



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση δικτυωμένων μικκυλίων πολυιστιδίνης-
πολυαιθυλενοξειδίου**

**ΚΙΑΦΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2015

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση δικτυωμένων μικκυλίων πολυιστιδίνης-πολυαιθυλενοξειδίου

ΚΙΑΦΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

A.M.: 131004

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος

Καθηγητής

Πιτσικάλης Μαρίνος

Καθηγητής

Σακελλαρίου Γεώργιος

Επίκουρος Καθηγητής

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

26/6/2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός καινοτόμων δικτυωμένων μικκυλίων (nanogel), διπλά αποκρινόμενων: σε pH και αναγωγικά μέσα. Τα nanogel αποτελούνται από πυρήνα δικτυωμένης με δισουλφιδικούς δεσμούς, πολυ-(L-ιστιδίνης) , (PHis), και κέλυφος πολυαιθυλενοξειδίου (PEO). Ο πολυμερισμός έγινε σε ένα βήμα, μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου. Ως απαρχητής για τον πολυμερισμό, χρησιμοποιήθηκε ο μακροαπαρχητής αμινοτελικό-πολυαιθυλενοξειδίου (PEO-NH₂), πολυαιθυλενοξειδίου με μια ακραία αμινική ομάδα. Ως μέσο δικτύωσης, χρησιμοποιήθηκε ο N-καρβοξυανυδρίτης (NCA) της κυστίνης. Συντέθηκαν τρία πολυμερή με τρία διαφορετικά ποσοστά δικτύωσης: 35%, 12% και 7%. Για τη σύνθεση των μονομερών N-καρβοξυανυδριτών των αμινοξέων, των καθαρισμό των διαλυτών αλλά και για τους πολυμερισμούς, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού, εξασφαλίζοντας απόλυτη καθαρότητα στο σύστημα, από προσμίξεις που θα οδηγούσαν σε μη ελεγχόμενο πολυμερισμό. Στη συνέχεια ακολούθησε χαρακτηρισμός των προϊόντων. Με φασματοσκοπία IR, NMR και TEM ταυτοποιήθηκαν οι δομές τους. Μελετήθηκε το μέγεθος των δικτυωμένων μικκυλίων, αλλά και η απόκριση τους στην αλλαγές του pH από 7.4 σε 6.5 και 5.0, όπως επίσης και στην προσθήκη αναγωγικού και συγκεκριμένα γλουταθειόνης (GSH), με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός. Η δευτεροταγής δομή τους και η συμπεριφορά της στις αλλαγές του pH μελετήθηκε με χρήση καμπυλών κυκλικού διχρωϊσμού. Τέλος, επιχειρήθηκε με επιτυχία, η σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού, με αναγωγή του άλατος του χρυσού (HAuCl₄ 3H₂O), σε στοιχειακό χρυσό. Το ρόλο του αναγωγικού παράγοντα έπαιξε η πολυ(ιστιδίνη). Η συμπεριφορά των συστημάτων συνολικά, μετά την έκθεση σε όλους αυτούς τους παράγοντες, είναι τέτοια που τα καθιστά υποψήφια για ένα νέο σύστημα στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Δικτυωμένα μικκύλια, Δισουλφιδικοί δεσμοί, N-καρβοξυανυδρίτες, διπλά αποκρινόμενα

ABSTRACT

In this survey is presented the synthesis and characterization of novel crosslinked micelles (nanogels), which are double responsive: pH and redox responsive. These nanogels consisted of a disulfide crosslinked poly(L-histidine) (PHIS) core and poly(ethylene oxide) (PEO) corona. The polymerization was conducted in one step, through Ring Opening Polymerization (ROP). Methoxy poly(ethylene glycol) amine was used as the macro-initiator for the ring opening copolymerization of Trt-HIS N-carboxy anhydride (Trt-HIS NCA) and Cystine N-carboxy anhydride (Cys NCA). Cystine N-carboxy anhydride (Cys NCA) was also used as a crosslinker. Three polymers were synthesized, with different ratios of cystine: 35%, 12%, 7%. High vacuum techniques were used for the purifications of the reactants, solvents, and for the synthesis of NCA's and polymers, and it had as a result well-defined crosslinked micelles. This was followed by characterization of the products. Their structures were identified by IR, NMR, TEM microscopy. DLS revealed the dimensions of the crosslinked micelles, and their behavior as the pH was changing from 7.4 to 6.5 and 5.0. With DLS was also revealed the responsiveness of the nanogels to the presence of a reducing agent, such as glutathione (GSH). The structure of the system were confirmed via circular dichroism. Finally, poly(Histidine) of the nanogels, was used as a reducing agent of the (HAuCl₄ 3H₂O) in order it to form gold nanoparticles. These results enable the nanogel as a very promising candidate for a new drug delivery system.

Subject area: Polymers

Keywords: Nanogels, Crosslinked micelles, Disulfide Bonds, N-carboxyanhydrides, Dual responsive

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ερμόλαο Ιατρού, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την καθοδήγηση, και την πολύτιμη συμβολή του, στη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας.

Ξεχωριστά, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Παναγιώτη Μπιλάλη, για τη συνεργασία μας σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αλλά και για την άρτια επιστημονική στήριξη, τις γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές του εργαστηρίου, κ. 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, που με βοήθησαν να καταλάβω καλύτερα και σε μεγαλύτερο βάθος το αντικείμενο της Επιστήμης των Πολυμερών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου από το εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας, για τη συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	17
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	25
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	28
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ι.....	28
2.1 Τα πεπτίδια και οι δομικές τους μονάδες	28
2.1.1 Τα 20 φυσικά αμινοξέα	28
2.1.2 Δομή των πεπτιδίων.....	33
2.2 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους και με καθορισμένη αλληλουχία.....	36
2.3 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους.....	37
2.3.1 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (ROP) των N-καβόξυαμινοξέων των α-αμινοξέων.	38
2.3.2 Κανονικός Μηχανισμός Αμινών [Normal Amine Mechanism (NAM)].	38
2.3.3 Ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς [Active Monomer Mechanism (AMM)].	43
2.3.4 Σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης βασισμένα στο Co και το Ni.....	44
2.3.5 Πρωτοταγείς αμίνες και τεχνικές υψηλού κενού.....	46
2.4 Σύνθεση N- καρβοξυαμινοξέων (NCAs).....	48
2.5 Προστασία της α- αμινομάδας των NCAs.	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	52
ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (DRUG DELIVERY)	52

3.1 Νανοτεχνολογία	52
3.1.1 Τι είναι η νανοτεχνολογία.....	52
3.1.2 Βιο-Εφαρμογές της Νανοτεχνολογίας.....	53
3.2 Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων	54
3.2.1 Εισαγωγή	54
3.2.2 Πολυπεπτίδια σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων	56
3.2.2.1 Συστήματα Πολυπεπτιδίων που αποκρίνονται σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες	56
3.2.2.2 Θερμο- αποκρινόμενα συστήματα πολυπεπτιδίων	57
3.2.2.3 pH-αποκρινόμενα συστήματα πολυπεπτιδίων	57
3.2.2.4 Φωτο-αποκρινόμενα συστήματα πολυπεπτιδίων	58
3.3 Δικτυωμένα πολυμερικά νανοσωματίδια (Nanogels)	59
3.4 Nanogels αποκρινόμενα σε ερεθίσματα.....	59
3.4.1 pH-αποκρινόμενα	59
3.4.2 Θερμο-αποκρινόμενα	61
3.4.3 Φωτο-αποκρινόμενα.....	62
3.4.4 Αποκρινόμενα σε μαγνητικό πεδίο	63
3.4.5 Αποκρινόμενα στην αναγνώριση βιομορίων.....	64
3.4.6 Αποκρινόμενα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες	66
3.4.7 Πολλαπλά αποκρινόμενα	66
3.5 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία	67
3.5.1 Πολυαιθυλενοξειδίο (PEO ή PEG).....	68
3.5.2 Πολυ(Ιστιδίνη).....	70
3.5.3 Δισουλφιδικοί Δεσμοί.....	72
3.5.4 Το μέγεθος των σωματιδίων.....	74

3.5.5 Παρόμοια συστήματα με αυτά που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία.	75
3.6 Νανოსωματίδια Χρυσού [AuNPs, Gold (Au) Nanoparticles]	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	78
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ	78
4.1 Εισαγωγή	78
4.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)	78
4.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός [Dynamic Light Scattering (DLS)]	80
4.4 ζ- Δυναμικό (Z- potential)	82
4.5 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	83
4.6 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διαπερατότητας (TEM)	85
4.7 Κυκλικός διχρωϊσμός (Circular Dichroism)	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	88
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	88
5.1 Τεχνική υψηλού κενού (HVT)	88
5.2 Καθαρισμός Διαλυτών	91
5.3 Σύνθεση και καθαρισμός των Ν-καρβοξυανυδριτών	92
5.3.1 Σύνθεση του NCA της κυστίνης	92
5.3.2 Σύνθεση του NCA της ιστιδίνης	95
5.4 Σύνθεση δικτυωμένων μικκυλίων ιστιδίνης με δισουλφιδικούς δεσμούς (NANOGELEL).	98
5.4.1 Σύνθεση NANOGELEL με ποσοστό κυστίνης 35%	98
5.5 Νανოსωματίδια χρυσού	106
5.5.1 Δημιουργία νανοςωματιδίων χρυσού στο Nanogel 12% κυστίνη	106
5.6 Χαρακτηρισμός των πολυμερών που συντέθηκαν	108
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	110
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	110

6.1	Σύνθεση των N- καρβοξυανυδριτών	110
6.1.1	Σύνθεση του NCA της κυστίνης.....	110
6.2	Χαρακτηρισμός Πολυμερών.....	117
6.2.1	Φάσματα IR και NMR κατά τη διάρκεια των πολυμερισμών.....	117
6.2.2	Μελέτη των Nanogel με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός	122
6.2.3	Μελέτη των Nanogel με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός κατά την προσθήκη GSH	140
6.2.4	Εικόνες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διαπερατότητας (TEM)	147
6.2.5	ζ- Δυναμικό.....	149
6.2.6	Κυκλικός Διχρωϊσμός	156
6.2.7	Νανοσωματίδια Χρυσού	157
	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	158
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	159
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	161

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Οι καταστάσεις ιοντισμού των αμινοξέων σε σχέση με το pH.....	28
Σχήμα 2 : Τα 20 βασικά αμινοξέα.....	31
Σχήμα 3: Αντίδραση σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού.....	34
Σχήμα 4: Μηχανισμός Διάνοιξης Δακτυλίου των NCAs των α-αμινοξέων.....	38
Σχήμα 5: Στάδιο έναρξης και στάδιο διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό NAM.....	39
Σχήμα 6: Τερματισμός της αντίδρασης των πρωτοταγών αμινών σε υψηλές θερμοκρασίες.....	41
Σχήμα 7: Αντίδραση της πρωτοταγούς αμίνης α) με το 5-CO ή β) με το 2-CO.....	41
Σχήμα 8: Τα δύο πιθανά ανιόντα που σχηματίζονται, με την προσβολή στον C ₅ ή στον C ₂	42
Σχήμα 9: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.....	42
Σχήμα 10: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς.....	44
Σχήμα 11: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs, με σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως.....	45
Σχήμα 12: Η Boc ομάδα.....	50
Σχήμα 13: Η Fmoc ομάδα.....	51
Σχήμα 14: Η τρίτυλο- ομάδα.....	51
Σχήμα 15: Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ομάδων του φαίνυλοβορονικού οξέος και του μορίου της γλυκόζης σε υδατικό διάλυμα...65	65
Σχήμα 16: Ο ιοντισμός της ιστιδίνης.....	70
Σχήμα 17 : Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του NCA της κυστίνης.....	94

Σχήμα 18: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του N ^{im} -trityl-His NCA.....	98
Σχήμα 19 : Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του nanogel 35%	105
Σχήμα 20: Η δομή της N,N' Δις(Βενζυλοξυκαρβόνυλο)-L-κυστίνης ή (Z-Cys-OH) ₂	110
Σχήμα 21: Η δομή του NCA της κυστίνης.....	111
Σχήμα 22: N _α -Boc-N _{im} - trityl-L-ιστιδίνη.....	114
Σχήμα 23: Trt-NCA της ιστιδίνης.....	115
Σχήμα 24: Ενδιάμεσο άλας της πορείας σχηματισμού του Trt NCA της ιστιδίνης.....	115
Σχήμα 25: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 35%, σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες.....	133
Σχήμα 26: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 35%, σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες.....	133
Σχήμα 27: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 35%, σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες.....	134
Σχήμα 28: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 12%, σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες.....	134
Σχήμα 29: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 12%, σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες.....	135
Σχήμα 30: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 12%, σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες.....	135
Σχήμα 31: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 7%, σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες.....	136
Σχήμα 32: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 7%, σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες.....	136
Σχήμα 33: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 7%, σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες.....	137

Σχήμα 34: Διάγραμμα Θερμοκρασιακής Εξάρτησης σε pH 7.4, και για τα τρία nanogel.....	137
Σχήμα 35: Διάγραμμα Θερμοκρασιακής Εξάρτησης σε pH 6.5, και για τα τρία nanogel.....	138
Σχήμα 36: Διάγραμμα Θερμοκρασιακής Εξάρτησης σε pH 5.0, και για τα τρία nanogel.....	138
Σχήμα 37: Διάγραμμα pH εξάρτησης σε T: 25°C, και για τα τρία nanogel...	139
Σχήμα 38: Διάγραμμα pH εξάρτησης σε T: 37°C, και για τα τρία nanogel...	139
Σχήμα 39: Διάγραμμα pH-εξάρτησης, σε θερμοκρασία 41° C, και για τα τρία nanogel.....	140

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των διπλά αποκρινόμενων πολυμερικών νανοσωματιδίων.....	26
Εικόνα 2: Στερεοχημική δομή του L- ισομερούς ενός αμινοξέος.....	29
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των δομών της α-έλικας και της β-πτυχωτής επιφάνειας.....	35
Εικόνα 4: Μεγέθη νανοσυσκευών, μορίων και βιολογικών οντοτήτων.....	53
Εικόνα 5: Εξέλιξη της Νανοτεχνολογίας από το 1960 εως σήμερα.....	55
Εικόνα 6: Τα νανοσωματίδια με πολυαιθυλενοξειδιο μπορούν να αποφύγουν την απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία του αίματος, απωθώντας την απορρόφηση πρωτεϊνων, παρατείνοντας έτσι την παραμονή των νανοσωματιδίων στο αίμα.....	69
Εικόνα 7: Α) Πολυμερές που εισέρχεται με ενδοκύτωση στο κύτταρο και στη συνέχεια παγιδεύεται στα ενδοσώματα. Β) Η αντλία πρωτονίων διοχετεύει πρωτόνια στα ενδοσώματα, το πολυμερές πρωτονιώνεται αλλά το πρόβλημα της μείωσης του pH του κυτοσολίου παραμένει οπότε η αντλία συνεχίζει να στέλνει πρωτόνια. Γ) Η δράση της αντλίας συνοδεύεται από παθητική είσοδο ιόντων χλωρίου, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ιόντων και συνεπώς και την εισροή νερού. Η αυξηση της ωσμωτικής πίεσης προκαλεί το φούσκωμα και τελικά τη ρήξη των ενδοσωμάτων, και την απελευθέρωσή τους στο κυτοσόλιο.....	71
Εικόνα 8 : EPR effect (Enhanced Permeability and retention effect).....	74
Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας εγκλωβισμού του φαρμάκου, της ενδοκύτωσης, και η απελευθέρωση του φαρμάκου μέσα στο κύτταρο, λόγω της διπλής απόκρισης του nanogel σε pH και αναγωγικές συνθήκες (GSH).....	76
Εικόνα 10: Μέθοδοι για τη σύνθεση πολυμερικών νανοσωματιδίων χρυσού.....	77

Εικόνα 11: Δονήσεις τάσης και κάμψης των μοριακών δομών και οι περιοχές απορρόφησης στην υπέρυθη περιοχή.....	79
Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού.....	88
Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου..	90
Εικόνα 14 : Η συσκευή στην οποία γίνεται ο πολυμερισμός, προσαρμοσμένη στη γραμμή υψηλού κενού.....	99
Εικόνα 15: Το διάλυμα της αντίδρασης κατά την έναρξη του πολυμερισμού.....	101
Εικόνα 16: Το διάλυμα της αντίδρασης του πολυμερισμού, μετά από 7 μέρες, πλησιάζοντας προς ο τέλος του πολυμερισμού.....	101
Εικόνα 17: Διήθηση του πολυμερούς στο χωνί Buchner.....	102
Εικόνα 18: Διήθηση στο χωνί Buchner.....	102
Εικόνα 19: Dialysis σε μεμβράνη με 3500 MB cut off.....	103
Εικόνα 20: Απομάκρυνση του H ₂ O, από το πολυμερές με την τεχνική του freeze drying.....	104
Εικόνα 21: Η πειραματική πορεία σύνθεσης νανοσωματιδίων χρυσου.....	108
Εικόνα 22: Φάσμα IR της αρχικής ένωσης (Z-Cys-OH) ₂	112
Εικόνα 23 : Φάσμα IR, μια ώρα μετά την έναρξη της σύνθεσης του NCA της κυστίνης.....	112
Εικόνα 24: Φάσμα IR, τρεις ώρες μετά την έναρξη της σύνθεσης του NCA της κυστίνης.....	113
Εικόνα 25: Τελικό φάσμα IR του NCA της κυστίνης.....	113
Εικόνα 26: Φάσμα ¹ H-NMR, του NCA της κυστίνης.....	114
Εικόνα 27: Φάσμα IR, της αρχικής ένωσης N _α – Boc – N _{im} – trityl – L – ιστιδίνης.....	116
Εικόνα 28: Φάσμα IR, μια ώρα μετά την έναρξη της σύνθεσης του NCA της ιστιδίνης.....	116
Εικόνα 29: Φάσμα ¹ H-NMR, του NCA της ιστιδίνης.....	117

Εικόνα 30: Φάσμα IR, μια μέρα μετά την έναρξη του πολυμερισμού.....	119
Εικόνα 31: Φάσμα IR, πέντε ημέρες μετά την έναρξη του πολυμερισμού...	119
Εικόνα 32: Φάσμα IR, δεκατρείς ημέρες μετά την έναρξη του πολυμερισμού, πριν από την καταβύθιση.....	120
Εικόνα 33: Φάσμα IR, μετά την καταβύθιση σε διαιθυλαιθέρα.....	120
Εικόνα 34: Φάσμα IR, μετά την αποπροστασία του πολυμερούς.....	121
Εικόνα 35: Φάσμα ¹ H-NMR, του τελικού nanogel 12%.....	121
Εικόνα 36: Εικόνα που έδωσαν τα νανοσωματίδια, με την τεχνική της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διαπερατότητας.....	148
Εικόνα 37: Εικόνα που έδωσαν τα νανοσωματίδια, με την τεχνική της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διαπερατότητας.....	148
Εικόνα 38: Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 35%, σε pH: 7.4.....	150
Εικόνα 39 : Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 12%, σε pH: 7.4.....	151
Εικόνα 40: Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 7%, σε pH: 7.4.....	152
Εικόνα 41: Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 35%, σε pH: 6.5.....	153
Εικόνα 42: Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 12%, σε pH: 6.5.....	154
Εικόνα 43: Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 7%, σε pH: 6.5.....	155
Εικόνα 44: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού για το Nanogel 12%.....	156

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οι απορροφήσεις των τριων διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.....	87
Πίνακας 2: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 35% σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.....	123
Πίνακας 3: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 35% σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.....	124
Πίνακας 4: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 35% σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.....	125
Πίνακας 5: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 12% σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.....	126
Πίνακας 6: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 12% σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.....	127
Πίνακας 7: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 12% σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.....	128
Πίνακας 8: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 7% σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.....	129
Πίνακας 9: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 7% σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.....	130
Πίνακας 10: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 7% σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.....	131
Πίνακας 11: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 35%, σε pH 7.4.....	141
Πίνακας 12: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 35%, σε pH 6.5.....	142

Πίνακας 13: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 35%, σε pH 5.0.....	143
Πίνακας 14: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 12%, σε pH 7.4.....	143
Πίνακας 15: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 12%, σε pH 6.5.....	144
Πίνακας 16: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 12%, σε pH 5.0.....	145
Πίνακας 17: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 7%, σε pH 7.4.....	145
Πίνακας 18: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 7%, σε pH 6.5.....	146
Πίνακας 19: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 7%, σε pH 5.0.....	147
Πίνακας 20 : Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 35% σε pH 7.4.....	150
Πίνακας 21: Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 12% σε pH 7.4.....	151
Πίνακας 22: Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 7% σε pH 7.4.....	152
Πίνακας 23 : Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 35% σε pH 6.5.....	153
Πίνακας 24: Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 12% σε pH	

6.5.....154

Πίνακας 25: Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 35% σε pH

6.5.....155

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας (Τομέας Πολυμερών) του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η εργασία αυτή έχει ως σκοπό τη σύνθεση πολυτεπτιδίων με οργάνωση τέτοια, που να μπορούν να εγκλωβίσουν αντικαρκινικά φάρμακα και να αποτελέσουν «οχήματα» για τη μεταφορά τους στον οργανισμό. Με την ελπίδα, να εξαχθούν συμπεράσματα που θα είναι χρήσιμα σε αυτόν τον τομέα της επιστήμης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

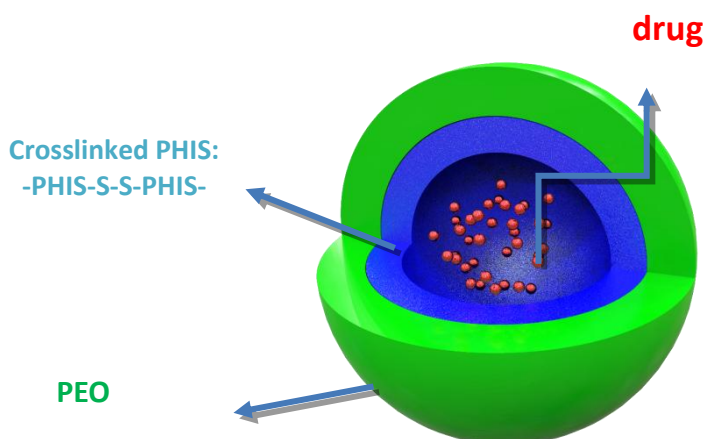
Η επιστήμη των πολυμερών αναπτύχθηκε ραγδαία, τον προηγούμενο αιώνα με της εφαρμογές της να απλώνονται σε πάρα πολλούς τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας, όπως τα ηλεκτρονικά, οι μεταφορές, καθώς και σε πληθώρα άλλων βιομηχανικών αγαθών που είναι φτιαγμένα από πολυμερικά υλικά και χρησιμοποιούνται ευρέως. Επίσης αναμένεται, να χρησιμοποιηθούν, σε τεχνικές αποθήκευσης και μετατροπής ενέργειας, στη μικροηλεκτρονική, στην ιατρική, τη διαγνωστική και τη θεραπευτική.

