



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Αμφίφιλα Πολυπεπτίδια: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και  
Μελέτη Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα**

**ΓΚΙΚΑΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012**



**Ευρωπαϊκή Ένωση**  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**ΕΣΠΑ**  
**2007-2013**  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Αμφίφιλα Πολυπεπτίδια: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Μελέτη Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα

**ΓΚΙΚΑΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ**

**A.M.: 261003**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**Ερμόλαος Ιατρού**, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:**

**1)Ερμόλαος Ιατρού**, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

**2)Νικόλαος Χατζηχρηστίδης**, Ομότιμος Καθηγητής ΕΚΠΑ

**3)Πασχάλης Αλεξανδρίδης**, Καθηγητής του Πανεπιστημίου Buffalo, The State University of New York

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**1)Ερμόλαος Ιατρού**, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

**2)Νικόλαος Χατζηχρηστίδης**, Ομότιμος Καθηγητής ΕΚΠΑ

**3)Πασχάλης Αλεξανδρίδης**, Καθηγητής του Πανεπιστημίου Buffalo, The State University of New York

**4)Μαρίνος Πιτσικάλης**, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

**5)Νικόλαος Θωμαΐδης**, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

**6)Γεωργιάδης Δημήτριος**, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

**7)Γεώργιος Σακελλαρίου**, Λέκτορας ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 24/10/2012



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτή τη διατριβή μελετούμε τα αμφίφιλα πολυπεπτίδια ως προς την σύνθεση, τον χαρακτηρισμό και την αυτοοργάνωση τους σε υδατικά διαλύματα, με χρήση τεχνικών πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών των αντίστοιχων αμινοξέων, καθώς και τεχνικές υψηλού κενού για τον καθαρισμό των αντιδραστηρίων και των διαλυτών. Για την σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων, αμιγών και υβριδικών, διαπιστώθηκε ότι είναι απαραίτητος ο καλός καθαρισμός των αρχικών πρόδρομων μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες αμινοξέων).

Ως προς τα πολυπεπτίδια, συνθέσαμε γραμμικά κατά συστάδες συμπολυπεπτίδια που σχηματίζουν α-έλικες του τύπου AB, υβριδικά κατά συστάδες πολυπεπτίδια πολυ(αιθυλενοξειδίου)-πολυ(L-προλίνης) του τύπου AB, υβριδικά τρισυσταδικά πολυπεπτίδια του τύπου ABA με πολυ(αιθυλενοξειδίο) ως μεσαία συστάδα και πλευρικές συστάδες: πολυ(L-λυσίνη), πολυ(L-προλίνη), πολυ(L-γλουταμικό οξύ), καθώς επίσης και υβριδικά τρισυσταδικά πολυπεπτίδια του τύπου ABC, αστεροειδή συμπολυμερή πολυ(στυρενίου)-πολυ(L-προλίνης) και εμβολιασμένα πολυπεπτίδια πάνω σε νανοσωλήνες.

Όλα τα πολυμερή χαρακτηρίστηκαν με πληθώρα φασματοσκοπικών τεχνικών (FTIR, NMR, SEC, TGA, UV-Vis), ενώ ως προς την αυτοοργάνωση τους, εξετάσαμε την συμπεριφορά τους σε υδατικά διαλύματα (CD, TEM) και την αυτοοργάνωση τους σε στερεά κατάσταση, τόσο σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας (WAXS, XRD) όσο και σε οργάνωση μεγάλης κλίμακας (SAXS). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι όλα τα πολυμερή που συντέθηκαν στην διδακτορική αυτή διατριβή, βρήκαν εφαρμογές είτε ως μοντέλα (μοριακός χάρακας), είτε ως μιμητές μεταξιού (αυξημένες μηχανικές ιδιότητες), ενώ ορισμένα είχαν σπουδαίες βιο-εφαρμογές (πέτρα στα νεφρά, φορείς αντικαρκινικών φαρμάκων).

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** πολυμερή

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** αμφίφιλα πολυπεπτίδια, N-καρβοξυ ανυδρίτες, αυτοοργάνωση, νερό, βιο-εφαρμογές

## ABSTRACT

In this dissertation we study the synthesis, characterization and self-assembly of amphiphilic polypeptides in aqueous solutions, using the ring-opening polymerization technique as long as high vacuum techniques for the purification of all the chemicals involved (reagents, solvents). For the preparation of well-defined polypeptides, the purification of the initial monomers (N-carboxy anhydrides) is of paramount importance.

As regards the polypeptides, we synthesized linear block copolypeptides of AB type that both adopt  $\alpha$ -helices, hybrid block polypeptides of AB type, consisting of poly(ethylene oxide) and poly(L-proline), hybrid triblock polypeptides of ABA type, with poly(ethylene oxide) as the middle block and poly(L-lysine), poly(L-proline) or poly(L-glutamic acid) as the side blocks, as long as hybrid triblock polypeptides of ABC type, star hybrid polypeptides, consisting of poly(ethylene oxide) and poly(L-proline) and polypeptides grafted on carbon nanotubes.

The polymers were characterized with different spectroscopic methods (FTIR, NMR, SEC, TGA, UV-Vis), while as regards their self-assembly, we examined their behavior in aqueous solutions (CD, TEM) and in the solid state, in both short-range order (WAXS, XRD) and long-range order (SAXS). Finally, it is important to be mentioned that all the polymers synthesized in this dissertation, had potential applications as models (molecular rulers), as silk mimetics (high mechanical properties) and very interesting bio-applications (kidney stones, drug carriers for cancer therapy).

**SUBJECT AREA:** polymers

**KEYWORDS:** amphiphilic polypeptides, N-carboxy anhydrides, self-assembly, water,  
bio-applications



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα θερμώς να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Ερμόλαο Ιατρού, για την βοήθεια του και την συνεργασία μας για πάνω από πέντε χρόνια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Ομότιμο Καθηγητή Νικόλαο Χατζηχρηστίδη για την δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο Πολυμερών, την καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερα ευχαριστώ στον Ερευνητή Γεώργιο Βουγιουκαλάκη για την συνεργασία μας αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές του όποτε τον χρειάστηκα. Ευχαριστώ επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαρίνο Πιτσικάλη για την βοήθεια του, τον Λέκτορα Γεώργιο Σακελλαρίου, τον Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Θωμαΐδη και τον διδάκτορα Αναστάσιο Καρατζά για την συνεργασία που είχαμε.

Οφείλω επιπλέον να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους Καθηγητές Πασχάλη Αλεξανδρίδη (University at Buffalo) και Janne Ruokolainen (Helsinki University of Technology: Aalto University) για την ευκαιρία που μου έδωσαν να δουλέψω στο εργαστήριό τους, αλλά και την καθοδήγηση τους. Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Γεώργιο Φλούδα (Παν/μιο Ιωαννίνων), την Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρίνα Τσιάνου (University at Buffalo) και τον Ερευνητή Nikolay Houbenon (Aalto University) για την συνεργασία μας. Τέλος, ευχαριστώ τους εξωτερικούς συνεργάτες μου και υποψήφιους διδάκτορες Jaakko Timonen, Johannes Haataja και Sussana Junnila (Aalto University), τους Biswa Das, Biswajit Sarkar και Mitali China (University at Buffalo) για την άριστη συνεργασία μας, καθώς επίσης και το πρόγραμμα Ηράκλειτος II για την οικονομική ενίσχυση της διδακτορικής αυτής διατριβής. Εξίσου σημαντική ήταν η συνεισφορά των παιδιών του εργαστηρίου Πολυμερών όλα αυτά τα χρόνια, με υπομονή, δυσκολίες και χαρές αλλά και άπειρο γέλιο.

**Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.**





## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση των πολυπεπτιδίων και συμπολυπεπτιδίων που παρασκευάστηκαν .....	26
Σχήμα 2: Η δομή του L-αμινοξέως.....	28
Σχήμα 3: Ο άκαμπτος πεπτιδικός δεσμός των πρωτεϊνών. ....	34
Σχήμα 4: Οι δευτεροταγείς δομές των πρωτεϊνών .....	35
Σχήμα 5: Σχηματισμός διπεπτιδίου με απώλεια νερού .....	40
Σχήμα 6: Σύνθεση πεπτιδίων με την τεχνική της στερεάς φάσης .....	42
Σχήμα 7: Οι βάσεις του DNA .....	44
Σχήμα 8: Σύνθεση πεπτιδίων με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA. ....	45
Σχήμα 9: Μονομερή που πολυμερίζονται με διάνοιξη δακτυλίου (R.O.P.).....	47
Σχήμα 10: Χαρακτηριστικά προϊόντα R.O.P .....	48
Σχήμα 11: Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβόξυ ανυδριτών (NCA's).....	49
Σχήμα 12: Μεθόδος του Leuchs για την σύνθεση των NCA's.....	52
Σχήμα 13: Μεθόδος των Fuchs-Farthing για την σύνθεση των NCA's .....	52
Σχήμα 14: Τα κυριότερα παραπροϊόντα κατά την σύνθεση των NCA's. ....	54
Σχήμα 15: Τα τέσσερα ενεργά κέντρα των NCA's .....	54
Σχήμα 16: Ο κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού. ....	56
Σχήμα 17: Σχηματισμός υδαντοϊκών οξέων. ....	56
Σχήμα 18: Μηχανισμός του Blout .....	58
Σχήμα 19: Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (AMM).....	59
Σχήμα 20: Μηχανισμός διάδοσης του AMM .....	60
Σχήμα 21: Παράπλευρη αντίδραση τερματισμού του AMM .....	61
Σχήμα 22: Πολυμερισμός του $\gamma$ -Bn-L-Glu NCA σε διοξάνιο.....	63
Σχήμα 23: Μέθοδος του Deming με σύμπλοκα Νικελίου .....	65
Σχήμα 24: Διαφορετικοί απαρχητές στον έλεγχο του μοριακού βάρους του PBLG.....	66

Σχήμα 25: Μηχανισμός πολυμερισμού με σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης .....	67
Σχήμα 26: Σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης με στερεοεκλεκτικότητα .....	68
Σχήμα 27: Μηχανισμός πολυμερισμού με τριμεθυλοπυριτικές αμίνες .....	69
Σχήμα 28: Μέθοδος του Schlaad με τελικές πολυμερικές αμίνες.....	70
Σχήμα 29: Συσκευή ανακρυστάλλωσης των NCA's με την τεχνική υψηλού κενού.....	72
Σχήμα 30: Δότηση δεσμών υδρογόνου στο άζωτο του πεπτιδικού δεσμού.....	76
Σχήμα 31: Οι δύο μορφές της πολυ(L-προλίνης).....	76
Σχήμα 32: Η αλληλομετρατροπή της πολυ(L-προλίνης).....	77
Σχήμα 33: Τα κατάλοιπα προλίνης στις πρωτεΐνες.....	78
Σχήμα 34: Δικετοπιπεραζίνες προλίνης.....	80
Σχήμα 35: FTIR του ακάθαρτου ανυδρίτη της προλίνης με Et <sub>3</sub> N ως βάση και διαλύτη ακετονιτρίλιο .....	82
Σχήμα 36: FTIR του ακάθαρτου ανυδρίτη της προλίνης με DEAM-PS ως βάση και διαλύτη THF .....	83
Σχήμα 37: Αντίδραση των Boc-αμινοξέων προς σχηματισμό NCA's .....	84
Σχήμα 38: Οι τρεις διαμορφώσεις της πολυ(L-λυσίνης) σε νερό.....	91
Σχήμα 39: Σχεδιάγραμμα μίας αντλίας διαχύσεως .....	97
Σχήμα 40: Συσκευή καθαρισμού διμεθυλαμίνης. ....	100
Σχήμα 41: Συσκευή αραίωσης διμεθυλαμίνης. ....	101
Σχήμα 42: Αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο προς σχηματισμό NCA's. ....	102
Σχήμα 43: Παράπλευρες αντιδράσεις κατά τον σχηματισμό του ανυδρίτη.....	103
Σχήμα 44: Συσκευή αντίδρασης προς σχηματισμό L-Pro NCA. ....	104
Σχήμα 45: Μηχανισμός σχηματισμού του ανυδρίτη L-Pro NCA.....	105
Σχήμα 46: Απεικόνιση των ιοντικών θραυσμάτων του ανυδρίτη L-Pro NCA. ....	137
Σχήμα 47: Συσκευή αντίδρασης προς σχηματισμό Bn-L-Glu NCA.....	110
Σχήμα 48: Συσκευή ανακρυστάλλωσης των NCA's για υψηλό κενό .....	112

Σχήμα 49: Μεταφορά τελικού διαλύματος NCA με cannula .....	113
Σχήμα 50: Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης της diBoc-(L)-Lys-DCHA.....	115
Σχήμα 51: Έναρξη και διάδοση του πολυμερισμού των NCA's .....	119
Σχήμα 52: Συσκευή πολυμερισμού των NCA's με διμεθυλαμίνη .....	121
Σχήμα 53: Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου του L-Pro NCA.....	122
Σχήμα 54: Πορεία σύνθεσης του μακροαπαρχητή PS-NH <sub>2</sub> -PS .....	129
Σχήμα 55: Συσκευή για σύνθεση CNT's-g-NH <sub>2</sub> σε υψηλό κενό .....	130
Σχήμα 56: Πορεία σύνθεσης των νανοσωλήνων CNTs-g-PLP .....	131
Σχήμα 57: Σύμπλεξη PLL- <i>b</i> -PLP με DBSA και dGMP .....	154
Σχήμα 58: Σχηματική αναπαράσταση αυτοοργάνωσης του PBLG- <i>b</i> -PLP .....	157
Σχήμα 59: Χημική δομή της δοξορουβικίνης και της ταξόλης .....	174
Σχήμα 60: Σύμπλεξη και αναγωγή των νανοσωματιδίων χρυσού .....	182
Σχήμα 61: Μερική οξείδωση της πολυ(L-προλίνης).....	183

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Απεικόνιση της γραμμής υψηλού κενού.....	96
Εικόνα 2: Συσκευή καθαρισμού των NCA's για υψηλό κενό.....	112
Εικόνα 3: Φάσμα FTIR σχηματισμού του L-Pro NCA .....	133
Εικόνα 4: Παρακολούθηση με <sup>1</sup> H-NMR του καθαρισμού του L-Pro NCA.....	134
Εικόνα 5: Φάσμα FTIR καθαρισμού του L-Pro NCA.....	134
Εικόνα 6: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του L-Pro NCA.....	135
Εικόνα 7: Φάσμα <sup>13</sup> C-NMR του L-Pro NCA .....	135
Εικόνα 8: Φάσμα ESI-MS του L-Pro NCA.....	136
Εικόνα 9: Ανάλυση με ESI-MS του ιοντικού θραύσματος με m/z=70.....	136
Εικόνα 10: Κρύσταλλοι του L-Pro NCA.....	137
Εικόνα 11: Φάσμα FTIR σχηματισμού του Bn-L-Hyr NCA .....	138
Εικόνα 12: Φάσμα FTIR σχηματισμού του L-Gly NCA.....	139
Εικόνα 13: Φάσμα FTIR σχηματισμού του Bn-L-Glu NCA.....	140
Εικόνα 14: Φάσμα FTIR σχηματισμού του Boc-L-Lys NCA.....	141
Εικόνα 15: Χρωματογράφημα GPC της PLP .....	143
Εικόνα 16: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR της PLP .....	144
Εικόνα 17: Φάσμα <sup>13</sup> C-NMR PLP .....	144
Εικόνα 18: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της PLP .....	145
Εικόνα 19: Φάσμα FTIR της PLP.....	146
Εικόνα 20: Φάσμα XRD της PLP .....	147
Εικόνα 21: Χρωματογράφημα GPC της PBHyLP .....	149
Εικόνα 22: Χρωματογράφημα GPC της PBocLL .....	151
Εικόνα 23: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του συμπολυπεπτιδίου PBocLL- <i>b</i> -PLP.....	152
Εικόνα 24: Μικκύλια σε νερό του συμπολυπεπτιδίου PBocLL- <i>b</i> -PLP.....	152
Εικόνα 25: Φάσματα WAXS του PLL- <i>b</i> -PLP πριν και μετά την σύμπλεξη με dGMP...	154

Εικόνα 26: Χρωματογράφημα GPC της PBLG .....	156
Εικόνα 27: Θερμιδογράφημα TGA του συμπολυτεπτιδίου PBLG- <i>b</i> -PLP .....	156
Εικόνα 28: Χρωματογράφημα GPC του συμπολυτεπτιδίου PBLG- <i>b</i> -PBHyLP .....	158
Εικόνα 29: TEM του συμπολυτεπτιδίου PBLG- <i>b</i> -PBHyLP.....	159
Εικόνα 30: Χρωματογράφημα GPC του PEO- <i>b</i> -PLP .....	161
Εικόνα 31: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του PEO- <i>b</i> -PLP .....	161
Εικόνα 32: Χρωματογράφημα GPC του PLP- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLP.....	162
Εικόνα 33: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του PLP- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLP .....	162
Εικόνα 34: Φάσμα XRD των PEO- <i>b</i> -PLP και PLP- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLP .....	163
Εικόνα 35: Χρωματογράφημα GPC του P <i>Boc</i> LL- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -P <i>Boc</i> LL .....	165
Εικόνα 36: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του PLL- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLL .....	165
Εικόνα 37: TEM του PLL- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLL μετά από σύμπλεξη με DBSA .....	167
Εικόνα 38: Χρωματογράφημα GPC του PBLG- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PBLG .....	169
Εικόνα 39: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του PBLG- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PBLG.....	169
Εικόνα 40: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR του PLGA- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLGA.....	169
Εικόνα 41: SEM του CaC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (πέτρα στα νεφρά) με PLGA- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLGA .....	172
Εικόνα 42: Χρωματογράφημα GPC του PEO- <i>b</i> -PBLG- <i>b</i> -PLL .....	173
Εικόνα 43: Χρωματογράφημα GPC του συμπολυμερούς PS <sub>2</sub> PLP .....	175
Εικόνα 44: Γράφημα SAXS του πολυμερούς PS <sub>2</sub> PLP .....	176
Εικόνα 45: Γράφημα WAXS του πολυμερούς PS <sub>2</sub> PLP .....	176
Εικόνα 46: Θερμιδογράφημα TGA του SWNTs-g-PLP .....	177
Εικόνα 47: Φωτογραφίες SEM των MWNTs-g-PLP.....	178
Εικόνα 48: Φωτογραφίες AFM των MWNTs-g-PLP .....	178
Εικόνα 49: Παρακολούθηση με UV-Vis του σχηματισμού των Au-NPs με PLP .....	180
Εικόνα 50: Φάσμα FTIR των Au-NPs με PLP .....	184
Εικόνα 51: Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR των Au-NPs με PLP.....	184

Εικόνα 52: Φωτογραφίες TEM των Au-NPs με PLP σε μοριακή αναλογία 2:1 .....	186
Εικόνα 53: Φωτογραφίες TEM των Au-NPs με PLP σε μοριακή αναλογία 5:1 .....	186

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συχνότητα εμφάνισης αμινοξέων στη δευτεροταγή δομή πρωτεϊνών .....	38
Πίνακας 2: Συνθήκες αντίδρασης διαφόρων ομάδων για τον πολυμερισμό του N-καρβοξυ ανυδρίτη της (L)-προλίνης.....	78
Πίνακας 3: Συνθήκες αντίδρασης διαφόρων ομάδων για την σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη της (L)-προλίνης .....	79
Πίνακας 4: Αποτελέσματα <sup>1</sup> H-NMR κατά την σύνθεση του ανυδρίτη της προλίνης με χρήση διαφορετικών βάσεων.....	80
Πίνακας 5: Αποτελέσματα <sup>1</sup> H-NMR με χρήση διαφορετικών βάσεων και διαλυτών κατά την σύνθεση του ανυδρίτη της προλίνης.....	81
Πίνακας 6: Απορροφήσεις κυκλικού διχρωϊσμού των τριών διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.....	90
Πίνακας 7: Μοριακά χαρακτηριστικά ομοπολυμερών PLP .....	143
Πίνακας 8: Μοριακά χαρακτηριστικά ομοπολυμερών PBHyLP .....	149
Πίνακας 9: Μοριακά χαρακτηριστικά των PBocLL- <i>b</i> -PLP και PBLG- <i>b</i> -PLP.....	151
Πίνακας 10: Μοριακά χαρακτηριστικά των PBLG- <i>b</i> -PBHyLP .....	158
Πίνακας 11: Μοριακά χαρακτηριστικά των PEO- <i>b</i> -PLP και PLP- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLP.....	160
Πίνακας 12: Μοριακά χαρακτηριστικά των PBocLL- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PBocLL .....	164
Πίνακας 13: Μοριακά χαρακτηριστικά των PLL- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLL.....	166
Πίνακας 14: Μοριακά χαρακτηριστικά των PBLG και PBLG- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PBLG .....	168
Πίνακας 15: Μοριακά χαρακτηριστικά των PLGA και PLGA- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLGA .....	171
Πίνακας 16: Μοριακά χαρακτηριστικά του PEO- <i>b</i> -PBLG- <i>b</i> -PLL .....	173
Πίνακας 17: Μοριακά χαρακτηριστικά του PS <sub>2</sub> PLP .....	175
Πίνακας 18: Επίδραση του μοριακού βάρους της PLP και της αρχικής συγκέντρωσης Au(III) στο μέγεθος των νανοσωματιδίων χρυσού .....	181





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	19
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	21
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	28
2.1 Τα φυσικά αμινοξέα .....	28
2.2 Δομές και λειτουργία Πρωτεϊνών .....	34
2.3 Πεπτιδική σύνθεση .....	39
2.3.1 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με συγκεκριμένη αλληλουχία.....	39
2.3.1.1 Σύνθεση σε διάλυμα .....	40
2.3.1.2 Σύνθεση σε στερεά φάση (solid phase synthesis) .....	41
2.3.1.3 Σύνθεση με τεχνική ανασυνδυασμένου DNA.....	43
2.3.2 Σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία.....	46
2.3.2.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (R.O.P) .....	47
2.3.2.2 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου NCA's α-αμινοξέων .....	48
2.3.2.2.α Κανονικός Μηχανισμός πολυμερισμού (Normal Route) .....	55
2.3.2.2.β Μηχανισμός του Blout.....	57
2.3.2.2.γ Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (AMM).....	58
2.3.2.3 Κινητικές Μελετες.....	61
2.3.2.4 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως .....	63
2.3.2.5 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με αμινο-πυριτικές ενώσεις.....	69
2.3.2.6 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με τελικές υδροχλωρικές αμίνες .....	70
2.3.2.7 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση υψηλού κενού .....	71
2.4 Ιδιότητες της πολυ(L-προλίνης), ιστορική αναδρομή σύνθεσης αυτής και του ανυδρίτη της L-προλίνης.....	75
2.5 Μοριακός Χαρακτηρισμός.....	85

<b>3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	95
3.1 Τεχνική υψηλού κενού .....	95
3.2 Καθαρισμός διαλυτών .....	98
3.3 Καθαρισμός αντιδραστηρίων .....	100
3.4 <b>Παρασκευή και Καθαρισμός Μονομερών</b> .....	102
3.4.1 Παρασκευή <b>(L)-Pro NCA</b> .....	103
3.4.2 Παρασκευή <b>Bn-(L)-Hyp NCA</b> .....	107
3.4.3 Παρασκευή <b>(L)-Gly NCA</b> .....	108
3.4.4 Παρασκευή <b>Bn-(L)-Glu NCA</b> .....	109
3.4.5 Παρασκευή <b>Boc-(L)-Lys NCA</b> .....	114
3.5 <b>Σύνθεση Πολυμερών</b> .....	119
3.5.1 Παρασκευή ομοπολυπεπτιδίων <b>PLP &amp; PBHyLP</b> .....	120
3.5.2 Παρασκευή γραμμικών δυσυσταδικών συμπολυπεπτιδίων α-έλικας. <b>PBocLL-b-PLP, PBLG-b-PLP, PBLG-b-PBHyLP</b> .....	123
3.5.3 Παρασκευή γραμμικών κατά συστάδες υβριδικών πολυπεπτιδίων τυχαίου σπειράματος / έλικας. <b>PEO-b-PLP &amp; PLP-b-PEO-b-PLP</b> .....	125
3.5.4 Παρασκευή γραμμικών τρισυσταδικών υβριδικών πολυπεπτιδίων τύπου α-έλικα / τυχαίο σπειράμα / α-έλικα. <b>PBocLL-b-PEO-b-PBocLL &amp; PBLG-b-PEO-b-PBLG</b> .....	127
3.5.5 Παρασκευή γραμμικών τρισυσταδικών υβριδικών πολυπεπτιδίων τύπου τυχαίο σπειράμα / α-έλικα / α-έλικα. <b>PEO-b-PBLG-b-PLL</b> .....	128
3.5.6 Παρασκευή <b>αστεροειδών</b> υβριδικών πολυπεπτιδίων .....	128
3.5.7 Παρασκευή ομοπολυπεπτιδίων πανω σε <b>Νανოსωλήνες άνθρακα</b> .....	129
3.5.8 Αναγωγή/σταθεροποίηση <b>Νανοσωματίδιων Χρυσού</b> .....	132
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	133
<b>5. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ</b> .....	188
<b>6. ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b> .....	190

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η έρευνα που περιλαμβάνεται στην διδακτορική αυτή διατριβή διενεργήθηκε στο Πανεπιστήμιο Αθηνών υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ερμόλαου Ιατρού, στο Πανεπιστήμιο Buffalo της πολιτείας της Νέας Υόρκης (20/8/2010–20/10/2010) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Πασχάλη Αλεξανδρίδη και στο Πανεπιστήμιο Aalto του Ελσίνκι (29/5/2011–29/6/2011) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Janne Ruokolainen.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κύριος στόχος των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια, είναι η σύνθεση πρότυπων πολυμερών με προκαθορισμένο βαθμό πολυμερισμού και μοριακή σύσταση, για την μελέτη της σχέσης δομής-ιδιοτήτων. Με κατάλληλη επιλογή της δομής και του μοριακού βάρους του πολυμερούς, γίνεται ουσιαστικά επιλογή των ιδιοτήτων του και άρα των δυνατών εφαρμογών του. Σε όλες όμως σχεδόν τις εφαρμογές, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της σύστασης, του μοριακού βάρους και της αρχιτεκτονικής. Μεγάλη προσοχή έχει δοθεί στην σύνθεση αστεροειδών πολυμερών και δενδριμερών, λόγω των ξεχωριστών φυσικών ιδιοτήτων και λειτουργιών τους, αποτέλεσμα του σφαιρικού τους σχήματος. Αυτό ωστόσο δεν είναι πάντοτε εφικτό, λόγω της δυσκολίας σύνθεσης πολυμερών καθορισμένης αρχιτεκτονικής με μικρή κατανομή μοριακών βαρών. Η συμβολή της ομάδος Πολυμερών του Χατζηχρηστίδη, για την διασαφήνιση της σχέσης δομής-ιδιοτήτων, ιδιαίτως μέσω της σύνθεσης πολύπλοκων αρχιτεκτονικών, είναι τεράστια.

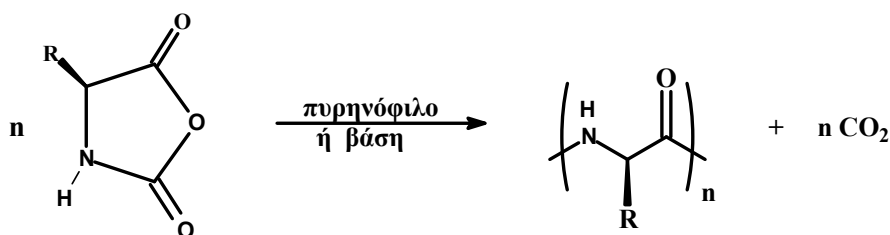
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αναπτύσσεται, τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο, για την παρασκευή βιοσυμβατών και βιοδιασπόμενων πολυμερών. Τα πολυπεπτίδια, είναι από τα πιο ενδιαφέροντα πολυμερή αυτής της κατηγορίας, και πολλές έρευνες έχουν γίνει για την σύνθεση, την διαμόρφωση και τις ιδιότητες τους. Αυτό δεν είναι τυχαίο, αν αναλογιστούμε ότι οι πρωτεΐνες είναι το πιο διαδεδομένο πολυμερές στη φύση, με την εξαιρετική ικανότητα που κατέχουν, να οργανώνονται σε περίπλοκες τρισδιάστατες δομές. Στη φύση βέβαια, τα βιολογικά συστήματα παράγουν πρωτεΐνες με επακριβώς καθορισμένη αλληλουχία και σύσταση, κάτι που είναι ιδιαίτερα δύσκολο να πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο. Η ανακάλυψη όμως, ότι οι δευτεροταγείς δομές των πρωτεϊνών, μπορούν να ληφθούν ακόμα και από απλά πολυαμινοξέα<sup>1-9</sup>, έχει δώσει μεγάλη ώθηση στην προσπάθεια συνθετικής παρασκευής τους.

Από την δεκαετία κιόλας του 40', αναπτυχθήκαν πολλές μέθοδοι για την σύνθεση πεπτιδίων όπως σύνθεση σε διάλυμα, σύνθεση σε στερεή

φάση (μέθοδος Merrifield), σύνθεση με την τεχνική του ανασυνδιασμένου DNA καθώς και η απομόνωση τους από φυσικές πηγές με ενζυμική υδρόλυση. Δεν είναι καθόλου τυχαίο πως έχουν δοθεί μέχρι σήμερα δυο βραβεία Nobel πάνω στη πεπτιδική σύνθεση, λόγω της εξαιρετικής σπουδαιότητας και των πολλαπλών εφαρμογών της.

Μικρές αλληλουχίες πεπτιδίων με λιγότερο από 20 αμινοξέα, μπορούν να συντεθούν σταδιακά με σύνθεση σε στερεή φάση. Παρόλα αυτά, αν και είναι εξαιρετική μέθοδος για την σύνθεση πεπτιδίων με καθορισμένη αλληλουχία, είναι ιδιαίτερα επίπονη και χρονοβόρα, και η απόδοση που δίνει είναι της τάξης των mgr. Η σύνθεση επίσης, δεν είναι πρακτική για την παραγωγή μεγάλων πεπτιδίων, λόγω των πολλαπλών αποπροστασιών και σταδίων σύζευξης, που η απόδοση τους δεν είναι 100% και χρειάζονται χρωματογραφικές μέθοδοι για τον καθαρισμό τους.

Μέχρι σήμερα, η καλλίτερη, γρηγορότερη και οικονομικότερη τεχνική για την σύνθεση μεγάλου μοριακού βάρους πολυπεπτιδίων<sup>10-14</sup> χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, περιλαμβάνει την διάνοιξη δακτυλίου N-καρβοξυ-ανυδριτών α-αμινοξέων (NCA's). Τα πολυμερή με αυτή την μέθοδο, λαμβάνονται σε μεγάλη απόδοση και χωρίς ρακεμίωση και ένας μεγάλος αριθμός NCA's έχει συντεθεί και πολυμεριστεί μέχρι σήμερα. Τα πολυπεπτιδία συνθέτονται με πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου NCA's α-αμινοξέων με πρωτικές αμίνες, βασικά άλατα καθώς και με θερμικές και καταλυτικές μεθόδους.



Επιτυχής σύνθεση καλά καθορισμένων πολυαμινοξέων που να μπορούν να μιμηθούν τις ιδιότητες των φυσικών πρωτεϊνών, δεν ήταν εφικτή με την μέθοδο αυτή για περισσότερο από 50 χρόνια, λόγω των αναπόφευκτων παράπλευρων αντιδράσεων τερματισμού και μεταφοράς

αλυσίδας που εμποδίζουν τον σχηματισμό επακριβώς καθορισμένων αλυσίδων. Έτσι η σύνθεση πρότυπων πολυπεπτιδίων, καθώς και οι ιδιότητες αυτών ήταν περιορισμένες, με την προβλεπόμενη μίμηση των πρωτεϊνών να μην είναι η αναμενομένη, λόγω κακής δομικής οργάνωσης των πολυαμινοξέων.

Μόλις το 1997, ο Deming παρουσίασε ένα επιτυχημένο καταλυτικό σύστημα<sup>15,16</sup> πολυμερισμού N-καρβοξυ ανυδριτών, βασισμένο σε σύμπλοκα του νικελίου με πολυσχιδείς υποκαταστάτες. Με την μέθοδο αυτή και υιοθετώντας ένα διαφορετικό μηχανισμό πολυμερισμού, κατάφερε να παρασκευάσει καλά καθορισμένα κατά συστάδες συμπολυπεπτίδια. Ο απαρχητής που χρησιμοποιεί παρέχει ενεργά κέντρα, τα οποία είναι λιγότερο προσβάσιμα λόγω στερεοχημικών και ηλεκτρονιακών παραγόντων, περιορίζοντας έτσι τις παράπλευρες αντιδράσεις. Δημιούργησε δηλαδή ένα σύστημα λιγότερο ευαίσθητο σε προσμίξεις, που μπορούν να οδηγήσουν σε παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας. Οι δομές ωστόσο που συνέθεσε με την μέθοδο αυτή, περιορίζονται σε γραμμικά συμπολυμερή χωρίς περίπλοκες αρχιτεκτονικές. Επίσης δεν είναι καθόλου σίγουρο αν τα πολυμερή αυτά είναι βιοτοξικά, διότι απαιτείται επισταμένη απομάκρυνση του μετάλλου του καταλυτικού συστήματος από το τελικό πολυμερές, κάτι το οποίο δεν είναι ούτε εύκολο, ούτε και ποσοτικό, μειώνοντας έτσι την χρησιμότητα και τις εφαρμογές τους, καθώς ο βασικότερος λόγος παρασκευής τέτοιων πολυμερών είναι η βιοσυμβατότητα τους. Παρόλα αυτά, αποτελεί την πιο αναγνωρισμένη διεθνώς τεχνική παρασκευής πολυπεπτιδίων.

Αντίθετα η δικιά μας στρατηγική περιλαμβάνει τον πολυμερισμό των NCA's των α-αμινοξέων με πρωτοταγείς αμίνες όπως η εξυλαμίνη και η διμεθυλαμίνη που είναι ισχυρά πυρηνόφιλα και οδηγούν αποκλειστικά στον κανονικό μηχανισμό αμίνης. Χρησιμοποιώντας τις απαιτητικές τεχνικές υψηλού κενού για το καθαρισμό όλων των αντιδραστηρίων, των διαλυτών και των μονομερών καθώς και την διατήρηση του περιβάλλοντος αντίδρασης απαλλαγμένου από προσμίξεις, καταφέραμε να λύσουμε ένα συνθετικό πρόβλημα που ήταν πρόκληση και παρέμενε άλυτο για περισσότερο από 50

χρόνια. Τα πολυμερή που λαμβάνονται με αυτή την μέθοδο, δεν χρειάζονται το επιπλέον στάδιο καθαρισμού του καταλύτη και είναι βιοσυμβατά, καθώς το μόνο που προστίθεται στο πολυμερές είναι μια μικρή αλειφατική αλυσίδα. Η τεχνική υψηλού κενού, εξασφαλίζει την υψηλή καθαρότητα όλων των αντιδραστηρίων που συμμετέχουν και διατηρεί όλες τις αναγκαίες συνθήκες για τον ζωντανό πολυμερισμό των NCA's. Με την μέθοδο αυτή είναι επίσης εφικτή, η διατήρηση ενός πολυμερούς ζωντανού για μεγάλο χρονικό διάστημα καθώς το σύστημα είναι τελείως απομονωμένο από το περιβάλλον, παρέχοντας έτσι την δυνατότητα παρασκευής συμπολυμερών πολυπεπτιδίων, καθώς και πολυμερών με πολύπλοκη αρχιτεκτονική.

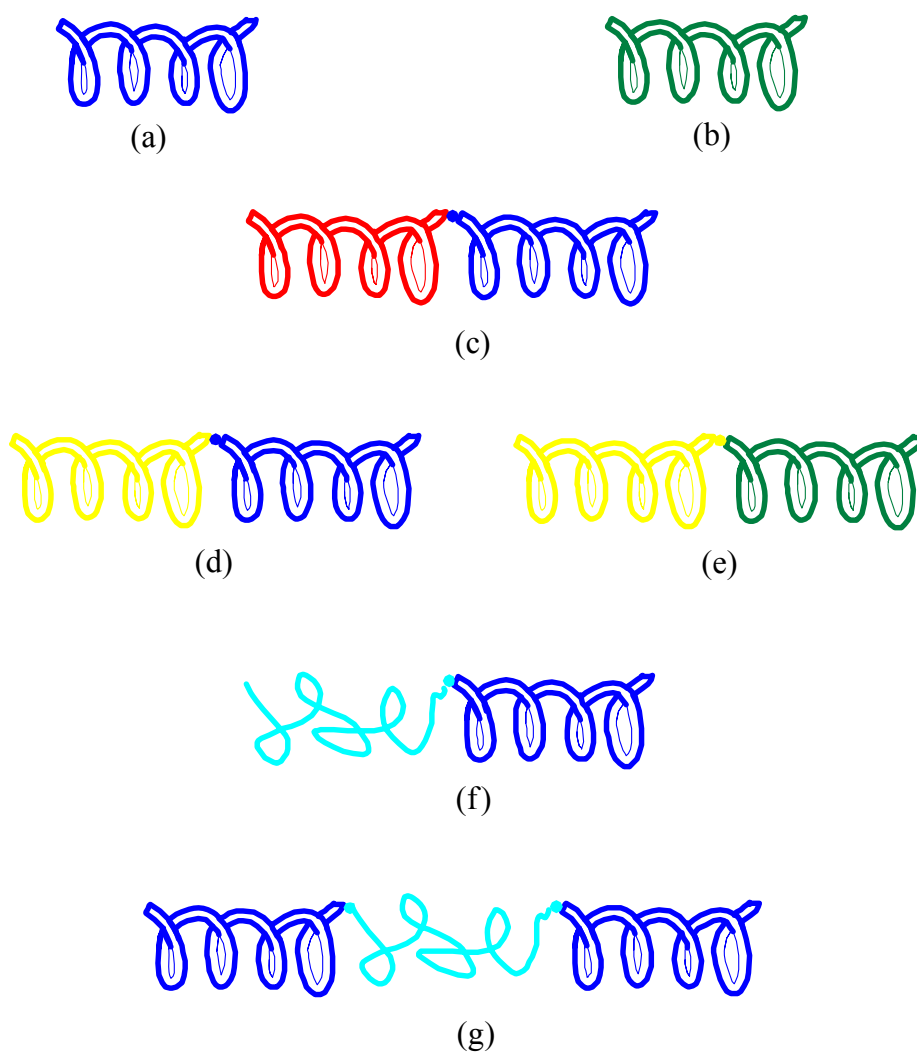
Τα συμπολυμερή πολυπεπτιδίων, συνδυάζουν την αυτοοργάνωση των κατά συστάδες<sup>17-18</sup> συμπολυμερών και την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών, παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον, καθώς μπορούν να αυτοοργανωθούν<sup>19-26</sup> σε διαφορετικές μορφολογίες και υπερμοριακές δομές<sup>27</sup>, με ευρύ φάσμα εφαρμογών. Σημαντικός παράγοντας για την χρησιμότητα αυτών των αυτοοργανωμένων δομών, είναι η ευχέρεια τους να διεγείρονται από εξωτερικές αλλαγές όπως η θερμοκρασία και το pH<sup>3,5,28,29</sup>. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτών των υλικών, είναι η δομή τους που μπορεί να αλλάζει από α-έλικα (rod) σε τυχαίο σπείραμα (random coil) ή β-φύλλο, με αλλαγή pH ή θερμοκρασίας, δίνοντας τους έτσι τρομερές δυνατότητες. Έτσι, με χρήση μακροαπαρητητών με πρωτοταγή αμίνη, μπορούμε να λάβουμε κατά συστάδες συμπολυμερή, με ένα πολυπεπτιδικό κομμάτι και με ένα κοινό πολυμερές μεγάλης ευκαμψίας (rod-coil), παρουσιάζοντας ως υλικά, πολύ ενδιαφέρουσες ιδιότητες σε διάλυμα και σε μικροφασικό διαχωρισμό.

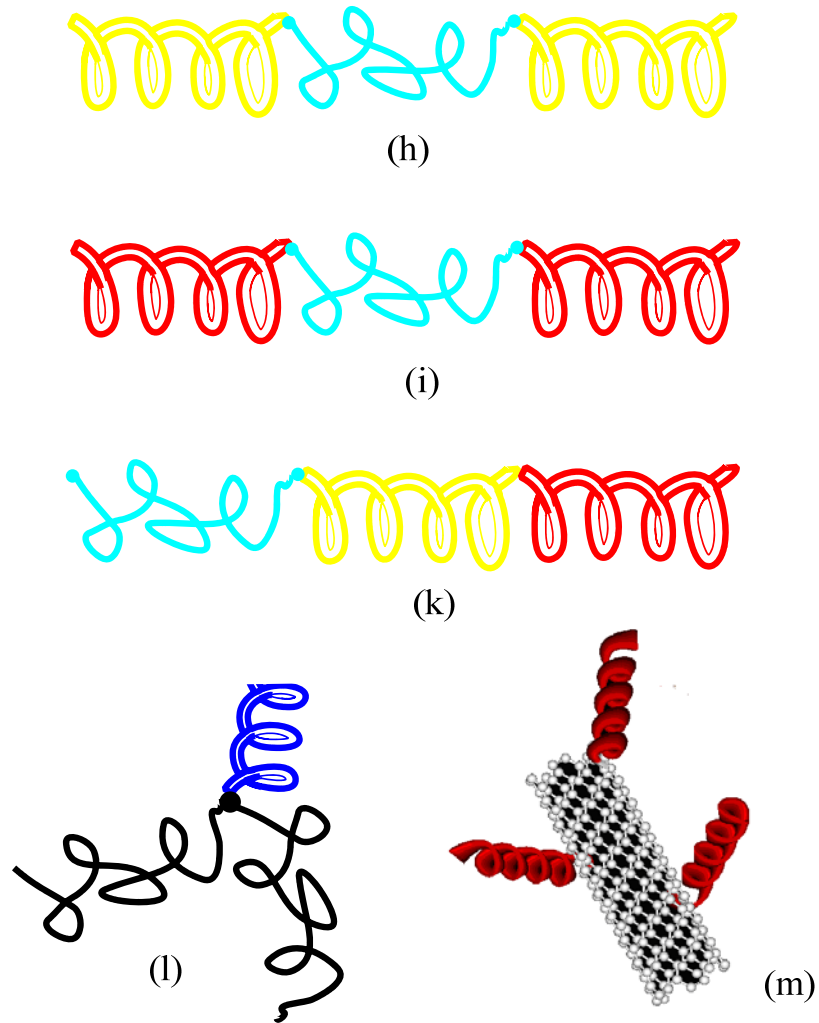
Αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή, μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα σε υδατικό διάλυμα είτε σε οργανικούς διαλύτες, ανάλογα με το μέγεθος του υδρόφοβου και υδρόφιλου τμήματος, και να οργανωθούν σε μικκύλια<sup>30,31</sup>, διπλοστιβάδες και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ακόμα και κυστίδια<sup>32,33</sup>. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικές μεμβράνες<sup>34</sup> καθώς και ως πολυμερικοί φορείς για να διαλυτοποιήσουν υδρόφοβα φάρμακα<sup>35-38</sup>, αυξάνοντας τον χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα και οδηγώντας σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου στον οργανισμό.



Σύμπλεξη μορίων DNA με υδατοδιαλυτές πολυπεπτιδικές συστάδες<sup>33</sup> και εγκλωβισμός του σε μικκύλια για στόχευση καρκινικών κυττάρων, έχει επίσης αναφερθεί. Πολυμερισμοί πεπτιδικών πολυμερών έχουν πραγματοποιηθεί τόσο πάνω σε ανόργανες επιφάνειες<sup>39,40</sup> όπως π.χ. πυρίτιο, όσο και σε νανοσωλήνες άνθρακα<sup>41,42</sup>, ενώ προσφάτως αναφέρθηκε η σύνθεση συμπολυπεπτιδίων με χρήση χημείας click<sup>43</sup>.

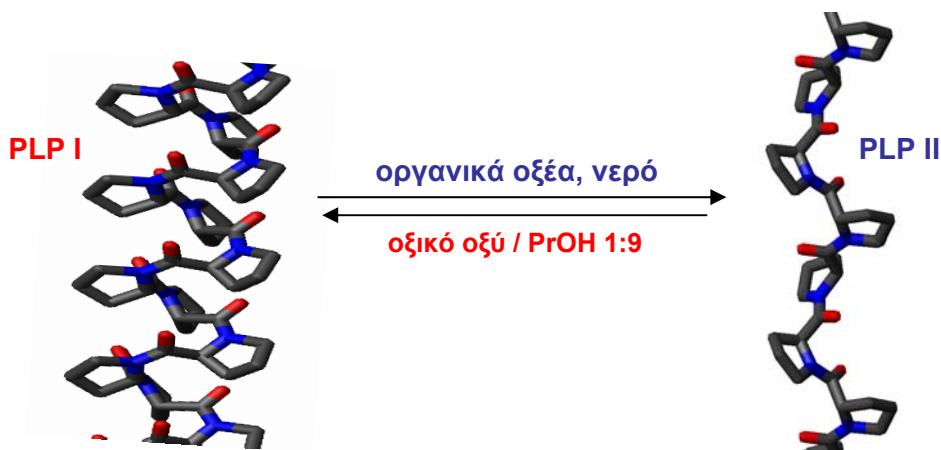
Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ομοπολυμερών πολυ(L-προλίνης) και πολυ(L-υδροξυπρολίνης), καθώς επίσης και κατά συστάδες συμπολυπεπτίδια αυτών, τόσο αμιγή όσο και υβριδικά. Επίσης παρασκευάστηκαν υδατοδιαλυτά υβριδικά πολυπεπτίδια L-λυσίνης και L-γλουταμικού οξέως με βάση το πολυ(αιθυλενοξειδίο) και πολυπεπτίδια πάνω σε νανοσωλήνες άνθρακα. Οι δομές των πολυμερών που παρασκευάστηκαν συνοψίζονται στο σχήμα 1.





**Σχήμα 1:** Σχηματική αναπαράσταση γραμμικών και αστεροειδών ομο- και συμπολυμερών πεπτιδίων: (a,b) ομοπολυμερή (PLP, PBHyLP); (c,d,e) συμπολυμερή κατά συστάδες που σχηματίζουν α-έλικες του τύπου AB (PBocLL-*b*-PLP, PBLG-*b*-PLP, PBLG-*b*-PBHyLP ); (f,g) Υβριδικά συμπολυμερή κατά συστάδες του τύπου AB και ABA με βάση την προλίνη (PEO-*b*-PLP, PLP-*b*-PEO-*b*-PLP); (h,i) υβριδικά συμπολυμερή κατά συστάδες του τύπου ABA με πολυ(αιθυλενοξείδιο) και αρνητικό ή θετικό φορτίο (PLGA-*b*-PEO-*b*-PLGA, PLL-*b*-PEO-*b*-PLL); (k) υβριδικά συμπολυμερή κατά συστάδες του τύπου ABC με πολυ(αιθυλενοξείδιο) και αρνητικό φορτίο (PEO-*b*-PBLG-*b*-PLL); (l) αστεροειδές συμπολυμερές (PS<sub>2</sub>-PLP); (m) πολυπεπτίδια πάνω σε νανοσωλήνες άνθρακα (CNT's-g-PLP / PBLG / PBocLL).

Η πολυ(L-προλίνη) λόγω έλλειψης δεσμών N-H και αρχιτεκτονικής (πυρρολιδινικός δακτύλιος), έχει σπουδαίες ιδιότητες και διαλύεται μόνο σε νερό και οργανικά οξέα, λόγω των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσει. Ο χαρακτήρας απλού αμιδικού δεσμού του πολυπεπτιδίου, του επιτρέπει να υιοθετεί δύο μορφές σε διάλυμα, όπου μέσω μιας οξεο-καταλυόμενης ισορροπίας, ευνοείται η λιγότερο συνωστισμένη μορφή II.



Η σύνθεση και η καθαρότητα του μονομερούς, έπαιξε πολύ σημαντικό ρόλο για την επιτυχή σύνθεση των ομοπολυμερών και συμπολυμερών της πολυ(L-προλίνης). Πραγματοποιήθηκε με θερμική διάλυση του ανυδρίτη της (L)-προλίνης από το μείγμα της αντίδρασης σε εξάνιο.

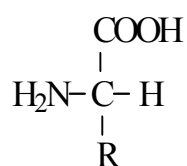
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 2.1 Τα φυσικά αμινοξέα

Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια αποτελούν φυσικά πολυμερή, δομημένα από 20 διαφορετικά α-αμινοξέα και ενωμένα μεταξύ τους σε τυχαίες θέσεις με πεπτιδικούς δεσμούς<sup>44</sup>. Συγκροτούμενες από ίδιες ή διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενωμένες, επιτελούν σειρά λειτουργιών όπως μηχανική υποστήριξη, κατεύθυνση της κίνησης, ανοσολογική προστασία, διεγερσιμότητα των κύτταρων, μεταφορά και αποθήκευση ουσιών, έλεγχο ανάπτυξης, μεταβολισμού και κυτταρικής διαφοροποίησης. Τα αμινοξέα είναι τα βασικά δομικά μονομερή όλων των ειδών πρωτεϊνών, από βακτηριακές μέχρι ανθρώπινες και συγκροτούν πολυπεπτιδικές αλυσίδες με βαθμό πολυμερισμού από 20 (ολιγοπεπτίδια) έως και παραπάνω από 1000.

Τα α-αμινοξέα συνίστανται από μια αμινομάδα  $-NH_2$ , μια καρβοξυλομάδα  $-COOH$ , μια χαρακτηριστική για κάθε αμινοξύ πλευρική ομάδα  $-R$  και ένα  $-H$ , συνδεδεμένα σε ένα τετραεδρικό άτομο άνθρακα  $H$  ύπαρξη τεσσάρων διαφορετικών υποκαταστατών στον άνθρακα, επάγει οπτική ενεργότητα στα αμινοξέα. Έτσι, υπάρχουν δυο ισομερείς μορφές με σχέση ειδώλου-αντικειμένου, η  $L$  που απαντάται αποκλειστικά στην φύση και η  $D$  που συναντάται σε κάποια βακτήρια (σχήμα 2).



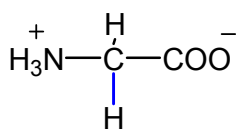
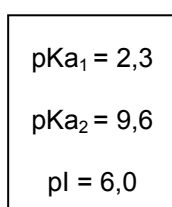
L - αμινοξύ

Σχήμα 2: Η δομή του L-αμινοξέως.

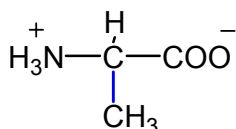
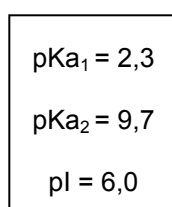
Οι 20 πλευρικές ομάδες  $-R$  διαφοροποιούν τα αμινοξέα, διότι συνίστανται από διαφορετικές χαρακτηριστικές ομάδες, διαφορετικά φορτία (ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου) καθώς και ανόμοια μεγέθη. Η

μεγάλη ποικιλία λειτουργικότητας των πρωτεϊνών, είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής χημικής δραστηριότητας των πλευρικών ομάδων, που καθορίζουν τις ιδιοτήτων αυτών.

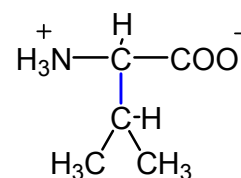
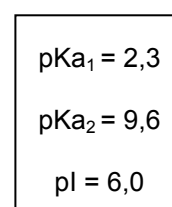
Τα (L)-αμινοξέα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την δομή της πλευρικής ομάδας σε αλειφατικά, αρωματικά (μη πολικά) και ανάλογα με την χαρακτηριστική ομάδα σε υδροξυλικά, θειούχα (πολικά ουδέτερα), όξινα και βασικά (πολικά φορτισμένα), τα οποία μπορεί να έχουν τόσο αλειφατικούς όσο και αρωματικούς άνθρακες. Το απλούστερο αμινοξύ είναι η **γλυκίνη**, που έχει μόνο ένα άτομο υδρογόνου στην πλευρική αλυσίδα και δεν εμφανίζει οπτική ενεργότητα. Η **αλανίνη** έχει μια μεθυλομάδα στην πλευρική αλυσίδα, ενώ αυξάνοντας τα άτομα υδρογονανθράκων στην αλυσίδα, συναντάμε την **βαλίνη**, τη **λευκίνη** και την **ισολευκίνη**. Περνώντας στα μη πολικά αρωματικά αμινοξέα, έχουμε την εξαιρετικά υδρόφοβη **φαινυλαλανίνη**, που περιέχει ένα φαινολικό δακτύλιο στην μεθυλενική ομάδα. Οι μεγαλύτερες αυτές πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων, εισάγουν υδροφοβικότητα και δίνουν τη δυνατότητα να πλησιάζουν ή μια την άλλη με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις για να αποφύγουν το πολικό περιβάλλον, δημιουργώντας έτσι πολύ συμπαγείς δομές με ελάχιστους κενούς χώρους.



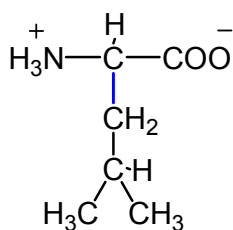
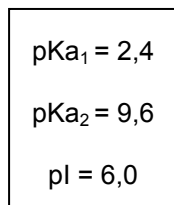
**Gly**



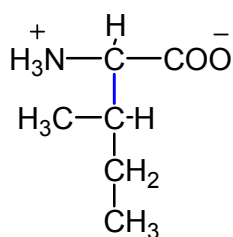
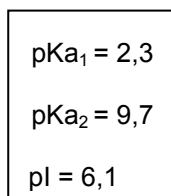
**Ala**



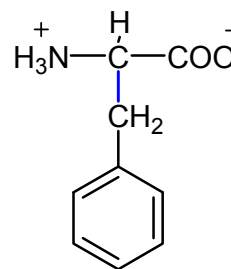
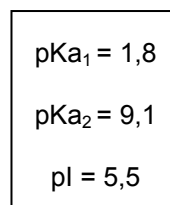
**Val**



**Leu**

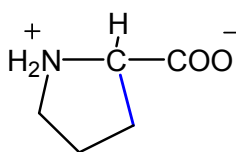


**Ile**

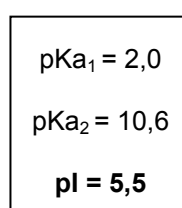


**Phe**

Η **προλίνη** έχει αλειφατική κυκλική πλευρική ομάδα και αποτελεί το μοναδικό φυσικό δευτεροταγές αμινοξύ. Διαφέρει από τα άλλα, στο ότι η πλευρική της αλειφατική αλυσίδα συνδέεται στο άτομο του αζώτου, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός πυρρολιδινικού δακτυλίου που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την πρωτεϊνική αρχιτεκτονική. Συχνά στα σημεία που υπάρχουν κατάλοιπα (πλευρικές ομάδες αμινοξέων) προλίνης κάμπτονται οι πρωτεϊνικές αλυσίδες ενώ συναντάται επίσης σε β-στροφές (b-turns) και ω-θηλιές (ω-loops), συνδέοντας παράλληλα ή αντιπαράλληλα β-φύλλα. Υιοθετεί αυτή την διαμόρφωση λόγω ελλείψεως δεσμού N-H και άρα δεσμών υδρογόνου, που επιτρέπει στα κατάλοιπα προλίνης να περιστρέφονται γύρω από τον πεπτιδικό δεσμό και να λαμβάνουν δυο μορφές, μια αριστερόστροφη και μια δεξιόστροφη. Τέτοια διαμόρφωση υιοθετούν επίσης και τα κατάλοιπα γλυκίνης, αλλά για λόγους συμμετρίας.

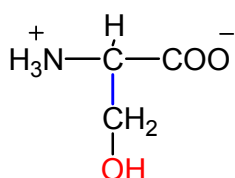
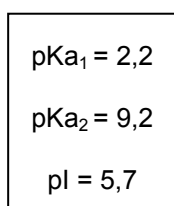


**Pro**

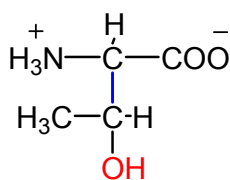
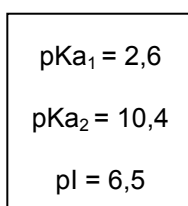


Στην ομάδα των ουδέτερων πολικών αμινοξέων, με χαρακτηριστική ομάδα **-OH**, που τις κάνει πιο υδρόφιλες και δραστικές, κατατάσσονται η **σερίνη** και η **θρεονίνη** με αλειφατικές υδροξυλικές ομάδες, και η **τυροσίνη** με το υδροξύλιο σε φαινολικό δακτύλιο. Ο αρωματικός δακτύλιος της τυροσίνης

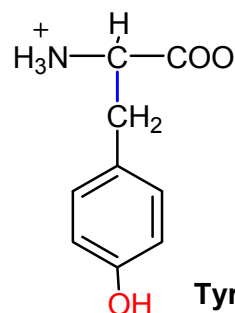
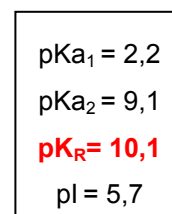
που περιέχει υδροξυλομάδα, την κάνει λιγότερο υδρόφοβη από την φαινυλαλανίνη. Στα αμινοξέα με χαρακτηριστική ομάδα  $-SH$  στις πλευρικές αλυσίδες, συναντάμε την **κυστεΐνη**, με σουλφυδρυλική ομάδα στο μεθυλένιο και την **μεθειονίνη**, με το άτομο θείου σε δεσμό θειο-αιθέρα. Υπάγονται επίσης στην ομάδα των 8 ουδέτερων αμινοξέων, η εξαιρετικά υδρόφοβη **τρυπτοφάνη**, με ινδολικό δακτύλιο στην μεθυλενική ομάδα, καθώς επίσης και τα μη φορτισμένα παράγωγα του γλουταμικού και ασπαρτικού οξέως, η **γλουταμίνη** και η **ασπαραγγίνη**, που περιέχουν ω-τελική αμιδική ομάδα.



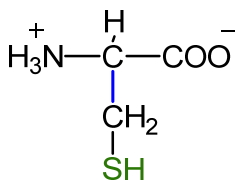
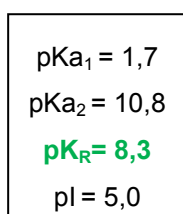
**Ser**



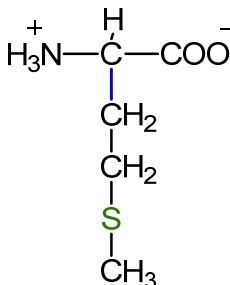
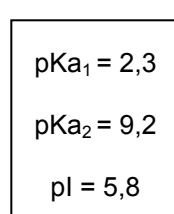
**Thr**



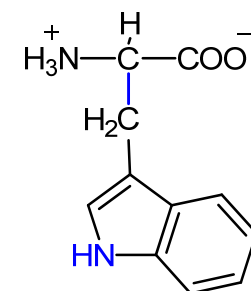
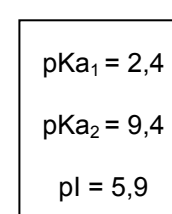
**Tyr**



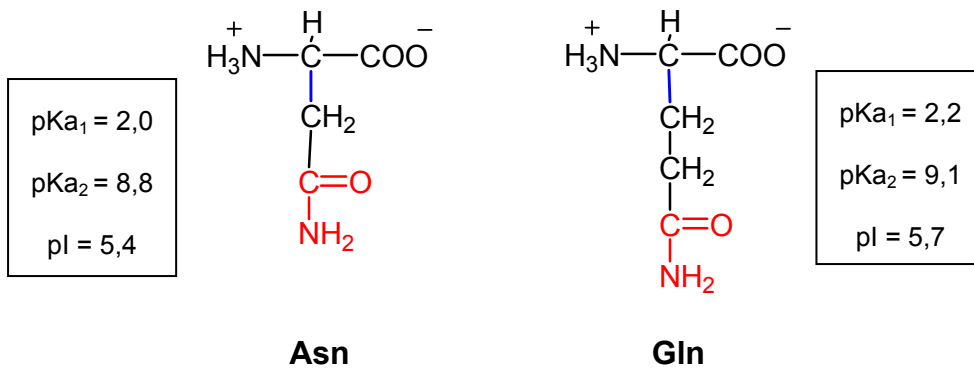
**Cys**



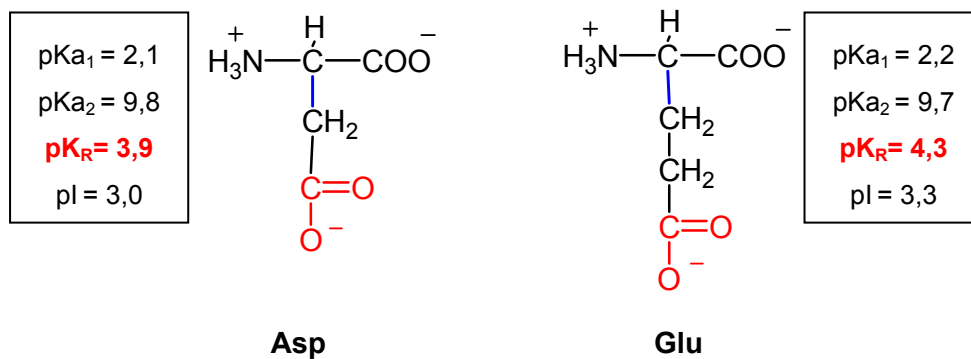
**Met**



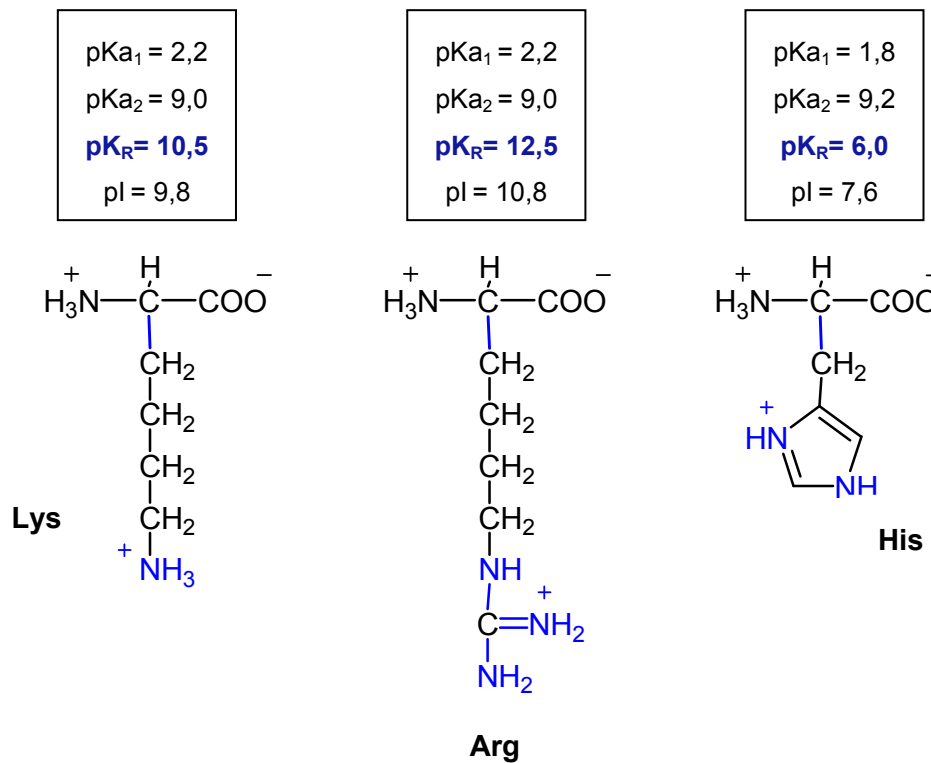
**Trp**



Όξινα αμινοξέα, με υδρόφιλες πολικές πλευρικές αλυσίδες αποτελούν το **ασπαρτικό οξύ** και το **γλουταμικό οξύ**. Οι πλευρικές ομάδες αυτών σε φυσιολογικό pH είναι σχεδόν πάντα αρνητικά φορτισμένες. Βασικά αμινοξέα, αποτελούν η **λυσίνη** και η **αργινίνη** που είναι φορτισμένες θετικά σε ουδέτερο PH, ενώ η **ιστιδίνη** ανάλογα με το άμεσο περιβάλλον της, μπορεί να είναι αφόρτιστη ή φορτισμένη θετικά. Εντοπίζεται πολύ συχνά στο ενεργό κέντρο των ένζυμων όπου συνδέεται με μέταλλα, με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο να μπορεί να αλλάζει γρήγορα μεταξύ των δυο αυτών καταστάσεων, καταλύοντας έτσι την δημιουργία ή την διάσπαση δεσμών.





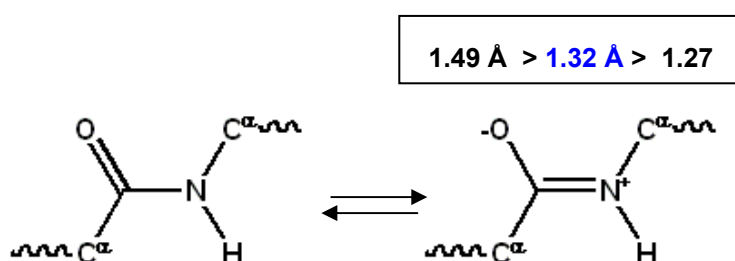


Γενικότερα, το φορτίο των αμινοξέων ποικίλει ανάλογα με το pH. Παρατηρώντας τα  $pK_{a1}$  και  $pK_{a2}$  της καρβοξυλομάδας και της αμινομάδας αντίστοιχα του βασικού κορμού του μορίου, βλέπουμε πως σε φυσιολογικό pH είναι και οι δυο φορτισμένες  $-\text{COO}^-$  και  $-\text{NH}_3^+$ , σχηματίζοντας ένα εσωτερικό αλάτι (zwitterion). Το pH στο οποίο το συνολικό φορτίο του αμινοξέως είναι μηδέν, ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο  $pI$  και είναι χαρακτηριστικό για κάθε αμινοξύ.

Όλα τα αμινοξέα είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, είτε από φυσικές πηγές είτε χημικώς παρασκευαζόμενα σε περιπτώσεις που είναι δύσκολο να παραληφθούν ή βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στην φύση (όπως τα D-ισομερή). Τα L-ισομερή λαμβάνονται συνήθως από όξινη υδρόλυση πρωτεϊνών με  $\text{HCl}$  6N ή από αλκαλική υδρόλυση με  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  6N είτε από υδρόλυση με πρωτεολυτικά ένζυμα. Η τελευταία μέθοδος είναι σαφώς η καλλίτερη, καθώς απομονώνονται οπτικώς καθαρά αμινοξέα (χωρίς να λαμβάνει χώρα ρακεμίωση) χωρίς να καταστρέφονται. Διαχωρισμός και καθαρισμός των αμινοξέων γίνεται είτε με χημικές μετατροπές, είτε με καταβύθιση, είτε με χρωματογραφικές μεθόδους καθώς και με ηλεκτροφόρηση, βάσει του ισοηλεκτρικού σημείου κάθε αμινοξέος.

## 2.2 Δομές και λειτουργίες Πρωτεϊνών

Στις πρωτεΐνες τα μονομερικά στοιχεία που είναι τα αμινοξέα, βρίσκονται ενωμένα μεταξύ τους με αμιδικό δεσμό, σχηματίζοντας πολυπεπτιδικές αλυσίδες χωρίς διακλαδώσεις. Ο πεπτιδικός αυτός δεσμός μεταξύ της α-καρβοξυλομάδας του ενός αμινοξέως και της α-αμινομάδας του διπλανού του μονομερούς, απελευθερώνει ένα μόριο νερού (πολυσυμπύκνωση) κατά την δημιουργία του. Σημαντική ανακάλυψη είναι ότι ο **πεπτιδικός δεσμός** μεταξύ του καρβονυλίου και του αζώτου είναι **άκαμπτος** και **επίπεδος** έχοντας χαρακτήρα **μερικώς διπλού δεσμού** (σχήμα 3). Το γεγονός αυτό εμποδίζει την ελευθέρια περιστροφή γύρω από τον δεσμό και μειώνει τόσο την δραστικότητα του, καθιστώντας αυτόν κινητικά σταθερό. Το φορτισμένο οξυγόνο του αμιδικού δεσμού, συμβάλει επίσης στον σχηματισμό ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου.



Σχήμα 3: Ο άκαμπτος πεπτιδικός δεσμός των πρωτεϊνών έχει χαρακτήρα μερικώς διπλού δεσμού.

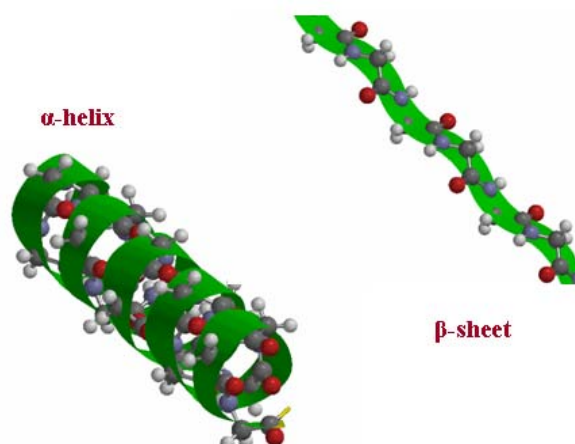
Οι πρωτεΐνες έχουν μια μοναδική αλληλουχία αμινοξέων που καθορίζεται γενετικά και επηρεάζει τις βιολογικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των. Η καθορισμένη αυτή αλληλουχία συνιστά την λεγόμενη πρωτοταγή δομή, η οποία καθορίζεται από τα γονίδια και πληροφορεί για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Ο τρόπος με τον οποίο τα **τμήματα** της πεπτιδικής αλυσίδας αναδιπλώνονται λόγω αλληλοεπιδράσεων και προσανατολίζονται στο χώρο ώστε να αποκτήσει το μόριο καθορισμένη τρισδιάστατη δομή, καθιστά την δευτεροταγή δομή, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση του σε αμινοξέα. Αυτή μαζί με τα ανώτερα επίπεδα οργάνωσης καθορίζουν τις χημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης. Έτσι η

διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης σε νερό, κατευθύνεται από την τάση των υδρόφοβων ομάδων να απομακρυνθούν από το υδάτινο περιβάλλον, με τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες να αναδιπλώνονται έτσι ώστε τα υδρόφοβα τμήματα να εισέρχονται στο εσωτερικό της ενώ οι πολικές ομάδες προς το νερό.

