώγων τους, ορισμένοι εκ των οποίων παρατίθενται στην Εικόνα 6.^[36] Αναγκαία κρίνεται η χρησιμοποίηση διάφορων προστατευτικών ομάδων για τις δραστικές πλευρικές ομάδες των αμινοξέων, έτσι ώστε να αποφεύγονται παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των μονομερών και του πολυμερισμού.^[37]

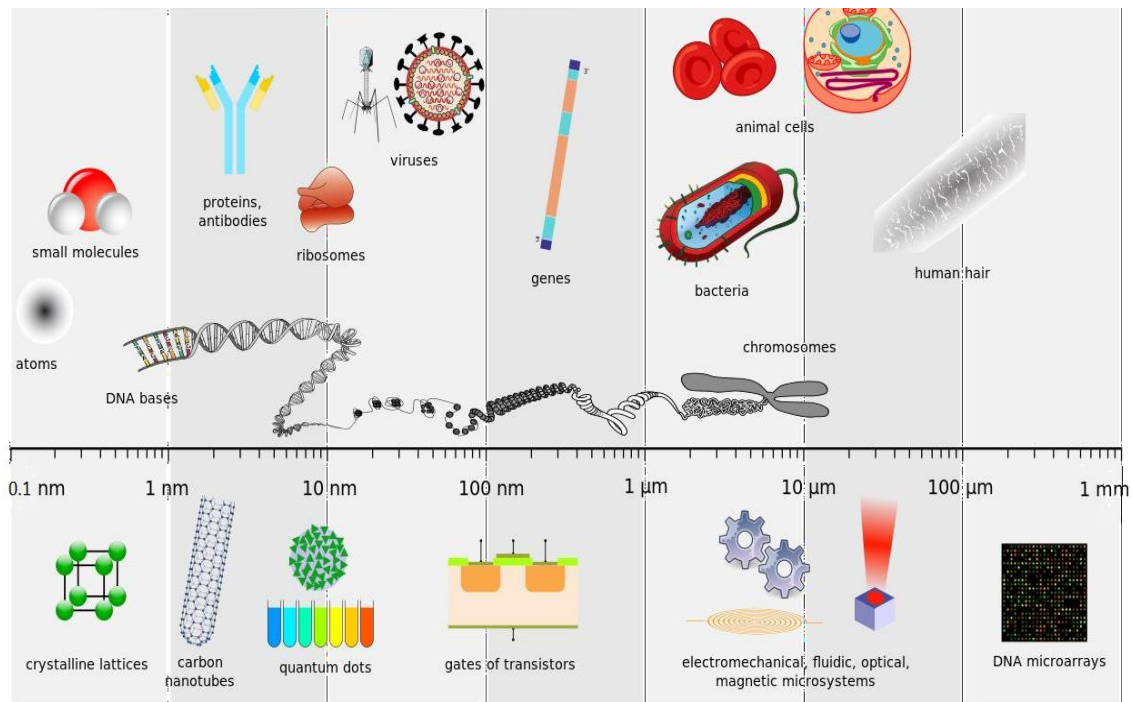


Εικόνα 6: Μερικοί χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά.

2.5 Νανοτεχνολογία και στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων

2.5.1 Νανοτεχνολογία και οι εφαρμογές της

Με τον όρο «νανοτεχνολογία» περιγράφεται ο τομέας της επιστήμης που αφορά την ανάπτυξη και χρήση υλικών με τα οποία μπορούν να παρασκευασθούν και να χρησιμοποιηθούν συσκευές και προϊόντα, τα οποία έχουν διαστάσεις της τάξης του δισεκατομμυριοστού του μέτρου (διαστάσεις τάξης μεγέθους μερικών δεκάδων ατόμων), δηλαδή δομές που δεν υπακούουν στους νόμους της Κλασσικής Μηχανικής, αλλά της Κβαντομηχανικής.^[38] Τα νανοσωματίδια και τα νανοϋλικά παρουσιάζουν καινοτόμες ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθός τους. Στην επιστήμη και την τεχνολογία, το πρόθεμα «nano-» (από την ελληνική λέξη νάνος) σημαίνει 10^{-9} (=0.000000001). Ένα νανόμετρο (nm) ισούται με ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου.



Εικόνα 7: Χαρακτηριστικά μεγέθη μορίων, νανοϋλικών και βιολογικών οντοτήτων.

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

Η νανοτεχνολογία βρίσκει εφαρμογή σε ένα ευρύ πεδίο επιστημών όπως είναι η ενέργεια, η μικροηλεκτρονική και η μηχανική. Στην παρούσα εργασία θα μελετηθούν οι βιολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές της.^{[39][40][41]} Συγκεκριμένα, οι τομείς της ιατρικής και φαρμακευτικής που μπορεί να βρει εφαρμογή η νανοτεχνολογία είναι οι ακόλουθοι:

- ◆ Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων (Drug delivery): Τα οχήματα μεταφοράς φαρμάκων, που το μέγεθος τους βρίσκεται στη νανοκλίμακα, μπορούν: α) να ενισχύσουν τη θεραπευτική ικανότητα ενός φαρμάκου, μειώνοντας τις παρενέργειες που σχετίζονται με τα ήδη διαθέσιμα φάρμακα, β) να προωθήσουν την επαναδιερεύνηση νέων μοριακών οντοτήτων, που δεν

μπορούν να χορηγηθούν απευθείας στον άνθρωπο λόγω των μη βέλτιστων φαρμακολογικών ιδιοτήτων, που είναι όμως βιολογικά ενεργές αλλά μέχρι στιγμής θεωρούνται μη αναπτύξιμες.^[42]

- ◆ Διαγνωστική: Οι νανο-«αισθητήρες» (όπως νανοσωλήνες άνθρακα ή άλλα νανοσωματίδια), μπορούν να επιτρέψουν τη γρήγορη και αποδοτική ανίχνευση των βιοδεικτών μίας νόσου, με πολύ μεγάλη ευαισθησία και με απαίτηση μικρής ποσότητας δείγματος. Επιπλέον, η νανοτεχνολογία δίνει ελπίδα για την έγκαιρη διάγνωση ιών, βακτηρίων αλλά και καρκινικών κυττάρων.
- ◆ Θεραπευτικές τεχνικές: Ορισμένα νανοϋλικά έχουν μοναδικές θεραπευτικές ιδιότητες, που διαφέρουν από τα συνηθισμένα φάρμακα, όπως τα νανοσωματίδια χρυσού που μπορούν να ενισχύσουν την ακτινοθεραπεία, οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα μαγνητικά νανοσωματίδια που μπορούν να προκαλέσουν υπερθερμία και να καταστρέψουν καρκινικά κύτταρα, ή τα νανοσωματίδια αργύρου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες.
- ◆ In vivo απεικόνιση: Η χρήση μορίων-στοχευμένων «διερευνητών», όπως είναι τα μαγνητικά νανοσωματίδια, μπορεί να παρέχει έγκυρο και ακριβή τρόπο διάγνωσης ασθενειών, όπως ο καρκίνος, καθώς και δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης μίας νόσου.
- ◆ Βιοϋλικά: Βιοσυμβατά νανοϋλικά που έχουν πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιατρικά εμφυτεύματα, στην οδοντιατρική ή ως υποκατάστατα οστών και εμφυτεύματα ιστών.

2.5.2 Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων μέσω πολυμερικών υλικών

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

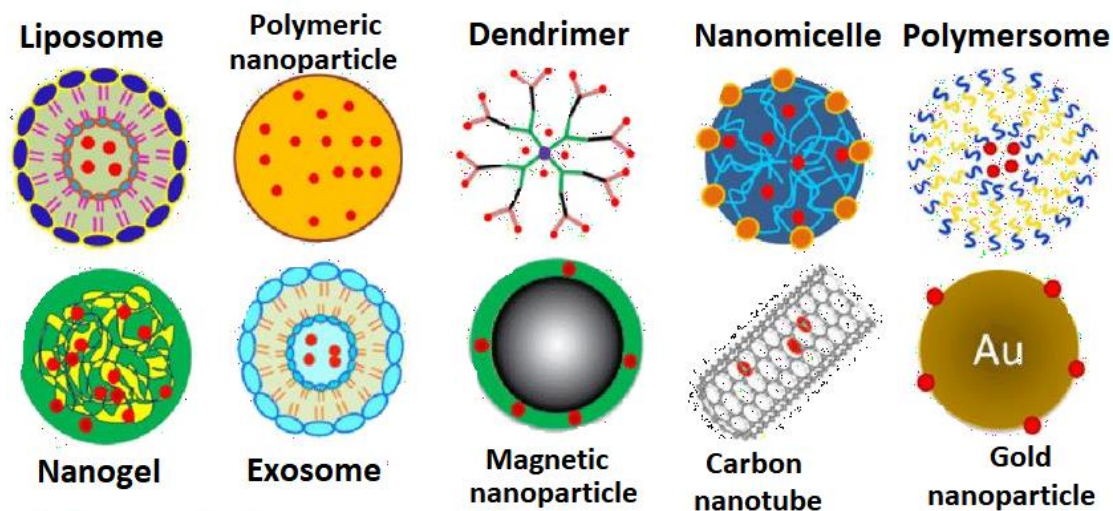
φαρμακευτική ουσία και θα την απελευθερώνουν στοχευμένα στους πάσχοντες ιστούς και κύτταρα.^[43]

Επιπλέον, όλες οι νέες μοριακές οντότητες που εισάγονται στη φαρμακοβιομηχανία, κρίνονται όχι για την ισχυρή τους δραστηριότητα, που είναι και το ζητούμενο, αλλά για τη διαλυτότητά τους στο νερό ή το χρόνο ζωής τους στο αίμα. Αυτό συμβαίνει διότι όσο μεγάλη κι αν είναι η δραστηριότητα ενός μορίου, είναι πρακτικά άχρηστη όταν αυτό δεν μπορεί να κυκλοφορήσει στο αίμα. Έτσι, λιγότερο δραστικές ουσίες, αλλά με χαρακτηριστικά που μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό, προτιμώνται για εξέλιξη και περαιτέρω διερεύνηση. Σε κάθε περίπτωση, υπάρχει πάντα ένα επίπεδο συμβιβασμού, που μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή μη ιδανικών φαρμάκων. Έτσι, η ανάγκη να μεταφέρονται στοχευμένα σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς, φαρμακευτικές ουσίες, ξεπερνώντας τα εμπόδια που βάζει ο οργανισμός σε οτιδήποτε ξένο προς τον ίδιο, αποτέλεσε το κίνητρο για την εκτενή έρευνα στο πεδίο που ονομάζεται “drug delivery”. Οι νανομεταφορείς μακράς κυκλοφορίας χρησιμοποιούνται για να διατηρήσουν το απαιτούμενο επίπεδο της φαρμακευτικής ουσίας στο αίμα για εκτεταμένα χρονικά διαστήματα, με σκοπό την αποτελεσματικότερη δράση του φαρμάκου.^{[44][45]}

Το 1960 ήταν η πρώτη φορά που περιγράφηκαν τα λιποσώματα, και προτάθηκαν ως μεταφορείς φαρμάκων και πρωτεϊνών. Σήμερα, η νανοτεχνολογία έχει κάνει άλματα στην ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων. Συγκεκριμένα, για το σκοπό αυτό έχουν σχεδιαστεί βιοαποικοδομήσιμα πολυμερικά νανοσωματίδια, πολυμερικά μικύλλια, δενδριμερή κ.ά. Τα νανοσωματίδια ή τα μακρομοριακά συσσωματώματα μακράς κυκλοφορίας, όταν διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς, συσσωρεύονται σταδιακά στις παθολογικές θέσεις (καρκινικοί όγκοι, φλεγμονές κλπ.) και βελτιώνουν ή ενισχύουν την αποδέσμευση των φαρμάκων στις περιοχές αυτές.^[46]

Η μεταφορά ενός φαρμάκου μέσω ειδικά σχεδιασμένων υπερμοριακών δομών επιδιώκει να εξασφαλίσει την αύξηση του χρόνου παραμονής του στο αίμα, τη βελτίωση της διαλυτότητας του όταν πρόκειται για υδρόφοβο φάρμακο, τη μείωση της ανοσογονικότητας και τη μεταφορά του σε συγκεκριμένο στόχο. Η κυκλοφορία των δραστικών ουσιών για μακρό χρονικό

διάστημα μπορεί να συντελέσει στην καλύτερη στόχευση, εφόσον αυξάνει τη συνολική ποσότητα του φορέα που συναντά το στόχο και τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκου και περιοχής δράσης του. Έτσι ο όρος “drug delivery”, περιλαμβάνει το σχεδιασμό και τη σύνθεση μορίων με χημικά χαρακτηριστικά τέτοια που να μπορέσουν να τα φέρουν όσο πιο κοντά στο κύτταρο-στόχο, αλλά και να τα καταστήσουν ικανά να εγκλωβίσουν ένα φάρμακο.^[47]

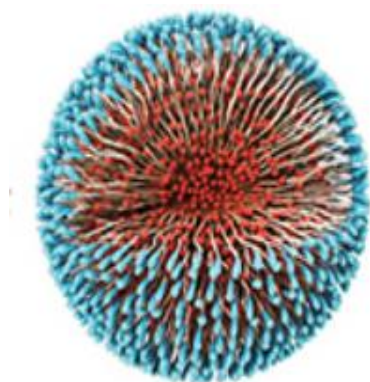


Εικόνα 8: Κυριότεροι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών.

Για τη βελτίωση της εξειδικευμένης αποδέσμευσης των φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί διάφοροι φορείς, όπως τα λιποσώματα, τα ανόργανα νανοσωματίδια, τα νανοσυσσωματώματα και τα πολυμερικά μικύλλια και κυστίδια (Εικόνα 8).^[48] Πρόσφατα τα πολυμερικά μικύλλια (micelles) αποτέλεσαν το αντικείμενο έντονης ερευνητικής απασχόλησης. Τα μικύλλια είναι δομές της μορφής κορώνα/πυρήνας, που συνήθως σχηματίζονται από αμφίφιλα κατά συστάδες πολυμερή, έχουν πάχος μόνο μερικά νανόμετρα και μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο ως «νανομεταφορείς». Έχουν αναδειχθεί ως δυνητικοί φορείς φαρμακευτικών ουσιών αδιάλυτων στο νερό, εξαιτίας της ικανότητάς τους να εγκλωβίζουν τις ουσίες αυτές στο υδρόφοβο τμήμα τους λόγω χημικής συγγένειας, προστατεύοντας τις με τις εξωτερικές υδατοδιαλυτές πολυμερικές αλυσίδες που διαθέτουν. Η ενσωμάτωση των φαρμάκων στις μικυλλιακές δομές πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της διαπίδυσης (dialysis), είτε με τη μέθοδο της διαλυτοποίησης–εξάτμισης ή μέσω της μεθόδου σχηματισμού λεπτών υμενίων (thin-film).^[49]

Οι μικυλλιακές δομές, ως φορείς φαρμάκων προσφέρουν μερικά πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα. Έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν μη υδατοδιαλυτά φάρμακα, αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα τους και έχουν μικρό σχετικά μέγεθος (έως 200 nm) αποτρέποντας την καταστροφή τους από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι μπορούν να παραμείνουν στο αίμα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα παρέχοντας σταδιακή συσσωμάτωση της δραστικής ουσίας στην επιθυμητή περιοχή. Επιπλέον είναι δυνατό να παρασκευασθούν σε σχετικά μεγάλες ποσότητες εύκολα και επαναλήψιμα. Ωστόσο, η πιο σημαντική εφαρμογή τους είναι η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων χωρίς την εκδήλωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών που μπορεί να εκδηλωθούν στον ανθρώπινο οργανισμό αν αυτά εισαχθούν ελεύθερα στο κυκλοφορικό σύστημα.^{[48][49]}

Τα υλικά που δομούνται από πολυπεπτίδια είναι ιδανικά για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, χάρη στην βιοσυμβατότητά τους, την αρχιτεκτονική της δομής τους και διότι είναι ικανά να σχηματίζουν χαρακτηριστικές δευτεροταγείς δομές. Τα αμφίφιλα πολυπεπτιδικά υλικά μπορούν να αυτο-οργανώνονται, σε μια πληθώρα από διαφορετικές αρχιτεκτονικές μέσα από ετεροπολικές αλληλεπιδράσεις, έχοντας την ικανότητα να εγκλωβίζουν και να μεταφέρουν φάρμακα. Υιοθετώντας συγκεκριμένες διαμορφώσεις, όπως η α-έλικα ή το β-φύλλο, είναι πιο πιθανό να σχηματίσουν συγκεκριμένες επιθυμητές νανοδομές. Η αυτο-οργάνωση των αμφίφιλων πολυμερών μπορεί να καθοριστεί αν ελεγχθούν παράγοντες όπως η αναλογία των υδρόφοβων-υδρόφιλων συστατικών, το μοριακό βάρος και η χημική φύση των πολυμερών.^[50]



polymeric nanoparticle

Εικόνα 9: Απεικόνιση ενός πολυμερικού νανοσωματιδίου.

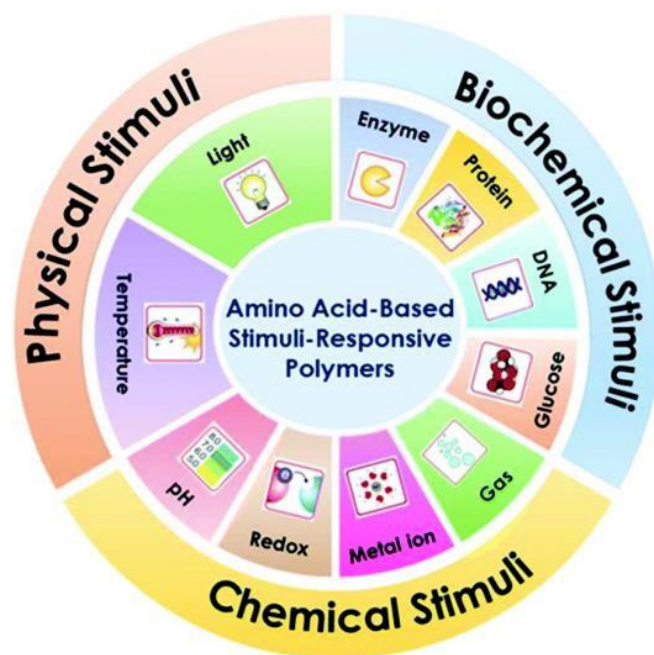
Υπό διερεύνηση και διαρκή μελέτη βρίσκεται επίσης η ανάπτυξη της μεθοδολογίας έτσι ώστε το τελικό προϊόν σε ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων να έχει επιπρόσθετα χαρακτηριστικά εκτός από τη βιοσυμβατότητα. Τέτοιες επιθυμητές ιδιότητες είναι να παραμένει σταθερό όταν διαλύεται σε βιολογικά μέσα, να έχει ιδιότητες που το καθιστού «αόρατο» για το ενδοθηλιακό δίκτυο και να κατευθύνεται εκλεκτικά σε συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους.^[51]

2.5.3 Πολυπεπτιδικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποκρινόμενα σε εξωτερικά ερεθίσματα

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

Ως αποκρίσιμα σε εξωτερικά ερεθίσματα ορίζονται τα πολυμερή που υφίστανται σημαντικές και άμεσες φυσικές ή χημικές μεταβολές αποκρινόμενα σε μικρές εξωτερικές αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών. Σε αυτά τα πολυμερή έχουν δοθεί διάφορες ονομασίες όπως αποκρίσιμα, έξυπνα και περιβαλλοντικά ευαίσθητα (ενώ στα αγγλικά επικρατεί ο όρος “stimuli-responsive”).^{[52][53]} Αυτά τα συστήματα αναγνωρίζουν κάποιο ερέθισμα ως σήμα, κρίνουν το μέγεθος του σήματος και μεταβάλουν τη διαμόρφωση της αλυσίδας με άμεση απόκριση. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την απόκριση των πολυμερών και μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως χημικά είτε ως φυσικά. Τα χημικά ερεθίσματα, όπως το pH και η ιοντική ισχύς, αλλάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων ή μεταξύ των αλυσίδων και του διαλύτη σε μοριακό επίπεδο. Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και η μηχανική τάση, επηρεάζουν τους θερμοδυναμικούς παράγοντες (ενθαλπία και

εντροπία) και μεταβάλουν τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Η μεγάλη ποικιλομορφία των πλευρικών ομάδων των πολυπεπτιδίων τα καθιστά άριστα πολυμερή που διαθέτουν την ικανότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Για το λόγο αυτό βρίσκουν τεράστια απήχηση σε εφαρμογές που απαιτείται η χρήση «έξυπνων» αποκρινόμενων υλικών, επιλέγοντας αντίστοιχα αμινοξέα που να εξυπηρετούν τις εκάστοτε ανάγκες.



Εικόνα 10: Τα κυριότερα εξωτερικά ερεθίσματα που προκαλούν απόκριση στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

Αυτές οι αποκρίσεις των πολυμερικών και ειδικότερα των πολυπεπτιδικών συστημάτων είναι πολύ χρήσιμες σε βιολογικές εφαρμογές, όπως στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, στη βιοτεχνολογία και στη χρωματογραφία.^[53] Επιπλέον, ορισμένα πολυμερικά συστήματα έχουν την ικανότητα να είναι πολλαπλά αποκρίσιμα (multi-stimuli responsive), καθώς συνδυάζουν την αποκρισιμότητα σε δυο ή περισσότερα εξωτερικά ερεθίσματα, για παράδειγμα είναι θερμο-ευαίσθητα αλλά και αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH.

2.5.3.1 pH-Αποκρινόμενα πολυπεπτιδικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Είναι γνωστό ότι οι τιμές του pH διαφέρουν σε διαφορετικούς ιστούς και διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι

περισσότεροι καρκινικοί ιστοί, καθώς είναι ιστοί που φλεγμαίνουν, παρουσιάζουν διαφορετικό pH από αυτό που έχουν οι φυσιολογικοί ιστοί. Συνήθως το pH των καρκινικών κυττάρων είναι όξινο και αρκετά χαμηλότερο του φυσιολογικού. Συγκεκριμένα, το pH στο εξωτερικό περιβάλλον ενός καρκινικού κυττάρου είναι περίπου 6.5, συνεπώς πιο όξινο από τους γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς που έχουν pH 7.4, ενώ το pH μέσα σε ένα καρκινικό κύτταρο, και συγκεκριμένα στα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα, είναι 5.0 έως 5.5, και άρα πιο χαμηλό σε σχέση με το pH του κυτταρικού υγρού. Συνεπώς έχει μεγάλη πρακτική σημασία να ληφθεί αυτός ο παράγοντας υπόψη για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων που θα αποκρίνονται στις αλλαγές του pH, καθώς είναι πιθανό να παρουσιάζουν αύξηση του μεγέθους τους σε συγκεκριμένη τιμή pH, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύουν σε συγκεκριμένο σημείο του σώματος το φάρμακο που μεταφέρουν.^{[54][55][56]}

Τα πολυπεπτίδια που εμφανίζουν ευαισθησία στο pH αποτελούνται από μονομερή των οποίων οι πλευρικές ομάδες μπορούν να ιονιστούν, δηλαδή έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν ή να παρέχουν πρωτόνια σε εξάρτηση με τη μεταβολή του pH. Καθώς το pH αλλάζει, ο βαθμός ιοντισμού του πολυμερούς αλλάζει δραματικά γύρω από μια συγκεκριμένη τιμή pH, που ονομάζεται pK_a και δίδεται από τον αρνητικό λογάριθμο της σταθεράς ισορροπίας ασθενούς οξέος ($pK_a = -\log K_a$). Αυτή η γρήγορη εναλλαγή στο συνολικό φορτίο της αλυσίδας προκαλεί μεταβολή του υδροδυναμικού όγκου των πολυμερικών αλυσίδων. Η μετάβαση από συρρικνωμένη σε πλήρως εκτεταμένη διαμόρφωση ερμηνεύεται από την ωσμωτική πίεση που προκαλούν τα αντισταθμιστικά ιόντα των φορτίων των αλυσίδων.^[56]

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ένας μεγάλος αριθμός pH-αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών νανοσυστημάτων, τα οποία συντίθενται από πολυμερή που φέρουν ασθενώς όξινες ομάδες (π.χ. καρβοξυλικές) ή ασθενώς βασικές (π.χ. αμινομάδες), και μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως δέκτες είτε ως δότες πρωτονίων (ή ως συνδυασμός των δύο).^[53] Οι μεταβολές του pH του περιβάλλοντος προάγουν την πρωτονίωση-αποπρωτονίωση πολυπεπτιδίων που διαθέτουν αμινομάδες ή καρβοξυλικά οξέα στην πλευρική τους αλυσίδα. Τα πολυπεπτίδια οδηγούνται σε αντιστρεπτές μεταβολές στη διαμόρφωσή

τους και στη συμπεριφορά της αυτο-οργάνωσής τους, κατά συνέπεια και της διαλυτότητας και της συσσωμάτωσής τους. Το πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικό οξύ) και η πολυ(L-λυσίνη) έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε pH-αποκρινόμενα συστήματα, ενώ εξέχουσα θέση κατέχει η πολυ(L-ιστιδίνη) (PHis), η οποία διαθέτει έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο ανά δομική μονάδα που μπορεί να πρωτονιώνεται και να αποπρωτονιώνεται.^[56]

2.5.3.2 Θερμο-Αποκρινόμενα πολυπεπτιδικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Τα θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή παρουσιάζουν μεταβολές των διαστάσεων τους σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία είναι γνωστή ως θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου (volume phase transition temperature, VPTT), όπου προκαλείται ξαφνική αύξηση ή μείωση του μεγέθους του σωματιδίου. Επιπλέον, απαιτείται η θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου των πολυμερικών νανοσωματιδίων να είναι μεγαλύτερη από τη φυσιολογική θερμοκρασία του οργανισμού (37 °C), όπως η θερμοκρασία που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα που φλεγμαίνουν (41 °C), έτσι ώστε τα κύτταρα αυτά να αποτελέσουν στόχο.^[52]

Χαρακτηριστικά παραδείγματα θερμο-αποκρινόμενων πολυπεπτιδίων, αποτελούν μία σειρά από αμφίφιλα υβριδικά συμπολυμερή που συντέθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Jeong, του τύπου πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*-πολυ(αλανίνη-co-φαινυλαλανίνη), πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*-πολυ(αλανίνη).^[57] Η συσσωμάτωση των μικυλλίων και η αλλαγή της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων, είναι πιθανώς οι λόγοι που οδηγούν σε αυτή τη μετατροπή. Η εμφάνιση τέτοιων ιδιοτήτων σε συστήματα πολυπεπτιδίων, αποτέλεσε έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη μιας πληθώρας συστημάτων. Πρόσφατα παρατηρήθηκαν αντίστοιχες ιδιότητες θερμοαποκρισιμότητας σε πολυμερή του τύπου πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*-πολυ(τυροσίνη), από την ερευνητική ομάδα του Heise. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η ερευνητική ομάδα του κ. Ιατρού ανέφερε τη σύνθεση του συμπολυμερούς πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*-πολυ(ιστιδίνη), (PEO-*b*-PHis), το οποίο βρέθηκε ότι αποκρίνεται σε μεταβολές και της θερμοκρασίας, εκτός από τις μεταβολές του pH.^[58]

2.5.3.3 Πολυπεπτιδικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποκρινόμενα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες

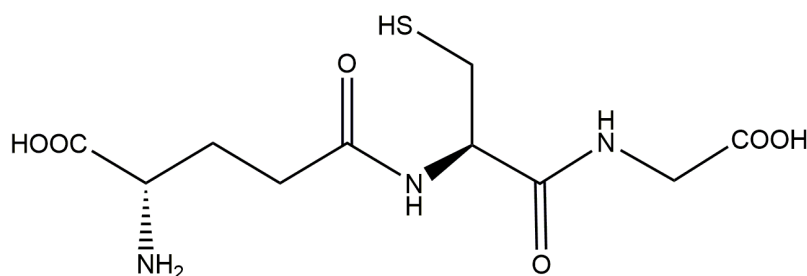
Πέρα από τη βιοσυμβατότητα, από τις βασικότερες απαιτήσεις για ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων είναι η σταθερότητά του μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Εάν ένα σύστημα δεν είναι σταθερό στα βιολογικά υγρά, υπάρχει πιθανότητα να οδηγηθεί σε απελευθέρωση του φορτίου του συστήματος (στη συγκεκριμένη περίπτωση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

Τα νανοσωματίδια μπορούν να είναι δικτυωμένα, είτε στον πυρήνα, είτε στο κέλυφός τους, ή και στα δύο. Τα νανοσωματίδια που είναι δικτυωμένα και στο κέλυφος πέρα από τον πυρήνα, ουσιαστικά ενισχύουν ακόμα περισσότερο τη σταθερότητα του συστήματος, σχηματίζοντας ένα διπλό αμυντικό σύστημα. Η δικτύωση μπορεί να επιτευχθεί είτε χρησιμοποιώντας μικρά μόρια μέσω των οποίων δημιουργείται το δίκτυο, είτε μέσω UV ακτινοβολίας προκαλώντας τη δικτύωση σε συγκεκριμένα συστήματα που έχουν αυτή τη δυνατότητα. Βέβαια, υπάρχουν και ορισμένα μειονεκτήματα που συνδέονται με τη δικτύωση, όπως είναι η περιπλοκότητα των τρόπων με τους οποίους λαμβάνει χώρα, όσο και η αποδοτικότητα της αντίδρασης.^[59]

Μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους δικτύωσης είναι η χρήση δισουλφιδικών δεσμών. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί (S–S), είναι ομοιοπολικοί δεσμοί, οι οποίοι προκύπτουν από την οξείδωση δύο σουλφυδριλομάδων (ή θειόλες, –SH). Τα δύο βασικότερα χαρακτηριστικά αυτού του δεσμού, που τον καθιστούν ελκυστικό για πολλά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, είναι η υψηλή σταθερότητά του στο πλάσμα του αίματος και η αναστρεψιμότητά του. Τα δικτυωμένα συστήματα που φέρουν δισουλφιδικούς δεσμούς, καθίστανται αυτόματα αποκρίσιμα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες (redox-responsive), λόγω της ιδιότητας των δεσμών αυτών να οξειδώνονται και να ανάγονται ανάλογα τις συνθήκες που επικρατούν.^[60]

Στην περίπτωση των «έξυπνων» συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, βασικός στόχος είναι οι δισουλφιδικοί δεσμοί να ανάγονται και συνεπώς να καταστρέφονται, μέσα ή κοντά στο κύτταρο-στόχο, έτσι ώστε να επηρεαστεί η αυτο-οργάνωσή τους και να απελευθερώσουν εκλεκτικά το φάρμακο στη συγκεκριμένη περιοχή.^[61]

Είναι γνωστό ότι στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχει η γλουταθειόνη (GSH), ένα τριπεπτίδιο, το οποίο ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, δηλαδή τους μετατρέπει στις αντίστοιχες θειόλες. Η γλουταθειόνη βρίσκεται σε αμελητέα συγκέντρωση στο αίμα (της τάξης των 1-2 μM), ενώ μέσα στον ενδοκυττάριο χώρο η συγκέντρωση της γλουταθειόνης είναι πολύ μεγαλύτερη (της τάξης των 10 mM). Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι στα καρκινικά κύτταρα η συγκέντρωση αυτή είναι ακόμη μεγαλύτερη (10-20 mM). Κάτι τέτοιο εξασφαλίζει ότι εφόσον το σύστημα προσεγγίσει τα καρκινικά κύτταρα-στόχους, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης της γλουταθειόνης στο εσωτερικό τους, θα αποικοδομηθεί και θα απελευθερώσει το φάρμακο.^{[62][63]}



Εικόνα 11: Χημική δομή Γλουταθειόνης.

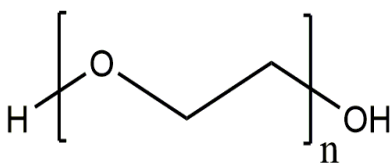
Τα τελευταία χρόνια έχει παρουσιαστεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο σχεδιασμό και στη σύνθεση πολυπεπτιδίων που μπορούν να οξειδώνονται ή να ανάγονται, ανάλογα με τον αντίστοιχο παράγοντα που υπάρχει στο χημικό περιβάλλον τους. Τα πολυπεπτίδια αυτά φέρουν συνήθως δισουλφιδικούς δεσμούς είτε στην κύρια αλυσίδα, είτε στην πλευρική, είτε πραγματοποιείται συμπολυμερισμός με μόρια που έχουν ήδη στη δομή τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Αντίστοιχα, χαρακτηριστικά παραδείγματα cross-linker σε κάθε περίπτωση είναι η χρήση του μορίου κυσταμίνης, η σύνθεση πολυπεπτιδίων βασισμένων στην πολυ(L-κυστεΐνη) ή την πολυ(L-κυστίνη) και ο συμπολυμερισμός μέσω μακροαπαρχητή πολυ(αιθυλενοξειδίου) που φέρει δισουλφιδικούς δεσμούς (PEO-SS-NH₂).^[64]

2.5.4 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν

Στην εργασία αυτή έγινε η σύνθεση πολυμερικών μικυλλίων σε μέγεθος νανοσωματιδίων. Η σύνθεση αυτών των μορίων έχει σαν στόχο τη στοχευμένη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων στους καρκινικούς ιστούς και κύτταρα. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν τα PEO-*b*-PHis-*b*-PBGL, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και νανοσωματίδια χρυσού, ο ρόλος των οποίων εξηγείται αναλυτικά στη συνέχεια.

2.5.4.1 Πολύ(αιθυλενοξειδίο), (PEO)

Το πολυ(αιθυλενοξειδίο) (PEO) είναι ένας γραμμικός ή διακλαδισμένος πολυαιθέρας με ποικιλία μοριακών βαρών. Το όνομα πολυ(αιθυλενογλυκόλη), (PEG) αναφέρεται σε πολυμερή με μοριακά βάρη κάτω των 20.000 g/mol, ενώ το PEO σε πολυμερή με μοριακά βάρη άνω των 20.000 g/mol. Τα PEG και PEO, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος είναι υγρά ή στερεά χαμηλού σημείου τήξεως. Το σημείο τήξεως είναι ανάλογο του μοριακού βάρους προσεγγίζοντας ένα όριο περίπου στους 67 °C^[65]

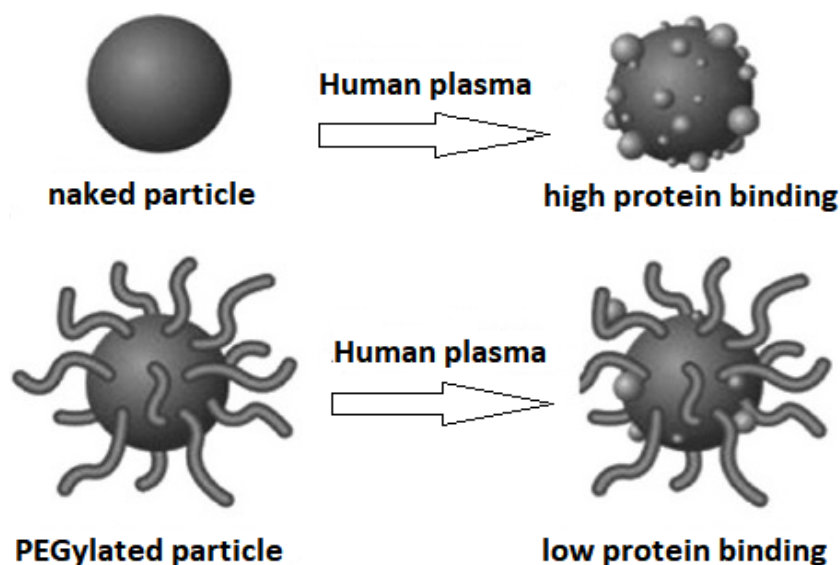


Εικόνα 12: Χημική δομή PEO.

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια αλληλεπιδρούν ισχυρά με το γύρω περιβάλλον, δηλαδή με το ενδοθηλιακό σύστημα, τα κύτταρα και τις πρωτεΐνες του αίματος. Συνεπώς, απομακρύνονται ταχύτατα από την κυκλοφορία, ως επί το πλείστον από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα. Γι' αυτόν το λόγο, το κομμάτι της επιστήμης που ασχολείται με τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, έχει στραφεί στην τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσυστημάτων, έτσι ώστε να έχουν τέτοιες φυσικοχημικές ιδιότητες που να εξασφαλίζεται η μεγαλύτερη διάρκεια κυκλοφορίας μέσα στον οργανισμό. Βρέθηκε ότι αυτή η επιφάνεια θα πρέπει να καλύπτεται από πολυμερές ή άλλο μόριο το οποίο κάνει το συνολικό σύστημα «stealth». Ο όρος αυτός κυριολεκτικά, σημαίνει λαθραίος, μυστικός, άρα αυτό που επιδιώκεται είναι να εξασφαλιστεί ένας τρόπος ώστε οι νανομεταφορείς φαρμάκων να μπαίνουν λαθραία στον οργανισμό, σαν

«δούρειοι ίπποι» και να μεταφέρουν το φάρμακο εκεί που πρέπει, χωρίς να τους αντιληφθούν οι αμυντικοί μηχανισμοί του οργανισμού. Τα πολυμερή αυτά πρέπει να έχουν δύο συγκεκριμένα χαρακτηριστικά: μεγάλη ευελιξία και υδροφιλικότητα.^{[66][67]}

Το πολυ(αιθυλενοξειδίο) είναι ένα ουδέτερο πολυμερές, δε φέρει φορτία που θα μπορούσαν να προκαλέσουν αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια κατά την είσοδό του στον οργανισμό, ενώ ταυτόχρονα είναι υδρόφιλο και ευέλικτο υλικό. Μπορεί να δημιουργεί γύρω από τα νανοσωματίδια επιφανειακό στρώμα, το οποίο μειώνει την προσκόλληση των οφονινών που βρίσκονται στον ορό του αίματος, πάνω στα νανοσωματίδια και να τα κάνει «αόρατα» για τα μακροφάγα. Η ιδιότητά του αυτή παρατείνει το χρόνο κυκλοφορίας του συστήματος στο αίμα, άρα αυξάνει τις πιθανότητες να μπορέσει να προσεγγίσει τα κύτταρα-στόχους. Η ιδιότητα αυτή ονομάζεται βιοσυμβατότητα. Τέλος, μια ακόμη ιδιότητα που έχει το πολύ(αιθυλενοξειδίο) είναι αυτή της βιοαποικοδομησιμότητας. Βιοαποικοδομήσιμο είναι εκείνο το υλικό, το οποίο μπορεί να αφομοιώνεται από τον οργανισμό εύκολα και στη συνέχεια να αποβάλλεται από αυτόν.^[68]

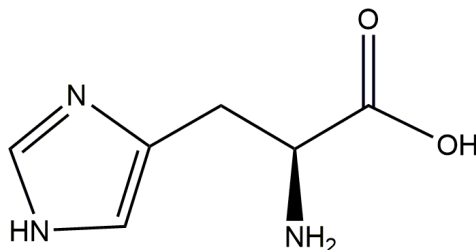


Σχήμα 12: Τα νανοσωματίδια με πολυαιθυλενοξειδίο μπορούν να αποφύγουν την απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία του αίματος, απωθώντας την απορρόφηση πρωτεϊνών, παρατείνοντας έτσι την παραμονή των νανοσωματιδίων στο αίμα.