Από την υιοθέτηση της έννοιας του μακρομορίου το 1860, μέχρι και σήμερα έχουν γίνει άλματα στη σύνθεση, αλλά και τον χαρακτηρισμό πολυμερών με πολύπλοκες αρχιτεκτονικές, μορίων με πολύπλοκες δομές. Πλέον για τους επιστήμονες που ασχολούνται με τα πολυμερικά υλικά, τη θέση της έννοιας του συγκεκριμένου μορίου, αρχίζει να παίρνει η έννοια του συστήματος, μιας πιο πολύπλοκης δομής δηλαδή, και η μελέτη της συνολικής λειτουργικότητας της δομής αυτής : το τι ιδιότητες έχει, πως μπορούν αυτές να φανούν χρήσιμες.

Μεγάλο πεδίο ενδιαφέροντος στην επιστήμη των πολυμερών, καταλαμβάνει η χρήση πολυμερικών μικκυλίων για την μεταφορά και ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων (drug delivery). Σε αυτό τον τομέα, τα δικτυωμένα πολυμερικά νανοσωματίδια (nanogel)^[1], είναι πολύ δημοφιλή ακριβώς γιατί σχεδιάζονται έτσι ώστε να είναι ικανά να «αποκρίνονται» σε ερεθίσματα όπως το pH, η θερμοκρασία, διάφορα ένζυμα, ή χρησιμοποιούνται με βάση την ικανότητα οξειδοαναγωγής τους ή με συνδυασμό όλων των παραπάνω παραγόντων. Συγκρινόμενα με άλλα πολυμερή που προορίζονται για ελεγχόμενη μεταφορά φαρμάκων, τα δικτυωμένα αναφέρεται ότι έχουν ιδιαίτερη σταθερότητα, πετυχαίνοντας μεγαλύτερη παραμονή στο αίμα. Επιπλέον, η ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκου γίνεται πιο εύκολη, καθώς

τα ερεθίσματα στα οποία αποκρίνονται, κάνουν την περιοχή στόχευσης συγκεκριμένη και προσβάσιμη με βάση τις ιδιότητές τους.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να συντεθούν πολυμερικά νανοσωματίδια (nanogel), με δικτυωμένο πυρήνα ιστιδίνης γύρω από τον οποίο θα σχηματίζει κέλυφος το πολυαιθυλενοξειδίο (PEO).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των διπλά αποκρινόμενων πολυμερικών νανοσωματιδίων.

Το PEO επιλέχθηκε καθώς είναι βιοαποικοδομήσιμο και βιοσυμβατό, δεν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του αίματος, που θα το αναγνώριζαν σαν αντιγόνο, δεν παρεμβάλλεται στις κυτταρικές λειτουργίες.

Η πολυ(L- ιστιδίνη), επιλέχθηκε με σκοπό να καταστήσει το σύστημα pH-αποκρινόμενο στην περιοχή pH 5.0- 6.5, την περιοχή pH που έχουν τα καρκινικά κύτταρα. Εξαιτίας του ιμιδαζολίου, μπορεί το μόριο να φορτιστεί ή όχι, ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται.

Η δικτύωση επιχειρήθηκε μέσω του διπλού μονομερούς, του N-καρβόξυανυδρίτη (NCA) της κυστίνης, και δίνει στο σύστημα την ικανότητα απόκρισης, μέσω της αναγωγής που μπορεί να συμβεί στους δισουλφιδικούς δεσμούς αν έρθουν σε επαφή με αναγωγικό παράγοντα, όπως η γλουταθειόνη (GSH), που βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων, μεγαλύτερη από των υγιών κυττάρων.

Η σύνθεση των πολυμερών έγινε με πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου [Ring Opening Polymerization (ROP)] N-καρβοξυανυδριτών (NCA's) των αμινοξέων

της L-ιστιδίνης και της κυστίνης, αφού πρώτα συντέθηκαν στο εργαστήριο οι δυο NCA's.

Η σύνθεση των δικτυωμένων πολυμερών έγινε με τρία διαφορετικά ποσοστά κυστίνης σε σχέση με την ιστιδίνη, έτσι ώστε να μελετηθεί η επίδραση του ποσοστού κυστίνης, στο μέγεθος και τις ιδιότητες των πολυμερών.

Παράλληλα έγινε μελέτη, των δομών που σχηματίζουν τα πολυμερή, αλλά και της αποκρυσιμότητας σε διάφορες θερμοκρασίες και διάφορα pH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

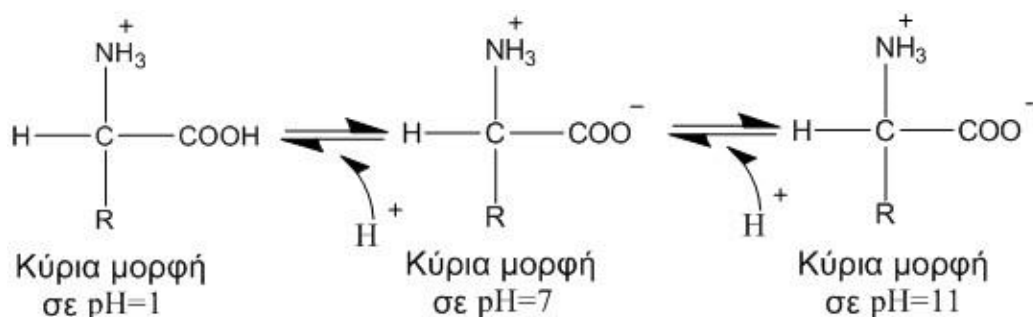
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ I

2.1 Τα πεπτίδια και οι δομικές τους μονάδες

2.1.1 Τα 20 φυσικά αμινοξέα^[2]

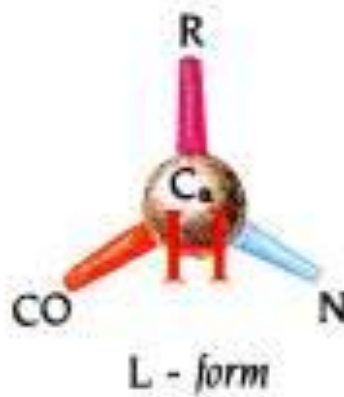
Τα αμινοξέα όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους περιέχουν δύο λειτουργικές ομάδες. Τη βασική αμινομάδα και την όξινη καρβοξυλομάδα. Επομένως ένα α-αμινοξύ αποτελείται από μία αμινομάδα, μία καρβοξυλομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μία χαρακτηριστική ομάδα R δεσμευμένη στο άτομο του άνθρακα που λέγεται α-άνθρακας, καθώς είναι ο γειτονικός άνθρακας της καρβοξυλικής ομάδας.

Σε διάλυμα που έχει ουδέτερο pH, τα αμινοξέα, συμπεριφέρονται σαν δίπολα ιόντα (τα οποία ονομάζονται αμφοτερικά ιόντα, zwitterions), όπου η αμινομάδα είναι πρωτονιωμένη (NH_3^+) και η καρβοξυλομάδα είναι αποπρωτονιωμένη (COO^-). Σε όξινα υδατικά διαλύματα, ένα αμφοτερικό αμινοξύ γίνεται δέκτης ενός πρωτονίου προς σχηματισμό ενός κατιόντος. Αντίθετα σε αλκαλικά διαλύματα το δίπολο αποβάλλει ένα πρωτόνιο, οπότε σχηματίζει ανιόν.



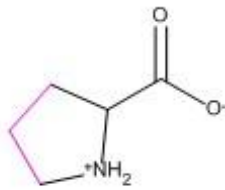
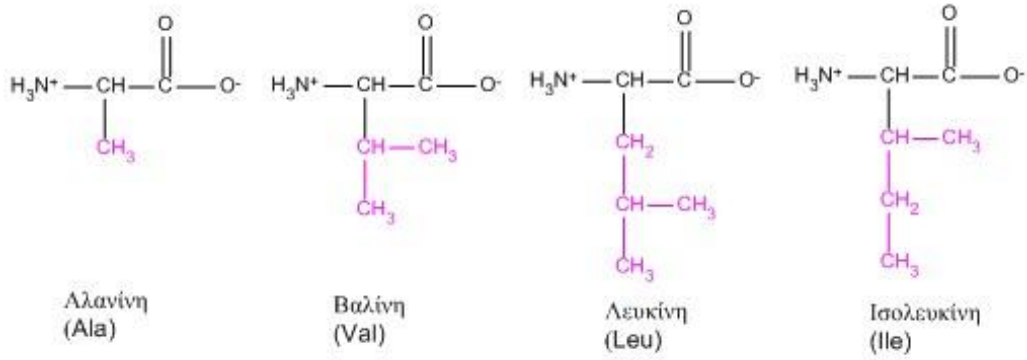
Σχήμα 1: Οι καταστάσεις ιοντισμού των αμινοξέων σε σχέση με το pH.

Εξαιτίας των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων οι οποίες είναι συνδεδεμένες στον άνθρακα τα αμινοξέα είναι χειρόμορφα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται δυο κατοπτρικά είδωλα που λέγονται D- και L- ισομερή. Στις πρωτεΐνες απαντούν μόνο τα L- αμινοξέα χωρίς να είναι γνωστό το γιατί. Παρακάτω παρατίθενται τα είκοσι βασικά αμινοξέα.



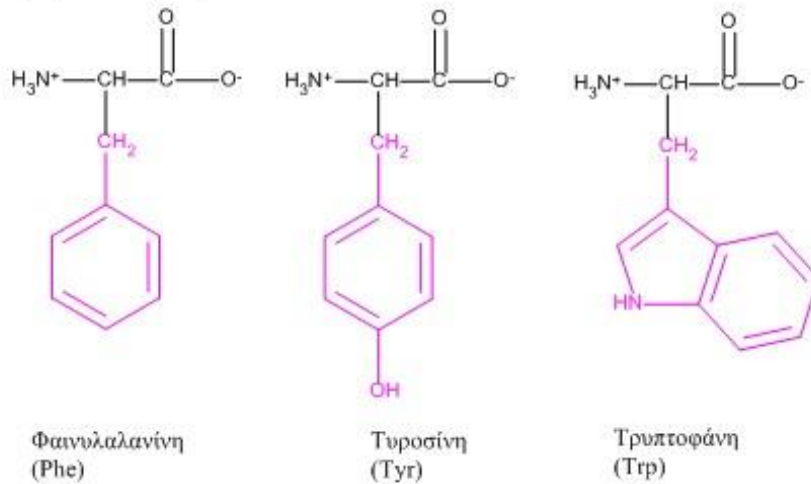
Εικόνα 2: Στεreoχημική δομή του L- ισομερούς ενός αμινοξέος.

Αλειφατικά αμινοξέα.

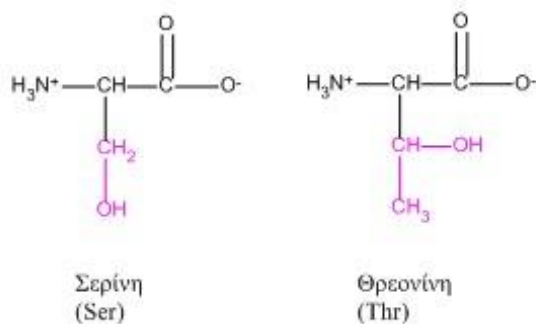


Προλίνη
(Pro)

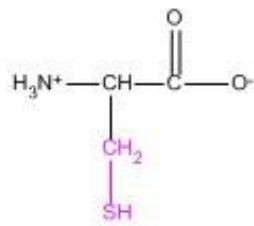
Αρωματικά αμινοξέα.



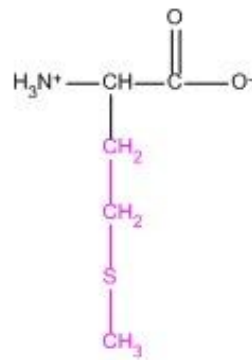
Αμινοξέα με αλειφατικά υδροξύλια.



Αμινοξέα που περιέχουν θείο.

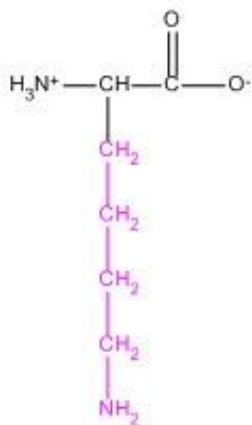


Κυστεΐνη
(Cys)

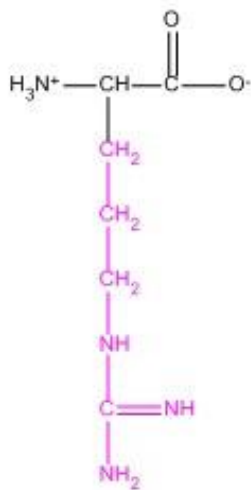


Μεθειονίνη
(Met)

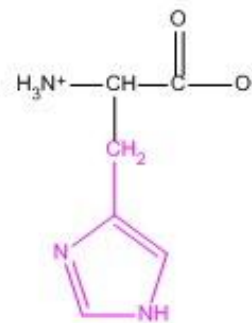
Βασικά αμινοξέα.



Λυσίνη
(Lys)

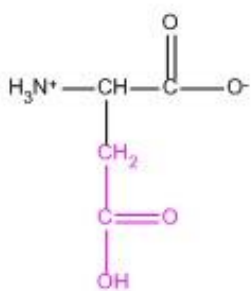


Αργινίνη
(Arg)

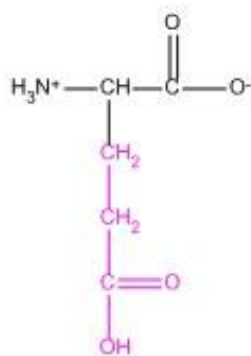


Ιστιδίνη
(His)

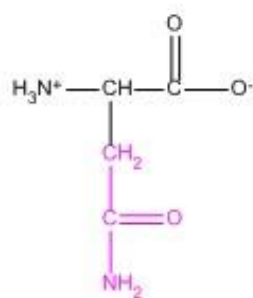
Όξινα αμινοξέα και τα παράγωγά τους.



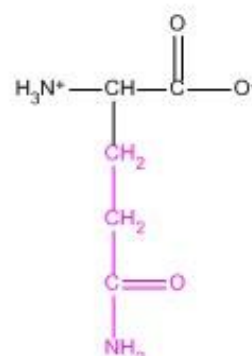
Ασπαρτικό οξύ
(Asp)



Γλουταμικό οξύ
(Glu)



Ασπαραγίνη
(Asn)



Γλουταμίνη
(Gln)

Σχήμα 2 : Τα 20 βασικά αμινοξέα

❖ Αλειφατικά αμινοξέα

Οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το σχήμα, το μέγεθος, το φορτίο, τη χημική δραστηριότητα και την υδροφοβικότητα. Η γλυκίνη είναι το πιο απλό αμινοξύ, αφού έχει μόνο ένα άτομο υδρογόνου στην πλευρική του αλυσίδα. Η αλανίνη είναι το επόμενο με μια μεθυλομάδα, αντί του υδρογόνου. Μεγαλύτερες υδρογονανθρακικές αλυσίδες (με τρία και τέσσερα άτομα άνθρακα) βρίσκονται στην βαλίνη, την λευκίνη και την ισολευκίνη. Όσο αυξάνεται η υδρογονανθρακική αλυσίδα της πλευρικής ομάδας, τόσο αυξάνεται και η υδροφοβική φύση του αμινοξέος. Η τρισδιάστατη δομή των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών σταθεροποιείται από την τάση που έχουν αυτές οι υδρόφοβες ομάδες να βρίσκονται κοντά ή μια στην άλλη και να αποφεύγουν την επαφή με το υδατικό περιβάλλον. Η τάση αυτή ονομάζεται φαινόμενο υδροφοβικότητας.

Η προλίνη έχει επίσης αλειφατική αλυσίδα, αλλά συνδέεται στο άτομο του αζώτου και στον α-άνθρακα. Η προλίνη είναι το μοναδικό φυσικό δευτεροταγές αμινοξύ.

❖ Αμινοξέα με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες

Η φαινυλαλανίνη, έχει ένα φαινολικό δακτύλιο, συνδεδεμένο με μια μεθυλενική ομάδα. Η τρυπτοφάνη που περιέχει ένα ινδολικό δακτύλιο. Τα δυο αυτά αμινοξέα παρουσιάζουν μεγάλη υδροφοβικότητα. Τέλος η τυροσίνη, η οποία έχει έναν φαινολικό δακτύλιο. Οι αρωματικοί δακτύλιοι των συγκεκριμένων αμινοξέων έχουν απεντοπισμένα τα ηλεκτρονικά τους νέφη π, που τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν με άλλα συστήματα π και να μεταφέρουν ηλεκτρόνια.

❖ Αμινοξέα που περιέχουν θείο.

Ένα άτομο θείου εμφανίζεται στις πλευρικές αλυσίδες της κυστεΐνης και της μεθειονίνης. Η κυστεΐνη περιέχει σουλφιδρυλομάδα και η μεθειονίνη δεσμό θειοαιθέρα. Σε μερικές πρωτεΐνες υπάρχουν διασυνδέσεις, ανάμεσα σε τμήματα της ίδιας αλυσίδας, ή και μεταξύ περισσότερων αλυσίδων. Οι διασυνδέσεις αυτές, είναι συνήθως δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται από την οξειδωση δυο μονάδων κυστεΐνης. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μιας μονάδας κυστίνης.

❖ Αμινοξέα με αλειφατικά υδροξύλια.

Δύο αμινοξέα, η σερίνη και η θρεονίνη, περιέχουν αλειφατικές υδροξυλικές ομάδες. Θα μπορούσαν να θεωρηθούν υδροξυλιωμένες μορφές της αλανίνης και της βαλίνης. Τα υδροξύλια τις καθιστούν πιο υδρόφιλες από τις αντίστοιχες αλειφατικές.

❖ Βασικά αμινοξέα.

Αμινοξέα με πολύ πολικές πλευρικές ομάδες και μεγάλη υδροφιλικότητα είναι η λυσίνη, η αργινίνη και η ιστοιδίνη. Η λυσίνη και η αργινίνη είναι θετικά φορτισμένες σε ουδέτερο pH ενώ η ιστοιδίνη μπορεί να φορτιστεί ανάλογα με το άμεσο περιβάλλον της. Η ιστοιδίνη εμφανίζεται τακτικά στο μέσο των ενζύμων όπου ο ιμιδαζολικός δακτύλιος αλλάζει γρήγορα κατάσταση καταλύοντας τη δημιουργία ή τη διάσπαση δεσμών. Οι πλευρικές αλυσίδες της αργινίνης και λυσίνης είναι οι μεγαλύτερες από το σύνολο των είκοσι αμινοξέων.

❖ Όξινα αμινοξέα και τα παράγωγά τους.