Ο τρόπος περιέλιξης **ολόκληρου** του μορίου συνολικά στο χώρο περιγράφεται από την λεγόμενη τριτοταγή δομή, η οποία πληροφορεί για τις αναδιπλώσεις περιοχών μεταξύ α-ελικών και β-πτυχωτών επιφανειών και χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ μακρινών κατάλοιπων της ίδιας πρωτεΐνης, καθώς και από δυνάμεις van der waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Τέλος η τεταρτοταγής δομή, αναφέρεται στον τρόπο αλληλεπίδρασης πολλών πρωτεϊνικών μορίων (υπομονάδων) μεταξύ τους μη ομοιοπολικώς, με τον σχηματισμό μεγάλων δομικών συσσωματωμάτων. Οι περιοχές επαφής μεταξύ των υπομονάδων έχουν πολλές φορές λειτουργική σημασία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τεταρτοταγούς δομής είναι η αιμοσφαιρίνη και η τριπλή έλικα του κολλαγόνου.

Οι δυο βασικές περιοδικές δευτεροταγείς δομές που απαντώνται στις πρωτεΐνες είναι η α-έλικα και η β-πτυχωτή επιφάνεια<sup>45</sup>. Η **α-έλικα** (α-helix) είναι δεξιόστροφη και έχει δομή **ράβδου**, με την ελιγμένη κύρια αλυσίδα να σχηματίζει το εσωτερικό της και τις πλευρικές αλυσίδες να εκτείνονται προς τα έξω, διαμορφωμένες σε έλικα. Η διαμόρφωση α-έλικας σταθεροποιείται με 'ενδομοριακούς' δεσμούς υδρογόνου μεταξύ -NH και -CO που απέχουν 4 κατάλοιπα στην κύρια αλυσίδα (n+4), με κάθε κατάλοιπο να απέχει από το επόμενο **1,5 Å** και να είναι στραμμένο 100° σε σχέση με τον κύριο άξονα ενώ το βήμα της έλικας είναι 3,6 αμινοξέα (5,4 Å). Η διαλεύκανση της δομής της α-έλικας με περίθλαση ακτινών X, από τους Pauling και Corey αποτέλεσε ορόσημο της μοριακής βιολογίας, γιατί απέδειξε ότι η στερεοδιάταξη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μπορεί να προβλεφθεί, αν οι ιδιότητες των συστατικών της είναι γνωστές. Την ίδια χρονιά, οι ίδιοι επιστήμονες ανακάλυψαν την **β-πτυχωτή** (β-sheet), δομή ανοικτή και **επίπεδη** με δεσμούς υδρογόνου να σχηματίζονται 'διαμοριακά' μεταξύ -NH και -CO διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων (σχήμα 4). Η απόσταση μεταξύ των γειτονικών αμινοξέων είναι **3,5 Å** σε αντίθεση με το 1,5 Å της α-έλικας, ενώ οι

γειτονικές αλυσίδες σε μία β-πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες).



Σχήμα 4: Οι κυριότερες δευτεροταγείς δομές των πρωτεϊνών.

Άλλες περιοδικές δομές που σχηματίζονται είναι η **β-στροφή** (β-turn), με δομή φουρκέτας όπου έχουμε σχηματισμό δεσμών υδρογόνου στην ίδια αλυσίδα μεταξύ δότη και δέκτη να απέχουν 3 κατάλοιπα ( $n+3$ ), και η **ω-θηλιά** (ω-loop), που αναφέρεται σε ένα μεγαλύτερο βρόγχο που συνδέει πρωτεϊνικά τμήματα και στον οποίο δεν σχηματίζονται ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου. Αυτές οι δυο δομές υιοθετούνται τόσο από κατάλοιπα προλίνης όσο και από κατάλοιπα γλυκίνης (για διαφορετικούς λόγους) και συνήθως συνδέουν παράλληλα ή αντιπαράλληλα β-φύλλα μεταξύ τους. Ως παράγοντες σταθερότητας, συμβάλουν στο να αποκτήσουν οι σφαιρικές πρωτεΐνες (κυρίως ένζυμα) το συμπαγές τους σχήμα. Ενώ όμως τα κατάλοιπα προλίνης υιοθετούν αυτήν την διαμόρφωση για στερεοχημικούς λόγους (δυσκαμψία) αλλά και λόγω ελλείψεως δόησης δεσμών υδρογόνου, στην γλυκίνη τα δυο υδρογόνα του  $C^\alpha$  είναι συμμετρικά, επιτρέποντας την ελεύθερη περιστροφή (ευκαμψία) γύρω από τον πεπτιδικό δεσμό.

Η τάση ενός πεπτιδίου για δευτεροταγή δομή, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση του σε αμινοξέα<sup>46</sup>. Οι σχετικές πιθανότητες να εμφανιστεί ένα κατάλοιπο αμινοξέος σε δευτεροταγή δομή έχουν προσδιοριστεί<sup>47</sup> και αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα 1. Η δημιουργία α-

έλικας προτιμάται από την λυσίνη, την ιστιδίνη, το γλουταμικό, την αλανίνη και την λευκίνη, ενώ β-πτυχωτή υιοθετείται κυρίως από την βαλίνη, την ισολευκίνη, την φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη. Αυξημένη πιθανότητα για β-στροφή παρουσιάζουν η γλυκίνη και προλίνη, ενώ η αργινίνη παρουσιάζει περίπου την ίδια πιθανότητα να βρεθεί σε οποιαδήποτε από τις τρεις δευτεροταγής δομές.

Πίνακας 1: Συχνότητα εμφάνισης αμινοξέων (%) στη δευτεροταγή δομή πρωτεϊνών.

Αμινοξύ	Σύντμηση	α-έλικα	β-πτυχή	β-στροφή
Μεθειονίνη	Met	1,47	0,97	0,39
Γλουταμικό	Glu	1,44	0,75	1,00
Λευκίνη	Leu	1,30	1,02	0,59
Αλανίνη	Ala	1,29	0,90	0,78
Γλουταμίνη	Gln	1,27	0,80	0,97
Λυσίνη	Lys	1,23	0,77	0,96
Ιστιδίνη	His	1,22	1,08	0,69
Κυστεΐνη	Cys	1,11	0,74	0,80
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
Θρεονίνη	Thr	0,82	1,21	1,03
Τρυπτοφάνη	Trp	0,99	1,14	0,75
Προλίνη	Pro	0,52	0,64	1,91
Γλυκίνη	Ser	0,56	0,92	1,64
Ασπαρτικό	Asp	1,04	0,72	1,41
Σερίνη	Ser	0,82	0,95	1,33
Ασπαραγγίνη	Asn	0,90	0,76	1,28
Αργινίνη	Arg	0,96	0,99	0,88

## 2.3 Πεπτιδική σύνθεση

### 2.3.1 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με συγκεκριμένη αλληλουχία

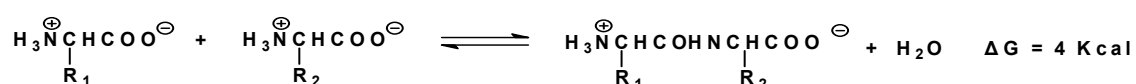
Τα πεπτίδια ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων που συμμετέχουν στην αλυσίδα διακρίνονται σε ολιγοπεπτίδια και πρωτεΐνες. Κατά παραδοχή, μόρια μέχρι πενήντα αμινοξέα θεωρούνται ως πεπτίδια, ενώ τα μεγαλύτερα ως πρωτεΐνες. Αρχικά τα πεπτίδια αντιμετωπίστηκαν ως μοντέλα για την συνθετική προσέγγιση και την μελέτη πρωτεϊνών και το πρώτο πεπτίδιο βιολογικής δράσης να συντίθενται στα μέσα τις δεκαετίας του '50.

Η σύνθεση 'πεπτιδίων καθορισμένης αλληλουχίας' είναι ουσιαστική για αρκετούς λόγους. Πρώτον, τα συνθετικά πεπτίδια μπορούν να αποκαλύψουν τους κανόνες που καθορίζουν την τρισδιάστατη στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών. Μπορούμε να ερευνήσουμε αν μια συγκεκριμένη αλληλουχία διαμορφώνεται σε α-έλικα, β-επιφάνεια, ή στροφή φουρκέτας ή αν συμπεριφέρεται σαν τυχαίο σπείραμα. Δεύτερον, πολλές ορμόνες και άλλα μηνυματοφόρα μόρια είναι πεπτίδια από την φύση τους. Η βαζοπρεσίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που ενεργοποιεί την επαναπροσρόφηση του νερού στα νεφρά, ενώ τα λευκοκύτταρα του αίματος έλκονται προς τα βακτήρια μέσω πεπτιδίων που προκύπτουν από την διάσπαση βακτηριακών πρωτεϊνών. Τα συνθετικά πεπτίδια έχουν αποδειχθεί χρήσιμα στον προσδιορισμό του υποδοχέα αυτής της τάξης των πεπτιδίων που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Επίσης, προσδεμένα σε κόκκους αραγόζης χρησιμοποιούνται για την δημιουργία στηλών χρωματογραφίας για το καθάρισμα πρωτεϊνών του υποδοχέα, που αναγνωρίζει ειδικά, αυτά τα πεπτίδια. Τέταρτον, τα συνθετικά πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα και ως αντιγόνα στην παραγωγή ειδικών αντισωμάτων. Συντίθενται με τους παρακάτω τρόπους:

- Σύνθεση σε διάλυμα
- Αυτοματοποιημένες μεθόδους στερεάς φάσης
- Τεχνική ανασυνδιασμένου DNA

### 2.3.1.1 Σύνθεση σε διάλυμα

Κατά το σχηματισμό των πεπτιδίων, η καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέος ενώνεται με την αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέως με ένα πεπτιδικό δεσμό. Ο σχηματισμός συνδέεται με απώλεια ενός μορίου νερού και απεικονίζεται στο σχήμα 5. Η ανάπτυξη της πεπτιδικής αλυσίδας γίνεται με την προσθήκη ενός αμινοξέως κάθε φορά είτε από την πλευρά της αμινομάδας είτε από την πλευρά του καρβοξυλίου. Η ισορροπία αυτής της αντίδρασης βρίσκεται προς την πλευρά της υδρόλυσης παρά της σύνθεσης. Η βιοσύνθεση πεπτιδικών δεσμών απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, ενώ η υδρόλυση απελευθερώνει ενέργεια. Εκτός όμως από το επιθυμητό διπεπτίδιο μπορούν να σχηματισθούν ακόμα και μεγαλύτερα πεπτίδια, καθώς και άλλα προϊόντα από την πολυσυμπύκνωση.



Σχήμα 5: Σχηματισμός διπεπτιδίου με απώλεια νερού.

Για την ελεγχόμενη σύνθεση ακόμη και του απλούστερου διπεπτιδίου απαιτείται η προστασία του N<sup>α</sup> της αμινομάδας του ενός αμινοξέως και του C<sup>α</sup> της καρβοξυλομάδας του άλλου, με κατάλληλες προστατευτικές ομάδες<sup>48</sup>. 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 δραστηκής πλευρικής ομάδας. Ενώ όμως οι πλευρικές ομάδες πρέπει να παραμένουν προστατευμένες καθ'όλη την διάρκεια της σύνθεσης, η α-προστατευτική ομάδα (αμινομάδα ή καρβοξυλομάδα) θα πρέπει να απομακρύνεται εύκολα πριν από κάθε σύζευξη. Επομένως χρειάζονται δύο είδη ομάδων που να έχουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς τα αντιδραστήρια αποπροστασίας. Μετά το τέλος της σύνθεσης, οι προστατευτικές ομάδες πρέπει να απομακρυνθούν, για να ληφθεί το επιθυμητό πεπτίδιο, το οποίο και καθαρίζεται από τα παραπροϊόντα. Κατά

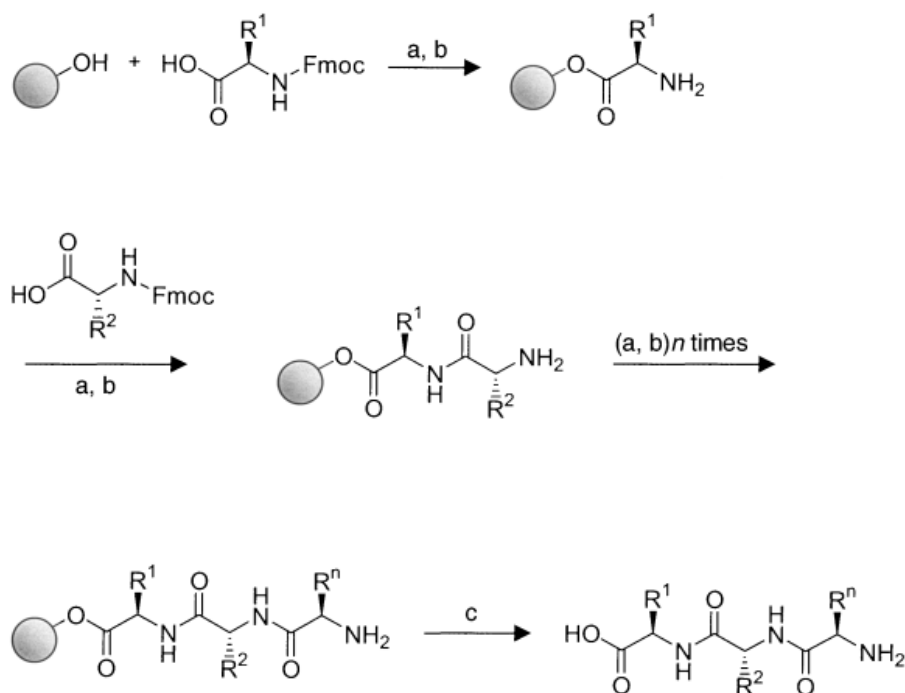


συνέπεια, η επιλογή των προστατευτικών ομάδων που θα χρησιμοποιηθούν είναι πολύ σημαντική για την επιτυχή σύνθεση των πεπτιδίων και εξαρτάται από τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνσή τους. Βασικό επίσης είναι οι συνθήκες αποπροστασίας να είναι τέτοιες ώστε το πεπτίδιο να είναι σταθερό και να μην προκαλείται ρακεμίωση. Στο πεδίο αυτό, είναι τεράστια η συμβολή του Ζέρβα και του Bergmann.

Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η **μέγιστη προστασία όλων των δραστικών ομάδων** που αυξάνει τις πιθανότητες για αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων, ενώ μειονέκτημα η δυσκολία απομάκρυνσης των προστασιών στο τέλος της σύνθεσης καθώς και η αυξημένη δυσδιαλυτότητα που παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα πεπτίδια. Για τον λόγο αυτό στην σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων, εφαρμόζεται η ελάχιστη προστασία.

### 2.3.1.2 Σύνθεση σε στερεά φάση (Μέθοδος Merrifield)<sup>49-51</sup>

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). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, η αναπτυσσόμενη πεπτιδική αλυσίδα είναι ενωμένη με χημικό δεσμό σε ένα 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 την επιπλέον ενεργοποίηση του καρβοξυλίου με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης όπως το δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC) και την αντίδραση μίας ελεύθερης αμινομάδας με το ενεργό καρβοξύλιο για την δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού.



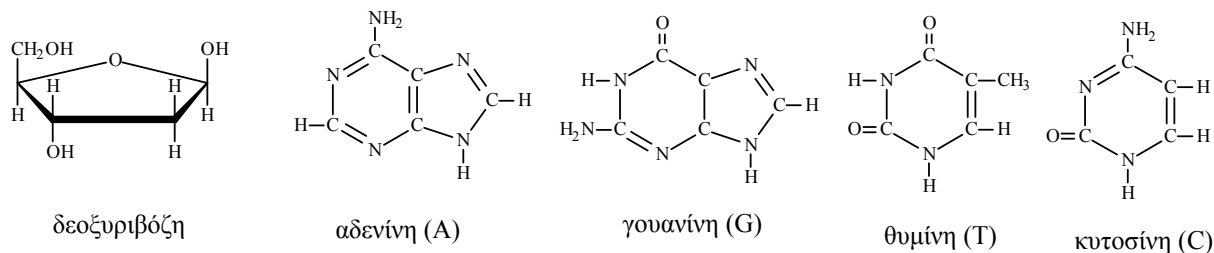
**Σχήμα 6:** Αρχικά συζεύγνυται το προστατευμένο αμινοξύ στην ρητίνη. Στην συνέχεια ακολουθεί αποπροστασία, έκπλυση, προσθήκη νέου αμινοξέως και αντιδραστηρίου σύζευξης και πάλι έκπλυση. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τόσες φορές, όσα τα αμινοξέα που θέλουμε στην αλυσίδα. Τέλος αποσπάται το πεπτίδιο από την ρητίνη.

Συνήθως ως στερεά φάση χρησιμοποιείται δικτυωμένο πολυστυρένιο με μια δραστική ομάδα ανά εκατό αρωματικούς δακτυλίους. 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 όσα είναι τα αμινοξέα που θέλουμε να προσθέσουμε στην αλυσίδα (σχήμα 6), 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'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο (DCC), αλλά σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως το N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC), διότι είναι πιο διαλυτό στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες και απομακρύνεται ευκολότερα.

Πλεονεκτήματα της σύνθεσης σε στερεή φάση, αποτελούν η μεγάλη ταχύτητα του, η αποφυγή δυσδιαλυτότητας, η αύξηση της απόδοσης και η δυνατότητα αυτοματισμού σε βάση ρουτίνας, αφού το προϊόν σε κάθε στάδιο είναι δεσμευμένο στους κόκκους της ρητίνης και μπορεί να ξεπλυθεί, χωρίς να υπάρχει ανάγκη να καθαριστούν τα ενδιάμεσα προϊόντα. Η μεγάλη σπουδαιότητα της, οφείλεται στο ότι είναι η μοναδική μέχρι σήμερα συνθετική μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων με καθορισμένη αλληλουχία. Μειώνονται κατά πολύ τα ενδιάμεσα στάδια καθαρισμού και τα παραπροϊόντα απομακρύνονται άμεσα. Αντίθετα μειονέκτημα, αποτελούν τα πολλαπλά στάδια αποπροστασιών και συζεύξεων, η σταθερότητα του δεσμού πεπτιδίου-ρητίνης στις συνθήκες απόσπασης της α-αμινο προστατευτικής ομάδας, οι ισχυρά όξινες συνθήκες που απαιτούνται για την απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη που μπορεί να προκαλέσουν ζημιά στην πεπτιδική αλυσίδα (διάσπαση ή ρακεμίωση) και η ετερογένεια των λαμβανόμενων προϊόντων, αφού η απόδοση δεν είναι πάντα 100%, με αποτέλεσμα να απαιτείται καθαρισμός του κύριου προϊόντος από παραπροϊόντα μικρότερου μοριακού βάρους κυρίως με χρωματογραφικές μεθόδους. Επίσης με σύνθεση σε στερεά φάση δεν μπορούν να συντεθούν πεπτιδικές αλληλουχίες με περισσότερα από 20 αμινοξέα, ενώ το βασικότερο μειονέκτημα είναι ότι το τελικό προϊόν είναι της τάξης των mg. Συγκρίνοντάς το με την σύνθεση σε διάλυμα επίσης, υπάρχει περιορισμός στην επιλογή διαλυτών και προστατευτικών ομάδων.

### **2.3.1.3 Σύνθεση με τεχνική ανασυνδιασμένου DNA<sup>52,53</sup>**

Το DNA είναι ένα επίμηκες βιοπολυμερές από δεοξυνουκλεοτίδια που περιέχει τις γενετικές πληροφορίες του οργανισμού. Περιέχει ένα σάκχαρο (δεοξυριβόζη), μια φωσφορική ομάδα και μια βάση. Οι βάσεις του DNA μεταφέρουν τις γενετικές πληροφορίες ενώ το σάκχαρο και η φωσφορική ομάδα παίζουν δομικό ρόλο και αποτελούν την κύρια αλυσίδα του πολυμερούς. Υπάρχουν τέσσερα είδη βάσεων η αδενίνη (A), η γουανίνη (G), η θυμίνη (T) και η κυτοσίνη (C) (σχήμα 7).



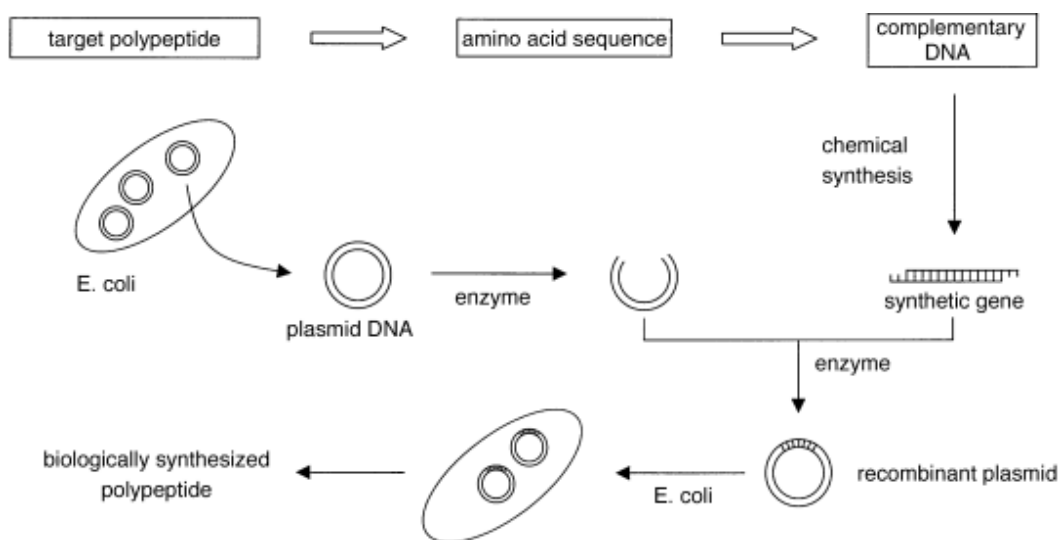
**Σχήμα 7: Οι βάσεις του DNA**

Το 1953 οι Watson και Crick ανακάλυψαν την δομή της **διπλής έλικας** του DNA και την εξειδίκευση των βάσεων όπου η αδερίνη ζευγαρώνει με την θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη λόγω δεσμών υδρογόνου και στερικών παραγόντων. Το DNA όμως δεν είναι το άμεσο εκμαγείο για την πρωτεϊνοσύνθεση. Προηγείται η διαδικασία της μεταγραφής (transcription) προς αγγελιοφόρο RNA και ακολουθεί η διαδικασία της μετάφρασης στα ριβοσώματα (translation) δηλαδή η σύνθεση των πρωτεϊνών. Η ροή των γενετικών πληροφοριών γίνεται ως εξής :



Υπάρχει σχέση μεταξύ της αλληλουχίας βάσεων του DNA και της αλληλουχίας των αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη μέσω του γενετικού κώδικα. Ένα αμινοξύ κωδικοποιείται από μια ομάδα τριών βάσεων του DNA που λέγεται κωδικόνιο. Υπάρχουν  $4^3=64$  πιθανές τριπλέτες, επομένως για τα περισσότερα αμινοξέα υπάρχουν περισσότερες από μια χαρακτηριστικές τριπλέτες δηλαδή ο γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος. Οι βάσεις διαβάζονται διαδοχικά ξεκινώντας από ένα συγκεκριμένο σημείο (που αντιστοιχεί σε χαρακτηριστική αλληλουχία) και ονομάζονται προαγωγείς (promoters). Για παράδειγμα το 1961 ο Marsall Nirenberg<sup>54</sup> ανακάλυψε ότι προσθήκη πολυουρακίλης σε ένα σύστημα ελεύθερων κυτάρων οδηγεί στην σύνθεση πολυφαινυλαλάνης, διότι το κωδικόνιο UUU κωδικοποιεί την φαινυλαλάνη. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η σύνθεση ομοπολυμερών πεπτιδίων χρησιμοποιώντας αγγελιοφόρους με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τρινουκλεοτιδίων.

Την δεκαετία του 1970 οι Berg (βραβείο Nobel το 1980), Boyer και Cohen ανέπτυξαν την “τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA”. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παρασκευή πρωτεϊνών με συγκεκριμένη αλληλουχία καθώς και την παραγωγή **μη φυσικών πολυπεπτιδικών αλληλουχιών με σχεδόν απόλυτο έλεγχο της σύστασης**. Αρχικά είναι απαραίτητη η απομόνωση του φορέα και η δημιουργία του συνθετικού γονιδίου. Μπορούν να δημιουργηθούν στο εργαστήριο και νέοι συνδυασμοί από γονίδια και να πολλαπλασιαστούν με την εισαγωγή τους σε κατάλληλα κύτταρα (κλωνοποίηση) τα οποία αναπαράγονται, χρησιμοποιώντας το DNA του ξενιστή. Η ενσωμάτωση του τμήματος του DNA γίνεται κυρίως σε φορείς που μπορούν να αναπαράγονται αυτόνομα όπως π.χ. τα πλασμίδια. Τα νέα τεχνητά γονίδια μπορούν να εκφραστούν σε μεγάλη απόδοση σε κύτταρα ξενιστών όπως τα βακτήρια (σχήμα 8).



**Σχήμα 8:** Αρχικά είναι απαραίτητη η δημιουργία του γονιδίου με συγκεκριμένη αλληλουχία που κωδικοποιεί την επιθυμητή πρωτεΐνη. Ακολουθεί ενσωμάτωση του τμήματος του DNA σε φορείς όπως τα πλασμίδια. Στην συνέχεια γίνεται εισαγωγή των πλασμιδίων σε κύτταρα ξενιστές όπως τα βακτήρια, όπου η μεταγραφή και μετάφραση τους οδηγεί σε πρωτεΐνες με μεγάλη απόδοση.

Πλεονέκτημα της μεθόδου, είναι η **παρασκευή συγκεκριμένης αλληλουχίας πρωτεϊνών με μονομοριακή κατανομή**, απαραίτητες για φαρμακευτικούς σκοπούς (όπως η ινσουλίνη) αλλά και για την σύνθεση δομικών πρωτεϊνών, ενώ μειονέκτημα, το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την δημιουργία των ανασυνδυασμένων γονιδίων και κατ'επέκταση των ανασυνδυασμένων φορέων (η όλη διαδικασία διαρκεί σχεδόν ένα χρόνο και παρακολουθείται στενά), με το είδος του κύτταρου ξενιστή να επηρεάζει σημαντικά τον χρόνο. Επίσης, η όλη διαδικασία της ανάπτυξης θα πρέπει να διακοπεί προτού τα κύτταρα εισέλθουν στην φάση του θανάτου.

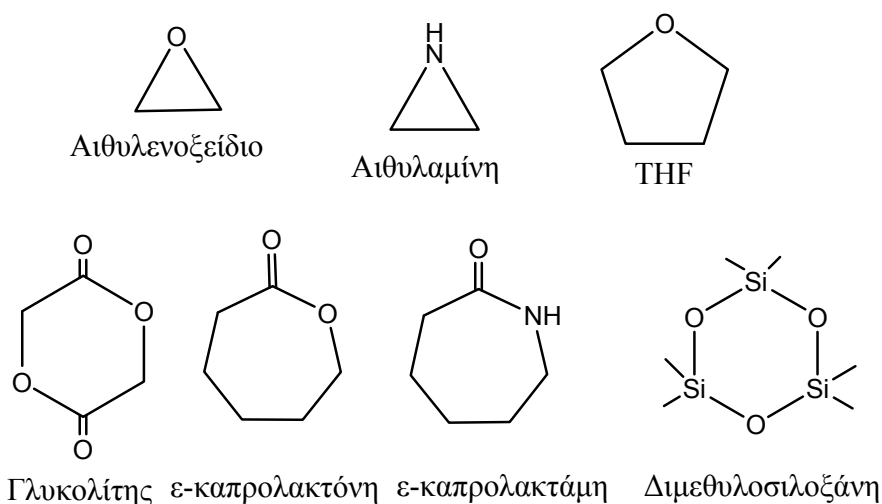
### **2.3.2 Σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία**

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους με καθορισμένο βαθμό πολυμερισμού, μοριακή σύσταση και άρα συγκεκριμένες ιδιότητες (και επομένως εφαρμογές), που να μπορούν να μιμηθούν επαρκώς τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών, περιλαμβάνει τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ring opening polymerization) των N-καρβόξυ ανυδριτών (NCA's). Η ανακάλυψη ότι οι δευτεροταγείς δομές μπορούν να ληφθούν και από απλά πολυαμινοξέα έδωσε μεγάλη ώθηση στην συνθετική παρασκευής τους. Τα πολυπεπτίδια παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά συνθετικά πολυμερή, δεδομένου ότι κατέχουν σταθερές δευτεροταγείς δομές εξαιτίας των δεσμών υδρογόνου, που συμβάλλουν έντονα στην αυτοοργανωτικό χαρακτήρα των αλυσίδων.

Συμπολυπεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων, μέσω της σύνθεσης κατάλληλης ακολουθίας πολυαμινοξέων. Βασική αρχή πίσω από τις περισσότερες μελέτες για τη σύνθεση συμπολυμερών πεπτιδίων είναι η ιδιότητα που παρουσιάζουν τα αμφίφιλα συμπολυμερή να αυτοοργανώνονται σε μικκύλια, χρησιμοποιώντας τον υδροφοβικό τους πυρήνα ως παγίδα φαρμάκων.

### 2.3.2.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (R.O.P.)

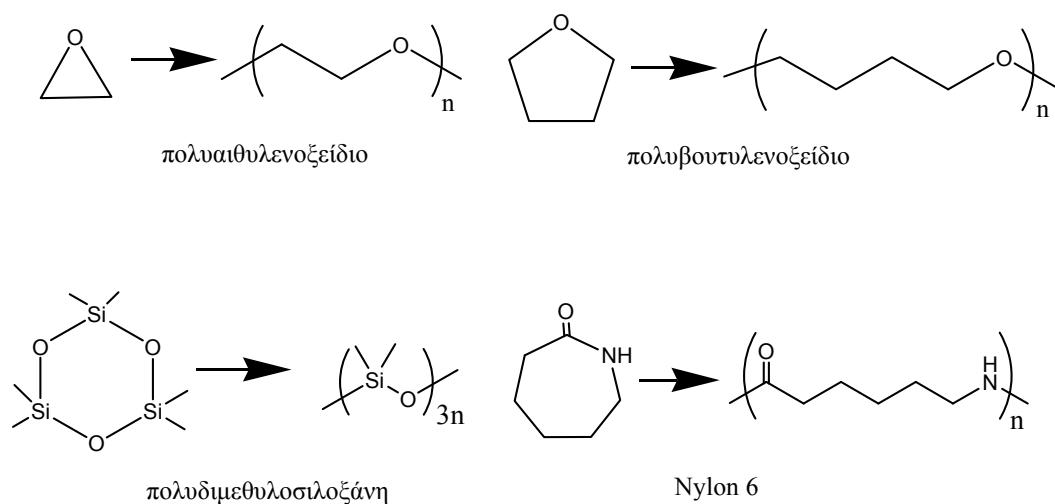
Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου αποτελεί εκείνο το είδος πολυμερισμού στο οποίο η τελική μακροαλυσίδα προέρχεται από ένα κυκλικό πρόδρομο μονομερές, κατόπιν διάνοιξης του δακτυλίου του. Τα πιο συνηθισμένα μονομερή που πολυμερίζονται με διάνοιξη δακτυλίου περιέχουν κάποιο ετεροατόμο στο δακτύλιο τους όπως O, S, N. Δεν μπορούν να πολυμεριστούν ωστόσο όλες οι κυκλικές ενώσεις. Για να γίνει αυτό εφικτό, θα πρέπει ο πολυμερισμός να ευνοείται κινητικά και θερμοδυναμικά. Αφενός μεν τα μονομερή να φέρουν μια κινητικά δραστική ομάδα που να μπορεί να αντιδράσει και αφετέρου η τάση διάνοιξης του δακτυλίου να είναι μεγάλη. Δακτύλιοι που περιέχουν 3, 4 ή 8, 9 ανθρακοάτομα, είναι πολύ στρεσαρισμένοι και ευνοείται η διάνοιξή τους. Οι εξαμελείς δακτύλιοι είναι θερμοδυναμικά οι πιο σταθεροί και σπάνια πολυμερίζονται. Πενταμελείς και εφταμελείς δακτύλιοι βρίσκονται στο ενδιάμεσο και τις περισσότερες φορές πολυμερίζονται. Αντιπροσωπευτικά μονομερή πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου δίδονται στο σχήμα 9.



Σχήμα 9: Χαρακτηριστικά παραδείγματα R.O.P μονομερών.

Πολλές φορές δεν αρκεί μόνο η διάνοιξη ενός δακτυλίου να είναι θερμοδυναμικά εφικτή. Πρέπει ταυτόχρονα να υπάρχει μια αντίδραση έναρξης του πολυμερισμού, η οποία να είναι κινητικά ευνοούμενη. Στις περισσότερες

περιπτώσεις, απαρχητές είναι πολικά ή ιοντικά είδη. Από τα κυκλικά μονομερή, το αιθυλενοξείδιο ήταν ένα από τα πρώτα μονομερή που πολυμερίστηκαν ανιοντικά. Σήμερα κυκλικά σουλφίδια, λακτόνες, λακτάμες και κυκλοσιλοξάνες μπορούν να πολυμεριστούν ανιοντικά. Εμπορικά πολυμερή που παρασκευάζονται μέσω πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου είναι αρκετά σημαντικά όπως το πολυ(αιθυλενοξείδιο), πολυ(βουτυλενοξείδιο), το νάιλον 6, η πολυ(διμεθυλοσιλοξάνη), κλπ. Μερικά χαρακτηριστικά εμπορικά πολυμερή φαίνονται στο σχήμα 10.



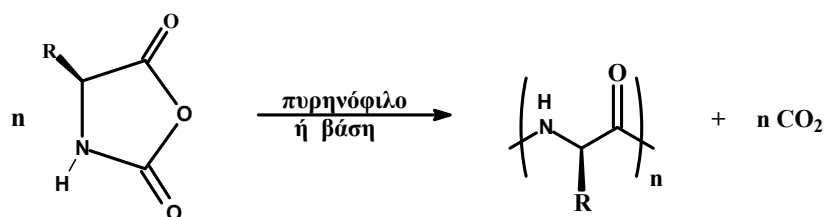
**Σχήμα 10: Μερικά χαρακτηριστικά προϊόντα R.O.P.**

### 2.3.2.2 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου NCA's α-αμινοξέων

Μέχρι σήμερα η ευκολότερη, γρηγορότερη, οικονομικότερη και εν τέλει καλλίτερη τεχνική για την σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, περιλαμβάνει την διάνοιξη δακτυλίου των N-καρβοξυ-ανυδριτών α-αμινοξέων (NCA's)<sup>10,11,55-57</sup>. Πολυπεπτίδια λαμβάνονται με αυτή την μέθοδο σε μεγάλη απόδοση και χωρίς ρακεμίωση. Ένας σημαντικός αριθμός NCA's έχει συντεθεί και πολυμεριστεί μέχρι σήμερα. Τα πολυπεπτίδια γενικά συνθέτονται από πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου NCA's α-αμινοξέων με πρωτικές (πρωτοταγείς και δευτεροταγείς) και



απρωτικές αμίνες (τριτοταγείς), βασικά άλατα, καθώς και με θερμικές και καταλυτικές μεθόδους, σύμφωνα με το σχήμα 11.



Σχήμα 11: Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβόξυ ανυδριτών (NCA's).

Επιτυχής σύνθεση πολυπεπτιδίων (που να μπορούν να μιμηθούν τις ιδιότητες των φυσικών πρωτεϊνών) με αυτή την μέθοδο δεν ήταν εφικτή για περισσότερο από 50 χρόνια, εξ'αιτίας των αναπόφευκτων αντιδράσεων τερματισμού που εμποδίζουν τον σχηματισμό επακριβώς καθορισμένων αλυσίδων. Έτσι η σύνθεση πρότυπων πολυπεπτιδίων καθώς και οι ιδιότητες αυτών ήταν περιορισμένες.<sup>10-14</sup>, με την προβλεπόμενη μίμηση των πρωτεϊνών να μην είναι η επιθυμητή, λόγω κακής οργάνωσης της δομής των αμινοξέων. Βιβλιογραφικά, η σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους από πολυμερισμό διάνοιξης NCA's αμινοξέων, αναφέρεται από έξι ομάδες που ακολουθούν διαφορετική προσέγγιση: τις ομάδες των Deming, Schlaad, Hadjichristidis-Iatrou, Klok, Gianni, και προσφάτως την ομάδα του Cheng, ενώ πολύ σημαντική είναι η συνεισφορά του συνθετικού Kricheldorf.

Μόλις το 1997, ο Deming παρουσίασε ένα επιτυχημένο καταλυτικό σύστημα πολυμερισμού N-καρβόξυ ανυδριτών, βασισμένο σε σύμπλοκα του νικελίου με πολυσχιδεΐς υποκαταστάτες<sup>15,16</sup>. Με την μέθοδο αυτή και υιοθετώντας ένα διαφορετικό μηχανισμό πολυμερισμού, κατάφερε να παρασκευάσει καλά καθορισμένα κατά συστάδες συμπολυπεπτιδία. Ο απαρχητής που χρησιμοποιεί παρέχει ενεργά κέντρα που είναι λιγότερο προσβάσιμα λόγω στερεοχημικών και ηλεκτρονιακών παραγόντων, περιορίζοντας έτσι τις παράπλευρες αντιδράσεις. Δημιούργησε δηλαδή ένα σύστημα λιγότερο ευαίσθητο σε προσμίξεις, που μπορούν να οδηγήσουν σε

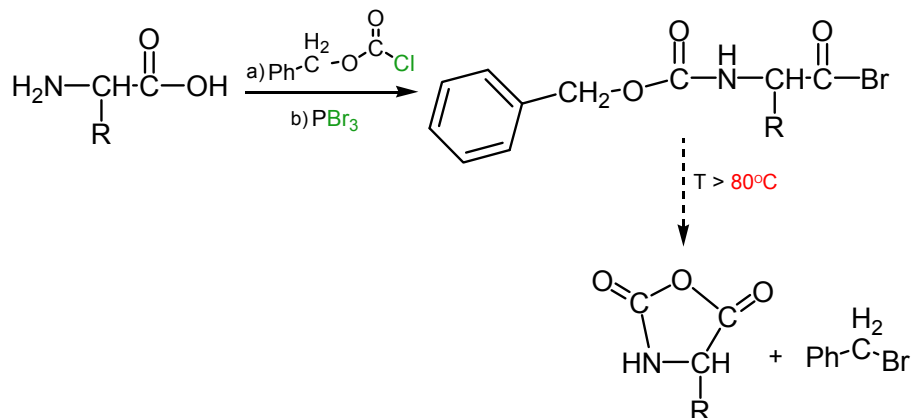
παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας. Οι δομές ωστόσο που συνέθεσε με την μέθοδο των καταλυτών, περιορίζονται σε γραμμικά συμπολυμερή χωρίς περίπλοκες αρχιτεκτονικές. Επίσης δεν είναι καθόλου σίγουρο αν αυτά τα πολυμερή είναι βιοσυμβατά, διότι απαιτείται επισταμένη απομάκρυνση του μετάλλου του καταλυτικού συστήματος από το τελικό πολυμερές, κάτι το οποίο δεν είναι ούτε εύκολο, ούτε και ποσοτικό, μειώνοντας έτσι την χρησιμότητα και τις εφαρμογές τους, καθώς ο βασικότερος λόγος παρασκευής τέτοιων πολυμερών είναι η βιοσυμβατότητα τους. Παρόλα αυτά, αποτελεί την πιο επιτυχημένη διεθνώς τεχνική παρασκευής πολυαμινοξέων.

Αντίθετα η δική μας στρατηγική περιλαμβάνει τον πολυμερισμό των NCA's των α-αμινοξέων με αμίνες όπως η η-εξυλαμίνη και η διμεθυλαμίνη, που είναι ισχυρά πυρηνόφιλα και οδηγούν την αντίδραση στο να ακολουθήσει αποκλειστικά τον κανονικό μηχανισμό. Χρησιμοποιώντας τις απαιτητικές τεχνικές υψηλού κενού για το καθαρισμό όλων των αντιδραστηρίων, των διαλυτών και των μονομερών καθώς και την διατήρηση του περιβάλλοντος αντίδρασης απαλλαγμένου από προσμίξεις, καταφέραμε να λύσουμε ένα συνθετικό πρόβλημα που ήταν πρόκληση και παρέμενε άλυτο για περισσότερο από 50 χρόνια. Τα πολυμερή που λαμβάνονται με αυτή την μέθοδο, δεν χρειάζονται το επιπλέον στάδιο καθαρισμού του καταλύτη και είναι βιοσυμβατά καθώς το μόνο που προστίθεται στο πολυμερές είναι μια μικρή αλειφατική αλυσίδα. Η τεχνική υψηλού κενού, εξασφαλίζει την υψηλή καθαρότητα όλων των αντιδραστηρίων που συμμετέχουν και διατηρεί όλες τις αναγκαίες συνθήκες για τον ζωντανό πολυμερισμό των NCA's. Με την μέθοδο αυτή είναι επίσης εφικτή, η διατήρηση ενός πολυμερούς ζωντανού για μεγάλο χρονικό διάστημα καθώς το σύστημα είναι τελείως απομονωμένο από το περιβάλλον, παρέχοντας έτσι την δυνατότητα παρασκευής συμπολυμερών καθώς και πολυμερών με πολύπλοκη αρχιτεκτονική με βάση τα πολυπεπτίδια.

Αναφέρονται δυο διαφορετικοί τρόποι ιστορικά, για την σύνθεση των NCA's. Οι N-καρβόξυ ανυδρίτες των α-αμινοξέων περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1906 από τον Hermann **Leuchs**<sup>58,59</sup>, ο οποίος στη συνέχεια

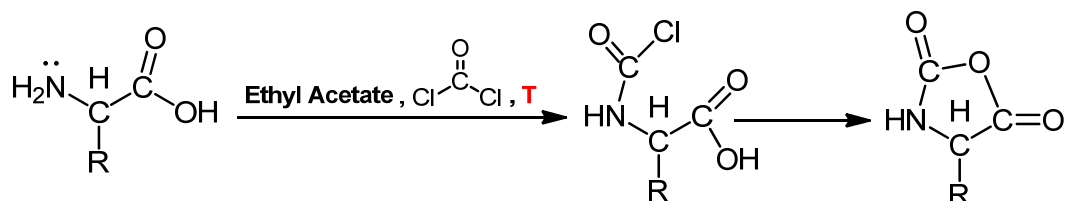
ασχολήθηκε με τον πολυμερισμό τους και κατόρθωσε να απομονώσει το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο. Εντούτοις, στα έτη προτού τον πρώτο Παγκόσμιο πόλεμο η επιστήμη των πολυμερών δεν υπήρχε και οι περισσότεροι χημικοί δεν παραδέχονταν την ύπαρξη ομοιοπολικά συνδεδεμένων μακρομορίων. Επομένως, ο Leuchs απέδωσε τα πολυπεπτίδια που παρασκεύασε ως ένα είδος συσσωματωμάτων αλακταμών και όχι ως πολυμερικές αλυσίδες αποτελούμενες από ομοιοπολικούς δεσμούς. Γύρω στο έτος του 1925, έγιναν συστηματικές μελέτες γύρω από τον πολυμερισμό των NCA's και τις ιδιότητες των συνθετικών πολυπεπτιδίων από την ομάδα του Wessely<sup>60-62</sup> στη Βιέννη. Από τότε υπήρξε συστηματική έρευνα και ένα πλήθος εργασιών αφιερώθηκαν στον πολυμερισμό πολυπεπτιδίων καθώς και στις ιδιότητες αυτών. Ομο- και συμπολυμερή παρασκευασμένα με την τεχνική διάνοιξης δακτυλίου, έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρότυπα πρωτεϊνών, ως συνθετικές ίνες και σαν υποστρώματα ενζύμων.

Η μέθοδος του Leuchs, περιλαμβάνει την κυκλοποίηση των προστατευμένων N-αλκοξυ-καρβονυλο αμινο-αλογονιδίων σε παρατεταμένη θερμοκρασία 70-90°C. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες μπορεί να υπάρξει αποσύνθεση των NCA's και διάνοιξη του δακτυλίου. Σε μια πιο βελτιωμένη έκδοση της μεθόδου, χρησιμοποιείται PBr<sub>3</sub> ως μέσο αλογόνωσης<sup>63</sup> της καρβοξυλομάδας του αμινοξέως (το Br<sup>-</sup> είναι καλή αποχωρούσα ομάδα), ενώ για την προστασία της αμινομάδας χρησιμοποιείται η ομάδα Z, που προέρχεται από αντίδραση του αμινοξέως με N-βενζυλοξυ-καρβόνυλο χλωρίδιο<sup>64</sup> (σχήμα 12). Επειδή στην μέθοδο αυτή, το καθοριστικό στάδιο είναι αλκυλίωση του Br<sup>-</sup> από το RCH<sub>2</sub> παράγωγο κατά το κλείσιμο του δακτυλίου, τα βενζυλο-παράγωγα είναι ισχυρότεροι αλκυλιωτικοί παράγοντες από τα μεθυλο ή αιθυλο παράγωγα ως περισσότερο ηλεκτρονιόφιλα και κλείνουν τον δακτύλιο γρηγορότερα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα, για την παρασκευή NCA's N<sup>ε</sup>-(Z)-λυσίνης<sup>65</sup> και N<sup>ε</sup>-(Z)-ορνιθίνης<sup>66</sup>, διότι η εκλεκτική προστασία των ω-αμινομάδων με την βενζυλοξυ καρβόνυλο ομάδα καθώς και ο σχηματισμός του δακτυλίου, γίνεται ταυτόχρονα σε ένα στάδιο παρουσία PCl<sub>5</sub>.



Σχήμα 12: Βελτιωμένο μοντέλο της μεθόδου του Leuchs για την σύνθεση N-καρβοξυ ανυδριτών.

Η πιο διαδεδομένη ωστόσο μέθοδος για την προετοιμασία των NCA's, είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον **Fuchs**<sup>67</sup> για την παρασκευή του NCA της N-φαινυλο-γλυκίνης και τροποποιήθηκε ακολούθως από τους **Farthing**<sup>68-70</sup>, **Coleman**<sup>71</sup> και **Levy**<sup>72</sup> για ένα πλήθος NCA's. Περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο, όπου στο πρώτο βήμα της αντίδρασης το αμινοξύ αντιδρά με το φωσγένιο, σχηματίζοντας πολύ γρήγορα το ενδιάμεσο N-χλωροφόρμυλο αμινοξύ (συνήθως δεν απομονώνεται), το οποίο μετατρέπεται σε N-καρβόξυ ανυδρίτη, ενώ αποδίδει  $\text{HCl}$  (σχήμα 13). Διαχωρισμός επιτυγχάνεται διότι οι ανυδρίτες είναι διαλυτοί στους περισσότερους απρωτικούς πολικούς διαλύτες, ενώ τα ελεύθερα αμινοξέα είναι αδιάλυτα.



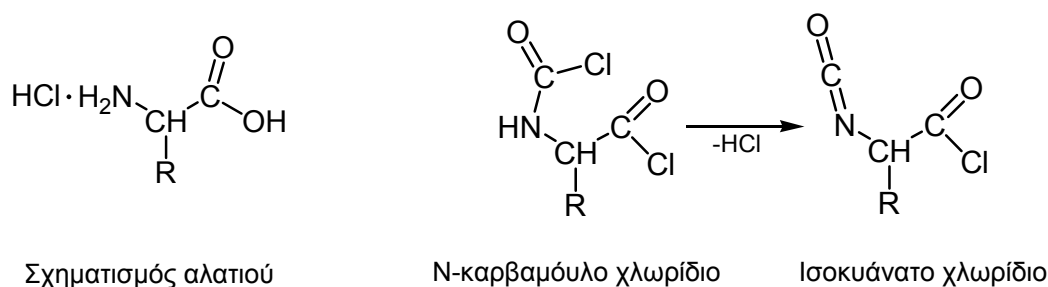
Σχήμα 13: Σύνθεση N-καρβόξυ ανυδριτών με την μέθοδο Fuchs-Farthing.

Αρχικά, το τετραυδροφουράνιο (THF) και το 1,4 διοξάνιο αποτέλεσαν τα πιο διαδεδομένα μέσα αντίδρασης. Ωστόσο και οι δύο παραπάνω διαλύτες δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις παρουσία  $\text{HCl}$  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 χλωροφόρμιο, τολουόλιο και οξικό αιθυλεστέρα, ο χρόνος αντίδρασης αυξάνεται. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε αλογονομένους υδρογονάνθρακες, το HCl παρουσιάζει μικρή διαλυτότητα<sup>73</sup> και πολλές φορές χρησιμοποιείται μείγμα THF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

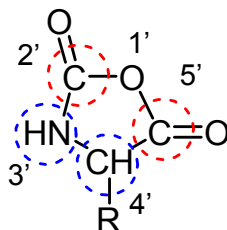
Οι παράπλευρες αντιδράσεις περιλαμβάνουν κυρίως την διάνοιξη του δακτυλίου των NCA's και λαμβάνουν χώρα λόγω **αυξημένης θερμοκρασίας, αυξημένου χρόνου αντίδρασης και υψηλής συγκέντρωσης υδροχλωρίου**, κυρίως όταν ποσότητες αμινοξέων μεγαλύτερες ( $\geq 0.5$  mol) πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Στις περισσότερες περιπτώσεις χαμηλής απόδοσης ανυδρίτη, το παραγόμενο HCl πρωτονιώνει την αμινομάδα κάποιων αμινοξέων, σχηματίζοντας **αλάτι** και εμποδίζοντας το κλείσιμο του δακτυλίου. Ακόμα όμως και να σχηματιστεί ο δακτύλιος είναι πιθανόν σε αυξημένες συγκεντρώσεις HCl, αυτό να ανοίξει τον δακτύλιο. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται μια βάση όπως Et<sub>3</sub>N για την δέσμευση του παραγόμενου HCl και την διευκόλυνση σχηματισμού του δακτυλίου. Εάν δεν εμποδιστεί η δημιουργία του αλατιού, αυτό μπορεί να αντιδράσει με το φωσγένιο δίνοντας **N-καρβαμύλο χλωρίδιο**, το οποίο βρίσκεται σε ισορροπία με το **α-ισοκυανατο χλωρίδιο**. Το τελευταίο κάτω από κατάλληλες συνθήκες, μπορεί να γίνει ακόμα και το κύριο προϊόν<sup>74</sup>. Τα τρία βασικά παραπροϊόντα (δίνονται στο σχήμα 14), είναι ελαφρώς όξινα και δύσκολα αποστάζουν. Έτσι εάν παραμείνουν στον ανυδρίτη αυτές οι προσμίξεις, θα αντιδράσουν κατά τον πολυμερισμό με τον βασικό απαρχητή, με αποτέλεσμα το σύστημα να μην είναι πλέον ζωντανό. Ο Kricheldorf αναφέρει<sup>73</sup> ότι παρουσία από ίχνη νερού είναι ευνοϊκή για τον ανυδρίτη, διότι αυτό αντιδρά με τυχόν όξινες προσμίξεις χωρίς να καταστρέφεται ο απαρχητής. Πιστεύει δηλαδή ότι πολύ καθαρά NCA's μπορούν να ληφθούν, μερικές μέρες μετά το πέρας της αντίδρασης. Τα περισσότερα NCAs έχουν κρυσταλλική μορφή σε αντίθεση με τη μορφή των προσμίξεων και επομένως δύο ή τρεις

ανακρυσταλλώσεις από κατάλληλους διαλύτες (και μη διαλύτες) αποτελούν την πιο συνηθισμένη και επαρκή διαδικασία καθαρισμού.



**Σχήμα 14:** Τα κυριότερα παραπροϊόντα κατά την σύνθεση των NCA's.

Για τον πολυμερισμό τώρα των NCA's, χρησιμοποιούνται ως απαραίτητες πρωτικές και απρωτικές αμίνες, καθώς και βασικά άλατα. Οι NCA's είναι πολύ ευαίσθητα μονομερή διότι περιέχουν στον δακτύλιο τους τέσσερα ενεργά κέντρα, δυο ηλεκτρονιόφιλα (2',5') και δυο πυρηνόφιλα (3',4'), όπως φαίνεται στο σχήμα 15.



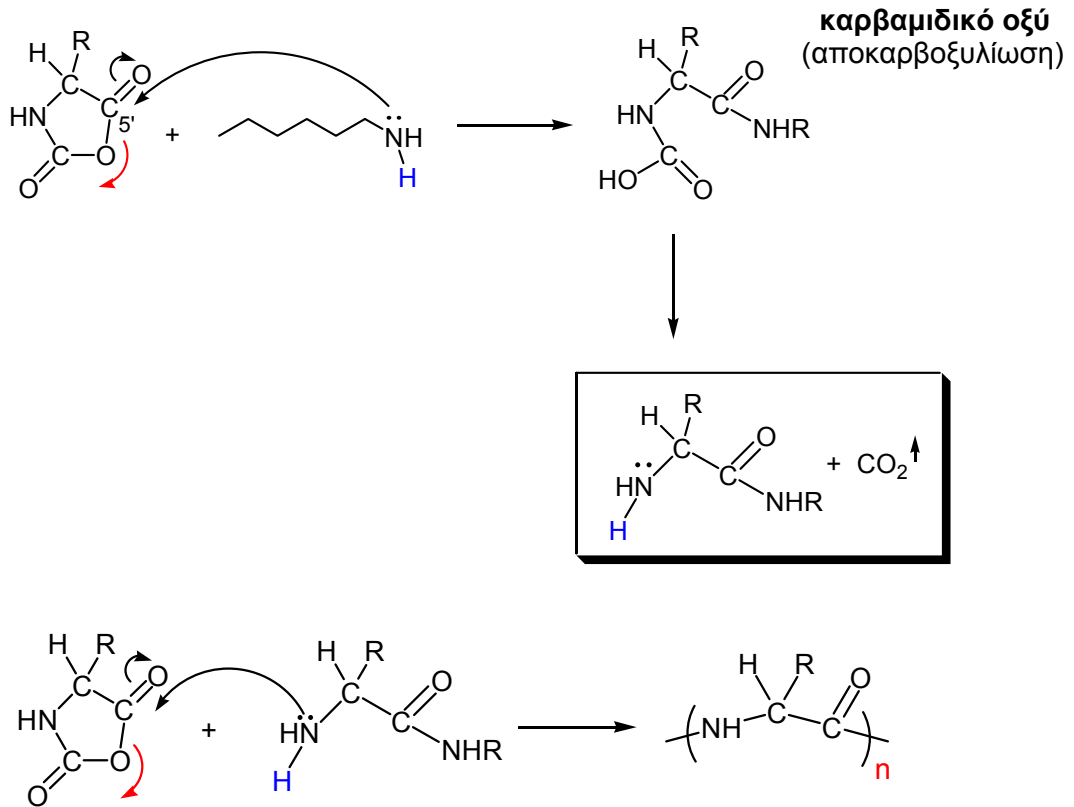
**Σχήμα 15:** Τα τέσσερα ενεργά κέντρα των NCA's, που καταδεικνύουν την μεγάλη ευαισθησία του.

Τρεις μηχανισμοί είναι γνωστοί και έχουν προταθεί για τον πολυμερισμό των NCA's από βασικούς απαραίτητες, εκ των οποίων δυο είναι οι κυριότεροι. Στην πραγματικότητα, ο πολυμερισμός δεν προχωρά μόνο με τον ένα μηχανισμό αλλά συνυπάρχουν και οι δυο, σε διαφορετικό βαθμό σε κάθε περίπτωση<sup>75-78</sup>. Καθοριστικότερο ρόλο για το ποιος από τους δύο μηχανισμούς επικρατεί κάθε φορά, παίζει ο **λόγος πυρηνοφιλικότητας / βασικότητας του απαραίτητη**. Όταν ο απαραίτητης δρα ως πυρηνόφιλο, επικρατεί ο λεγόμενος κανονικός μηχανισμός (Normal Route) και όταν δρα ως

βάση ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM).

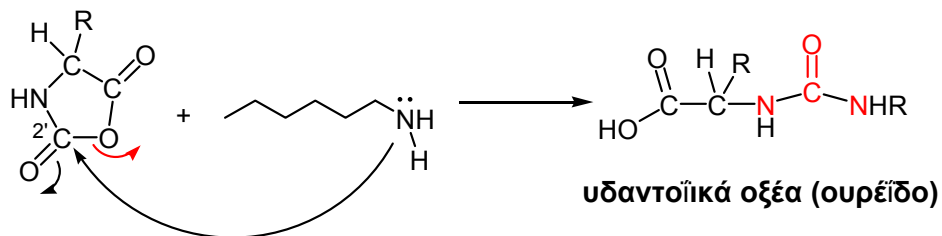
### 2.3.2.2.α Κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού (Normal Route)

Ισχύει για πυρηνόφιλους απαρχητές που έχουν τουλάχιστον ένα **ενεργό υδρογόνο** όπως είναι οι πρωτοταγείς και οι δευτεροταγείς αμίνες (χαμηλής βασικότητας, με αλειφατικούς υποκατάστατες μέχρι δυο άνθρακες), το νερό και οι αλκοόλες. Οι απαρχητές αυτοί δρουν ως πυρηνόφιλα με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται κατάλοιπα τους στις τελικές αλυσίδες. Τα ενεργά κέντρα σε αυτό το μηχανισμό είναι μη ιοντικά πυρηνόφιλα και ο πολυμερισμός γίνεται σταδιακά. Κατά το στάδιο της έναρξης ο πυρηνόφιλος απαρχητής προσβάλλει το καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Το καρβαμιδικό οξύ που παράγεται είναι θερμοδυναμικά ασταθές και αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια ελεύθερη αμινομάδα και CO<sub>2</sub> (σχήμα 16). Επειδή όμως τα μόρια της εξυλαμίνης είναι ισχυρότερα πυρηνόφιλα από τα ενεργά αμινο-τελικά άκρα της αλυσίδας, η έναρξη του πολυμερισμού γίνεται γρηγορότερα από την διάδοση, οπότε το καθοριστικό και αργό στάδιο είναι αυτό της διάδοσης του πολυμερισμού, όπου όλες οι μονομερικές μονάδες ξεκινάνε ουσιαστικά ταυτόχρονα να πολυμερίζονται, με των ίδιο αριθμό μονομερικών μονάδων να προστίθεται κάθε φορά στην αλυσίδα. Ο μηχανισμός αυτός, που προτάθηκε αρχικά από τον **Wessely**<sup>60-62</sup> και επιβεβαιώθηκε αργότερα από τον **James Watson**<sup>79</sup>, είναι σχετικά αργός και ισχύει τόσο για μη υποκατεστημένα NCA (N-H) όσο και για υποκατεστημένα (N-R). Η πυρηνοφιλικότητα της πρωτικής αμίνης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αντίδραση.



**Σχήμα 16:** Ο κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού περιλαμβάνει προσβολή του πυρηνόφιλου στον άνθρακα 5' του ανυδρίτη, αποκαρβοξυλίωση και αναγέννηση της αμινομάδας, μέχρι πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς.

Σύμφωνα με τους Sela και **Berger**<sup>80</sup>, το πυρηνόφιλο μπορεί επίσης να προσβάλει τον ανυδρίτη στην θέση 2', δίνοντας υδαντοϊκά οξέα (ουρέϊδο) στην άκρη της αλυσίδας. Η δευτερογενής αυτή αντίδραση οδηγεί στον τερματισμό του πολυμερισμού καθώς δεν γίνεται αναγέννηση της αμινομάδας στην άκρη της αλυσίδας (σχήμα 17).



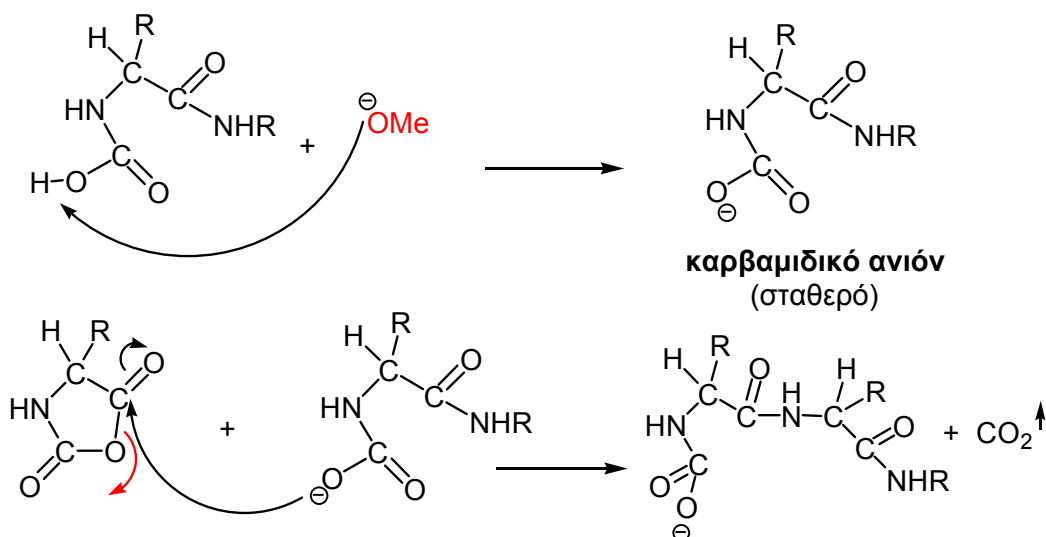
**Σχήμα 17:** Παράπλευρη αντίδραση τερματισμού με προσβολή του -CO στη θέση 2' της αλυσίδας.



Τα καλλίτερα αποτελέσματα για πρωτοταγείς απαρχητές, δίνει η n-εξυλαμίνη που προκαλεί ταυτόχρονα ταχεία έναρξη και η πιθανότητα προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' είναι μόλις 0,15%, όπως έχει υπολογιστεί για τον πολυμερισμό του NCA του γ-βενζυλο-(L)-γλουταμικού εστέρα<sup>81</sup>. Δηλαδή, μόλις 1 αλυσίδα περίπου στις 670 κατά το στάδιο της έναρξης παίρνει την λάθος πορεία που προκαλεί τερματισμό. Για τις πρωτοταγείς αμίνες θεωρητικά, εάν δεν υπήρχαν αντιδράσεις τερματισμού θα έπρεπε η αντίδραση να παρουσιάζει κινητική 1<sup>ης</sup> τάξης και ο πολυμερισμός να είναι ζωντανός.

### 2.3.2.2.β Μηχανισμός του Blout (Carbamate mechanism)

Το 1958 οι **Blout** και Idelson<sup>82</sup> πρότειναν ένα μηχανισμό για ισχυρές βάσεις (όπως το  $\text{MeO}^-\text{Na}^+$ ), σύμφωνα με τον οποίο, το σταθερό καρβαμιδικό ανιόν εκκινεί και διαδίδει τον πολυμερισμό. Το καρβαμιδικό ανιόν, είναι ικανό να εκκινήσει πολυμερισμό, μέσω πυρηνόφιλης προσβολής στην θέση 5' και διάνοιξης δακτυλίου. Επειδή όμως τα ενεργά καρβαμιδικά άκρα είναι ασθενέστερα πυρηνόφιλα σε σχέση με τα αντίστοιχα αμινο-τελικά, ο μηχανισμός αυτός είναι λιγότερο πιθανός. Εξαρτάται ωστόσο από τις συνθήκες της αντίδρασης<sup>83,84</sup> (θερμοκρασία, pH, πίεση  $\text{CO}_2$ ), αφού τόσο η πρωτονίωση όσο και η αποκαρβοξυλίωση είναι αντιστρεπτές αντιδράσεις. Τα καρβαμιδικά άλατα είναι σταθερά, σχηματίζονται εύκολα και η σταθερότητα τους εξαρτάται από την φύση του αντισταθμιστικού κατιόντος και από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του αζώτου (αυξημένη οδηγεί σε πιο σταθερά άλατα). Επίσης, στην περίπτωση εκκίνησης του πολυμερισμού με κάποια αμίνη, η παρουσία  $\text{MeO}^-\text{Na}^+$ , οδηγεί σε αποπρωτονίωση του καρβαμιδικού οξέος και παράπλευρη διάδοση με καρβαμιδικά ανιόντα (σχήμα 18).

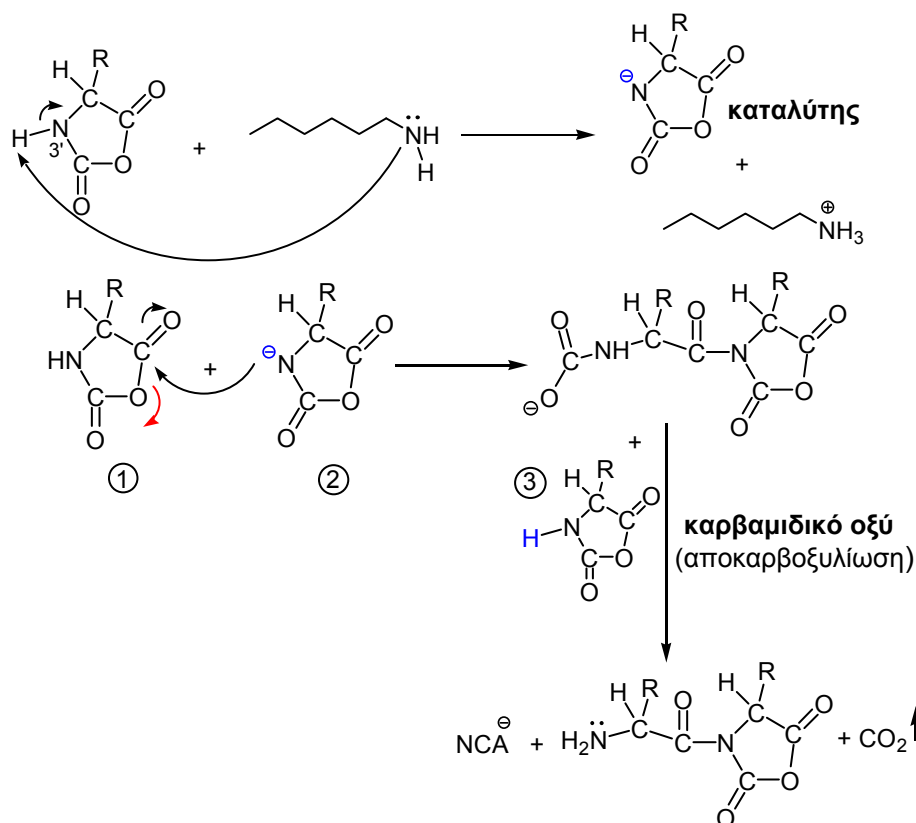


Σχήμα 18: Μηχανισμός του Blout.

### 2.3.2.2.γ Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (A.M.M)

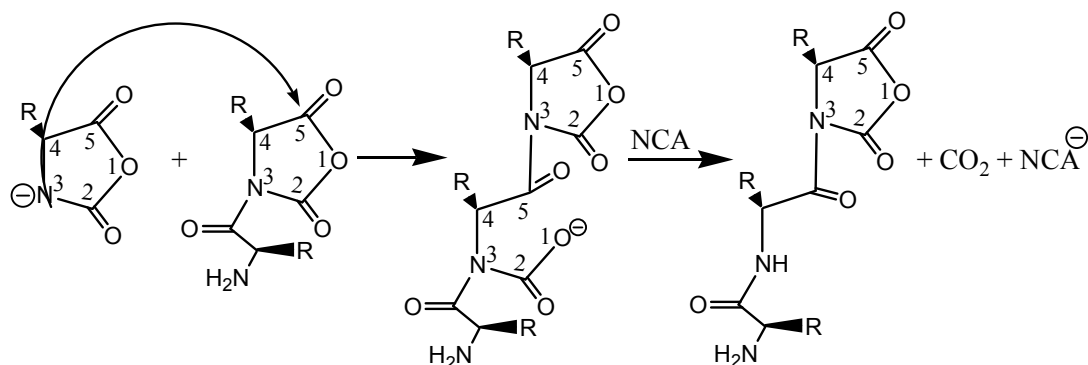
Αυξάνοντας την βασικότητα του απαρχητή, πηγαίνοντας σε τριτοταγείς αμίνες καθώς και σε δευτεροταγείς υψηλής βασικότητας (με αλειφατικούς υποκατάστατες πάνω από δύο άνθρακες), το σύστημα ακολουθεί ένα διαφορετικό μηχανισμό. Ο μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς προτάθηκε αρχικά από τους Ballard και Bamford<sup>85-87</sup> για τις τριτοταγείς αμίνες αλλά και για τις ισχυρές βάσεις<sup>88</sup> και τα μεταλλικά άλατα<sup>89</sup> για **μη υποκατεστημένα NCA** (N-H). Περιλαμβάνει την αποπρωτονίωση του δεσμού N-H του NCA από τον απαρχητή-βάση και την πυρηνόφιλη προσβολή του 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 και ο καταλύτης. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει τρία μόρια μονομερούς και αυτό που αναγεννάται κάθε φορά, είναι το ανιόν  $\text{NCA}^-$ . Ο βασικός απαρχητής επομένως δεν δρα ως απαρχητής μέσω της πυρηνοφιλικότητας του, αλλά ως καταλύτης για τον ιοντισμό του μονομερούς

σε μια αντίδραση οξέος-βάσεως, προς σχηματισμό ανιόντος που δρα ως πυρηνόφιλο. Στην περίπτωση αυτή δηλαδή, η πολυμερική αλυσίδα είναι αυτοεκκινούμενη. Επιπλέον, ο μηχανισμός αυτός, μπορεί να υφίσταται ως παράπλευρη αντίδραση, στην περίπτωση εκκίνησης του πολυμερισμού με κάποια αμίνη, όπως εξυλαμίνη (σχήμα 19).



Σχήμα 19: Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (AMM).

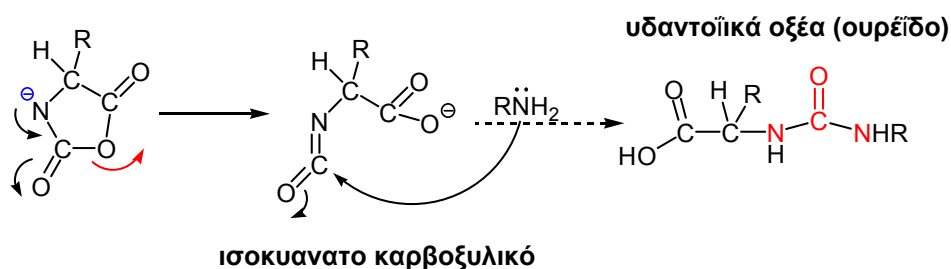
Κατά το στάδιο της διάδοσης το διμερές που σχηματίστηκε προσβάλλεται από ένα άλλο ανιόν NCA<sup>-</sup> για να δώσει τριμερές, κτλ. Το NCA<sup>-</sup> αναγεννάται σε κάθε αντίδραση (σχήμα 20). Ο μηχανισμός αυτός είναι τουλάχιστον 100 φορές γρηγορότερος από τον κανονικό μηχανισμό και δεν περιλαμβάνει ενσωμάτωση τμήματος του απαρχητή στην τελική αλυσίδα.