Στην παρούσα εργασία το PEO-NH₂, που προήλθε από την τροποποίηση του PEO-OH, αποτέλεσε τον απαρχητή του πολυμερισμού, ενώ παράλληλα

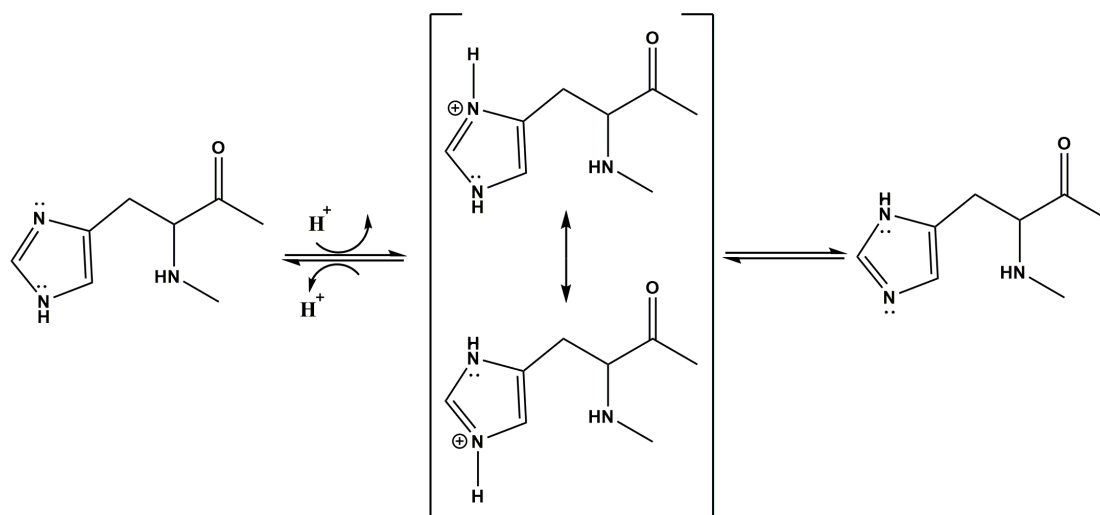
διαπιστώθηκε ότι αποτελεί το κέλυφος των νανοσωματιδίων,^[69] κάτι που εξασφαλίζει στο σύστημα όλες τις ιδιότητες που προαναφέρθηκαν.

2.5.4.2 Πολυ(Ιστιδίνη), (PHis)



Εικόνα 13: Χημική δομή Ιστιδίνης.

Το αμινοξύ της ιστιδίνης παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον, καθώς το πολυμερές της αποτελεί ιδανικό πολυπεπτιδίο για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων. Όπως προαναφέρθηκε, τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων πρέπει να αποκρίνονται σε κάποιο ερέθισμα. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν χαμηλότερο pH από τα φυσιολογικά, είναι δηλαδή περισσότερο όξινα. Η ξεχωριστή ιδιότητα της ιστιδίνης οφείλεται στο ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων στο μη υποκατεστημένο άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου, το οποίο προσδίδει στο μόριο pK_a περίπου 6.0, άρα και pH-αποκρισιμότητα. Αυτό για ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων σημαίνει ότι σε pH~6.5 (που αντιστοιχεί στο pH ενός καρκινικού κυττάρου) ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της πολυ(ιστιδίνης) θα πρωτονιωθεί και θα προκληθεί διόγκωση στο σύστημα που μεταφέρει το φάρμακο, άρα και απελευθέρωση του φαρμάκου, λόγω της αλλαγής της δευτεροταγούς δομής του πολυπεπτιδίου, ενώ σε pH~7.4 (υγιείς ιστοί) το μόριο θα είναι απολύτως σταθερό. Ακόμα το γεγονός ότι σχηματίζει μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, καθιστά την πολυ(ιστιδίνη) ένα ιδανικό μέσο για να χρησιμοποιηθεί για βιολογικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς.

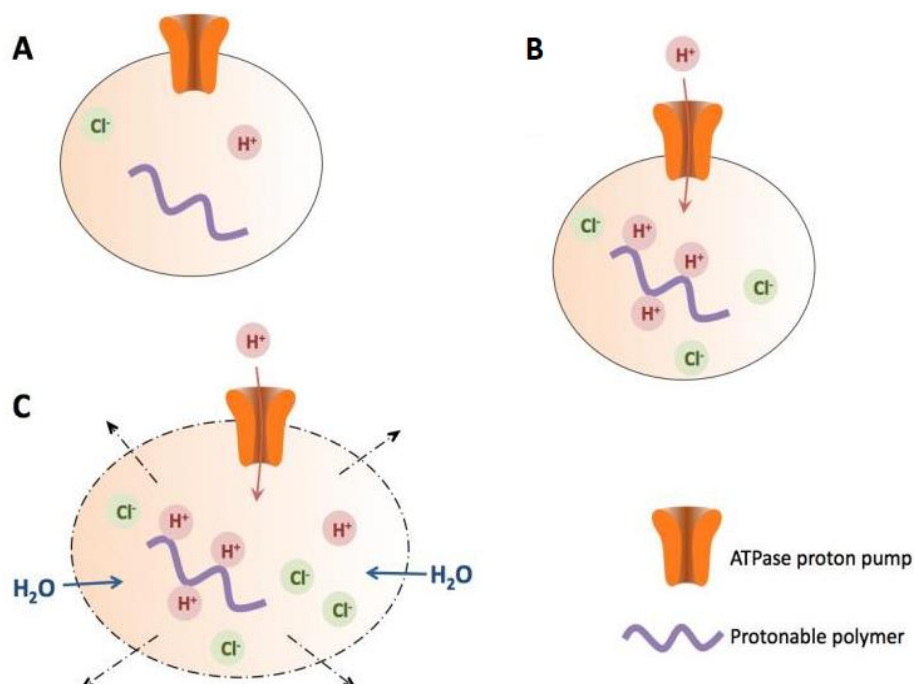


Σχήμα 13: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης).

Επίσης, η πολυ(ιστιδίνη) έχει την ικανότητα να συμπλέκει μέταλλα (όπως Au, Ni, Co, Cu, Mn, Pt). Αυτή η ικανότητά της μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία νανοσωματιδίων χρυσού (Au-NPs), τα οποία βρίσκουν εφαρμογή στη θεραπεία του καρκίνου με τη χρήση ακτινοβολίας (photo-thermal effect) αλλά και στην απεικόνισή του. Πιο συγκεκριμένα, ο υποχλωριώδης χρυσός, (HAuCl₄) συμπλέκεται με το άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης) και ανάγεται. Ακόμα, η ιστιδίνη μπορεί να συμπλεχτεί με αντικαρκινικά φάρμακα που περιέχουν λευκόχρυσο, όπως το cis-platin. Αυτό δίνει τη δυνατότητα σχεδιασμού πολυμερικών νανοφορέων για φάρμακα που περιέχουν μέταλλα στη δομή τους.

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

πίεση, οδηγεί σε διόγκωση και τελικά σε ρήξη των ενδοσωμάτων, απελευθερώνοντας όλο το περιεχόμενο στο κυττάρo. [70]



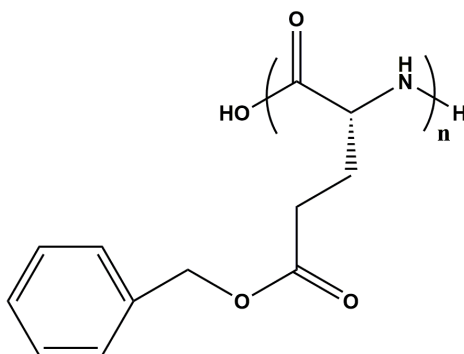
Εικόνα 14: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα.

Παρόλο όμως τις ποικίλες ιδιότητες της, η ιστιδίνη παρουσιάζει ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα, αυτό της ρακεμείωσης. Καθοριστικό παράγοντα στη μείωση της ρακεμείωσης αποτελεί η προστατευτική ομάδα. Οι προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση της PHis είναι είτε η benzyl προστατευτική ομάδα, είτε η 2,4-dinitrophenyl προστατευτική ομάδα (DNP), όμως καμία δεν προσδίδει έλεγχο στην σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών. Η benzyl προστατευτική ομάδα αποπροστατεύεται κάτω από πολύ δραστικές συνθήκες όπου μπορεί να προκαλέσει σπάσιμο του πεπτιδικού δεσμού ή ρακεμείωση, ενώ η 2,4-dinitrophenyl προστατευτική ομάδα (DNP) δε συνδυάζεται με δισουλφιδικούς δεσμούς, αφού ο δεσμός αυτός σπάει κατά τη διάρκεια της αποπροστασίας του DNP με θειόλυση. Το 2014 η ερευνητική ομάδα του κ. Ιατρού ανέφερε τη σύνθεση της PHis με τρίτυλο-προστατευτική ομάδα. Τα πλεονεκτήματα της τρίτυλο-προστατευτικής ομάδας είναι ότι εμφανίζει τη μικρότερη ρακεμείωση κατά την αποπροστασία και μπορεί να αποπροστατευτεί εύκολα με ασθενή οξέα. [55] Επίσης, υπάρχει εκλεκτικότητα κατά την αποπροστασία της τρίτυλο-προστατευτικής ομάδας,

αφού οι υπόλοιπες προστατευτικές ομάδες δε θα επηρεαστούν και θα αποκοπεί μόνο η τρίτυλο-ομάδα. Άλλο ένα χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ομάδας είναι ότι είναι πολύ σταθερή απέναντι σε ουδέτερα και αλκαλικά μέσα και ως προς τα πυρηνόφιλα. Για τους παραπάνω λόγους, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να συντεθούν πολυμερή βασισμένα στην PHis, με χρήση του μονομερούς Trt-His-NCA, και έγινε προσπάθεια για οργάνωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων προς σχηματισμό ανώτερων σταθερών μικυλλιακών δομών.

2.5.4.3 Πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικό οξύ), (PBLG)

Το γ-βενζυλο-L-γλουταμικό οξύ προέρχεται από το γλουταμικό οξύ, το οποίο αποτελεί ένα από τα 22 αμινοξέα. Η προστασία της πλευρικής καρβοξυλομάδας γίνεται με την προσθήκη βενζυλοξυκαρβονυλομάδας και έτσι προκύπτει το τελικό BLG. Τα πεπτίδια του PBLG σχηματίζουν 2 δευτεροταγείς δομές, τις R έλικες σταθεροποιημένες από ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου και τα α-φύλλα, τα οποία επίσης σταθεροποιούνται με τον ίδιο τρόπο. Το πολυμερές αυτό είναι υδρόφοβο και μάλιστα στη συγκεκριμένη εργασία αποτελεί τον υδρόφοβο πυρήνα στα μικύλλια που αυτο-οργανώνονται σε υδατικά διαλύματα.



Εικόνα 15: Χημική δομή του πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικού οξέος).

Το πολύ(βενζυλο-L-γλουταμικό οξύ) (PBLG) είναι ένα βιοπολυμερές που έχει προσελκύσει πρόσφατα την προσοχή λόγω της βιοσυμβατότητας, της μη ανοσογονικότητας και της βιοδιασπασιμότητάς του. Πολλοί ερευνητές έχουν δείξει ότι το PBLG είναι ιδανικός υποψήφιος για αντιμικροβιακά υλικά, ανοσοενισχυτικά εμβολίων, θεραπείες καρκίνου, ιατρικές συσκευές και αναγέννηση ιστών. Στο όχι και τόσο μακρινό μέλλον, το PBLG μπορεί να

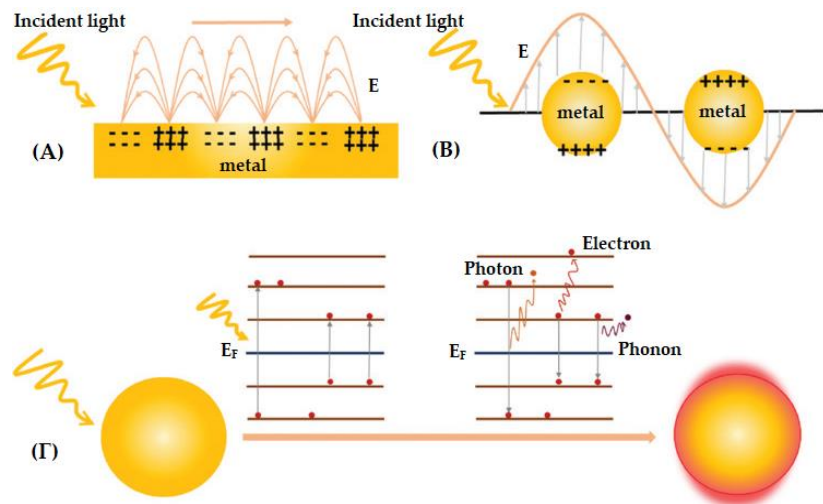
χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία πραγματικών ασθενών, και όχι μόνο για δοκιμές σε ζώα. Το πολυ(γλουταμικό οξύ) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο σχηματισμό νανοσωματιδίων για τη μεταφορά και εκλεκτική απελευθέρωση αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως του φαρμάκου σισπλατίνη και της πακλιταξέλης.^{[71][72]}

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το γ-βένζυλο-προστατευμένο πολυ(L-γλουταμικό οξύ) (Εικόνα 15) ως συστάδα του τρισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG για το σχηματισμό νανοσωματιδίων χρυσού, όπως θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο.

2.6 Νανοσωματίδια χρυσού [AuNPs, Gold (Au) Nanoparticles]

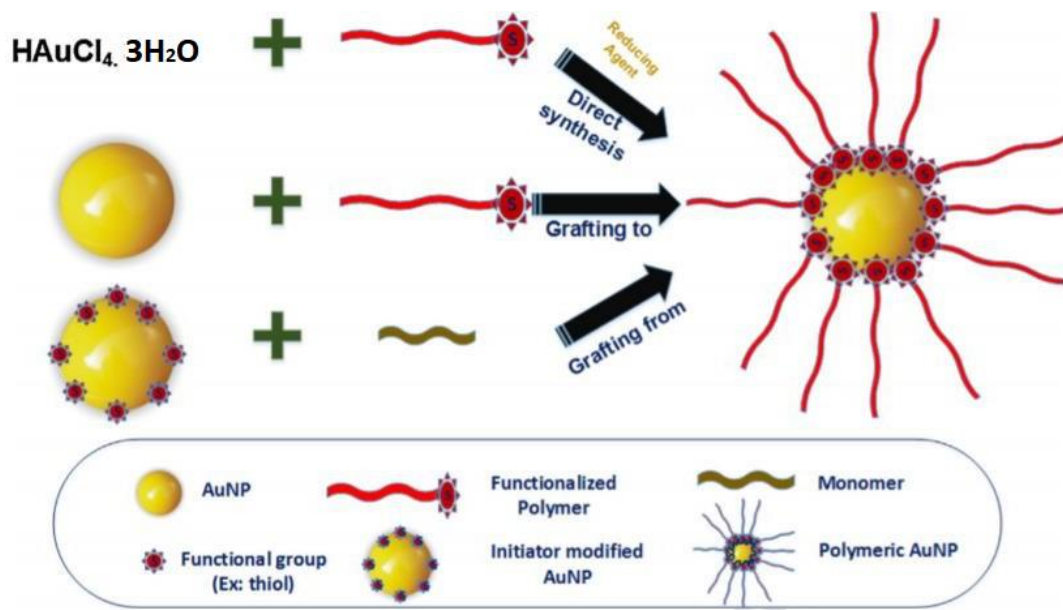
2.6.1 Ιδιότητες και εφαρμογές των AuNPs

Η νανοϊατρική έχει εφαρμοστεί στην κυτταρική απεικόνιση, τη μοριακή διάγνωση και τη στοχευμένη θεραπεία εξαρτώμενη από τη δομή, τα βιοϋλικά και το σχήμα των νανοσωματιδίων (NPs). Πρόσφατα, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη χρήση των πλασμονικών νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs) για τη διάγνωση του καρκίνου και τη φωτοθερμική θεραπεία, κυρίως μέσω των μοναδικών ιδιοτήτων που προκύπτουν από τον εντοπισμένο επιφανειακό συντονισμό πλασμονίου (LSPR).^[73] Σήμερα, η θεραπεία του καρκίνου βασίζεται σε χειρουργική επέμβαση που συμπληρώνεται με χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία και ανοσοθεραπεία. Δυστυχώς, οι συμβατικές μέθοδοι δεν είναι στοχευμένες, αλλά είναι αρκετά επεμβατικές σε υγιείς ιστούς κατά μήκος της ακτινοβολίας, σκοτώνοντας έτσι και υγιή κύτταρα πέρα από τα παθολογικά, με αποτέλεσμα να καταστρέφεται το ανοσοποιητικό σύστημα ή να υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για ανάπτυξη δευτεροπαθών καρκίνων.^[74] Η στοχευμένη φωτοθερμική θεραπεία με λέιζερ που χρησιμοποιεί οπτική θέρμανση για την κατάλυση των καρκινικών κυττάρων, αποτελεί μια ήπια λύση που μπορεί να ξεπεράσει τα παραπάνω μειονεκτήματα. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, το φως είναι ένα ιδανικό εξωτερικό ερέθισμα καθώς ρυθμίζεται εύκολα, εστιάζεται και ελέγχεται από απόσταση.^[75]



Εικόνα 16: Διαγράμματα των επιφανειακών πλάσμονίων. (Α) Πολλαπλασιαστική ενέργεια πλάσμονίου (SPP) που παράγεται στη μεταλλική-διηλεκτρική διεπαφή. (Β) εντοπισμένος συντονισμός επιφανειακού πλάσμονίου (LSPR) που παράγονται στα μεταλλικά νανοσωματίδια. (Γ) Διάσπαση με τρεις διαφορετικούς τρόπους (ηλεκτρόνιο σε φωτόνιο, ηλεκτρόνιο σε ηλεκτρόνιο και ηλεκτρόνιο σε φωτόνιο) και παραγωγή τοπικής θέρμανσης.^[80]

Τα AuNPs παρουσιάζουν μοναδικές οπτικές ιδιότητες λόγω του LSPR, καθώς απορροφούν το φως εκατομμύρια φορές πιο έντονα από τα μόρια οργανικής βαφής.^{[76][77]} Επιπλέον, σχεδόν όλο το απορροφημένο φως μετατρέπεται γρήγορα σε θερμότητα μέσω μιας σειράς ήπιων, μη ακτινοβολικών διεργασιών. Τα AuNPs είναι επίσης, πολύ σταθερά στο φως και βιοσυμβατά. Αυτά τα χαρακτηριστικά τα καθιστούν τη νέα γενιά φωτοθερμικών παραγόντων αντίθεσης για φωτοθερμική θεραπεία, στην οποία η ενέργεια των φωτονίων μετατρέπεται σε θερμότητα επαρκή για να προκαλέσει κυτταρική βλάβη μέσω θερμικών επιδράσεων όπως η υπερθερμία, η πήξη και η εξάτμιση.^[78] Επιπροσθέτως, τα AuNPs μπορούν να εντοπιστούν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, καθιστώντας τα ιδανικά υλικά για απεικόνιση και πρόγνωση όταν συσσωρεύονται σε παθολογικά κύτταρα, επομένως χρησιμοποιούνται ως νέα θερμοστικά, καθώς συνδυάζουν και διαγνωστική και θεραπευτική δράση. Ως εκ τούτου, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη χρήση των οπτικών ιδιοτήτων τους σε βιολογικές εφαρμογές, όπως φασματοσκοπική ανίχνευση, απεικόνιση καρκίνου και θεραπεία.^[79]



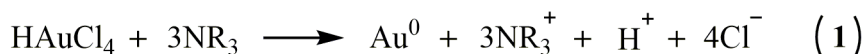
Σχήμα 14: Μέθοδοι για τη σύνθεση πολυμερικών νανοσωματιδίων χρυσού.

Το μέγιστο φάσμα απορρόφησης για κανονικά, μικρά, σφαιρικού σχήματος κολλοειδή AuNPs είναι μεταξύ 500 και 560 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος, η παραδοσιακή φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) των ιστών που μεσολαβεί από το λέιζερ ορατού φωτός περιορίζεται από το ανεπαρκές βάθος διείσδυσης, αφού σε αυτό το μήκος κύματος η δέσμη αλληλεπιδρά με τους ιστούς, περιορίζοντας τη χρησιμότητά της για βαθιά θεραπεία όγκων. Προκειμένου να αυξηθεί το βάθος διείσδυσης, η απορρόφηση των NPs θα πρέπει να μετατοπιστεί στο σχεδόν-υπέρυθρο φως (NIR), δηλαδή στο εύρος μήκους κύματος 800-1200 nm. Συνεπώς, συντέθηκαν μεγάλα συμπαγή AuNPs με μεγάλες διαστάσεις και ποικιλία σχημάτων. Σε αντίθεση με τα AuNPs, η φασματική περιοχή απορρόφησης των νανοκελυφών χρυσού (AuNS) δεν εξαρτάται από τις συνολικές διαστάσεις του NP, αλλά από το σχετικό μέγεθος του πυρήνα των νανοσωματιδίων και το πάχος του κελύφους χρυσού. Έχει αποδειχθεί ότι όσο μικρότερο είναι το πάχος του κελύφους και όσο μεγαλύτερες είναι οι διαστάσεις του πυρήνα, τόσο μεγαλύτερο είναι το μήκος κύματος απορρόφησης.^[81]

2.6.2 Μηχανισμός σχηματισμού AuNPs και AuNSs

Η σύνδεση μεταξύ μετάλλων και ιστιδίνης έχει μελετηθεί εκτενώς λόγω της υψηλής συγγένειας αυτού του αμινοξέος με ιόντα μετάλλου.^{[81][82]} Η PHis έχει επίσης την ικανότητα να ανάγει το HAuCl_4 και να σχηματίζει νανοσωματίδια

χρυσού. Ο Au(III) είναι ένα μέταλλο μετάπτωσης d8 και είναι ισχυρό οξειδωτικό. Ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων του χρυσού γίνεται με την προσθήκη του H₂AuCl₄ σε υδατικό διάλυμα του πολυμερούς και στη συνέχεια ακολουθεί θέρμανση στους 80 °C,^[83] που οδηγεί στην αναγωγή λόγω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από την αμίνη της ομάδας ιμιδαζολίου στο μεταλλικό ιόν, με αποτέλεσμα το σχηματισμό Au(0) σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

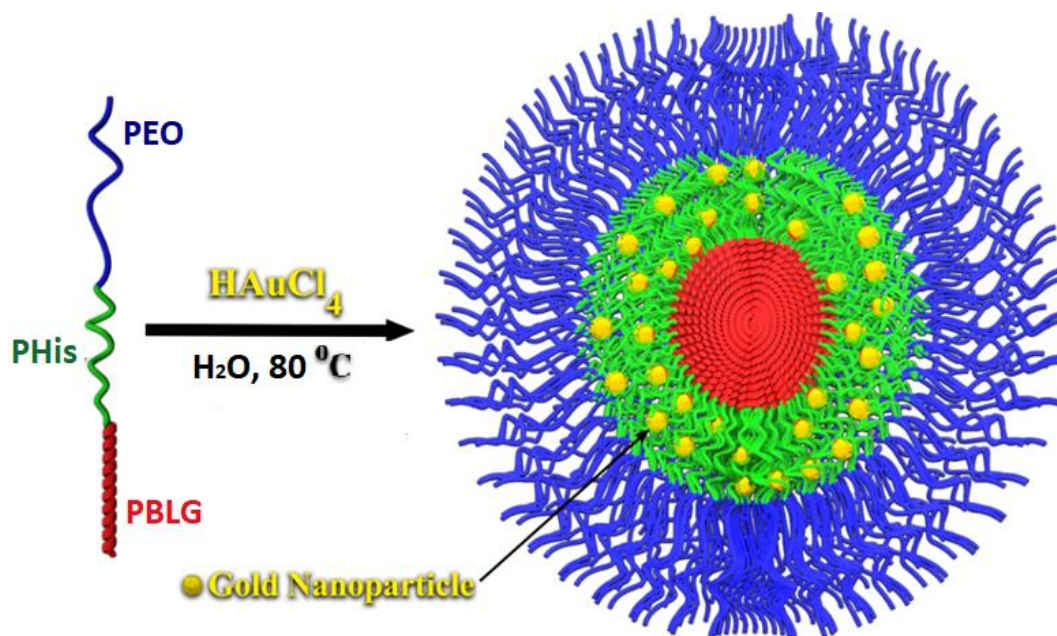


Η ιστιδίνη οξειδώνεται για να σχηματίσει ένα ριζικό κατιόν. Οι μονομερικές μονάδες της ιστιδίνης είναι θετικά φορτισμένες, δημιουργώντας επίσης HCl που θα πρωτονιώσει περαιτέρω την PHis που δεν αντέδρασε, καθιστώντας την πρωτονιωμένη PHis υδρόφιλη. Λόγω της ήπιας αναγωγικής ικανότητας του ιμιδαζολικού δακτυλίου, η αναγωγική αντίδραση μεταξύ Au³⁺ και ιστιδίνης είναι αργή και απαιτείται αυξημένη θερμοκρασία.^[84]

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν τρισυσταδικά πολυμερή PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG. Σε αυτά τα συστήματα σχηματίζονται μικύλλια πυρήνα-κελύφους στο νερό, όπου η εξωτερική κορώνα αποτελείται από PEO, το ενδιάμεσο στρώμα αποτελείται από την ελαφρώς ενυδατωμένη PHis, ενώ ο υδρόφοβος πυρήνας βασίζεται στο εξαιρετικά υδρόφοβο PBLG.^[55] Η προσθήκη υδατικού H₂AuCl₄ σε υδατικό διάλυμα πολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG, αρχικά οδηγεί σε πρωτονίωση της PHis που την καθιστά υδρόφιλη και διογκωμένη και τα αντίθετα ανιόντα AuCl₄⁻ αλληλεπιδρούν με την πρωτονιωμένη και θετικά φορτισμένη PHis μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Αυτή η αλληλεπίδραση συμβαίνει κυρίως στο σημείο σύνδεσης μεταξύ των αλυσίδων PEO και PHis. Σε αυτό το σημείο, τα NPs αναμένεται να αυξηθούν σε διάσταση λόγω της πρωτονίωσης που καθιστά την PHis υδρόφιλη και λόγω της διογκωσης από το νερό. Το ελεύθερο άζωτο του ιμιδαζολίου στη συνέχεια συμπλέκεται με το Au(III), σχηματίζοντας χηλικά σύμπλοκα, οδηγώντας στο σχηματισμό πιο συμπαγών NPs και μικρότερων διαστάσεων. Η PHis έχει την ισχυρότερη ικανότητα να συμπλέκει ιόντα Au(III) μεταξύ των τριών πολυμερικών αλυσίδων. Κατά τη θέρμανση, ο Au(III) ανάγεται σύμφωνα με την εξίσωση (1) και παράγεται HCl που θα πρωτονώνει περαιτέρω το

υπόλοιπο στρώμα της PHis του συσσωματώματος. Ο σχηματισμός ανηγμένων νανοσωματιδίων Au(0), ως υδρόφοβα, θα προκαλέσουν περαιτέρω συρρίκνωση των NPs.^[85] Ωστόσο, μειώνοντας το λόγο PHis/Au(III) (αυξάνοντας την ποσότητα του Au), αναμένεται μείωση των διαστάσεων των NPs, αφού όλες οι μονομερικές μονάδες της PHis γίνονται έντονα υδρόφοβες μέσω σύνδεσης με τα σχηματισμένα νανοσωματίδια Au(0). Μια πρόσθετη ποσότητα οξέος, θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με τις τελικές ομάδες αμίνης των αλυσίδων εντός του υδρόφοβου PBLG, οδηγώντας στην αύξηση των διαστάσεων του πυρήνα. Χρησιμοποιούνται διάφορες αναλογίες μεταξύ των μονομερικών μονάδων της ιστιδίνης και Au, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση στη δομή των νανοσωματιδίων καθώς και το πάχος των νανοκελύφων, με στόχο να επιτευχθεί το υψηλότερο δυνατό μήκος κύματος απορρόφησης.^[85] Υπάρχουν μόνο λίγες ερευνητικές εργασίες που αναφέρουν τη χρήση της PHis για το σχηματισμό μικρών NPs που απορροφούν στο NIR.^{[86][87]} Ωστόσο, σε αυτές τις αναφορές, το μέγιστο μήκος κύματος που λαμβάνεται από μικρά AuNS ήταν κοντά στα 750 nm, ενώ υπήρχε κάποια απορρόφηση σε υψηλότερα μήκη κύματος.



Σχήμα 15: Πορεία σύνθεσης των νανοκελυφών χρυσού (AuNSs).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

3.1 Εισαγωγή

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

3.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου, (IR)

Όλα τα μόρια διαθέτουν κάποια συγκεκριμένη ποσότητα ενέργειας κατανεμημένη σε όλη τη δομή τους, που προκαλεί στους δεσμούς δονήσεις (επιμηκύνσεις) και κάμψεις. Ταυτόχρονα λόγω της ενέργειας αυτής, τα άτομα πάλλονται και περιστρέφονται, ενώ παρατηρούνται και διάφορες άλλες μοριακές δονήσεις, όπως αυτές που προαναφέρθηκαν. Η ποσότητα της ενέργειας που περιλαμβάνει ένα μόριο δεν μεταβάλλεται κατά συνεχή τρόπο, αλλά είναι κβαντισμένη. Δηλαδή ένα μόριο μπορεί να επιμηκύνεται, να πάλλεται ή να κάμπτεται σε συγκεκριμένες συχνότητες που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα ενεργειακά επίπεδα. Στην πραγματικότητα οι δεσμοί συνεχώς δονούνται και κάμπτονται, με συνέπεια το μήκος τους να αυξάνεται και να μειώνεται ανάλογα. Έτσι ένας δεσμός που συνδέει δύο άτομα, στην πραγματικότητα πάλλεται σαν ελατήριο.^[88]

Όταν το μόριο δέχεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφάται ενέργεια μόνο στην περίπτωση που η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίδια με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δυο δονητικών συχνοτήτων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίση με εκείνη της ακτινοβολίας, αυξάνει το πλάτος της. Με άλλα λόγια, το «ελατήριο», που συνδέει τα δυο άτομα διαδοχικά, εκτείνεται και συμπιέζεται λίγο

περισσότερο. Εφόσον κάθε συχνότητα που απορροφάται από ένα μόριο, αντιστοιχεί σε μια προκαθορισμένη μοριακή κίνηση μπορούν να διαπιστωθούν τις κινήσεις του μορίου, μελετώντας το φάσμα υπερέθρου. Από την ερμηνεία αυτών των κινήσεων, μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί και κατά συνέπεια ποιες λειτουργικές ομάδες υπάρχουν στην προς μελέτη ένωση. Οι δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων μίας ένωσης είναι ανεξάρτητες της υπόλοιπης δομής και συνήθως εμφανίζονται σε περιοχές του υπερέθρου φάσματος όπου δεν απορροφούν οι δονήσεις σκελετού (Πίνακας 3). Πιο συγκεκριμένα, η υπέρυθρη περιοχή από 4000 cm^{-1} έως 400 cm^{-1} είναι δυνατό να χωριστεί σε τέσσερα τμήματα:^[89]

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

Πίνακας 3: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1} .

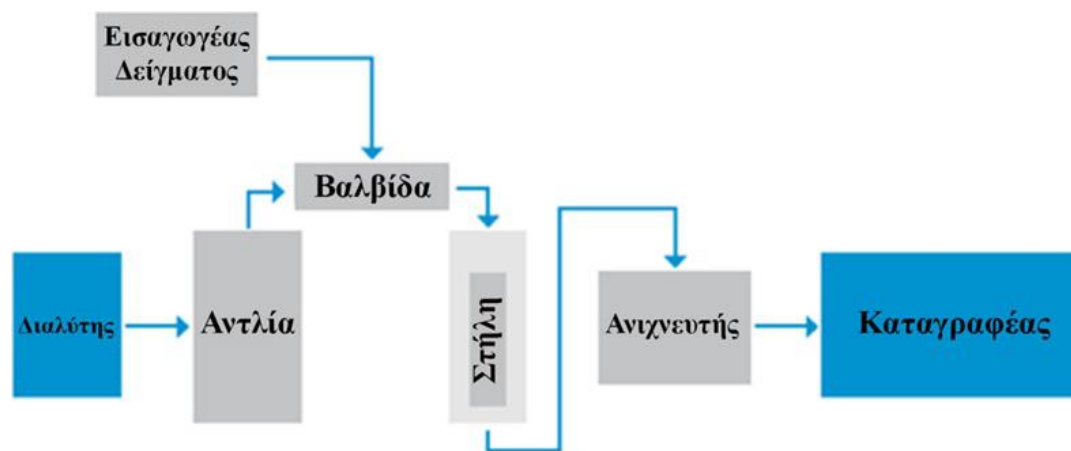
Λειτουργική Ομάδα	Περιοχή Απορρόφησης ($1/\text{cm}$)			
O-H	3650-3590			
N-H	3500-3300	1650-1590	900-650	
=CH-H	3100-3070	1420-1410	900-880	
=C-H	3100-3000	2000-1600		
C-H	2900-2700	1440-1320		
=-CH ₃	2880-2860	2970-2950	1380-1370	1470-1430
O-H	2700-2500	1320-1210	950-900	
C≡C	2140-2100			
C=O	1750-1700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

Η τεχνική του IR εφαρμόζεται στα πολυπεπτίδια προκειμένου να διερευνηθεί ποιοτικά η επιτυχή σύνθεση είτε του N-καρβοξυ ανυδρίτη των αμινοξέων (συνήθεις δονήσεις έκτασης στα 1785 cm^{-1} και 1855 cm^{-1}), είτε για τη σύνθεση των πολυμερικών πεπτιδίων (δόνηση του αμιδικού δεσμού στα 1650 cm^{-1}). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε μηχάνημα Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR. Για την παρασκευή του δείγματος χρησιμοποιείται περίπου 1 mg ουσίας και 0.2 g ξηρής σκόνης KBr. Τα δύο υλικά αναμιγνύονται και λειοτριβούνται καλά σε γουδί, σε σημείο που το μέγεθος των σωματιδίων να είναι μικρότερο από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, ώστε να αποφευχθεί η σκέδαση της ακτινοβολίας. Στη συνέχεια το μίγμα πιέζεται σε ειδική μήτρα σε πίεση μέχρι 10 τόνων για να δημιουργηθεί ένα διαφανές δισκίο. Τα αποτελέσματα είναι καλύτερα εάν το δισκίο παρασκευαστεί σε συνθήκες κενού για να ελαχιστοποιηθεί ο εγκλωβισμός αέρα. Τέλος, το δισκίο τοποθετείται στην οπτική δέσμη του φασματομέτρου και γίνεται η καταγραφή του φάσματος και η ταυτοποίηση της ένωσης με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

3.3 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών, (SEC)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) ή χρωματογραφία διαπερατότητας μέσω πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC) αποτελεί μία από τις δυναμικότερες μεθόδους χαρακτηρισμού των πολυμερών τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα, όσο και στη

βιομηχανία. Πρόκειται ουσιαστικά για μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προσαρμοσμένης για ανάλυση μακρομορίων. Η σχετική απλότητα της μεθόδου, η ταχύτητα με την οποία πραγματοποιούνται οι αναλύσεις, η δυνατότητα εύρεσης οποιασδήποτε μέσης τιμής μοριακού βάρους και της κατανομής μοριακών βαρών, αλλά και η δυνατότητα διασύνδεσης με άλλες μεθόδους χαρακτηρισμού (όπως η ιξωδομετρία τριχοειδούς σωλήνα) για τη λήψη περισσότερων πληροφοριών είναι ενδεικτικά της σπουδαιότητας της μεθόδου και εξηγούν την ευρεία χρήση της. Η διάταξη της οργανολογίας σε μία συσκευή SEC φαίνεται στο Σχήμα 16.



Σχήμα 16: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης SEC.