Μεταξύ των αμινοξέων υπάρχουν επίσης και δυο με όξινες πλευρικές αλυσίδες, το ασπαρτικό και το γλουταμικό οξύ. Τα μη φορτισμένα τους παράγωγα ονομάζονται ασπαραγίνη και γλουταμίνη και περιέχουν μια τελική αμιδική ομάδα στη θέση της καρβοξυλικής.

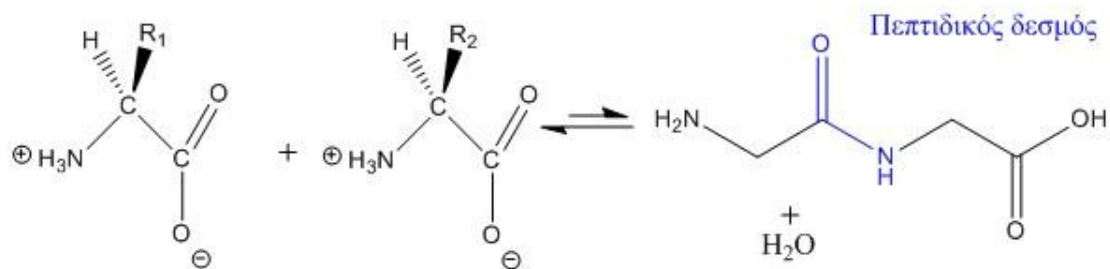
Τα βασικά ή όξινα αμινοξέα, που διαθέτουν φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες, τείνουν να προσανατολίζονται προς το εξωτερικό μέρος των πρωτεϊνών στις οποίες βρίσκονται, όπου επιδιαλυτώνονται από τα μόρια του νερού.

2.1.2 Δομή των πεπτιδίων^[3]

A. Πεπτιδικός Δεσμός (Πρωτοταγής δομή)

Η μεγάλη βιολογική σημασία των αμινοξέων απορρέει, από το γεγονός ότι τα αμινοξέα μπορούν να συνδέονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας μακριές αλυσίδες, μέσω αμιδικών δεσμών ανάμεσα στην $-NH_2$ του ενός αμινοξέος και στο $-COOH$ κάποιου άλλου αμινοξέος. Πολλά αμινοξέα ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς για να δημιουργήσουν μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι

αλυσίδες με λιγότερα από 50 αμινοξέα, συχνά ονομάζονται πεπτιδία, ενώ ο όρος πρωτεΐνες χρησιμοποιείται για τις μεγαλύτερες αλυσίδες.



Σχήμα 3: Αντίδραση σχηματισμού ενός πεπτιδικού δεσμού.

Η πρωτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης αναφέρεται στην ακολουθία με την οποία τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους. Μια πολυπεπτιδική αλυσίδα συντίθεται με κατεύθυνση από αριστερά προς τα δεξιά, πάντα στο αριστερό άκρο της αλυσίδας θα βρίσκεται μια αμινομάδα (-NH₂), και στο δεξιό, μια καρβοξυλομάδα (-COOH).

B. Τρία ακόμη επίπεδα δομής των πρωτεϊνών

Εκτός από την ακολουθία των αμινοξέων, υπάρχουν πολλοί άλλοι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή των πρωτεϊνών. Οι χημικές ιδιότητες μιας πρωτεΐνης, εξαρτώνται επίσης από τα ανώτερα επίπεδα δομών, δηλαδή από το πως η πεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται ώστε να αποκτήσει το μόριο ένα συγκεκριμένο τρισδιάστατο σχήμα. Έτσι ο όρος δευτεροταγής δομή αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο τα τμήματα μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας προσανατολίζονται, λόγω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων. Η τριτοταγής δομή αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο ολόκληρο το μόριο της πρωτεΐνης περιελίσσεται συνολικά στο χώρο. Τέλος η τεταρτοταγής δομή αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο πολλά μόρια πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για το σχηματισμό μεγάλων δομικών συσσωματωμάτων.

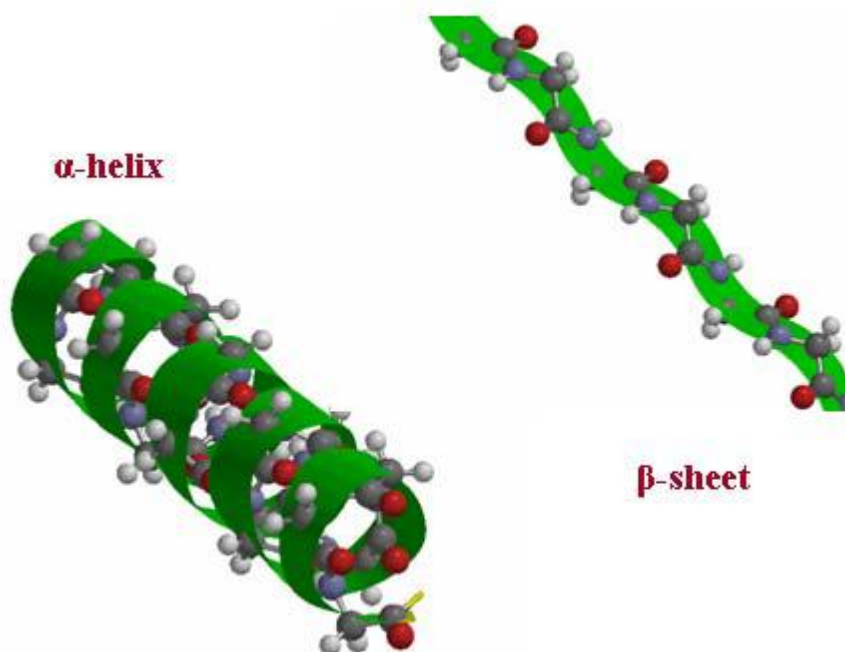
❖ Η α-έλικα.

Η α-έλικα είναι μορφή δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, η οποία σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου, ανάμεσα στις αμινικές ομάδες N-H και τις ομάδες C=O αμινοξέων που βρίσκονται σε απόσταση τεσσάρων υπολειμάτων αμινοξέων. Ο μεγάλος αριθμός δεσμών υδρογόνου που

επιτυγχάνεται με την ελικοειδή αναδίπλωση, προσδίδει στη δομή της α -έλικας ιδιαίτερη σταθερότητα. Κάθε περιέλιξη της α -έλικας περιέχει κατά μέσο όρο 3,6 αμινοξέα, ενώ η απόσταση ανάμεσα στις περιελίξεις (η επαναλαμβανόμενη απόσταση) είναι 540 pm.

❖ β - πτυχωτή επιφάνεια ή β - φύλλο.

Είναι άλλη δευτεροταγής δομή που μπορούν να πάρουν οι πρωτεΐνες ή τα πολυπεπτίδια. Η δομή αυτή ονομάζεται αλλιώς πριονωτή και σ' αυτή, οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες διατάσσονται παράλληλα μεταξύ τους και συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των αλυσίδων. Η δομή είναι ανοιχτή και επίπεδη, με τους δεσμούς υδρογόνου να σχηματίζονται διαμοριακά μεταξύ $-NH$ και $-CO$, διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Οι γειτονικές αλυσίδες σε μια β - πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλες). Περιοχές με δομή β - πτυχωτής επιφάνειας απαντούν συχνά σε πρωτεΐνες στις οποίες οι πεπτιδικές αλυσίδες αναδιπλώνονται στον εαυτό τους.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των δομών της α -έλικας και της β - πτυχωτής επιφάνειας.

2.2 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους και με καθορισμένη αλληλουχία

Η σύνθεση των πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με καθορισμένη αλληλουχία, είναι πολύ σημαντική γιατί βρίσκει εφαρμογές σε μελέτες με φαρμακευτικό και ιατρικό ενδιαφέρον. Αν και η σύνθεσή τους είναι δύσκολο και απαιτητικό έργο, οι παρακάτω τρόποι είναι οι επικρατέστεροι:

A. Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση^[4]

Η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση περιλαμβάνει την πρόσδεση του N-προστατευμένου C-τελικού αμινοξέος, σε ένα αδιάλυτο πολυμερές υποστήριγμα (μια ρητίνη), ακολουθούμενη από αποπροστασία και ακυλίωση της ελεύθερης πλέον αμινομάδας με το προτελευταίο αμινοξύ, και την εξακολούθηση της ίδιας πορείας με παρόμοιους κύκλους αποπροστασίας και εισαγωγής των υπόλοιπων αμινοξέων. Η περίσσεια των αρχικών πρώτων υλών και των αντιδραστηρίων καθώς επίσης και τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων απομακρύνονται απλώς με έκπλυση του πεπτιδίου -πολυμερούς με κατάλληλα επιλεγμένους διαλύτες. Η ιδέα αυτή εισήχθη από τον Merrifield το 1963, και η ρητίνη του Merrifield, αυτή που χρησιμοποίησε τότε ως αδιάλυτο υποστήριγμα, αποτελεί ακόμη ένα από τα κύρια στηρίγματα για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση. Η ρητίνη του Merrifield, είναι το χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρολίου- διβίνυλοβενζολίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σε πολλές συνθέσεις αλλά αποτέλεσε το ίδιο βάση, για ανάπτυξη των ρητινών. Ως προστατευτική ομάδα των αμινοξέων χρησιμοποιείται η Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc), για να μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα με οξέα. Η ενεργοποίηση του καρβονυλίου, γίνεται με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης όπως το δικυκλοέξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC).

B. Σύνθεση σε διάλυμα^[5]

Ένα αμινοξύ προσκολλημένο σε ένα διαλυτό πολυμερές, από την καρβοξυλική του ομάδα μπορεί να ακυλωθεί από ένα κατάλληλα προστατευμένο και ενεργοποιημένο αμινοξύ, και να αρχίσει με αυτόν τον τρόπο η σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας. Τα ενδιάμεσα πεπτίδια, καταβυθίζονται και πλένονται για να απομακρυνθούν όσα από τα αντιδρώντα δεν αντέδρασαν, και παραπροϊόντα. Το καθαρό προϊόν επαναδιαλύεται, αποπροστατεύεται, ακυλιώνεται ξανά σε διάλυμα κ.ό.κ.

Η πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης είναι η μόνη ευρέως εφαρμοζόμενη τεχνική γρήγορης σύνθεσης, αλλά έχουν προταθεί και αρκετές άλλες μέθοδοι για τη γρήγορη σύνθεση μικρών πεπτιδικών αλυσίδων, όπως η σύνθεση σε διάλυμα. Το μειονέκτημα της σύνθεσης σε στερεά φάση σε σχέση με τη σύνθεση σε διάλυμα, είναι ότι, η ταχύτητα της αντίδρασης μειώνεται εντός της πηκτής σε σχέση με την ταχύτητα μιας αντίδρασης που γίνεται σε διάλυμα. Επίσης όπου είναι δυνατή η απομόνωση των ενδιάμεσων παραγώγων, αυτά μπορεί να αναλυθούν και να καθαρισθούν.

2.3 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους

Τα πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους, είναι υλικά που έχουν άριστες ιδιότητες για να χρησιμοποιηθούν σε δομές που λειτουργούν ως μεταφορείς φαρμάκων. Παρόλα αυτά, η σύνθεση πολυπεπτιδίων, μεγάλου μοριακού βάρους, η δομή των οποίων μπορεί να μιμείται επαρκώς τις ιδιότητες των φυσικών πρωτεϊνών, απαιτεί τη δυνατότητα να ελεγχθεί η ακολουθία και η σύνθεση των καταλοίπων αμινοξέων κατά μήκος της αλυσίδας. Είναι σημαντικό να μπορούν να επιτευχθούν στενές κατανομές, έτσι ώστε να μπορούν να αυτοοργανώνονται σε ακριβώς καθορισμένες μικροδομές, παρόμοιες με εκείνες που βρίσκονται στις πρωτεΐνες. Έτσι οι πολυπεπτιδικές αυτές αλυσίδες, πλησιάζουν μια δευτεροταγή δομή, όμοια με αυτή των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να αυτοοργανώνονται με συγκεκριμένο τρόπο στο χώρο, και να αποκτούν μια σειρά από ιδιότητες, χρήσιμες για τη μεταφορά φαρμάκων.

Η συμβατική μέθοδος σύνθεσης στη στερεά φάση, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, εξαιτίας των πολλών σταδίων αποπροστασίας και σύζευξης^[6]. Η καλύτερη μέθοδος για τη σύνθεση καλά χαρακτηρισμένων πολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους είναι, ο πολυμερισμός N- καρβοξυανυδριτών (NCAs), μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP)^{[7],[8]}.

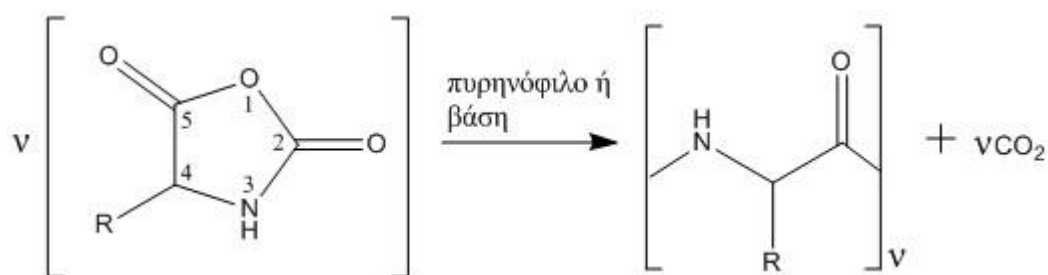
Για πάνω από έξι δεκαετίες, η σύνθεση πολυπεπτιδίων με τη μέθοδο του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου, απασχόλησε την επιστημονική κοινότητα. Αυτό συνέβη ακριβώς επειδή υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί στη σύνθεση

πολυεπεπιδίων που απαιτούν υπερβολικό καθαρισμό και επεξεργασία για να ληφθούν καλά καθορισμένα πολυμερή.

Παρακάτω παρατίθενται οι πρόσφατες εξελίξεις στη σύνθεση των όμο- και συμπολυμερών, που πραγματοποιούνται με ελεγχόμενους πολυμερισμούς, επιτρέποντας τη δημιουργία πολυμερών με άριστες ιδιότητες.

2.3.1 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (ROP) των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων.

Κατά τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου, αυτό που συμβαίνει είναι, ο πολυμερισμός ενός N-καρβοξυανυδρίτη ενός α-αμινοξέος, μέσω ενός απαρχητή, όπως φαίνεται παρακατω. Η αντίδραση προχωράει με την παραγωγή CO₂, και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους.



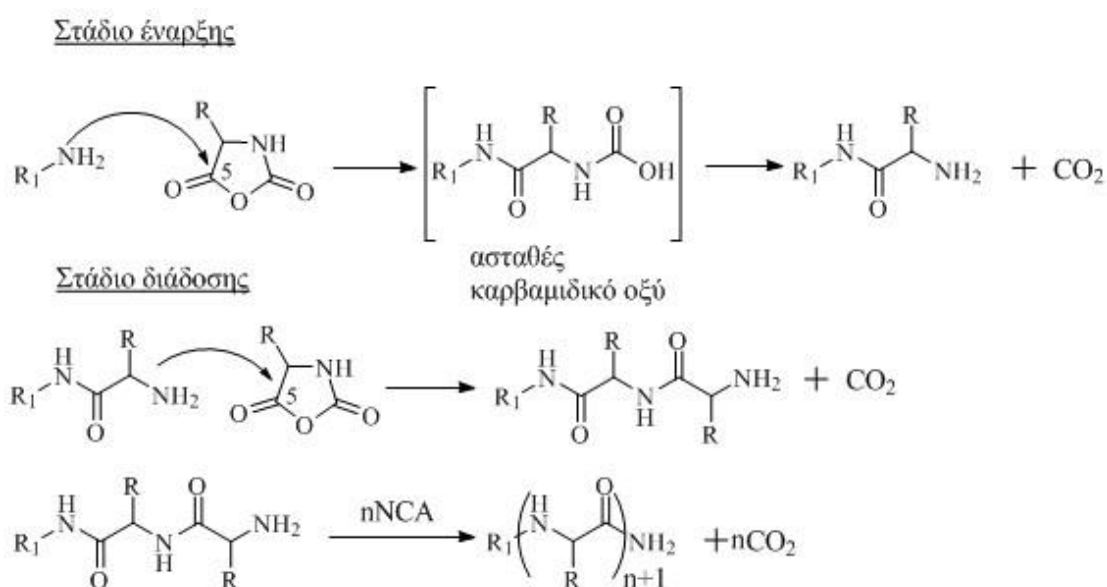
Σχήμα 4: Μηχανισμός Διάνοιξης Δακτυλίου των NCAs των α-αμινοξέων.

Ο μηχανισμός με τον οποίο προχωράει αυτή η αντίδραση είναι ένα θέμα το οποίο απασχόλησε αρκετά τους επιστήμονες, με τους περισσότερους να συμφωνούν στην πρόταση για δύο πιθανούς μηχανισμούς: 1. Τον Κανονικό Μηχανισμό Αμινών [Normal Amine Mechanism (NAM)] και 2. Τον Μηχανισμό Ενεργοποιημένου Μονομερούς [Active Monomer Mechanism (AMM)].

2.3.2 Κανονικός Μηχανισμός Αμινών [Normal Amine Mechanism (NAM)].

Αυτός ο μηχανισμός, γενικά ισχύει για τον πολυμερισμό των NCAs, όπου χρησιμοποιούνται απαρχητές, που έχουν τουλάχιστον ένα ασταθές υδρογόνο, (Βάση-H), όπως οι πρωτοταγείς και οι δευτεροταγείς αμίνες, οι αλκοόλες και το νερό. Ο μηχανισμός βασίζεται στην πυρηνόφιλη προσβολή του απαρχητή, στη συγκεκριμένη περίπτωση της βάσης, που «κουβαλάει», το μη σταθερό υδρογόνο. Το ενδιάμεσο ασταθές, καρβαμικό οξύ, αποκαρβοξυλιώνεται για να

δώσει, μια νέα αμινομάδα, που θα συνεχίσει τον πολυμερισμό. Οι πρωτοταγείς αμίνες έχουν τα καλύτερα αποτελέσματα, παίρνοντας υπ'όψη τη συμφωνία μεταξύ των πειραματικά παρατηρούμενων μοριακών βαρών και αυτών που αναμένονται στοιχειομετρικά. Δεδομένου του ότι οι πρωτοταγείς αμίνες είναι περισσότερο πυρηνόφιλες από τις αμινομάδες που βρίσκονται στις αλυσίδες διάδοσης, ο ρυθμός έναρξης είναι πολύ μεγαλύτερος από το ρυθμό διάδοσης. Αυτό αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά ενός «ζωντανού πολυμερισμού», άρα τα πολυπεπτίδια που λαμβάνονται έχουν πολύ καλές κατανομές. Ο μηχανισμός αυτός επιβεβαιώθηκε ξεχωριστά, από τις επιστημονικές μονάδες των Peggion και Goodman^[9].



Σχήμα 5: Στάδιο έναρξης και στάδιο διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό NAM.

Η συχνότητα με την οποία ο απαρχητής ενσωματώνεται στο σύστημα για να ξεκινήσει πολυμερισμό, στο συγκεκριμένο μηχανισμό σχετίζεται με τη δομή του απαρχητή. Για παράδειγμα, οι πρωτοταγείς αμίνες όπως η n-εξυλαμίνη ενσωματώνεται 100%, ενώ μια δευτεροταγής αμίνη όπως η διισοπροπυλαμίνη, μόνο κατά 10%. Αυτό συμβαίνει λόγω της μεγαλύτερης βασικότητας και της στερεοχημικής παρεμπόδισης της δευτεροταγούς αμίνης έναντι της πρωτοταγούς.

Εκτός από την επιθυμητή αντίδραση συμβαίνουν μια σειρά από άλλες παράπλευρες αντιδράσεις, οι οποίες οφείλονται σε παράγοντες όπως η

ισορροπία καρβαμικού οξέος - διοξειδίου του άνθρακα, οι διαλύτες ή η παρουσία νερού ή άλλων προσμίξεων.