**Σχήμα 20:** Αντίδραση διάδοσης, όπου το  $\text{NCA}^-$  δεν έχει καμιά εκλεκτικότητα και μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα καινούργιο μονομερές.

Τα πολυτεππίδια που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο έχουν υψηλό μοριακό βάρος και μεγάλη κατανομή, διότι το ανιόν  $\text{NCA}^-$  που αναγεννάται δεν έχει καμιά εκλεκτικότητα, καθώς μπορεί να αντιδράσει είτε με την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε με ένα άλλο μονομερές, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στο τελικό προϊόν. Ο μηχανισμός αυτός δεν είναι επιθυμητός καθώς ο πολυμερισμός αυτός, απέχει πολύ από το να χαρακτηριστεί ζωντανός. Υπάρχει επίσης πλήθος συνδυασμών πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων που μπορούν να τερματίσουν τον πολυμερισμό, όπως αντιδράσεις διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας ή ισομερίωσης και ενδομοριακής κυκλοποίησης. Όπως εύκολα αντιλαμβανόμαστε, ο έλεγχος όλων αυτών των αντιδράσεων και επομένως του πολυμερισμού είναι πολύ δύσκολος.

Ο **Kopple**<sup>90,91</sup> και αργότερα οι **Seeney** και **Harwood**<sup>92</sup> καθώς και ο **Kricheldorf**<sup>93</sup>, πρότειναν ένα μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο το αρνητικά φορτισμένο άτομο του αζώτου του σχηματισθέντος καρβαμιδικού ανιόντος δίνει ηλεκτρονική πυκνότητα στο καρβονύλιο, διανοίγοντας τον δακτύλιο και σχηματίζοντας ένα ισοκυανατο καρβοξυλικό ανιόν. Αυτό μπορεί να προσβληθεί από ενεργά αμινοτελικά άκρα πολυμερικών αλυσίδων, δίνοντας υδαντοϊκά οξέα και τερματίζοντας τον πολυμερισμό (σχήμα 21).



**Σχήμα 21:** Παράπλευρη αντίδραση τερματισμού με σχηματισμό υδαντοϊκών οξέων.

Ανακεφαλαιώνοντας, όσο αυξάνεται η βασικότητα και η συγκέντρωση του απαρχητή, αυξάνεται η λάθος πορεία. Το είδος της έναρξης, εξαρτάται από τον λόγο πυρηνοφιλικότητας προς βασικότητα (κυρίως στις δευτεροταγείς αμίνες), τον λόγο  $M/I$ , καθώς και από τις συνθήκες της αντίδρασης. Η επιλογή του απαρχητή πρέπει να είναι τέτοια, ώστε αφενός μεν η ταχύτητα έναρξης να είναι πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάδοσης και αφετέρου ο απαρχητής να μην είναι πολύ βασικός για να περιορίζεται η λάθος πορεία.

### 2.3.2.3 Κινητικές μελέτες

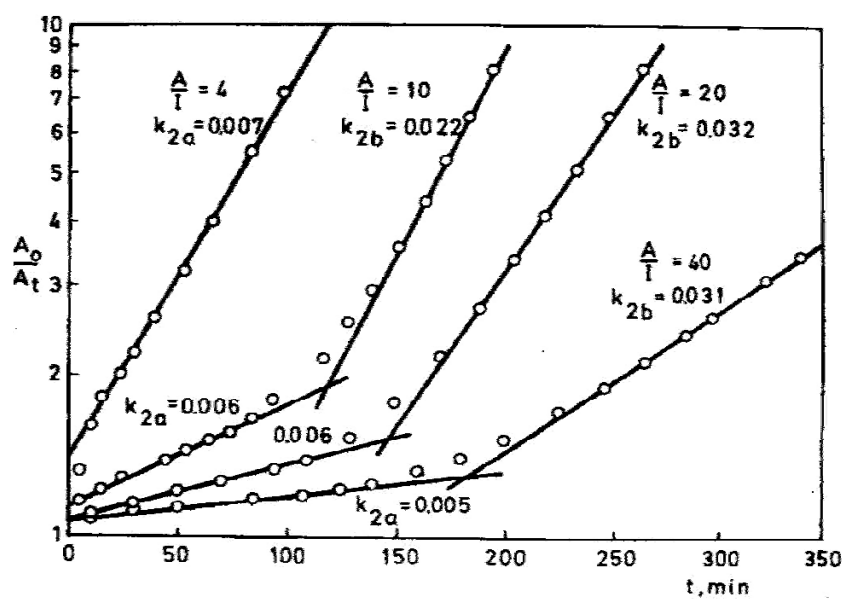
Μέθοδοι όπως το IR και το NMR δεν χρησιμοποιούνται συχνά για τις κινητικές μελέτες πολυμερισμού. Όλες οι κινητικές μελέτες που έχουν γίνει, βασίζονται στην μέτρηση του όγκου έκλυσης  $CO_2$ . Το κύριο μειονέκτημα στην προσέγγιση αυτή, είναι ότι περιλαμβάνει και όλους τους παράγοντες που επηρεάζουν την έκλυση  $CO_2$ . Η μέθοδος αυτή λοιπόν, δεν μπορεί να θεωρηθεί ακριβής αναλυτική μέθοδος για την διεκρίνιση των μηχανισμών πολυμερισμού των NCA's. Είναι ωστόσο δυνατόν να δώσει σημαντικές πληροφορίες, σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους μέτρησης, π.χ GPC, NMR.

Με βάση τις κινητικές μελέτες από μέτρηση του παραγόμενου όγκου  $CO_2$ , τρεις διαφορετικές ομάδες ανίχνευσαν την επίδραση διαμόρφωσης της αλυσίδας στον μηχανισμό του πολυμερισμού. Οι Ballard και Bamford<sup>94</sup> το 1956, παρατήρησαν επιτάχυνση στο αρχικό στάδιο πολυμερισμού όταν ολίγο ή πολυ(σαρκοζίνη) χρησιμοποιήθηκαν ως απαρχητές πολυμερισμού D,L-Phe-

NCA. Οι Blout και Asadourian<sup>95</sup>, όπως επίσης και οι Doty και Lundberg<sup>96</sup> διαπίστωσαν ότι ένα μικρό ποσοστό πολυμερισμού ακολουθείται από ένα μεγαλύτερο, όταν πρωτοταγής αμίνη χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμερισμό του γ-Bn-(L)-Glu NCA, σε λιγότερο πολικούς διαλύτες όπως διοξάνιο και THF. Η διαπίστωση αυτή συχνά αναφέρεται με τον όρο "**κινητική δύο σταδίων**". Όταν το στάδιο έναρξης είναι πολύ πιο αργό από αυτό της διάδοσης, για παράδειγμα όταν χρησιμοποιούνται ως απαρχητές τριτοταγείς αμίνες ή πρωτοταγείς αρωματικές αμίνες, δεν παρατηρείται πολυβάθμια κινητική.

Τέτοιου είδους φαινόμενα, φαίνεται να παρατηρούνται όταν ως μέσο αντίδρασης πολυμερισμού χρησιμοποιούνται χαμηλής ή μέτριας πολικότητας διαλύτες, όπως **βενζόλιο, διοξάνιο, THF ή CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**. Το DMF που είναι διαλύτης υψηλής πολικότητας και δεκτής δεσμών υδρογόνου, καταστέλλει αυτά τα φαινόμενα, ένδειξη ότι η κινητική δύο σταδίων, συσχετίζεται με τους δεσμούς υδρογόνου. Οι Doty και Lundberg ανέφεραν ότι η διαδικασία πολυμερισμού του γ-Bn-(L)-Glu NCA με απαρχητή εξυλαμίνη σε διαλυτή DMF, λαμβάνει χώρα με κινητική ενός σταδίου.

Η ύπαρξη "κινητικής δύο σταδίων", καταδεικνύεται από μελέτες διαφόρων ερευνητικών ομάδων, αλλά μια επαρκής εξήγηση για την αυτοεπιτάχυνση δεν έχει δοθεί. Μία αλλαγή στη διαμόρφωση της αναπτυσσόμενης αλυσίδας από τυχαίο σπείραμα ή β-φύλλα σε έλικα, φαίνεται να είναι η αιτία της αυτοεπιτάχυνσης, καθώς το άκρο της ενεργής αλυσίδας σε ελικοειδή διαμόρφωση είναι λιγότερο παρεμποδισμένο από ότι σε άλλες διαμορφώσεις. Η παραπάνω υπόθεση ονομάζεται "ελικοειδής ανάπτυξη αλυσίδας" και διατυπώθηκε από τους Doty και Lundberg, Idelson και Blout, καθώς και από τον Werngarten. Ο Werngarten διαπίστωσε σημαντική αυτοεπιτάχυνση κατά τον πολυμερισμό του N<sup>ε</sup>-Z-(L)-Lys NCA σε διοξάνιο αλλά όχι για το αντίστοιχο D,L-NCA, λόγω του ότι **τα πολυ-(D,L-αμινοξέα) διαμορφώνονται σε μικρότερο βαθμό σε ελικοειδή δομή από ότι τα αντίστοιχα (L)-αμινοξέα**. Τα αποτελέσματα της κινητικής απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα 22 και θεωρήθηκαν ως απόδειξη για την πιθανή "ελικοειδή ανάπτυξη της αλυσίδας".



Σχήμα 22: Πολυμερισμός του  $\gamma$ -BI-L-Glu-NCA σε διοξάνιο στους 35°C με απαρχητή εξυλαμίνη. Η αναλογία μονομερούς/απαρχητή (A/I) ποικίλει σε διάφορες συνθήκες.

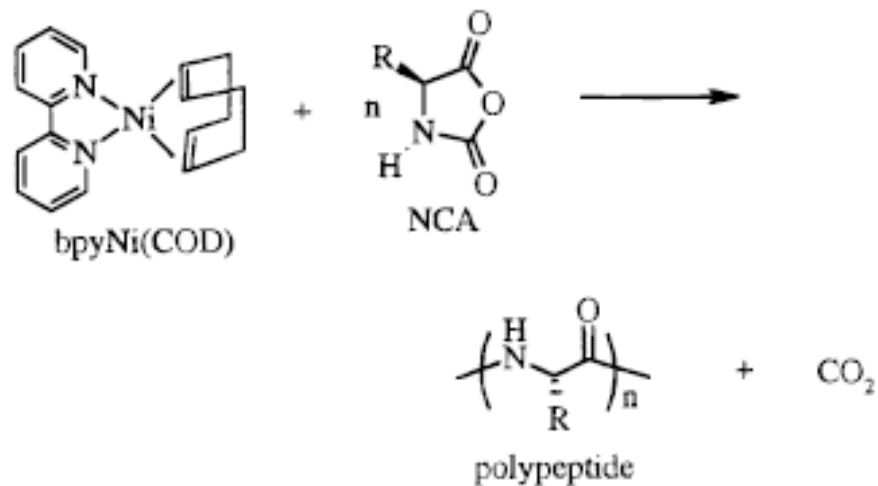
#### 2.3.2.4 Σύνθεση πεπτιδίων με σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως

Την τελευταία δεκαετία αναπτύχθηκε από τον Timothy Deming<sup>15,16</sup> η πιο γνωστή τεχνική παρασκευής πολυαμινοξέων διεθνώς χρησιμοποιώντας σαν απαρχητές σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως. Κατάφερε να επιτύχει έλεγχο στην δραστικότητα του απαρχητή ανάλογα με τους υποκαταστάτες και το μέσο της αντίδρασης. Ο απαρχητής που χρησιμοποιεί παρέχει ενεργά κέντρα που είναι λιγότερο προσβάσιμα λόγω στερεοχημικών και ηλεκτρονιακών λόγων, περιορίζοντας έτσι τις παράπλευρες αντιδράσεις. Δημιούργησε δηλαδή ένα σύστημα λιγότερο ευαίσθητο σε προσμίξεις που μπορούν να δώσουν παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας. Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατή η παρασκευή ομοπολυμερών και συμπολυμερών πεπτιδίων με σχετικά μικρή κατανομή μοριακών βαρών και έλεγχο στο μοριακό βάρος.

Αρχικά ο Deming έπρεπε να βρει τον κατάλληλο συνδυασμό μετάλλου, υποκαταστατών και μέσου αντίδρασης ώστε το σύμπλοκο να είναι αρκετά δραστικό και να δίνει ικανοποιητική ταχύτητα έναρξης και διάδοσης αλλά ταυτόχρονα να είναι και σταθερό για να εμποδιστεί η αποσύνθεση του ενεργού οργανομεταλλικού κέντρου καθώς και ο τερματισμός στην ανάπτυξη της αλυσίδας. Το σκεπτικό του ήταν πως εάν η τελική αμινομάδα παρέμενε καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης συνδεδεμένη με το μέταλλο, θα ήταν εφικτός ο έλεγχος προσθήκης του μονομερούς στην αλυσίδα και ο «ζωντανός» πολυμερισμός του. Στην προσπάθεια του αυτή, δοκίμασε διάφορους πολυμερισμούς αλλά τα σύμπλοκα του έδιναν μεγάλες κατανομές και μικρές αποδόσεις σε πολυμερές. Οι αποδόσεις καθώς επίσης και το μοριακό βάρος, διαπίστωσε πως άλλαζαν ανάλογα με το μέταλλο. Κατέληξε στο ότι το νικέλιο ήταν το πιο αποτελεσματικό για την παρασκευή πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους.

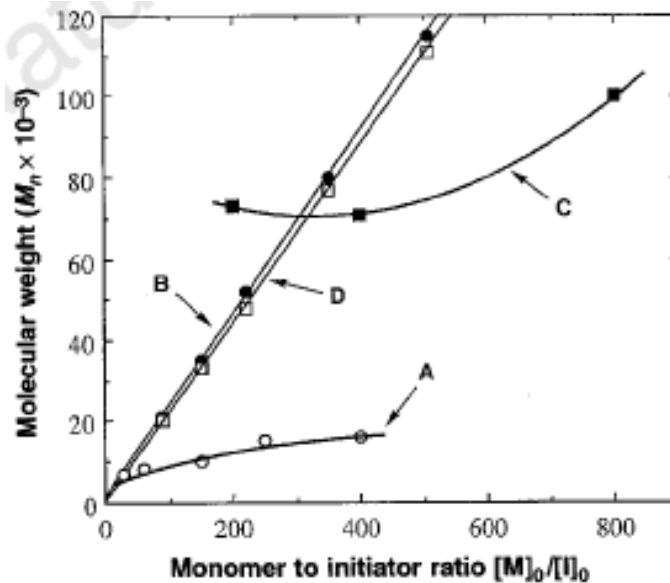
Έπειτα από πολλούς συνδυασμούς υποκαταστατών και μέσων αντίδρασης κατέληξε τελικώς πως ο καλύτερος συνδυασμός υποκαταστάτη-μετάλλου βρέθηκε να είναι το σύμπλοκο  $\text{bipyNi(COD)}$ , όπου  $\text{bipy}=2,2'$ -διπυριδίνη,  $\text{COD}=1,5$ -κυκλο οκταδιένιο σε DMF, το οποίο παράγει PBLG σε μεγάλη απόδοση με μονομοριακή κατανομή μοριακών βαρών. Αυτός ο συνδυασμός, παρέχει την ιδανική ισορροπία μεταξύ στερεοχημικής παρεμπόδισης και ηλεκτρονιακών αλληλεπιδράσεων και κάνει το σύμπλοκο αρκετά ενεργό ώστε να εκκινήσει τον πολυμερισμό, κρατώντας ταυτόχρονα την τελική αμινομάδα συνδεδεμένη με το μέταλλο (σχήμα 23).





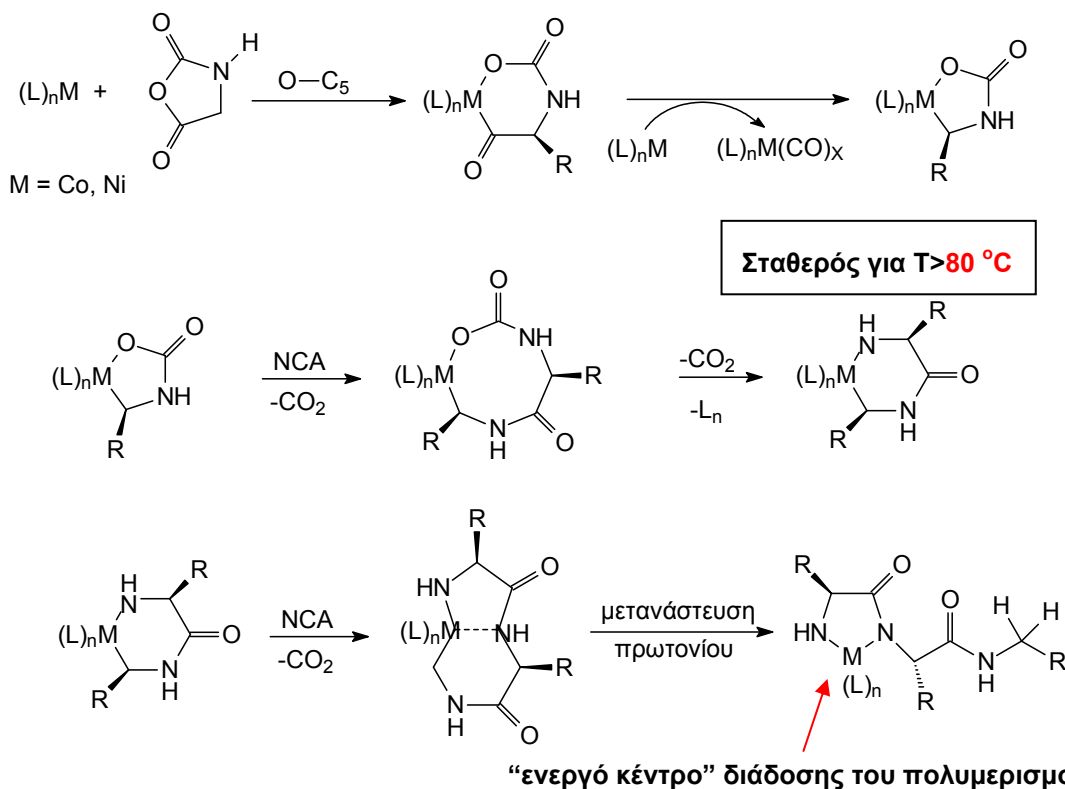
Σχήμα 23: Βέλτιστο σύμπλοκο  $\text{bipyNi(COD)}$  για πολυμερισμό των NCA's (Μέθοδος Deming), όπου  $\text{bipy}=2,2'$ -διπυριδίνη,  $\text{COD}=1,5$ -κυκλοοκταδιένιο.

Τα μοριακά βάρη που παρασκευάζονται με αυτόν τον απαρχητή σε DMF, αυξάνονται γραμμικά με την αναλογία μονομερούς-απαρχητή, δεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την απουσία αντιδράσεων τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας (σχήμα 24). Με τον απαρχητή αυτόν, συνέθεσε συμπολυμερή πολυπεπτιδίων διαλυτά σε DMF, όπως πολυ(γ-βενζυλο γλουταμικό) (PBLG) και πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL), καθώς και συμπολυμερή που περιείχαν μια αδιάλυτη συστάδα όπως η L-λευκίνη, η οποία εξαιτίας των διαλυτών συστάδων PBLG και PZLL, παρέμεινε και αυτή διαλυτή.



Σχήμα 24: Σύγκριση της συμπεριφοράς διαφορετικών απαρχητών στον έλεγχο του μοριακού βάρους του PBLG συναρτήσει της συγκέντρωσης του απαρχητή σε πολυμερισμό γ-βενζυλο γλουταμικού ανυδρίτη: A: φαινυλαιθυλαμίνη, B:  $\text{bipyNi}(\text{COD})$ , C: βουτοξείδιο του νατρίου, D: θεωρητικό μοριακό βάρος από την αναλογία  $[M]_0/[I]_0$ . Όλοι οι πολυμερισμοί έχουν γίνει σε άνυδρο DMF στους  $25^\circ\text{C}$  για 1 μέρα, ενώ το μέσο μοριακό βάρος  $M_n$  υπολογίστηκε με GPC με ανιχνευτή σκέδασης φωτός.

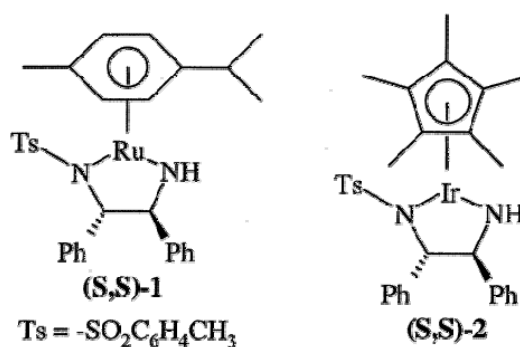
Ο Deming πρότεινε ένα πιθανό μηχανισμό για το πολυμερισμό των NCA με απαρχητή, οργανομεταλλικά σύμπλοκα (σχήμα 25). Με ισοτοπική επισήμανση έδειξε την στερεοεκλεκτική οξειδωτική προσθήκη στον O-C5 δεσμό, την οποία ακολούθησε η προσθήκη ενός δεύτερου μονομερούς προς σχηματισμό συμπλόκου με εξαμελή αμιδο-άλκυλο μεταλλοκυκλικό δακτύλιο, ύστερα από αποκαρβοξυλίωση (προ-εκκινητής). Ακόμα μια προσθήκη μονομερούς, οδηγεί στην μετατροπή του ενδιαμέσου σε πενταμελή αμινο-αμιδικό μεταλλοκυκλικό δακτύλιο, που αποτελεί το ενεργό κέντρο του πολυμερισμού. Αυτή η συστολή του δακτυλίου πιστεύεται ότι συμβαίνει με μετανάστευση του πρωτονίου του αμιδίου στο δεσμό άνθρακα μετάλλου, που ελευθερώνει την άκρη της αλυσίδας από το μέταλλο. Με τον τρόπο αυτό το μέταλλο μπορεί να μεταναστεύει κατά μήκος της αναπτυσσόμενης αλυσίδας και ταυτόχρονα να είναι γερά δεμένο στο ενεργό άκρο. Τα μεταλλοκυκλικά αυτά ενδιάμεσα θεωρείται ότι αποτελούν τα ενεργά κέντρα στον πολυμερισμό των ανυδριτών, με την μέθοδο του Deming.



**Σχήμα 25:** Προτεινόμενος μηχανισμός για πολυμερισμό NCA's με σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης.

Ο διαλύτης και οι υποκαταστάτες επηρεάζουν καθοριστικά την πορεία του πολυμερισμού, κυρίως κατά το στάδιο της έναρξης, μειώνοντας τον αριθμό των ενεργών κέντρων. Χρησιμοποιώντας π.χ υποκαταστάτη bry, διαπιστώθηκε σχηματισμός του πενταμελούς δακτυλίου μόνο σε DMF σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ σε THF χρειάστηκε θερμοκρασία μεγαλύτερη των  $80^\circ\text{C}$ , για την ενεργοποίηση του προ-εκκινητή. Αυξάνοντας την πολικότητα του διαλύτη, επιταχύνεται η συστολή του μεταλλοκυκλικού δακτυλίου διότι μόρια πολικού διαλύτη δρουν σαν υποκατάστατες σύμπλεξης με το μέταλλο, εμποδίζοντας τον σχηματισμό π.χ διμερών ανενεργών συσσωματωμάτων εξαμελών δακτυλίων που εμφανίζονται σε THF. Για τον λόγο αυτό αναφέρει ο Deming, σε λιγότερο πολικούς από το DMF διαλύτες, όπως τολουόλιο, διοξάνιο και THF, τα μοριακά βάρη κατά τον πολυμερισμό Bn-Glu NCA, ήταν 3-5 φορές μεγαλύτερα από τα αναμενόμενα, ανεξάρτητα από τον υποκαταστάτη.

Συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης και με την ηλεκτραρνητικότητα των υποκαταστατών. Με χρήση υποκαταστατών που είναι ισχυροί δότες  $e^-$ , όπως το *tert*-βουτύλιο, το μεταλλικό κέντρο ήταν πλούσιο ηλεκτρονιακά και ο δεσμός με την αμίνη ασθενής, ενώ με χρήση υποκαταστατών που είναι δέκτες  $e^-$ , όπως  $NO_2$ , το μεταλλικό κέντρο ήταν ηλεκτρονιακά ελλιπές και ο δεσμός με την αμίνη ισχυρός περιορίζοντας έτσι την δραστικότητά του. Τέλος, με χρήση ασύμμετρων υποκαταστατών ανέπτυξε μια μέθοδο για στερεοχημικό έλεγχο στην πεπτιδική σύνθεση καθώς κατόρθωσε να έχει στερεοεκλεκτικότητα στην προσθήκη D και L ισομερών<sup>97</sup> (σχήμα 26). Αλλαγή μιας χειρικής διαμόρφωσης σε ένα μόνο αμινοξύ, μπορεί να σταθεροποιεί ή να διακόπτει την δομή του πεπτιδίου.

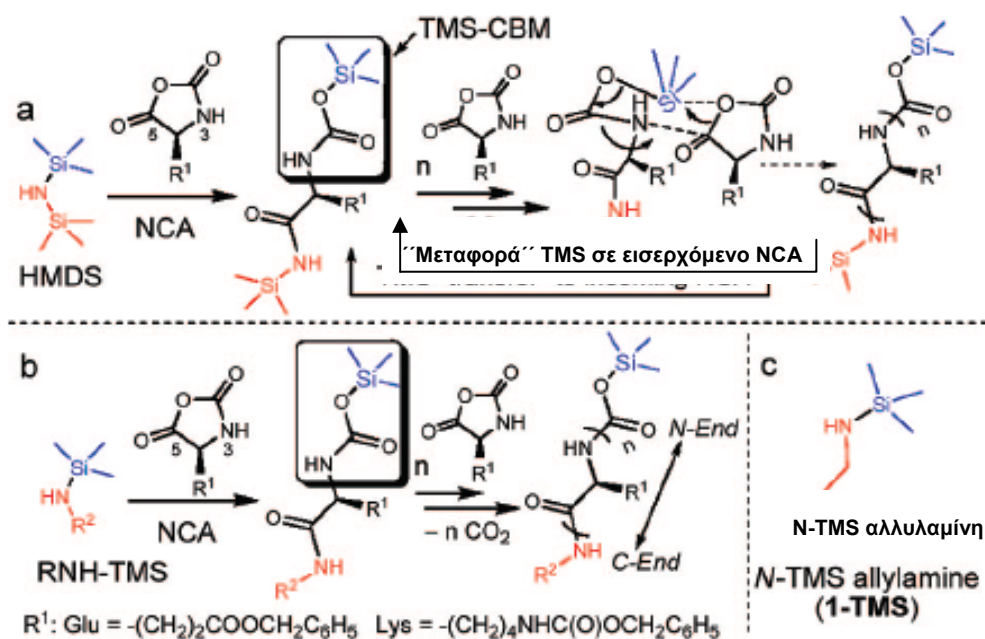


**Σχήμα 26:** Σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης με στερεοεκλεκτικότητα στον πολυμερισμό NCA's.

Ανακεφαλαιώνοντας, η μέθοδος που ανέπτυξε ο Deming είναι πολύ σημαντική και έδωσε ώθηση στην παρασκευή καλά καθορισμένων πολυ-α-αμινοξέων, σε ένα τομέα που είχε έλθει σε αδιέξοδο μετά από περίπου 50 χρόνια έρευνας. Οι δομές που συνέθεσε ωστόσο, περιορίζονται σε γραμμικά συμπολυμερή χωρίς περίπλοκες αρχιτεκτονικές. Επίσης απαιτείται η επισταμένη απομάκρυνση του βιοτοξικού μετάλλου από το τελικό πολυμερές, πράγμα που δεν είναι ούτε εύκολο αλλά ούτε και ποσοτικό, μειώνοντας έτσι την χρησιμότητα και τις εφαρμογές τους στην πράξη, καθώς ο βασικότερος λόγος παρασκευής τέτοιων πολυμερών είναι η βιοσυμβατότητα τους.

### 2.3.2.5 Πολυμερισμός με τριμεθυλοπυριτικές αμίνες

Το 2007 ο Cheng<sup>98</sup> πρότεινε ένα σύστημα με την χρήση του εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS) για τον πολυμερισμό των N-καρβοξυ ανυδριτών. Αυτός ο πολυμερισμός εξελίσσεται μέσω ενός μοναδικού τριμεθυλοπυριτικού καρβαμιδικού (TMS-CBM) μέσου διάδοσης του πολυμερισμού, που περιλαμβάνει σπάσιμο του δεσμού Si-N του εξαμεθυλοδισιλαζανίου κατά την έναρξη (σχήμα 27). Η προκύπτουσα τριμεθυλοπυριτική (TMS) αμίνη ανοίγει τον δακτύλιο του NCA στην θέση 5' προς σχηματισμό TMS-αμιδίου στον τελικό άνθρακα, ενώ ταυτόχρονα στον N-τελικό άνθρακα σχηματίζεται η ομάδα που διαδίδει τον πολυμερισμό. Κατά την διάδοση γίνεται μεταφορά της τριμεθυλοπυριτικής ομάδας από τον τελικό άνθρακα στο εισερχόμενο μονομερές προς σχηματισμό νέου TMS-CBM. Με το σύστημα αυτό η ομάδα του Cheng παρασκεύασε ομοπολυτεππίδια (PBLG) και δισυσταδικά συμπολυτεππίδια (PZLL-*b*-PBLG) με ελεγχόμενα μοριακά βάρη, με ικανοποιητικές κατανομές μοριακών βαρών (~1,2) και υψηλές αποδόσεις (>99%). Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η εισαγωγή δραστικών ομάδων στο C-τελικό άκρο του πολυτεπτιδίου με την χρήση κατάλληλων αμινών

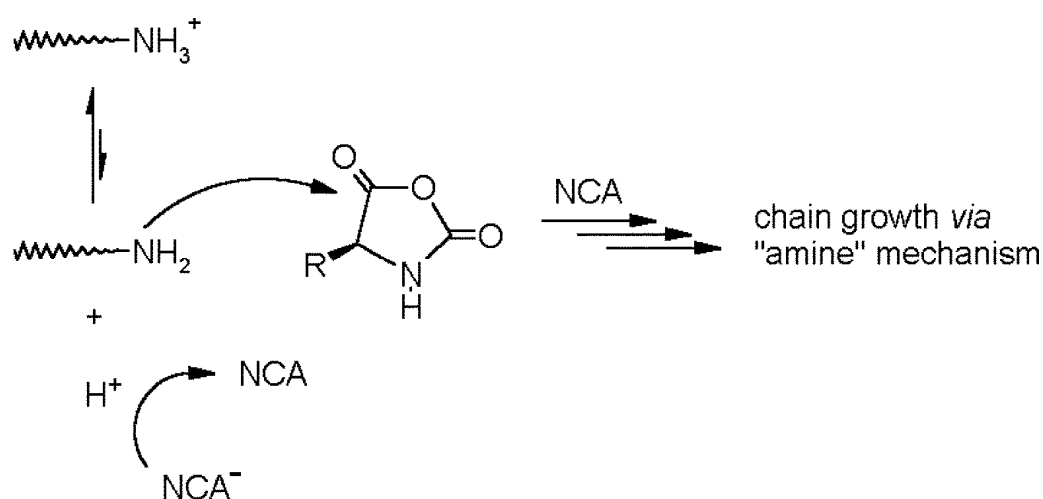


Σχήμα 27: Μηχανισμός πολυμερισμού μέσω τριμεθυλοπυριτικών αμινών.

### 2.3.2.6 Μέθοδος του Schlaad

Την ίδια περίπου εποχή που η ομάδα μας παρουσίαζε για πρώτη φορά τον ζωντανό πολυμερισμό των NCA's (2003), η ομάδα του Schlaad<sup>99,100</sup> παρουσίασε ένα καλά ελεγχόμενο πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου N<sup>ε</sup>-Z-(L)-λυσίνης NCA με χρήση υδροχλωρικών αλάτων πρωτοταγών αμινοτελικών μακροαπαρχητών. Έτσι, μπόρεσε να συνθέσει υβριδικά συμπολυμερή κατά συστάδες με μικρή κατανομή μοριακών βαρών. Όπως αναφέρει, οι μεγάλες τιμές στην πολυδιασπορά οφείλονται στο ότι ο πολυμερισμός των NCA's συνοδεύεται από παράπλευρες αντιδράσεις, η πιο συνηθισμένη εκ των οποίων είναι η διαδικασία του ενεργοποιημένου μονομερούς που ξεκινά με απόσπαση H από ένα μόριο NCA. Συνεπώς κατά την διάρκεια του πολυμερισμού, η αλυσίδα αναπτύσσεται αλλάζοντας συνεχώς μεταξύ των δυο μηχανισμών, της κανονικής πορείας και του ενεργοποιημένου μονομερούς.

Η λύση που έδωσε για την αποφυγή του μηχανισμού του ενεργοποιημένου μονομερούς είναι η προσθήκη πρωτονίων, ώστε το τυχόν σχηματιζόμενο NCA<sup>-</sup> να προσλαμβάνει πρωτόνια γρηγορότερα από την πυρηνόφιλη προσβολή του ανιόντος ανυδρίτη σε ένα άλλο μόριο NCA. Δηλαδή αντί να καθαρήσει το σύστημα του για να απομακρύνει τις προσμίξεις που προκαλούν το μηχανισμό αυτό, όπως κάνουμε εμείς, απλά προσθέτει πρωτόνια (σχήμα 28).



Σχήμα 28: Μέθοδος του Schlaad για τον πολυμερισμό NCA's με χρήση υδροχλωρικών αλάτων πρωτοταγών αμινομάδων.

Ο πολυμερισμός που προτείνει, λαμβάνει χώρα σε διαλύτη **DMF σε θερμοκρασία 40-80°C**. Με την μέθοδο αυτή, ο Schlaad συνέθεσε συμπολυμερή με πολύ μικρή κατανομή μοριακών βαρών  $I < 1.05$ , που είναι κοντά σε κατανομή Poisson. Παρά την μικρή κατανομή, ο πολυμερισμός αυτός δεν μπορεί να θεωρηθεί ζωντανός, για τους εξής τρεις λόγους. Πρώτον, η επάρκεια του μακροαπαρχητή είναι σχετικά χαμηλή (περίπου 70%) με αποτέλεσμα να απαιτείται το επιπλέον στάδιο της απομάκρυνσης του πρόδρομου πολυμερούς (PS-NH<sub>2</sub>). Δεύτερον η απόδοση της αντίδρασης κυμαίνεται μεταξύ 69-76% ανάλογα την περίσταση και το μοριακό βάρος. Συνέπεια της ατελούς μετατροπής του μονομερούς, είναι η μη εφικτή παρασκευή κατά συστάδες συμπολυμερών πολυαμινοξέων με διαδοχική προσθήκη μονομερών. Η τεχνική αυτή επίσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα και την καθαρότητα του μονομερούς. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παλαιότερα στο εργαστήριο μας, με χρήση της τεχνικής αυτής σε υψηλό κενό, στέφθηκαν με αποτυχία. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος του Schlaad μπορεί να θεωρηθεί επιτυχημένη για την σύνθεση υβριδικών συμπολυμερών με μια πολυπεπτιδική συστάδα, λόγω της απλότητας της και της χρήσης μη απαιτητικών συνθηκών.

### **2.3.2.7 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση υψηλού κενού**

Η τεχνική που χρησιμοποιούμε εμείς για τον πολυμερισμό των NCA's μέσω της διάνοιξης δακτυλίου, περιλαμβάνει την χρήση διμεθυλαμίνης ως απαρχητή και την τεχνική υψηλού κενού για τον καθαρισμό όλων των χημικών ειδών που λαμβάνουν χώρα στον πολυμερισμό (διαλυτών, μονομερών, απαρχητών). Πιστεύουμε ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες, μόνο ο πυρηνόφιλος μηχανισμός αμίνης λαμβάνει χώρα. Απαραίτητη για την τεχνική αυτή, είναι η γνώση υαλοουργίας για την κατασκευή των απαιτούμενων, ειδικά σχεδιασμένων συσκευών (αντιδραστήρων), τόσο του πολυμερισμού όσο και του καθαρισμού των μονομερών (σχήμα 29). Τα πολυμερή που λαμβάνονται με την τεχνική αυτή, χαρακτηρίζονται από μεγάλη καθαρότητα και υψηλές

αποδόσεις. Σε αυτό βέβαια, συμβάλει η επιτυχής σύνθεση και ο καθαρισμός των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδριτών) με ανακρυσταλλώσεις σε υψηλό κενό, απομακρύνοντας έτσι τις διάφορες προσμίξεις και περιορίζοντας τις παράπλευρες αντιδράσεις.



**Σχήμα 29:** Συσκευή ανακρυστάλλωσης-καθαρισμού των NCA's με την τεχνική υψηλού κενού.

Εκμεταλλεούμενοι τον ζωντανό χαρακτήρα του πολυμερισμού, έχουν συντεθεί στο εργαστήριο μας καλά καθορισμένα ομοπολυπεπτίδια (γλουταμικό, λυσίνη, γλυκίνη, αλανίνη, προλίνη, υδροξυπρολίνη, αργινίνη, ιστιδίνη), καθώς και κατά συστάδες συμπολυπεπτίδια<sup>23,24</sup> με διαδοχική προσθήκη μονομερών NCA's. Πλεονεκτεί η τεχνική αυτή έναντι των αντίστοιχων του Deming και του Schlaad, στο ότι μπορούν επιπλέον να συντεθούν συμπολυπεπτίδια, τόσο αστεροειδή όσο και υβριδικά<sup>25,33,101,102</sup>, καθώς και περίπλοκες μακρομοριακές αρχιτεκτονικές<sup>103</sup> με βάση τα πεπτίδια. Προτού όμως συνεχίσουμε, θα πρέπει να γίνει μια σύντομη αναφορά στο τι εννοούμε 'ζωντανό' πολυμερισμό.



### **«Ζωντανός» πολυμερισμός»**

Η σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών με προκαθορισμένη μακρομοριακή αρχιτεκτονική, έχει αποτελέσει έναν από τους κύριους στόχους των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια. **Με τον όρο καλά καθορισμένα**, εννοούμε τα πολυμερή με μικρή κατανομή μοριακών βαρών ( $I < 1,1$ ) και ελεγχόμενα μοριακά χαρακτηριστικά, όπως μοριακά βάρη, σύσταση, μικροδομή και αρχιτεκτονική. Η ικανότητα ή μη σχηματισμού καλά καθορισμένων μακρομορίων, οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη αντιδράσεων τερματισμού ή μεταφοράς αλυσίδας. Μέχρι σήμερα ο ανιοντικός πολυμερισμός αποτελεί το πλέον ισχυρό συνθετικό εργαλείο για την παρασκευή πλήθους πρότυπων υλικών με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και η ομάδα του Χατζηχρηστίδη είναι πρωτοπόρα σε αυτό το τομέα σε διεθνές επίπεδο. Ο ανιοντικός πολυμερισμός αποτελεί μέθοδο «ζωντανού» πολυμερισμού λόγω της απουσίας οποιασδήποτε αυθόρμητης αντίδρασης τερματισμού. Μικρή κατανομή μοριακών βαρών ( $I < 1,1$ ), **εξασφαλίζει την ομοιογένεια των αλυσίδων** που παρασκευάζονται και διασφαλίζεται από την επιλογή του συστήματος διαλύτη, μονομερούς, απαρχητή, στο οποίο η ταχύτητα έναρξης πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάδοσης. Όλες οι μονομερικές μονάδες ουσιαστικά πρέπει να ξεκινάνε ταυτόχρονα τον πολυμερισμό τους και κατά συνέπεια ίδιος αριθμός μονομερικών μονάδων να προστίθεται πάντα σε κάθε αλυσίδα. Μόνο ο ζωντανός πολυμερισμός μπορεί να δώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα για την σύνθεση πρότυπων υλικών. Η απόδειξη από το εργαστήριο μας, ότι ο πολυμερισμός των NCA's α-αμινοξέων με πρωτοταγείς αλειφατικές αμίνες με την τεχνική του υψηλού κενού, προσεγγίζει τον ζωντανό χαρακτήρα, άνοιξε πολλές προοπτικές για την σύνθεση καλά καθορισμένων συμπολυμερών πολυαμινοξέων και συμπολυμερών με περίπλοκη μακρομοριακή αρχιτεκτονική. Για να χαρακτηριστεί τώρα ένας πολυμερισμός «ζωντανός», πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια<sup>104,105</sup> :

- 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 μετατροπή. Για να γίνει αυτό, πρέπει να μην υπάρχουν παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και ο πολυμερισμός να προχωρά ομαλά και σταδιακά.
- Το τελικό μοριακό βάρος  $M_n$  να είναι ελεγχόμενο και να καθορίζεται από την στοιχειομετρία της αντίδρασης. Το μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό των πολυμερών προκαθορίζεται με ακρίβεια από τις ποσότητες του μονομερούς και του απαρχητή, σύμφωνα με την σχέση:

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

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

## 2.4 Ιδιότητες της πολυ(L-προλίνης), ιστορική αναδρομή σύνθεσης αυτής και του ανυδρίτη της L-προλίνης

Το γεγονός πως μεγάλα ονόματα όπως ο James Watson<sup>79</sup>, ο Linus Pauling<sup>106</sup> και ο Frank Bovey<sup>107-111</sup> έχουν ασχοληθεί με την πολυ(L-προλίνη) και τις ιδιότητες της, προσδίδει ιδιαίτερο κύρος στο συνθετικό αυτό πολυπεπτίδιο. Οι ξεχωριστές ιδιότητες της, προκύπτουν από το ότι το άζωτο του πεπτιδικού δεσμού είναι υποκατεστημένο και οδηγεί σε δυο αλληλοσυνδεόμενα συμπεράσματα:

α) **κατάλοιπα πολυ(προλίνης)** δεν μπορούν να δώσουν δεσμούς υδρογόνου μέσω του δεσμού N-H, διότι αυτός δεν υπάρχει. Παρουσία όμως H<sup>+</sup>, **μπορούν να δεχτούν δεσμούς υδρογόνου μέσω του αζώτου και του καρβονυλίου**, γι'αυτό και διαλύεται τόσο σε νερό όσο και σε οργανικά οξέα.

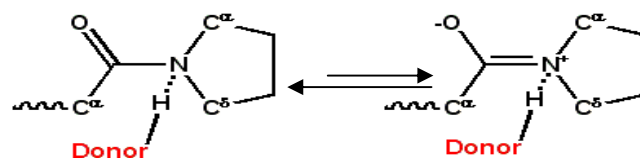
β) η υποκατάσταση του N, βρίσκεται **στον κύριο άξονα του πολυπεπτιδίου, παρέχοντας μια επιπλέον διαμορφωτική ακαμψία**, που επηρεάζει την αρχιτεκτονική. Η πολυ(προλίνη) υιοθετεί μια σταθερή, άκαμπτη και ιδιαίτερα εκτεταμένη ειδικού τύπου α-έλικα, που ονομάζεται 'έλικα πολυ(προλίνης)'.

### \* Γιατί η πολυ(προλίνη) διαλύεται στο νερό και έχει δυο μορφές;

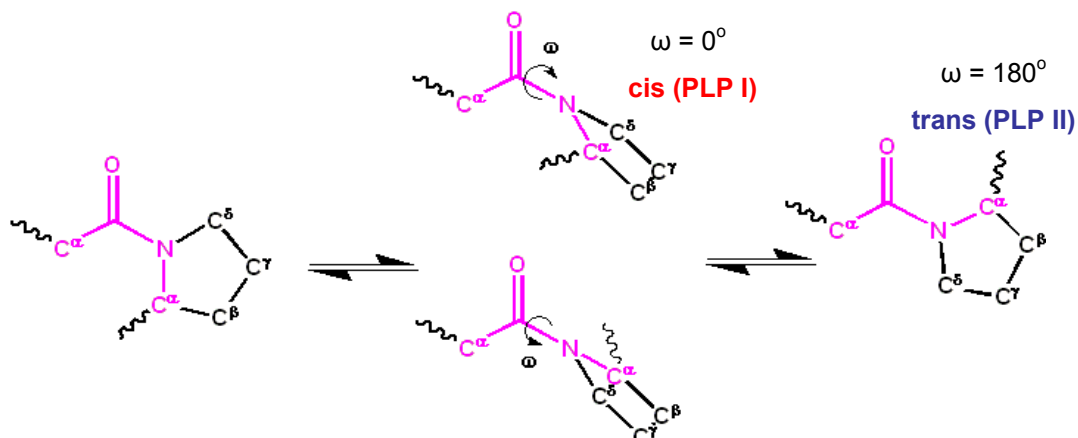
Μελέτες με ακτίνες Χ<sup>112-114</sup>, οπτικές μελέτες<sup>115-120</sup> σε υδατικό διάλυμα, καθώς και μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού<sup>107,108,121-123</sup>, έδειξαν ότι η πολυ(προλίνη) υιοθετεί δυο μορφές, την PLP I (cis διαμόρφωση) που είναι δεξιόστροφη έλικα και συναντάται στις δικετοπιπεραζίνες (DKPs), και την **PLP II (trans διαμόρφωση) που βρίσκεται στο κολλαγόνο και υιοθετεί μια μοναδική αριστερόστροφη έλικα**. Μάλιστα η PLP I μετατρέπεται με νερό και οξέα στην μορφή II (υδατοδιαλυτή μορφή), ακολουθώντας μια cis-trans ισομερίωση. Οι διαμορφωτικές αυτές αλλαγές της έλικας είναι αργές σε νερό, λόγω της υψηλής ενέργειας ενεργοποίησης που απαιτείται για την ισομερίωση, αλλά καταλύονται από οξέα. Η πολυ(προλίνη) αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου μέσω του N-υποκατεστημένου πυρρολιδινικού δακτυλίου της και του καρβονυλίου και σε νερό διαλύεται. Επίσης, ευνοημένη ενεργειακά,

μετατρέπεται μέσω μιας cis-trans ισομερίωσης στην λιγότερο συνωστισμένη μορφή II.

Ενώ σχεδόν σε όλα τα πολυπεπτίδια ο αμιδικός δεσμός έχει χαρακτήρα μερικώς διπλού δεσμού (σε όξινο περιβάλλον ευνοείται, λόγω των ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσει, το αρνητικά φορτισμένο οξυγόνο κοντά στον διπλό δεσμό), στην πολυ(προλίνη) τα πράγματα είναι διαφορετικά. Αυτό διότι **η δότηση ενός δεσμού υδρογόνου στο άζωτο του πεπτιδικού δεσμού, ευνοεί τον απλό δεσμό**, παρά την ύπαρξη πέντε ημι-ομοιοπολικών δεσμών (σχήμα 30) που προσφέρει ο μερικώς διπλός δεσμός. Επειδή όμως επιπλέον, **ο πυρρολιδινικός δακτύλιος είναι και συμμετρικός μεταξύ των ατόμων C<sup>α</sup> και C<sup>δ</sup>**, ο αμιδικός δεσμός που έχει χαρακτήρα απλού δεσμού, είναι ικανός να περιστρέφεται μεταξύ των δυο ισομερικών καταστάσεων (που είναι και κοντά ενεργειακά), υιοθετώντας τις δυο μορφές (σχήμα 31) και καθιστώντας το υπόλοιπο κομμάτι άκαμπτο. Από τα φυσικά αμινοξέα, μόνο η προλίνη έχει την δυνατότητα να υιοθετεί την μορφή cis.

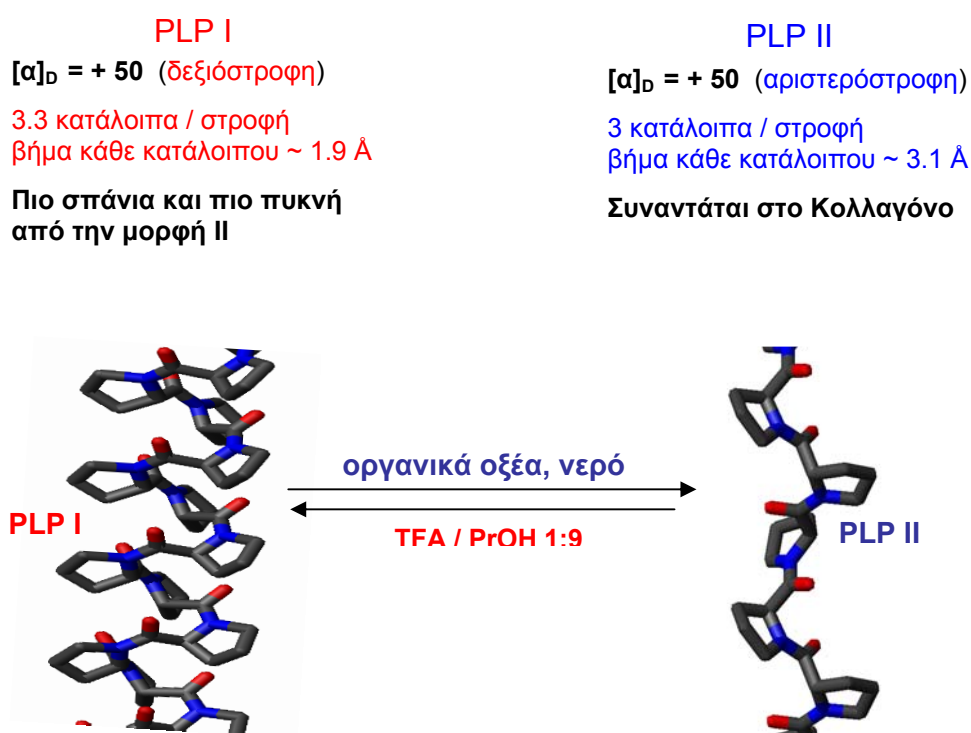


Σχήμα 30: Η δότηση δεσμών υδρογόνου στο άζωτο του πεπτιδικού δεσμού, ευνοεί τον απλό δεσμό παρά πέντε ημι-ομοιοπολικούς δεσμούς.



Σχήμα 31: Λόγω της συμμετρίας του, ο πυρρολιδινικός δακτύλιος μπορεί να περιστρέφεται, υιοθετώντας τις δύο ενεργειακά παρόμοιες μορφές της πολυ(προλίνης).

Η πολυ(προλίνη) διαλύεται εκτός από νερό και σε όξινους<sup>115,118,124-126</sup> πρωτικούς οργανικούς διαλύτες και μάλιστα ταχύτερα (οξέο-καταλυόμενες μετατροπές). Ο Kricheldorf αναφέρεται σε ισομεριώσεις στην μία ή την άλλη μορφή, επαγόμενες από διαλύτη<sup>127</sup>. Μεταβάσεις σε **PLP II** έχουμε σε νερό, μυρμηγκικό, οξικό, προπιονικό και τριφθοροξικό οξύ καθώς και φορμαμίδιο, ενώ η **PLP I** υιοθετείται σε αλκοόλες, υδατικά διαλύματα αλάτων και σε απρωτικούς διαλύτες. Τα χαρακτηριστικά των δυο μορφών της πολυπρολίνης, δίνονται στο σχήμα 32.



Σχήμα 32: Σε νερό και οργανικά οξέα υιοθετείται η πιο εκτεταμένη μορφή II.

\* Ποια η σημασία των κατάλοιπων προλίνης στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών;

Κατάλοιπα προλίνης εντοπίζονται σε β-στροφές (δεσμοί υδρογόνου ανά 3 κατάλοιπα) και ω-θηλιές (μεγαλύτερος βρόγχος χωρίς την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου) και συνδέουν κυρίως παράλληλα ή αντιπαράλληλα β-φύλλα μεταξύ τους, επιτρέποντας στην αλυσίδα να στρίβει (σχήμα 33). Αυτό συμβαίνει λόγω της “διαμορφωτικής ακαμψίας” της προλίνης, που την καθιστά

παράγοντα σταθερότητας και δίνει στις σφαιρικές πρωτεΐνες (κυρίως ένζυμα) το σχήμα αυτό. Παρόμοιο ρόλο έχει και η γλυκίνη αλλά για λόγους “διαμορφωτικής ευκαμψίας”.



Σχήμα 33: Τα κατάλοιπα προλίνης συνδέουν παράλληλα ή αντιπαράλληλα β-φύλλα.

### Ιστορική αναδρομή σύνθεσης της πολυ(L-προλίνης)

Βιβλιογραφικά, τέσσερις ομάδες αναφέρουν την σύνθεση πολυ(L-προλίνης) από τον πολυμερισμό του N-καρβοξυ ανυδρίτη της προλίνης. Καμία όμως εξ αυτών δεν έχει χαρακτηρίσει τα πολυμερή αυτά, πέραν από IR και ιξωδομετρία (τα επιτρεπτά για την εποχή εκείνη). Στον παρακάτω πίνακα, αναφέρονται οι συνθήκες αντίδρασης των ομάδων αυτών.

Πίνακας 2: Συνθήκες αντίδρασης των διαφόρων ομάδων για τον πολυμερισμό του N-καρβόξυ ανυδρίτη της (L)-Pro NCA.

* Ερευνητικές ομάδες *	Απαρχητής	Διαλύτης	T	Διάρκεια	Απόδοση (%)
Kurtz-Berger-Katchalski <sup>127</sup>	Diethylamine	Dioxane	80°C	12 h	67 (μείγμα)
Blout-Fasman <sup>128</sup>	NaOCH <sub>3</sub>	Acetonitrile	25°C	4 d	85 (PLP II)
	Hexylamine	Pyridine 1%	25°C	4 d	- (PLP I)
Komoto-Kawai-Kim <sup>129</sup>	Butylamine	Acetonitrile	30°C	7 d	99 (PLP I)
	Butylamine	Benzene	30°C	7 d	66 (μείγμα)
Kricheldorf-Muller-Stulz <sup>126</sup>	Butylamine	Dioxane	100°C	1 d	96 (μείγμα)
	Butylamine	Dioxane	20°C	7 d	95 (PLP I)
	Pyridine	-	20°C	7 d	93 (PLP I)

## Ιστορική αναδρομή σύνθεσης του ανυδρίτη της L-προλίνης

Η προλίνη ξεχωρίζει ανάμεσα στα άλλα αμινοξέα διότι αποτελεί το μοναδικό φυσικό δευτεροταγές αμινοξύ. Ο πυρρολιδινικός της δακτύλιος εισάγει “διαμορφωτικούς περιορισμούς”, προσδίδοντας στα κατάλοιπα προλίνης ξεχωριστές ιδιότητες.

Στον τομέα της σύνθεσης του ανυδρίτη της προλίνης, βιβλιογραφικά έξι ομάδες αναφέρουν την σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη της προλίνης. Σχεδόν όλοι χρησιμοποιούν φωσγένιο (g) ή τριφωσγένιο (s) ως **μέσο καρβονυλίωσης** και μια **βάση για δέσμευση του παραγόμενου HCl** και καθαρίζουν το μείγμα με ανακρυσταλλώσεις. Ωστόσο μόνο η τελευταία ομάδα κάνει κάποιο χαρακτηρισμό (πίνακας 3), αλλά στο τελικό φάσμα FTIR, είναι ξεκάθαρη η πρόσμιξη δικετοπιπεραζινών (Pro-Pro DKP's<sup>134,135</sup>), με ισχυρή κορυφή στα 1650 cm<sup>-1</sup>. Στον παρακάτω πίνακα, αναφέρονται οι συνθήκες αντίδρασης των ομάδων αυτών.

Πίνακας 3: Συνθήκες αντίδρασης διαφόρων ομάδων για τον σχηματισμό (L)-Pro-NCA

* Ερευνητικές ομάδες *	Αμινοξύ	Διαλύτης	Βάση	T (°C)	Pro-NCA (%)
Kurtz -Berger-Katchalski <sup>127</sup>	(Z)-Pro-OH	Benzene	(απόσταξη)	25	31
Blout-Fasman <sup>128</sup>	H-Pro-OH	Acetone	<b>Ag<sub>2</sub>O</b>	4	81
Komoto-Kawai-Kim <sup>129</sup>	H-Pro-OH	Isoprop. ether	<b>Et<sub>3</sub>N</b>	25	-
Kricheldorf-Muller-Stulz <sup>126</sup>	H-Pro-OH	THF	<b>Et<sub>3</sub>N</b>	25	-
Lizuka-Uchida-Oya <sup>130</sup>	H-Pro-OH	Acetonitrile	<b>Et<sub>3</sub>N</b>	-20	24
Gulin-Rabanal-Giralt <sup>131</sup>	H-Pro-OH	THF	<b>DEAM-PS</b>	25	93

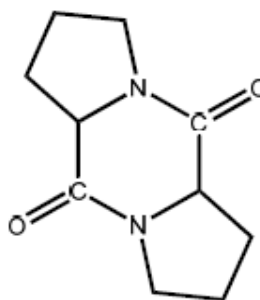
Μόλις το 2006, η ομάδα του Giralt<sup>131</sup> χρησιμοποίησε δικτυωμένο πολυστυρένιο με διάφορες δραστικές αμινομάδες για δέσμευση του παραγόμενου HCl, εκ των οποίων το δι-αιθυλο άμινο πολυστυρένιο (DEAM-PS) έδινε την καλλίτερη απόδοση (93%) με χρήση περίσσειας 3:1 ως προς το αμινοξύ. Η ομάδα αυτή, πραγματοποίησε πειράματα τόσο με Et<sub>3</sub>N σε

διάφορες θερμοκρασίες, όσο και με DEAM-PS και διαπίστωσε ότι το δεύτερο έδινε σαφώς καλλίτερα αποτελέσματα, με αυξημένο ποσοστό ανυδρίτη. Στον παρακάτω πίνακα 4, αναφέρονται οι κυριότερες προσπάθειες σύνθεσης του (L)-Pro NCA σε THF, από την ομάδα του Giralt. Τα ποσοστά έχουν υπολογισθεί από  $^1\text{H-NMR}$ . Σύμφωνα με την ομάδα του Giralt, οι χαρακτηριστικές κορυφές των παραπροϊόντων στο  $^1\text{H-NMR}$  των παραπροϊόντων αποδίδονται σε: **δικετοπιπεραζίνες**<sup>132</sup> (στερεό): 4.23 ppm & **N-καρβαμόυλο χλωρίδιο** (λάδι): 4.48 cis & 4.59 trans.

**Πίνακας 4: Αποτελέσματα  $^1\text{H-NMR}$  της ομάδας του Giralt για την σύνθεση του (L)-Pro NCA με χρήση διαφορετικών βάσεων.**

<u>Αμινοξύ</u>	<u>Βάση (1:1)</u>	<u>T (°C)</u>	<u>Pro-NCA (%)</u>	<u>N-carbamoyl (%)</u>	<u>Pro-Pro DKP (%)</u>
H-Pro-OH	Et <sub>3</sub> N	-25	<b>59</b>	<1	40
H-Pro-OH	Et <sub>3</sub> N	0	<b>27</b>	38	35
H-Pro-OH	Et <sub>3</sub> N	25	<b>41</b>	54	5
H-Pro-OH	DEAM-PS	25	<b>70</b>	29	<1

Πρακτικά, δοκιμάστηκαν όλες οι βάσεις που αναφέρονται βιβλιογραφικά (E<sub>3</sub>N, Ag<sub>2</sub>O, PS-DEAM) αλλά το τελικό αποτέλεσμα οδηγούσε σε μεγάλες αποδόσεις N-καρβαμόυλο χλωριδίου ή δικετοπιπεραζινών και χαμηλές αποδόσεις αντίστοιχα σε (L)-Pro NCA, με αποτέλεσμα οι ανακρυσταλλώσεις να μην έχουν νόημα. Το PS-DEAM, έδινε υψηλότερες αποδόσεις, αλλά ήταν μεν ακριβό και επιπλέον το παραπροϊόν (DKP's, σχήμα 34), κρυστάλλωνε επίσης στον μη διαλύτη και δεν καθαριζόταν επιπλέον.



**Σχήμα 34: Χημική δομή των δικετοπιπεραζινών προλίνης.**



## Προβλήματα που αντιμετωπίστηκαν κατά την σύνθεση (L)-Pro NCA

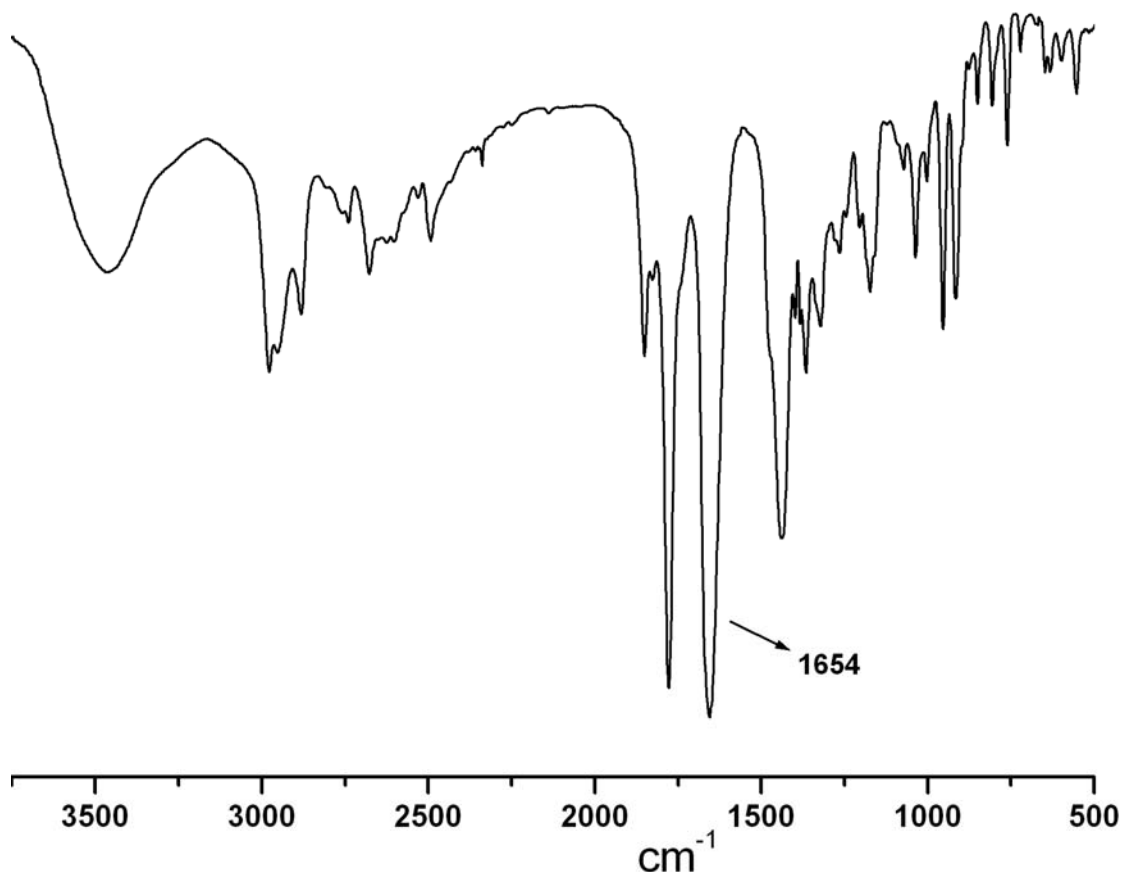
Λαμβάνοντας υπ'όψιν τα πειράματα της ομάδας του Giralt με χρήση Et<sub>3</sub>N για δέσμευση του παραγόμενου HCl, καθώς επίσης και την εμπειρία της δικής μας ομάδας πάνω στην σύνθεση ανυδριτών, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με Et<sub>3</sub>N στους 0°C, -20°C και 25°C, σε διαφόρους διαλύτες (πίνακας 5), ενώ το μείγμα καθαρίστηκε με ανακρυσταλλώσεις.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα <sup>1</sup>H-NMR για την σύνθεση του (L)-Pro NCA με χρήση διαφορετικών βάσεων και διαλυτών.

H-Pro-OH	Acetonitrile	Et <sub>3</sub> NH	0°C	20% -Cl 45% DKP
H-Pro-OH	Acetonitrile	Et <sub>3</sub> NH	-20°C	3% -Cl 55% DKP
H-Pro-OH	THF	Et <sub>3</sub> NH	0°C	35% -Cl 25% DKP
H-Pro-OH	THF	Et <sub>3</sub> NH	25°C	54% -Cl 5% DKP
H-Pro-OH	THF	PS-DEAM	25°C	20% -Cl 5% DKP

Αρχικά, αντιδράσαμε το αμινοξύ με τριφωσγένιο για 1 ώρα στους 50°C σε THF, προς σχηματισμό διαλυτού λαδιού N-καρβαμόυλο χλωριδίου και έπειτα διώχνουμε τον διαλύτη υπό κενό. Στην συνέχεια αποστάζουμε ακετονιτρίλιο ή THF, μεταφέρουμε το σύστημα στην γραμμή αργού/κενού και προσθέτουμε από το σταγονομετρικό χωνί τριαιθυλαμίνη (1,1 equiv.), διαλυμένη σε λίγο διαλύτη, κατεβάζοντας την θερμοκρασία στους 0°C ή στους -20°C (λουτρό ισοπροπανόλης ή ψυγείο αντίστοιχα) και αφήνουμε το σύστημα να αντιδράσει υπό αργό, με ισχυρή ανάδευση. Η χρήση του πολικού ακετονιτριλίου ως διαλύτη δεν ήταν τυχαία, γιατί ο διαλύτης αυτός χρησιμοποιείται για την σύνθεση ανυδριτών μη πολικών αμινοξέων. Την επόμενη, διηθούμε με φίλτρο το διάλυμα σε άλλη τρίγαμη φιάλη των 500 ml για την απομάκρυνση του αλατιού Et<sub>3</sub>N·HCl και έπειτα διώχνουμε τον διαλύτη υπό κενό. Τέλος, διηθούμε το διάλυμα στην συσκευή ανακρυστάλλωσης (σχήμα 48), κόβουμε, παγώνουμε, απαρώνουμε και ακολουθεί το στάδιο των ανακρυσταλλώσεων με σύστημα οξικού αιθυλεστέρα / εξανίου.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των ακάθαρτων μειγμάτων στον πίνακα 5 και αναφέρονται αμέσως μετά το πέρας της αντίδρασης, η αντίδραση στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε ακετονιτρίλιο δουλεύει καλλίτερα (ανάλογα με αυτά του Giralt για THF), καθώς παίρνουμε την μέγιστη απόδοση σε ανυδρίτη. Ωστόσο το ποσοστό των δικετοπιπεραζινών είναι υψηλό (σχήμα 34), αν και το διάλυμα της αντίδρασης ήταν αρκετά αραιό για την αποφυγή διμερών.

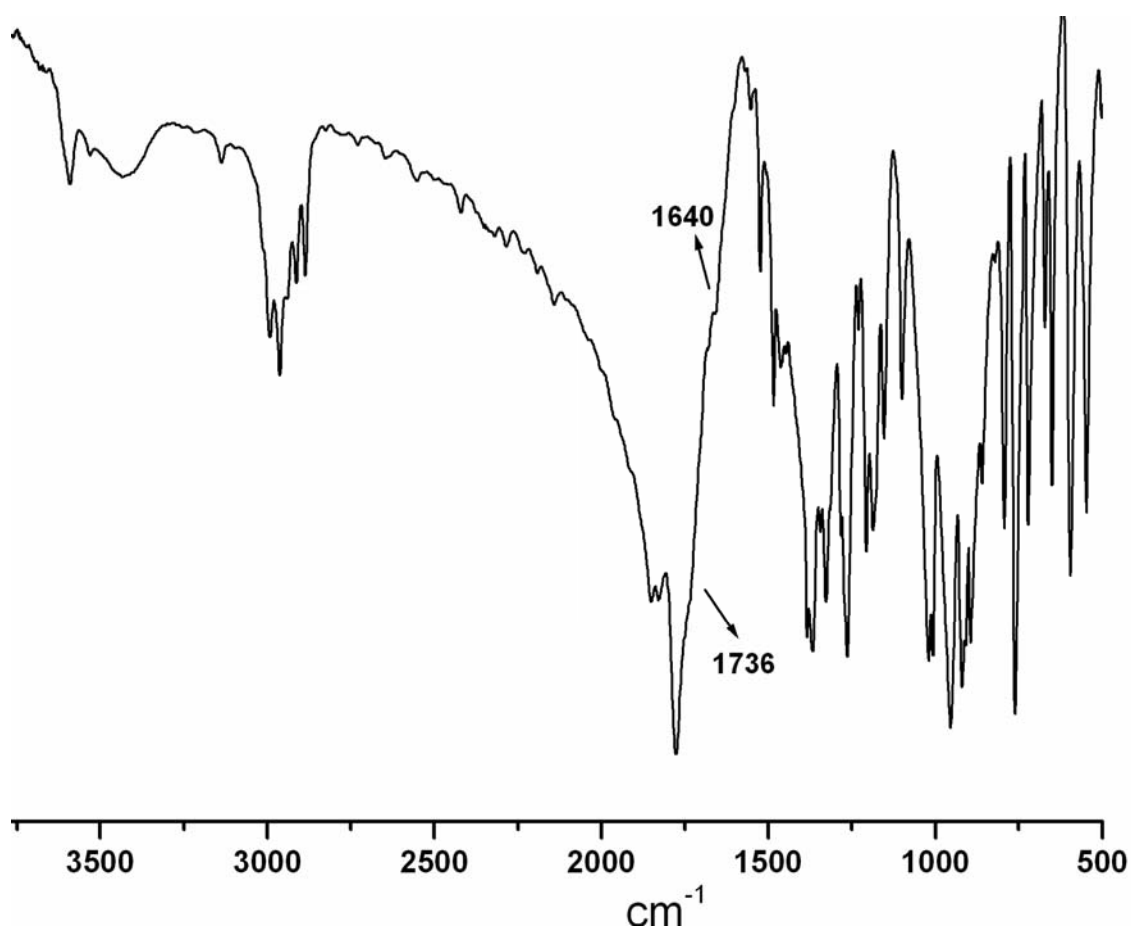


Σχήμα 35: Ακάθαρο μείγμα μετά από αντίδραση στους  $0^{\circ}\text{C}$  με  $\text{Et}_3\text{N}$  ως βάση και διαλύτη ακετονιτρίλιο για την σύνθεση (L)-Pro NCA.