Διάλυμα πολυμερούς διέρχεται μέσω στήλων οι οποίες περιέχουν ένα μέσο διαχωρισμού, συνήθως σφαιρικούς πόρους από δικτυωμένο πολυστυρένιο γνωστό με την εμπορική ονομασία styragel. Η πηκτή styragel διαθέτει πόρους το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 60-107 Å (μέση διάμετρος). Το gel είναι πλήρως εμβαπτισμένο στο διαλύτη της διάταξης χωρίς την παρουσία αερίων. Όταν διάλυμα πολυμερούς εισέρχεται από τις στήλες, τα μόρια του πολυμερούς διέρχονται από τους πόρους οι οποίοι είναι αρκετά μεγάλοι ώστε αρκετά μεγάλα μόρια, όπως είναι τα πολυμερή, να χωρούν μέσα σε αυτούς. Επομένως, αφού οι στήλες είναι πακεταρισμένες με υλικό που παρουσιάζει κατανομή μεγέθους πόρων, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των πολυμερικών μορίων με βάση τη διαφορά μεγέθους τους. Τα μεγάλα μόρια περνούν από ελάχιστους πόρους με αποτέλεσμα να εκλούνται νωρίτερα από τα μικρότερα που λόγω του μικρού μεγέθους τους παραμένουν σε περισσότερους πόρους. Ουσιαστικά, ο υδροδυναμικός όγκος είναι το μοριακό μέγεθος που καθορίζει

τον χρόνο έκλουσης του πολυμερούς. Αν ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι καλός για κάποιο συγκεκριμένο πολυμερές τότε αυτό διογκώνεται και αποκτά όγκο (υδροδυναμικός όγκος). Γίνεται, συνεπώς, αντιληπτό ότι στην περίπτωση των γραμμικών μονομοριακών πολυμερών ο υδροδυναμικός όγκος μπορεί να συνδεθεί άμεσα με το χρόνο έκλουσης. Δε συμβαίνει όμως το ίδιο με τα μίγματα ομοπολυμερών, συμπολυμερών και διακλαδισμένων ομοπολυμερών ή συμπολυμερών γιατί :

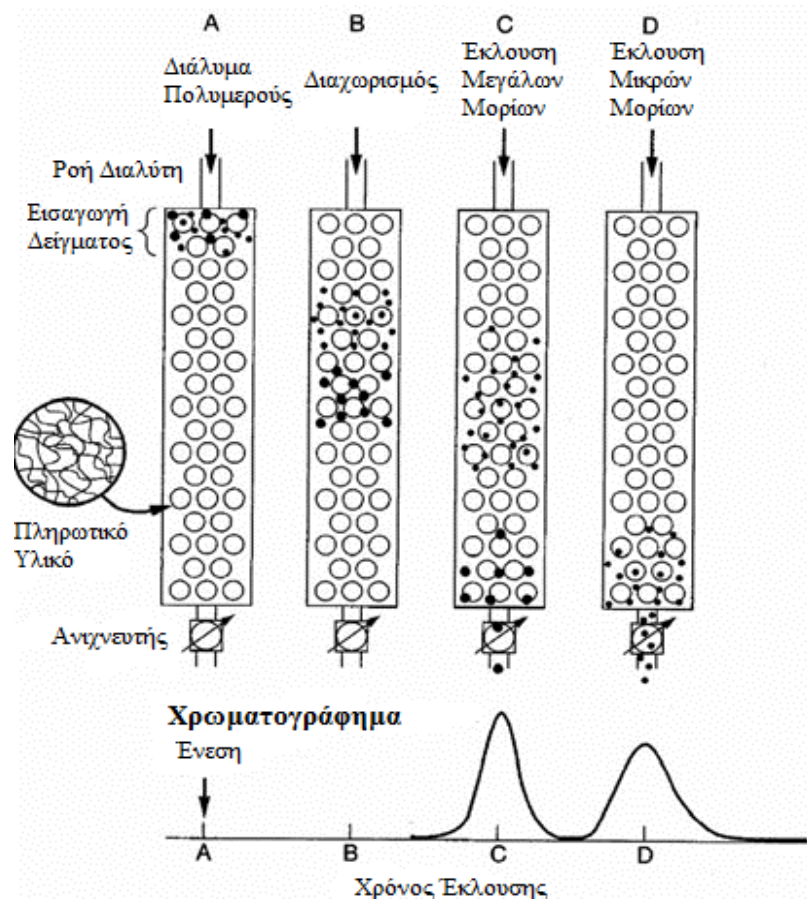
A. Για δεδομένο μοριακό βάρος ο υδροδυναμικός όγκος ενός διακλαδισμένου ομοπολυμερούς είναι μικρότερος από του αντίστοιχου γραμμικού.

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

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

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

Αν λοιπόν το εσωτερικό ιξώδες $[\eta]$ κάποιων προτύπων και του προς εξέταση πολυμερούς έχουν καθοριστεί ανεξάρτητα, το μοριακό βάρος του αγνώστου δείγματος μπορεί να υπολογιστεί από την καμπύλη βαθμονόμησης του γινομένου $[\eta] M$ συναρτήσει του όγκου έκλουσης (V_e). Στην παραπάνω εξίσωση το N_A είναι ο αριθμός Avogadro και το V_h συμβολίζει τον υδροδυναμικό όγκο του πολυμερούς σε συγκεκριμένο διαλύτη.^{[90][91]}



Εικόνα 17: Διαχωρισμός μακρομορίων διαφορετικού υδροδυναμικού όγκου.

Πολύ σημαντικό ρόλο στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών παίζει και ο ανιχνευτής ή οι ανιχνευτές οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με τον χρωματογράφο. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα τα μεγέθη που προσδιορίζουν. Χρησιμοποιούνται ανιχνευτές συγκέντρωσης-μάζα, όπως για παράδειγμα οι ανιχνευτές UV και IR και οι ανιχνευτές μοριακής μάζας, όπως ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός και ο ιξωδομετρικός.^[92] Για την παρασκευή δείγματος ζυγίζονται 6 mg της ουσίας σε βial και διαλύονται σε 1 ml του φέροντα διαλύτη.

3.4 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδος που έχουν στη διάθεσή τους οι χημικοί. Είναι η πρώτη μέθοδος προσδιορισμού της δομής των μορίων, προς την οποία στρέφονται για την άντληση πληροφοριών, γιατί παρέχει ένα «χάρτη» του όλου ανθρακικού σκελετού με τα άτομα υδρογόνου σε ένα μόριο. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο, γιατί με τη βοήθειά της προσδιορίζουμε τη στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) του πολυμερούς καθώς και τη γεωμετρική ισομέρεια, τη δομή και τη σύσταση των συμπολυμερών, ενώ επίσης πραγματοποιείται η μελέτη της δυναμικής των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση.

Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εκδηλώνουν όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων. Μόνο οι πυρήνες με άρτιο αριθμό νετρονίων και πρωτονίων δεν προξενούν μαγνητικά φαινόμενα ($I = 0$). Έτσι, οι πυρήνες πολλών ατόμων (^1H , ^{13}C) συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα (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 $m_I = -1/2$) ως 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.

Όλοι οι πυρήνες των μορίων περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν δικά τους τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό (*H_{πραγ.} = H_{εφαρμ.} - H_{τοπικό}*). Περιγράφοντας αυτό το φαινόμενο, συμπεραίνεται ότι οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου, λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Επειδή κάθε συγκεκριμένος πυρήνας ενός μορίου βρίσκεται σε κάπως διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, προστατεύεται και σε κάπως διαφορετική έκταση, με αποτέλεσμα το πραγματικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο να μην είναι ίδιο για κάθε πυρήνα και έτσι να απορροφούν διαφορετικής συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Συνέπεια των παραπάνω είναι ότι οι πυρήνες σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δίνουν διαφορετική γραμμή συντονισμού. Για να εκφραστούν με ενιαίο τρόπο οι μεταβολές των γραμμών συντονισμού στους διάφορους πυρήνες, χρησιμοποιούνται πρότυπες ουσίες αναφοράς και εισάγεται η έννοια της χημικής μετατόπισης. Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα είναι η διαφορά μεταξύ της συχνότητας συντονισμού του πυρήνα και μιας πρότυπης ουσίας αναφοράς. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο ((CH₃)₄Si, TMS), που έχει δώδεκα ισοδύναμα (δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία ¹H-NMR συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία ¹H-NMR (ppm).

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ ¹ H-NMR (ppm)					
R-CH ₃	0.8-1.2	Μεθύλιο			
R-CH ₂ -R	1.1-1.5	Μεθυλένιο		3.7-5.4	Εστερικά αλκύλια
R ₃ CH	1.4-1.9	Μεθίνιο			
C≡CH	1.5-3.0	Ακραία αλκίνια	A-CH ₂ -Cl	~3.5 (A=R), ~4.5 (A=Ar)	Χλωρίδια
	1.6-1.8	Αλλυλικά μεθύλια	A-CH ₂ -Br	~3.4 (A=R), ~4.4 (A=Ar)	Βρωμιδία
	0.5-4.0*	Πρωτόνια αμινών	A-CH ₂ -I	~3.2 (A=R), ~4.4 (A=Ar)	Ιωδιδία
R-OH	1.0-5.5*	Αλκοολικά υδροξύλια	A-CH ₂ -F	~4.3 (A=R), ~5.3 (A=Ar)	Φθοριδία
R-SH	1.1-1.9*	Αλκυλοθειόλες		4.2-4.7	Νιτροαλκάνια
	2.0-3.6	α-Καρβονυλικά πρωτόνια		4.5-6.0	Βινυλικά πρωτόνια
	2.0-3.2	α-Πρωτόνια θειολών	$\left. \begin{matrix} \text{RCO-NHR} \\ \text{RCONH}_2 \end{matrix} \right\}$	5.0-8.0	Αμιδικά πρωτόνια
	2.2-3.0	Βενζυλικά πρωτόνια		5.0-8.0*	Φαινολικά υδροξύλια
	2.2-3.6	α-Πρωτόνια Αμινών		6.8-7.8	Αρωματικά πρωτόνια
	2.7-4.2	Αρωματικές θειόλες		H^a : 4.0-6.6 H^b : 3.8-6.2 H^c : 5.2-7.3	Βινυλικά πρωτόνια
	3.3-4.3	Αιθερικά πρωτόνια	RCOOH	10-13*	Καρβοξυλικά οξέα
	3.5-4.0*	α-Πρωτόνια Αλκοολών		9.0-10.1	Αλδεϋδικά πρωτόνια

* Αφορούν σε ανταλλάξιμα πρωτόνια

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, (CH₃)₄Si], που έχει δώδεκα ισοδύναμα (άρα δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Η χημική μετατόπιση ορίζεται από τις σχέσεις:

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

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

όπου H_α και H_δ τα πεδία συντονισμού των πυρήνων της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα, ενώ ν_α και ν_δ οι συχνότητες συντονισμού της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα. Όπως ορίζεται το δ στις σχέσεις είναι αδιάστατο και ανεξάρτητο του H_{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 διαπιστώνεται 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 $(1+x)^n$. Για παράδειγμα, ένας πυρήνας που διαχωρίζεται από δύο άλλους γειτονικούς θα δίνει μια τριπλή κορυφή με εντάσεις κορυφών 1:2:1. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους κορυφών σε μία πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης και συμβολίζεται J . Η σταθερά σύζευξης είναι ίδια και για τους δύο πυρήνες, τα spin των οποίων συζευγνύονται και δεν εξαρτάται από την ισχύ πεδίου του φασματοφωτόμετρου.

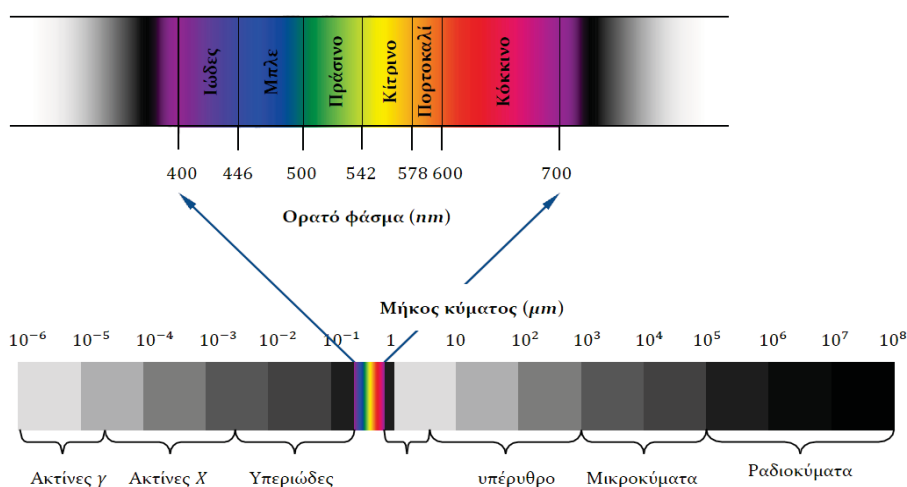
Τέλος, στη φασματοσκοπία ^1H -NMR και όχι στη ^{13}C -NMR (λόγω του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, Nuclear Overhauser Effect, NOE) το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι δυνατό να μετρήσουμε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

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν δύο είδη φασματοφωτόμετρων NMR, τα συνεχούς κύματος και τα παλμικά (ή μετασχηματισμού Fourier). Τα φασματοφωτόμετρα συνεχούς κύματος διέπονται από την ίδια αρχή που ισχύει και για τα οπτικά φασματοφωτόμετρα, στα οποία το σήμα απορρόφησης καταγράφεται ως συνάρτηση της συχνότητας της πηγής. Στα

παλμικά, το δείγμα δέχεται περιοδικά ακτινοβολία με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σήμα στην περιοχή του χρόνου το οποίο φθίνει. Στη συνέχεια, μέσω μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform, FT) το σήμα αυτό μετατρέπεται σε σήμα στην περιοχή των συχνοτήτων, με αποτέλεσμα να λαμβάνεται ένα φάσμα ανάλογο με αυτό που προκύπτει από τα φασματοφωτόμετρα συνεχούς κύματος.^[93]

3.5 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού, (UV-Vis)

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



Εικόνα 18: Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

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

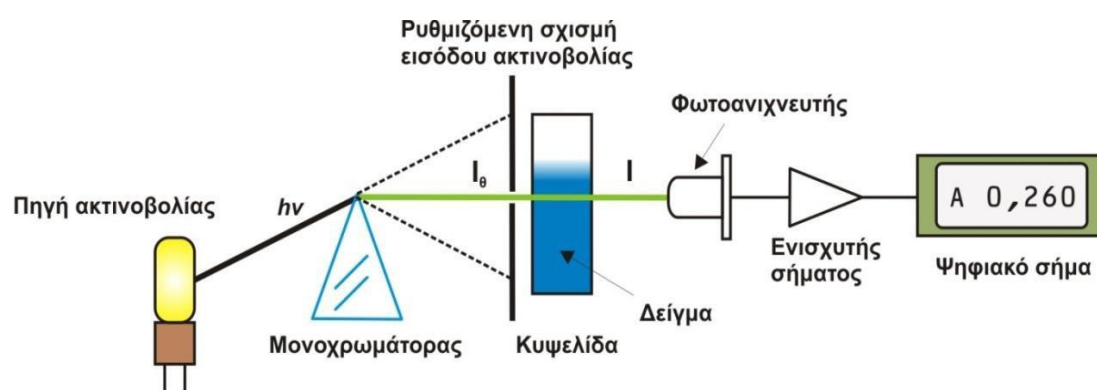
$$A = \log(P_0/P) = -\log T = \log(100/\%T) = abc \text{ g/L} = \epsilon bc \text{ mol/L}$$

όπου A η απορρόφηση (absorbance) και είναι καθαρός αριθμός, P_0 και P η ισχύς της προσπίπτουσας και της εξερχόμενης ακτινοβολίας αντίστοιχα, T η διαπερατότητα (transmittance) και είναι καθαρός αριθμός, a σταθερά αναλογίας, όταν η c εκφράζεται σε g/L, που καλείται απορροφητικότητα (absorptivity), b το μήκος διαδρομής που διανύθηκε μέσα σε διάλυμα και εκφράζεται σε cm (αναφέρεται και ως πάχος κυψελίδας), ε σταθερά αναλογίας όταν το c εκφράζεται σε mol/L και καλείται μοριακή απορροφητικότητα (molar absorptivity).

Η απορροφητικότητα χρησιμοποιείται, όταν είναι άγνωστη φύση της ουσίας X, που απορροφά, και επομένως και το μοριακό της βάρος, ενώ η μοριακή απορροφητικότητα ε προτιμάται, όταν θέλουμε να συγκρίνουμε ποσοτικά την απορρόφηση διαφόρων ουσιών γνωστού μοριακού βάρους. Στην πράξη, η συγκέντρωση εκφράζεται και σε άλλες μονάδες, π.χ. mg/mL (ppm), οπότε η σταθερά αναλογίας στον τύπο του Beer έχει διαφορετική τιμή από την α ή και την ε. Απεικόνιση της A ως συνάρτηση του μήκους κύματος λ ή του κυματάριθμου ν παρέχει το φάσμα απορροφήσεως, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαπίστωση της υπάρξεως χαρακτηριστικών ομάδων, για τη διευκρίνιση της δομής της ουσίας που απορροφά και για την ταυτοποίηση της. Τα χαρακτηριστικά ενός φάσματος είναι το λ_{\max} και το αντίστοιχο ϵ_{\min} . Από την απορρόφηση A μπορεί να προσδιορισθεί η συγκέντρωση c της ουσίας που απορροφά με βάση την εξίσωση του Beer.

Τα φασματοφωτόμετρα ταξινομούνται ποικιλότροπα παρόλα αυτά ανεξάρτητα από τις επιμέρους διαφορές, όλα τα φασματοφωτόμετρα περιέχουν τις ίδιες βασικές δομικές μονάδες, δηλαδή μία πηγή ακτινοβολίας σταθερής ισχύος,

που αναφέρεται και ως πηγή φωτός ή απλώς πηγή, ένα επιλογή μήκους κύματος για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας, μια κυψελίδα για την τοποθέτηση του δείγματος, ένα ανιχνευτή ακτινοβολίας, που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό (μεταλλάκτης) και ένα σύστημα μετρήσεως το οποίο συνήθως περιλαμβάνει ενισχυτή του σήματος και όργανο αναγνώσεως. Στη φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού χρησιμοποιούνται αραιά διαλύματα. Ο διαλύτης δεν πρέπει να απορροφά στην περιοχή του φάσματος. Επίσης, οι πολικοί διαλύτες αυξάνουν το εύρος των κορυφών απορροφήσεως και τέλος η οξύτητα μπορεί να επηρεάσει δραστικά το φάσμα απορροφήσεως πολλών ουσιών.^[94]



Σχήμα 17: Διάταξη φασματοφωτόμετρου απλής δέσμης.

3.6 Δυναμική Σκέδαση Φωτός, (DLS)

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

Από την σχέση των Stokes-Einstein:

$$R_h = kT/6\pi\eta D_t$$

όπου R_h η υδροδυναμική ακτίνα, k η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία, η το ιξώδες και D_t ο συντελεστής διάχυσης, φαίνεται η εξάρτηση του μεγέθους του σωματιδίου από τον μεταφορικό συντελεστή διάχυσης. Μάλιστα, τα μεγέθη είναι αντιστρόφως ανάλογα, δηλαδή τα μεγάλα σωματίδια έχουν μικρό συντελεστή διάχυσης.

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

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

όπου τ ο χρόνος καθυστέρησης (ή χρόνος δειγματοληψίας), t_0 ο αρχικός χρόνος, T ο χρόνος διεξαγωγής της μέτρησης. Αν το B είναι μια «αργοπορημένη» μορφή του A , τότε η εξίσωση αποτελεί μια συνάρτηση αυτοσυσχέτισης. Στην απλή περίπτωση ενός συνόλου από σφαιρικά μη αλληλεπιδρώντα μεταξύ τους ομοειδή σωματίδια που κινούνται μέσα σε ένα υγρό διάλυμα η συνάρτηση αυτή γράφεται ως:

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

όπου $\Gamma = D_t q^2$ είναι η σταθερά παρακμής της συνάρτησης όπου χάνεται, δηλαδή η συσχέτιση των σημάτων, D_t ο συντελεστής διάχυσης και q το άνυσμα σκέδασης.^{[95][96]}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

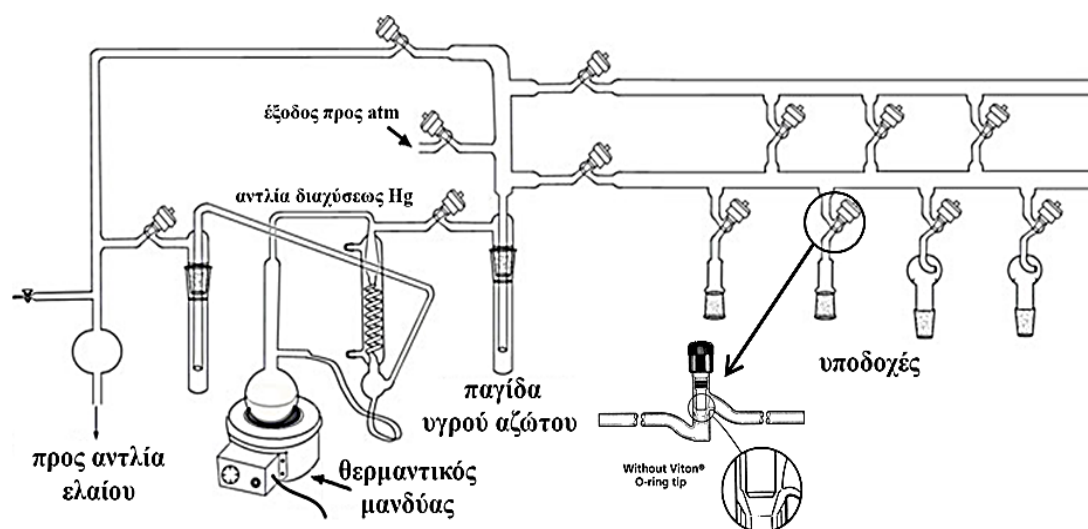
4.1 Τεχνική Υψηλού Κενού

Ο «ζωντανός» πολυμερισμός, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών. Για να παραμείνει όμως ένα σύστημα ζωντανό, κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνση από το σύστημα ανεπιθύμητων ουσιών (κυρίως υγρασίας και τυχόν προσμίξεων που υπάρχουν στα αντιδραστήρια) που μπορεί να προκαλέσουν πρόωρο τερματισμό των ζωντανών αλυσίδων, εξαιτίας της μεγάλης δραστηριότητας των ενεργών κέντρων και των μονομερών. Για το λόγο αυτό, τόσο κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των μονομερών, όσο και του πολυμερισμού, είναι επιτακτική η τήρηση ορισμένων διαδικασιών. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν τον καθαρισμό των διαλυτών, των μονομερών και των αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιηθούν. Μέχρι σήμερα η τεχνική υψηλού κενού είναι η μόνη τεχνική που εξασφαλίζει ότι όλα τα αντιδραστήρια και το περιβάλλον είναι εντελώς απαλλαγμένα από προσμίξεις σε όλα τα συνθετικά βήματα. Όλες οι συσκευές που χρησιμοποιούνται είναι ιδιοκατασκευασμένες μόνο με γυαλί, διότι εμπορικές συσκευές με εσφυρίσματα ενέχουν το κίνδυνο διαρροής και εισαγωγής στην γραμμή κενού υγρασίας και άλλων προσμίξεων από τον αέρα. Η απομάκρυνση της υγρασίας είναι καθοριστική, γιατί το νερό ανάλογα με τη συγκέντρωση που βρίσκεται, είτε υδρολύει τους NCA, είτε δρα ως αργός απαρχητής πολυμερισμού. Όλες οι διαδικασίες για τη σύνθεση των πολυμερών της συγκεκριμένης εργασίας πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της παραπάνω τεχνικής. Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από μία αντλία ελαίου, μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου, γυάλινους σωλήνες (Pyrex) και στρόφιγγες υψηλού κενού από teflon (Rotafion HP 10mm). Η αντλία ελαίου δημιουργεί ένα προκαταρκτικό κενό της τάξης των 10^{-2} - 10^{-3} mmHg στην αντλία διαχύσεως του υδραργύρου που βρίσκεται σε θερμοκρασία 350-400 °C.

Τελικώς, δημιουργείται από την απόσταξη του υδραργύρου ένα κενό της τάξης 10^{-6} mmHg.

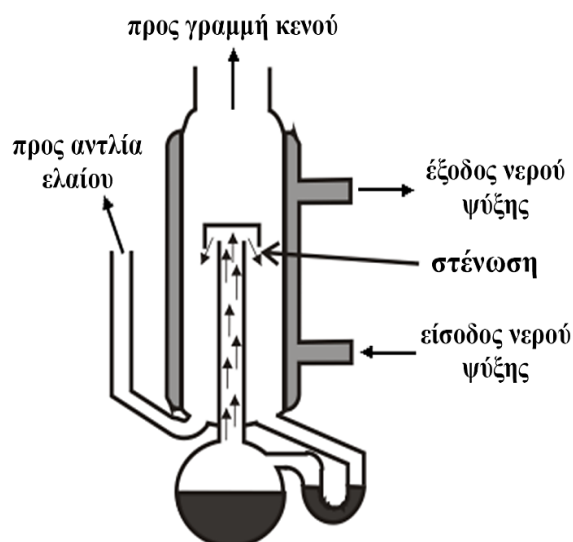
Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από :

- Αντλία ελαίου
- Αντλία διαχύσεως υδραργύρου
- Παγίδα αζώτου
- Γυάλινους σωλήνες (Pyrex)
- Στρόφιγγες υψηλού κενού από Teflon (Rotaflon HP 10mm)
- Εσφυρίσματα (αντάπτορες)



Εικόνα 19: Απεικόνιση της γραμμής υψηλού κενού.

Κατά τη δίοδο των μορίων του υδραργύρου μέσα από τη στένωση, προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς τους και λόγω της μειωμένης πίεσης που αυτό προκαλεί, δημιουργείται διαφορά πίεσης (υποπίεση) στα άκρα της στήλης. Ο υδράργυρος κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη. Όλη η διαδικασία επαναλαμβάνεται, δημιουργώντας έτσι ένα κενό της τάξης των 10^{-6} mmHg, ίσο με την τάση των ατμών του υδραργύρου (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Σχεδιάγραμμα αντλίας διαχύσεως.

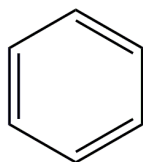
Για την προστασία της αντλίας διαχύσεως και της αντλίας λαδιού από πτητικά συστατικά υπάρχει μία παγίδα υγρού αζώτου. Η αντλία διαχύσεως συνδέεται με το κύριο μέρος της γραμμής κενού (που αποτελείται από γυάλινους σωλήνες Pyrex) με στρόφιγγες υψηλού κενού. Με τις στρόφιγγες ελέγχονται κάθε φορά τα σημεία που χρειάζεται το κενό και καθίσταται δυνατή η απομόνωση άλλων σημείων. Η σύνδεση των ιδιοκατασκευασμένων συσκευών με τη γραμμή κενού γίνεται με αντάπτορες, με τη βοήθεια των οποίων προσαρμόζονται οι συσκευές σε αυτήν. Με τον τρόπο αυτό, πραγματοποιούνται οι διάφορες διεργασίες (αποστάξεις διαλυτών, μονομερών, απαερώσεις κλπ.) στις συγκεκριμένες συσκευές. Οι αποστάξεις γίνονται εύκολα σε υψηλό κενό, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με παγόνερο ή υγρό άζωτο. Ιδιαίτερα μέτρα ασφαλείας πρέπει να λαμβάνονται κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων στη γραμμή υψηλού κενού. Η "ύπαρξη ή όχι" του κενού, είναι δυνατό να ελεγχθεί με πηνίο Tesla. Λεπτομέρειες για τη χρήση της γραμμής υψηλού κενού και τις απαραίτητες προφυλάξεις που πρέπει να λαμβάνονται, αναφέρονται στη βιβλιογραφία.^{[97][98]}

4.2 Καθαρισμός διαλυτών

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις πολυμερισμού, όπως επίσης και στις περισσότερες οργανικές αντιδράσεις, είναι απαραίτητο να μην περιέχουν ίχνη υγρασίας και οξυγόνου, αλλά και να έχουν απομακρυνθεί από

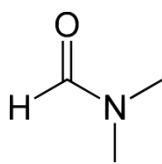
αυτούς ανεπιθύμητες προσμίξεις που μπορεί να υπάρχουν, καθώς μπορεί να επηρεάσουν σε σημαντικό βαθμό την πορεία των αντιδράσεων και ανάλογα τις συνθήκες μπορούν να δράσουν ως απαρχητές, επιβραδυντές ή αναστολείς πολυμερισμού, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα, όπως είναι η ευρεία κατανομή μοριακών βαρών. Γι' αυτόν το λόγο, οι εμπορικά διαθέσιμοι διαλύτες υπόκεινται σε περαιτέρω διαδικασίες καθαρισμού που στις περισσότερες των περιπτώσεων περιλαμβάνουν την αντίδραση τους με κάποιο ξηραντικό μέσο για απομάκρυνση της υγρασίας και εν συνεχεία την απαέρωση και απόσταξη τους υπό κενό. Ακολουθως, παρατίθενται οι διαδικασίες καθαρισμού των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:

Βενζόλιο:



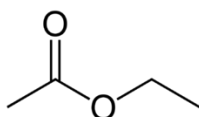
Το εμπορικά διαθέσιμο βενζόλιο (99%, thiophen-free grade, Sigma Aldrich) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 1 L και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα μαζί με μικρή ποσότητα λειτριβημένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2), που δρα ως ξηραντικό μέσο για την απομάκρυνση ιχνών νερού και υγρασίας. Την επόμενη ημέρα, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, το βενζόλιο ψύχεται σε όλη τη μάζα του με χρήση υγρού αζώτου, απαερώνεται ενδεδελεχώς και αποστάζεται σε γειτονική σφαιρική φιάλη 1 L στην οποία έχει γίνει προηγουμένως ένεση μικρής ποσότητας (~10 mL) κανονικού βουτυλολιθίου (n-BuLi), το οποίο αντιδρά με προσμίξεις που μπορεί να έχουν παραμείνει. Τέλος, η ποσότητα CaH_2 της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

Διμεθυλοφορμαμίδιο, (DMF):



Το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) υπόκειται σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά τη θερμική του αποικοδόμηση παράγεται διμεθυλαμίνη (DMA) και μονοξειδίο του άνθρακα. Επίσης υδρολύεται παρουσία νερού, παράγοντας DMA και φορμικό οξύ. Η παραγωγή DMA είναι μία διαδικασία που πρέπει να αποφεύγεται, καθώς κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού των NCAs μπορεί να δράσει ως απαρχητής, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, το εμπορικά διαθέσιμο DMF (99,9%, Alfa Aesar, anhydrous, amine free) φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box. Για τον καθαρισμό του, περίπου 700 mL του διαλύτη μεταγγίζονται, μέσα στο glove box, σε σφαιρική φιάλη 1 L που φέρει στρόφιγγα, η οποία προηγουμένως έχει υποστεί ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού (flame-drying). Στη συνέχεια, η φιάλη με το διαλύτη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται, για να απομακρυνθεί το αδρανές αέριο του glove box. Έπειτα, το DMF αποστάζεται κλασματικά σε διπλανή σφαιρική φιάλη 1 L, δηλαδή το πρώτο και το τελευταίο κλάσμα του διαλύτη απορρίπτονται πάντα κατά την απόσταξη και συλλέγονται μόνο τα μεσαία κλάσματα. Το απεσταγμένο DMF που λαμβάνεται, φυλάσσεται στους 3 °C, προστατευμένο από το φως.

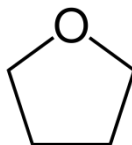
Οξικός αιθυλεστέρας, (EtOAc):



Ο εμπορικά διαθέσιμος οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) (>99,9%, Carlo Erba) αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε σφαιρική φιάλη 2 L με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P₂O₅) για μια ημέρα, οπότε ο διαλύτης αποκτά ένα ασθενές μαύρο χρώμα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται και εν συνεχεία τα μεσαία κλάσματα του διαλύτη αποστάζονται

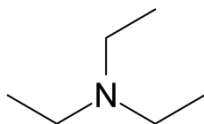
σε διπλανή σφαιρική φιάλη 2 L με στρόφιγγα. Μετά το πέρας της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση του διαλύτη.

Τετραϋδροφουράνιο, (THF):



Αρχικά, το εμπορικά διαθέσιμο τετραϋδροφουράνιο (THF) (>99,9%, Carlo Erba) αφήνεται να αντιδράσει για μία ημέρα παρουσία λειοτριβημένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2). Ο διαλύτης αφήνεται υπό ανάδευση με το ξηραντικό για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται ενδεδειγμένα και ο διαλύτης αποστάζεται σε γειτονική σφαιρική φιάλη 1 L που περιέχει λεπτότατα κομμένες πλάκες μεταλλικού νατρίου. Ο διαλύτης απαερώνεται και παραμένει υπό ανάδευση με το μεταλλικό νάτριο για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα αποστάζεται σε νέα σφαιρική φιάλη 1 L που περιέχει κράμα μεταλλικού καλίου-νατρίου σε αναλογία 3:1, όπου και αφήνεται υπό ανάδευση. Η εμφάνιση χαρακτηριστικού έντονου κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη υψηλής καθαρότητας του συγκεκριμένου 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 διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια).

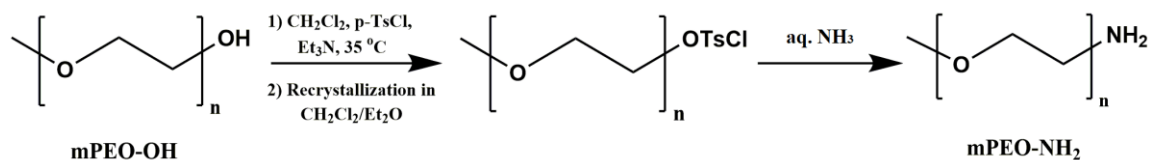
Τριαιθυλαμίνη, (Et_3N):



Για τον καθαρισμό της εμπορικά διαθέσιμης τριαιθυλαμίνης (Et_3N) (99,83%, Fluka), 50 ml από την Et_3N τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 250 mL που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH_2 και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Έπειτα, η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα απαερωθεί η ποσότητα της Et_3N ,

ακολουθεί απόσταξη σε σφαιρική φιάλη 250 ml με στρόφιγγα, που περιέχει λεπτότατα κομμένες πλάκες μεταλλικού νατρίου και αποθηκεύεται υπό κενό.

4.3 Σύνθεση τροποποιημένου απαρχητή mPEO-NH₂



Σχήμα 18: Αντίδραση χημικής τροποποίησης του mPEO-OH σε mPEO-NH₂.

Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη προστίθενται 5.00 g (0.5 mmol) mPEO-OH και με την χρήση κατάλληλου προσαρμογέα, προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται.

Στη συνέχεια, αποστάζονται στη φιάλη περίπου 20 ml βενζολίου και το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση για λίγη ώρα μέχρι πλήρους διάλυσης του στερεού. Το βενζόλιο έχει την ικανότητα να σχηματίζει αζεοτροπικό μείγμα με το H₂O και συνεπώς η υγρασία απομακρύνεται εύκολα από το πολυ(αιθυλενοξείδιο). Με αυτόν τον τρόπο, ίχνη υγρασίας συμπαρασύρονται κατά την απόσταξη του βενζολίου και έτσι απομακρύνονται ποσοτικά από τη συσκευή. Μετά την απομάκρυνση της υγρασίας, το στερεό αφήνεται στην HVL για ξήρανση overnight.



Εικόνα 20: Απόσταξη βενζολίου για απομάκρυνση υγρασίας.

Την επόμενη μέρα αποστάζονται στη φιάλη 60 ml διχλωρομεθανίου (CH_2Cl_2), απορρίπτοντας τα πρώτα ml στην παγίδα αζώτου και αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης. Ύστερα, η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό και στη μία έξοδο προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας, ενώ στην άλλη κατάλληλο επίθεμα για τη συνεχή παροχή αδρανούς αερίου. Με αυτές τις συνθήκες γίνεται προσθήκη 1.9 g (10 mmol, $\text{MB}=190.65 \text{ g/mol}$) π-τολουολοσουλφονυλο χλωριδίου (TsCl) και 1.4 ml ($\text{MB}=101.19 \text{ g/mol}$ $d=0.726 \text{ g/ml}$) τριαιθυλαμίνης (Et_3N). Η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους $35 \text{ }^\circ\text{C}$ με λουτρό ελαίου, που είναι κοντά στο σημείο ζέσεως του διχλωρομεθανίου, έτσι ώστε να υπάρχει επαναρροή του διαλύτη στα τοιχώματα της φιάλης και αφήνεται προς αντίδραση για μία ημέρα. Το χρώμα είναι διαυγές προς υποκίτρινο.

Για τον καθαρισμό του ενδιάμεσου προϊόντος mPEO-OTs πραγματοποιούνται τρεις ανακρυσταλλώσεις, προς απομάκρυνση της περίσσειας TsCl . Το διάλυμα καταβυθίζεται αρχικά σε 600 ml διαιθυλαιθέρα και διηθείται υπό κενό σε χωνί Buchner και φίλτρο πεφρυγμένης υάλου por. 4. Το στερεό συλλέγεται σε φιάλη των 50 ml, διαλυτοποιείται εκ νέου σε 20 ml διχλωρομεθανίου, καταβυθίζεται σε 200 ml διαιθυλαιθέρα και ακολουθείται η προηγούμενη πορεία ακόμα μία φορά. Το τελικό στερεό μεταφέρεται σε φιάλη, προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφήνεται για ξήρανση για μία ημέρα.



Εικόνα 21: Κατάλληλη διάταξη για μετατροπή PEO-OH σε PEO-NH₂.