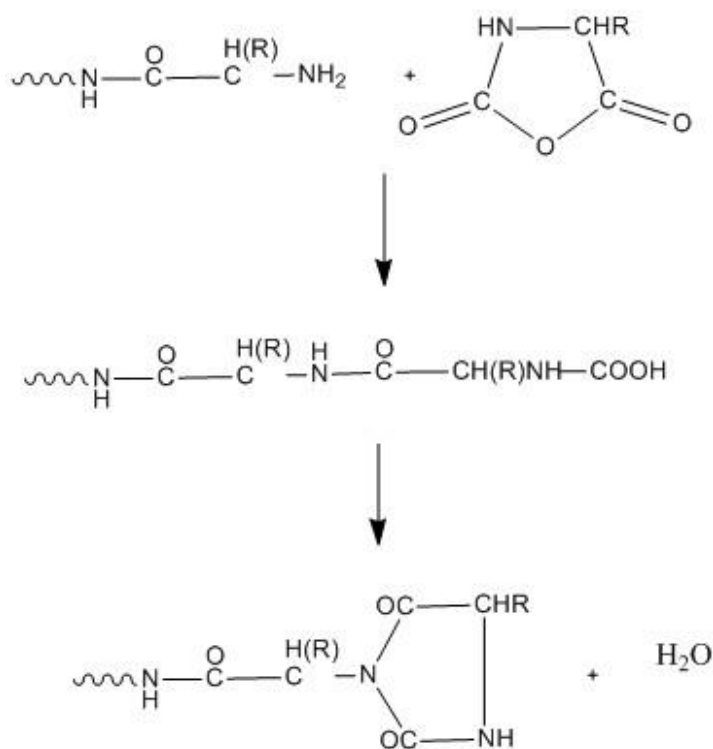
Η επιστημονική ομάδα του Ballard^{[10],[11]}, παρατήρησε τη δημιουργία ενός άλατος μεταξύ των αμινομάδων των αλυσίδων που συντίθενται, και του καρβαμικού οξέος. Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι παρεμποδίζονται οι αλυσίδες να συνεχίσουν τη διάδοση, προσβάλλοντας άλλο μονομερές. Παρατηρήθηκε επίσης ότι το φαινόμενο αυτό σταμάτησε, όταν ο διαλύτης που χρησιμοποιούνταν έως τότε, το νιτροβενζόλιο, αντικαταστάθηκε με διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF)^[12]. Αυτό συνέβη γιατί η μεγαλύτερη οξύτητα του DMF, μείωσε τη βασικότητα του ενεργού κέντρου των αμινομάδων, εμποδίζοντας τη δημιουργία του άλατος.

Η ισορροπία καρβαμικού οξέος - διοξειδίου του άνθρακα, φαίνεται ότι επηρεάζει την αντίδραση ως εξής: Η συνεχής απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται, οδηγεί την αντίδραση προς τα δεξιά, σε αντίθεση με τη μη απομάκρυνση του, όπου υπάρχει κορεσμός και ευνοείται πλέον ο σχηματισμός του άλατος μεταξύ αμίνης και καρβαμικού οξέος.

Άλλος παράγοντας που παρατηρήθηκε ότι είχε σημαντική επίδραση στη λήψη επιθυμητών προϊόντων, ήταν η καθαρότητα των NCAs, όπου παρατηρήθηκε από πολλούς ερευνητές, και αναμεσα του και τον Ballard ότι NCAs υψηλής καθαρότητας έδωσαν πολυπεπτίδια με πολύ καλές κατανομές^[13].

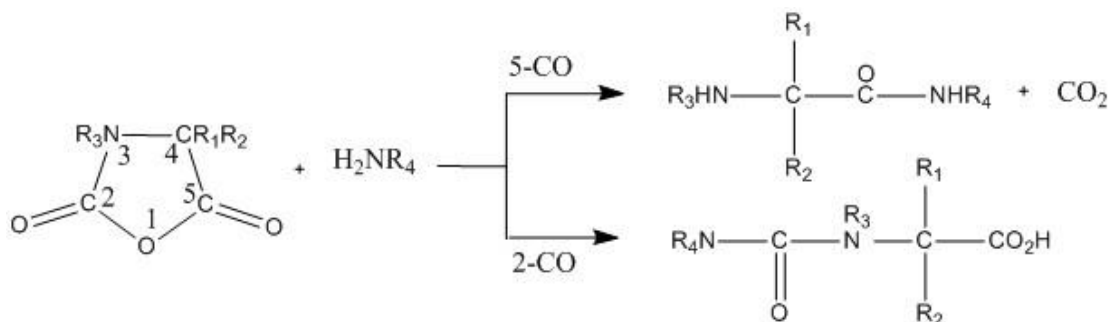
Το νερό είναι μια από τις συνήθεις προσμίξεις, που μπορεί να επηρεάσει τον μηχανισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs, κι αυτό επιβεβαιώθηκε από πολλούς συγγραφείς^{[14]-[20]}. Η αντίδραση του νερού, με τους NCAs, διερευνήθηκε από μια σειρά ερευνητές, οι οποίοι κατέληξαν στο εξής συμπέρασμα: με αναλογία NCA/H₂O μεγαλύτερη του 10, λαμβάνονται πολυπεπτίδια με καλά καθορισμένα χαρακτηριστικά. Αν αυτή η αναλογία είναι μικρότερη του 10⁻³, τότε συμβαίνει πλήρης υδρόλυση. Για ενδιάμεσες αναλογίες, ευνοείται ο σχηματισμός ολιγοπεπτιδίων.

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η θερμοκρασία επηρεάζει το σύστημα και είναι κρίσιμη για τη υδρόλυση των NCAs, δεδομένου του ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες κάνουν την αντίδραση πιο αργή^{[19],[20]}.



Σχήμα 6: Τερματισμός της αντίδρασης των πρωτοταγών αμινών σε υψηλές θερμοκρασίες

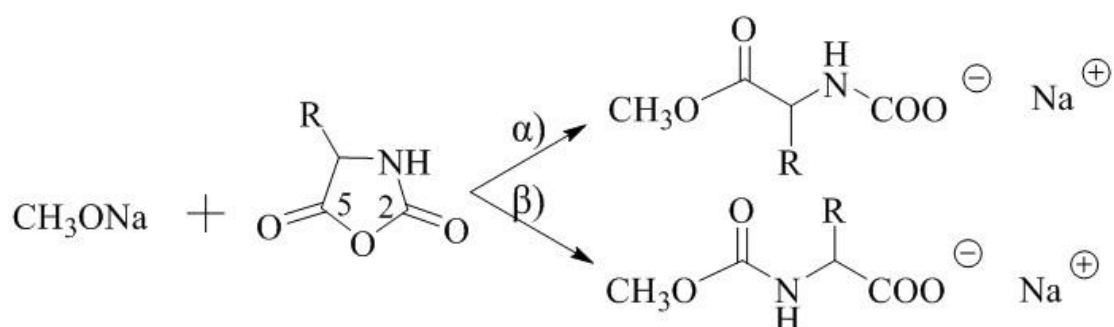
Δευτερεύουσες αντιδράσεις μπορούν επίσης να προκληθούν, από την προσβολή της αμινομάδας στο 2-CO αντί για το επιθυμητό 5-CO. Όσο πιο πυρηνόφιλος είναι ο απαρχητής, τόσο μικρότερο είναι το ποσοστό της πιθανής προσβολής στο 2-CO^[21].



Σχήμα 7: Αντίδραση της πρωτοταγούς αμίνης α) με το 5-CO ή β) με το 2-CO.

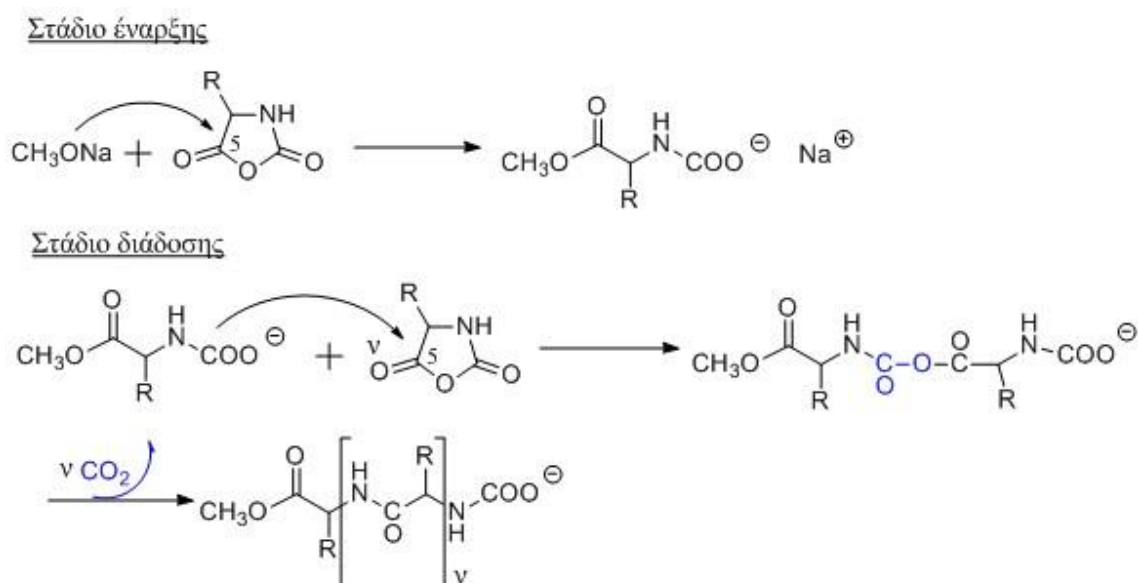
Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΟΥ Blout^[22].

Ο μηχανισμός αυτός είναι μια «ιοντική» μορφή, του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM). Το 1958 οι Idelson και Blout, μελέτησαν τον πολυμερισμό των NCAs μέσω ισχυρών βάσεων, χρησιμοποιώντας μεθοξείδιο του νατρίου. Κατά το στάδιο της έναρξης, το μεθοξείδιο του νατρίου προβάλλει πυρηνόφιλα είτε τον C₅ είτε τον C₂ του καρβοξυανυδρίτη προκαλώντας διάνοιξη δακτυλίου. Έτσι σχηματίζονται τα δύο πιθανά ανιόντα:



Σχήμα 8: Τα δύο πιθανά ανιόντα που σχηματίζονται, με την προσβολή στον C₅ ή στον C₂.

Σ' αυτό το στάδιο δε λαμβάνει χώρα αποκαρβοξυλίωση. Κατά το στάδιο της διάδοσης, το καρβαμιδικό ανιόν που έχει προκύψει, συμπεριφέρεται όπως το μεθόξυ- ανιόν, και ακολουθεί απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα.



Σχήμα 9: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης. .

Ο μηχανισμός αυτός δεν απαιτεί το πρωτόνιο του απαρχητή, και μπορεί να έχει εφαρμογή τόσο σε N-υποκατεστημένους NCAs, όσο και σε μη υποκατεστημένους.

Παρ' ότι υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι ο μηχανισμός του Blout, «δουλεύει» κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, είναι γενικά αποδεκτό ότι ο πολυμερισμός των NCAs, με ισχυρές βάσεις, όπως το μεθοξείδιο του νατρίου, προχωρά μέσω του Μηχανισμού του ενεργοποιημένου μονομερούς.

2.3.3 Ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς [Active Monomer Mechanism (AMM)].

Αυτός ο μηχανισμός προτάθηκε πρώτα από τον Ballard^[23], για να εξηγήσει τον πολυμερισμό του NCA, της L-φαινυλαλανίνης, με απαρχητή μια τεταρτοταγή αμίνη^[24]. Αργότερα ο Swarc^[25], πρότεινε το μηχανισμό αυτό για περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως απαρχητές ισχυρές βάσεις. Σε περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται τεταρτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες, όπως και ισχυρές βάσεις ως απαρχητές, πιστεύεται ότι οι δύο μηχανισμοί, του ενεργοποιημένου μονομερούς και ο κανονικός μηχανισμός αμίνης, συνυπάρχουν. Παρακάτω δίνονται τα στάδια του μηχανισμού.

❖ Στάδιο προέναρξης

Εδώ ο απαρχητής δεν δρα σαν πυρηνόφιλο, όπως στον NAM, αλλά περισσότερο σαν βάση, αφαιρώντας ένα πρωτόνιο από το 3-N του NCA, δημιουργώντας, το αντίστοιχο ανιόν. Σ' αυτόν 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.

❖ 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⁽⁻⁾.

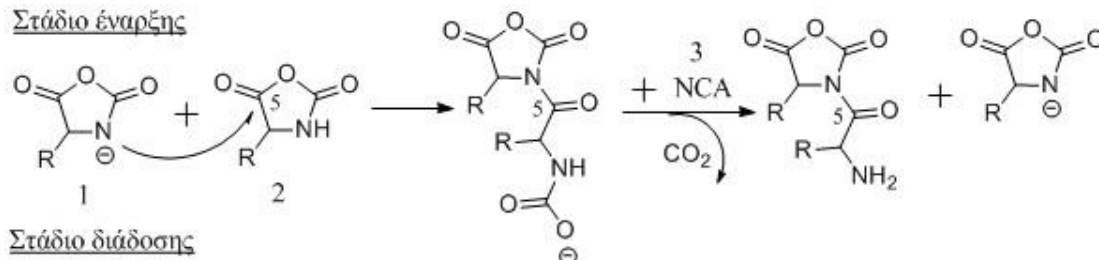
❖ Στάδιο Διάδοσης

Κατά το στάδιο της διάδοσης με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω, δημιουργείται σε κάθε βήμα ανιόν που προσβάλλει τον επόμενο NCA, κ.ό.κ

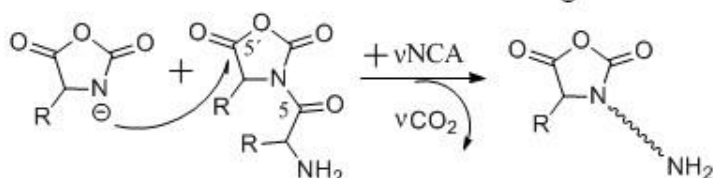
Στάδιο προέναρξης



Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



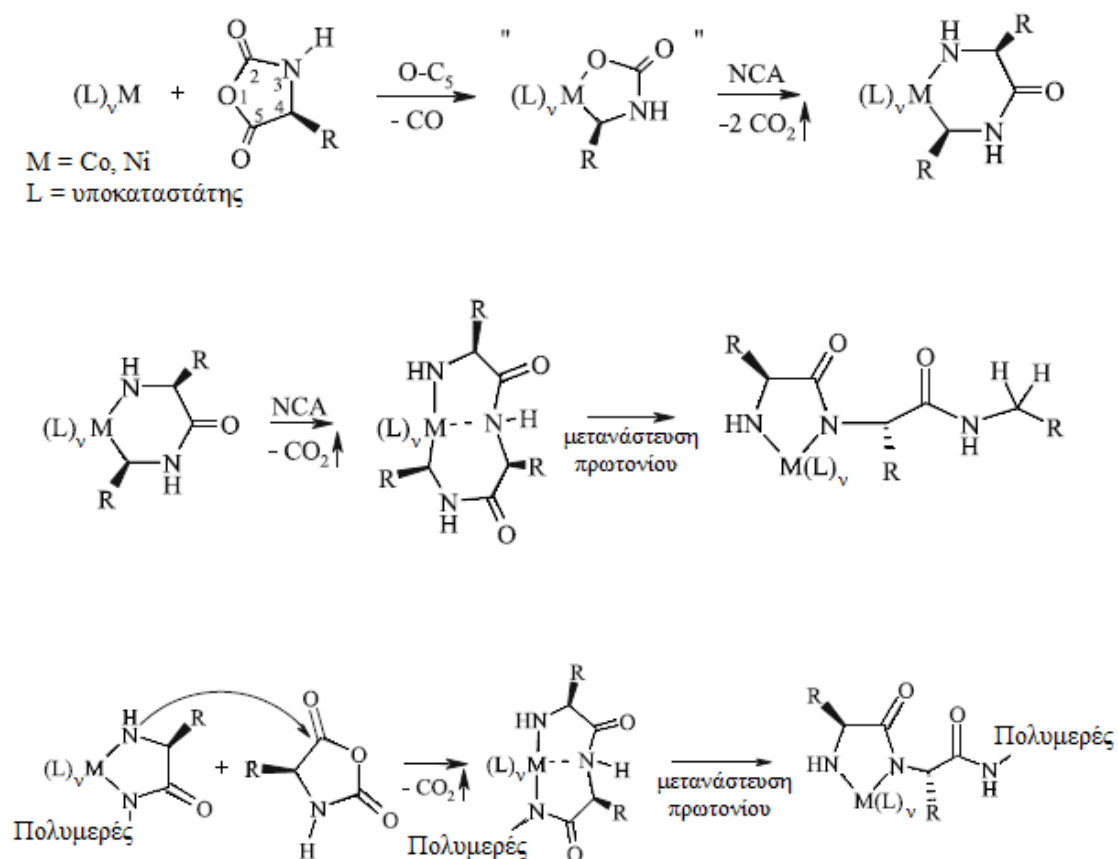
Σχήμα 10: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς.

2.3.4 Σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης βασισμένα στο Co και το Ni

Μέχρι το 1997, οι προσπάθειες να συντεθούν πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους, με καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και μικρή κατανομή, ήταν ανεπιτυχείς, λόγω των παράπλευρων αντιδράσεων. Ο Deming^{[26]-[28]}, κατάφερε κάτι τέτοιο προτείνοντας μια νέα σειρά απαρχητών, βασισμένους σε οργανομεταλλικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να ξεπεράσουν τις αντιδράσεις τερματισμού.

Οι μελέτες που έγιναν πάνω στο μηχανισμό αυτό, έδειξαν ότι αυτά τα μέταλλα αντιδρούν με τον NCA, για να σχηματίσουν μεταλλοκυκλικά σύμπλοκα, με οξειδωτική προσθήκη, στους δεσμούς του ανυδρίτη. Αυτές οι αντιδράσεις οξειδωτικής προσθήκης, ακολουθούνται από, προσθήκη δεύτερου NCA για να δώσουν σύμπλοκα, που χαρακτηρίζονται ως εξαμελή άμιδο-άλκυλο μεταλλοκυκλικά. Όμως, έχει βρεθεί ότι με την προσθήκη των NCAs, κάποια

στιγμή, αυτοί οι ενδιάμεσοι εξαμελείς δακτύλιοι, μετατρέπονται σε πενταμελείς λόγω της μετανάστευσης, ενός αμιδικού πρωτονίου, στον άνθρακα που κάνει δεσμό με το μέταλλο, κάτι το οποίο απελευθερώνει το τέλος της αλυσίδας από το μέταλλο. Η διάδοση γίνεται, με την προσβολή της πυρηνόφιλης αμινομάδας στον ηλεκτρονιόφιλο C₅ (CO), ενός NCA. Η αντίδραση αυτή καταλήγει στο ένα μεταλλοκυκλικό ενδιάμεσο, με ταυτόχρονη απελευθέρωση CO₂. Με αυτόν τον τρόπο, το μέταλλο, μετακινείται σε όλο το μήκος της αναπτυσσόμενης πολυμερικής αλυσίδας, η οποία στο ενεργό της άκρο, φέρει μια ισχυρά χηλική ένωση. Ο σχηματισμός αυτών των χηλικών μεταλλοκυκλικών ενδιάμεσων κρίνεται απαραίτητος για να είναι «ζωντανός» ένας πολυμερισμός που χρησιμοποιεί μέταλλα μετάπτωσης.



Σχήμα 11: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs, με σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως.

Ο μηχανισμός που περιγράφεται παραπάνω είναι ικανός να δημιουργεί, πολυεπιπύδια με ελεγχόμενα μοριακά βάρη, καλές κατανομές μοριακών

βαρών, ενώ μπορεί να πολυμεριστεί μέσω αυτού, πληθώρα NCAs διάφορων α-αμινοξέων.

Βασικό μειονέκτημα αυτού του μηχανισμού, είναι η παρουσία μετάλλων στο τελικό πολυπεπτίδιο, κάτι που τελικά καθιστά το πολυπεπτίδιο τοξικό, άρα και αδύνατο να χρησιμοποιηθεί σε βιολογικές εφαρμογές. Επιπλέον, ο μηχανισμός αυτός απαιτεί μόνο μη N-υποκατεστημένους NCAs, καθώς απαιτείται το πρωτόνιο στο 3-N.

2.3.5 Πρωτοταγείς αμίνες και τεχνικές υψηλού κενού

Το 2004, η ερευνητική ομάδα Ιατρού, Αλiferis, Chadjichristidis^[29] παρουσίασε τον πρώτο «ζωντανό πολυμερισμό» των NCA, χρησιμοποιώντας πρωτοταγείς αμίνες σαν απαρχητές, με την τεχνική του υψηλού κενού. Η αναγκαιότητα αυτών των τεχνικών οφείλεται στην ευαισθησία των απαρχητών και των μακροανιόντων που δημιουργούνται, στα ίχνη του νερού, του διοξειδίου του άνθρακα, του οξυγόνου, και άλλων δραστικών προσμίξεων^{[29],[30]}. Η χρήση αυτών των τεχνικών είναι επίσης αποτελεσματική σε περιπτώσεις που η διάρκεια της αντίδρασης είναι μεγάλη. Οι αδρανείς ατμοσφαιρικές συνθήκες δεν είναι ικανές να εξασφαλίσουν υψηλή καθαρότητα στο σύστημα και να το διατηρήσουν για πολύ καιρό.

Η τεχνική του υψηλού κενού, αντιμετωπίζει επαρκώς όλα εκείνα τα προβλήματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τον μηχανισμό NAM. Την ευαισθησία δηλαδή, σε προσμίξεις όπως τα υδροχλωρικά άλατα και ακυλοχλωρίδια που προέρχονται από τη σύνθεση των NCA, που οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού, όπως επίσης και σε άλλα είδη που μπορούν να εκκινήσουν πολυμερισμό όπως το νερό και άλλες αμίνες που τυχόν υπάρχουν, δίνοντας έτσι μεγάλες κατανομές στα τελικά πολυμερή που συντίθενται.