Αν και φαίνεται ξεκάθαρα από το IR ότι απαλλαγή από τις δικετοπιπεραζίνες (DKP's) θα οδηγήσει σε καθαρό NCA, στην πράξη είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί, διότι προκύπτουν προβλήματα διαλυτότητας κατά το στάδιο των ανακρυσταλλώσεων, καθώς οι DKP's παρουσιάζουν πολύ μικρή διαλυτότητα σε οξικό αιθυλεστέρα και THF, και καταβυθίζονται σε

εξάνιο, ενώ διαλύονται εύκολα στο πολικό ακετονιτρίλιο (το οποίο ωστόσο είναι μη αναμίξιμο με το εξάνιο).

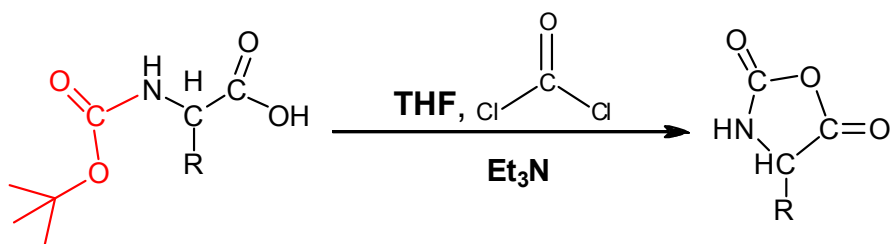
Αντίδραση επίσης σε THF, οδηγεί σε μειωμένο ποσοστό δικετοπιπεραζινών (ιδίως στους 25°C). Ωστόσο το παραπροϊόν N-καρβαμόυλο χλωριδίο είναι αυξημένο (σχήμα 36). Αφού είδαμε ότι η χρήση Et<sub>3</sub>N, οδηγεί σε αυξημένο ποσοστό διάφορων παραπροϊόντων (πίνακας 5), χρησιμοποιήσαμε ως βάση την πολυμερική ρητίνη DEAM-PS (δι-αιθυλο άμινο πολυστυρένιο), που περιέχει δραστικές αμινομάδες και οδηγεί σε πολύ υψηλό ποσοστό ανυδρίτη. Το μείγμα καθαρίστηκε με ανακρυσταλλώσεις, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν αυτά που περιμέναμε. Αν και μειώνεται το ποσοστό του N-καρβαμόυλο χλωριδίου, παραμένει πάλι αρκετά υψηλό, ενώ εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν σε αμιδικούς δεσμούς.



Σχήμα 36: Ακάθαρο μείγμα μετά από αντίδραση στους 25°C με DEAM-PS ως βάση και διαλύτη THF για την σύνθεση (L)-Pro NCA.

Κατά την διάρκεια όλων αυτών των αντιδράσεων ωστόσο, διαπιστώσαμε ότι ο **(L)-Pro NCA εξαχνωνόταν**, κάτι λογικό, λόγω του μικρού μεγέθους της προλίνης (η εξαχνωση αναφέρεται βιβλιογραφικά κατά την σύνθεση N-μεθυλο γλυκίνης<sup>61,79</sup>). Το γεγονός αυτό, μας οδήγησε στον σχεδιασμό ειδικής συσκευής short-path για εξαχνωση σε υψηλό κενό. Η εξαχνωση έδωσε καλά αποτελέσματα (με αυτήν πήραμε και τα πρώτα πολυμερή), με απομόνωση του καθαρότερου μέχρι τότε ανυδρίτη (σε σχέση με τα υπάρχοντα δημοσιευμένα φάσματα) χωρίς την παρουσία αμιδικού δεσμού στα  $1650\text{ cm}^{-1}$ . **Το μειονέκτημα του καθαρισμού με εξαχνωση, είναι η μικρή ποσότητα του καθαρού ανυδρίτη που απομονώνεται.** Διαπιστώθηκε, ότι η απόδοση αυξανόταν, όσο μικρότερη ήταν η ποσότητα ανυδρίτη προς εξαχνωση (μέγιστη απόδοση 20% για 2 gr προλίνης). Το γεγονός αυτό έγκειται στο ότι μεγαλύτερη ποσότητα ανυδρίτη, απαιτεί παρατεταμένη θέρμανση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητο θερμικό πολυμερισμό μάζας<sup>128</sup>, **καθώς επίσης και σε πιθανή απόσταξη παραπροϊόντων (N-καρβαμούλο χλωρίδιο) που έχουν ελαιώδη μορφή και μολύνουν τον καθαρό εξαχνωμένο ανυδρίτη.** Καθίσταται επομένως αδύνατον να καθαριστεί ο ανυδρίτης με ανακρυσταλλώσεις ή εξαχνωση.

Έχοντας όλα αυτά τα προβλήματα, αποφασίσαμε να αλλάξουμε την πορεία φωσγενίωσης (αλλάζοντας ταυτόχρονα τα παραπροϊόντα), στην ελεύθερη καρβοξυλομάδα πλέον, προστατεύοντας την ελεύθερη αμινομάδα με την Boc-ομάδα (σχήμα 37). Αυτό, οδήγησε σε υψηλές αποδόσεις μετά το πέρας της αντίδρασης και μηδενική ύπαρξη DKP's. Επιπλέον, βρέθηκε ένας τρόπος καθαρισμού του ανυδρίτη με θερμική διάλυση σε μη διαλύτη, οδηγώντας σε εκδίωξη του βασικού παραπροϊόντος (κορυφή στα  $1700\text{ cm}^{-1}$ ) και αποτελεσματική απομόνωση του ανυδρίτη.



**Σχήμα 37: Αντίδραση του αμινοξέως με το φωσγένιο προς σχηματισμό NCA.**

## 2.5 Μοριακός Χαρακτηρισμός

### Φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR)

Στα πολυπεπτίδια η χρήση του IR είναι πολύ σημαντική, τόσο για την ποιοτική εξακρίβωση σύνθεσης του ανυδρίτη των αμινοξέων (συνήθεις δονήσεις έκτασης στα  $1785\text{ cm}^{-1}$  και  $1855\text{ cm}^{-1}$ ) όσο και για την σύνθεση των πολυμερικών πεπτιδίων (δόνηση του αμιδικού δεσμού στα  $1650\text{ cm}^{-1}$ ). Χαρακτηριστικά, οι δεσμοί N-H, O-H απορροφούν στην περιοχή  $3600\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ , ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Οι καρβονυλικές ομάδες απορροφούν μεταξύ  $1750\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ , ενώ η περιοχή κάτω από τα  $1500\text{ cm}^{-1}$  χαρακτηρίζεται ως περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος, με τις απορροφήσεις να οφείλονται σε ποικιλία δεσμών C-C, C-O, C-N, C-X. Οι μετρήσεις έγιναν σε μηχάνημα Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR, αναμειγνύοντας για τον σχηματισμό του μετρούμενου δισκίου (πελέτα), 1 mgr ουσίας και 0.2 gr KBr.

### Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Στο χώρο των πολυμερών το NMR αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο διότι με τη βοήθεια της τεχνικής αυτής, μπορούμε να προσδιορίσουμε την δομή ομοπολυμερών καθώς και τη σύσταση και την τακτικότητα συμπολυμερών.

Οι μετρήσεις των φασμάτων τόσο  $^1\text{H-NMR}$  όσο και  $^{13}\text{C-NMR}$ , για τον προσδιορισμό της δομής ομοπολυμερών όσο και της σύστασης των συμπολυμερών, καθώς και της ταυτοποίησης των NCA's, έγιναν σε όργανο Varian Unity Plus 300 MHz/54, σε θερμοκρασία δωματίου. Για την παρασκευή των δειγμάτων, ζυγίστηκαν 20 mgr πολυμερούς και στην περίπτωση λήψης φάσματος  $^{13}\text{C-NMR}$ , το δείγμα αφέθηκε όλη την νύχτα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CF}_3\text{COOD}$  και  $\text{D}_2\text{O}$ .

## Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography) ή αλλιώς χρωματογραφία διαπερατότητας μέσω πηκτής (Gel Permeation Chromatography) είναι ουσιαστικά μία τεχνική τύπου υγρής χρωματογραφίας, προσαρμοσμένης στην ανάλυση μεγαλομορίων. Όπως οι περισσότερες αναλυτικές μέθοδοι, προϋποθέτει ότι το δείγμα είναι διαλυτό στο φέροντα διαλύτη και αποτελεί ίσως την πιο γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο προσδιορισμού κατανομής μοριακών βαρών των πολυμερών. Αποτελεί σήμερα μια από τις σημαντικότερες μεθόδους χαρακτηρισμού των πολυμερών τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα όσο και στη βιομηχανία. Μεγάλο πλεονεκτήματα της μεθόδου, είναι η απλότητα της, η μικρή ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιείται (της τάξης των mg), καθώς επίσης η ευκολία μέτρησης (μικρός χρόνος, αυτοματισμός).

Πρόκειται για μέθοδο τύπου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, όπου το δείγμα μεταφέρεται από τον φέροντα διαλύτη μέσα σε στήλες, κατάλληλα πακεταρισμένες με πορώδες υλικό που έχει μεγάλο εύρος πόρων (κυμαίνεται από 50 ως  $10^5$  nm). Το πορώδες υλικό μπορεί να αποτελείται είτε από ανόργανα υλικά (silica gel, πορώδες γυαλί), είτε να είναι οργανικής φύσεως (δικτυωμένο πολυστυρένιο). Στις ιδανικές στήλες, δεν υπάρχει κανενός είδους αλληλεπίδραση μεταξύ πορώδους υλικού και μακρομορίων και ο διαχωρισμός οφείλεται μόνο στο μοριακό μέγεθος. Συνήθως προτιμάται η χρήση του δικτυωμένου πολυστυρενίου ως πακεταριστικό υλικό, διότι οι ανόργανες ύλες μπορεί λόγω δευτερογενών αλληλεπιδράσεων να οδηγήσουν σε “δευτερογενείς διαδικασίες κατανομής” (προσρόφηση, ασυμβατότητα), που καθιστούν την μέτρηση των  $I$  και  $M_n$  μη αξιόπιστη. Ο διαχωρισμός των μακρομορίων γίνεται με βάση τον υδροδυναμικό τους όγκο. Τα μακρομόρια με το μικρότερο υδροδυναμικό όγκο, διαχέονται μέσα σε περισσότερους πόρους, καθυστερώντας έτσι αρκετά, σε σχέση με τα μεγαλύτερου μεγέθους μακρομόρια, τα οποία μη μπορώντας να εισέλθουν σε όλους τους πόρους, εκκλούνται γρηγορότερα. Έτσι επιτυγχάνεται διαχωρισμός μοριακών ειδών ανάλογα με το μέγεθος. Στη περίπτωση που τα μόρια έχουν μικρή κατανομή μοριακών βαρών,

διαχωρίζονται εύκολα. Η διαχωριστική ικανότητα εξαρτάται από τη ταχύτητα ροής του διαλύτη, την ποιότητα του, την θερμοκρασία, αλλά και κυρίως από το εύρος του πορώδους των στηλών.

Στην έξοδο των στηλών, βρίσκονται ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές για την ανίχνευση των εκλούμενων μορίων και πρέπει αυτοί να χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία, για να αποκρίνονται στη συγκέντρωση του διαλυμένου συστατικού. Οι ανιχνευτές χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες : ανιχνευτές μάζας (π.χ. διαφορικό διαθλασίμετρο) που βασίζονται στον διαφορετικό δείκτη διάθλασης μεταξύ του διαλύτη και του διαλύματος, ανιχνευτές απορρόφησης (π.χ. φασματοφωτόμετρο UV-Vis) και ανιχνευτές που είναι ευαίσθητοι σε μοριακή μάζα (π.χ. ανιχνευτής σκέδασης φωτός laser σε μικρές γωνίες και ιζωδομετρικός ανιχνευτής).

Σε περίπτωση που ένα σύστημα SEC είναι εξοπλισμένο με περισσότερους από ένα ανιχνευτές, μπορεί να γίνει προσδιορισμός της σύστασης συμπολυμερών. Εφ'όσον η ολική απόκριση του ανιχνευτή αποτελεί το σύνολο των αποκρίσεων των διαφόρων μονομερικών μονάδων του συμπολυμερούς, η απόκριση της κάθε μονομερικής μονάδας είναι ανάλογη της συγκέντρωσής της και είναι γνωστή η σταθερά αναλογίας για κάθε μονομερική μονάδα.

Με την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών, προσδιορίζεται το μοριακό βάρος και η κατανομή μοριακών βαρών. Είναι όμως έμμεση μέθοδος, οπότε απαιτείται βαθμονόμηση των στηλών, κάτι που επιτυγχάνεται μετρώντας τον χρόνο έκλουσης προτύπων δειγμάτων με γνωστό μοριακό βάρος (π.χ. πρότυπα πολυστυρένια). Η απ'ευθείας αντιστοίχιση του μοριακού βάρους στον όγκο έκλουσης μπορεί να γίνει μόνο στη περίπτωση που τα πρότυπα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για βαθμονόμηση και τα άγνωστα δείγματα είναι ομοειδή πολυμερή. Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους πολυμερών διαφορετικής χημικής σύστασης ή αρχιτεκτονικής, απαιτείται η χρήση μιας παγκόσμιας καμπύλης αναφοράς, της μορφής  $\log([\eta] \cdot M) = f(V_e)$ , όπου  $[\eta]$  είναι το εσωτερικό ιξώδες του πολυμερούς με μοριακό βάρος  $M$  και όγκο έκλουσης  $V_e$ .

Στην περίπτωση περίπλοκων αρχιτεκτονικών και συμπολυμερών, όπως π.χ. στα μικτόκλινα αστεροειδή συμπολυμερή, δεν είναι δυνατός ο υπολογισμός του ακριβούς μοριακού βάρους και τα αποτελέσματα είναι μόνο ποιοτικά. Αυτό οφείλεται στο ότι ο υδροδυναμικός όγκος των συμπολυμερών αυτών, εξαρτάται τόσο από τη δομή όσο και από τη σύστασή τους. Στην περίπτωση αυτή, η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη παρακολούθηση της πορείας αντιδράσεων που σχετίζονται με τη σύνθεση όπως για παράδειγμα την κινητική και των αντιδράσεων σύζευξης.

Ο προσδιορισμός των χρωματογραφημάτων αποκλεισμού μεγεθών (SEC), έγινε με τη χρησιμοποίηση αντλίας Waters 510 με διαφορικό διαθλασίμετρο Waters 410 και με ανιχνευτή απορρόφησης UV. Για την εύρεση του μοριακού βάρους, χρησιμοποιήθηκαν 4 στήλες τύπου μ-Styragel, με πορώδες υλικό (δικτυωμένο πολυστυρένιο) που έχει μέγεθος πόρων από  $10^2$  ως  $10^6$  Å. Ο φέρων διαλύτης ήταν DMF σε LiBr 0,1% κ.β. με παροχή 1 ml / min σε θερμοκρασία 60°C. Η καμπύλη βαθμονόμησης έγινε με την χρήση 7 προτύπων πολυστυρενίου που κάλυπταν το εύρος μοριακών βαρών από 1.800 μέχρι 900.000. Για την παρασκευή των δειγμάτων, ζυγίστηκαν 7 mgr πολυμερούς σε μπουκαλάκι (vial), διαλύθηκαν στον φέροντα διαλύτη και πριν την ένεση, φιλτραρίστηκαν.

### Διαφορικός Δείκτης Διάθλασης

Μια παράμετρος που είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους με σκέδαση φωτός είναι ο διαφορικός δείκτης διάθλασης,  $dn/dc$ . Η παράμετρος αυτή αποτελεί μέτρο της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύματος με την αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς, και ορίζεται ως εξής :

$$dn/dc = \lim_{c \rightarrow 0} (n - n_0) / c$$

όπου  $n$ ,  $n_0$  οι δείκτες διάθλασης του διαλύματος και του διαλύτη αντίστοιχα και  $c$  η συγκέντρωση. Ο διαφορικός δείκτης διάθλασης είναι ανεξάρτητος του



μοριακού βάρους για περίπου  $M_w > 10000$  και μειώνεται με το μοριακό βάρος για περίπου  $M_w < 10000$ . Για να είναι ακριβείς οι μετρήσεις του μοριακού βάρους, θα πρέπει η απόλυτη τιμή του διαφορικού δείκτη διάθλασης να είναι μεγαλύτερη, της τιμής 0,080, αλλιώς η ένταση του φωτός που σκεδάζεται θα είναι πολύ μικρή.

Ο διαφορικός δείκτης διάθλασης μετράται με διαφορικά διαθλασίμετρα. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη μέτρηση της μετατόπισης της δέσμης φωτός που διέρχεται από μια κυψελίδα η οποία είναι χωρισμένη σε δύο τμήματα, όπου στο ένα τμήμα φέρει καθαρό διαλύτη και στο άλλο διάλυμα πολυμερούς στον ίδιο διαλύτη. Στην περίπτωση συμπολυμερών ο διαφορικός δείκτης διάθλασης δίνεται από την σχέση :

$$(dn/dc)_C = w_A(dn/dc)_A + (1 - w_A)(dn/dc)_B$$

όπου  $w_A$  το κλάσμα βάρους του μονομερούς A στο συμπολυμερές,  $(dn/dc)_C$  ο δείκτης διάθλασης του συμπολυμερούς και  $(dn/dc)_A$ ,  $(dn/dc)_B$  οι δείκτες διάθλασης των δύο συστατικών του συμπολυμερούς αντίστοιχα. Απαραίτητες προϋποθέσεις για την ακριβή μέτρηση του μοριακού βάρους συμπολυμερών αποτελούν : i) οι απόλυτες τιμές των διαφορικών δεικτών διάθλασης του κάθε ενός συστατικού να είναι μεγάλες [ $(dn/dc)_A$ ,  $(dn/dc)_B > 0,080$ ] και ii) τα  $(dn/dc)_A$  και  $(dn/dc)_B$  να έχουν τα ίδια πρόσημα. Οι διαφορικοί δείκτες διάθλασης των ομοπολυπεπτιδίων, είναι οι εξής:

$$(dn/dc)_{\text{PBIG}} = 0,104 \text{ ml/gr (ως προς DMF)} \quad (dn/dc)_{\text{PLL}} = 0,123 \text{ ml/gr (ως προς DMF)}$$

$$(dn/dc)_{\text{PLP}} = 0,196 \text{ ml/gr (ως προς H}_2\text{O)}$$

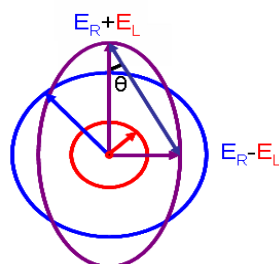
### Κυκλικός διχρωϊσμός (CD)

Οι πρωτεΐνες (οπτικά ενεργές ενώσεις) και γενικότερα τα μόρια, απορροφούν κβάντα φωτός, προάγοντας τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερες διεγερμένες καταστάσεις. Το εξερχόμενο φως έχει την ίδια συχνότητα αλλά έχει επιβραδυνθεί, εισάγοντας μια διάφορα φάσης, που είναι ανάλογη της ποσότητας του υλικού. Στην τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού, μετράται η

διαφορά της μοριακής απορροφητικότητας ( $\epsilon_R - \epsilon_L$ ), κατά την απορρόφηση από την πρωτεΐνη, κυκλικά πολωμένης (αριστερόστροφα ή δεξιόστροφα) μονοχρωματικής ακτινοβολίας φωτός στην περιοχή του far-UV, που οδηγεί σε π-π\* ηλεκτρονιακές μεταβάσεις. Αυτές αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς των πεπτιδίων (χρωμοφόρα) και επηρεάζονται σημαντικά από την δευτεροταγή δομή.

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

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

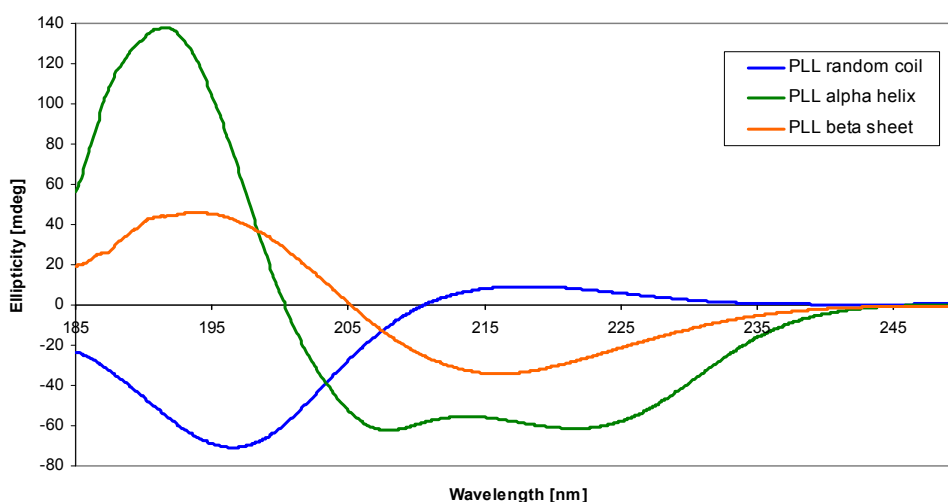


Οι ηλεκτρονικές διεγέρσεις του πεπτιδικού δεσμού των τριών διαμορφώσεων πολυπεπτιδικής αλυσίδας, δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 6: Απορροφήσεις των τριών διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.**

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

Οι μετρήσεις έγιναν σε μηχανήμα Perkin-Elmer, σε ειδικά κατασκευασμένες κυψελίδες. Επειδή οι μετρήσεις του κυκλικού διχρωϊσμού γίνονται σε διάλυμα, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην επιλογή του διαλύτη, ώστε να μην απορροφά αυτός στις μετρούμενες περιοχές. Τέτοιοι διαλύτες είναι το ακετονιτρίλιο και το νερό. Παρακάτω δίνεται χαρακτηριστικό φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού των διαφορετικών διαμορφώσεων της πολυ(L-λυσίνης) σε νερό (σχήμα 38). Η συγκέντρωση διαλυμάτων που χρησιμοποιήσαμε είναι της τάξης των  $2 \times 10^3$  gr/mol.



**Σχήμα 38:** Χαρακτηριστικό φάσμα CD της πολυ(L-λυσίνης) σε νερό στους 20°C, που δείχνει τις τρεις διαμορφώσεις που μπορεί να υιοθετήσει ανάλογα με τις συνθήκες: τυχαίο σπείραμα (σε pH=7), α-έλικα (σε υψηλό pH) και β-φύλλο (σε υψηλό pH και αυξημένη θερμοκρασία).

### Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η θερμοσταθμική ανάλυση ανήκει στις μεθόδους θερμικής ανάλυσης. Στην μέθοδο αυτή γίνεται μέτρηση της μεταβολής του βάρους δείγματος συναρτήσει της θερμοκρασίας. Παρακολουθείται η θερμική σταθερότητα και η διαδικασία της αποικοδόμησης του δείγματος σε υψηλές θερμοκρασίες μέχρι την καύση του. Κατά την μέθοδο αυτή γνωστή ποσότητα δείγματος τοποθετείται σε προζυγισμένο μικρό μεταλλικό δοχείο από πλατίνα ή αλουμίνιο και κρεμιέται σε ευαίσθητο θερμοζυγό. Το όλο σύστημα τοποθετείται σε φούρνο ελεγχόμενης θερμοκρασίας με δυνατότητα μεταβολής

της θερμοκρασίας. Η θέρμανση γίνεται είτε με την βοήθεια αντιστάσεων είτε στα πιο σύγχρονα μοντέλα με λάμπες φθορίου που φτάνουν σε θερμοκρασίες ως 1200°C. Η θέρμανση γίνεται πάντοτε υπό αδρανή ατμόσφαιρα για την αποφυγή οξειδωσης του δείγματος από την ατμόσφαιρα. Για την βαθμονόμηση του οργάνου χρησιμοποιούνται μέταλλα και κράματα με γνωστές θερμοκρασίες αποικοδόμησης όπως Ni 358.2°C και Co 1116.0°C. Από την θερμοσταθμική ανάλυση μπορούν να ληφθούν ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τις φυσικοχημικές μεταβολές του δείγματος, την θερμική συμπεριφορά του, την σύσταση και την περιεκτικότητα του δείγματος σε μέταλλα. Συνήθως η θερμοσταθμική ανάλυση προηγείται της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης για την εύρεση του εύρους θερμοκρασίας που μπορεί το δείγμα να εξεταστεί, χωρίς να καταστραφεί.

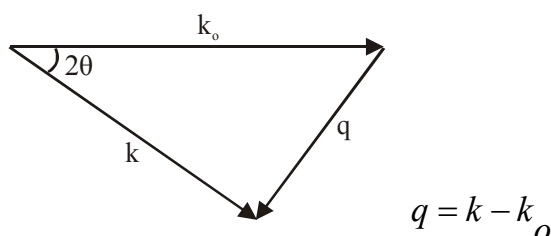
#### Σκέδαση ακτίνων-X (SAXS και WAXS)

Η σκέδαση ακτίνων X σε μικρές (small angle X-ray scattering, SAXS) και μεγάλες γωνίες (wide angle X-ray scattering, WAXS) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους διερεύνησης της δομής των πολυμερών. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη δομών με διαστάσεις από 1 έως 2000 Å. Η απαραίτητη αντίθεση σκέδασης (scattering contrast) για τις ακτίνες X, οφείλεται στην ύπαρξη διαφορών στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του δείγματος. Η σκέδαση προέρχεται από την αλληλεπίδραση των ακτίνων X με τα ηλεκτρόνια του δείγματος. Από την ανάλυση της γωνιακής εξάρτησης της έντασης της σκέδασης είναι δυνατόν να εξαχθούν πληροφορίες για την γεωμετρική διευθέτηση του δείγματος στο χώρο.

Η γωνιακή μεταβολή της σκεδαζόμενης έντασης προέρχεται από θετική ή αρνητική συμβολή των κυμάτων που σκεδάζονται από διάφορα σημεία του συστήματος. Όταν πρόκειται για απομονωμένα σημεία σκέδασης, δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους και η σκέδαση δίνεται από τον παράγοντα δομής, ο οποίος σε αυτήν την περίπτωση εξαρτάται μόνο από το σχήμα του σημείου που σκεδάζει και ονομάζεται παράγοντας μορφής (form factor). Όταν

πρόκειται για πυκνά συστήματα, υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σημείων σκέδασης, και μάλιστα η συνεισφορά των αλληλεπιδράσεων αυτών στη συνολική σκέδαση είναι σημαντική. Ο παράγοντας δομής για έναν τέλειο κρύσταλλο μπορεί να αναλυθεί σε δύο μέρη. Το ένα μέρος οφείλεται αποκλειστικά στο σχήμα των σωματιδίων (παράγοντας μορφής) και το άλλο προέρχεται από τη διεύθυνση των σωματιδίων στο χώρο (παράγοντας πλέγματος). Για οργανωμένες μορφολογίες συμπολυμερών κατά συστάδες, το σκεδάζον αντικείμενο θα είναι η δομική μονάδα της μορφολογίας (σφαίρες, κύλινδροι, φύλλα κτλ).

Αν  $k_0$  και  $k$  είναι τα διανύσματα κύματος της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης δέσμης ακτίνων  $X$  αντίστοιχα, ορίζεται ως διάνυσμα σκέδασης  $q$ , η διανυσματική διαφορά των  $k_0$  και  $k$ :



Για ένα ισότροπο μίγμα το διάνυσμα σκέδασης μπορεί να αντικατασταθεί με το μέτρο του από τη σχέση:

$$q = 2 \sin \theta / \lambda$$

όπου  $\lambda$ , το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και  $2\theta$ , η γωνία σκέδασης της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.

Όταν ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος προσπίπτει υπό γωνία  $\theta$  σε κρυσταλλικό σώμα, οι εξερχόμενες ακτινοβολίες έχουν εποικοδομητικό ή καταστρεπτικό αποτέλεσμα. Οι ανακλάσεις με εποικοδομητικό αποτέλεσμα περιγράφονται από το νόμο του Bragg από την διαφορά στην οπτική διαδρομή των ακτίνων σε διάφορα επίπεδα  $(hkl)$  του κρυσταλλικού πλέγματος:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta$$

όπου  $n$  είναι ακέραιος (τάξη ανάκλασης),  $\lambda$  το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας,  $d_{hkl}$  η απόσταση ανάμεσα στα επίπεδα ( $hkl$ ) και  $\theta$  η γωνία που σχηματίζει η προσπίπτουσα ακτινοβολία με τα επίπεδα.

Συμπεράσματα για το είδος της μορφολογίας που παρουσιάζει ένα συμπολυμερές μπορούν να εξαχθούν από το διάγραμμα έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το διάνυσμα σκέδασης [ $\ln I(q)=f(q)$ ], ανάλογα με τους λόγους των κορυφών ως προς τη θέση της πρώτης κορυφής. Έτσι για φυλλοειδή μορφολογία αναμένονται ανακλάσεις όπου οι λόγοι των αποστάσεων  $q$  σε σχέση με την πρώτη ανάκλαση, έχουν τιμές 1:2:3:4... (μορφολογία περιοδική σε μια διάσταση). Στην κυλινδρική μορφολογία, οι κύλινδροι τοποθετούνται σε εξαγωνικό πλέγμα, όπου οι λόγοι των θέσεων των κορυφών για τις επιτρεπόμενες ανακλάσεις είναι 1: $\sqrt{3}$ : $\sqrt{4}$ : $\sqrt{7}$ : $\sqrt{9}$ ... (δισδιάστατη μορφολογία). Τέλος στις κυβικές μορφολογίες, η μοναδιαία κυψελίδα έχει κυβική συμμετρία και το πλέγμα εμφανίζει περιοδικότητα σε τρεις διαστάσεις. Από αυτές, η μορφολογία OBDD ανήκει στην  $Pn3m$  ομάδα χώρου και οι επιτρεπόμενες ανακλάσεις βρίσκονται σε θέσεις με αναλογία  $\sqrt{2}$ : $\sqrt{3}$ : $\sqrt{4}$ : $\sqrt{5}$ : $\sqrt{6}$ : $\sqrt{8}$ ..., η δομή gyroid ανήκει στην ομάδα χώρου  $Ia3d$  και οι επιτρεπόμενες ανακλάσεις βρίσκονται σε θέσεις με αναλογία  $\sqrt{3}$ : $\sqrt{4}$ : $\sqrt{7}$ : $\sqrt{8}$ : $\sqrt{10}$ : $\sqrt{11}$ ..., και η σφαιρική μορφολογία, όπου οι σφαίρες διατάσσονται σε πλέγμα bcc (body centered cubic) με τις προβλεπόμενες ανακλάσεις να εμφανίζουν αναλογία 1: $\sqrt{2}$ : $\sqrt{3}$ : $\sqrt{4}$ : $\sqrt{5}$ : $\sqrt{6}$ ...

Οι κορυφές στο διάγραμμα  $\ln I(q)=f(q)$  εμφανίζονται αρκετές φορές πεπλατυσμένες ως συνέπεια μηχανικών παραμορφώσεων ή μη σωστής εξισορρόπησης του δείγματος. Πολύ σημαντικός στα πειράματα σκέδασης είναι ο διαχωρισμός σε μικροφάσεις. Αν ο διαχωρισμός είναι ασθενής τότε σχηματίζονται μεταξύ των δύο φάσεων, μεσοφάσεις (αντί για μεσεπιφάνειες) με μεταβαλλόμενο πάχος. Αποτέλεσμα της κατάστασης αυτής είναι η μείωση του παράγοντα δομής και η έλλειψη κορυφών στο διάγραμμα  $\ln I(q)=f(q)$ .

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

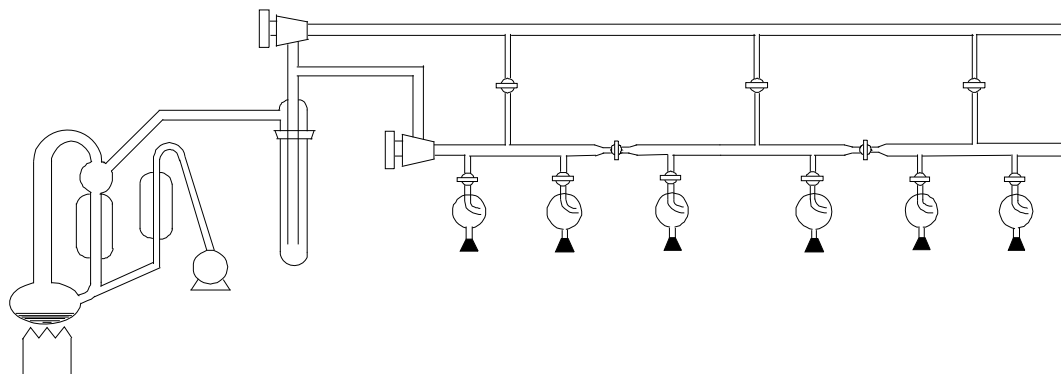
#### 3.1 Τεχνική Υψηλού Κενού

Ο “ζωντανός” πολυμερισμός, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών τα οποία χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της σχέσης δομής και ιδιοτήτων. Για να παραμείνει όμως ένα σύστημα ζωντανό, κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνση από το σύστημα ανεπιθύμητων ουσιών (κυρίως υγρασία και τυχόν προσμίξεις που υπάρχουν στα αντιδραστήρια) που θα προκαλέσουν πρόωρο τερματισμό των ζωντανών αλυσίδων, εξαιτίας της μεγάλης δραστηριότητας των ενεργών κέντρων, των μέσων σύζευξης 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 διαλυτών, μονομερών και των αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιηθούν.

Μέχρι σήμερα η τεχνική υψηλού κενού<sup>134</sup> 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 χειροποίητες και έχουν κατασκευαστεί μόνο με γυαλί, διότι εμπορικές συσκευές με εσφυρίσματα, ενέχουν το κίνδυνο διαρροής και εισαγωγής στον αντιδραστήρα υγρασίας και άλλων προσμίξεων από τον αέρα. Η απομάκρυνση της υγρασίας είναι καθοριστική, γιατί το νερό ανάλογα με την συγκέντρωση που βρίσκεται, είτε υδρολύει τα NCA's, 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 (εικόνα 1), αποτελείται από μία αντλία ελαίου, μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου, γυάλινους σωλήνες (Pyrex) και στρόφιγγες υψηλού κενού από teflon (Rotaflo 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-

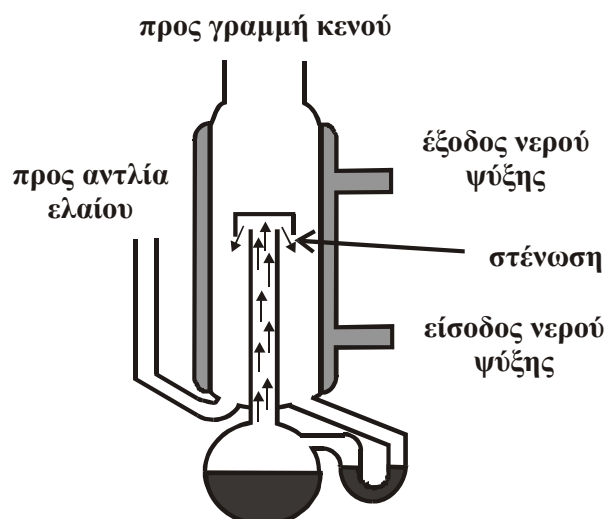
400°C). Τελικώς δημιουργείται από την απόσταξη του υδραργύρου ένα κενό της τάξης  $10^{-6}$  mmHg.



**Εικόνα 1:** 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 (σχήμα 39).





Σχήμα 39: Σχεδιάγραμμα μίας απλής αντλίας διαχύσεως.

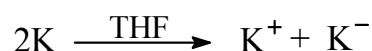
Για την προστασία της αντλίας διαχύσεως και της αντλίας λαδιού από πτητικά συστατικά υπάρχει μία παγίδα υγρού αζώτου. Η αντλία διαχύσεως συνδέεται με το κύριο μέρος της γραμμής κενού (που αποτελείται από γυάλινους σωλήνες Pyrex), με στρόφιγγες υψηλού κενού. Με τις στρόφιγγες, το κενό κατευθύνεται σε συγκεκριμένα σημεία της γραμμής και καθίσταται δυνατή η απομόνωση άλλων σημείων. Η σύνδεση των ειδικά κατασκευασμένων συσκευών με τη γραμμή κενού γίνεται με εσφυρίσματα, με την βοήθεια των οποίων προσαρμόζονται οι συσκευές σε αυτήν. Με τον τρόπο αυτό, πραγματοποιούνται οι διάφορες διεργασίες (αποστάξεις διαλυτών, μονομερών, απαερώσεις κ.λ.π.) 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 στην γραμμή υψηλού κενού. Η «ποιότητα» του κενού είναι δυνατόν να ελεγχθεί με πηνίο Tesla. Όταν η γραμμή υψηλού κενού έχει απαερωθεί ικανοποιητικά, ο θόρυβος κατά την επαφή του πηνίου με τα γυάλινα τμήματα της γραμμής είναι ασήμαντος. Λεπτομέρειες για τη χρήση της γραμμής υψηλού κενού και τις απαραίτητες προφυλάξεις που πρέπει να λαμβάνονται, αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

### 3.2 Καθαρισμός Διαλυτών<sup>135</sup>

**Οξικός αιθυλεστέρας:** Ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται ως διαλύτης τόσο για την σύνθεση των μονομερών όσο και για τις ανακρυσταλλώσεις. Ο διαλύτης αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε φιάλη 2000 ml με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) για μια μέρα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή κενού, απαερώνεται και εν συνεχεία αποστάζονται τα μεσαία κλάσματα σε νέα φιάλη 2 L με στρόφιγγα.

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

**Τετραϋδροφουράνιο (THF):** Το τετραϋδροφουράνιο αφήνεται για μια μέρα να αντιδράσει παρουσία μεταλλικού νατρίου, απαερώνεται και μεταφέρεται σε νέα σφαιρική φιάλη 2000 ml που περιέχει κράμα μεταλλικού καλίου-νατρίου σε αναλογία 3:1, όπου και αφήνεται υπό ανάδευση. Η εμφάνιση κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη της καθαρότητας του THF. Όπως είναι γνωστό, το αρνητικό ιόν καλίου επιδιαλυτώνεται στο THF και σχηματίζει διάλυμα με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Έχει προταθεί ότι το χρώμα αυτό, προέρχεται από σύμπλοκα του καθαρού διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια) σύμφωνα με την αντίδραση :



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

**Ακετονιτρίλιο:** Το ακετονιτρίλιο αντιδρά με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) για μια μέρα, αποστάζεται ακολούθως σε άλλη φιάλη που έχει υποστεί ξήρανση και απαερώνεται.

(διηλ.σταθερά  $\epsilon_r = 37.5$  στους 20°C,  $\Sigma.Z = 82^\circ\text{C}$ )

**Εξάνιο:** Το εξάνιο, αφού αντιδράσει για μία μέρα υπό ανάδευση με λεπτότατα διαμερισμένο  $\text{CaH}_2$ , μεταφέρεται στη γραμμή κενού, απαερώνεται και αποστάζεται τελικά σε άλλη φιάλη που έχει ξηραθεί στην γραμμή και περιέχει λεπτά κομμένες πλάκες Na.

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

**Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF):** Χρησιμοποιείται DMF υψηλής καθαρότητας (ποιότητας extra dry με  $\text{H}_2\text{O} < 50$  ppm) που παραλαμβάνεται σε κλειστά δοχεία των 100 ml και φυλάσσεται σε αδρανή ατμόσφαιρα (glove box). Για τον καθαρισμό του, το μεταγγίζουμε με γυάλινο χωνάκι υπό αργό, σε σφαιρική φιάλη 250 ml με στρόφιγγα, που έχει υποστεί ξήρανση στην γραμμή κενού και κατόπιν τοποθετείται στην γραμμή κενού και απαερώνεται. Το στάδιο αυτό, πραγματοποιείται δυο φορές. Από την σφαιρική φιάλη, λαμβάνονται με απόσταξη για τις απαιτούμενες αραιώσεις τα μεσαία κλάσματα.

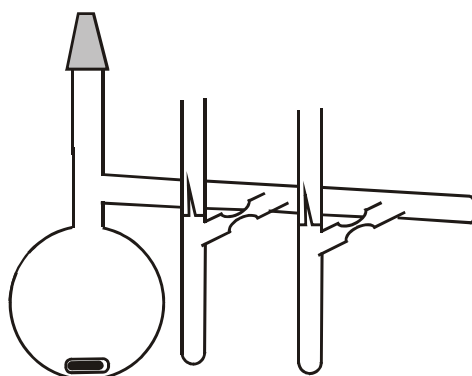
(διηλ.σταθερά  $\epsilon_r = 36.71$  στους  $25^\circ\text{C}$  ,  $\Sigma.Z = 153^\circ\text{C}$ )

**1,4 Διοξάνιο:** Το διοξάνιο παραλαμβάνεται σε κλειστά δοχεία των 100 ml και φυλάσσεται σε αδρανή ατμόσφαιρα (glove box). Για τον καθαρισμό του, αφού το βγάλουμε από το glove box, το μεταγγίζουμε με γυάλινο χωνάκι σε σφαιρική φιάλη 250 ml με στρόφιγγα που έχει υποστεί ξήρανση στην γραμμή κενού και περιέχει λεπτά κομμένες πλάκες Na. Εν συνεχεία αυτό παγώνεται με υγρό άζωτο και απαερώνεται με προσοχή, διότι το διοξάνιο παγώνει πολύ εύκολα και είναι δυνατόν να φράξει τον λαιμό της φιάλης, με αποτέλεσμα να μην γίνει σωστή απαέρωση.

(διηλ.σταθερά  $\epsilon_r = 2.20$  στους  $25^\circ\text{C}$  ,  $\Sigma.Z = 101^\circ\text{C}$ )

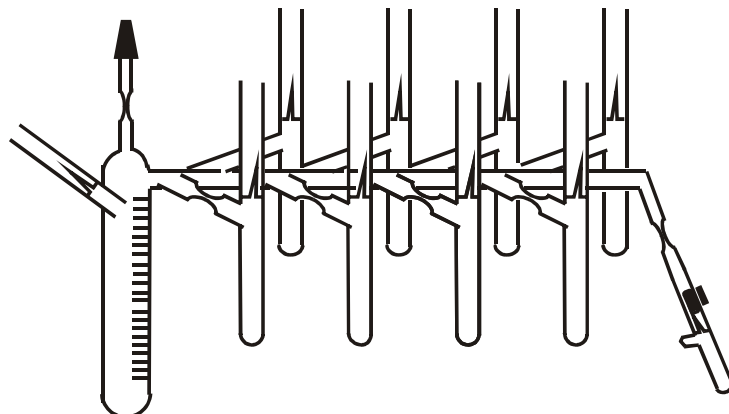
### 3.3 Καθαρισμός Άλλων Αντιδραστηρίων

**Διμεθυλαμίνη:** Η διμεθυλαμίνη χρησιμοποιήθηκε ως απαραίτητη για τον πολυμερισμό των NCA's. Η διαδικασία είναι τροποποιημένη σε σχέση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την εξυλαμίνη, λόγω του χαμηλού σημείου ζέσεως της (αέριο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με υψηλή τάση ατμών 1.8 atm,  $\Sigma.Z=7^{\circ}\text{C}$ ) και πρέπει να υγροποιηθεί για να ακολουθήσει ο καθαρισμός της. Για την υγροποίηση προσαρμόζεται η οβίδα του αερίου στην γραμμή κενού και γίνεται διεξοδικός έλεγχος με την βοήθεια του πηνίου Tesla για τυχόν διαρροές. Σε γειτονική στρόφιγγα προσαρμόζεται φιάλη των 100 ml που περιέχει κάτοπτρο νατρίου και είναι απαερωμένη. Η φιάλη εν συνεχεία ψύχεται με την βοήθεια λουτρού ισοπροπανόλης/ξηρού πάγου στους  $-78^{\circ}\text{C}$ . Τέλος ανοίγεται η στρόφιγγα της οβίδας σιγά και με προσοχή για να μην συμπυκνωθεί μεγαλύτερος όγκος αερίου από αυτόν της φιάλης. Όταν έχουν συμπυκνωθεί 10 ml περίπου το λουτρό ισοπροπανόλης ανταλλάσσεται γρήγορα με παγόνερο και αφήνεται το υγροποιημένο πλέον αέριο να αντιδράσει με το νάτριο για δυο ώρες. Περιοδικά συμπληρώνεται πάγος στο λουτρό ώστε η θερμοκρασία να μην υπερβεί το σημείο ζέσεως της διμεθυλαμίνης. Εν συνεχεία αποστάζεται η επιθυμητή ποσότητα κάθε φορά, σε συσκευή (σχήμα 40) που περιέχει βαθμονομημένες αμπούλες, μοιράζοντας έτσι τον πυκνό απαραίτητο. Η κάθε αμπούλα παγώνεται με υγρό άζωτο, απαερώνεται, συντήκεται στην στένωση και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.



Σχήμα 40: Συσκευή καθαρισμού διμεθυλαμίνης.

Αφού κόψουμε μια βαθμονομημένη αμπούλα και την προσαρμόσουμε στην συσκευή αραίωσης, στην συνέχεια αραιώνουμε τον απαρχητή με ACN ή DMF ή THF (σχήμα 41).

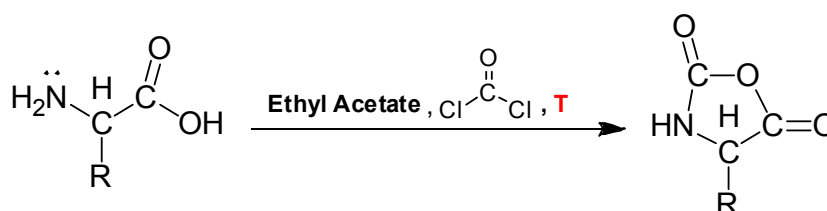


Σχήμα 41: Συσκευή αραίωσης διμεθυλαμίνης.

**Τριαιθυλαμίνη (Et<sub>3</sub>N)**: Αφήνεται να αντιδράσει για ένα βράδυ με CaH<sub>2</sub> και την επομένη αφού απαερωθεί, αποστάζεται σε γειτονική συσκευή 250 ml με εσμύρισμα που περιέχει λεπτά κομμένες πλάκες μεταλλικού νάτριου. Κάθε φορά, αποστάζουμε την ποσότητα τριαιθυλαμίνης που θέλουμε σε γειτονική μικρή αμπούλα με εσμύρισμα και κόβουμε την στένωση.

### 3.4 Παρασκευή και Καθαρισμός Μονομερών

Τα μονομερή NCA's δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα και επομένως πρέπει να παρασκευαστούν από τα αντίστοιχα αμινοξέα. Η παρασκευή τους<sup>55,136,137</sup> είναι γνωστή διεθνώς στην βιβλιογραφία (μέθοδος Fuchs-Farthing) και γίνεται με αντίδραση στερεού τριφωσγενίου<sup>138-141</sup> με το α-αμινοξύ (σχήμα 42) σε θερμοκρασία και διαλύτη, οξικό αιθυλεστέρα ή THF. Το τελευταίο συνήθως αποφεύγεται γιατί είναι πιο πολικό και μπορεί να αντιδράσει με το φωσγένιο. Αν το αμινοξύ περιέχει πλευρική χαρακτηριστική ομάδα, αυτή θα πρέπει να προφυλαχθεί με κατάλληλη προστασία.

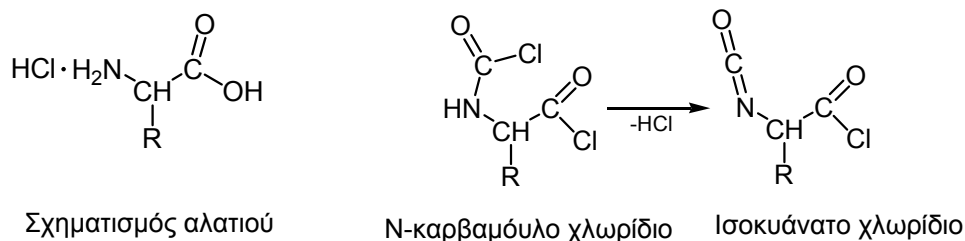


Σχήμα 42: Αντίδραση του αμινοξέως με το φωσγένιο προς σχηματισμό NCA.

Αρχικά, αντιδρά το αμινοξύ (αιώρημα στον διαλύτη) με το παραγόμενο *in situ* φωσγένιο υπό αργό σε ένα γρήγορο στάδιο, παράγοντας HCl και N-καρβαμόυλο χλωρίδιο. Το τελευταίο, δεν απομονώνεται συνήθως στα περισσότερα αμινοξέα, διότι μετατρέπεται αμέσως στο επιθυμητό NCA. Στο τέλος της αντίδρασης, το χλωρίδιο υπάρχει σαν παραπροϊόν σε μικρό βαθμό. Το κλείσιμο του δακτυλίου του πιο πολικού N-καρβόξυ ανυδρίτη, εξασφαλίζεται, με την διάλυση του στο μέσο αντίδρασης. Στην περίπτωση που παρασκευάζονται ανυδρίτες 'άπολων' αμινοξέων όπως γλυκίνη, αλανίνη, λευκίνη κ.λ.π., απαιτείται για το κλείσιμο του δακτυλίου, η χρήση αφενός μεγαλύτερης θερμοκρασίας, και αφετέρου η χρήση του πιο πολικού ακετονιτριλίου μετά από κάποιο χρονικό διάστημα.

Στα περισσότερα αμινοξέα, ο σχηματισμός του NCA επιβάλλει την χρήση μιας βάσης όπως Et<sub>3</sub>N<sup>141</sup>, γιατί το παραγόμενο HCl επικάθεται πάνω στο άζωτο του αμινοξέως, εμποδίζοντας τον δακτύλιο να κλείσει. Αυξημένη συγκέντρωση του οξέως αυτού, μπορεί επίσης να ανοίξει τον δακτύλιο. Έτσι, η αντίδραση μιας βάσης με τα όξινα παραπροϊόντα (σχήμα 43) καθίσταται

αναγκαία αφού αυτά, δύσκολα αποστάζουν και η εκδίωξη τους είναι αρκετά δύσκολη.

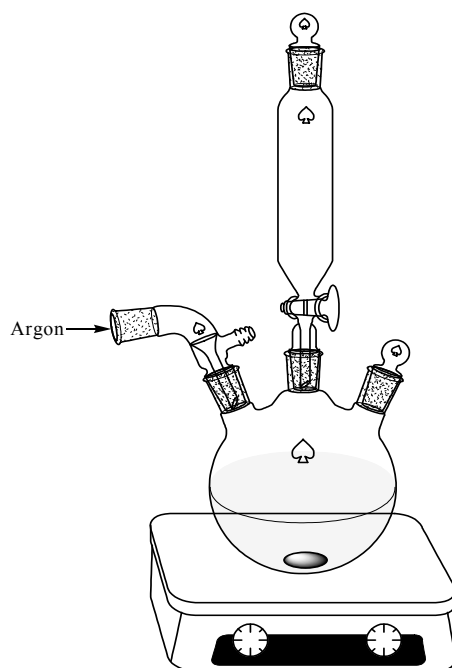


**Σχήμα 43: Παράπλευρες αντιδράσεις κατά τον σχηματισμό του NCA.**

Μετά το πέρας της αντίδρασης, ακολουθούν εκχυλίσεις<sup>142</sup> και το μείγμα καθαρίζεται με ανακρυσταλλώσεις σε αργό ή υψηλό κενό. Η καθαρότητα του ανυδρίτη είναι τεράστιας σημασίας για την σύνθεση πεπτιδικών πολυμερών, καθώς τυχόν όξινες προσμίξεις θα αντιδράσουν με τον βασικό απαρχητή (διμεθυλαμίνη), με αποτέλεσμα να υπάρχουν αντιδράσεις τερματισμού και η απόδοση του πολυμερισμού να είναι μικρή.

### 3.4.1 Παρασκευή (L)-Pro NCA<sup>143</sup>

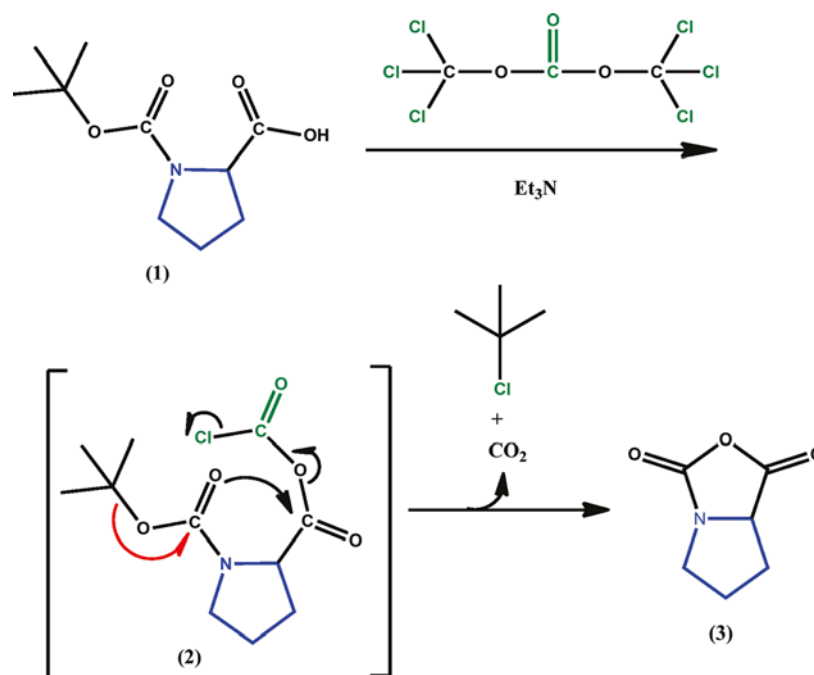
Αφήνουμε το προστατευμένο αμινοξύ για ένα βράδυ στην γραμμή υψηλού κενού (Boc-L-proline 30 gr, 0.139 mol) σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 1000 ml, για να τραβήξει τυχόν πτητικές προσμίξεις. Την επομένη, αποστάζουμε στην φιάλη 600 ml ξηρό THF, απαερώνουμε και αφού το ξεπαγώσουμε, ανοίγουμε την στρόφιγγα και προσθέτουμε αργό από την γραμμή αργού/κενού. Ακολούθως, προσθέτουμε από το ελεύθερο στόμιο τριφωσγένιο (0,37 equiv, 15,2 gr), το αφήνουμε να αντιδράσει για 10 λεπτά και έπειτα, σπάμε την αμπούλα της απεσταγμένης τριαιθυλαμίνης (1,1 equiv, 21,3 mL) σε σταγονομετρικό χωνί που περιέχει μικρή ποσότητα THF, και την ρίχνουμε στάγδην στους 0°C στο διάλυμα (σχήμα 44). Όταν τελειώσει όλη η ποσότητα στο χωνί, αποσύρουμε το παγόλουτρο, και αφήνουμε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 6,5h.



Σχήμα 44: Συσκευή αντίδρασης προς σχηματισμό (L)-Pro NCA.

Το διάλυμα πρέπει να αναδεύεται συνεχώς ιδιαίτερα κατά την πορεία σχηματισμού του αλατιού  $\text{HCl}\cdot\text{Et}_3\text{N}$  (γι'αυτό και ο όγκος του διαλύτη είναι μεγάλος), διότι αν σταματήσει η ανάδευση (εξ'αιτίας της μεγάλης ποσότητας αλατιού), είναι πιθανό η τριαθουλαμίνη που πέφτει σε ένα σημείο μόνο, να πολυμερίσει τον σχηματιζόμενο ανυδρίτη. Θα πρέπει να επισημανθεί, ότι η αντίδραση γίνεται σε ένα στάδιο και η τριαθουλαμίνη, είναι απαραίτητη για να ξεκινήσει ο σχηματισμός του δακτυλίου (σχήμα 45). Μετά το τέλος της αντίδρασης, φιλτράρουμε το διήθημα (φίλτρο No.3) σε νέα συσκευή και αποστάζουμε την ποσότητα του διαλύτη. Το εναπομείνων στερεό ξεραίνεται για ένα βράδυ στο υψηλό κενό, για να απομακρύνουμε την περίσσεια φωσγενίου (αέριο).





Σχήμα 45: Μηχανισμός σχηματισμού του ανυδρίτη (L)-Pro NCA.

### Καθαρισμός (L)-Pro NCA

Το ακάθαρτο μονομερές, διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με παγόνερο 3% HCl, έτσι ώστε το pH=6-7. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης αποστάζεται, αποδίδοντας ακάθαρτους κρυστάλλους. Ο ανυδρίτης, διαλύεται στην ελάχιστη ποσότητα THF και ακολουθεί αποκρυστάλλωση με εξάνιο (400 mL), οδηγώντας σε ένα γαλακτώδες παχύ ίζημα, το οποίο αφήνεται στους -20°C για να πέσει καλά. Το διάλυμα διαλυτών απομακρύνεται στην γραμμή αργού/κενού με λεπτό και στενό φίλτρο ανάστροφου φιλτραρίσματος (microfilter candle for reversed filtration with a narrow tube, Duran, d=13 mm, por.3) και το ίζημα ξηραίνεται στην γραμμή υψηλού κενού. Με αυτόν τον τρόπο, η πρόσμιξη (1) απομακρύνεται. Η όλη διαδικασία, ελέγχεται με FTIR and <sup>1</sup>H-NMR (εικόνες 3-7). Το τελικό και σημαντικότερο στάδιο καθαρισμού, περιλαμβάνει διάλυση του ανυδρίτη με θέρμανση σε εξάνιο (μη-διαλύτης για τον ανυδρίτη σε θερμοκρασία δωματίου) στους 48°C υπό ισχυρή ανάδευση.

Ρίχνουμε 500 ml εξάνιο στην φιάλη υπό ανάδευση, και σταδιακά θερμαίνουμε στους 48°C, όπου το διάλυμα ομογενοποιείται και διαλύεται πλήρως. Αμέσως το φιλτράρουμε με ζεστό φίλτρο (No.3, χωρητικότητας 125 ml) υπό κενό σε καινούργια φιάλη 1000 ml, όπου από την διαφορά θερμοκρασίας, σχηματίζονται βελονοειδείς κρύσταλλοι (L)-Pro NCA (needles), οι οποίοι και αφήνονται στους -20°C. Με αυτήν την διαδικασία, απομακρύνονται στο φίλτρο οι ελαιώδεις μη διαλύτες σε εξάνιο προσμίξεις (2). Χρησιμοποιώντας και πάλι φίλτρο ανάστροφου φιλτραρίσματος, διώχνουμε το παγωμένο εξάνιο και αφήνουμε τους κρυστάλλους στο υψηλό κενό για να ξηραθούν. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται, εάν κριθεί σκόπιμο από τον χαρακτηρισμό και η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχεται με FTIR, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR και ESI-MS. Το τελικό προϊόν φυλάσσεται στο glove box, λόγω της ευαισθησίας του. Η απόδοση που παίρνουμε μπορεί να είναι χαμηλή, αλλά το μονομερές NCA (που αποτελεί το καθοριστικό για την επίτευξη ελεγχόμενου πολυμερισμού) είναι ότι πιο καθαρό έχει παρουσιαστεί και χαρακτηριστεί με φασματοσκοπικές μεθόδους στην βιβλιογραφία. Στις εικόνες 3-10, δίνονται τα φάσματα που ελήφθησαν και πιστοποιούν την καθαρότητα του ανυδρίτη. Ολική απόδοση 6 gr (30%), Σ.Ζ: 53-55°C.

(MB<sub>Boc-Pro-OH</sub> = 215,25 gr/mol, MB<sub>Pro-NCA</sub> = 141,12 gr/mol, MB<sub>τριφωσγενίου</sub> = 296,75 gr/mol, MB<sub>Et<sub>3</sub>N</sub> = 101,19, d<sub>Et<sub>3</sub>N</sub> = 0,726)

(L)-Pro NCA. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.27 (dd, J = 8.78, 7.84 Hz, 1H), 3.71 (dt, J = 11.4, 7.47, 7.47 Hz, 1H), 3.26 (dd, J = 11.4, 8.32, 4.92 Hz, 1H), 2.25 (m, 1H), 2.11 (m, 2H), 1.88 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.0, 155.2, 63.3, 46.8, 28.0, 27.2; IR (λεπτό υμένιο) 2994, 2958, 1845, 1824, 1772, 1364, 1328, 1270, 1202, 1185, 1150, 1095, 998, 952, 916 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS m/z 70, 114, 130, 141 (capillary temperature 150°C, spray voltage 3000-4000 V).

### 3.4.2 Παρασκευή Bn-(L)-Hyp NCA<sup>144</sup>

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια όπως προηγουμένως, με αλλαγή βέβαια στις ποσότητες λόγω κόστους. Αφήνουμε το προστατευμένο αμινοξύ για ένα βράδυ στην γραμμή υψηλού κενού (Boc-L-Hy(Bn)<sub>n</sub>: 5 gr, 0,016 mol) σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 500 ml, για να τραβήξει τυχόν πτητικές προσμίξεις. Την επομένη, αποστάζουμε στην φιάλη 200 ml ξηρό THF, απαερώνουμε και αφού το ξεπαγώσουμε, ανοίγουμε την στρόφιγγα και προσθέτουμε αργό από την γραμμή αργού/κενού. Ακολούθως, προσθέτουμε από το ελεύθερο στόμιο τριφωσγένιο (0,37 equiv, 1,74 gr), το αφήνουμε να αντιδράσει για 10 λεπτά και έπειτα, σπάμε την αμπούλα της απεσταγμένης τριαθυλαμίνης (1,1 equiv, 2,45 mL) σε σταγονομετρικό χωνί που περιέχει μικρή ποσότητα THF, και την ρίχνουμε στάγδην στους 0°C στο διάλυμα. Όταν τελειώσει η όλη η ποσότητα στο χωνί, αποσύρουμε το παγόλουτρο, και αφήνουμε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 16h. Θα πρέπει να επισημανθεί, ότι η αντίδραση γίνεται σε ένα στάδιο και η τριαθυλαμίνη, είναι απαραίτητη για να ξεκινήσει ο σχηματισμός του δακτυλίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, φιλτράρουμε (φίλτρο No.3) το διήθημα σε νέα συσκευή και αποστάζουμε την ποσότητα του διαλύτη. Το εναπομείνων στερεό ξεραίνεται για ένα βράδυ στο υψηλό κενό, για να απομακρύνουμε την περίσσεια φωσγενίου (αέριο).

### Καθαρισμός Bn-(L)-Hyp NCA

Το ακάθαρμο μονομερές, διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με παγωμένο 3% HCl, έτσι ώστε το pH=6-7. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ή MgSO<sub>4</sub> και ο διαλύτης αποστάζεται, αποδίδοντας ακάθατους κρυστάλλους. Ο ανυδρίτης, διαλύεται στην ελάχιστη ποσότητα THF και ακόλουθη ανακρυστάλλωση με εξάνιο, η οποία αφήνεται στους -20°C για να πέσει καλά το ίζημα. Το διάλυμα διαλυτών απομακρύνεται στην γραμμή αργού/κενού με λεπτό και στενό φίλτρο ανάστροφου φιλτραρίσματος (microfilter candle for reversed filtration with a narrow tube, Duran, d=13 mm, por.3) και το ίζημα ξηραίνεται στην γραμμή υψηλού κενού. Με αυτόν τον

τρόπο, απομακρύνεται τόσο το αρχικό Boc αμινοξύ, όσο και ο γραμμικός ανυδρίτης που δεν έχει ακόμα κλείσει. Το τελικό στάδιο καθαρισμού, περιλαμβάνει ακόμα δυο ανακρυσταλλώσεις με τον ίδιο τρόπο και η τελική καθαρότητα των βελονοειδών κρυστάλλων του ανυδρίτη, πιστοποιείται με FTIR (εικόνα 11). Ολική απόδοση 6 gr (30%).

$$(MB_{\text{Boc-Hy(Bn)P-OH}} = 321,37 \text{ gr/mol}, \quad MB_{\text{Bn-Hyp-NCA}} = 247,08 \text{ gr/mol})$$

### 3.4.3 Παρασκευή (L)-Gly NCA

Αφήνουμε το προστατευμένο αμινοξύ για ένα βράδυ στην γραμμή υψηλού κενού (Boc-L-Gly: 5 gr, 0,028 mol) σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 500 ml, για να τραβήξει τυχόν πτητικές προσμίξεις. Την επομένη, αποστάζουμε στην φιάλη 200 ml ξηρό THF, απαερώνουμε και αφού το ξεπαγώσουμε, ανοίγουμε την στρόφιγγα και προσθέτουμε αργό από την γραμμή αργού/κενού. Ακολουθως, προσθέτουμε από το ελεύθερο στόμιο τριφωσγένιο (0,37 equiv, 3 gr), το αφήνουμε να αντιδράσει για 10 λεπτά και έπειτα, σπάμε την αμπούλα της απεσταγμένης τριαθυλαμίνης (1,1 equiv, 4,3 mL) σε σταγονομετρικό χωνί που περιέχει μικρή ποσότητα THF, και την ρίχνουμε στάγδην στους 0°C στο διάλυμα. Όταν τελειώσει η όλη η ποσότητα στο χωνί, αποσύρουμε το παγόλουτρο, και αφήνουμε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 6h. Θα πρέπει να επισημανθεί, ότι η αντίδραση γίνεται σε ένα στάδιο και η τριαθυλαμίνη, είναι απαραίτητη για να ξεκινήσει ο σχηματισμός του δακτυλίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, φιλτράρουμε (φίλτρο No.3) το διήθημα σε νέα συσκευή και αποστάζουμε την ποσότητα του διαλύτη. Το εναπομείναν στερεό ξηραίνεται για ένα βράδυ στο υψηλό κενό, για να απομακρύνουμε την περίσσεια φωσγενίου (αέριο).

### Καθαρισμός (L)-Gly NCA

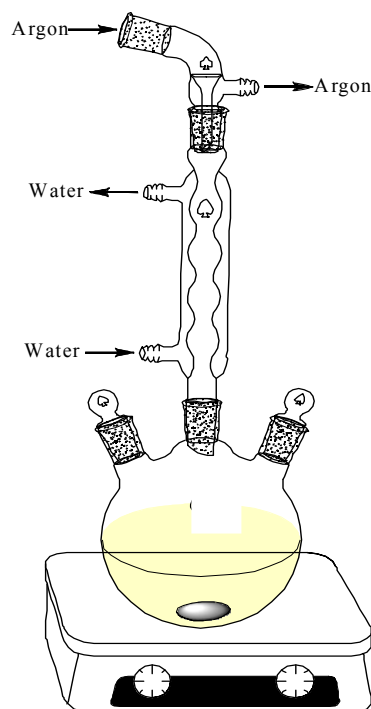
Στην περίπτωση του ανυδρίτη της γλυκίνης δεν κάνουμε εκχύλιση. Ο ανυδρίτης διαλύεται στην ελάχιστη ποσότητα THF και ακολουθεί ανακρυστάλλωση με εξάνιο, η οποία αφήνεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για να πέσει καλά το ίζημα. Το διάλυμα διαλυτών απομακρύνεται στην γραμμή αργού/κενού με λεπτό και στενό φίλτρο ανάστροφου φιλτραρίσματος (microfilter candle for reversed filtration with a narrow tube, Duran,  $d=13\text{ mm}$ , por.3) και το ίζημα ξηραίνεται στην γραμμή υψηλού κενού. Με αυτόν τον τρόπο, απομακρύνεται τόσο το αρχικό Boc αμινοξύ, όσο και ο γραμμικός ανυδρίτης που δεν έχει ακόμα κλείσει. Το τελικό στάδιο καθαρισμού, περιλαμβάνει ακόμα δυο ανακρυσταλλώσεις με τον ίδιο τρόπο και η τελική καθαρότητα των βελονοειδών κρυστάλλων του ανυδρίτη, πιστοποιείται με FTIR (εικόνα 12). Ολική απόδοση 2 gr (50%).

$$(MB_{\text{Boc-Gly-OH}}=175,18\text{ gr/mol},\quad MB_{\text{Gly-NCA}}=101,01\text{ gr/mol})$$

#### 3.4.4 Παρασκευή Bn-(L)-Glu NCA<sup>139</sup>

Αφήνουμε το προστατευμένο αμινοξύ για ένα βράδυ στην γραμμή υψηλού κενού σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 1000 ml με στρόφιγγα, για να τραβήξει τυχόν πτητικές προσμίξεις. Την επομένη, αποστάζουμε στην φιάλη 400 ml ξηρό οξικό αιθυλεστέρα, απαερώνουμε και αφού το ξεπαγώσουμε, ανοίγουμε την στρόφιγγα και προσθέτουμε αργό από την γραμμή αργού/κενού. Το αμινοξύ βρίσκεται υπό μορφή αιωρήματος στον διαλύτη. Ανεβάζουμε την θερμοκρασία σταδιακά μέχρι τους  $50^{\circ}\text{C}$  (γι'αυτό απαιτείται και ψυκτήρας, σχήμα 47) και αφού σταθεροποιηθεί η θερμοκρασία, προσθέτουμε από το ελεύθερο στόμιο, μικρή περίσσεια τριφωσγενίου ( $1,2 / 3 = 0,40\text{ equiv.}$ ). Εάν μετά από 1,5 ώρα δεν έχει διαυγάσει το διάλυμα (το NCA είναι διαλυτό στον οξικό αιθυλεστέρα), προσθέτουμε μικρή ποσότητα τριφωσγενίου, έως ότου διάλυμα γίνει πλήρως διαυγές. Η όλη διαδικασία απαιτεί περίπου 3-4 ώρες και η αντίδραση γίνεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού.

Προς το τέλος της αντίδρασης, κλείνουμε την θέρμανση και αφήνουμε το διάλυμα να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διήθηση του μείγματος (φίλτρο Νο.3) σε άλλη ξηρή τρίλαιμη φιάλη με στρόφιγγα, για την απομάκρυνση στερεών παραπροϊόντων και τυχόν αμινοξέων που δεν έχουν αντιδράσει. Έπειτα, διώχνουμε τον διαλύτη και αφήνουμε το στερεό να ξηραθεί υπό κενό για ένα βράδυ. Την επομένη, ακολουθεί το σημαντικότερο στάδιο του καθαρισμού του μονομερούς και των ανακρυσταλλώσεων.



Σχήμα 47: Συσκευή αντίδρασης για την σύνθεση του μονομερούς Bn-(L)-Glu NCA.

