



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Επίδραση της αρχιτεκτονικής στην αυτοοργάνωση  
αμφίφιλων υβριδικών τετραπολυμερών του τύπου PEO-b-  
(PHIS-co-PBLG)-b-PLL. Μελέτη εγκλωβισμού και  
αποδέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου Everolimus.**

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΗ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΥΛΙΚΩΝ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΜΑΙΟΣ 2016**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Επίδραση της αρχιτεκτονικής στην αυτοοργάνωση αμφίφιλων υβριδικών τετραπολυμερών του τύπου PEO-b-(PHIS-co-PBLG)-b-PLL. Μελέτη εγκλωβισμού και αποδέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου Everolimus.

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΗ**

**A.M.:141004**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 28/06/2016**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση δυο αμφίφιλων υβριδικών τρισυσταδικών τετραπολυμερών του τύπου PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL με μοναδική διαφορά τη μακρομοριακή αρχιτεκτονική του PEO: Στο ένα το PEO είναι γραμμικό, ενώ στο άλλο είναι διακλαδισμένο, με δύο κλάδους και ίδιο συνολικό μοριακό βάρος με το γραμμικό. Εξετάστηκε η επίδραση της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής στην αυτοοργάνωση των δυο πολυμερών Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των μονομερών (His NCA,  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA, PLL NCA) και η επιτυχής σύνθεση τους επαληθεύτηκε με την τεχνική του IR και NMR. Για την πραγματοποίηση των πολυμερισμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ROP των NCA των αντίστοιχων αμινοξέων σε συνδυασμό με τη χρήση των τεχνικών υψηλού κενού. Στη συνέχεια, όλα τα πολυμερή χαρακτηρίστηκαν με τις τεχνικές του GPC, NMR και IR. Με τη τεχνική του SLS παρατηρήθηκαν δομές μικκυλίων για το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή ενώ, βρέθηκε η μορφολογία των κυστιδίων για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή όπου με τη τεχνική του DLS μελετήθηκε η αυτοοργάνωση τους και η απόκριση τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες (25°C, 37°C, 40°C, 45°C) και pH (5.0, 6.5, 7.4). Τέλος, μελετήθηκε ο εγκλωβισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου Everolimus σε αυτοοργανούμενες κυστιδιακές δομές, αποτελούμενες από το τρισυσταδικό τετραπολυμερές PEO<sub>2</sub>-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL. Ο εγκλωβισμός σε αυτούς τους βιοσυμβατούς πολυμερικούς «μεταφορείς» πραγματοποιήθηκε με σκοπό η απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας στον οργανισμό να γίνεται στοχευμένα στα καρκινικά κύτταρα, με ελεγχόμενο τρόπο και αργό ρυθμό αποδέσμευσης, χωρίς την εκδήλωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών που μπορεί να εμφανίσει το φάρμακο κατά τη λήψη του σε μορφή δισκίου.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Βιοπολυμερή

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** αμφίφυλα πολυεπεπίδια, N-καβοξυ ανυδρίτες, τρισυσταδικά τετραπολυμερή, κυστίδια, μικκύλια, everolimus, εγκλωβισμός και μεταφορά φαρμάκων

## ABSTRACT

In the present research project is presented the synthesis of two amphiphilic hybrid triblock quarterpolymers of the type PEO-*b*-(PHis-*co*-PBLG)-*b*-PLL. The only difference between the two polymers was the macromolecular architecture: In one the PEO was branched, while in the other was linear. We studied the influence of the macromolecular architecture on the self-assembly properties. First, we studied the synthesis of the monomers (His NCA,  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA, PLL NCA) and successful synthesis verified by IR and NMR techniques. The ROP method for the polymerization of the NCAs of the aminoacids took place in combination with the use of high vacuum techniques. Subsequently, all polymers were characterized with GPC, NMR and IR techniques. With the technique of SLS we obtained core-shell micelles for the linear polymer, while we observed vesicles for the branched. Using the DLS technique we studied their self-assembly, at different temperatures (25°C, 37°C, 40°C, 45°C) and pH (5.0, 6.5, 7.4). Finally, we studied the encapsulation of the anticancer drug Everolimus into self-assembled vesicular structures consisting of the branched quarterpolymer PEO<sub>2</sub>-*b*-(PHis-*co*-PBLG)-*b*-PLL. The encapsulation in these biocompatible polymeric <<nanocarriers>> was structured so that the release of the pharmaceutical substance in the system will occur at the cancer cells solely, in controlled manner and at slow release rate, without the presence of undesired side effects that can appear the oral intake of the drug as a tablet.

**SUBJECT AREA:** Biopolymers

**KEYWORDS:** amphiphilic polypeptides, NCAs, triblock tertrapolymers, vesicles, micelles, everolimus, drug encapsulation and delivery.



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ερμόλαο Ιατρού που με έκανε δεκτή στο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών «ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ» και για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβουλή του στην ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Σκουλά, για τη συνεργασία μας, την πολύτιμη βοήθεια του, τις συμβουλές του και για την άρτια επιστημονική στήριξη και εμπιστοσύνη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές του εργαστηρίου, Μαρίνο Πιτσικάλη και κ. Γιώργο Σακελλαρίου, για τις γνώσεις που μας παρείχαν κατά τη διάρκεια των μαθημάτων αλλά και συνολικά στο διάστημα της παραμονής μου στο εργαστήριο.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>16</b>
<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b> .....	<b>17</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>17</b>
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ι</b> .....	<b>19</b>
2.1 ΒΙΟΜΟΡΙΑ.....	19
2.2 Τα πεπτιδία και οι δομικές τους μονάδες.....	20
2.2.1 Δομή των πεπτιδίων .....	20
A. Πεπτιδικός δεσμός( Πρωτοταγής δομή).....	20
B. Τα τέσσερα διαφορετικά επίπεδα δομής της πρωτεΐνης.....	21
2.3 Πολυπεπτιδία μέσω << ζωντανού >> πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) N-καρβοξυανυδριτών.....	24
2.3.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (R.O.P) .....	24
2.3.2 Κανονικός μηχανισμός αμινών (NAM=Normal amine mechanism).....	25
2.3.3 Μηχανισμός του Blout.....	27
2.3.4 Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM) .....	28
2.4 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Ιστιδίνη.....	29
2.5 Προστατευτικές ομάδες .....	32
2.5.1 Προστασία α-Αμινομάδας .....	33
<b>3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Τεχνολογία Στοχευμένης Μεταφοράς Φαρμάκων (Targeted “Smart” Drug Delivery)</b> .....	<b>37</b>
3.1 Νανοεπιστήμες και νανοτεχνολογία.....	37
3.2 Ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων (controlled drug delivery) .....	39
3.2.1 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Συστημάτων Φορέα Φαρμάκων Drug Delivery System .....	41
A. Το ιδανικό drug delivery system .....	41
B. Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα της ελεγχόμενης αποδέσμευσης.....	41

3.3	Μικκύλια-κυστίδια .....	42
3.4	Αποκρίσιμα πολυμερή .....	43
3.4.1	Θέρμο-αποκρίσιμα πολυμερή .....	44
3.4.2	Ευαίσθητα Πολυμερή στο pH.....	45
3.5	Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία .....	46
3.5.1	Πολυαιθυλενοξειδίο (PEO ή PEG) .....	46
3.5.2	Πολύ(Ιστιδίνη).....	48
3.5.3	Everolimus-Μηχανισμός παρενέργειες .....	50
3.6	Διαπίδυση (Dialysis) .....	51
<b>4.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ4 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ .....</b>	<b>53</b>
4.1	Εισαγωγή.....	53
4.2	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography) ....	53
4.3	Φασματομετρία Υπερύθρου (FTIR).....	56
4.4	Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) .....	57
4.5	Στατική Σκέδαση Φωτός (SLS).....	58
4.6	Z-Δυναμικό (Z-Potential) .....	61
4.7	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) .....	62
4.8	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (TEM) .....	64
<b>5.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>67</b>
	<b>Σύνθεση και χαρακτηρισμός πολυμερών .....</b>	<b>67</b>
5.1	Τεχνική υψηλού κενού .....	67
5.2	Καθαρισμός Διαλυτών .....	69
5.3	Σύνθεση και καθαρισμός N-Καρβοξυανυδριτών .....	71
5.3.1	Σύνθεση Nim-Trt-L-Histidine NCA.....	71
5.3.2	Σύνθεση N <sup>ε</sup> -Boc-L-Lys NCA.....	77
5.3.3	Σύνθεση γ-Bz-L-Glutamate NCA.....	84

5.4	Σύνθεση γραμμικού τρισυσταδικού τετραπολυμερούς PEO- <i>b</i> -(His- <i>co</i> -PBLG)- <i>b</i> -PLL .....	87
5.4.1	Εισαγωγή.....	87
5.5	Σύνθεση διακλαδισμένου τρισυσταδικού τετραπολυμερούς PEO <sub>2</sub> - <i>b</i> -(His- <i>co</i> -PBLG)- <i>b</i> -PLL .....	101
5.5.1	Εισαγωγή.....	101
5.5.2	Παραγωγή του μακροαπαρχητή (PEO) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> .....	102
5.6	Προετοιμασία των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για DLS .....	112
5.7	Εγκλωβισμός φαρμάκου Everolimus στο πολυμερές PEO <sub>2</sub> - <i>b</i> -(PHis- <i>co</i> -PBLG)- <i>b</i> -PLL .....	113
<b>6.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>115</b>
6.1	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης .....	115
6.2	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Στατικής Σκέδασης .....	127
6.3	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική του ζ-Δυναμικού.....	131
6.4	Μελέτη αποδέσμευσης του Everolimus .....	133
6.5	Συμπεράσματα – Μελλοντικοί Στόχοι .....	137
<b>7.</b>	<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ .....</b>	<b>139</b>
<b>8.</b>	<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....</b>	<b>141</b>
<b>9.</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</b>	<b>142</b>
<b>10.</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....</b>	<b>145</b>
<b>11.</b>	<b>Αναφορές .....</b>	<b>149</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομή α-έλικα.....	22
Εικόνα 2: Δομή β- φύλλου.....	23
Εικόνα 3: Η κλίμακα μεγέθους διαφόρων φυσικών και τεχνητών αντικειμένων.....	37
Εικόνα 4: Γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις περιπτώσεις: (a) συμβατικής μεθόδου χορήγησης φαρμάκων, (b) Ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων.....	40
Εικόνα 5: Δομές οργανωμένων υπερμοριακών συστημάτων : τα μικκύλια (A) και τα κυστίδια (B).....	43
Εικόνα 6: Ο συντακτικός τύπος του φαρμάκου Everolimus.....	50
Εικόνα 7: Τα μόρια της πρωτεΐνης (κόκκινα) παραμένουν μέσα στη σακούλα διαπίδωσης ,ενώ τα μικρά μόρια(μπλέ) διαχέονται κατά την κατεύθυνση της βαθμίδωσης συγκέντρωσης τους προς το διάλυμα που περιβάλλει τη μεμβράνη.....	52
Εικόνα 8: Χρωματογράφος αποκλεισμού μεγεθών.....	54
Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της διπλοστιβάδας και του ζ-δυναμικού.....	61
Εικόνα 10: Σχηματικό διάγραμμα φασματομέτρου NMR.....	64
Εικόνα 11: Σχηματική παράσταση ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.....	66
Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση γραμμής υψηλού κενού.....	67
Εικόνα 13: Αντλία διαχύσεως υδραργύρου.....	68
Εικόνα 14: Φάσμα IR της Nim-Trt-L-Histidine NCA.....	76
Εικόνα 15: Φάσμα NMR της Nim-Trt-L-Histidine NCA.....	77
Εικόνα 16: Οξικός αιθυλεστέρας μετά από αντίδραση με πεντοξειδίο του φωσφόρου.....	79
Εικόνα 17: Φάσμα IR του τελικού προϊόντος N <sup>ε</sup> -Boc-L-Lys NCA.....	83
Εικόνα 18: Φάσμα NMR του προϊόντος N <sup>ε</sup> -Boc-Lys NCA.....	84
Εικόνα 19: Φάσμα IR της γ-Bz-L-Glutamate NCA.....	87
Εικόνα 20: Απόσταξη βενζολίου στη συσκευή πολυμερισμού που περιέχει PEO (εργαστήριο).....	90
Εικόνα 21: Φάσμα IR του PEO- <i>b</i> -(His- <i>co</i> -PBLG)μετά τον πολυμερισμό.....	92
Εικόνα 22: Φάσμα IR του PEO- <i>b</i> -(His- <i>co</i> -PBLG)- <i>b</i> -PLL μετά τον πολυμερισμό.....	94
Εικόνα 23: Διήθηση του πολυμερούς στο χωνί Buchner.....	95
Εικόνα 24: Αποπροστασία του πολυμερούς με TFA (A) και dialysis σε μεμβράνη 3500MB (B).....	98
Εικόνα 25: Απομάκρυνση του H <sub>2</sub> O από το πολυμερές με την τεχνική freeze drying.....	99
Εικόνα 26: Φάσμα IR του PEO- <i>b</i> -(PHis- <i>co</i> -PBLG)- <i>b</i> -PLL μετά την αποπροστασία.....	99
Εικόνα 27: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του PEO- <i>b</i> -(PHis- <i>co</i> -PBLG)- <i>b</i> -PLL.....	100
Εικόνα 28: Α) Πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή Β) Πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή.....	101

Εικόνα 29: Φάσμα IR του PEO <sub>2</sub> - <i>b</i> -(PHis- <i>co</i> -PBLG) μετά τον πολυμερισμό. ....	106
Εικόνα 30: Φάσμα IR του PEO <sub>2</sub> - <i>b</i> -(PHis- <i>co</i> -PBLG)- <i>b</i> -PLL μετά τον πολυμερισμό.....	107
Εικόνα 31: Φάσμα IR του PEO <sub>2</sub> - <i>b</i> -(PHis- <i>co</i> -PBLG)- <i>b</i> -PLL μετά την αποπροστασία. ...	109
Εικόνα 32: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του PEO <sub>2</sub> - <i>b</i> -(PHis- <i>co</i> -PBLG)- <i>b</i> -PLL.....	110
Εικόνα 33: Φάσμα NMR του PEO <sub>2</sub> - <i>b</i> -(PHis- <i>co</i> -PBLG)- <i>b</i> -PLL. ....	111
Εικόνα 34: Απεικόνιση διαπίδυσης πολυμερούς με φάρμακο- <i>buffer</i> σε pH= 6.5 και pH= 7.4 .....	114
Εικόνα 35: Διάλυμα πολυμερούς με γραμμικό μακροαπαρχητή και διάλυμα πολυμερούς με διακλαδισμένο μακροαπαρχητή για μετρήσεις του DLS.....	116
Εικόνα 36: Γράφημα προσδιορισμού του Z-Δυναμικού σε (mV) για το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή .....	132
Εικόνα 37: Γράφημα προσδιορισμού του Z-Δυναμικού σε (mV) για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή.....	132
Εικόνα 38: Καμπύλη βαθμονόμησης των προτύπων δειγμάτων. ....	133
Εικόνα 39: Δείγματα κατά τη διάρκεια της απελευθέρωσης του φαρμάκου με το χρόνο σε διαφορετικά pH (6.5, 7.4).....	134
Εικόνα 40: Γραφική παράσταση του ποσοστού απελευθέρωσης του φαρμάκου Everolimus ως προς το χρόνο σε pH= 6.5 και 7.4. ....	135
Εικόνα 41: 3D απεικόνιση δείγματος φαρμάκου με χλωροφόρμιο σε σχέση με το χρόνο και με τους ανιχνευτές RI και UV. ....	136
Εικόνα 42: Φάσμα του φαρμάκου ως προς το χρόνο με δυο δείγματα τα οποία έχουν διαφορετική ποσότητα φαρμάκου.....	136
Εικόνα 43: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή σε pH=7.4 και T=37°C στις 90°(με φιλτράρισμα). ....	145
Εικόνα 44: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή σε pH=6.5 και T=37° στις 90° (με φιλτράρισμα). ....	145
Εικόνα 45: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή σε pH=5 και T=25°C στις 90°(χωρίς φιλτράρισμα). ....	146
Εικόνα 46: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=7.4 και T=37°C στις 90°(με φιλτράρισμα). ....	146
Εικόνα 47: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=6.5 και T=40°C στις 90°(με φιλτράρισμα). ....	147
Εικόνα 48: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=5 και T=45°C στις 90° (χωρίς φιλτράρισμα). ....	147
Εικόνα 49: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε T=37°C με εγκλωβισμό του φαρμάκου Everolimus (με φιλτράρισμα). ....	148

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σύνθεση πολυπεπτιδικής αλυσίδας.....	20
Σχήμα 2: Μηχανισμός διάνοιξης δακτυλίου των NCAs των α- αμινοξέων. ....	25
Σχήμα 3:Στάδιο έναρξης και στάδιο διάδοσης σύμφωνα με το μηχανισμό NAM .....	26
Σχήμα 4: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.....	28
Σχήμα 5: Στάδιο μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς.....	29
Σχήμα 6: Ο ιονισμός της ιστοδίνης .Η ιστοδίνης μπορεί να δεσμεύει και να απελευθερώνει πρωτόνια κοντά στο φυσιολογικό pH.....	48
Σχήμα 7: Αντίδραση σύνθεσης Nim-Trt-L-Histidine NCA.....	72
Σχήμα 8: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του N <sup>im</sup> -Trityl-His NCA. ..	76
Σχήμα 9:Πορεία σύνθεσης N <sup>ε</sup> -Boc-L-Lys NCA. ....	80
Σχήμα 10: Αντίδραση σύνθεσης γ-Bz-L-Glutamate NCA.....	85

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Δομές των ευρύτερα χρησιμοποιούμενων N-α προστατευτικών ομάδων ....	34
Πίνακας 2: Τιμές pH διαφορετικών ιστών. ....	46
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά πολυαιθυλενογλυκόλης. ....	47
Πίνακας 4: Μετρήσεις DLS, για πολυμερές με γραμμικό μακροαπαρχητή σε pH=6.5, 7.4, 5.0 και T=25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C. ....	116
Πίνακας 5: Μετρήσεις DLS για πολυμερές με διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=6.5, 7.4, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C. ....	120
Πίνακας 6: Μετρήσεις DLS για το πολυμερές το γραμμικό μακροαπαρχητή σε pH= 7.4, 6.5, 5 και T= 25°C, 37°C, 40°C, 45°C σε γωνία 90°.....	124
Πίνακας 7: Μετρήσεις DLS για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH= 7.4, 6.5, 5 και T= 25°C, 37°C, 40°C, 45°C σε γωνία 90° .....	125
Πίνακας 8: Μετρήσεις DLS για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=7.4 και T=37°C. ....	126
Πίνακας 9: Μετρήσεις SLS για πολυμερές με διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=6.5, 7.4, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C. ....	127
Πίνακας 10: Μετρήσεις SLS για το πολυμερές με μακροαπαρχητή γραμμικό σε pH=6.5, 7.4, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C. ....	129
Πίνακας 11: Μετρήσεις SLS για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε PH=7.4 και T=37°C.....	130
Πίνακας 12: Μετρήσεις του z-δυναμικού σε pH= 7.4 και T=25°C με διαλύτη H <sub>2</sub> O. ....	131

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Βιομηχανικής Χημείας (Τομέας Πολυμερών) του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη χρονική περίοδο 2014-2016, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ.Ερμόλαου Ιατρού.

Η εργασία αυτή έχει σκοπό τη σύνθεση πολυπεπτιδίων με οργάνωση τέτοια (μικκύλια, κυστίδια) όπου θα γίνεται ο εγκλωβισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου σε αυτούς τους βιοσυμβατούς πολυμερικούς «μεταφορείς» με σκοπό την απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας στον οργανισμό στοχευόμενα στα καρκινικά κύτταρα, με ελεγχόμενο τρόπο και αργό ρυθμό αποδέσμευσης, χωρίς την εκδήλωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών που μπορεί να εμφανίσει το φάρμακο κατά τη λήψη του σε μορφή δισκίου. Ελπίζω τα συμπεράσματα που διεξάχθηκαν από αυτή την έρευνα να δώσουν λύσεις σε αυτόν το τομέα της επιστήμης.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα πολυμερή είναι ένας από τους σημαντικότερους τομείς της Χημείας και η εικόνα αυτή πρόκειται να διατηρηθεί και στο ορατό μέλλον καθώς σε παγκόσμιο επίπεδο, τα πολυμερή αποτελούν έναν από τους πλέον εύρωστους βιομηχανικούς κλάδους με σχετικά υψηλούς ρυθμούς ετήσιας αύξησης. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν συντελεστεί, θεαματικές εξελίξεις στον τομέα των πολυμερών: Νέες μέθοδοι στη σύνθεση, τροποποίηση και μορφοποίηση των πολυμερών, νέα σύνθετα υλικά και υλικά υψηλών θερμομηχανικών επιδόσεων, νέα πολυμερικά υλικά με εξαιρετικές ηλεκτρικές και οπτικές ιδιότητες, υγροκρυσταλλικά πολυμερή, βιοσυμβατά και βιοποικοδομήσιμα πολυμερή, νέοι μέθοδοι χαρακτηρισμού των πολυμερών και άλλα. Έχει γίνει κοινή συνείδηση ότι η εποχή μας είναι η εποχή των πλαστικών αφού χρησιμοποιούνται σε τομείς υψηλής τεχνολογίας όπως η διαστημική, η μικροηλεκτρονική, η βιοτεχνολογία, η ιατρική και η νανοτεχνολογία ακόμα και μέλη και όργανα σώματος έχουν αντικατασταθεί από πολυμερικά υλικά [1]

Συγκεκριμένα τα πολυπεπτίδια τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο και εξαιτίας των ιδιοτήτων τους ανοίγουν νέους ορίζοντες καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τεχνολογία μεταφοράς φαρμάκων με εκλεκτική και ελεγχόμενη αποδέσμευση αυτών στους ιστούς που πάσχουν από καρκίνο αυξάνοντας το χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα και μειώνοντας τις παρενέργειες τους. Άλλωστε το γεγονός αυτό δεν είναι τυχαίο, αφού, οι πρωτεΐνες είναι φυσικά πολυμερή και έχουν την ικανότητα να οργανώνονται σε περίπλοκες τρισδιάστατες δομές.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση γραμμικών και διακλαδισμένων αμφίφυλων υβριδικών τετραπολυμερών του τύπου PEO-b-(PHIS-co-PBLG)-b-PPLL που θα μπορούν να φέρουν και να αποδεσμεύουν εκλεκτικά στους πάσχοντες ιστούς αντικαρκινικά φάρμακα (Everolimus). Η σύνθεση των πολυμερών έγινε με πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου [Ring Opening Polymerization (ROP)] N-καρβοξυανυδριτών αμινοξέων (NCA's). Η μέθοδος αυτή θεωρείται από τις πιο αποδοτικές, γρήγορες και οικονομικές τεχνικές και δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα στη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους.[2]

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα αμφίφυλα 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 [3],[4] διπλοστιβάδες και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ακόμα και κυστίδια.[5] Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικές μεμβράνες καθώς και ως πολυμερικοί φορείς για να διαλυτοποιήσουν υδρόφοβα φάρμακα (Everolimus)[6] αυξάνοντας τον χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα και οδηγώντας σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου στον οργανισμό.

Στην παρούσα εργασία σαν μακροαπαρχητής επιλέχθηκε το PEO αφού είναι βιοαποικοδομήσιμο, βιοδιασπώμενο και μη τοξικό καθώς και δεν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του αίματος. Η επιλογή της υδρόφοβης συστάδας πολυ-L(ιστιδίνη) έγινε με σκοπό να καταστήσει το σύστημα pH-αποκρινόμενο στην επιθυμητή περιοχή pH 5.0-6.5 που είναι το pH που έχουν τα καρκινικά κύτταρα. Το ποσοστό του PBLG ήταν 15% κατά μοι ως προς την ιστιδίνη αφού έχει παρατηρηθεί ότι σε αυτό το ποσοστό τη βοηθάει να είναι διαλυτή και το πολυμερές να έχει μικρό  $pK_a$ . Σαν υδρόφοβη συστάδα επιλέχθηκε η λυσίνη με μοριακό βάρος 15000 αφού παλιά είχαν λάβει χώρα αντίστοιχα πειράματα με μοριακό βάρος 7000, 25000, 45000. Έτσι επιλέχθηκε μια ενδιάμεση τιμή του μοριακού βάρους για να ερευνηθεί αν τελικά και το μοριακό βάρος επηρεάζει την αυτοοργάνωση των πολυμερών.

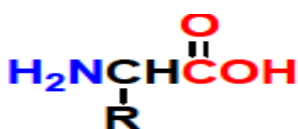
Ουσιαστικά η μόνη διαφορά στα δύο πολυμερή που συντέθηκαν ήταν ο μακροαπαρχητής και αυτό έγινε με σκοπό να ερευνηθεί αν η αρχιτεκτονική επηρεάζει την αυτοοργάνωση αμφίφυλων υβριδικών τετραπολυμερών του τύπου PEO-b-(PHIS-co-PBLG)-b-PLL. Τέλος έγιναν μελέτες των δομών που σχηματίζουν τα πολυμερή σε διαφορετικά pH και θερμοκρασίες για να παρατηρηθούν πως αυτοοργανώνονται και αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

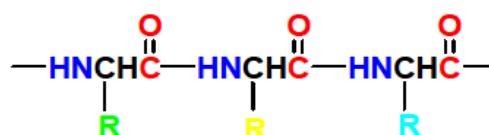
### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ I

#### 2.1 ΒΙΟΜΟΡΙΑ

Τα βιομόρια των κυττάρων διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τα μικρομόρια και τα μακρομόρια. Οι πρωτεΐνες είναι μια από τις τέσσερις κατηγορίες βιολογικών μακρομορίων μαζί με τα νουκλεικά οξέα, τους πολυσακχαρίτες και τα λιπίδια. Είναι μεγάλα βιομόρια που απαντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη πρωτεϊνών, τα οποία συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες.[1],[7],[8],[9] Λειτουργούν ως καταλύτες, μεταφέρουν και αποθηκεύουν άλλα μόρια, όπως οξυγόνο, παρέχουν μηχανική στήριξη και ανοσοπροστασία, δημιουργούν κίνηση, διαβιβάζουν νευρικές ώσεις και ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση. Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή και αποτελούνται από ένα μεγάλο αριθμό αμινοξέων, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με απολύτως καθορισμένη αλληλουχία σχηματίζοντας μια επιμήκη αλυσίδα.[7],[9],[10] Αλυσίδες με λιγότερα από 50 αμινοξέα ονομάζονται συχνά πεπτίδια, ενώ για τις μεγαλύτερες αλυσίδες χρησιμοποιείται ο όρος πρωτεΐνες. Στην περίπτωση πεπτιδίου μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων χρησιμοποιείται ο όρος πολυπεπτίδιο(πολυαμινοξύ) [11]



Αμινοξύ



Πεπτίδιο

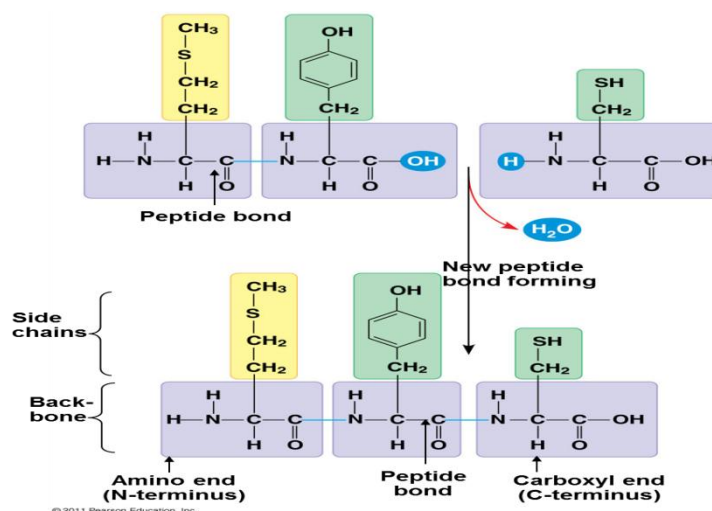
Η τεράστια ικανότητα των πολυπεπτιδίων για τη ρύθμιση της βιολογικής λειτουργίας έχει ενθαρρύνει την επιστημονική κοινότητα να αναπτύξει συνθετικές οδούς για την παρασκευή τους, τη μελέτη των ιδιοτήτων τους [11] και πάνω απ' όλα να κατανοήσουμε τη σχέση δομής-λειτουργίας του.[12],[13] Αυτό στη συνέχεια θα οδηγούσε σε διάφορες βιοϊατρικές εφαρμογές όπως στη βιοτεχνολογία (τεχνητή ιστών, εμφυτεύματα), και βιο-ανάλυση (βιοαισθητήρες, ιατρικές διαγνώσεις).[14],[15]

## 2.2 Τα πεπτιδία και οι δομικές τους μονάδες

### 2.2.1 Δομή των πεπτιδίων

#### A. Πεπτιδικός δεσμός( Πρωτοταγής δομή)

Τα μονομερικά στοιχεία των πολυμερών είναι τα αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με τον πεπτιδικό δεσμό ή αλλιώς αμιδικό δεσμό οι οποίοι είναι αρκετά σταθεροί κινητικά. Με λίγα λόγια όταν δυο αμινοξέα τοποθετούνται το ένα δίπλα στο άλλο κατά τρόπο ώστε η καρβοξυλοομάδα του ενός να βρίσκεται ακριβώς δίπλα στην αμινοομάδα του άλλου, τότε μπορούν να ενωθούν με αντίδραση αφυδάτωσης κατά την οποία αφαιρείται ένα μόριο νερού. Έτσι σχηματίζεται ένας ομοιοπολικός δεσμός που ονομάζεται πεπτιδικός δεσμός .Αν αυτή η διαδικασία επαναληφθεί πολλές φορές, τότε προκύπτει ένα πολυπεπτιδίο, ένα πολυμερές δηλαδή από πολλά αμινοξέα που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς. Στο ένα άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας υπάρχει μια ελεύθερη αμινοομάδα, ενώ στο αντίθετο άκρο υπάρχει μια ελεύθερη καρβοξυλοομάδα. Έτσι, η αλυσίδα έχει ένα αμινοτελικό άκρο (άκρο N) και ένα καρβοξυτελικό άκρο (άκρο C). Στην παρακάτω εικόνα η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία των ατόμων που απεικονίζεται με μωβ χρώμα ονομάζεται πολυπεπτιδικός σκελετός και οι διάφορες ομάδες ή άτομα που προεξέχουν από το σκελετό αυτό είναι παράπλευρες ομάδες των επιμέρους αμινοξέων. [8],[16]



Σχήμα 1: Σύνθεση πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

## **B. Τα τέσσερα διαφορετικά επίπεδα δομής της πρωτεΐνης**

Όσο περισσότερο γνωρίζουμε τη δομή μιας πρωτεΐνης τόσο περισσότερο κατανοούμε τη λειτουργία της. Παρά την πολύ μεγάλη ποικιλομορφία τους, όλες ανεξαρτήτως οι πρωτεΐνες διαθέτουν τρία διαδοχικά επίπεδα οργάνωσης στη δομή τους τα οποία είναι (α) η πρωτοταγής (β) η δευτεροταγής (γ) η τριτοταγής όμως όσες πρωτεΐνες αποτελούνται από δυο ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες εμφανίζουν και ένα τέταρτο επίπεδο το οποίο ονομάζεται τεταρτοταγής δομή. [8],[16],[17]

(α) Η **πρωτοταγής δομή** μιας πρωτεΐνης αναφέρεται στη σειρά (αλληλουχία) με την οποία τα αμινοξέα συντάσσονται στην πρωτεϊνική αλυσίδα και τις θέσεις που πιθανά υπάρχουν δισουλφιδικές γέφυρες. Η πρωτοταγής δομή είναι σημαντική και ακόμα και μια μικρή αλλαγή στην πρωτοταγή δομή μιας πρωτεΐνης μπορεί να επηρεάσει το σχήμα και τη λειτουργικότητα της.

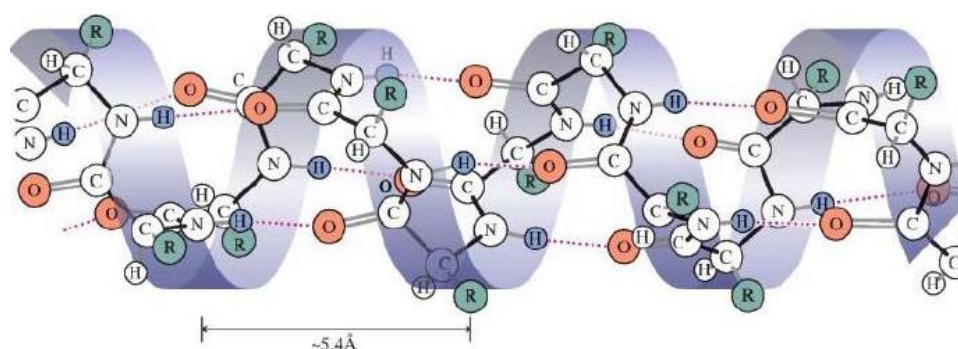
(β) Η δευτεροταγής δομή δίνει τον τρόπο με τον οποίο η πρωτεϊνική αλυσίδα (πρωτοταγής δομή) αναδιπλώνεται έτσι ώστε η πρωτεΐνη να έχει τη μεγαλύτερη σταθερότητα (δομή ελάχιστης ενέργειας). Οι κυριότεροι παράγοντες που καθορίζουν τη δευτεροταγή δομή είναι: οι δεσμοί H μεταξύ του O του καρβονυλίου με αμινομάδες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

Σύμφωνα με τον Linus Pauling και Robert Corey το 1951 δυο είναι οι τύποι δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, η **α-έλικα** και η **β-πτυχωτή επιφάνεια** ή **β-φύλλο**. [18]

### **❖ α-έλικα**

Η α-έλικα είναι μια σπειροειδής δομής ιδιαίτερης σημασίας, που συναντάμε πολύ συχνά σε πρωτεΐνες (~30%). [16] Συμμετέχει σε διάφορα μοτίβα δέσμησης του DNA όπως το 'φερμουάρ' λευκίνης (leucine zipper), μοτίβα έλικας-στροφής-έλικας και τα 'δάκτυλα' ψευδαργύρου (zinc fingers) διότι η διάμετρος της (1.2 nm, ανάλογα με τα αμινοξέα) ταιριάζει με την κύρια αύλακα της διπλής έλικας του DNA. Στην α-έλικα η πολυπεπτιδική

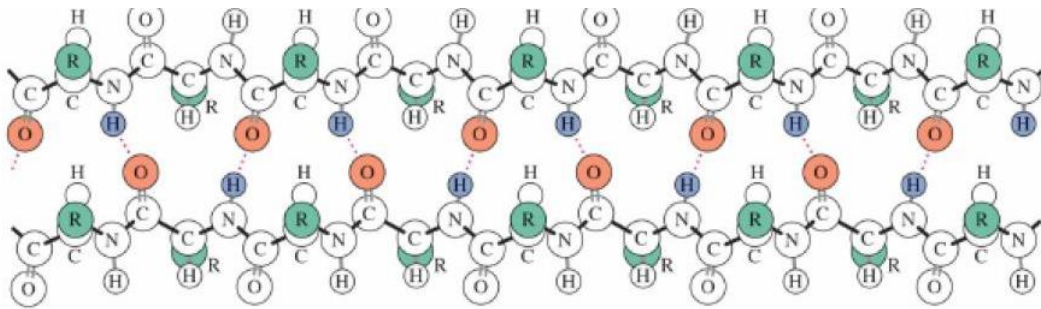
αλυσίδα σχηματίζει τον κορμό της έλικας και οι πλευρικές ομάδες εκτείνονται προς τα έξω. Η διαμόρφωση α-έλικας σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ  $-NH$  και  $-CO$  που απέχουν τέσσερα κατάλοιπα στην κύρια αλυσίδα με κάθε κατάλοιπο να απέχει από το επόμενο  $1,5 \text{ \AA}$  και να είναι στραμμένο  $100^\circ$  σε σχέση με τον κύριο άξονα ενώ το βήμα της έλικας είναι  $3,6$  αμινοξέα ( $5,4 \text{ \AA}$ ).[18],[23] Οι έλικες που σχηματίζουν τα L-αμινοξέα είναι μόνο δεξιόστροφες διότι είναι πιο ευνοούμενες ενεργειακά.[19],[20] Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι α-έλικες σε πολυπεπτίδια μεγάλου μήκους δεν είναι απόλυτα τέλειες αλλά περιέχουν «σπασίματα»(ατέλειες).[21] Η λυσίνη, η ιστιδίνη, το γλουταμικό, η αλανίνη και η λευκίνη είναι μερικά αμινοξέα που δημιουργούν δομή α-έλικας.[22]



Εικόνα 1: Δομή α-έλικα.

#### ❖ β-πτυχωτή ή β-φύλλο

Η β-φυλλοειδής μορφολογία είναι εξίσου σημαντικό συστατικό πολλών πρωτεϊνών.[24] Είναι μία δομή ανοικτή και επίπεδη με τους δεσμούς υδρογόνου να σχηματίζονται διαμοριακά μεταξύ  $-NH$  και  $-CO$  διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων στην ίδια αλυσίδα ενός β-φύλλου είναι περίπου  $0,35 \text{ nm}$  και μεταξύ γειτονικών αλυσίδων περίπου  $0,6 \text{ nm}$ . Γειτονικές αλυσίδες σε μία β-πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες) ή αντίθετη (αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες).[23],[24],[25] Η βαλίνη, η ισολευκίνη, η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη είναι μερικά από τα αμινοξέα που δημιουργούν δομή β-φύλλου.[9]



**Εικόνα 2: Δομή β- φύλλου.**

Η τάση ενός πεπτιδίου για δευτεροταγή δομή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση του σε αμινοξέα. Οι παραπάνω δευτεροταγής δομές συμβάλλουν σημαντικά στην αυτο-οργάνωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων υπερμοριακών δομών που βρίσκουν εφαρμογές στη φαρμακευτική και στη βιοϊατρική. [26]

**(γ)Η τριτοταγή δομή** περιγράφει τη δομή (σε τρεις διαστάσεις) της πρωτεΐνης στο χώρο. Η δομή αυτή καθορίζεται κατά κύριο λόγο από την πρωτοταγή δομή, αφού αυτή είναι υπεύθυνη για τα μόρια που εμπεριέχονται και τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται είναι ομοιπολικοί δεσμοί, ηλεκτροστατική έλξη, δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals.

**(δ)Η τεταρτοταγής δομή** περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο διαφορετικές αλυσίδες διευθετούνται μεταξύ τους. Όπως αναφέραμε και παραπάνω η δομή αυτή έχει έννοια μόνο όταν στο σχηματισμό της πρωτεΐνης συμμετέχουν περισσότερες από μια διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες ονομάζονται και υπομονάδες. Μια πρωτεΐνη με μια υπομονάδα (η οποία συνεπώς στερείται τεταρτοταγούς δομής) χαρακτηρίζεται ως μονομερής, μια άλλη με δυο διμερής και κατ' αντιστοιχία τριμερής, τεταμερής κλπ.[7],[17]

## 2.3 Πολυπεπτίδια μέσω << ζωντανού >> πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) N-καρβοξυανυδρυτών.

Τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες παίζουν σημαντικούς ρόλους στην καθημερινή μας ζωή. Είναι δομημένα από α-αμινοξέα συνδεδεμένα με αμιδικούς δεσμούς. Δυστυχώς, η σύνθεση φυσικών πολυπεπτιδίων (πρωτεϊνών) με καλά καθορισμένες αλληλουχίες αμινοξέων είναι αρκετά περιορισμένα με μικρό μοριακό βάρος πολυπεπτιδίων μικρών ποσοτήτων. Αυτό οφείλεται στη μέθοδο σύνθεσης γνωστή ως σύνθεση πεπτιδίων στερεάς φάσης (SPPS).[27],[28] Υπάρχει όμως μια άλλη μέθοδος, η οποία επιτρέπει τη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους αμινοξέων. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) του α-αμινοξέων-N-καρβοξυανυδρυτών(NCAs).[18]

Για να χαρακτηριστεί ένας πολυμερισμός «ζωντανός», πρέπει να πληρεί τις παρακάτω προϋποθέσεις: πλήρη κατανάλωση του μονομερούς (απόδοση 100%), γραμμικότητα του μοριακού βάρους με την απόδοση του πολυμερισμού, στοιχειομετρικό έλεγχο του μοριακού βάρους, μικρή κατανομή μοριακών βαρών ( $I=M_w/M_n < 1,1$ ), σύνθεση κατά συστάδες συμπολυμερών με τη διαδοχική προσθήκη μονομερών και το μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό των πολυμερών να προκαθορίζεται με ακρίβεια από τις ποσότητες του μονομερούς και του απαρχητή από τη σχέση  $M_n = \text{gr μονομερούς}$  .

mol απαρχητή

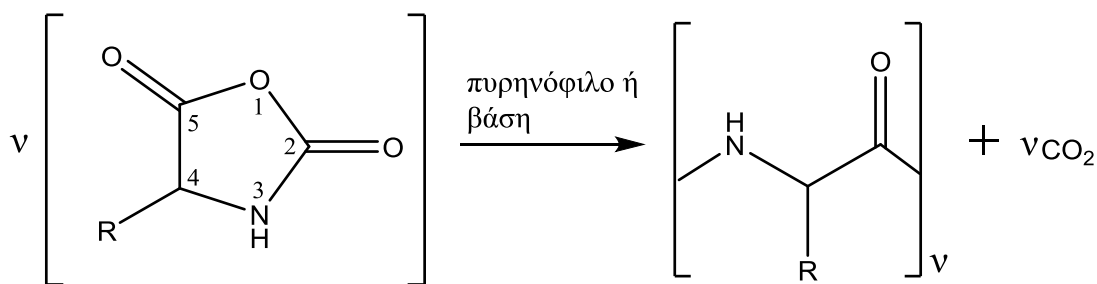
Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε ένα <<ζωντανό>> πολυμερισμό η ταχύτητα έναρξης είναι πολύ πιο μεγάλη από την ταχύτητα διάδοσης ( $u_e \gg u_d$ ) και δεν υπάρχει το στάδιο του τερματισμού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση προϊόντων με καλό έλεγχο της μακρομοριακής δομής, στενή κατανομή μοριακών βαρών και μεγάλη ομοιογένεια σύστασης.[29]

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

Από τα τέλη 1940 ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) α-αμινοξέων N-καρβοξυανυδρυτών (NCAs) θεωρείται η πιο οικονομική, εύκολη και γρήγορη τεχνική για τη σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει τα απλούστερα αντιδραστήρια και από αυτή λαμβάνονται πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους σε μεγάλες αποδόσεις και χωρίς ρακεμείωση.[18],[30],[31] Όμως τα κυριότερα



μειονεκτήματα της είναι η μικρή δυνατότητα ελέγχου της πολυδιασποράς και της αλληλουχίας των αμινοξέων (σε συμπολυτεππίδια).



**Σχήμα 2: Μηχανισμός διάνοιξης δακτυλίου των NCAs των α- αμινοξέων.**

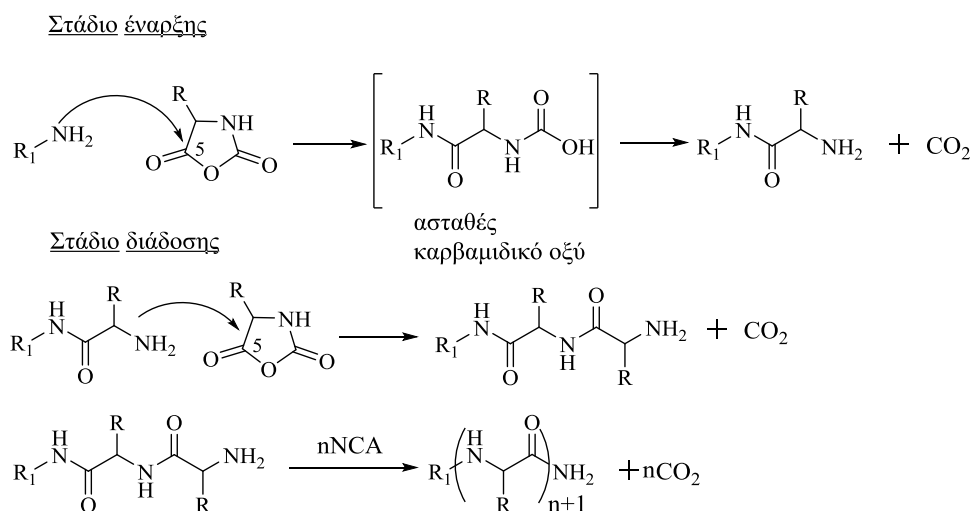
Σύμφωνα με το παραπάνω σχήμα κατά τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου μπορούμε να παρατηρήσουμε τον πολυμερισμό ενός N-καρβοξυανυδρίτη ενός α-αμινοξέως μέσω ενός απαρχητή.[18] Τα NCAs δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα συνθέτονται όμως εύκολα με αντίδραση του αντίστοιχου L-αμινοξέος και για τον πολυμερισμό τους συνήθως χρησιμοποιούνται ως απαρχητές. Η αντίδραση προχωρά με το σχηματισμό CO<sub>2</sub> και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους πρωτικές (πρωτοταγής και δευτεροταγής), αποπρωτικές (τριτοταγής) και βασικά άλατα.

Για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs έχουν προταθεί δυο μηχανισμοί τον κανονικό μηχανισμό αμινών (NAM=Normal amine mechanism) και το μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM=Active monomer mechanism). Ο πρώτος αποδόθηκε στον πολυμερισμό με πρωτοταγής αμίνες και πυρηνόφιλο απαρχητή και ο δεύτερος αποδόθηκε σε μεταλλοαλκοξειδία ή τεταρτοταγής αμίνες και βασικό απαρχητή. Καθοριστικό ρόλο για το ποιος από τους μηχανισμούς επικρατεί κάθε φορά παίζει ο λόγος πυρηνοφιλικότητας/βασικότητα του απαρχητή.[18]

### 2.3.2 Κανονικός μηχανισμός αμινών (NAM=Normal amine mechanism)

Αυτός ο μηχανισμός γενικά εφαρμόζεται για τον πολυμερισμό των NCAs που ξεκινούν με μη ιοντικούς απαρχητές έχοντας το τουλάχιστον ένα ενεργό άτομο υδρογόνου (βάση-H) όπως πρωτοταγής και δευτεροταγής αμίνες, αλκοόλες και νερό.

Οι γενικές αντιδράσεις οι οποίες εμπλέκονται στα στάδια της έναρξης και της διάδοσης δίνονται στο παρακάτω σχήμα:



**Σχήμα 3: Στάδιο έναρξης και στάδιο διάδοσης σύμφωνα με το μηχανισμό NAM**

Η έναρξη του πολυμερισμού βασίζεται στην πυρινόφιλη προσβολή του απαρχητή (βάση) το οποίο μεταφέρει το ασταθές υδρογόνο στον 5C του καρβονυλίου του NCA. Στη συνέχεια, το ενδιάμεσο ασταθές, καρβαμιδικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια νέα αμινομάδα η οποία θα συνεχίσει τον πολυμερισμό. Οι πρωτοταγής αμίνες (όπως η n-εξυλαμίνη) έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα αφού είναι περισσότερο πυρινόφιλες από τις αμινομάδες των αλυσίδων της διάδοσης.[32],[33],[34] Έτσι ο ρυθμός έναρξης είναι γρηγορότερος από τη διάδοση, οδηγώντας σε πολυπεπίδια με μικρή πολυδιασπορά ( $I = M_w/M_n$ ). Ο παραπάνω μηχανισμός ισχύει τόσο για τους N-μη υποκατεστημένους NCAs όσο και για τους N-υποκατετημένους NCAs.

Παράγοντες που προκαλούν αποκλίσεις από τη ζωντανή φύση του ROP αναφέρονται παρακάτω:[35 -45]

- Η ισορροπία καρβαμιδικό οξύ  $-CO_2$ , ο διαλύτης, η ύπαρξη νερού και άλλων προσμίξεων.
- Σύμφωνα με το Ballard όταν το καρβαμιδικό οξύ σχηματίσει αλάτι με την αμινομάδα της αναπτυσσόμενης αλυσίδας αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των αλυσίδων να συνεχίσουν τη διάδοση. Με χρήση του διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF) σαν διαλύτη εμποδίστηκε ο σχηματισμός αλατος αφού το DMF λόγω της μεγάλης οξύτητας του σε σχέση με το νιτροβενζόλιο μείωσε τη βασικότητα των ενεργών κέντρων των αμινομάδων.
- Η πίεση στην οποία συμβαίνει ο πολυμερισμός είναι ένας άλλος παράγοντας που εμποδίζει την αντίδραση να ακολουθήσει κινητική πρώτης τάξης. Υπό σταθερή πίεση το καρβαμιδικό οξύ είναι ασταθές και παρατηρήθηκαν κινητικές πρώτης

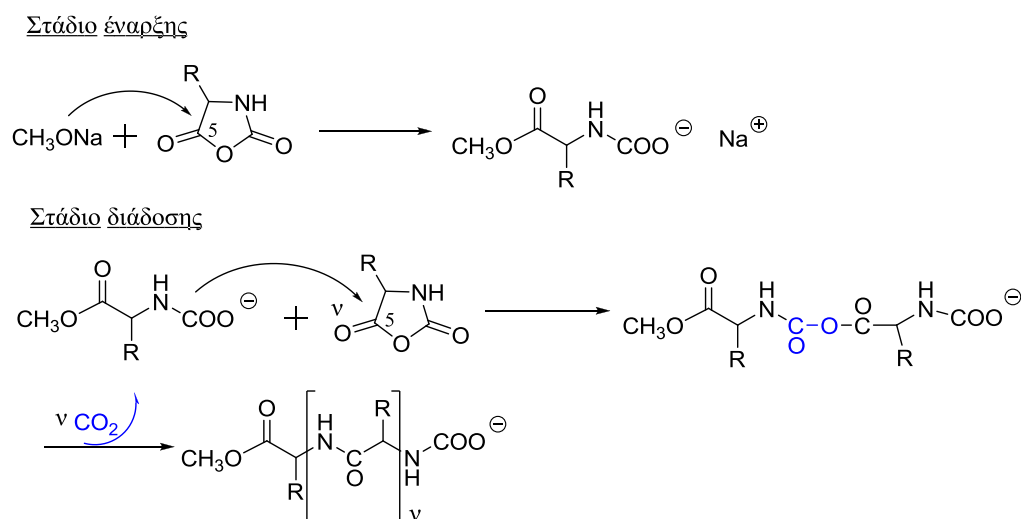
τάξης ενώ, όταν η αντίδραση λαμβάνει χώρα χωρίς την απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> και ευνοείται ο σχηματισμός του καρβαμιδικού άλατος παρατηρούνται διαφορετικές κινητικές (αργές) και μη ολοκλήρωση του πολυμερισμού.

- Σύμφωνα με το Ballard και άλλους ερευνητές η καθαρότητα των NCAs παίζει σημαντικό ρόλο στον ROP αφού τα πολυεπεπίδια που προκύπτουν έχουν πολύ καλές κατανομές.
- Το νερό είναι μια ακαθαρσία, η οποία μπορεί να επηρεάσει τον μηχανισμό του ROP των NCAs. Οι ερευνητές ανέφεραν ότι όταν στην αντίδραση η αναλογία  $\frac{NCA}{H_2O} > 10$  σχηματίζονται πολυεπεπίδια ενώ όταν η αναλογία αυτή είναι μικρότερη του 10<sup>-3</sup> τότε συμβαίνει πλήρης υδρόλυση. Για ενδιάμεσες αναλογίες ευνοείται ο σχηματισμός των ολιγοεπεπιδίων.
- Η θερμοκρασία του συστήματος είναι επίσης κρίσιμη για την υδρόλυση των NCAs, αφού σε χαμηλές θερμοκρασίες η αντίδραση προχωράει αργά.

### 2.3.3 Μηχανισμός του Blout

Ο μηχανισμός του Blout είναι μια ιοντική εκδοχή του κανονικού μηχανισμού αμινών NAM, ο οποίος προτάθηκε στην περίπτωση του BLG-NCA πολυμερισμού σε διοξάνη με μεθοξείδιο του νατρίου σαν απαρχητή. Το στάδιο της έναρξης περιλαμβάνει το μεθοξείδιο του νατρίου (ισχυρή βάση) να αντιδρά με το μονομερές μέσω πυρηνόφιλης προσβολής στον C(5) του ανυδρίτη και να επέρχεται η διάνοιξη του δαχτυλίου. (Σχήμα 5) Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος δε λαμβάνει μέρος η αποκαρβοξυλίωση.