Το ξηρό πλέον προϊόν διαλυτοποιείται σε 60 ml πυκνού διαλύματος αμμωνίας (NH₃) 25% w/w και αφήνεται για δέκα μέρες μέχρι να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η φιάλη προσαρμόζεται στην HVL και το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις από το τελικό προϊόν mPEO-NH₂, ακολουθούν εκχυλίσσεις. Σε 30 ml υπερκάθαρου νερού (Milli-Q) διαλυτοποιείται το τροποποιημένο πολυ(αιθυλενοξειδίο), ρυθμίζεται το pH στην τιμή 12 (NaOH 1M) και προστίθενται 20 ml NaCl 20% w/v (υδατική φάση). Σε διαχωριστική χοάνη που περιέχει 40 ml διχλωρομεθάνιο (οργανική φάση), αναμειγνύεται η υδατική φάση και μετά το πέρας της εκχύλισης συλλέγεται η οργανική φάση. (Αφήνονται να διαχωριστούν καλά οι 2 φάσεις.) Πραγματοποιούνται άλλες 2 εκχυλίσσεις με προσθήκη 20 ml CH₂Cl₂ και 10 ml NaCl κάθε φορά. Η τελική οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄ και διηθείται υπό κενό σε φίλτρο πεφρυγμένης υάλου (por. 4) σε σφαιρική φιάλη που περιέχει διαιθυλαιθέρα (600 ml). Στη συνέχεια, το διήθημα, που περιέχει το καταβυθισμένο πολυμερές, διηθείται ξανά υπό κενό σε χωνί Buchner με

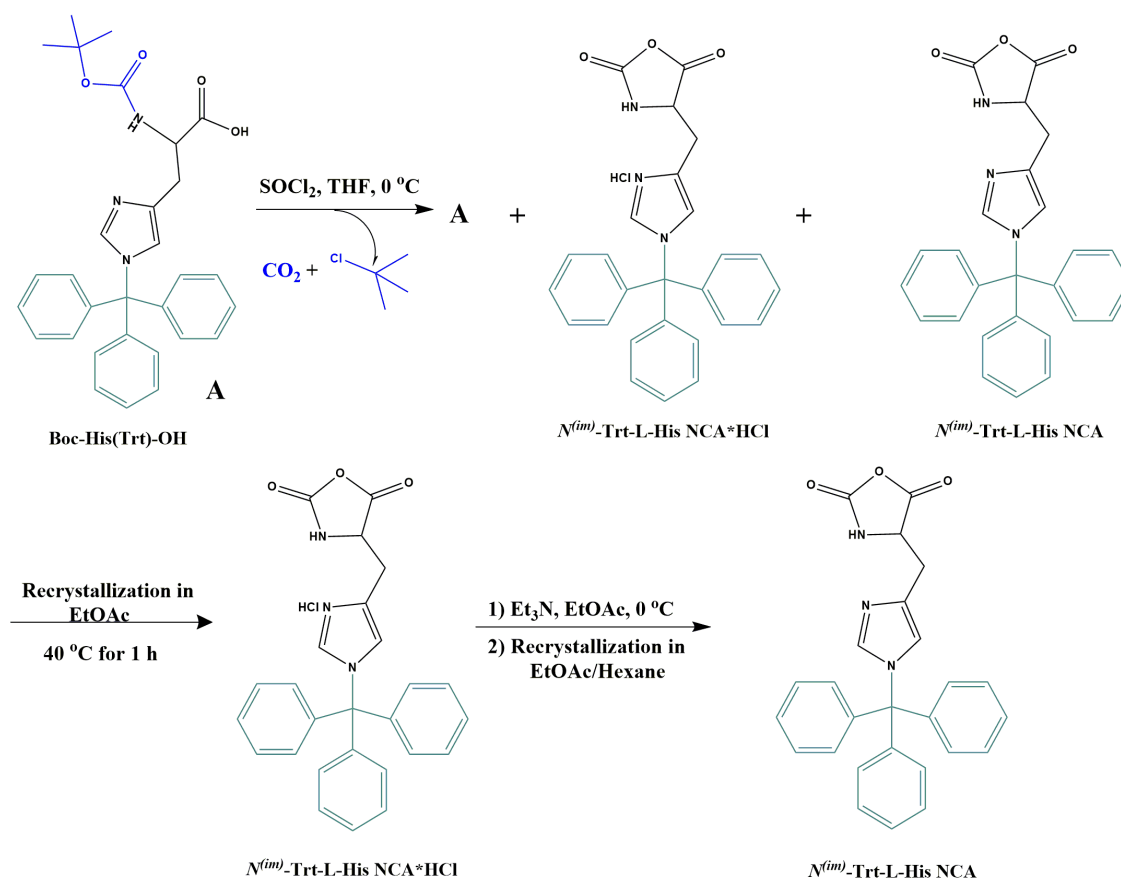
υδρόφοβο φίλτρο. Το στερεό συλλέγεται και αφήνεται για ξήρανση στην HVL. Τελικά ζυγίζονται 3.7 g PEO-NH₂ (απόδοση 75%) και φυλάσσεται στους -20 °C.

4.4 Σύνθεση και καθαρισμός μονομερών (N-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων)

Τα μονομερή που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων, δηλαδή οι N-καρβοξυ ανυδρίτες (N-Carboxy Anhydrides, NCA) των α-αμινοξέων, δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα κατά πλειονότητα και μπορούν να συντεθούν μόνο εργαστηριακά. Η σύνθεση των NCA που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, αλλά και με την εφαρμογή κατάλληλων τροποποιήσεων της συνθετικής πορείας, όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο. Ακολούθως, παρατίθενται οι μέθοδοι σύνθεσης και καθαρισμού των μονομερών N^(im)-Trt-(L)-His NCA και BLG NCA.

4.4.1 Σύνθεση και καθαρισμός του N-καρβοξυ ανυδρίτη της N^(im)-Trityl-(L)-Histidine (N^(im)-Trt-(L)-His NCA)

Η σύνθεση για το μονομερές N^(im)-Trityl-(L)-His NCA πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο παραλαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας του N^(im)-Trityl-(L)-His NCA και στη συνέχεια με την προσθήκη τριαιθυλαμίνης (Et₃N) παραλαμβάνεται το καθαρό μονομερές N^(im)-Trityl-(L)-His NCA.



Σχήμα 19: Αντιδράσεις σύνθεσης του προστατευμένου ανυδρίτη της L-ιστιδίνης $\text{N}^{(\text{im})}$ -Trityl-(L)-His NCA.

Σύνθεση $\text{N}^{(\text{im})}$ -Trt-(L)-His-NCA*HCl: Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη 1 L ζυγίζονται 10.00 g (20.1 mmol, MB=497.58 g/mol) Boc-His(Trt)-OH. Η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω επιθέματος με στρόφιγγα από τη μία είσοδο, και από την άλλη πωματίζεται με γυάλινο πώμα και το στερεό αφήνεται προς ξήρανση για περίπου 20 ώρες. Στη συνέχεια, αποστάζονται στη φιάλη περίπου 200 ml καθαρού τετραϋδροφουρανίου (THF), δίνοντας ένα διαυγές υποκίτρινο διάλυμα. Η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό, όπου εφαρμόζεται συνεχής ροή αργού ώστε να επιτευχθεί αδρανής ατμόσφαιρα στο διάλυμα, και τοποθετείται σε παγόλουτρο ώστε να αποφευχθούν οι παράπλευρες αντιδράσεις. Με τεχνικές υαλουργίας κατασκευάζεται αμπούλα βαθμονομημένη στα 1.7 ml, στην οποία στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη θειονυλοχλωριδίου (SOCl_2), το οποίο είναι το μέσο κυκλοποίησης που χρησιμοποιείται στην αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Για την απόσταξή του, προσαρμόζονται στη γραμμή υψηλού κενού μία φιάλη 50 ml με επίθεμα με στρόφιγγα, η

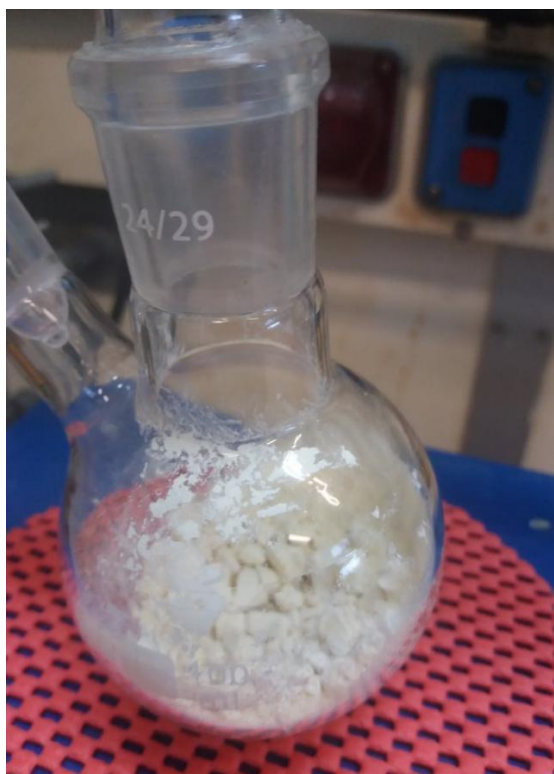
βαθμονομημένη αμπούλα, καθώς επίσης και μια άλλη φιάλη 50 ml, η οποία περιέχει 10 ml SOCl_2 . Από τη φιάλη αυτή αποστάζονται τα 1.7 ml (23.43 mmol, $\text{MB}=118.97 \text{ g/mol}$, $d=1.64 \text{ g/mL}$) στη βαθμονομημένη αμπούλα. Ταυτόχρονα, γίνεται απόσταξη 30 ml THF στην άλλη φιάλη των 50 ml με τη στρόφιγγα. Έπειτα, αποστάζονται σε αυτήν και τα 1.7 ml SOCl_2 από την αμπούλα. Η φιάλη με το SOCl_2 και το THF απομακρύνεται από τη γραμμή, πληρώνεται με αργό, και μεταφέρεται στον απαγωγό, όπου γίνεται προετοιμασία της διάταξης της αντίδρασης. Στη φιάλη τοποθετείται κατάλληλο επίθεμα μέσω του οποίου υπάρχει συνεχής παροχή αργού, σύνδεσμος στον οποίο προσαρμόζεται κάθετα το σταγονομετρικό χωνί, το οποίο προηγουμένως είχε ξηρανθεί στο φούρνο, και το bubbler ελαίου ώστε να ελέγχεται η ροή του αργού. Αφού ετοιμάστηκε η παραπάνω διάταξη, το διάλυμα του SOCl_2 σε THF μεταγγίζεται στο σταγονομετρικό χωνί υπό ροή αργού και προστίθενται στάγδην στη φιάλη αντίδρασης. Η προσθήκη ολοκληρώνεται μέσα σε περίπου 18 λεπτά. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία $0 \text{ }^\circ\text{C}$ για περίπου 2.5 ώρες, ενώ παρατηρείται αλλαγή του χρώματος της αντίδρασης σε έντονο κίτρινο έως πορτοκαλί.



Εικόνα 22: Διάλυμα της Boc-His(Trt)-OH σε THF πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την αντίδραση με το SOCl_2 .

Μετά το τέλος της αντίδρασης, παραλαμβάνεται σαν κύριο προϊόν το υδροχλωρικό άλας του NCA, $\text{N}^{(\text{im})}\text{-Trt-(L)-His}\cdot\text{HCl}$ NCA, ενώ σαν δευτερεύοντα προϊόντα παραλαμβάνονται ποσότητες του αρχικού αμινοξέος Boc-His(Trt)-OH, που δεν έχει αντιδράσει, και καθαρού $\text{N}^{(\text{im})}\text{-Trityl-(L)-His}$

NCA που έχει σχηματιστεί, αλλά δεν είναι το επιθυμητό προϊόν σε αυτό το στάδιο. Με σκοπό να απομονωθεί το υδροχλωρικό άλας του NCA, το διάλυμα καταβύθίζεται σε περίπου 1.5 L διαιθυλαιθέρα, όπου και πραγματοποιείται η καταβύθιση του $N^{(im)}\text{-Trt-(L)-His}\cdot\text{HCl}$ NCA ως κύριο προϊόν. Το υποκίτρινο στερεό διαχωρίζεται έπειτα από διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner υπό συνεχή ροή αργού και συλλέγεται σε ξηρή σφαιρική φιάλη των 500 ml. Η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω αντάπτορα με στρόφιγγα και αφήνεται προς ξήρανση για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται η πρώτη ανακρυστάλλωση με αλλαγή της διαλυτότητας ανάλογα με τη θερμοκρασία, με σκοπό να παραληφθεί το υδροχλωρικό άλας του NCA καθαρό και απαλλαγμένο από τυχόν υπολείμματα του πρόδρομου αμινοξέος και του καθαρού NCA. Στη σφαιρική φιάλη με το στερεό αποστάζονται περίπου 300 ml οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc). Το γαλάκτωμα που προκύπτει αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 1 ώρα μέσα σε υδρόλουτρο στους 40 °C, ενώ στιγμιαία παρατηρείται πλήρης διάλυση του στερεού στον οξικό αιθυλεστέρα υποδεικνύοντας την επιτυχή ανακρυστάλλωση του προϊόντος. Μετά το πέρας της 1 ώρας, η φιάλη ψύχεται στους 0 °C προς ποσοτική καταβύθιση του $N^{(im)}\text{-Trt-(L)-His-NCA}\cdot\text{HCl}$, καθώς δε διαλυτοποιείται στον EtOAc, σε αντίθεση με το πρόδρομο αμινοξύ και τον καθαρό NCA, τα οποία είναι διαλυτά στον EtOAc. Η αντίδραση αφήνεται σε αυτή τη θερμοκρασία για 1.5 ώρα. Το $N^{(im)}\text{-Trt-(L)-His-NCA}\cdot\text{HCl}$ παραλαμβάνεται ως μοναδικό προϊόν έπειτα από διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner. Η διήθηση πραγματοποιείται υπό ροή αργού, ώστε να μην έρθει σε επαφή το τελικό προϊόν με τον ατμοσφαιρικό αέρα και την υγρασία. Το στερεό συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέα ξηρή προζυγισμένη σφαιρική φιάλη 100 ml με επίθεμα με στρόφιγγα και ξηραίνεται στη γραμμή υψηλού κενού όλο το βράδυ.



Εικόνα 23: $N^{(im)}$ -Trt-His-NCA*HCl

Σύνθεση του $N^{(im)}$ -Trt-His-NCA: Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο σύνθεσης του N-καρβοξυ ανυδρίτη της (L)-Ιστιδίνης. Την επόμενη μέρα και αφού η φιάλη πληρώνεται με αργό, πωματίζεται και ζυγίζεται, με το βάρος του $N^{(im)}$ -Trt-(L)-His-NCA*HCl να είναι 6.90 g (15.00 mmol, MB=459.93 g/mol). Το στερεό μεταφέρεται υπό ατμόσφαιρα αργού σε νέα ξηρή δίλιμη σφαιρική φιάλη 500 ml και προσαρμόζεται ξανά στη γραμμή υψηλού κενού, όπου απαερώνεται και στη συνέχεια αποστάζονται στη φιάλη 250 ml EtOAc. Το προκύπτον λευκό γαλάκτωμα απομακρύνεται από τη γραμμή και αφήνεται υπό ανάδευση και υπό συνεχή παροχή αργού στον απαγωγό μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία συλλογής της τριαθυλαμίνης (Et_3N). Λίγο πριν την προσθήκη της Et_3N η φιάλη της αντίδρασης τοποθετείται σε παγόλουτρο.



Εικόνα 24: $N^{(im)}$ -Trt-(L)-His-NCA \cdot HCl σε EtOAc.

Σε αυτό το βήμα παραλαμβάνεται ισομοριακή ποσότητα απεσταγμένης τριαιθυλαμίνης (Et_3N) 2.1 ml (15.00 mmol, $MB=101.19$ g/mol, $d=0.7255$ g/mL), αρχικά σε βαθμονομημένη αμπούλα και έπειτα σε σφαιρική φιάλη που περιέχει 30 ml απεσταγμένο EtOAc. Η φιάλη με την Et_3N και τον EtOAc μεταφέρεται σε ξηρό σταγονομετρικό χωνί στον απαγωγό και προστίθεται στάγδην στη φιάλη με το γαλάκτωμα υπό συνεχή ροή αργού. Η προσθήκη έγινε στους 0 °C, σε χρονικό διάστημα 45 λεπτών και υπό έντονη ανάδευση. Μετά το τέλος της προσθήκης, το γαλάκτωμα αφήνεται άλλα 30 λεπτά υπό ανάδευση ώστε να αντιδράσει πλήρως η Et_3N . Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, καταβυθίζεται ως παραπροϊόν το υδροχλωρικό άλας της τριαιθυλαμίνης ($Et_3N\cdot HCl$), ενώ το κύριο προϊόν του $N^{(im)}$ -Trityl-(L)-His NCA παρέμεινε διαλυτό στον EtOAc.

Ο διαχωρισμός των δύο ενώσεων πραγματοποιείται μέσω διήθησης, ενώ ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα διαδικασία ανακρυστάλλωσης σε μίγμα διαλυτών οξικού αιθυλεστέρα/εξανίου σε αναλογία κατά όγκο περίπου 1:5. Έτσι, το διάλυμα διηθείται σε ηθμό πεφρυγμένης υάλου (por. 4) προς εκδίωξη του υδροχλωρικού άλατος της τριαιθυλαμίνης, ενώ παράλληλα το διήθημα αποχύνεται σε δίλιμη φιάλη 2 L, που περιείχε 1.5 L εξάνιο, προς καταβύθιση του $N^{(im)}$ -Trityl-His NCA. Το προκύπτον ίζημα, $N^{(im)}$ -Trityl-His NCA,

παραλαμβάνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε συσκευή Buchner. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό ατμόσφαιρα αργού. Το καθαρό λευκό στερεό συλλέγεται υπό ροή αργού σε σφαιρική φιάλη 250 ml και αφήνεται προς ξήρανση για περίπου 20 ώρες στη γραμμή υψηλού κενού. Την επόμενη ημέρα, επαναλαμβάνεται η διαδικασία ανακρυστάλλωσης, δηλαδή η διάλυση του στερεού σε 150 ml απεσταγμένου οξικού αιθυλεστέρα και καταβύθιση σε 1.5 L εξάνιο, προκειμένου να ληφθεί ο πλέον καθαρός N-καρβοξυ ανυδρίτης της ιστιδίνης. Το στερεό που προκύπτει έπειτα και από τη δεύτερη ανακρυστάλλωση, συλλέγεται σε ξηρή σφαιρική φιάλη 100 ml και προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού για ξήρανση για ένα βράδυ. Τέλος, ο N^(im)-Trityl-(L)-His NCA μεταφέρεται στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας, όπου ζυγίζεται και υπολογίζεται ίσως με 4.9 g (11.57 mmol, MB=423.47 g/mol, απόδοση 50%) και φυλάσσεται σε αδρανείς συνθήκες.

4.4.2 Σύνθεση και καθαρισμός του N-καρβοξυ ανυδρίτη του γ-βενζυλο-(L)-γλουταμικού οξέος, (BLG NCA)

Σε δίλαιο σφαιρική φιάλη 1 L, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται 25 g της πρόδρομης ένωσης H-Glu(OBzl)-OH (102.37 mmol, MB=237.26 g/mol). Η φιάλη προσαρμόζεται στην γραμμή υψηλού κενού μέσω προσαρμογέα με στρόφιγγα από τη μία είσοδο, η άλλη είσοδος πωματίζεται με γυάλινο πώμα και το στερεό αφήνεται προς ξήρανση για μία ημέρα. Την επόμενη ημέρα αποστάζονται περίπου 600 mL καθαρού οξικού αιθυλεστέρα. Παρατηρείται ότι το στερεό βρίσκεται υπό μορφή λευκού αιωρήματος στο συγκεκριμένο διαλύτη. Έπειτα, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού, μεταφέρεται σε απαγωγό και προετοιμάζεται η διάταξη για την αντίδραση. Η φιάλη τοποθετείται σε ελαιόλουτρο στους 75 °C, στην μία είσοδο της φιάλης προσαρμόζεται κατάλληλο επίθεμα για συνεχή παροχή αργού, ενώ στη δεύτερη είσοδο της φιάλης τοποθετείται κατακόρυφος ψυκτήρας, ο οποίος συνδέεται με παροχή νερού. Στη συνέχεια, υπό συνεχή παροχή αργού προστίθενται στη φιάλη 30 mL (R)-(+)-limonene (185.2 mmol, MB=136.24 g/mol, d=0.8411 g/ml) και 20 g τριφωσγένιου (67.4 mmol, MB=296.75 g/mol) υπό συνεχή ανάδευση. Το λιμονένιο χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο δέσμωσης του παραγόμενου HCl, ενώ το τριφωσγένιο χρησιμοποιείται ως μέσο κυκλοποίησης κατά την αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA.

Η φιάλη πωματίζεται και το διάλυμα διατηρείται υπό ανάδευση και υπό συνεχή ροή αργού για 3 ώρες, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδός της. Μετά το πέρας των 3 ωρών παρατηρείται ότι το διάλυμα γίνεται διαυγές και αποκτά κίτρινο χρώμα.

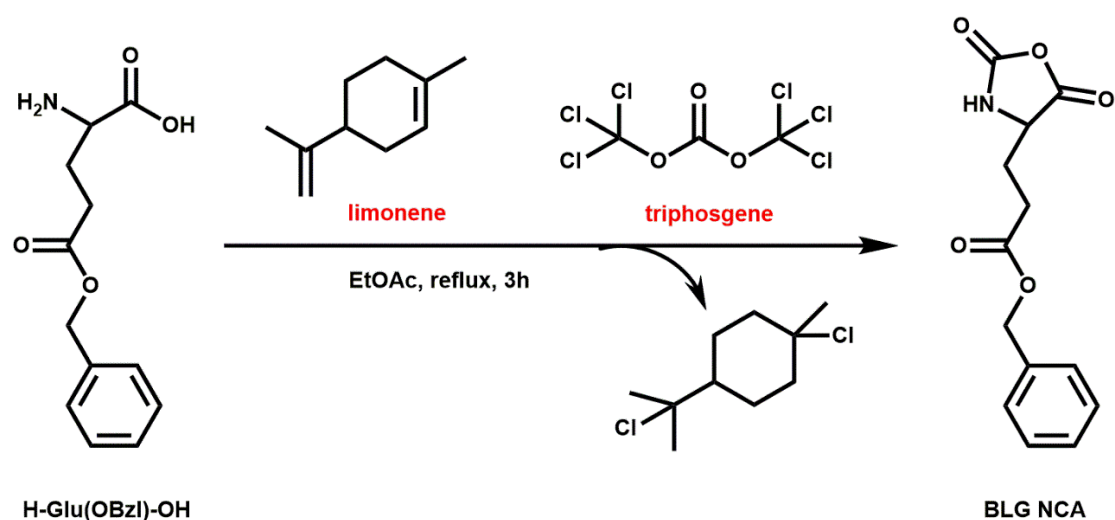
Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση, η σφαιρική φιάλη ψύχεται σε υδρόλουτρο, έως ότου η θερμοκρασία φτάσει τους 25 °C, και το περιεχόμενό της διηθείται υπό κενό και ροή αργού με χρήση γυάλινου φίλτρου por.3 προς απομάκρυνση τυχόν στερεών προσμίξεων και παραπροϊόντων. Το διήθημα του BLG NCA στον οξικό αιθυλεστέρα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη των 2 L και ακολουθεί το στάδιο καθαρισμού μέσω εκχυλίσεων προς απομάκρυνση του παραγόμενου HCl, της πρόδρομης ένωσης που δεν έχει αντιδράσει, αλλά και του υδροχλωρικού άλατος του αρχικού αμινοξέος που έχει σχηματισθεί.

Πραγματοποιούνται εκχυλίσεις αρχικά με NaCl 10% (500 mL) (pH=2) και στη συνέχεια με δ/μα NaCl 10 % - K₂CO₃ 0,5 % (1000 mL), μέχρις ότου το pH της υδατικής φάσης να γίνει ουδέτερο. Στη συνέχεια, λαμβάνεται η οργανική φάση και ξηραίνεται με μικρή ποσότητα ενεργοποιημένου MgSO₄ και έπειτα διηθείται υπό κενό με φίλτρο por.3 προς απομάκρυνση του ξηραντικού μέσου (MgSO₄), ενώ το διήθημα καταλήγει σε ξηρή δίλαιομη σφαιρική φιάλη. Η διήθηση γίνεται υπό συνεχή ροή αργού. Η σφαιρική φιάλη που περιέχει το διήθημα του BLG NCA προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και αφήνεται μία νύχτα, για να ξηρανθεί ενδεδειχώς.

Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση του BLG NCA ως εξής: στη φιάλη που περιέχει τον ξηρό BLG NCA αποστάζονται 150 mL καθαρού οξικού αιθυλεστέρα, οπότε το στερεό διαλύεται. Στη συνέχεια, η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό και το περιεχόμενό της καταβυθίζεται in situ και υπό συνεχή ροή αργού σε ξηρή δίλαιομη σφαιρική φιάλη που περιέχει περίπου 2 L καθαρού παγωμένου εξανίου. Καθώς το εξάνιο είναι κακός διαλύτης για το μονομερές, με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των προσμίξεων. Ακολουθεί εκ νέου διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner προς απομόνωση του στερεού που προκύπτει. Η διήθηση πραγματοποιείται υπό συνεχή παροχή αργού. Το προϊόν συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη που φέρει

στρόφιγγα και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

Την επόμενη ημέρα, η φιάλη απομακρύνεται από τη HVL και μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται (24,9284 g., 94.9 mmol, MB=263.25 g/mol) και στη συνέχεια φυλάσσεται ο τελικός BLG NCA (απόδοση=89.83%). Συνοπτικά, η αντίδραση που ακολουθείται για τη σύνθεση του BLG NCA δίνεται στο Σχήμα 20.



Σχήμα 20: Αντίδραση σύνθεσης του ανυδρίτη του γ -Benzyl-L-Glutamate BLG NCA.

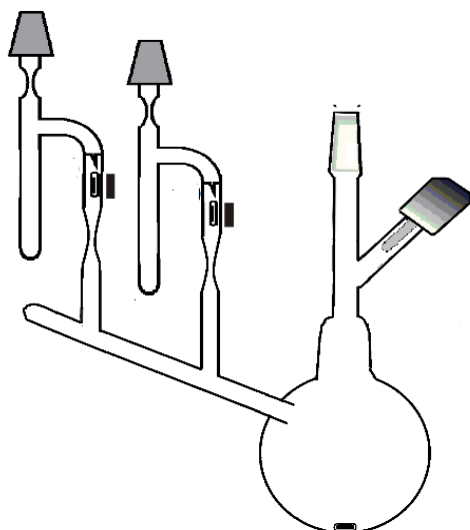
4.5 Σύνθεση υβριδικών πολυπεπτιδικών πολυμερών

4.5.1 Σύνθεση κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(Trt-His)_n-*b*-PBLG₂₀ με χρήση PEO-NH₂ ως μακροαπαρχητή

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν οι συνθέσεις κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-PHis_n-*b*-PBLG₂₀, (όπου n= 5, 10, 30 και M_{WPEO}=10.000 g/mol), μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N^(im)-Trt-His NCA και BLG NCA με χρήση του πολυμερούς mPEO-NH₂ ως μακροαπαρχητή. Τα προστατευμένα πολυμερή PEO-*b*-P(Trt-His)-*b*-PBLG που προκύπτουν, υπόκεινται επιπλέον σε αντιδράσεις αποπροστασίας των δομικών μονάδων της PHis, ώστε να ληφθούν τελικά τα μερικώς αποπροστατευμένα συμπολυμερή. Οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθούνται για τον πολυμερισμό και την αποπροστασία των πολυμερών περιγράφονται λεπτομερώς παρακάτω. Για

συντομία, περιγράφεται η μέθοδος σύνθεσης ενός, καθώς ακολουθείται η ίδια πορεία και για τα υπόλοιπα συμπολυμερή.

Ειδικά σχεδιασμένη συσκευή πολυμερισμού των 250 mL, η οποία φέρει μαγνητικό αναδευτήρα και κατάλληλες αμπούλες με εσμύρισμα και break-seal για την προσθήκη των μονομερών, ελέγχεται πρώτα για την ύπαρξη μικροοπών με χρήση του πηνίου Tesla και ξηραίνεται ενδεδειγμένα στη γραμμή υψηλού κενού (flame-drying). Στη συσκευή προστίθενται 0.6 g μακροαπαρχητή mPEO-NH₂ (0.06 mmol, M_n=10.000 g/mol) και η ποσότητα του στερεού αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα, η απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας από το mPEO-NH₂ είναι αναγκαία. Αποστάζονται περίπου 60 ml καθαρού βενζολίου στη φιάλη του πολυμερισμού και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 30 min. σε υδρόλουτρο (35-40 °C). Το βενζόλιο έχει την ικανότητα να σχηματίζει αζεοτροπικό μείγμα με το H₂O και συνεπώς η υγρασία απομακρύνεται εύκολα από το πολυ(αιθυλενοξειδίο), όταν η ποσότητα του διαλύτη αποστάζεται έπειτα από 30 min. σε γειτονική φιάλη. Με αυτό τον τρόπο ίχνη υγρασίας συμπαρασύρονται κατά την απόσταξη του βενζολίου και έτσι απομακρύνονται ποσοτικά από τη συσκευή. Η υψηλή καθαρότητα τόσο του μακροαπαρχητή όσο και των μονομερών κρίνεται απαραίτητη για τον ελεγχόμενο χαρακτήρα του πολυμερισμού και για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων. Στη φιάλη του πολυμερισμού έχει πλέον απομείνει το καθαρό από υγρασία PEO-NH₂, το οποίο αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.



Εικόνα 25: Ειδικά σχεδιασμένη συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των συμπολυμερών PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG.

Την επόμενη ημέρα, αποστάζονται περίπου 30 mL καθαρού DMF στη συσκευή του πολυμερισμού, αφού πρώτα έχει πραγματοποιηθεί flame drying. Προηγουμένως, τα πρώτα κλάσματα του διαλύτη έχουν απορριφθεί στην παγίδα αζώτου. Μόλις τελειώσει η απόσταξη, το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε υδρόλουτρο (30-40 °C) μέχρι πλήρους διάλυσης του απαρχητή, δίνοντας ένα διαυγές και άχρωμο διάλυμα. Έπειτα, η συσκευή απομακρύνεται από την HVL και τοποθετώντας ειδικό αντάπτορα στη μια αμπούλα, η συσκευή προσαρμόζεται στην HVL από την πλευρά της αμπούλας. Το συγκεκριμένο τμήμα απαερώνεται και ξηραίνεται με χρήση φλόγας (flame drying). Στη συνέχεια, η συσκευή μεταφέρεται στο glove box, όπου φυλάσσονται τα μονομερή (NCA) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Μετά την εισαγωγή της συσκευής στον κύριο θάλαμο, ανοίγεται και αφαιρείται ο αντάπτορας, ώστε να εξισορροπηθεί η πίεση εντός της αμπούλας της συσκευής, και ακολούθως προστίθενται με τη βοήθεια χωνιού 0.2545 g από τον N^(im)-Trt-His NCA (11.9 mmol, MB=423.46 g/mol). Η αμπούλα απομονώνεται πρώτα μέσω της στρόφιγγας του αντάπτορα και η συσκευή εξέρχεται από το glove box, μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού και η ποσότητα του μονομερούς απαερώνεται.



Εικόνα 26: Απόσταξη διαλύτη DMF.

Ύστερα, αποστάζονται στην αμπούλα περίπου 10 mL καθαρού DMF, ώστε να διαλυτοποιηθεί το μονομερές πριν γίνει η προσθήκη του στο διάλυμα του μακροαπαρχητή. Όσο ακόμα το διάλυμα του μονομερούς σε DMF είναι παγωμένο, η αμπούλα συντήκεται στη στένωση που φέρει, με χρήση φλόγας, ώστε να παραμείνει υπό κενό και η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού. Μετά το ξεπάγωμα και την πλήρη διάλυση του μονομερούς NCA His στο DMF, πραγματοποιείται θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας και το περιεχόμενο διάλυμα της αμπούλας αποχύνεται ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη πολυμερισμού, ώστε να εκκινήσει ο πολυμερισμός και να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές. Η έναρξη του πολυμερισμού συνοδεύεται από έκλυση διοξειδίου του άνθρακα από το διάλυμα υπό μορφή φυσαλίδων, το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη διάδοση του πολυμερισμού. Έπειτα από μία ώρα γίνεται απαέρωση, ώστε να απομακρυνθεί το παραγόμενο CO₂ και να ευνοείται ο σχηματισμός του πολυπεπτιδίου. Γίνονται απαερώσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα για την απομάκρυνση του CO₂. Το χρώμα του διαλύματος στην αρχή είναι διαυγές υποκίτρινο. Το διάλυμα μένει υπό ανάδευση για 7 ημέρες μέχρι πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς. Παράλληλα, λαμβάνονται δείγματα FT-IR για την παρακολούθηση της

πορείας του πολυμερισμού. Μετά την πάροδο των 7 ημερών το χρώμα του διαλύματος είναι πλέον θολό και υποκίτρινο, γεγονός που αποτελεί μία πρώτη ένδειξη για την επιτυχημένη πορεία του πολυμερισμού. Ταυτόχρονα, παρατηρείται μη έκλυση φυσαλίδων CO₂, ενώ από το δείγμα FT-IR επιβεβαιώνεται ότι ο πολυμερισμός έχει ολοκληρωθεί.

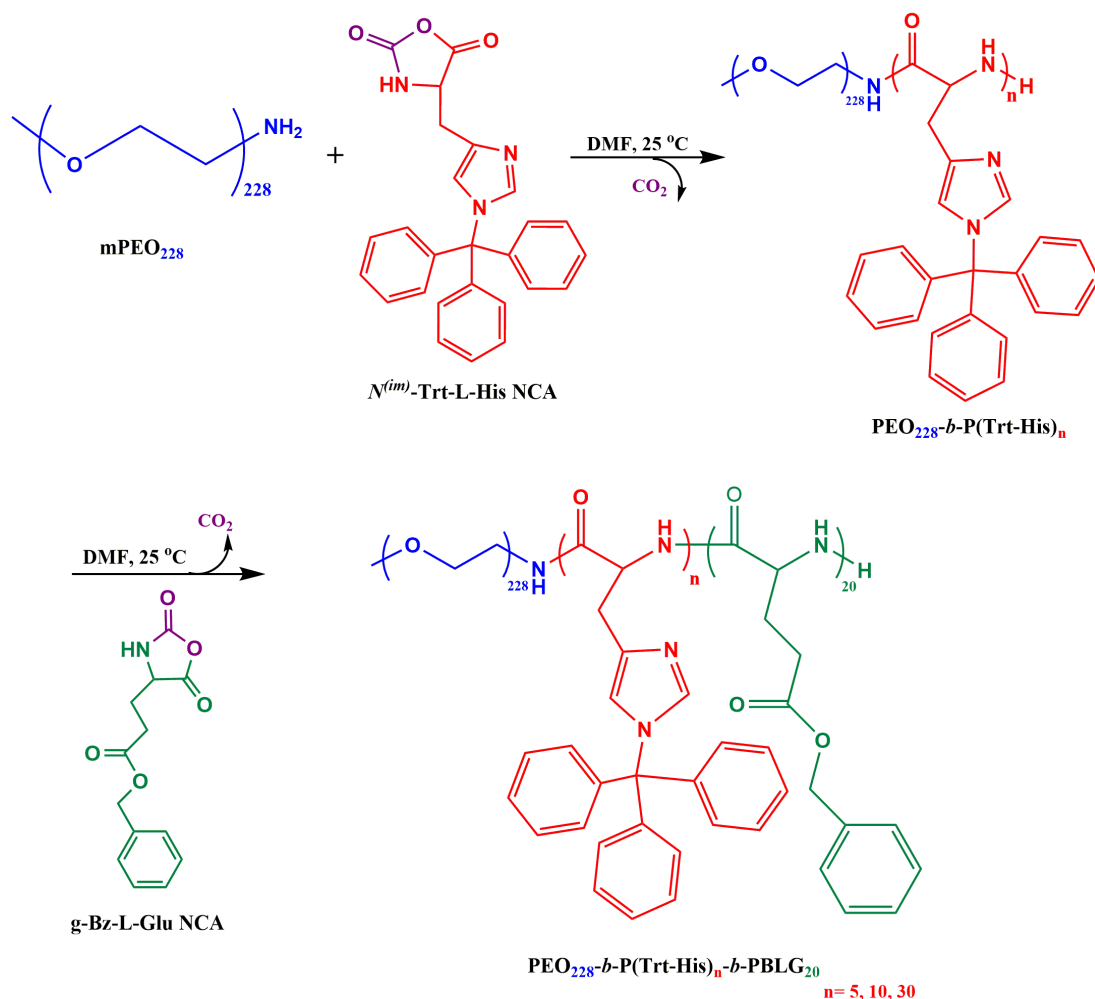
Όταν, λοιπόν, ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του N^(im)-Trt-His NCA, ακολουθεί ο πολυμερισμός της επόμενης συστάδας. Τοποθετώντας ειδικό αντάπτορα στη δεύτερη αμπούλα, η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή από την πλευρά αυτής της αμπούλας. Το συγκεκριμένο τμήμα απαερώνεται και ξηραίνεται με χρήση φλόγας (flame drying). Στη συνέχεια, η συσκευή μεταφέρεται στο glove box και, όπως περιγράφηκε παραπάνω, προστίθενται εντός της αμπούλας της συσκευής 0.3167 g από τον BLG NCA (0.3 mmol, MB=263.25 g/mol). Η αμπούλα απομονώνεται μέσω της στρόφιγγας του αντάπτορα και η συσκευή εξέρχεται από το glove box, μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού και η ποσότητα του μονομερούς αφήνεται προς ξήρανση για τουλάχιστον μισή ώρα. Μετά την πάροδο των 30 min., αποστάζονται στην αμπούλα περίπου 10 mL καθαρού DMF, ώστε να διαλυτοποιηθεί το μονομερές πριν γίνει η προσθήκη του στο διάλυμα του PEO-*b*-P(Trt-His). Όσο ακόμα το διάλυμα του μονομερούς σε DMF είναι παγωμένο, η αμπούλα συντήκεται στη στένωση που φέρει, ώστε να παραμείνει υπό κενό και η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού. Μετά την πλήρη διάλυση του μονομερούς στο DMF, πραγματοποιείται θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας και το περιεχόμενο διάλυμα αποχύνεται ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη πολυμερισμού, ώστε να εκκινήσει ο πολυμερισμός και να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του νέου μακροαπαρχητή με το μονομερές. Η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή και αφήνεται υπό ανάδευση. Μια ώρα μετά, εκτονώνεται το διάλυμα και παρατηρείται έναρξη του πολυμερισμού που συνοδεύεται από έκλυση διοξειδίου του άνθρακα υπό μορφή φυσαλίδων. Το διάλυμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 ημέρες μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το μονομερές, ενώ η πορεία του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. Παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών που διεξάγεται ο πολυμερισμός, το διάλυμα

μετατρέπεται σταδιακά από έντονο κίτρινο και διαυγές που ήταν αρχικά σε λευκό-κιτρινωπό και μη διαυγές (θολό), γεγονός που αποτελεί ένδειξη για την επιτυχή σύνθεση του συμπολυμερούς. Μετά την πάροδο των 5 ημερών δεν εκλύονται πλέον φυσαλίδες CO₂, ενώ ταυτόχρονα με λήψη δείγματος FT-IR παρατηρείται πως ο πολυμερισμός έχει τελειώσει και το δεύτερο μονομερές έχει καταναλωθεί πλήρως.