### Καθαρισμός Bn-(L)-Glu NCA

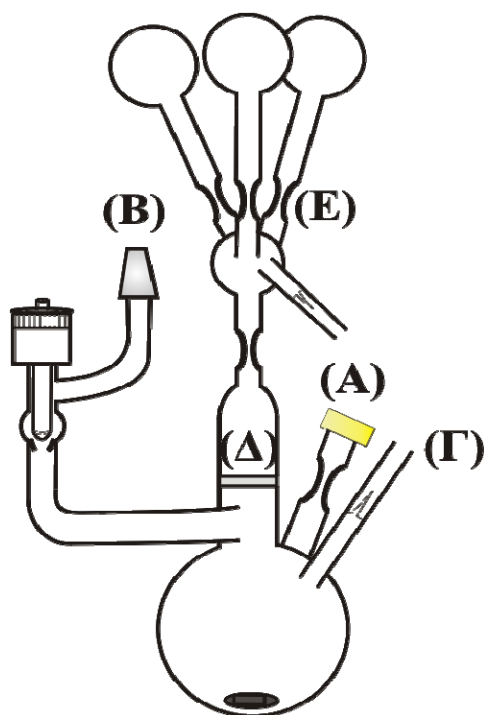
**Βήμα 1<sup>ο</sup>:** Προσθέτουμε στο στερεό, οξικό αιθυλεστέρα από το μπουκάλι, διαλύοντας το, και το διάλυμα ψύχεται με παγόνερο στους 0°C. Ακολουθούν εκχυλίσσεις, αρχικά με παγωμένο καθαρό υδατικό διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> 0.5% κ.β και κατόπιν με παγωμένο υδατικό διάλυμα NaCl 3% κ.β, έως ότου το pH γίνει ουδέτερο. Με τον τρόπο αυτό, απομακρύνουμε την περίσσεια του τριφωσγενίου, το HCl, υδροχλωρικά άλατα του αμινοξέως καθώς και υπολείμματα αμινοξέως που δεν έχουν αντιδράσει. Ακολούθως λαμβάνουμε την οργανική στιβάδα και την ξηραίνουμε με MgSO<sub>4</sub>.

**Βήμα 2<sup>ο</sup>:** Αφού ελέγξουμε την συσκευή (σχήμα 48) για οπές, την ξηραίνουμε στην γραμμή κενού. Στην συνέχεια κατεβάζουμε την συσκευή από την γραμμή, προσθέτουμε αργό από την γραμμή αργού/κενού και διηθούμε το διαυγές διάλυμα υπό ροή αργού μέσω γυάλινου φίλτρου στο στένωμα (Α) της συσκευής καθαρισμού.

**Βήμα 3<sup>ο</sup>:** Ανεβάζουμε την συσκευή στην γραμμή κενού από το εσμύρισμα (Β), απομακρύνουμε την μεγαλύτερη ποσότητα του αργού στην παγίδα, κόβουμε το (Α) με σύντηξη και διώχνουμε το διαλύτη με απόσταξη σε διπλανή σφαιρική φιάλη. Ακολούθως αφήνουμε το μονομερές να ξηραθεί στην γραμμή κενού.

**Βήμα 4<sup>ο</sup>:** Αποστάζουμε ακολούθως την ελάχιστη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα, που είναι ικανή να διαλύσει το μονομερές, απαερώνουμε και απομακρύνουμε την συσκευή από την γραμμή. Αφού ξεπαγώσουμε, διαλύουμε την ποσότητα του μονομερούς στην χαμηλότερη δυνατή θερμοκρασία και προσθέτουμε ξηρό εξάνιο από την γραμμή (περίπου 3 φορές την ποσότητα του οξικού αιθυλεστέρα). Το μονομερές κατά την προσθήκη εξανίου, παραμένει διαλυτό αρχικά και κοντά στην ολοκλήρωση της προσθήκης, θολώνει και καταβυθίζεται. Η συσκευή τοποθετείται στο ψυγείο στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για μία νύχτα ή και λιγότερο, ώστε να καταβυθιστεί όλη η ποσότητα του μονομερούς.

**Βήμα 5<sup>ο</sup>:** Την επόμενη μέρα, διηθείται το υπερκείμενο υγρό μέσω του γυάλινου φίλτρου (Δ) της συσκευής σε παρακείμενη φιάλη, η οποία και απομακρύνεται με σύντηξη στο (Ε) όπως φαίνεται στην εικόνα 2.



Σχήμα 48: Συσκευή ανακρυστάλλωσης των NCA's κατασκευασμένες για υψηλό κενό.

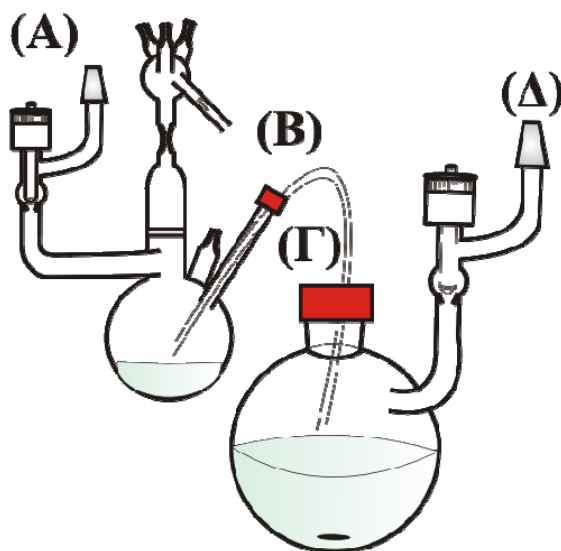


Εικόνα 2: Διήθηση του υπερκείμενου διαλύματος από το φίλτρο στην άδεια φιάλη και απομάκρυνση της από την συσκευή καθαρισμού με σύντηξη στο σημείο C.



**Βήμα 6<sup>ο</sup>:** Ανεβάζουμε την συσκευή στην γραμμή κενού από το εσμύρισμα (B) και αφήνουμε το μονομερές να ξηραθεί στη γραμμή κενού. Στην συνέχεια επαναλαμβάνονται τα βήματα 4-6 άλλες δύο φορές, ώσπου στο τέλος να απομακρυνθούν όλες οι σφαιρικές φιάλες. Τέλος ανεβάζουμε την συσκευή από το εσμύρισμα B στην γραμμή κενού και αφήνουμε το μονομερές να ξηραθεί για 1-2 ώρες. Αποστάζουμε ακολούθως ποσότητα ξηρού οξικού αιθυλεστέρα, απαιρώνουμε και μεταφέρουμε την συσκευή στην γραμμή αργού/κενού. Εκεί υπό ροή αργού, μεταφέρεται το διάλυμα με cannula (σχήμα 49) σε παρακείμενη ξηρή φιάλη 500 ml και αποστάζεται ο διαλύτης υπό κενό. Ο τελικός καθαρός ανυδρίτης, ξηραίνεται για 2 ώρες και φυλάσσεται στο glove box, ενώ η τελική καθαρότητα του ανυδρίτη ελέγχεται με FTIR (εικόνα 13). Ολική απόδοση 12 gr (60%),

( $MB_{Bn-Glu-OH}=237,25 \text{ gr/mol}$ ,  $MB_{Bn-Glu-NCA}=269,13 \text{ gr/mol}$ )



**Σχήμα 49:** Μεταφορά τελικού διαλύματος NCA με cannula σε σφαιρική φιάλη.

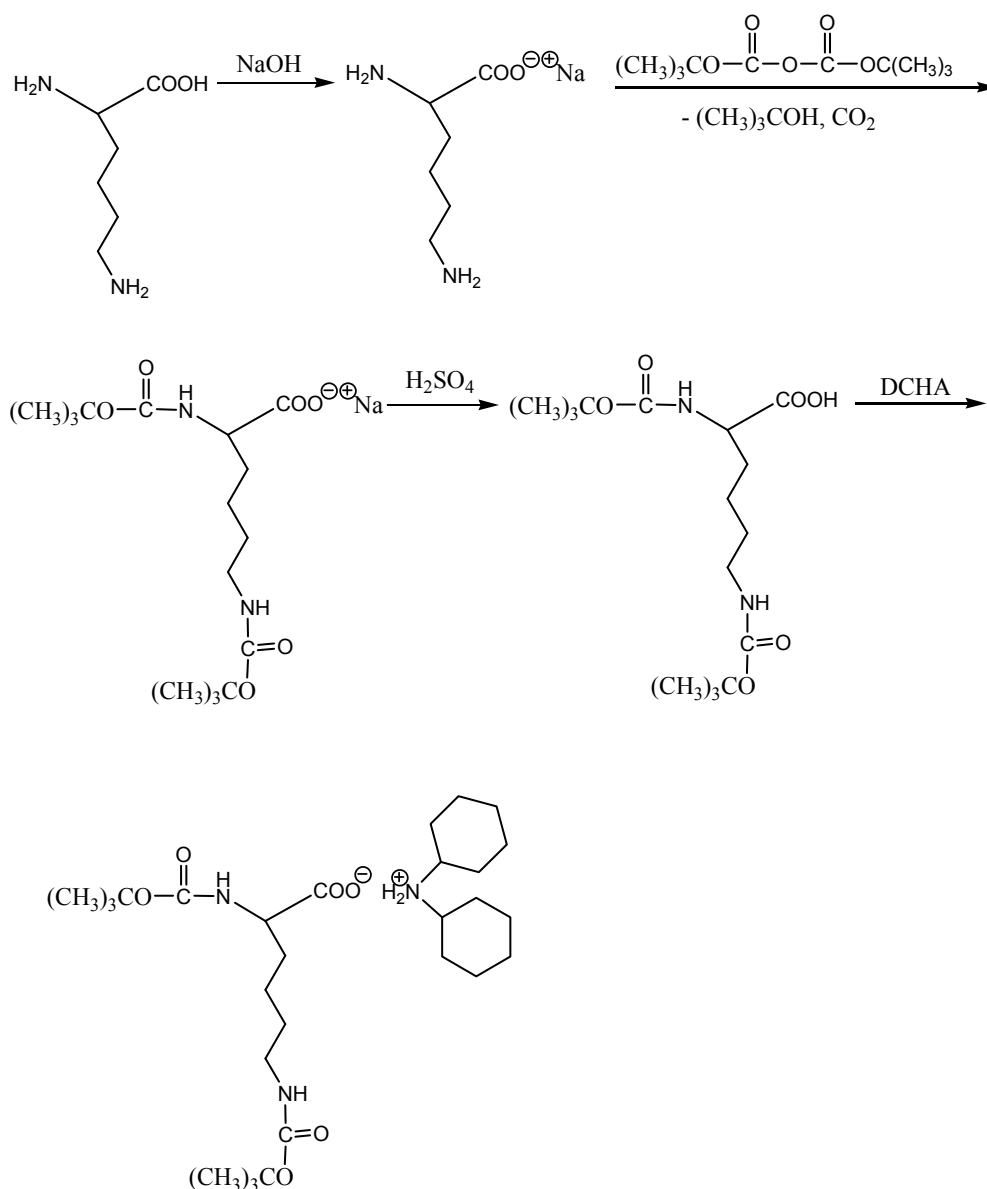
### 3.4.5 Παρασκευή *Boc-(L)-Lys NCA*<sup>141,145</sup>

Ο ανυδρίτης της λυσίνης είναι πολύ σημαντικός για την παρασκευή τόσο αμφίφιλων, όσο και υδατοδιαλυτών συμπολυμερών. Για την σύνθεση του, απαιτείται η χρήση διαφορετικών προστατευτικών ομάδων στην πλευρική ομάδα, που να μπορούν να αποπροστατευτούν εκλεκτικά. Επιλέχθηκε η χρήση της *Boc*-ομάδας, διότι αυτή είναι σταθερή στην υδρογόνωση και αποπροστατεύεται εύκολα με χρήση τριφθοροξικού οξέος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η ομάδα *Z*, έχει ακριβώς την αντίθετη συμπεριφορά. Δυστυχώς η *Boc* ομάδα είναι ευαίσθητη σε όξινο περιβάλλον και θα πρέπει να ληφθούν πρόσθετα μέτρα κατά την σύνθεση του ανυδρίτη για να αποφευχθεί τυχόν αποπροστασία, που μπορεί να οδηγήσει είτε σε ανεπιθύμητο πολυμερισμό (π.χ δικτυωμένα πολυμερή). Αποφεύγεται λοιπόν η χρήση περίσσειας τριφωσγενίου κατά την σύνθεση του ανυδρίτη, που θα έκανε το περιβάλλον όξινο και θα οδηγούσε σε παράπλευρες αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούμε σχεδόν ισομοριακή ποσότητα τριφωσγενίου.

#### Σύνθεση *diBoc-(L)-Lys-DCHA*

Δυστυχώς, το προστατευμένο αμινοξύ *diBoc-(L)-Lys-OH* είναι αρκετά ακριβό και δεν ήταν οικονομικώς δυνατή η παραλαβή του, στις χρησιμοποιούμενες για τα πολυπεπτίδια ποσότητες. Ακόμα και το πρόδρομο αλάτι *diBoc-(L)-Lys-DCHA* είναι πολύ ακριβό. Κρίθηκε λοιπόν απαραίτητη η σύνθεση του από το αρχικό αμινοξύ, την (L)-λυσίνη. Μια τυπική σύνθεση είχε ως εξής:

Σε κωνική φιάλη 1000 ml διαλύουμε NaOH (30,8 gr, 0,77 mole) σε 250 ml καθαρό νερό και προσθέτουμε 500 ml διοξάνιο και την (L)-λυσίνη (102 gr, 0,7 mole) και τα αφήνουμε να αναδεύονται για 10 λεπτά. Παγώνουμε στην συνέχεια την φιάλη, και προσθέτουμε αραιωμένο σε 100 ml διοξανίου το *di-tert-butyl-dicarbonate* (38,8 gr, 1,75 mole) σε 4-5 δόσεις, μέχρι να διαυγάσει. Η αντίδραση, αφήνεται υπό ανάδευση για το βράδυ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (σχήμα 50).



**Σχήμα 50:** Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης του αλατιού diBoc-(L)-Lys-DCHA.

Την επόμενη μέρα, συμπυκνώνουμε το διάλυμα μέχρι 300 ml ώστε να έχουμε διώξει όλη την ποσότητα διοξανίου και ακολουθούν εκχυλίσσεις. Την υδατική στοιβάδα, την εκχυλίζουμε με διαιθυλαιθέρα και την αιθερική 2-3 φορές με νερό, ενώ στο τέλος συλλέγονται τα υδατικά κλάσματα. Με τον τρόπο αυτό, απομακρύνεται η περίσσεια του di-tert-butyl-dicarbonate που πάει στην αιθερική στοιβάδα, ενώ η υδατική φάση είναι αλκαλική λόγω περίσσειας NaOH και  $\text{-COO}^{\ominus}\text{Na}^{\oplus}$ .

Στο υδατοδιαλυτό αλάτι της προστατευμένης λυσίνης, προσθέτουμε  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3N έως ότου το pH να γίνει ασθενώς όξινο ( $-\text{COO}^-\text{Na}^+ \rightarrow -\text{COOH}$ ) και αφού το αφήσουμε για 1 ώρα υπό ανάδευση, ακολουθείται εκχύλιση της υδατικής φάσης με οξικό αιθυλεστέρα 2-3 φορές, οπότε και συλλέγουμε πλέον το diBoc-(L)-Lys-OH που έχει πάει στην οργανική φάση (εξουδετέρωση). Την οργανική φάση την εκχυλίζουμε με υδατικό διάλυμα NaCl 3 % κ.β, έως ότου το pH=7. Λαμβάνουμε την οργανική στοιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα και την ξηραίνουμε με  $\text{MgSO}_4$ .

Στην συνέχεια, διηθούμε με γυάλινο φίλτρο (No.3) και συμπυκνώνουμε στη γραμμή κενού μέχρι ξηρού, όπου λαμβάνεται ένα ελαιώδες υγρό. Αυτό αραιώνεται με 400 ml διαιθυλαιθέρα και ακολούθως προστίθεται δικυκλοεξυλαμίνη σε μικρή περίσσεια. Με γυάλινη ράβδο τρίβουμε τα τοιχώματα, ώστε να δώσουμε στο σύστημα την κατάλληλη ενέργεια για να κρυσταλλώσει, όποτε και καταβυθίζεται λευκό ίζημα. Το στερεό διηθείται σε buchner, ξεπλένεται με εξάνιο και ξηραίνεται. Τέλος, αποθηκεύεται σε κλειστά δοχεία και φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$ . Ολόκληρη η πορεία της σύνθεσης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 60 (Η απόδοση σε αλάτι είναι 52.4%, 193,5 gr).

### **Απελευθέρωση diBoc-(L)-Lys-OH**

Για την απελευθέρωση της diBoc-L-Lys-OH από το αλάτι, ακολουθείται η εξής διαδικασία κάθε φορά που θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε μέρος της ποσότητας :

Ζυγίζουμε καταρχήν την τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 500 ml (κρατάμε το νούμερο) και προσθέτουμε σε αυτήν την ποσότητα του στερεού diBoc-L-Lys-DCHA (30 gr, 0,0568 mol). Στην συνέχεια, τοποθετούμε τα εσφυρίσματα και αφήνουμε το μονομερές για ένα βράδυ στην γραμμή υψηλού κενού, για να τραβήξει τυχόν πητικές προσμίξεις. Την επομένη, διαλύουμε την επιθυμητή ποσότητα του άλατος σε 300 ml οξικό αιθυλεστέρα και προσθέτουμε 100 ml καθαρό νερό. Στην συνέχεια προσθέτουμε στάγδην στο διφασικό διάλυμα,

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N (μικρή περίσσεια) έως ότου η οργανική στοιβάδα να διαυγάσει. Ακολουθείται εκχύλιση, όπου η οργανική στοιβάδα εκπλένεται με υδατικό διάλυμα NaCl 3% κ.β έως ότου το pH=7, ενώ η συνολική υδατική στοιβάδα (στην οποία πηγαίνει το άλας DCHA·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) με οξικό αιθυλεστέρα. Τέλος συλλέγονται όλα τα οργανικά κλάσματα και ξηραίνεται η οργανική στοιβάδα με MgSO<sub>4</sub>.

Το διάλυμα επιστρέφεται στην φιάλη των 500 ml, τοποθετείται η στρόφιγγα και συμπυκνώνεται ο διαλύτης στην γραμμή κενού μέχρι ξηρού, προς σχηματισμό άσπρου αφρού diBoc-L-Lys-OH. Αφήνεται να τραβήξει για το βράδυ, και την επομένη ζυγίζεται, οπότε από την διαφορά βάρους, βρίσκουμε τα moles της πρόδρομης ένωσης. (Η απόδοση σε προστατευμένο αμινοξύ είναι ~ 60 %)

### Σύνθεση **Boc-(L)-Lys-NCA**

Αποστάζουμε στην φιάλη 400 ml ξηρό THF, απαερώνουμε και αφού το ξεπαγώσουμε, ανοίγουμε την στρόφιγγα και προσθέτουμε αργό από την γραμμή αργού/κενού. Σε αντίθεση με τα περισσότερα αμινοξέα, η diBoc-(L)-Lys-OH είναι διαλυτή στο μέσο αντίδρασης (οι προστασίες αυξάνουν την διαλυτότητα στους χαμηλότερης πολικότητας διαλύτες) και έτσι δεν υπάρχει μια σαφής ένδειξη ολοκλήρωσης της αντίδρασης. Προσθέτουμε από το ελεύθερο στόμιο μικρή περίσσεια τριφωσγενίου (1,1 / 3 = 0,37 equiv.) και μετά από 10 λεπτά, κατεβάζουμε την θερμοκρασία στους 0°C με παγόνη και προσθέτουμε από το σταγονομετρικό χωνί στάγδην μικρή περίσσεια ξηρής τριαιθυλαμίνης (1,1 equiv) διαλυμένη σε THF και υπό συνεχή ανάδευση. Η τριαιθυλαμίνη αποσπά το HCl, σχηματίζοντας στο μέσο αντίδρασης δυσδιάλυτο άλας, επιτρέποντας το κλείσιμο του δακτυλίου σε χαμηλή θερμοκρασία, χωρίς περίσσεια τριφωσγενίου. Πρέπει να είμαστε πολύ προσεχτικοί γιατί ελάχιστη περίσσεια τριαιθυλαμίνης από λάθος υπολογισμό, μπορεί να προκαλέσει μη επιθυμητή έναρξη πολυμερισμού. Η αντίδραση αφήνεται στους 0°C για 5-6 ώρες. Το διάλυμα έπειτα διηθείται με γυάλινο φίλτρο (No. 3) σε καινούργια τρίλαιμη φιάλη των 500 ml (που έχει υποστεί

ξηρανση στη γραμμή κενού), απομακρύνοντας έτσι το υδροχλωρικό άλας της τριαιθυλαμίνης. Τέλος το διήθημα συμπυκνώνεται στην γραμμή κενού μέχρι ξηρού προς άσπρο αφρό και ξηραίνεται στην γραμμή κενού για όλο το βράδυ.

### **Καθαρισμός Boc-(L)-Lys NCA**

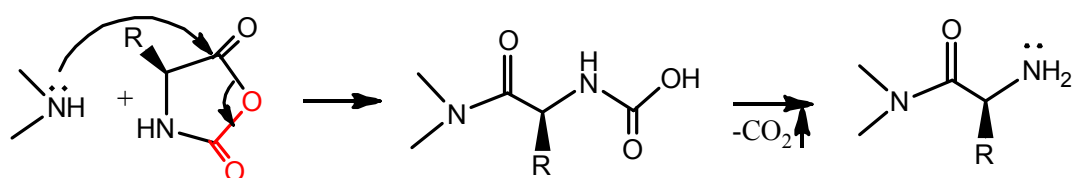
**Βήμα 1<sup>ο</sup>:** Την επομένη, προσθέτουμε οξικό αιθυλεστέρα από το μπουκάλι και αφού διαλύσουμε το μονομερές, εκχυλίζουμε το διάλυμα με παγωμένο καθαρό υδατικό διάλυμα NaCl 3%, έως όπου το pH=7. Στην συνέχεια συλλέγεται η οργανική φάση και ξηραίνεται με MgSO<sub>4</sub>. Ακολουθούνται στην συνέχεια τα **βήματα 2-6**, ενώ η τελική καθαρότητα του ανυδρίτη ελέγχεται με FTIR (εικόνα 14). Ολική απόδοση σε ανυδρίτη: 12 gr (60%). Στην παρακάτω εικόνα δίνεται το φάσμα IR του Boc-L-Lys NCA.

( $MB_{H-Lys-OH} = 146,19 \text{ gr/mol}$ ,  $MB_{diBoc-Lys-DCHA} = 52,39 \text{ gr/mol}$ ,  $MB_{diBoc-Lys-OH} = 346,21 \text{ gr/mol}$ ,  $MB_{Boc-Lys-NCA} = 272,14 \text{ gr/mol}$ )

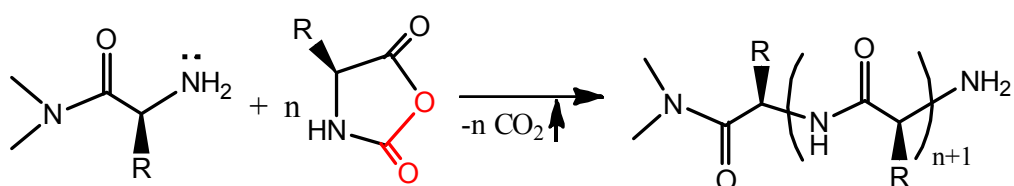
### 3.5 Σύνθεση Πολυμερών

Ο πολυμερισμός των NCA's γίνεται με διμεθυλαμίνη υπό υψηλό κενό. Μόνο για την περίπτωση -μεθυλ των δευτεροταγών αμινών, πιστεύεται ότι λαμβάνει χώρα ο κλασικός μηχανισμός (δρα ως πυρηνόφιλο και όχι σαν βάση). Η καθαρότητα δε των μονομερών NCA's, είναι μεγάλης σημασίας, για την αποφυγή αντιδράσεων τερματισμού και την επίτευξη ελεγχόμενου πολυμερισμού (όξινες οργανικές προσμίξεις αντιδρώντας με βάσεις, μειώνουν τον τίτλο της διμεθυλαμίνης). Η πορεία του πολυμερισμού δίνεται στο παρακάτω σχήμα.

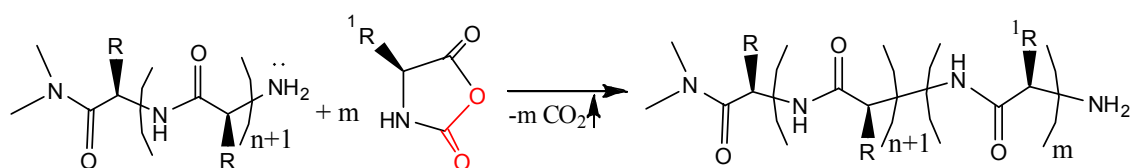
Έναρξη :



Διάδοση :



Συμπολυμερισμός :



Σχήμα 51: Έναρξη και διάδοση του πολυμερισμού των NCA's.

### 3.5.1 Παρασκευή PLP & PBHyLP

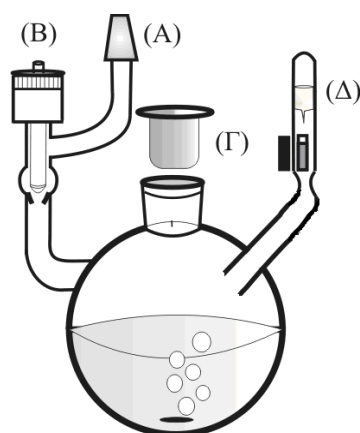
#### Σύνθεση Πολυ(L-προλίνης)

Ενώ ο N-καρβόξυ ανυδρίτης της προλίνης είναι διαλυτός σε βενζόλιο, διοξάνιο, τετραχλωράνθρακα, οξικό αιθυλεστέρα, THF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και DMF, το πολυμερές είναι αδιάλυτο σε οργανικούς διαλύτες, ενώ διαλύεται μόνο σε νερό και οργανικά οξέα. Οι συνθήκες του πολυμερισμού καθορίστηκαν, λαμβάνοντας υπ'όψιν και τα στοιχεία του πίνακα 2. Ο πολυμερισμός πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, αφήνοντας το NCA να πολυμεριστεί για 7-9 μέρες, σε σφαιρική φιάλη εφοδιασμένη με στρόφιγγα υψηλού κενού, χωρίς την χρήση εσφυρισμάτων που εγκυμονούν πιθανότητα διαρροής. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν γίνεται πλύσιμο της συσκευής με κανονικό βουτυλολίθιο γιατί τα βασικά άλατα είναι απαρχητές πολυμερισμού με διαφορετική κινητική από τις πρωτοταγείς αμίνες. Η σύνθεση του ομοπολυπεπτιδίου, περιγράφεται παρακάτω.

Η συσκευή πολυμερισμού (σχήμα 52) προσαρμόζεται στη γραμμή κενού με τη βοήθεια του εσφυρίσματος (Α), ελέγχεται για την ύπαρξη οπών και κατόπιν ξηραίνεται επανειλημμένως στο υψηλό κενό με χρήση δυνατής φλόγας για τουλάχιστον 1 ώρα. Η συσκευή μεταφέρεται από το υψηλό κενό σε αδρανή ατμόσφαιρα αργού (glove box) και τοποθετείται σε αυτήν, η ποσότητα NCA που θέλουμε. Στην συνέχεια, αφού βάλουμε λίπος υπό αργό στην κεντρική στρόφιγγα (Γ), μεταφέρουμε και πάλι την συσκευή στο υψηλό κενό, όπου και ξηραίνεται για μισή ώρα. Έπειτα, αποστάζουμε κατάλληλη ποσότητα ακετονιτριλίου, διαλύουμε το μονομερές και σπάμε τον γυάλινο υμένα της αμπούλας του απαρχητή, αναμιγνύοντας αυτά γρήγορα στη φιάλη, ώστε να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές. Ο πολυμερισμός της πολυ(L-προλίνης) (PLP) είναι ετερογενής και η κατανομή μοριακών βαρών της τάξεως του 1,23-1,44. Καθ'όλη την διάρκεια του πολυμερισμού, εκλύονται φυσαλίδες από το διάλυμα λόγω απελευθέρωσης CO<sub>2</sub> που είναι η κινητήριος δύναμη του πολυμερισμού. Η συσκευή επανατοποθετείται στην γραμμή μέσω του εσφυρίσματος (Α) και κατά διαστήματα ανοίγουμε την στρόφιγγα για να εκτονώσουμε το CO<sub>2</sub> που



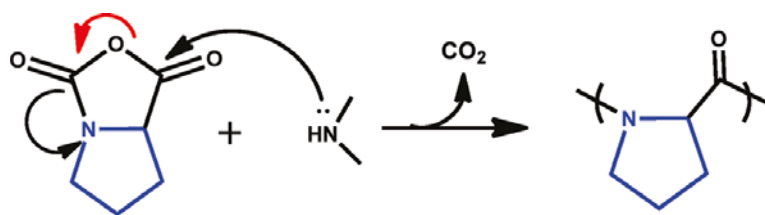
παράγεται. Το διάλυμα παραμένει σε ανάδευση μέχρι το πέρας της αντίδρασης και την πλήρη κατανάλωση του μονομερούς.



Σχήμα 52: Συσκευή πολυμερισμού για την σύνθεση συμπολυμερών με διμεθυλαμίνη.

Ο όγκος της σφαιρικής φιάλης, πρέπει να είναι μεγαλύτερος από την ποσότητα του  $\text{CO}_2$  που παράγεται, γιατί η αποκαρβοξυλίωση του καρβαμιδικού οξέος αποτελεί καθοριστικό στάδιο και κινητήριο δύναμη του πολυμερισμού. Η χρήση της στρόφιγγας είναι επιβεβλημένη γιατί αλλιώς σε μεγάλες μετατροπές, η αποκαρβοξυλίωση δεν γίνεται γρήγορα με αποτέλεσμα να αυξάνεται η κατανομή μοριακών βαρών (πιθανές αντιδράσεις διμερισμού, όπου αλυσίδες καρβαμιδικού οξέως αντιδρούν με αλυσίδες ελεύθερης αμινομάδας).

Η πορεία του πολυμερισμού της πολυ(L-προλίνης) δίνεται στο σχήμα 53, ενώ ο χαρακτηρισμός του πολυμερούς έγινε τόσο σε διάλυμα, με GPC,  $^1\text{H-NMR}^{109,110,124,125,143}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}^{111,126,143}$  και  $\text{CD}^{107,108,121-123}$ , όσο και σε στερεή φάση  $\text{IR}^{127-129,143}$ ,  $\text{XRD}^{112-115,129,143}$  και δίνεται στις εικόνες 15-20. Θα πρέπει εδώ να αναφερθεί, ότι ο Deming δεν έχει καταφέρει μέχρι τώρα<sup>146</sup> να συνθέσει πολυ(L-προλίνη), αλλά ούτε και πολυ(N-μεθυλο-L-γλυκίνη): πολυ(σαρκοζίνη), εξ' αιτίας της έλλειψης δεσμού N-H, που εμποδίζει τον σχηματισμό του πενταμελούς μεταλλοκυκλικού αμινο-αμιδικού ενεργού κέντρου του καταλύτη λόγω ελλιπούς μετανάστευσης υδρογόνου (κεφαλαίο 2.3.2.4).



Σχήμα 53: Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου του (L)-Pro NCA.

**PLP #15.**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )  $\delta$  4.70 (1H,  $\text{C}^\alpha$ ), 3.85-3.60 (2H,  $\text{C}^\delta$ ), 2.24 (1H,  $\text{C}^{\beta 2}$ ), 1.93 (3H,  $\text{C}^{\beta 1+\gamma}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )  $\delta$  4.70 (1H,  $\text{C}^\alpha$ ), 3.85-3.60 (2H,  $\text{C}^\delta$ ), 2.24 (1H,  $\text{C}^{\beta 2}$ ), 1.93 (3H,  $\text{C}^{\beta 1+\gamma}$ ); GPC (0.1M  $\text{NaNO}_3$ ) νερό/ACN 80:20 στους  $35^\circ\text{C}$ ,  $M_w/M_n = 1,24$ .

### Σύνθεση Πολυ(Ο-βενζυλο-υδροξυ-L-προλίνης)

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω, με την διαφορά ότι ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμερισμό ήταν THF ή  $\text{CHCl}_3$  (επιβεβαιώνεται βιβλογραφικά<sup>144b</sup>), ενώ ο πολυμερισμός ομογενής (εικόνα 21). Ακόλουθη διαδικασία με ακετονιτρίλιο, έδωσε ετερογενή πολυμερισμό.

**PBHyLP #1.** GPC ( $\text{CHCl}_3$ ) στους  $35^\circ\text{C}$ ,  $M_w/M_n = 1,12$ .

### 3.5.2 Παρασκευή γραμμικών δυσυσταδικών συμπολυπεπτιδίων α-έλικας. *PBocLL-b-PLP*, *PBLG-b-PLP* και *PBLG-b-PBHyLP*

#### Σύνθεση Πολυ(ε-βουτυλοξυ-καρβονυλο-L-λυσίνης)-*b*-Πολυ(L-προλίνης) (*PBocLL-b-PLP*)

Μεταφέρουμε στο glove box την ξηρή συσκευή πολυμερισμού και εισάγουμε την ποσότητα *Boc*-(L)-Lys NCA που θέλουμε. Στην συνέχεια, η συσκευή μεταφέρεται στην γραμμή υψηλού κενού όπου και αφήνεται για μίση ώρα. Αποστάζουμε ποσότητα DMF, διαλύουμε το μονομερές και έτσι όπως είναι παγωμένο, θραύουμε τον γυάλινο υμένα του απαρχητή. Ο πολυμερισμός αφήθηκε για 3 μέρες, με συνεχή απαέρωση δυο φορές την ημέρα. Στο τέλος του πολυμερισμού, η συσκευή μεταφέρεται στην γραμμή αργού/κενού, όπου παίρνουμε δείγμα της *PBocLL* υπό αργό. Μόνο εάν η κατανομή είναι μονομοριακή, συνεχίζουμε τον συμπολυμερισμό.

Για τον συμπολυμερισμό, χρησιμοποιούμε μια άλλη ξηρή μονόλαιμη συσκευή 100 ml με στρόφιγγα, που αντίστοιχα μεταφέρουμε στο glove box και αφού βάλουμε την κατάλληλη ποσότητα, την μεταφέρουμε στην γραμμή υψηλού κενού. Σε αυτήν, αποστάζεται ποσότητα DMF, διαλύεται το μονομερές της LP-NCA και αμέσως μεταφέρεται στην γραμμή αργού/κενού, όπου και σπάμε το υψηλό κενό με ροή αργού. Το διάλυμα της LP-NCA μεταφέρεται με *canpula* (από το αργό στο κενό), στην συσκευή πολυμερισμού που περιέχει την *PBocLL* και ξεκινάει ο πολυμερισμός της δεύτερης συστάδας. Η συσκευή μεταφέρεται αμέσως στην γραμμή υψηλού κενού και σταδιακά απαερώνεται. Ο πολυμερισμός της PLP είναι ετερογενής και διαρκεί 7 ημέρες (εικόνες 22-23), ενώ το τελικό συμπολυπεπτίδιο είναι αδιάλυτο σε DMF.

Για να πάρουμε το υδατοδιαλυτό πολυμερές PLL-*b*-PLP, αποπροστατεύσαμε το πολυπεπτίδιο με TFA για 2h. Η περίσσεια TFA αποστάζεται στην γραμμή κενού και το εναπομείνων, διαλύεται σε νερό milliQ και μεταφέρεται σε μεμβράνη για να καθαριστεί με διαπίδυση (το εξωτερικό νερό milliQ περιέχει 4 σταγόνες πυκνού HCl κάθε φορά, pH=4). Τέλος, ακολουθεί freeze drying.

**PLL-*b*-PLP #1.**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )  $\delta$  5.25-4.35 (1H,  $\text{C}^\alpha$  της PLP και 1H,  $\text{C}^\alpha$  της PLL), 4.20-3.50 (2H,  $\text{C}^\delta$ ), 3.20 (2H,  $\text{C}^\epsilon$ ), 2.75-1.1 (4H,  $\text{C}^{\beta+\gamma}$  της PLP and 6H,  $\text{C}^{\text{b+c+d}}$  της PLL); GPC της P*Boc*LL σε (0.1M LiBr) DMF στους  $65^\circ\text{C}$ ,  $M_w/M_n = 1,18$ .

### **Σύνθεση Πολυ( $\gamma$ -βενζυλο-L-γλουταμικού εστέρα)-*b*-Πολυ(L-προλίνης) (PBLG-*b*-PLP)**

Ο τρόπος σύνθεσης είναι ο ίδιος όπως προηγουμένως, με την διαφορά ότι το διάλυμα της (L)-Pro NCA που μεταφέρεται με *cannula* είναι σε THF και ο πολυμερισμός ομογενής. Για να εξακριβώσουμε το πέρας του πολυμερισμού της πρώτης συστάδας, χρησιμοποιούμε και πάλι χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών. Η απορρόφηση του αρωματικού δακτυλίου του PBLG αλλά και του μονομερούς φαίνεται στα 267 nm στον ανιχνευτή UV και έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε με ακρίβεια το ποσοστό μετατροπής και φυσικά το πέρας της αντίδρασης. Δυστυχώς το συμπολυτεππίδιο είναι αδιάλυτο σε DMF και έτσι το πολυμερές χαρακτηρίστηκε σε στερεά φάση (με TGA), όπου από την διαφορά στην θερμοκρασία αποσύνθεσης κάθε συστάδας πολυμερούς, υπολογίσαμε την σύσταση του συμπολυμερούς (για τα ομοπολυμερή, PBLG:  $265-330^\circ\text{C}$  ενώ PLP:  $380-450^\circ\text{C}$ ), όπως φαίνεται στις εικόνες 26-27. Οι μετρατροπές είναι υψηλές και η σύσταση είναι σε καλή συμφωνία με τις θεωρητικά υπολογιζόμενες

**PBLG-*b*-PLP #1.** TGA (ατμόσφαιρα  $\text{N}_2$ ): θερμοκρασία αποσύνθεσης στο συμπολυμερές, συστάδα PBLG:  $230-350^\circ\text{C}$  ενώ συστάδα PLP:  $380-450^\circ\text{C}$ ; GPC του PBLG (0.1M LiBr) DMF στους  $65^\circ\text{C}$ ,  $M_w/M_n = 1,10$ .

### **Σύνθεση Πολυ( $\gamma$ -βενζυλο-L-γλουταμικού εστέρα)-*b*-Πολυ(O-βενζυλο-L-υδροξυπρολίνης) (PBLG-*b*-PBHyLP)**

Ο τρόπος σύνθεσης είναι ο ίδιος όπως προηγουμένως, με την διαφορά ότι το διάλυμα (L)-Pro NCA που μεταφέρεται με cannula είναι σε THF και ο πολυμερισμός ομογενής. Ανάλογα με την σύσταση της PBHyLP, ορισμένα συμπολυτεπτιδία είναι διαλυτά σε DMF (εικόνα 28).

**PBLG-*b*-PBHyLP #1.** GPC σε (0.1M LiBr) DMF στους 65°C,  $M_w/M_n = 1,14$ .

### **3.5.3 Παρασκευή γραμμικών κατά συστάδες υβριδικών πολυτεπτιδίων τυχαίου σπειράματος / έλικας. PEO-*b*-PLP και PLP-*b*-PEO-*b*-PLP**

#### **Σύνθεση Πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*-Πολυ-(L-προλίνης) (PEO-*b*-PLP)**

Μεταφέρουμε στην γραμμή αργού/κενού μια ξηρή μονόλαιμη συσκευή 100 ml με στρόφιγγα και πλάγιο break seal, και υπό ροή αργού, εισάγουμε την ποσότητα μακροαπαρχητή PEO-NH<sub>2</sub> ( $M_w=10,0 \times 10^3$  και  $20,0 \times 10^3$  gr/mol) που θέλουμε. Μεταφέρουμε στην συνέχεια την συσκευή στην γραμμή υψηλού κενου όπου και αφήνεται για μισή ώρα. Έπειτα, αποστάζουμε μικρή ποσότητα βενζολίου, ικανή για να διαλυτοποιήσει το πολυμερές και αφού απαερώσουμε, αφήνουμε το πολυμερές με θέρμανση στους 40°C και ανάδευση. Αυτό γίνεται, διότι το βενζόλιο κάνει αζεοτροπικό μείγμα με το νερό (που είναι εκκινητής πολυμερισμού και λόγω υγροσκοπικότητας του PEO, δυστυχώς υπάρχει). Εν συνεχεία, αποστάζεται το αζεοτροπικό μείγμα και ο μακροαπαρχητής ξηραίνεται για 1-2 ώρες. Έπειτα, αποστάζεται μικρή ποσότητα ακετονιτριλίου, ικανή για να διαλυτοποιήσει το πολυμερές, το διάλυμα μεταφέρεται στο υπό γωνία πλάγιο break seal και συντήκεται με φλόγα.

Για τον συμπολυμερισμό, χρησιμοποιούμε μια άλλη ξηρή μονόλαιμη συσκευή 100 ml με στρόφιγγα, στην οποία έχουμε κολλήσει το πλάγιο break seal, που περιέχει το διάλυμα του μακροαπαρχητή πλέον, την οποία και μεταφέρουμε στο glove box. Αφού βάλουμε την κατάλληλη ποσότητα (L)-Pro

NCA, την μεταφέρουμε και πάλι στην γραμμή υψηλού κενού. Σε αυτήν, αποσπάζεται ποσότητα ακετονιτριλίου, διαλύεται το μονομερές και σπάμε την αμπούλα του μακροαπαρχητή, εκκινώντας έτσι τον πολυμερισμό της δεύτερης συστάδας. Ο πολυμερισμός είναι ετερογενής, όπως και στην περίπτωση του ομοπολυμερούς. Για να πάρουμε το υδατοδιαλυτό συμπολυμερές, το αφήνουμε υπό ανάδευση σε νερό για μία μέρα και στην συνέχεια διηθούμε το υδατοδιαλυτό μέρος (εικόνες 30-31).

**PEO-*b*-PLP #1.** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CF<sub>3</sub>COOD) δ 4.70 (1H, C<sup>α</sup>), 4.15-3.15 (4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O και 2H, C<sup>δ</sup>), 2.24 (1H, C<sup>β2</sup>), 1.93 (3H, C<sup>β1+γ</sup>); GPC (0.1M NaNO<sub>3</sub>) νερό/ACN 80:20 στους 35°C, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1,10.

#### **Σύνθεση Πολυ(L-προλίνης)-*b*-Πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*-Πολυ(L-προλίνης) (PLP-*b*-PEO-*b*-PLP)**

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια όπως παραπάνω με την διαφορά ότι ο μακροαπαρχητής που χρησιμοποιείται είναι H<sub>2</sub>N-PEO-NH<sub>2</sub> (M<sub>w</sub>=10,0 x 10<sup>3</sup> gr/mol), όπως φαίνεται στις εικόνες 32-33.

**PLP-*b*-PEO-*b*-PLP #2.** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CF<sub>3</sub>COOD) δ 4.73 (2H, C<sup>α</sup>), 3.85-3.35 (4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O και 4H, C<sup>δ</sup>), 2.26 (2H, C<sup>β2</sup>), 1.96 (6H, C<sup>β1+γ</sup>); GPC (0.1M NaNO<sub>3</sub>) νερό/ACN 80:20, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1,09.

### 3.5.4 Παρασκευή γραμμικών τρισυσταδικών υβριδικών πολυπεπτιδίων τύπου α-έλικα / τυχαίο σπείραμα / α-έλικα. **PBocLL-*b*-PEO-*b*-PBocLL** και **PBLG-*b*-PEO-*b*-PBLG**

#### Σύνθεση Πολυ(ε-βουτυλοξυ-καρβονυλο-L-λυσίνης)-*b*-Πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*-Πολυ(ε-βουτυλοξυ-καρβονυλο-L-λυσίνης) (**PBocLL-*b*-PEO-*b*-PBocLL**)

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια όπως στην περίπτωση του PLP-*b*-PEO-*b*-PLP με την διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν μικρότερα μοριακά βάρη μακροαπαρχητή H<sub>2</sub>N-PEO-NH<sub>2</sub> ( $M_w=2,3 \times 10^3$ ,  $3,0 \times 10^3$  gr/mol) και ο πολυμερισμός έγινε σε DMF. Στις εικόνες 35-36, βλέπουμε το χρωματογράφημα του προστατευμένου πολυμερούς και το φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του αποπροστατευμένου υδατοδιαλυτού πολυμερούς PLL-*b*-PEO-*b*-PLL.

**PBocLL-*b*-PEO-*b*-PBocLL #2.** GPC (0.1M LiBr) DMF στους 65°C,  $M_w/M_n = 1,33$ .

**PLL-*b*-PEO-*b*-PLL #2.** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 4.18 (2H, C<sup>a</sup>), 3.57 (4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.88 (4H, C<sup>e</sup>), 1.8-1.2 (12H, C<sup>b+c+d</sup>)

#### Σύνθεση Πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικού εστέρα)-*b*-Πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*-Πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικού εστέρα) (**PBLG-*b*-PEO-*b*-PBLG**)

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια όπως στην περίπτωση του PLP-*b*-PEO-*b*-PLP με διαφορά στα μοριακά βάρη μακροαπαρχητή H<sub>2</sub>N-PEO-NH<sub>2</sub> που χρησιμοποιήθηκαν ( $M_w=6,0 \times 10^3$  gr/mol και  $10,0 \times 10^3$ ). Στις εικόνες 38-40, βλέπουμε το χρωματογράφημα και το <sup>1</sup>H-NMR του προστατευμένου πολυμερούς, καθώς και το φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του αποπροστατευμένου υδατοδιαλυτού πολυμερούς PLGA-*b*-PEO-*b*-PLGA.

**PBLG-*b*-PEO-*b*-PBLG #1.** GPC (0.1M LiBr) DMF στους 65°C,  $M_w/M_n = 1,26$ .

**PLGA-*b*-PEO-*b*-PLGA #1.** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 4.21 (2H, C<sup>a</sup>), 3.57 (4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.88 (4H, C<sup>e</sup>), 2.35-1.7 (8H, C<sup>b+c</sup>)

### 3.5.5 Παρασκευή γραμμικών τρισυσταδικών υβριδικών πολυπεπτιδίων τύπου τυχαίο σπείραμα / α-έλικα / α-έλικα. PEO-*b*-PBLG-*b*-PLL

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια όπως παραπάνω με την διαφορά ότι ξεκινάμε την σύνθεση, με μακροαπαρχητή το PEO-NH<sub>2</sub> ( $M_w=10,0 \times 10^3$  gr/mol). Ακολουθεί πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου του Bn-(L)-Glu NCA σε DMF για 3 μέρες. Έπειτα, αφού πάρουμε δείγμα για SEC του μακροαπαρχητή PEO-*b*-PBLG (υπό αργό) και ελέγξουμε την ποιότητα αυτού ως προς κατανομή και μοριακό βάρος, ακολουθεί ο πολυμερισμός της τρίτης συστάδας με Boc-(L)-Lys NCA σε DMF για άλλες 3 μέρες. Το τελικό υβριδικό συμπολυπεπτίδιο PEO-*b*-PBLG-*b*-PBocLL καταβυθίζεται σε αιθέρα. Ακολουθεί έπειτα αποπροστασία της PBocLL με TFA σε διχλωρομεθάνιο και καθαρισμός του τελικού υδατοδιαλυτού πολυμερούς PEO-*b*-PBLG-*b*-PLL με μεμβράνη (εικόνα 42).

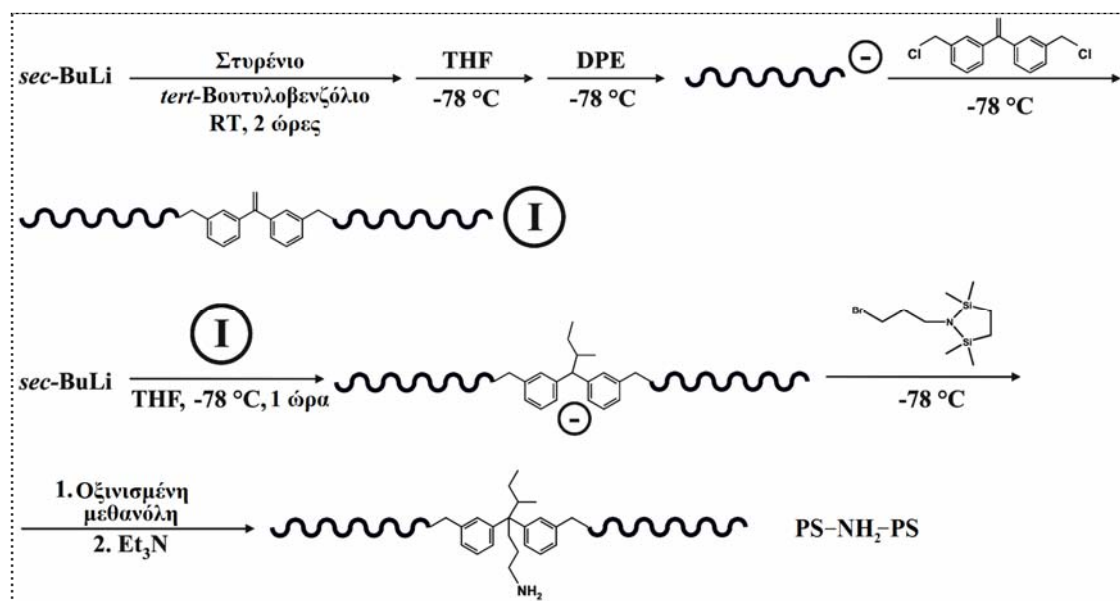
**PEO-*b*-PBLG-*b*-PLL.** GPC (0.1M NaNO<sub>3</sub>) νερό/ACN 80:20 στους 35°C,  $M_w/M_n = 1,10$ .

### 3.5.6 Παρασκευή αστεροειδών υβριδικών πολυπεπτιδίων PS<sub>2</sub>PLP

Η διαδικασία που ακολουθείται φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 54. Αρχικά, συντίθεται πολυ(στυρένιο) με ανιοντικό πολυμερισμό και έπειτα ο ζωντανός κλάδος (PS), αντιδρά με 1,2-διχλωρομέθυλο διφαινυλοαιθυλένιο. Στην συνέχεια, ακολουθεί διάνοιξη του διπλού δεσμού με *sec*-BuLi και αντίδραση του ενεργού ανιοντικού κέντρου με ένα βρωμο-άμινο σιλάνιο και έπειτα αποπροστασία σε οξινισμένη μεθανόλη και καταβύθιση σε εξάνιο (αρκετές φορές). Ακολουθεί ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου του ανυδρίτη (L)-Pro NCA σε DMF, χρησιμοποιώντας ως μακροαπαρχητή το PS-NH<sub>2</sub>-PS, οπότε παράγεται PS-PLP-PS σε πολύ καλή συμφωνία με την στοιχειομετρία, ενώ το λαμβανόμενο χρωματογράφημα δίνεται στην εικόνα 43.

**PS<sub>2</sub>PLP.** GPC (THF) στους 35°C,  $M_w/M_n = 1,04$ .





Σχήμα 54: Πορεία σύνθεσης του μακροαπαρηχητή PS-NH<sub>2</sub>-PS.

### 3.5.7 Παρασκευή ομοπολυεπιπιδίων πάνω σε Νανοσωλήνες άνθρακα

Για την σύνθεση ομοπολυεπιπιδίων πάνω σε νανοσωλήνες άνθρακα τόσο απλών τοιχωμάτων<sup>147</sup> (SWNTs), όσο και πολλαπλών<sup>148</sup> (MWNTs), έχουνε χρησιμοποιηθεί διαφορετικές τεχνικές εμβολιασμού. Εμείς, ακολουθώντας μεθόδους ανιοντικού πολυμερισμού, δημιουργήσαμε αρχικά τις κατάλληλες λειτουργικές ομάδες, πάνω στους νανοσωλήνες (η πορεία σύνθεσης είναι η ίδια και για τα δύο είδη), ακολουθώντας τα εξής βήματα:

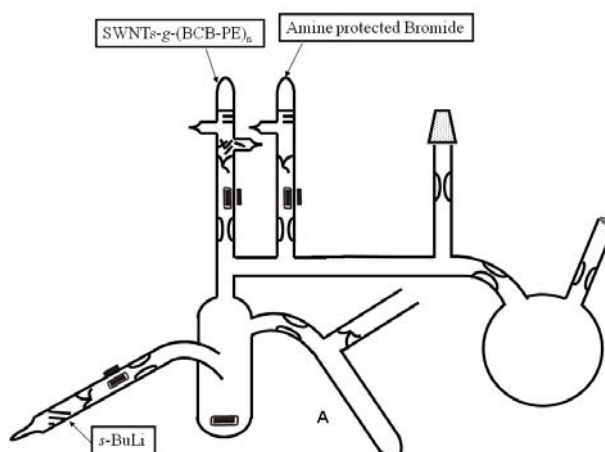
Αντίδραση Diels-Alder για την σύνθεση υποκατεστημένων βενζοκυκλοβουτενίων πάνω σε SWNTs.

Ο απαρηχητής πολυμερισμού δένεται ομοιοπολικά πάνω στους νανοσωλήνες άνθρακα με μια αντίδραση κυκλοπροσθήκης Diels-Alder [4+2]. Αρχικά, διασπείρουμε 100 mgr SWNTs σε 10 mL δεκατετρανίου υπό ροή αργού σε γυάλινο αντιδραστήρα υπό ανάδευση και έπειτα ανεβάζουμε την θερμοκρασία στους  $235\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Προσθέτουμε στάγδην 1 ml βενζοκυκλοβουτενίου (BC-BPE) στο μείγμα μέσω περισταλτικής σύριγγας, με βαθμό of 1,25 mL/h και υπό

ισχυρή ανάδευση με ροή αργού. Έπειτα, αφήνουμε το μείγμα υπό ανάδευση και στην συνέχεια κατεβάζουμε την θερμοκρασία. Το σχηματισθέν υποκατεστημένο βενζοκυκλοβουτένιο πάνω στους νανοσωλήνες SWNTs-g-(BCB-PE)<sub>n</sub> απομονώνεται με διήθηση με φίλτρο teflon (0.2 μm). Ακολουθεί πολύ καλό ξέπλυμα με διαλύτη THF και το υπερκείμενο ξαναφιλτράρεται μέχρι την απουσία οποιουδήποτε παραπροϊόντος με TLC. Τέλος οι τροποποιημένοι νανοσωλήνες ξηραίνονται υπό κενό στους 60°C για 5h.

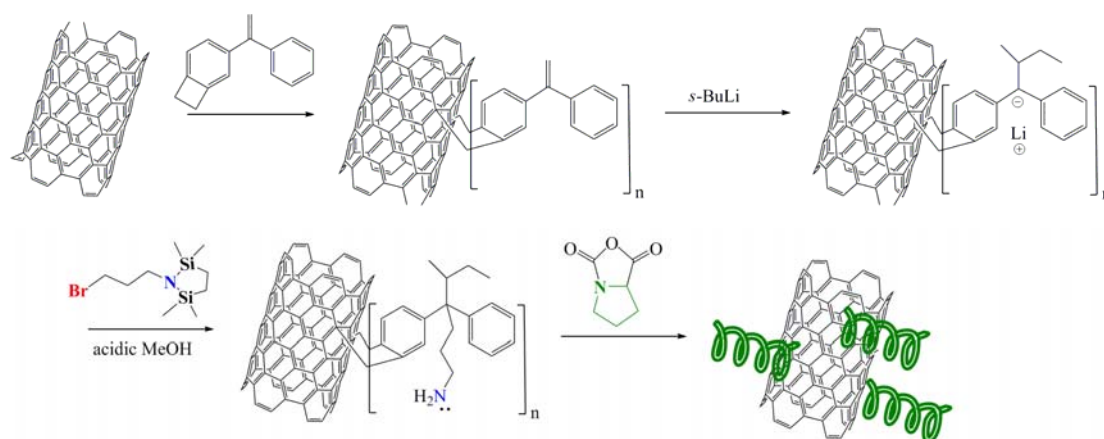
#### Αντίδραση σύζευξης SWNTs-g-(BCB-PE)<sub>n</sub> με προστατευμένες αμινομάδες

Ειδικά κατασκευασμένη γυάλινη συσκευή για υψηλό κενό (σχήμα 55), που περιέχει αμπούλες SWNTs-g-(BCB-PE)<sub>n</sub> (15 mgr,  $3,93 \times 10^{-5}$  mol, 54 wt % BCB-PE σε 15 ml εξανίου), 1-(3-βρωμοπρόπυλο)-2,2,5,5-τετραμέθυλο-αζα-2,5-δισυλλοκυκλοπεντάνιο (1,8 gr), βενζόλιο (20 ml), δευτεροταγές βουτυλολίθιο (sec-BuLi) ( $4,0 \times 10^{-5}$  mol σε εξάνιο) και τμήμα καθαρισμού με πλαστικό septum (φιάλη 100 mL), προσαρμόζεται στην γραμμή υψηλού κενού. Στην συνέχεια προστίθεται με σύριγγα μικρή ποσότητα n-βουτυλολιθίου (1,3 M σε εξάνιο) στο τμήμα καθαρισμού και έπειτα το septum κόβεται με σύντηξη. Έπειτα, αποστάζονται 50 mL βενζολίου και ο αντιδραστήρας απομακρύνεται από την γραμμή. Πλένουμε την συσκευή με το διάλυμα του n-βουτυλολιθίου σε βενζόλιο και τέλος απομακρύνουμε με σύντηξη το τμήμα καθαρισμού.



Σχήμα 55: Συσκευή για σύνθεση CNT's-g-NH<sub>2</sub> σε υψηλό κενό.

Στην συνέχεια, σπάμε την αμπούλα του *sec*-BuLi και του SWNTs-g-(BCB-PE)<sub>n</sub> και τα αφήνουμε να αντιδράσουν. Το *sec*-BuLi αντιδρά στην επιφάνεια των SWNTs με τις ομάδες του BCB-PE για 12h και παράγει καρβανιόντα (το πορτοκαλί χρώμα των υποκατεστημένων φαινυλίων δεν φαίνεται). Οι νανοσωλήνες αφήνονται σε ηρεμία και το υπερκείμενο υγρό που περιέχει περίσσεια *sec*-BuLi μεταφέρεται στην αμπούλα A. Από εκεί, αποστάζεται το εξάνιο στους νανοσωλήνες, για να ξεπλύνει τυχόν προσροφημένη περίσσεια *sec*-BuLi (το βήμα αυτό, επαναλαμβάνεται για πάνω από 10 φορές) και έπειτα συντήκεται η αμπούλα A. Στην συνέχεια, θραύεται η αμπούλα του βενζολίου και του 1-(3-βρωμοπρόπυλο)-2,2,5,5-τετραμέθυλο-αζα-2,5-δισιλυλοκυκλοπεντανίου, οπότε και αφήνονται οι νανοσωλήνες να αντιδράσουν με αυτό, για όλο το βράδυ (σχήμα 56). Τέλος, σπάμε το κενό και ακολουθεί καταβύθιση σε μεθανόλη υπό ανάδευση (έτσι επιτυγχάνεται η αποπροστασία) και διήθηση με φίλτρο. Τέλος, ακολουθεί ξήρανση υπό κενό στους 60°C για 5h.



**Σχήμα 56: Πορεία σύνθεσης του νανοσωλήνων CNTs-g-PLP.**

### Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου πάνω στην επιφάνεια των CNT's-g-NH<sub>2</sub>

Ξηραίνουμε τον ανυδρίτη της L-προλίνης σε ειδικά διαμορφωμένη για υψηλό κενό, συσκευή των 100 ml, στην οποία έχουμε κάνει προηγουμένως flame-drying. Στο μονομερές αποστάζουμε THF και αφού το διαλύσουμε, το μεταφέρουμε στην γραμμή αργού/κενού με cannula, σε παρακείμενη γυάλινη

συσκευή των 100 ml, που περιέχει τους SWNT's-NH<sub>2</sub> διεσπαρμένους σε μικρή ποσότητα THF (η οποία αντιστοίχως έχει ξηραθεί και υποστεί flame-drying). Ο αντιδραστήρας μεταφέρεται αμέσως στο υψηλό κενό, απαερώνεται από τον αργό και τα αντιδρώντα αφήνονται υπό ανάδευση για μια βδομάδα υπό ισχυρή ανάδευση, με καθημερινές απαερώσεις για την εκδίωξη του παραγόμενου κατά την αντίδραση CO<sub>2</sub>. Το τελικό πολυπεπτιδίο πάνω στους νανοσωλήνες, απομονώνεται με φιλτράρισμα, πλένεται αρκετές φορές με THF για την εκδίωξη παραπροϊόντων και τέλος ξηραίνεται στους 40°C υπό κενό. Για την επιβεβαίωση πολυπεπτιδικών αλυσίδων προλίνης πάνω στους νανοσωλήνες, έγινε χαρακτηρισμός τόσο σε στερεή φάση (FTIR, Raman) όσο και σε διάλυμα με <sup>1</sup>H NMR. Επειδή δεν μπορέσαμε να πάρουμε κάποιο χρωματογράφημα, κάναμε μετρήσεις θερμοσταθμικής ανάλυσης TGA για να προσδιορίσουμε το ποσοστό της PLP πάνω στους νανοσωλήνες (εικόνα 46), το οποίο βρέθηκε να είναι ~70%. Το ίδιο έγινε αντίστοιχα με PBLG και PBocLL για SWNTs και MWNTs.

### 3.6 Αναγωγή / σταθεροποίηση **Νανოსωματιδίων Χρυσού**

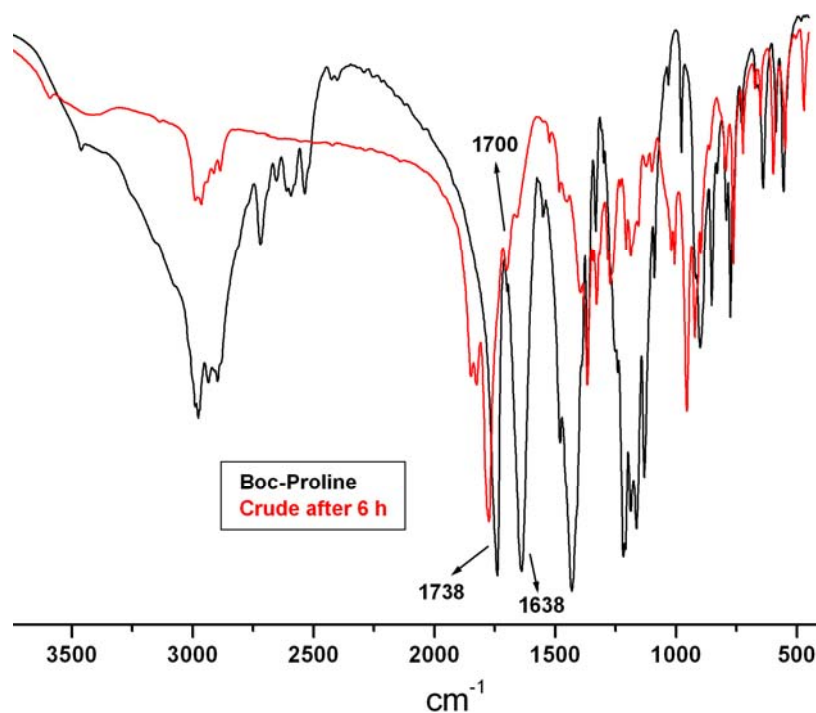
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την σύνθεση/σταθεροποίηση των νανოსωματιδίων χρυσού, περιελάμβανε την ανάμειξη υδατικού διαλύματος, ύδριδο τετράχλωρο χρυσικού οξέως με [HAuCl<sub>4</sub>] = 1 x 10<sup>-3</sup> mol/L και 2 x 10<sup>-3</sup> mol/L, με υδατικό διάλυμα πολυ(L-προλίνης) διαφορετικών μοριακών βαρών (M<sub>n</sub>=2,3 x 10<sup>3</sup>, 4,6 x 10<sup>3</sup>, 7,4 x 10<sup>3</sup>, 9,3 x 10<sup>3</sup> g/mol) σε θερμοκρασία 50°C, έτσι ώστε η [AuCl<sub>4</sub>]<sup>-</sup> μετά την ανάμειξη να είναι 1.0 x 10<sup>-4</sup> και 2.0 x 10<sup>-4</sup> mol/L αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του πολυμερούς πριν την ανάμειξη, διέφερε κάθε φορά ανάλογα με το πείραμα και χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0,10, 0,20, 0,40 and 1,10 x 10<sup>-3</sup> mol/L, ενώ η τελική συγκέντρωση μετά την ανάμειξη ήταν 10% λιγότερη. Για να δούμε πως επηρεάζει η θερμοκρασία, το μέγεθος, το σχήμα καθώς και την κρυσταλλικότητα των νανοςωματιδίων, κάναμε πειράματα σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 25°C, 50°C και 65°C.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

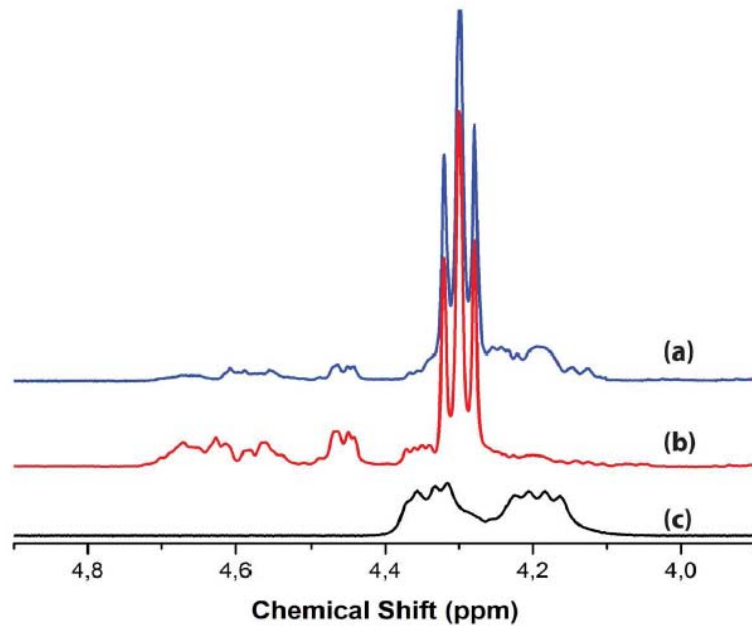
### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 4.1 Ν-καρβοξυ ανυδρίτης της L-προλίνης (L-Pro NCA)

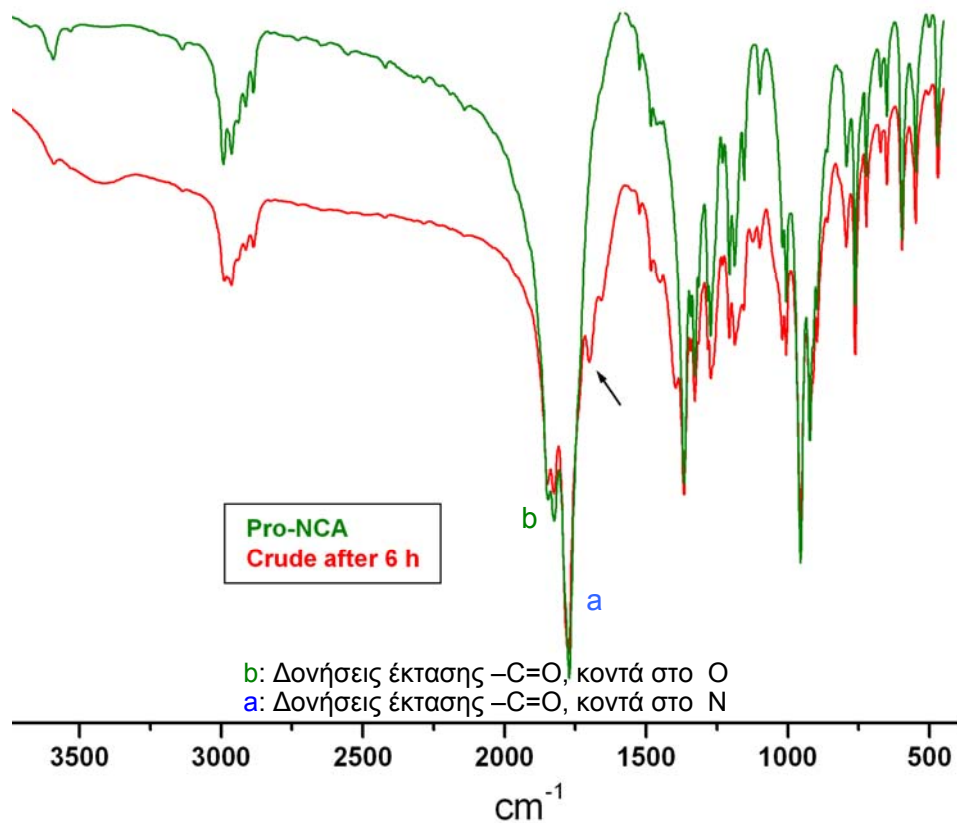
Ο L-Pro NCA καθαρίζεται με θερμική διάλυση σε εξάνιο και η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχεται με FTIR,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR και ESI-MS. Μετά από αντίδραση 6,5h σε THF (εικόνα 3) βλέπουμε ότι έχει σχηματιστεί ο ανυδρίτης κατά ένα μεγάλο ποσοστό. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση σε THF/εξάνιο όπου όπως βλέπουμε στην εικόνα 4, φεύγει το αρχικό αμινοξύ που δεν αντέδρασε (*Boc-Pro*). Στην συνέχεια με θερμική διάλυση σε εξάνιο, φεύγει το ενδιάμεσο παραπροϊόν (γραμμικός ανυδρίτης) στα  $1700\text{ cm}^{-1}$  και λαμβάνουμε το καθαρό προϊόν (εικόνες 5-7). Η πολλαπλότητα των κορυφών στα 3.25 και 3.75 ppm (που αντιστοιχούν στον  $\text{C}^{\delta 1}$  και  $\text{C}^{\delta 2}$ ) οφείλεται στην διάσχιση κάθε κορυφής από τον γειτονικό  $\text{C}^{\delta}$  και από τα δύο πρωτόνια του  $\text{C}^{\gamma}$ . Το φάσμα ESI-MS αντίστοιχα, έδειξε τρία ιοντικά θραύσματα με μοριακό βάρος 70, 114 και 130 gr/mol. Η ανάλυση του θραύσματος με μοριακό βάρος 70 gr/mol, έδειξε ότι προέρχεται από τα ιοντικά θραύσματα 114 και 130 (εικόνες 8-9), ενώ αντιστοιχήσαμε τα θραύσματα σύμφωνα με το σχήμα 46. Η καθαρότητα του μονομερούς φαίνεται στην εικόνα 10.