Κατά το στάδιο της διάδοσης του πολυμερισμού το προκύπτον καρβαμιδικό ανιόν συμπεριφέρεται ως ανιόν του μεθοξειδίου, ακολουθούμενο από την απελευθέρωση του διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>). Αυτός ο μηχανισμός δεν απαιτεί το πρωτόνιο του απαρχητή και μπορεί να εφαρμοστεί και στα N-υποκατεστημένα και στα N-μη υποκατεστημένα NCAs. Παρόλο που υπάρχουν αποδείξεις ότι ο μηχανισμός Blout δουλεύει υπό συγκεκριμένες συνθήκες, είναι γενικά αποδεκτό ότι ο πολυμερισμός των NCAs με ισχυρές βάσεις, όπως μεθοξείδιο του νατρίου, προχωράει μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM). [46]



**Σχήμα 4: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.**

### 2.3.4 Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)

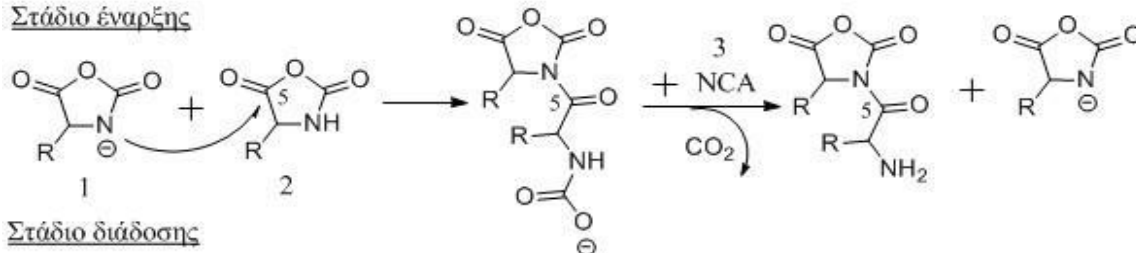
Ο μηχανισμός αυτός πρώτα προτάθηκε από τον Ballard [47] για να εξήγηση τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου του NCA της L-φαινυλαλανίνης με απαρχητή μια τεταρτοταγή αμίνη. Αργότερα, ο Szwarc [48] πρότεινε τον AMM για περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως απαρχητές ισχυρές βάσεις. Σε περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται τεταρτοταγείς [49] και δευτεροταγείς αμίνες, όπως και ισχυρές βάσεις ως απαρχητές, πιστεύεται ότι οι δυο μηχανισμοί AMM και NAM συνυπάρχουν.[50]

Τα στάδια του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM) είναι τα εξής: Στάδιο προέναρξης όπου εδώ ο απαρχητής δε δρα σαν πυρηνόφιλο όπως στο NAM αλλά, περισσότερο σαν βάση, αφαιρώντας ένα πρωτόνιο από το 3-N του NCA, δημιουργώντας το αντίστοιχο ανιόν. Σε αυτό το μηχανισμό ο απαρχητής δρα σαν καταλύτης. Ο μηχανισμός αφορά μόνο τους μη N-υποκατεστημένους NCAs, που φέρουν ένα υδρογόνο στο 3-N, του NCA. Στο στάδιο έναρξης ο πραγματικός απαρχητής είναι το ανιόν του NCA που προκύπτει από το προηγούμενο στάδιο, που προσβάλλει το CO στη θέση 5, για να δώσει ένα πολικό διμερές, το οποίο πρωτονιώνεται από ένα άλλο μόριο NCA, που χάνει το υδρογόνο στο 3-N, έτσι ώστε να σχηματιστεί το αντίστοιχο οξύ και παράλληλα να αναγεννηθεί ο καταλύτης NCA<sup>(-)</sup>. Κατά το στάδιο της διάδοσης δημιουργείται σε κάθε βήμα ανιόν που προσβάλλει τον επόμενο NCA.

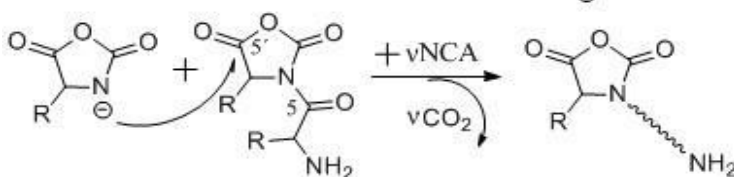
### Στάδιο προέναρξης



### Στάδιο έναρξης



### Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 5: Στάδιο μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς.

Χαρακτηριστικό του μηχανισμού είναι ότι δεν περιλαμβάνει ενσωμάτωση τμήματος του απαρχητή στην αλυσίδα και είναι 100 φορές ταχύτερος από τον κανονικό μηχανισμό. Τα πολυπεπτιδία που λαμβάνονται με αυτήν την μέθοδο έχουν υψηλό μοριακό βάρος και μεγάλη κατανομή, διότι το ανιόν NCA που αναγεννάται δεν έχει καμία εκλεκτικότητα. Μπορεί δηλαδή να αντιδράσει είτε με την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε με ένα άλλο μονομερές. Με λίγα λόγια ο μηχανισμός αυτός δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ζωντανός. Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο τερματισμός του πολυμερισμού γίνεται από παράπλευρες αντιδράσεις, όπως αντιδράσεις διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας κ.α

## 2.4 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Ιστιδίνη.

Η ιστοδίνη είναι ένα αμινοξύ που τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της πολυλειτουργικότητας της και των εξαιρετικών ιδιοτήτων της. Ο σχηματισμός πολυπεπτιδίων με βάση την ιστοδίνη ξεκινά από το σχηματισμό του αντίστοιχου NCA του μορίου της, το οποίο και αποτελεί το μονομερές, για τον πολυμερισμό. Διάφορες προσπάθειες με διαφορετικές προστατευτικές ομάδες έλαβαν χώρα.[51]

Η πρώτη προσπάθεια που αναφέρεται στην βιβλιογραφία είναι η προσπάθεια της ομάδας του Katchalski [52] το 1957, ο οποίος ενδιαφερόταν να εξετάσει τις ιδιότητες της ιστοδίνης σε μεγαλύτερα μοριακά της βάρη και κυρίως της ικανότητας της να συνδέεται

με μέταλλα, ερευνώντας τον ρόλο που παίζει στις μεταλλοπρωτεΐνες. Χρησιμοποίησε την βένζυλο ομάδα για την προστασία του αζώτου στον ιμιδαζολικό δακτύλιο και του αζώτου δίπλα στον α-άνθρακα. Ξεκινώντας από την 1-βένζυλο-N-καρβοβενζοξυ-L-ιστιδίνη και αντιδρώντας την με πενταχλωριούχο φωσφόρο έφτιαξε τον αντίστοιχο N-καρβοξυανυδρίτη με απομάκρυνση της προστασίας στο άζωτο δίπλα στον α-άνθρακα. Ο διαλύτης ήταν το διοξάνιο και ο πολυμερισμός έλαβε χώρα με διμεθυλαμίνη ή τριαιθυλαμίνη. Η απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας έγινε με αντίδραση με νάτριο σε υγρή αμμωνία και ο βαθμός πολυμερισμού ήταν 15-50. Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δε μπόρεσε να διώξει το νερό με ξήρανση υπό κενό.

Το 2003 το ενδιαφέρον στράφηκε στον πολυμερισμό της ιστιδίνης με την προστατευτική ομάδα DNP[53]. Σε αυτήν την προσπάθεια ξεκινώντας από την L-ιστιδίνη, συντέθηκε η N-καρβοβενζοξυ-L-ιστιδίνη με αντίδραση με χλωροφορμικό βενζύλιο. Στην συνέχεια, προστέθηκε η DNP προστατευτική ομάδα κατά την αντίδραση του προϊόντος του προηγούμενου βήματος με 2,4-δινιτροφθοροβενζόλιο. Τέλος έγινε η αντίδραση με θειόνυλο χλωρίδιο για την παραλαβή του αντίστοιχου NCA. Έπειτα, ακολούθησε ο πολυμερισμός του μονομερούς χρησιμοποιώντας ως απαρχητή εξυλαμίνη ή ισοπροπυλαμίνη σε διαλύτη άνυδρο DMF ο οποίος έγινε σε θερμοκρασία δωματίου με απελευθέρωση CO<sub>2</sub>. Τέλος η αποπροστασία έγινε με μερκαπτοαιθανόλη. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι με αυτή την προστατευτική ομάδα, δεν αποφεύγεται η ρακεμείωση του πολυμερούς.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η σύνθεση συμπολυμερών ιστιδίνης με πολυαιθυλενοξειδίο σε μια χωριστή συστάδα. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται η σύνθεση του συμπολυμερούς πολύ(αιθυλενοξειδίο)-b-(πολυιστιδίνη-co-πολυφαινουλαανίνη) το οποίο έχει την ικανότητα να σχηματίζει μικκύλια και να μεταφέρει φαρμακα.[54] Αρχικά, συντέθηκε ο NCA της ιστιδίνης από την 1-βένζυλο-N-καρβοβενζοξυ-L-ιστιδίνη με πενταχλωρίδιο του φωσφόρου και διαλύτη 1,4-διοξάνιο. Η L-φαινουλαανίνη μετατράπηκε με αντίδραση με τριφωσγένιο στον αντίστοιχο NCA σε διαλύτη 1,4-διοξάνιο. Η απομάκρυνση του υδροχλωρίου από τον NCA της ιστιδίνης έγινε με την προσθήκη τριαιθυλαμίνης. Στην συνέχεια οι δυο NCAs αναμίχθηκαν σε διάφορες αναλογίες και το μίγμα πολυμερίστηκε σε DMF χρησιμοποιώντας ισοπροπυλαμίνη ως απαρχητή. Έπειτα, ακολούθησε η σύνθεση τρισυπολυμερούς[55] πολύ(L-γαλακτικό οξύ)-b-πολυαιθυλενοξειδίο-b-πολύ(L-ιστιδίνη) το οποίο σχηματίζει μικκύλια με αποκρισιμότητα σε pH. Χρησιμοποιήθηκε πολύ(βένζυλο-L-ιστιδίνη) όπου και έγινε τροποποίηση της ακραίας αμινομάδας με ηλεκτρικό ανυδρίτη, 4-διμεθυλάμινοπυριδίνη

και τριαιθανολαμίνη σε DMF. Έτσι είχαμε την μετατροπή της ακραίας αμινομάδας σε καρβοξυλομάδα. Η αποπροστασία έλαβε χώρα με μεταλλικό νάτριο. Το συμπολυμερές πολύ(L-γαλακτικό οξύ)-b-πολυαιθυλενοξειδίο ενεργοποιήθηκε με NHS και DCC και με προθήκη κυσταμίνης προστέθηκαν δισουλφιδικοί δεσμοί. Με τη σύζευξη των δυο προϊόντων έγινε η παραλαβή του τελικού πολυμερούς όπου διαπιστώθηκε ότι σχηματίστηκαν μικκύλια ενώ παράλληλα έλαβαν χώρα μελέτες για την δέσμευση και την αποδέσμευση φαρμάκου.

Επόμενη αξιολογη μελέτη ήταν και η σύνθεση πολύ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)-b-πολύ(L-ιστιδίνη) συνδυάζοντας τους πολυμερισμούς ATRP και ROP.[56] Αρχικά πολυμερίστηκε ο μεθακρυλικός μεθυλεστέρας ακολουθώντας την τυπική διαδικασία του ATRP. Στην συνέχεια και με χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων προστέθηκαν ομάδες οι οποίες διαμόρφωσαν τον κατάλληλο μακροαπαρχητή για τον πολυμερισμό του NCA της βένζυλο-ιστιδίνης με ROP. Εξετάστηκαν οι δυνατότητες αυτοοργάνωσης αυτού του πολυμερούς όπου η συστάδα του μεθακρυλικού παίζει τον ρόλο του υδρόφοβου κομματιού στο μικκύλιο και η συστάδα της ιστιδίνης του υδρόφιλου. Σχηματίστηκαν κυκλικά μικκύλια με την παρουσία AgNO<sub>3</sub> όπου στον πυρήνα βρέθηκε το κομμάτι της πολυιστιδίνης, ενώ ο μεθακρυλικός ήταν έξω από αυτόν. Επίσης το μέγεθος των μικκυλίων μπορεί να ελεγχθεί από την θερμοκρασία μικυλλίωσης.

Ακολούθησε μια μελέτη όπου έγινε συνδυασμός του ROP με την χημεία click.[57] Χρησιμοποιήθηκε πολυαιθυλενοξειδίο με ακραία αζιδοομάδα στο οποίο με εφαρμογή της χημείας click προστέθηκε μια τριδραστική δενδριτικού τύπου πολυαμιδοαμίνη με προσαρμοσμένο έναν τριπλό δεσμό. Στη συνέχεια, ακολούθησε πολυμερισμός ROP της ιστιδίνης με DNP προστατευτική ομάδα και αποπροστασία αυτής με 2-μερκαπτοαιθανόλη. Οι αντιδράσεις έγιναν υπό ροή αζώτου. Σχηματίστηκαν δομές σε νανοκλίμακα με δέσμευση φαρμάκου.

Το 2012 [58] εμφανίστηκε μια νέα μελέτη στην οποία είχαμε πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης. Σύμφωνα με αυτή, έλαβε χώρα η χρήση διακλαδισμένων ολιγοαιθυλενοϊμινών όπου οι ακραίες αμινομάδες εκκινούν τον πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης, ο οποίος έχει την βένζυλο προστασία. Ακολουθεί η σύζευξη με πολυαιθυλενοξειδίο, ενώ στο τέλος έχουμε την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας. Σχηματίστηκαν έτσι μικροσφαίρες που μπορούσαν να μεταφέρουν ινσουλίνη.

Πρόσφατα μια νέα εργασία παρουσίασε τον πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης, φτιάχνοντας συμπολυμερή με την χρήση των πολυμερισμών RAFT και ROP. [59] Αρχικά με την χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων για τον RAFT πολυμερισμό

πολυμερίστηκε το N-ισοπροπυλοακρυλαμίδιο και στην συνέχεια συμπολυμερίστηκε ο NCA της ιστιδίνης με την βένζυλο προστασία. Ακολούθησε η αποπροστασία της βένζυλο ομάδας. Σχηματίστηκαν σφαιρικά μικκύλια που ανταποκρίνονταν τόσο στην αλλαγή του pH όσο και της θερμοκρασίας.

Τελευταίες μελέτες[60] αφορούν το πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP και σύζευξη του με υαλουρονικό οξύ. Τέτοια πολυμερή μπορούν να σχηματίζουν μικκύλια και να φέρουν αντικαρκινικά φάρμακα, που τα απελευθερώνουν σε μειωμένο pH.

Το 2015 ο Zhang [61]έκανε μια μελέτη όπου σε αυτή τη μελέτη συντέθηκαν μια σειρά συμπολυμερών με βάση την PHis για να διερευνηθεί η επίδραση του υποκατεστημένου DNP της PHis συστάδας σε ιδιότητες φυσιο-χημικές και βιοκατανομής των μικκυλίων. Το υποκατεστημένο DNP στο κορεσμένο άζωτο της PHis έδειξε μικρή επίδραση στο χαρακτηριστικό της PHis που στηρίζεται στα μικκύλια δηλαδή το pH πυροδότησε την απελευθέρωση του φαρμάκου και η PHis διευκόλυνε την ενδοσωματική απελευθέρωση αλλά και μια βελτιωμένη μικκυλιακή σταθερότητα, υποδεικνύοντας ότι το κορεσμένο άζωτο μπορεί να χρησιμεύσει ως πολύτιμη χημική θέση τροποποίησης για τη βελτίωση της ποιότητας των μικκυλίων ή για να προσδώσουν μια νέα λειτουργία. Όμως το υποκατεστημένο DNP αύξησε σημαντικά το μέγεθος των σωματιδίων των μικκυλίων του συμπολυμερούς οδηγώντας σε κίνδυνο της in vivo στόχευσης των όγκων. Επομένως, η προσεκτική επιλογή της ομάδας υποκατάστασης είναι αναγκαία για την επιτυχή χημική τροποποίηση.

## 2.5 Προστατευτικές ομάδες

Οι προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση για την προστασία αμινομάδων, καρβοξυλομάδων καθώς και δραστικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων, πρέπει να επιλέγονται με τα παρακάτω κριτήρια.[62] Να αντιδρούν εύκολα και με μεγάλη απόδοση κάτω από συνθήκες που δεν προκαλούν χημικές ή στερεοχημικές μεταβολές στο μόριο.

- Να παρουσιάζουν σταθερότητα στις συνθήκες της πεπτιδικής σύνθεσης.



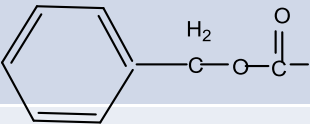
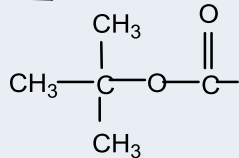
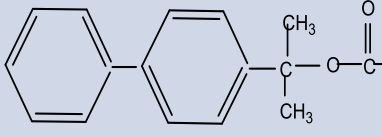
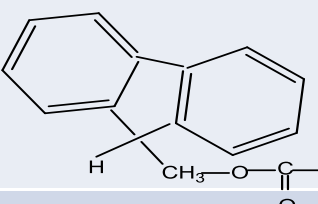
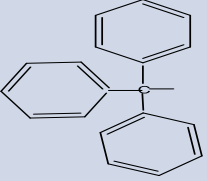
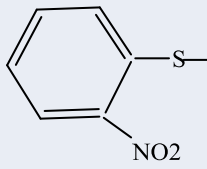
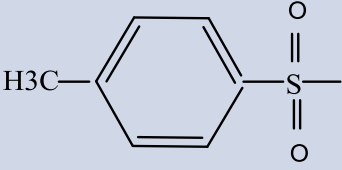
- Να μπορούν να αφαιρεθούν εύκολα και εκλεκτικά και με τρόπο που δεν προκαλεί δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις στο πεπτίδιο, να μην πραγματοποιείται ρακεμίωση.

Οι προστατευτικές ομάδες οι οποίες παραμένουν μέχρι να ολοκληρωθεί η σύνθεση χαρακτηρίζονται ως μόνιμες, ενώ εκείνες που απομακρύνονται νωρίτερα παροδικές.

### 2.5.1 Προστασία α-Αμινομάδας

Η παραλαβή του επιθυμητού πεπτιδίου, αλλά και η ικανοποιητική απόδοση της πεπτιδικής σύνθεσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προστασία της α-αμινομάδας. Οι αμινο-προστατευτικές ομάδες μειώνουν τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα του αζώτου της αμινομάδας ώστε να αποφεύγεται η συμμετοχή της σε διάφορες παράπλευρες αντιδράσεις.[62] Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με μηχανισμούς έλξης ηλεκτρονίων μέσω μεσομέρειας (όπως συμβαίνει στις ουρεθανικού τύπου ομάδες) ή μέσω επαγωγικού φαινομένου, είτε με στερεοχημική παρεμπόδιση (όπως συμβαίνει στις τριφαινυλο-μέθυλο τύπου ομάδες, π.χ. τριτυλομάδα. Η επιλογή της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας της α-αμινομάδας ενός αμινοξέος είναι πολύ σημαντική για την πεπτιδική σύνθεση. Ειδικά στη σύνθεση σε στερεή φάση, η αναγκαιότητα της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας είναι πολύ σημαντική αφού εκεί είναι δύσκολος ο διαχωρισμός του επιθυμητού πεπτιδίου από τα πεπτιδικής φύσεως παραπροϊόντα. Η προστασία της α-αμινομάδας πρέπει να είναι παροδική και η αποπροστασία της εκλεκτική. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η προστασία της α-αμινομάδας πρέπει να είναι παροδική και να απομακρύνεται εύκολα, γρήγορα και εκλεκτικά όταν η σύζευξη ολοκληρωθεί, έτσι ώστε να προκύψει η ελεύθερη αμινομάδα, με την οποία θα αντιδράσει η καρβοξυλομάδα του επομένου αμινοξέος. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που παίζει ρόλο στην επιλογή είναι η σταθερότητα της προστατευτικής ομάδας, έτσι ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών ή ολιγομερών του εκάστοτε προς σύζευξη αμινοξέος, με αποτέλεσμα τη σύζευξη ολιγομερών στην πεπτιδική αλυσίδα. Οι κυριότερες αμινοπροστατευτικές ομάδες αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Δομές των ευρέτερα χρησιμοποιούμενων N-α προστατευτικών ομάδων

Όνομασία	Χημικός τύπος	Συνθήκες αποπροστασίας
Βενζυλοξυκαρβonyλομάδα ή καρβοβενζοξυ-ομάδα Z-ομάδα		Pd/H <sub>2</sub> , HBr/AcOH σε διοξάνη, TFMSA/TFA
Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβonyλομάδα Boc-ομάδα		40% TFA, HF
2-(π-Διφαινυλο)-2-προπυλοξυκαρβonyλομάδα Broc-ομάδα		1% TFA
9-Φλουορενυλομεθυλοξυκαρβonyλομάδα Fmoc-ομάδα		4N NaOH, 20-40% Pip/DMF
Τριφαινυλομεθυλομάδα ή τριτυλομάδα Tft-ομάδα		~5% AcOH
2-Νιτροφαινυλοσουλφενυλομάδα Nps-ομάδα		Ασθενές οξύ, υδρογόνωση
4-τολουολοσουλφονυλομάδα Tos-ομάδα		Na/NH <sub>3</sub> , HF

Οι ομάδες <<ουρεθανικού τύπου>> είναι μια μεγάλη κατηγορία προστατευτικών ομάδων, οι οποίες όταν προσδένονται στην αμινοομάδα, την μετατρέπουν σε αλκοξυ

καρβόνυλ-αμινο παράγωγα, που ονομάζονται ουρεθάνες ή καρβαμίδια. Τα παράγωγα αυτά είναι και αμίδια και εστέρες. Σαν αμίδια έχουν μειωμένο πυρηνόφιλο χαρακτήρα στο άζωτο, ενώ σαν εστέρες μπορούν να μετατραπούν σε καρβαμιδικά οξέα. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z), η τριτοταγής βουτόξυ-καρβονυλομάδα (Boc) , η 2-(4-διφαινυλο)-ισοπρόποξυ-καρβονυλομάδα (Broc), και η 9-φλουορενυλ-βουτόξυ-καρβονυλομάδα (Fmoc). Οι ομάδες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για πολλά χρόνια λόγω της αποδοτικότητας τους ενώ η ενώ η τριφαινυλομεθυλομάδα ή αλλιώς τριτυλομάδα (Ttt)είναι μη ουρεθανικού τύπου.[62]

#### ❖ Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z)

Η πρώτη ουρεθανικού τύπου ομάδα, που χρησιμοποιήθηκε από τους Bergmann και Ζέρβα το 1932 είναι η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z).[62][63] Εισάγεται εύκολα με επίδραση βενζυλοξυκαρβονυλοχλωριδίου (Z-Cl) σε αλκαλικές συνθήκες. Απομακρύνεται εύκολα με καταλυτική υδρογόνωση και επίδραση ισχυρών οξέων όπως HF και HBr/AcOH. Μειονεκτήματα στη χρήση της είναι ότι δεν μπορεί να απομακρυνθεί με καταλυτική υδρογόνωση σε πεπτιδία που περιέχουν Cys, Met διότι το θείο που περιέχουν αυτά τα αμινοξέα δηλητηριάζει τον καταλύτη, ενώ κατά την απομάκρυνσή της με ισχυρά οξέα, τα βενζυλοκατιόντα που δημιουργούνται προσβάλλουν τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων Tyr, Trp, Met.

#### ❖ Τριτοταγής βουτόξυ-καρβονυλομάδα (Boc)

Το 1957 παρουσιάστηκε από τους McKay και Albertson η οποία χρησιμοποιήθηκε ως κύρια προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας στα χρόνια που ακολούθησαν, κατά την ανάπτυξη της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση. Η Boc-ομάδα εισάγεται εύκολα κυρίως με τριτοταγή βουτυλοξυκαρβονυλ-ανυδρίτη (Boc<sub>2</sub>O) .Η Boc-ομάδα είναι σταθερή κατά την καταλυτική υδρογόνωση και απομακρύνεται πιο εύκολα με επίδραση οξέων σε σχέση με τη Z-ομάδα. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην πεπτιδική σύνθεση σε συνδυασμό με ομάδες που απομακρύνονται σ'αυτές τις συνθήκες. Η απομάκρυνσή της γίνεται με επίδραση οξέων όπως TFA ή HCl σε διάφορους οργανικούς διαλύτες.[62][63]

### ❖ 9-φλουορενυλ-βουτόξυ-καρβονυλομάδα(Fmoc)

Το 1970 παρουσιάστηκε μια νέα ουρεθανικού τύπου ομάδα, η 9 φλουορενυλ-βουτόξυ-καρβονυλομάδα (Fmoc) από τους Carriño & Han.[62][64],[65] Η Fmoc ομάδα είναι σταθερή στα οξέα και απομακρύνεται με την επίδραση βάσεων. Επομένως η προστασία πλευρικών ομάδων Fmoc –αμινοξέων απαιτεί προστατευτικές ομάδες που να είναι σταθερές σε βάσεις και να απομακρύνονται σε όξινες συνθήκες.(π.χ.TFA).Η αποπροστασία της Fmoc- ομάδας γίνεται γρήγορα με πρωτοταγείς αμίνες (π.χ.κυκλοεξυλαμίνη) και μερικές δευτεροταγείς (πιπεριδίνη, πιπεραζίνη)και πιο αργά με τριτοταγής αμίνες (π.χTEA). Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι το πιο κατάλληλο αντιδραστήριο για τη σύνθεση των Fmoc-αμινοξέων είναι το Fmoc-ηλεκτριμίδιο (FmocOSu).[66] Η Fmoc-ομάδα είναι μια σημαντική προστατευτική ομάδα και μπορεί να συνδυαστεί με τις ομάδες Boc και Z αφού αυτές απομακρύνονται σε όξινες συνθήκες.

### ❖ Τριφαινυλομεθυλομάδα ή αλλιώς τριτυλομάδα (Ttt)

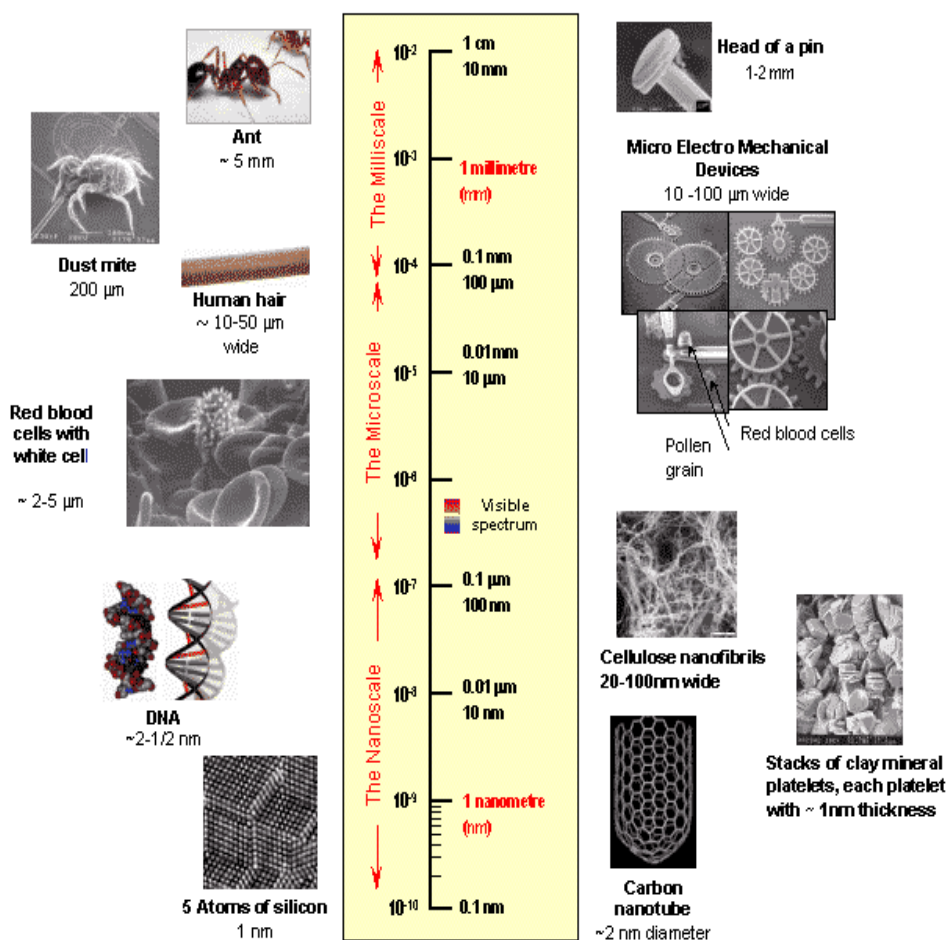
Η σημαντικότερη αλκυλο-τύπουομάδα είναι τριφαινυλομεθυλομάδα ή αλλιώς τριτυλομάδα (Ttt). Η χρήση της ως αμινοπροστατευτική ομάδα καθιερώθηκε από τους Ζερβά και Θεοδωρόπουλο το 1955 και η τριτυλίωση των αμινοξέων γίνεται με χρήση τριτυλοχλωριδίου.[62],[67] Η προστατευτική Ttt-ομάδα είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στα οξέα και μπορεί πολύ εύκολα να απομακρυνθεί ύστερα από απλή θέρμανση με αραιό διάλυμα (~5%) οξικού οξέος. Αντίθετα αξιοσημείωτη είναι η σταθερότητά της έναντι των αλκαλίων και της υδραζίνης. Η τριτυλίωση των α-αμινοξέων γίνεται με τη χρήση τριτυλοχλωριδίου. Τα τριτυλο-αμινοξέα έχουν μερικώς βασικό χαρακτήρα και η ελάττωση της δραστηρότητας του αζώτου οφείλεται στη στερεοχημική παρεμπόδιση από την ογκώδη τριτυλομάδα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### Τεχνολογία Στοχευμένης Μεταφοράς Φαρμάκων (Targeted “Smart” Drug Delivery)

#### 3.1 Νανοεπιστήμες και νανοτεχνολογία

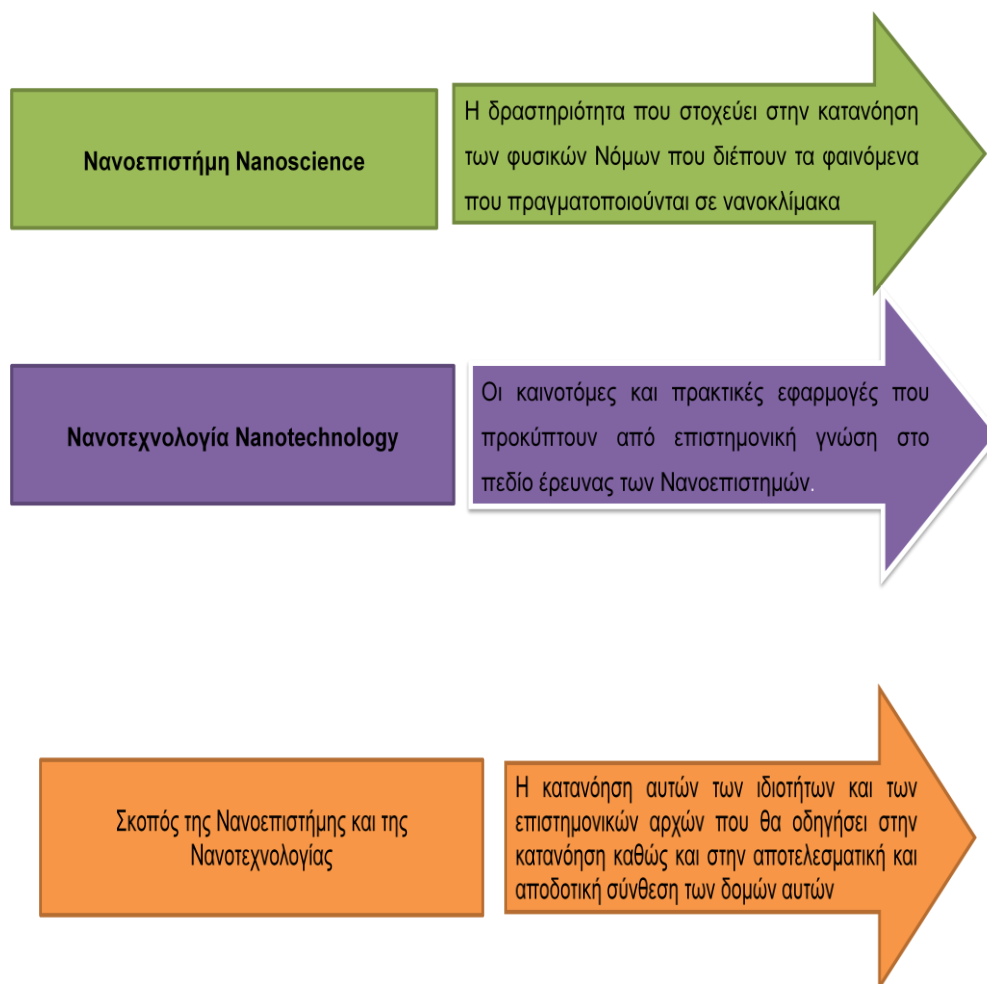
Στην επιστήμη και την τεχνολογία, το πρόθεμα “νανο” (από την ελληνική λέξη νάνος) σημαίνει  $10^{-9}=0.000000001$ . Ένα νανόμετρο (nm) ισούται με ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου, είναι δηλαδή δεκάδες χιλιάδες φορές μικρότερο από το πάχος μιας ανθρώπινης τρίχας[68],[69]



Εικόνα 3: Η κλίμακα μεγέθους διαφόρων φυσικών και τεχνητών αντικειμένων.

Ο όρος **νανοτεχνολογία** χρησιμοποιείται εδώ ως περιληπτικός όρος, και καλύπτει τους διάφορους κλάδους νανοεπιστημών και νανοτεχνολογιών. Ως **Νανοτεχνολογία** ορίζεται ο τρόπος με τον οποίο μπορούμε να κατασκευάσουμε διατάξεις και συστήματα (π.χ.,

νανοκινητήρες, νανορομπότ, sensors, biochips, κ.α.)[70] με έλεγχο της ύλης στη νανοκλίμακα, δηλαδή σε κλίμακα ατόμων, μορίων και μοριακών δομών. Η ουσία της νανοτεχνολογίας έγκειται στην δυνατότητα πραγματοποίησης διεργασιών και διαδικασιών στη νανοκλίμακα με στόχο την δημιουργία μεγαλύτερων δομών με νέα μοριακή οργάνωση. Οι ονομαζόμενες αυτές νανοδομές αποτελούν τα μικρότερα κατασκευάσματα του ανθρώπου και εμφανίζουν καινοτόμες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες και διεργασίες. Οι **Νανοεπιστήμες** ασχολούνται με την διερεύνηση, τη κατανόηση, τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων, την παρατήρηση, τη μέτρηση και τον έλεγχο της ύλης στη νανοκλίμακα. Κατέχουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο και εκτείνονται σε ένα ευρύ επιστημονικό-ερευνητικό πεδίο όπου απαραίτητα συναντώνται διάφορες επιστήμες όπως η φυσική, η χημεία, η επιστήμη των υλικών, η βιολογία, η φαρμακευτική και η μηχανολογία. Οι νανοεπιστήμες φαίνεται να έχουν την δυναμική να αλλάξουν τα πάντα στον επιστημονικό χώρο.

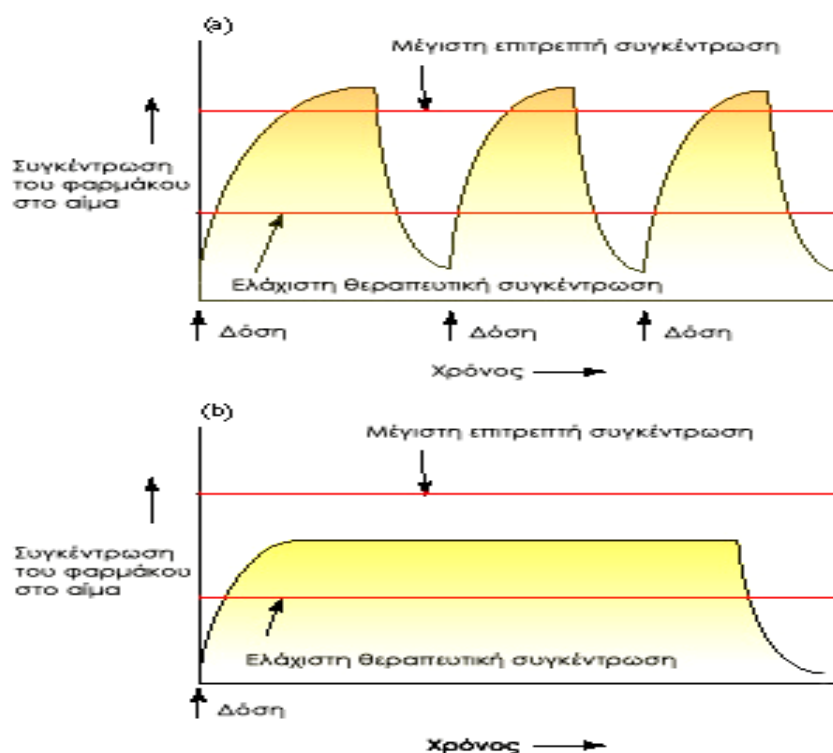


Οι Νανοτεχνολογίες αναμένεται να "αναδομήσουν" τις υπάρχουσες σήμερα τεχνολογίες παραγωγής, την υγεία και την ποιότητα ζωής, τη διαχείριση του περιβάλλοντος, την παραγωγή ενέργειας, τις μεταφορές & επικοινωνίες, τους υπολογιστές & πληροφορική,

την εκπαίδευση και έρευνα. Η όποια προσέγγιση (ερευνητική ή εκπαιδευτική) στις περιοχές των Νανοεπιστημών & Νανοτεχνολογιών απαιτεί διεπιστημονική θεώρηση. Η νανοτεχνολογία δεν μπορεί να οριστεί αποκλειστικά μόνο με όρους διαστάσεων, αλλά αντιπροσωπεύει μία σύγκλιση των παραδοσιακών επιστημών της Φυσικής, Χημείας και Βιολογίας σε ένα κοινό ερευνητικό σύνορο.[71]

### **3.2 Ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων (controlled drug delivery)**

Για πολλές δεκαετίες η θεραπευτική αγωγή μιας οξείας ή χρόνιας ασθένειας βασιζόταν κυρίως στην συχνή λήψη φαρμάκων από τους ασθενείς σε διάφορες φαρμακομορφές όπως, ταμπλέτες, κάψουλες, χάπια, κρέμες, σιρόπια, υπόθετα και ενέσεις. Ακόμη και σήμερα τα συμβατικά αυτά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων φαίνεται να κυριαρχούν στην αγορά. Παρόλα αυτά, για να επιτευχθεί αλλά και να διατηρηθεί η συγκέντρωση του φαρμάκου στον οργανισμό μέσα στα απαραίτητα θεραπευτικά επίπεδα, είναι συχνά απαραίτητη η λήψη των παραπάνω φαρμάκων πολλές φορές την ημέρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια ανεπιθύμητη αυξομείωση στα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα. Τα τελευταία χρόνια οι εταιρείες έχουν στρέψει τις έρευνες τους σε υποσχόμενες τεχνολογίες όπως είναι η ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων (controlled drug delivery). Ο όρος 'ελεγχόμενη αποδέσμευση' υποδηλώνει συστήματα μεταφοράς με προβλέψιμο και φυσικά επαναλήψιμο ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου στους πάσχοντες ιστούς για να αυξηθεί η αποδοτικότητα του φαρμάκου και να μειωθούν οι παρενέργειες. Άλλη μία τεχνική για τη μεταφορά φαρμάκων είναι η παρατεταμένη αποδέσμευση (sustained release) η οποία αναφέρεται σε φαρμακοσκευάσματα τα οποία έχουν την ιδιότητα να επιβραδύνουν την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας και την είσοδο της στην κυκλοφορία έτσι ώστε να ενισχύεται η θεραπευτική τους δράση.[72][73][74] Πολυμερή που μπορούν να διαμορφώνουν δομές όπως μικκύλια, κυστίδια, υδροζελ είναι κατάλληλα μέσα μεταφοράς φαρμάκων και πεδίο έρευνας με πολλές προοπτικές και ιδιαίτερο ενδιαφέρον.



**Εικόνα 4: Γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις περιπτώσεις: (α) συμβατικής μεθόδου χορήγησης φαρμάκων, (β) Ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων.**

Η συγκέντρωση φθάνει μία μέγιστη τιμή και μετά ελαττώνεται μέχρι μια ελάχιστη, οπότε και είναι απαραίτητη η χορήγηση της δεύτερης δόσης του φαρμάκου. Στα διάγραμμα παρατηρούνται δύο χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις: η ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση, ώστε το φάρμακο να έχει θεραπευτική δράση και η μέγιστη συγκέντρωση, ώστε τα φάρμακο να μην έχει τοξική δράση στον οργανισμό. Η βέλτιστη συγκέντρωση πρέπει να βρίσκεται μεταξύ των δύο αυτών συγκεντρώσεων και αυτό είναι δύσκολο να επιτευχθεί όταν η δραστική και η τοξική συγκέντρωση είναι πολύ κοντά.[75] Στόχος ενός φαρμακευτικού σκευάσματος με ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου είναι να διατηρεί τη συγκέντρωση σταθερή και μεταξύ των δύο χαρακτηριστικών συγκεντρώσεων (ελάχιστη και μέγιστη επιθυμητή). Το σκεύασμα αυτό πρέπει δηλαδή να απελευθερώνει ορισμένη ποσότητα φαρμάκου για μία επιθυμητή χρονική περίοδο με σταθερή ταχύτητα. Με τον τρόπο αυτό στην ιδανική περίπτωση χορηγούνται μικρότερες δόσεις και προκαλούνται λιγότερες παρενέργειες. [74]



### 3.2.1 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Συστημάτων Φορέα Φαρμάκων Drug Delivery System

#### A. Το ιδανικό drug delivery system

Το ιδανικό drug delivery system πρέπει να έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

- ❖ Μηχανική αντοχή
- ❖ Βιοσυμβατότητα
- ❖ Ασφάλεια για τον ασθενή από περίπτωση τυχαίας, μη αναμενόμενης απελευθέρωσης
- ❖ Απλότητα στην κατασκευή και την εφαρμογή
- ❖ Ικανότητα να επιτύχει υψηλό εγκλεισμό και ελεγχόμενη αποδέσμευση

#### B. Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα της ελεγχόμενης αποδέσμευσης

Η μέθοδος ελεγχόμενης αποδέσμευσης κατά την εφαρμογή της στην φαρμακευτική παρουσιάζει αρκετά σημαντικά *πλεονεκτήματα* αλλά και κάποια μη παραβλέψιμα *μειονεκτήματα*.

Τα *πλεονεκτήματά* της είναι:

1. Σταθεροποίηση της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας πάνω από τα θεραπευτικά επίπεδα για όσο χρόνο διαρκεί η θεραπεία και μικρότερες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης.
2. Ελάττωση των παρενεργειών.
3. Ελάττωση της ποσότητας του φαρμάκου που απαιτείται για τη θεραπεία.
4. Ελάττωση της συχνότητας χορήγησης των δόσεων.
5. Αποτελεσματική χορήγηση βιοδραστικών ουσιών με μικρή βιολογική ημιπερίοδο ζωής.

Ενώ αντίστοιχα τα *μειονεκτήματα* της είναι:

1. Υψηλό κόστος παρασκευής.
2. Πιθανή τοξικότητα λόγω των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή τους ή των προϊόντων διάσπασης αυτών.

3. Κίνδυνος υπέρβασης των τοξικών επιπέδων του φαρμάκου από την μη αναμενόμενη απελευθέρωση του εγκλεισμένου φαρμάκου.
4. Πιθανή ενόχληση του ασθενούς από τη φαρμακομορφή αλλά και από τον τρόπο χορήγησης.[74][76]

### 3.3 Μικκύλια-κυστίδια

Ωστόσο για τη βελτίωση της εξειδικευμένης αποδέσμευσης των φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί διάφοροι φορείς, όπως τα λιποσώματα, τα νανοσωματίδια, τα νανοσυσσωματώματα και τα πολυμερικά μικκύλια και κυστίδια. Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή σχημάτιζε μικκύλια ενώ το πολυμερές με τον διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σχημάτιζε κυστίδια.

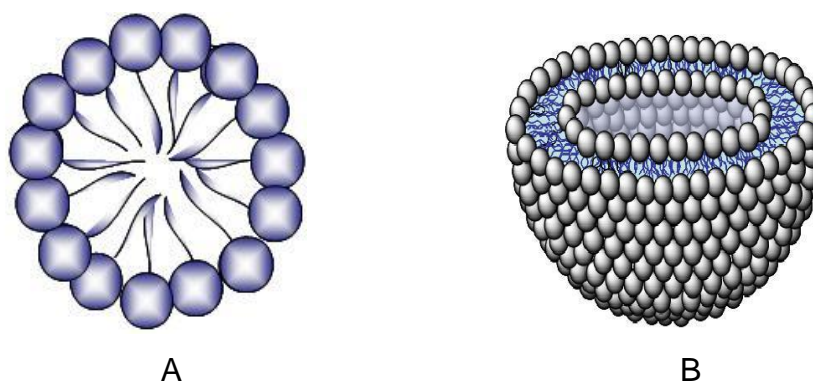
#### ❖ Μικκύλια [77],[78],[79]

Επιφανειοδραστικές ή αμφίφιλες ουσίες, δηλαδή ουσίες που αποτελούνται από μόρια τα οποία έχουν ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα, οργανώνονται στο νερό σε μικκύλια. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η συγκέντρωση να είναι μεγαλύτερη από μια τιμή συγκέντρωσης που ονομάζεται κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση, ή για συντομογραφία CMC (Critical Micelle Concentration). Η CMC είναι διαφορετική για κάθε επιφανειοδραστική ουσία και σε αυτή την συγκέντρωση παρατηρείται απότομη αλλαγή στις φυσικοχημικές της ιδιότητες, η οποία όπως αρχικά ερμηνεύτηκε από τον Mc Bain (1914) οφείλεται στο σχηματισμό μικκυλίων.

Οι μικκυλιακές δομές εμφανίζονται ως σφαιρικοί, φυλλοειδείς και κυλινδρικοί σχηματισμοί. Στα μικκύλια, οι λιπόφιλες υδρογονανθρακικές αλυσίδες προσανατολίζονται προς το εσωτερικό τους, αφήνοντας τις υδρόφιλες ομάδες στο εξωτερικό μέρος σε επαφή με τα πολικά μόρια του νερού. Σε μη πολικούς διαλύτες όπως για παράδειγμα κυκλοεξάνιο, οργανώνονται κατ' αντίστροφο τρόπο, δηλαδή με τις ανθρακικές αλυσίδες προς τα έξω και τις υδρόφιλες κεφαλές προς το εσωτερικό του μικκυλίου. Η διαμόρφωση αυτή αποτελεί το αντεστραμμένο μικκύλιο.

#### ❖ Κυστίδια [80],[81]

Τα κυστίδια είναι υπερμοριακά συστήματα σφαιρικού σχήματος και μεγέθους από 10 nm έως 800 nm, τα οποία σχηματίζονται κατά την αυτοοργάνωση συνθετικών ή φυσικών αμφιφιλικού τύπου μορίων σε υδατικά διαλύματα. Τα αμφιφιλικά μόρια από τα οποία αποτελούνται συνήθως τα κυστίδια διαθέτουν δύο μακριές υδρογονανθρακικές αλυσίδες και μία πολική κεφαλή, με αποτέλεσμα να έχουν σχήμα κυλινδρικό. Στην περίπτωση κατά την οποία οι υπερμοριακές αυτές δομές αποτελούνται από φυσικά φωσφολιπίδια, ονομάζονται λιποσώματα, ενώ στην περίπτωση που αποτελούνται από συνθετικά μόρια (συνθετικά αμφίφιλα μόρια ή αμφίφιλα πολυμερή) λέγονται κυστίδια.



**Εικόνα 5: Δομές οργανωμένων υπερμοριακών συστημάτων : τα μικκύλια (A) και τα κυστίδια (B).**

Η αναλογία  $p=Rg/Rh$  είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο εξαρτάται από τη μορφολογία των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων (χρήση στατικής σκέδασης-SLS). Η τιμή  $p$  κοντά στο 1 αποδίδεται σε μια γεωμετρία κυστιδίου ενώ σε μικρότερες τιμές αποδίδεται σε σφαιρικά μικκύλια (θεωρητικά  $p=0.775$ ). [82]

### 3.4 Αποκρίσιμα πολυμερή

Τα αποκρίσιμα [83], περιβαλλοντικά ευαίσθητα[84] ή αλλιώς <<έξυπνα>> πολυμερή [85][86] αποσπούν ιδιαίτερα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας την τελευταία δεκαετία με αρκετές βιολογικές εφαρμογές, όπως στη μεταφορά φαρμάκων[84], στη βιοτεχνολογία[88] και στη χρωματογραφία.[88] Όλες αυτές οι εφαρμογές δείχνουν πολύ υποσχόμενα αποτελέσματα, ανοίγοντας κάθε μέρα ένα νέο παράθυρο της ανάπτυξης. Η χρήση των αποκρινόμενων πολυμερών με τροποποιημένη απελευθέρωση φαρμακευτικής δοσολογίας έχει πολλά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης την απελευθέρωση και τη διανομή του φαρμάκου σε ένα συγκεκριμένο στόχο μειώνοντας

έτσι τις παρενέργειες ή τις ανεπιθύμητες συστηματικές αντιδράσεις.[87] Η εκλεκτικότητα φαίνεται από τον τύπο των φαρμακευτικών συστημάτων τα οποία παρέχουν μείωση σε θεραπευτικές δόσεις και επακόλουθη συμμόρφωση του ασθενούς. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι τα συστήματα αυτά είναι ικανά να ανακτήσουν την αρχική τους κατάσταση όταν το ερέθισμα σταματήσει να υπάρχει.[89],[90] Επίσης είναι βιοσυμβατά, εύκολα στην κατασκευή τους ευέλικτα, καλοί μεταφορείς θρεπτικών ουσιών στα κύτταρα. [91]

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ευαίσθητων πολυμερών, όπως θέρμο-ευαίσθητα πολυμερή και pH-ευαίσθητα πολυμερή τα οποία έχουν δείξει ελπιδοφόρα αποτελέσματα, αφού υπάρχουν ήδη φαρμακευτικά συστήματα κατασκευασμένα από τέτοια πολυμερή στην αγορά.[92] Η διαδρομή της έρευνας στο τομέα αυτό αποδεικνύει το συνδυασμό των πολυμερών τα οποία ανταποκρίνονται σε διαφορετικά ερεθίσματα (φυσικά, χημικά και βιοχημικά) προκειμένου να βελτιστοποιήσει το σκεύασμα και να αυξήσει την αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών παραγόντων.