Χρησιμοποιώντας τις τεχνικές υψηλού κενού, οι διαλύτες και οι απαρχητές με χαμηλό σημείο βρασμού (όπως το DMF και η n-εξυλαμίνη), καθαρίζονται επαρκώς. Όταν ένας διαλύτης αποστάζει σε θερμοκρασία 153° C, αποσυντίθεται. Υπό κενό, αυτή η απόσταξη γίνεται σε πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία (35 – 45 °C) και έτσι αποφεύγεται η ύπαρξη των προϊόντων της αποσύνθεσής του.

Ο καθαρισμός του μονομερούς είναι πολύ απαιτητικός. Οι περισσότεροι NCA απαντούν σε στερεή μορφή και απαιτούν, προσεκτικές επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις υπό κενό, για να αποφευχθεί η επαφή με την υγρασία του αέρα, για τον καθαρισμό τους.

Η απόδειξη για την καθαρότητα του συστήματος με τη χρήση των τεχνικών υψηλού κενού, είναι, η παραμονή, του NCA, για μεγάλο χρονικό διάστημα μέσα σε διαλύτη DMF, χωρίς να συμβεί πολυμερισμός ή αποσύνθεση.

Μια παράμετρος-κλειδί για την επιτυχία ενός ζωντανού Πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCA, είναι ο περιορισμός της ύπαρξης του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται κατά το στάδιο της διάδοσης. Λόγω της μικρής διαλυτότητας του διοξειδίου του άνθρακα σε διαλύτες όπως το DMF, η αποκαρβοξυλίωση του καρβονικού οξέος, δεν συμβαίνει ακαριαία, με αποτέλεσμα, κάποια ενεργά κέντρα να παραμένουν όπως είναι ή άλλα να δημιουργούν άλατα με τις ενεργές αμίνες. Και στις δυο περιπτώσεις οι δομές που δημιουργούνται είναι απενεργοποιημένες, και οδηγούν σε αντιράσεις τερματισμού και σε μη ολοκληρωμένο πολυμερισμό. Γι' αυτό η απαέρωση του συστήματος με τη βοήθεια του υψηλού κενού κρίνεται απαραίτητη.

Η τεχνική αυτή είναι γενική και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον πολυμερισμό υποκατεστημένων και μη υποκατεστημένων NCA. Επιπλέον, η τεχνική υψηλού κενού, έχει μεγάλες δυνατότητες σε ότι αφορά τη σύνθεση καλά καθορισμένων, όμο- και συμπολυεπιπιδίων με πολύπλοκες μακρομοριακές αρχιτεκτονικές^{[29],[30],[31]}. Επιτυγχάνεται μέσω των τεχνικών υψηλού κενού, αυτό που χαρακτηρίζεται ως ζωντανός πολυμερισμός.

Για να χαρακτηριστεί ως ζωντανός ένας πολυμερισμός θα πρέπει να πληροί συγκεκριμένες προϋποθέσεις^[32] :

- ❖ Πλήρης πολυμερισμός του μονομερούς,
- ❖ Γραμμικότητα του μοριακού βάρους M_n , με την απόδοση του πολυμερισμού, αυτό προϋποθέτει να μην συμβαίνουν παράπλευρες αντιδράσεις στο διάλυμα του πολυμερισμού.
- ❖ Στοιχειομετρικός έλεγχος του μοριακού βάρους

- ❖ Μικρή κατανομή μοριακών βαρών, θα πρέπει η ταχύτητα έναρξης να είναι πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάδοσης του πολυμερισμού.
- ❖ Σύνθεση κατά συστάδων συμπολυμερών με διαδοχική προσθήκη μονομερών.

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

Ο πρώτος που μίλησε για NCAs α-αμινοξέων, και συνέθεσε τον πρώτο NCA, ήταν ο Leuch's το 1906. Η αντικατάσταση των καρβοξυλικών ομάδων των οξέων από έναν υποκαταστάτη-δέκτη ηλεκτρονίων (όπως ένα αλογονο, πχ Cl) αυξάνει την πολικότητα, της καρβονυλικής ομάδας και επομένως αυξάνει και ο ηλεκτρονιόφιλος χαρακτήρας του ατόμου του άνθρακα. Οι συχνά χρησιμοποιούμενες αλκυλόξυκαρβονυλο- προστατευτικές ομάδες προσβάλλουν μέσω του πηρηνόφιλου οξυγόνου, το ηλεκτρονιόφιλο καρβονύλιο, σχηματίζοντας N-καρβοξυανυδρίτες.

Η μέθοδος του Leuchs, με κάποιες βελτιώσεις, χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα, για τη σύνθεση ορισμένων NCA. Η θερμοκρασία της αντίδρασης θα πρέπει να είναι υψηλή, 70- 90°C, καθώς εκεί έχει παρατηρηθεί ότι προχωρά η αντίδραση της κυκλοποίησης, παρ' όλα αυτά υπάρχει κίνδυνος διάνοιξης του δακτυλίου λόγω της μεγάλης ευαισθησίας των NCA σε μεγάλες θερμοκρασίες.

Το 1922, για πρώτη φορά εφαρμόστηκε η σύνθεση των NCA, μέσω φωσγενίου, από τον Fuchs, και στη συνέχεια οι Farthing, Coleman και Levy^{[33], [34],[35]}, τροποποίησαν τη σύνθεση αυτή ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί και στη σύνθεση άλλων N- καρβοξυανυδριτών. Πρόκειται για μια αντίδραση φωσγενίωσης η οποία πραγματοποιείται σε ένα στάδιο, και έχει επικρατήσει με την ονομασία μέθοδος «Fuchs- Farthing».

Κατά τη διαδικασία αυτή, το αμινοξύ αντιδρά με το φωσγένιο, σχηματίζοντας γρήγορα το ασταθές ενδιάμεσο, του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, το οποίο δεν απομονώνεται συνήθως, και κατευθείαν μετατρέπεται σε N-καρβοξυανυδρίτη, ενώ ταυτόχρονα εκλύεται HCl.

Σημαντικό ρόλο στην αντίδραση παίζουν, ο διαλύτης, η θερμοκρασία, αλλά και ο χρόνος της αντίδρασης, γιατί ενδέχεται να συμβούν παράπλευρες αντιδράσεις.

Επιπλέον, ο βρωμιούχος φώσφορος χρησιμοποιήθηκε ως μέσω αλογόνωσης, α-αμινοξέων για το σχηματισμό NCAs, καθώς το Br θεωρείται καλή αποχωρούσα ομάδα, όπως επίσης χρησιμοποιήθηκε και το θειόνυλοχλωρίδιο.

Η χρήση του SOCl_2 , έχει το πλεονέκτημα ότι τα προϊόντα της αντίδρασης, εκτός από το χλωριωμένο α-αμινοξύ, είναι πτητικά, είναι δηλαδή υδροχλώριο (HCl) και διοξείδιο του θείου (SO_2), και απομακρύνονται εύκολα.

2.5 Προστασία της α- αμινομάδας των NCAs^[36].

Για να αποφευχθούν όλες οι παράπλευρες αντιδράσεις που μπορεί να υπάρξουν κατά τη διάρκεια ενός πολυμερισμού, και να ληφθεί το επιθυμητό πεπτίδιο, κρίνεται αναγκαία η προστασία της α-αμινομάδας.

Για να προστατευτεί μια αμινομάδα πρέπει να μειωθεί δραστικά ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας της, μετατοπίζοντας την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του αζώτου σε έναν κατάλληλο αντικαταστάτη υδρογόνου ή αποκρύπτοντάς τη πίσω από κάποιον στερεοχημικό παρεμποδιστή.

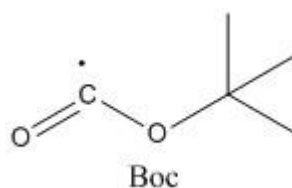
Οι ομάδες «ουρεθανικού τύπου» είναι μια μεγάλη κατηγορία προστατευτικών ομάδων, οι οποίες όταν προσδένονται στην αμινομάδα, τη μετατρέπουν σε αλκόξυ- καρβόνυλ-αμινο παράγωγα, που ονομάζονται ουρεθάνες ή καρβαμίδια. Τα παράγωγα αυτά είναι ταυτόχρονα και αμίδια και εστέρες. Σαν αμίδια έχουν μειωμένο πυρηνόφιλο χαρακτήρα στο άζωτο, ενώ σαν εστέρες μπορούν να μετατραπούν σε καρβαμιδικά οξέα. Αντιπροσωπευτικά δείγματα της κατηγορίας αυτής είναι, 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 αποδοτικότητάς τους, παρ' όλα αυτά υπάρχουν κι άλλες εξίσου αποδοτικές,

όπως είναι η τριφαίνυλο- (Tft), η τοζυλομάδα (Tos-), η 2-νίτρο-φαίνυλο-σουλφαίνυλομάδα (Nps), η φθαλιμιδομάδα κ.ά.

❖ Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα ή Z- ομάδα

Πήρε το ονομά της από τον έλληνα χημικό Λ. Ζέρβα, ο οποίος την ανακάλυψε, το 1932 και έδωσε το έναυσμα για την περαιτέρω προσπάθεια εύρεσης της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας ανάλογα με το αμινοξύ που πρόκειται να προστατευτεί. Η απομάκρυνσή της μπορεί να γίνει με καταλυτική υδρογόνωση, η οποία όμως είναι απαγορευτική σε πεπτίδια που περιέχουν θειούχα αμινοξέα, γιατί το θείο δηλητηριάζει τον καταλύτη. Επιπλέον μπορεί να απομακρυνθεί με επίδραση νατρίου (Na) σε υγρή αμμωνία, με επίδραση υδροβρωμίου (HBr) σε οξικό οξύ, ή τριφθοροξικού (TFA) με βρασμό. Η ομάδα αυτή είναι αρκετά διαδεδομένη, γιατί παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως το ότι ο πεπτιδικός δεσμός δεν επηρεάζεται από τις συνθήκες απομάκρυνσής της, τα πεπτίδια που λαμβάνονται έχουν κρυσταλλική δομή.

❖ Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc-ομάδα)



Σχήμα 12: Η Boc ομάδα

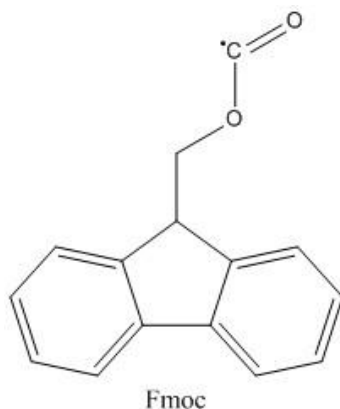
Η Boc ομάδα εισήχθη στη βιβλιογραφία το 1957 από τον Carpio, και άμεσα βρήκε εφαρμογή στην πεπτιδική σύνθεση. Η ομάδα αυτή είναι σταθερή σε συνθήκες καταλυτικής υδρογόνωσης, και γενικότερα σε αναγωγικά μέσα, είναι όμως περισσότερο ασταθής στα οξέα από την Z- ομάδα. Ενώ πυρηνόφιλα και βάσεις, δεν ασκούν καμία επίδραση πάνω της, ακόμα και μετά από εκτεταμένη έκθεση σ' αυτά.

Η διάσπασή της επιτυγχάνεται με διάλυση του προστατευμένου πεπτιδίου σε TFA, τα προϊόντα που σχηματίζονται είναι πτητικά και απομακρύνονται εύκολα. Στην περίπτωση που είναι παρόντα αμινοξέα με ευαίσθητες πλευρικές ομάδες, τότε προστίθενται δεσμευτές (scavengers), οι οποίοι αντιδρούν με τα αρχικά σχηματιζόμενα καρβοκατιόντα.

❖ 2-(π-Διφαίνυλο)-2-προπυλοξυκαρβονυλομάδα (Broc)

Η συγκεκριμένη ομάδα, δίνει το πλεονέκτημα της ήπιας αποπροστασίας. Δηλαδή χρειάζεται πολύ ήπια οξέα για να αποπροστατευτεί, όπως 0,5% χλωρο-οξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο, αφήνοντας ανέπαφες άλλες ομάδες ευαίσθητες στα οξέα, όπως η Boc ή η Z-ομάδα.

❖ 9-φλουορένυλομεθόξυκαρβόνυλο (Fmoc)

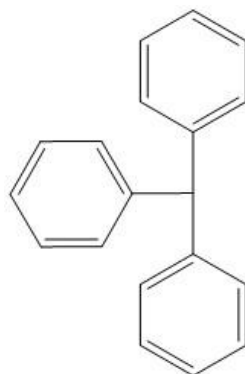


Σχήμα 13: Η Fmoc ομάδα

Είναι η μοναδική ομάδα από αυτές του τύπου ουρεθάνης, που είναι ευαίσθητη σε βασικές συνθήκες, γεγονός που δίνει αρκετές δυνατότητες όταν πρόκειται για συνδυασμό προστατευτικών ομάδων. Συνήθως η αποπροστασία γίνεται σε 20% πιπεριδίνη σε DMF, για μερικά δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου.

❖ Προστατευτικές ομάδες άλκυλο-τύπου

Η σημαντικότερη από αυτές είναι η τριφαίνυλομεθυλομάδα ή τρίτυλομάδα (Ttt). Η ομάδα αυτή εμφανίζει εξαιρετική ευαισθησία στα οξέα, τόσο που με απλή θέρμανση σε αραιό διάλυμα οξικού οξέος, είναι δυνατή η απομάκρυνσή της. Αντίθετα παρουσιάζει έντονη σταθερότητα έναντι των βάσεων και της υδραζίνης.



Σχήμα 14: Η τρίτυλο- ομάδα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

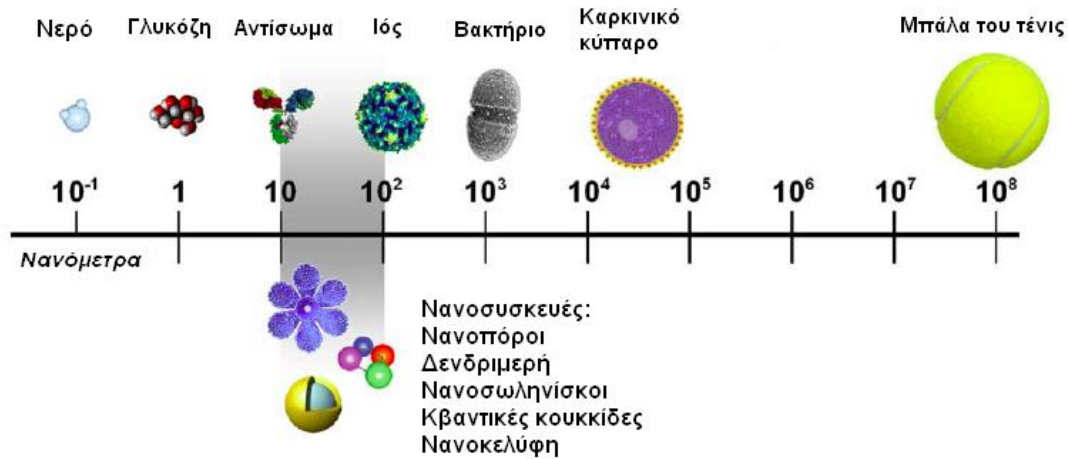
ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (DRUG DELIVERY)

3.1 Νανοτεχνολογία

3.1.1 Τι είναι η νανοτεχνολογία

Νανοτεχνολογία^[37] είναι ο τομέας της επιστήμης που αφορά στην ανάπτυξη και χρήση υλικών με τα οποία μπορούν να παρασκευασθούν και να χρησιμοποιηθούν συσκευές και προϊόντα τα οποία να έχουν διαστάσεις της τάξης του δισεκατομμυριοστού του μέτρου, διαστάσεις μεγέθους τάξης μερικών δεκάδων ατόμων, δηλαδή δομές οι οποίες δεν υπακούουν στους νόμους της Κλασσικής Μηχανικής, αλλά της Κβαντομηχανικής, δομές με τις οποίες αγγίζουμε τα όρια του κόσμου που ζούμε (Εικόνα 4). Τα νανοσωματίδια και τα νανο-υλικά παρουσιάζουν καινοτόμες ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθός τους.

Στην επιστήμη και την τεχνολογία, το πρόθεμα «νάνο» (από την ελληνική λέξη νάνος) σημαίνει $10^{-9} = 0,000000001\text{m}$. Ένα νανόμετρο (nm) ισούται με ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου, είναι δηλαδή δεκάδες χιλιάδες φορές μικρότερο από το πάχος της ανθρώπινης τρίχας. Ο όρος νανοτεχνολογία χρησιμοποιείται εδώ ως περιληπτικός όρος, και καλύπτει τους διάφορους κλάδους νανοεπιστημών και νανοτεχνολογιών. Η νανοτεχνολογία αναφέρεται στην επιστήμη και τεχνολογία που αναπτύσσεται σε κλίμακα μορίων και υπερμοριακών συστημάτων (νανοκλίμακα), καθώς και σε επιστημονικές αρχές και νέες ιδιότητες για την κατανόηση σε βάθος των λειτουργιών και των δυνατοτήτων της ύλης σε αυτή την κλίμακα μεγέθους. Ταυτόχρονα, με την εξέλιξη και άλλων επιστημών η νανοτεχνολογία αναμένεται να σημειώσει σημαντική πρόοδο στην ανάπτυξη βιοϊατρικών εφαρμογών, όπως η γονιδιακή θεραπεία, η στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, ή η ανακάλυψη νέων φαρμάκων.



Εικόνα 4: Μεγέθη νανοσυσκευών, μορίων και βιολογικών οντοτήτων.

3.1.2 Βιο-Εφαρμογές της Νανοτεχνολογίας

Η νανοτεχνολογία βρίσκει εφαρμογή σε ένα ευρύ πεδίο επιστημών όπως είναι η ενέργεια ή η μικροηλεκτρονική. Στην παρούσα εργασία θα μελετηθούν οι βιολογικές εφαρμογές της^{[37],[38],[39]}.

Συγκεκριμένα οι τομείς της ιατρικής και φαρμακευτικής που μπορεί να έχει εφαρμογή η νανοτεχνολογία είναι οι εξής:

- ❖ Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων (drug delivery): Τα οχήματα μεταφοράς φαρμάκων, που το μέγεθος τους βρίσκεται στη νανοκλίμακα, μπορούν: 1) να ενισχύσουν τη θεραπευτική ικανότητα ενός φαρμάκου, μειώνοντας τις παρενέργειες, που σχετίζονται με τα διαθέσιμα φάρμακα, 2) να ενθαρρύνουν την επαναδιερεύνηση νέων μοριακών οντοτήτων, που δεν μπορούν να χορηγηθούν απ'ευθείας στον άνθρωπο, λόγω των μη βέλτιστων φαρμακολογικών ιδιοτήτων, που όμως, είναι βιολογικά ενεργές αλλά μέχρι στιγμής θεωρούνταν μη αναπτύξιμες.
- ❖ Στη διαγνωστική: οι νανο-«αισθητήρες» (όπως νανωσληνές ή νανωσματοίδια), μπορούν να επιτρέψουν τη γρήγορη και υψηλή απόδοση ανίχνευσης των βιοδεικτών μιας νόσου, με πολύ μεγάλη ευαισθησία και μικρή απαίτηση δείγματος. Η νανοτεχνολογία επιπλέον δίνει ελπίδα για την έγκαιρη διάγνωση ιών, βακτηρίων, καρκινικών κυττάρων, όσο και της ανάλυσης κυττάρων.

- ❖ In vivo απεικόνιση: με τη χρήση μορίων-στοχευμένων «διερευνητών», (όπως μαγνητικά νανοσωματίδια ή νανοσωλήνες) μπορούν να παρέχουν έγκυρο και ακριβή τρόπο διάγνωσης ασθενειών όπως ο καρκίνος καθώς και παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου.
- ❖ Θεραπευτικές τεχνικές: ορισμένα νανοϋλικά, έχουν μοναδικές θεραπευτικές ικανότητες, που διαφέρουν από τα συνηθισμένα φάρμακα, όπως τα νανοσωματίδια χρυσού που μπορούν να ενισχύσουν την ακτινοθεραπεία, ή οι νανοσωλήνες και τα μαγνητικά νανοσωματίδια που μπορούν να προκαλέσουν υποθερμία και να σκοτώσουν καρκινικά κύτταρα ή τα νανοσωματίδια αργύρου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες.
- ❖ Βιοϋλικά: Βιοσυμβατά νανοϋλικά που έχουν πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιατρικά εμφυτεύματα, στην οδοντιατρική ή ως υποκατάστατα οστών ή εμφυτεύματα ιστών.

3.2 Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων

3.2.1 Εισαγωγή

Η μη εκλεκτική κυτταροτοξικότητα που εμφανίζουν τα αντικαρκινικά φάρμακα, που είναι η αιτία για τις σοβαρές παρενέργειες και τη χαμηλή ποιότητα ζωής των ασθενών, είναι αυτή που οδήγησε να στραφούν οι έρευνες στη δημιουργία «μορίων-οχημάτων», που θα κουβαλούν το φάρμακο και θα το μεταφέρουν στοχευμένα στους πάσχοντες ιστούς και κύτταρα.