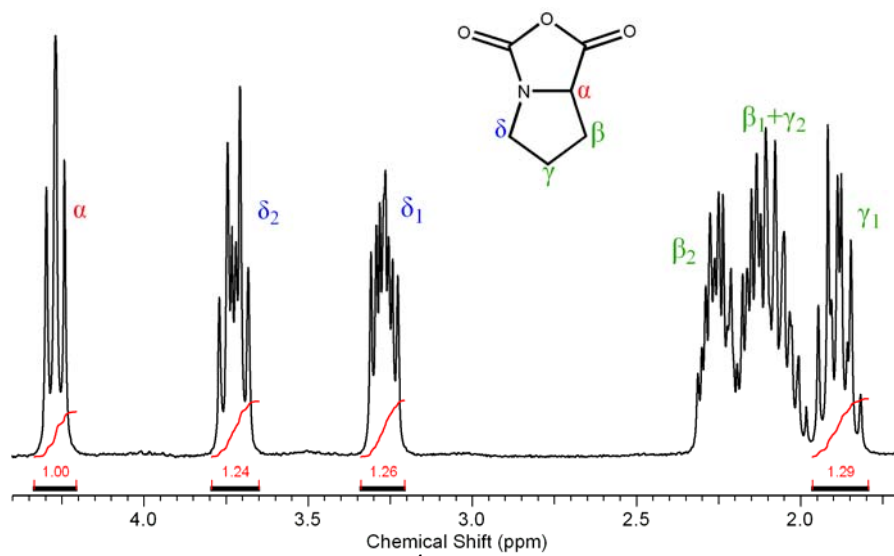
Εικόνα 3: FTIR σχηματισμού του (L)-Pro NCA μετά το πέρας της αντίδρασης.



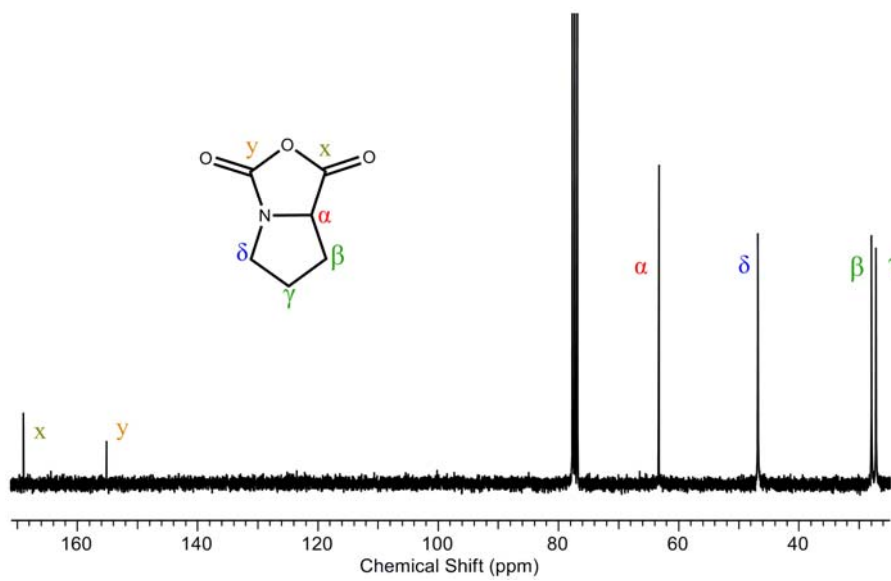
Εικόνα 4: Παρακολούθηση με  $^1\text{H-NMR}$  της διαδικασίας καθαρισμού του (L)-Pro NCA (a) πριν και (b) μετά την ανακρυστάλλωση με σκοπό την εκδίωξη της (c) αρχικού Boc-Pro.



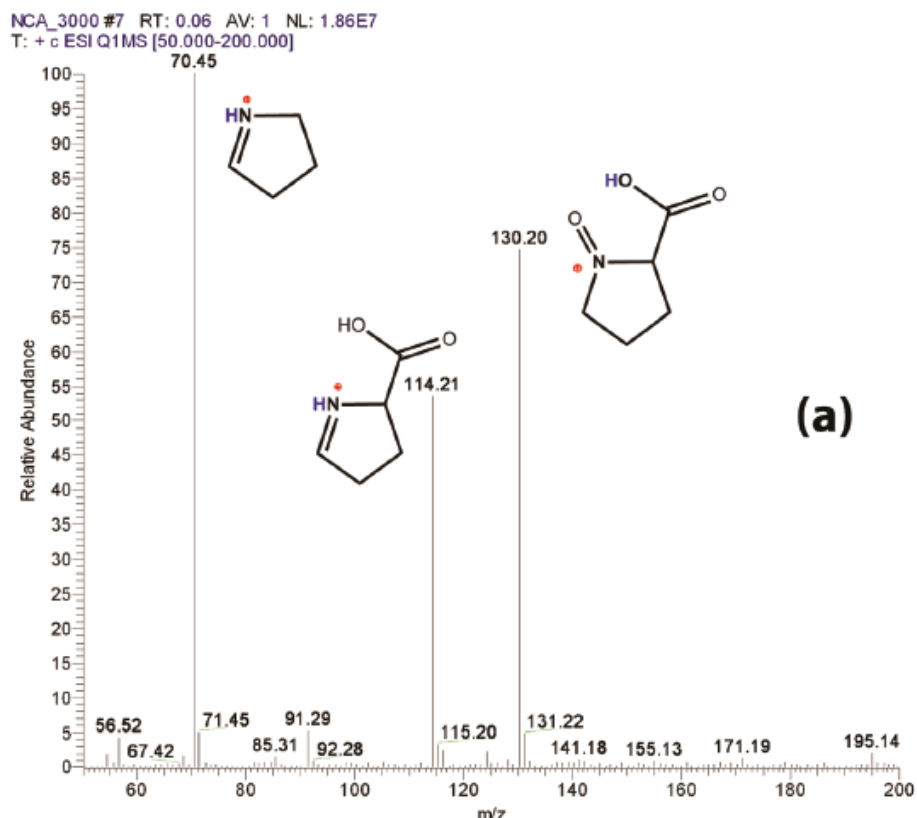
Εικόνα 5: FTIR καθαρισμού του (L)-Pro NCA με θερμική διάλυση σε εξάνιο.



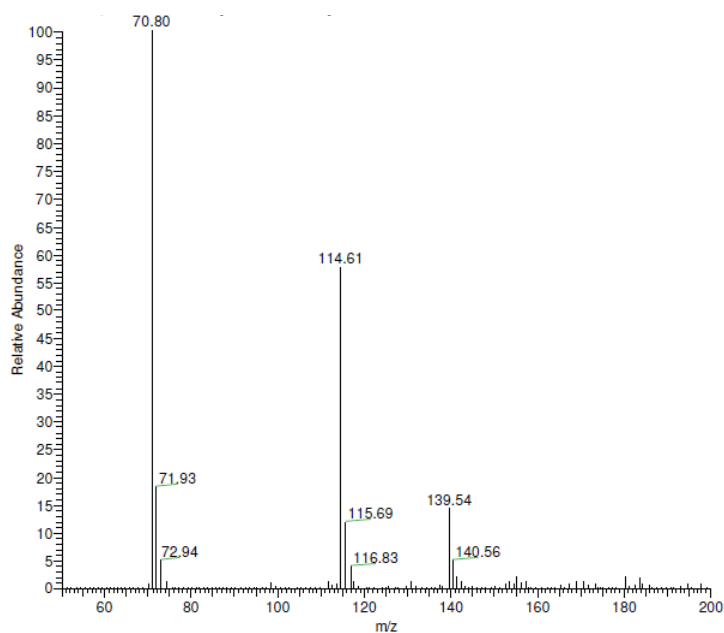
Εικόνα 6: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του (L)-Pro NCA.



Εικόνα 7: Φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  του (L)-Pro NCA.

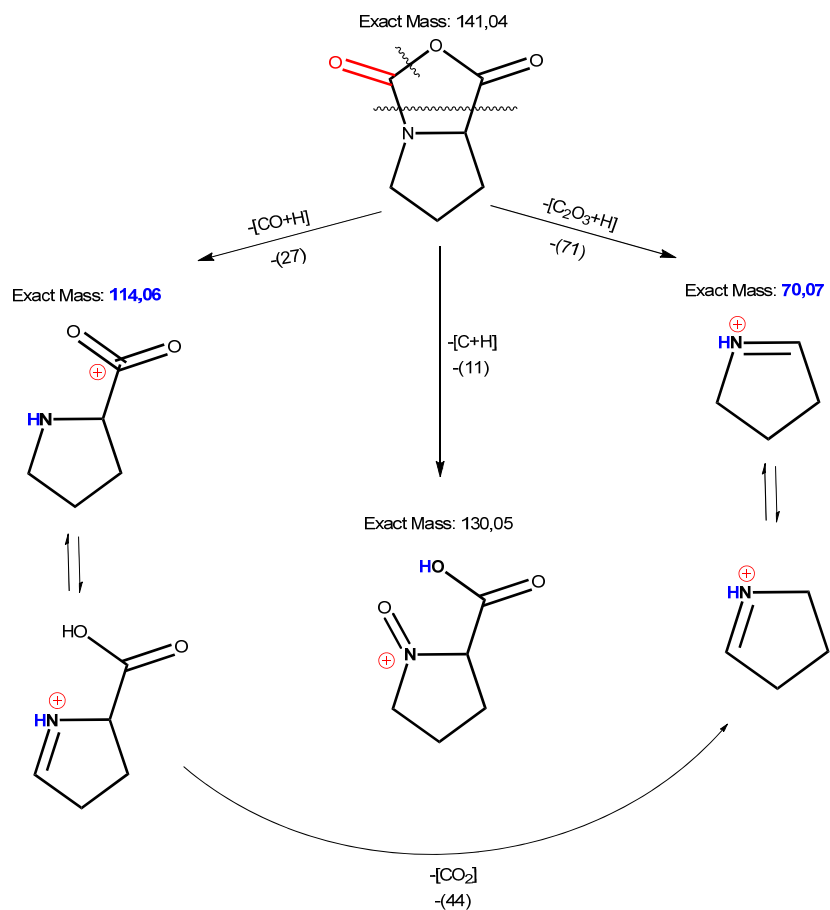


Εικόνα 8: Φάσμα ESI-MS του (L)-Pro NCA.

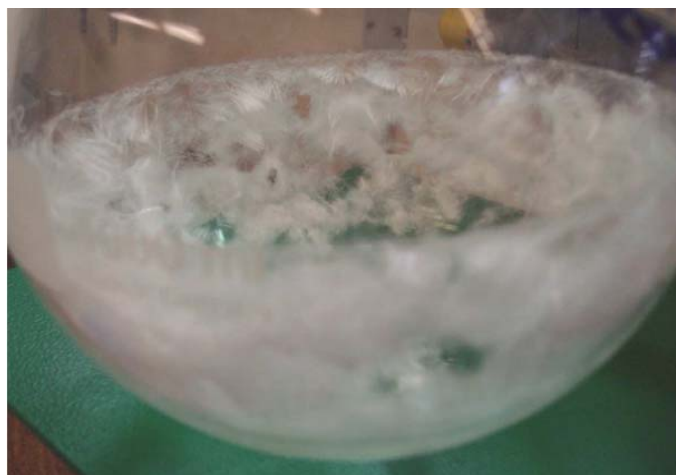


Εικόνα 9: Φάσμα ESI-MS του πρόδρομου θραύσματος με  $m/z=70$ , το οποίο δείχνει ότι τα ιοντικά θραύσματα με  $m/z=114$  and  $m/z=140$  προέρχονται από αυτό.





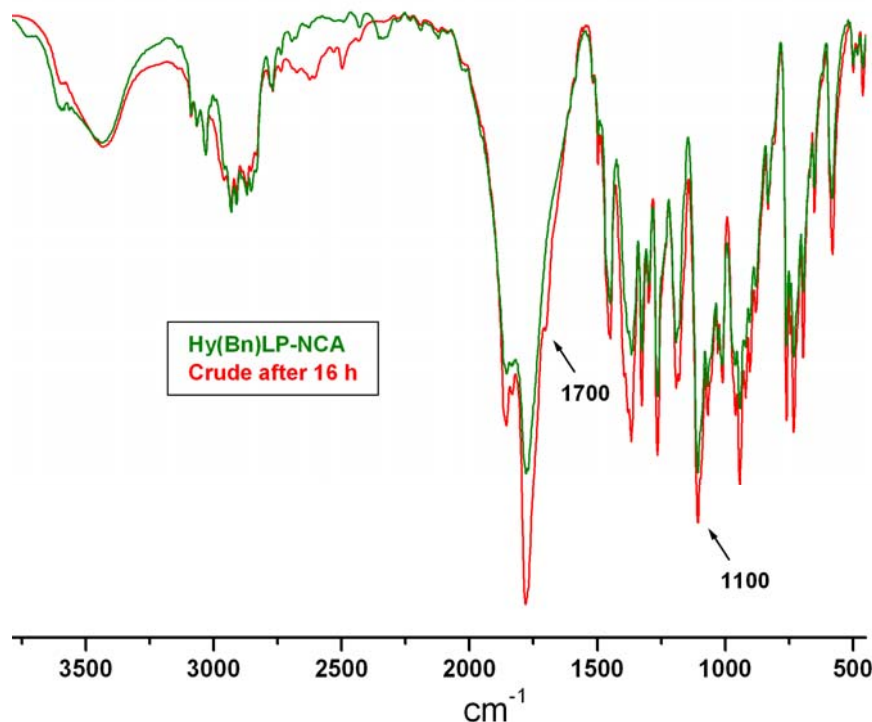
Σχήμα 46: Απεικόνιση των ιοντικών θραυσμάτων του (L)-Pro NCA σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ESI-MS.



Εικόνα 10: Κρύσταλλοι του (L)-Pro NCA.

## 4.2 N-καρβοξυ ανυδρίτης βενζυλο-L-υδρόξυπρολινής (Bn-L-Hyp NCA)

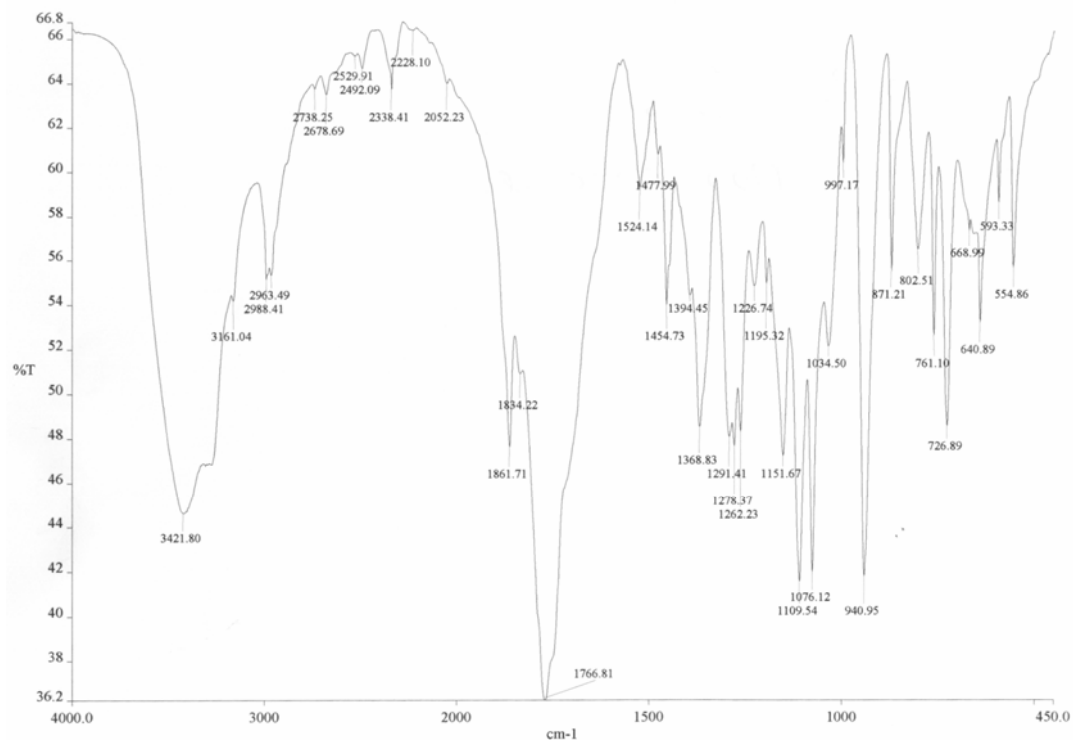
Μετά από αντίδραση 16h σε THF βλέπουμε ότι έχει σχηματιστεί ο ανυδρίτης κατά ένα μεγάλο ποσοστό (εικόνα 11). Ακολουθούν ανακρυστάλλωσεις σε THF/εξάνιο οπότε λαμβάνεται καθαρός ο Bn-L-Hyp NCA.



Εικόνα 11: FTIR σχηματισμού του Bn-(L)-Hyp NCA μετά το πέρας της αντίδρασης και μετά τον καθαρισμό.

## 4.3 N-καρβοξυ ανυδρίτης της γλυκίνης (L-Gly NCA)

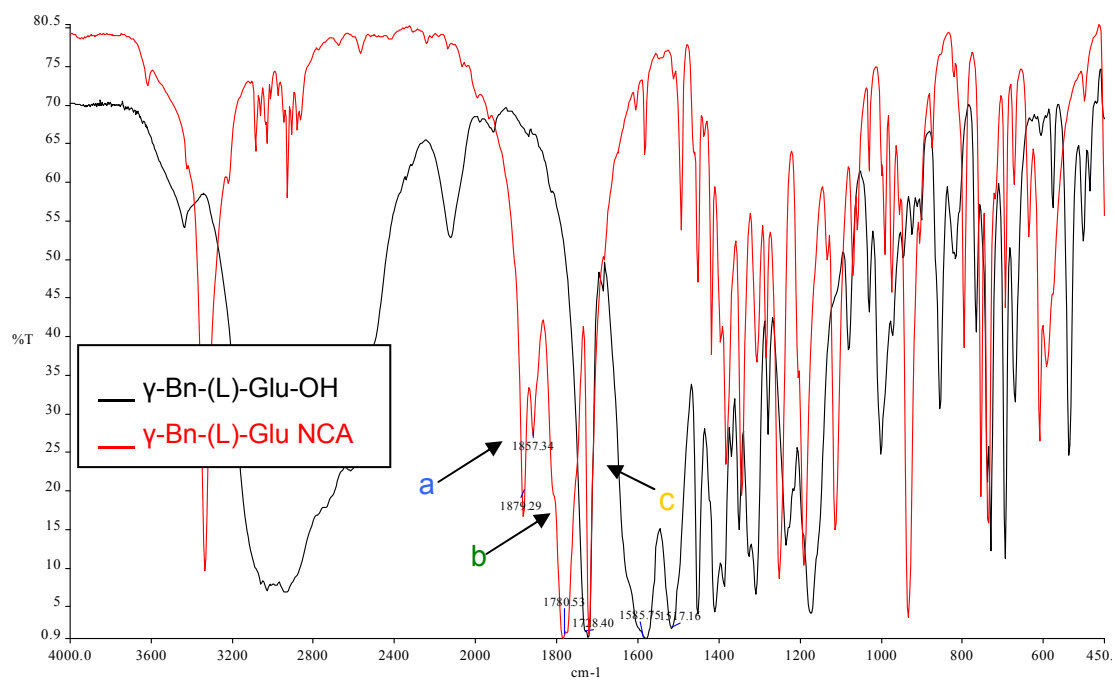
Μετά από αντίδραση 6h σε THF, έχει σχηματιστεί ο ανυδρίτης κατά ένα μεγάλο ποσοστό. Στην περίπτωση του ανυδρίτη της γλυκίνης, δεν κάνουμε εκχύλιση. Ακολουθούν ανακρυστάλλωσεις σε THF/εξάνιο οπότε λαμβάνεται καθαρός ο L-Gly NCA (εικόνα 12).



Εικόνα 12: FTIR σχηματισμού του (L)-Gly NCA μετά τον καθαρισμό.

#### 4.4 N-καρβοξυ ανυδρίτης βενζυλο-L-γλουταμικού εστέρα (*Bn-L-Glu NCA*)

Το αρχικό αμινοξύ βρίσκεται υπό την μορφή αιωρήματος στον διαλύτη (οξικός αιθυλεστέρας) και για την σύνθεση του ανυδρίτη, απαιτείται θερμοκρασία 50°C και μικρή περίσσεια τριφωσγενίου, ενώ είναι το μοναδικό αμινοξύ που κλείνει μόνο του και δεν χρειάζεται τριαιθυλαμίνη. Η όλη διαδικασία απαιτεί περίπου 3-4 ώρες και Μετά από αντίδραση 3-4h σε οξικό αιθυλεστέρα, σχηματίζεται ο ανυδρίτης κατά ένα μεγάλο ποσοστό, ενώ με ανακρυσταλλώσεις σε οξικό αιθυλεστέρα/εξάνιο λαμβάνεται καθαρός ο *Bn-L-Glu NCA* (εικόνα 13).

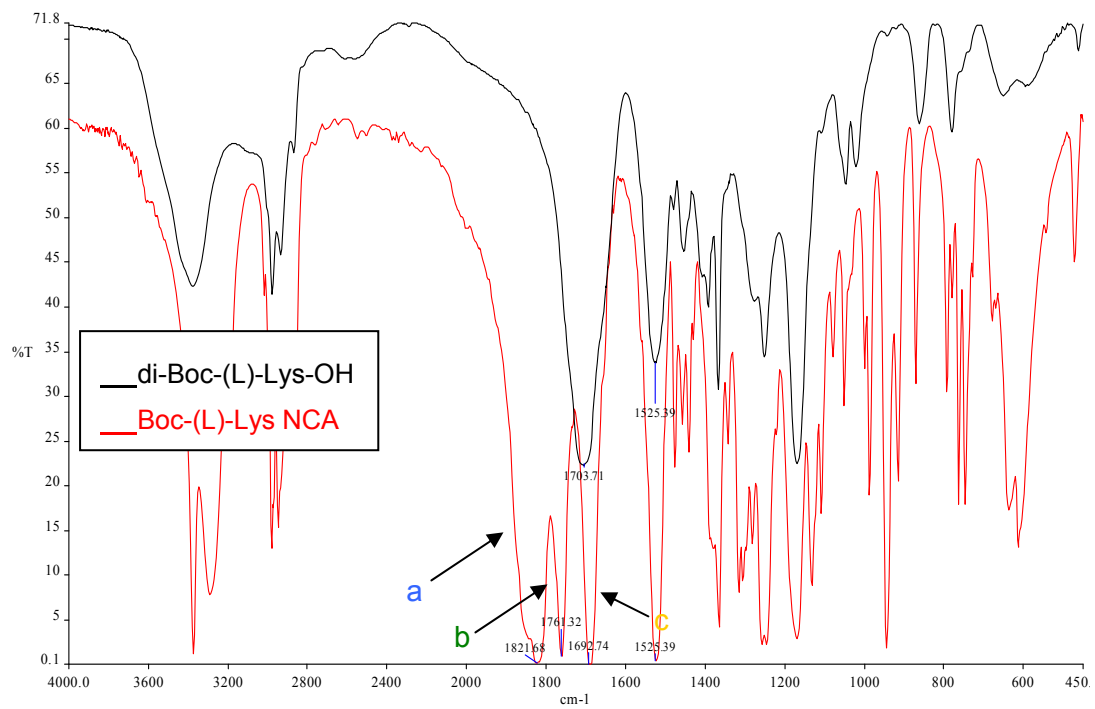


**Εικόνα 13. FTIR φάσμα του  $\gamma$ -Bn-(L)-Glu NCA.**

- a** : Δονήσεις έκτασης  $\text{-C=O}$ , κοντά στο O
- b** : Δονήσεις έκτασης  $\text{-C=O}$ , κοντά στο N
- c** : Δονήσεις έκτασης  $\text{-C=O}$ , της προστασίας

#### **4.5 N-καρβοξυ ανυδρίτης της $\epsilon$ -tert-βουτοξυ καρβονυλο-L-λυσίνης (*Boc-L-Lys NCA*)**

Στην περίπτωση του ανυδρίτη αυτού, συνθέτουμε αρχικά το αλάτι diBoc-L-Lys-DCHA, ακολουθεί απελευθέρωση της καρβοξυλομάδας και σχηματισμός του ανυδρίτη με αντίδραση 5-6h σε THF. Ο ανυδρίτης σχηματίζεται σε μεγάλο ποσοστό, ενώ με ανακρυσταλλώσεις σε οξικό αιθυλεστέρα/εξάνιο λαμβάνεται καθαρός ο *Boc*-(L)-Lys NCA (εικόνα 14).

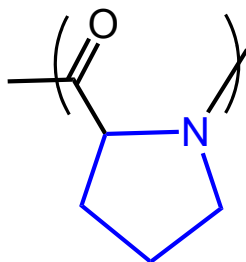


**Εικόνα 14: FTIR φάσμα του Boc-(L)-Lys NCA.**

- a** : Δονήσεις έκτασης  $\text{C}=\text{O}$ , κοντά στο O
- b** : Δονήσεις έκτασης  $\text{C}=\text{O}$ , κοντά στο N
- c** : Δονήσεις έκτασης  $\text{C}=\text{O}$ , της προστασίας

## 4.6 Ομοπολυπεπτίδια PLP & PBHyLP

### 4.6.1 Πολυ(L-προλίνη) (PLP)



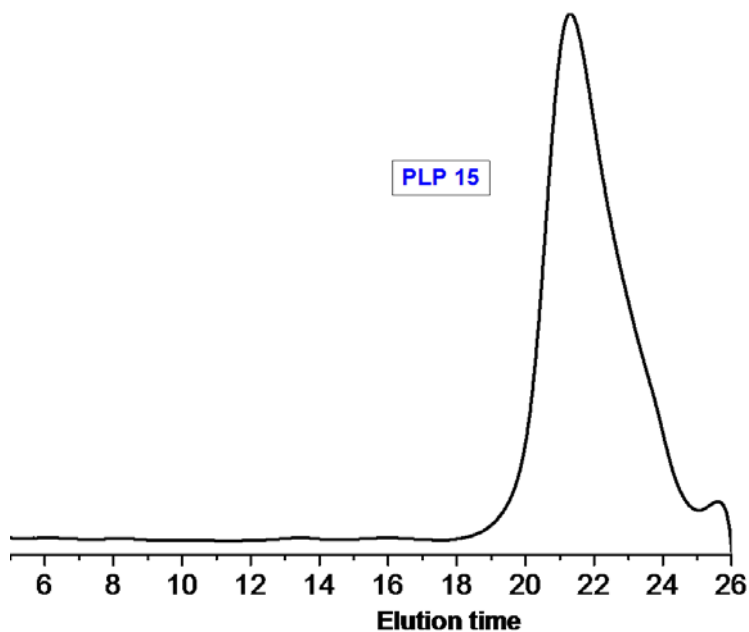
Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της πολυ(L-προλίνης), του μοναδικού υποκατεστημένου στο άζωτο φυσικού αμινοξέως, από πολυμερισμό του N-καρβόξυ ανυδρίτη της (L)-προλίνης με την τεχνική του υψηλού κενού. Ο (L)-Pro NCA παρασκευάστηκε από *Boc*-(L)-προλίνη και τριφωσγένιο σε THF σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία τριαιθυλαμίνης για την δέσμευση του HCl. Ο πολυμερισμός έγινε με διμεθυλαμίνη (DMA) ως απαρχητή σε διαλύτη ACN και ήταν ετερογενής. Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, τόσο της σύνθεσης του ανυδρίτη της (L)-προλίνης όσο και της πολυ(L-προλίνης), έδειξε πως βρέθηκε μια πρωτότυπη μέθοδος, που απαλλάσσει τον ανυδρίτη από προσμίξεις και οδηγεί στην παρασκευή καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων προλίνης. Παρ'όλο που ο πολυμερισμός είναι ετερογενής, οι κατανομές πολυμερισμού είναι σχετικά μικρές και συμμετρικές, ενώ οι μετατροπές είναι υψηλές και σε αρκετά καλή συμφωνία με τις θεωρητικά υπολογιζόμενες. Υπάρχει δηλαδή έλεγχος μοριακού βάρους και οι αποδόσεις είναι της τάξεως του 95%, ωστόσο τα μοριακά βάρη των ομοπολυμερών ωστόσο δεν ξεπερνούν τις 13K (Πίνακας 7). Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  βλέπουμε και πάλι οι δύο  $\text{C}^\delta$  να διαφοροποιούνται και να δίνουν διαφορετικό σήμα, ωστόσο επειδή έχουμε πολυμερές δεν φαίνονται οι διασχίσεις που βλέπαμε στο φάσμα του (L)-Pro NCA.

Πίνακας 7: Μοριακά χαρακτηριστικά ομοπολυμερών PLP που παρασκευάστηκαν.

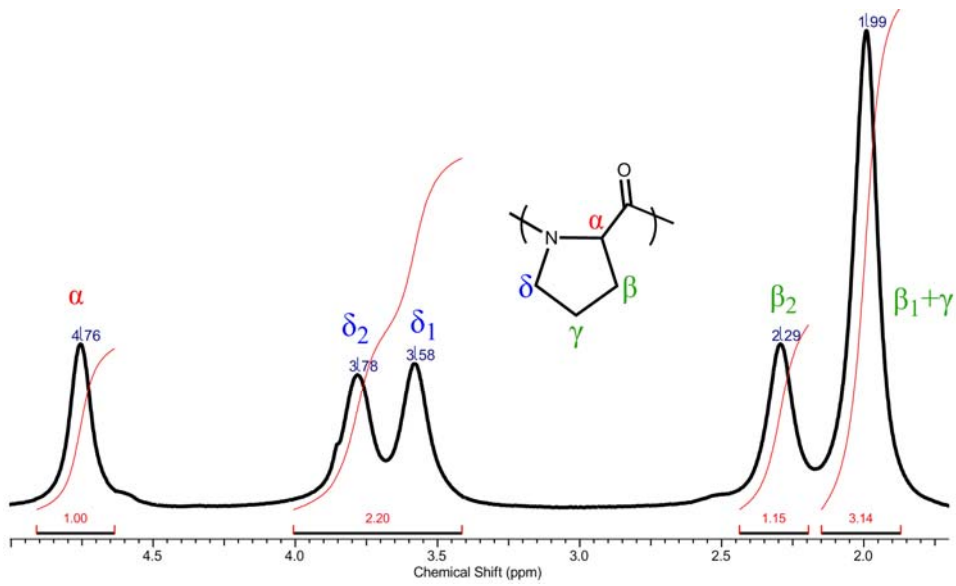
Δείγμα	$M_n \times 10^3$ ( $g \cdot mole^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$M_n / M_w$	διαλύτης / απαρχ.	DP <sup>b</sup>
PLP	2,3	1.23	ACN (DMA)	23
PLP	4,6	1.46	ACN (DMA)	47
PLP	4,6	1.42	DMF (-)	47
PLP	7,4	1.44	THF (HEX)	75
PLP	9,3	1.23	ACN (DMA)	95
PLP	10,7	1.48	ACN (DMA)	109
PLP	13,0	1.24	ACN (DMA)	133

<sup>a</sup> SEC σε νερό (0.1 M NaNO<sub>3</sub>) / ACN 80:20 στους 35°C.

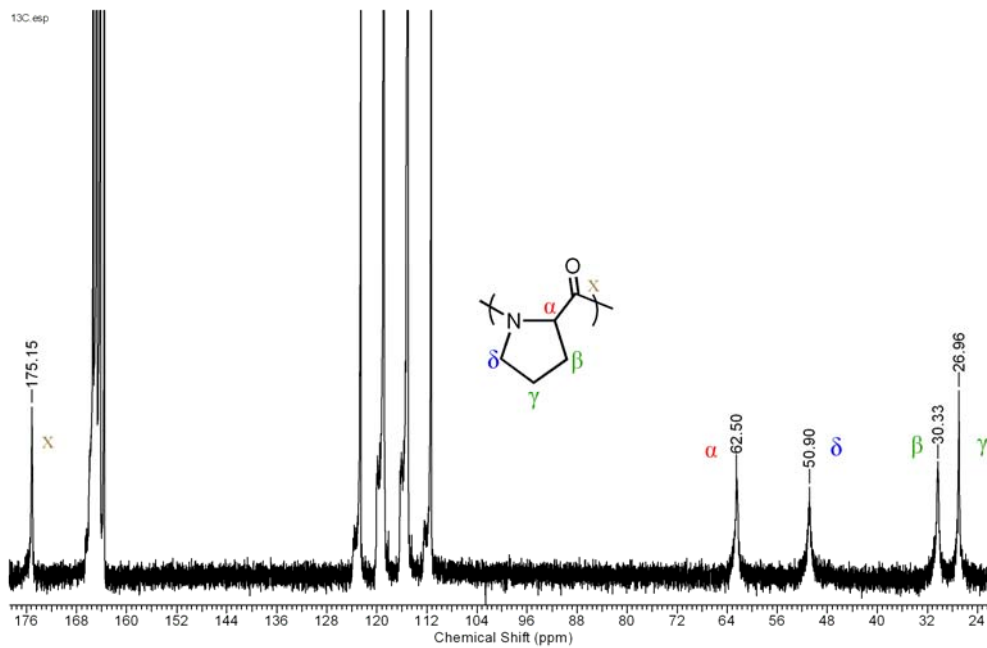
<sup>b</sup> Βαθμός πολυμερισμού. Μοριακό Βάρος (L)-Pro NCA προς πολυμερισμό, 98 gr/mol.



Εικόνα 15: Χρωματογράφημα GPC της PLP 13K σε νερό.

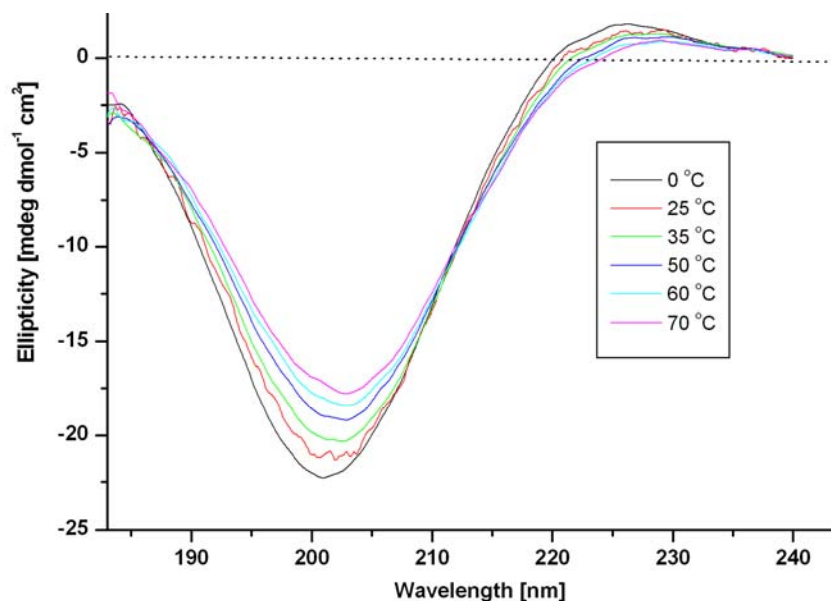


Εικόνα 16: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της PLP II σε d-TFA.



Εικόνα 17: Φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  της PLP II σε d-TFA.



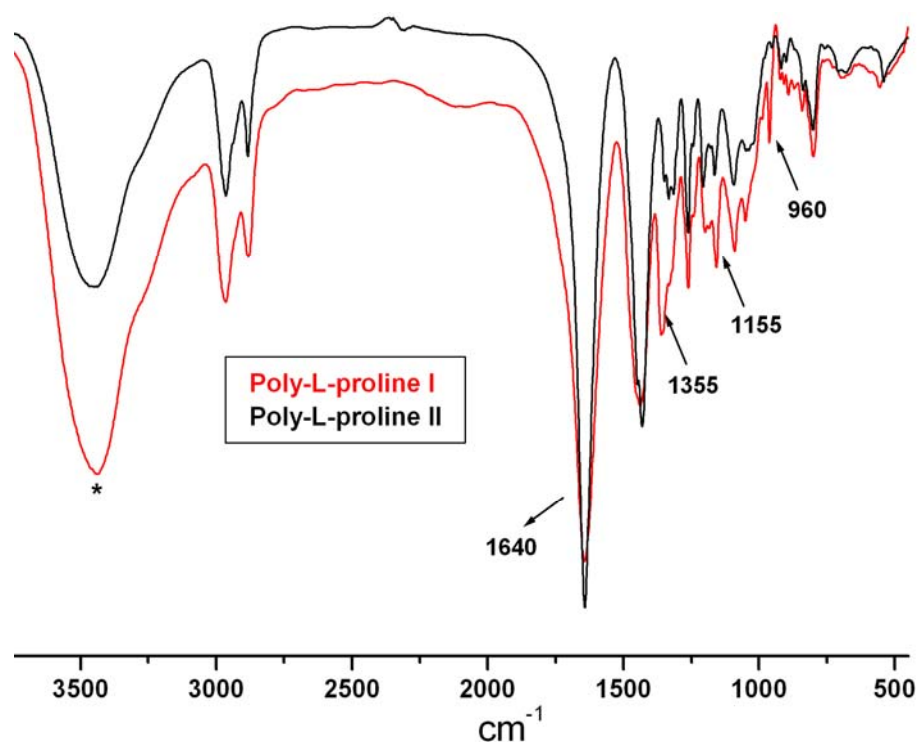


**Εικόνα 18:** Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού που δείχνει την σταθερότητα της αριστερόστροφης έλικας PLP II σε νερό σε θερμοκρασία από 0-70°C.

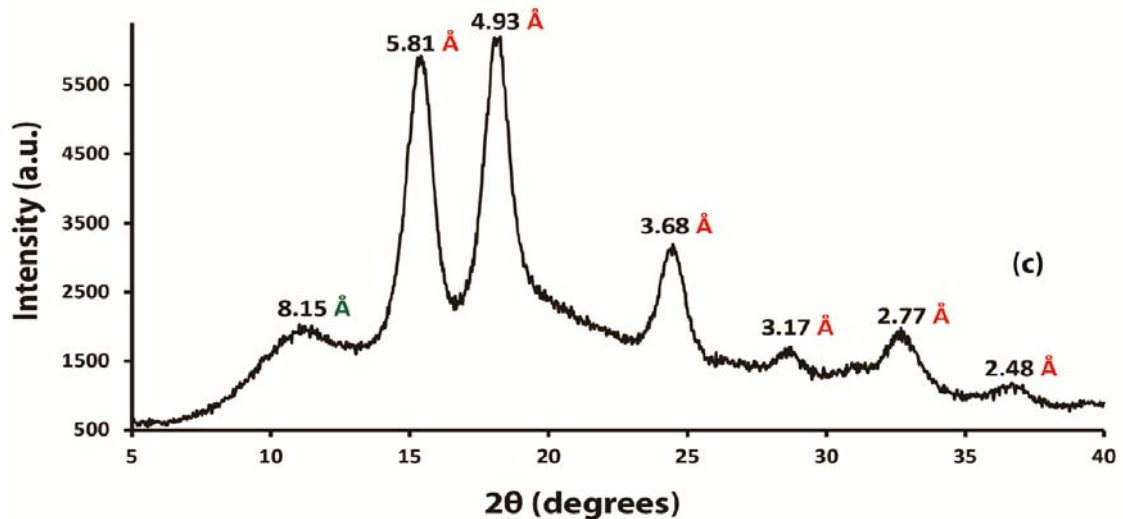
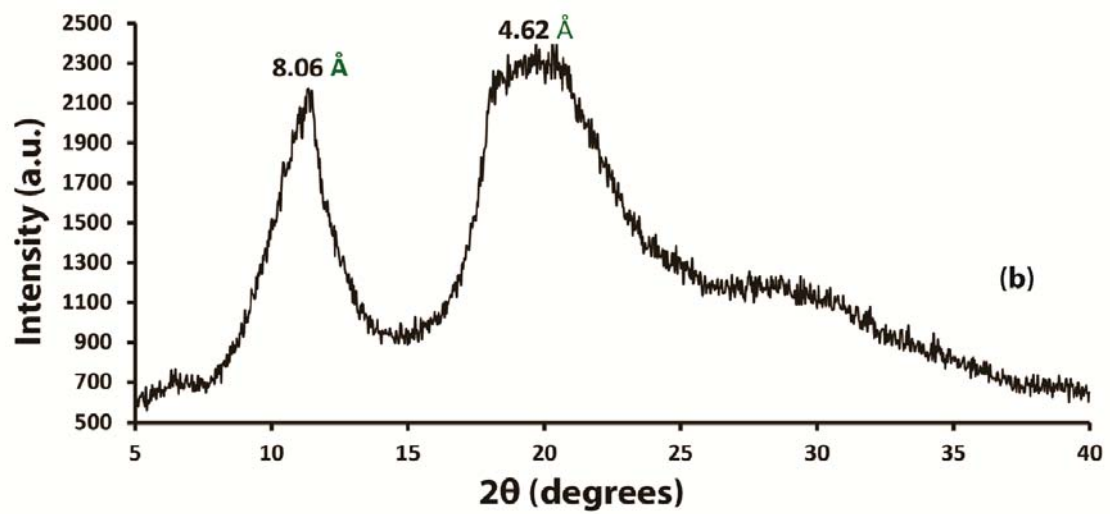
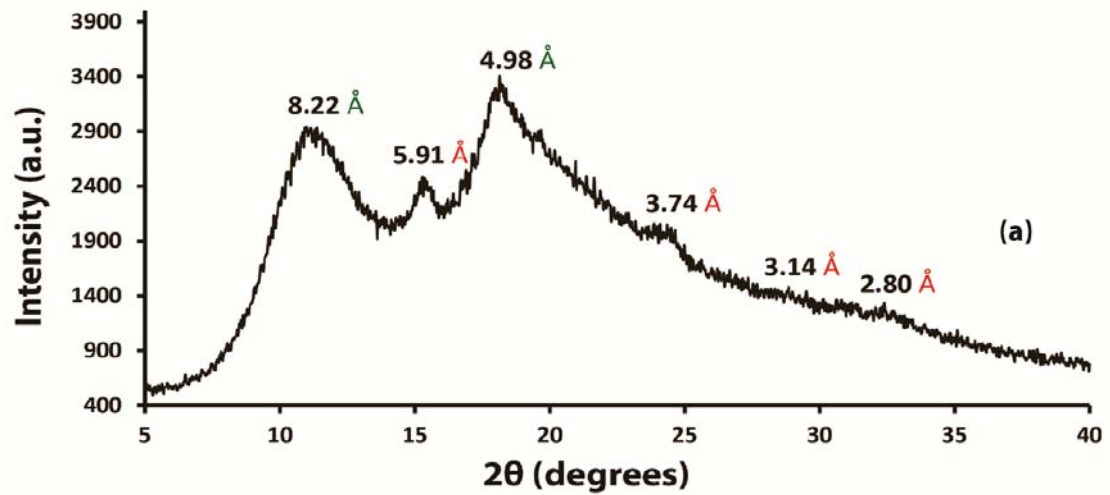
Η αριστερόστροφη έλικα της πολυ(L-προλίνης)<sup>133</sup>, μορφής τυχαίου σπειράματος, οφείλεται στις στερεοχημικές απώσεις των πυρρολιδινικών δακτυλίων, στην προσπάθεια του πολυπεπτιδίου να αυξήσει τις αλληλεπιδράσεις με τον διαλύτη. Την μορφή της πολυ(L-προλίνης), υιοθετεί και η πολυ(L-λυσίνη) σε ουδέτερο/όξινο pH, λόγω όμως ηλεκτροστατικών απώσεων που αναπτύσσονται εξ' αιτίας των φορτισμένων πλευρικών αμινομάδων. Η έλλειψη δεσμού N-H στην πολυ(L-προλίνη) παρέχει μια επιπλέον διαμορφωτική ακαμψία στην αλυσίδα (παρόμοια δομή με αυτήν τυχαίου σπειράματος στο κυκλικό διχρωϊσμό) που επηρεάζει άμεσα την αρχιτεκτονική. Επιπλέον, η αριστερόστροφη έλικα της πολυ(L-προλίνης) είναι σταθερή σε νερό σε θερμοκρασία από 0-60°C, γεγονός το οποίο συμβάλει περαιτέρω στις σπουδαίες εφαρμογές της.

Χαρακτηρισμός σε στερεή φάση έγινε με IR και XRD (εικόνες 19-20). Και τα δυο αποτελέσματα είναι συμπληρωματικά και αποδεικνύουν ότι μετά την καταβύθιση του πολυμερούς από οργανικό διαλύτη, αυτό βρίσκεται σε να μείγμα των δυο μορφών (κυρίως PLP I). Όταν όμως η έλικα έρθει σε επαφή με νερό ή οργανικά οξέα και λυοφιλιωθεί, υιοθετείται η εκτενής δομή της PLP II (εικόνες 16-18). Αυτό γίνεται μέσω μιας οξεο-καταλυόμενης ισορροπίας,

διότι με την παρουσία όξινων πρωτικών διαλυτών, το πολυπεπτίδιο προσπαθεί να αυξήσει τις αλληλεπιδράσεις του με τον διαλύτη και έτσι λαμβάνεται η λιγότερο συνωστισμένη και ιδιαίτεως εκτεταμένη μορφή II της πολυ(L-προλίνης) (εικόνα 19). Στην εικόνα 20(c) βλέπουμε την υψηλής κρυσταλλικότητας μορφή II, μετά από παραμονή σε νερό και διήθηση. Η εικόνα 20(b), είναι χαρακτηριστική της μορφής I, έπειτα από διάλυση της πολυ(L-προλίνης) σε οξικό οξύ/προπανόλη 1:9, σύμφωνα με την βιβλιογραφία<sup>116</sup>, ενώ τέλος η εικόνα 20(a), δείχνει την μορφή του πολυμερούς, μετά από τον πολυμερισμό σε ακετονιτρίλιο και καταβύθιση σε αιθέρα, που είναι μείγμα των δύο μορφών (συμπληρωματικό του IR, εικόνα 19).



Εικόνα 19: Φάσμα IR που δείχνει ξεκάθαρα τον αμιδικό δεσμό της PLP, καθώς και την συνύπαρξη των δυο μορφών μετά από την σύνθεση (κυρίως μορφή I). Η μορφή II υιοθετείται έπειτα από παραμονή σε νερό.

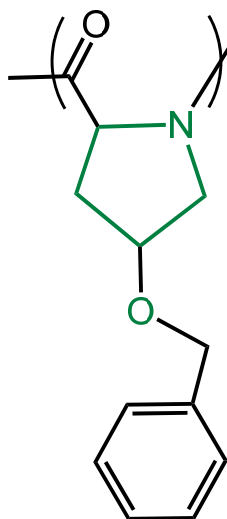


Εικόνα 20: Φάσμα XRD της PLP που δείχνει (a) την συνύπαρξη των δυο μορφών μετά από πολυμερισμό; (b) την μορφή I μετά από διάλυση σε οξικό οξύ/PrOH 1:9; (c) την υψηλής κρυσταλλικότητας μορφή II μετά από διάλυση σε νερό.

## **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

Μέχρι σήμερα ολιγομερή προλίνης έχουν χρησιμοποιηθεί από τον Stryer ως μοριακός χάρακας για την μέτρηση αποστάσεων από μία φθορίζουσα ουσία δότη σε μια άλλη δέκτη κατά την ανάλυση FRET. Μελέτες στα δικά μας πολυμερή έδειξαν ότι η υδατοδιαλυτή πολυ(L-προλίνη) II είναι ένα πολύ μαλακό πολυμερές με  $T_g > 100^\circ\text{C}$  (το  $T_g$  πιθανώς να οφείλεται στα λίγα κατάλοιπα *cis* που υπάρχουν, πιθανώς τυχαία διεσπαρμένα κατά μήκος της αλυσίδας και εμποδίζουν το πλήρες ξεδίπλωμα της αλυσίδας), ενώ παρουσιάζει θερμοκρασία αποσύνθεσης μεταξύ  $380-450^\circ\text{C}$ . Ομοπολυμερή προλίνης εξετάζονται για το κατά πόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακός χάρακας, με πολύ καλά καθορισμένες διαστάσεις.

### **4.6.2 Πολυ(O-βενζυλο-L-υδροξυπρολίνη) (PBHyLP)**



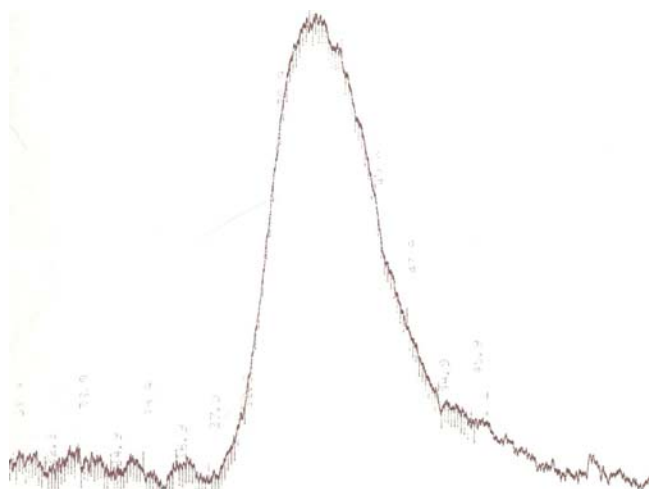
Η σύνθεση της πολυ(O-βενζυλο-L-υδροξυπρολίνης) έγινε με πολυμερισμό του N-καρβόξυ ανυδρίτη της O-βενζυλο-(L)-υδροξυπρολίνης σε THF ή  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και ο πολυμερισμός ήταν ομογενής. Το τελικό πολυπεπτίδιο διαλύεται σε  $\text{CHCl}_3$ , THF και  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ενώ είναι αδιάλυτο σε DMF. Τα μοριακά χαρακτηριστικά δίνονται στον Πίνακα 8. Όπως βλέπουμε οι κατανομές πολυμερισμού είναι σαφώς μικρότερες λόγω ομοιογένειας του διαλύματος (εικόνα 8).

**Πίνακας 8. Μοριακά χαρακτηριστικά ομοπολυμερών PBHyLP που παρασκευάστηκαν.**

Δείγμα	$M_n \times 10^{-3}$ ( $g \cdot mole^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$M_n / M_w$	διαλύτης / απαρχ.	DP <sup>b</sup>
PBHyLP	7.3	1,12	THF (DMA)	39
PBHyLP	15.0	1,14	THF (DMA)	73

<sup>a</sup> SEC σε CHCl<sub>3</sub> στους 35°C.

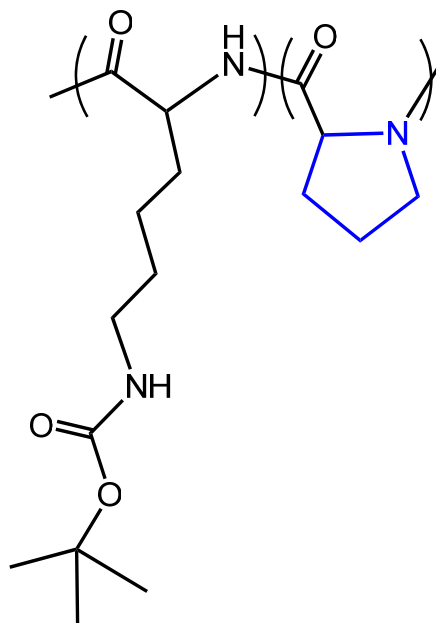
<sup>b</sup> Βαθμός πολυμερισμού. Μοριακό Βάρος Bn-(L)-Hyg NCA προς πολυμερισμό, 203 gr/mol.



**Εικόνα 21: GPC χρωματογράφημα της PBHyLP 7,3K σε CHCl<sub>3</sub>.**

## 4.7 Παρασκευή γραμμικών δυσυσταδικών συμπολυπεπτιδίων α-έλικας *PBocLL-b-PLP*, *PBLG-b-PLP* & *PBLG-b-PBHyLP*

### 4.7.1 Πολυ(ε-βουτυλοξυ-καρβονυλο-L-λυσίνη)-*b*-Πολυ(L-προλίνη) (*PBocLL-b-PLP*)



Στην παρούσα εργασία, συντέθηκαν επίσης κατά συστάδες συμπολυμερή *PBocLL-b-PLP* και *PBLG-b-PLP* με διαφορετικές αναλογίες κάθε συστάδας, με διαδοχική προσθήκη του ανυδρίτη της (L)-προλίνης στο ζωντανό κλάδο της *PBocLL* (εικόνα 22) ή του *PBLG* αντίστοιχα. Τα συμπολυπεπτίδια αυτά, συνδυάζουν την αυτοοργάνωση των κατά συστάδες συμπολυμερών με τις διαταγμένες τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών. Η ικανότητα λήψης καθαρών φασμάτων NMR του συμπολυπεπτιδίου, χωρίς να συμπίπτουν οι χαρακτηριστικές κορυφές των δυο συστάδων είναι πολύ σημαντική (εικόνα 23) και η θεωρητικά υπολογισμένη σύσταση βρίσκεται σε καλή συμφωνία. Ο πολυμερισμός του δεύτερου κλάδου του ανυδρίτη της (L)-προλίνης με μακροαπαρχητή την *PBocLL*, παρ'ότι ετερογενής, οδήγησε σε πολύ υψηλά μοριακά βάρη της PLP (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9: Μοριακά χαρακτηριστικά γραμμικών συμπολυπεπτιδίων που παρασκευάστηκαν.**

Δείγμα	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> )	$M_w/M_n$	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	% PLP
<b>PBocLL-<i>b</i>-PLP</b>	<b>99,1<sup>a</sup></b>	<b>1,18</b>	<b>185,7</b>	<b>44<sup>d</sup></b>
<b>PBLG-<i>b</i>-PLP #1</b>	<b>20,0<sup>b</sup></b>	<b>1,02</b>	<b>33,2</b>	<b>39<sup>e</sup></b>
<b>PBLG-<i>b</i>-PLP #2</b>	<b>16,0<sup>b</sup></b>	<b>1,08</b>	<b>45,3</b>	<b>58<sup>e</sup></b>

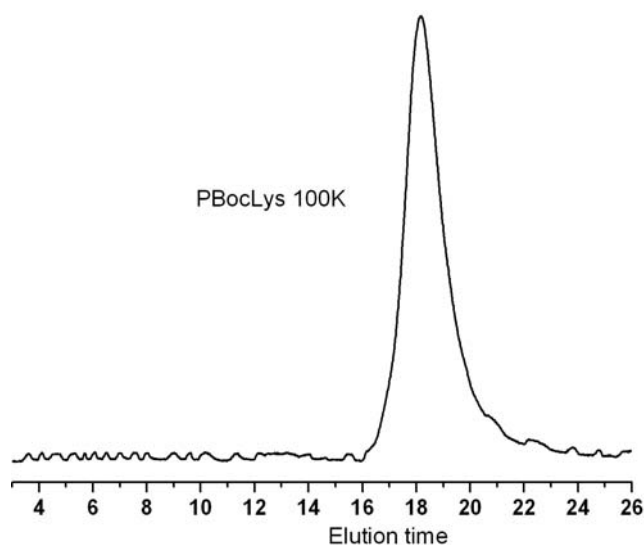
<sup>a</sup> SEC σε DMF (0.1M LiBr) στους 65°C με βάση το dn/dc

<sup>b</sup> SEC σε DMF (0.1M LiBr) στους 65°C με βάση το UV.

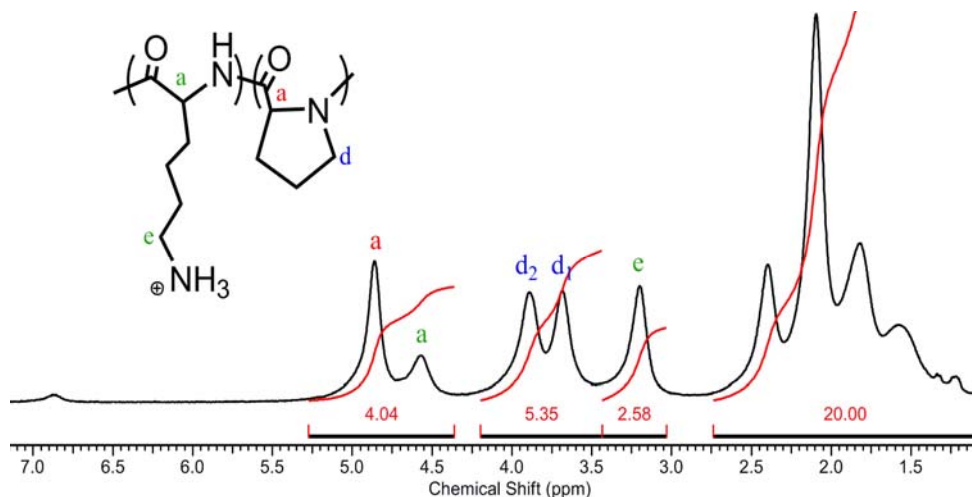
<sup>c</sup> Υπολογισμός τελικού  $M_n$  από στοιχειομετρία.

<sup>d</sup> Σύσταση κατά βάρος από <sup>1</sup>H-NMR του PLL-*b*-PLP σε CF<sub>3</sub>COOD και αναγωγή στο αρχικό προστατευμένο συμπολυπεπτιδίιο.

<sup>e</sup> Σύσταση κατά βάρος από TGA.



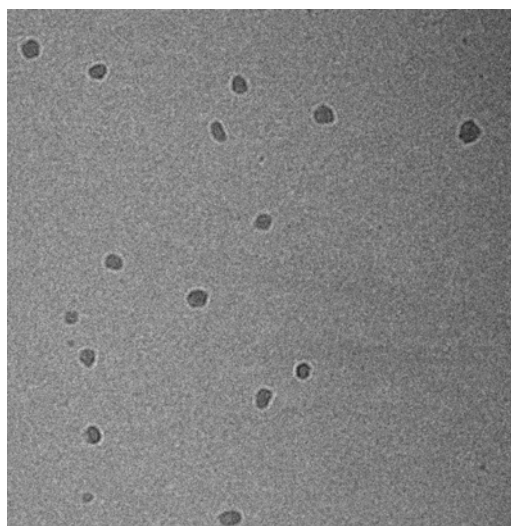
**Εικόνα 22: GPC χρωματογράφημα της PBocLL 100K σε DMF.**



Εικόνα 23: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του PLL-*b*-PLP σε d-TFA.

### ΜΙΚΚΥΛΙΩΣΗ ΣΕ ΝΕΡΟ

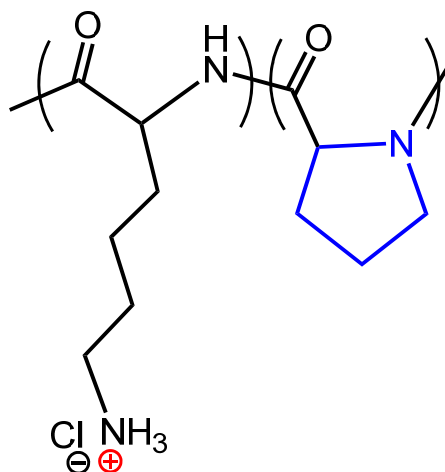
Το πολυμερές αυτό, χαρακτηρίζεται από μια υδατοδιαλυτή συστάδα (PLP) και μια υδρόφοβη συστάδα (PBocLL). Παρουσία νερού, η προστατευμένη συστάδα της λυσίνης πακετάρεται προς τα μέσα, σε μια προσπάθεια να αποφύγει κάθε επαφή με τον νερό, ενώ η υδρόφιλη πολυ(L-προλίνη) βρίσκεται σε επαφή με το νερό, οδηγώντας παράλληλα στην εκτεταμένη μορφή PLP II. Τα μικκύλια που σχηματίζονται, βρέθηκαν να έχουν μέση  $d=20\text{nm}$  (εικόνα 24).



Εικόνα 24: Cryo-TEM μικκυλίων PBocLL-*b*-PLP σε νερό.



**ΑΠΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ:** Για να πάρουμε το υδατοδιαλυτό πολυμερές PLL-*b*-PLP, αντιδράσαμε το πολυπεπτίδιο με TFA. Η περίσσεια του οξέως αποστάζεται στην γραμμή κενού και το εναπομείνων, διαλύεται σε δισαππεσταγμένο νερό (ένδειξη ότι είναι έγινε η αποπροστασία) και μεταφέρεται στην μεμβράνη για να καθαριστεί. Η διαδικασία της διαπίδυσης (dialysis) διαρκεί 5-7 μέρες και το δισαππεσταγμένο νερό (εξωτερικά της μεμβράνης), αλλάζεται κάθε μέρα με προσθήκη σε αυτό, 4 σταγόνων πυκνού HCl, έτσι ώστε το pH=4.



Δείγμα	$M_n \times 10^3$ (g · mole <sup>-1</sup> )	$M_n \times 10^3$ (g · mole <sup>-1</sup> )	$M_n \times 10^3$ (g · mole <sup>-1</sup> )	% PLP
PLL- <i>b</i> -PLP	56,8 <sup>a</sup>	86,6 <sup>b</sup>	144,4 <sup>c</sup>	60 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> SEC σε DMF (0.1M LiBr) στους 65°C με βάση το dn/dc και αναγωγή στο αππροστάτευτο συμπολυπεπτίδιο.

<sup>b</sup> Μοριακό βάρος της PLP με αφαίρεση από το τελικό μοριακό βάρος.

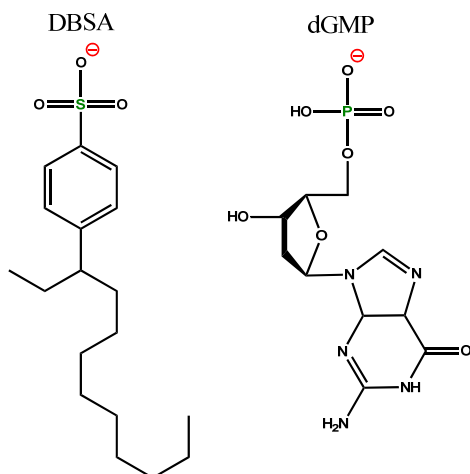
<sup>c</sup> Υπολογισμός τελικού  $M_n$  από στοιχειομετρία.

<sup>d</sup> Σύσταση κατά βάρος από <sup>1</sup>H-NMR του PLL-*b*-PLP σε CF<sub>3</sub>COOD.

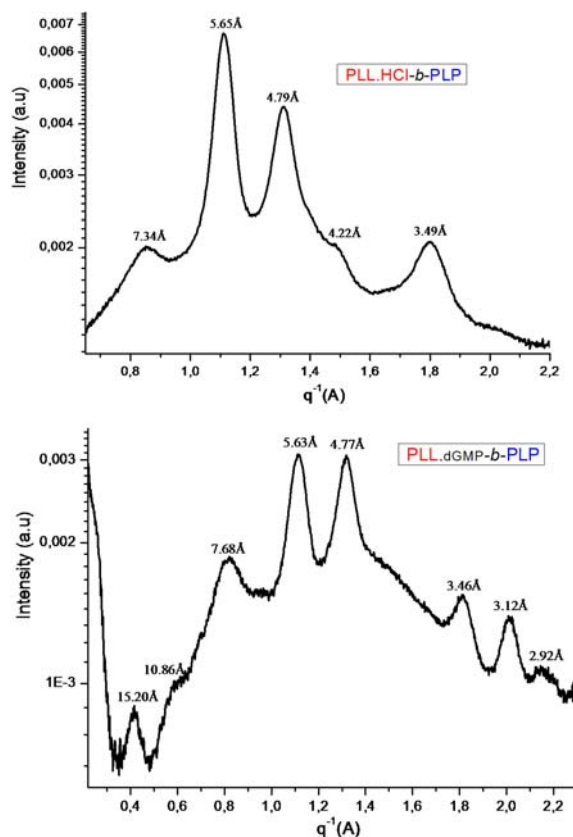
## **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

Στο πολυμερές αυτό, του οποίου η σύνθεση αναφέρθηκε για πρώτη φορά, εξετάσαμε την αυτοοργάνωση του σε στερεά κατάσταση, τόσο σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας (WAXS), όσο και σε οργάνωση μεγάλης κλίμακας (SAXS) και εξετάστηκε επίσης, η σύμπλεξη αυτού με μικρά αρνητικά φορτισμένα μόρια όπως **DBSA**, **dGMP** (σχήμα 57), όπου και ελέγξαμε εκ νέου την αυτοοργάνωση (εικόνα 25). Στο φάσμα WAXS, οι κορυφές στα 5.65,

4.79 και 3.49 Å, αντιστοιχούν στην μοναδιαία κυψελίδα της PLP II στο συμπολυμερές PLP-*b*-PLL, ενώ η κορυφή στα 4.22 Å αντιστοιχεί στην PLL. Μετά από σύμπλεξη με το αρνητικά φορτισμένο dGMP, βλέπουμε πόσο αυξάνονται οι κορυφές στο φάσμα WAXS, αποτέλεσμα της αυξημένης οργάνωσης και του πακεταρίσματος (εικόνα 44).

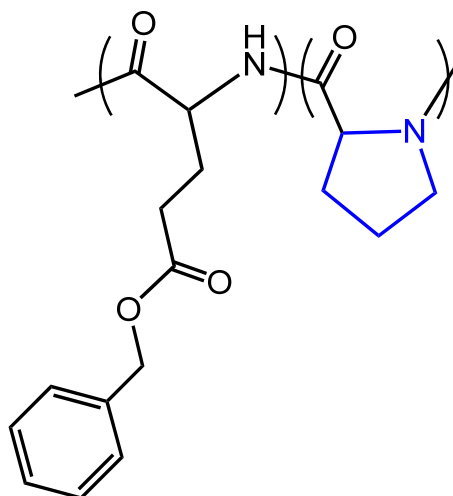


Σχήμα 57: Σύμπλεξη PLL-*b*-PLP με αρνητικά φορτισμένα μόρια όπως DBSA και dGMP.

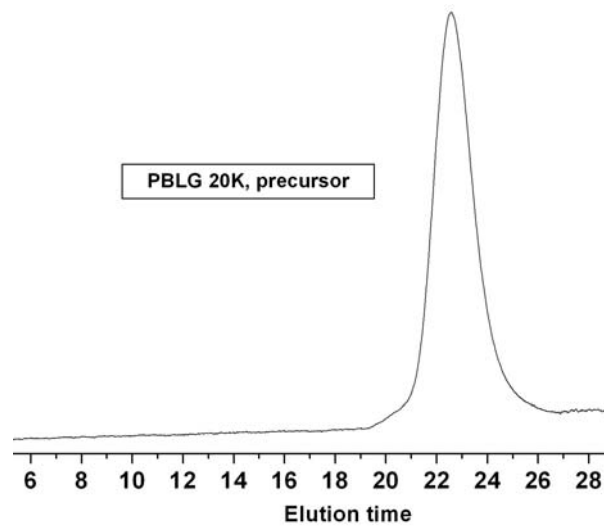


Εικόνα 25: Φάσματα WAXS του συμπολυτεπτιδίου PLL-*b*-PLP πριν και μετά την σύμπλεξη με dGMP.

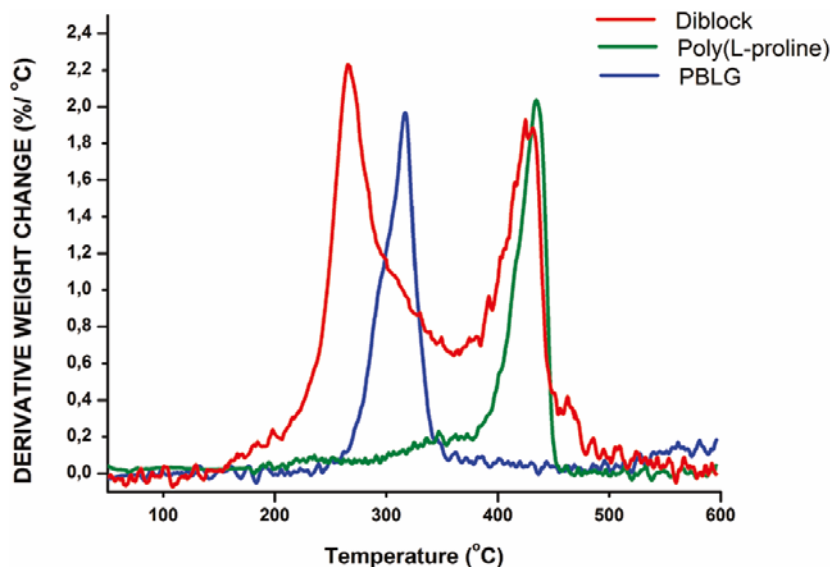
#### 4.7.2 Πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικός εστέρας)-b-Πολυ-(L-προλίνη) (PBLG-b-PLP)



Ο πολυμερισμός του ανυδρίτη της (L)-προλίνης με μακροαπαρχητή το PBLG (εικόνα 26) σε THF ήταν ομογενής, αλλά το τελικό συμπολυτεπτίδιο ήταν αδιάλυτο σε DMF. Έτσι για να βρούμε την σύσταση, κάναμε χαρακτηρισμό σε στερεά φάση με TGA (εικόνα 27) και είδαμε ότι το θεωρητικά υπολογισμένο μοριακό βάρος από στοιχειομετρία, συμφωνεί αρκετά καλά με την σύσταση. Το μοριακό βάρος της PLP ήταν 13K και 29K αντίστοιχα, μεγαλύτερο και πάλι από αυτό του ομοπολυμερούς (όπως και στην περίπτωση της *PBocLL*). Χαρακτηρισμός με NMR στερεάς φάσης, καθώς και πειράματα WAXS και διηλεκτρικής σταθεράς, έδειξαν αυτοοργάνωση των δύο συστάδων, παρ'όλο που η μοναδιαία εξαγωνική κυψελίδα της PLP είναι πολύ μικρότερη από αυτήν του PBLG (σχήμα 58).



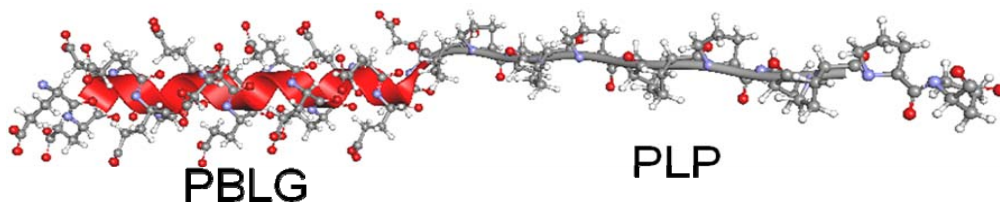
Εικόνα 26: GPC χρωματογράφημα του PBLG 20K σε DMF.