Τα χημικά ερεθίσματα, όπως το pH, η ιοντική ισχύς και οι ιοντικοί και χημικοί παράγοντες αλλάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων ή μεταξύ των αλυσίδων και του διαλύτη σε μοριακό επίπεδο. Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία το ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και η μηχανική τάση επηρεάζουν τους θερμοδυναμικούς παράγοντες (ενθαλπία και εντροπία) και μεταβάλλουν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις. Ορισμένα όμως πολυμερικά συστήματα συνδυάζουν απόκριση σε δυο ή περισσότερα ερεθίσματα για παράδειγμα είναι θερμο-ευαίσθητα αλλά και αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH.[93],[94],[95]

### **3.4.1 Θέρμο-αποκρίσιμα πολυμερή**

Η θερμοκρασία είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ερέθισμα στα αποκρίσιμα πολυμερικά συστήματα. Η μεταβολή της θερμοκρασίας δεν είναι μονό σχετικά εύκολο να ελεγχθεί, αλλά επίσης είναι εύκολο να χρησιμοποιηθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Αυτά είναι τα πιο γνωστά και ασφαλή πολυμερικά συστήματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διεργασίες απομόνωσης κυττάρων *in vitro* και θερμο-ευαίσθητα υδατοπηκτώματα ή μικκύλια, που περιέχουν φάρμακα μπορούν να εφαρμοστούν *in vivo*. Τα θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή παρουσιάζουν στη δομή τους μια πολύ

ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ των υδρόφοβων και των υδρόφιλων ομάδων, και μια αλλαγή της θερμοκρασίας μπορεί να δημιουργήσει νέες προσαρμογές.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό σε αυτό το είδος των πολυμερών είναι η ύπαρξη μια κρίσιμης θερμοκρασίας διάλυσης (Lower Critical Solution Temperature, LCST). Η LCST είναι η θερμοκρασία στην οποία η φάση του πολυμερούς και του διαλύματος αλλάζουν ασυνεχώς σύμφωνα με τη σύστασή τους. Αν το διάλυμα του πολυμερούς έχει μια φάση κάτω από τη κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης (LCST) αυτό θα γίνει αδιάλυτο μετά από θέρμανση δηλαδή έχει μια χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης. Πάνω από τη κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης (LCST) οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης (δεσμοί υδρογόνου) μεταξύ των μορίων του νερού και του πολυμερούς γίνονται δυσμενείς, αυτό αφυδατώνει και συμβαίνει επικρατήσει υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων προκαλώντας το φούσκωμα του πολυμερούς. Γενικά δυο είδη διαμοριακών δυνάμεων θεωρείται ότι υπάρχουν: οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Τα πολυμερή με μικρή κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης (LCST) είναι τα πιο χρησιμοποιημένα συστήματα χορήγησης φαρμάκων. Αυτό το είδος φαρμακευτικού συστήματος διοχετεύει το φάρμακο με ελεγχόμενο τρόπο χωρίς να είναι διεισδυτικό. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυμερούς με LCST είναι το πολύ(N-ισοπροπυλ-ακρυλαμίδιο), PNIPAAm, το οποίο εμφανίζει απότομη μεταβολή φάσης στο νερό στους 32°C. Πρόσφατα έχουν υπάρξει αναφορές για βιολογικά πολυμερή, αλλά και για συμπολυμερή πολυπεπτιδίων, τα οποία αλλάζουν τη διαμόρφωσή τους με μεταβολή της θερμοκρασίας. [96],[97],[98],[99]

### 3.4.2 Ευαίσθητα Πολυμερή στο pH

Στο ανθρώπινο σώμα μπορούμε να δούμε αξιοσημείωτες αλλαγές του pH που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατεύθυνση θεραπευτικών παραγόντων σε μια συγκεκριμένη περιοχή του σώματος, ιστών ή κυτταρικών διαμερισμάτων. Αυτό κάνει τα pH ευαίσθητα πολυμερή ιδανικά φαρμακευτικά συστήματα σε συγκεκριμένη χορήγηση θεραπευτικών παραγόντων. Ο ιονισμός των pH ευαίσθητων πολυμερών έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό το γεγονός ότι είναι ικανά να αποδεχτεί ή να απελευθερώσει πρωτόνια σε απάντηση στις αλλαγές του pH.[100],[101]

Τα pH-ευαίσθητα πολυμερή περιέχουν όξινες ομάδες στη δομή τους (καρβοξυλικό ή σουλφονικό) ή βασικές ομάδες (άλατα αμμωνίου). Με άλλα λόγια τα pH ευαίσθητα

πολυμερή είναι πολυηλεκτρολύτες που έχουν στη δομή τους όξινες ή βασικές ομάδες οι οποίες μπορούν να δεχτούν ή να απελευθερώσουν πρωτόνια με την επίδραση των αλλαγών του pH στο γύρω περιβάλλον.[102] Αυτή η ομάδα των <έξυπνων> πολυμερών αλλάζει τη διαλυτότητα τους με την αλλαγή του ηλεκτρικού (φορτίο) πολυμερικού μορίου. Έτσι, η μετάβαση από διαλυτή κατάσταση σε μη διαλυτή κατάσταση προκαλείται από τη μείωση του ηλεκτρικού φορτίου στα μόρια του πολυμερούς. Το ηλεκτρικό φορτίο του πολυμερούς μπορεί να μειωθεί με τη μείωση του pH του εξουδετερώνοντας το ηλεκτρικό φορτίο και μειώνοντας τη υδροφιλικότητα (αύξηση της υδροφοβικότητας) των μακρομορίων του πολυμερούς. [103]

Ως παράδειγμα αυτού του είδους των πολυμερών μπορούμε να τονίσουμε πολυακρυλαμίδιο((PAAm), πολύ(ακρυλικό οξύ) (PAA), πολύ(μεθακρυλικό οξύ) (PMAA), πολύ(L-λυσίνη) και άλλα[104]

**Πίνακας 2:Τιμές pH διαφορετικών ιστών.**

Ιστοί	pH
Αίμα υγιούς ανθρώπου	7.4-7.5
Εξωτερικό pH όγκων	6.5
Λυσοσώματα	4.5-5.0
Ενδοσώματα	5.5-6

### **3.5 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία**

#### **3.5.1 Πολυαιθυλενοξειδίο (PEO ή PEG)**

Τα τελευταία χρόνια τα αμφίφυλα κατά συστάδες συμπολυμερή παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω του συνδιασμού των υδρόφιλων και των υδρόφοβων ιδιοτήτων τους. Αυτού του τύπου τα πολυμερή έχουν πιθανή εφαρμογή ως σταθεροποιητές διάχυσης, γαλακτωματοποιητές, συμβατοποιητές και στη μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων.[105] Το PEO είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη υδατοδιαλυτή συστάδα. Η πολύ(αιθυλενογλυκόλη) αναφέρεται συχνά και ως πολύ(αιθυλενοξειδίο) (PEO), για μοριακά βάρη άνω των 20.000 g/mol, ενώ αναφέρεται σπανιότερα και ως πολύ(οξυαιθυλένιο) (POE).[106],[107] Πρόκειται για ένα γραμμικό ή διακλαδισμένο

πολυαιθέρα, διαθέσιμο σε μια ποικιλία μοριακών βαρών. Πιο συγκεκριμένα σε μοριακό βάρος μικρότερο από 1000 PEGs είναι ιξώδη και άχρωμα υγρά ενώ σε υψηλότερα μοριακά βάρη τα PEGs είναι κηρώδη και λευκά στερεά.[108] Το σημείο τήξεως είναι ανάλογο του μοριακού βάρους προσεγγίζοντας ένα όριο περίπου στους 67°C. Η πολύ(αιθυλενογλυκόλη), μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλά επιστημονικά πεδία όπως τη βιο-φαρμακευτική, τη χημεία των επιφανειών, βιολογία και τη βιο-ιατρική.[109],[110] Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται κάποια χαρακτηριστικά της.

**Πίνακας 3:Χαρακτηριστικά πολυαιθυλενογλυκόλης.**

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	$C_{2n}H_{4n+2}O_{n-1}$
ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ	Εξαρτάται από την μοριακή μάζα του
ΣΗΜΕΙΟ ΑΝΑΦΛΕΞΗΣ (°C)	182 - 287
Διαλυτότητα	Διαλύεται σε νερό, μεθανόλη, αιθανόλη, ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο κ.α.

Είναι γνωστό ότι το PEO κατέχει την πρώτη θέση σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, εξαιτίας της υψηλής του ευκαμψίας, σταθερότητας του υδροφιλικότητας του, της μη τοξικότητας του, της βιο-αποικοδομησιμότητας αφού αφομοιώνεται και αποβάλλεται εύκολα από τον οργανισμό και της βιοσυμβατότητας του καθώς δεν αλληλεπιδρά με της πρωτεΐνες του αίματος οι οποίες χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα για την ειδική αναγνώριση των αντιγόνων. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό του PEO είναι ότι αυξάνει το χρόνο κυκλοφορίας του συστήματος στο αίμα.[111]

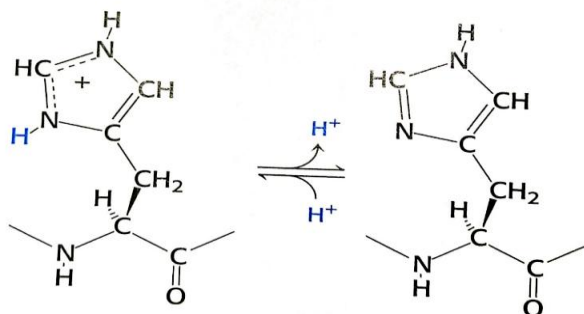
Στην παρούσα εργασία φτιαχτήκαν δυο πολυμερή το ένα με PEO-NH<sub>2</sub> ως μακροαπαρχητής (linear) και το δεύτερο πολυμερές με (PEO)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> ως μακροαπαρχητής (branched) όπου ξεκίνησε ο πολυμερισμός .

Το (PEO)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> έχει ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με το PEO-NH<sub>2</sub> στο μόνο που διαφέρουν είναι ο αριθμός των κλάδων, αφού στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή η δομή του είναι συμπαγής (μικρότερος υδροδυναμικός όγκος και γυροσκοπική ακτίνα και συνεπώς μικρότερη πυκνότητα). Η εισαγωγή των αλυσίδων του PEO στη δομή του πολυμερούς ίσως έχει περισσότερα πλεονεκτήματα σύγκριση με το

γραμμικό και συνεπώς περισσότερες εφαρμογές. Μια από αυτές θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι η διατήρηση της αποδέσμευσης του φαρμάκου σε μεγάλη συγκέντρωση η οποία παραμένει για πιο πολύ χρόνο στο καρκινικό κύτταρο.[112]

### 3.5.2 Πολύ(Ιστιδίνη)

Η L-ιστιδίνη ως αμινοξύ παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω της πολυλειτουργικότητας της και των εξαιρετικών ιδιοτήτων της. Η ιστιδίνη περιέχει μια ομάδα ιμιδαζολίου, έναν αρωματικό δακτύλιο που μπορεί να φορτιστεί (Σχήμα 6). Με  $pK_a$  κοντά στο 6, η ομάδα του ιμιδαζολίου μπορεί να είναι είτε φορτισμένη θετικά είτε αφόρτιστη σε ουδέτερο pH, ανάλογα με το μικροπεριβάλλον στο οποίο θα βρεθεί. Η ιστιδίνη είναι ένα μόριο το οποίο έχει αποκρισιμότητα στο pH όταν πολυμεριστεί αφού ο ιμιδαζολικός της δακτύλιος της δίνει την δυνατότητα να μπορεί να φορτίζεται και να αποφορτίζεται όταν αλλάζει το pH.



**Σχήμα 6: Ο ιονισμός της ιστιδίνης. Η ιστιδίνης μπορεί να δεσμεύει και να απελευθερώνει πρωτόνια κοντά στο φυσιολογικό pH.**

Νανοφορείς οι οποίοι περιέχουν PHIS έχουν την ικανότητα να ελέγχουν που θα διανεμηθούν τα φάρμακα μέσω των pH-αποκρινόμενων sol gel αφού, είναι γνωστό ότι η ιστιδίνη σχηματίζει μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή και γι αυτό το λόγο αποτελεί ιδανικό μέσο στην φαρμακευτική και ιατρική έρευνα. Όμως οι περισσότεροι pH-αποκρινόμενοι νανομεταφορείς επικεντρώνονται στην ενδοσωματική απάντηση του pH με αποτέλεσμα τα περισσότερα από αυτά να απελευθερώνουν το φάρμακο έξω από τα καρκινικά κύτταρα εξαιτίας του χαμηλού όξινου περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα τη χαμηλή αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Μερικά από τα πλεονεκτήματα της PHIS είναι ότι σε  $pH < \sim 6.3$  είναι διαλυτή ενώ σε φυσιολογικό pH ( $\sim 7.4$ ) είναι αδιάλυτη, είναι

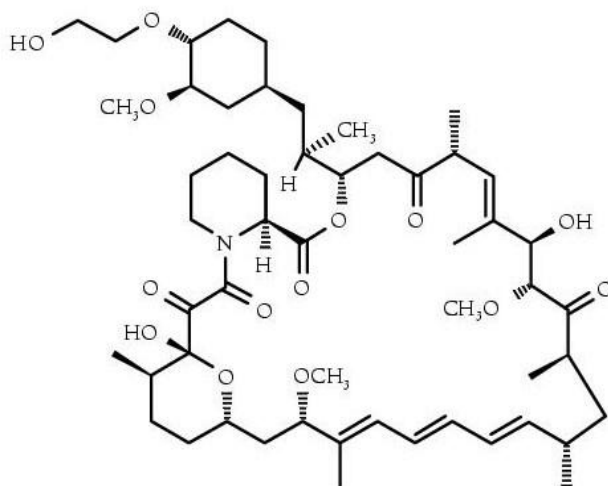


ευαίσθητη στην αλλαγή του pH δηλαδή με την αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της κατά την μεταβολή του pH θα μπορεί να απελευθερώνει το φάρμακο, όταν αλλάζουν οι εξωτερικές συνθήκες, έχει την ικανότητα να διαπερνά την εσωτερική μεμβράνη των όξινων υποκυτταρικών διαμερισμάτων, όπως τα ενδοσώματα, συνδέεται με μέταλλα όπως Au, Co, Fe, Mn καθώς και έχει την ικανότητα να συνδέεται με το DNA μέσω ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των θετικών και των αρνητικών φορτίων του DNA σχηματίζοντας έτσι ένα σταθερό πολυιοντικό συγκρότημα. Παρόλο όμως τις ποικίλες ιδιότητες της, η ιστιδίνη παρουσιάζει ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα αυτό της ρακεμείωσης όπου καθοριστικό παράγοντα στη μείωση της ρακεμείωσης παίζει η προστατευτική ομάδα.

Οι προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση της PHIS είναι είτε η benzyl προστατευτική ομάδα είτε η 2,4-dinitrophenyl προστατευτική ομάδα(DNP). Όμως το 2014 η ερευνητική ομάδα του κ.Ιατρού σύνθεσε την PHIS με τρίτυλο προστατευτική ομάδα. Η σύνθεση της Trt-HIS-NCA ήταν μια διαδικασία πολλών βημάτων, και η καθαρότητα του προϊόντος ήταν πολύ σημαντική αφού αυτή καθόρισε την ποιότητα και την ικανότητα για έλεγχο μοριακών χαρακτηριστικών (μοριακό βάρος, πολυδιασπορά) των συστάδων της πολυιστιδίνης (PHIS). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η κινητική του πολυμερισμού της Trt-HIS-NCA επιβεβαιώνει ότι το ποσοστό του πολυμερισμού είναι περίπου 10 φορές μικρότερο από εκείνο του NCA του γ-βενζυλο-L-γουταμικού. Η benzyl προστατευτική ομάδα αποπροστατεύεται κάτω από πολύ δραστικές συνθήκες όπου μπορεί να προκαλέσει σπάσιμο του πεπτιδικού δεσμού ή ρακεμείωση ενώ η 2,4-dinitrophenyl προστατευτική ομάδα (DNP) δεν συνδιάζεται με δισουλφιδικούς δεσμούς αφού ο δεσμός αυτός σπάει κατά τη διάρκεια της αποπροστασίας του DNP με θειόλυση. Από την άλλη τα πλεονεκτήματα της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας είναι ότι εμφανίζει τη μικρότερη ρακεμείωση κατά την αποπροστασία και μπορεί να αποπροστατευτεί εύκολα με ασθενή οξέα. Επίσης υπάρχει εκλεκτικότητα κατά την αποπροστασία της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας αφού οι άλλες προστατευτικές ομάδες δεν θα επηρεαστούν μόνο η τρίτυλο θα φύγει. Άλλο ένα χαρακτηριστικό της είναι ότι είναι πολύ σταθερή απέναντι σε ουδέτερα, αλκαλικά μέσα και ως προς τα πυρηνόφιλα.[113]

### 3.5.3 Everolimus-Μηχανισμός παρενέργειες

Το Afinitor είναι φάρμακο που περιέχει τη δραστική ουσία everolimus και διατίθεται υπό μορφή δισκίων (2,5 mg, 5 mg και 10 mg). Η χημική του ονομασία είναι 40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin ή 40-O-(2-hydroxyethyl)-sirolimus, ο μοριακός του τύπος είναι  $C_{53}H_{83}NO_{14}$  και το μοριακό του βάρος 958.2. Παρακάτω απεικονίζεται ο συντακτικός τύπος του Everolimus:



Εικόνα 6: Ο συντακτικός τύπος του φαρμάκου Everolimus

#### Μηχανισμός και παρενέργειες

Η δραστική ουσία του Afinitor, η everolimus (παράγωγο του Sirolimus) είναι αντικαρκινικό φάρμακο που δρα αναστέλλοντας μια πρωτεΐνη που ονομάζεται «στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά» (mTOR). Σήμερα χρησιμοποιείται ως ένα ανοσοκατασταλτικό για την πρόληψη της απόρριψης των μεταμοσχεύσεων οργάνων και τη θεραπεία του καρκίνου των νεφρικών κυττάρων και άλλων όγκων όπως το προχωρημένο καρκίνο του μαστού και για παγκρεατικούς νευροενδοκρινικούς όγκους. Η mTOR είναι μια βασική κίνηση σερίνης-θρεονίνης που παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης. Στον οργανισμό, η everolimus προσκολλάται σε μια πρωτεΐνη που υπάρχει στο εσωτερικό των κυττάρων και δημιουργεί ένα «σύμπλοκο» το οποίο, στη συνέχεια, αναστέλλει την πρωτεΐνη mTOR. Επειδή η mTOR συμμετέχει στον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης και στην ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων, το Afinitor προλαμβάνει τη διαίρεση των κυττάρων του όγκου και περιορίζει την παροχή αίματος σε αυτά. Έτσι επιβραδύνεται η ανάπτυξη και η εξάπλωση των όγκων. Οι νευροενδοκρινείς όγκοι προέρχονται από κύτταρα τα οποία παράγουν και εκκρίνουν μία σειρά από ορμόνες που ρυθμίζουν

διάφορες λειτουργίες του οργανισμού. Οι όγκοι αυτοί μπορεί να εμφανιστούν οπουδήποτε στον οργανισμό. Ωστόσο, οι περισσότεροι εκδηλώνονται στο πάγκρεας (παγκρεατικοί NET), στη γαστρεντερική οδό ή στους πνεύμονες (καρκινοειδείς όγκοι). Οι NET του παγκρέατος, γνωστοί και ως όγκοι των νησιδιακών κυττάρων, είναι ένας σπάνιος τύπος καρκίνου που διαφέρει από τον εξωκρινό καρκίνο του παγκρέατος, ο οποίος γενικά αναφέρεται ως καρκίνος του παγκρέατος.

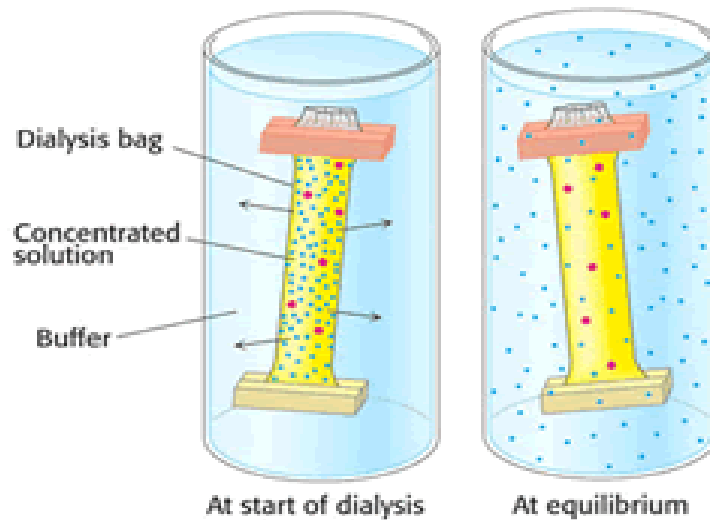
Το Afinitor μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες συμπεριλαμβανομένων προβλημάτων στους πνεύμονες ή την αναπνοή, λοιμώξεων και νεφρικής ανεπάρκειας που μπορεί να οδηγήσουν σε θάνατο. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου (επίπτωση  $\geq 15\%$ ) είναι στοματικά έλκη, διάρροια, αίσθημα αδυναμίας ή κόπωσης, δερματικά προβλήματα (όπως εξάνθημα ή ακμή), λοιμώξεις, ναυτία, οίδημα στα άκρα ή σε άλλα σημεία του σώματος, απώλεια όρεξης, κεφαλαλγία, φλεγμονή του πνευμονικού ιστού, μη φυσιολογική γεύση, ρινορραγίες, φλεγμονή της επένδυσης του πεπτικού συστήματος, μείωση σωματικού βάρους και εμετός.

Στην παρούσα εργασία η θεραπεία αυτού του είδους όγκου αποτέλεσε τον κύριο στόχο λόγω των παρενεργειών που προσκαλεί το φάρμακο που διανέμεται σε μορφή δισκίων χωρίς την εκλεκτική τοποθέτηση του στα καρκινικά κύτταρα στόχους. Έτσι πραγματοποιήθηκε στοχευόμενη εναπόθεση της δραστικής ουσίας στα καρκινικά κύτταρα μέσω <<έξυπνων>> αυτοοργανωμένων συστημάτων, όπως τα μικκύλια και τα κυστίδια που παρασκευάστηκαν στην παρούσα ερευνητική μελέτη. Η επιλογή του φαρμάκου αυτού έγινε επειδή είναι υδρόφοβο φάρμακο δηλαδή είναι αδιάλυτο στο νερό με αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό του σε κυστίδια και στα μικκύλια ώστε να μπορεί με αυτές τις δομές να μεταφέρονται στο αίμα και να εισάγεται στα κύτταρα-στόχους. Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι η δομή των κυστιδίων έχει ιδιαίτερη σταθερότητα πετυχαίνοντας μεγαλύτερη παραμονή του φαρμάκου στο αίμα. [114], [115], [116]

### **3.6 Διαπίδυση (Dialysis)**

Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν από μικρότερα μόρια με τη μέθοδο της διαπίδυσης μέσα από μια ημιπερατή μεμβράνη, όπως μια μεμβράνη κυτταρίνης με πόρους (Εικόνα 7). Το μείγμα των πρωτεϊνών τοποθετείται μέσα σε μια σακούλα διαπίδυσης η οποία αφού δεθεί βυθίζεται μέσα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα από το οποίο

απουσιάζουν όλα τα μικρά μόρια που πρέπει να απομακρυνθούν από το μείγμα των πρωτεϊνών. Τα μόρια που έχουν διαστάσεις σημαντικά μεγαλύτερες από τη διάμετρο των πόρων διατηρούνται μέσα στη σακούλα διαπίδυσης. Τα μικρότερα μόρια και τα ιόντα περνούν από τους πόρους της μεμβράνης και εμφανίζονται στο διάλυμα εκτός σακούλας. Η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη για την απομάκρυνση ενός άλατος ή άλλων μικρών μορίων από ένα κυτταρικό κλάσμα, δεν είναι αποτελεσματική όμως για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. [7]



**Εικόνα 7:** Τα μόρια της πρωτεΐνης (κόκκινα) παραμένουν μέσα στη σακούλα διαπίδυσης, ενώ τα μικρά μόρια (μπλέ) διαχέονται κατά την κατεύθυνση της βαθμίδωσης συγκέντρωσής τους προς το διάλυμα που περιβάλλει τη μεμβράνη.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ**

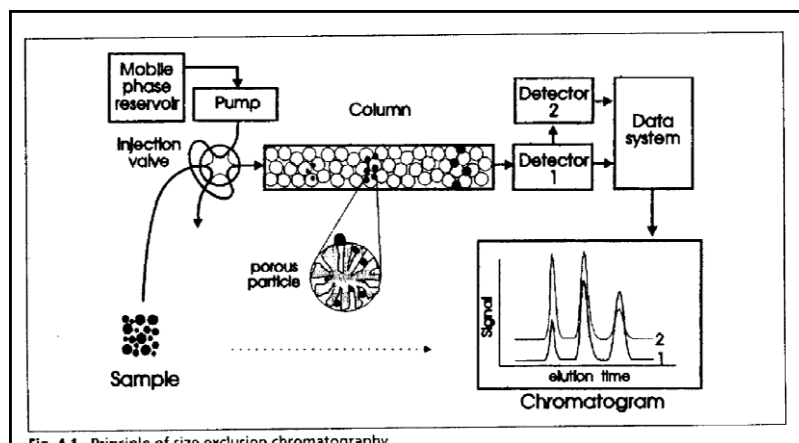
#### **4.1 Εισαγωγή**

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των πολυμερών δίνει τη δυνατότητα της σαφούς γνώσης της μοριακής διασποράς, του μοριακού βάρους, της αρχιτεκτονικής και της σύστασης των πολυμερών. Επίσης πληροφορεί εάν η μεθοδολογία, που χρησιμοποιήθηκε κατά τη σύνθεση, έδωσε το επιθυμητό προϊόν. Για το μοριακό χαρακτηρισμό των πολυμερών, της εργασίας αυτής, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πειραματικές μέθοδοι: η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC), η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS), Στατική σκέδαση φωτός (SLS), ζ-δυναμικό (ζ-potential), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (TEM).

#### **4.2 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography)**

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) ή αλλιώς χρωματογραφία μέσω πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC) μετά της πρώτες προσπάθειες του Moore, η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε σημαντικά και σήμερα αποτελεί την ευρύτερη αναγνωρισμένη μέθοδο για τον προσδιορισμό του μέσου μοριακού βάρους, αλλά κυρίως της κατανομής μοριακών βαρών και την καθαρότητα των πολυμερών τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα, όσο και στη βιομηχανία.

Ουσιαστικά πρόκειται για μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προσαρμοσμένης για την ανάλυση μεγάλων μορίων όπως τα πολυμερή. Στην ουσία με τη SEC προσδιορίζονται τα διάφορα μέσα μοριακά βάρη ( $M_w$ : μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος,  $M_n$ : μέσο μοριακό βάρος κατ'αριθμό,  $M_z$ : μέσο z-μοριακό βάρος) και οι κατανομές μοριακών βαρών ( $I_w = M_w/M_n$ ,  $I_z = M_z/M_w$ ). Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η διάταξη της οργανολογίας σε μία συσκευή SEC.



Εικόνα 8: Χρωματογράφος αποκλεισμού μεγεθών.

Τα μέρη από τα οποία αποτελείται είναι α) Δεξαμενή διαλύτη, β) Αντλία διαλύτη υψηλής πίεσης, γ) Σύστημα εισαγωγής δείγματος δ) Στήλη ή σειρά στηλών με πορώδες υλικό και ε) Ανιχνευτής. Σαν διαλύτες χρησιμοποιούνται κυρίως το τετραυδροφουράνιο (THF) και το χλωροφόρμιο αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και νερό όταν πρόκειται για υδροδιαλυτά πολυμερή. Η αντλία πρέπει να εξασφαλίζει σταθερή παροχή διαλύτη με υψηλή πίεση για να ωθεί το διάλυμα μέσα από τις στήλες. Το σημαντικότερο τμήμα είναι οι στήλες διαχωρισμού. Αρχικά το δείγμα (αραιό διάλυμα πολυμερούς) μεταφέρεται από το φέροντα διαλύτη μέσα σε στήλες κατάλληλα πακεταρισμένες με πορώδες υλικό (δικτυωμένο πολυστυρένιο) μεγάλου εύρους πόρων (102–106 Å). Το υλικό πλήρωσης των στηλών μπορεί να είναι οργανικής φύσεως (π.χ. δικτυωμένο πολυστυρένιο με διβινυλοβενζόλιο) ή ανόργανο (silica gel ή πορώδες γυαλί). Συνήθως προτιμάται υλικό πλήρωσης από πολυστυρένιο, επειδή δε δημιουργούνται δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις (προσρόφηση, ασυμβατότητα) που θα οδηγούσαν σε δευτερογενείς διαδικασίες κατανομής. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις αυξάνουν το χρόνο έκλουσης με αποτέλεσμα να δίνουν μοριακό βάρος μικρότερο του πραγματικού για το άγνωστο δείγμα. Σε ιδανικές στήλες ο διαχωρισμός οφείλεται μόνο στο μοριακό μέγεθος (υδροδυναμικός όγκος) και δεν υπάρχει κανενός άλλου είδους αλληλεπίδραση μεταξύ πορώδους υλικού και μακρομορίων. Ο μηχανισμός διαχωρισμού (αποκλεισμός λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης) στα μικρά μόρια του πολυμερούς (μικρότερος υδροδυναμικός όγκος) μπορούν να περνούν τόσο μεταξύ των κόκκων, όσο και να εισχωρούν μέσα στους πόρους των κόκκων με αποτέλεσμα να καθυστερεί η έκλουση τους από τη στήλη. Αντίθετα τα μεγάλα σωματίδια με διαστάσεις μεγαλύτερες από το μέγεθος των πόρων δε μπορούν να διέλθουν μέσα από αυτούς με συνέπεια να κινούνται μόνο μεταξύ των κόκκων και να εκλούνται σε μικρότερους χρόνους. Μόρια με ενδιάμεσο μέγεθος μπορούν να εισχωρούν σε μερικούς από τους πόρους του

κοκκώδους υλικού εμφανίζοντας διαφορετικό βαθμό καθυστέρησης στο υλικό της στήλης. Έτσι τελικά ο διαχωρισμός των διαλυμένων στην κινητή φάση υλικών επιτυγχάνεται ανάλογα με το μέγεθος τους με τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους να εκκλούνται πρώτα και να ακολουθούν κατόπιν μόρια κατά σειρά μειούμενου μεγέθους. Η ανίχνευση των εκλούμενων μορίων παρατηρείται με κατάλληλο ανιχνευτή που βρίσκεται στην έξοδο των στηλών. Οι χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές πρέπει να χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία και να αποκρίνονται στη συγκέντρωση του διαλυμένου συστατικού. Οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές βασίζονται σε μεταβολές του δείκτη διάθλασης ή σε μεταβολές στην απορρόφηση του διαλύματος σε μήκη κύματος στην περιοχή του υπεριώδους (SEC-UV). Τέλος, το επιθυμητό χρωματογράφημα αποτυπώνεται με τη βοήθεια ενός καταγραφέα. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί έμμεση μέθοδο, γι αυτό απαιτείται βαθμονόμηση των στηλών, που γίνεται μετρώντας το χρόνο έκλυσης προτύπων δειγμάτων (δείγματα γνωστού μοριακού βάρους, στενής κατανομής μοριακών βαρών και ορισμένης αρχιτεκτονικής). Έτσι δημιουργείται μια καμπύλη αναφοράς  $\log M_w$  ως προς τον όγκο έκλυσης  $V_e$  [ $\log M_w = f(V_e)$ ]. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να βρούμε το μοριακό βάρος ενός αγνώστου πολυμερούς από τον όγκο έκλυσης. Για να εφαρμοστεί αυτή η μέθοδος θα πρέπει το άγνωστο δείγμα να έχει την ίδια χημική σύσταση και αρχιτεκτονική με τα πρότυπα δείγματα με τα οποία έγινε η βαθμονόμηση. Για παράδειγμα στην περίπτωση των μιγμάτων ομοπολυμερών, συμπολυμερών και διακλαδισμένων ή αστεροειδών ομοπολυμερών ή συμπολυμερών θα πρέπει να λαμβάνετε υπόψη ότι :

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

Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης  $\log [\eta]M_w = f(V_e)$  όπου  $[\eta]$  το εσωτερικό ιξώδες του εκάστοτε πρότυπου στο φέροντα διαλύτη και στη θερμοκρασία λειτουργίας του οργάνου SEC. Η μέθοδος εξομοιώνει τις διαφορετικές αρχιτεκτονικές και χημικές συστάσεις γιατί το γινόμενο  $[\eta]M_w$  είναι ανάλογο του υδροδυναμικού όγκου του πολυμερούς.

Συμπεραίνουμε ότι η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί μια εύχρηστη και γρήγορη μέθοδο με τη βοήθεια της οποίας μπορεί να σχηματιστεί μια πρώτη εικόνα για το πολυμερές που παρασκευάστηκε ως προς το μέσο μοριακό του βάρος, αλλά κυρίως

προς την κατανομή μοριακών βαρών του και να εξαχθούν συμπεράσματα για την επίτευξη ή όχι της σύνθεσης του επιθυμητού μακρομορίου.[118]

### 4.3 Φασματομετρία Υπερύθρου (FTIR)

Η υπέρυθη περιοχή του φάσματος αντιπροσωπεύει συχνότητες ακριβώς κάτω από τις ορατές συχνότητες, μέχρι ακριβώς πάνω τις υψηλότερες συχνότητες μικροκυμάτων και ραντάρ: μήκη κύματος περίπου από  $8 \times 10^{-5}$  cm έως  $1 \times 10^{-2}$  cm. Τα συνηθισμένα φασματομέτρα υπέρυθρου λειτουργούν στο μέσο της περιοχής αυτής, σε μήκη κύματος μεταξύ  $2.5 \times 10^{-4}$  cm και  $25 \times 10^{-4}$  cm, που αντιστοιχούν σε ενέργειες από περίπου 4.6 έως 46 kJ/mol. Τα υπέρυθρα φωτόνια δεν διαθέτουν αρκετή ενέργεια, ώστε να προκαλέσουν μεταπτώσεις, μπορούν όμως να προκαλέσουν τη δόνηση ομάδων ατόμων, γύρω από τους δεσμούς που τις συνδέουν. Οι δονητικές μεταπτώσεις αντιπροσωπεύουν διακριτές ενέργειες, ενώ τα μόρια απορροφούν υπέρυθη ακτινοβολία μόνο σε συγκεκριμένα μήκη κύματος και συγκεκριμένες συχνότητες.

Η θέση μιας υπέρυθρης ζώνης μπορεί να καθοριστεί από το μήκος κύματός της ( $\lambda$ ), μετρημένο σε μικρά ( $\mu$ ). Το μικρό αντιστοιχεί στο ένα εκατομμυριοστό του μέτρου, ή  $10^{-4}$  cm. Ωστόσο, πιο συνηθισμένη μονάδα είναι ο κυματάριθος, ο οποίος αντιστοιχεί στον αριθμό των κύκλων (μήκη κύματος) ανά εκατοστό. Ο κυματάριθος είναι το αντίστροφο του μήκους κύματος (σε εκατοστά).

Οι κυματάριθοι αποτελούν την πιο συνηθισμένη μέθοδο προσδιορισμού των απορροφήσεων IR. Ο κυματάριθος είναι ανάλογος προς τη συχνότητα ( $\nu$ ) του κύματος και επομένως και προς την ενέργεια του φωτονίου με τη συγκεκριμένη συχνότητα.

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (Infrared Spectroscopy) δίνει πληροφορίες για τις μοριακές ταλαντώσεις που συμβαίνουν σε μια χημική ένωση. Η ενέργεια των περισσότερων μοριακών ταλαντώσεων αντιστοιχεί στην υπέρυθη ακτινοβολία του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και κατά συνέπεια μπορούν να ανιχνευθούν άμεσα από ένα φάσμα IR. Από όλο το εύρος ενός φάσματος IR η περιοχή  $1.400-4.000 \text{ cm}^{-1}$  είναι αυτή που δίνει τις περισσότερες πληροφορίες καθώς εκεί εμφανίζονται απορροφήσεις που οφείλονται σε χαρακτηριστικές ομάδες όπως π.χ καρβονύλια. Βέβαια και η περιοχή  $600-1.400 \text{ cm}^{-1}$  περιέχει πολλές ταινίες απορροφήσεων οι οποίες προέρχονται κυρίως από τον ανθρακικό σκελετό μιας ένωσης. Το σύνολο αυτών των ταινιών είναι μοναδικό για κάθε χημική ένωση και επομένως αποτελεί εργαλείο για την χημική ταυτοποίησή της .[118]



#### 4.4 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Σε ένα διάλυμα πολυμερούς τα μόρια του βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση που προκαλείται από τη θερμική ενέργεια που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown). Εξαιτίας των συγκρούσεων τα μόρια του πολυμερούς εκτελούν μεταφορική αλλά και περιστροφική κίνηση και οι συντελεστές διάχυσής τους συνδέονται άμεσα με την κίνησή τους. Αφού τα κινούμενα μόρια σκεδάσουν φως με τρόπο που συνδέεται ποσοτικά με την κίνησή τους, είναι δυνατόν χρησιμοποιώντας πειράματα σκέδασης φωτός να προσδιοριστούν οι συντελεστές διάχυσης των μορίων. Οι συντελεστές αυτοί συνδέονται άμεσα με χαρακτηριστικές ιδιότητες των μορίων, όπως το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθός τους. [33][119]

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

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

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

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

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

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

Ο υπολογισμός των ακτινών ( $r$ ) των λιποσωμάτων γίνεται με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων ανάλυσης των συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης. Τέτοιες μέθοδοι είναι η μέθοδος των αθροισμάτων (cumulants method) και οι τεχνικές κανονικοποίησης όπως είναι το πρόγραμμα CONTIN. Η δεύτερη μέθοδος όπου και χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία βασίζεται στην απόρριψη των πολύπλοκων λύσεων της  $G(\Gamma)$  υποθέτοντας ότι

είναι λιγότερο πιθανές ή περισσότερο πιθανό να οφείλονται σε πειραματικά σφάλματα ή απροσδιοριστίες. Για αυτό το λόγο προστίθεται ένας όρος στο άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων μεταξύ της υπολογιζόμενης καμπύλης και των πειραματικών δεδομένων, ο οποίος είναι μέτρο του ρυθμού αλλαγής της  $G(\Gamma)$ . Ο όρος αυτός είναι ανάλογος του ολοκληρώματος της δευτέρας παραγώγου της  $G(\Gamma)$  ως προς ολόκληρη την κατανομή. Η σταθερά αναλογίας  $\alpha^2$ , καλείται παράμετρος κανονικοποίησης και μπορεί να μεταβληθεί, επιλέγοντας μια τιμή του  $\alpha$  η οποία αλλάζει συστηματικά. Υπολογίζεται το αποτέλεσμα της  $G(\Gamma)$  με ελαχιστοποίηση του αθροίσματος των τετραγώνων των αποκλίσεων και του  $\alpha$ . Τελικά, εξετάζεται μια περιοχή τιμών του  $\alpha$  και κατόπιν επιλέγεται μια μικρή περιοχή μέσα από την οποία προκύπτει η τελική λύση [120],

#### 4.5 Στατική Σκέδαση Φωτός (SLS)

Στην στατική σκέδαση φωτός (Static Light Scattering, SLS), η μέση χρονική τιμή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, μετράται συναρτήσει της γωνίας σκέδασης  $\theta$  και της συγκέντρωσης του διαλύματος  $c$  και εκφράζεται μέσω του λόγου Rayleigh,  $R_\theta$ , ο οποίος ορίζεται ως:

$$R_\theta = \frac{d^2 I_s}{V f I_0} \quad (4.5.1)$$

όπου  $d$  είναι η απόσταση μεταξύ δείγματος και ανιχνευτή,  $V$  ο σκεδαζόμενος όγκος,  $f$  ο παράγοντας διόρθωσης ως προς το επίπεδο πόλωσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και  $I_s$ ,  $I_0$  οι εντάσεις της σκεδαζόμενης και προσπίπτουσας ακτινοβολίας, αντίστοιχα.

Σε ένα αραιό σύστημα, όπως για παράδειγμα ένα αέριο, τα μόρια κατανέμονται τυχαία στο χώρο και σε μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους, οπότε η συνεισφορά κάθε μορίου στην ένταση σκέδασης μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη του αριθμού τους. Στην περίπτωση όμως πυκνών συστημάτων, όπως τα καθαρά υγρά και τα διαλύματα, τα μόρια βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις, οπότε η ακτινοβολία που σκεδάζεται από κάθε μόριο αλληλεπιδρά με εκείνη που προέρχεται από άλλα μόρια. Η πιθανότητα για καταστρεπτική συμβολή αυξάνεται και το φαινόμενο αυτό μειώνει την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Η περιγραφή του φαινομένου αυτού μπορεί να γίνει μέσω της θεωρίας των διακυμάνσεων Einstein-Smoluchowski, η οποία λαμβάνει υπόψη τις τοπικές διακυμάνσεις της διηλεκτρικής σταθεράς, σε κλίμακα της τάξης μεγέθους του

μήκους κύματος, οι οποίες προέρχονται από διακυμάνσεις πυκνότητας σε ένα καθαρό υγρό και/ή από διακυμάνσεις συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η συνεισφορά των διακυμάνσεων συγκέντρωσης στη σκέδαση εκφράζεται μέσω της σχέσης:

$$\Delta R_{\theta} = R_{\theta, \text{διαλύματος}} - R_{\theta, \text{διαλύτη}} \quad (4.5.2)$$

Όπως φαίνεται στη σχέση (4.5.1), ο λόγος  $R_{\theta}$  εξαρτάται από τη γεωμετρία της πειραματικής διάταξης. Για το λόγο αυτό στην πράξη υπολογίζεται ο απόλυτος λόγος  $R_{\theta}$ , ο οποίος κανονικοποιείται ως προς πρότυπους διαλύτες όπως το τολουόλιο, ως εξής:

$$R_{\theta} = R_T \frac{n_0^2}{n_T^2} \frac{I_S}{I_{S,T}} \quad (4.5.3)$$

όπου  $R_T$  ο λόγος Rayleigh του τολουολίου,  $n_0$  και  $n_T$  οι δείκτες διάθλασης του διαλύτη και του τολουολίου και  $I_S$  και  $I_{S,T}$  οι εντάσεις της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας του διαλύματος και του τολουολίου, αντίστοιχα.

Στην περίπτωση των πολυμερικών διαλυμάτων, η διαφορά  $\Delta R_{\theta}$  συνδέεται με τα μοριακά χαρακτηριστικά του πολυμερούς και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του διαλύματος μέσω της εξίσωσης Zimm:

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right) + 2A_2c \quad (4.5.4)$$

όπου  $M_w$  το μοριακό βάρος του πολυμερούς,  $R_g$  η γυροσκοπική ακτίνα του πολυμερούς,  $A_2$  ο δεύτερος συντελεστής Virial, ο οποίος εκφράζει αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο μορίων και  $q$  το διάνυσμα σκέδασης, το οποίο ορίζεται ως:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (4.5.5)$$

όπου  $\lambda$  το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η σταθερά  $K$  δίνεται από τη σχέση:

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \quad (4.5.6)$$

όπου  $N_A$  ο αριθμός του Avogadro και  $\partial n/\partial c$  ο διαφορικός δείκτης διάθλασης.

Μέσω της εξίσωσης (4.5.4) και για μετρήσεις σε πολλαπλές γωνίες  $\theta$  και συγκεντρώσεις  $c$ , προκύπτει το διάγραμμα Zimm. Από το διάγραμμα αυτό με διπλή προέκταση των μετρούμενων τιμών του λόγου  $Kc/\Delta R_\theta$  σε μηδενική γωνία σκέδασης και μηδενική συγκέντρωση, εξάγεται το μοριακό βάρος  $M_W$  ως το αντίστροφο της κοινής τεταγμένης επί της αρχής, ενώ ο συντελεστής  $A_2$  και η γυροσκοπική ακτίνα  $R_g$  υπολογίζονται από τις κλίσεις των ευθειών για  $\theta = 0$  και  $c = 0$ , αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται από τη σχέση (4.5.4) ο διαφορικός δείκτης διάθλασης  $\partial n/\partial c$  του πολυμερικού διαλύματος, είναι μια απαραίτητη παράμετρος για την ανάλυση των μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός. Η παράμετρος αυτή αποτελεί το μέτρο της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύματος συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης του πολυμερούς, είναι χαρακτηριστική του κάθε συστήματος πολυμερούς-διαλύτη και μετράται με τη χρήση διαφορικών διαθλασιμέτρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση συμπολυμερών κατά συστάδες και διαλυμάτων που περιέχουν δύο ή περισσότερα συστατικά, τα οποία δεν παρουσιάζουν ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του διαλύματος  $(\partial n/\partial c)_{ολικό}$  μπορεί να υπολογιστεί ως σταθμισμένος μέσος όρος των διαφορικών δεικτών διάθλασης  $(\partial n/\partial c)_1$  και  $(\partial n/\partial c)_2$  των επιμέρους συστατικών, ως εξής:

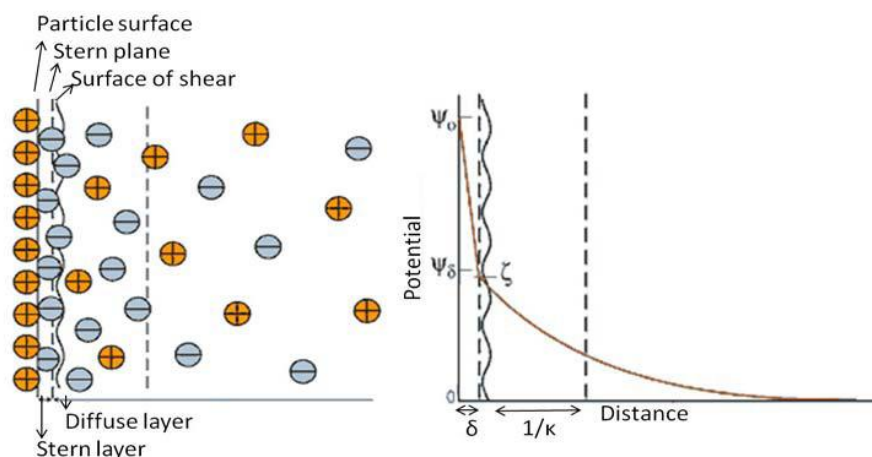
$$\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_{ολικό} = w_1 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_1 + w_2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_2 \quad (4.5.7)$$

όπου  $w_1$  και  $w_2$  τα κλάσματα βάρους των δύο συστατικών.[119]

#### 4.6 Ζ-Δυναμικό (Z-Potential)

Ζήτα δυναμικό είναι το φορτίο που αναπτύσσεται στη μεσεπιφάνεια μεταξύ μίας στερεάς επιφανείας και του υδατικού διαλύματος. Αυτό το δυναμικό, το οποίο μετράται σε millivolts (mV), μπορεί να προκύψει με αρκετούς μηχανισμούς. Η ανάπτυξη φορτίων στην επιφάνεια των σωματιδίων επηρεάζει την κατανομή των ιόντων που περιβάλλουν την περιοχή της μεσεπιφάνειας έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των αντισταθμιστικών ιόντων (ιόντων που έχουν αντίθετο φορτίο από αυτά των σωματιδίων). Έτσι δημιουργείται μια ηλεκτρική διπλοστιβάδα γύρω από κάθε σωματίδιο.

Η διμερής υγρή στιβάδα, που περιβάλλει το σωματίδιο, αποτελείται από μια εσωτερική περιοχή γνωστή ως στοιβάδα του Stern, όπου τα ιόντα είναι στενά δεμένα και μια εξωτερική, διάχυτη περιοχή όπου είναι λιγότερο σταθερά προσκολλημένα. Στο εσωτερικό της διάχυτης στοιβάδας υπάρχει ένα ιδεατό τμήμα όπου τα σωματίδια και τα ιόντα σχηματίζουν μια σταθερή οντότητα. Όταν ένα σωματίδιο κινείται, τα ιόντα στο εσωτερικό τμήμα κινούνται μαζί του αλλά οποιαδήποτε ιόντα πέρα από αυτό το τμήμα δε ταξιδεύουν με το σωματίδιο. Αυτό το τμήμα καλείται ως υδροδυναμική διάτμηση ή επίπεδο ολίσθησης και το δυναμικό που επικρατεί σε αυτό το τμήμα ονομάζεται ζ-δυναμικό (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της διπλοστιβάδας και του ζ-δυναμικού.

Αν τα σωματίδια έχουν μικρές τιμές ζ-δυναμικού τότε τα σωματίδια θα συσσωματωθούν ενώ αν όλα τα σωματίδια έχουν μεγάλο θετικό ή αρνητικό ζ-δυναμικό θα απωθούνται μεταξύ τους. Όπως αναφέραμε και παραπάνω το ζ-δυναμικό εκτός του ότι είναι μία σημαντική παράμετρος για την κατανόηση των κolloειδών συστημάτων, αντιπροσωπεύει το φορτίο ενός σωματιδίου, που το αποκτά σε ένα συγκεκριμένο

περιβάλλον. Επίσης εξαρτάται από το pH, την ιοντική ισχύ και τη συγκέντρωση του συστατικού. Η κινητικότητα των σωματιδίων μετράται με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης με λείζερ. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα μετατρέπεται σε ζ-δυναμικό χρησιμοποιώντας γνωστές θεωρίες. Όμως οι επιδράσεις στο ζ-δυναμικό από πιθανές αλλαγές στο pH, τη συγκέντρωση ιόντων και τη συγκέντρωση των συστατικών, μπορούν να δώσουν πληροφορίες, όπως το ισοηλεκτρικό σημείο ενός δείγματος πρωτεΐνης.[121]

Το ζ-δυναμικό ενός σωματιδίου μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση Henry αν η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του δείγματος είναι γνωστή

$$U_e = 2 \times \epsilon \times \zeta \times f \times (ka) / 3 \times \eta$$

#### 4.7 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποτελεί μία από τις σπουδαιότερες μεθόδους χαρακτηρισμού της δομής και χρησιμοποιείται ευρέως σε σχεδόν όλους τους κλάδους της χημείας. Μέσω του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μπορούμε να προσδιορίσουμε τη στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) του πολυμερούς καθώς και τη γεωμετρική ισομέρεια, τη δομή και τη σύσταση των συμπολυμερών, ενώ τελευταία έχει αναπτυχθεί και τεχνική για τη μελέτη της κίνησης των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση. Πρέπει να τονιστεί ότι η θεωρητική βάση του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προτάθηκε το 1924 από τον W.Pauli ο οποίος είπε ότι ο πυρήνας ενός ατόμου πρέπει να έχει spin και μαγνητική ροπή έτσι ώστε με έκθεση του σε μαγνητικό πεδίο να υποστούν διάσχιση οι ενεργειακές τους στάθμες.

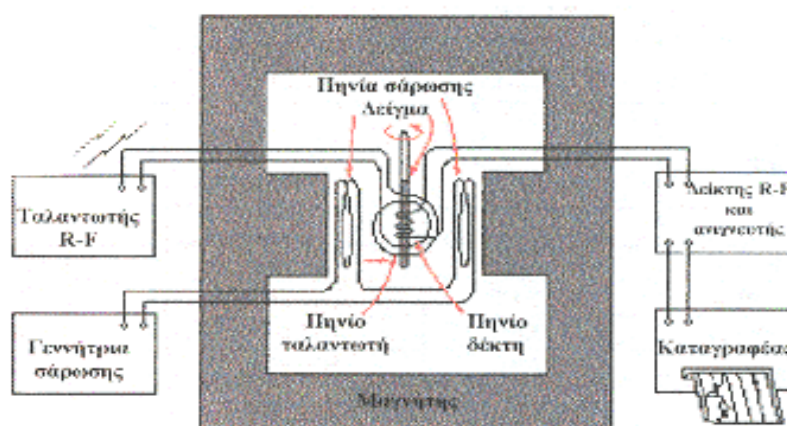
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μηχανισμού, αφορά στους πυρήνες των ατόμων και όχι στα ηλεκτρόνια. Ουσιαστικά είναι φασματοσκοπία απορρόφησης με βάση τις μαγνητικές ιδιότητες των πυρήνων των ατόμων. Ανάλογα με το είδος των πυρήνων που εξετάζονται υπάρχει και μια ειδική τεχνική π.χ.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  κτλ. Η φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ , με την οποία χαρακτηρίστηκαν τα υλικά της παρούσας εργασίας, ασχολείται με την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου στα άτομα του υδρογόνου ενός μορίου. Είναι γνωστό ότι κάθε πυρήνας διαθέτει ένα φορτίο το οποίο περιστρεφόμενο γύρω από ένα νοητό άξονα (spin) δημιουργεί ένα μαγνητικό πεδίο, λόγω της στροφορμής η οποία εκφράζεται με τον αριθμό αυτοστροφής  $I$  (spin).

Συγκεκριμένα, σε πυρήνες που έχουν περιττό αριθμό πρωτονίων ή/ και νετρονίων παρουσιάζονται spin με ημιακέραιες ή ακέραιες τιμές ενώ, οι πυρήνες που έχουν άρτιο αριθμό πρωτονίων και νετρονίων παρουσιάζουν μηδενικό spin και δε εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες. Οι πυρήνες όμως στους οποίους  $I > 0$  όταν αλληλεπιδρούν με ένα ισχυρό μαγνητικό εξωτερικό πεδίο,  $H_0$ , προσανατολίζονται και καταλαμβάνουν συγκεκριμένες κβαντισμένες ενεργειακές στάθμες οι οποίες εξαρτώνται από το  $I$ . Όταν προσφερθεί σε ένα πρωτόνιο ενέργεια  $\Delta E$  μέσω ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κατάλληλης συχνότητας, τότε το πρωτόνιο μεταπηδά από τη στάθμη χαμηλής ενέργειας στη στάθμη υψηλής ενέργειας. Αυτή η διεργασία απορρόφησης ενέργειας λέγεται μαγνητικός συντονισμός και είναι η βασική αρχή της φασματοσκοπίας NMR. Απουσία άλλων αλληλεπιδράσεων, η απορρόφηση της ενέργειας θα δινόταν σαν μια απλή κορυφή στο φάσμα NMR. Στην πραγματικότητα, το μαγνητικό πεδίο μέσα στο οποίο βρίσκεται ο πυρήνας μεταβάλλεται από το μαγνητικό πεδίο που δημιουργούν τα κινούμενα  $e^-$  γύρω από αυτόν θωρακίζοντας τον. Τα  $e^-$  δημιουργούν τα δικά τους τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο του πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό.

Οι πυρήνες όμως ενός μορίου, διαφέρουν ως προς το ηλεκτρονιακό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, οπότε θωρακίζονται και μάλιστα σε διαφορετικό βαθμό. Αυτό έχει ως συνέπεια το πραγματικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο να μην είναι το ίδιο και να λαμβάνεται διαφορετικό σήμα NMR. Οι χημικά ισοδύναμοι πυρήνες εμφανίζουν μια απορρόφηση. Ένα γράφημα του NMR βαθμολογείται και χρησιμοποιείται με κάποιο σημείο αναφοράς. Χημική μετατόπιση ονομάζεται η θέση στο γράφημα όπου απορροφά ένας πυρήνας.

Πιο συγκεκριμένα το φάσμα πρωτονίου  $^1H$  NMR, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την μελέτη των πολυμερών, αποτελείται από μία ομάδα φασματικών γραμμών οι οποίες οφείλονται στα διαφορετικά είδη πρωτονίων του δείγματος. Υπάρχουν τρεις βασικές πληροφορίες που μπορούμε να πάρουμε από ένα φάσμα: (α) η θέση της φασματικής γραμμής ή όπως λέγεται η χημική μετατόπιση, η οποία είναι χαρακτηριστική του είδους των πυρήνων και του μοριακού περιβάλλοντός τους. (β) το εμβαδόν της περιοχής κάτω από κάθε φασματική γραμμή, το οποίο είναι ανάλογο με τον αριθμό των πυρήνων που υπάρχουν στο δείγμα (γ) το εύρος της φασματικής γραμμής, το οποίο σχετίζεται με το μοριακό περιβάλλον του συγκεκριμένου πρωτονίου.