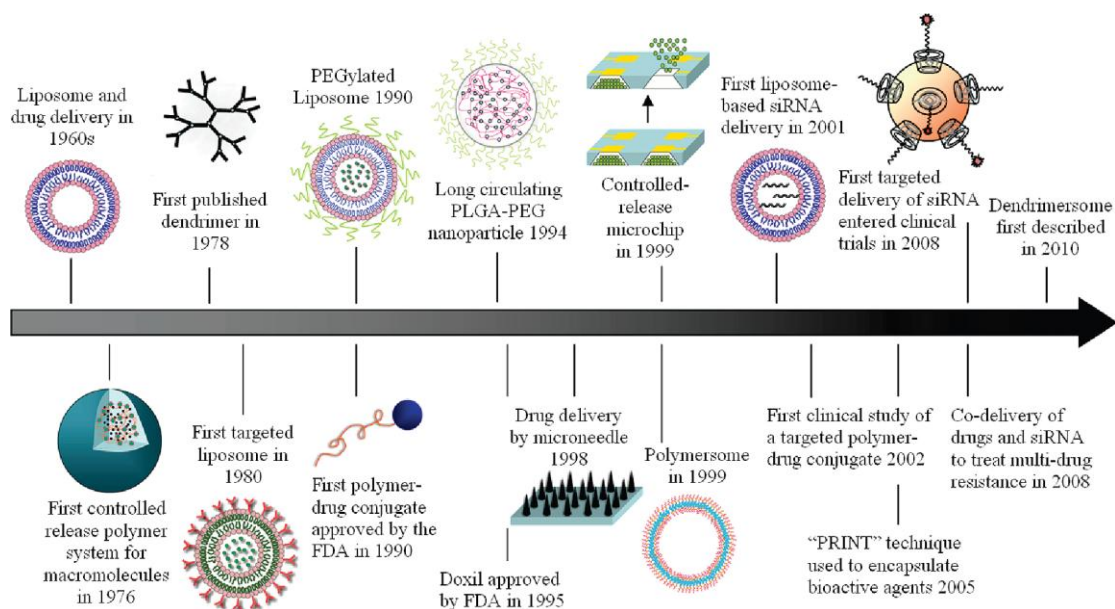
Επιπλέον, όλες οι νέες μοριακές οντότητες που εμφανίζονται στη φαρμακοβιομηχανία, κρίνονται όχι για την ισχυρή τους δραστηριότητα, που είναι και το ζητούμενο, αλλά για τη διαλυτότητά τους στο νερό ή το χρόνο ζωής τους στο αίμα. Αυτό συμβαίνει γιατί όσο μεγάλη κι αν είναι η δραστηριότητα ενός μορίου, είναι πρακτικά άχρηστη όταν αυτό δεν μπορεί να κυκλοφορήσει στο αίμα. Έτσι, λιγότερο δραστηριές ουσίες, αλλά με χαρακτηριστικά που να μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό, προτιμούνται για εξέλιξη. Σε κάθε περίπτωση, υπάρχει πάντα ένα επίπεδο συμβιβασμού, που μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή μη ιδανικών φαρμάκων. Έτσι, η ανάγκη να μεταφέρονται στοχευμένα σε συγκεκριμένα κύτταρα και

ιστούς, φαρμακευτικές ουσίες, ξεπερνώντας τα εμπόδια που βάζει ο οργανισμός σε οτιδήποτε ξένο, αποτέλεσε το κίνητρο για την εκτενή έρευνα στο πεδίο που ονομάζεται «drug delivery»^[37].

Το 1960 ήταν η πρώτη φορά που περιγράφηκαν τα λιποσώματα, και προτάθηκαν ως μεταφορείς φαρμάκων και πρωτεϊνών. Σήμερα η νανοτεχνολογία έχει κάνει άλματα στην ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων. Συγκεκριμένα, γι' αυτό το σκοπό έχουν σχεδιαστεί πολυμερικά βιοαποικοδομήσιμα νανοσωματίδια, πολυμερικά μικκύλια, δενδριμερή κ.ά (Εικόνα 5).

Η μεταφορά ενός φαρμάκου με μόριο ειδικά σχεδιασμένο, επιδιώκεται να εξασφαλίσει την αύξηση του χρόνου ημιζωής του στο αίμα, τη βελτίωση της διαλυτότητας του όταν πρόκειται για υδρόφοβο φάρμακο, τη μείωση της ανοσογονικότητας και τη μεταφορά του σε συγκεκριμένο στόχο.

Έτσι ο όρος «Drug delivery», περιλαμβάνει το σχεδιασμό και τη σύνθεση μορίων με χημικά χαρακτηριστικά τέτοια που να μπορέσουν να το φέρουν όσο πιο κοντά στο κύτταρο-στόχο, αλλά και να το καταστήσουν ικανό να εγκλωβίσει φάρμακο.



Εικόνα 5: Εξέλιξη της Νανοτεχνολογίας από το 1960 έως σήμερα.

3.2.2 Πολυπεπτίδια σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Τα υλικά που δομούνται από πολυπεπτίδια είναι ιδανικά για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, χάρη στη βιοσυμβατότητα, τη βιοαποικοδομησιμότητα τους, την αρχιτεκτονική της δομής τους καθώς και το ότι είναι ικανά να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές^[40]. Τα αμφίφιλα πολυπεπτιδικά υλικά μπορούν να αυτοοργανώνονται, σε μια πληθώρα από διαφορετικές αρχιτεκτονικές μέσα από διάφορες αλληλεπιδράσεις, έχοντας την ικανότητα να εγκλωβίζουν και να μεταφέρουν φάρμακα. Υιοθετώντας συγκεκριμένες διαμορφώσεις, όπως α-έλικα ή β-φύλλο, είναι πιο πιθανό να σχηματίσουν συγκεκριμένες νανοδομές. Η αυτοοργάνωση των αμφίφιλων πολυμερών μπορεί να σχεδιαστεί αν ελεγχθούν παράγοντες όπως η αναλογία υδρόφοβων-υδρόφιλων, το μοριακό βάρος και η χημική φύση.

Μέχρι στιγμής έχουν δημοσιευτεί μια σειρά από συστήματα μεταφοράς φαρμάκων που βασίζονται στα πολυπεπτίδια. Σχηματίζουν δομές όπως μικκύλια, ίνες, κυστίδια, δένδρομερή. Πολλά από αυτά βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές. Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας έτσι ώστε το τελικό προϊόν σε ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκου, να έχει επιπρόσθετα χαρακτηριστικά εκτός από τη βιοσυμβατότητα: να παραμένει σταθερό όταν διαλύεται σε βιολογικά μέσα, να έχει ιδιότητες που θα το κάνουν «αόρατο», για το ενδοθηλιακό δίκτυο, και να κατευθύνεται σε συγκεκριμένα κύτταρα- στόχους, είναι υπό διερεύνηση.

3.2.2.1 Συστήματα Πολυπεπτιδίων που αποκρίνονται σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο σχεδιασμό και τη σύνθεση πολυπεπτιδίων που μπορούν να οξειδώνονται ή να ανάγονται, ανάλογα με τον αντίστοιχο παράγοντα που υπάρχει στο περιβάλλον τους. Τα πολυπεπτίδια αυτά έχουν συνήθως δισουλφιδικούς δεσμούς, είτε στην κύρια αλυσίδα, είτε στην πλευρική, είτε γίνεται συμπολυμερισμός με μόριο που έχει στη δομή του δισουλφιδικούς δεσμούς.

Συγκεκριμένα, παραδείγματα μπορούν να αποτελέσουν τα συστήματα που συντέθηκαν από τον Kataoka^[41] και την επιστημονική ομάδα του. Ως απαρχητής του πολυμερισμού των NCA, χρησιμοποιήθηκε πολυαιθυλενοξειδίο, για να συντεθούν πολυπεπτίδια πολυαιθυλενοξειδίο-SS-πολυ[N-(2-αμινοαιθυλο)-2-αμινοεθυλο]-α, β-ασπαρταμίδιο] και πολυαιθυλενοξειδίο-SS-πολυ(α,β-ασπαρτικό οξύ). Παρατηρήθηκε ότι οι δισουλφιδικοί δεσμοί έπαιξαν ρόλο στην αυτοοργάνωση των πολυμερών σε κυστίδια, και στις μορφολογικές τους μεταβάσεις.

3.2.2.2 Θερμο- αποκρινόμενα συστήματα πολυπεπτιδίων

Ένα παράδειγμα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια σειρά από αμφίφιλα υβριδικά συμπολυμερή θερμο-αποκρινόμενα, που συντέθηκαν από την ομάδα του Jeong : πολυαιθυλενοξειδίο-b-πολυ(αλανίνη-co-φαινυλαλανίνη), πολυαιθυλενοξειδίο-b-πολυ(φαινυλαλανίνη), πολυαιθυλενοξειδίο-b-πολυ(αλανίνη)^{[42],[43],[44],[45]}. Από τη μελέτη που έγινε βρέθηκε ότι υφίστανται μεταβολή από διάλυμα σε gel (όταν πρόκειται για υδατικό διάλυμα), με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η συσσωμάτωση των μικκυλίων, και η αλλαγή της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων, είναι πιθανώς οι λόγοι που οδηγούν σε αυτή τη μετατροπή. Η εμφάνιση τέτοιων ιδιοτήτων σε συστήματα πολυπεπτιδίων, αποτέλεσε έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη μιας πληθώρας συστημάτων. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν αντίστοιχες ιδιότητες θερμοαποκρισιμότητας, σε πολυμερή όπως η πολυτυροσίνη με απαρχητή πολυαιθυλενοξειδίο.

3.2.2.3 pH-αποκρινόμενα συστήματα πολυπεπτιδίων

Οι μεταβολές του pH του περιβάλλοντος προάγουν την πρωτονίωση-αποπρωτονίωση πολυπεπτιδίων που έχουν αμινομάδες ή καρβοξυλικά οξέα. Τα πολυπεπτίδια φαίνεται να δίνουν αντιστρεπτές μεταβολές στη διαμόρφωσή τους και την συμπεριφορά της αυτοοργάνωσής τους, κατά συνέπεια και της διαλυτότητα και τη συσσωμάτωσή τους. Το πολυ(γ- βενζυλο-L-γλουταμικό) και η πολυλυσίνη, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε pH- αποκρινόμενα

συστήματα. Το 2005 ο Lecommandoux^{[46],[47]}, χρησιμοποίησε την αυτοοργάνωση που παρουσιάζει το συμπολυμερές του πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικού)-b-πολυ(λυσίνη) για να συνθέσει pH αποκρινόμενα κυστίδια. Σε διάφορα pH από 4 έως 10, η διαμόρφωσή τους αλλάζει από α-έλικα σε τυχαίο σπείραμα, αντίστροφα μεταξύ τους, και αντίστοιχα επηρεάζεται και το μέγεθος των κυστιδίων. Λόγω της αντίστροφης συμπεριφοράς των δυο συστάδων καθώς αυξάνεται το pH, η κατηγορία αυτών των μικκυλίων ονομάστηκε «σχιζοφρενή μικκύλια».

Ενώ πολλά συμπολυμερή πεπτιδίων έχει βρεθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση pH- αποκρινόμενων συστημάτων, όπως, η πολυ(λυσίνη)-b-πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικό)-b-πολυ(λυσίνη), πολυ(λυσίνη)-b-πολυ(φαινυλαλανίνη), πολυ(λυσίνη)-b-πολυ(γλυκίνη) και πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικό)-b-πολυ(φαινυλαλανίνη). Ενώ εξέχουσα θέση κατέχει η πολυ(ιστιδίνη), με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο, που μπορεί να πρωτονιώνεται και να αποπρωτονιώνεται. Το πολυπεπτίδιο αυτό και η σημασία του αναλύονται εκτενώς παρακάτω.

3.2.2.4 Φωτο-αποκρινόμενα συστήματα πολυπεπτιδίων

Συνήθως φωτοαποκρινόμενα πολυπεπτίδια συντίθενται, ενσωματώνοντας στο ίδιο το πολυπεπτίδιο, ομάδες όπως αζωβενζόλια, σπιροπυράνια, κουμαρίνη, 2-νιτρο-βενζυλομάδα^{[48],[49]}. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το φωτο αποκρινόμενο, πολυ(μεθυλ-γ-βενζυλο-L-γλουταμικό), το οποίο συντέθηκε με τη χρήση αζωβενζολίου ως απαρχητή^[50].

Κάποια πολυπεπτίδια όπως η πολυ-L-φαινυλαλανίνη, πολυ(L-ασπαρτικό), πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικό), πολυ(L-λυσίνη), πολυ(L-ορνιθίνη) και ανάλογα της πολυ(L-λυσίνης), με ενσωματωμένο αζωβενζόλιο και σπιροπυράνιο, παρουσίασαν φωτοχρωμική συμπεριφορά. Όταν εκτέθηκαν σε ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος, παρουσίασαν αλλαγές στη δομή και τη διαμόρφωσή τους, συσσωμάτωση- αποσυσσωμάτωση (με την απομάκρυνση της ακτινοβολίας), αντιστρεπτές αλλαγές στο ιξώδες και τη διαλυτότητα^{[51],[52],[53]}.

Συνεπώς, τα πολυπεπτίδια αποτελούν άριστα υλικά για τη σύνθεση πιο σύνθετων δομών όπως κυστιδίων, νανοσωματιδίων, που προορίζονται για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, όπως τα αντικαρκινικά φάρμακα, στον ανθρώπινο οργανισμό.

3.3 Δικτυωμένα πολυμερικά νανοσωματίδια (Nanogels)

Ένα από όλα τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων που αναπτύσσονται είναι και αυτό των nanogel και συγκεκριμένα το ενδιαφέρον έχει στραφεί πλέον στα πολλαπλά αποκρινόμενα nanogel. Πρόκειται για δικτυωμένα πολυμερικά νανοσωματίδια, που έχουν την ικανότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα, αλλάζοντας τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως τον όγκο, την υδροφιλικότητα ή υδροφοβικότητα, τη διαπερατότητα, το δείκτη διάθλασής τους. Το πρόθεμα του ονόματός τους, νανο- υποδηλώνει ότι πρόκειται για συστήματα συνήθως, με μέγεθος από 1 έως 100 nm, αν και τα όρια δεν είναι τόσο στενά, μπορεί να πρόκειται και για μεγαλύτερα νανοσωματίδια, μέχρι 1000 nm, ανάλογα με τις ανάγκες και το σκοπό για τον οποίο προορίζεται το κάθε σύστημα. Τα nanogel συντίθενται από πολυμερή, τα οποία είναι δικτυωμένα με κάποιον τρόπο. Συγκρινόμενα, με άλλα σωματίδια που προορίζονται για μεταφορά φαρμάκων, αυτά φαίνεται να υπερέχουν καθώς μπορούν να εγκλωβίζουν περισσότερο φάρμακο λόγω της δομής τους, έχουν μεγάλη σταθερότητα άρα έτσι εξασφαλίζεται η παρατεταμένη κυκλοφορία τους στο αίμα, και η απελευθέρωση του φαρμάκου γίνεται ελεγχόμενα καθώς επάγεται σε συγκεκριμένη στιγμή και συγκεκριμένο σημείο, από ερεθίσματα που δίνει ο ίδιος ο οργανισμός^[54]. Παρακάτω πρόκειται να εξετασθεί, το ποιά είναι τα ερεθίσματα στα οποία επιδιώκεται να αποκρίνονται ορισμένα Nanogel που έχουν δημοσιευτεί μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία καθώς και το που οφείλονται οι ιδιότητές τους αυτές.

3.4 Nanogels αποκρινόμενα σε ερεθίσματα

3.4.1 pH-αποκρινόμενα

Είναι γνωστό ότι οι τιμές του pH διαφέρουν σε διαφορετικούς ιστούς, και διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Οι περισσότεροι καρκινικοί ιστοί, καθώς είναι ιστοί που φλεγμαίνουν,

παρουσιάζουν pH διαφορετικό από το pH που έχουν οι φυσιολογικοί ιστοί. Συνήθως το pH των καρκινικών κυττάρων είναι όξινο. Συγκεκριμένα, το pH, στο εξωτερικό περιβάλλον ενός καρκινικού κυττάρου, είναι περίπου 6.5, πιο όξινο από τους γύρω φυσιολογικούς ιστούς που έχουν pH 7.4. Ενώ το pH, μέσα σε ένα καρκινικό κύτταρο, και συγκεκριμένα στα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα, είναι 5.0- 5.5, πιο χαμηλό σε σχέση με το pH του κυτοσολίου^[55]. Συνεπώς έχει μεγάλη πρακτική σημασία να ληφθεί αυτός ο παράγοντας υπόψη για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων που θα αποκρίνονται στις αλλαγές του pH. Δηλαδή, πιθανώς θα παρουσιάζουν αύξηση του όγκου τους σε συγκεκριμένο pH, θα εκμεταλλεύονται τις αλλαγές του pH, για να μεταφέρουν σε συγκεκριμένο σημείο του σώματος το φάρμακο που κουβαλούν.

Πολλά pH-αποκρίσιμα nanogel που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, συντίθενται από δικτυωμένα πολυμερή με ασθενώς όξινες ομάδες (π.χ καρβοξυλικές) ή ασθενώς βασικές (π.χ αμινομαδές), που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως δέκτες είτε ως δότες πρωτονίων ή ένα συνδυασμο και των δύο.

Ασθενώς όξινοι πολυηλεκτρολύτες, όπως το πολυακρυλικό οξύ, δέχονται πρωτόνια σε όξινο περιβάλλον και δίνουν πρωτόνια σε βασικό περιβάλλον. Η κατάσταση είναι διαφορετική όταν πρόκειται για ασθενώς βασικό πολυηλεκτρολύτη όπως η πολυ-βινυλοπυριδίνη^[56].

Άρα μια μικρή ποικιλία στο pH του περιβάλλοντος τους μπορεί, να αλλάξει το βαθμό ιοντισμού της αλυσίδας του πολυμερούς. Αύξηση ή μείωση στην οσμωτική πίεση ανάμεσα στα πολυμερικά νανοσωματίδια, βασιζόμενη στο βαθμό ιοντισμού, έχει σαν αποτέλεσμα το φούσκωμα ή μη του nanogel. Για παράδειγμα, nanogel με πυρήνα δικτυωμένο πολυμεθακρυλικό οξύ (PMA) και κέλυφος πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), (PEG-b-PMA), φουσκώνει όσο το pH αυξάνεται από το 5 έως το 9, εξαιτίας του ιοντισμού των καρβοξυλομάδων του PMA^[57]. Αντιστρόφως το μέγεθος δικτυωμένων nanogel πολυαιθυλενοξειδίου- πολυαιθυλενιμίνης, (PEG-cl-PEI), μειώνεται όσο αυξάνεται το pH από το 6.5 στο 10, εξαιτίας της αποπρωτονίωσης των αμινομάδων της πολυαιθυλενιμίνης^[58]. Έχει προκύψει σαν συμπέρασμα ότι η

ικανότητα των nanogel να διογκώνονται, μειώνεται όσο το ποσοστό της δικτύωσης μεγαλώνει^[59].

Η παράμετρος κλειδί για τα pH αποκρινόμενα πολυμερή για μεταφορά φαρμάκων είναι μια κρίσιμη τιμή pH, pH_c . Η αποκρισσιμότητα του nanogel σε αυτό το pH, μπορεί να συσχετιστεί με τιμές pH του οργανισμού, σε συγκεκριμένα κύτταρα- στόχους, όπου αυτή η αποκρισσιμότητα μπορεί να φανεί χρήσιμη για μεταφορά φαρμάκων. Το pH_c , εξαρτάται από την pK_a των ασθενώς όξινων ομάδων και από την pK_b των ασθενώς βασικών ομάδων.

Τα κατιοντικά pH-αποκρινόμενα πολυμερή διογκώνονται ή αλλιώς «φουσκώνουν» σε pH χαμηλότερο από το pK_b των αμινομάδων, ενώ τα ανιοντικά, φουσκώνουν σε pH μεγαλύτερο από το pK_a των ασθενώς όξινων ομάδων ή το pK_b των ασθενώς βασικών ομάδων. Συνεπώς το κρίσιμο pH των nanogel είναι σημαντικό εξαιτίας της μεγάλης ιοντικής ισχύος των βιολογικών υγρών ή των ασθενικών ιστών του οργανισμού^[60].

Επιπλέον, υπάρχουν pH-αποκρίσιμα πολυμερικά νανοσωματίδια τα οποία έχουν και θετικά και αρνητικά φορτία κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας. Η ξεχωριστή ιδιότητα αυτών των πολυμερών είναι ότι έχουν ισοηλεκτρικό σημείο σε υδατικό διάλυμα, κάτι το οποίο είναι ανόλογο με τη δομή των πρωτεϊνών. Ενώ φαίνεται να ευνοείται η διόγκωσή τους όταν βρίσκονται στο ισοηλεκτρικό τους σημείο.