Εικόνα 27: Πορεία του πολυμερισμού του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(Trt-His)-*b*-PBLG.

Εφόσον έχει ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του PEO-*b*-P(Trt-His)-*b*-PBLG, η απομόνωση του πολυμερούς πραγματοποιείται με καταβύθισή του σε περίπου 200 mL κρύου διαιθυλαιθέρα και το στερεό παραλαμβάνεται έπειτα από διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου. Το λευκό στερεό που συλλέγεται μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 100 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Μετά την ξήρανσή του, το τελικό προστατευμένο πολυμερές ζυγίζεται (0.7981 g) και φυλάσσεται σε vial στους 3 °C. Συνοπτικά, η γενική πορεία που ακολουθείται για τη σύνθεση πολυπεπτιδικών συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(Trt-His)-*b*-PBLG με χρήση μακροαπαρχητή mPEO-NH₂, δίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



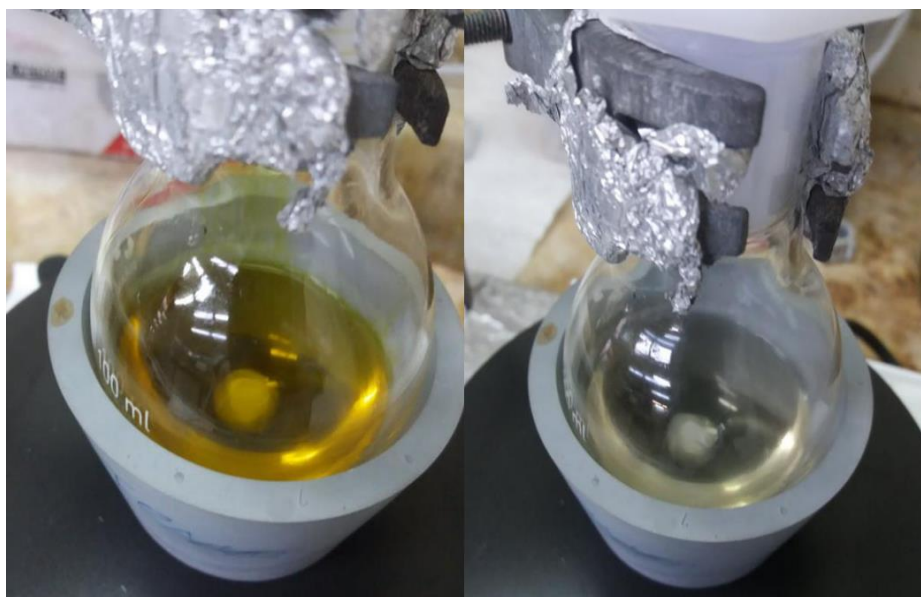
Σχήμα 21: Αντίδραση πολυμερισμού του $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-P(Trt-His)}_n\text{-}b\text{-PBLG}_{20}$ με χρήση PEO-NH_2 ως μακροαπαρχηγή.

4.5.2 Εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της πολυ(ιστιδίνης), (PHis)

Ακολούθως περιγράφεται η γενική πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για την εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της PHis στο συμπολυμερές $\text{PEO-}b\text{-P(Trt-His)-}b\text{-PBLG}$ που συντέθηκε, ενώ εξασφαλίζεται ότι οι προστατευτικές ομάδες του PBLG παραμένουν ανέπαφες. Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL προστίθενται 20 mL διχλωρομεθανίου (CH_2Cl_2 , DCM) και σχεδόν όλη η ποσότητα που λήφθηκε από το πλήρως προστατευμένο πολυμερές $\text{PEO-}b\text{-P(Trt-His)-}b\text{-PBLG}$.

Το πολυμερές αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για 30 min, ώστε να διαλυθεί και να διογκωθεί στο CH_2Cl_2 , το οποίο είναι καλός διαλύτης για το πολυμερές. Έπειτα, στη φιάλη προστίθενται 10 mL τριφθοροοξικού οξέος (CF_3COOH ,

TFA, $\geq 99.5\%$, Fischer) και το έντονο κίτρινο/πορτοκαλί και διαυγές διάλυμα που προκύπτει αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ώρα. Με την χρήση του TFA επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των προστατευτικών τρίτυλο-ομάδων από τις δομικές μονάδες της PHis. Επιπλέον, στο διάλυμα προστίθενται 0.14 ml (μερικές σταγόνες) τρισοπρωπουλοσιλανίου ((iPr)₃SiH, 99%, Sigma-Aldrich) μέχρι πλήρους αποχρωματισμού του διαλύματος, το οποίο σχηματίζει σταθερό δεσμό με τις τρίτυλο-ομάδες που έχουν αποκοπεί από τις πολυμερικές αλυσίδες και τις καθιστά ανενεργές, οπότε εξασφαλίζεται ότι δε θα συνδεθούν ξανά στην PHis (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Διάλυμα του πολυμερούς PEO-*b*-P(Trt-His)-*b*-PBLG σε TFA πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την προσθήκη ποσότητας (iPr)₃SiH, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια η φιάλη της αντίδρασης προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού σε ειδική διάταξη “short-path” και πραγματοποιείται απόσταξη προς απομάκρυνση των DCM και TFA σε κενή γειτονική φιάλη. Συνεπώς στη φιάλη παραμένει μόνο το πολυμερές, το οποίο αφήνεται για ξήρανση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα προστίθενται στη φιάλη 30 mL Milli-Q και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 10-15 min, όπου και παρατηρείται καθίζηση των τρίτυλο-ομάδων, οι οποίες απομακρύνονται με διήθηση υπό κενό Buchner με φίλτρο por. 3. Στο διήθημα γίνεται μέτρηση pH, το οποίο διαπιστώνεται ότι είναι ίσο με 2, και προστίθενται σταγόνες K₂CO₃ 10% για εξουδετέρωση (pH=5-6). Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται με χρήση πιπέτας σε κατάλληλη μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis) (όριο αποκλεισμού MW=3.5 kDa),

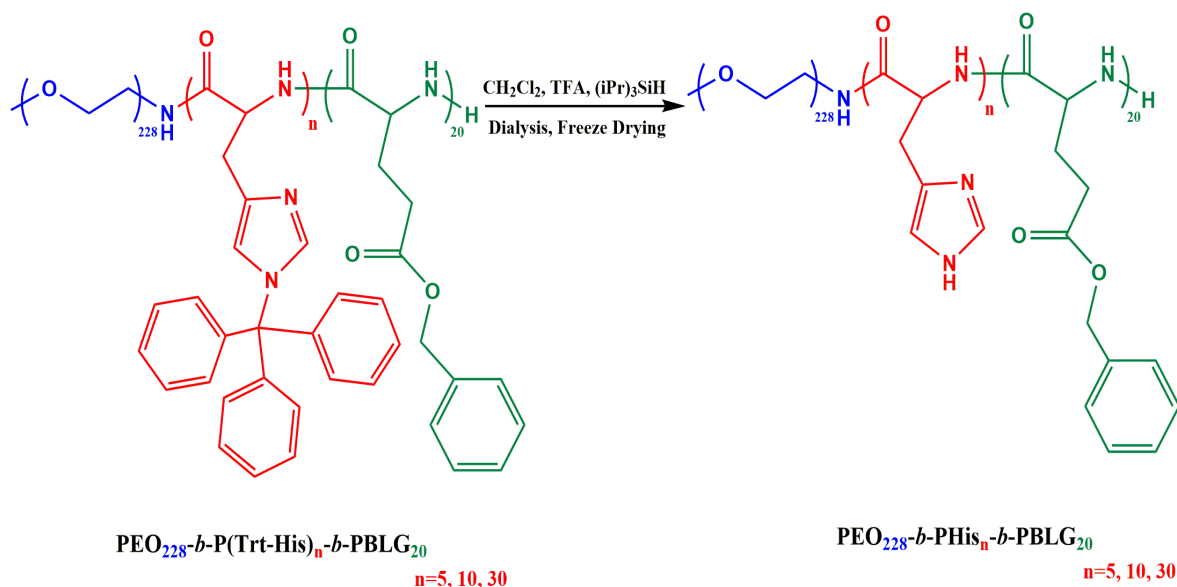
η οποία με τη σειρά της τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 2 L Milli-Q υπό ανάδευση (Εικόνα 29). Στο ποτήρι που περιέχει το milli-Q, το pH προσαρμόζεται στο 3 με την προσθήκη σταγόνων HCl 1N. Η διαδικασία της διαπίδυσης λαμβάνει χώρα για την απομάκρυνση των δεσμευμένων τρίτυλο-ομάδων από το πολυμερές διαμέσου των πόρων της μεμβράνης. Το pH του εξωτερικού διαλύματος ρυθμίζεται ανά 3 ώρες στο 3-4 με προσθήκη σταγόνων HCl 1N. Την επόμενη ημέρα γίνεται ρύθμιση του pH στο 9-10 με προσθήκη σταγόνων NaOH 1N, για την απομάκρυνση της περίσσειας HCl. Με το πέρας των ωρών παρατηρείται μείωση του pH του νερού, οπότε πραγματοποιούνται διαδοχικές αλλαγές του ανά τακτά χρονικά διαστήματα με νέα ποσότητα milli-Q και προσθήκη σταγόνων NaOH 1N, μέχρι να παρατηρηθεί σταθεροποίηση του pH στην περιοχή 9-10. Όταν το pH σταθεροποιηθεί γίνονται ακόμα δύο αλλαγές νερού με σκέτο Milli-Q, ώστε να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια του NaOH και το pH να γίνει ουδέτερο. Η διαδικασία του dialysis διαρκεί 4 ημέρες.



Εικόνα 29: Διαδικασία διαπίδυσης για την απομάκρυνση των τρίτυλο-προστατευτικών ομάδων.

Τέλος, ακολουθεί η διαδικασία του freeze-drying (λυοφιλοποίηση), μια διαδικασία που πραγματοποιείται με σκοπό την εκδίωξη του νερού από το

πολυμερές. Το περιεχόμενο της μεμβράνης μεταφέρεται με τη βοήθεια πιπέτας σε σφαιρική φιάλη, η οποία ψύχεται καλά εξωτερικά σε υγρό άζωτο. Ύστερα, προσαρμόζεται στη συσκευή του freeze-drying για την απομάκρυνση όλου του νερού. Το στερεό που παραλαμβάνεται είναι λευκό κοκκώδες. Το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG ζυγίζεται (0.3030 g) και φυλάσσεται σε vial στους 3 °C. Με παρόμοιο τρόπο, παρασκευάστηκαν και τα άλλα 2 συμπολυμερή.



Σχήμα 22: Αντίδραση εκλεκτικής αποπροστασίας των δομικών μονάδων της P(Trt-His) προς σχηματισμό του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHis_{*n*}-*b*-PBLG₂₀.

Στον παρακάτω πίνακα αποτυπώνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των συμπολυμερών PEO₂₂₈-*b*-(PHis)_{*n*}-*b*-PBLG₂₀ που παρασκευάστηκαν.

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των συμπολυμερών που παρασκευάστηκαν.

Πολυμερές	Ποσότητα (g.) πριν την αποπροστασία	Απόδοση (%)	Τελική Ποσότητα (g.)
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₅ - <i>b</i> -PBLG ₂₀	0,609	60	0,2583
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₁₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀	0,7981	71	0,303
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₃₀ - <i>b</i> -PBLG ₂₀	0,95	81	0,4205

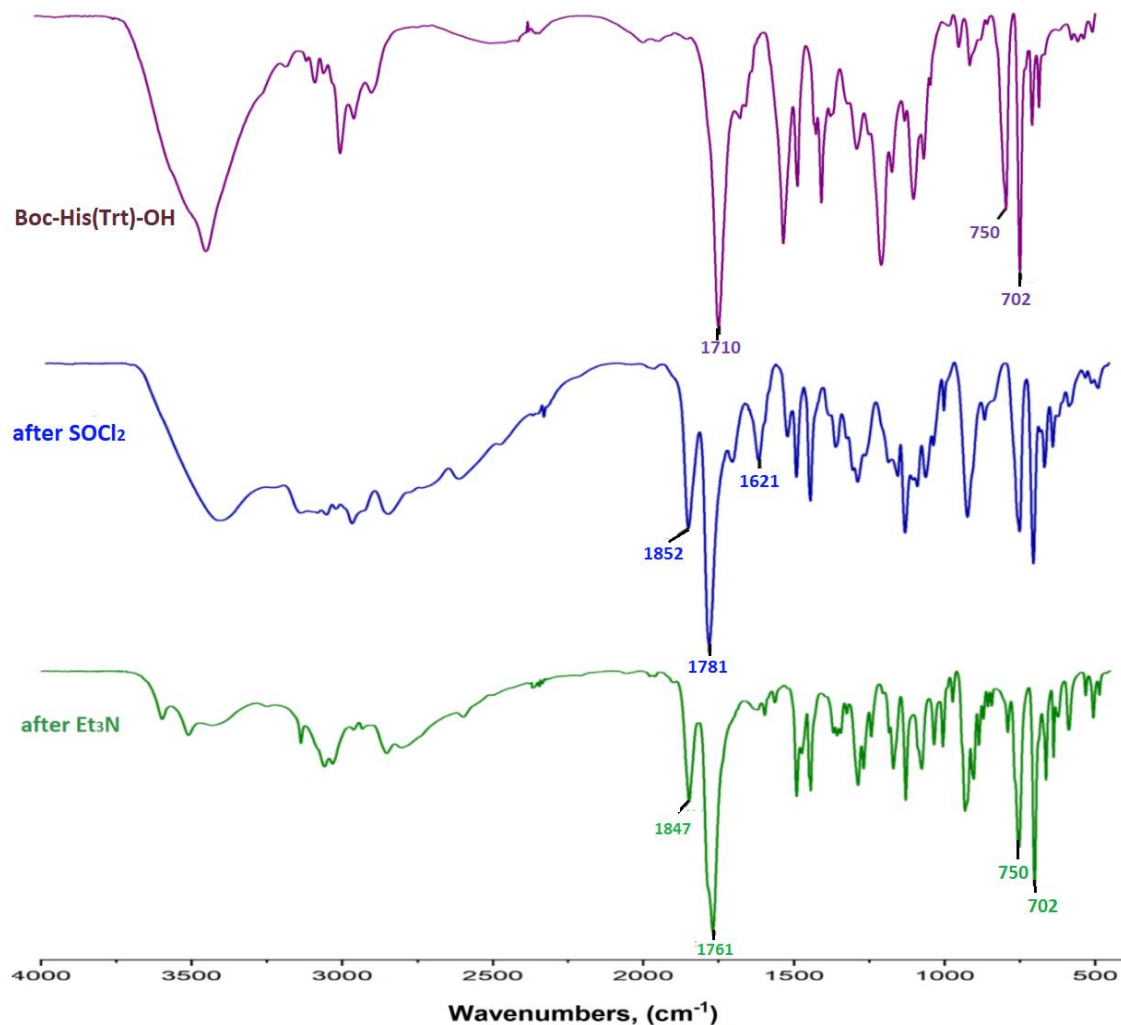
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Χαρακτηρισμός του $N^{(im)}$ -Trityl-L-Histidine N-Carboxy Anhydride, ($N^{(im)}$ -Trt-L-His NCA)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πορεία της σύνθεσης των N-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων ελέγχεται σε όλα τα στάδιά της, με φασματοσκοπία FT-IR, καθώς η τεχνική αυτή δίνει πληροφορίες τόσο για το πρόδρομο αμινοξύ, όσο και για τα ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης κυκλοποίησης προς σχηματισμό του τελικού ανυδρίτη. Έτσι, κατά τη διαδικασία σύνθεσης του ανυδρίτη της ιστοιδίνης, αρχικά, λαμβάνεται φάσμα IR της πρόδρομης ένωσης Boc-His(Trt)-OH (Σχήμα 23). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1710 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου (C=O) του αμινοξέος της ιστοιδίνης. Ακολούθως, λαμβάνει χώρα η αντίδραση κυκλοποίησης του αμινοξέος προς σχηματισμό του ανυδρίτη, οπότε χρησιμοποιείται το SOCl_2 ως μέσο χλωρίωσης. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2.5 ώρες και το τέλος της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με τη λήψη φάσματος IR. Σε αυτό το φάσμα η χαρακτηριστική κορυφή στα 1710 cm^{-1} του πρόδρομου αμινοξέος έχει εξαφανιστεί, ενώ είναι ορατές οι δύο κορυφές στα 1781 cm^{-1} και 1852 cm^{-1} , που αντιστοιχούν στη δόνηση του δεσμού του C=O δίπλα στο άζωτο του NCA και στη δόνηση του δεσμού του C=O δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA. Επιπλέον, είναι εμφανής και μία κορυφή στα 1621 cm^{-1} , η οποία οφείλεται σε έκταση δόνησης του δεσμού N-H και αποδίδεται στο σχηματισθέν υδροχλωρικό άλας του NCA της ιστοιδίνης. Η πλήρης δέσμευση του HCl από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο του NCA επιτυγχάνεται με χρήση ισομοριακής ποσότητας Et_3N προς σχηματισμό του άλατος $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ υπό μορφή ιζήματος, το οποίο απομακρύνεται από το επιθυμητό προϊόν μέσω διήθησης. Στο φάσμα IR του τελικού NCA απουσιάζει η κορυφή στα 1621 cm^{-1} , που δείχνει ότι δεσμεύτηκε ποσοτικά το HCl μετά την προσθήκη της ποσότητας τριαιθυλαμίνης, ενώ δεν εμφανίζεται κορυφή στα 1650 cm^{-1} , που θα οφειλόταν στη δόνηση του πεπτιδικού δεσμού λόγω πιθανής έναρξης

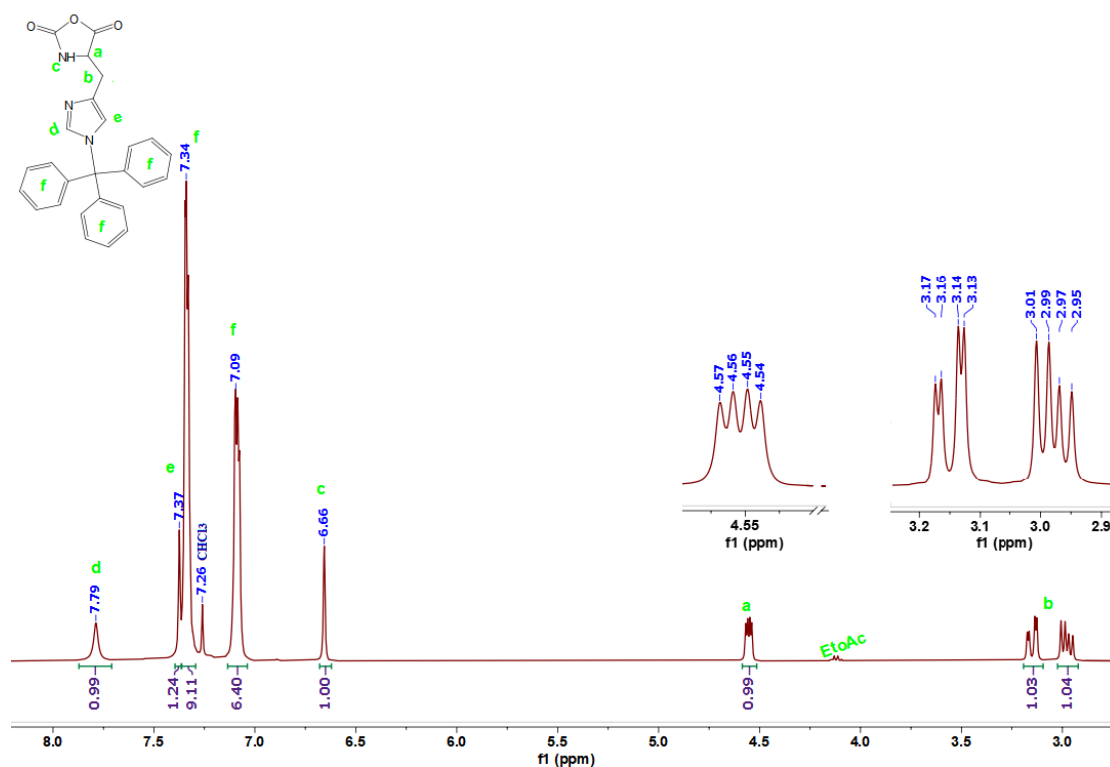
του πολυμερισμού από τυχόν περίσσεια της Et_3N . Τέλος, παρατηρούμε ότι η τρίτυλο-προστατευτική ομάδα παραμένει ανέπαφη σε όλα τα στάδια της συνθετικής πορείας, καθώς οι δονήσεις των δεσμών $-\text{CH}=\text{CH}-$ των βενζολικών δακτυλίων στα 702 cm^{-1} και 750 cm^{-1} παραμένουν αμετάβλητες.



Σχήμα 23: Φάσματα IR του πρόδρομου αμινοξέος, του υδροχλωρικού άλατος του NCA και του τελικού καθαρού $\text{N}^{(\text{im})}$ -Trityl-L-His NCA.

Ακολούθως, η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του $\text{N}^{(\text{im})}$ -Trityl-L-His NCA επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε διαλύτη CDCl_3 (Σχήμα 24). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.96–3.18 (b: 2H, $-\text{CH}_2$), 4.55–4.57 (a: 1H, $-\text{CH}-$ του δακτυλίου του NCA), 6.66 (c: 1H, $-\text{NH}-$ του δακτυλίου του NCA), 7.08–7.35 (f: 16H, ArH των τρίτυλο-ομάδων),

7.37 (e: 1H, -C=CH-N, ιμιδαζολικού δακτυλίου), 7.79 (d: 1H, -N=CH-N, ιμιδαζολικού δακτυλίου).

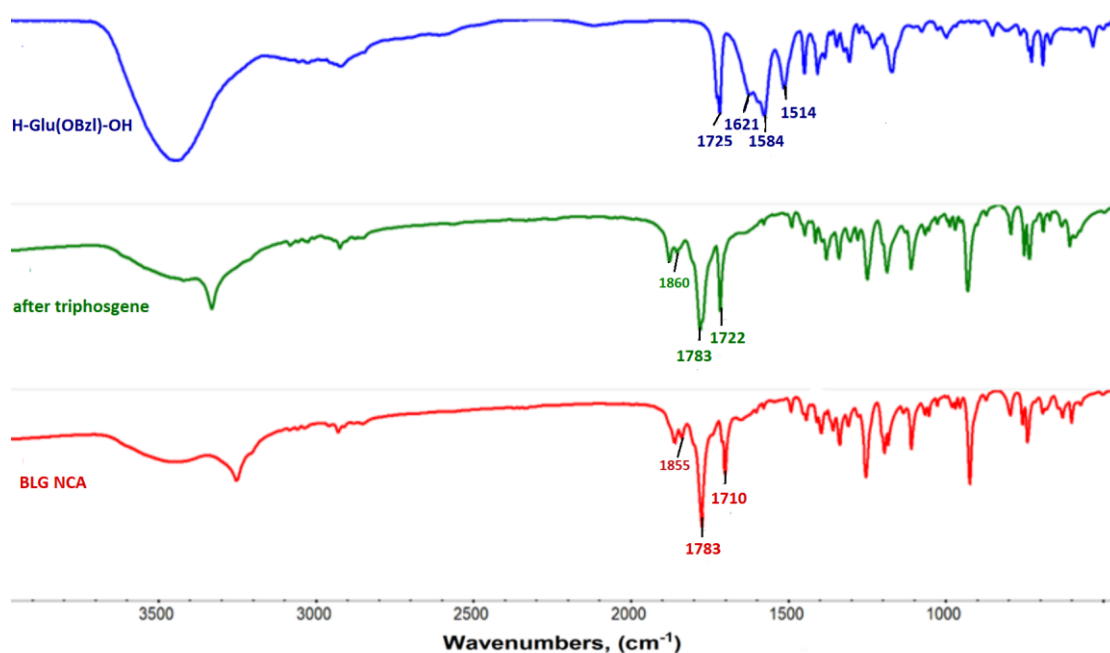


Σχήμα 24: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του $\text{N}^{(\text{im})}$ -Trityl-L-His NCA σε διαλύτη CDCl_3 .

5.2 Χαρακτηρισμός του γ -Benzyl-L-Glutamate N-Carboxy Anhydride (BLG NCA)

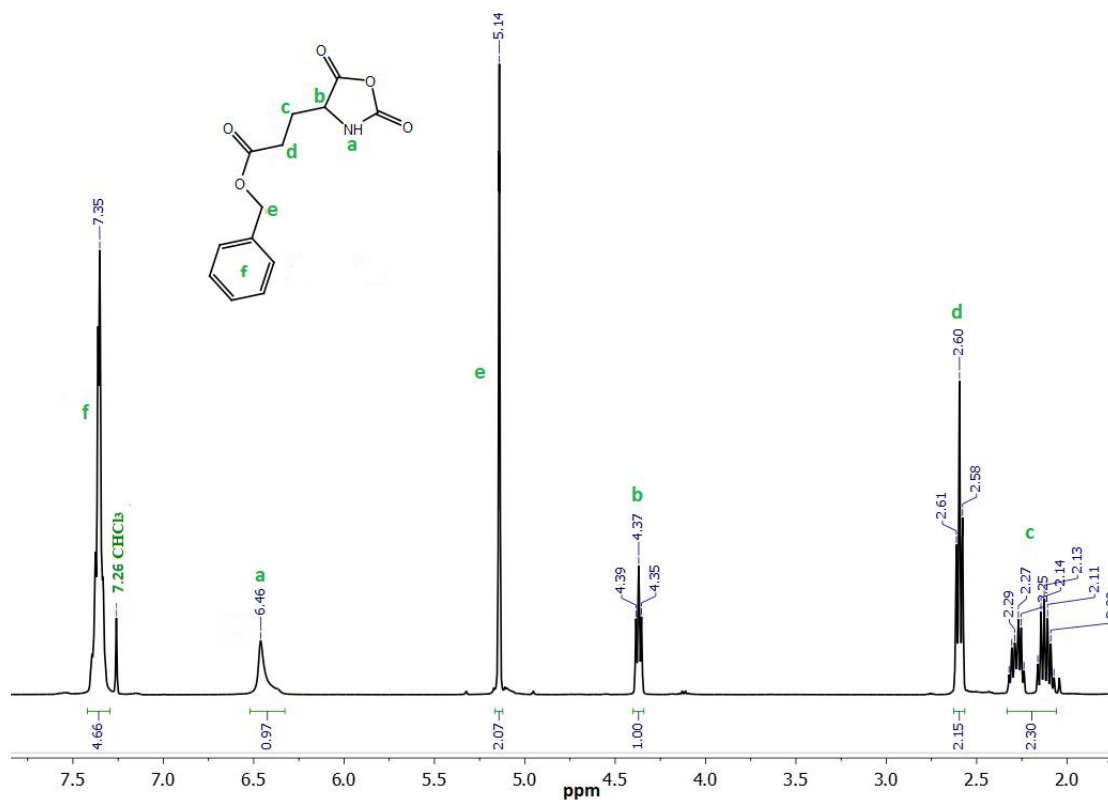
Σε πρώτο βήμα, πραγματοποιείται η λήψη φάσματος IR της πρόδρομης ένωσης H-Glu(OBzl)-OH (Σχήμα 25). Η ευρεία κορυφή στην περιοχή $2500\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχεί στη δόνηση έκτασης του δεσμού -N-H της πρωτοταγούς αμίνης και στις δονήσεις έκτασης των δεσμών -C-H του ανθρακικού σκελετού και του αρωματικού δακτυλίου. Στους 1725 cm^{-1} απορροφά το καρβονύλιο του εστερικού δεσμού (δόνηση έκτασης) στην πλευρική ομάδα του αμινοξέος, ενώ στην περιοχή $600\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται οι απορροφήσεις των δονήσεων του αρωματικού δακτυλίου της προστατευτικής ομάδας. Στους 1621 cm^{-1} και 1514 cm^{-1} αντιστοιχεί η ασύμμετρη και η συμμετρική δόνηση κάμψης του δεσμού N-H της αμινομάδας, ενώ στους 1584 cm^{-1} αντιστοιχεί η ασύμμετρη δόνηση έκτασης του καρβοξυλικού ανιόντος, που αποδεικνύει ότι το αμινοξύ βρίσκεται με τη μορφή διπολικού ιόντος. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης με το τριφωσγένιο επιβεβαιώθηκε με την εμφάνιση των δύο νέων κορυφών στα

1783 cm^{-1} και 1855 cm^{-1} που αφορούν τη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση έκτασης των καρβονυλίων του ανυδρίτη αντίστοιχα. Στο φάσμα του τελικού αμινοξέος, παρατηρείται η πλήρης κατανάλωση του αρχικού αμινοξέος καθώς απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές της ελεύθερης αμινομάδας και του καρβοξυλίου στην περιοχή 1621 cm^{-1} και 1514 cm^{-1} , ενώ ταυτόχρονα απουσιάζει η χαρακτηριστική δόνηση του αμιδικού δεσμού στους 1650 cm^{-1} , γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν υπήρξε πρόωρος πολυμερισμός του μονομερούς κατά τη διάρκεια των σταδίων καθαρισμού του.



Σχήμα 25: Φάσματα IR του πρόδρομου αμινοξέος, μετά την προσθήκη του τριφωσγενίου και του τελικού BLG NCA.

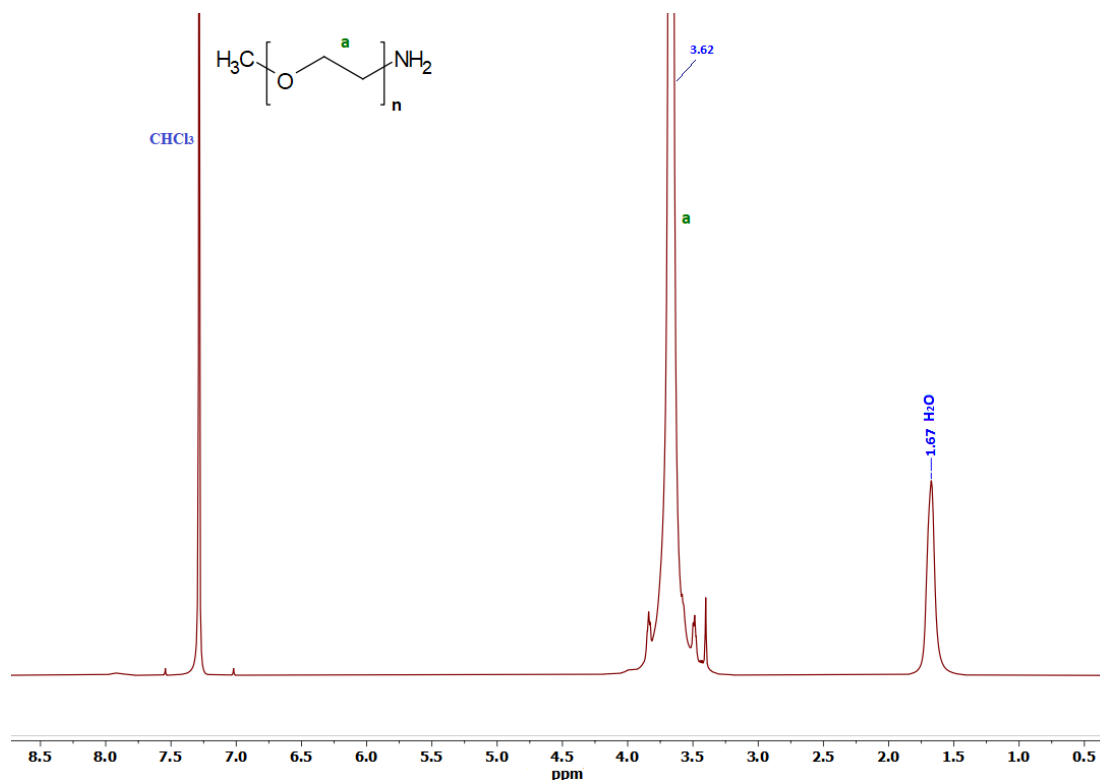
Τέλος, η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του BLG-NCA επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη CDCl_3 . Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.10–2.30 (c: 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 2.60 (d: 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 4.37 (b: 1H, $-\text{CH}-$ του δακτυλίου του NCA), 5.14 (e: 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$ βενζυλικά), 6.46 (a: 1H, $-\text{NH}-$ του δακτυλίου του NCA), 7.26–7.40 (f: 5H, αρωματικά H της προστατευτικής ομάδας).



Σχήμα 26: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του BLG NCA σε διαλύτη CDCl_3 .

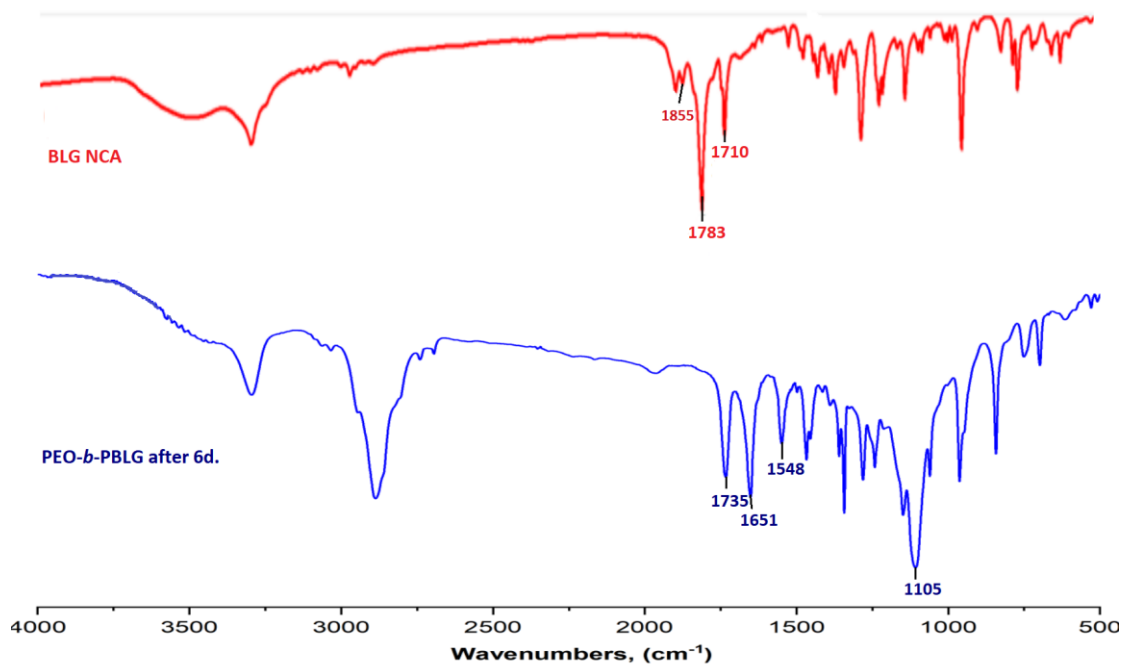
5.3 Αποτελέσματα δοκιμαστικού πολυμερισμού με τροποποιημένο μακροαπαρχητή PEO-NH₂

Για την εξακρίβωση της επιτυχούς σύνθεσης του μακροαπαρχητή PEO-NH₂ και της ικανότητάς του να εκκινεί πολυμερισμό, πραγματοποιήθηκε δοκιμαστικός πολυμερισμός με τον ανυδρίτη του γ-βενζυλο-L-γλουταμικού οξέος (BLG NCA). Αρχικά, λήφθηκε φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του τροποποιημένου απαρχητή PEO-NH₂. Δυστυχώς, δεν μπορεί να φανεί η χαρακτηριστική ομάδα -NH₂ που προκύπτει μετά την τροποποίηση της -OH του αρχικού απαρχητή, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Αυτό συμβαίνει, λόγω των πολύ ευκίνητων υδρογόνων.