Τα βασικά τμήματα ενός φασματομέτρου NMR φαίνονται στην (Εικόνα 10). Το δείγμα, που βρίσκεται μέσα σε φιαλίδιο μικρής διαμέτρου, τοποθετείται σε ειδικό γυάλινο υποδοχέα που περιστρέφεται από αεροτουρμπίνα για να επιτυγχάνεται η ισοκατανομή του μαγνητικού πεδίου προς όλες τις διευθύνσεις του. Περιβάλλεται από πηνίο που συνδέεται με δέκτη ραδιοσυχνοτήτων, ενώ ένα δεύτερο πηνίο εκπέμπει ενέργεια προς αυτό, σε διεύθυνση κάθετη προς το μαγνητικό πεδίο και συνδέεται με ταλαντωτή ραδιοσυχνοτήτων. Τα δύο πηνία είναι κάθετα μεταξύ τους και προς την διεύθυνση του μαγνητικού πεδίου.[122]



Εικόνα 10: Σχηματικό διάγραμμα φασματομέτρου NMR .

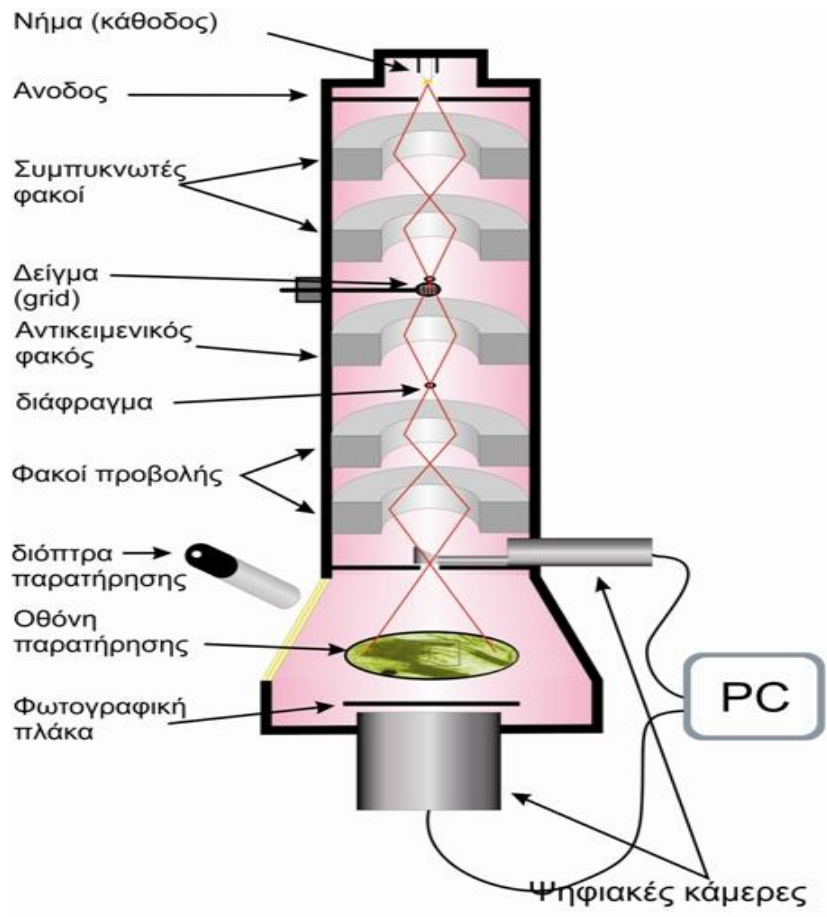
#### 4.8 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (TEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) είναι μια σημαντική τεχνική χαρακτηρισμού μιας και μπορεί να φτάσει σε διακριτική ικανότητα περίπου τα 0,15–0,35 nm εκμεταλλευόμενη την κυματική φύση των ηλεκτρονίων. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής αυτής είναι η εξής: μια δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από το δείγμα και αλληλεπιδρά με τα συστατικά του (ανάλογα με τα στοιχεία που το αποτελούν). Η προβολή της δέσμης μετά το δείγμα αντιστοιχεί στο είδωλο του δείγματος όπως προκύπτει μετά από την αλληλεπίδραση της δέσμης με το δείγμα. Η πηγή ηλεκτρονίων αποτελείται από νήμα βολφραμίου το οποίο καθώς διατρέχεται από ρεύμα εκπέμπει ηλεκτρόνια (θερμιονική εκπομπή). Μεταξύ του νήματος, που αποτελεί την κάθοδο, και της ανόδου, εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού (της τάξης των 60-200 kV) η οποία επιταχύνει τα ηλεκτρόνια. Η πορεία και η κλίση των τροχιών των ηλεκτρονίων, ρυθμίζεται από τους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς στους οποίους αλλάζοντας την ένταση



του ρεύματος που τους διαπερνάει, μεταβάλλεται η ένταση του μαγνητικού πεδίου και επομένως η δέσμη των ηλεκτρονίων μπορεί να εστιαστεί στο δείγμα. Το δείγμα πρέπει να είναι πολύ λεπτό έτσι ώστε τα ηλεκτρόνια να διέρχονται από μέσα του, με συνέπεια να λαμβάνει χώρα ελαστική ή και καθόλου σκέδαση των ηλεκτρονίων (σε αντίθεση με τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια σάρωσης όπου τα ηλεκτρόνια σταματούν μέσα στο δείγμα). Το σύστημα που αποτελείται από την πηγή ηλεκτρονίων, φακούς, δείγμα, οθόνη και σύστημα φωτογράφησης, πρέπει να βρίσκεται σε υψηλό κενό της τάξης των 10<sup>-4</sup> Torr τουλάχιστον για να αποφεύγονται οι σκεδάσεις ηλεκτρονίων από μόρια του αέρα (Εικόνα 11). Η εικόνα που λαμβάνεται σχηματίζεται πάνω σε οθόνη επικαλυμμένη με φθορίζουσα ουσία. Η οθόνη αυτή διεγείρεται από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν επάνω της, αφού πρώτα έχουν διαπεράσει το δείγμα. Στα σημεία εκείνα που το δείγμα δεν είναι διαπερατό από τα ηλεκτρόνια, δημιουργούνται σκοτεινές περιοχές, ενώ αντίθετα τα διαπερατά σημεία δίνουν φωτεινές περιοχές. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα λήψης εικόνας μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή σε ψηφιακή μορφή, χάρη στην διάταξη με μικροκάμερες που υπάρχει στο σύστημα. Όπως συμβαίνει στην περίθλαση ακτίνων Χ, έτσι και στην ηλεκτρονική μικροσκοπία τα ηλεκτρόνια περιθλώνται από τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα του κρυστάλλου έτσι ώστε να ισχύει ο νόμος του Bragg. Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης θέτει πολλούς περιορισμούς ως προς τη φύση των δειγμάτων που μπορούν να μελετηθούν. Κάποιες από τις ιδιότητες που θα πρέπει να έχει ένα δείγμα ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί με TEM είναι οι ακόλουθες: να μην είναι πτητικό, να αντέχει σε υψηλό κενό, να είναι σταθερό στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων και να είναι αρκετά λεπτό για να μπορούν να το διαπερνούν τα ηλεκτρόνια. [123]

Σχηματική αναπαράσταση ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης δίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 11: Σχηματική παράσταση ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.

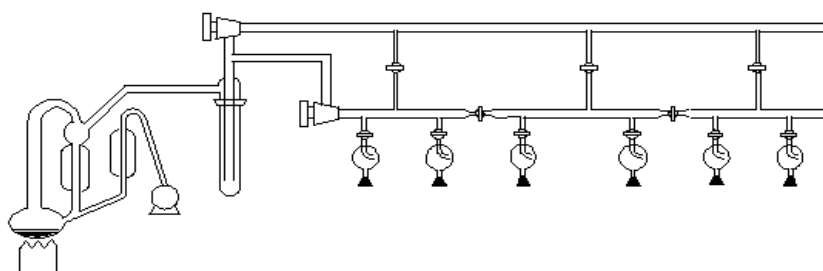
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Σύνθεση και χαρακτηρισμός πολυμερών

##### 5.1 Τεχνική υψηλού κενού

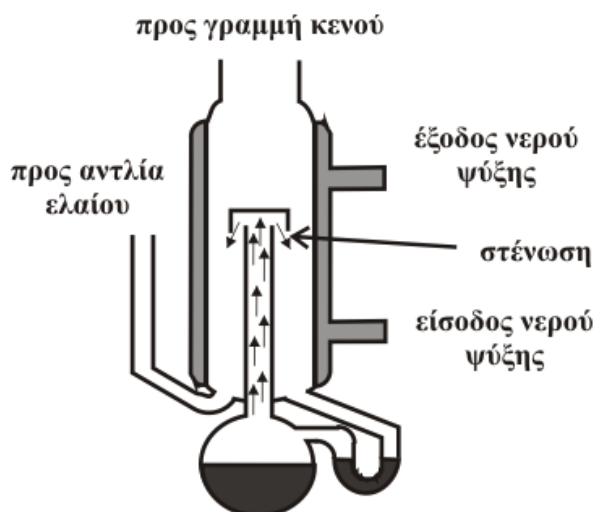
Η σύνθεση των πολυμερών, που έγινε στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου, ROP, χρησιμοποιώντας την τεχνική υψηλού κενού. Για να επιτευχθεί η σύνθεση μακρομορίων με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά απαιτούνται αυστηρά καθορισμένες συνθήκες. Γι αυτό το λόγο ειδικά σχεδιασμένες συσκευές πολυμερισμού και κατάλληλες τεχνικές υψηλού κενού χρησιμοποιούνται για να απομακρυνθούν από το περιβάλλον των αντιδράσεων όλες εκείνες οι ανεπιθύμητες προσμίξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε παράπλευρες αντιδράσεις. Έχοντας υψηλό κενό στον αντιδραστήρα του πολυμερισμού, απομακρύνεται ο ατμοσφαιρικός αέρας που περιέχει πλήθος ανεπιθύμητων προσμίξεων, όπως οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα ή υγρασία οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν είτε με τον απαρχητή του πολυμερισμού είτε με την αναπτυσσόμενη αλυσίδα και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να προκύψει ένα μη καθαρό προϊόν. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι καθαρισμοί όλων των διαλυτών και των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν έγιναν σε υψηλό κενό ώστε να απομακρυνθούν οι πιθανές δραστικές προσμίξεις που περιέχονται στα αντιδραστήρια του εμπορίου (αλκοόλες, αμίνες και οξέα). Η γραμμή υψηλού κενού φαίνεται στο (Εικόνα 12)



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση γραμμής υψηλού κενού.

Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από μια αντλία ελαίου, μια αντλία διαχύσεως υδραργύρου, από γυάλινους σωλήνες (Pyrex) και στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (Rotaflo HP10mm, 10 στην -8 mm Hg). Η αντλία ελαίου δημιουργεί κενό 74 της τάξης των  $10^{-2}$  –  $10^{-3}$  mm Hg. Το προκαταρκτικό αυτό κενό είναι απαραίτητο για να

αποστάξει ο υδράργυρος, που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως, σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία. (Εικόνα 13)



Εικόνα 13: Αντλία διαχύσεως υδραργύρου.

Καθώς τα μόρια του υδραργύρου κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξηση της ταχύτητάς τους με ταυτόχρονη ελάττωση της πίεσής τους, σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli.

Σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli, όταν ένα ασυμπίεστο ρευστό ρέει κατά μήκος ενός σωλήνα ροής που δεν έχει σταθερή διατομή, η παροχή (ρυθμός ροής) του δεν πρέπει να αλλάζει. Όταν ένα στοιχείο του ασυμπίεστου ρευστού επιταχύνεται, θα πρέπει να κινείται από μία περιοχή υψηλής πίεσης προς μία άλλη χαμηλής πίεσης, ώστε να υπάρχει συνισταμένη δύναμη που να το επιταχύνει προς τα εμπρός. Όταν η διατομή του σωλήνα ροής μεταβάλλεται, θα πρέπει να αλλάζει και η πίεση ακόμα και αν δεν υπάρχει διαφορά στο ύψος. Έτσι, κατά τη δίοδο των μορίων του υδραργύρου μέσα από τη στένωση προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς τους και λόγω της μείωσης της πίεσης που αυτό προκαλεί, δημιουργείται διαφορά πίεσης (υποπίεση) στα άκρα της στήλης. Κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα, ο υδράργυρος συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη, όπου και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Έτσι επιτυγχάνεται το τελικό κενό που είναι της τάξης των  $10^{-6}$  mm Hg, ίσο με την τάση ατμών του υδραργύρου.

Σύμφωνα με το σχήμα παρατηρούμε ότι για την προστασία της αντλίας διαχύσεως και ελαίου από πτητικά συστατικά, υπάρχουν δύο παγίδες υγρού αζώτου πριν από κάθε

αντλία. Με τις στρόφιγγες το κενό κατευθύνεται σε συγκεκριμένα σημεία της γραμμής και καθίσταται δυνατή η απομόνωση άλλων σημείων και με την βοήθεια διαφόρων εσφυρισμάτων επιτυγχάνεται η προσαρμογή των χρησιμοποιούμενων συσκευών στη γραμμή κενού και γίνεται η απόσταξη των διαφόρων ουσιών (διαλύτες, μονομερή, κλπ.) στις συγκεκριμένες συσκευές. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται εύκολα θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με παγόνερο ή υγρό άζωτο. Η «ποιότητα του κενού είναι δυνατόν να ελεγχθεί με το πηνίο Tesla. Όταν η γραμμή υψηλού κενού έχει απαερωθεί ικανοποιητικά, τότε ο θόρυβος του πηνίου κοντά στα γυάλινα τμήματα της γραμμής είναι ασήμαντος. Πριν από τη λήψη των πειραμάτων θα πρέπει να ανεβάζουμε στη γραμμή υψηλού κενού τη συσκευή μας για να ελέγχουμε τη συσκευή πολυμερισμού για τυχόν ύπαρξη μικροοπών αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση του Tesla καθώς και να τηρούμε όλα τα μέτρα ασφαλείας. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται αναλυτικά ο χειρισμός της γραμμής κενού και οι απαραίτητες προφυλάξεις που θα πρέπει να παίρνουμε.[124],[125]

## 5.2 Καθαρισμός Διαλυτών

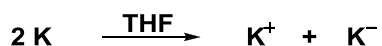
**Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF):** Το DMF έχει (σ.ζ=153°C) και είναι ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τους πολυμερισμούς των NCAs στην παρούσα εργασία καθώς και για την αραίωση του απαρχητή. Το DMF υπόκειται σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση όμως κατά την θερμική παράγεται διμεθυλαμίνη και μονοξείδιο του άνθρακα. Επίσης υδρολύεται αργά παρουσία νερού, παράγοντας διμεθυλαμίνη και φορμικό οξύ. Το DMF φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box σε μπουκάλια και μεταγγίζεται σε φιάλη με στρόφιγγά, η οποία περιέχει υδρίδιο του ασβεστίου και πριν είχε ξεραθεί στη γραμμή υψηλού κενού και απαερωθεί δύο φορές. Στη συνέχεια αφήνεται να αντιδράσει για μισή ώρα, απαερώνεται και αποστάζεται σε διπλανή φιάλη. Η απόσταξη γίνεται κλασματικά και συλλέγεται μόνο το μεσαίο κλάσμα, το οποίο φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -20°C και προστατεύεται από το φως.

**Οξικός αιθυλεστέρας (EtAc):** Ο οξικός αιθυλεστέρας έχει (σ.ζ= 77°C) και χρησιμοποιείται ως διαλύτης τόσο για την σύνθεση των μονομερών(BOC-Lys NCA) όσο και για τις ανακρυσταλλώσεις τους. Ο διαλύτης αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε φιάλη 2 L με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) για μια μέρα. Παρατηρούμε ότι ο

διαλύτης αποκτά ένα ασθενές μαύρο χρώμα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή κενού, απαερώνεται και εν συνεχεία αποστάζεται σε διπλανή φιάλη 2 L με στρόφιγγα (δεν παίρνω το τελευταίο κλάσμα). Μετά το τέλος της απόσταξης απαερώνεται άλλη μια φορά.

**Εξάνιο:** Το βενζόλιο έχει (σ.ζ=69°C) και αποτελεί το μη διαλύτη στο σύστημα ανακρυσταλλώσεων διαλύτη-μη διαλύτη για τον καθαρισμό των N-Καρβοξυανυδριτών. Όσο αναφορά τον καθαρισμό του αφήνεται για μια μέρα υπό ανάδευση σε σφαιρική φιάλη 2L η οποία περιέχει λεπτότατα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου(CaH<sub>2</sub>) για την απομάκρυνση ιχνών νερού και υγρασίας. Στη συνέχεια, η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή κενού και το διάλυμα απαερώνεται και αποστάζεται σε γειτονική φιάλη που περιέχει κανονικό βουτυλολίθιο (n-BuLi) αραιωμένο σε εξάνιο, το οποίο θα αντιδράσει με τις όποιες τυχόν προσμίξεις. Μετά το τέλος της απόσταξης ακολουθεί και άλλη απαέρωση. Η διατήρηση του κίτρινου χρώματος του παραπάνω διαλύματος αποτελεί ένδειξη καθαρότητας. Τέλος η φιάλη με το υδρίδιο του ασβεστίου απενεργοποιείται μετά με τολουόλιο και μεθανόλη.

**Τετραϋδροφουράνιο (THF):** Το THF έχει (σ.ζ= 66°C). Όσο αναφορά τον καθαρισμό του THF αφήνεται για μια μέρα να αντιδράσει παρουσία μεταλλικού νατρίου στη συνέχεια μεταφέρεται στη γραμμή απαερώνεται και αποστάζεται σε νέα σφαιρική φιάλη 1000 ml η οποία περιέχει κράμα μεταλλικού καλίου-νατρίου σε αναλογία 3:1 και αφήνεται υπό ανάδευση. Η εμφάνιση κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη της καθαρότητας του διαλύτη. Το χρώμα πιθανότατα οφείλεται σε σύμπλοκα του καθαρού διαλύτη με τα αρνητικά ιόντα μετάλλων, κυρίως του καλίου. Δηλαδή το αρνητικό ιόν καλίου επιδιαλυτώνεται στο THF σύμφωνα με την αντίδραση.



και γι αυτό σχηματίζει διάλυμα με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα.

**Βενζόλιο:** Το βενζόλιο έχει (σ.ζ= 80° C) .Αρχικά το βενζόλιο προστίθεται σε θειικό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και αφήνεται υπό ανάδευση τουλάχιστον μια εβδομάδα για την απομάκρυνση ακόρεστων ενώσεων όπως είναι το θειοφένιο και άλλες ολεφίνες. Στη συνέχεια το πλένουμε ανακινώντας το με νερό, υδροξείδιο νατρίου και πάλι νερό, και σχηματίζονται

δύο φάσεις μια διαυγής και μια σκούρα. Αφού πάρουμε τη διαυγή φάση που μας ενδιαφέρει προσθέτω λεπτότατα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου ( $\text{CaH}_2$ ) και το αφήνω υπό ανάδευση για μια μέρα για την απομάκρυνση ιχνών νερού και υγρασίας. Έπειτα ανεβάζω τη φιάλη μου στη γραμμή κενού, το διάλυμα της φιάλης απαερώνεται και αποστάζεται σε γειτονική φιάλη που περιέχει κανονικό βουτυλολίθιο ( $n\text{-BuLi}$ ) όπου και αφήνεται υπό ανάδευση για μια μέρα ώστε να αντιδράσουν και τα τελευταία ίχνη προσμίξεων με αυτό. Τέλος η φιάλη με το υδρίδιο του ασβεστίου απενεργοποιείται μετά με τολουόλιο και μεθανόλη. [126]

### **Καθαρισμός Απαρχητή και Αντιδραστηρίων**

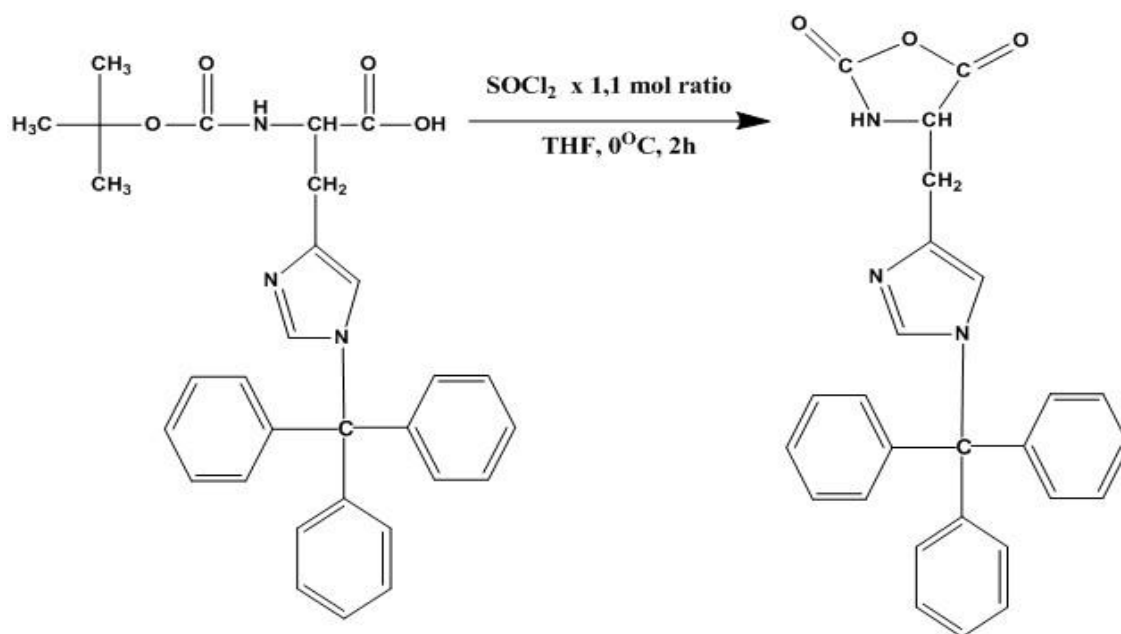
**Τριαιθυλαμίνη:** Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται κατά τη σύνθεση του Boc-Lys NCA ως μέσω δέσμευσης του υδροχλωρίου. Ο καθαρισμός της γίνεται με υδρίδιο του ασβεστίου ( $\text{CaH}_2$ ) για μια μέρα και την επόμενη μέρα, αφού απαερωθεί ακολουθεί απόσταξη σε γειτονική φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει μεταλλικό νάτριο. [126]

## **5.3 Σύνθεση και καθαρισμός N-Καρβοξυανυδριτών**

Τα μονομερή NCA's που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των πολυπεπτιδίων δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα και γι'αυτό παρασκευάζονται στο εργαστήριο από τα αντίστοιχα αμινοξέα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται ο NCA της ιστιδίνης, ο NCA του  $\gamma\text{-Bz-L-Glutamate}$  και ο NCA της λυσίνης, όπου η σύνθεση αυτού του μονομερούς απαιτεί ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της προστασίας. Το προστατευμένο αμινοξύ υπάρχει στο εμπόριο, αλλά η τιμή του είναι υψηλή. Έτσι η συνθετική πορεία ξεκινά από το ελεύθερο αμινοξύ.

### **5.3.1 Σύνθεση Nim-Trt-L-Histidine NCA**

Η διαδικασία της σύνθεσης του Nim-Trt-L-Histidine NCA διαρκεί περίπου τρεις ημέρες και η αντίδραση σύνθεσης απεικονίζεται παρακάτω.



**Σχήμα 7: Αντίδραση σύνθεσης Nim-Trt-L-Histidine NCA.**

1. Προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού δίλαιομη σφαιρική φιάλη του 1L, η οποία απαερώνεται και στη συνέχεια, γίνονται σε αυτήν τρία flame drying ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Στη συνέχεια, προστίθενται 20 gr Boc-His(Trt)-OH υπό ροή αργού και προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού προς ξήρανση για μια μέρα.
2. Την επόμενη μέρα, αποστάζονται ~200 ml καθαρού THF στη φιάλη με την Boc-His(Trt)-OH (το στερεό διαλύεται αμέσως στο THF) ώστε να προκύψει διάλυμα περίπου 10% .Με την ολοκλήρωση της απόσταξης η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή και ξεπαγώνει με νερό βρύσης. Με χρήση της φιάλης αργού, τοποθετείται αργό μέσα στην συσκευή .Το αργό είναι βαρύ και αδρανές αέριο οπότε θα βρίσκεται πάνω στο διάλυμα αποτρέποντας να έρθει σε επαφή το διάλυμα με την υγρασία και την ατμόσφαιρα. Έπειτα, η φιάλη του 1L τοποθετείται υπό ανάδευση και συνδέεται με φιάλη αργού συνέχεια, ώστε να υπάρχει συνεχή ροή αργού.
3. Σε καθαρή φιάλη των 50ml, αποστάζονται στη γραμμή κενού, 25ml THF. Αφού, η φιάλη ξεπαγώσει με νερό βρύσης στη συνέχεια μεταγγίζονται σε σταγονομετρικό χωνί με στρόφιγγα το οποίο, έχει ξηρανθεί σε φούρνο των 150°C. Σε αυτό το χωνί που περιέχει τα 25ml THF προστίθεται με σύριγγα και διαλύεται η ποσότητα του θειόνυλο χλωριδίου  $\text{SOCl}_2$  η οποία χρησιμοποιείται για την αντίδραση.



Χρησιμοποιούνται 3.25ml (44.2mmol)  $\text{SOCl}_2$ , δηλαδή 1.1 φορές τα mol της Boc-His(Trt)-OH.

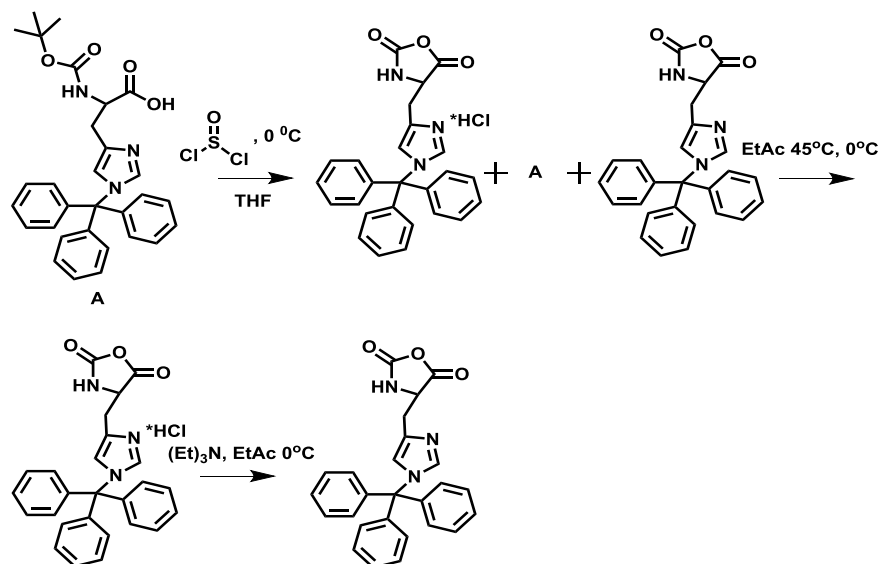
4. Προσαρμόζεται το σταγονομετρικό χωνί που περιέχει  $\text{SOCl}_2$  διαλυμένο με THF στη φιάλη και προστίθεται στάγδην στην φιάλη που είχε Boc-His(Trt)-OH και THF υπό ροή αργού. Η προσθήκη ολοκληρώνεται μέσα σε περίπου είκοσι (20) λεπτά και η αντίδραση μένει για δυο ώρες. Ακολουθεί η τοποθέτηση της φιάλης σε παγόλουτρο για να είναι η θερμοκρασία της αντίδρασης στους  $0^\circ\text{C}$ , ώστε να επιβραδυνθούν παράπλευρες αντιδράσεις. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων IR έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδος της. Μετά, την αντίδραση στη φιάλη υπάρχει: ο NCA της ιστιδίνης ( $\text{N}^{\text{im}}$ -trityl-His NCA), χλωρίδιο της Boc-His(trt)-OH, που δεν έχει κλείσει και το υδροχλωρικό άλας του NCA της ιστιδίνης σε μεγάλο ποσοστό.
5. Μετά, την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το περιεχόμενο της συσκευής που έλαβε χώρα η αντίδραση χύνεται σε ποτήρι ζέσης που περιέχει διαιθυλαιθέρα περίπου δέκα φορές σε σχέση με το THF με σκοπό να διαλυθεί το χλωρίδιο της Boc-His(trt)-OH που δεν έχει κλείσει και τυχόν  $\text{SOCl}_2$  που έχει απομείνει. Εκεί το προϊόν της αντίδρασης καταπέφτει και στη συνέχεια, φιλτράρεται με Buchner (φίλτρο No 3) έτσι ώστε να συλλεχτεί το στερεό (υποκίτρινο χρώμα) ενώ, παράλληλα πάνω από το διάλυμα το οποίο φιλτράρεται αλλά και από το στερεό εφαρμόζεται ήπια ροή αργού ώστε να δημιουργηθεί ένα ασφαλές περιβάλλον για τον NCA. Αφού, τελειώσει το φιλτράρισμα συλλέγεται το στερεό που μένει στο φίλτρο και τοποθετείται σε φιάλη 500ml η οποία, έχει ξηραθεί στη γραμμή κενού και έχει μείνει προς ξήρανση όλο το βράδυ. Στο στερεό αυτό υπάρχει πλέον ο NCA της ιστιδίνης και το υδροχλωρικό άλας του NCA.
6. Την επόμενη μέρα, αποστάζονται μέσα στη φιάλη με το στερεό, 250-300ml AcOEt. Σκοπός της απόσταξης με AcOEt είναι ο διαχωρισμός ο NCA της ιστιδίνης από το υδροχλωρικό άλας του NCA. Το διάλυμα έχει χρώμα υποκίτρινο και είναι γαλακτοειδές. Αυτό συνέβη γιατί ο NCA της ιστιδίνης είναι αδιάλυτος στον οξικό αιθυλεστέρα ενώ το υδροχλωρικό άλας του NCA δεν είναι. Μετά, η φιάλη τοποθετείται για ανάδευση μέσα σε μια κάψα με νερό και θερμαίνεται με τη χρήση της ανάδευσης στους  $45^\circ\text{C}$  για μια ώρα.
7. Μετά τη μία ώρα αντικαθίσταται το ζεστό νερό στην κάψα με λουτρό πάγου αφού, με αυτό τον τρόπο μειώνεται η διαλυτότητα του NCA και παρατηρείται ότι ο σχηματισμένος λευκός NCA καταβυθίζεται (ίζημα) ενώ πάνω σχηματίζεται ένα

κίτρινο διάλυμα. Το κίτρινο διάλυμα είναι οι διάφορες προσμίξεις, ακαθαρσίες, παραπροϊόντα ή μη αντιδρώντα που είναι διαλυτά στον AcOEt.

8. Στην συνέχεια, γίνεται φιλτράρισμα πάλι στο περιεχόμενο της συσκευής χρησιμοποιώντας φίλτρο No 3 και με τη βοήθεια αργού για να εμποδιστεί η επαφή του τελικού προϊόντος με τον ατμοσφαιρικό αέρα και την υγρασία. Πάνω στο φίλτρο μένει ο NCA με το υδροχλώριο. Το υδροχλώριο που προκύπτει κατά την αντίδραση φεύγει, λόγω της ενεργότητας του τ-N του ιμιδαζολικού δακτυλίου το υδροχλώριο συνδέεται σε αυτό. Το στερεό έχει υφή πούδρας και λευκό χρώμα. Τέλος, το στερεό, τοποθετείται σε προζυγισμένη φιάλη και μένει για ξήρανση όλο το βράδυ.
9. Την επόμενη μέρα, ζυγίζεται το στερεό το οποίο είχε μείνει για ξήρανση όλο το βράδυ (NCA με υδροχλώριο). Η ζύγιση του στερεού είναι: 14,608g (31mmol). Αυτό γίνεται για να υπολογιστεί η ποσότητα της τριαιθυλαμίνης και στη συνέχεια, τιλοδοτείται η ποσότητα αυτή του NCA-His:HCl με 1:1 ποσότητα τριαιθυλαμίνης ( $\text{Et}_3\text{N}$ ), με το HCl και μένει ο καθαρός NCA. Είναι γνωστό πως το μοριακό βάρος του NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο είναι 459,5. Υπολογίζεται με προσοχή η ποσότητα της τριαιθυλαμίνης που χρησιμοποιείται, γιατί αν πέσει λιγότερο δε θα φύγει όλο το υδροχλώριο με συνέπεια ο πολυμερισμός να μη γίνει σωστά και αν πέσει περισσότερο υπάρχει κίνδυνος έναρξης πολυμερισμού, αφού η τριαιθυλαμίνη ως βάση μπορεί να εκκινήσει τον πολυμερισμό των NCAs .
10. Στην συνέχεια, αποστάζονται στη φιάλη NCA-His: HCl με την βοήθεια της γραμμής κενού 250ml AcOEt. Δε διαλύεται τίποτα απλά προκύπτει ένα λευκό γαλάκτωμα και μόλις η φιάλη ξεπαγώσει τοποθετείται σε παγόλουτρο. Σε μια άλλη φιάλη των 50ml αποστάζονται 20ml AcOEt στο οποίο διαλύεται η ποσότητα της τριαιθυλαμίνης που προστίθεται στο άλας του NCA.
11. Υπολογίζεται πως στη φιάλη υπάρχουν 0,031791 mol από τον NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο ( $14,608\text{g}/459,14\text{g}\cdot\text{mol}^{-1} = 0,031791\text{mol}$ ). Είναι γνωστό ότι το μοριακό βάρος της τριαιθυλαμίνης είναι  $101,19\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Άρα χρειάζονται  $101,19\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \times 0,031791\text{ mol} = 3,2169$  γραμμάρια τριαιθυλαμίνης. Η πυκνότητα της τριαιθυλαμίνης είναι  $0,7255\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Και από τον τύπο της πυκνότητας  $d = m \times V$  υπολογίζονται 4,434 ml τριαιθυλαμίνης. Άρα τα 20ml AcOEt και τα 4,434ml  $\text{Et}_3\text{N}$  (1:1 ποσότητα με τα mol του NCA-His:HCl ώστε να δεσμευτεί ποσοτικά το HCl) διαλύονται σε γυάλινο χωνί με στρόφιγγα το οποίο έχει ξηρανθεί στο φούρνο των  $150^\circ\text{C}$ . Η προσθήκη γίνεται στους  $0^\circ\text{C}$  για να μη συμβεί έναρξη του

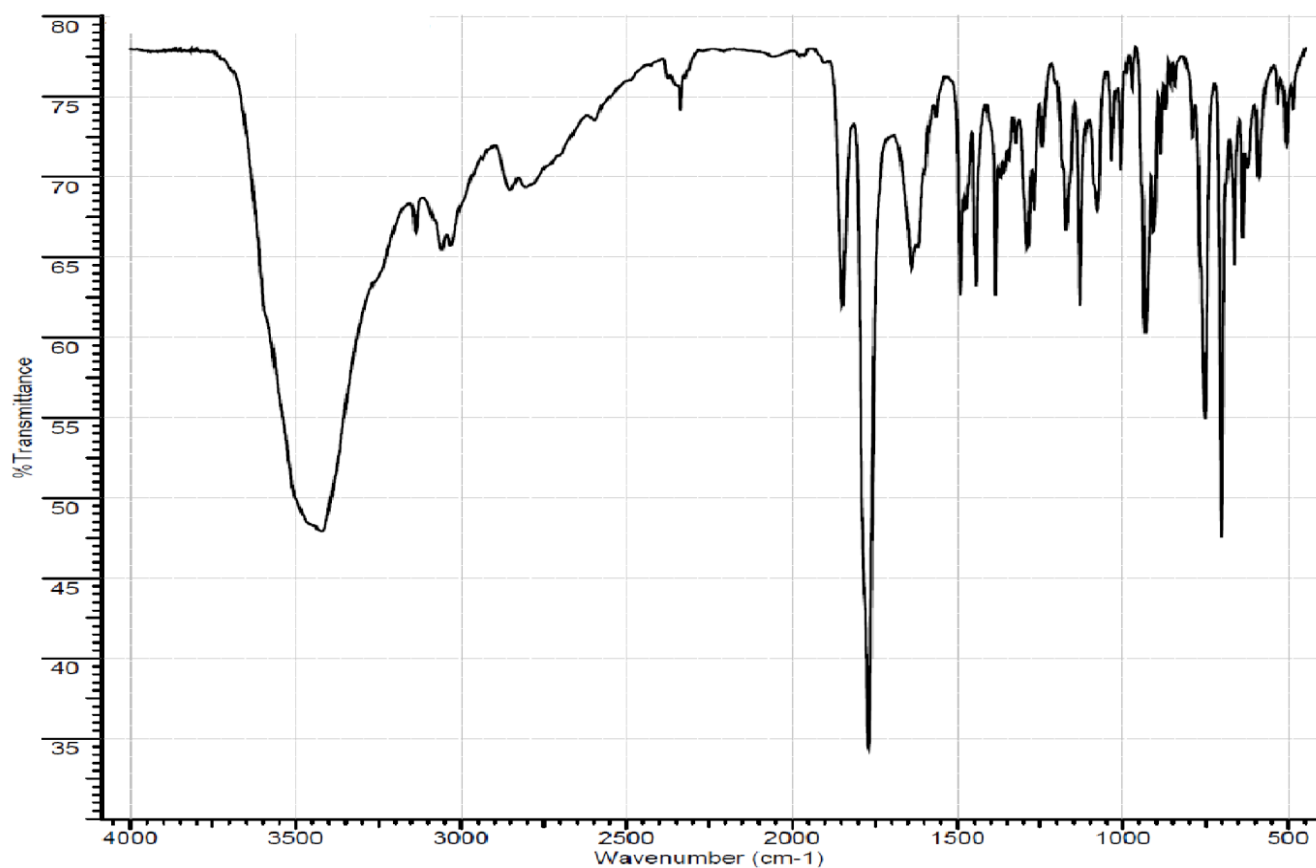
πολυμερισμού όταν υπάρχει NCA. Ακολούθως, το χωνί προσαρμόζεται στη φιάλη έτσι ώστε να πέσει στάγδην το διάλυμα  $\text{Et}_3\text{N}-\text{AcOEt}$  σε χρονικό διάστημα δέκα λεπτών και υπό έντονη ανάδευση, ώστε να μη δημιουργηθεί τοπική περίσσεια τριαιθυλαμίνης. Η προσθήκη ολοκληρώνεται σε 15 λεπτά και μένει για μια ώρα ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Σκοπός είναι να αντιδράσει η τριαιθυλαμίνη η οποία είναι βασική με το υδροχλώριο που υπάρχει στον NCA και εξαιτίας της χαμηλής θερμοκρασίας που έχει δημιουργηθεί με το παγόλουτρο, το άλας της τριαιθυλαμίνης το οποίο δεν είναι διαλυτό να καταβυθιστεί ώστε να απομακρυνθεί με διήθηση. Παρατηρείται ότι σε αυτή τη μια ώρα αρχικά το διάλυμα είναι γαλακτοειδές στη συνέχεια, γίνεται για λίγο διαυγές και στη συνέχεια, γίνεται πάλι γαλακτοειδές γιατί  $\text{Et}_3\text{N}:\text{HCl}$  πέφτει σαν ίζημα. Αυτό συνέβη επειδή ο Nim-trityl-His NCA είναι διαλυτός στον AcOEt ενώ το άλας  $\text{Et}_3\text{N}:\text{HCl}$  δεν είναι διαλυτό.

12. Σε φιάλη 2L η οποία έχει ξεραθεί στη γραμμή κενού προστίθεται περίπου 1L εξάνιο. Χρησιμοποιείται φίλτρο No 3 στο οποίο διηθείται το περιεχόμενο της φιάλης από το προηγούμενο βήμα έτσι ώστε το άλας της τριαιθυλαμίνης να μείνει πάνω σε αυτό και να περάσει κάτω διαλυτός ο NCA. Κρατιέται το περιεχόμενο της δόλαιμης που είναι ο NCA σε εξάνιο και παρατηρείται να πέφτει στο εξάνιο έχοντας άσπρο χρώμα .
13. Σε αυτό το βήμα φιλτράρεται ξανά ο NCA στο εξάνιο. Χρησιμοποιείται μια νέα φιάλη των 2L στην οποία έχει προσαρμοστεί φίλτρο. Η όλη διαδικασία γίνεται υπό ροή αργού .Ο καθαρός NCA μένει στο φίλτρο και αμέσως συλλέγεται .Στη συνέχεια, τοποθετείται σε φιάλη των 250 ml όπου μένει για ξήρανση στη γραμμή κενού όλο το βράδυ.
14. Την επόμενη μέρα, η φιάλη με τον NCA της ισιδίνης μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και φυλάσσεται εκεί, σε δοχείο υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Ζυγίζονται 12,1 γραμμάρια. Για την απόδοση έχουμε  $20\text{g}/497,58 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}=0,0402 \text{ mol}$  για το αντιδρών και  $12,1\text{g}/423 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}=0,0286\text{mol}$  για το προϊόν.
15. Άρα η συνολική απόδοση είναι:  $0,0286\text{mol}/0,0402\text{mol}\times 100\%=71,14\%$



Σχήμα 8: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του N<sup>im</sup>-Trityl-His NCA.

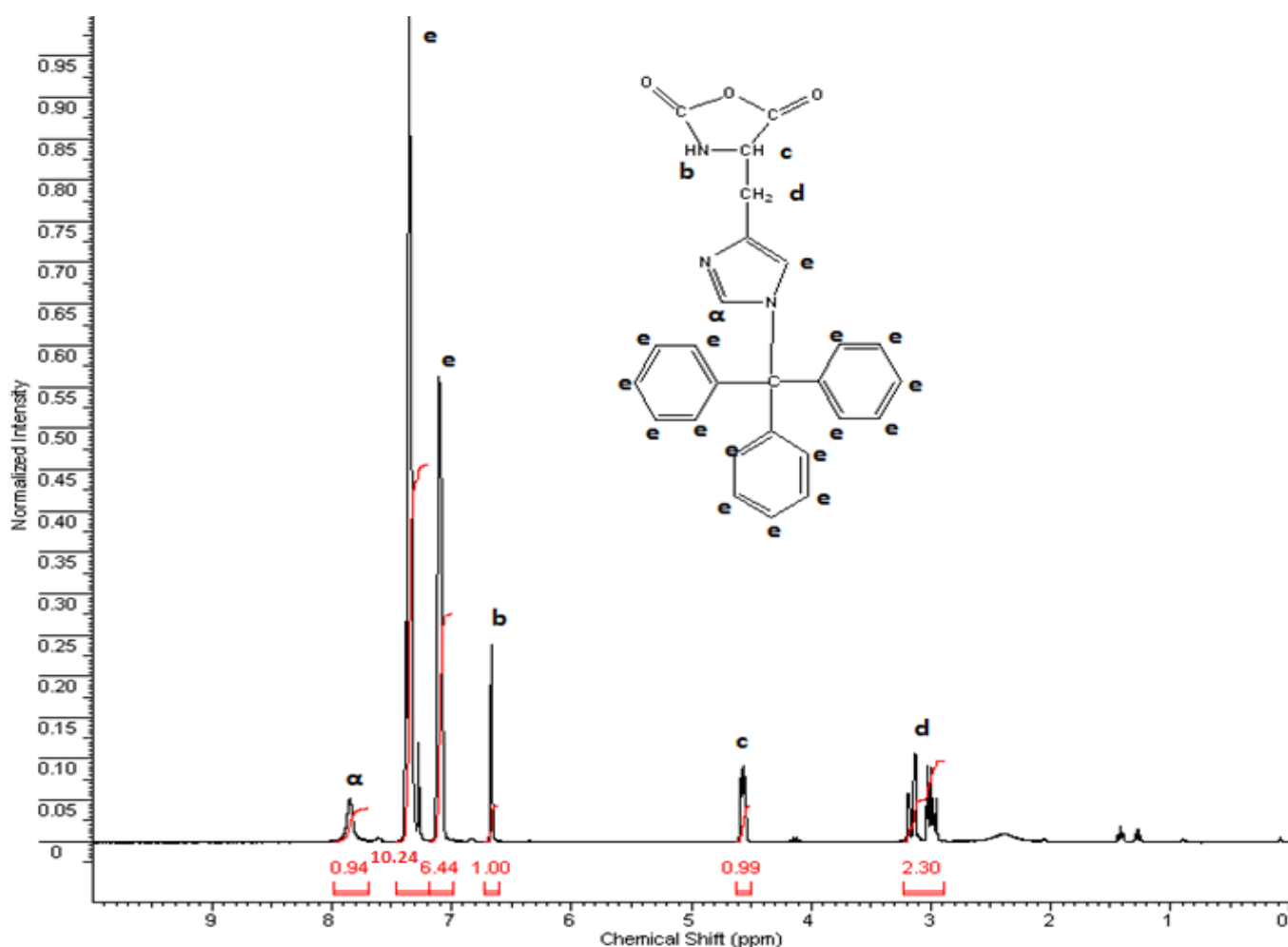
Τέλος γίνεται λήψη των φασμάτων IR και NMR.



Εικόνα 14: Φάσμα IR της Nim-Trt-L-Histidine NCA.

Στο Φάσμα του IR για τον Nim-Trt-L-Histidine NCA είναι χαρακτηριστικές οι κορυφές στα  $1768\text{ cm}^{-1}$  του C2 και στα  $1849\text{ cm}^{-1}$  του C5 του NCA.

Για την εξακρίβωση της σύνθεσης του NCA της ιστιδίνης με την τρίτυλο προστατευτική ομάδα γίνεται λήψη του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.



Εικόνα 15: Φάσμα NMR της Nim-Trt-L-Histidine NCA.

Στο φάσμα του  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρείται ότι το υδρογόνο του C του ιμιδαζολικού δακτυλίου που συνδέεται με το άζωτο που φέρει την προστασία (e) εντοπίζεται στην ίδια περιοχή με τα υδρογόνα της προστασίας. Επίσης στην ίδια περιοχή (7,2 ppm) εμφανίζεται και η κορυφή από το διαλύτη.

### 5.3.2 Σύνθεση $\text{N}^t\text{-Boc-L-Lys NCA}$

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το προστατευμένο αμινοξύ υπάρχει στο εμπόριο αλλά η τιμή του είναι υψηλή. Έτσι η συνθετική πορεία ξεκινάει από το ελεύθερο αμινοξύ όμως, για τη σύνθεση αυτού του μονομερούς απαιτείται και ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της προστασίας. Γι αυτό το λόγο για τη σύνθεση του μονομερούς, απαιτείται η χρήση

διαφορετικών προστατευτικών ομάδων στην πλευρική ομάδα, που να μπορούν να αποπροστατευτούν εκλεκτικά. Σαν προστατευτική ομάδα επιλέχτηκε η Boc-ομάδα και όχι η ομάδα Z γιατί η Boc-ομάδα είναι σταθερή στην υδρογόνωση και αποπροστατεύεται εύκολα με χρήση τριφθοροξικού οξέος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αλλά είναι ευαίσθητη σε όξινο περιβάλλον. Αυτός είναι και ο λόγος, που κατά τη σύνθεση του ανυδρίτη αποφεύγεται η περίσσεια τριφωσγενίου που θα έκανε το περιβάλλον όξινο και θα οδηγούσε σε παράπλευρες αντιδράσεις και για αυτό, χρησιμοποιείται ισομοριακή ποσότητα τριφωσγενίου.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι, η σύνθεση και ο καθαρισμός γίνεται σε μια μέρα και κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πρέπει να υπάρχει έντονη ανάδευση ώστε να μη δημιουργηθεί τοπική περίσσεια κατά την εισαγωγή της τριαιθυλαμίνης.

Πριν, τη συνθετική πορεία N<sup>ε</sup>-Boc-L-Lys NCA γίνεται καθαρισμός των διαλυτών (εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα) από τυχόν προσμίξεις. Σκοπός είναι να μην υπάρχει υγρασία στο εξάνιο γιατί έτσι μπορεί να ξεκινήσει ο πολυμερισμός των μονομερών. Για να μη συμβεί αυτό προστίθεται μικρή ποσότητα λειοτριβημένο υδρίδιο του ασβεστίου CaH<sub>2</sub> (μεγαλύτερη επιφάνεια αντίδρασης) το οποίο, δρά σαν ξηραντικό και μένει υπό ανάδευση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα, η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή όπου παγώνει το εξάνιο με το CaH<sub>2</sub> γίνεται απαέρωση και μετά ελέγχεται με Tesla αν έχει πιάσει κενό η γραμμή κενού. Έπειτα, προσαρμόζεται μια γειτονική φιάλη 2L που περιέχει sec-BuLi και αφού δημιουργείται ενεργειακή διαφορά παγώνοντας τη φιάλη με το sec-BuLi και θερμαίνοντας τη φιάλη με το εξάνιο ξεκινάει η απόσταξη. Το sec-BuLi αντιδρά με τα οργανικά παραπροϊόντα του εξανίου. Μετά την απόσταξη ότι έχει μένει από το εξάνιο απενεργοποιείται με τολουόλιο και μεθανόλη και όχι νερό γιατί υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να γίνει έκρηξη. Τέλος, η φιάλη που περιέχει sec-BuLi και εξάνιο ξεπαγώνετε με νερό βρύσης. Με τον ίδιο τρόπο καθαρίζεται και ο οξικός αιθυλεστέρας. Σε σφαιρική 2L φιάλη που περιέχει οξικό αιθυλεστέρα προστίθεται πεντοξείδιο του φωσφόρου και ένα μαγνητάκι και μένει υπό ανάδευση όλη το βράδυ. Την επόμενη μέρα, παρατηρείται ότι το διάλυμα της φιάλης έχει αλλάξει χρώμα προς το πιο σκούρο (μαύρο χρώμα). Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως ο οξικός αιθυλεστέρας με το πεντοξείδιο του φωσφόρου αντιδρούν με την υγρασία.



**Εικόνα 16: Οξικός αιθυλεστέρας μετά από αντίδραση με πεντοξειδίο του φωσφόρου.**

Στη συνέχεια, παγώνεται με άζωτο η φιάλη που περιέχει οξικό αιθυλεστέρα με πεντοξειδίο του φωσφόρου απαερώνεται και μετά ελέγχεται με Tesla αν έχει πιάσει κενό η γραμμή κενού. Έπειτα, προσαρμόζεται στη γραμμή γειτονική σφαιρική φιάλη 2L που περιέχει καθαρό οξικό αιθυλεστέρα ώστε να γίνει η απόσταξη και μετά την απόσταξη η φιάλη απομακρύνεται από την γραμμή κενού και ξεπαγώνετε με νερό βρύσης. Με το τρόπο αυτό γίνεται ο καθαρισμός του οξικού αιθυλεστέρα .

1. Προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μια καθαρή δίλαιομη σφαιρική φιάλη των 1000 ml η οποία απαερώνεται και γίνονται σε αυτήν τρία flame drying ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Έπειτα, ζυγίζονται: 430,409gr. Με τη βοήθεια του αργού τοποθετείται το αντιδρών Na-Ne-Di-Boc-L-Lysine 98% μέσα στη φιάλη. Στη συνέχεια, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή κενού όπου απαερώνεται.

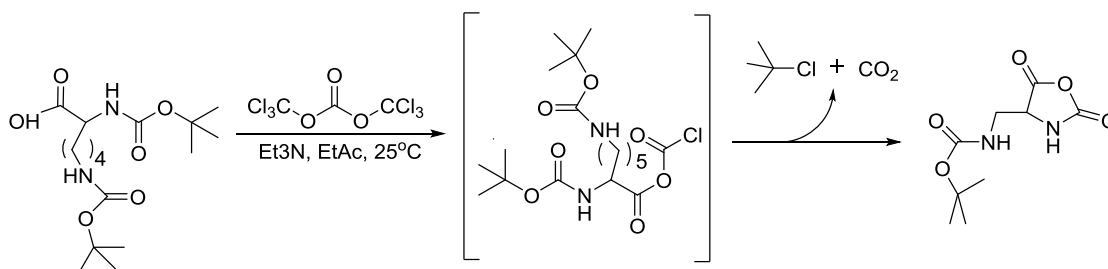
2. Ακολουθεί η διαδικασία της απόσταξης αφού το μπουκάλι του αντιδρώντος που χρησιμοποιείται Na-Ne-Di-Boc-L-Lysine 98% είναι σαν κρύσταλλος γι αυτό προστίθεται EtAc (έχει ξεραθεί ένα βράδυ υπό  $P_2O_5$ ) ώστε να διαλυθεί και να τοποθετηθεί στη φιάλη των 1000ml. Αρχικά, παγώνεται η φιάλη των 1000ml με άζωτο που περιέχει το αντιδρών της Lys και την EtAc απαερώνεται και ύστερα απομακρύνεται από τη γραμμή και ξεπαγώνετε με νερό της βρύσης. Έπειτα, γίνεται απόσταξη για να απομακρυνθεί από τη φιάλη των 1000ml ο EtAc και να μείνει μόνο το αντιδρών της Lys και ύστερα μένει για ξήρανση στη γραμμή ώστε να φύγει ο διαλύτης που έχει απομείνει. Μόλις φύγει ο διαλύτης ανοίγεται η στρόφιγγα της φιάλης όπου παρατηρείται το αντιδρών (σαν αφρός) .