3.4.2 Θερμο-αποκρινόμενα

Τα θερμοαποκρινόμενα nanogel παρουσιάζουν μια μεταβολή του όγκου τους, σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία η οποία είναι γνωστή ως θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου (volume phase transition temperature, VPTT). Όπου προκαλείται ξαφνική αύξηση ή μείωση του μεγέθους του σωματιδίου. Ανάλογα με τη συμπεριφορά τους στην αλλαγή θερμοκρασίας τα nanogel μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αρνητικά θερμοκρασιακά αποκρινόμενα nanogel ή αντίστοιχα σε θετικά θερμοκρασιακά αποκρινόμενα. Τα αρνητικά θερμοκρασιακά αποκρινόμενα nanogel, κυρίως συντίθενται από το πολυμερές πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) ή PNIPAM^[61]. Το μέγεθός των νανοσωματιδίων μειώνεται απότομα, όταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος

γίνεται μικρότερη από τη θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου τους. Αντίθετη συμπεριφορά έχουν τα θετικά θερμοκρασιακά αποκρινόμενα nanogel, τα οποία προτιμούνται περισσότερο για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων. Ακριβώς γιατί, η διαχύση του εγκλωβισμένου φαρμάκου από την αύξηση του όγκου του nanogel, που έχει προκληθεί από αύξηση της θερμοκρασίας πιθανώς να είναι πιο αποτελεσματική από την πίεση με την οποία θα εξέλθει ένα φάρμακο από ένα nanogel που μειώθηκε ο όγκος του. Ενώ, στα συστήματα που μειώνεται ο όγκος τους, υπάρχει πιθανότητα να μην ελευθερωθεί το φάρμακο, καθώς μπορεί να το εμποδίσει η «κλειστή» επιφάνεια του nanogel^[62].

Επιπλέον απαιτείται τα nanogel να έχουν μια θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου, μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία του οργανισμού, όπως η θερμοκρασία που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα που φλεγμαίνουν, 41°C, έτσι ώστε να αποτελέσουν στόχο τα κύτταρα αυτά.

Τα PNIPAM που έχουν μελετηθεί πιο πολύ ως τώρα για αυτή τους την ιδιότητα, παρουσιάζουν θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου στους 33°C, θερμοκρασία προφανώς μικρότερη από τη θερμοκρασία του ανθρώπινου οργανισμού^[63].

3.4.3 Φωτο-αποκρινόμενα

Τα φωτοαποκρινόμενα nanogel, μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες.

Τα nanogel εκείνα που συντίθενται από φωτοαποκρινόμενα πολυμερή, με φωτοενεργές ομάδες, όπως το αζωβενζόλιο. Αυτές οι φωτοευαίσθητες ομάδες, αλλάζουν σχήμα και μέγεθος ή ιοντική ισχύ κατά την ακτινοβολία^[64]. Για παράδειγμα, τα cis και trans ισομερή του αζωβενζολίου, μπορούν να ενεργοποιηθούν με υπεριώδη ακτινοβολία, η οποία καλύπτει την π-π* μετάβαση που πρέπει να γίνει για να γίνει η trans διαμόρφωση cis. Κατά την έκθεση στην ακτινοβολία, τα nanogel που συντίθενται από τα φωτοαποκρινόμενα πολυμερή, σίγουρα θα εμφανίσουν αλλαγή φάσης, η οποία θα προάγεται από τις αλλαγές της δομής ή της πολικότητας των λειτουργικών ομάδων. Παρ'όλα αυτά, η κατηγορία αυτή των nanogel δεν έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, καθώς η

υπεριώδης ακτινοβολία που χρησιμοποιείται, απορροφάται ισχυρά απο το δέρμα, άρα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εσωτερικούς ιστούς.

Η άλλη κατηγορία των φωτο-αποκρινόμενων nanogels, είναι ένα υβριδικό σύστημα που αποτελείται από νανοσωματίδια ευγενών μετάλλων και από θερμοκρασιακά αποκρινόμενα πολυμερή. Όταν το nanogel εκτίθεται στην υπεριώδη ακτινοβολία, το ευγενές μέταλλο, όπως ο άργυρος (Ag) ή ο χρυσός (Au), την απορροφά και τη μετατρέπει σε θερμότητα, που προάγει μια αλλαγή φάσης στα θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή.

Τέτοια nanogel έχουν σχεδιαστεί για να χρησιμοποιηθούν σε φωτο-θερμικές θεραπείες. Τα πιο γνωστά, είναι αυτό που συντέθηκε από την ομάδα του Nidome^[65], βασισμένο σε PNIPAM και νανοσωματίδια χρυσού, και αυτό που συντέθηκε από την ομάδα του Nagasaki^[66], το οποίο διαθέτει ένα δικτυωμένο πυρήνα από πόλυ[2-(N,N-δισουλφαμινο)-εθυλο μεθακρυλικό οξύ], στον οποίο βρίσκονται νανοσωματίδια χρυσού, και ο πυρήνας περιτριγυρίζεται από κέλυφος πολυαιθυλενοξειδίου. Τα nanogel μελετήθηκαν και δεν παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα, έτσι προορίζονται για να χρησιμοποιηθούν σε συμπληρωματική της χημειοθεραπείας, θερμική θεραπεία.

Επιπλέον η ομάδα του Zhou^[67], έχει συνθέσει ένα υβριδικό nanogel, με δικτυωμένο πυρήνα, και κέλυφος πολυαιθυλενοξειδίου, όπου στον πυρήνα υπάρχουν νανοσωματίδια αργύρου και χρυσού. Το nanogel αυτό έχει ως στόχο, να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας, συνδυάζοντας τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκου, με την εξωτερική φωτοθερμική θεραπεία.

3.4.4 Αποκρινόμενα σε μαγνητικό πεδίο

Πρόκειται για υβριδικά nanogel τα οποία περιέχουν μαγνητικά νανοσωματίδια όπως Fe_2O_3 (αιματίτης) ή Fe_3O_4 (μαγνητίτης). Τα παραμαγνητικά νανοσωματίδια προτιμούνται για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, γιατί δεν αφήνουν κανένα μαγνητικό υπόλειμμα στον οργανισμό, μετά την απομάκρυνση του μαγνητικού πεδίου. Η τοξικότητά τους ποικίλει ανάλογα με το σχήμα, το μέγεθος, τη σύνθεση και τη λειτουργικότητα της επιφάνειας. Η δυσκολία με τα μαγνητικά νανοσωματίδια, είναι το να μπορέσουν να

ενσωματωθούν στα nanogel, με μια ομοιόμορφη κατανομή, καθώς αυτό είναι που καθορίζει την άμεση και καλή απόκρισή τους σε ένα μαγνητικό πεδίο, όταν πρόκειται για μεταφορά φαρμάκου. Μία ολοκληρωμένη προσπάθεια που έγινε για σύνθεση τέτοιων συστημάτων ήταν αυτή της επιστημονικής ομάδας του Chen, που συνέθεσε, nanogel πολυ(βίνυλο-πυρρολιδόνης), με μαγνητικά νανοσωματίδια, τα οποία δοκιμάστηκαν σε ποντίκια και το φάρμακο απελευθερωνόταν σε συγκεκριμένα σημεία του σώματός τους όπου εξωτερικά εφαρμοζόταν μαγνητικό πεδίο. Αντίστοιχη προσπάθεια ήταν και αυτή της επιστημονικής ομάδας του Sun^[68], που συνέθεσε nanogel πολυακρυλαμιδίου, με μαγνητικά νανοσωματίδια.

Επιπλέον τα μαγνητικά νανοσωματίδια έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν θερμότητα, κάτι που μπορεί να αξιοποιηθεί είτε αν το πολυμερές εμφανίζει θερμο-αποκρισιμότητα, για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκου ή για θεραπεία μέσω της ίδιας της θερμότητας.

3.4.5 Αποκρινόμενα στην αναγνώριση βιομορίων

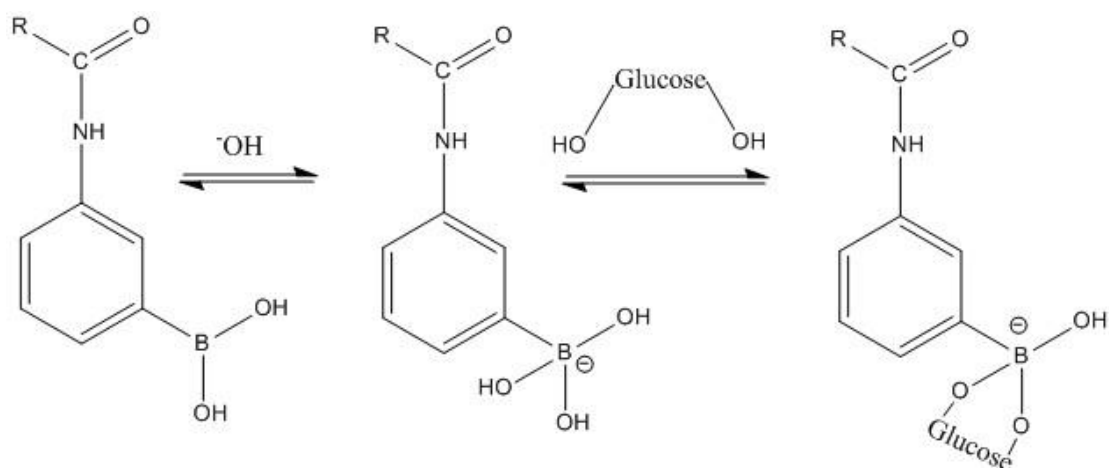
Τα βιοσυστήματα αναγνωρίζουν συγκεκριμένα ιόντα ή βιολογικά μόρια και αντιδρούν αλλάζοντας τη διαμόρφωση τους έτσι ώστε να αποκριθούν στην εμφάνιση αυτών των βιομορίων. Έτσι, δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στο να συντεθούν συγκεκριμένα nanogel που θα αποκρίνονται στην παρουσία βιομορίων ή ιόντων. Αυτά τα nanogel αναγνωρίζουν και αποκρίνονται σε βιομόρια όπως η γλυκόζη, σε πεπτίδια, πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα. Πρόσφατα, το ενδιαφέρον στράφηκε περισσότερο στα nanogel που αποκρίνονται στη γλυκόζη, καθώς είναι τα κατάλληλα για να αποτελέσουν μεταφορείς της ινσουλίνης και να παίξουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη θεραπεία του διαβήτη^[69]. Τα nanogel που αποκρίνονται στη γλυκόζη, μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: αυτά που βασίζονται την οξειδάση της γλυκόζης (GOx), κι αυτά που βασίζονται σε συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις σύμπλεξης μεταξύ των λειτουργικών ομάδων τους και τα μόρια της γλυκόζης.

Σχετικά με τα GOx nanogels, η ομάδα του Tirelli^[70], συνέθεσε nanogel τα οποία περιείχαν δεσμούς θείου, και στην άκρη είχαν οξειδάση της γλυκόζης.

Με την παρουσία της γλυκόζης, η οξειδάση της γλυκόζης ενεργοποίησε την οξείδωση των σουλφιδίων, προκαλώντας αύξηση μεγέθους-φούσκωμα των nanogel, και απελευθέρωση του εγκλωβισμένου φαρμάκου. Η καταλυτική οξείδωση της γλυκόζης από την GOx, προκαλεί την παραγωγή γλυκονικού οξέος, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του pH στο τοπικό περιβάλλον. Αυτός είναι ένας παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει την απόκριση pH- αποκρινόμενων nanogel που περιέχουν GOx^[71].

Σχετικά με τον δεύτερο τύπο nanogel που προαναφέρθηκε, χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το σύμπλεγμα που σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των ομάδων του φαινυλοβορονικού οξέος (PBA), και της γλυκόζης (Σχήμα 15). Οι ομάδες του φαινυλοβορονικού οξέος συνυπάρχουν σε φορτισμένη μορφή και μη, σε υδατικό διάλυμα. Με την παρουσία της γλυκόζης, μόνο η φορτισμένη μορφή των ομάδων σχηματίζει σύμπλεγμα μαζί της. Ο σχηματισμός του σταθερού συμπλόκου, οδηγεί σε μια μετατόπιση της ισορροπίας η οποία αυξάνει το κλάσμα των φορτισμένων ομάδων και συνεπώς υπάρχει μια αύξηση του υδροφιλικού χαρακτήρα της πολυμερικής αλυσίδας, που οδηγεί σε φούσκωμα του nanogel και απελευθέρωση του φαρμάκου.

Nanogel με ομάδες PBA, συνέθεσαν οι Hoare και Pelton^[72] και ήταν αποκρίσιμα στη γλυκόζη και το pH.



Σχήμα 15: Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ομάδων του φαινυλοβορονικού οξέος και του μορίου της γλυκόζης σε υδατικό διάλυμα.

3.4.6 Αποκρινόμενα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες

Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες που αφορούν τη σύνθεση nanogel δικτυωμένων, με δισουλφιδικούς δεσμούς και την εφαρμογή τους σε συστήματα στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων- λόγω της δυνατότητας τους να ανάγονται σε συγκεκριμένες συνθήκες που αναλύονται παρακάτω. Για παράδειγμα, ο Oh^[73] και η επιστημονική του ομάδα συνέθεσαν, σταθερά, βιοαποικοδομήσιμα nanogel, μέσω ριζικού πολυμερισμού μεταφοράς ατόμου (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP), μονομέθυλο αιθέρα μεθακρυλικού εστέρα ολιγοαιθυλενοξειδίου [oligo(ethylene oxide) monomethyl ether methacrylate (OEOMA)], με μέσο δικτύωσης διμεθακρυλικό εστέρα με δισουλφίδιο (Dimethacrylate, DMA). Το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως μεταφορέας Doxorubicin (αντικαρκινικού φαρμάκου).

Ο Matyjaszewski^[73] και η επιστημονική του ομάδα, συνέθεσαν νανοσωματίδια μέσω ριζικού συμπολυμερισμού (ATRP), συμπολυμερίζοντας μεθακρυλικό μεθυλεστέρα (MMA) και n-βουτυλοακρυλικό (n-BA), με μεθακρυλοϋλοξεθυλο-δισουλφίδιο [bis(methacryloyloxyethyl)] ως μέσο δικτύωσης.

3.4.7 Πολλαπλά αποκρινόμενα

Τα πολλαπλά αποκρινόμενα nanogel, είναι νανοϋλικά, που μπορούν να αποκρίνονται σε περισσότερα από ένα εξωτερικά ερεθίσματα. Υπάρχουν δύο τύποι πολλαπλά αποκρινόμενων nanogel: Εκείνα που αποκρίνονται σε καθένα από τα εξωτερικά ερεθίσματα ξεχωριστά, ονομάζονται και « A ή B» τύπου, και σε εκείνα που αποκρίνονται μόνο όταν όλα τα εξωτερικά ερεθίσματα συνυπάρχουν ταυτόχρονα, τα οποία καλούνται «A και B» τύπου. Αυτά τα nanogel συντίθενται συνήθως με συνδυασμό όλων αυτών των πολυμερικών συστατικών που αποκρίνονται σε διάφορα ερεθίσματα, μέσω μεθόδων τυχαίου συμπολυμερισμού, ή μεθόδων που οδηγούν σε εμβολιασμένα συμπολυμερή, ή πολυμερή που διαθέτουν πυρήνα και κέλυφος.

Τα πολλαπλά αποκρινόμενα nanogel, έχουν μεγάλες δυνατότητες για χρήση σε εφαρμογές στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων. Ιδίως, ο τύπος «A και B».

Ορισμένες προσπάθειες που έγιναν, για σύνθεση τέτοιων συστημάτων:

Η ομάδα του Kim^[74] συνέθεσε βιοαποικοδομήσιμα nanogel, χρησιμοποιώντας μεθακρυλικό γλυκιδιλεστέρα της δεξτράνης, (glycidyl methacrylate dextran), σαν το βασικό μονομερές, και διμεθακρυλικό εστέρα της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) [dimethacrylate poly(ethylene glycol)] ως μέσο δικτύωσης. Είναι pH-αποκρινόμενο σύστημα, αλλά και αποκρινόμενο στο ένζυμο δεξτρανάση, το οποίο αποικοδόμησε τη δεξτράνη με αποτέλεσμα να απελευθερωθεί το υδρόφοβο φάρμακο που είχε φορτωθεί.

Η ομάδα του Chen^[54], ανέπτυξε αντίστοιχα nanogel με ακρυλικό οξύ ως το βασικό μονομερές, υδροξυπροπυλοκυτταρίνη [hydroxypropylcellulose (HPC)] και N,N-μεθυλενοδιακρυλαμίδιο (N,N-methylenebisacrylamide) ως μέσω δικτύωσης. Στο σύστημα εγκλωβίστηκε υδρόφιλο φάρμακο.

Η ομάδα του Zha^[54], συνέθεσε pH- αποκρίσιμα και αποκρίσιμα στη γλυκόζη πολυμερή, βασισμένα στο N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο (NIPAM), και το 3-(ακρυλαμιδοφαινυλο) βορονικό οξύ (AAPBA). Οι διαστάσεις τους μετρήθηκαν παρουσία γλυκόζης, με δυναμική σκέδαση φωτός, και έδειχναν να έχουν διογκωθεί αρκετά.

Τέλος, η ομάδα του Battacharya^[75], συνέθεσε nanogel τριπλά αποκρινόμενα, σε θερμοκρασία, μαγνητικό πεδίο και pH. Ενώ διογκώνονταν διαφορετικά, ανάλογα με το pH και τη θερμοκρασία καθώς ένα μαγνητικό πεδίο έλεγχε την κάθε τους κίνηση.

3.5 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να συντεθούν πολυμερικά δικτυωμένα μικκύλια σε μέγεθος νανοσωματιδίων. Ως απαραίτητης για τον πολυμερισμό της ιστιδίνης χρησιμοποιήθηκε το πολυαιθυλενοξειδίο, ενώ ως μέσο δικτύωσης χρησιμοποιήθηκε η κυστίνη. Σε αυτό το υποκεφάλαιο, επιδιώκεται να αναλυθεί η μη τυχαία, αλλά στοχευμένη επιλογή των παράπλων συστατικών έτσι ώστε το σύστημα να έχει δυνατότητες να αξιοποιηθεί ως σύστημα στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων.

3.5.1 Πολυαιθυλενοξειδιο (PEO ή PEG)^[76]

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια αλληλεπιδρούν ισχυρά με το γύρω περιβάλλον, δηλαδή με το ενδοθηλιακό σύστημα, όπως και τα κύτταρα και τις πρωτεΐνες του αίματος. Συνεπώς απομακρύνονται ταχύτατα από την κυκλοφορία, ως επι το πλείστον από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα. Γι' αυτό το λόγο το κομμάτι της επιστήμης που ασχολείται με τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, έχει στραφεί στην τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσυστημάτων έτσι ώστε να έχουν τέτοιες φυσικοχημικές ιδιότητες που να εξασφαλίζεται η μεγαλύτερη διάρκεια κυκλοφορίας μέσα στον οργανισμό. Βρέθηκε ότι αυτή η επιφάνεια θα πρέπει να καλύπτεται από πολυμερές ή άλλο μόριο το οποίο κάνει το συνολικό σύστημα «stealth». Ο όρος αυτός κυριολεκτικά, σημαίνει λαθραίος, μυστικός, άρα αυτό που επιδιώκεται είναι να εξασφαλιστεί τρόπος στους νανομεταφορείς φαρμάκων, να μπαίνουν λαθραία στον οργανισμό, σαν «δούρειοι ίπποι» και να μεταφέρουν το φάρμακο εκεί που πρέπει, χωρίς να τους αντιληφθούν οι αμυντικοί μηχανισμοί του οργανισμού. Τα πολυμερή αυτά πρέπει να έχουν δύο συγκεκριμένα χαρακτηριστικά: μεγάλη ευελιξία και υδροφιλικότητα.

Πιο συγκεκριμένα, το πολυαιθυλενοξειδιο ή αλλιώς πολυαιθυλενογλυκόλη, είναι το πιο διαδεδομένο λόγω των αποδεδειγμένα προηγμένων ιδιοτήτων του.

Το πολυμερές αυτό είναι ουδέτερο, δεν φέρει φορτία που θα μπορούσαν να προκαλέσουν αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια κατά την εισοδό του στον οργανισμό. Ενώ ταυτόχρονα είναι υδρόφιλο και ευέλικτο υλικό. Μπορεί να δημιουργεί γύρω από τα νανοσωματίδια επιφανειακό στρώμα το οποίο μειώνει την προσκόλληση των οψονινών, που βρίσκονται στον ορό του αίματος, πάνω στα νανοσωματίδια και να τα κάνει «αόρατα» για τα μακροφάγα. Η ιδιότητά του αυτή παρατείνει το χρόνο κυκλοφορίας του συστήματος στο αίμα, άρα αυξάνει τις πιθανότητες να μπορέσει να προσεγγίσει τα κύτταρα-στόχους.