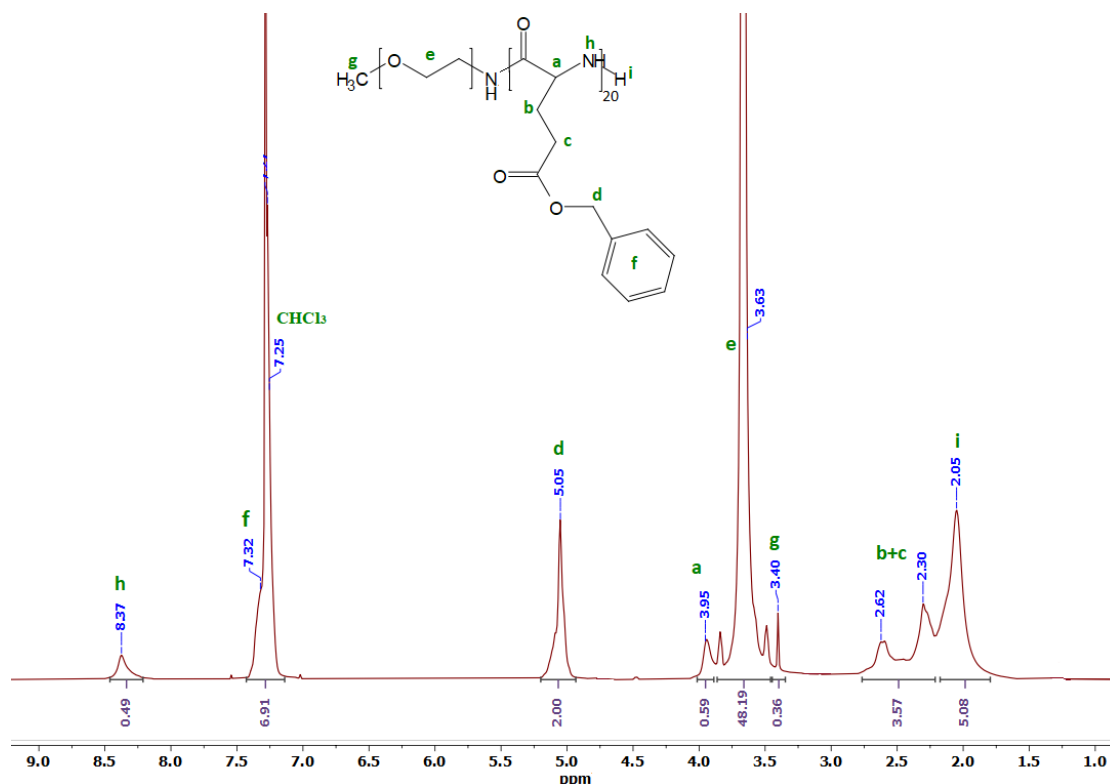
Σχήμα 27: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μακροαπαρρητή PEO-NH₂ σε διαλύτη CDCl₃.

Από τα IR φάσματα του πολυμερούς PEO-*b*-PBLG₂₀, παρατηρείται ότι απουσιάζουν οι κορυφές στα 1855 και 1783 cm⁻¹, οι οποίες οφείλονται στην ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση έκτασης των καρβονυλίων του NCA, γεγονός που αποδεικνύει ότι το μονομερές έχει καταναλωθεί πλήρως. Χαρακτηριστικές είναι επίσης οι κορυφές στα 1651 και 1548 cm⁻¹, που οφείλονται στην έκταση του δεσμού του καρβονυλίου και την κάμψη του δεσμού N-H, γεγονός που αποδεικνύει την επιτυχή σύνθεση της πολυπεπτιδικής συστάδας. Τέλος, η κορυφή στα 1105 cm⁻¹, είναι χαρακτηριστική της δόνησης έκτασης του δεσμού -C-O-C- του πολυ(αιθυλενοξειδίου), καθώς και η κορυφή στα 1735 cm⁻¹, που αντιστοιχεί στην δόνηση έκτασης του καρβονυλίου του εστερικού δεσμού της προστατευτικής ομάδας. Στο παρακάτω Σχήμα παρατίθεται το φάσμα IR του πολυμερούς PEO-*b*-PBLG₂₀.



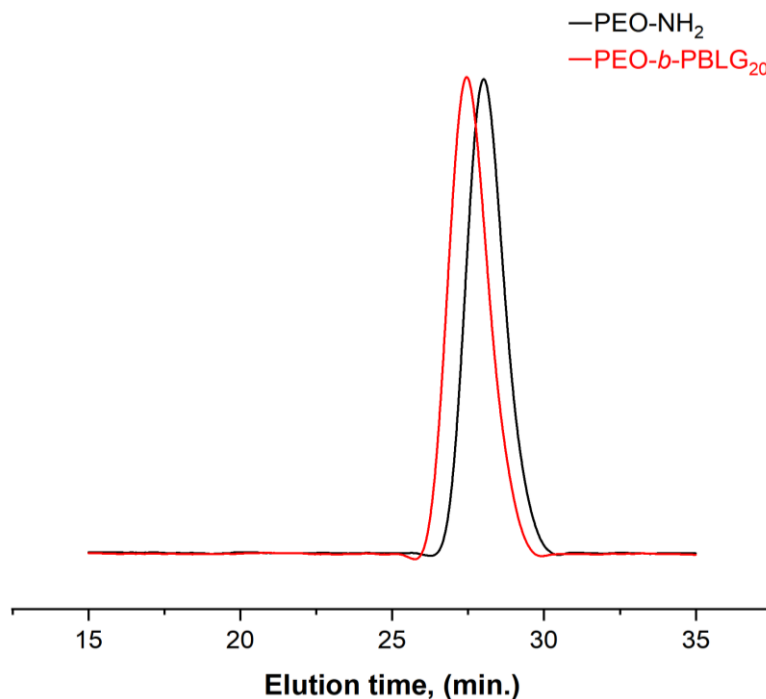
Σχήμα 28: Φάσμα IR του δοκιμαστικού πολυμερούς PEO-*b*-PBLG₂₀.

Επιπλέον, μέσω του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εξακριβώθηκε η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του επιθυμητού συμπολυμερούς PEO-*b*-PBLG₂₀. Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του συμπολυμερούς, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών τους συμπίπτουν με τις θεωρητικά προβλεπόμενες σε μεγάλο βαθμό. Οι υπολογισμοί έγιναν για την προσθήκη 20 μονομερικών μονάδων NCA BLG. Η κατά βάρος αναλογία υπολογίστηκε από τις αναλογίες των κορυφών d και e σε 33% που συμπίπτει με τη θεωρητική 32%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 2.05 (2H, -NH₂), 2.30–2.62 (4H, CH₂–CH₂–C=O benzyl ester), 3.40 (3H, CH₃–O-), 3.42–3.92 (4H, -CH₂–CH₂-O-), 3.95 (1H, (C=O)-C-H-N), 5.05 (2H, (C=O)-O-CH₂ benzyl), 7.25-7.32 (5H, =C-H aromatic), 8.20-8.37 (1H, -NH- του backbone του πολυμερούς, ευκίνητο).



Σχήμα 29: Φάσμα ¹H-NMR του PEO-*b*-PBLG₂₀ σε CDCl₃.

Τέλος, από το χρωματογράφημα SEC του πολυμερούς σε διαλύτη DMF παρατηρείται ότι η κορυφή που αντιστοιχεί στο συμπολυμερές εμφανίζεται σε μικρότερους χρόνους έκλουσης σε σχέση με την κορυφή του μακροαπαρχητή, PEO-NH₂. Αυτό είναι φυσιολογικό, καθώς στην SEC ο διαχωρισμός γίνεται με βάση τον υδροδυναμικό όγκο. Έτσι, τα πολυμερή με μεγαλύτερο υδροδυναμικό όγκο εκλούνται σε μικρότερους χρόνους λόγω της μικρότερης κατακράτησης τους από την στήλη. Η κατανομή των μοριακών βαρών του μακροαπαρχητή PEO-NH₂ είναι 1.05 και του PEO-*b*-PBLG₂₀ είναι ίση με 1.08, ενώ το MB=14400 ($M_{wPEO}=10.000$). Το μοριακό βάρος του πολυμερούς συμπίπτει με το θεωρητικά προβλεπόμενο, ωστόσο πρέπει να τονιστεί ότι τα αποτελέσματα οφείλουν να αναφέρονται με κάθε επιφύλαξη, καθώς υπολογίστηκαν κατόπιν βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα πολυ(στυρενίου).



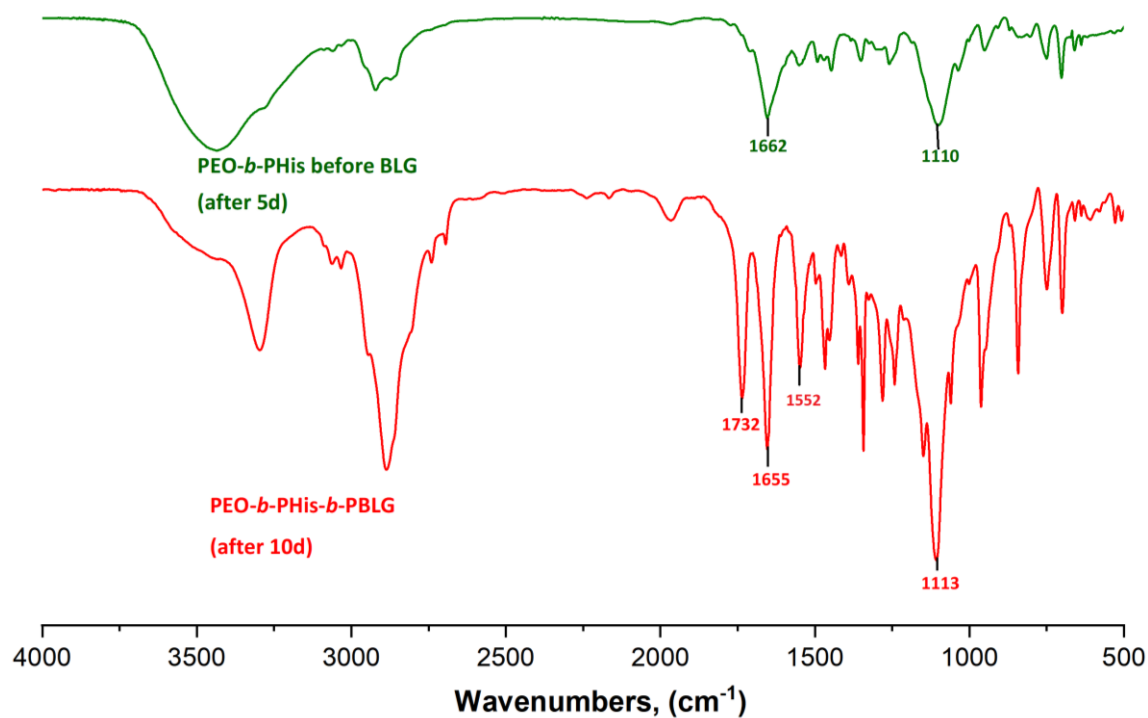
Σχήμα 30: Χρωματογράφημα SEC των PEO-NH₂ και PEO-*b*-PBLG₂₀ σε διαλύτη DMF.

5.4 Χαρακτηρισμός των κατά συστάδων συμπολυμερών του τύπου poly(ethyleneoxide)₂₂₈-*b*-poly(L-Histidine)_n-*b*-poly(γ-benzyl-glutamate)₂₀, (PEO₂₂₈-*b*-PHis_n-*b*-PBLG₂₀)

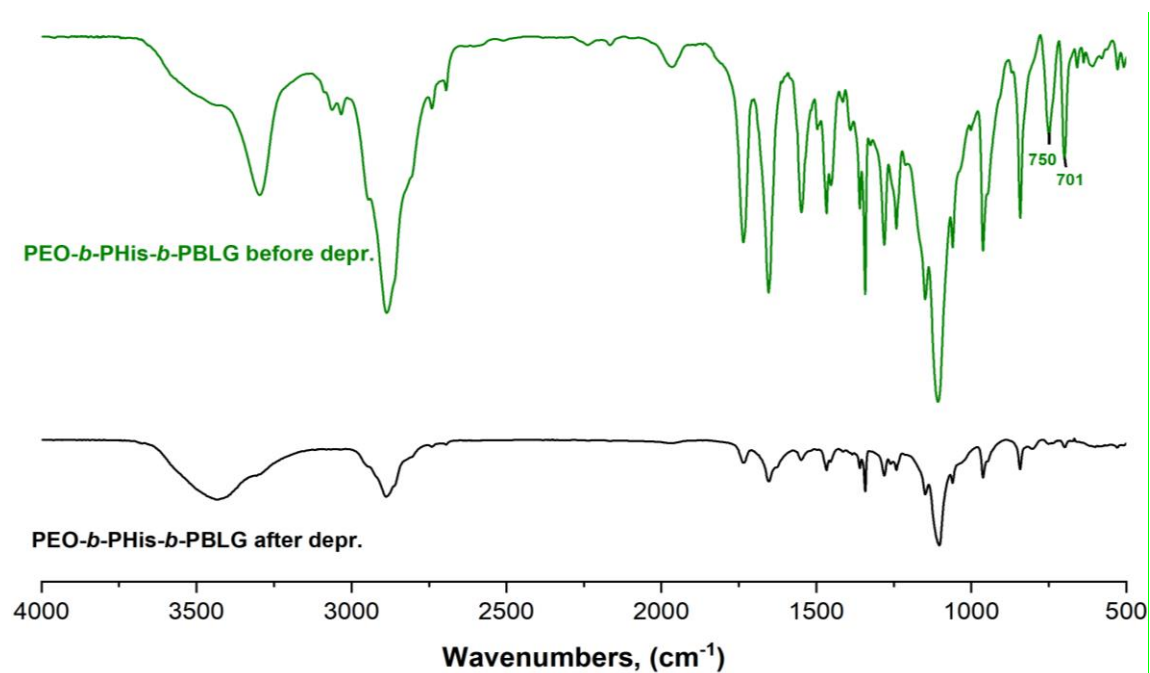
Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν κατά συστάδες συμπολυμερή του τύπου PEO₂₂₈-*b*-PHis_n-*b*-PBLG₂₀, όπου n= 5, 10 και 30. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη φασματοσκοπία IR, από μαγνητικό πυρηνικό συντονισμό ¹H-NMR και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών SEC παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

Αρχικά, κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού και για την εξακρίβωση της πορείας του, λήφθηκαν φάσματα IR. Για το πολυμερές με τις 5 μονομερικές μονάδες της ιστοδίνης, η ολοκλήρωση της αντίδρασης του πολυμερισμού επιβεβαιώνεται από την απουσία των κορυφών των NCA (1847 και 1761 cm⁻¹ για His και 1783 και 1880 cm⁻¹ για BLG), καθώς και την εμφάνιση των κορυφών στα 1655 cm⁻¹ και 1551 cm⁻¹ (Σχήμα 31) του αμιδικού δεσμού. Επιπλέον, η απουσία των χαρακτηριστικών κορυφών στα 701 και 750 cm⁻¹ που αποδίδονται στις Ttt- προστατευτικές ομάδες της ιστοδίνης υποδεικνύουν την πλήρη διάσπαση των προστατευτικών τμημάτων μετά την αποπροστασία, ενώ η κορυφή στα 1732 cm⁻¹ της βένζυλο-προστατευτικής ομάδας του NCA

BLG, παρέμεινε άθικτη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 32. Τέλος, η κορυφή στα 1113 cm^{-1} , είναι χαρακτηριστική της δόνησης έκτασης του δεσμού -C-O-C- του πολυ(αιθυλενοξειδίου).

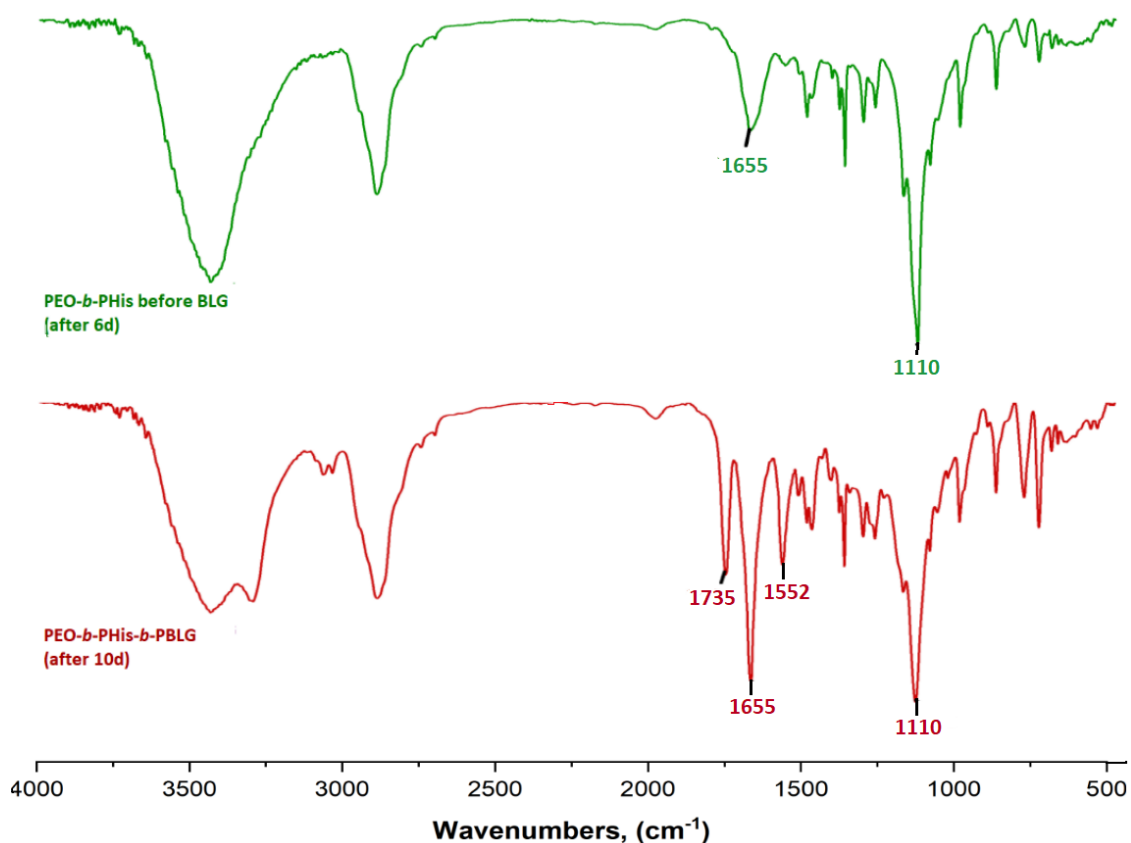


Σχήμα 31: Φάσματα IR πριν την προσθήκη του BLG και του τελικού προστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-P(Trt-His)₅-*b*-PBGL₂₀.

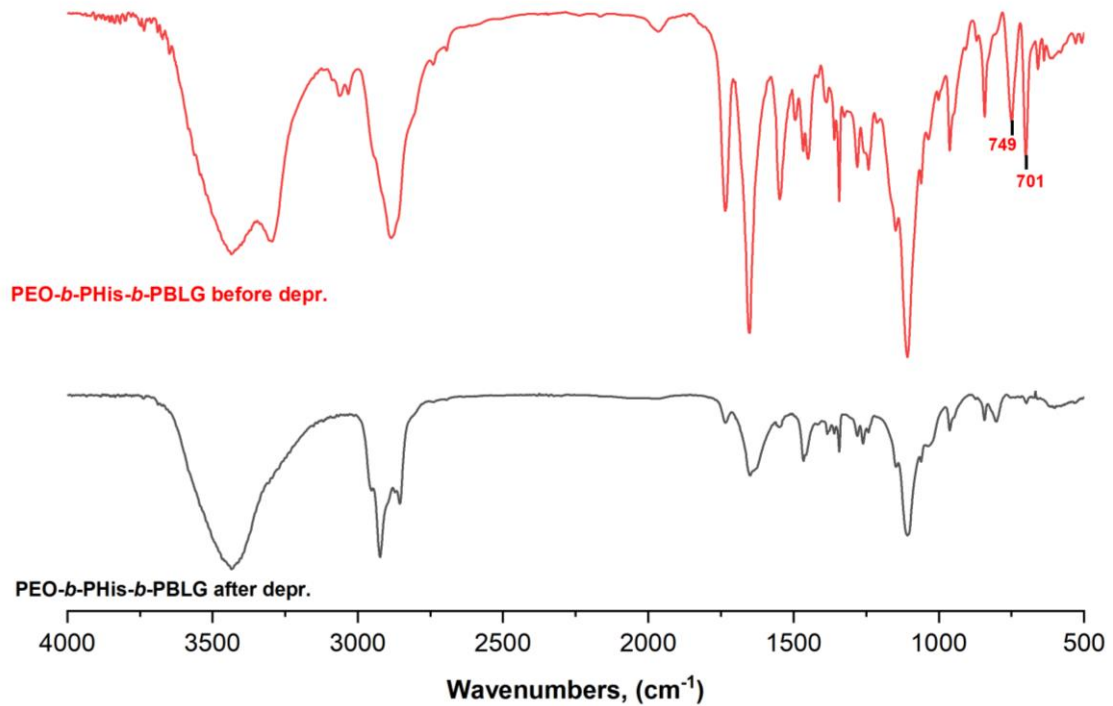


Σχήμα 32: Φάσμα IR του προστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-P(Trt-His)₅-*b*-PBLG₂₀ και του αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-PHis₅-*b*-PBLG₂₀.

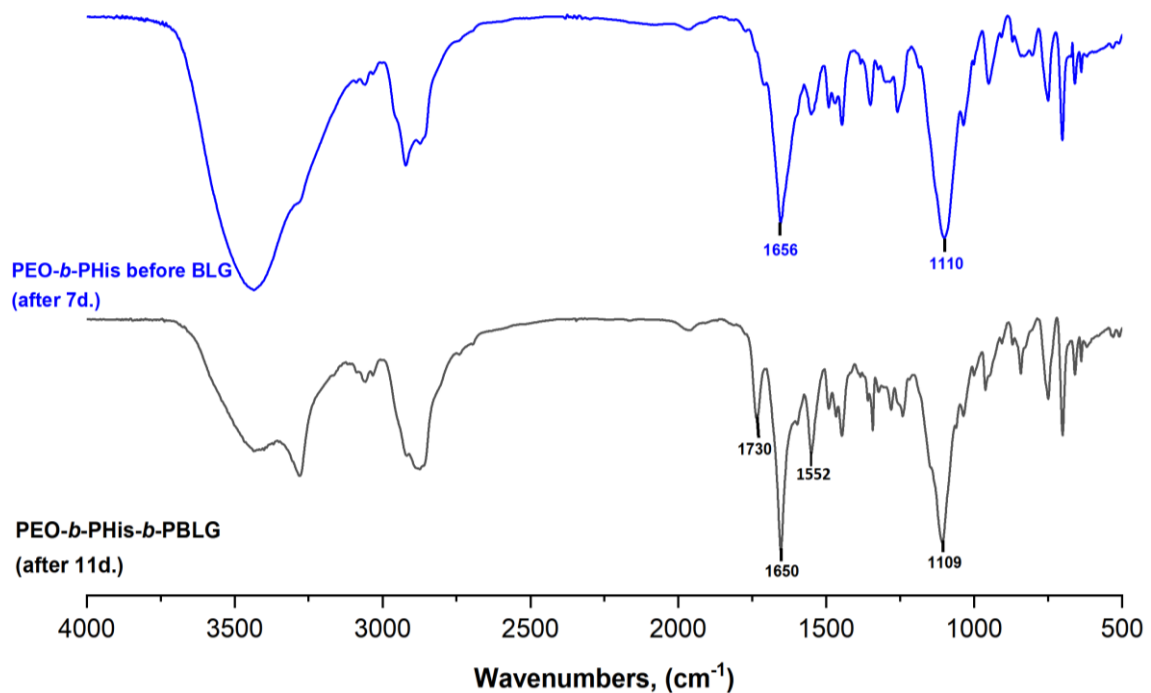
Αντίστοιχα, παρατίθενται και τα υπόλοιπα φάσματα για τα πολυμερή PEO-*b*-PHis₁₀-*b*-PBLG₂₀ και PEO-*b*-PHis₃₀-*b*-PBLG₂₀. Όπως παραπάνω, από τα τελικά προστατευμένα πολυμερή απουσιάζουν οι κορυφές των NCA (ένδειξη ότι ο πολυμερισμός έχει ολοκληρωθεί), ενώ χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 1655 cm⁻¹ και 1552 cm⁻¹ των δονήσεων του πεπτιδικού δεσμού. Ακόμα, από τα αποπροστατευμένα πολυμερή απουσιάζουν εκ νέου οι κορυφές που αντιστοιχούν στις Trt-προστατευτικές ομάδες (750 και 701 cm⁻¹), ένδειξη επιτυχούς αποπροστασίας.



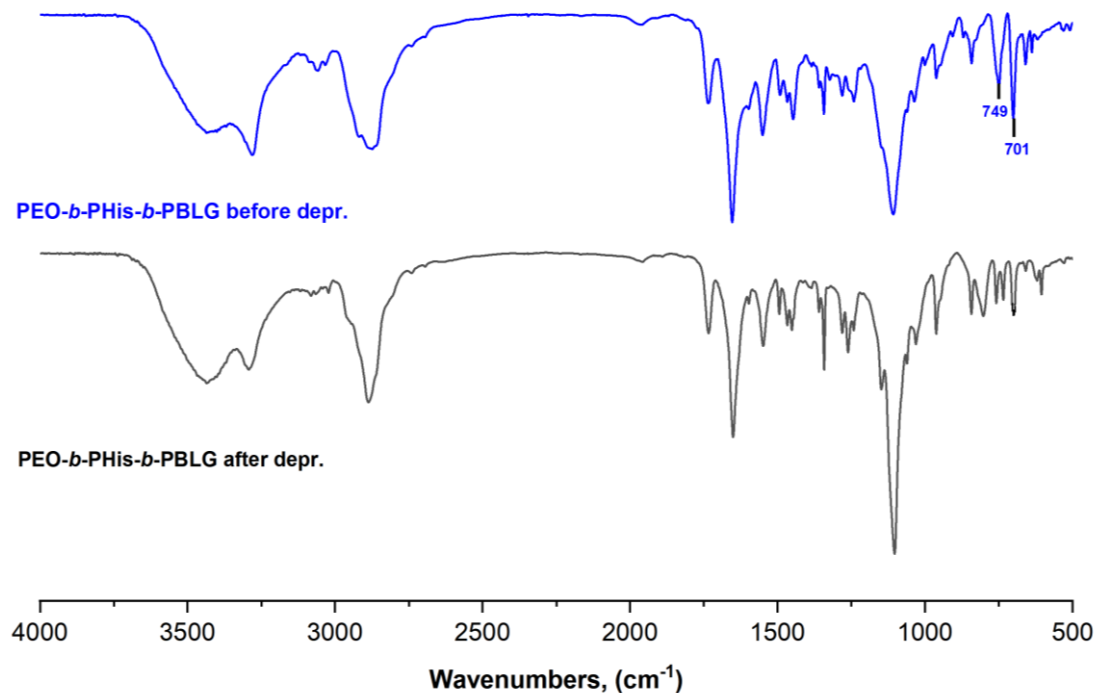
Σχήμα 33: Φάσματα IR πριν την προσθήκη του BLG NCA και του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-P(Trt-His)₁₀-*b*-PBLG₂₀,



Σχήμα 34: Φάσμα IR του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-PHis₁₀-*b*-PBLG₂₀ (κάτω).

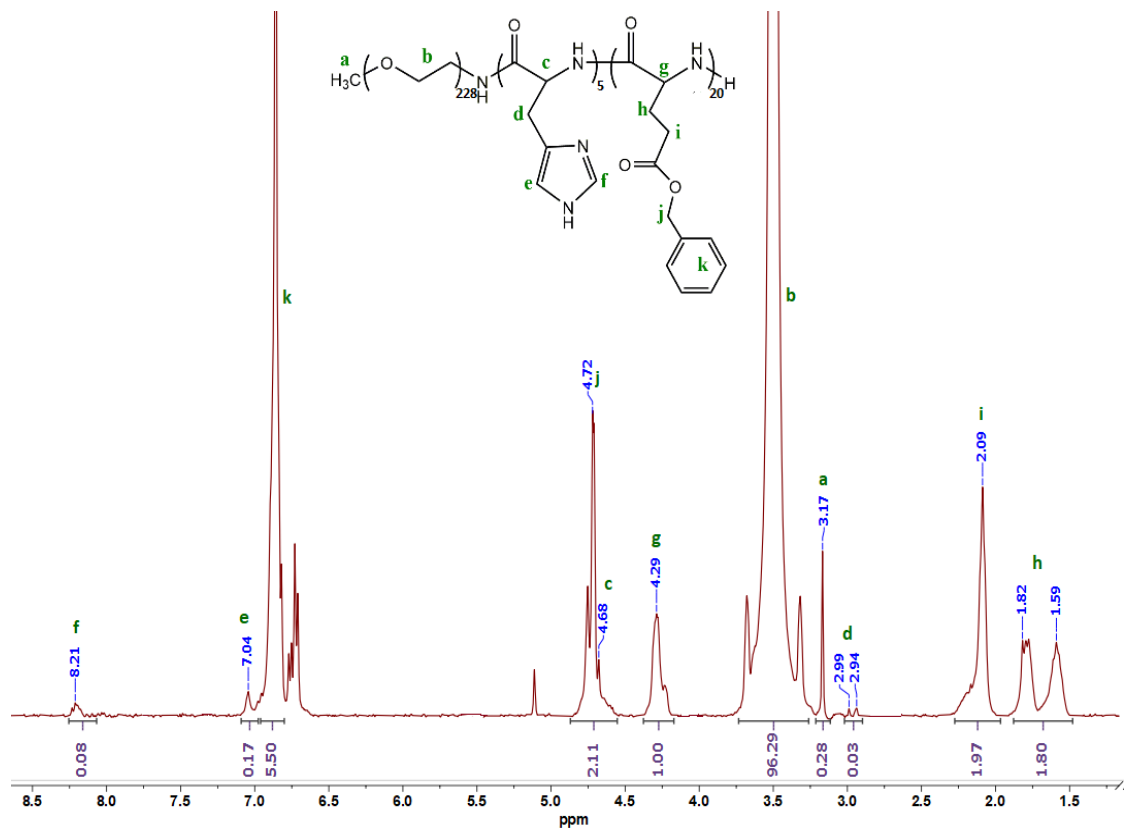


Σχήμα 35: Φάσματα IR πριν την προσθήκη του BLG NCA και του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-P(Trt-His)₃₀-*b*-PBLG₂₀.

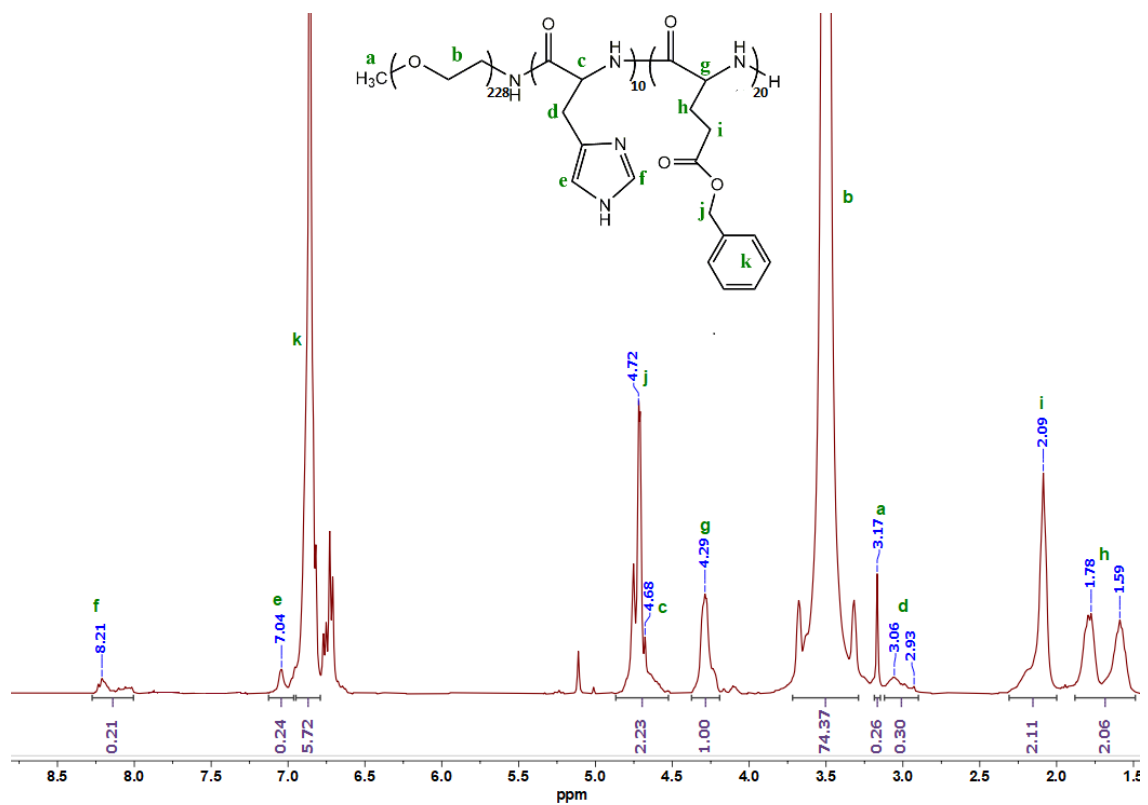


Σχήμα 36: Φάσμα IR του τελικού αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-PHis₃₀-*b*-PBLG₂₀ (κάτω).

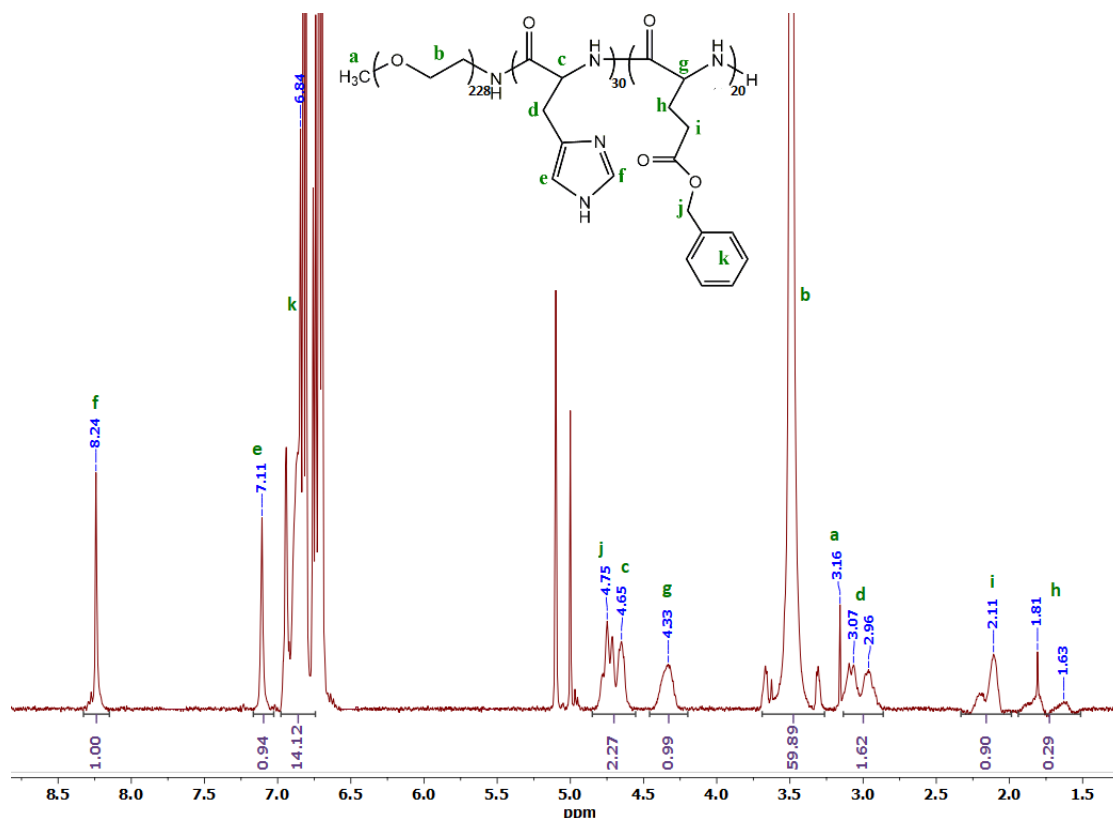
Επιπλέον, η καθαρότητα καθώς και η επιτυχής σύνθεση των συμπολυμερών επιβεβαιώθηκαν με φασματοσκοπία ¹H-NMR (Σχήματα 37, 38, 39): ¹H-NMR (400 MHz, d-TFA, δ, ppm): 1.59–2.25 (h+i: 4H, –CH₂–CH₂–C=O βενζυλικός εστέρας), 2,93–3.06 (d: 2H, –CH₂–), 3.17 (a: 3H, CH₃–O–), 3.5 (b: 4H, –CH₂–CH₂–O–), 4.29 (g: 1H, NH–CH–(CH₂–)–C=O), 4.68 (c: 1H, NH–CH–(CH₂–)–C=O), 4.72 (j: 2H, (C=O)–O–CH₂–benzyl), 6.85 (k: 5H, =C–H αρωματικά), 7.04 (e: 1H, C=CH–NH–), 8.21 (f: 1H, –N=CH–NH–). Η αποπροστασία της PHis είναι εμφανής και στα τρία πολυμερή που παρασκευάστηκαν, αφού οι κορυφές των πρωτονίων που αντιστοιχούν στα αρωματικά υδρογόνα στα 7.08-7.35 ppm δεν εμφανίζονται στα φάσματα. Όπως παρατηρήθηκε, όλες οι κορυφές και στα τρία φάσματα αποδίδονται στα υδρογόνα του πολυμερούς και η ολοκλήρωση των κορυφών συμπίπτει σχεδόν με τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές, επιβεβαιώνοντας έτσι την επιτυχημένη σύνθεση των συμπολυμερών. Η μη ακριβής συσχέτιση των ολοκληρώσεων μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών τιμών, ίσως να οφείλεται στη συσσωμάτωση των δομικών μονάδων της πολυ(ιστιδίνης), πράγμα που απαντάται και στη βιβλιογραφία για πολυμερή που περιέχουν PHis.



Σχήμα 37: Φάσμα ¹H-NMR του αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-PHis₅-*b*-PBLG₂₀ σε d-TFA.



Σχήμα 38: Φάσμα ¹H-NMR του αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO-*b*-PHis₁₀-*b*-PBLG₂₀ σε d-TFA.