3. Την επόμενη μέρα ζυγίζεται η φιάλη με το αντιδρών. Ζύγιση: 457,79g

(Φιάλη+αντιδρών) - άδεια φιάλη = 457,79 - 430,409 = 27,381g. Στη συνέχεια, προσαρμόζεται η σφαιρική φιάλη των 1000ml που έχει το αντιδρών της Lys (σαν αφρός) και γίνεται απόσταξη 500ml EtAc σε αυτή.

Υπολογισμοί των ποσοτήτων .

Μετά από υπολογισμούς παρατηρείται ότι το αντιδρών της Lys είναι 27,381gr και το  $MB_{\text{αντιδρώντος της Lys}}$  είναι 346,044



**Σχήμα 9: Πορεία σύνθεσης  $N^{\epsilon}$ -Boc-L-Lys NCA.**

Οπότε από τη στοιχειομετρία της αντίδρασης υπολογίζονται τα mol της λυσίνης:  $n = m/Mr$ . Άρα  $n = 0,0791$  mol Lys. Στη συνέχεια, διαιρούνται τα 0,0791 mol Lys με ένα συντελεστή διόρθωσης ώστε να υπολογιστούν τα mol του τριφωσγενίου. Άρα  $0,0791/2,73 = 0,0289$  mol τριφωσγενίου. Είναι γνωστό ότι το μοριακό βάρος του τριφωσγενίου είναι  $MB = 296,748$  και άρα η μάζα του τριφωσγενίου θα ισούται με  $m = 0,0289 \times 296,748 = 8,6g$  τριφωσγενίου (από τύπο  $m = n \times MB$ ). Επειδή η αντίδραση είναι 1:1, όσα mol Lys υπάρχουν τόσα mol  $Et_3N$  τριαιθυλαμίνης θα χρειαστούν. Δηλαδή 1mol αντιδρώντος = 1 mol  $Et_3N$ . Άρα  $n = m/MB \Rightarrow m = 0,0791 \times 101,19 \Rightarrow m = 8,004129$  gr  $Et_3N$  όπου  $n = 0,0791$  mol  $Et_3N$  και  $MB_{Et_3N} = 101,19$ . Από τον τύπο της πυκνότητας  $d = m/V$  υπολογίζονται  $V = m/d = 8,004129/0,729 = 10,98$  ml  $Et_3N$ .

4. Προσαρμόζεται στη γραμμή κενού η  $Et_3N$  με υδρίδιο του ασβεστίου με σκοπό να πάρει την υγρασία αφού το υδρίδιο λειτουργεί σαν ξηραντήρας. Παγώνεται η φιάλη με την  $Et_3N$  και το υδρίδιο απαερώνεται και μετά απομακρύνεται και ξεπαγώνετε με νερό βρύσης. Μετά, προσαρμόζεται και τοποθετείται μια γειτονική φιάλη 50 ml στην οποία νωρίτερα έχουν γίνει 3 flame drying. Αφού ελέγχεται αν η γραμμή κενού έχει πιάσει κενό ξεκινάει η απόσταξη. ( $Et_3N$  χωρίς υγρασία).

5. Προστίθενται στο σταγονομετρικό χωνί 10,98 ml  $Et_3N$ . Προσαρμόζεται η τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 1000ml που περιέχει το αντιδρών της Lys και οξικό αιθυλεστέρα EtAc υπό ανάδευση (έντονη ανάδευση ώστε να μη δημιουργηθεί τοπική περίσσεια κατά



την εισαγωγή της  $\text{Et}_3\text{N}$  ) και στον ένα λαιμό της φιάλης τοποθετείται εσμύρισμα παροχής αργού το οποίο συνδέεται η φιάλη του αργού με τη συσκευή της αντίδρασης και από τον άλλον λαιμό συνδέεται μέσω εσμύρισματος η φιάλη με την παροχή αργού με σκοπό το έλεγχο της ροή του αργού στη φιάλη της αντίδρασης. Ζυγίζονται 8,6gr τριφωσγενείου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος το οποίο προστίθεται σε μια δόση στη φιάλη. Μένει για 10 λεπτά. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το τριφωσγένιο έχει Cl τα οποία μερικά κολλάνε στο αντιδρών και γι αυτό προστίθεται μετά  $\text{Et}_3\text{N}$  για να σχηματιστεί το  $\text{HCl}$  της  $\text{Et}_3\text{N}$  και όσα Cl περίσσεψαν από το τριφωσγένιο βγαίνουν σαν  $\text{HCl}$  (κάπνισμα). Στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην για 20 λεπτά η  $\text{Et}_3\text{N}$  μέσω του σταγονομετρικού χωνιού Η αντίδραση μένει για 4 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μετά τοποθετείται παγόνερο και μένει υπό ανάδευση για 1 ώρα με σκοπό να μειωθεί η διαλυτότητα και να πέσει το άλας της  $\text{Et}_3\text{N}$ .

6. Σε ένα ποτήρι των 1000ml ,προστίθεται θειικό μαγνήσιο  $\text{MgSO}_4$  και τοποθετείται στο φούρνο των  $150^\circ\text{C}$  ώστε να είναι άνυδρο .

7. Σε μια δίλαιομη σφαιρική φιάλη των 1000ml τοποθετείται φίλτρο ώστε να γίνει φιλτράρισμα της τρίλαιομη σφαιρικής φιάλης των 1000ml που περιέχει το διάλυμα μετά την αντίδραση με τη βοήθεια αργού .Όταν γίνεται φιλτράρισμα παρατηρείται ότι στο φίλτρο μένει το  $\text{HCl}$  άλας της  $\text{Et}_3\text{N}$  και κάτω περνάει το προϊόν που είναι ο NCA.

8. Σε αυτό το βήμα γίνονται εκχυλίσεις. Ο σκοπός που γίνονται οι εκχυλίσεις είναι για να διαχωριστούν τα οργανικά (προϊόν με παραπροϊόντα) από τα ανόργανα (άλας  $\text{Et}_3\text{N}$ , μικρή ποσότητα η οποία μένει).

### **1° διάλυμα**

Σε διαχωριστική χοάνη των 2L μεταφέρεται το διάλυμα της αντίδρασης και προστίθεται ένα ποτήρι απιονισμένο νερό και ξεκινά η ανακίνηση. Η πυκνότητα του νερού ισούται με 1 οπότε αφού είναι πιο βαρύ το νερό κάθεται στο κάτω μέρος της διαχωριστικής χοάνης (διαυγές) ενώ στο πάνω μέρος μένει η οργανική φάση η οποία είναι θολή. Η πρώτη εκχύλιση γίνεται με νερό γιατί το άλας της  $\text{Et}_3\text{N}$  πηγαίνει στο νερό. Τέλος ,σώζεται η οργανική και μετριέται το pH το οποίο είναι 1.

### **2° διάλυμα**

Η δεύτερη εκχύλιση γίνεται με προσθήκη ενός ποτηριού οξικού ανθρακικού νατρίου  $\text{NaHCO}_3$  με σκοπό να ανέβει το pH. Αφού, ανακινείται η διαχωριστική χοάνη γίνεται πάλι διαχωρισμός της οργανικής με τη υδατική φάση. Με τον ίδιο τρόπο όπως πριν

προστίθεται σε ένα ποτήρι η υδατική φάση και φυλάσσεται η οργανική όπου μετρίεται το pH το οποίο είναι 5.

### 3° διάλυμα

Η τρίτη εκχύλιση γίνεται με προσθήκη ενός ποτηριού με το ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Η τρίτη εκχύλιση γίνεται με νερό για να ξεπλυθεί το διάλυμα της αντίδρασης από το άλας του οξικού ανθρακικού νατρίου  $\text{NaHCO}_3$ .

9. Μετά τις εκχυλίσεις τοποθετείται το 1000ml ποτήρι που περιέχει θειικό μαγνήσιο  $\text{MgSO}_4$  (από το φούρνο) υπό ανάδευση για λίγη ώρα και στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα της αντίδρασης ώστε να τραβήξει την υγρασία. Στο διάλυμα αυτό γίνεται φιλτράρισμα όπου πάνω στο φίλτρο μένει το θειικό μαγνήσιο  $\text{MgSO}_4$  ενώ κάτω περνάει το προϊόν με τα παραπροϊόντα του.

10. Σε αυτό το βήμα γίνονται αποκρυσταλλώσεις ώστε να μην υπάρχουν οργανικά παραπροϊόντα. Οι N-καρβοξυανυδρίτες αποτελούν κρυσταλλικές ενώσεις και ο καθαρισμός τους περιλαμβάνει αποκρυσταλλώσεις από σύστημα διαλύτη- μη διαλύτη. Συνήθως 2-3 αποκρυσταλλώσεις είναι αρκετές εφόσον έχει προηγηθεί το στάδιο των εκχυλίσεων. Οπότε, προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μια σφαιρική φιάλη 1000ml που περιέχει το προϊόν και παγώνεται, απαερώνεται και μόλις πιάσει κενό η γραμμή κενού ξεκινάει η απόσταξη με τον οξικό αιθυλεστέρα EtAc για να διαλυθεί ξανά το προϊόν. Έπειτα, ξεπαγώνεται με νερό βρύσης και ύστερα προσαρμόζεται πάλι στη γραμμή κενού όπου θα γίνει απόσταξη με εξάνιο και αφήνεται για 1 ώρα στο ψυγείο. Το εξάνιο είναι κακός διαλύτης επομένως μόλις βγει από το ψυγείο παρατηρείται ότι έχει γίνει καταβύθιση. Επειδή, το εξάνιο είναι κακός διαλύτης ανάγκασε το προϊόν να πέσει κάτω ενώ τα διάφορα παραπροϊόντα έμειναν διαλυμένα στον οξικό αιθυλεστέρα ο οποίος είναι καλός διαλύτης. Τέλος, γίνεται φιλτράρισμα και ότι μένει πάνω στο χωνί είναι ο NCA της Lys. Το βήμα αυτό της αποκρυστάλλωσης γίνεται άλλη μια φορά.

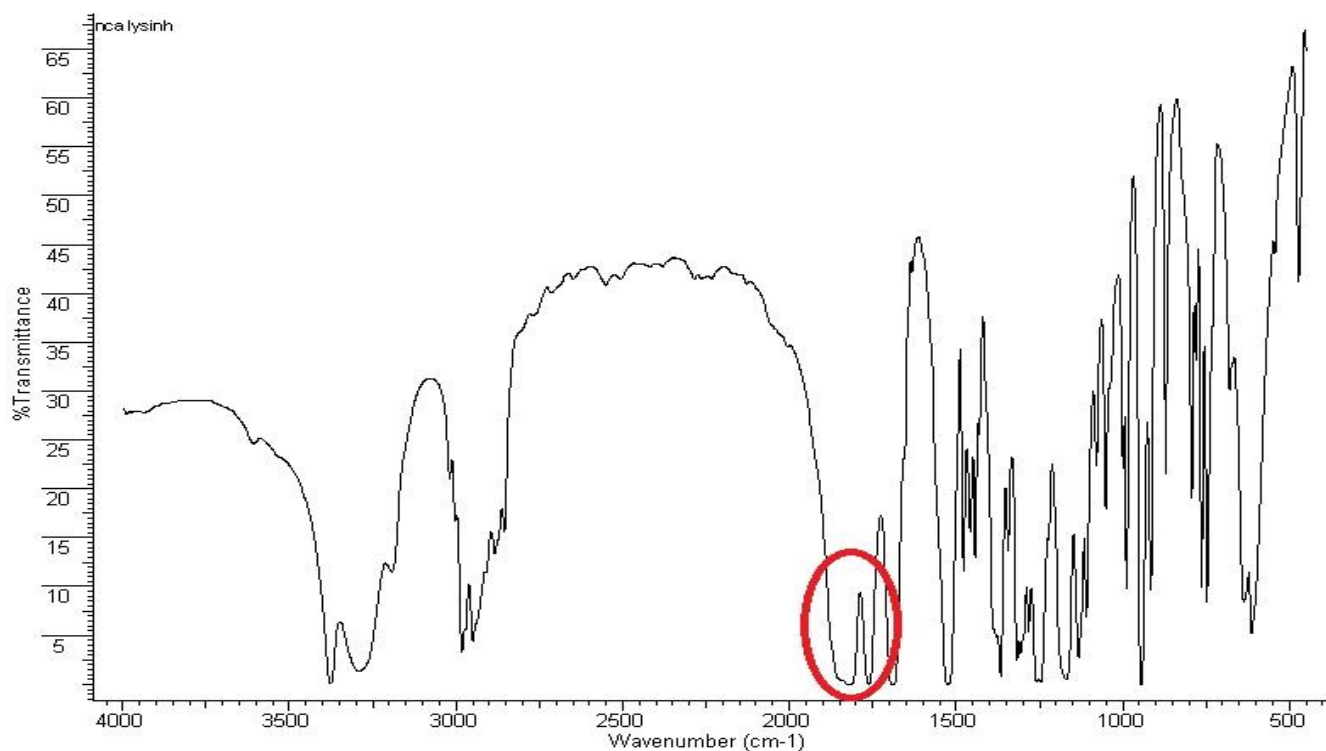
11. Αφού ολοκληρώνονται οι αποκρυσταλλώσεις προσαρμόζεται η σφαιρική φιάλη των 50 ml (η οποία έχει απαερωθεί και υποστεί τρία flame drying) με τον NCA της Lys και μένει όλη νύχτα για ξήρανση.

12. Την επόμενη μέρα, απομακρύνεται από τη γραμμή κενού η σφαιρική φιάλη των 50ml με το μονομερές που έχει μείνει για ξήρανση όλη νύχτα και μεταφέρεται στο glovebox όπου ζυγίζεται και φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Ζύγιση :3,931gr.

13. Υπολογισμός της απόδοσης

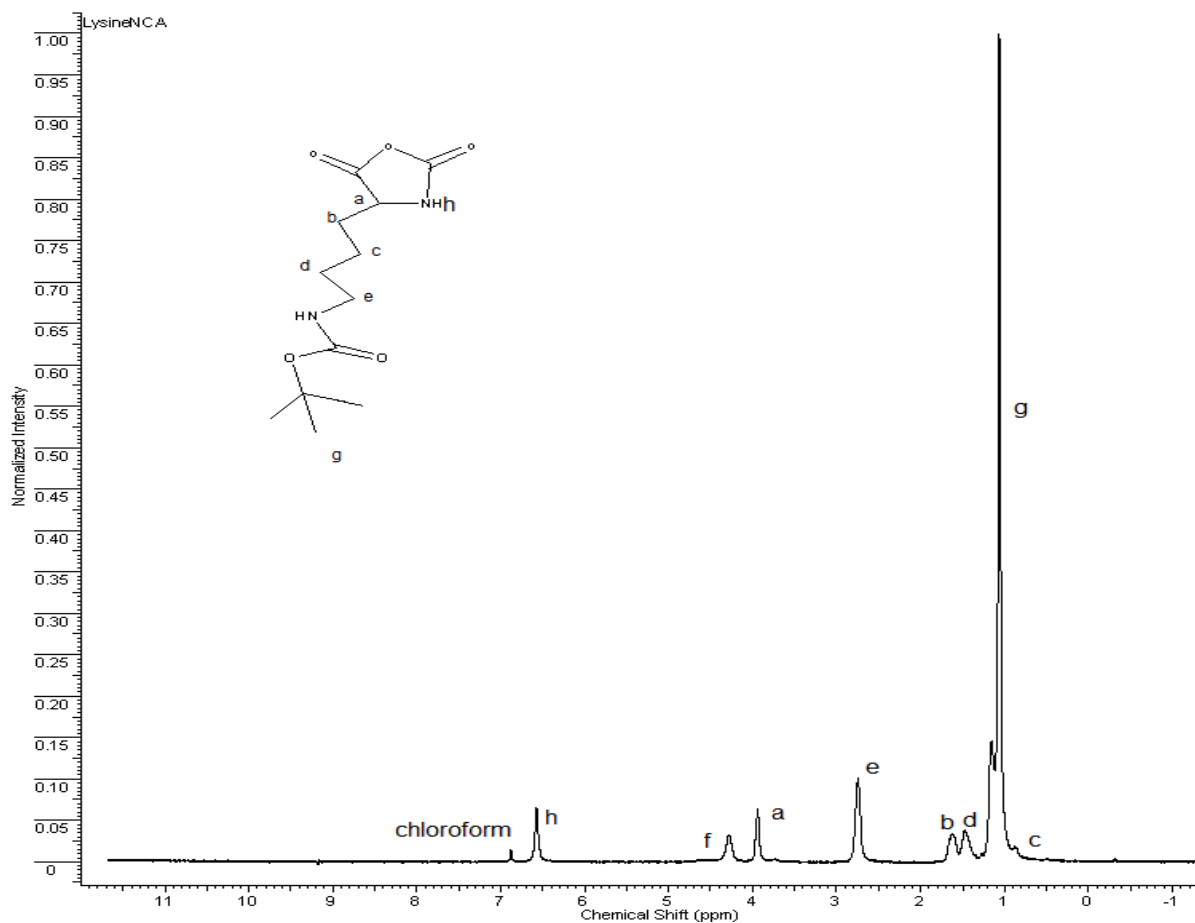
Ζυγίζονται 3,931gr προϊόντος που αντιστοιχούν σε απόδοση 21,6% αφού τα mol του αντιδρώντος είναι 0,079 άρα θεωρητικά τόσα είναι και τα mol του προϊόντος. Επομένως  $m_{\theta\epsilon\omega\rho} = n \times Mr$  και αφού  $MB_{\pi\rho\omicron\upsilon\nu} = 23,22 \text{ gr/mol}$  θα έχω  $m_{\pi\tau\epsilon\iota\rho} = 0,079 \times 230,22 = 18,19\text{gr}$ . Άρα  $\alpha = (m_{\pi\tau\epsilon\iota\rho}/m_{\theta\epsilon\omega\rho}) \times 100 = 21,6\%$ . Η ζύγιση είναι αναμενόμενη αφού η απόδοση είναι 20-25%.

Έπειτα γίνεται λήψη των φασμάτων IR και NMR



**Εικόνα 17: Φάσμα IR του τελικού προϊόντος N<sup>ε</sup>-Boc-L-Lys NCA.**

Εδώ παρατηρείται πως δεν υπάρχει η χαρακτηριστική κορυφή στα  $1706\text{cm}^{-1}$  που οφείλεται στον δεσμό της Boc ομάδας με την αμινομάδα άρα γίνεται η σύνθεση του προϊόντος. Σε αυτό το διάγραμμα παρατηρούνται χαρακτηριστικές κορυφές στα  $1690\text{cm}^{-1}$ , στα  $1760\text{cm}^{-1}$  και στα  $1825\text{cm}^{-1}$  όπου αυτές είναι οι χαρακτηριστικές κορυφές του ανυδρίτη της λυσίνης. Τέλος παρατηρείται και μία κορυφή στα  $1400\text{cm}^{-1}$  όπου οφείλεται στους αλειφατικούς άνθρακες.

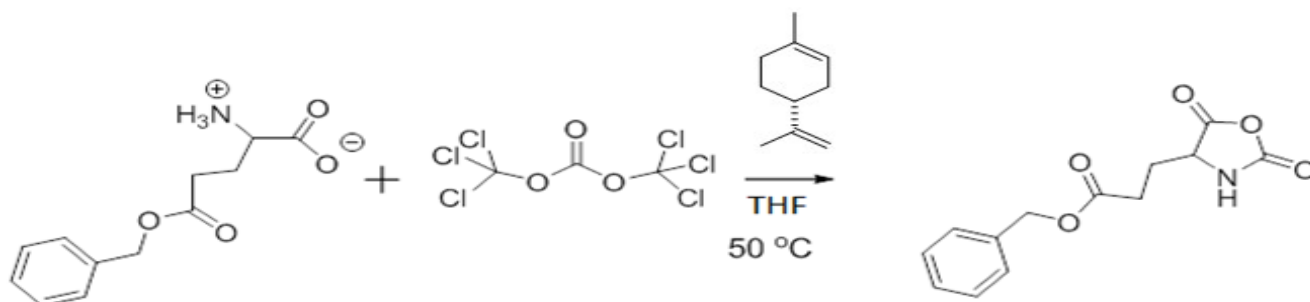


**Εικόνα 18: Φάσμα NMR του προϊόντος Nε-Boc-Lys NCA.**

Παρατηρείται μία μεγάλης έντασης κορυφή στα 1 ppm που οφείλεται στα υδρογόνα των τριών μεθυλίων στο κάτω μέρος της ένωσης. Επίσης παρατηρείται γύρω στα 6,5 ppm το υδρογόνο του αζώτου στον δακτύλιο. Στις θέσεις b,c,d,e απεικονίζονται τα αλειφατικά υδρογόνα.

### 5.3.3 Σύνθεση $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA

Η διαδικασία της σύνθεσης του  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA διαρκεί περίπου πέντε ημέρες όπου η αντίδραση είναι γρήγορη και οδηγεί σε μεγάλες αποδόσεις. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η παρουσία της βένζυλο ομάδας επιτρέπει τις όξινες συνθήκες της αντίδρασης χωρίς επιπλοκές.



**Σχήμα 10: Αντίδραση σύνθεσης  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA.**

1. Ζυγίζονται 10 γραμμάρια  $\gamma$ -βένζυλο-L-γλουταμικό οξύ τα οποία, και τοποθετούνται σε μία φιάλη των 500ml, αφήνοντας τα για ξήρανση όλο το βράδυ.
2. Την επόμενη ημέρα, αποστάζονται 167 ml THF στην φιάλη των 500ml και τοποθετούνται μέσα σε μια κάψα με νερό όπου μένει υπό ανάδευση. Γίνεται τοποθέτηση αργού μέσα στη συσκευή καθώς και τοποθέτηση ψυκτήρα.με προσαρμογή παροχή αδρανούς αερίου.
3. Θερμαίνεται το νερό και όταν η θερμοκρασία ανέβει στους 45°C προστίθεται 10,9 ml από το λιμονένιο και μετά 5 γραμμάρια από το τριφωσγένιο σε μία δόση, διατηρώντας τη θερμοκρασία σε αυτά τα επίπεδα. Στα πρώτα 20 λεπτά ήδη το διάλυμα έχει διαυγάσει και έχει γίνει ομογενές. Συνολικά μένει μιάμιση ώρα.
4. Διηθείται σε μια νέα φιάλη με χωνί No 3 και στη συνέχεια, γίνεται απόσταξη προς εκδίωξη του THF.
5. Προστίθενται 200ml παγωμένου EtAc για να διαλυτοποιηθεί ο ανυδρίτης. Αφού, διαλυτοποιηθεί ο ανυδρίτης ακολουθεί το στάδιο των εκχυλίσεων.
6. Σε αυτό το βήμα γίνονται οι εκχυλίσεις: Σε διαχωριστική χοάνη του ενός λίτρου μεταφέρεται το διάλυμα και εκχυλίζεται με υδατικό διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> 0,5% και στη συνέχεια, με παγωμένο νερό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά. Με τη δεύτερη εκχύλιση το pH είναι ουδέτερο.
7. Από τις εκχυλίσεις λαμβάνεται η οργανική στοιβάδα και ξηραίνεται με ενεργοποιημένο MgSO<sub>4</sub>. Ακολουθεί διήθηση με χωνί No4 για απομάκρυνση του MgSO<sub>4</sub> και μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη ώστε να αποταχθεί όλη η ποσότητα του διαλύτη μέχρι ξηρού και ακολουθεί ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού.

8. Σε αυτό το στάδιο έγιναν οι αποκρυσταλλώσεις. Αποστάζονται περίπου 80 ml EtAc ώστε να διαλυθεί ο NCA και μετά 200 ml εξάνιο. Αφήνεται στο ψυγείο για ένα βράδυ.
9. Την επόμενη ημέρα, γίνεται μεταφορά με μετάγγιση από την φιάλη που βρίσκεται το διάλυμα σε άλλη φιάλη υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Η αρχική μας φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή αργού και συνδέεται με πώμα και κατάλληλο λάστιχο με τη φιάλη στην οποία θα πάνε οι διαλύτες, η οποία συνδέεται με το κενό του πάγκου. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δυο φορές αφού συνολικά πρέπει να γίνουν τρεις αποκρυσταλλώσεις.
10. Με απόσταξη απομακρύνεται ο διαλύτης και προσαρμόζεται η φιάλη με το προϊόν μου στη γραμμή υψηλού κενού για ξήρανση όλο το βράδυ.
11. Ο NCA μεταφέρεται στο glove box όπου ζυγίζεται και φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Ζύγιση: 10,2 γραμμάρια.

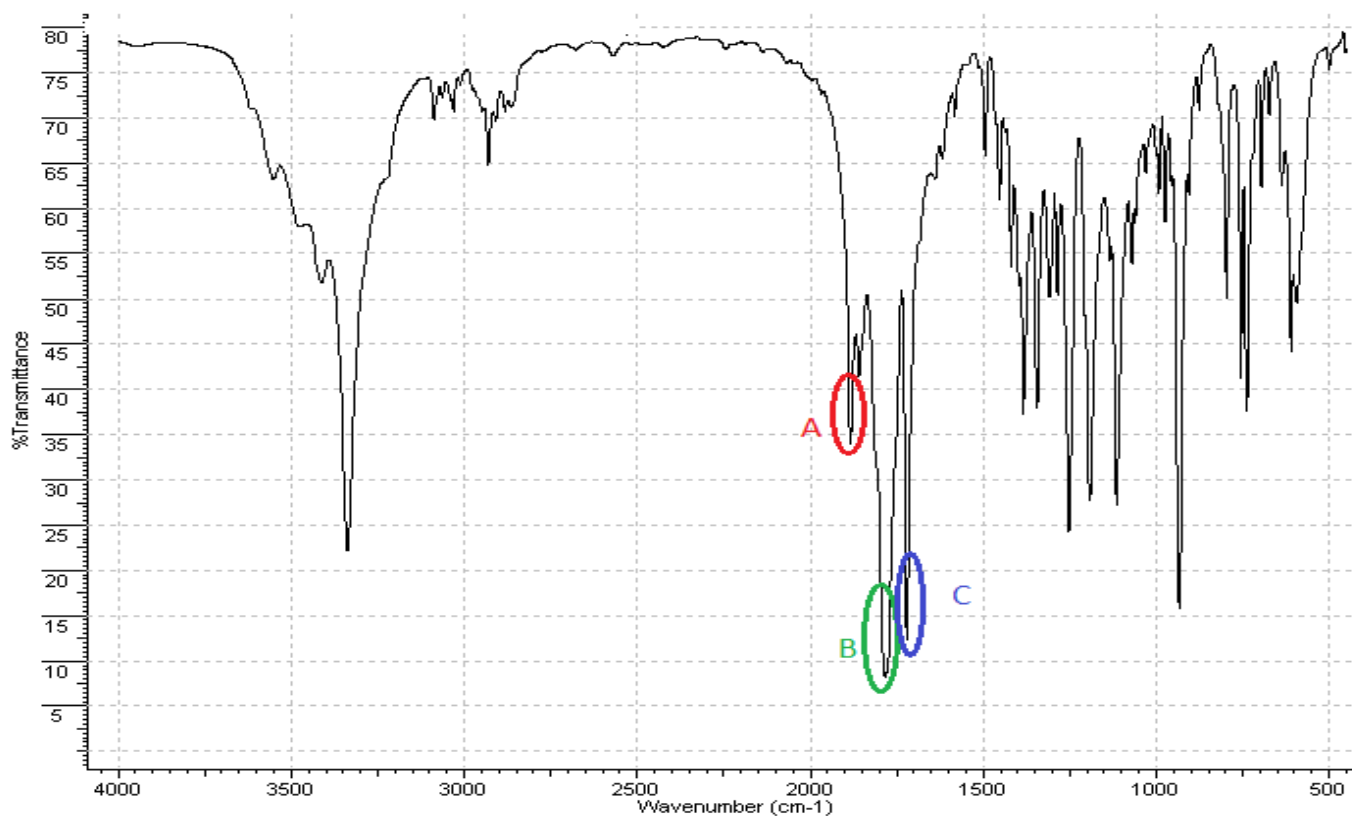
Υπολογισμός απόδοσης:

$$\text{Αντιδρών: } \frac{10\text{g}}{237,25\text{g/mol}} = 0,0421\text{mol}$$

$$\text{Προϊόν: } \frac{10,2\text{g}}{263\text{g/mol}} = 0,0388\text{mol}$$

Άρα η συνολική απόδοση είναι :  $0,0373 \text{ mol} \times 100\% = 92,2\%$

$$0,0421\text{mol}$$



Εικόνα 19: Φάσμα IR της  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate NCA.

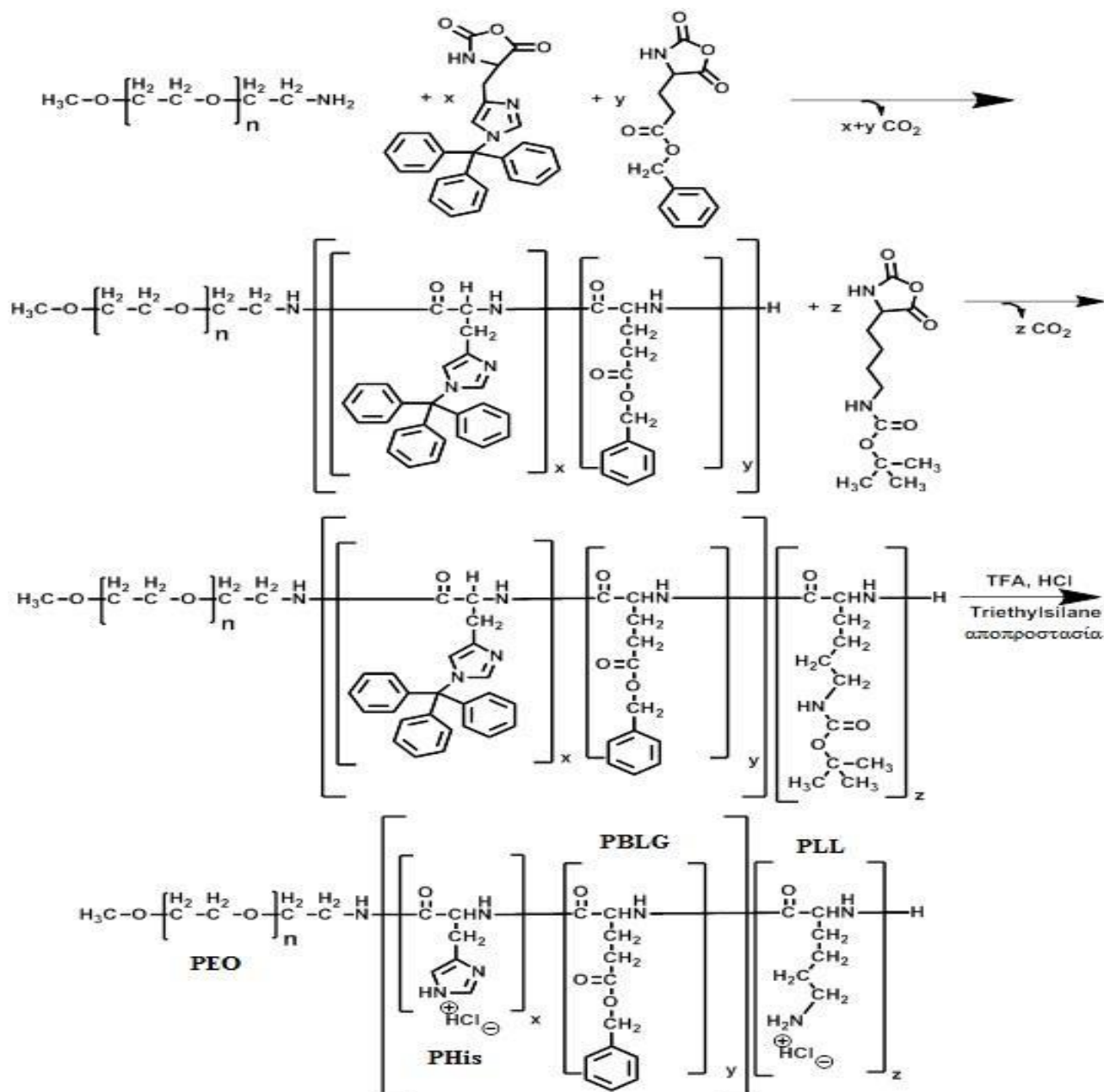
Η επιτυχής σύνθεση του NCA επιβεβαιώνεται από το φάσμα του IR όπου απεικονίζονται οι εξής χαρακτηριστικές κορυφές: **A**: Δονήσεις έκτασης  $\text{C}=\text{O}$  κοντά στο O στα  $1883\text{cm}^{-1}$  **B**: Δονήσεις έκτασης  $\text{C}=\text{O}$  κοντά στο N στα  $1784\text{cm}^{-1}$  και **C**: Δονήσεις έκτασης  $\text{C}=\text{O}$  της προστασίας στα  $1722\text{cm}^{-1}$ .

## 5.4 Σύνθεση γραμμικού τρισυσταδικού τετραπολυμερούς PEO-*b*-(His-co-PBLG)-*b*-PLL

### 5.4.1 Εισαγωγή

Για τη σύνθεση του γραμμικού τρισυσταδικού τετραπολυμερούς PEO-*b*-(His-co-PBLG)-*b*-PLL, η οποία πραγματοποιείται με τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβοξυανυδριτών χρησιμοποιείται ως μακροαπαρχητής το πολυμερές PEO-NH<sub>2</sub> που έχει ακραία αμινομάδα και θα εκκινήσει τον πολυμερισμό των αμινοξέων της ιστοιδίνης (His), του  $\gamma$ -βενζυλο-d7 L-γλουταμινικού (PBLG), τα οποία είναι τα μονομερή της δεύτερης συστάδας και στη συνέχεια θα εκκινήσει τον πολυμερισμό της λυσίνης

(PLL) που είναι το μονομερές για την σύνθεση της τρίτης συστάδας. Στόχος είναι η πρώτη συστάδα που είναι ο μακροαπαρρηγής να έχει μοριακό βάρος 10.000, η δεύτερη συστάδα να έχει μοριακό βάρος 6.000 (His-co-PBLG) και το PBLG να είναι το 15% και η τρίτη συστάδα να έχει μοριακό βάρος 15.000(PLL). Άρα, το μοριακό βάρος του τρισυσταδικού τετραπολυμερούς να είναι 31000. Οι αντιδράσεις σύνθεσης του γραμμικού τρισυσταδικού τετραπολυμερούς απεικονίζονται παρακάτω:



Υπολογισμοί των ποσοτήτων που χρησιμοποιούνται για τον πολυμερισμό του παραπάνω πολυμερούς:

Είναι γνωστό ότι  $m_{\text{PEO}} = 0,3\text{g}$  και  $MB_{\text{PEO}} = 10000$ , συνεπώς από το τύπο  $n = m / MB_{\text{PEO}} = 0,3/10000 = 0,00003\text{mol}$  PEO



$MB_{\text{συστάδας}} = \text{gr}_{\text{μονομερούς}} / \text{mol}_{\text{απαρχηγή}} \Rightarrow \text{gr}_{\text{μονομερούς}} = MB_{\text{συστάδας}} \times \text{mol}_{\text{απαρχηγή}} \Rightarrow$

$\text{gr}_{\text{μονομερούς}} = 6000 \times 0,00003 = 0,18 \text{gr His}$

Είναι γνωστό ότι το  $MB_{\text{His}}$  χωρίς προστασία είναι 135,7, άρα:

$n = m / MB_{\text{His}} = 0,18 / 135,7 = 0,0013 \text{mol His}$

100molHis	15mol PBLG
0,0013molHis	x
<hr/>	
x=0,000195 mol γλουταμικό οξύ	

$MB_{\text{γλουταμικό οξύ}}: 263$

Από τον τύπο :  $m = n \times MB \Rightarrow m = 0,000195 \times 263 = 0,0512 \text{gr γλουταμικό οξύ}$

$m = 0,0013 \times 423 = 0,5499 \text{gr His}$  όπου το  $MB_{\text{His}} = 423$

**Οι διαδικασίες που γίνονται σε έναν πολυμερισμό είναι :**

- Ξήρανση του mPEO-NH<sub>2</sub> στη γραμμή κενού .
- Καθαρισμός του mPEO-NH<sub>2</sub> με βενζόλιο .
- Προσθήκη των μονομερών και απόσταξη του διαλύτη DMF σε αυτά.
- Έναρξη του πολυμερισμού.
- Καταβύθιση του πολυμερούς.
- Αποπροστασία του πολυμερούς.
- Dialysis.
- Freeze Drying.

Στη συνέχεια, περιγράφονται αναλυτικά οι ανωτέρω διαδικασίες.

Αρχικά, κατασκευάζεται η συσκευή πολυμερισμού μέσα στην οποία τοποθετείται ένα μαγνητάκι. Στη συνέχεια, προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, απαιρώνεται,

ελέγχεται αν υπάρχουν τυχόν τρύπες με τη χρήση του Tesla και όταν πιάσει η γραμμή υψηλού κενού κενό, γίνονται τρία flame drying. Έπειτα, βγάζουμε από το ψυγείο τον μακροαπαρχητή πολυαιθυλενοξειδίο με αμινοόμαδα (PEO-NH<sub>2</sub>) με μοριακό βάρος MB=10.000 και ζυγίζονται 0,3gr. Αφού, απομακρύνεται η συσκευή από τη γραμμή υψηλού κενού, προστίθεται η ποσότητα του μακροαπαρχητή στη συσκευή του πολυμερισμού και κατόπιν προσαρμόζεται πάλι στη γραμμή υψηλού κενού. Απαερώνεται, με τη χρήση του Tesla, ελέγχεται αν έχει πιάσει κενό, και μόλις πιάσει κενό η συσκευή μένει για ξήρανση όλο το βράδυ.

Την επόμενη μέρα γίνεται η απόσταξη του PEO-NH<sub>2</sub>, που είχε μείνει για ξήρανση όλη νύχτα με καθαρό βενζόλιο (~20ml) (απομάκρυνση της υγρασία από το PEO-NH<sub>2</sub>). Το πολυαιθυλενοξειδίο PEO μαζεύει πολύ εύκολα υγρασία και γι' αυτό αποστάζεται βενζόλιο, γιατί το βενζόλιο θα αναμειχθεί με το νερό και θα κάνει το αζεοτροπικό μίγμα. Για να γίνει το αζεοτροπικό μίγμα, μένει υπό ανάδευση για μια ώρα. Ένα πλεονέκτημα που έχει το βενζόλιο είναι ότι αποστάζει και παγώνει εύκολα.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η καθαρότητα τόσο του μακροαπαρχητή όσο και των μονομερών είναι απαραίτητη για τον ελεγχόμενο χαρακτήρα του πολυμερισμού και για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων.



**Εικόνα 20: Απόσταξη βενζολίου στη συσκευή πολυμερισμού που περιέχει PEO (εργαστήριο)**

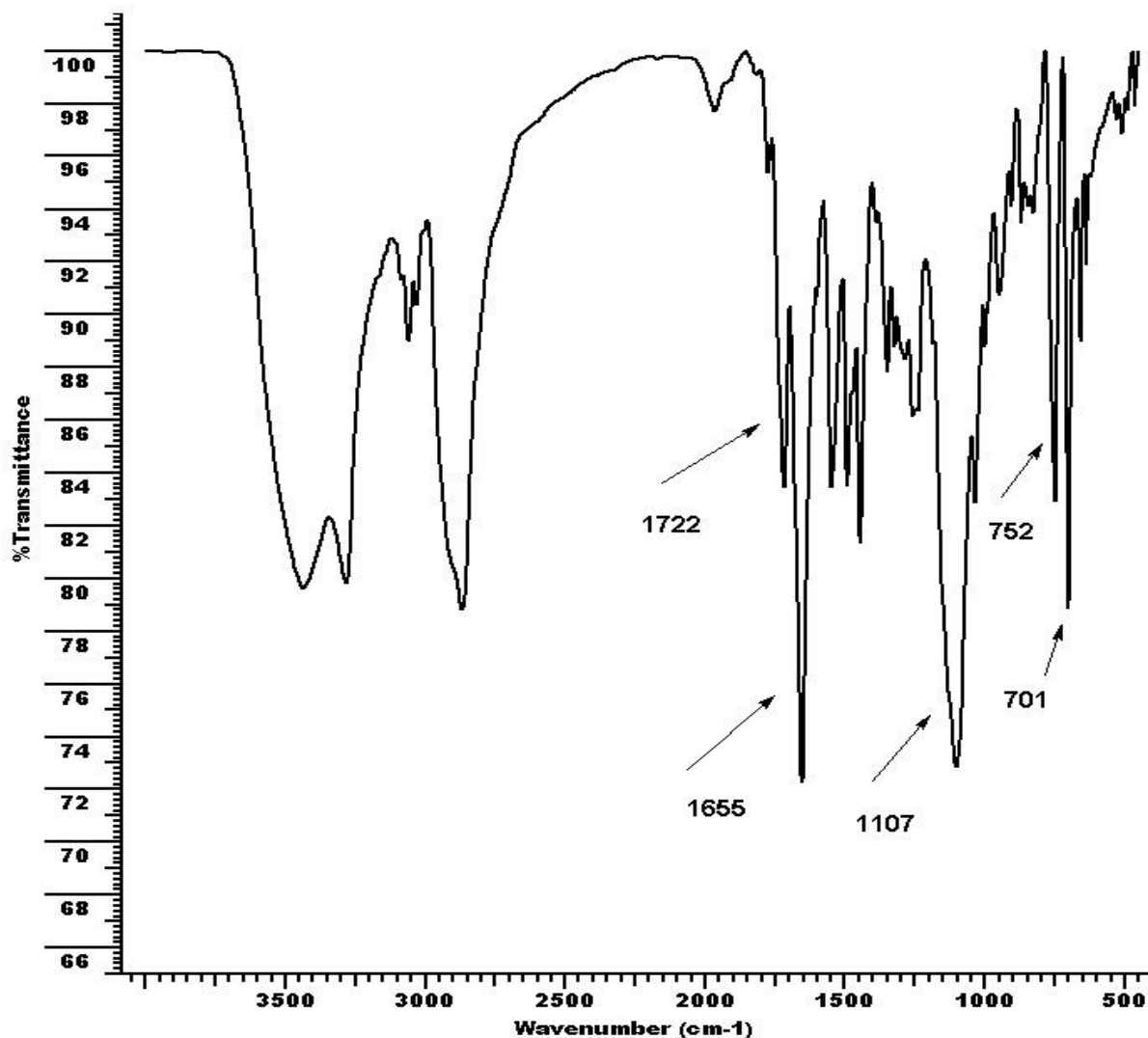
Μόλις αποστάζεται η ποσότητα των 20ml βενζολίου, και αφού ο μακροαπαρχητής διαλυθεί καλά, η συσκευή του πολυμερισμού απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού, ξεπαγώνεται με νερό βρύσης και μένει υπό ανάδευση για μια ώρα. Στη συνέχεια,

επαναπροσαρμόζεται η συσκευή πολυμερισμού στη γραμμή υψηλού κενού και σε γειτονική θέση προσαρμόζεται μια άδεια σφαιρική φιάλη των 50ml στην οποία απομακρύνεται το αζεοτροπικό μίγμα. Έτσι, στη φιάλη του πολυμερισμού μένει ο καθαρός μακροαπαρχητής PEO-NH<sub>2</sub>, ο οποίος μένει για ξήρανση όλο το βράδυ.

Σε αυτό το βήμα ξεκινάει ο πολυμερισμός. Αρχικά, αποστάζονται στην γραμμή υψηλού κενού 30ml διμεθυλοφορμαμιδίο DMF στη συσκευή του πολυμερισμού. Απομακρύνεται από την γραμμή, ξεπαγώνεται και ανακινείται μέχρι να διαλυθεί καλά ο μακροαπαρχητής στο DMF (DMF είναι καλός διαλύτης για τον μακροαπαρχητή). Στη συνέχεια, εφαρμόζεται ειδικός προσαρμογέας στο εσμύρισμα της φιάλης και προσαρμόζεται στη γραμμή κενού, όπου απαιρώνεται το αντίστοιχο τμήμα, και όταν πιάσει κενό η γραμμή κενού με τη χρήση του Tesla, γίνονται τρία flame drying, όπου η συσκευή μένει για λίγα λεπτά, ώστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, η συσκευή μεταφέρεται στο glove box και προστίθενται 0,5499gr N<sup>im</sup>-Trt-L-Histidine NCA και 0,0512gr NCA γλουταμικού οξέος (PBLG). Η προσθήκη των μονομερών γίνεται με τη βοήθεια χωνιού, αφού, πρώτα καθαριστεί πολύ καλά το εσμύρισμα από το λίπος. Αφού, προστίθενται τα μονομερή στη συσκευή στη συνέχεια, επανατοποθετείται ο προσαρμογέας στη συσκευή μας και μόλις βγει η συσκευή από το glovebox προσαρμόζεται στη γραμμή κενού όπου παγώνεται η πλευρά που υπάρχει το break seal και απαιρώνεται διώχνοντας έτσι το αδρανές αέριο που μπήκε από το glove box. Έπειτα, γίνεται απόσταξη στο τμήμα αυτό 10 ml διμεθυλοφορμαμιδίο DMF και παγώνει το διάλυμα με υγρό άζωτο. Τα μονομερή διαλύονται πλήρως μετά από απόσταξη 10 ml διαλύτη καθαρού DMF και η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού μέσω του constriction (κόψιμο με φλόγα στο constriction). Όταν κρυώσει το κομμένο γυαλί ξεπαγώνετε το διάλυμα με νερό βρύσης. Μόλις, ο NCA διαλυθεί καλά στο DMF, πραγματοποιείται σπάσιμο της μύτης του break seal ανακινώντας τη φιάλη ώστε να ενωθεί με το διάλυμα DMF του μακροαπαρχητή. Έτσι, ξεκινάει ο πολυμερισμός. Το διάλυμα μένει υπό έντονη ανάδευση και κάθε μέρα ανοίγεται η στρόφιγγα, για να απομακρυνθεί και να εκτονωθεί το αέριο CO<sub>2</sub>, το οποίο παράγεται κατά τον πολυμερισμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η ισορροπία να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. (ένδειξη φουσαλίδων). (Με το πέρασμα των μερών βγαίνουν λιγότερες μπουρμπουλήθρες και μόλις σταματήσουν να βγαίνουν, σημαίνει ότι ολοκληρώθηκε ο πολυμερισμός). Ο πολυμερισμός διαρκεί 7ημέρες.

Με την τεχνική του IR πριν την προσθήκη της δεύτερης συστάδας, καθίσταται σαφές ότι επιτεύχθηκε ο πολυμερισμός(Εικόνα 21). Συγκεκριμένα απομακρύνεται η συσκευή του

πολυμερισμού από τη γραμμή κενού και τοποθετείται στο glove box. Εκεί με τη χρήση σύριγγας μεταφέρεται μικρή ποσότητα από το διάλυμα σε ένα ύαλο ωρολογίου. Με την έξοδο της από το glove box, στεγνώνεται με αργό η ποσότητα που προστέθηκε πάνω στον ύαλο ωρολογίου και είναι έτοιμο για την εξαγωγή IR.



Εικόνα 21: Φάσμα IR του PEO-*b*-(His-co-PBLG) μετά τον πολυμερισμό.

Στο φάσμα του IR του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό του μακροαπαρχητή και της δεύτερης συστάδας παρατηρείται μια κορυφή στα  $1722\text{ cm}^{-1}$ , η οποία φανερώνει την προστασία του καρβονυλίου του PBLG. Η κορυφή στα  $1655\text{ cm}^{-1}$  αποκαλύπτει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Άλλη ευδιάκριτη κορυφή, είναι αυτή στα  $1107\text{ cm}^{-1}$ , όπου βρίσκεται ο αιθερικός δεσμός του πολυαιθυλενοξειδίου.(PEO) και στα  $701\text{ cm}^{-1}$  και στα  $752\text{ cm}^{-1}$  εμφανίζονται οι κορυφές της προστασίας της ιστιδίνης

Στη συνέχεια, η συσκευή του πολυμερισμού προσαρμόζεται στη γραμμή κενού, παγώνεται με υγρό άζωτο, απαρώνεται και με τη χρήση του Tesla ελέγχεται, αν έχει πιάσει κενό ή έχει αέρα.

Υπολογισμός για την ποσότητα της λυσίνης PLLL:

$$n_{PEO} = 0,00003 \text{ mol}$$

$$MB_{\text{συστάδας}} = \text{gr}_{\text{μονομερούς}} / \text{mol}_{\text{απαρχητή}} \text{ συνεπώς } \text{gr}_{\text{μονομερούς}} = 15000 \times 0,00003 \Rightarrow$$

$$\text{gr}_{\text{μονομερούς}} = 0,45 \text{ gr λυσίνης χωρίς προστασία και CO}_2$$

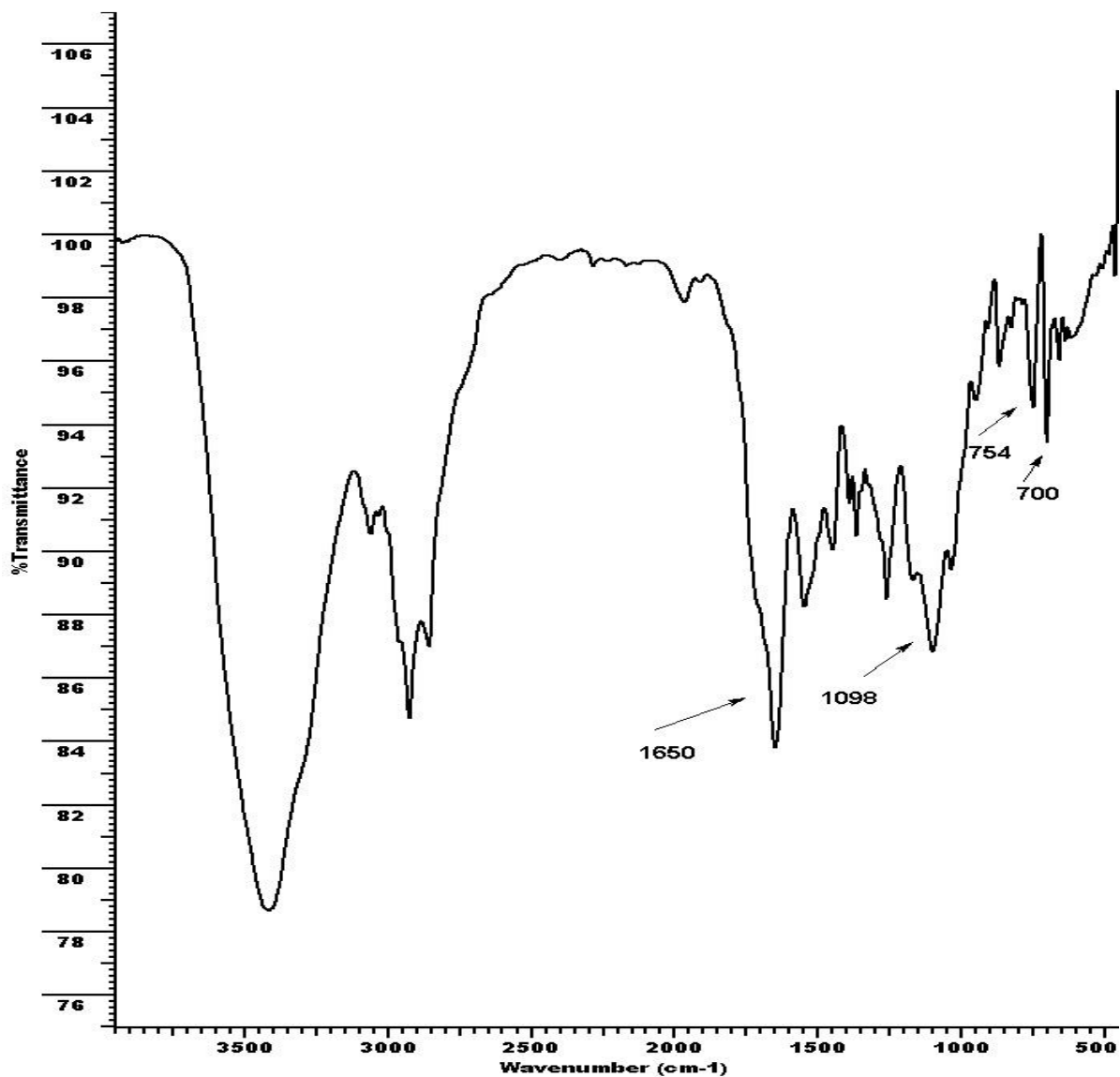
$$\text{Είναι γνωστό ότι το } MB_{Lys} = 272 \text{ και προστασία} = 101,125 \text{ και CO}_2 = 44$$

Συνεπώς,  $272 - 101,125 - 44 = 127$  προστίθεται και 1H λόγω του ότι μπαίνει μια προστασία, άρα 128

Άρα,  $n = m / MB_{Lys} = 0,45 / 128 = 0,003515 \text{ mol}$  λυσίνης χωρίς προστασία από τον τύπο  $m = n \times MB_{Lys} = 0,003515 \text{ mol}$  λυσίνης  $\times 272 = 0,95625 \text{ gr}$  λυσίνης με προστασία.