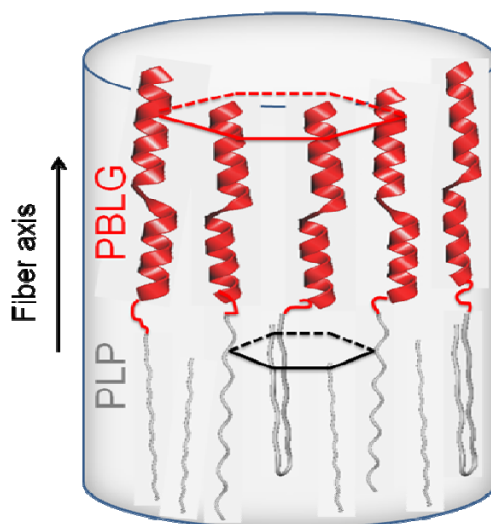


Εικόνα 27: Θερμιδογράφημα TGA του συμπολυμερούς PBLG-*b*-PLP #1.

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

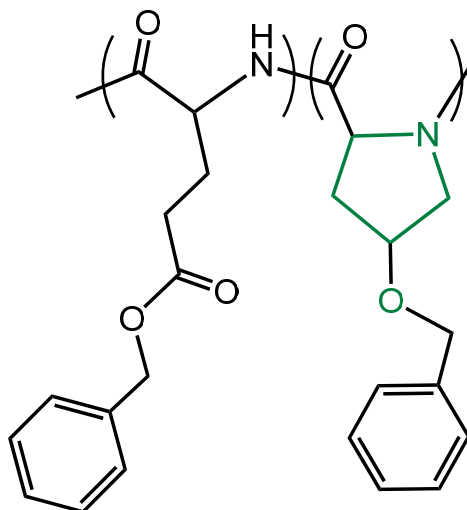
Δείγματα αυτών των συμπολυτεπτιδίων εξετάζονται ως προς την αυτοοργάνωσή τους σε επίπεδο μεγάλης κλίμακας.





Σχήμα 58: Σχηματική αναπαράσταση αυτοοργάνωσης του συμπολυτεπτιδίου αποτελούμενο από α-έλικες, PBLG και PLP, σύμφωνα με αποτελέσματα στερεάς φάσης NMR, που δείχνουν αυτοοργάνωση σε εξαγωνική διαμόρφωση. Με κόκκινο και γκρι χρώμα δίνονται οι μοναδιαίες κυψελίδες του PBLG και της PLP.

#### 4.7.3 Πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικός εστέρας)-*b*-Πολυ(Ο-βενζυλο-L-υδροξυπρολίνη) (PBLG-*b*-PBHyLP)



Ο πολυμερισμός του ανυδρίτη της βενζυλο-(L)-υδροξυπρολίνης με μακροαπαρχητή το PBLG έγινε σε THF και ήταν ομογενής. Οι μικρές μετατοπίσεις στο SEC οφείλονται στο μικρό μοριακό βάρος του κλάδου της PBHyLP (εικόνα 28), ενώ τα αποτελέσματα είναι τα αναμενόμενα από την

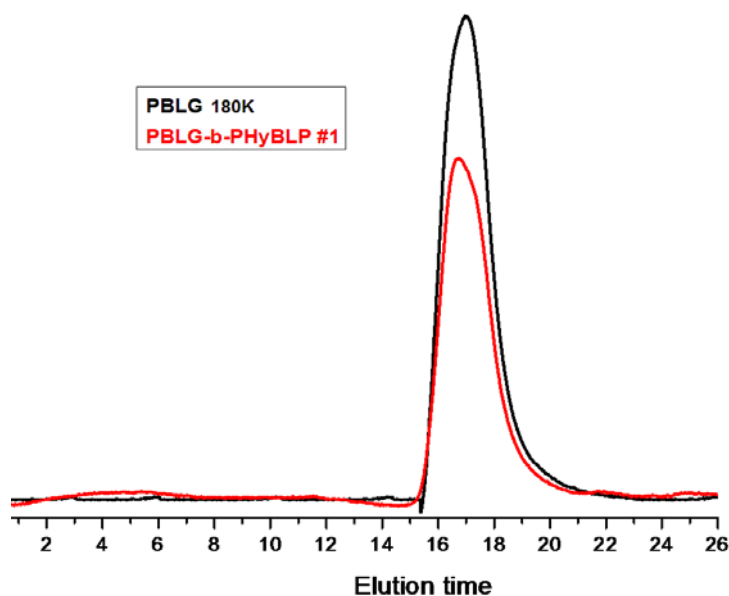
στοιχειομετρία. Παρόλο που το μοριακό βάρος της PBHyLP είναι μικρό στα συμπολυτεπτιδία αυτά (Πίνακας 10), υπήρχαν σημαντικές διαφοροποιήσεις όσον αφορά την αυτοοργάνωση σε στερεά φάση και έδειξε διαμόρφωση zig-zag, κάτι που αναφέρεται για πρώτη φορά στην περίπτωση rod-rod συμπολυτεπτιδίων [έχει αναφερθεί για την περίπτωση rod-coil<sup>149</sup>, όπου rod: πολυ(ισοκυανικός εξυλεστέρας)<sup>165</sup>].

**Πίνακας 10.** Μοριακά χαρακτηριστικά γραμμικών συμπολυτεπτιδίων που παρασκευάστηκαν.

Δείγμα	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$M_w/M_n$	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$M_w/M_n$
PBLG- <i>b</i> -PBHyLP #0	200,0	1,18	202,4	1,23
PBLG- <i>b</i> -PBHyLP #1	180,2	1,14	187,1	1,22
PBLG- <i>b</i> -PBHyLP #2	180,2	1,14	192,0	1,25

<sup>a</sup> SEC σε DMF (0.1M LiBr) στους 65°C με βάση το UV του αρχικού μακροαπαρητητή PBLG.

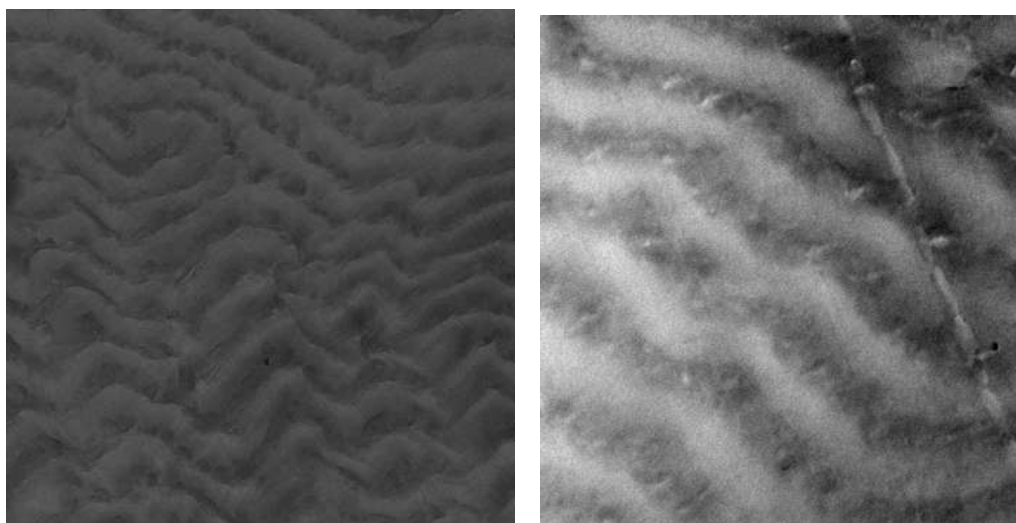
<sup>b</sup> SEC σε DMF (0.1M LiBr) στους 65°C με βάση το UV του τελικού συμπολυτεπτιδίου.



**Εικόνα 28:** GPC χρωματογράφημα του PBLG-*b*-PBHyLP 200K σε DMF.

## **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

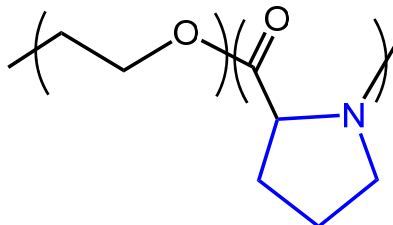
Στο πολυμερές αυτό, του οποίου η σύνθεση αναφέρθηκε για πρώτη φορά, εξετάσαμε την αυτοοργάνωση του σε στερεά κατάσταση, σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας (WAXS), αλλά και σε επίπεδο ευρύτερης οργάνωσης (TEM). Χαρακτηρισμός σε στερεά φάση (έπειτα από διάλυση σε THF ή  $\text{CHCl}_3$  και πολύ αργή εκδίωξη του διαλύτη), έδειξε αυτοοργάνωση σε zig-zag φυλλοειδείς διαμορφώσεις (lamelles) με πάχος  $>200$  nm (για τα δείγματα PBLG-*b*-PBHyLP #1 και #2, εικόνα 29), κάτι που το SAXS δεν μπορεί να ανιχνεύσει λόγω ελλείψεως κατάλληλου ανιχνευτή για τόσο μεγάλες περιοδικότητες. Είναι επίσης αξιοσημείωτο, ότι και μέσα στις περιοδικές lamelles υπάρχει οργάνωση.



**Εικόνα 29: TEM του συμπολυπεπτιδίου PBLG-*b*-PBHyLP#2.**

## 4.8 Γραμμικά κατά συστάδες υβριδικά πολυπεπτίδια τυχαίου σπειράματος / έλικας, PEO-*b*-PLP & PLP-*b*-PEO-*b*-PLP

### 4.8.1 Πολυ(αιθυλενοξειδίο)-*b*-Πολυ(L-προλίνη) (PEO-*b*-PLP)



Ο πολυμερισμός της πολυ(L-προλίνης) είναι και εδώ ετερογενής. Η σύσταση και τα μοριακά βάρη είναι κοντά στα υπολογιζόμενα από την στοιχειομετρία. Καταφέραμε να πάρουμε υψηλά μοριακά βάρη PLP σε σχέση με το ομοπολυμερή (Πίνακας 11), κάτι το οποίο είδαμε και στην περίπτωση των συμπολυπεπτιδίων. Για να λάβουμε την μορφή II, προσθέσαμε νερό όπου με ανάδευση, το αρχικό θόλωμα έγινε διαυγές μετά από μια μέρα (εικόνα 30-31)

Πίνακας 11: Μοριακά χαρακτηριστικά γραμμικών κατά συστάδες υβριδικών πολυπεπτιδίων τυχαίου σπειράματος / έλικα που παρασκευάστηκαν.

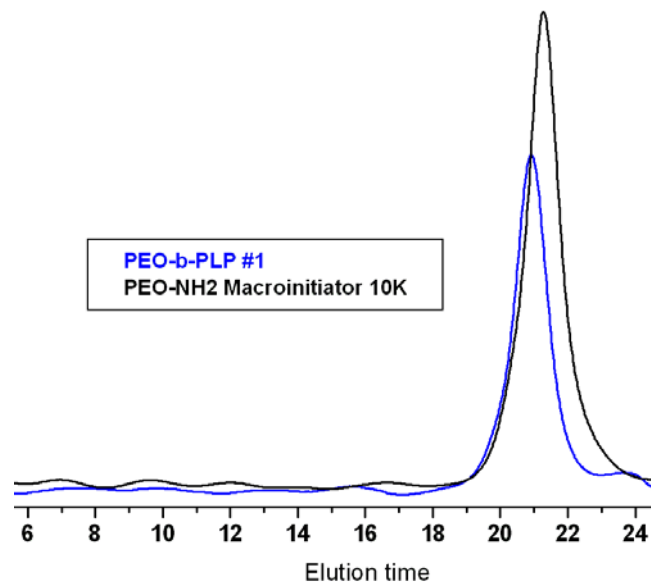
Δείγμα	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$M_w/M_n$	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$M_w/M_n$	% PLP <sup>c</sup>
PEO- <i>b</i> -PLP #1	9,2	1,12	36,8	1,10	75
PEO- <i>b</i> -PLP #2	17,3	1,13	34,6	1,21	50
PLP- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLP #1	8,5	1,12	12,5	1,09	32
PLP- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLP #2	8,5	1,12	14,9	1,10	43
PLP- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLP #3	8,5	1,12	20,0	1,44	58

<sup>a</sup> SEC σε (0.1 M NaNO<sub>3</sub>) νερό / ACN 80:20 στους 35°C των μακροαπαρχητών PEO-NH<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>N-PEO-NH<sub>2</sub> με βάση το dn/dc.

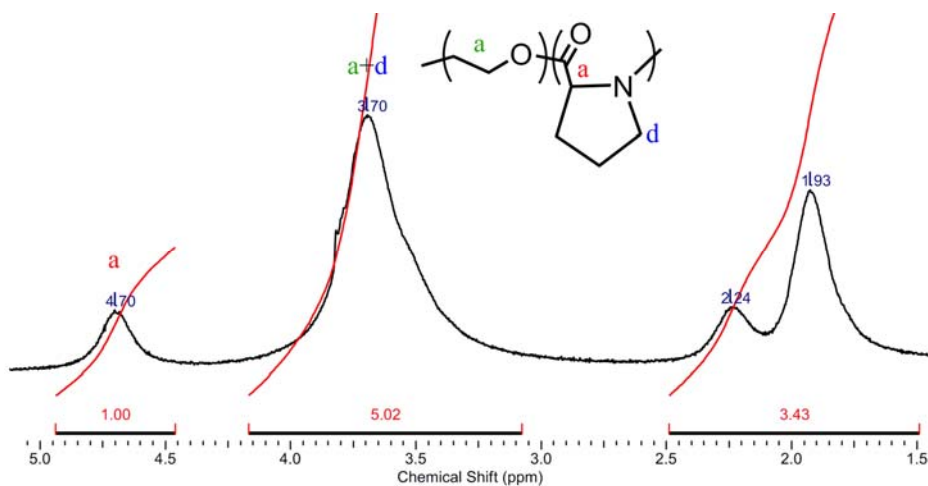
<sup>b</sup> SEC σε (0.1 M NaNO<sub>3</sub>) νερό / ACN 80:20 στους 35°C του τελικού πολυμερούς.

<sup>c</sup> Σύσταση κατά βάρος από <sup>1</sup>H-NMR σε CF<sub>3</sub>COOD.



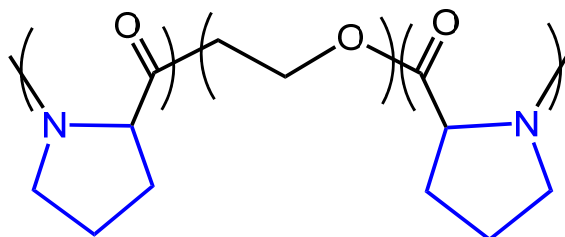


Εικόνα 30: GPC χρωματογράφημα του PEO-*b*-PLP 20K σε νερό.

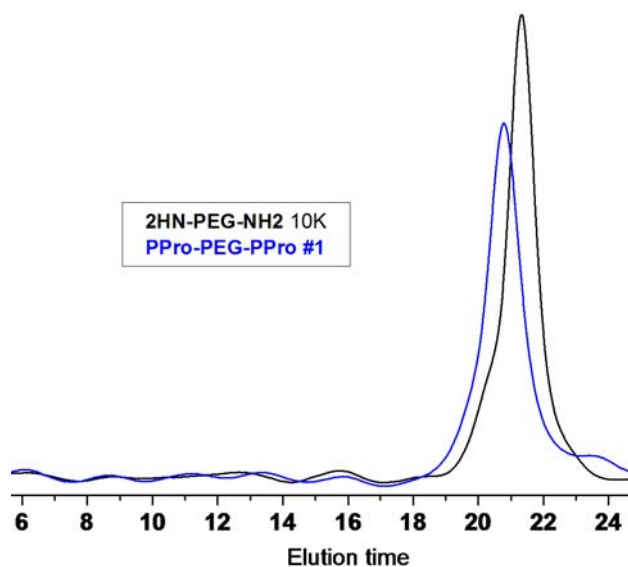


Εικόνα 31: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του PEO-*b*-PLP #1 σε d-TFA.

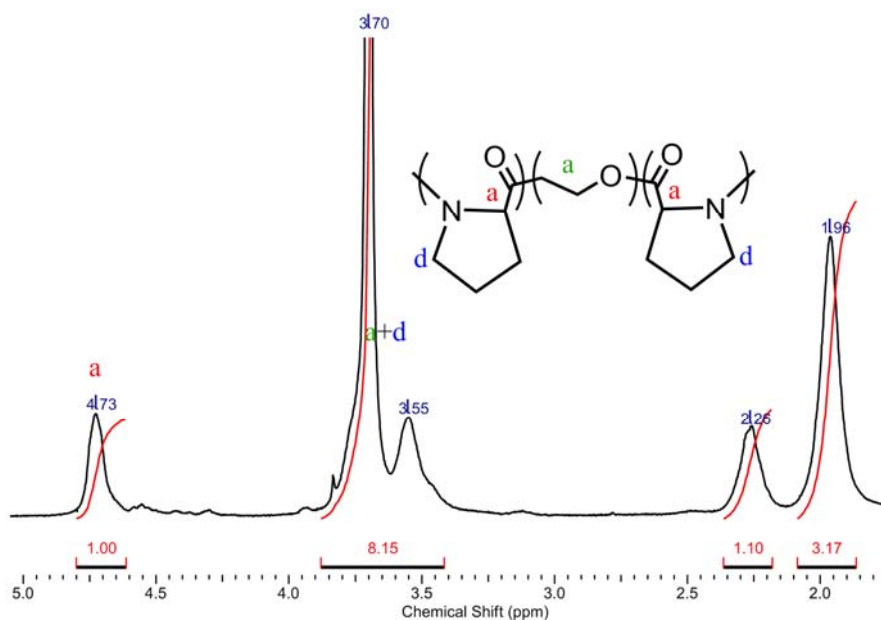
#### 4.8.2 Πολυ(L-προλίνη)-*b*-Πολυ(αιθυλενοξειδίο)-*b*-Πολυ(L-προλίνη) (PLP-*b*-PEO-*b*-PLP)



Ο πολυμερισμός της πολυ(L-προλίνης) είναι ετερογενής. Σε αυτό το πολυμερές, το τυχαίο σπείραμα (PEO) είναι αγκυροβολημένο ανάμεσα στους δυο άκαμπτες πυρρολιδινικές συστάδες. Τα μοριακά βάρη της PLP που πήραμε είναι μικρότερα σε σχέση με το PEO-*b*-PLP (Πίνακας 12). Για να λάβουμε την μορφή II, προσθέσαμε νερό όπου με ανάδευση, το αρχικό θόλωμα έγινε διαυγές μετά από μια μέρα (εικόνα 32-33).



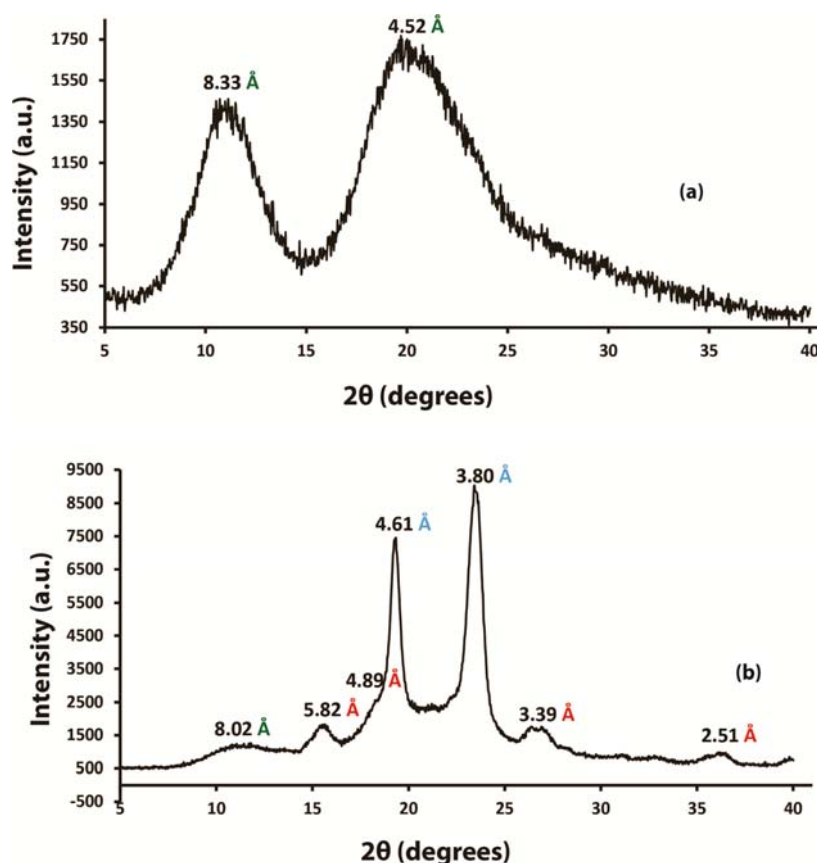
Εικόνα 32: GPC χρωματογράφημα του PLP-*b*-PEO-*b*-PLP 12,5K σε νερό.



Εικόνα 33: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του PLP-*b*-PEO-*b*-PLP #1 σε d-TFA.

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

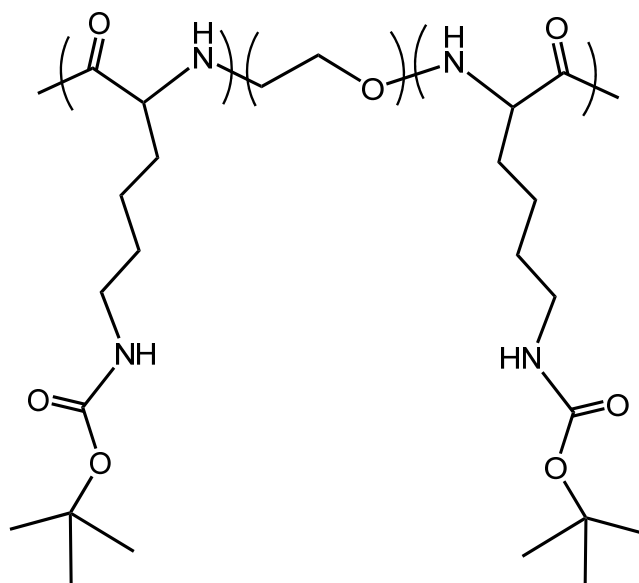
Οι δυο τύποι υβριδικών γραμμικών πολυπεπτιδίων εξεταστήκαν σε στερεά κατάσταση ως προς την αυτοοργάνωση τους σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας (XRD) και έδειξαν τελείως διαφορετική συμπεριφορά. Τα PEO-*b*-PLP #1 και PLP-*b*-PEO-*b*-PLP #1, με παρόμοιο μοριακό βάρος PEO ~10K, έδειξαν μετά από τον πολυμερισμό σε ακετονιτρίλιο, ανάμειξη το μεν πρώτο [εικόνα 34(a)] με το PEO και υιοθέτηση της μορφής PLP I, ενώ το δεύτερο, έδειξε υιοθέτηση κυρίως της μορφής PLP II, παράλληλα με την υψηλή κρυστάλλωση του PEO [εικόνα 34(b)]. Επειδή στο PEO-*b*-PLP #1, το μοριακό βάρος της PLP είναι μεγαλύτερο σε σχέση με το τρισυσταδικό, σίγουρα το μοριακό βάρος άλλα και η αρχιτεκτονική, φαίνεται να έχουν ενεργό ρόλο στην κρυστάλλωση του PEO και στο πακετάρισμα της PLP. Τα πολυμερή αυτά εξετάζονται επίσης για την αντοχή τους και για μηχανικές ιδιότητες



Εικόνα 34: Φάσμα XRD του (a) PEO-*b*-PLP, με ανάμειξη των δυο συστατικών και υιοθέτηση μιας καθαρής μορφής I και (b) PLP-*b*-PEO-*b*-PLP, όπου είναι εμφανής η κρυσταλλικότητα του πολυ(αιθυλενοξειδίου), ενώ η πολυ(L-προλίνη) βρίσκεται κυρίως στην μορφή II.

## 4.9 Γραμμικά τρισυσταδικά υβριδικά συμπολυτεπτιδία α-έλικα / τυχαίο σπείραμα / α-έλικα, *PBocLL-b-PEO-b-PBocLL* & *PBLG-b-PEO-b-PBLG*

### 4.9.1 Πολυ(ε-βουτυλοξυ-καρβονυλο-L-λυσίνη)-*b*-Πολυ(αιθυλενοξειδίο)-*b*-Πολυ(ε-βουτυλοξυ-καρβονυλο-L-λυσίνη) (*PBocLL-b-PEO-b-PBocLL*)



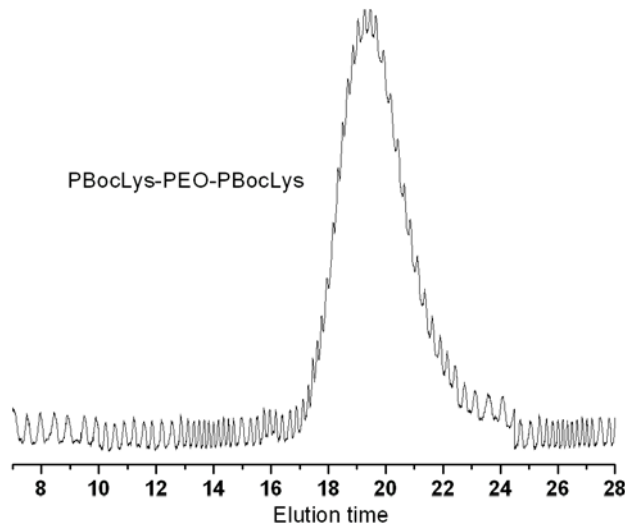
Ο πολυμερισμός του ανυδρίτη της *Boc*-(L)-λυσίνης έγινε σε DMF με μακροαπαρχητή το  $H_2N$ -PEO- $NH_2$  και τα τελικά πολυμερή (εικόνα 35) ήταν σε καλή συμφωνία με την στοιχειομετρία. Τα μοριακά χαρακτηριστικά φαίνονται στον Πίνακα 12. Στη συνέχεια ακολούθησε αποπροστασία για να πάρουμε το υδατοδιαλυτό υβριδικό πολυτεπτιδίο (εικόνα 36) .

**Πίνακας 12:** Μοριακά χαρακτηριστικά γραμμικών κατά συστάδες υβριδικών πολυτεπτιδίων έλικας / τυχαίου σπειράματος / έλικας που παρασκευάστηκαν.

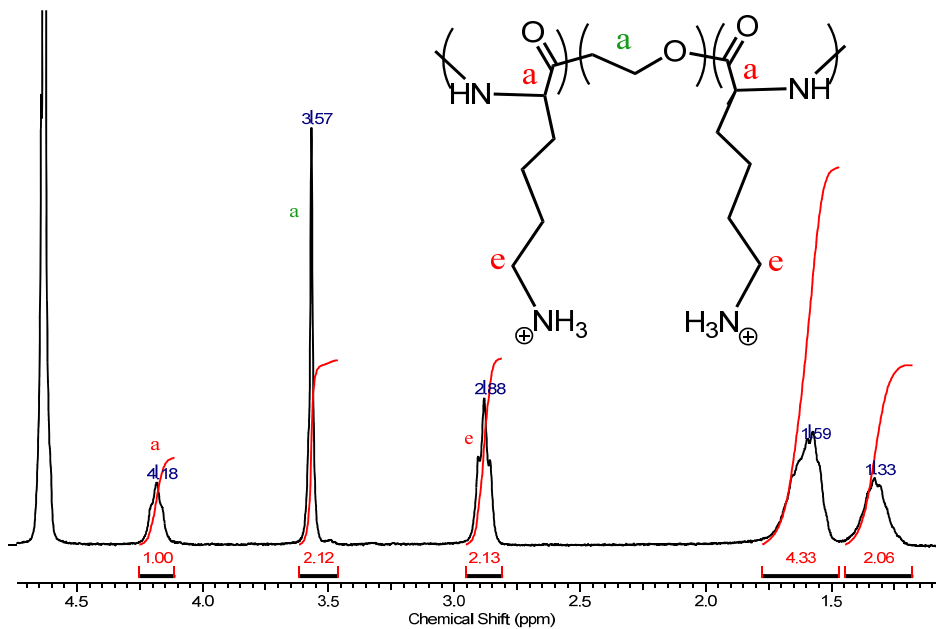
Δείγμα	$M_n \times 10^{-3}$ ( $g \cdot mole^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$M_w / M_n$	$M_n \times 10^{-3}$ ( $g \cdot mole^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$M_w / M_n$
<i>PBocLL-b-PEO-b-PBocLL</i> #1	2,3	1,10	13,1	1,34
<i>PBocLL-b-PEO-b-PBocLL</i> #2	2,3	1,10	16,4	1,46
<i>PBocLL-b-PEO-b-PBocLL</i> #3	2,3	1,10	26,0	1,33
<i>PBocLL-b-PEO-b-PBocLL</i> #4	3,0	1,12	28,3	1,24

<sup>a</sup> SEC σε (0.1 M LiBr) DMF στους 65°C του μακροαπαρχητή  $H_2N$ -PEO- $NH_2$ .

<sup>b</sup> SEC σε (0.1 M LiBr) DMF στους 65°C του τελικού πολυμερούς.



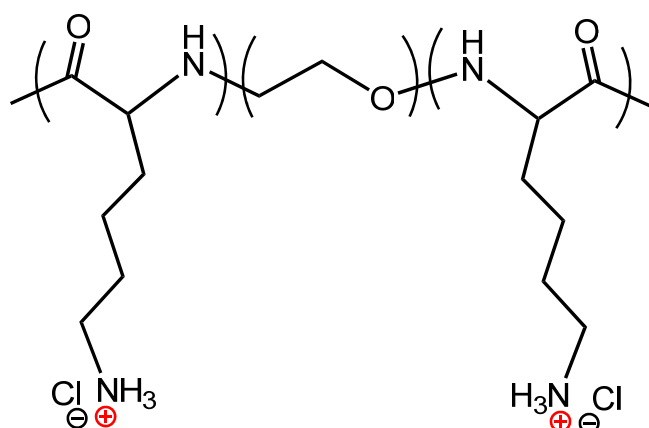
Εικόνα 35: GPC χρωματογράφημα του PBocLL-*b*-PEO-*b*-PBocLL 25K σε DMF.



Εικόνα 36: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του PLL-*b*-PEO-*b*-PLL #1 σε  $\text{D}_2\text{O}$ .

**ΑΠΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ:** Για να πάρουμε το υδατοδιαλυτό πολυμερές, αντιδράσαμε το PBocLL-*b*-PEO-*b*-PBocLL με TFA. Το πολυμερές διαλύθηκε αρχικά σε  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και αφέθηκε υπό ανάδευση παρουσία οξέως για 2 ώρες. Η περίσσεια TFA αποστάζεται στην γραμμή κενού και το εναπομείνων, διαλύεται σε δισαππεσταγμένο νερό (ένδειξη ότι έγινε η αποπροστασία) και μεταφέρεται στη μεμβράνη για να καθαριστεί. Η διαδικασία της διαπίδυσης (dialysis) διαρκεί 7

μέρες και το διασπασταγμένο νερό αλλάζεται κάθε μέρα με προσθήκη σε αυτό, 4 σταγόνων πυκνού HCl, έτσι ώστε το pH=4 (Πίνακας 13).



Πίνακας 13: Μοριακά χαρακτηριστικά γραμμικών κατά συστάδες υβριδικών πολυπεπτιδίων έλικας / τυχαίου σπειράματος / έλικας που παρασκευάστηκαν.

Δείγμα	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	% PLL <sup>d</sup>
PLL- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLL #1	2,3	6,1	8,3	59
PLL- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLL #2	2,3	8,0	10,3	78
PLL- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLL #3	2,3	13,4	15,6	85
PLL- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLL #4	3,0	14,3	17,3	83

<sup>a</sup> SEC σε (0.1 M LiBr) DMF στους 65°C του μακροαπαρχητή H<sub>2</sub>N-PEO-NH<sub>2</sub>.

<sup>b</sup> Μοριακό βάρος της PLL με αφαίρεση από το τελικό μοριακό βάρος.

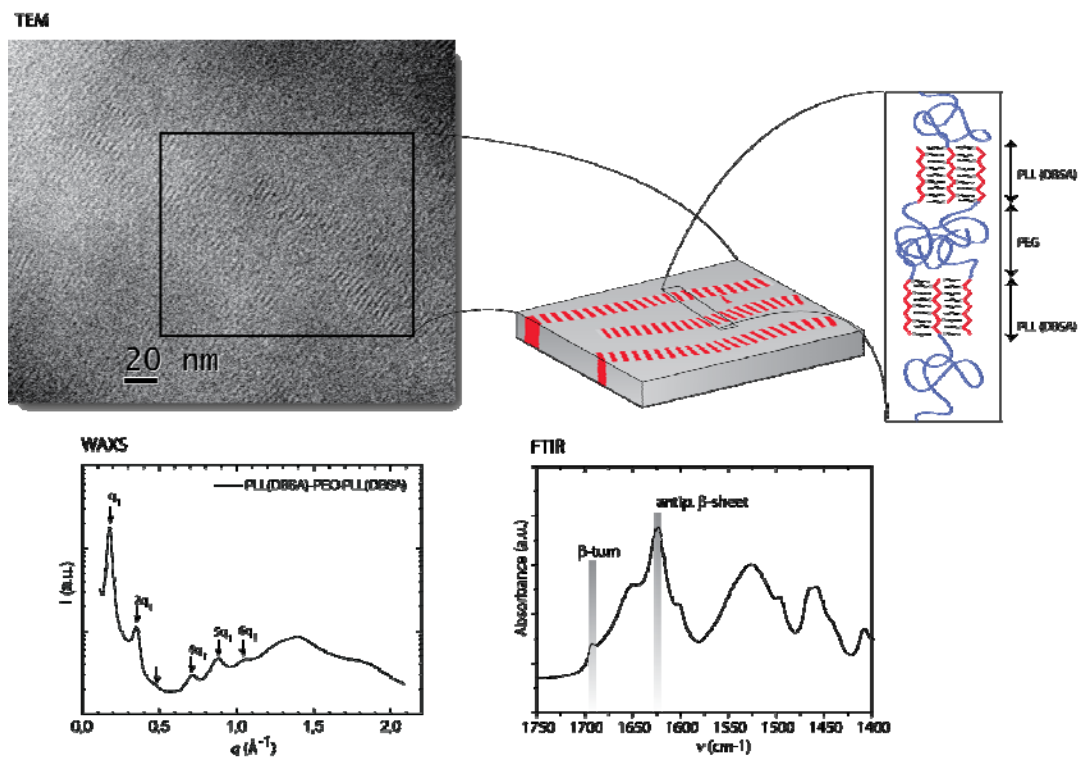
<sup>c</sup> SEC του τελικού συμπολυμερούς έπειτα από αναγωγή σε PLL.

<sup>d</sup> Σύσταση κατά βάρος από <sup>1</sup>H-NMR σε D<sub>2</sub>O.

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

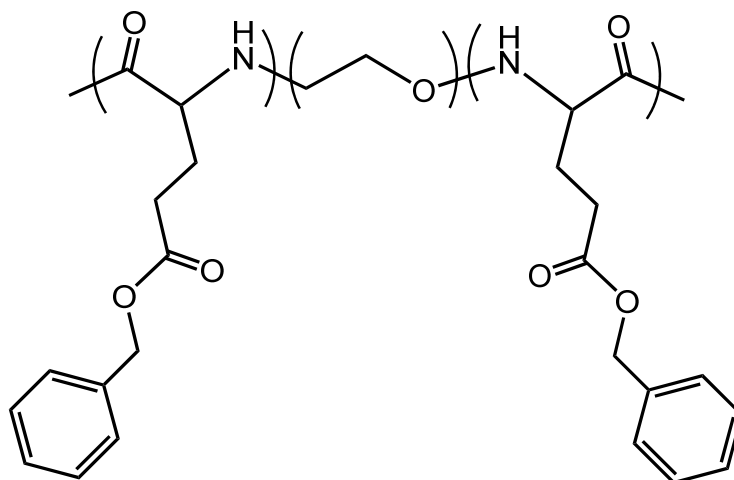
Στα πολυμερή αυτά, εξετάσαμε την αυτοοργάνωση τους σε στερεά κατάσταση, τόσο σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας (WAXS) όσο και σε οργάνωση μεγάλης κλίμακας (SAXS). Επίσης, εξετάστηκε η σύμπλεξη με **DBSA** και ελέγξαμε εκ νέου την αυτοοργάνωση (εικόνα 37). Η σύμπλεξη γίνεται σε νερό στοιχειομετρικά με βάση τα moles. Η επιφανειοδραστική ουσία διαλυμένη σε νερό (βρίσκεται στην μορφή μικκυλίων), ρίχνεται στάγδην στο υδατοδιαλυτό

πολυμερές, με πολύ χαρακτηριστικό θόλωμα αρχικά και έπειτα καταβύθιση, λόγω της αποφόρτισης των πλευρικών, θετικά φορτισμένων λυσινών. Όπως φαίνεται από τις αυξημένες κορυφές στο φάσμα WAXS, τα υβριδικά αυτά πολυπεπτίδια πακετάρονται πολύ καλά και με μεγάλη οργάνωση μετά τη σύμπλεξη, ενώ η PLL υιοθετεί διαμόρφωση αντιπαράλληλων β-φύλλων. Τα συμπλεγμένα υβριδικά πολυπεπτίδια ελέγχονται περαιτέρω ως προς την αντοχή και τις μηχανικές τους ιδιότητες ως **MIMΗΤΕΣ ΜΕΤΑΞΙΟΥ**.



Εικόνα 37: TEM του συμπολυπεπτιδίου PLL-*b*-PEO-*b*-PLL μετά από σύμπλεξη με DBSA.

#### 4.9.2 Πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικός εστέρας)-b-Πολυ(αιθυλενοξειδίο)-b-Πολυ-(γ-βενζυλο-L-γλουταμικός εστέρας) (PBLG-b-PEO-b-PBLG)



Ο πολυμερισμός του ανυδρίτη του γ-βενζυλο-(L)-γλουταμικού εστέρα έγινε σε DMF με μακροαπαρχητή τα H<sub>2</sub>N-PEO-NH<sub>2</sub> και PNVP-NH<sub>2</sub> και τα τελικά πολυμερή (εικόνα 38) ήταν σε καλή συμφωνία με την στοιχειομετρία. Τα μοριακά χαρακτηριστικά φαίνονται στον Πίνακα 14. Στην συνέχεια ακολούθησε αποπροστασία για να πάρουμε το υδατοδιαλυτό υβριδικό πολυπεπτιδίο. Από τα φάσματα NMR βλέπουμε ότι εξαφανίζονται οι κορυφές στα 7 και στα 5 ppm που αντιστοιχούν στα βενζυλικά υδρογόνα και στα -CH<sub>2</sub> της προστασίας (εικόνες 39-40).

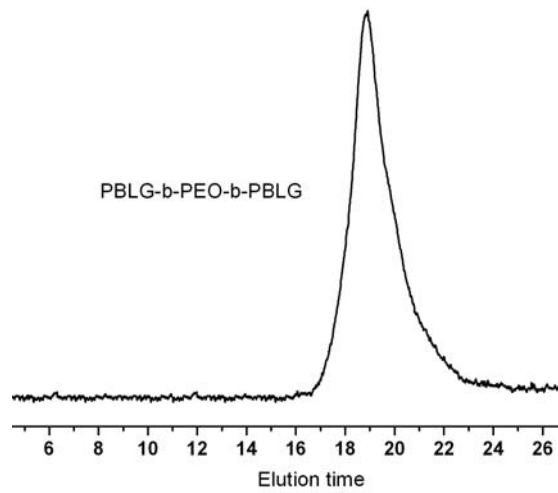
**Πίνακας 14:** Μοριακά χαρακτηριστικά γραμμικών κατά συστάδες υβριδικών πολυπεπτιδίων έλικας / τυχαίου σπειράματος / έλικας που παρασκευάστηκαν.

Δείγμα	M <sub>n</sub> × 10 <sup>-3</sup> (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	M <sub>w</sub> / M <sub>n</sub>	M <sub>n</sub> × 10 <sup>-3</sup> (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	M <sub>w</sub> / M <sub>n</sub>
PBLG	42,0	1,12	-	-
PBLG	230,2	1,22	-	-
PNVP- <i>b</i> -PBLG	94,5	1,12	105,0	1,09
PBLG- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PBLG	6,0	1,12	75,5	1,28
PBLG- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PBLG	10,0	1,10	37,0	1,19
PBLG- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PBLG	10,0	1,10	194,0	1,23

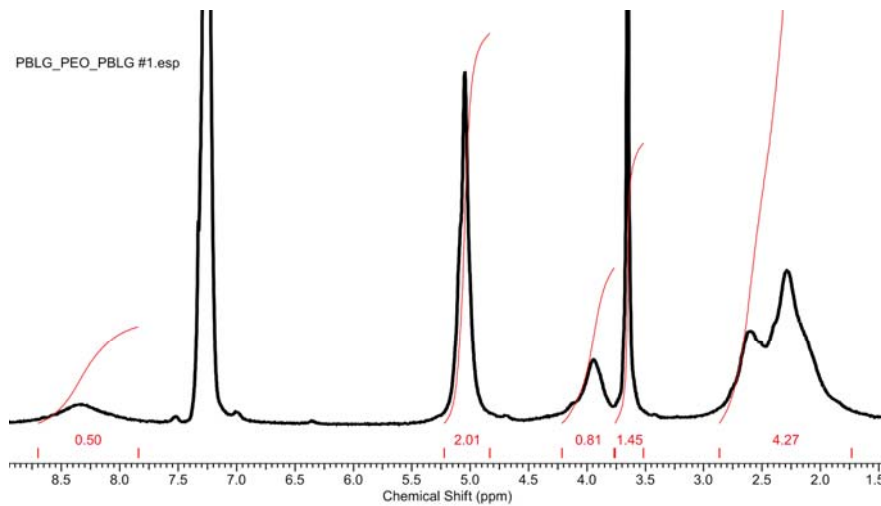
<sup>a</sup> SEC σε (0.1 M LiBr) DMF στους 65°C του PBLG και των μακροαπαρχητών PNVP-NH<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>N-PEO-NH<sub>2</sub>.

<sup>b</sup> SEC σε (0.1 M LiBr) DMF στους 65°C του τελικού πολυμερούς.

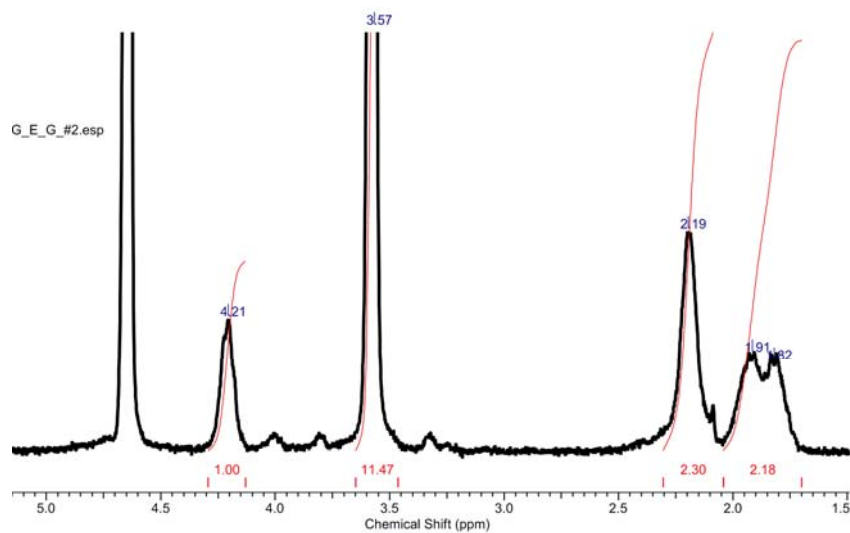




Εικόνα 38: GPC χρωματογράφημα PBLG-*b*-PEO-*b*-PBLG 130K σε DMF.

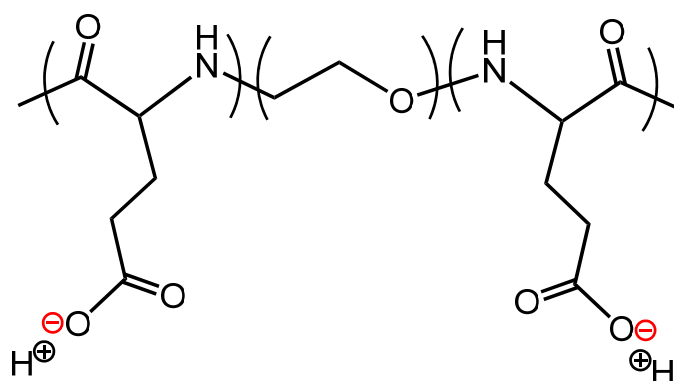


Εικόνα 39: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  PBLG-*b*-PEO-*b*-PBLG #1 σε  $\text{CDCl}_3$ .



Εικόνα 40: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  PLGA-*b*-PEO-*b*-PLGA #2 σε  $\text{D}_2\text{O}$ .

**ΑΠΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ:** Για να πάρουμε το υδατοδιαλυτό υβριδικό πολυπεπτίδιο, αντιδράσαμε το PBLG-*b*-PEO-*b*-PBLG (διαλυμένο σε DMF) με LiOH (διαλυμένο στην ελάχιστη ποσότητα μεθανόλης) στάγδην και υπό ελαφρά θέρμανση. Το DMF αποστάζεται στην γραμμή κενού και το εναπομείνων, διαλύεται σε δισαπτεσταγμένο νερό και μεταφέρεται στην μεμβράνη για να καθαριστεί με dialysis. Εξωτερικά της μεμβράνης βάζουμε δισαπτεσταγμένο νερό με 4 σταγόνες πυκνού HCl, έτσι ώστε το pH=4. Αυτό γιατί πρέπει να αντικατασταθούν τα ιόντα Li<sup>+</sup> με H<sup>+</sup>, διότι θα χρησιμοποιηθούν για σύμπλεξη με Ca<sup>2+</sup> (Πίνακας 15)



Πίνακας 15: Μοριακά χαρακτηριστικά γραμμικών υβριδικών πολυπεπτιδίων γλουταμικού οξέως.

Δείγμα	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>
PLGA	25,0	-	-
PLGA	135,7	-	-
PNVP- <i>b</i> -PLGA	94,5	100,7	6,2
PLGA- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLGA	10,0	26,0	16,0
PLGA- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLGA	6,0	47,0	41,0
PLGA- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PLGA	10,0	118,6	108,6

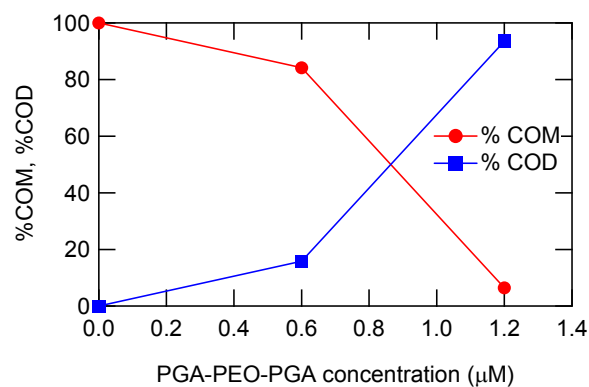
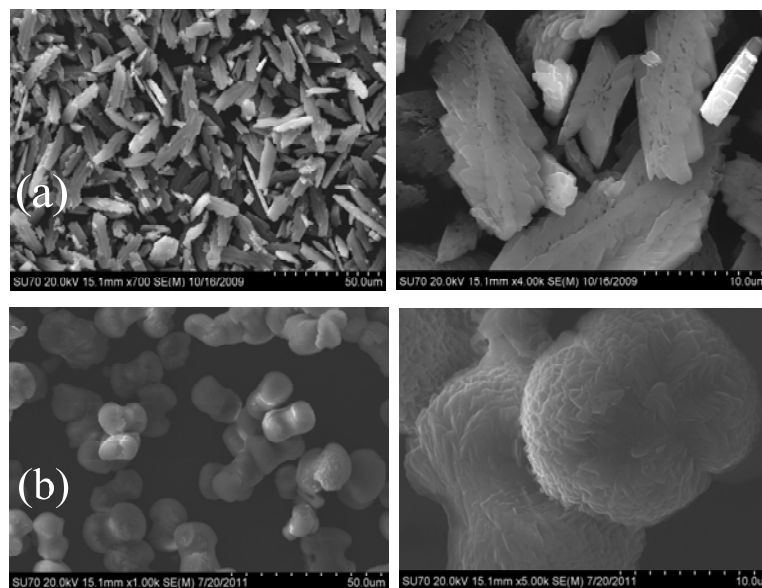
<sup>a</sup> SEC σε (0.1 M LiBr) DMF στους 65°C των μακροαπαρχητών PNVP-NH<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>N-PEO-NH<sub>2</sub>.

<sup>b</sup> Μοριακό βάρος του PLGA με αφαίρεση από το τελικό μοριακό βάρος.

<sup>c</sup> SEC του τελικού συμπολυμερούς έπειτα από αναγωγή σε PLGA.

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

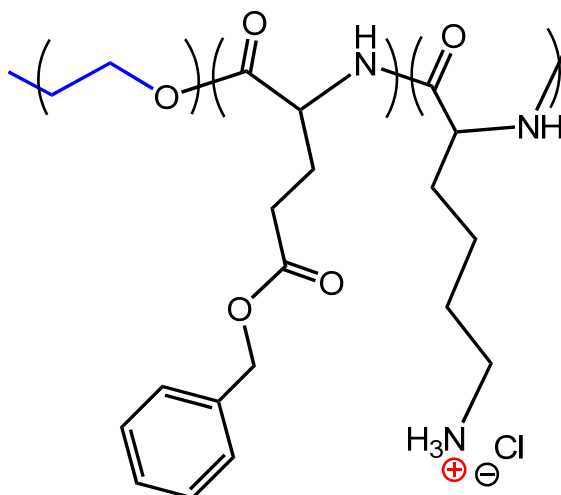
Στην σειρά αυτή πολυμερών με βασικό συστατικό το PLGA, εξετάσαμε κατά πόσο επηρεάζει την κρυστάλλωση του οξαλικού ασβεστίου, η παρουσία αρνητικά φορτισμένων πολυεπεπτιδίων. Το αλάτι αυτό κρυσταλλώνει σε 3 μορφές (ανάλογα με την ποσότητα του προσροφημένου νερού), η σταθερότερη εκ των οποίων (η αγκαθωτή, COM) οδηγεί σε **ΠΕΤΡΑ ΣΤΑ ΝΕΦΡΑ**. Η ιδέα ήταν να οδηγήσουμε την κρυστάλλωση σε μια από τις άλλες μορφές, κάτι που πειραματικά, έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα (εικόνα 41).



Εικόνα 41: SEM που δείχνουν (a) την μορφή  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  που προκαλεί πέτρα στα νεφρά; (b) την αλλαγή που επιφέρει το PLGA-*b*-PEO-*b*-PLGA στην μορφή  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  μετά από σύμπλεξη με  $\text{Ca}^{2+}$ , [PGA-PEO-PGA]: 0,6 μM [CaOx]: 1 mM; (c) σχεδιάγραμμα που δείχνει αλλαγή κρυσταλλικότητας ανάλογα με την [PLGA-*b*-PEO-*b*-PLGA].

#### 4.10 Γραμμικά τρισυσταδικά υβριδικά συμπολυπεπτίδια τύπου τυχαίο σπείραμα / α-έλικα / α-έλικα

##### Πολυ(αιθυλενοξείδιο)-*b*-Πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικός εστέρας)-*b*-Πολυ(L-λυσίνη) (PEO-*b*-PBLG-*b*-PLL)



Αρχικά συνθέσαμε τον μακροαπαρχητή PEO-*b*-PBLG από εμπορικά διαθέσιμο PEO-NH<sub>2</sub> και έπειτα το τρισυσταδικό συμπολυμερές PEO-*b*-PBLG-*b*-PBocLL, στο οποίο κάναμε αποπροστασία με TFA, για να πάρουμε τελικά το υδατοδιαλυτό PEO-*b*-PBLG-*b*-PLL (εικόνα 42, Πίνακας 16). Από μετρήσεις Z-δυναμικού στο κυστίδιο, βρέθηκε ότι στην εξωτερική στοιβάδα που βλέπει το νερό, βρίσκεται το πολυ(αιθυλενοξείδιο).

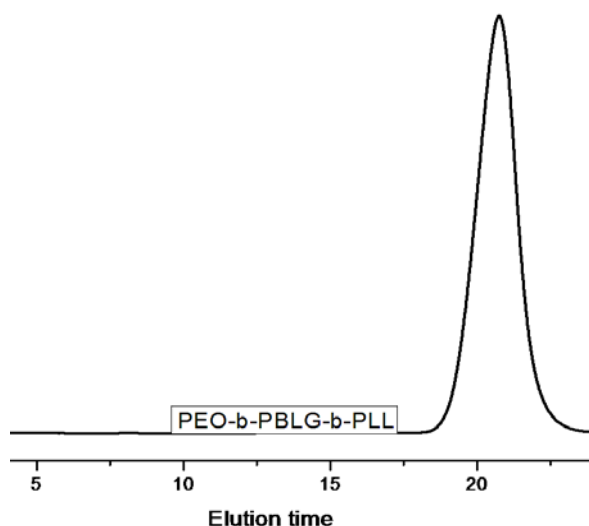
Πίνακας 16: Μοριακά χαρακτηριστικά γραμμικών κατά συστάδες υβριδικών πολυπεπτιδίων τυχαίου σπειράματος / έλικας / έλικας που παρασκευάστηκαν.

Δείγμα	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> )	$M_w/M_n$	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> )	$M_w/M_n$
PEO- <i>b</i> -PBLG	8,5 <sup>a</sup>	1,12	14,5 <sup>b</sup>	1,21
PEO- <i>b</i> -PBLG- <i>b</i> -PLL	-	-	21,5 <sup>c</sup>	1,15

<sup>a</sup> SEC σε (0.1 M LiBr) DMF στους 65°C του μακροαπαρχητή PEO-NH<sub>2</sub>.

<sup>b</sup> SEC σε (0.1 M LiBr) DMF στους 65°C.

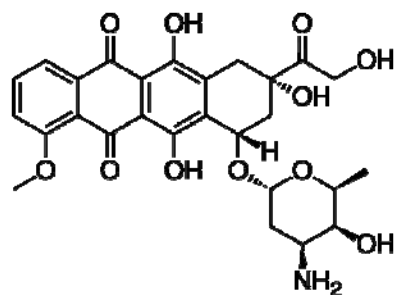
<sup>c</sup> SEC του τελικού συμπολυμερούς σε (0.1 M LiBr) DMF στους 65°C και αναγωγή σε PLL.



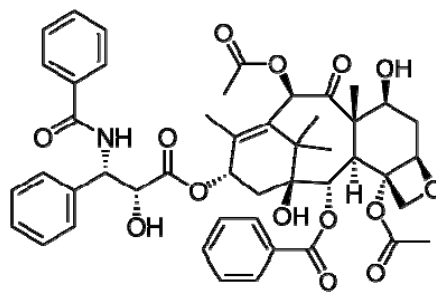
Εικόνα 42: GPC χρωματογράφημα του πολυμερούς PEO-*b*-PBLG-*b*-PLL 20K σε νερό.

### **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

Στο υβριδικό αυτό υδατοδιαλυτό πολυπεπτίδιο, εξετάσαμε τον εγκλωβισμό αντικαρκινικών φαρμάκων (σχήμα 59) στο μικκύλιο-πολυμερικό φορέα, όπως δοξορουβικίνη (υδατοδιαλυτή ανάλογα με το pH) και ταξόλη (υδρόφοβη). Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι ο πολυμερικός φορέας δεν εμφανίζει τοξικότητα, ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αφού σπάσαμε τα κυστίδια που είχαν εγκλωβίσει τα φάρμακα με DMSO, διαπιστώσαμε φτιάχνοντας πρότυπα διαλύματα δοξορουβικίνης (UV) και ταξόλης (SEC σε CHCl<sub>3</sub>), ότι το φάρμακο εγκλωβίζεται σε ποσοστό της τάξεως του 90%. Ήδη διενεργούνται μελέτες των εγκλωβισμένων αντικαρκινικών φαρμάκων στον μη τοξικό πολυμερικό φορέα, σε ποντίκια.



Δοξορουβικίνη (Adriamycin)

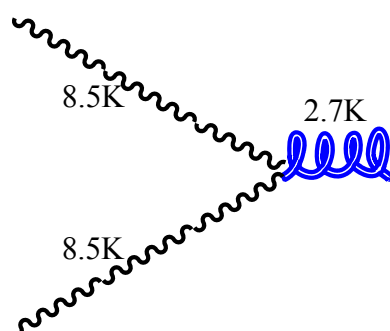


Ταξόλη (Paclitaxel)

Σχήμα 59: Χημική δομή των αντικαρκινικών φαρμάκων δοξορουβικίνης και ταξόλης που εγκλωβίστηκαν μέσω μικκυλίωσης στον μη τοξικό πολυμερικό φορέα PEO-*b*-PBLG-*b*-PLL. Διενεργούνται ήδη μελέτες σε ποντίκια.

#### 4.11 Αστεροειδή υβριδικά πολυπεπτίδια

##### Πολυ(στυρένιο)<sub>2</sub> – Πολυ(L-προλίνη) (PS<sub>2</sub>PLP)



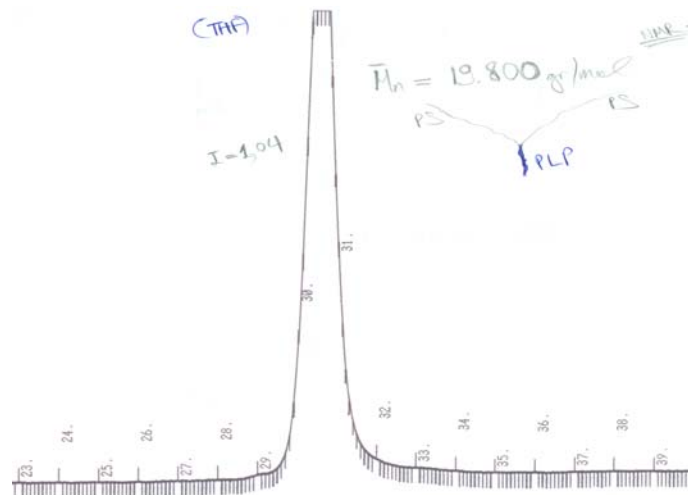
Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου του ανυδρίτη της (L)-προλίνης με μακροαπαρχητή το παρασκευασμένο από ανιοντικό πολυμερισμό, PS<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, έγινε σε THF και ήταν ομογενής (εικόνα 43, Πίνακας 17). Το γράφημα SAXS του πολυμερούς PS<sub>2</sub>PLP σε στερεά φάση δείχνει μακροφασικό διαχωρισμό με περιοδικότητα ~13 nm (εικόνα 44), ενώ το γράφημα WAXS (εικόνα 45), δείχνει καθαρά την ύπαρξη της υψηλής κρυσταλλικότητας μορφής PLP II στο συμπολυμερές (5.65, 4.79 και 3.49 Å), μαζί με την χαμηλότερης κρυσταλλικότητας μορφή I (8.55 και 4.74 Å).

Πίνακας 17: Μοριακά χαρακτηριστικά του υβριδικού αστεριού PS<sub>2</sub>-PLP.

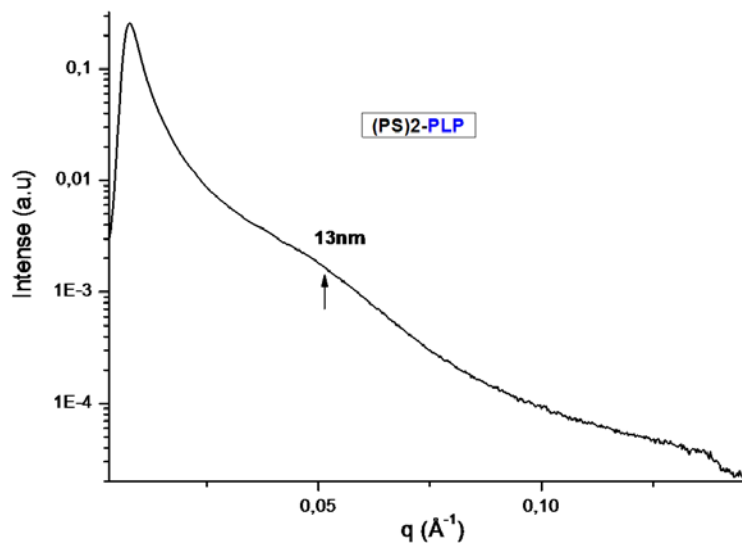
Δείγμα	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$M_w/M_n$ <sup>b</sup>	$M_n \times 10^{-3}$ (g · mole <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$M_w / M_n$
PS <sub>2</sub> -PLP	17.1	1,02	19,8	1,04

<sup>a</sup> SEC σε CHCl<sub>3</sub> στους 65°C του μακροαπαρχητή PS<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

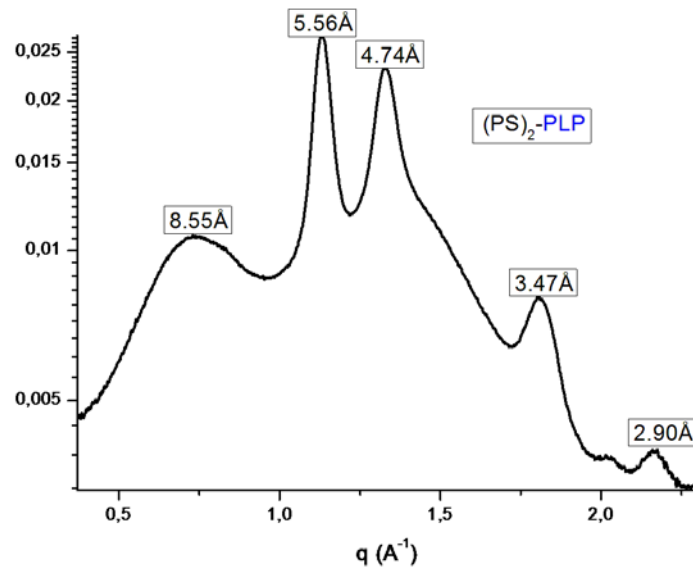
<sup>b</sup> SEC σε CHCl<sub>3</sub> του τελικού πολυμερούς.



Εικόνα 43: GPC χρωματογράφημα του πολυμερούς PS<sub>2</sub>PLP 19K σε DMF.



Εικόνα 44: Γράφημα SAXS σε στερεά φάση του πολυμερούς PS<sub>2</sub>PLP που δείχνει μακροφασικό διαχωρισμό με περιοδικότητα 13 nm



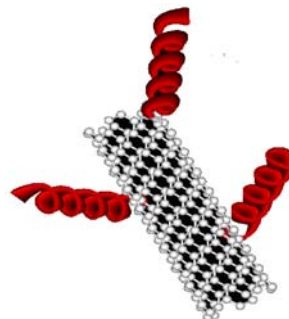
Εικόνα 45: Γράφημα WAXS σε στερεά φάση του πολυμερούς  $PS_2PLP$  που δείχνει καθαρά κυρίως την ύπαρξη της υψηλής κρυσταλλικότητας μορφής PLP II στο συμπολυμερές μαζί με PLP I.

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Στο υβριδικό αυτό αστεροειδές πολυπεπτιδίδιο, εξετάζουμε την επίδραση της αρχιτεκτονικής της PLP, στην αυτοοργάνωση του συμπολυμερούς.

### 4.12 Παρασκευή ομοπολυπεπτιδίων πάνω σε Νανοσωλήνες άνθρακα.

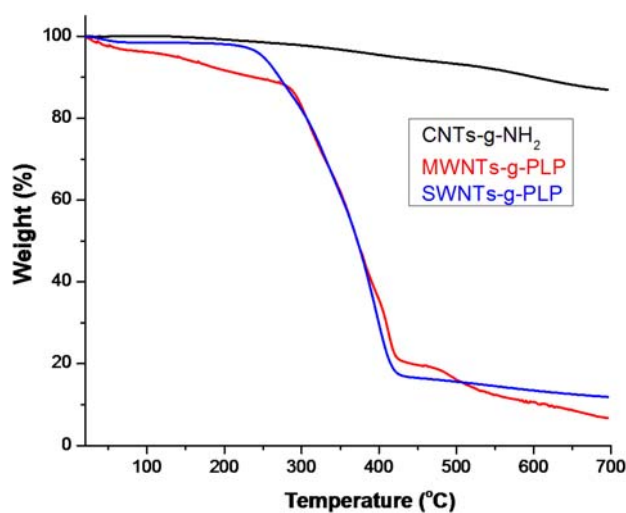
Νανοσωλήνες απλών (SWNTs) / πολλαπλών (MWNTs) τοιχωμάτων-*g*-Πολυ(L-προλίνη) (CNTs-*g*-PLP)



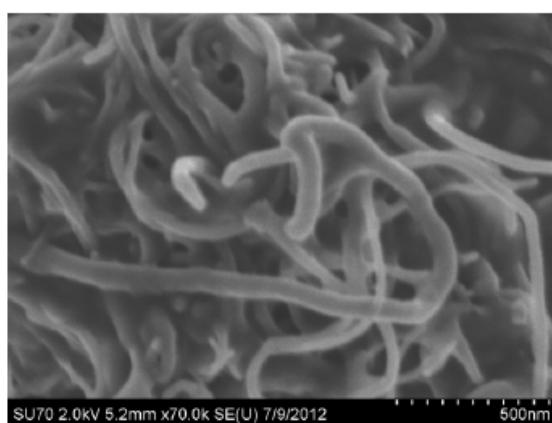
Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου του ανυδρίτη της (L)-προλίνης έγινε σε THF με απαραίτητη, εμβολιασμένες πρωτοταγείς αμινομάδες πάνω σε



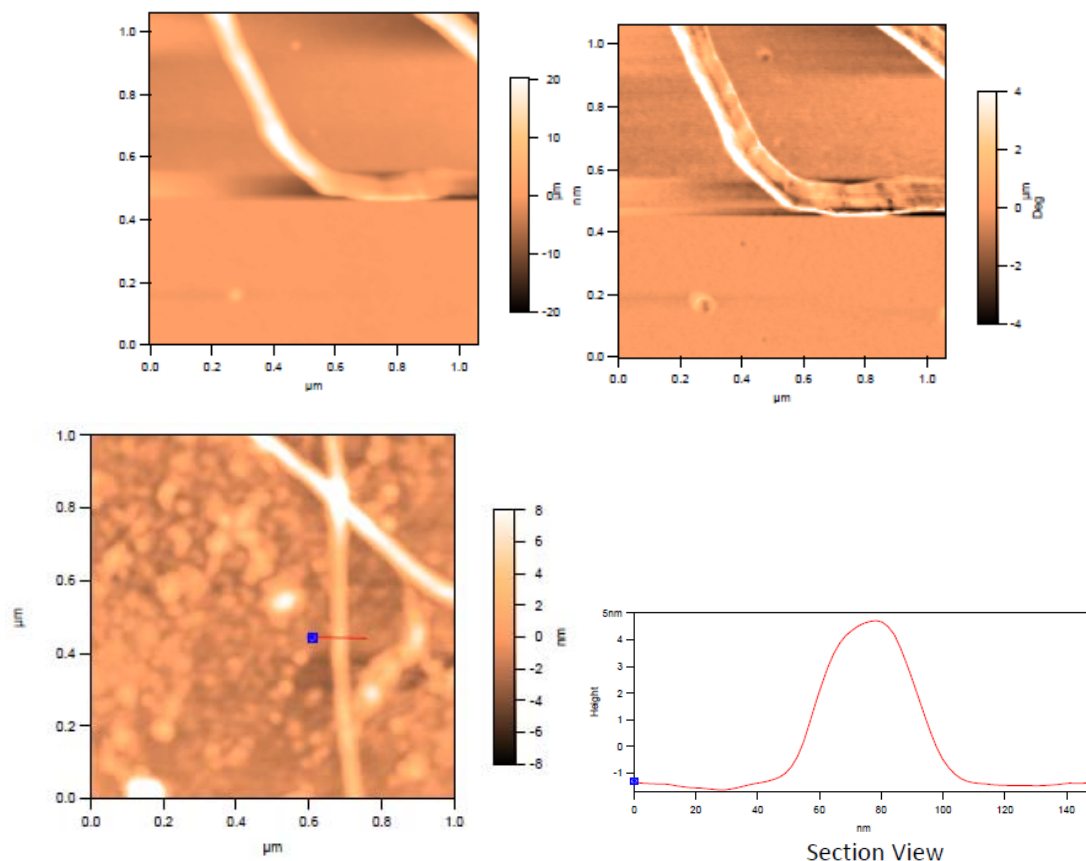
νανοσωλήνες, τόσο πολλαπλών (MWNTs) και απλών τοιχωμάτων (SWNTs). Το TGA έδειξε ότι ένα ποσοστό 10% ανήκει σε εμβολιασμένες αμινομάδες, ενώ όσον αφορά την PLP, καταλαμβάνει ένα ποσοστό 70% πάνω στους SWNTs και 68% πάνω στους MWNTs (εικόνα 46). Φωτογραφίες SEM (εικόνα 47) και AFM (εικόνα 48) έδειξαν την ύπαρξη νανοσωλήνων με πολυμερές. Δεδομένου ότι η διάμετρος ενός νανοσωλήνα είναι 1-2 nm, βλέπουμε από την εικόνα του AFM ότι αυτή έχει αυξηθεί σε 5,5 nm (εξετάζουμε το ύψος μόνο που σκανάρει το tip του AFM – το πλάτος δεν δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα), οπότε συνδυάζοντας τα αποτελέσματα με αυτά του TGA και του Raman, πιστοποιούμε την ύπαρξη του πολυπεπτιδίου πάνω στους νανοσωλήνες.



Εικόνα 46: Θερμιδογράφημα TGA του SWNTs-g-PLP.



Εικόνα 47: Φωτογραφίες SEM από MWNTs-g-PLP σε υπόστρωμα πυριτίου.