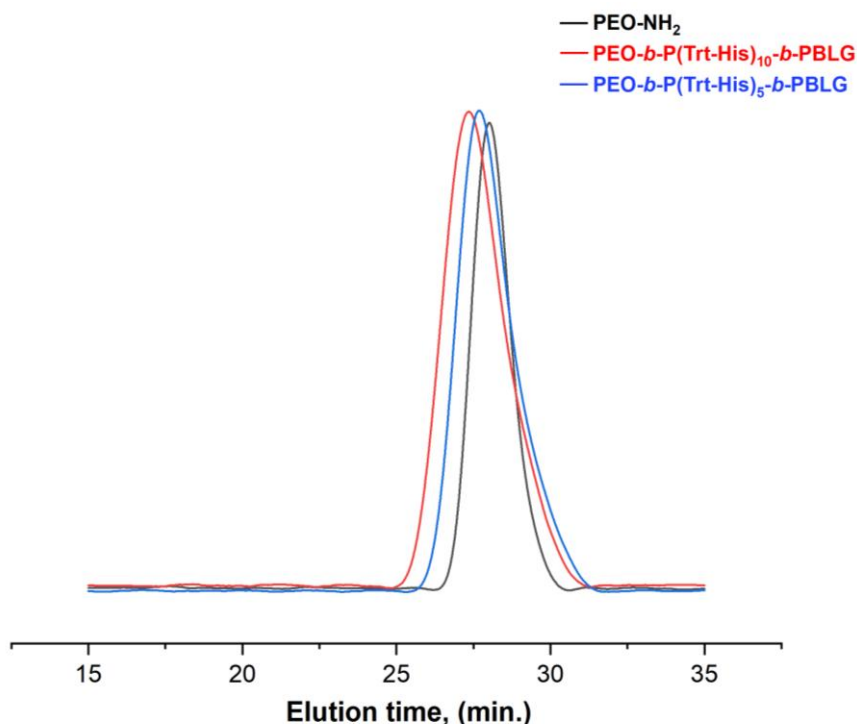


Σχήμα 39: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του αποπροστατευμένου πολυμερούς $\text{PEO-}b\text{-PHis}_{30}\text{-}b\text{-PBLG}_{20}$ σε $d\text{-TFA}$.

Για το $\text{PEO-}b\text{-PHis}_5\text{-}b\text{-PBLG}_{20}$, από τις ολοκληρώσεις των κορυφών g και f προκύπτει ότι το ποσοστό κατά βάρος της πολυ(ιστιδίνης) στο πολυπεπτιδικό τμήμα είναι 5%, ενώ του πολυ(βενζυλο-L-γλουταμικού) 95%, με τα αντίστοιχα θεωρητικά υπολογιζόμενα να είναι 12% και 88%, αντίστοιχα. Παράλληλα, για το $\text{PEO-}b\text{-PHis}_{10}\text{-}b\text{-PBLG}_{20}$ προκύπτουν τα πειραματικά ποσοστά για την πολυ(ιστιδίνη) να είναι 12% και 88% για το πολυ(βενζυλο-L-γλουταμικού), με τα θεωρητικά να είναι 22% και 78%, αντίστοιχα. Παρόμοια για το $\text{PEO-}b\text{-PHis}_{30}\text{-}b\text{-PBLG}_{20}$ υπολογίζονται τα πειραματικά για την πολυ(ιστιδίνη) να είναι 40% και 60% για το πολυ(βενζυλο-L-γλουταμικού), με τα θεωρητικά να προκύπτουν 48% και 52%, αντίστοιχα.

Τέλος, λήφθηκαν φάσματα SEC και για τα τρία προστατευμένα συμπολυμερή σε διαλύτη DMF. Για το πολυμερές με τις 30 μονομερικές μονάδες της ιστιδίνης προκύπτουν δύο κορυφές που οφείλονται σε συσσωμάτωση της PHis, όπως αποδεικνύεται και παρακάτω. Τα αποτελέσματα είναι τα αναμενόμενα, καθώς το $\text{PEO-}b\text{-P(Trt-His)}_{10}\text{-}b\text{-PBLG}$ εκλούεται σε μικρότερους χρόνους και ακολουθεί αυτό με τις 5 μονάδες. Αυτό είναι λογικό, αφού πρώτα

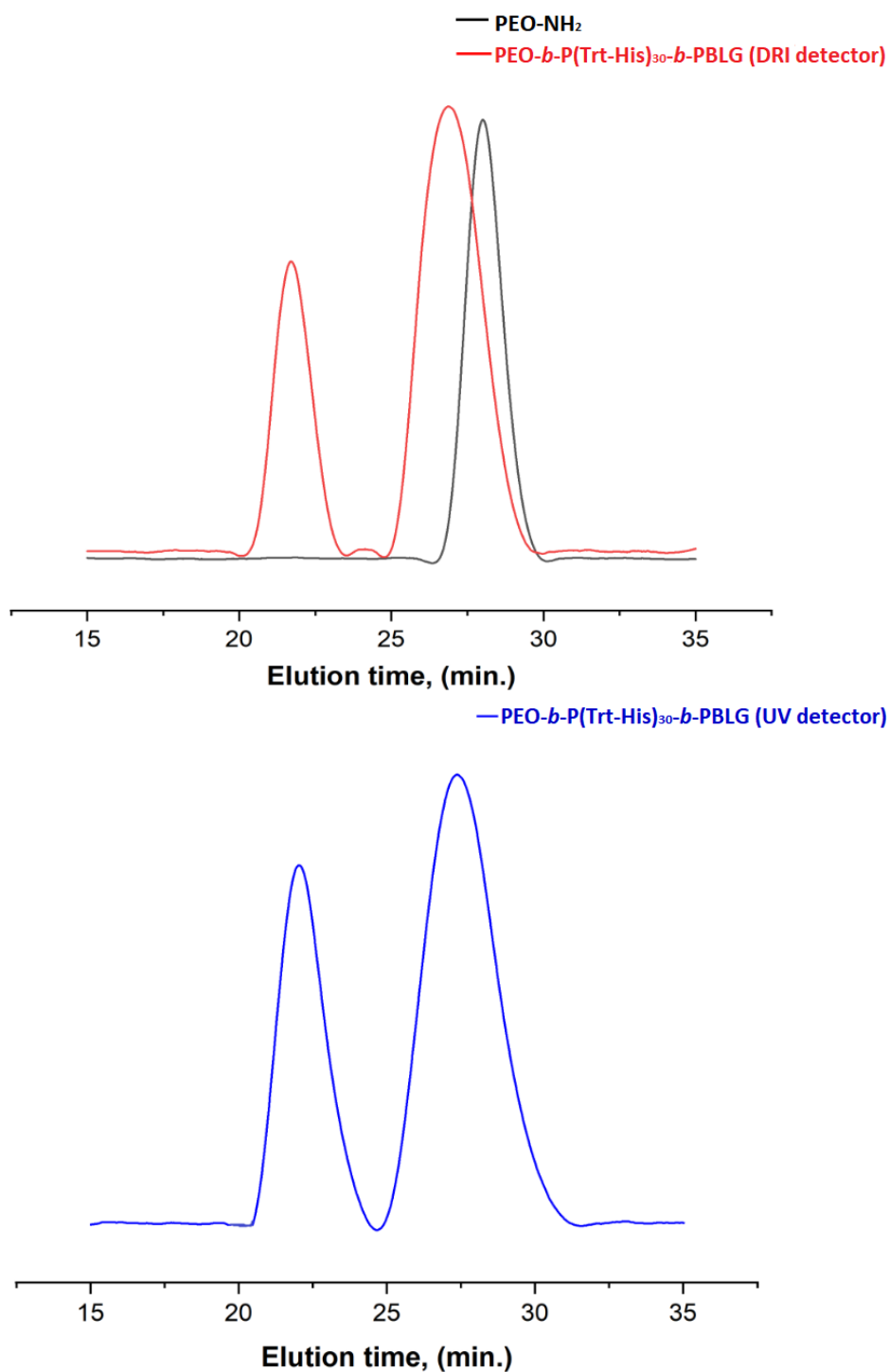
εκλούονται τα πολυμερή με μεγαλύτερους υδροδυναμικούς όγκους και ακολουθούν αυτά με τους μικρότερους, λόγω μεγαλύτερης κατακράτησής τους στην στήλη. Η κατανομή μοριακών βαρών για το PEO-NH₂ είναι 1.05 ενώ για τα PEO₂₂₈-*b*-P(Trt-His)₅-*b*-PBLG₂₀, PEO₂₂₈-*b*-P(Trt-His)₁₀-*b*-PBLG₂₀ είναι ίσες με 1.15 και 1.21, αντίστοιχα.



Σχήμα 40: Διαγράμματα SEC για τον μακροαπαρρηγή PEO-NH₂ και τα συμπολυμερή PEO₂₂₈-*b*-P(Trt-His)₁₀-*b*-PBLG₂₀ και PEO₂₂₈-*b*-P(Trt-His)₅-*b*-PBLG₂₀ σε διαλύτη DMF.

Για το πολυμερές PEO-*b*-P(Trt-His)₃₀-*b*-PBLG₂₀ λήφθηκαν φάσματα SEC σε DRI και UV ανιχνευτή για να αποδείξουμε ότι οι δύο κορυφές οφείλονται σε συσσωμάτωση των μονάδων της πολυ(ιστιδίνης). Πράγματι, στον UV ανιχνευτή εμφανίζονται πάλι δύο κορυφές (266 nm), οι οποίες οφείλονται στις απορροφήσεις των αρωματικών δακτυλίων των προστατευτικών ομάδων του συμπολυμερούς και σε χρόνους έκλουσης 21.7 min. και 26.98 min., παρόμοιους δηλαδή με αυτούς από τον DRI ανιχνευτή. Παράλληλα, εκλούεται σε μικρότερους χρόνους έκλουσης σε σχέση με τα άλλα δύο συμπολυμερή, όπως και αναμενόταν. Ακόμα ένας τρόπος για να αποδειχθεί η συσσωμάτωση είναι να διαλυθεί το συμπολυμερές σε δυο διαφορετικούς διαλύτες. Αν η αναλογία των συστάδων δεν είναι η ίδια και για τους δυο διαλύτες τότε αποδεικνύεται η ύπαρξη συσσωμάτωσης. Δοκιμάστηκε να

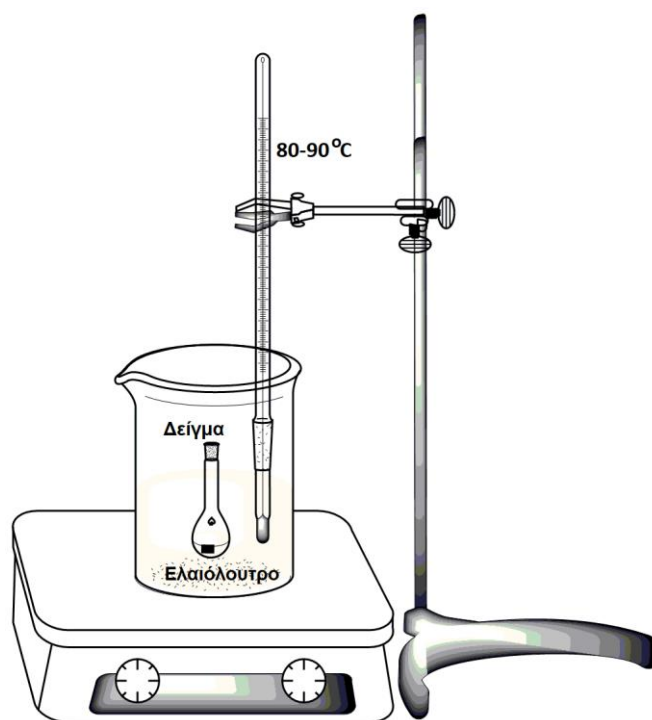
διαλυθεί σε DMSO, όμως παράμεινε αδιάλυτο και η λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε άλλο διαλύτη ήταν αδύνατη.



Σχήμα 41: Διαγράμματα SEC για το PEO₂₂₈-*b*-P(Trt-His)₃₀-*b*-PBLG₂₀ σε DRI και UV ανιχνευτή.

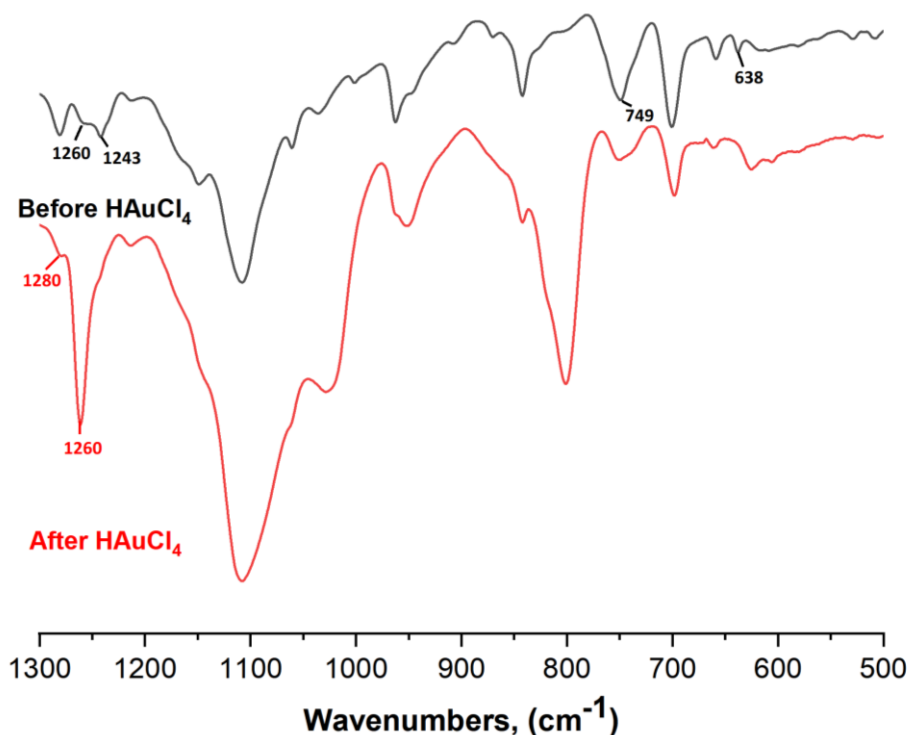
5.5 Μελέτη Νανოსωματιδίων Χρυσού

Για τη σύνθεση των νανოსωματιδίων χρυσού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Turkevics. Παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα HAuCl_4 (1mg/ml). Διαλύθηκαν 1-2 mg πολυμερούς σε milli-Q και αφέθηκαν για ανάδευση για μία μέρα σε vial. Την επόμενη, προστέθηκε στο vial η ανάλογη ποσότητα του χρυσού και το vial τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο σε σταθερή θερμοκρασία στους 80-90 °C. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα.



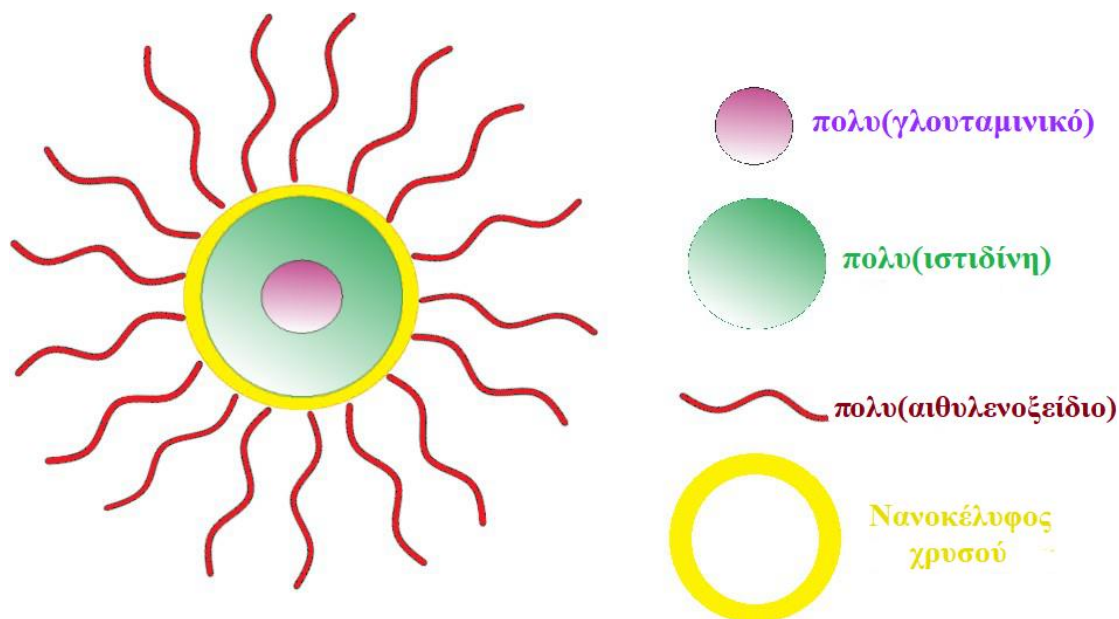
Εικόνα 30: Πειραματική διάταξη για σύνθεση νανοςωματιδίων χρυσού.

Στην παρούσα εργασία, η πολυ(ιστιδίνη) είναι υπεύθυνη για την αναγωγή του χρυσού. Λόγω της ήπιας αναγωγικής ικανότητας του ιμιδαζολικού δακτυλίου και της στερικής παρεμπόδισης της πολυμερικής φύσης της PHis, η αναγωγική αντίδραση μεταξύ Au^{3+} και PHis ήταν αργή και απαιτήθηκε αυξημένη θερμοκρασία. Η αλληλεπίδραση του χρυσού με τα άζωτα της ομάδας ιμιδαζολίου αποδείχθηκε με φασματοσκοπία IR. Μια πρώτη ένδειξη για τη σύμπλεξη του χρυσού με την ιστιδίνη είναι επίσης η αλλαγή του χρώματος του διαλύματος.



Σχήμα 42: Φάσματα IR του PEO₂₂₈-*b*-PHis₃₀-*b*-PBLG₂₀ (μαύρο) και του ίδιου πολυμερούς μετά το σχηματισμό των νανοσφαιρών χρυσού (κόκκινο).

Διαπιστώθηκε ότι μετά το σχηματισμό των νανοσφαιρών χρυσού, η δόνηση του δεσμού $-C=N-$ μετατοπίστηκε προς τα πάνω από 1243 σε 1280 cm^{-1} , ενώ οι κορυφές στα 749 και 638 cm^{-1} λόγω των δονήσεων του δεσμού $-N-H$ εξαλείφθηκαν σχεδόν εντελώς. Τα σχηματιζόμενα NPs αποτελούνται από έναν πολυπεπτιδικό πυρήνα αποτελούμενο από πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικό οξύ), καλυμμένο από ένα στρώμα PHis, το οποίο περιβάλλεται με ένα επιπλέον εξωτερικό κέλυφος PEO (υδρόφιλο). Ο Au(III) συμπλέκεται αρχικά με την PHis και στην συνέχεια ανάγεται με τη βοήθεια θέρμανσης, σχηματίζοντας AuNSs με τη μορφή “δακτυλιδιού”, όπως φαίνεται στην Εικόνα 31. Διαπιστώθηκε ότι ρυθμίζοντας τα μοριακά χαρακτηριστικά των συμπολυμερών, είναι δυνατό να ρυθμιστεί το σχετικό πάχος πυρήνα και κελύφους των NPs που σχηματίζουν τα AuNSs, μετατοπίζοντας έτσι την κορυφή απορρόφησης στο επιθυμητό μήκος κύματος μεταξύ ορατού και NIR. Οι οπτικές αυτές ιδιότητες των AuNSs μελετήθηκαν με φασματοσκοπία UV-Vis στη συνέχεια.

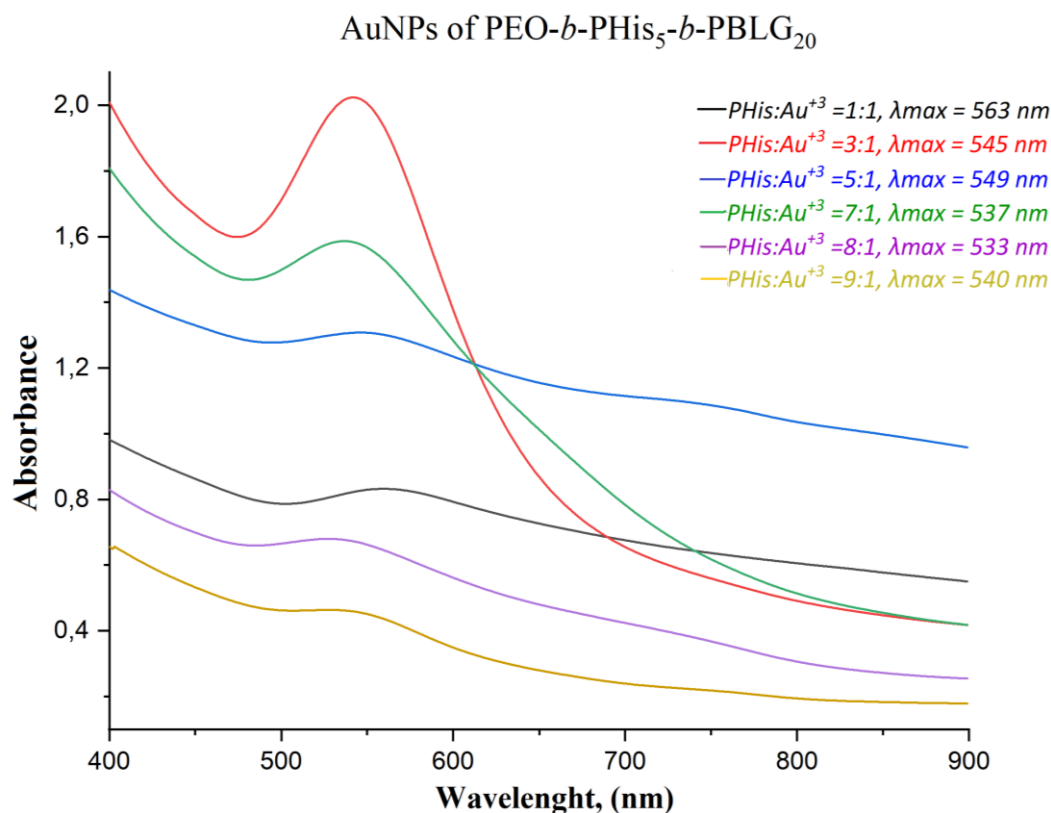


Εικόνα 31: Αναπαράσταση σχηματισμού νανοκελυφών χρυσού.

5.6 Μελέτη των Νανοσωματιδίων Χρυσού με φασματοσκοπία UV-Vis

Ο συντονισμός των AuNPs για απορρόφηση φωτός σε συγκεκριμένα μήκη κύματος παρουσιάζει ενδιαφέρον για την απεικόνιση και την θεραπεία του καρκίνου. Με βάση τις διαφορετικές αναλογίες πυρήνα/κελύφους μπορούν να συντεθούν AuNSs με απορροφήσεις που εκτείνονται από το ορατό μέχρι το NIR (800-1300 nm). Συγκεκριμένα, για απορροφήσεις στο NIR, όταν το σύστημα ακτινοβοληθεί, θερμαίνεται και είναι δυνατή η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, χωρίς να επηρεάζονται τα υγιή κύτταρα. Έχει αποδειχθεί ότι ο συντονισμός των AuNPs μπορεί να επιτευχθεί ελέγχοντας τις φυσικές τους παραμέτρους, όπως το πάχος του νανοκελύφους, ή μεταβάλλοντας το συνολικό μέγεθος των σωματιδίων ή και τα δύο. Αφού το μέγεθος του πυρήνα και για τα τρία συστήματα είναι το ίδιο και αλλάζοντας μόνο το πάχος κάθε φορά του κελύφους, αναμένεται ότι όσο λεπτότερο κέλυφος PHis να οδηγήσει στον σχηματισμό και λεπτότερων AuNSs και ως εκ τούτου, σε μια αύξηση του μεγίστου απορρόφησης. Για το σύστημα PEO-*b*-PHis₅-*b*-PBLG₂₀, παρατηρούνται κορυφές μόνο γύρω από τα 540 nm, δηλαδή σχηματισμό μόνο νανοσφαιρών και όχι νανοκελυφών. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι είναι λίγες οι μονομερικές μονάδες της ιστοιδίνης σε σχέση με τον πυρήνα, για αυτό και στη συνέχεια συντέθηκαν πολυμερή με περισσότερες μονομερικές μονάδες ιστοιδίνης. Μάλιστα, οι κορυφές

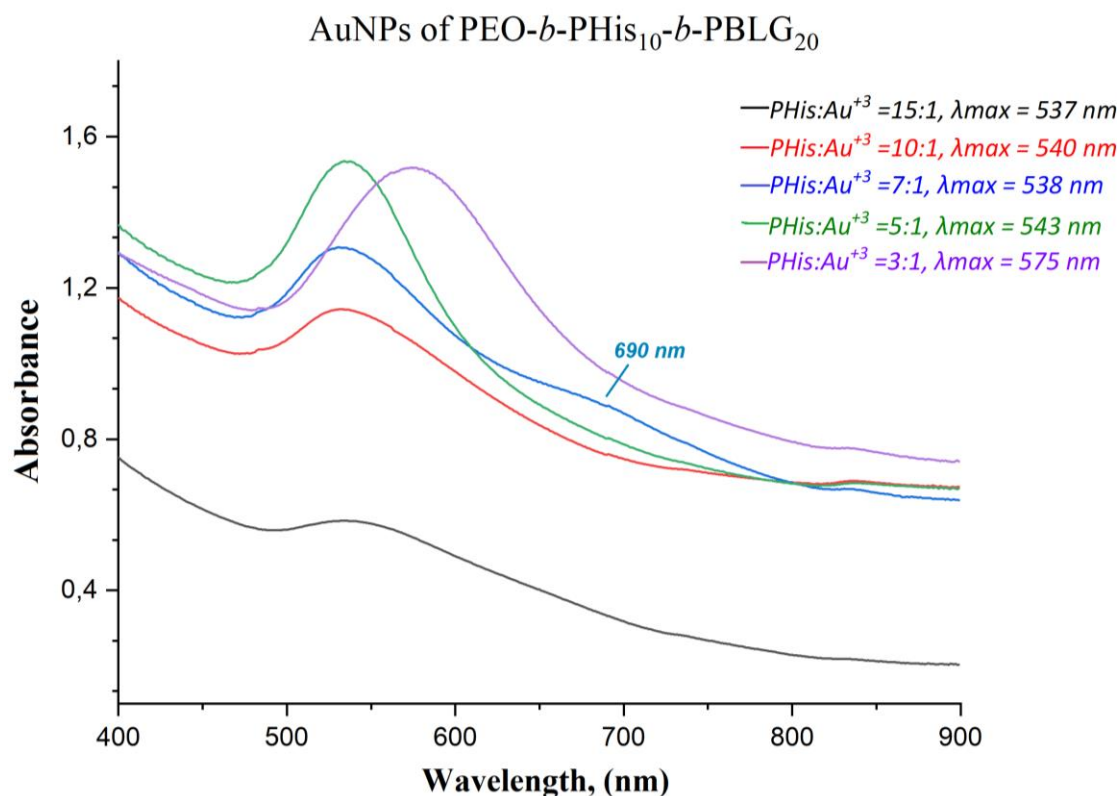
μετατοπίζονται ανάλογα και με την ποσότητα του χρυσού που προστίθεται, λόγω της πολυδιασποράς των σχηματισμένων νανοσφαιρών AuNPs.



Σχήμα 43: Φάσματα UV-Vis των νανοσωματιδίων χρυσού για το PEO₂₂₈-*b*-PHis₅-*b*-PBLG₂₀ σε διάφορες αναλογίες PHis/Au(III).

Ύστερα, αυξάνοντας τις μονομερικές μονάδες της ιστιδίνης σε 10 και ταυτόχρονα δοκιμάζοντας διαφορετικές αναλογίες PHis/Au(III), παρατηρούμε μια ένδειξη σχηματισμού νανοκελυφών χρυσού, καθώς εμφανίζεται μια δεύτερη κορυφή κοντά στα 700 nm για την αναλογία 7:1 (Σχήμα 44). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αυξήθηκαν οι μονομερικές μονάδες της ιστιδίνης, άρα και η πιθανότητα του H₂AuCl₄ να συμπλεχθεί και να γίνει η αναγωγή του από το άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(ιστιδίνης). Αντίθετα, για το PEO-*b*-PHis₅-*b*-PBLG₂₀, πιθανώς ο χρυσός μπορεί να συμπλεχθεί με τις αμίνες που υπάρχουν στον πυρήνα (PBLG) και λιγότερο με την PHis, γι' αυτό προκύπτουν νανοσφαίρες χρυσού, χωρίς να αποκλείεται να υπάρχουν και σχηματισμένα νανοκελύφη τα οποία βρίσκονται όμως σε πολύ μικρούς πληθυσμούς. Για το ίδιο σύστημα, δοκιμάστηκε η ρύθμιση του pH~4 πριν την προσθήκη του H₂AuCl₄, ώστε να πρωτονιωθεί η ιστιδίνη και να γίνει πιο

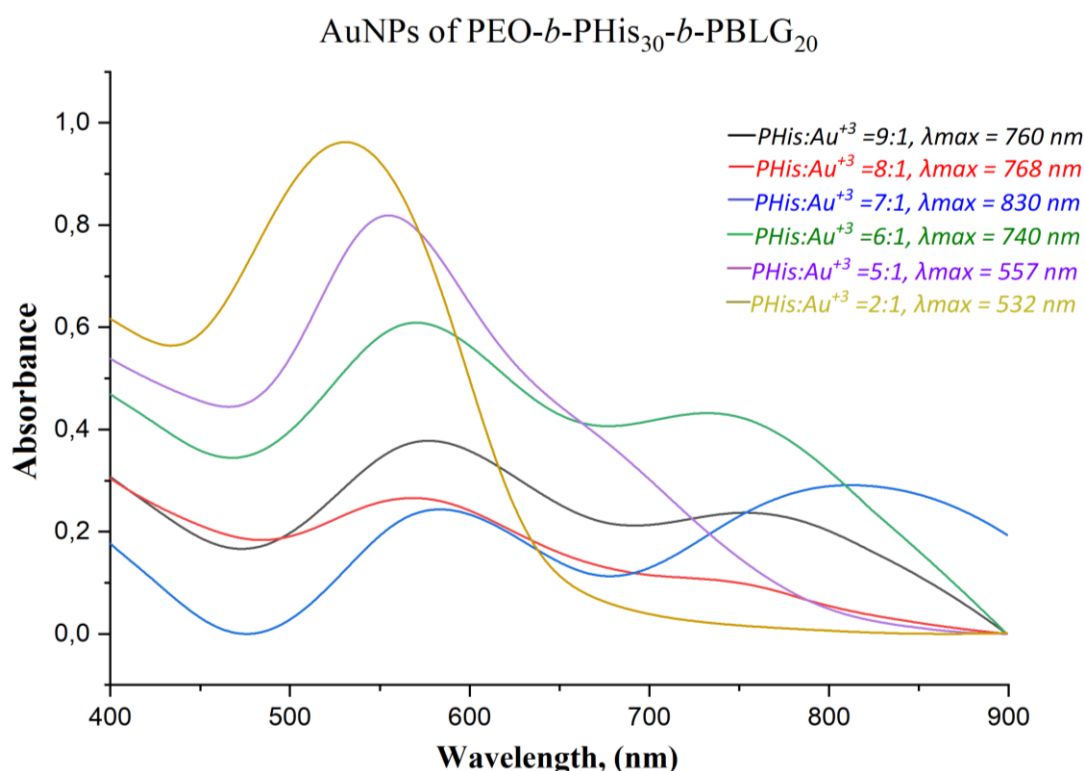
υδρόφιλη και έτσι να γίνει και πιο εύκολη η σύμπλεξη και η αναγωγή του χρυσού σε αυτήν. Τα αποτελέσματα, ωστόσο, ήταν ίδια με τα προηγούμενα.



Σχήμα 44: Φάσματα UV-Vis των νανοσωματιδίων χρυσού για το PEO₂₂₈-*b*-PHis₁₀-*b*-PBLG₂₀ σε διάφορες αναλογίες PHis/Au(III).

Τέλος, για το συμπολυμερές PEO-*b*-PHis₃₀-*b*-PBLG₂₀ εντοπίζεται πιο ξεκάθαρα ο σχηματισμός νανοκελυφών χρυσού (εμφάνιση κορυφών κοντά στο NIR), χωρίς ωστόσο να απουσιάζουν τα AuNPs που απορροφούν κοντά στην περιοχή των 540 nm. Μάλιστα, η αύξηση της ποσότητας Au(III), και συνεπώς η μείωση της γραμμομοριακής αναλογίας PHis/Au, οδηγεί σε αύξηση του μήκους κύματος του μέγιστου της απορρόφησης έως τη γραμμομοριακή αναλογία 7:1, μετά την οποία μειώνεται εκ νέου. Αυξάνοντας ακόμη περισσότερο την ποσότητα Au(III), ο Au(III) αρχίζει να διαπερνά τον πυρήνα λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας, σε συνδυασμό με την συμπλοκοποίησή του με τις τελικές αμίνες των πολυμερικών αλυσίδων που υπάρχουν μέσα στον πυρήνα. Επομένως, αντί για νανοκελύφη, τα NPs αρχίζουν να συμπεριφέρονται ως νανοσφαίρες. Αυτό οδηγεί σε μείωση του μέγιστου μήκους κύματος και ταυτόχρονα σε αύξηση της έντασης της κορυφής σε χαμηλά μήκη κύματος (500-600 nm), εκεί δηλαδή που

απορροφούν οι νανοσφαίρες χρυσού. Ένας ακόμη λόγος που εντοπίζεται αυτό το μέγιστο, βρίσκεται στα φαινόμενα πυρήνωσης (nucleation) και ανάπτυξης (growth) των νανοσωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα, όταν προστίθεται εξ' αρχής ο HAuCl_4 , το λ_{max} φτάνει σε ένα μέγιστο (7:1 αναλογία) όπου η ποσότητα του χρυσού είναι μεγάλη και δεν καταφέρνει να αντιδράσει με τα ήδη σχηματισθέντα $\text{Au}(0)$ (growth), προτιμάει δηλαδή να συμπλεχθεί με διαφορετικές αλυσίδες ιστιδίνης. Συμπερασματικά, το σύστημα καταλήγει σε ένα μέγιστο και έπειτα μειώνονται το μήκος κύματος και η ένταση της κορυφής, αφού ο χρυσός καταβυθίζεται ως συσσωμάτωμα.



Σχήμα 45: Φάσματα UV-Vis των νανοσωματιδίων χρυσού για το PEO₂₂₈-*b*-PHis₃₀-*b*-PBLG₂₀ σε διάφορες αναλογίες PHis/Au(III).

5.7 Μελέτη Νανοσωματιδίων Χρυσού με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Για να μελετηθεί η αυτο-οργάνωση των συμπολυμερών αλλά και για να γίνει σύγκριση της δομής και του μεγέθους των νανοσωματιδίων πριν και μετά την προσθήκη του χρυσού, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός. Η μελέτη αυτή έγινε σε ουδέτερο pH και στους 25 °C πριν την προσθήκη και 80 °C μετά την προσθήκη του χρυσού, αντίστοιχα. Το

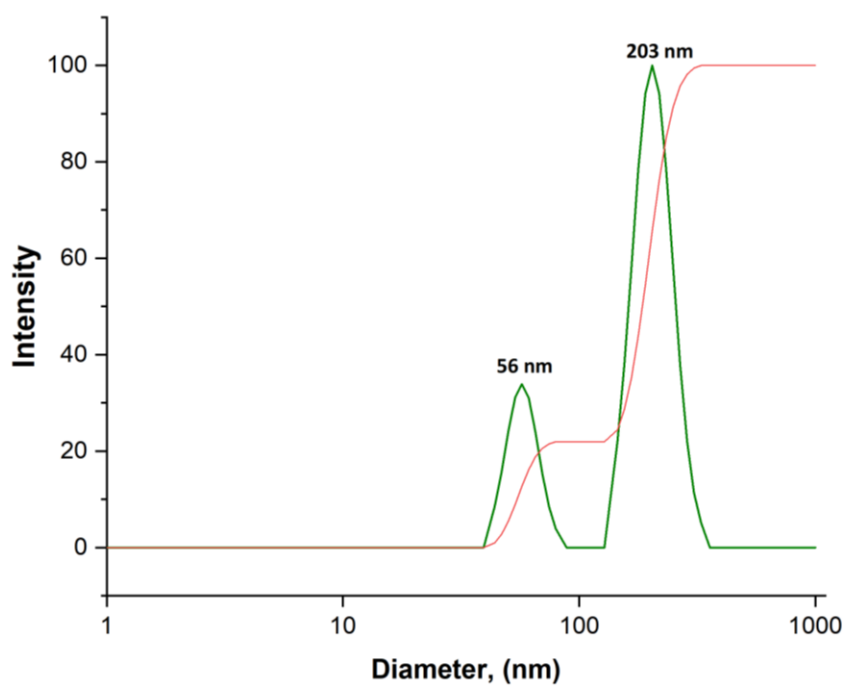
πολυμερές διαλύεται αρχικά σε DMSO (καλός διαλύτης), ώστε να «σπάσουν» τα συσσωματώματα και αφήνεται για μία μέρα υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης και πραγματοποιείται η διαδικασία του Dialysis σε milli-Q (κακός διαλύτης). Αυτή η πορεία ακολουθείται, ώστε να αυτο-οργανωθεί όσο το δυνατόν καλύτερα το συμπολυμερές στις επιθυμητές μικυλλιακές δομές. Τέλος, γίνεται η προσθήκη της κατάλληλης κάθε φοράς ποσότητας του H₂AuCl₄. Η τελική συγκέντρωση του δείγματος είναι 0.2 mg/ml και πριν τη μέτρηση φιλτράρεται με υδρόφιλο φίλτρο πορώδους 0.45 μm, για να ελαχιστοποιηθεί το ποσοστό της σκόνης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS στο συμπολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₃₀-*b*-PBLG₂₀ πριν και μετά την προσθήκη χρυσού.