Την επόμενη μέρα, στο άλλο εξάρτημα της συσκευής πολυμερισμού, αφού πρώτα απαερωθεί και ελεγχθεί αν έχει πιάσει κενό η γραμμή κενού, γίνονται τρία flame drying και στη συνέχεια, μεταφέρεται στο glovebox, όπου γίνεται προσθήκη 0,957 gr λυσίνης. Έπειτα, προσαρμόζεται η συσκευή πολυμερισμού στη γραμμή κενού, παγώνεται με υγρό άζωτο, απαερώνεται και κατόπιν ξεπαγώνεται με νερό βρύσης. Ακολούθως, προσαρμόζεται πάλι στη γραμμή κενού και ελέγχεται αν έχει πιάσει κενό. Ύστερα, παγώνεται το εξάρτημα της συσκευής του πολυμερισμού που προστίθεται η λυσίνη για να γίνει η απόσταξη του DMF. Αφού ολοκληρώνεται η απόσταξη και διαλύεται καλά ο NCA της λυσίνης με τη βοήθεια γυάλινου breaker, το οποίο έχει τοποθετηθεί στο εξάρτημα της συσκευής πολυμερισμού, σπάζει το brake seal. Επομένως, το διάλυμα του μονομερούς της λυσίνης ενώνεται με τον μακραπαρχητή και το άλλο μονομερές [PEO-*b*-(His-co-PBLG)] γεγονός που συμβάλλει στην έναρξη του πολυμερισμού. Το διάλυμα μένει υπό έντονη ανάδευση και κατά διαστήματα ανοίγεται η στρόφιγγα, για να απομακρυνθεί το CO<sub>2</sub>, που παράγεται κατά τον πολυμερισμό. Ο πολυμερισμός διαρκεί 4 ημέρες. Όταν σταματήσουν να βγαίνουν 'μπουρμπουλήθρες', έχει ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός.

Στη συνέχεια, με την τεχνική IR διαφαίνεται, αν ο πολυμερισμός ολοκληρώθηκε με επιτυχία μετά την προσθήκη της τρίτης συστάδα.



Εικόνα 22: Φάσμα IR του PEO-*b*-(His-co-PBLG)-*b*-PLL μετά τον πολυμερισμό

Στο παραπάνω φάσμα παρατηρείται μια κορυφή στα  $1650\text{cm}^{-1}$ , που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού και στα  $1098\text{cm}^{-1}$  βρίσκεται ο αιθερικός δεσμός του πολυαιθυλενοξειδίου. Υπάρχουν κανονικά οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας στα  $754\text{cm}^{-1}$  και  $700\text{cm}^{-1}$ .

Το επόμενο βήμα είναι η καταβύθιση του πολυμερούς μου σε διαιθυλαιθέρα(κακός διαλύτης). Για να γίνει η καταβύθιση του πολυμερούς, χρησιμοποιείται ένας κακός διαλύτης, που είναι το πολυμερές αδιάλυτο σε αυτόν, και ένας καλός διαλύτης(DMF). Αρχικά, σε ποτήρι ζέσεως των 2L, προστίθενται 300ml διαιθυλαιθέρα και ακολούθως αποχύνεται όλο το διάλυμα της συσκευής πολυμερισμού (~30ml) όπου παρατηρείται η καταβύθιση του στερεού. Η καταβύθιση υποβοηθείται με ψύξη του ποτηριού ζέσεως για

30'λεπτά. Ακολουθεί η διήθηση με χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου. Από το χωνί συλλέγεται το στερεό, το οποίο φυλάσσεται σε σφαιρική φιάλη των 50 ml και προσαρμόζεται στη γραμμή κενού για ξήρανση όλο το βράδυ.



Εικόνα 23: Διήθηση του πολυμερούς στο χωνί Buchner

Το πολυμερούς το οποίο συλλέγεται είναι: 0,999gr

Ζύγιση: (Άδεια φιάλη + πολυμερές) – άδεια φιάλη = 64,275 - 63,276 = 0,999gr

#### Υπολογισμός απόδοσης

PEO: 0,3gr

His:  $0,5499 \times \frac{379}{423}$  (με προστασία χωρίς CO<sub>2</sub>) = 0,4927gr

423

PBLG:  $0,0512 \times \frac{219}{263}$  = 0,0426gr

263

PLLL:  $0,95625 \times \frac{228}{272}$  = 0,8016gr

272

Προστίθενται τα gr του μακροαπαρχητή και των μονομερών και υπολογίζεται το θεωρητικό. Άρα:  $0,3 + 0,4927 + 0,0426 + 0,8016 = 1,6369$

Επομένως, για τον υπολογισμό της απόδοσης χρησιμοποιείται ο τύπος :

$$\frac{\text{πειραματικό}}{\text{θεωρητικό}} \times 100\% = \frac{0,999}{1,6369} \times 100 = 61\%$$

$$\frac{0,999}{1,6369} \times 100 = 61\%$$

Στη συνέχεια, ακολουθεί το στάδιο της αποπροστασίας του πολυμερούς. Προστίθενται σε φιάλη 50ml όπου βρίσκεται το πολυμερές 15ml διχλωρομεθάνιο ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), ο οποίος είναι καλός διαλύτης και διαλύει το πολυμερές. Ύστερα, προστίθενται 10ml τριφθοροξικού οξέος (TFA), το οποίο τοποθετείται με σκοπό να σπάσουν οι προστατευτικές ομάδες της ιστοδίνης (τρίτυλο-ομάδα) και της λυσίνης (Boc-ομάδα).

Με την προσθήκη του TFA στο πολυμερές, παρατηρείται αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε σκούρο κίτρινο. Η αλλαγή χρώματος είναι μια ένδειξη ότι έσπασαν οι προστατευτικές ομάδες.

Η ποσότητα του τριαιθυλοσιλανίου που χρησιμοποιείται υπολογίζεται ως εξής:

$$\begin{array}{r} 1,6369 \text{ θεωρητικό πολυμερές} \\ 0,999 \text{ πολυμερές που ζύγισα} \\ \hline x = 0,3 \text{ gr His} \end{array} \qquad \begin{array}{r} 0,4927 \text{ gr His} \\ x \end{array}$$

$$\text{mol} = \frac{\text{gr His}}{\text{MB}_{\text{His}}} = \frac{0,3 \text{ gr His}}{375 \text{ χωρίς CO}_2 \text{ (εφόσον χρησιμοποιώ NCA)}} = 0,00079 \text{ mol His}$$

$$\text{gr}_{\text{τριαιθυλοσιλανίου}} = \text{mol His} \times \text{MB} = 0,00079 \text{ mol} \times 116,28 \text{ gr/mol} = 0,092 \text{ gr τριαιθυλοσιλάνιο}$$

Και για τον υπολογισμό του όγκου:

$$V = \frac{m}{\rho} = \frac{0,092 \text{ gr τριαιθυλοσιλάνιο}}{0,728 \text{ gr/ml}} = 0,126 \text{ ml τριαιθυλοσιλάνιο.}$$

$$\rho = 0,728 \text{ gr/ml}$$

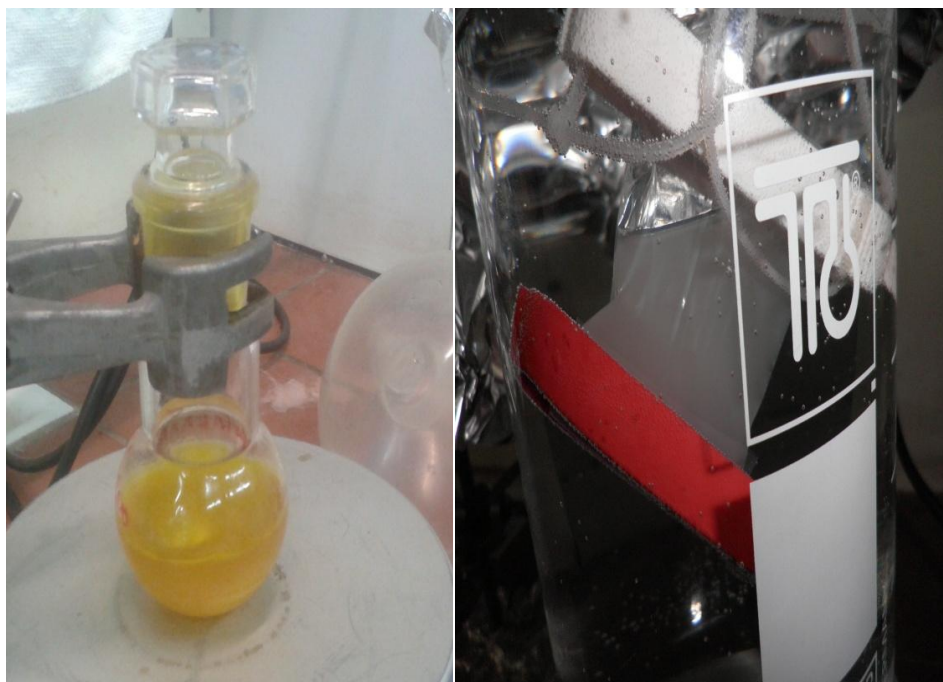
Οπότε με μια σύριγγα συλλέγονται 0,126 ml και προστίθενται στο διάλυμα στάγδην. Επειδή, η αντίδραση είναι ποσοτική, είναι εύκολο να υπολογιστεί η ποσότητα, καθώς με την προσθήκη των σταγόνων αποχρωματίζεται το διάλυμα και από κίτρινο σκούρο γίνεται κίτρινο ανοιχτό όπως πριν. Χρησιμοποιείται τριαιθυλοσιλάνιο με σκοπό να



ενωθεί το τριαθυλοσιλάνιο με την τρύτιλο-ομάδα και τη Βοc-ομάδα, όπου τις δεσμεύει και τις απομακρύνει. Αλλιώς υπάρχει περίπτωση να ξανακολλήσουν οι προστατευτικές ομάδες. Το διάλυμα μένει υπό ανάδευση για 1 ώρα.

Ακολούθως, προσαρμόζεται ένας συνδετήρας κενού στη φιάλη και τοποθετείται σε μια γυάλινη συσκευή σχήματος Π. Η συσκευή προσαρμόζεται με εσμύρισμα στη γραμμή κενού όπου στο άλλο άκρο του Π εφαρμόζεται μια κενή φιάλη, η οποία απαερώνεται και με απόσταξη απομακρύνεται το TFA και το διχλωρομεθάνιο. Έτσι, μένει μόνο το πολυμερές. Ακολουθούν 5 πλύσεις με διαιθυλαιθέρα, έτσι ώστε μαζί του να παρασυρθούν το τριεθυλοσιλάνιο και οι προστατευτικές ομάδες που έχουν κοπεί. Επιλέγεται σαν διαλύτης ο διαιθυλαιθέρας, γιατί το πολυμερές δε διαλύεται σε αυτό. Άρα, στη φιάλη μένει το πολυμερές, το οποίο προσαρμόζεται στη γραμμή για ξήρανση για 1 μέρα .

Επόμενο στάδιο είναι το dialysis, το οποίο γίνεται με σκοπό να απομακρυνθούν τα παραπροϊόντα από το πολυμερές. Αρχικά, σε ένα ποτήρι ζέσεως, το οποίο περιέχει αποσταγμένο νερό, τοποθετείται η μεμβράνη που θα χρησιμοποιηθεί, αφήνοντάς την για 30 λεπτά, ώστε να φουσκώσει. Το πολυμερές διαλύεται σε νερό milliQ και μπαίνει σε μεμβράνη dialysis με όριο 3500 MB και πάχος 6,74cm. Όταν η μεμβράνη φουσκώσει, προστίθεται με την βοήθεια πιπέτας το διαλυμένο σε νερό πολυμερές και η μεμβράνη κλείνεται με κατάλληλα πιαστράκια και από τις δυο πλευρές. Κατόπιν, η μεμβράνη τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει 2L H<sub>2</sub>O milliQ και προστίθενται 4 σταγόνες πυκνό υδροχλωρίο (HCl) 1M, το οποίο είναι πιο ισχυρό από το TFA και ένα μαγνητάκι και μένει υπό ανάδευση. Η προσθήκη του πυκνού υδροχλωρίου γίνεται ώστε να μη σχηματίσει η ιστιδίνη β-φύλλο στη δευτεροταγή της δομή. Τις επόμενες 3 μέρες γίνονται αλλαγές νερού και προσθήκη NaOH μέχρι να πραγματοποιηθεί σταθεροποίηση του pH στην περιοχή 7 ή 7,5, που είναι το pH του υγιούς κυττάρου, οπότε σταματάει η προσθήκη NaOH και γίνονται δυο συνεχόμενες μέρες αλλαγές νερού. Όλη η διαδικασία διαρκεί 7-8 μέρες.



A

B

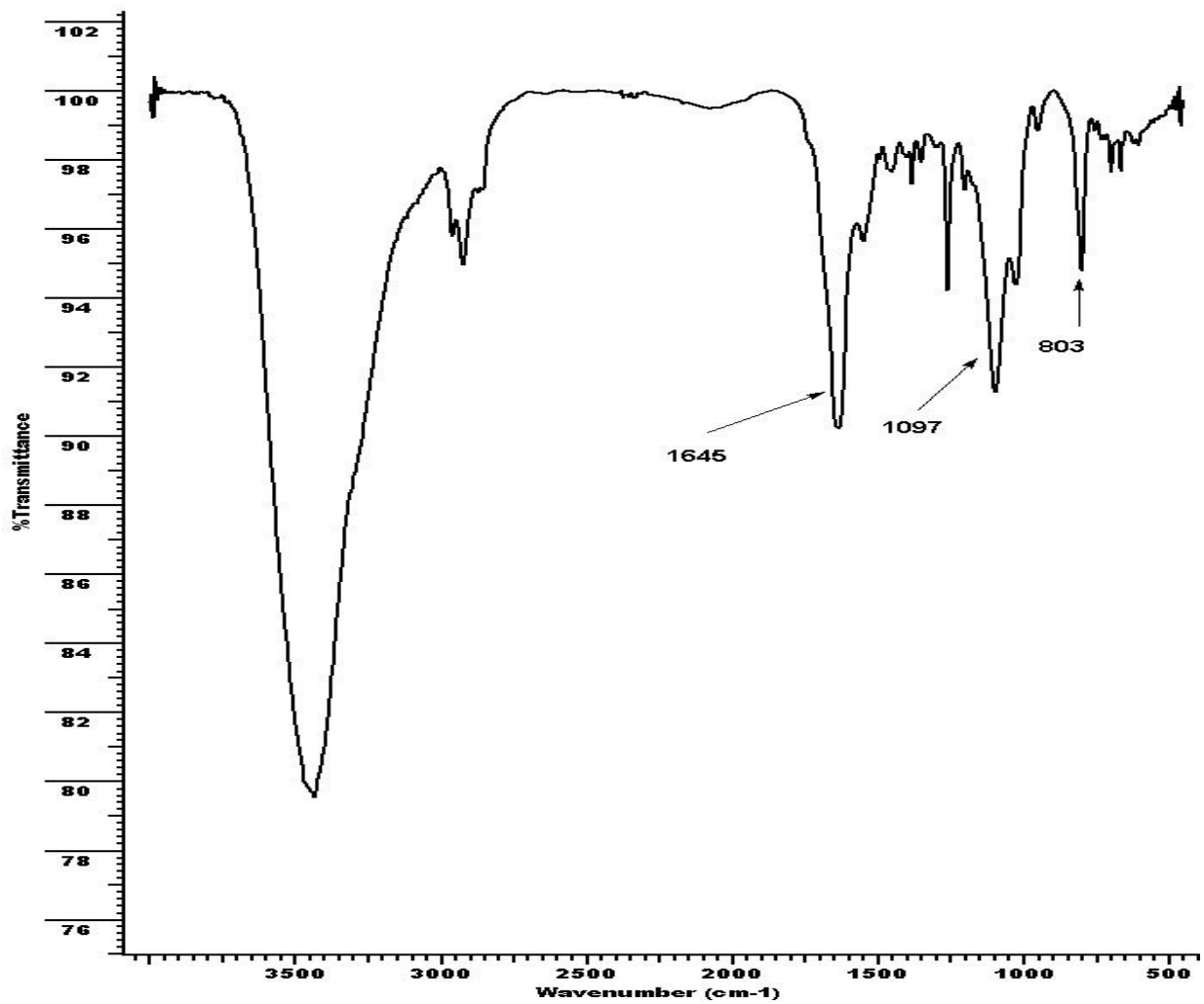
**Εικόνα 24: Αποπροστασία του πολυμερούς με TFA (A) και dialysis σε μεμβράνη 3500MB (B).**

Τελευταίο στάδιο είναι το freeze drying για την εκδίωξη του νερού από το πολυμερές. το οποίο γίνεται με τη γυάλινη συσκευή Π, ώστε να μη μείνει νερό στη γραμμή κενού. Προσαρμόζεται το Π στη γραμμή κενού και τοποθετείται μια φιάλη 500ml στο ένα άκρο του, η οποία απαερώνεται. Με τη βοήθεια πιπέτας προστίθεται το διαλυμένο σε νερό πολυμερές από το εσωτερικό της μεμβράνης σε μια 50 ml φιάλη, η οποία προσαρμόζεται στο άλλο άκρο του Π. Αφού παγώσει, απαερώνεται και ελέγχεται, αν έχει πιάσει κενό η γραμμή, ώστε να ξεκινήσει το freeze drying. Αφού η 50 ml φιάλη παγώσει τοποθετείται κάτω από αυτήν ένα μικρό ποτήρι ζέσεως και στην 500 ml άδεια φιάλη ένα labjack με υγρό άζωτο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η εξάχνωση του νερού από την 50ml φιάλη στην 500ml φιάλη. Η όλη διαδικασία διαρκεί τρεις ημέρες. Τελικά, ζυγίζονται 0,19 gr πολυμερούς, τα οποία φυλάσσονται σε ειδικά σακουλάκια στην κατάψυξη.



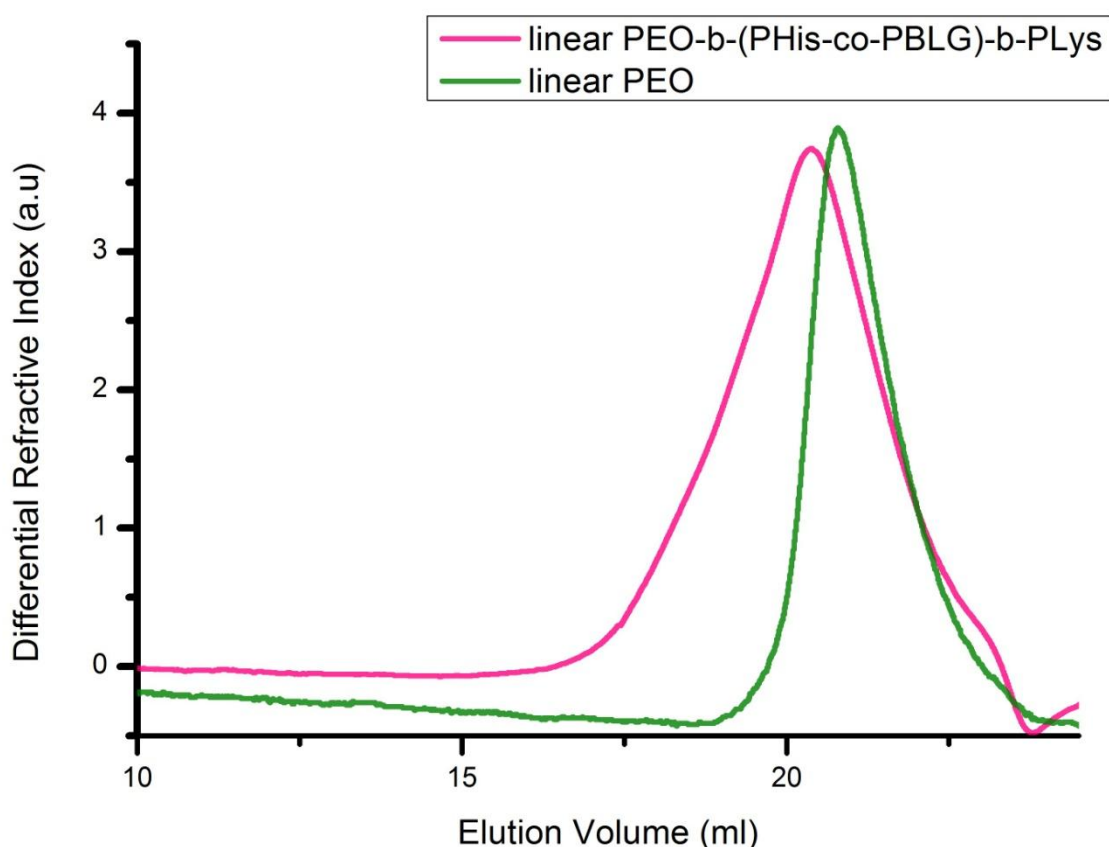
Εικόνα 25: Απομάκρυνση του H<sub>2</sub>O από το πολυμερές με την τεχνική freeze drying.

Για το χαρακτηρισμό του πολυμερούς χρησιμοποιούνται οι τεχνικές του IR, GPC και NMR.



Εικόνα 26: Φάσμα IR του PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL μετά την αποπροστασία

Στο φάσμα IR του πολυμερούς, μετά τον πολυμερισμό και την αποπροστασία παρατηρείται μια κορυφή στα  $1645\text{cm}^{-1}$ , που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού, καθώς και στα  $1097\text{cm}^{-1}$  βρίσκεται ο αιθερικός δεσμός του πολυαιθυλενοξειδίου. Η κορυφή στα  $803\text{cm}^{-1}$  υποδηλώνει την κάμψη του N-H της αποπροστατευμένης αμινοομάδας της λυσίνης. Τέλος, παρατηρείται ότι δεν υπάρχουν οι κορυφές από την τρίτυλο προστασία στα  $700\text{ cm}^{-1}$  και  $754\text{ cm}^{-1}$ , σε αντίθεση με το IR μετά τον πολυμερισμό, οπότε η αποπροστασία έγινε επιτυχώς.



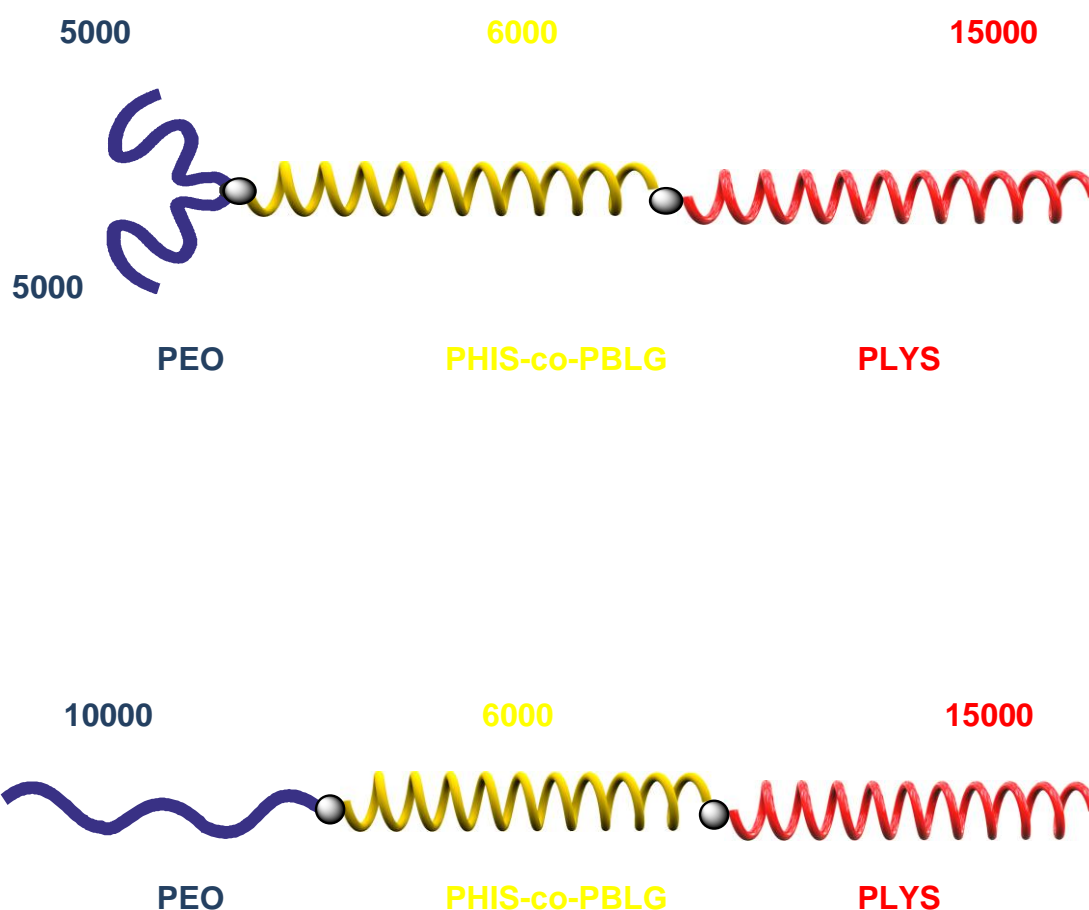
Εικόνα 27: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL.

Στο Χρωματογράφημα GPC σε διαλύτη νερό του PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL παρατηρείται μια καμπύλη με συμμετρική κατανομή (ροζ). Στο Χρωματογράφημα φαίνεται και η καμπύλη του μακροαπαρχητή που έχει 10.000 μοριακό βάρος. Η καμπύλη του συμπολυμερούς εμφανίζεται νωρίτερα, κάτι αναμενόμενο, αφού έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

## 5.5 Σύνθεση διακλαδισμένου τρισυσταδικού τετραπολυμερούς PEO<sub>2</sub>-*b*-(His-co-PBLG)-*b*-PLL

### 5.5.1 Εισαγωγή

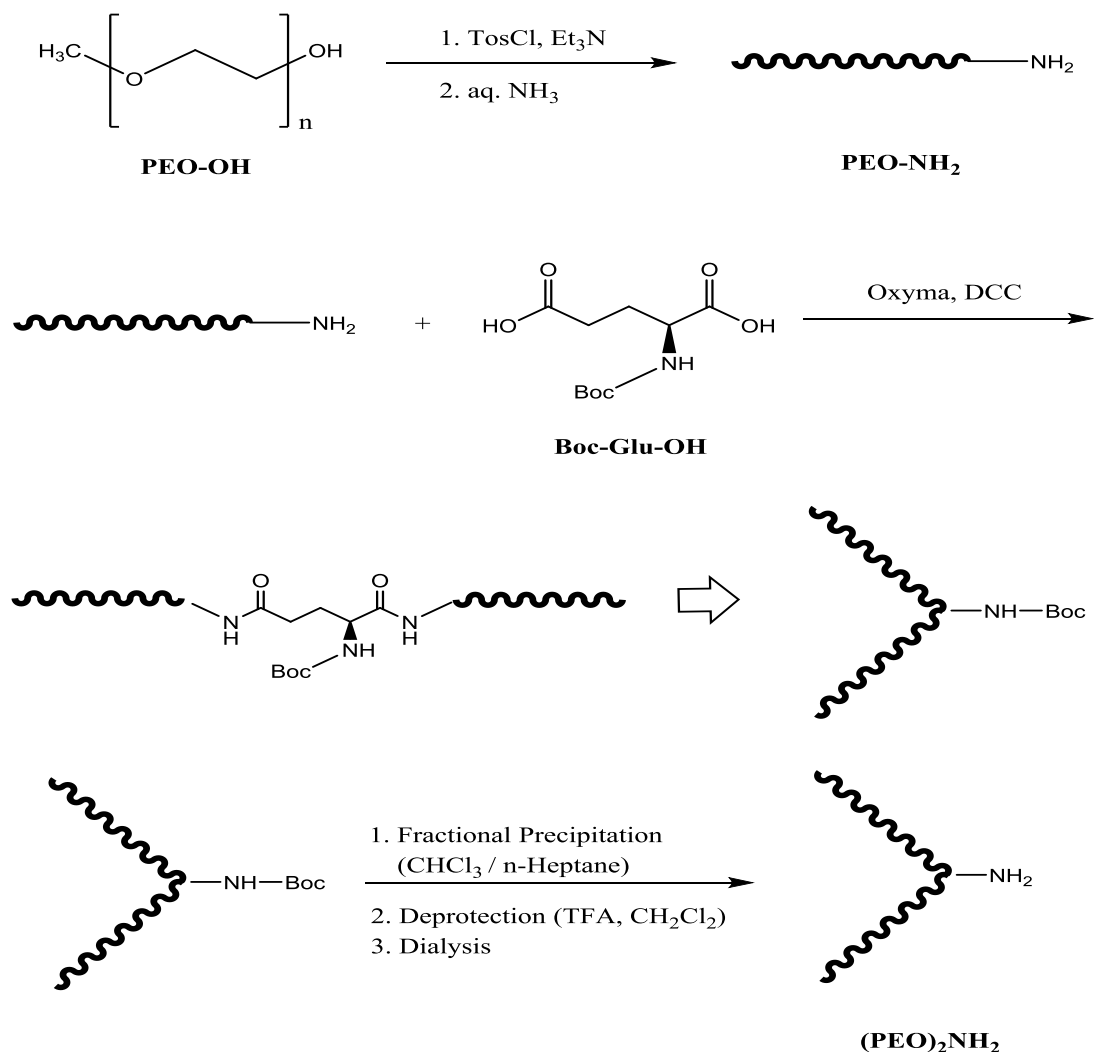
Για τη σύνθεση του διακλαδισμένου τρισυσταδικού τετραπολυμερούς PEO<sub>2</sub>-*b*-(His-co-PBLG)-*b*-PLL χρησιμοποιείται ως μακροαπαρχητής το πολυμερές PEO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, που έχει ακραία αμινομάδα και θα εκκινήσει τον πολυμερισμό του Nim-Trt-L-Histidine NCA και του NCA του PBLG, τα οποία είναι τα μονομερή για τη σύνθεση της δεύτερης συστάδας. Στη συνέχεια, θα εκκινήσει τον πολυμερισμό του NCA της λυσίνης, που είναι το μονομερές για την σύνθεση της τρίτης συστάδας. Αυτό το πολυμερές σε σύγκριση με το προηγούμενο διαφέρει μόνο στην αρχιτεκτονική του μακροαπαρχητή, αφού οι υπόλοιπες συστάδες είναι ίδιες. Παρακάτω απεικονίζονται τα δύο πολυμερή που συνθέτονται:



Εικόνα 28: Α) Πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή Β) Πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή.

## 5.5.2 Παραγωγή του μακροαπαρχητή (PEO)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>

Παρακάτω απεικονίζεται η παραγωγή του μακροαπαρχητή (PEO)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> :



Η παραγωγή του PEO-NH<sub>2</sub> περιγράφεται παραπάνω στο παρόν. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η αντίδραση του PEO-NH<sub>2</sub> με το Boc-Glu-OH. Μετά από πειράματα και δοκιμές εξάγεται ως συμπέρασμα ότι η αναλογία της αντίδρασης αυτής θα πρέπει να είναι NH<sub>2</sub>/COOH = 1-1,25 και το 1,25 επειδή δεν είναι 100% η μετατροπή της -OH σε -NH<sub>2</sub> κατά το πρώτο στάδιο.

Επίσης, τόσο το Oxyma όσο και το DCC πρέπει να είναι σε 2,2 περίσσεια σε σχέση με τα -COOH. Σύμφωνα με τα παραπάνω και για αναλογία NH<sub>2</sub>/COOH = 1 περιγράφεται παρακάτω η πειραματική διαδικασία.

Το PEO-NH<sub>2</sub> (5K) (15 g, 3 mmol) διαλυτοποιείται σε 90 mL DMF (από το μπουκάλι με το septum). Στο έντονα αναδευόμενο αυτό διάλυμα προστίθεται μίγμα Boc-Glu-OH (0,371 g, 1,5 mmol αλλά 3 mmol -COOH, MB= 247,25 g/mol), Oxyma (0,94 g, 6,6 mmol, MB = 142,11 g/mol), DCC (1,36 g, 6,6 mmol, MB = 206,33 g/mol) σε 10 mL DMF,

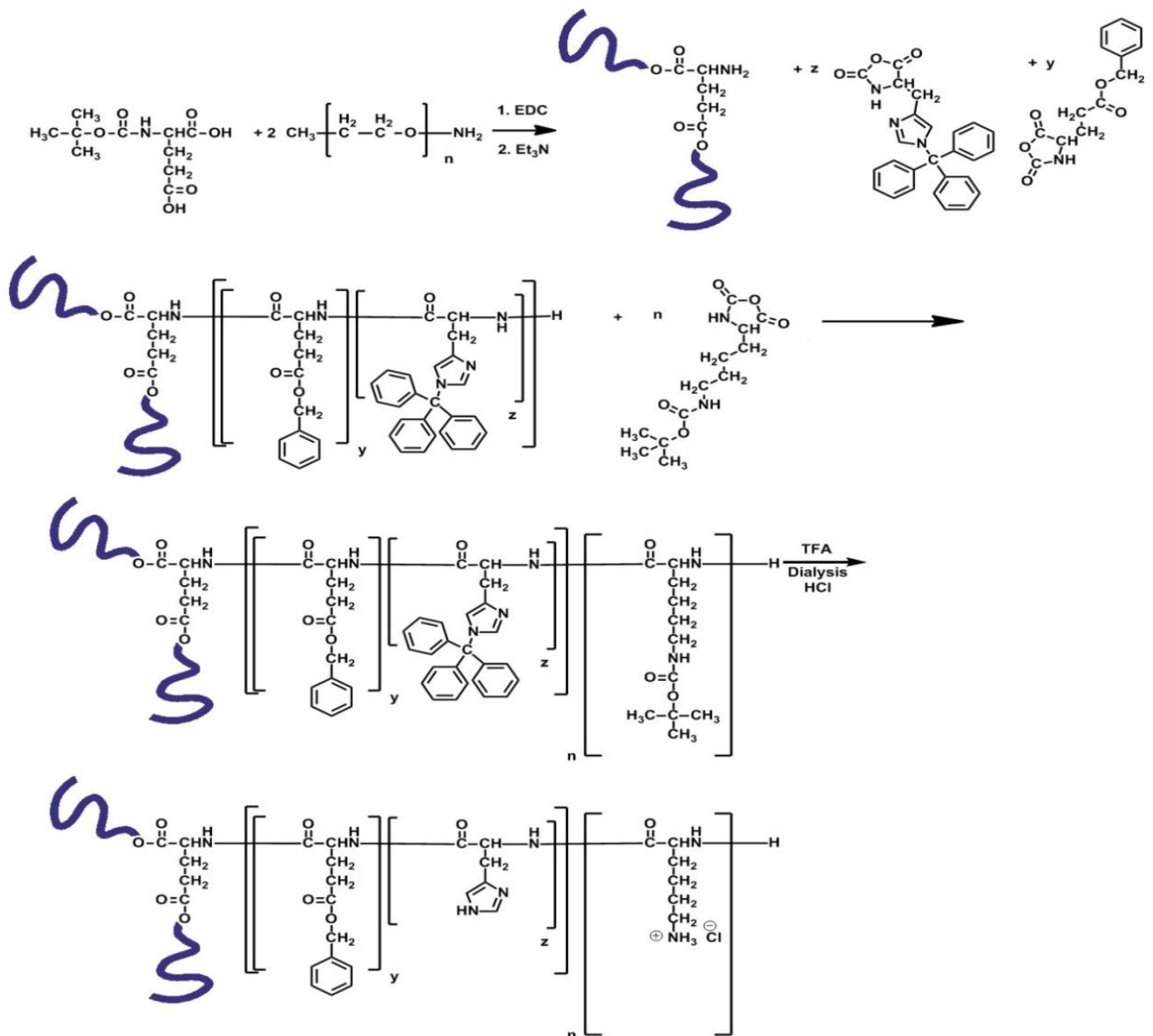
το οποίο έχει αφεθεί να ενεργοποιηθεί υπό ανάδευση για 10 λεπτά. Τελικά, το μίγμα της αντίδρασης, αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Την επομένη, γίνεται εκ νέου προσθήκη 0,47 g Οxyoma και 0,68 g DCC και η ανάδευση συνεχίζεται για άλλη μία νύχτα.

Γενικά, το μίγμα που λαμβάνεται είναι θολό, λόγω των παραπροϊόντων από το DCC και το Οxyoma. Αφού αραιωθεί με ποσότητα διχλωρομεθανίου, διηθείται μέσω celite σε τριάρι χωνί. Το διαυγές διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Διαλυτοποιείται σε ποσότητα διχλωρομεθανίου και καταβυθίζεται σε αιθέρα. Το στερεό που λαμβάνεται από τη διήθηση, ξηραίνεται στο φούρνο κενού ή στον απαγωγό. Ακολουθεί η διαδικασία της κλασματικής καταβύθισης.

Το στερεό διαλυτοποιείται σε χλωροφόρμιο για να προκύψει διάλυμα με συγκέντρωση 5-10% κ.β. Το διάλυμα τοποθετείται σε διαχωριστική χοάνη και σε αυτό προστίθεται τμηματικά κανονικό επτάνιο έως ότου προκύψει θολό μίγμα (μετά από έντονη ανατάραξη). Γενικά, διπλάσια ποσότητα επτανίου χρειάζεται για να θολώσει το διάλυμα. Προς επίρρωση των ανωτέρω, είχαν τοποθετηθεί 18 g, που διαλυτοποιήθηκαν σε 300 mL  $\text{CHCl}_3$ . Στη διαχωριστική χοάνη προστέθηκε τμηματικά 700 mL επτανίου συνολικά για να παραμείνει το διάλυμα θολό. Αφέθηκε ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και απομακρύνθηκε η κάτω στιβάδα (1<sup>ο</sup> κλάσμα). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 mL επτανίου τα οποία ανακινήθηκαν έντονα και αφέθηκαν να διαχωριστούν. Αποσπίαστηκε η κάτω στιβάδα (2<sup>ο</sup> κλάσμα) και προστέθηκαν άλλα 100 mL επτανίου και πάρθηκε η κάτω στιβάδα (3<sup>ο</sup> κλάσμα) και τέλος 150 mL για να συλεχθεί το (4<sup>ο</sup> κλάσμα). Από το GPC στο DMF παρατηρήθηκε ότι το 4<sup>ο</sup> κλάσμα έχει κυρίως κλάδο. Στα άλλα 3 κλάσματα είναι εμφανής η μείωση του κλάδου. Συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν. Διαφοροποιήθηκαν σε διχλωρομεθάνιο και καταβυθίστηκαν σε αιθέρα. Μετά, από ξήρανση προκύπτουν 11 g στερεού. Αυτά διαλυτοποιήθηκαν σε 40 mL διχλωρομεθανίου και προστέθηκαν 40 mL τριφθοροξικού οξέος. Η αποπροστασία της Boc ομάδας αφέθηκε για 1,5 ώρα υπό έντονη ανάδευση. Στη συνέχεια, συμπυκνώθηκε και το υπόλειμμα διαλύτοποιήθηκε σε 30 mL υπερκάθαρο νερού στα οποία είχαν διαλυτοποιηθεί και 10 g NaCl. Στον εν λόγω διάλυμα έγινε εξουδετέρωση με υδατικό διάλυμα 1N NaOH μέχρις έως ότου το pH αυξηθεί στο 14 (πεχαμετρικό χαρτί). Αφήνεται το αλκαλικό διάλυμα για περίπου 10 λεπτά υπό ανάδευση και στη συνέχεια εκχυλίζεται δύο φορές με 100 mL διχλωρομεθανίου. Οι στιβάδες του διχλωρομεθανίου τοποθετήθηκαν κατευθείαν σε αιθέρα, για να καταβυθιστεί το πολυμερές.

Ακολουθεί το στάδιο της διαπίδυσης (dialysis) τόσο για την απομάκρυνση των ουσιών μικρού μοριακού βάρους όσο και του κλάδου που έχει απομείνει. Γενικά χρειάζονται αραιά υδατικά διαλύματα σε μεμβράνη 6-8K (για μικρό χρονικό διάστημα). Θα πρέπει να παρακολουθείται όλη η διαδικασία με το GPC, γιατί χάνεται και ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος. Ταυτόχρονα, πρέπει να φτιάχνεται μεγάλη ποσότητα αρχικά γιατί σε αυτό το στάδιο έχουμε απώλειες. Πάντως, όταν η μεμβράνη διογκώνεται υπερβολικά, ο διαχωρισμός δεν είναι εφικτός. Φεύγουν και τα δύο και το ποσοστό δεν αλλάζει. Χρειάζεται πολλές φορές καινούρια μεμβράνη (για μικρό χρονικό διάστημα) για να καθαρίσει πλήρως το προϊόν από τον κλάδο.

Είναι γνωστό ότι  $m_{(PEO)_2-NH_2} = 0,2\text{gr}$  και  $MB_{PEO} = 10.000$ . Συνεπώς με βάση τον τύπο  $n = m / MB_{PEO} = 0,2 / 10000 = 0,00002\text{mol}$   $(PEO)_2-NH_2$ , οι αντιδράσεις σύνθεσης του διακλαδισμένου τρισταδιακού τετραπολυμερούς απεικονίζονται παρακάτω:





Οι υπολογισμοί των μονομερών γίνονται ως εξής:

$$MB_{\text{συστάδας}} = \text{gr}_{\text{μονομερούς}} / \text{mol}_{\text{απαρχητή}} \Rightarrow \text{gr}_{\text{μονομερούς}} = MB_{\text{συστάδας}} \times \text{mol}_{\text{απαρχητή}} \Rightarrow$$

$$\text{gr}_{\text{μονομερούς}} = 6000 \times 0,00002 = 0,12 \text{ gr His}$$

Είναι γνωστό ότι το  $MB_{\text{His}}$  χωρίς προστασία και  $\text{CO}_2$  είναι 135,7, άρα:

$$n = m / MB_{\text{His}} = 0,12 / 135,7 = 0,0008843036 \text{ mol His}$$

100 mol His	15 mol PBLG
0,0008843036 mol His	x
<hr/>	
x = 0,0001326455 mol γλουταμικό οξύ	

$$MB_{\text{γλουταμικό οξύ}}: 263$$

Από τον τύπο:  $m = n \times MB \Rightarrow m = 0,0001326455 \times 263 = 0,0348857665 \text{ gr γλουταμικό οξύ}$

$$m = 0,0008843036 \times 423 = 0,3740604228 \text{ gr His όπου το } MB_{\text{His}} = 423$$

$$n_{(\text{PEO})_2\text{-NH}_2} = 0,00002 \text{ mol}$$

$$MB_{\text{συστάδας}} = \frac{\text{gr}_{\text{μονομερούς}}}{\text{mol}_{(\text{PEO})_2\text{-NH}_2}} \Rightarrow \text{gr}_{\text{μονομερούς}} = 15000 \times 0,00002 = 0,3 \text{ gr λυσίνης χωρίς } \text{CO}_2 \text{ και προστασία}$$

$$n = m / MB = 0,3 / 128 = 0,00234375 \text{ mol λυσίνης χωρίς προστασία}$$

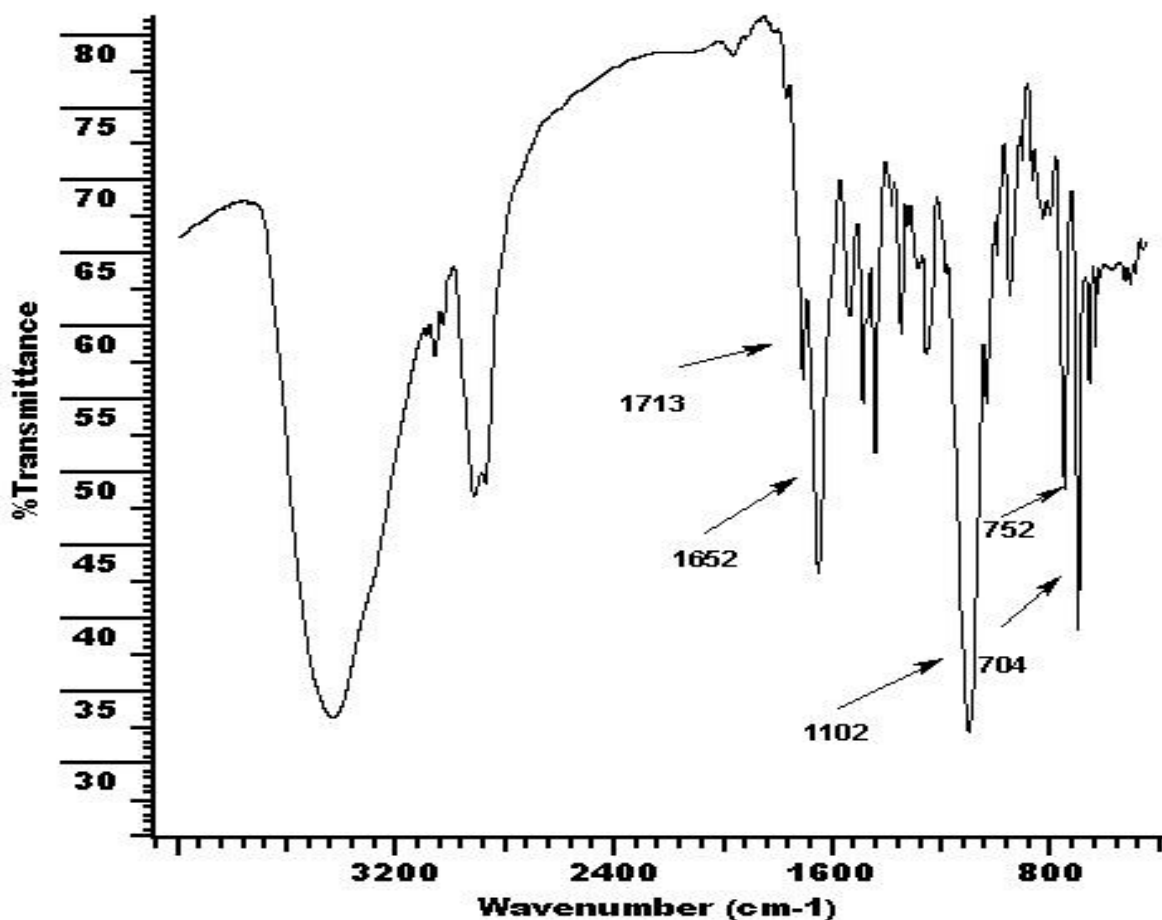
$$\text{από τον τύπο } n = m / MB \Rightarrow m = n \times MB = 0,00234375 \text{ mol λυσίνης} \times 272 = 0,6375 \text{ gr λυσίνης με προστασία}$$

Οι διαδικασίες που έλαβαν χώρα στον πολυμερισμό του πολυμερούς με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή είναι ακριβώς οι ίδιες, όπως και στο πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή.

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού γίνεται λήψη των φασμάτων IR, για την επιτυχή πορεία του πολυμερισμού. Μόλις τελειώσει ο πολυμερισμός, ζυγίζεται το πολυμερές.

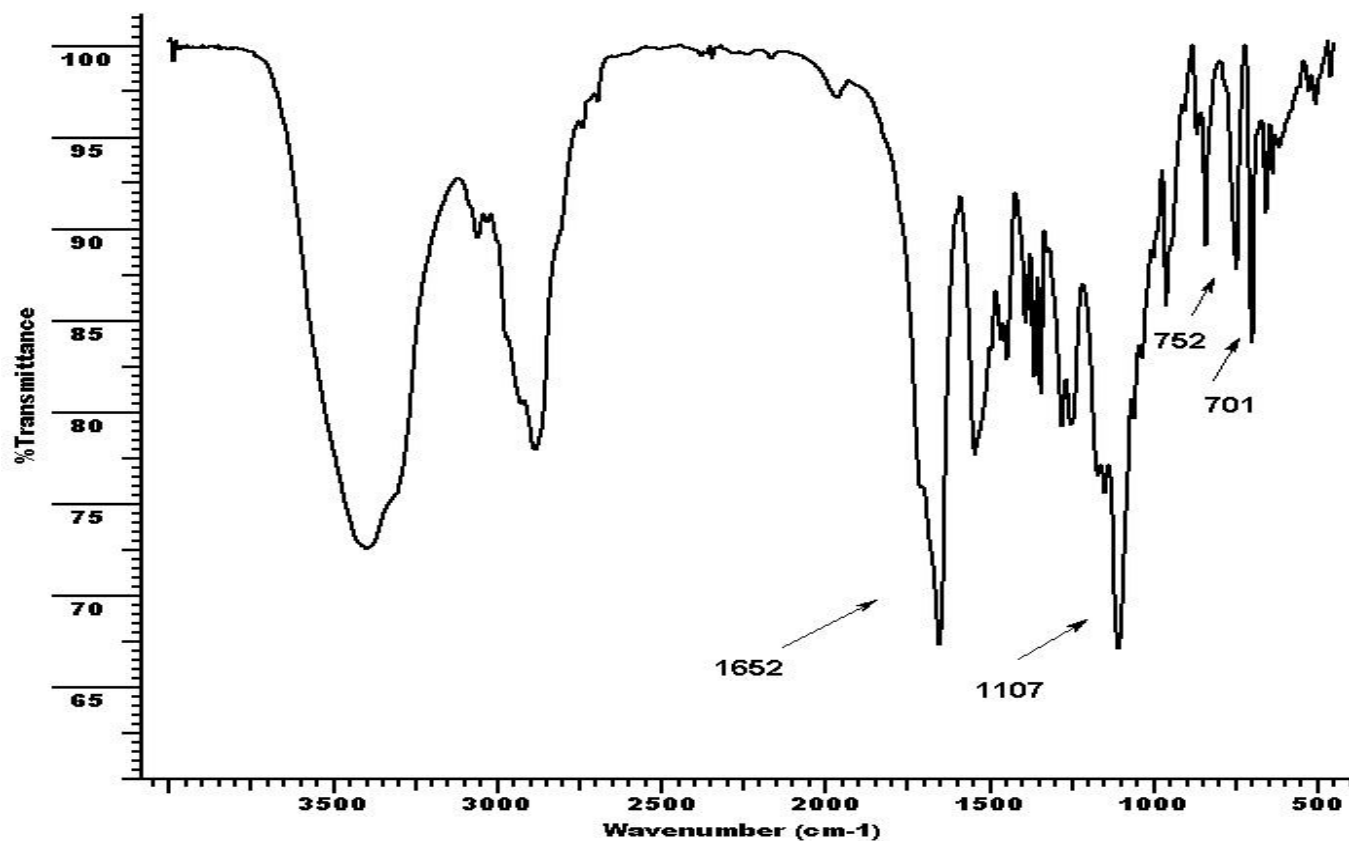
$$\text{Ζύγιση: (Άδεια φιάλη + πολυμερές) - άδεια φιάλη} = 62,401 - 61,665 = 0,736 \text{ gr}$$

Παρακάτω απεικονίζονται τα φάσμα IR του PEO<sub>2</sub>-*b*-(PHis-co-PBLG) και PEO<sub>2</sub>-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL, πριν την αποπροστασία του πολυμερούς.



Εικόνα 29: Φάσμα IR του PEO<sub>2</sub>-*b*-(PHis-co-PBLG) μετά τον πολυμερισμό.

Στο φάσμα του IR του πολυμερούς, μετά τον πολυμερισμό του μακροαπαρχητή και της πρώτης συστάδας, παρατηρείται μια κορυφή στα 1713 cm<sup>-1</sup>, που φανερώνει την προστασία του καρβονυλίου του PBLG. Η κορυφή στα 1652 cm<sup>-1</sup> φανερώνει την ύπαξη αμιδικού δεσμού. Άλλη ευδιάκριτη κορυφή, είναι αυτή στα 1102cm<sup>-1</sup>, όπου βρίσκεται ο αιθερικός δεσμός του πολυαιθυλενοξειδίου (PEO) και στα 704cm<sup>-1</sup> και στα 752cm<sup>-1</sup>, εμφανίζονται οι κορυφές της προστασίας της ιστιδίνης



Εικόνα 30: Φάσμα IR του PEO<sub>2</sub>-b-(PHis-co-PBLG)-b-PLL μετά τον πολυμερισμό

Στο φάσμα του IR του πολυμερούς, μετά τον πολυμερισμό του μακροαπαρρητή και της δεύτερης συστάδας παρατηρείται μια κορυφή στα 1652 cm<sup>-1</sup> η οποία υποδηλώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Άλλη ευδιάκριτη κορυφή, είναι αυτή στα 1107cm<sup>-1</sup>, όπου βρίσκεται ο αιθερικός δεσμός του πολυαιθυλενοξειδίου.(PEO) και στα 752cm<sup>-1</sup> και στα 701cm<sup>-1</sup> εμφανίζονται οι κορυφές της προστασίας της ιστιδίνης.