**Εικόνα 48: Φωτογραφίες AFM ύψους και φάσης των MWNTs-g-PLP σε υπόστρωμα πυριτίου.**

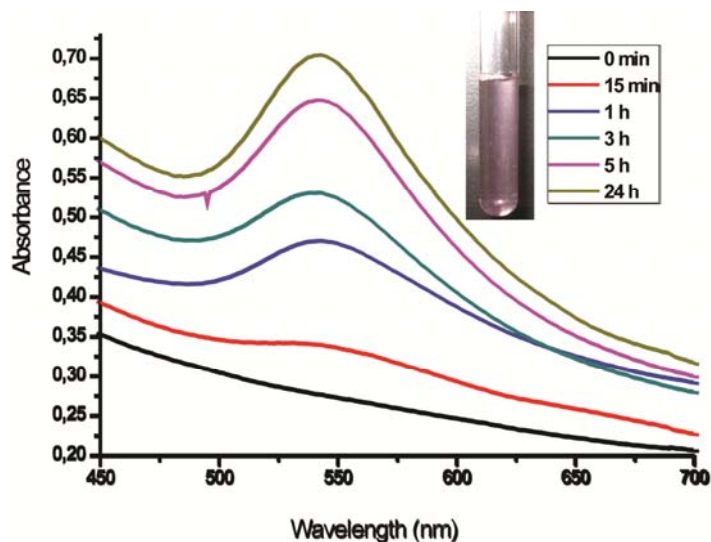
#### **4.13 Αναγωγή/σταθεροποίηση Νανოსωματιδίων Χρυσού**

Κατά την διάρκεια πειραμάτων με άλατα χρυσού, διαπιστώσαμε πως η πολυ(L-προλίνη) όχι μόνο τα ανάγει, αλλά ταυτόχρονα και σταθεροποιεί τα σχηματιζόμενα νανოსωματίδια χρυσού σε νερό. Αυτό μέχρι στιγμής γίνεται σε δύο στάδια, την σύνθεση των νανοςωματιδίων και στην συνέχεια την σταθεροποίησή τους, και περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο οργανικές ενώσεις, τόσο ως αναγωγικά μέσα (κιτρικό νάτριο, διόλες,  $\text{NaBH}_4$ )<sup>149</sup>, όσο και σαν σταθεροποιητές. Επειδή τα κολλοειδή σωματίδια έχουν την τάση να συσσωματώνονται λόγω δυνάμεων van der Waals, και προκειμένου να αποφύγουμε πιθανή καθίζηση τους, χρησιμοποιούμε ένα προστατευτικό παράγοντα (σταθεροποιητή). Η πλειονότητα των ενώσεων αυτών, αφορά

αλκυλαμίνες<sup>150</sup> και αλκυλοθειόλες<sup>151</sup> σε οργανικούς διαλύτες (παράγοντας υδρόφοβα νανοσωματίδια χρυσού), περιορίζοντας έτσι την χρησιμοποίησή τους σε βιο-εφαρμογές.

Συνθετικές προσεγγίσεις σε νερό ως μέσο αντίδρασης, με ταυτόχρονο 'διπλό' ρόλο ως αναγωγικά μέσα και σταθεροποιητές, περιλαμβάνουν την χρήση υδατοδιαλυτών αμινών<sup>152</sup> και πολυμερών, αποδίδοντας υδατοδιαλυτά νανοσωματίδια χρυσού. Όσον αφορά τα υδατοδιαλυτά πολυμερή<sup>153</sup>, έχουν χρησιμοποιηθεί: πολυ(αιθυλενοξειδίου)<sup>154</sup>, πολυ(N-βινυλο-2-πυρρολιδόνη)<sup>155</sup>, πολυ(αλλουλαμίνη)<sup>156</sup>, πολυ(ακρυλικό νάτριο)<sup>157</sup> και ο περιέχον τεταρτοταγή αμίνη, πολυ(διμεθυλο-αμινο-αιθυλο μεθακρυλικός εστέρας)<sup>158</sup>. Σταθερά υδατοδιαλυτά κολλοειδή σωματίδια χρυσού, έχουν επίσης παραχθεί με απλά πολικά αμινοξέα<sup>159a,159b</sup> (είτε ως αναγωγικά μέσα, είτε ως σταθεροποιητές μέσω σύμπλεξης), με αμφίφιλα πεπτιδία τρυπτοφάνης<sup>159c</sup>, ενώ η σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων χρυσού έχει αναφερθεί να γίνεται εφικτή με συμπολυπεπτιδία κυστεΐνης<sup>160a</sup> και ομοπολυπεπτιδία πολυ(L-λυσίνης)<sup>160b</sup>. Σε αντίθεση με την βιβλιογραφία, εμείς καταφέραμε ταυτόχρονα να ανάγουμε και να σταθεροποιήσουμε τα νανοσωματίδια, απλά με χρήση ενός πολυπεπτιδίου σε νερό, αποφεύγοντας την χρήση οργανικών διαλυτών, σταθεροποιητών και πιθανών τοξικών παραπροϊόντων. Δεδομένου του ότι ο Faraday ήταν ο πρώτος που κατάφερε να συνθέσει νανοσωματίδια χρυσού με χρήση της υδατοδιαλυτής ζελατίνης<sup>161</sup> (τα κύρια συστατικά της είναι η προλίνη και η γλυκίνη), η δική μας στρατηγική σύνθεσης/σταθεροποίησης με πολυ(L-προλίνη) σε νερό, φαίνεται πολλά υποσχόμενη.

Η αναγωγή των  $\text{AuCl}_4^-$  και ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων χρυσού, φαίνεται καταρχήν οπτικά, με αλλαγή του κίτρινου χρώματος των υδατοδιαλυτών αλάτων χρυσού σε ροζ-μωβ, και πειραματικά ελέγχεται με απορρόφηση στο φάσμα UV-Vis στα 530 nm (εικόνα 49), που αντανακλά στην μπάντα απορρόφησης της επιφάνειας του μεταλλικού χρυσού.



Εικόνα 49: Παρακολούθηση του σχηματισμού των νανοσωματιδίων χρυσού-πολυ(L-προλίνης) με UV-Vis σε μοριακή αναλογία  $[PLP]/[Au^{III}]=2:1$  στους  $50^{\circ}C$ , απλά αναμειγνύοντας το πολυμερές με 1 mM Au(III). Μετά τις 16h το φάσμα απορρόφησης παραμένει σταθερό.

#### Μοριακό βάρος PLP

Χρησιμοποιήσαμε διαφορετικά μοριακά βάρη πολυ(L-προλίνης) και είδαμε την επίπτωση που είχαν αυτά, σε συγκεντρώσεις Au(III) 1 mM και 2 mM (Πίνακας 18). Σε όλες τις περιπτώσεις, πήραμε μικρότερες διαστάσεις νανοσωματιδίων χρυσού, χρησιμοποιώντας τα μικρότερα μοριακά βάρη PLP. Χαρακτηριστικά, ελήφθησαν νανοσφαίρες χρυσού με διάμετρο 9,3 nm, απλά αναμειγνύοντας το πολυμερές με μοριακό βάρος  $2,3 \times 10^3$  g/mol με 2 mM Au(III) σε μοριακή αναλογία 2:1, ενώ νανοσφαίρες χρυσού με διάμετρο 8,7 nm ελήφθησαν, χρησιμοποιώντας το πολυμερές με μοριακό βάρος  $4,6 \times 10^3$  g/mol και 1 mM Au(III) στην ίδια αναλογία.

**Πίνακας 18: Επιρροή του μοριακού βάρους της PLP και της αρχικής συγκέντρωσης Au(III) στο μέγεθος των νανοσωματιδίων χρυσού.**

Polymer	$M_n$ ( $g \cdot mole^{-1}$ ) <sup>a</sup>	[Au <sup>III</sup> ] (mM)	molar ratio [Au <sup>III</sup> ]/[PLP] <sup>b</sup>	T (°C)	C <sub>PLP</sub> (mM)	$\bar{d}_{Au-PLP}$ (nm) <sup>e</sup>
Boc-(L)-Pro	215	2,0	1 : 70 <sup>c</sup>	50	14,0 <sup>d</sup>	ανόμοια
PLP	2,3 x 10 <sup>3</sup>	2,0	1 : 2	50	0,4	9,3 <sup>1day</sup>
PLP	4,6 x 10 <sup>3</sup>	2,0	1 : 2	50	0,4	9,6 <sup>1day</sup>
PLP	4,6 x 10 <sup>3</sup>	2,0	1 : 5	50	1,1	7,1 <sup>1day</sup>
PLP	7,4 x 10 <sup>3</sup>	2,0	1 : 2	50	0,4	11,9 <sup>1day</sup>
PLP	4,6 x 10 <sup>3</sup>	1,0	1 : 2	50	0,2	8,7 <sup>5days</sup>
PLP	9,3 x 10 <sup>3</sup>	1,0	1 : 2	50	0,2	13,7 <sup>5days</sup>

<sup>a</sup> Με SEC-TALLS σε (0.1 M NaNO<sub>3</sub>) νερό / ACN 80:20 σε θερμοκρασία 35°C.

<sup>b</sup> Μοριακή αναλογία Au(III) και πολυμερικών αλυσίδων PLP.

<sup>c,d</sup> Μοριακή αναλογία και συγκέντρωση του δείγματος αναφοράς BocLP.

<sup>e</sup> Διαστάσεις από TEM.

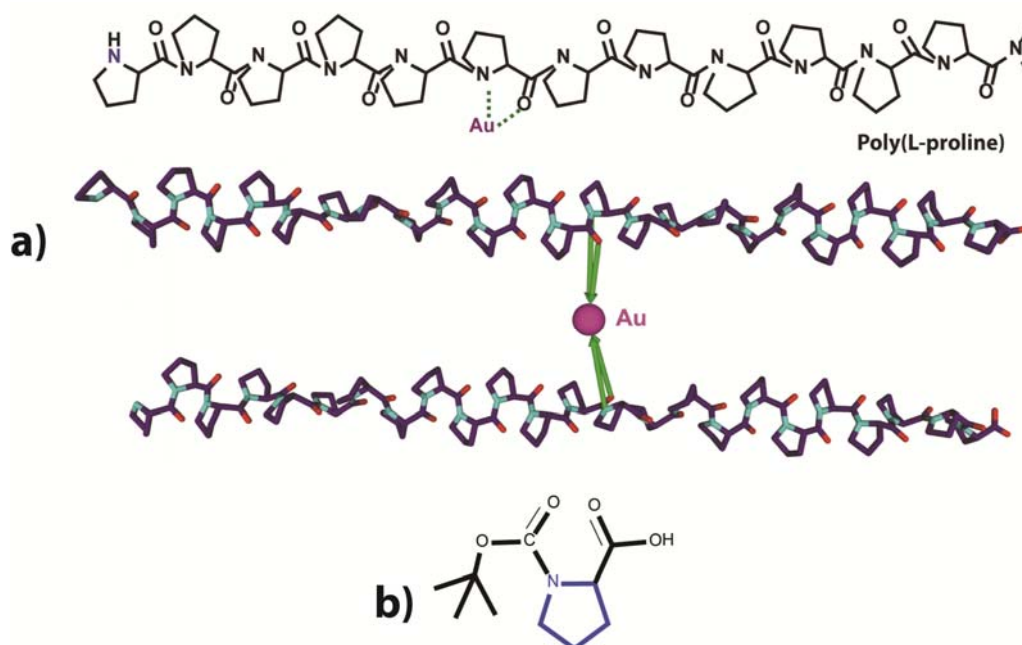
### Μοριακή αναλογία PLP/Au(III)

Στην συνέχεια, εξετάσαμε την επίπτωση που θα είχε στην διάμετρο των νανοσωματιδίων, μια αλλαγή στην μοριακή αναλογία PLP/Au(III) στην ίδια θερμοκρασία, από 2:1 σε 5:1. Αν και λόγω της υψηλής συγκέντρωσης PLP (1,1 mM) ένα μέρος του πολυμερούς καταβυθίζεται, λόγω περιορισμένης διαλυτότητας στο νερό, η αναγωγή/σταθεροποίηση έγινε πολύ αποτελεσματικά και οδήγησε σε νανοσωματίδια υψηλής κρυσταλλικότητας με μέση διάμετρο 7.1 nm στους 50°C.

### Προτεινόμενος μηχανισμός PLP/Au-NPs

Πιστεύουμε πως η PLP συμπλέκεται με τα ιόντα AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>, μέσω του ζεύγους ηλεκτρονίων του οξυγόνου του καρβονυλίου και του τεταρτοταγούς αζώτου και ανάγει τον Au(III), οδηγώντας στον σχηματισμό νανοσφαιρών (σχήμα 60), δεδομένου και του ότι το χρυσικό οξύ στην οξειδωτική κατάσταση (III), είναι

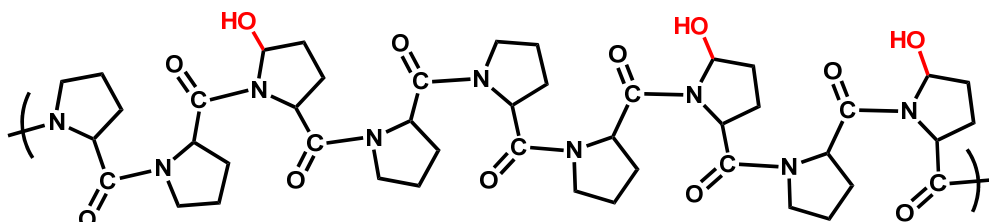
ένα  $d^8$  μέταλλο μετάπτωσης και θεωρείται αρκετά ισχυρό οξειδωτικό μέσο<sup>162</sup>. Τα  $AuCl_4^-$  μεταφέρουν ηλεκτρόνια στις τεταρτοταγείς αμιδικές ομάδες και είναι πιθανό, η αύξηση της θερμοκρασίας να οδηγεί σε επιτάχυνση αυτής της διαδικασίας.



Σχήμα 60: Σύμπλεξη και αναγωγή της (a) πολυ(L-προλίνης) και (b) του παρόμοιας δομής μονομερούς σύγκρισης N-Boc-(L)-προλίνης. Και τα δύο στερούνται δεσμών N-H που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην αναγωγή.

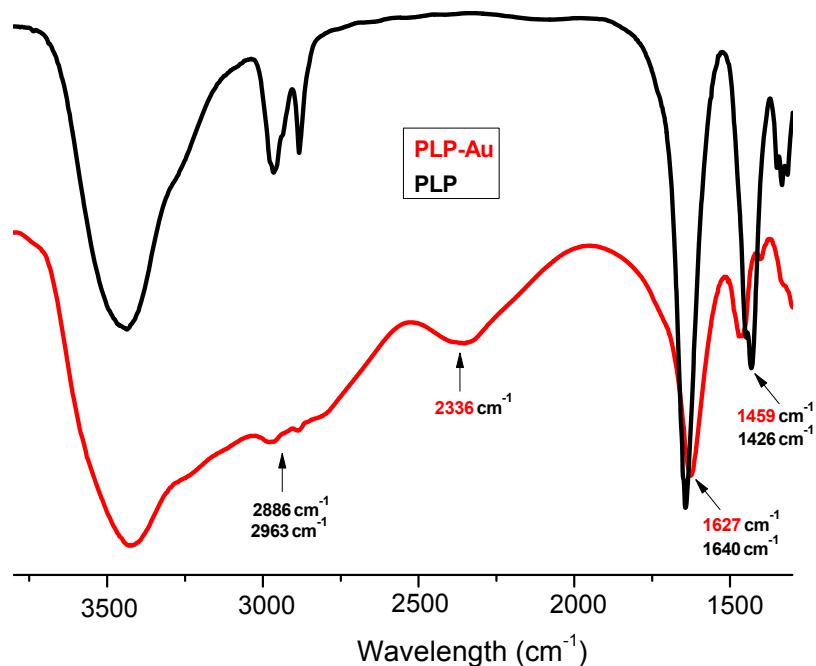
Όσον αφορά το πολυμερές, πιστεύουμε πως ανάγει τα ιόντα χρυσού, και ταυτόχρονα ο δακτύλιος της οξειδώνεται μερικώς στον  $C^\delta$ . Κάτι τέτοιο αναφέρεται στην βιβλιογραφία<sup>163</sup>, με οξυγόνωση δεσμών C-H, δίπλα στο άζωτο τεταρτοταγών N-υποκατεστημένων αμιδίων, μετά από αντίδραση του συμπλόκου  $RuCl_2(PPh_3)_3/Bu^tOOH$  με πυρρολιδινικό N-μεθυλεστέρα<sup>163a</sup> και του συμπλόκου του σιδήρου  $TPPFe/Bu^tOOH$  με N-μεθυλο-2-πυρρολιδόνη<sup>163b</sup>. Αρχικά, πιστεύεται πως λαμβάνει χώρα απόσπαση υδρογόνου από το μέταλλο στον άνθρακα του πυρρολιδινικού δακτυλίου, δίπλα στο άζωτο του αμιδίου (οι ενδοκυκλικές ρίζες ευνοούνται θερμοδυναμικά) και ακολούθως οξείδωση του άνθρακα αυτού. Έτσι πιστεύουμε πως συμβαίνει και την περίπτωση αναγωγής των αλάτων χρυσού με την πολυ(L-προλίνη), όπου

αρχικά έχουμε σύμπλεξη των ιόντων  $\text{AuCl}_4^-$ , μέσω του ζεύγους ηλεκτρονίων του οξυγόνου του καρβονυλίου και του τεταρτοταγούς αζώτου (δρώντας σαν  $n^2$ -χηλικός υποκατάστατης) και ακολούθως οξείδωση του πυρρολιδινικού δακτυλίου στον  $\text{C}^\delta$ , οδηγώντας στην μερική οξείδωση του πολυμερούς και την δημιουργία αλκοολών στον δακτύλιο (σχήμα 61).

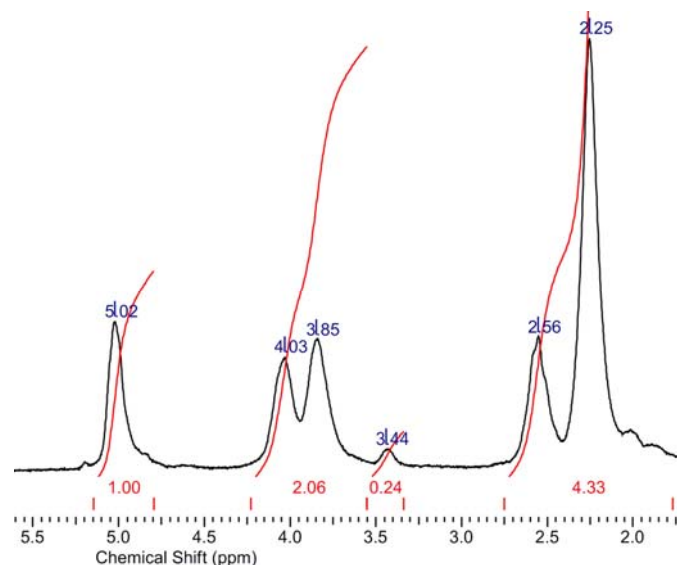


Σχήμα 61: Μερική οξείδωση στον δεσμό  $\text{C}^\delta$  της πολυ(L-προλίνης).

Τα νανοσωματίδια χρυσού, χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω τόσο σε στερεά φάση, όσο και σε διάλυμα. Στο φάσμα FTIR των νανοσφαιρών Au-PLP (εικόνα 50), είχαμε μια μετατόπιση του αμιδικού δεσμού από τα 1640 στα  $1627\text{ cm}^{-1}$ , που δείχνει την σύμπλεξη του μεταλλικού χρυσού στους αμιδικούς δεσμούς, ενώ η μετατόπιση της κορυφής στα  $1426\text{ cm}^{-1}$  σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, δείχνει τις αλλαγές που συνδέονται με τις δονήσεις κάμψης C-H του δακτυλίου. Μια νέα κορυφή που σχηματίζεται στα  $2336\text{ cm}^{-1}$  μπορεί να αποδοθεί σε δεσμούς έκτασης  $\text{Au-CO}^{(0)}$ , καρβονυλίου στην επιφάνεια του μεταλλικού χρυσού. Επιπλέον, η ένταση των δεσμών έκτασης C-H, στα  $2886$  και  $2963\text{ cm}^{-1}$  είναι μειωμένη, ενώ το πλάτεμα των κορυφών στα  $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ , πιθανώς να οφείλεται στον σχηματισμό υδροξυλομάδων. Χαρακτηρισμός σε διάλυμα με  $^1\text{H-NMR}$  του PLP-Au, έδειξε τον σχηματισμό μιας νέας κορυφής στα  $3.44\text{ ppm}$ , πέρα από το χαρακτηριστικό φάσμα της PLP, που αποδίδουμε σε υδροξυλομάδες προερχόμενες από μερική οξείδωση του δακτυλίου στον  $\text{C}^\delta$ , ενώ με ολοκλήρωση της κορυφής, βρίσκουμε ότι  $\sim 25\%$  του πολυμερούς έχει οξειδωθεί (εικόνα 51).



Εικόνα 50: FTIR φάσμα των νανοσωματιδίων χρυσού με ανάμειξη PLP  $4,6 \times 10^3$  g/mol και Au(III) 2 mM στους  $50^\circ\text{C}$  σε μοριακή αναλογία 2:1.



Εικόνα 51: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  των νανοσωματιδίων χρυσού σε  $\text{CF}_3\text{COOD}$  με ανάμειξη PLP  $4,6 \times 10^3$  g/mol και Au(III) 2 mM στους  $50^\circ\text{C}$  σε μοριακή αναλογία 2:1 που δείχνει τον μερικό σχηματισμό αλκοολών στον  $\text{C}^\delta$  της PLP.

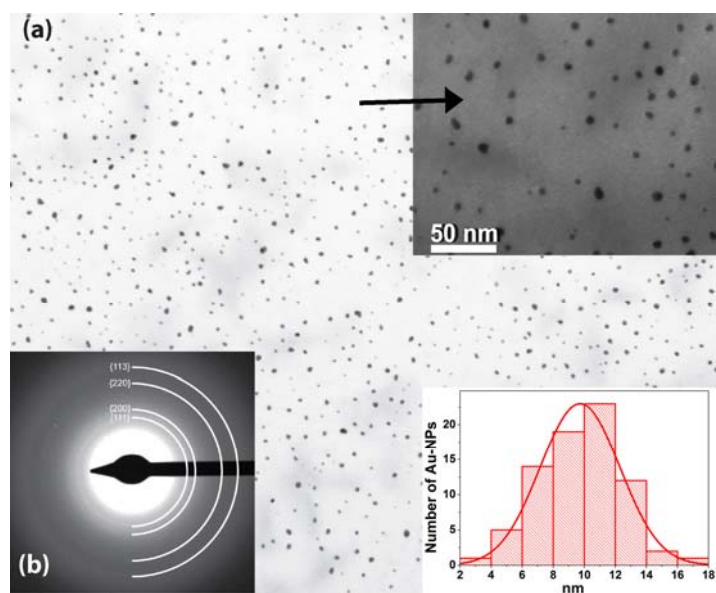
Η υψηλή κρυσταλλικότητα που πετύχαμε σε όλα τα ληφθέντα νανοσωματίδια, χρησιμοποιώντας ως αναγωγικό μέσο και ως σταθεροποιητή την πολυ(L-προλίνη) πιστεύουμε ότι συνδέεται με την εκτεταμένη δευτεροταγή της δομής II στο νερό (βήμα της έλικας  $9.3 \text{ \AA}$  / στροφή), που πιθανώς να



οδηγεί τα νανοσωματίδια σε μεγαλύτερη οργάνωση και σαν αποτέλεσμα, να έχουμε τις υψηλές κρυσταλλικές δομές. Η εκτεταμένη δευτεροταγή δομή του πολυπεπτιδίου, πιθανώς να αλληλεπιδρά πιο εύκολα με τα ιόντα του χρυσού, απ'ότι ένα πολυμερές με δομή τυχαίου σπειράματος. Επιπλέον, η ταυτόχρονη συμμετοχή στην σύμπλεξη, τόσο της αμινομάδας όσο και της καρβονυλομάδας, αλλά και η άπωση των πυρρολιδινικών δακτυλίων, πιστεύουμε ότι παίζουν σημαντικό ρόλο. Τέλος, σύμφωνα με τα ληφθέντα αποτελέσματα, προτείνουμε ένα μηχανισμό για την αναγωγή και σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων χρυσού.

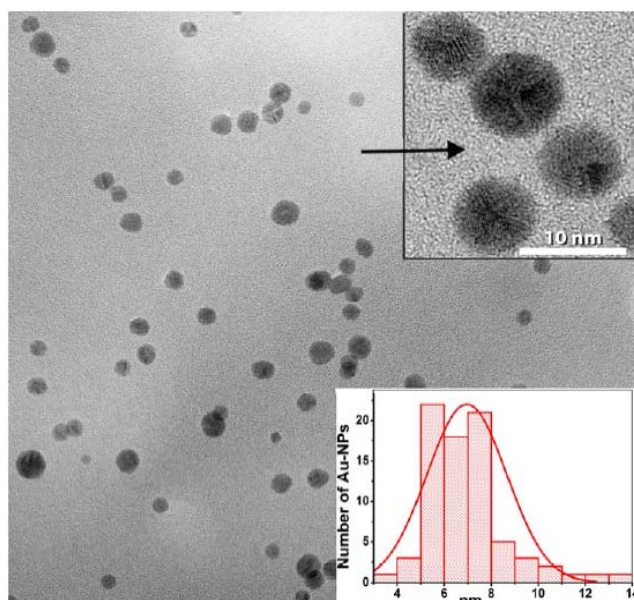
Συμπερασματικά, πετύχαμε τη σύνθεση και τη σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων χρυσού με πάρα πολύ μικρή διάμετρο (7-9 nm) σε πολύ χαμηλές αναλογίες PLP/Au(III) από 2:1 ως 5:1 (η μικρότερη αναφέρεται βιβλιογραφικά να είναι 10:1)<sup>153-158</sup>, απλά με ανάμειξη υδατοδιαλυτής πολυ(L-προλίνης) μοριακού βάρους  $4,6 \times 10^3$  g/mol και 1-2 mM Au(III) στους 50°C (εικόνα 52 και 53). Συγκρίνοντας τις διαστάσεις των νανοσωματιδίων με ανάλογα συστήματα ομοπολυμερών σε νερό, ο Iwamoto<sup>154b</sup> πήρε σωματίδια με μέση διάμετρο  $\bar{d}=16,3$  nm, χρησιμοποιώντας δι-άμινο τελεχειλικό πολυ(αιθυλενοξειδίο), ενώ ο Hussain<sup>157</sup> πέτυχε την σύνθεση νανοσωματιδίων με μέση διάμετρο  $\bar{d}=14$  nm με αναγωγικό μέσο το πολυ(ακρυλικό νάτριο). Τέλος, αποτελέσματα συγκριτικά με τα δικά μας, κατάφερε ο Yuan<sup>158b</sup> λαμβάνοντας σωματίδια με μέση διάμετρο  $\bar{d}=10$  nm, χρησιμοποιώντας τον περιέχοντα τεταρτοταγή αμίνη στην δομική του μονάδα, πολυ(διμεθυλο-αμινο-αιθυλο μεθακρυλικός εστέρα). Η υψηλή κρυσταλλικότητα που είχαμε σε όλα τα ληφθέντα νανοσωματίδια, χρησιμοποιώντας ως αναγωγικό μέσο την πολυ(L-προλίνη), πιστεύουμε ότι συνδέεται με την εκτεταμένη δευτεροταγή της δομή II στο νερό (βήμα της έλικας 9.3 Å / στροφή), που πιθανώς να οδηγεί τα νανοσωματίδια σε μεγαλύτερη οργάνωση και σαν αποτέλεσμα να έχουμε τις υψηλές κρυσταλλικές δομές. Η εκτεταμένη δευτεροταγής δομή του πολυπεπτιδίου, πιθανώς να αλληλεπιδρά πιο εύκολα με τα ιόντα του χρυσού, απ'ότι ένα πολυμερές με δομή τυχαίου σπειράματος. Επιπλέον, μελέτες φασματοσκοπίας Raman ενισχυμένης επιφάνειας (SERS), έδειξαν ότι το διπεπτιδίο προλίνης<sup>164</sup> δένεται αρκετά ισχυρά σε μεταλλικές επιφάνειες

χρυσού, εξ' αιτίας της άπωσης των πυρρολιδινικών δακτυλίων και της ταυτόχρονης συμμετοχής στην σύμπλεξη, τόσο της αμινομάδας όσο και της καρβονυλομάδας



$$\bar{d} = 8.7 \text{ nm} \pm 1.3$$

Εικόνα 52: (a) Φωτογραφίες TEM των νανοσφαιρών χρυσού-πολυ(L-προλίνης) με ανάμειξη PLP μοριακού βάρους  $4,6 \times 10^3$  g/mol και 1 mM Au(III) στους 50°C σε μοριακή αναλογία 2:1 (b) Περίθλαση με ακτίνες X των νανοσωματιδίων χρυσού που δείχνουν ότι το πλέγμα του χρυσού είναι fcc.



$$\bar{d} = 7.1 \text{ nm} \pm 1.3$$

Εικόνα 53: Φωτογραφίες TEM των νανοσφαιρών χρυσού-πολυ(L-προλίνης) με ανάμειξη PLP μοριακού βάρους  $4,6 \times 10^3$  g/mol και 2 mM Au(III) στους 50°C σε μοριακή αναλογία 5:1.



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

γ-Bn-L-Glu	γ-βενζυλο-L-γλουταμικός εστέρας
Bn-L-Hyp	O-βενζυλο-L-υδροξυπρολίνη
Boc-L-Lys	ε- <i>tert</i> -βουτοξυ καρβονυλο-L-λυσίνη
L-Pro	L-προλίνη
L-Gly	L-γλυκίνη
PBLG	Πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικός εστέρας)
PBHyLp	Πολυ(O-βενζυλο-L-υδροξυπρολίνη)
PBocLL	Πολυ(ε- <i>tert</i> -βουτοξυ-L-λυσίνη)
PZLL	Πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη)
PLP	Πολυ(L-προλίνη)
PLGA	Πολυ(L-γλουταμικό οξύ)
PLL	Πολυ(L-λυσίνη)
PEO	Πολυ(αιθυλενοξειδίο)
PEO	Πολυ(στυρένιο)
NCA	N-καρβοξυ ανυδρίτης
R.O.P	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
THF	Τετραϋδροφουράνιο
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
ACN	Ακετονιτρίλιο
Ethyl Acetate	Οξικός αιθυλεστέρας
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
DCHA	Δικυκλοεξυλαμίνη
DBSA	Δωδεκυλο βενζοσουλφονικό
dGMP	Μονοφωσφορική δεοξυγουανοσίνη
DCC	N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
DMA	Διμεθυλαμίνη
HEX	Εξυλαμίνη
Di- <i>tert</i> butyl dicarbonate	Δι- <i>tert</i> -βουτοξυ καρβονυλικός ανυδρίτης
DKPs	Δικετοπιπεραζίνες
DEAM-PS	Διαιθυλο-άμινο δικτυωμένο πολυ(στυρένιο)

BC-BPE	βενζοκυκλοβουτένιο
CNTs	Νανοσωλήνες άνθρακα
SWNTs	Νανοσωλήνες άνθρακα απλών τοιχωμάτων
MWNTs	Νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων
Au-NPs	Νανოსωματίδια χρυσού
dn/dc	Διαφορικός δείκτης διάθλασης
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
FTIR	Φασματοσκοπία υπέρυθρου ακτινοβολίας
SEC	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
UV-Vis	Φασματοσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας
GPC	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
TGA	Θερμοσταθμική ανάλυση
CD	Κυκλικός διχρωϊσμός
ESI-MS	Φασματοσκοπία μάζας ηλεκτροψεκασμού
TEM	Μικροσκοπία διαπερατότητας ηλεκτρονίων
SEM	Μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων
AFM	Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων
WAXS	Σκέδαση ακτίνων Χ υπό μεγάλες γωνίες
SAXS	Σκέδαση ακτίνων Χ υπό μικρές γωνίες
XRD	Περίθλαση ακτίνων Χ
FRET	Τεχνική μεταφοράς ενέργειας με συντονισμό φθορισμού

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Karlson, R.H., Norland, K.S., Fasman G.D. and Blout, E.R., The Helical Sense of Poly- $\beta$ -benzyl-L-aspartate. Synthesis and Rotatory Dispersion of Copolymers of  $\beta$ -Benzyl-L and D-Aspartate with  $\gamma$ -Benzyl-L-glutamate *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 2268-2275.
2. Myer, W., The pH-Induced Helix-Coil Transition of Poly-L-lysine and Poly-L-glutamic Acid and the 238-m $\mu$  Dichroic Band, *Macromolecules* **1969**, 2, 624-628.
3. Koenig, J. L. and Sutton, P. L., Raman spectra of poly-L-lysines, *Biopolymers* **1970**, 9, 1229-1237.
4. Anand, N., Murthy, N. S., Naider, F. and Goodman, M., Conformational Aspects of Polypeptide Structure. XXXIV. Amino Acid Substituted Poly-L-Lysines, *Macromolecules* **1971**, 4, 564-569 .
5. Nagy, J. A., Powers, S. P., Zweifel, B. O. and Sheraga, H. A., Helix-Coil Stability Constants for the Naturally Occurring Amino Acids in Water, 18. Tryptophan Parameters from Random Poly[(hydroxypropyl)glutamine-co-L-tryptophan] *Macromolecules* **1980**, 13, 1428-1440.
6. Sueki, M., Lee, S., Powers, S.P., Denton, J. P., Konishi, Y. and Sheraga, H. A., Helix-Coil Stability Constants for the Naturally Occurring Amino Acids in Water, 22. Histidine parameters from random poly[(hydroxybutyl)glutamine-co-L-histidine], *Macromolecules* **1984**, 17, 148-155.
7. Kricheldorf, H. R. and Muller, D., Secondary structure of peptides, 3. Carbon-13 NMR Cross Polarization/Magic Angle Spinning Spectroscopic Characterization of Solid Polypeptides, *Macromolecules* **1983**, 16, 615-623.
8. Kelly, M. A., Chellgren, B. W., Rucker, A. L., Troutman, J. M., Fried, M. G., Miller, A.-F. and Creamer, T. P., Host-Guest Study of Left-Handed Polyproline II Helix Formation, *Biochemistry* **2001**, 40, 14376-14383.

9. Yang, D., Li, W., Qu, J., Luo, S. W. and Wu, Y. D., A New Strategy to Induce  $\gamma$ -Turns: Peptides Composed of Alternating  $\alpha$ -Aminoxy Acids and  $\alpha$ -Amino Acids, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13018-13019.
10. Woodward, R. B. and Schramm, C. H., Synthesis of protein analogs, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 1551-1552.
11. Katchalski, E., Grossfeld, I. and Frankel, M., Poly-Lysine, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 2564-2565.
12. Blout, E. R., Karlson, R. H., Doty, P. and Hargitay, B., Polypeptides, I. The Synthesis and the Molecular Weight of High Molecular Weight Polyglutamic Acids and Esters, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 4492-4493.
13. Blout, E. R. and Karlson, R. H., Polypeptides, III. Synthesis of High Molecular Weight Poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamates, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 94-946.
14. Hirschmann, R., Schwam, H., Strachan, R. G., Schoenewaldt, E. F., Barkemeyer, H., Miller, S., Conn, J. B., Garsky, V., Veber, D. and Denkwalter, R. G., Controlled Synthesis of Peptides in Aqueous Medium. VIII. Preparation and Use of Novel  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2746-2754.
15. Deming, T. J., Facile Synthesis of Block Copolypeptides of Defined Architecture, *Nature* **1997**, 390, 386-389.
16. (a) Deming, T., Living Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid-N-Carboxy anhydrides, *J. Polym. Sci.* **2000**, Part A, 38, 3011-3018. (b) Deming, T. J. Amino Acid Derived Nickelacycles: Intermediates in Nickel-Mediated Polypeptide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4240-4241.
17. Sigel, R., Fytas, G., Vainos, N., Pispas, S. and Hadjichristidis, N., Pattern Formation in Homogeneous Polymer Solutions Induced by a ContinuousWave Visible Laser, *Science* **2002**, 297, 67-70.
18. Chan, N., Hoffman, J., Lee, V., Iatrou, H., Avgeropoulos, A., Hadjichristidis, N., Miller R. and Thomas, E., Ordered Bicontinuous

- Nanoporous and Nanorelief Ceramic Films from Self Assembling Polymer Precursors, *Science* **1999**, 286, 1716-1719.
19. Lecommandoux, S., Achard, M. F., Langenwalter, J. F. and Klok, H. A., Self-Assembly of Rod-Coil Diblock Oligomers Based on  $\alpha$ -Helical Peptides, *Macromolecules* **2001**, 34, 9100-9111.
  20. Pakstis, L. M., Ozbas, B., Pochan, D., Nowak, A. P. and Deming, T. J., SANS and Cryo-TEM Study of Self-Assembled Diblock Copolypeptide Hydrogels with Rich Nano- through Microscale Morphology, *Macromolecules* **2002**, 35, 5358-5360.
  21. Papadopoulos, P., Floudas, G., Klok, H. A., Schnell, I. and Pakula, T., Self-Assembly and Dynamics of Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) Peptides, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 81-91.
  22. Pakstis, L. M., Ozbas, B., Hales, K. D., Nowak, A. P., Deming, T. J. and Pochan, D., Effect of Chemistry and Morphology on the Biofunctionality of Self-Assembling Diblock Copolypeptide Hydrogels, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 312-318.
  23. Papadopoulos, P., Floudas, G., Schnell, I., Aliferis, T., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., Nanodomain-Induced Chain Folding in Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)-*b*-Polyglycine Diblock Copolymers, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2352-2361.
  24. Hanski, S., Houbenov, N., Ruokolainen, J., Chondronicola, D., Iatrou, H., Hadjichristidis, N. and Ikkala, O. Hierarchical Ionic Self-Assembly of Rod-Comb Block Copolypeptide-Surfactant Complexes, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 3379-3384.
  25. Gitsas, A., Floudas, G., Mondeshki, M., Butt, H. J., Spiess, H. W., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., Effect of chain topology on the self-organization and dynamics of block copolypeptides: from diblock copolymers to stars, *Biomacromolecules* **2008**, 9, 1959-1966.
  26. Ramassubu, R., Hanski, S., Laiho, A., Tuma, R., Kilpelainen, S., Tuomisto, F., Ruokolainen, J. and Ikkala, O., Evidence of PPII-like



- helical conformation and glass transition in a self-assembled solid-state polypeptide-surfactant complex: poly(L-histidine)/docylbenzenesulfonic acid, *Biomacromolecules* **2008**, 9, 1390-1397.
27. Houbenov, N., Nykanen, A., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Ruokolainen, J., Faul, C. F. J. and Ikkala, O., Fibrillar Constructs from Multilevel Hierarchical Self-Assembly of Discotic and Calamitic Supramolecular Motifs, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, 18, 2041-2047.
  28. Parkhe, A. D., Cooper, S. J., Atkins, E., Fournier, M. J., Mason, T. L. and Tirell, D. A., Effect of Local Sequence Inversions on the Crystalline Antiparallel  $\beta$ -sheet Lamellar Structures of Periodic Polypeptides: Implications for Chain Folding, *Int. J. Biol. Macrom.* **1998**, 23, 251-258.
  29. Dzwolak, W., Muraki, T., Kato, M. and Taniguchi, Y., Chain-Length Dependence of  $\alpha$ -Helix to  $\beta$ -sheet Transition in Polylysine: Model of Protein Aggregation Studied by Temperature-Tuned FTIR Spectroscopy, *Biopolymers*, **2004**, 73, 463-469.
  30. Rodriguez-Hernandez, J., Checot, F., Gnanou, Y. and Lecommandoux, S., Toward 'Smart' Nano-Objects by Self-Assembly of Block Copolymers in Solution, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, 69-724.
  31. Checot, F., Rodriguez-Hernandez, J., Gnanou, Y. and Lecommandoux, S., pH-Responsive Micelles and Vesicles Nanocapsules Based on Polypeptide Diblock Copolymers, *J. Bioeng* **2007**, 24 81-85.
  32. Disher, B., Won, Y-Y.; Ege, D.; Lee, J. C-M.; Bates, F.; Disher, D. and Hammer, D., Polymersomes: Vesicles Made from Diblock Copolymers, *Science* **1999**, 284, 1143-1146.
  33. Iatrou, H., Frielinghaus, H., Hanski, S., Ferderigos, N., Ruokolainen, J., Ikkala, O., Richter, D., Mays, J. and Hadjichristidis, N., Architecturally Induced Multiresponsive Vesicles from Well-Defined Polypeptides: Formation of Gene Vehicles, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 2173-2381.
  34. Minoura, N., Aiba, S. and Fujiwara, Y., Spontaneous Oscillation of the Electrical Membrane Potential in Triblock Copolypeptide Membranes

- Composed of L-Glutamic Acid and L-Leucine, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5902-5906.
35. Deming, T. J., Methodologies for Preparation of Synthetic Block Copolypeptides: Materials with Future Promise in Drug Delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 1145-1155.
  36. Yokoyama, M., Kwon, G. S., Okano, T., Sakurai, Y., Seto, T. and Kataoka, K., Preparation of Micelle-Forming Polymer-Drug Conjugates, *Bioconjugate. Chem.* **1992**, 3, 295-301.
  37. Nakanishi, T., Fukushima, S., Okamoto, K., Suzuki, M., Matsumura, Y., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y. and Kataoka, K., Development of the Polymer Micelle Carrier System for Doxorubicin, *Journal of Controlled Release* **2001**, 74, 295-302.
  38. Rosler, A., Vandermeulen, G. W. M. and Klok, H. A., Advanced Drug Delivery Devices via Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, 95-108.
  39. Lee, N. and Frank, C., Surface-Initiated Vapor Polymerization of Various  $\alpha$ -Amino Acids, *Langmuir* **2002**, 19, 1295-1303.
  40. Lee, N., Christensen, L. M. and Frank, C., Morphology of Vapor-Deposited Poly(Amino acid) Films, *Langmuir* **2003**, 19, 3525-3230.
  41. Li, X., Chen, W., Zhan, Q., Dai, L., Sowards, L., Pender, M. and Naik, R., Direct Measurements of Interactions between Polypeptides and Carbon Nanotubes, *J. Phys. Chem.* 2006, Part B, 110, 12621-12625.
  42. Yao, Y., Li, W., Wang, S., Yan, D. and Chen, X., Polypeptide Modification of Multiwalled Carbon Nanotubes by a Graft-From Approach, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, 27, 2019-2025.
  43. Agut, W., Agnaou, R., Lecommandoux, S. and Taton, D., Synthesis of Block Copolypeptides by Click Chemistry, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, 29, 1147-1155.
  44. Styer, L., *Βιοχημεία*, Έκδοση 5<sup>η</sup>, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο **2001**, pp. 15-41.

45. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, J. and Watson J., *Molecular Biology of The Cell*, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Garland Publishing, New York **1989**. pp. 87-134 & 820-830.
46. Chou, P. Y. and Fasman, G. D., Conformational Parameters for Amino Acids in Helical, beta-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins, *Biochemistry* **1974**, 13, 211-222.
47. Creghton, T. E., *Proteins: Structures and Molecular Properties*, Έκδοση 1<sup>η</sup>, Freeman Publishing **1983**., pp. 235.
48. Τζουγκράκη, Χ. και Κόκοτος, Γ., *Θέματα Βιοοργανικής Χημείας*, Έκδοση 4<sup>η</sup>, Μέρος Α, Αθήνα **2003**, pp. 20-73.
49. Merrifield, R., Automated Synthesis of Peptides, *Science* **1965**, 150, 178-185.
50. Merrifield, R. and Stewart, J., Automated Peptide Synthesis, *Nature* **1966**, 207, 522-523.
51. Dawson, P., Muir, T., Clark-Lewis, I. H. and Kent, S., Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, *Science* **1994**, 266, 776-779.
52. Styer, L., *Βιοχημεία*, Έκδοση 5<sup>η</sup>, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο **2001**, pp. 73-141.
53. (a) Jackson, D. A, Symons, R. H. and Berg, P., Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia Coli, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1972**, 69, 2904-2909. (b) Cohen, S., Chang, A., Boyer, H. and Helling, R., Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids in Vitro, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 3240-3244. (c) Yu, S. M., Conticello, V. P., Zhang, G., Kayser, C., Fournier, M. J., Mason, T. L. and Tirrell, D. A., Smectic Ordering in Solutions and Films of a Rod-Like Polymer Owing to Monodispersity of Chain Length, *Nature* **1997**, 389, 167-170. (d) Tirrell, D. A., Fournier, M. and Mason, T., Genetic Engineering of Polymeric Materials, *MRS Bull.* **1991**, 16, 23-28. (e) Zhang, K., Diehl, M. R. and

- Tirrell, D. A., Artificial Polypeptide Scaffold for Protein Immobilization, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10136-10137.
54. Bernfield, M. R. and Nirenberg, M. W., RNA Codewords and Protein Synthesis. The Nucleotide Sequences of Multiple Codewords for Phenylalanine, Serine, Leucine and Proline, *Science* **1965**, *147*, 479-484.
55. Kricheldorf, H. R.,  *$\alpha$ -Aminoacid N-carboxyanhydrides and Related Materials*, Έκδοση 1<sup>η</sup>, Springer-Verlag, New York **1987**.
56. Iatrou, H., Aliferis, T. and Hadjichristidis, N., Living polypeptides, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1653-1656.
57. Vayaboury, W., Giani, O., Cottet, H., Deratani, A. and Schue, F., Living Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides (NCA) upon Decreasing the Reaction Temperature, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1221-1224.
58. Leuchs, H., Ueber die Glycin-Carbonsäure, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 857-861.
59. Leuchs, H. and Geiger, W., Über die Anhydride von  $\alpha$ -Amino-N-Carbonsäuren und die von  $\alpha$ -Aminosäuren, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, *41*, 1721-1726.
60. Wessely, F., *Z. Physiol. Chem.* **1925**, *146*, 72.
61. Wessely, F. and Sigmund, F., *Z. Physiol. Chem.* **1926**, *159*, 102.
62. Wessely, F., Riedl, K. and Tuppy, K., Untersuchungen über  $\alpha$ -Amino-N-Carbonsäureanhydride, *Monatsh. Chem.* **1950**, *81*, 861-872.
63. Ben-Ishai, D. and Katchalski, E., Synthesis of N-Carboxy- $\alpha$ -amino Acid Anhydrides from N-Carboxy- $\alpha$ -amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3688-3689.
64. Green, M. and Stahmann, M. A., Synthesis and Enzymatic Hydrolysis of Glutamic Acid Polypeptides, *J. Biol. Chem.* **1952**, *197*, 771-782.

65. Katchalski, E., Grossfeld, J. and Frankel, M., Poly-condensation of  $\alpha$ -Amino Acid Derivatives. III. Poly-lysine, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 2094-2101.
66. Katchalski, E. and Spitnik, P., Poly-arginine, *Nature* **1949**, *164*, 1092-1093.
67. Fuchs, F., Über N-Carbonsäure-Anhydride, *Chem. Ber.* **1922**, *55*, 2943.
68. Brown, C. J., Coleman, D. and Farthing, A.C., Further Studies in Synthetic Polypeptides, *Nature* **1949**, *163*, 834-835.
69. Farthing, A. C. And Reynolds, R. J. W., Anhydro-N-Carboxy-DL- $\beta$ -Phenylalanine, *Nature* **1950**, *165*, 647-647.
70. Farthing, A. C., Synthetic polypeptides. Part I. Synthesis of Oxazolid-2:5-diones and a New Reaction of Glycine, *J. Chem. Soc.* **1950**, 3213-3217.
71. Coleman, D. And Farthing, A. C., Synthetic Polypeptides. Part II. Properties of Oxazolid-2:5-diones and an Initial Study of the Preparation of Polypeptides There-From, *J. Chem. Soc.* **1950**, 3218-3222.
72. Levy, A. L., Anhydro-N-Carboxy-dl-beta-Phenylalanine, *Nature* **1950**, *165*, 152-153.
73. Kricheldorf, H. R., *Models of Biopolymers by Ring-Opening Polymerization*, Έκδοση 1<sup>η</sup>, CRC Press, Boca Raton **1990**, pp. 8 & 11.
74. Iwakura, Y., Uno, K. and Kang, S., The Synthesis and Reactions of 2-Isocyanatoacyl Chlorides, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1158-1161.
75. Goodman, M. and Hutchison, J. The Mechanisms of Polymerization of N-Unsubstituted N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3627-3630.
76. Kricheldorf, H. R., Mechanism of the NCA-Polymerization, 5. Catalysis by Secondary Amines, *Macromol. Chemie.* **1977**, *178*, 1959-1970.
77. Sekiguchi, H. and Froyer, G., Anionic Polymerization Mechanism of N-Carboxy- $\alpha$ -Amino Acid Anhydrides, *J. Polym. Sci.* **1975**, *52*, 157-171.

78. Sekiguchi, H., Mechanism of N-Carboxy- $\alpha$ -Amino Acid Anhydride (NCA) Polymerization, *Pure. Appl. Chem.* **1981**, 53, 1689-1714.
79. Waley, S. G. and Watson, J., The Kinetics of the Polymerization of Sarcosine Carbonic Anhydride, *Proc. R. Soc.* **1949**, 199, 499-517.
80. Sela, M. and Berger, A., The Terminal Groups of Poly- $\alpha$ -amino Acids, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1893-1898.
81. Goodman, M. and Hutchison, J., Propagation Mechanism in Strong Base Initiated Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3524-3525.
82. Blout, E. R. and Idelson, M., Polypeptides. XVIII.1 A Kinetic Study of the Polymerization of Amino Acid N-Carboxyanhydrides Initiated by Strong Bases, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2387-2393.
83. Thuning, D., Semen, J. and Elias, H. G., Carbon dioxide influence on NCA polymerizations, *Macromol. Chem.* **1977**, 178, 603-607.
84. Bailey, J. L., A New Peptide Synthesis, *Nature* **1949**, 164, 889-899.
85. Ballard, D. G., Bamford, C. H. and Weymouth, F. J., New Observations on the Chemistry of N-Carboxy- $\alpha$ -Amino-Acid Anhydrides, *Nature* **1954**, 174, 173-175.
86. Ballard, D. G. and Bamford, C. H., The Polymerization of  $\alpha$ -Benzyl-LI-Glutamate N-Carboxy Anhydride, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 2336-2338.
87. Ballard, D. G., Bamford, C. H. and Elliot, A., Synthetic Polypeptides, *Macromol. Chem.* **1960**, 35, 222-238.
88. Goodman, M. and Hutchison, U., The Mechanisms of Polymerization of N-Unsubstituted N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3627-3630.
89. Ballard, D. G., Bamford, C. H. and Weymouth, F. J., Studies in Polymerization. VIII. Reactions of N-Carboxy- $\alpha$ -Amino Acid Anhydrides Initiated by Metal Cations, *Proc. R. Soc.* **1955**, 227, 155-183.

90. Kopple, K. D., The Reaction of Amines with Amino Acid N-Carboxy Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 662-664.
91. Kopple, K. D., Some Reactions of Amino Acid N-Carboxy Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6442-6446.
92. Seeney, C. and Harwood J., Carbamate Ions as Propagating Species in N-Carboxy Anhydride Polymerizations, *J. Macromol. Sci. Chem.* **1975**, *9*, 779-795.
93. Kricheldorf, H. R., Mechanism of the NCA-Polymerization, 5. Catalysis by Secondary Amines, *Macromol. Chem.* **1977**, *178*, 1959-1970.
94. Ballard, D. G. and Bamford, C. H., Reactions of N-Carboxy- $\alpha$ -Amino-Acid Anhydrides Catalysed by Tertiary Bases, *J. Chem. Soc.* **1956**, 381-387.
95. Blout, E. R. and Asadourian, A., Polypeptides, V. The Infrared Spectra of Polypeptides Derived from *c*-Benzyl-L-glutamate, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 955-961.
96. Lundberg, R. D. and Doty, R., Polypeptides. XVII. A Study of the Kinetics of the Primary Amine-initiated Polymerization of N-Carboxy-anhydrides with Special Reference to Configurational and Stereochemical Effects, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3961-3971.
97. Seidel, W. T. and Deming, T., Use of Chiral Ruthenium and Iridium Amido-Sulfonamidate Complexes for Controlled, Enantioselective Polypeptide Synthesis, *Macromolecules* **2003**, *36*, 969-979.
98. Lu, H. and Cheng, J., N-Trimethylsilyl Amines for Controlled Ring-Opening Polymerization of Amino Acid N-Carboxyanhydrides and Facile End Group Functionalization of Polypeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12562-12563.
99. Kukula, H., Schlaad, H., Falkenhagen, J., Kruger, R.-P., Improved Synthesis and Characterization of  $\omega$ -Primary Amino-Functional Polystyrenes and Polydienes, *Macromolecules* **2002**, *35*, 7157-7160.

100. Dimitrov, I. and Schlaad, H., Synthesis of Nearly Monodisperse Polystyrene-Polypeptide Block Copolymers via Polymerisation of N-Carboxyanhydrides, *Chem. Commun.* **2003**, 23, 2944-2945.
101. Aliferis, T., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., Well-defined Linear Multiblock and Branched Polypeptides by Linking Chemistry, *J. Polym. Sci.* **2005**, Part A, 43, 4670-4673.
102. Aliferis, T., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Messman, J. and Mays, J., Synthesis and Characterization of 3- and 4-Arm Star-Block Copolypeptides using Multifunctional Amino Initiators and High Vacuum Techniques, *J. Macromol. Symp.* **2006**, 240, 12-17.
103. Karatzas, A., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Inoue, K., Sugiyama, K. and Hirao, A., Complex Macromolecular Chimeras, *Biomacromolecules* **2008**, 9, 2072-2080.
104. Fetters, L., *Encyclopedia of Polymer Science Engineering*, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Τόμος 10<sup>ος</sup>, Wiley-Interscience, New York **1987**, pp.19-25
105. Quirk, R. P. and Lee, B., Experimental Criteria for Living Polymerizations *Polymer international*, **1992**, 27, 359-367.
106. Pauling, L., A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 2643-2657.
107. Bovey, F. A. and Hood, F. P., The Optical Rotatory Properties of Poly-L-proline, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 2326-2327.
108. Bovey, F. A. and Hood, F. P., Circular Dichroism Spectrum of Poly-L-Proline, *Biopolymers* **1967**, 5, 325-326.
109. Deber, C. M., Bovey, F. A., Carver, J. P. and Blout, E. R., Nuclear Magnetic Resonance Evidence for cis-Peptide Bonds in Proline Oligomers, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 6191-6198.
110. Bovey, F. A. and Torchia, D. A., A Nuclear Magnetic Resonance Study of Poly(L-proline) in Aqueous and Aqueous Salt Solutions, *Macromolecules* **1971**, 4, 246-251.



111. Dorman, D. E., Torchia, D. A. and Bovey, F. A., Carbon-13 and Proton Nuclear Magnetic Resonance Observations of the Conformation of Poly(L-proline) in Aqueous Salt Solutions, *Macromolecules* **1973**, 6, 80-82.
112. Cowan, P. M. and McGavin, S., Structure of Poly-L-Proline, *Nature* **1955**, 176, 501-503.
113. Sasisekharan, V., Structure of Poly-L-Proline II, *Acta Cryst.* **1959**, 12, 897-903.
114. Traub, W. and Shmueli, U., Structure of Poly-L-Proline I, *Nature* **1963**, 198, 1165-1166.
115. Berger, A., Kurtz, J. and Katchalski, E., Mutarotation of Poly-L-Proline, *Nature* **1956**, 176, 1066-1067.
116. Steinberg, I. Z., Berger, A. and Katchalski, E., Reverse Mutarotation of Poly-L-proline, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 28, 647-648.
117. Harrington, W. F. and Sela, M., Studies on the Structure of Poly-L-Proline in Solution, *Biochem. Biophys. Acta* **1958**, 27, 24-41.
118. Steinberg, I. Z., Harrington, W. F., Berger, A., Sela, M. and Katchalski, E., The Configurational Changes of Poly-L-proline in Solution, *J. Am. Chem. Soc* **1960**, 82, 5263-5279.
119. Engel, J., Equilibrium and Kinetic Studies of the Cooperative I-II Transition in Poly- L-proline, *Biopolymers*, **1966**, 4, 945-948.
120. Blout, E. R., Carver, J. P. and Gross, J., Polypeptides, XLII. Intrinsic Cotton Effects in Collagen and Poly-L-proline, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 644-645.
121. Rosenheck, K., Miller, H. and Zakaria, A., Polarised Ultraviolet Absorption Spectra and Electronic Transitions of Poly-L-proline, *Biopolymers*, **1966**, 7, 614-618.
122. Young, M. and Pysh, E. S., Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism of Poly(L-proline) I and II, *J. Am. Chem.Soc.* **1975**, 97, 5100-5103.

123. Rucker, A. and Creamer, T., Polyproline II Helical Structure in Protein Unfolded States: Lysine Peptides Revisited, *Protein Science* **2002**, 11, 980-985.
124. Conti, F., Piatelli, M. and Viglino, P., NMR Studies in Solution of Poly-L-proline, *Biopolymers* **1969**, 7, 411-415.
125. Wu, C. C., Komoroski, A. and Mandelkern, L., The Observation of Cis Residues in Poly(L-proline) in Aqueous Solution, *Macromolecules* **1975**, 8, 635-637.
126. Muller, D., Stulz, J. and Kricheldorf, H. R., FT-IR and <sup>13</sup>C NMR CP/MAS investigation of the helix stability of solid poly(L-proline)s, *Macromol. Chem.* **1984**, 185, 1736-1749.
127. Berger, A., Kurtz, J. and Katchalski, E., Poly-L-Proline, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 5552-5554.
128. Fasman, G. D and Blout, E. R., High Molecular Weight Poly-L-Proline: Synthesis and Physical-Chemical Studies, *Biopolymers* **1963**, 1, 3-14.
129. Kim, K. Y., Komoto, T. and Kawai, T., Crystallization of Poly(L-proline) in the Course of Polymerization, *Macromol. Chem.* **1979**, 180, 465-472.
130. Lizuka, Y., Uchida, C., Wakamatsu, K. and Oya, M., Synthesis and Properties of High Molecular Weight Polypeptides Containing Proline, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, 66, 1269-1272.
131. Gulin, O. P., Rabanal, F. and Giralt, E., Efficient Preparation of Proline N-Carboxyanhydride Using Polymer-Supported Bases, *Org.Lett.* **2006**, 23, 5385-5388.
132. Fisher, P. M., Diketopiperazines in Peptide and Combinatorial Chemistry, *J. Peptide Sci.* **2003**, 9, 9-35.
133. Miyazawa, T., Normal Vibrations of Monosubstituted Amides in the Cis Configuration and Infrared Spectra of Diketopiperazines, *J. Mol. Spec.* **1960**, 4, 155-167.

134. Hadjichristidis, N., Iatrou, H., Pispas S. and Pitsikalis, M., Anionic Polymerization: High Vacuum Techniques, *J. Polym. Sci.* **2000**, Part A, 38, 3211-3224.
135. Riddick, J. and Bunger, W., *Organic solvents: physical properties and methods of purification*, Έκδοση 3<sup>η</sup>, Τόμος 2<sup>ος</sup>, Wiley-Interscience, New York **1970**.
136. Hirschmann, R., Schwam, H., Strachan, R. G., Schoenewaldt, E. F., Barkemeyer, H., Miller, S., Conn, J. B., Garsky, V., Veber, D. and Denkwalter, R. G., Controlled Synthesis of Peptides in Aqueous Medium. VIII. Preparation and Use of Novel  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2746-2754.
137. Block, H., *Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) and Other Glutamic Acid Containing Materials*, Έκδοση 1<sup>η</sup>, Gordon and Breach, New York **1983**.
138. Eckert, H. and Forster, B., Triphosgene, A Crystalline Phosgene Substitute, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, 26, 894-895.
139. Daly, W.; Poche, D., The Preparation of N-Carboxyanhydrides of  $\alpha$ -Amino Acids Using Bis(trichloromethyl)carbonate, *Tetr. Lett.* **1988**, 29, 5859-5862.
140. Cotarca, L., Delogu, P., Nardelli, A. and Sunjic, V., Bis(trichloromethyl) Carbonate in Organic Synthesis, *Synthesis* **1996**, 557-576.
141. Wilder, R. and Mobashery, S., The Use of Triphosgene in Preparation of N-Carboxy  $\alpha$ -Amino Acid Anhydrides, *J. Org. Chem* **1992**, 57, 2755-2756.
142. Poche, D., Moore, M. J. and Bowles, J. L., An Unconventional Method for Purifying the N-Carboxyanhydride Derivatives of  $\gamma$ -Alkyl-L-Glutamates, *Synth. Comm.* **1999**, 29, 843-854.
143. Gkikas, M., Iatrou, H., Thomaidis, N. S., Alexandridis, P. and Hadjichristidis, N., Well-Defined Homopolypeptides, Copolypeptides, and Hybrids of Poly(L-proline), *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 2396.

144. (a) Kurtz, J., Fasman, G. D., Berger, A. and Katchalski, E., Poly-Hydroxy-L-proline, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 393-397. (b) Kawasaki, T. and Komai, T., Poly(O-acyl-Hydroxy-L-proline). I. Synthesis and Polymerization of O-Acetyl-, Butyryl-, Hexanoyl-, Dodecanoyl-, and Benzoyl-Hydroxy-L-proline, *Polymer Journal* **1983**, *15*, 743-751.
145. Rodriguez-Hernandez, J. and Klok, H. A., Synthesis and Ring-Opening (co)polymerization of L-Lysine N-Carboxyanhydrides Containing Labile Side-Chain Protective Groups, *J. Pol. Sci.* **2003**, Part A, *41*, 1167-1187.
146. Deming, T. and Curtin, S. A., Chain Initiation in Cobalt and Nickel-Mediated Polypeptide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5710-5717.
147. (a) Zhang, Y., Li, J., Shen, Y., Wang, M. and Li, J., Poly-L-Lysine Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 15343-15346. (b) Tang, H. and Zhang, D., Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes from Surface-Initiated Ring-Opening Polymerizations of N-Carboxylanhydride, *J. Polym. Sci. Part A: Polymer Chemistry* **2010**, *48*, 2340-2350. (c) Yao, Y., Wenwen, L., Wang, S., Yan, D. and Chen, X., Polypeptide Modification of Multiwalled Carbon Nanotubes by a Graft-From Approach, *Macromol. Rapid. Commun.* **2006**, *27*, 2019-2025.
148. (a) Salzmann, C. G., Ward, M. A. H., Jacobs, R. M. J., Tobias, G. and Green, M. L. H., Interaction of Tyrosine-, Tryptophan-, and Lysine-Containing Polypeptides with Single-Wall Carbon Nanotubes and Its Relevance for the Rational Design of Dispersing Agents, *J. Phys. Chem C* **2007**, *111*, 18520-18524. (b) Salzmann, C. G., Lee, G. K.-C., Ward, M. A. H., Chu, B. T. T. and Green, M. L. H., Highly Hydrophilic and Stable Polypeptide/Single-Wall Carbon Nanotube Conjugates, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1977-1983. (c) Li, C., Adamcik, J., Zhang, A. and Mezzenga, R., Twofold pH and Temperature Stimuli-Responsive Behaviour in Block Copolypeptide-Decorated Single Wall Carbon Nanotubes, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 262-264.

149. (a) Turkevich, J., Stevenson, P. C. and Hillier, J., A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 55-75. (b) Fievet, F., Lagier, J. P. and Figlarz, M., Preparing Monodisperse Metal Powders in Micrometer and Submicrometer Sizes by the Polyol Process, *MRS Bull.* **1989**, *14*, 29-34. (c) Sun, Y. and Xia Y., Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles, *Science* **2002**, *298*, 2176-2179. (d) Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. and Whyman, R., Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a Two-Phase Liquid-Liquid system, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 801-802.
150. (a) Leff, D. V., Brandt, L. and Heath, J. R., Synthesis and Characterization of Hydrophobic Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines, *Langmuir* **1996**, *12*, 4723-4730. (b) Brown, L. O. and Hutchison, J. E., Controlled Growth of Gold Nanoparticles during Ligand Exchange, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 882-883. (c) Brown, L. O. and Hutchison, J. E., Formation and Electron Diffraction Studies of Ordered 2-D and 3-D Superlattices of Amine-Stabilized Gold Nanocrystals, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8911-8916. (d) Sastry, M., Kumar, A. and Mukherjee, P., Phase Transfer of Aqueous Colloidal Gold Particles into Organic Solutions Containing Fatty Amine Molecules, *Colloids Surf. A* **2001**, *181*, 255-259.
151. (a) Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. and Whyman, R., Synthesis of Thiol-derivatized Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 801-802. (b) Cossaro, A., Mazzarello, R., Rousseau R., Casalis, L., Verdini A., Kohlmeyer, A., Floreano, L., Scandolo, S., Morgante, A., Klein, M. L. and Scoles, G., X-ray Diffraction and Computation Yield the Structure of Alkanethiols on Gold(111), *Science* **2008**, *321*, 943-946.
152. (a) Selvakannan, P. R., Mandal, S., Pasricha, R., Adyantaya, S. D. and Sastry, M., One-step Synthesis of Hydrophobized Gold Nanoparticles of Controllable Size by the Reduction of Aqueous Chloroaurate Ions by Hexadecylaniline at the Liquid-Liquid Interface, *Chem. Commun.* **2002**,

- 13, 1334-1335. (b) Kumar, A., Mandal, S., Selvakannan, P. R., Pasricha, R., Mandale, A. B. and Sastry, M., Investigation into the Interaction between Surface-Bound Alkylamines and Gold Nanoparticles, *Langmuir* **2003**, *19*, 6277-6288.
153. (a) Alexandridis, P., Gold Nanoparticle Synthesis, Morphology Control, and Stabilization Facilitated by Functional Polymers, *Chem. Eng. Technol.* **2011**, *34*, 15-28. (b) Alexandridis, P. and Tsianou, M., Block Copolymer-directed Metal Nanoparticle Morphogenesis and Organization, *Eur. Pol. J.* **2011**, *47*, 569-583.
154. (a) Longerberger L. and Mills, G., Formation of Metal Particles in Aqueous Solutions by Reactions of Metal Complexes with Polymers, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 475-478. (b) Iwamoto M., Kuroda, K., Zaporozhchenko, V., Hayashi, S. and Faupel, F., Production of Gold Nanoparticles-Polymer Composite by Quite Simple Method. *Eur. Phys. J.* **2003**, *24*, 365-367. (c) Sakai, T. and Alexandridis, P., Single-Step Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles in Aqueous Pluronic Block Copolymer Solutions at Ambient Temperature, *Langmuir* **2004**, *20*, 8426-8430. (d) Sakai, T. and Alexandridis, P., Mechanism of Gold Metal Ion Reduction, Nanoparticle Growth and Size Control in Aqueous Amphiphilic Block Copolymer Solutions at Ambient Conditions, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 7766-7777. (e) Sakai, T. and Alexandridis, P., Ag and Au Monometallic and Bimetallic Colloids: Morphogenesis in Amphiphilic Block Copolymer Solutions, *Chem. Mat.* **2006**, *18*, 2577-2583.
155. (a) Hoppe, C. E., Lazzari, M., Pardinias-Blanco, I. and Lopez-Quintela, M. A., One-Step Synthesis of Gold and Silver Hydrosols Using Poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) as a Reducing Agent, *Langmuir* **2006**, *22*, 7027-7034. (b) Xu, J., Li, S., Weng, J., Wang, X., Zhou, Z., Yang, K., Liu, M., Chen, X., Cui, Q., Cao, M. and Zhang, Q., Hydrothermal Syntheses of Gold Nanocrystals: From Icosahedral to Its Truncated Form, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 277-284.

156. Sardar, R., Park, J-W. and Shumaker-Parry, J. S., Polymer-Induced Synthesis of Stable Gold and Silver Nanoparticles and Subsequent Ligand Exchange in Water, *Langmuir* **2007**, *23*, 11883-11889.
157. Hussain, I., Brust, M., Papworth, A. J. and Cooper, A. I., Preparation of Acrylate-Stabilized Gold and Silver Hydrosols and Gold-Polymer Composite Films, *Langmuir* **2003**, *19*, 4831-4835.
158. (a) Ishi, T., Otsuka, H., Kataoka, K. and Nagasaki, Y., Preparation of Functionally PEGylated Gold Nanoparticles with Narrow Distribution through Autoredution of Auric Cation by  $\alpha$ -Biotinyl-PEG-*block*-[poly(2-(*N,N*-dimethylamino)ethylmethacrylate)], *Langmuir* **2004**, *20*, 561-564. (b) Yuan, J., Shmid, A., Armes, S. P. and Lewis, A. L., Facile Synthesis of Highly Biocompatible Poly(2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine)-Coated Gold Nanoparticles in Aqueous Solution, *Langmuir* **2006**, *22*, 11022-11027.
159. (a) Shao, Y., Jin, Y. and Dong, S., Synthesis of Gold Nanoplates by Aspartate Reduction of Gold Chloride, *Chem. Commun.* **2004**, *9*, 1104-1105. (b) Mitra, R. N. and Das, P. K., In situ Preparation of Gold Nanoparticles of Varying Shape in Molecular Hydrogel of Peptide Amphiphiles, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 8159-8166. (c) Selvakannan, PR., Swami, A., Srisathiyannarayanan, D., Shirude, P. S., Pasricha, R., Mandale, A. B. and Sastry, M., Synthesis of Aqueous Au Core-Ag Shell Nanoparticles Using Tyrosine as a pH-Dependent Reducing Agent and Assembling Phase-Transferred Silver Nanoparticles at the Air-Water Interface, *Langmuir* **2004**, *20*, 7825-7836.
160. (a) Wong, M. S., Cha, J. N., Choi, K-S., Deming, T. and Stucky, G. D., Assembly of Nanoparticles into Hollow Spheres Using Block Copolypeptides, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 583-587. (b) Murthy, V. S., Cha, J. N., Stucky, G. D. and Wong, M. S., Charge-Driven Flocculation of Poly(L-lysine)s Gold Nanoparticle Assemblies Leading to Hollow Microspheres, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5292-5299.

161. Faraday, M., Experimental Relations of Gold (and other Metals) to Light, *Philosophical Transactions of the Royal Society*, **1857**, 147, 145-181.
162. Cotton, F. A., Wilkinson, G., Murillo, C. A. and Bochmann, M., *Advanced Inorganic Chemistry*, Έκδοση 6<sup>η</sup>, Μέρος 3, Κεφάλαιο 18.1.8, John Wiley & Sons, New York **1999**.
163. (a) Murahashi, S-I., Naota, T., Kuwabara, T., Saito, T., Kumobayashi, H. and Akutagava, S., Ruthenium-Catalyzed Oxidation of Amides and Lactams with Peroxides, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7820-7822. (b) Iley, J., Tolando, R. and Constantino, L., Chemical and Microsomal Oxidation of Tertiary Amides: Regio- and Stereoselective Aspects, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **2001**, 1299-1305.
- 164.** Podstawka, E., Ozaki, Y. and Proniewicz, L. M., Surface-Enhanced Raman Scattering of Amino Acids and Their Homodipeptide Monolayers Deposited onto Colloidal Gold Surface, *Applied Spectroscopy*, **2005**, 59, 1516-1526.
165. (a) Chen, J. T., Thomas, E. L., Ober, C. K. and Hwang, S. S., Zigzag Morphology of a Poly(styrene-*b*-hexyl isocyanate) Rod-Coil Block Copolymer, *Macromolecules* **1995**, 28, 1688-1697. (b) Chen, J. T., Thomas, E. L., Ober, C. K. and Mao, J. P., Self-Assembled Smectic Phases in Rod-Coil Block Copolymers, *Science* **1996**, 273, 343-346.