PEO₂₂₈-<i>b</i>-PHis₃₀-<i>b</i>-PBLG₂₀ (Au NPs)					
Δείγμα	Αναλογία PHis/Au (III)	Υδροδυναμική διάμετρος (nm)		Πολυδιασπορά	Kcps (ποσοστό καταμέτρησης)
Χωρίς H ₂ AuCl ₄	–	203	56	0.270	420
Με H ₂ AuCl ₄	9/1	77	7	0.259	533
	8/1	88	9.5	0.255	441
	7/1	86.5	9	0.232	411
	5/1	81	7	0.265	412
	2/1	79	9.5	0.211	390

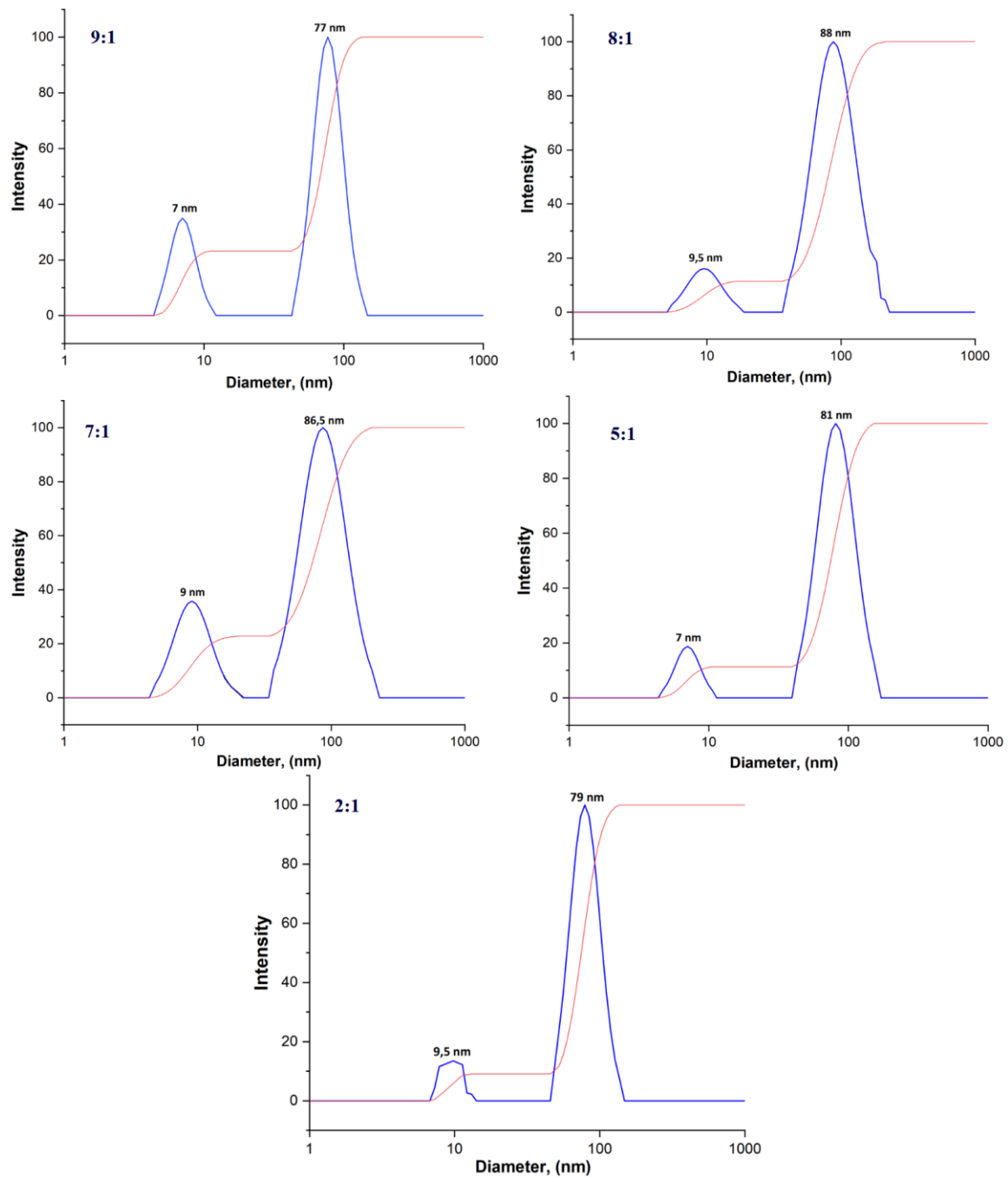
Για το πολυμερές, πριν την προσθήκη του H₂AuCl₄, παρατηρείται η ύπαρξη δύο πληθυσμών, ενός μικρού πληθυσμού με διάμετρο 56 nm και ενός μεγαλύτερου με διάμετρο 203 nm. Η εμφάνιση δύο πληθυσμών είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την αυτο-οργάνωση του νανοσωματιδίου. Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός με διάμετρο 56 nm

οφείλεται σε ελεύθερα μικύλλια, ενώ αυτός με διάμετρο 203 nm ενδεχομένως να αφορά συσσωματώματα μικυλλίων. Αυτό μπορεί να διαπιστωθεί και από το διάγραμμα αριθμών (number), όπου ο αριθμός των συσσωματωμάτων δεν εμφανίζεται καθόλου στο διάγραμμα.



Σχήμα 46: Μελέτη αυτο-οργάνωσης με Δυναμική Σκέδαση Φωτός του PEO-*b*-PHis₃₀-*b*-PBLG₂₀ πριν την προσθήκη H₂AuCl₄, στους 25 °C.

Για τα NPs, μετά την προσθήκη του H₂AuCl₄, παρατηρείται εκ νέου η εμφάνιση δύο πληθυσμών για τις διάφορες αναλογίες PHis/Au. Μάλιστα, η διάμετρος και των δύο πληθυσμών είναι εμφανώς μικρότερη από τα νανοσωματίδια του αρχικού πολυμερούς. Επίσης φαίνεται και μια μικρή μείωση στην πολυδιασπορά των NPs. Η πρωτονίωση της PHis και η θέρμανση στους 80 °C οδήγησε σε διάσπαση των συσσωματωμάτων και έτσι προέκυψαν μικρότερα AuNPs. Η αύξηση της ποσότητας του χρυσού, άρα η μείωση του λόγου PHis/Au, φαίνεται να οδηγεί στην τάση να σχηματιστούν ακόμα μικρότερα νανοσωματίδια. Γενικότερα, ο σχηματισμός νανοσωματιδίων χρυσού μέσα στα πολυμερικά NPs οδηγεί σε πιο συμπαγείς και υδρόφοβες δομές. Στο παρακάτω Σχήμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από μετρήσεις DLS για κάθε αναλογία PHis/Au(III).

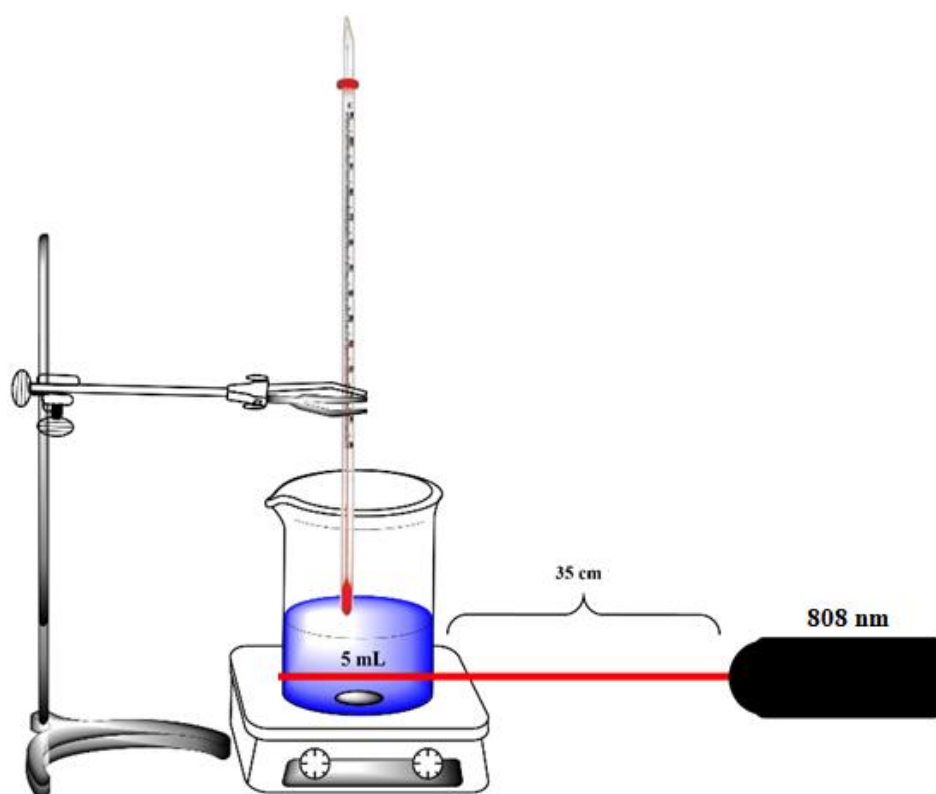


Σχήμα 47: Διαγράμματα DLS έντασης συναρτήσει της διαμέτρου των PEO-*b*-PHis₃₀-*b*-PBLG₂₀ AuNPs για τις διάφορες αναλογίες PHis/Au(II).

5.8 Αποδοτικότητα φωτοθερμικής μετατροπής των AuNPs

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι το φως που απορροφάται από ένα φωτοενεργό νανοϋλικό εκπέμπεται με τη μορφή θερμότητας. Δεδομένου ότι η αναλογία πυρήνα/κελύφους επηρεάζει τη θέση της απορρόφησης της ζώνης πλάσμονίου, η σύνθεση των AuNPs μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα για να φθάσει στο επιθυμητό μήκος κύματος, κατά προτίμηση στο NIR. Στην

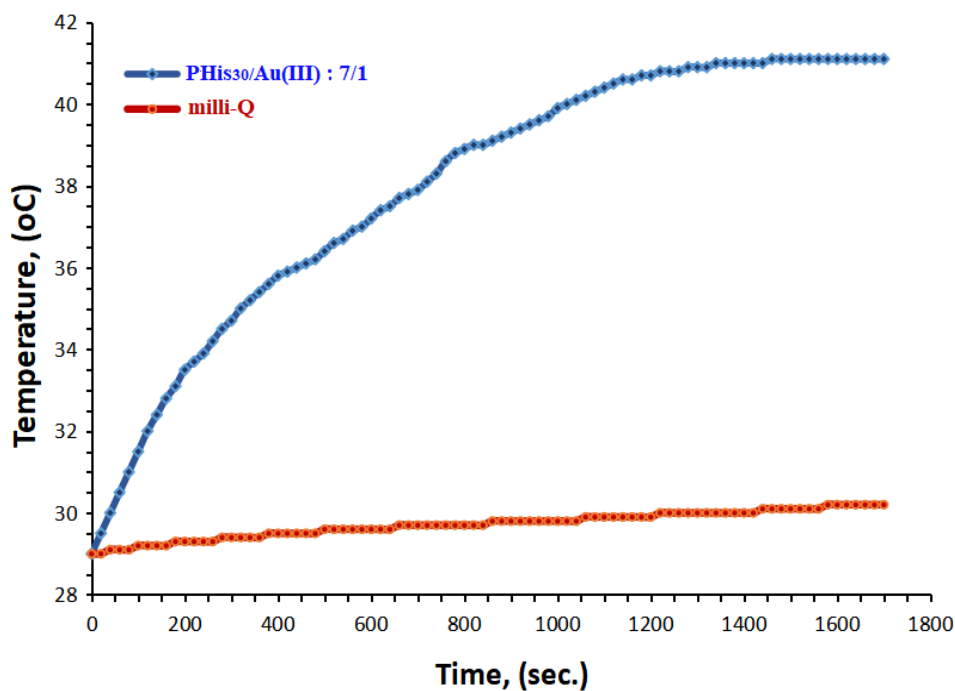
παρούσα εργασία για να διερευνηθεί η ικανότητα των AuNPs να χρησιμοποιηθούν για εφαρμογές φωτοθερμικής θεραπείας, εξετάστηκε η απόδοση της φωτοθερμικής μετατροπής ενός από τα συνθετικά NPs. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε AuNPs που παρασκευάστηκε από το PEO₂₂₈-*b*-PHis₃₀-*b*-PBLG₂₀ σε αναλογία PHis/Au(III) : 7/1. Η πειραματική διάταξη που σχεδιάστηκε απεικονίζεται στην Εικόνα 32.



Εικόνα 32: Πειραματική διάταξη για τη μελέτη απόδοσης της φωτοθερμικής μετατροπής των AuNPs.

Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση 830 nm, κοντά στο μήκος κύματος του λέιζερ (808 nm). Για να αποδειχθεί άμεσα η φωτοθερμική συμπεριφορά των AuNPs, αξιολογήθηκαν οι θερμικές ιδιότητες υπό συνεχή ακτινοβολία λέιζερ χρησιμοποιώντας milli-Q ως δείγμα ελέγχου. Μετά από 20 λεπτά περίπου ακτινοβολήσης με λέιζερ, η θερμοκρασία του διαλύματος των AuNPs αυξήθηκε κατά 13 °C και ύστερα σταθεροποιήθηκε στους 41 °C, ενώ του νερού αυξήθηκε μέχρι 2 °C. Αυτή είναι μια σημαντική αύξηση, λαμβάνοντας υπόψη ότι η δέσμη θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με έναν μικρό όγκο του διαλύματος. Αποδεικνύεται έτσι ότι τα AuNPs μπορούν να απορροφούν την ακτινοβολία και να την μετατρέπουν επιτυχώς σε

θερμότητα, λόγω του φαινομένου LSPR. Πρέπει να σημειωθεί ότι η απορρόφηση είναι ανάλογη και της συγκέντρωσης κάθε φορά του διαλύματος. Μάλιστα, όσο πιο πυκνό είναι το διάλυμα, τόσο περισσότερο αυξάνεται η θερμοκρασία του συστήματος, υποδεικνύοντας έτσι ότι η φωτοθερμική συμπεριφορά εξαρτάται και από την συγκέντρωση.



Σχήμα 48: Μεταβολή της θερμοκρασίας των AuNPs αναλογίας PHis₃₀/Au(III) : 7/1 και του milli-Q μετά από ακτινοβόληση από πηγή μονάδας λέιζερ (808nm) για 25 min.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος στη συγκεκριμένη εργασία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ήταν η σύνθεση συμπολυμερών του τύπου PEO₂₂₈-*b*-PHis_{*n*}-*b*-PBGL₂₀, (*n*= 5, 10 και 30) και η παρασκευή νανοσωματιδίων χρυσού βασισμένα σε αυτά. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων, συνοψίζονται τα εξής συμπεράσματα:

Αρχικά, διαπιστώθηκε η επιτυχής σύνθεση του μακροαπαρχητή PEO-NH₂ και παράλληλα η παρασκευή των προστατευμένων μονομερών N^(im)-Trt-L-His NCA και BLG NCA. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των μονομερών και η αποπροστασία τους, με σκοπό τη λήψη καλά καθορισμένων, τρίτυλο-αποπροστατευμένων υβριδικών πολυμερών PEO₂₂₈-*b*-PHis_{*n*}-*b*-PBLG₂₀ (*n*= 5, 10, 30). Η επιτυχής σύνθεση των μονομερών, αλλά και των πολυμερών επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές IR, ¹H-NMR και SEC.

Ακόμα, παρουσιάστηκε μια εύκολη στρατηγική σύνθεσης υβριδικών νανοσωματιδίων που περιέχουν AuNSs που απορροφούν κοντά στο εγγύς υπέρυθρο (NIR). Πρώτο στάδιο του σχηματισμού των NPs ήταν η αυτο-οργάνωση των υβριδικών συμπολυμερών σε υδατικό διάλυμα. Η προσθήκη HAuCl₄ που ακολουθήθηκε από θέρμανση, είχε ως αποτέλεσμα την αναγωγή του Au(III) από την PHis, οδηγώντας στο σχηματισμό AuNSs μόνο στο στρώμα της PHis, σχηματίζοντας έτσι ένα νανοκέλυφος μέσα στα προσχηματισμένα NPs. Με αυτόν τον τρόπο, αποδεικνύεται η ικανότητα της πολυ(ιστιδίνης) να ανάγει τον υποχλωριώδη χρυσό. Τα NPs που σχηματίστηκαν αποτελούνταν από ένα κέλυφος PEO, ένα στρώμα PHis που περιέχει το νανοκέλυφος χρυσού και έναν πυρήνα PBLG. Ελέγχοντας το πάχος του AuNS και τη διάμετρο του πυρήνα από τα μοριακά χαρακτηριστικά των πολυμερικών πρόδρομων ουσιών, καθώς και την αναλογία PHis/Au(III), οι οπτικές ιδιότητες των AuNS ρυθμίστηκαν με ακρίβεια ώστε να απορροφούν σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Έτσι, επιτεύχθηκε μια μετατόπιση της κορυφής απορρόφησης που αντιστοιχεί στο συντονισμό του διαμήκους επιφανειακού πλάσμονιου (500-600 nm) σε μήκη κύματος NIR. Οι οπτικές

ιδιότητες των AuNS μελετήθηκαν με φασματοσκοπία UV-Vis, ενώ το μέγεθος και η μορφολογία των νανοσωματιδίων πριν και μετά την προσθήκη του HAuCl_4 μελετήθηκαν με DLS. Τέλος, μελέτη σε διάλυμα πολυμερικών νανοσωματιδίων που περιέχουν AuNSs έδειξε ότι η ακτινοβολία με λέιζερ ισχύος στα 808 nm οδηγεί σε σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας του. Συνεπώς, παρουσιάστηκε μια ορθή προσέγγιση για το σχεδιασμό και τη σύνθεση βιοσυμβατών πολυμερικών νανοσωματιδίων, που διαθέτουν AuNSs με κορυφαία οπτική απορρόφηση στο NIR, η οποία μπορεί να ρυθμιστεί με ακρίβεια, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ανίχνευση καρκινικών ιστών όσο και για φωτοθερμική θεραπεία.

Στο μέλλον, θα μπορούσαν τα παραπάνω συστήματα να χρησιμοποιηθούν για τον εγκλωβισμό και τη στοχευμένη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων, καθώς επίσης και να προσδεθούν ομάδες πάνω σε αυτά που θα ενισχύουν την αποκρισιμότητά τους έναντι των καρκινικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα η εισαγωγή φολικού οξέος στα άκρα των αλυσίδων του PEO. Ταυτόχρονα, θα ήταν σημαντική η μελέτη των AuNSs με τεχνικές μικροσκοπίας, ώστε να εξακριβωθεί η δομή τους, ενώ τα συνθετιμένα νανοσωματίδια του χρυσού μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες, προκειμένου να αποφανθεί η αποτελεσματικότητά τους.



Εικόνα 33: Μεταβολή των οπτικών ιδιοτήτων των διαλυμάτων των νανοσωματιδίων χρυσού σε διάφορες αναλογίες mol His/mol Au(III).

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

BOC	Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα
DCC	<i>N,N'</i> -δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο
DIC	<i>N,N'</i> -δισοπυροπυλοκαρβοδιϊμίδιο
ROP	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
NCA	N-καρβόξυ ανυδρίτης
I	Κατανομή μοριακών βαρών
RROP	Ριζικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
AROP	Ανιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
ROMP	Πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου
HVT	Τεχνικές υψηλού κενού
NAM	Κανονικός μηχανισμός αμινών
AMM	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
SOCl ₂	Θειονυλοχλωρίδιο
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη
PBr ₃	Τριβρωμίδιο του φωσφόρου
VPTT	Θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου
AuNPs	Νανოსωματίδια Χρυσού
AuNSs	Νανοκελύφη Χρυσού

GSH	Γλουταθειόνη
IR	Υπέρυθρη ακτινοβολία
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
NOE	Nuclear Overhauser Effect
UV-Vis	Υπεριώδες-ορατό
DLS	Δυναμική σκέδαση φωτός
SEC	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
EPR	Ενισχυμένη διαπερατότητα και συγκράτηση
LSPR	Εντοπισμένος επιφανειακός συντονισμός πλάσμονίου
PEO	Πολυ(αιθυλενοξειδίο)
PEO- <i>b</i> -Phis	Πολυ(αιθυλενοξειδίο)- <i>b</i> -πολυ(ιστιδίνη)
FDA	Αμερικανική υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων
N ^(im) -Trt-His NCA	N ^(im) -Trityl-Histidine N-carboxy anhydride
BOC-His(Trt)-OH	BOC-N ^(im) -trityl-L-histidine
H-Glu-(OBzl)-OH	L-Glutamic acid γ -benzyl ester
BLG NCA	γ -benzyl-L-glutamate N-carboxy anhydride
Phis	Πολυ(ιστιδίνη)
PBLG	Πολυ(βενζυλο-L-γλουταμικό οξύ)
CaH ₂	Υδρίδιο του ασβεστίου
n-BuLi	Κανονικό βουτυλολίθιο
H ₂ SO ₄	Θειικό οξύ

P ₂ O ₅	Πεντοξειδίο του φωσφόρου
DMA	Διμεθυλαμίνη
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
THF	Τετραϋδροφουράνιο
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
MgSO ₄	Θειικό μαγνήσιο
TsCl	π-τολουολοσουλφονυλο χλωριδίου
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DMSO	Διμέθυλο σουλφοξειδίο
(iPr) ₃ SiH	Τρισοπρωτυλοσιλάνιο
MWCO	Όριο αποκλεισμού μοριακών βαρών
K ₂ CO ₃	Ανθρακικό κάλιο
NaOH	Καυστικό νάτριο
HCl	Υδροχλωρικό οξύ
PEO- <i>b</i> -PHis- <i>b</i> -PBLG	Πολυ(αιθυλενοξειδίο)- <i>b</i> -πολυ(ιστιδίνη)- <i>b</i> -πολυ(βενζυλο-L-γλουταμικό οξύ)
HAuCl ₄	Υποχλωριώδης χρυσός

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. C. I. Branden, *Introduction to Protein Structure*, 2nd Edition, Volume I, U.Kingdom **1999**.
2. Ε. Γκίκας, *Αμφίφιλα Πολυπεπτίδια: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Μελέτη Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα **2012**.
3. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, J. Roberts and J. Watson, *Molecular Biology of The Cell*, 2η Έκδοση, Volume II, New York **1989**.
4. D. J. Barlow, J. M. Thornton, Helix geometry in proteins, *J Mol Biol.* **1988**, 201, pp. 601-619.
5. E. T. Harper, G. D. Rose, Helix stop signals in proteins and peptides: the capping box, *Biochemistry* **1993**, 32, pp. 7605-7609.
6. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, Synthesis of well-defined polypeptide-based materials via the ring-opening polymerization of alpha-amino acid N-carboxyanhydrides, *Chem Rev.* **2009**, 109, pp. 5528-5578.
7. M. I. Monastyrsky, *Topology in Molecular Biology*, 1^η Έκδοση, Volume I, New York **2006**.
8. Π. Κατινάκης, *Βιοχημεία*, 2^η Έκδοση, Τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Αθήνας **2004**, pp. 69-78.
9. G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. A. Smith, Turns in peptides and proteins, *Adv Protein Chem.* **1985**, 37, pp. 1-109.
10. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W.H. Freeman and Co, 2nd Edition , Volume II, New York **2002**.
11. M. Bodansky, A. Bodansky, *The practice of peptide synthesis*, 2nd Edition, Springer-Verlag: New York **1993**.
12. R. Merrifield, Automated Synthesis of Peptides, *Science* **1965**, 150, pp. 178-185.

13. R. Merrifield and J. Stewart, Automated Peptide Synthesis, *Nature* **1966**, 207, pp. 522-523.
14. P. Dawson, T. Muir, I. H. Clark-Lewis and S. Kent, Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, *Science* **1994**, 266, pp. 776-779.
15. M. Goodman, J. Hutchison, The mechanisms of polymerization of N-unsubstituted N-carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, pp. 3627-3630.
16. T. J. Deming, Synthesis and self-assembly of well-defined block copolypeptides via controlled NCA polymerization, *Adv. Polym. Sci.* **2013**, 262, pp. 1-38.
17. T. J. Deming, *Peptide-Based Materials*, 1st Edition, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg **2012**.
18. O. Nuyken, S. D. Pask, Ring-opening polymerization—An introductory review, *Polymers* **2013**, 5, pp. 361-403.
19. P. Dubois, O. Coulembier, J.-M. Raquez, *Handbook of Ring-Opening Polymerization*, 1st Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim **2009**.
20. A. L. Levy, Anhydro-N-Carboxy-dl-beta-Phenylalanine, *Nature* **1950**, 165, pp. 152-153.
21. D. Thinning, J. Semen and H. G. Elias, Carbon dioxide influence on NCA polymerizations, *Macromol. Chem.* **1977**, 178, pp. 603-607.
22. D. G. Ballard, C. H. Bamford and F. J. Weymouth, New Observations on the Chemistry of N-Carboxy-Alpha-Amino-Acid Anhydrides, *Nature* **1954**, 174, pp. 173-175.
23. D. G. Ballard, C. H. Bamford and A. Elliot, Synthetic Polypeptides, *Macromol. Chem.* **1960**, 35, pp. 222-238.
24. K. D. Kopple, The Reaction of Amines with Amino Acid N-Carboxy Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, pp. 662-664.
25. T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, Living polypeptides, *Biomacromolecules* **2004**, 5, pp. 1653-1656.

26. H. Lu, J. Wang, Z. Song, L. Yin, Y. Zhang, H. Tang, C. Tu, Y. Lin, J. Cheng, Recent advances in amino acid N-carboxyanhydrides and synthetic polypeptides: chemistry, self-assembly and biological applications, *Chem. Commun.* **2013**, pp. 1-17.
27. D. L. Pickel, N. Politakos, A. Avgeropoulos, J. M. Messman, A Mechanistic Study of α -(Amino acid)-N-carboxyanhydride Polymerization: Comparing Initiation and Termination Events in High-Vacuum and Traditional Polymerization Techniques, *Macromolecules* **2009**, 42, pp. 7781–7788.
28. H. R. Kricheldorf, *α -Aminoacid N-carboxyanhydrides and Related Heterocycles*, 1st Edition, Springer-Verlag: New York **1987**.
29. H. R. Kricheldorf, Polypeptides and 100 years of chemistry of α -amino acid N-carboxyanhydrides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, pp.5752-5784.
30. H. Leuchs, Ueber die Glycin-Carbonsäure, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, 39, pp. 857-861.
31. H. Leuchs, W. Geiger, Über die Anhydride von α -Amino-N-Carbonsäuren und die von α -Aminosäuren, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, 41, pp. 1721-1726.
32. B. Ishai, D. Katchalski, Synthesis of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides from N-Carboxy- α -amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, pp. 3688-3689.
33. A. L. Levy, Anhydro-N-carboxy-DL- β -phenylalanine, *Nature* **1950**, 165, pp. 152-153.
34. D. Coleman, A. C. Farthing, Synthetic polypeptides, Part I. Synthesis of oxazolid-2,5-diones and a new reaction of glycine, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, pp. 3218-3222.
35. L. Cotarca, Conversion of bis (trichloromethyl) carbonate to phosgene and reactivity of triphosgene, diphosgene, and phosgene with methanol, *Synthesis* **1996**, pp. 553-560.

36. G. J. M. Habraken, M. Peeters, C. H. J. T. Dietz, C. E. Koning, A. Heise, How controlled and versatile is N-carboxy anhydride (NCA) polymerization at 0 °C? Effect of temperature on homo-, block- and graft (co)polymerization, *Polym. Chem.* **2010**, 1, pp. 514-524
37. L. Cotarca, H. Eckert, Phosgenations – A Handbook, *Wiley* **2003**, pp. 125-128.
38. J. Shi, A. R. Votruba, O. C. Farokhzad, R. Langer, Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications, *Nanolett.* **2010**, 10, pp. 3223-3230.
39. S. K. Sahoo, V. Labhasetwar, Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discovery Today* **2003**, 8, pp. 1112-1120.
40. O. C. Farokhzad, R. Langer, Impact of nanotechnology on drug delivery, *ACS Nano.* **2009**, 3, pp. 16-20.
41. M. M. Amiji, *Nanotechnology for Cancer Therapy*, 1st Edition, Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton **2007**.
42. J.L. Arias, *Nanotechnology and Drug Delivery, Nanoplatfroms in Drug Delivery*, 1st Edition, Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton **2015**.
43. E. P. Holowka, S. K. Bhatia, *Drug Delivery: Materials Design and Clinical Perspective*, 1st Edition, Springer: New York **2014**.
44. C. Demetzos, N. Pippa, Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): a mini-review, *Drug Deliv.* **2014**, 21, pp. 250-257.
45. D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, pp. 751-760.
46. Μ. Πισικάλης, Μ. Χατζηχρησιτίδη, *Ειδικά Θέματα Επιστήμης Πολυμερών*, ΕΚΠΑ, Αθήνα **2010**.
47. R. Duncan, The drawing era of polymer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, pp. 347-360.

48. D. Douroumis, A. Fahr, *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*, 1st Edition, John Wiley & Sons, Ltd: United Kingdom **2013**.
49. X. Chen, S. Wong, *Cancer Theranostics*, 1st Edition, Elsevier Academic Press: San Diego **2014**.
50. U. Kedar, P. Phutane, S. Shidhaye, V. Kadam, Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting, *Nanomedicine* **2010**, 6, pp. 714-729.
51. Σ. Βάρλας, *Εγκλωβισμός Φαρμάκων σε Πολυπεπτίδια*. Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα **2014**.
52. C. Deng, J. Wu, R. Cheng, F. Meng, H.-A. Klok, Z. Zhong, Functional polypeptide and hybrid materials: Precision synthesis via α -amino acid N-carboxyanhydride polymerization and emerging biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, 39, pp. 330-364.
53. S. Salmaso, P. Caliceti, Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers, *J. Drug Deliv.* **2013**, pp. 19.
54. J. Huang, A. Heise, Stimuli responsive synthetic polypeptides derived from N-carboxyanhydride (NCA) polymerization, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, pp. 7373-7390.
55. Y. Shen, X. Fu, W. Fu, Z. Li, Biodegradable stimuli-responsive polypeptidematerials prepared by ring opening polymerization, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, pp. 612-622.
56. P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review, *Cancer Res.* **1989**, 49, pp. 6449-6465.
57. D. Mavrogiorgis, P. Bilalis, A. Karatzas, D. Skoulas, G. Fotinogiannopoulou, H. Iatrou, Controlled polymerization of histidine and synthesis of well-defined stimuli responsive polymers. Elucidation of the structure–aggregation relationship of this highly multifunctional material, *Polym. Chem.* **2014**, 5, pp. 6256-6278.

58. Y. Li, D. Maciel, J. Rodrigues, X. Shi, H. Tomás, Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery, *Chem. Rev.* **2015**, 115, pp. 8564-8608.
59. Y. Jeong, M. K. Joo, K. H. Bahk, Y. Y. Choi, H. T. Kim, W. K. Kim, H. J. Lee, Y. S. Sohn, B. Jeong, Enzymatically degradable temperature-sensitive polypeptide as a new in situ gelling biomaterial, *J. Control. Release* **2009**, 137, pp. 25-30.
60. J. Huang, C. L. Hastings, G. P. Duffy, H. M. Kelly, J. Raeburn, A. Heise, Supramolecular hydrogels with reverse thermal gelation properties from (oligo)tyrosine containing block copolymers, *Biomacromolecules* **2013**, 14, pp. 200-206.
61. R. K. O'Reilly, C. J. Hawker, K. L. Wooley, Cross-linked block copolymer micelles: functional nanostructures of great potential and versatility, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, pp. 1068-1083.
62. B. Gyarmati, Á. Némethy, A. Szilágyi, Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications, *Eur. Polym. J.* **2013**, 49, pp. 1268-1286.
63. R. L. McCarley, Redox-responsive delivery systems, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, 5, pp. 391-411.
64. P. Bilalis, S. Varlas, A. Kiafa, A. Velentzas, D. Stravopodis, H. Iatrou, Preparation of hybrid triple-stimuli responsive nanogels based on poly(L-histidine), *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2016**, 54, pp. 1278-1288.
65. R. Cheng, F. Feng, F. Meng, C. Deng, J. Feijen, Z. Zhong, Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery, *J. Control. Release* **2011**, 152, pp. 2-12.
66. X. Chang, L. Liu, Y. Guan, C.-M. Dong, Disulfide-centered star-shaped polypeptide-PEO block copolymers for reduction-triggered drug release, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2014**, 52, pp. 2000-2010.

67. H. Zhu, C. Dong, H. Dong, T. Ren, X. Wen, J. Su, Y. Li, Cleavable PEGylation and hydrophobic histidylation of polylysine, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, pp. 10393-10407.
68. J. M. Harris, *Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly(Ethylene Glycol), Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, 1st Edition, Volume I, New York **1992**.
69. M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, Chemistry for peptide and protein PEGylation, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, pp. 116-127.
70. Y. Kim, Y. Nagasaki, K. Kataoka, M. Kato, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, Nanotechnology in Drug Delivery, *Polym. Bull* **1994**, 60, pp. 33.
71. H. Iatrou, K. Dimas, M. Gkikas, C. Tsimblouli, S. Sofianopoulou, Polymersomes from Polypeptide Containing Triblock Co-and Terpolymers for Drug Delivery against Pancreatic Cancer: Asymmetry of the External Hydrophilic Blocks, *Macromolecular Bioscience* **2014**, 14, pp. 1222-1238.
72. Y. Ding, Z. Jiang, K. Saha, C. S. Kim, S. T. Kim, R. Landis, Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery, *Molecular Therapy* **2014**, 22, pp. 6.
73. S. Dutta, S. Ray, K. Nagarajan, Glutamic acid as anticancer agent: An overview, *Saudi Pharmaceutical Journal* **2013**, 21, pp. 337-343.
74. S. B. Park, M. H. Sung, H. Uyama, D. K. Han, Poly(glutamic acid): Production, composites, and medical applications of the next-generation biopolymer, *Progress in Polymer Science* **2021**, 113, pp. 101-341.
75. M. Sharifi, F. Attar, A. A. Saboury, K. Akhtari, N. Hooshmand, A. Hasan, M. A. El-Sayed, M. Falahati, Plasmonic gold nanoparticles: Optical manipulation, imaging, drug delivery and therapy, *Journal of Controlled Release* **2019**, 311, pp. 170-189.
76. E. Boisselier, D. Astruc, Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity, *Chemical society reviews* **2009**, 38, pp. 1759-1782.

77. D. P. O'Neal, L. R. Hirsch, N. J. Halas, J. D. Payne, J. L. West, Photothermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles, *Cancer letters* **2004**, 209, pp. 171-176.
78. J. M. Slocik, M. O. Stone, R. R. Naik, Synthesis of gold nanoparticles using multifunctional peptides, *Small* **2005**, 1, pp. 1048-1052.
79. L. R. Hirsch, R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas, J. L. West, Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance, *Proceedings of the National Academy of Science* **2003**, 100, pp. 13549-13554.
80. E. Oh, J. B. Delehanty, K. E. Sapsford, K. Susumu, R. Goswami, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, J. Granek, M. Shoff, Q. Zhang, Cellular uptake and fate of PEGylated gold nanoparticles is dependent on both cell-penetration peptides and particle size, *ACS nano*. **2011**, 5, pp. 6434-6448.
81. Y. Jin, X. Gao, Spectrally tunable leakage-free gold nanocontainers, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, pp. 17774-17776.
82. J. Liang, H. Liu, J. Yu, L. Zhou and J. Zhu, Plasmon-enhanced solar vapor generation, *Nanophotonics* **2019**, 8, pp. 771–786
83. M. R. Rasch, K. V. Sokolov, B. A. Korgel, Limitations on the optical tunability of small diameter gold nanoshells, *Langmuir* **2009** 25, pp. 11777-11785.
84. X. Yang, M. Shi, R. Zhou, X. Chen, H. Chen, Blending of H₂AuCl₄ and histidine in aqueous solution: a simple approach to the Au₁₀ cluster, *Nanoscale* **2011**, 3, pp. 2596-2601.
85. V. Athanasiou, D. Stavroulaki, F. Arfara, D. Kabras, I. Kleideris, D. Haddleton, H. Iatrou, Gold Nanoparticles and Nanoshells Embedded as Core–Shell Architectures in Hybrid Poly(l-Histidine)-Containing Polymers for Photothermal Therapies, *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, 4, pp. 14217–14230.

86. Y. Jin, X. Gao, Plasmonic fluorescent quantum dots, *Nature nanotechnology* **2009**, 4, pp. 571-576.
87. Y. Jin, C. Jia, S.-W. Huang, M. O'Donnell, X. Gao, Multifunctional nanoparticles as coupled contrast agents, *Nature Communications* **2010**, 1, pp. 41.
88. Ε. Γκίκας, *Αμφίφιλα Πολυπεπτίδια: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Μελέτη Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών **2012**, pp. 1-208.
89. J. McMurry, *Οργανική Χημεία Ι*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο **1998**.
90. R. M. Wheaton, W. C. Bauman, Non-Ionic Separations with Ion Exchange Resins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1953**, 57, pp. 159-176.
91. G. H. Lathe, C. R. Ruthven, The Separation of Substances and Estimation of their Relative Molecular Sizes by the Use of Columns of Starch in Water, *Biochem. J.* **1956**, 62, pp. 665-674.
92. J. C. Moore, Gel Permeation Chromatography. I. A New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **1964**, 2, pp. 835-843.
93. K. P. Vollhardt and N. E. Schore, *Organic Chemistry*, 6th Edition, **2010**.
94. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, M. I. Καραγιάννης, Κ. Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, **2005**, pp. 1-984.
95. B. Chu, *Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice*, 2nd Edition, Volume II, USA **1991**.
96. R. Pecora, *Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy*, 2nd Edition, Volume I, USA **1985**.
97. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas and M. Pitsikalis, Anionic polymerization: High vacuum techniques, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **2000**, 38, pp. 3211-3234.

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