#### Υπολογισμός απόδοσης

(PEO)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>: 0,2gr

His:  $0,37406 \times \frac{379}{423}$  (με προστασία χωρίς CO<sub>2</sub>) = 0,3351gr

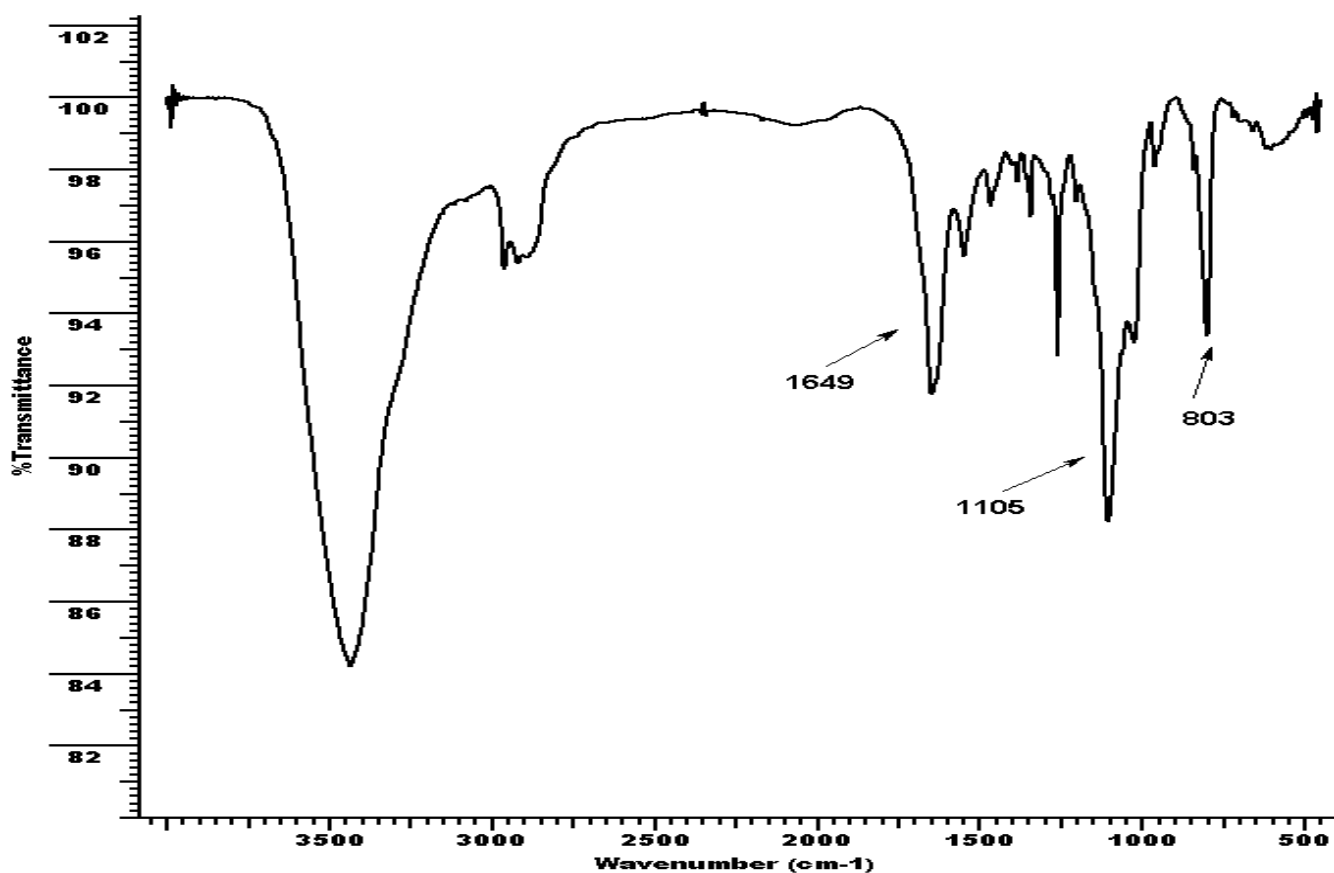
PBLG:  $0,03488 \times \frac{219}{263}$  = 0,0290gr

PLLL:  $0,6375 \times \frac{228}{272}$  = 0,5343gr



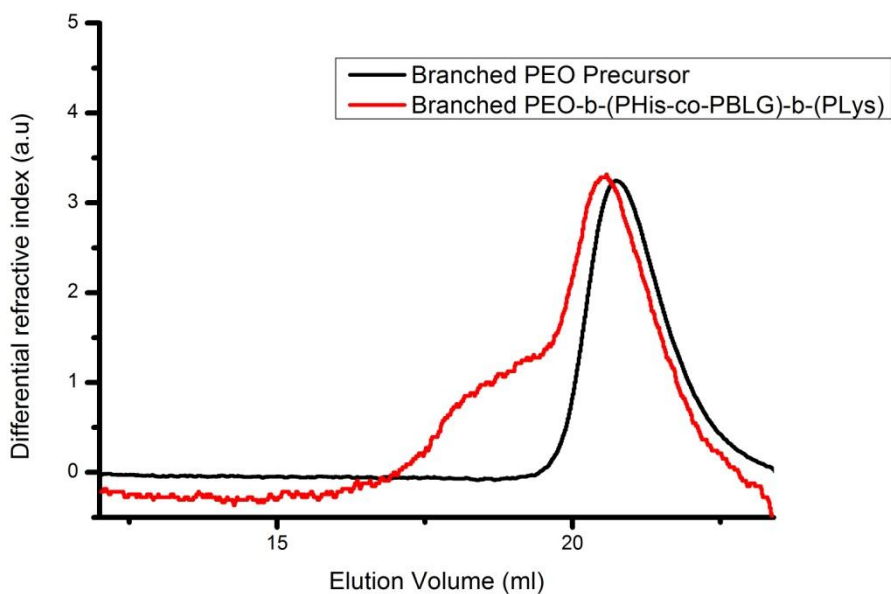
Μετά την ολοκλήρωση του dialysis και του freeze drying (ίδιες διαδικασίες με το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή) συλέγονται 0,19 gr πολυμερούς το οποίο φυλάσσεται σε ειδικά σακουλάκια στην κατάψυξη.

Για τον χαρακτηρισμό του πολυμερούς χρησιμοποιούνται οι τεχνικές του IR, NMR και GPC.

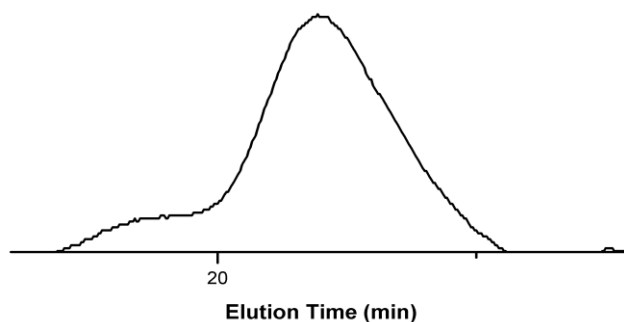


Εικόνα 31: Φάσμα IR του PEO<sub>2</sub>-b-(PHis-co-PBLG)-b-PLL μετά την αποπροστασία.

Στο φάσμα IR του πολυμερούς, μετά τον πολυμερισμό και την αποπροστασία παρατηρείται μια κορυφή στα 1649 cm<sup>-1</sup> που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού και στα 1105cm<sup>-1</sup> βρίσκεται ο αιθερικός δεσμός του πολυαιθυλενοξειδίου. Η κορυφή στα 803cm<sup>-1</sup> υποδηλώνει την κάμψη του N-H της αποπροστατευμένης αμινοομάδας της λυσίνης, ενώ παρατηρείται ότι δεν υπάρχουν οι κορυφές από την τρίτυλο προστασίας στα 700 cm<sup>-1</sup> και 750 cm<sup>-1</sup>, σε αντίθεση με το IR μετά τον πολυμερισμό, οπότε η αποπροστασία έγινε επιτυχώς.

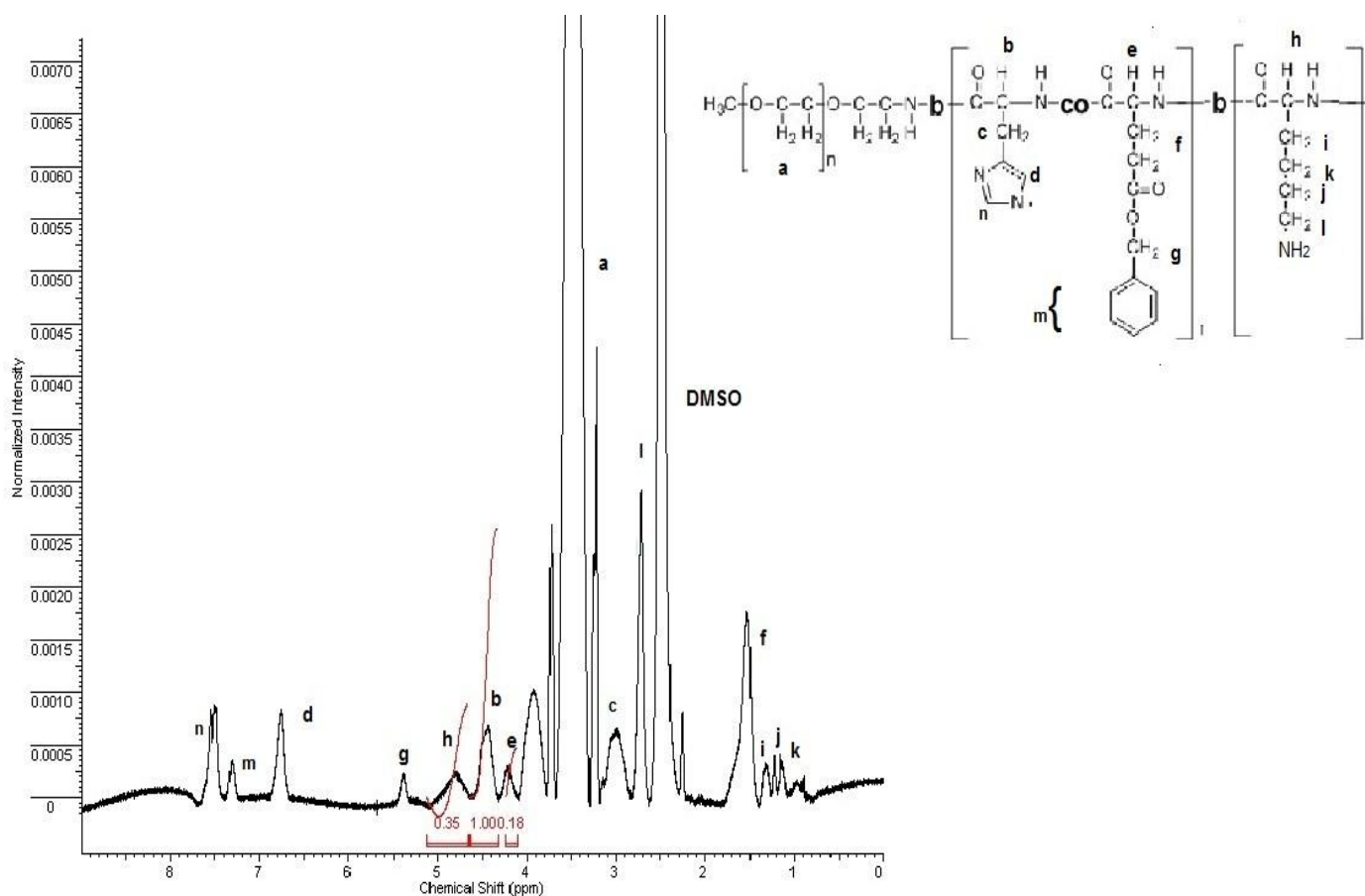


branched PEO-b-(PHis-co-PBLG)-b-PLys



**Εικόνα 32: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του PEO<sub>2</sub>-b-(PHis-co-PBLG)-b-PLL.**

Στο πρώτο χρωματογράφημα του GPC παρατηρείται ότι βγαίνει ένας ώμος πριν την κορυφή του πολυμερούς (κόκκινο). Αυτός ο ώμος δείχνει ότι το πολυμερές συσσωματώνεται και γίνεται παρακράτηση στις στήλες του GPC και γι αυτό το λόγο εμφανίζεται αυτός ο ώμος λίγο πριν την κορυφή του πολυμερούς. Αφού, γίνονται διάφορες αραιώσεις παρατηρείται αλλαγή του ώμου στον ίδιο χρόνο και αλλάζει η μορφή του χρωματογραφήματος.(Εικόνα 32).



Εικόνα 33: Φάσμα NMR του PEO<sub>2</sub>-*b*-(PHis-*co*-PBLG)-*b*-PLL.

Για την εξακρίβωση της σύνθεσης του PEO<sub>2</sub>-*b*-(PHis-*co*-PBLG)-*b*-PLL γίνεται λήψη του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR σε δευτεριωμένο DMSO. Από το φάσμα παρατηρείται ότι  $\mathbf{b/e}=1/0.18= 5,55$  και αφού η αναλογία είναι 80:15 προκύπτει:  $80/15=5,6$  καθώς και  $\mathbf{b/h}=1/0.35= 2,85$  και αφού η αναλογία είναι molLys/molHis προκύπτει  $0,00234375\text{molLys}/0,0008843036\text{molHis}= 2,65$ . Άρα, παρατηρείται ότι οι αναλογίες που τέθηκαν σαν στόχο αντιστοιχούν με τις ποσότητες που υπολογίστηκαν. Στα 7,4 ppm φαίνονται και τα υδρογόνα του βενζολικού δακτυλίου της προστασίας του PBLG που αποτελεί μεγάλο μέρος της δεύτερης συστάδας. Όμως, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί ότι το PEO βγαίνει στα ίδια ppm με το H<sub>2</sub>O (3,5 ppm) και επειδή το PEO κατακρατάει νερό βγαίνει πιο ψηλά. Γι'αυτό το λόγο δε υπολογίζεται το μοριακό βάρος του PEO και δε μπορεί να γίνει ιδιαίτερη επεξεργασία.





## 5.7 Εγκλωβισμός φαρμάκου Everolimus στο πολυμερές PEO<sub>2</sub>-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL.

Σκοπός του εγκλωβισμού του φαρμάκου Everolimus (υδρόφοβο και αδιάλυτο στο H<sub>2</sub>O) στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαχητή που σχηματίζει κυστίδια είναι η ενσωμάτωση του στην υδρόφοβη στιβάδα (PHis-co-PBLG) των αυτοοργανούμενων σωματιδίων κατά την διαδικασία της διαπίδυσης.

Αρχικά, διαλύονται 30mg του πολυμερούς σε 6mL DMSO και μένει υπό ανάδευση για μια νύχτα. Την επόμενη μέρα, σε αυτό το διάλυμα προστίθενται 4mg Everolimus και το vial μένει υπό ανάδευση για 1 ώρα.

Στο φιαλίδιο vial που περιέχει διαλυμένα το πολυμερές με το φάρμακο προστίθενται σταδιακά 2mL του tris-buffer ανά 200 μL και κάθε 10 λεπτά υπό ανάδευση έτσι ώστε να μπει το φάρμακο στο κυστίδιο. Το buffer που χρησιμοποιείται γι' αυτό το πείραμα είναι ακριβώς το ίδιο με αυτό που αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 5.6 το οποίο χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις του DLS στο pH=7.4 με τη μόνη διαφορά ότι εδώ η ποσότητα του tris που προστίθεται είναι 0,6057gr.

Μετά το πέρας των προσθηκών το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική μεμβράνη διαπίδυσης 3500MB, η οποία επιτρέπει στα μόρια του DMSO να εξέρχονται από αυτήν ενώ στα μόρια του νερού να εισέρχονται, και η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε υάλινη πηγάδα που περιείχε 4L buffer. Το διάλυμα της μεμβράνης αφήνεται υπό ανάδευση ώστε να πραγματοποιηθεί η ανταλλαγή των διαλυτών DMSO-H<sub>2</sub>O, λόγω διαφοράς στην ωσμωτική πίεση και το βράδυ γίνεται αλλαγή του buffer, ώστε να γίνει ανανέωση του διαλύτη και διευκόλυνση της εξόδου του εναπομείναντος DMSO.

Την επόμενη μέρα, μεταφέρονται 3ml σε ένα vial με σκοπό να δούμε πόσο φάρμακο έχει εγκλωβιστεί στο διάλυμα (τυφλό). Το υπόλοιπο διάλυμα μοιράζεται στη μέση και η μισή ποσότητα του διαλύματος που απέμεινε τοποθετείται σε μεμβράνη 12-14MB η οποία δένεται με κόμπο σε ποτήρι 40ml buffer\* σε pH=7.4 και η άλλη μισή ποσότητα του διαλύματος σε ποτήρι με 40ml buffer\* σε pH=6.4. Στη συνέχεια, τα δύο αυτά ποτήρια ζέσεως τοποθετούνται σε θερμοστάτη στους 37°C.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 6.1 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης

Αφού επαληθεύεται η σύνθεση των πολυμερών με τα φάσματα IR, GPC και NMR στη συνέχεια, με τη τεχνική της δυναμικής σκέδασης μελετείται η αυτοοργάνωση τους και το μέγεθος τους. Για τα δύο πολυμερή γίνονται μετρήσεις σε pH= 7.4 (pH του αίματος), σε pH= 6.5 (pH εξωτερικά ενός καρκινικού κυττάρου) και pH= 5 (pH καρκινικού κυττάρου).

Σε κάθε pH γίνονται μετρήσεις σε τέσσερις θερμοκρασίες: 25°C που είναι η θερμοκρασία δωματίου, στους 37 °C που είναι η θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, 40°C που είναι η θερμοκρασία της φλεγμονής που κάνουν τα καρκινικά κύτταρα και 45 °C ώστε να παρατηρηθεί πως αυτοοργανώνονται τα πολυμεροσώματα σε μία ανώτερη τιμή θερμοκρασίας.

Σε κάθε pH και θερμοκρασία μετριέται η διάμετρος των σωματιδίων σε τρεις γωνίες 45°, 90°, 135° για να δούμε πως σκεδάζουν τα μικρά σωματίδια και πως τα μεγάλα καθώς και αν υπάρχει γωνιακή εξάρτηση.

Συγκεκριμένα το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή είναι θολό σε σχέση με το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 37 και γ'αυτό χρειάζεται να γίνει μεγάλη αραιώση γιατί στις μετρήσεις του DLS δε δίνει σήμα. Βέβαια το θόλομα του πολυμερούς αυτού είναι μια 1<sup>η</sup> ένδειξη ότι αυτοοργανώνεται διαφορετικά αφού όλες οι άλλες συνθήκες είναι ίδιες με το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή. Η συγκέντρωση του πολυμερούς με το γραμμικό μακροαπαρχητή όπου γίνονται οι μετρήσεις είναι 1mg/10ml, ενώ για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή είναι 5mg/5ml. Για τις αραιώσεις των διαλυμάτων χρησιμοποιούνται τα ρυθμιστικά διαλύματα Buffer pH= 7.4, 6.5, 5.0 που προαναφέρθηκαν στο και Κεφάλαιο 5.7

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι και για τα δύο πολυμερή με Buffer pH=7.4 και 6.5 γίνεται φιλτράρισμα ώστε να ελαχιστοποιηθεί το ποσοστό της σκόνης για να δίνει καλό σήμα ενώ για τα πολυμερή με Buffer pH=5 δε γίνεται φιλτράρισμα γιατί το πολυμερές θα μένει πάνω στο φίλτρο. Τα Buffer και στα τρία pH φιλτράρονται για να ελαχιστοποιηθεί η σκόνη.



**Εικόνα 35: Διάλυμα πολυμερούς με γραμμικό μακροαπαρχητή και διάλυμα πολυμερούς με διακλαδισμένο μακροαπαρχητή για μετρήσεις του DLS.**

Παρακάτω απεικονίζονται σε πίνακες τα αποτελέσματα του DLS για το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή καθώς και για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=6.5, 7.4, 5.0 και T=25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C. όπου, intensity είναι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, pdi είναι η πολυδιασπορά του συστήματος η οποία προέρχεται από τον τύπο  $\mu_2/\Gamma^2$ , Contin rh είναι η υδροδυναμική διάμετρος η οποία υπολογίζεται με τη χρήση του αλγόριθμου contin, wp% υποδηλώνει το ποσοστό του πληθυσμού.

**Πίνακας 4: Μετρήσεις DLS, για πολυμερές με γραμμικό μακροαπαρχητή σε pH=6.5, 7.4, 5.0 και T=25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C.**

<b>pH=7.4 T=25°C filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	51.874	0.52	1) 95.71	1)92.73%
<b>90°</b>	25.256	0.57	1)66.63 2)0.10	1)86.61% 2)13.38%
<b>135°</b>	29.885	0.59	1)72.72 2)0.161	1)77.59% 2)18.15%

<b>pH=7.4 T=37°C filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	51.398	0.50	1)66.38 2)31.89	1)77.08% 2)10.35%
<b>90°</b>	29.989	0.60	1)32.50 2)0.14	1)86% 2)13.96%
<b>135°</b>	27.687	0.57	1)55.76 2)0.24	1)86.03% 2)13.96%

<b>pH=7.4 T=40°C filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>Pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	46.024	0.53	1)65.65	1)83.65%
<b>90°</b>	23.928	0.57	1)56.86 2)0.10	1)85.43% 2)14.56%
<b>135°</b>	27.595	0.58	1)44.38 2)0.20	1)84.6% 2)15.36%

<b>pH=7.4 T=45°C filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	66.237	0.44	1)67.60	1)90.78%
<b>90°</b>	35.255	0.50	1)64.25	1)87.47%
<b>135°</b>	38.448	0.52	1)53.54	1)84.03%

<b>pH=6.5 T=25°C filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	211.436	0.42	1)172.3	1)91.19%
<b>90°</b>	41.376	0.48	1)106.3	1)91.55%
<b>135°</b>	58.589	0.49	1)84.2	93.62%

<b>pH=6.5 T=37°C filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	196.089	0.11	1)88.42	1)96.72%
<b>90°</b>	68.363	0.49	1)81.46	1)94.9%
<b>135°</b>	67.957	0.47	1)64.87	1)94.44%

<b>pH=6.5 T=40°C filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	181.825	0.41	1)111.9	1)93.66%
<b>90°</b>	66.367	0.46	1)82.3	1)90.53%
<b>135°</b>	65.833	0.48	1)60.95	1)94.7%

<b>pH=6.5 T=45°C filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	177.944	0.41	1)96.8	1)90.60%
<b>90°</b>	61.237	0.46	1)69.09	1)94.13%
<b>135°</b>	61.329	0.48	1)59.19	1)92.22%

<b>pH=5 T=25°C without filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	1088.203	0.53	1)533.6	1)99.6%
<b>90°</b>	558.109	0.45	1)821.3 2)98.65	1)88.60% 2)10.7%
<b>135°</b>	379.183	0.46	1)108.5	1)89.84%

<b>pH=5 T=37°C without filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	266.097	0.44	1)586.4	1)95.5%
<b>90°</b>	487.914	0.33	1)424.2 2)288.3	1)71.99% 2)25%
<b>135°</b>	646.261	0.32	1)509.7	1)98.45%

<b>pH=5 T=40°C without filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	848.814	0.42	1)393.1	1)98.61%
<b>90°</b>	603.927	0.37	1)456.3	1)99.04%
<b>135°</b>	578.072	0.47	1)584.4	1)99.22%

<b>pH=5 T=45°C without filtration 1mg-10ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	726.404	0.21	1)212.1	1)99.5%
<b>90°</b>	686.005	0.35	1)460.4	1)89.28%
<b>135°</b>	503.393	0.38	1)474.4	1)98.94%

**Πίνακας 5: Μετρήσεις DLS για πολυμερές με διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=6.5, 7.4, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C.**

<b>pH=7.4 T=25°C with filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	380.984	0.40	1)149,7	1)92.3%
<b>90°</b>	465.085	0.48	1)121.7	1)88.3%
<b>135°</b>	429.781	0.52	1)111 2)6.162	1)87.9% 2)10.6%



<b>pH=7.4 T=37°C with filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	349.580	0.41	1)118.2	1)94.4%
<b>90°</b>	422.810	0.49	1)94.8	1)86.42%
<b>135°</b>	405.175	0.52	1)87.13	1)84.43

<b>pH=7.4 T=40°C with filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>Pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	348.978	0.41	1)111.3	1)94.1%
<b>90°</b>	442.662	0.45	1)89.9	1)87.9%
<b>135°</b>	410.965	0.50	1)54.56	1)100%

<b>pH=7.4 T=45°C with filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	349.105	0.39	1)103.9	1)92.9%
<b>90°</b>	421.278	0.47	1)83.05 2)5.683	1)88.27% 2)10.6%
<b>135°</b>	395.720	0.51	1)74.5 2)5	1)84.75% 2)14.04%

<b>pH=6.5 T=25°C with filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	433.420	0.36	1)163.4	1)93.34%
<b>90°</b>	490.876	0.45	1)136.6	1)82.37%
<b>135°</b>	452.060	0.49	1)113.3 2)11.98	1)82.9% 2)11.94%

<b>pH=6.5 T=37°C with filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	460.823	0.39	1)114.5	1)95.35%
<b>90°</b>	479.528	0.45	1)100.9	1)89.45%
<b>135°</b>	437.589	0.51	1)64.47	1)99%

<b>pH=6.5 T=40°C with filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	449.089	0.40	1)141.2	1)89.6%
<b>90°</b>	484.581	0.48	1)93.4	1)87.04%
<b>135°</b>	418.792	0.49	1)61.77	1)99.6%

<b>pH=6.5 T=45°C with filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	445.198	0.44	1)96.94	1)95.08%
<b>90°</b>	451.586	0.45	1)87.63	1)87.69%
<b>135°</b>	411.917	0.50	1)78.21 2)5.121	1)85.5% 2)13.3%

<b>pH=5 T=25°C without filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	533.191	0.47	1)532.8 2)132.2	1)67.79% 2)30.54%
<b>90°</b>	805.155	0.47	1)461.7 2)99.50	1)55.56% 2)39.62%
<b>135°</b>	782.693	0.49	1)181.8	1)89.27%

<b>pH=5 T=37°C without filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	308.899	0.38	1)272.1	1)98.02%
<b>90°</b>	810.903	0.47	1)226.4	1)95.3%
<b>135°</b>	640.271	0.50	1)170.8	1)87.83%

<b>pH=5 T=40°C without filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	592.598	0.41	1)272.6	1)94.52%
<b>90°</b>	788.557	0.48	1)173.7	1)94.96%
<b>135°</b>	668.837	0.50	1)173.9	1)99.15%

<b>pH=5 T=45°C without filtration 5mg-5ml</b>				
<b>angle</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>Contin rh</b>	<b>Wp%</b>
<b>45°</b>	599.437	0.37	1)280	1)92.56%
<b>90°</b>	775.300	0.49	1)159.1	1)94.99%
<b>135°</b>	659.563	0.50	1)132.6 2)19.48	1)83.48% 2)11.48%

Παρακάτω παρουσιάζονται σε συγκεντρωτικούς πίνακες τα αποτελέσματα του DLS στις 90° και για τα δύο πολυμερή ώστε να παρατηρηθεί η αυτοοργάνωση τους με την αύξηση της θερμοκρασίας T= 25°C, 37°C, 40°C, 45°C καθώς και με τη μείωση του pH=7.4, 6.5, 5 .

**Πίνακας 6: Μετρήσεις DLS για το πολυμερές το γραμμικό μακροαπαρχητή σε pH= 7.4, 6.5, 5 και T= 25°C, 37°C, 40°C, 45°C σε γωνία 90°.**

<b>PH</b>	<b>T</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>R<sub>n</sub></b>	<b>Wp%</b>
<b>7.4</b>	<b>25°C</b>	25.256	0.575	1)66.63 2)0.1037	1)86.61% 2)13.38%
	<b>37 °C</b>	29.989	0.609	1)32.50 2)0.14	1)86% 2)13.96%
	<b>40 °C</b>	23.928	0.571	1)56.86 2)0.107	1)85.43% 2)14.56%
	<b>45 °C</b>	35.255	0.508	1)64.25	1)87.47%

<b>6.5</b>	<b>25 °C</b>	41.376	0.489	<b>1)106.3</b>	<b>1)91.55%</b>
	<b>37 °C</b>	68.363	0.495	<b>1)81.46</b>	<b>1)94.9%</b>
	<b>40 °C</b>	66.367	0.46	<b>1)82.3</b>	<b>1)90.53%</b>
	<b>45 °C</b>	61.237	0.46	<b>1)69.09</b>	<b>1)94.13%</b>
<b>5</b>	<b>25 °C</b>	558.109	0.452	<b>1)821.3</b> <b>2)98.65</b>	<b>1)88.60%</b> <b>2) 10.7%</b>
	<b>37 °C</b>	487.914	0.331	<b>1)424.2</b> <b>2)288.3</b>	<b>1)71.99%</b> <b>2) 25%</b>
	<b>40 °C</b>	603.927	0.37	<b>1)456.3</b>	<b>1)99.04%</b>
	<b>45 °C</b>	686.005	0.359	<b>1)460.4</b>	<b>1)89.28%</b>

Πίνακας 7: Μετρήσεις DLS για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH= 7.4, 6.5, 5 και T= 25°C, 37°C, 40°C, 45°C σε γωνία 90°

<b>PH</b>	<b>T</b>	<b>Int</b>	<b>pdi</b>	<b>R<sub>h</sub></b>	<b>Wp%</b>
<b>7.4</b>	<b>25 °C</b>	465.085	0.481	1)121.7	1)88.3%
	<b>37 °C</b>	422.810	0.492	1)94.8	1)86.42%
	<b>40 °C</b>	442.662	0.454	1)89.9	1)87.9%
	<b>45 °C</b>	421.278	0.47	1)83.05 2)5.683	1)88.27% 2)10.6%
<b>6.5</b>	<b>25 °C</b>	490.876	0.453	1)136.6	1)82.37%
	<b>37 °C</b>	479.528	0.458	1)100.9	1)89.45%
	<b>40 °C</b>	484.581	0.483	1)93.4	1)87.04%
	<b>45 °C</b>	451.586	0.455	1)87.63	1)87.69%
<b>5</b>	<b>25 °C</b>	805.155	0.479	1)461.7 2)99.50	1)55.56% 2)39.62%
	<b>37 °C</b>	810.903	0.473	1)226.4	1)95.3%
	<b>40 °C</b>	788.557	0.48	1)173.7	1)94.96%
	<b>45 °C</b>	775.300	0.499	1)159.1	1)94.99%

Συμπερασματικά από τα αποτελέσματα του DLS για τα δύο πολυμερή προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- ❖ Και στα δύο πολυμερή παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας το PEO συσσωματώνεται γιατί χάνει νερό με αποτέλεσμα η υδροδυναμική ακτίνα( $R_h$ ) να μικραίνει άρα και τα σωματίδια να μικραίνουν σε διαστάσεις
- ❖ Όσο μειώνεται το pH η υδροδυναμική ακτίνα( $R_h$ ) αυξάνεται και αυτό συμβαίνει γιατί φορτίζονται οι αλυσίδες με αποτέλεσμα τα συσσωματώματα να φουσκώνουν επειδή θέλουν να είναι πιο υδατοδιαλυτά. Αυτό το φαινόμενο είναι πιο έντονο στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή.
- ❖ Το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή στο pH=7.4 και 6.5 οι τιμές του  $R_h$  είναι μεγαλύτερες από το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή όπως είναι φυσιολογικό λόγω του ότι το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σχηματίζει κυστίδια (μεγαλύτερη δομή). Στο pH=5 αποδιατάσσονται οι αλυσίδες και εμφανίζονται τα πολυμερή σαν ελεύθερες αλυσίδες και το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή έχει μεγαλύτερο  $R_h$

Από τα ανωτέρω εξάγεται ως συμπέρασμα ότι η αρχιτεκτονική του μακροαπαρχητή παίζει σημαντικό ρόλο στην αυτοοργάνωση των πολυμερισωμάτων.

Στη συνέχεια, γίνονται μετρήσεις DLS για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή στο οποίο έχει εγκλωβιστεί το αντικαρκινικό φάρμακο Everolimus. Οι μετρήσεις γίνονται με φιλτράρισμα ώστε να είναι συγκρίσιμες με τα DLS του ίδιου πολυμερούς χωρίς τον εγκλωβισμό του φαρμάκου.

**Πίνακας 8: Μετρήσεις DLS για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=7.4 και T=37°C.**

angle	Int	pdi	Contin rh	Wp%
45°	826.517	0.44	1)194 2)39.7	1)6.97% 2)34.17%
90°	961.775	0.35	1)683.4 2)17.94	1)83,31% 2)15.77%
135°	1007.138	0.32	1)31.55 2)117.5	1)54.89% 2)43.49

Παρατηρείται ότι το  $R_h$  του πολυμερούς με τον εγκλωβισμό του φαρμάκου είναι μεγαλύτερος σε σχέση με το  $R_h$  του πολυμερούς χωρίς τον εγκλωβισμό του φαρμάκου. Αυτό δείχνει ότι έγινε με επιτυχία ο εγκλωβισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου στο πολυμερές αυτό και για αυτό το πολυμερές αυτό έχει μεγαλύτερες διαστάσεις

## 6.2 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Στατικής Σκέδασης

Οι μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός πραγματοποιούνται με το ίδιο όργανο του DLS σε γωνιακό εύρος  $30^\circ$ - $150^\circ$  λαμβάνοντας μέτρηση ανά 10 μοίρες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό του φαινόμενου μοριακού βάρους και του γυροσκοπικού λόγου γίνεται με τη χρήση της προσέγγισης Guinier  $2^{ns}$  τάξης η οποία είναι μια πολυωνυμική εξίσωση από την οποία βρίσκουμε το  $R_g/R_h$ . Πραγματοποιούνται μετρήσεις σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυμερούς οι οποίες προκύπτουν με αραιώση ενός αρχικού διαλύματος υψηλότερης συγκέντρωσης. Όλα τα διαλύματα διηθούνται με υδρόφιλο φίλτρο πορώδους  $0,45\mu m$  πριν τη μέτρηση. Η μέθοδος αυτή καθορίζει τη δομή των πολυμερών.

Στο pH 7.4 και 6.5 γίνεται φιλτράρισμα ενώ για το pH 5 δε γίνεται φιλτράρισμα γιατί τα σωματίδια είναι πολύ μεγάλα και δε γίνεται με τις υπάρχουσες θεωρίες να γίνει σωστό fitting ώστε να βγει συμπέρασμα. Τα μόρια δεν μπορούν να αυτοοργανωθούν γιατί μπαίνει διαλύτης μέσα στο σωματίδιο και έτσι χαλάει η δομή τους. Γι'αυτό και ο λόγος  $R_g/R_h$  είναι πολύ μικρός σύμφωνα με τις μετρήσεις που γίνονται με φιλτράρισμα. Με λίγα λόγια, δε βγαίνει συμπέρασμα για τη δομή τους.

**Πίνακας 9: Μετρήσεις SLS για πολυμερές με διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=6.5, 7.4, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C.**

PH	T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
7.4	25 °C	Guinier $2^{ns}$ τάξης	97.2	96.147	1.01
	37 °C	Guinier $2^{ns}$ τάξης	99.32	78.784	1.26
	40 °C	Guinier $2^{ns}$ τάξης	98.86	75.443	1.31
	45 °C	Guinier $2^{ns}$ τάξης	98.33	68.628	1.43

PH	T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
6.5	25 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	101.7	123.743	0.82
	37 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	100.4	85.367	1.17
	40 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	100.5	81.910	1.22
	45 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	101.2	78.9	1.28

PH	T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
5	25 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	182.8	598.190	0.30
	37 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	192.3	1169.5	0.16
	40 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	197.4	673.035	0.29
	45 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	201.9	599.669	0.33



**Πίνακας 10: Μετρήσεις SLS για το πολυμερές με μακροαπαρχητή γραμμικό σε pH=6.5, 7.4, 5.0 και T= 25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C.**

<b>PH</b>	<b>T</b>	<b>Εξίσωση</b>	<b>Rg</b>	<b>Rh</b>	<b>Rg/Rh</b>
<b>7.4</b>	25 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	87	114.490	0.759
	37 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	82.19	73.491	1.118
	40 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	78.39	65.114	1.203
	45 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	78.47	62.308	1.259

<b>PH</b>	<b>T</b>	<b>Εξίσωση</b>	<b>Rg</b>	<b>Rh</b>	<b>Rg/Rh</b>
<b>6.5</b>	25 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	155.3	182.019	0.853
	37 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	114.2	181.760	0.628
	40 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	112.1	116.280	0.96
	45 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	113.1	105.458	1.072

<b>PH</b>	<b>T</b>	<b>Εξίσωση</b>	<b>Rg</b>	<b>Rh</b>	<b>Rg/Rh</b>
<b>5</b>	25 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	258.9	841.479	0.307
	37 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	213.1	420.693	0.506
	40 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	204.6	378.834	0.540
	45 °C	Guinier 2 <sup>ης</sup> τάξης	197.9	428.536	0.461

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τη στατική σκέδαση και για τα δυο πολυμερή και συγκρίνοντας το λόγο Rg/Rh με τη βιβλιογραφία (Κεφάλαιο 3.3) το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή σχηματίζει μικκύλια ενώ το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σχηματίζει κυστίδια κάτι που συνάδει με τις παρατηρήσεις του DLS.

Επίσης, γίνονται και μετρήσεις SLS για το πολυμερές στο οποίο έγινε ο εγκλωβισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου Everolimus.

**Πίνακας 11: Μετρήσεις SLS για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε PH=7.4 και T=37°C.**

<b>PH=7.4</b>	<b>T=37°C</b>	<b>Guinier 2<sup>ης</sup> τάξης</b>	<b>R<sub>g</sub>=128,2</b>	<b>R<sub>h</sub>=125,078</b>	<b>R<sub>g</sub>/R<sub>h</sub>=1,024</b>
---------------	---------------	-------------------------------------	----------------------------	------------------------------	--

Σύμφωνα με τις παραπάνω μετρήσεις παρατηρείται ότι στο πολυμερές αυτό στο οποίο έγινε ο εγκλωβισμός του φαρμάκου συνεχίζει να σχηματίζει κυστίδια .

### 6.3 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική του ζ-Δυναμικού

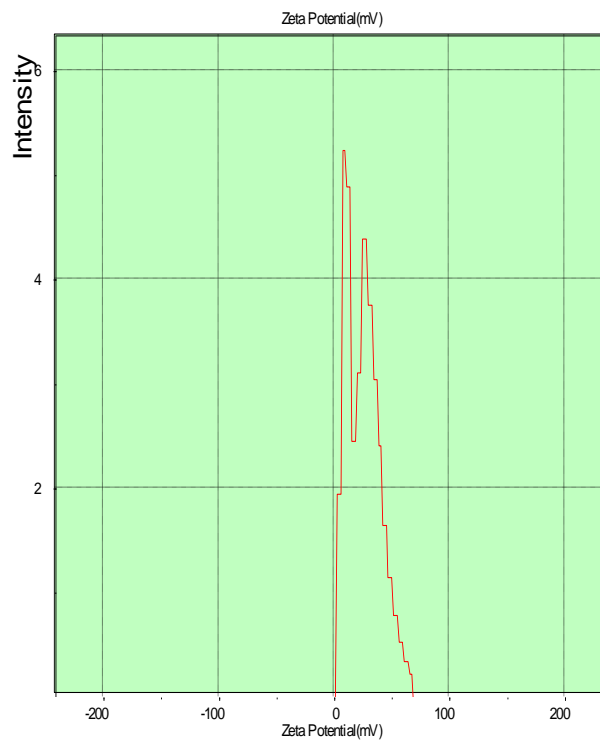
Το ζ-δυναμικό γίνεται με σκοπό να παρατηρηθεί ποια συστάδα βρίσκεται στο εξωτερικό των πολυμερισμάτων. Με λίγα λόγια, το z-δυναμικό αφορά το επιφανειακό φορτίο που έχει το πολυμερές.

Αρχικά, ζυγίζονται 1,5 mg του triblock PEO-*b*-(His-co-PBLG)-*b*-PLL και τοποθετούνται σε ένα μπουκαλάκι. Το ίδιο γίνεται και για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή όπου στη συνέχεια, προστίθενται 1ml milliQ ώστε να διαλυτοποιηθούν. Οι μετρήσεις του z-δυναμικού γίνονται σε pH=7,4 και T=25°C. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι μετρήσεις των πολυμερών αυτών γίνονται χωρίς φιλτράρισμα, αφού η τεχνική αυτή μετράει σε γωνία 135° και σε αυτή τη γωνία σκεδάζουν τα μικρά σωματίδια οπότε είτε γίνει με φιλτράρισμα είτε όχι είναι το ίδιο πράγμα αφού και πάλι θα σκεδάζουν τα μικρά.

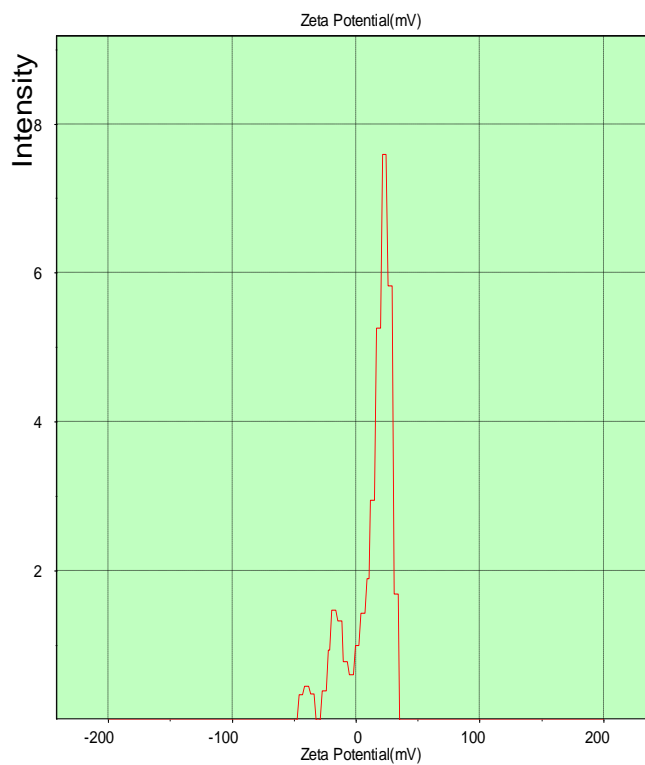
Πίνακας 12: Μετρήσεις του z-δυναμικού σε pH= 7.4 και T=25°C με διαλύτη H<sub>2</sub>O.

SAMPLE	ZETA-POTENTIALVALUE
15K linear at 25°C without filtration	28.5 +/- 7.4
15K branched at 25°C without filtration	16.7 +/- 0.7

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του z-δυναμικού παρατηρείται ότι στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή που σχηματίζει κυστίδια η τιμή του z-Δυναμικού είναι πιο κοντά στα 0 mV σε σχέση με το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή και αυτό δείχνει ότι το PEO βρίσκεται στην εξωτερική συστάδα αυτών των πολυμερισμάτων. Άρα, η αρχιτεκτονική του μακροαπαρχητή παίζει καθοριστικό ρόλο στην αυτοοργάνωση των πολυμερισμάτων.



**Εικόνα 36: Γράφημα προσδιορισμού του Z-Δυναμικού σε (mV) για το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή**

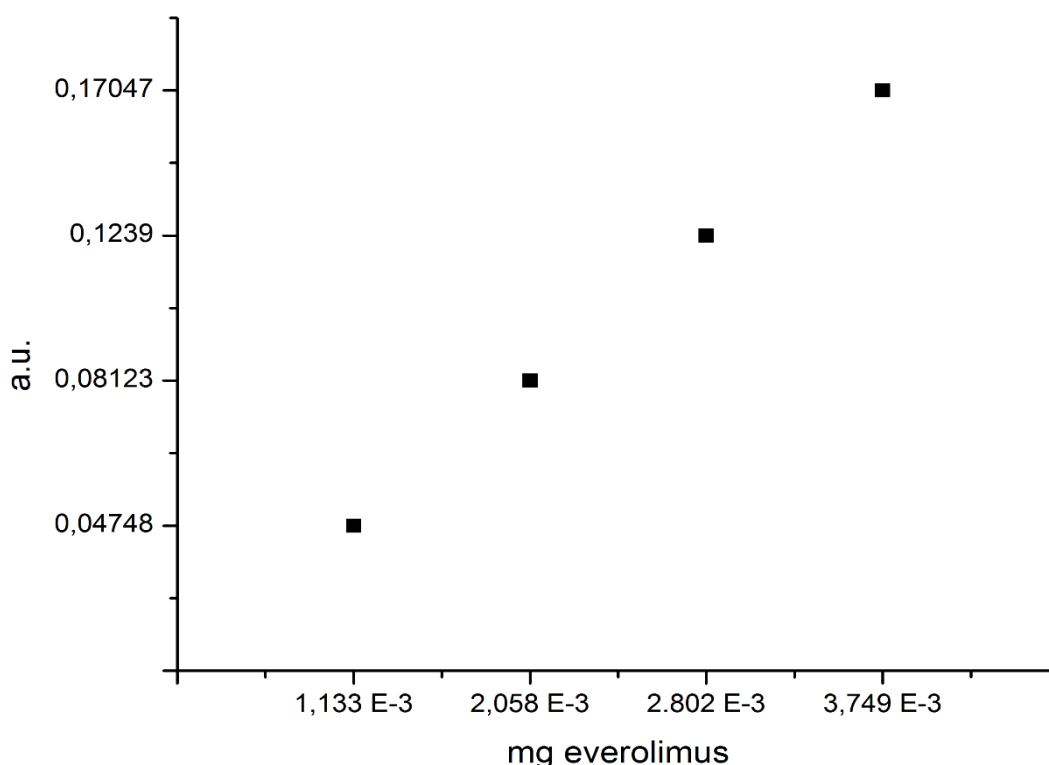


**Εικόνα 37: Γράφημα προσδιορισμού του Z-Δυναμικού σε (mV) για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή.**

#### 6.4 Μελέτη αποδέσμευσης του Everolimus

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται ποσοτική ανάλυση του αντικαρκινικού φαρμάκου Everolimus με το pH και το χρόνο. Αρχικά, περνιούνται πρότυπα δείγματα (10, 20, 30, 40μL) στο GPC του DMF ώστε, να υπολογιστεί η καμπύλη βαθμονόμησης από την οποία βρίσκεται η εξίσωση  $y=ax+b$  όπου, στο  $y$  τοποθετούνται οι τιμές της απορρόφησης του φαρμάκου από το UV και λύνοντας προς  $x$  υπολογίζονται τα mg του φαρμάκου της ένεσης. Το  $a$  υποδηλώνει την κλίση της ευθείας και το  $b$  είναι η το σημείο τομής με τον άξονα  $y$ .

Intercept	Intercept	Slope	Slope	Statistics
Value	Standard Error	Value	Standard Error	Adj. R-Square
<b>-0,19359</b>	0,1576	<b>26,05196</b>	1,7546	0,99097



Εικόνα 38: Καμπύλη βαθμονόμησης των προτύπων δειγμάτων.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η ανάλυση του τυφλού για τον υπολογισμό του ποσοστού δέσμευσης του φαρμάκου μέσα στα κυστίδια ώστε, να προσδιοριστούν τα

ποσοστά loading efficiency και loading capacity, γίνεται από την κατασκευή της αντίστοιχης καμπύλης βαθμονόμησης βάσει των χρωματογραφημάτων των προτύπων δειγμάτων. Τα παρακάτω ποσοστά αναφέρονται για τον εγκλωβισμό του φαρμάκου. Συνεπώς:

$$\text{loading efficiency} = \frac{\text{mg everolimus που δεσμεύτηκαν}}{\text{mg everolimus που χρησιμοποιήθηκαν}} = 83,3\%$$

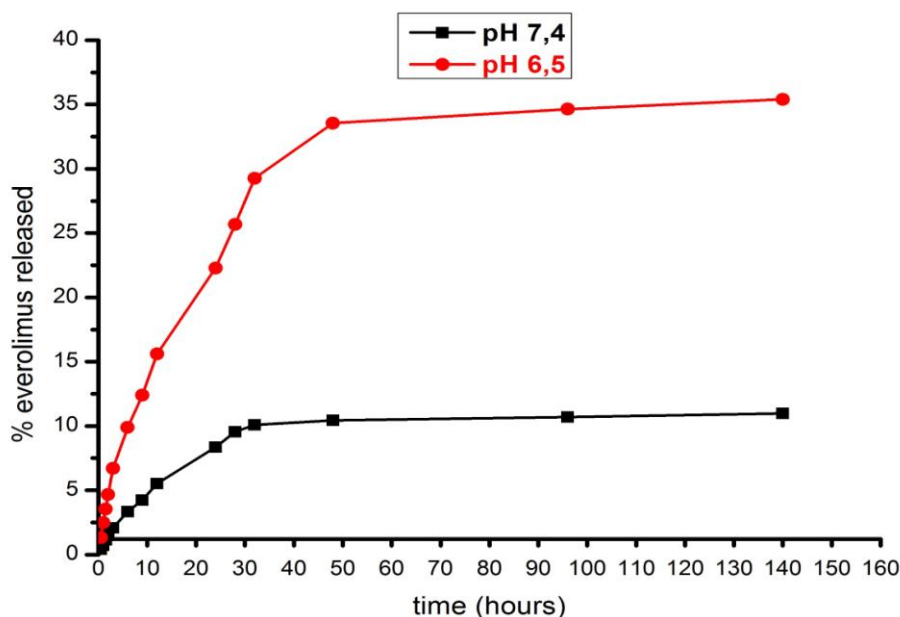
$$\text{loading capacity} = \frac{\text{mg everolimus που δεσμεύτηκαν}}{\text{mg πολυμερούς που χρησιμοποιήθηκαν}} = 11,1\%$$

Στη συνέχεια, για τον υπολογισμό του φαρμάκου στα δείγματα τα οποία συλλέγονται σε vial σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και για pH=6.5 και pH=7.4 γίνονται εκχυλίσεις και περνιούνται με ένεση στο GPC του DMF για να παρατηρηθεί πόσο φάρμακο αποδεσμεύεται σε αυτούς τους χρόνους. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται διαχωριστική χοάνη όπου γίνονται εκχυλίσεις με 2 ml χλωροφορμίου ώστε να διαχωριστεί η οργανική (χλωροφόρμιο+ φάρμακο) με την ανόργανη φάση. Συλλέγεται η οργανική φάση σε vial και με ένεση των 250 mL περνιέται στο GPC του DMF όπου ο ανιχνευτής του UV ανιχνεύει το Everolimus σε μήκος κύματος(λ)= 279,4nm και υπολογίζεται το ύψος της απορρόφησης του φαρμάκου όπου μέσω της εξίσωσης  $y=ax+b$  βρίσκεται πόσα mg φαρμάκου υπάρχουν μέσα στην ένεση. Το ίδιο συμβαίνει και για το τυφλό όπου στη συνέχεια, γίνεται αναγωγή του ποσού του φαρμάκου σε κάθε pH ως προς το τυφλό.



Εικόνα 39: Δείγματα κατά τη διάρκεια της απελευθέρωσης του φαρμάκου με το χρόνο σε διαφορετικά pH (6.5, 7.4)

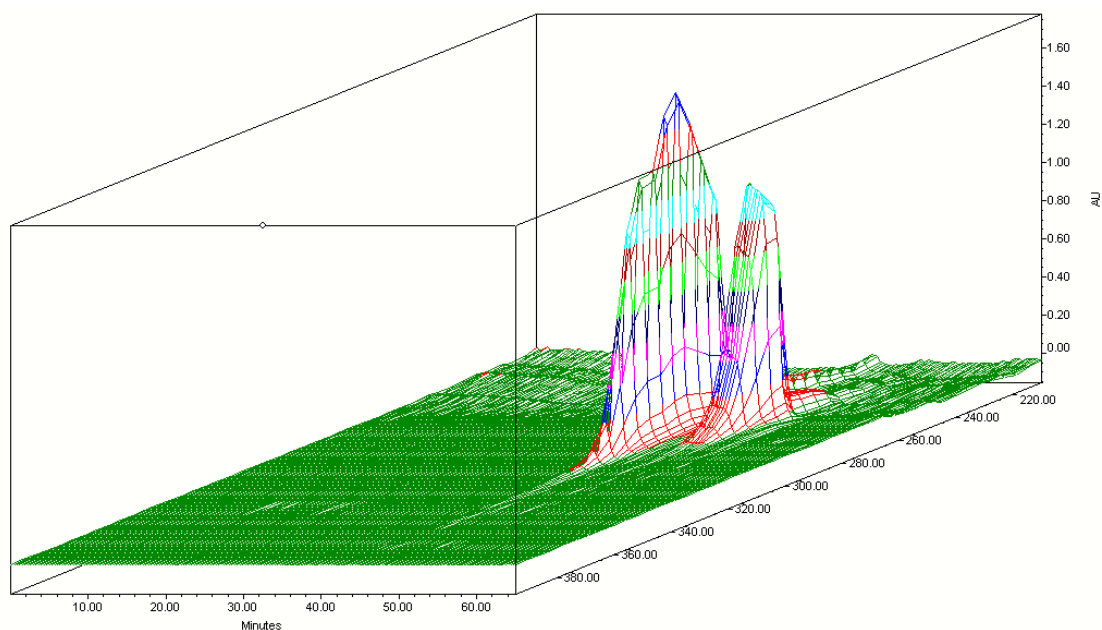
Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται το ποσοστό του φαρμάκου το οποίο απελευθερώνεται σε συνάρτηση με το χρόνο.



**Εικόνα 40:** Γραφική παράσταση του ποσοστού απελευθέρωσης του φαρμάκου Everolimus ως προς το χρόνο σε pH= 6.5 και 7.4.

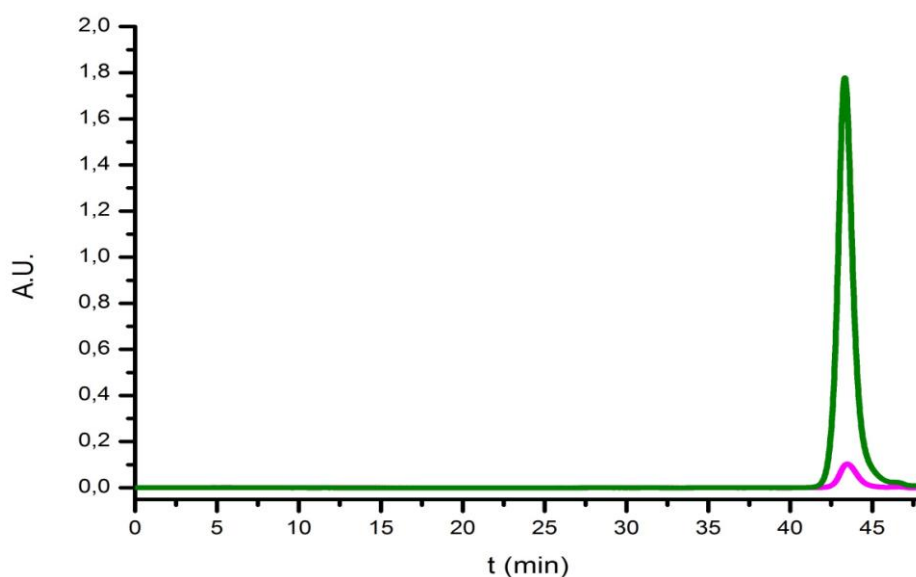
Από την παραπάνω γραφική παράσταση παρατηρείται ότι στο pH= 6,5 απελευθερώνεται περισσότερο φάρμακο σε σχέση με το pH=7,4 και στη συνέχεια, πιάνει πλατό όπου και συνεχίζεται η αργή αποδέσμευση για ένα χρονικό διάστημα (αποδέσμευση 35%). Από την άλλη στο pH=7.4 στην αρχή γίνεται γρήγορη αποδέσμευση αλλά όταν πιάσει πλατό φαίνεται ότι το κυστίδιο κρατάει το φάρμακο.(αποδέσμευση 10%)

Παρακάτω απεικονίζεται μια 3D εικόνα του δείγματος του φαρμάκου με χλωροφόρμιο το οποίο περάστηκε στο GPC του DMF και απεικονίζει το ύψος της καμπύλης της απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο και τον RI.



**Εικόνα 41: 3D απεικόνιση δείγματος φαρμάκου με χλωροφόρμιο σε σχέση με το χρόνο και με τους ανιχνευτές RI και UV.**

Από την παραπάνω 3D απεικόνιση του δείγματος φαρμάκου με χλωροφόρμιο παρατηρείται η απεικόνιση της καμπύλης του φαρμάκου (1<sup>η</sup> καμπύλη σε  $t=43\text{min}$ ) και του χλωροφορμίου (δεύτερη καμπύλη).



**Εικόνα 42: Φάσμα του φαρμάκου ως προς το χρόνο με δυο δείγματα οποία έχουν διαφορετική ποσότητα φαρμάκου.**



Από το παραπάνω φάσμα παρατηρείται ότι όσο μεγαλύτερη είναι η δόση του φαρμάκου τόσο υψηλότερα βγαίνει η κορυφή του φαρμάκου.

## 6.5 Συμπεράσματα – Μελλοντικοί Στόχοι

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση δυο αμφίφιλων υβριδικών τρισυσταδικών τετραπολυμερών του τύπου PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL με μοναδική διαφορά τη μακρομοριακή αρχιτεκτονική του PEO: Στο ένα το PEO ήταν γραμμικό, ενώ στο άλλο ήταν διακλαδισμένο, με δύο κλάδους και ίδιο συνολικό μοριακό βάρος με το γραμμικό. με σκοπό να παρατηρηθεί αν η επίδραση της αρχιτεκτονικής του PEO επηρεάζει την αυτοοργάνωση των πολυμερών τα οποία θα μπορούν να έρθουν και να αποδεσμεύουν εκλεκτικά στους πάσχοντες ιστούς αντικαρκινικά φάρμακα. Πρώτος στόχος ήταν η σύνθεση των μονομερών, όπως της ιστιδίνης με χρήση της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας, η οποία και δίνει ιδιαίτερα πλεονεκτήματα, του  $\gamma$ -Bz-L-Glutamate και της λυσίνης, τα οποία ελέγχθηκαν με τις τεχνικές IR και NMR. Ακολούθως, έγιναν με επιτυχία οι πολυμερισμοί και στη συνέχεια, η σύνθεση όλων των πολυμερών επιβεβαιώθηκαν με χρήση μεθόδων μοριακού χαρακτηρισμού IR, NMR και GPC.

Στη συνέχεια, με τη μέθοδο του DLS παρατηρήθηκε η αυτοοργάνωση των πολυμερών αυτών όπου σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η επίτευξη μικκυλιακών και κυστιδιακών δομών από τα πολυμερή που συντέθηκαν στη παρούσα ερευνητική εργασία. Όλες οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων έγιναν σε γωνίες 45°, 90°, 135°, για να ελεγχθεί η ύπαρξη γωνιακής εξάρτησης σε θερμοκρασίες 25°C(θερμοκρασία δωματίου), 37°C(θερμοκρασία ανθρώπινου σώματος), 40°C(θερμοκρασία φλεγμονής), 45°C για να παρατηρηθεί τυχόν απόκριση στη μεταβολή θερμοκρασίας και σε pH 7.4(pH υγιούς κυττάρου), 6.5(pH γύρω από το καρκινικό κύτταρο), 5.0(pH καρκινικού κυττάρου) για να παρατηρηθεί τυχόν απόκριση στο pH. Με τη μέθοδο του SLS παρατηρήθηκαν οι δομές των πολυμερών. Οι δομές που επιτεύχθηκαν ήταν μικκύλια για το γραμμικό μακροαπαρχητή και κυστίδια για το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή.

Δεύτερος στόχος ήταν το πολυαιθυλενοξειδίο, λόγω των ιδιοτήτων του να βρίσκεται στην εξωτερική συστάδα του πολυμεροσώματος (κυστιδίου) πράγμα το οποίο

αποδείχτηκε με τη μέθοδο του ζ-δυναμικού και με την τεχνική TEM παρατηρήθηκε η μορφολογία των πολυμερών αυτών.

Επόμενος στόχος ήταν ο εγκλωβισμός του φαρμάκου Everolimus στα πολυμεροσώματα που σχημάτιζαν δομές κυστιδίου (πολυμερές με διακλαδισμένο μακροαπαρχητή) όπου έγινε με επιτυχία όπως φάνηκε από τις μετρήσεις του DLS και του SLS. Τελευταίος στόχος ήταν η μελέτη αποδέσμευσης του φαρμάκου από τα πολυμεροσώματα σε διαφορετικά pH= 6.5 και 7.5 σε σχέση με το χρόνο το οποίο, επιτεύχθηκε με τη χρήση του GPC του DMF.

Μελλοντικοί στόχοι αφορούν τη σύνθεση πολυμερούς με διακλαδισμένο πολυαιθυλενοξειδίου (μακροαπαρχητής) με 3 κλάδους με σκοπό να παρατηρηθεί η αυτοοργάνωση και η δομή των πολυμερών με διαφορετική αρχιτεκτονική του μακροαπαρχητή αφού, αποδείχθηκε ότι το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή είχε σημαντικές διαφορές σε σχέση με το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή το οποίο, αποδεικνύει ότι η αρχιτεκτονική του μακροαπαρχητή παίζει καθοριστικό ρόλο στην αυτοοργάνωση των πολυμερών. Ένας άλλος στόχος αφορά τη σύνθεση πολυμερών με μόρια στόχους τα οποία θα μπορούν να προσδεθούν στοχευμένα στα καρκινικά κύτταρα καθώς και ο εγκλωβισμός του αντικαρκινικού υδρόφοβου φαρμάκου στα πολυμερή πιο συγκεκριμένα στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή καθώς και τη μελέτη της ελεγχόμενης αποδέσμευσης του σε πειραματόζωα. Τέλος ένας άλλος σημαντικός στόχος θα ήταν να γίνουν μετρήσεις για την αποδέσμευση του φαρμάκου σε pH=5 σε σχέση με το χρόνο.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Ring opening Polymerization	Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου
Targeted (Smart) Drug Delivery	Τεχνολογία Στοχευμένης (έξυπνης) μεταφοράς φαρμάκων
Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση φωτός
Static Light Scattering	Στατική Σκέδαση φωτός
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
Gel Permeation Chromatography	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών
TEM	Transmission Electron Microscope
z-potential	z-Δυναμικό
Amphiphilic Block Copolymers	Αμφίφιλα Κατά Συστάδες Συμπολυμερή
Critical Micelle Concentration	Κρίσιμη Μικκυλιακή Συγκέντρωση
Glove box	Χώρος αποθήκευσης χημικού και βιολογικού υλικού σε αδρανή ατμόσφαιρα όπου οι χειρισμοί γίνονται με την βοήθεια γαντιών προσαρμοσμένων σε υάλινο διάφραγμα
Flame Drying	Ξήρανση συσκευής στη γραμμή κενού για απομάκρυνση υγρασίας με χρήση φλόγας από πυρσό(ανόπτηση)
Brake seal	Υάλινος υμένας αμπούλας
Breaker	Μαγνήτης πακτωμένος μέσα σε κλειστή

	υάλινη ράβδος για σπάσιμο break seal
Dialysis	Διαπίδυση
Freeze Drying	Λυοφιλοποίηση
Adaptor	Προσαρμογέας-Συνδετήρας
Constriction	Στένωση

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

### Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

NCA	N-Καρβοξυανιδρύτης α-αμινοξέων
PEO	Πολυαιθυλενοξειδίο
PHis	Πολυιστιδίνη
PBLG	πολυ(γ-βενζυλο-d7 L-γλουταμινικό οξύ)
PLL	πολυ-L-λυσίνη
R.O.P	Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου
NAM	Normal Amine Mechanism
AMM	Active Monomer Mechanism
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
EtAc	Οξικός Μεθυλεστέρας
DCC	Δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
TFA	Τριφθορικό οξύ
Βένζυλο	Προστατευτική ομάδα του βενζυλεστέρα
DNP	2,4-δινιτροφθοροβένζυλο προστατευτική ομάδα
Trt	Τρίτυλο Προστατευτική Ομάδα
tris	τρεις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο
Et3N	Τριαιθυλαμίνη
mTOR	Στόχος της Ραπαμυκίνης στα Θηλαστικά
GPC	Gel Permeation Chromatography
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
IR	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία
DLS	Dynamic Light Scattering
SLS	Static Light Scattering
z-potential	z-Δυναμικό
TEM	Transmission Electron Microscope
PDI	Polydispersity Index
Rg	Γυροσκοπική Ακτίνα
Rh	Υδροδυναμική ακτίνα

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Χαρακτηρισμός πολυμερών που συντέθηκαν

Η σύνθεση τόσο των μονομερών όσο και των πολυμερών ελέγχεται τόσο με φασματοσκοπία υπερύθρου(IR), χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών(SEC) όσο και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού(NMR).

Οι μετρήσεις φασματοσκοπία υπερύθρου(IR) με σκοπό το χαρακτηρισμό και την καθαρότητα των πολυμερών πραγματοποιείται σε μηχάνημα Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR, με την τεχνική διαπερατότητας μέσω διασποράς σε KBr. Τα δισκία προήλθαν κατά την κονιορτοποίηση 0.2g KBr με 1mg της προς εξέταση ουσίας, με εφαρμογή πίεσης μερικών τόνων ανά  $\text{cm}^2$ .

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας όργανο αποτελούμενο από αντλία της Waters μοντέλο 510 και ανιχνευτές διαφορικού διαθλασιμέτρου της Waters μοντέλο 401 και διοδική διάταξη UV-Vis. Η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται στο 1 mL/min και ως φέροντας διαλύτης χρησιμοποιείται το νερό.

Οι μετρήσεις της φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$  γίνεται σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (DMSO). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε συσκευή Varian Unity Plus 300/54.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η επίτευξη μικκυλιακών και κυστιδιακών δομών από τα πολυμερή που συνθέτονται στη παρούσα ερευνητική εργασία συνεπώς αυτοοργάνωση τους ελέγχονται με τη δυναμική σκέδαση φωτός(DLS). Οι μετρήσεις των πολυμερών πραγματοποιούνται στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών σε συνεργασία με τον κ.Πίσπα ο οποίος μας διαθέτει το όργανο ALV/CGS-3 Compact Goniometer System (ALV GmbH, Germany), εξοπλισμένο με λέιζερ JDS Uniphase 22mW He-Ne, που λειτουργεί στα 632,8 nm, συνδεδεμένο με έναν ψηφιακό συσχετιστή 288 καναλιών ALV-5000/EPP multi-tau και μία ηλεκτρονική μονάδα σκέδασης φωτός ALV/LSE-5003 για έλεγχο της σταδιακής κίνησης του γωνιομέτρου και έλεγχο του διακόπτη ακραίας θέσης. Για την μέτρηση των δειγμάτων χρησιμοποιείται κατάλληλη κυψελίδα την οποία πλένεται με νερό και ακετόνη μετά από κάθε μέτρηση και στεγνώνεται με ροή αέρα πριν

την μέτρηση του κάθε δείγματος. Όλες οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων γίνονται σε γωνίες 45°, 90°, 135°, για να ελεγχθεί η ύπαρξη γωνιακής εξάρτησης σε θερμοκρασίες 25°C(θερμοκρασία δωματίου), 37°C(θερμοκρασία ανθρώπινου σώματος), 40°C(θερμοκρασία φλεγμονής), 45°C για να παρατηρηθεί τυχόν απόκριση στη μεταβολή θερμοκρασίας και σε pH 7.4(pH υγιούς κυττάρου), 6.5(pH γύρω από το καρκινικό κύτταρο), 5.0(pH καρκινικού κυττάρου) για να παρατηρηθεί τυχόν απόκριση στο pH. Οι συναρτήσεις συσχέτισης καταγράφονται πέντε φορές και αναλύονται με τη μέθοδο αθροισμάτων και τον αλγόριθμο CONTIN, ο οποίος παρέχει τις κατανομές για την φαινόμενη υδροδυναμική ακτίνα με χρήση αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης με τη βοήθεια της σχέσης Stokes – Einstein.

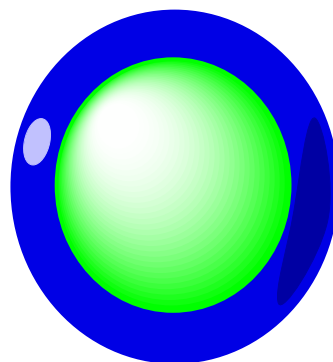
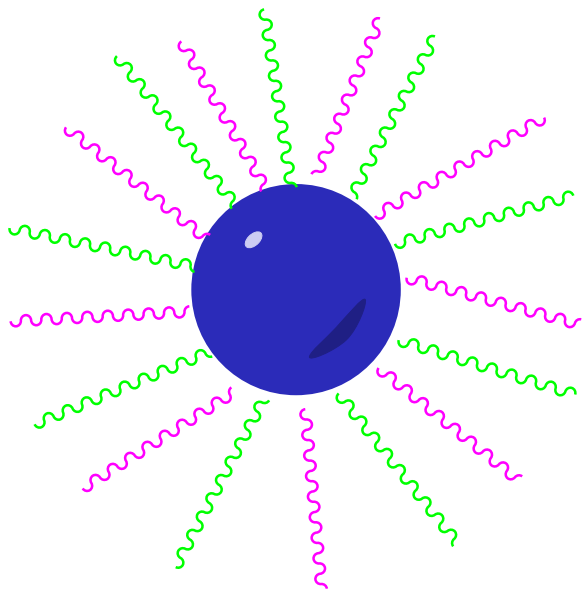
Οι μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός πραγματοποιούνται με το ίδιο όργανο σε γωνιακό εύρος 30°-150° λαμβάνοντας μέτρηση ανά 10 μοίρες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό του φαινόμενου μοριακού βάρους και του γυροσκοπικού λόγου γίνονται με τη χρήση της προσέγγισης Guinier 2<sup>ης</sup> τάξης. Γίνονται μετρήσεις σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυμερούς οι οποίες προκύπτουν με αραίωση ενός αρχικού διαλύματος υψηλότερης συγκέντρωσης. Όλα τα διαλύματα διηθούνται με υδρόφιλο φίλτρο πορώδους 0,45μm πριν τη μέτρηση. Η μέθοδος αυτή καθορίζει τη δομή των πολυμερών.

Η μορφολογία των πολυμερών ελέγχεται και με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διαπερατότητας(TEM).

Ακολουθούν μετρήσεις του ζ-δυναμικού των πολυμερών οι οποίες πραγματοποιούνται σε συνεργασία με τον καθηγητή Κ. Δεμέτζο του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών(Μοντέλο: Zetasizer Particle Size and Zeta Potential Analyser 3000 HS) για να επιβεβαιωθεί ότι στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή το PEO είναι η εξωτερική συστάδα των κυστιδίων ενώ στο πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή που είναι μικκύλιο περιμένουμε στην εξωτερική συστάδα[2] να είναι ανακατεμένες οι υδρόφιλες αλυσίδες (PEO, PLL).



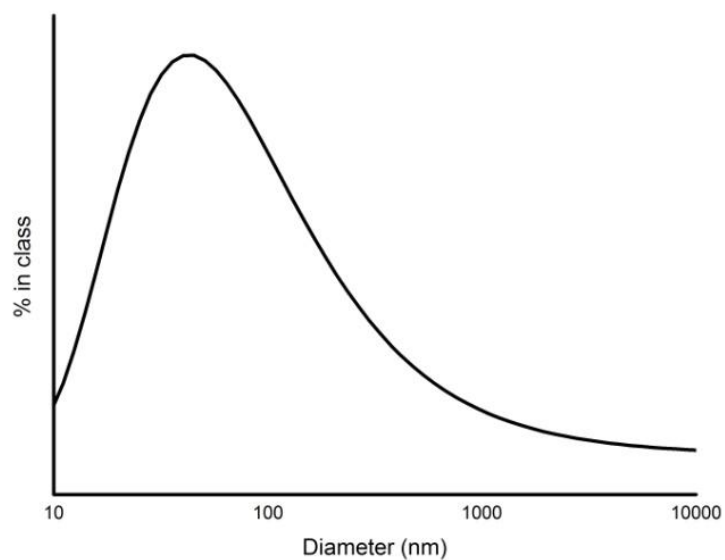
PEO-b(His-co-PBLG)-b-PLL



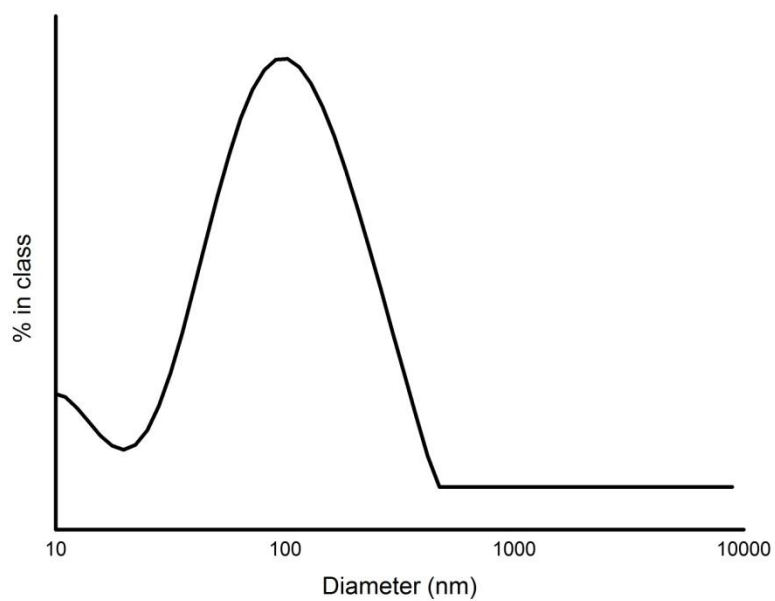
PEO



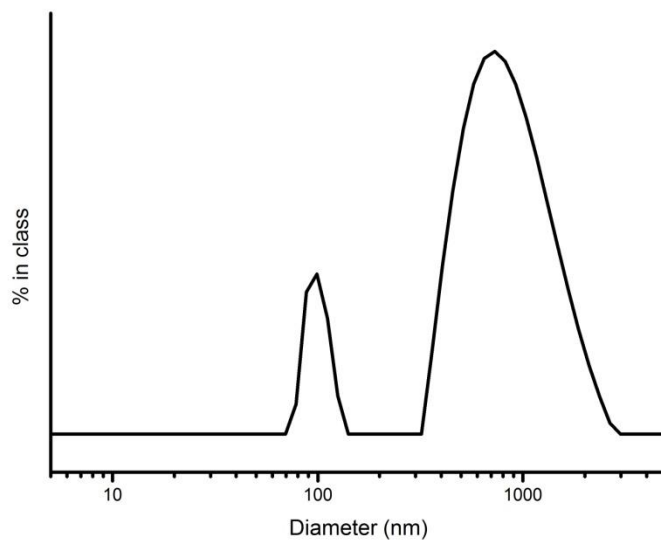
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ



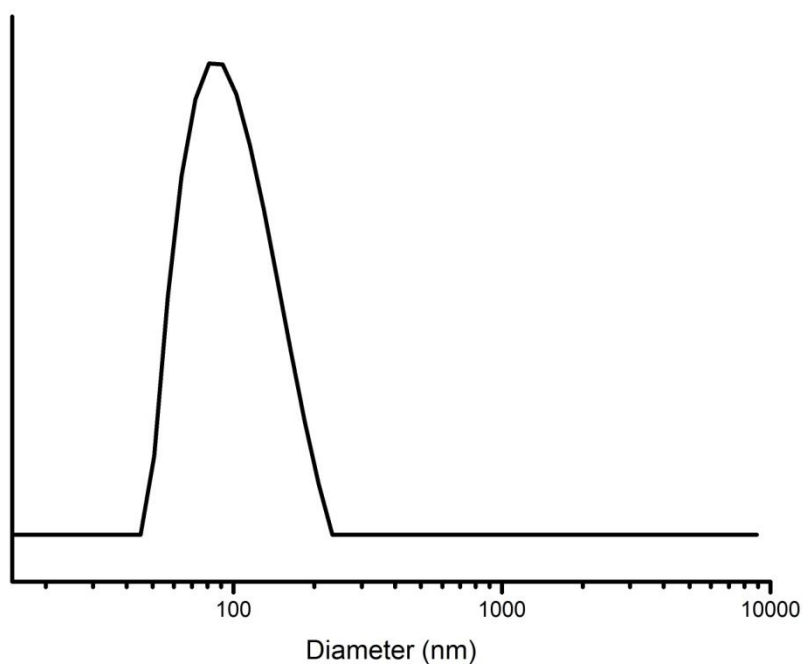
Εικόνα 43: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή σε  $\text{pH}=7.4$  και  $T=37^{\circ}\text{C}$  στις  $90^{\circ}$  (με φιλτράρισμα).



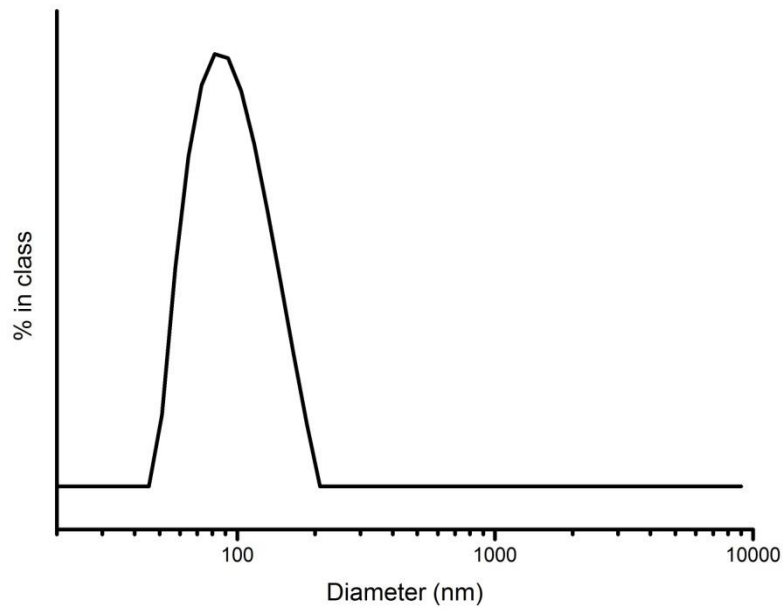
Εικόνα 44: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή σε  $\text{pH}=6.5$  και  $T=37^{\circ}$  στις  $90^{\circ}$  (με φιλτράρισμα).



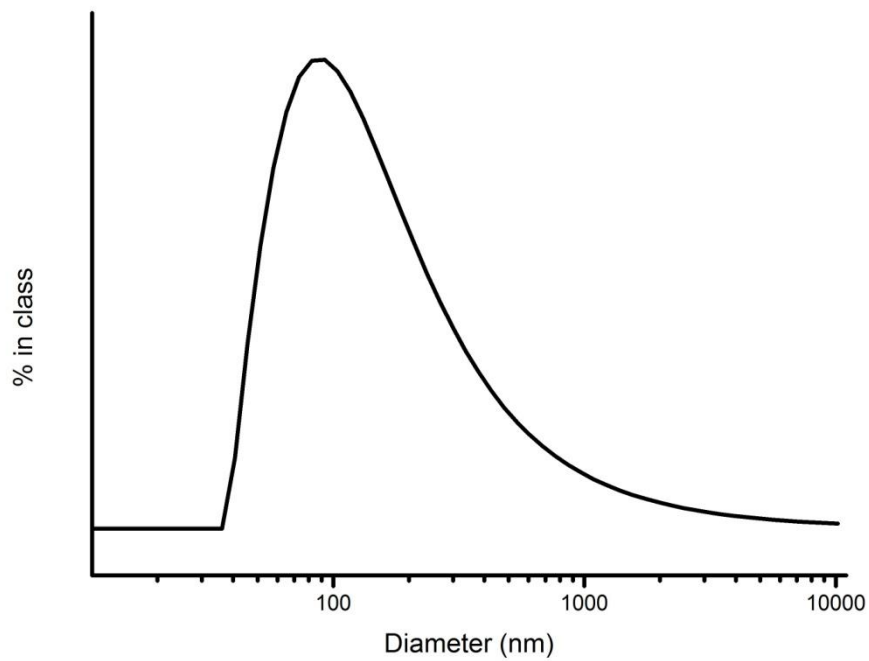
**Εικόνα 45: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή σε pH=5 και T=25°C στις 90°(χωρίς φιλτράρισμα).**



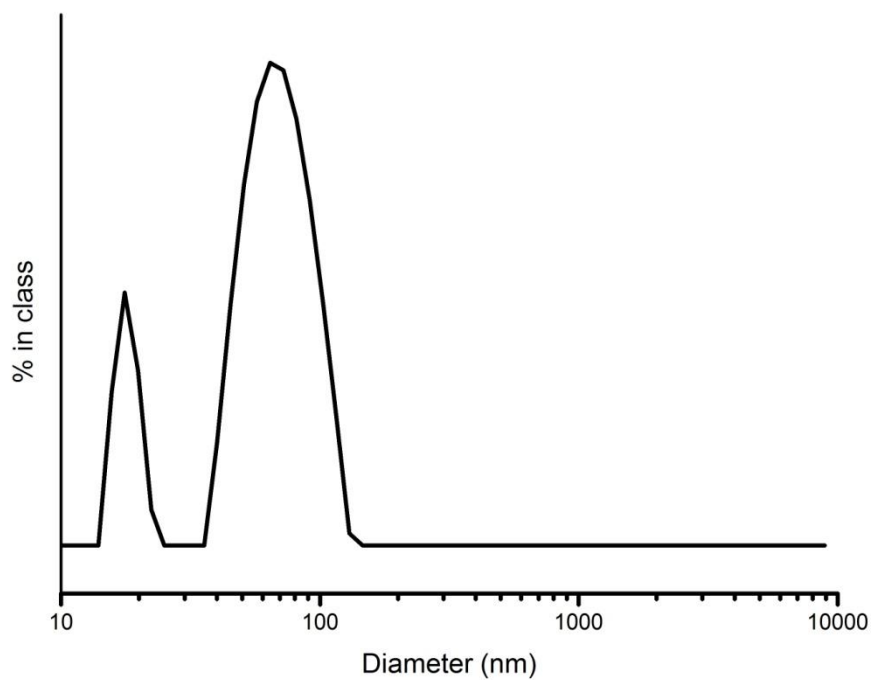
**Εικόνα 46: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=7.4 και T=37°C στις 90°(με φιλτράρισμα).**



**Εικόνα 47: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το διακλαδωρισμένο μακροαπαρχητή σε pH=6.5 και T=40°C στις 90°(με φιλτράρισμα).**



**Εικόνα 48: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε pH=5 και T=45°C στις 90° (χωρίς φιλτράρισμα).**



**Εικόνα 49: Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) στο πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή σε  $T=37^{\circ}\text{C}$  με εγκλωβισμό του φαρμάκου Everolimus (με φιλτράρισμα).**

## Αναφορές

1. Κ. Παναγιώτου, Επιστήμη και τεχνολογία των πολυμερών, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλονίκης, Τόμος Ι, 3<sup>η</sup> έκδοση, 2000.
2. G. Floudas, H.W. Spiess, Self-assembly and dynamics of polypeptides. *Macromol. Rapid Communications*, 2009, 30, pp.278-298.
3. J. Rodriguez-Hernandez, S. Lecommandoux, Reversible inside-out micellization of pH-responsive and water-soluble vesicles based on polypeptide diblock copolymers, *J Am Chem Soc*, 2005, 127, pp.2026-2027.
4. F. Checot, J. Rodriguez-Hernandez, Y. Gnanou, S. Lecommandoux, pH-responsive micelles and vesicles nanocapsules based on polypeptide diblock copolymers, *Biomol Eng*, 2007, 24, pp.81-85.
5. H. Iatrou, H. Frielinghaus, S. Hanski, N. Ferderigos, J. Ruokolainen, O. Ikkala, D. Richter, J. Mays, N. Hadjichristidis, Architecturally induced multiresponsive vesicles from well-defined polypeptides: formation of gene vehicles, *Biomacromolecules*, 2007, 8, pp.2173-2181.
6. T.J. Deming, Methodologies for preparation of synthetic block copolypeptides: materials with future promise in drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54, pp.1145-1155.
7. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, New York, Volume I, 5<sup>η</sup> Edition, 2002.
8. C.I. Branden, *Introduction to Protein Structure*, U.Kingdom, Volume I, 2<sup>η</sup> Edition, 1999.
9. J. Mc Murry, Βιομόρια: αμινοξέα, πεπτιδία και πρωτεΐνες, Εκδόσεις Κρήτης, Τόμος ΙΙ, 2<sup>η</sup> Έκδοση, 2008.
10. E. Gammon, Βιολογικά μόρια, Εκδόσεις Πάτρας, Τόμος Ι, 6<sup>η</sup> Έκδοση, 2008.
11. G. Goldstein, M. Scheid, U. Hammerling, D.H. Schlesinger, H.D. Niall, E.A. Boyse, Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72, pp.11-15.

12. W. Zhang, R.A. Laursen, Structure-function relationships in a type I antifreeze polypeptide. The role of threonine methyl and hydroxyl groups in antifreeze activity, *J Biol Chem*, 1998, 273, pp.34806-34812.
13. R.S. Norton, Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel, *Toxicon*, 1991, 29, pp. 1051-1084.
14. J.N. Cha, G.D. Stucky, D.E. Morse, T.J. Deming, Biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolypeptides, *Nature*, 2000, 403, pp.289-292.
15. J.C. van Hest, D.A. Tirrell, Protein-based materials, toward a new level of structural control, *Chem Commun (Camb)*, 2001, 17, pp.1897-1904.
16. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, J. Roberts and J. Watson, *Molecular Biology of The Cell*, New York, Volume II, 2<sup>η</sup> Έκδοση, 1989.
17. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W.H. Freeman and Co, New York, Volume II, 2<sup>η</sup> Edition, 2002.
18. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, Synthesis of well-defined polypeptide-based materials via the ring-opening polymerization of alpha-amino acid N-carboxyanhydrides, *Chem Rev*, 2009, 109, pp.5528-5578.
19. D.J. Barlow, J.M. Thornton, Helix geometry in proteins, *J Mol Biol*, 1988, 201, pp.601-619.
20. E.T. Harper, G.D. Rose, Helix stop signals in proteins and peptides: the capping box, *Biochemistry*, 1993, 32, pp.7605-7609.
21. P. Papadopoulos, G. Floudas, H.A. Klok, I. Schnell, T. Pakula, Self-assembly and dynamics of poly(gamma-benzyl-L-glutamate) peptides, *Biomacromolecules*, 2004, 4, pp.81-91.
22. T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, Cells, 1993, 73, pp.1031-1040.
23. Π. Κατινάκης, *Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Αθηνών, Τόμος Ι, 2<sup>η</sup> Έκδοση, 2004, pp.69-78.
24. M.I. Monastyrsky, *Topology in Molecular Biology*, New York, Volume I, 1<sup>η</sup> Έκδοση, 2006.

25. G.D. Rose, L.M. Gierasch, J.A. Smith, Turns in peptides and proteins, *Adv Protein Chem*, 1985, 37, pp.1-109.
26. P.Y. Chou, G.D. Fasman, Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins, *Biochemistry*, 1974, 13, pp.211-222.
27. B. Merrifield, Solid phase synthesis, *Science*, 1986, 232, pp.341-347.
28. H.R. Marsden, J.W. Handgraaf, F. Nudelman, N.A. Sommerdijk, A. Kros, Uniting polypeptides with sequence-designed peptides: synthesis and assembly of poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)- $\beta$ -coiled-coil peptide copolymers, *J Am Chem Soc*, 2010, 132, pp.2370-2377.
29. R.P. Quirk, B. Lee, Experimental Criteria for Living Polymerizations, *Polymer international*, 1992, 27, pp.359-367.
30. T. Deming, *Peptide-Based Materials*, Springer Berlin Heidelberg, Volume I, 1<sup>st</sup> Edition, 2012.
31. M.I. Gibson, C.A. Barker, S.G. Spain, L. Albertin, N.R. Cameron, Inhibition of ice crystal growth by synthetic glycopolymers: implications for the rational design of antifreeze glycoprotein mimics, *Biomacromolecules*, 2009, 10, pp.328-333.
32. H.J. Block, In Vitro Sensitivity of Routine Hospital Pathogenic Bacteria to a Group of Commonly Used Antibiotics, *Can Med Assoc J*, 1961, 85, pp.269.
33. E. Peggion, E. Scoffone, A. Cosani, A. Portolan, Polymerization of  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate N-carboxyanhydride: effects of conditions of polymer precipitation on the molecular weight distribution, *Biopolymers*, 1966, 4, pp.695-704.
34. Y. Imanishi, A. Aoyama, Y. Hashimoto, T. Higashimura, Polymerization of N-carboxyanhydrides of various  $\alpha$ -amino acids using secondary amines as initiator, *Biopolymers*, 1977, 16, pp.187-197.
35. D.G. Ballard, C.H Bamford and F.J Weymouth, New Observations on the Chemistry of N-Carboxy- $\alpha$ -Amino-Acid Anhydrides, *Nature*, 1954, 174, pp.173-175.
36. D.J. Ballard, C. H.Bamford, F.j. Weymouth, Reactions of N-Carboxy- $\alpha$ -Acid Anhydrides Initiated by Metal Cations, *Proc.R.Soc*, 1955, 227, pp.155-183.

37. D.Thunig, J. Semen and H.G. Elias, Carbon Dioxide influence on NCA polymerizations, *Macromol.Chem*, 1977, 178, pp.603-607.
38. D.J. Ballard, C. H.Bamford, The polymerization of  $\alpha$ -Benzyl-L-Glutamate N-Carboxy Anhydride, *J.Am. Chem.Soc*, 1957, 79, pp.2336-2338.
39. F.Z Wessely, Untersuchungen  $\alpha$ -Amino-N-Carbonsaureanhydride.I,*Physiol.Chem.*, 1925, 146, pp.72.
40. F. Sigmund, F.Z Wessely, Untersuchungen  $\alpha$ -Amino-N-Carbonsaureanhydride.II, *Physiol.Chem.*, 1926, 157, pp.91.
41. F. Sigmund, F.Z Wessely, Untersuchungen  $\alpha$ -Amino-N-Carbonsaureanhydride.III, *Physiol.Chem.*, 1926, 159, pp.102.
42. F. Sigmund, M.Z. John, Untersuchungen  $\alpha$ -Amino-N-Carbonsaureanhydride.IV, *Physiol.Chem.*,1927, 170, pp.38.
43. F. Sigmund, K .Riedl, K.Z. Tuppy, Untersuchungen  $\alpha$ -Amino-N-Carbonsaureanhydride, *Monatsh.Chem.*,1950, 81, pp.861.
44. D. Bartlett, H.J. Jones, *Am.Chem. Soc.*,1957, 79, pp.2153.
45. D. Bartlett, C.J. Dittmer, *Am. Chem. Soc.*,1957, 79, pp.2159.
46. E.R. Bloutand, M. Idelson, A Kinetic Study of the Polymerization of Aminoacid N-Carboxyanhydrides Initiated by Strong Bases, *J.Am. Chem.Soc.*, 1958, 80, pp.2387-2393.
47. H.G. Ballard, H.C. Bamford, Additional comments of the amine-initiated polymerization, *J.Am Chem. Soc.*,1956, 79 ,pp.2338.
48. M. Szwarc, The kinetics and Mechanism of N-carboxy- $\alpha$ -amino-acid Anhydride (NCA) Polymerisation to Poly-amino Acids, *Adv.Polym.Sci*, 1965, 4, pp.1-65.
49. C. Bamford, H. Block, The polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid N-Carbonic Anhydrides in Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins, Stahmann, M.A, Ed, *Wisconsin University Press:Madison, WI*, 1962, 80, pp.70-71.
50. J.L. Bailey, A New Peptide Synthesis, *Nature*, 1949, 164, pp.889-899.
51. D. Mavrogiorgis, P. Bilalis, A. Karatzas, D. Skoulas, G. Fotinopogiannopoulou, H. Iatrou, Controlled polymerization of histidine and synthesis of well-defined stimuli responsive polymers. Elucidation of the structure-aggregation relationship of this highly multifunctional material, *Polym.Chem*, 2014, 5, pp.6256.



52. A. Patchornik, A. Berger, E. Katchalski, Poly-L-Histidine, JACS, 1957, 79, pp.5227-5230.
53. E.S. Lee, H.J. Shin, K. Na, Y.H. Bae, Poly(L-histidine)-PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization, Journal of Controlled Release, 2003, 90, pp.363-374.
54. G.M. Kim, Y.H. Bae, W.H. Jo, Ph-induced Micelle Formation of Poly-(histidine-co-phenylalanine)-block-Poly(ethylene glycol) in Aqueous Media, Macromolecular Bioscience, 2005, 5, pp.1118-1124.
55. E.S. Lee, K.T. Oh, D. Kim, Y.S. Youn, Y.H. Bae, Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(L-lactic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(L-histidine), Journal of Controlled Release, 2007, 123, pp.19-26.
56. N.H. Shin, J.K. Lee, H. Li, C.S. Ha, Y.A. Shchipunov, I. Kim, Synthesis of Poly(methyl methacrylate)-Block-Poly(L-histidine) and its use as a Hybrid Silver Nanoparticle Conjugate, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2010, 10, pp.1-6.
57. H. Yin, H.C. Kang, K.M. Huh, Y.H. Bae, Biocompatible, pH-sensitive AB<sub>2</sub> miktoarm polymer-based polymersomes: preparation, characterization and acidic pH-activated nanostructural transformation, J. Mater. Chem, 2012, 22, pp.19168.
58. W. Park, D. Kim, H.C. Kang, Y.H. Bae, K. Na, Multi-arm histidine copolymer for controlled release of insulin from poly(lactide-co-glycolide) microsphere, Biomaterials, 2012, 33, pp.8848-8857.
59. R.P. Johnson, Y. Il Jeong, J.V. John, C.W. Chung, D.H. Kang, M. Selvaraj, H. Suh, I. Kim, Dual Stimuli-Responsive Poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(L-histidine) Chimeric Materials for the Controlled Delivery of Doxorubicin into Liver Carcinoma, Biomacromolecules, 2013, 14, pp.1434-1443.
60. L. Qiu, Z. Li, M. Qiao, M. Long, M. Wang, X. Zhang, C. Tian, D. Chen, Self-assembled pH-Responsive Hyaluronic Acid-g-poly(L-histidine) Copolymer Micelles for Targeted Intracellular Delivery of Doxorubicin, Acta Biomaterialia, 2014, 10, pp.2024-35.
61. X. Zhang, D. Chen, S. Ba, J. Chang, J. Zhou, H. Zhao, J. Zhu, X. Zhao, H. Hu, M. Qiao, Poly(L-histidine) based copolymers: effect of the chemically substituted L-

- histidine on the physio-chemical properties of the micelles and in vivo biodistribution, *Colloids Surf B. Biointerfaces*, 2015, 140, pp.176-84.
62. M. Bodansky, Πεπτιδοχημεία, Springer-Verlag, Τόμος Ι, 2<sup>η</sup> έκδοση, 1994.
  63. M. Bergman, L. Zervas, The world of Peptides:A brief history of peptide chemistry, Sping-Verlag, 1932, 65, pp.1192-1201.
  64. L.A. Carpino, G.Y.J. Han, Protecting groups, Volume I, 3<sup>η</sup> Edition, 2005.
  65. Y. Feng, K. Noda, Y. Saad, X. Liou, A. Husain, S.S. Karnik, *Biol.Chem*, 1995, 270, pp.12846.
  66. R.R Smeby, S. Fermandjian, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, New York, Volume 1, 1<sup>η</sup> Edition, 1978.
  67. L. Zervas, J.M. Theodoropoulos, N-Tritylamino acids and peptides.A new method of peptide synthesis, *Journal of the American Chem.Soc.*, 1956, 78, pp.1359-1363.
  68. M.C. Roco, Nanoparticles and nanotechnology research, *Journal of nanoparticles research* ,1999, 1, pp.1-6.
  69. J. Shi, A.R Votruba, O.C. Farokhzad and R.Langer, Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications, *Nanoletters*, 2010, 10, pp.3223-3230.
  70. C. Pinto Reis, R.J. Neufeld, A.J.Ribeiro, F.Veiga, NanoencapsulationI, Methods for preparation of drug–loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine*, 2006, 5, pp.8-21.
  71. L. Illum, Nanoparticulate systemsfor nasal delivery of drugs:a real improvement oversimple systems.,Volume 96, 1<sup>η</sup> Edition, 2007.
  72. Yie.W. Chien, Concepts and System Design for Rate-Controlled Drug Delivery, *Novel Drug Delivery Systems*,Nigeria, 2<sup>η</sup> Edition, 1992.
  73. C. Simo, A.Cifuentes, A. Gallardo, Drug delivery systems: polymers and drugs monitored by capillary electromigration methods, *Journal of Chromotography B*, 2003, 797, pp.37-49.
  74. Ν. Μπουρόπουλος, Προηγμένα Βιολικά Ελεγχόμενη αποδεσμευση φαρμάκων, Πανεπιστήμιο Πατρών ,Τόμος Ι, 1<sup>η</sup> Έκδοση, 2004, pp.5-7.

75. L. Brannon –Peppas, Polymers in controlled Drug Delivery, Medical Plastics and Biomaterials Magazine, 1997.
76. K.K. Jain, Methods in Molecular Biology Drug Delivery Systems, U. Kingdom, Volume 437, 3<sup>rd</sup> Edition 2008.
77. B. Lidman, H. Wennerstrom, Topics in Current Chemistry-Micelles, New York, Volume 26, 1<sup>st</sup> Edition, 1980.
78. K. Miyata, R.J. Christie, K.kataoka, Polymeric micelles for nano-drug delivery, Adv Polym Sci, 2010, 71, pp.227-234.
79. J.F. Gohy, Block copolymer micelles, Adv Polym Sci, 2005, 190, pp.65-136.
80. H. Iatrou, H. Frielinghaus, S. Hanski, N. Ferderikos, J. Ruokolainen, O. Ikkala, D. Richter, J. Mays, N. Hadjichristidis, Architecturally induced multiresponsive vesicles from well-defined polypeptides: formation of gene vehicles, Biomacromolecules, 2007, 8, pp 2173-81.
81. A.D Bangham, M.M Standish ,J.C. Watkins, J.Mol.Biol, 1965, 13, pp.238
82. F. Checot, A. Brylet, J. Oberdisse, Y.Gnanou, S. Lecommandoux, Structure of Polypeptide Based Diblock copolymers in Solution: Stimuli-responsive vesicles and micelles, Langmuir, 2005, 21, pp.4308-4315.
83. A. Moradi-Araghi, D.H Beardmore, G.A Stahl, In the water soluble Polymers for Petroleum Recovery,New York, 1988, 85, pp.299-312.
84. P. Alexandridis, T. A. Hatton, Poly(ethylene oxide), poly(propylene oxide) poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, Colloids Surf. A, 1995, 96, pp.1-46.
85. C.L .McCormick, T. Nonaka, C.B. Johnson, Water-soluble copolymers.Synthesis and aqueous solution behaviour of associative acrylamideN-alkylacrylamide copolymers,Polymer, 1988, 29, pp.731-739.
86. C. Price, Development in Block Copolymers, USA, Volume 6, 3<sup>rd</sup> Edition 1985.
87. P.Gupta, K. Vermani, S.Garg, Hydrogels:fromcontrolled releaseto pH-responsive drug delivery, Drug Discov Today, 2002, 7, pp.569–79.
88. B.Jeong, A.Gutowska, Lessons from nature:stimuli –responsive polymers and their biomedical applications, Trends Biotechnol, 2002, 20, pp.305–11.

89. M.A.C. Stuart, W.T.S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G.B. Sukhorukov, I. Szleifer, V.V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov, S. Minko, Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials, *Nature Materials*, 2010, 9, pp.101-113.
90. K. Al-Tahami, J. Singh, Smart polymer based delivery systems for peptides and proteins, *Recent. Pat. Drug Deliv. Formul.*, 2007, 1, pp.65-71.
91. A. Mahajan, G. Aggarwal, Smart polymers: innovations in novel drug delivery, *Int.J. Drug Dev&Res.*, 2011, 3, pp.16-30.
92. B. Jeong, A. Gutowska, Stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, *Trends Biotechnol.*, 2002, 20, pp.305-310.
93. V. Pinkrah, M. Snowden, J. Mitchell, J. Seidel, B. Chowdhry, G. Fern, Physicochemical properties of poly (N-isopropylacrilamide-co-4-vinylpyridine) cationic polyelectrolyte colloidal microgels, *Langmuir*, 2003, 19, pp.585–590.
94. H. Gan, Y.Y Gan, G.R Deen, Poly( N-acryloyl-N-propylpiperazine):A new Stimuli-Responsive-Polymer, *Macromolecules*, 2000, 33, pp.7893–7897.
95. T. Peng, Y.L Cheng, PNIPAm and PMAA co-grafted porous PE membranes: living radical co-grafting mechanism and multi-stimuli responsive permeability, *Polymer*, 2001, 42, pp.2091–2100.
96. A.K. Bajpai, S.K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, Responsive polymers in controlled drug delivery, *Polymer Science*, 2008, 33, pp.1088-1118.
97. S.R. Macewan, D.J Callahan, A. Chilkoti, Stimulus-responsive macromolecules and nanoparticles for cancer drug delivery, *Nanomedicine U.K*, 2010, 5, pp.793-806.
98. B. Jeong, A. Gutowska, Lessons from Nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, *Trends Biotechnol*, 2002, 20, pp.305-310.
99. S.S. Kulkarni, N.H. Aloorkar., Smart polymers in drug delivery:an overview, *J. Pharm.Res*, 2010, 3, pp.100-108.
100. M.W Urban, *Handbook of Stimuli-responsive permeability*, Wiley, Volume V, 1<sup>st</sup> Edition, 2011.

101. S.T. Grainger, MEH. EL-Sayed, Biologically-responsive hybrid biomaterials: a reference for material scientists and bioengineers, S.Carolina. USA, Volume I, 1<sup>st</sup> Edition, 2010.
102. J. You, D. Almeda, G.J.C. Ye, D.T. Auguste, Bioresponsive matrices in drug delivery, Biological Engineering, 2010, 4, pp.1-12.
103. A. Kumar, Smart polymeric biomaterials: where chemistry & biology can merge, Polymers, 2011, 4, pp.9-18.
104. P. Bawa, V. Pillay, Y.E. Choonara, L.C. Toit, Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery, Biomed.Mater., 2009, 1, pp.1-15.
105. M.A. Hillmyer, F.S. Bates, K. Almdal, K.Mortensen, A.J. Ryan, J.P. Fairclough, Complex Phase Behavior in Solvent-Free Nonionic Surfactants, Science, 1996, 271, pp.976.
106. J.M. Harris, Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly(Ethylene Glycol), Poly(ethylene glycol) Chemistry:Biotechnical and Biomedical Applications,New York, Volume I, 1<sup>st</sup> Edition, 1992, pp.1-14.
107. M.J. Roberts, M.D. Bentley, J.M Harris, Chemistry for peptide and protein PEGylation, Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64, pp.116-127.
108. F.E. Bailey, J.V. Koleske, Alkylene Oxides and Their Polymers, New York, Volume V, 3<sup>rd</sup> Edition, 1976.
109. R. Mahou, C. Wandrey, Versatile route to synthesize heterobifunctional poly(ethylene glycol) of variable functionality for subsequent pegylation, Polymers, 2012, 4, pp.561-589.
110. Y. Kim, Y Nagasaki, K. Kataoka, M. Kato, M.Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, Nanotechnology in Drug Delivery, Polym.Bull, 1994, 60, pp.33.
111. H. Iatrou, K. Dimas, M. Gkikas, C. Tsimblouli, S.Sofianopoulou, Polymersomes from Polypeptide Containing Triblock Co-and Terpolymers for Drug Delivery against Pancreatic Cancer: Asymmetry of the External Hydrophilic Blocks, Macromolecular Bioscience, 2014, 14, pp.1222-1238.
112. G. Lapienis, Star –shaped polymers having PEO arms, Polymer Science, 2009, 34, pp.852-892.

113. D. Mavrogiorgis, P. Bilaqlis, A. Karatzas, D. Skoulas, G. Fotinogiannopoulou, H. Iatrou, Controlled polymerization of histidine and synthesis of well- defined stimuli responsive polymers. Elucidation of the structure-aggregation relationship of this highly multifunctional material, *Polymer Chemistry*, 2014, 5, pp.6256-6278.
114. J.C. Yao, M.H. Shah, T. Ito, C.L. Bohas, E.M. Wolin, E.V. Cutsem et al., Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors, *N.Engl. J.Med*, 2011, 364, pp. 514-523.
115. J.C. Yao, A.T. Phan, V. Jehl, G.Shah, F.M-Bemstam, Everolimus in Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors:The Clinical Experience, *Cancer Research*, 2013, 73, 1449.
116. Y.Kawashima, H.Ishikawa, T.Hisaka, K. Okuda, Y. Akagi, 'Treatment Strategy for Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors(P-NETs) at Kurume University Hospital', *Polymer Science*, 2016, 43, pp.107-110.
117. J.C. Moore, Gel Permeation Chromatography .I. A New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers, *Journal of Polymer Science: Part A:Polymer Chemistry*, 1964, 2, pp. 835-843.
118. O. Fuchs, Nb. Colthup, Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, *Zeitschrift Fur Analytische Chemie Fresenius, Science*, 1967, 228, pp.42-44.
119. B.Chu, *Laser Light Scattering :Basic Principles andPractice*, USA, Volume 1, 2<sup>n</sup> Edition, 1991.
120. R.Pecora, *Dynamic light scattering:Applications of photon correlation spectroscopy*, USA, Volume 1, 2<sup>n</sup> Edition, 1985.
121. R.J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*, USA, Volume 1, 2<sup>n</sup> Edition, 1981
122. J.B. Grutzner, *NMR-Spectroscopy, a Practical Introduction to Molecular Orbital Theory*, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 1977, 174, pp.43.
123. D.J Mendez-Vilas, *Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy of Mollicutes: Challenges and Opportunities*, *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 2007, 1, pp.122-131.

124. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, A. Pispas, M. Pitsikalis, Anionic Polymerization: High Vacuum Techniques, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2000, 38, pp.3211-3224.
125. D. Uhrig, J. Mays, Experimental Techniques in High Vacuum Anionic Polymerization, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 2005, 43, pp.6179-6222.
126. J. Riddick and W. Bunger, *Organic Solvents: Physical Properties and Methods of Purification*, New York, Volume II, 3<sup>rd</sup> Edition, 1970.
127. Δ. Σκουλάς, Σύνθεση συμπολυμερών Πολυαιθυλενοξειδίου και Ιστιδίνης με γ-βενζυλεστέρα του γλουταμικού οξέος και επίδραση του εστέρα στο pKa της πολυιστιδίνης, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Αθήνα, 2014.
128. Σ. Βάρλας, Εγκλωβισμός Φαρμάκων σε Πολυπεπτίδια, Πτυχιακή Εργασία, Αθήνα, 2014.