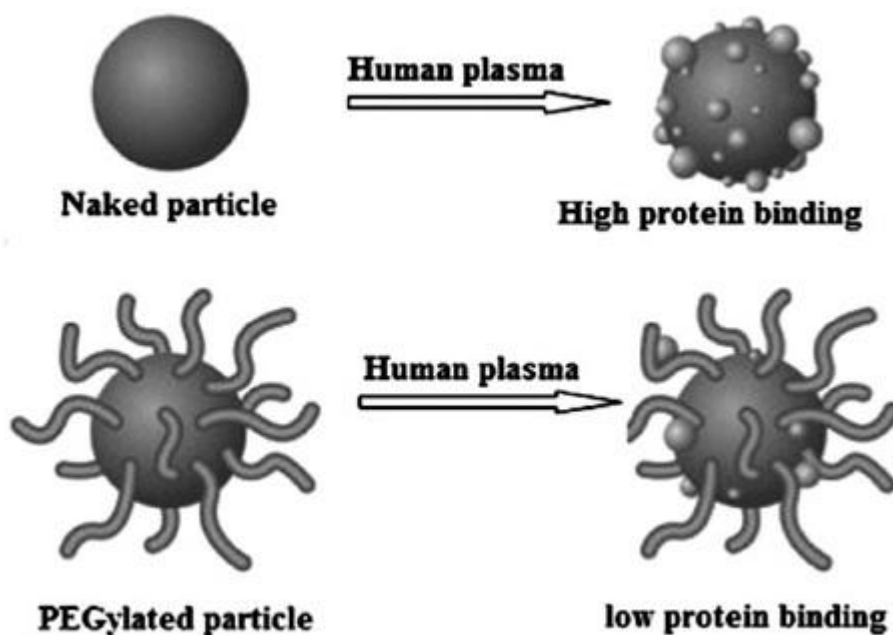
Η απώθηση των πρωτεϊνών του αίματος από το πολυαιθυλενοξειδιο, απεικονίστηκε και με ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας (TEM).

Έχει βρεθεί ότι το πολυαιθυλενοξείδιο πρέπει να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τα νανοσωματίδια, έτσι ώστε να μην υπάρχει τρόπος να απελευθερωθεί και να χαθεί η ιδιότητα των νανοσωματιδίων.

Η ιδιότητα αυτή του πολυαιθυλενοξειδίου, να μην αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του αίματος, είναι αυτό ακριβώς που ονομάζεται βιοσυμβατότητα.

Άλλη ιδιότητα που έχει το πολυαιθυλενοξείδιο, είναι αυτή της βιοαποικοδομησιμότητας. Βιοαποικοδομήσιμο, είναι εκείνο το υλικό το οποίο μπορεί να αφομοιώνεται από τον οργανισμό εύκολα, και στη συνέχεια να αποβάλλεται από αυτόν.

Στην παρούσα εργασία το PEO αποτέλεσε τον μακροαπαρχητή απ' όπου ξεκίνησε ο πολυμερισμός και τελικά διαπιστώθηκε μέσω μετρήσεων ζ-δυναμικού, αποτελεί το κέλυφος των νανοσωματιδίων, κάτι που εξασφαλίζει όλες τις ιδιότητες που προαναφέρθηκαν.

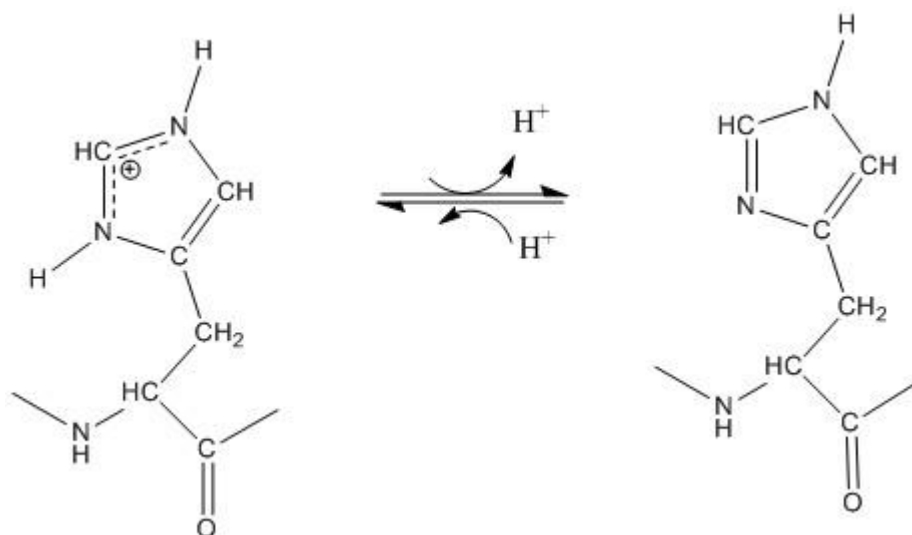


Εικόνα 6: Τα νανοσωματίδια με πολυαιθυλενοξείδιο μπορούν να αποφύγουν την απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία του αίματος, απωθώντας την απορρόφηση πρωτεΐνων, παρατείνοντας έτσι την παραμονή των νανοσωματιδίων στο αίμα.

3.5.2 Πολυ(Ιστιδίνη)^[77]

Η L-Ιστιδίνη ως αμινοξύ έχει παρουσιάσει τεράστιο ενδιαφέρον, καθώς το πολυμερές της θα αποτελούσε ιδανικό πολυπεπτίδιο, ως συστατικό σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η ξεχωριστή της ιδιότητα είναι το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων στο μη υποκατεστημένο άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου, το οποίο προσδίδει $pK_a \sim 6.0$ στο μόριο, και συνεπώς pH-αποκρισιμότητα.

Αυτό για ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων, πρακτικά σημαίνει ότι σε $pH \sim 6.5$, το pH ενός καρκινικού κυττάρου δηλαδή, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της ιστιδίνης θα πρωτονιωθεί και θα προκληθεί διόγκωση στο σύστημα που μεταφέρει το φάρμακο -άρα και απελευθέρωση του φαρμάκου-, λόγω της αλλαγής της δευτεροταγούς δομής του πολυπεπτιδίου. Ενώ σε $pH: 7.4$, στους υγιείς ιστούς, το μόριο θα είναι απολύτως σταθερό.

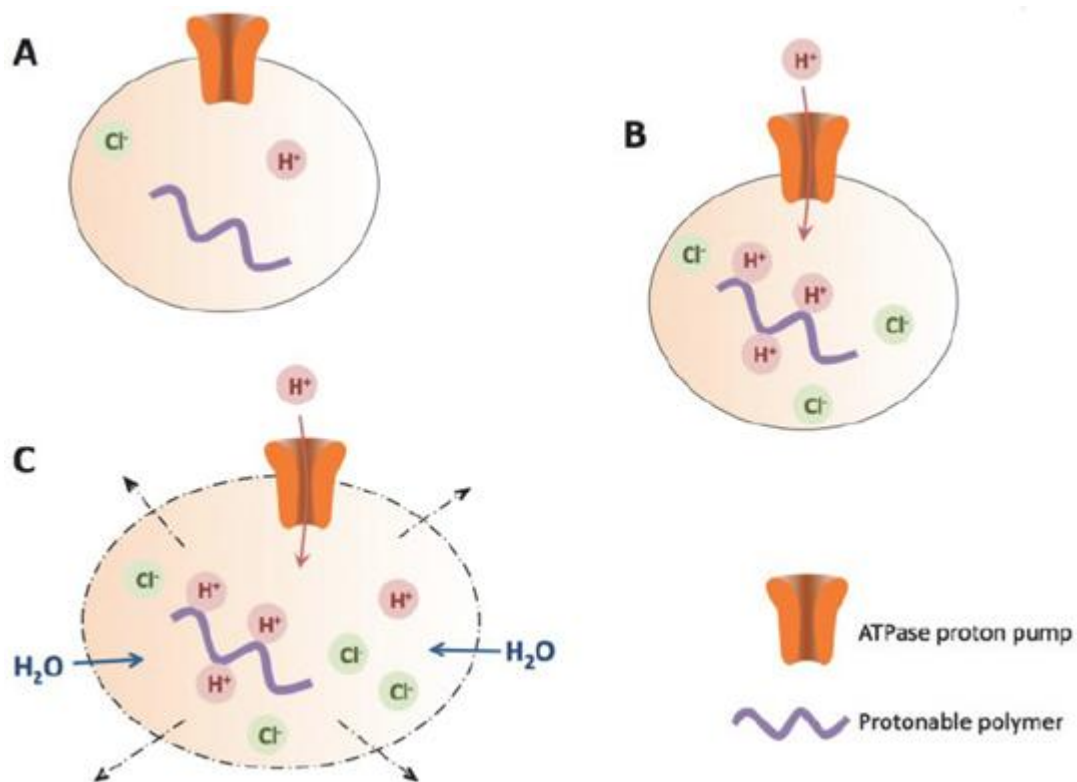


Σχήμα 16: Ο ιοντισμός της ιστιδίνης

Επιπλέον η πολυ-L-ιστιδίνη, μπορεί να φτιάχνει σταθερά πολυϊοντικά συμπλέγματα, με αρνητικά φορτισμένα πολυμερή όπως είναι το DNA, ολιγοδεοξυριβονουκλεοτίδια, ή ένζυμα, λόγω των δικών της θετικών φορτίων, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Με τη δυνατότητα, με την αλλαγή του pH, να αποπρωτονιωθεί ο ιμιδαζολικός της δακτύλιος, και να αποσυμπλεχθεί με το DNA.

Ενώ το γεγονός ότι σχηματίζει μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, την κάνει ένα ιδανικό μέσο για να χρησιμοποιηθεί για βιολογικούς, φαρμακευτικούς σκοπούς.

Μια ακόμη πολύ ενδιαφέρουσα ιδιότητα που εμφανίζει η ιστιδίνη (και η PHIS), είναι το λεγόμενο «Proton Sponge Effect», κατά το οποίο συμβαίνει το εξής: Όταν ένα πολυμερές εισέρχεται στο κύτταρο με τη διαδικασία της ενδοκύτωσης, στη συνέχεια παγιδεύεται στα ενδοσώματα. Με την μεμβράνη των ενδοσωμάτων είναι συνδεδεμένη μια αντλία πρωτονίων, η οποία τα εφοδιάζει συνεχώς με πρωτόνια, ειδικά όταν αντιληφθεί την ύπαρξη ξένου σώματος μέσα σε αυτά. Ένα πολυμερές όπως η πολυ(ιστιδίνη), που έχει τη δυνατότητα να πρωτονιωθεί, λαμβάνει εκείνο τα πρωτόνια, και έτσι η αντλία συνεχίζει να στέλνει πρωτόνια μέχρι να πετύχει τη μείωση του pH. Η δράση αυτή της αντλίας, συνοδεύεται από παθητική είσοδο ιόντων χλωρίου, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ιόντων άρα και την εισροή νερού. Η υψηλή ωσμωτική πίεση, οδηγεί σε διόγκωση και τελικά σε ρήξη των ενδοσωμάτων, απελευθερώνοντας όλο το περιεχόμενο στο κυτοσόλιο (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: A) Πολυμερές που εισέρχεται με ενδοκύτωση στο κύτταρο και στη συνέχεια παγιδεύεται στα ενδοσώματα. B) Η αντλία πρωτονίων διοχετεύει πρωτόνια στα

ενδοσώματα, το πολυμερές πρωτονιώνεται αλλά το πρόβλημα της μείωσης του pH του κυτοσολίου παραμένει οπότε η αντλία συνεχίζει να στέλνει πρωτόνια. C) Η δράση της αντλίας συνοδεύεται από παθητική είσοδο ιόντων χλωρίου, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ιόντων και συνεπώς και την εισροή νερού. Η αύξηση της ωσμωτικής πίεσης προκαλεί το φούσκωμα και τελικά τη ρήξη των ενδοσωμάτων, και την απελευθέρωσή τους στο κυτοσόλιο.

Επιπλέον, η πολυ-L-ιστιδίνη έχει τη δυνατότητα να ανάγει τον υποχλωριώδη χρυσό, έτσι ώστε να δημιουργηθούν νανοσωματίδια χρυσού, δίνοντας τη δυνατότητα για συστήματα όχι μόνο θεραπευτικά αλλά και διαγνωστικά.

Με βάση όλες αυτές τις ενδιαφέρουσες ιδιότητες, η επιστημονική ομάδα του Η. Ιατρού^[77], δημοσίευσε το 2014, τη σύνθεση του καινοτόμου μονομερούς, του Ν-καρβοξυανυδρίτη (NCA) της N^{im}-τριτυλο ιστιδίνης (Trit-His-NCA). Επίσης συντέθηκε το πολυμερές της με απαρχητή πολυαιθυλενοξειδίο (PEO- PHIS), και συμπολυμερή της PHIS με πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικό) (PBLG) και πολυ(λυσίνη) (Plys) και πολυ(λευκίνη) (Pleu). Στα πολυμερή αυτά παρατηρήθηκαν δομές μικκυλίων, όπου με μετρήσεις σκέδασης επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι τα μικκίλια διογκώνονται, με την αλλαγή του pH από 7.4 σε 6.5 και 5.0, λόγω πρωτονίωσης της ιστιδίνης και αλλαγής της δευτεροταγούς της δομής. Η δευτεροταγής δομή της πολυ-L-ιστιδίνης μελετήθηκε εκτενώς με μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού, οι οποίες επιβεβαίωσαν την αλλαγή από β-φύλλο σε τυχαίο σπείραμα.

Σε αυτή τη δημοσίευση στηρίζεται και η παρούσα εργασία, όπου συντέθηκε το μονομερές Trit-His-NCA, και έγινε προσπάθεια το πολυμερές του, να συμμετάσχει σε μια πιο πολύπλοκη αρχιτεκτονική, να δικτυωθεί και να σχηματίσει μικκύλια.

3.5.3 Δισουλφιδικοί Δεσμοί

Μετά τη βιοσυμβατότητα, μια από τις βασικές απαιτήσεις, είναι η σταθερότητα του μεταφορικού συστήματος μέσα στον οργανισμό. Αν ένα σύστημα δεν είναι σταθερό στα βιολογικά υγρά, αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε «έκρηξη», ουσιαστικά απελευθέρωση του ωφέλιμου φορτίου του συστήματος- στην προκειμένη περίπτωση του φαρμάκου- σε περιοχές μακριά από το στόχο, μη

στοχευμένα. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος αύξησης της σταθερότητας είναι η δικτύωση.

Τα νανοσωματίδια μπορούν να είναι δικτυωμένα, είτε στον πυρήνα, είτε στο κέλυφος τους, ή και στα δύο. Τα νανοσωματίδια που είναι δικτυωμένα και στο κέλυφος, ουσιαστικά ενισχύουν ακόμα περισσότερο τη σταθερότητα του συστήματος, σχηματίζουν ένα διπλό αμυντικό σύστημα στον κίνδυνο να σπάσει κάποιο από τα δύο.

Η δικτύωση μπορεί να επιτευχθεί είτε χρησιμοποιώντας μικρά μόρια πάνω στα οποία χτίζεται το δίκτυο, είτε προκαλώντας τη δικτύωση με UV ακτινοβολία σε συγκεκριμένα συστήματα που έχουν αυτή την ιδιότητα.

Υπάρχουν μειονεκτήματα που συνδέονται με τη δικτύωση, όπως είναι η περιπλοκότητα των τρόπων με τους οποίους λαμβάνει χώρα, όσο και η αποδοτικότητα της αντίδρασης^[78].

Μια δημοφιλής μέθοδος δικτύωσης είναι η χρήση δισουλφιδικών δεσμών. Ο δισουλφιδικός δεσμός (S-S), είναι ομοιοπολικός δεσμός, ο οποίος προκύπτει από την οξειδωση δυο σουλφυδριλομάδων (-SH). Δυο βασικά χαρακτηριστικά αυτού του δεσμού, που τον κάνουν ελκυστικό για πολλά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, είναι η σταθερότητά του στο πλάσμα του αίματος και η αναστρεψιμότητά του.

Αυτόματα τα συστήματα που έχουν δισουλφιδικούς δεσμούς, καθίστανται αποκρίσιμα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες, λόγω της ιδιότητας των δισουλφιδικών δεσμών να οξειδώνονται και να ανάγονται.

Όταν προκειται για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, ο στόχος είναι οι δισουλφιδικοί δεσμοί, να σπάσουν, δηλαδή να αναχθούν, μέσα ή κοντά στο κύτταρο στόχο, έτσι ώστε να απελευθερώσουν εκεί το φάρμακο.

Στον ανθρώπινο οργανισμό, υπάρχει η γλουταθειόνη (GSH), ένα τριπεπτίδιο, το οποίο, ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, δηλαδή τους αποικοδομεί στις αντίστοιχες θειόλες. Η γλουταθειόνη βρίσκεται σε αμελητέα συγκέντρωση στο αίμα (της τάξης των 0.2 mM), ενώ μέσα στα κύτταρα, η συγκέντρωση της γλουταθειόνης είναι πολύ μεγαλύτερη, (της τάξης των 10 mM). Έχε βρεθεί ότι στα καρκινικά κύτταρα η συγκέντρωση αυτή είναι ακόμη μεγαλύτερη. Κάτι τέτοιο εξασφαλίζει ότι εφόσον το σύστημα προσεγγίσει τα κύτταρα στόχους,

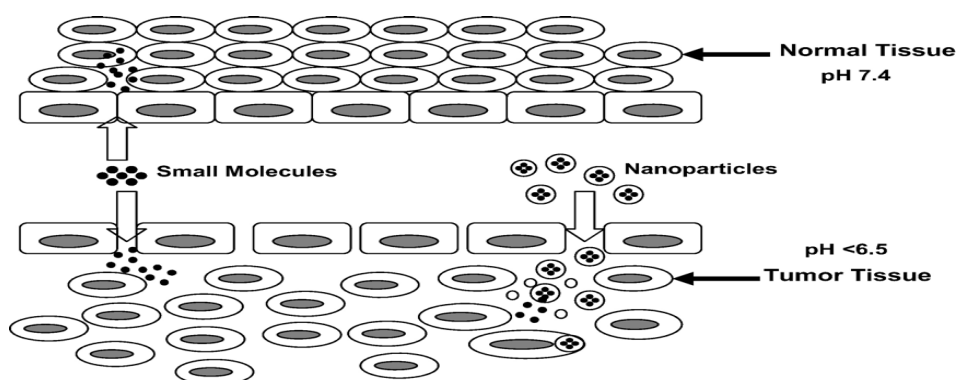
λόγω της υψηλής συγκέντρωσης της γλουταθειόνης στο εσωτερικό τους, θα αποκοδομηθεί και θα απελευθερώσει το φάρμακο^[79].

Στη συγκεκριμένη εργασία επιλέχθηκε ως μέσω δικτύωσης ο NCA της L-κυστίνης, ο οποίος έχει δύο δακτυλίους N-καρβοξυανυδρίτη και έναν δισουλφιδικό δεσμό. Το μόριο αυτό εισήχθη από την επιστημονική ομάδα του Qiao, και έχει χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα συστημάτων. Ένα παράδειγμα είναι τα αστεροειδή πολυμερή με δικτυωμένο πυρήνα και κλάδους πολυ-(L-λουσίνης) ή πόλυ-(L-γλουταμικού οξέος), που συντέθηκαν από την ίδια ομάδα.

3.5.4 Το μέγεθος των σωματιδίων

Το μέγεθος των μορίων που πιθανώς θα εισέλθουν στον οργανισμό για στοχευμένη μεταφορά αντικαρκινικού φαρμάκου, είναι αυτό που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, στην γρήγορη διάχυση του στα καρκινικά κύτταρα και τους ιστούς. Οι υγιείς ιστοί είναι ομαλά συνδεδεμένοι, έτσι που δεν επιτρέπουν την είσοδο, παρά μόνο σε πολύ μικρά μόρια. Αντίθετα οι καρκινικοί ιστοί φέρουν ασυνέχειες που επιτρέπουν και σε νανοσωματίδια να εισέλθουν. Αυτό είναι το λεγόμενο EPR (Enhanced Permeability and retention effect), το αποτέλεσμα της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης.

Έτσι είναι πολύ σημαντικό, το μέγεθος των σωματιδίων να μην είναι πολύ μικρό, γιατί έτσι όλες οι αποκρίσεις σε συγκεκριμένα ερεθίσματα καρκινικών κυττάρων δεν έχουν καμία αξία, αφού μπορεί να διαχυθούν και σε υγιείς ιστούς. Πάρολα αυτά, όταν πρόκειται για εδοφλέβια χορήγηση, το μεγεθός τους δεν πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερο από 100 nm, γιατί έτσι δεν θα μπορέσουν να εγκαταλείψουν γρήγορα το αίμα^[80].



Εικόνα 8 : EPR effect (Enhanced Permeability and retention effect).

3.5.5 Παρόμοια συστήματα με αυτά που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία.

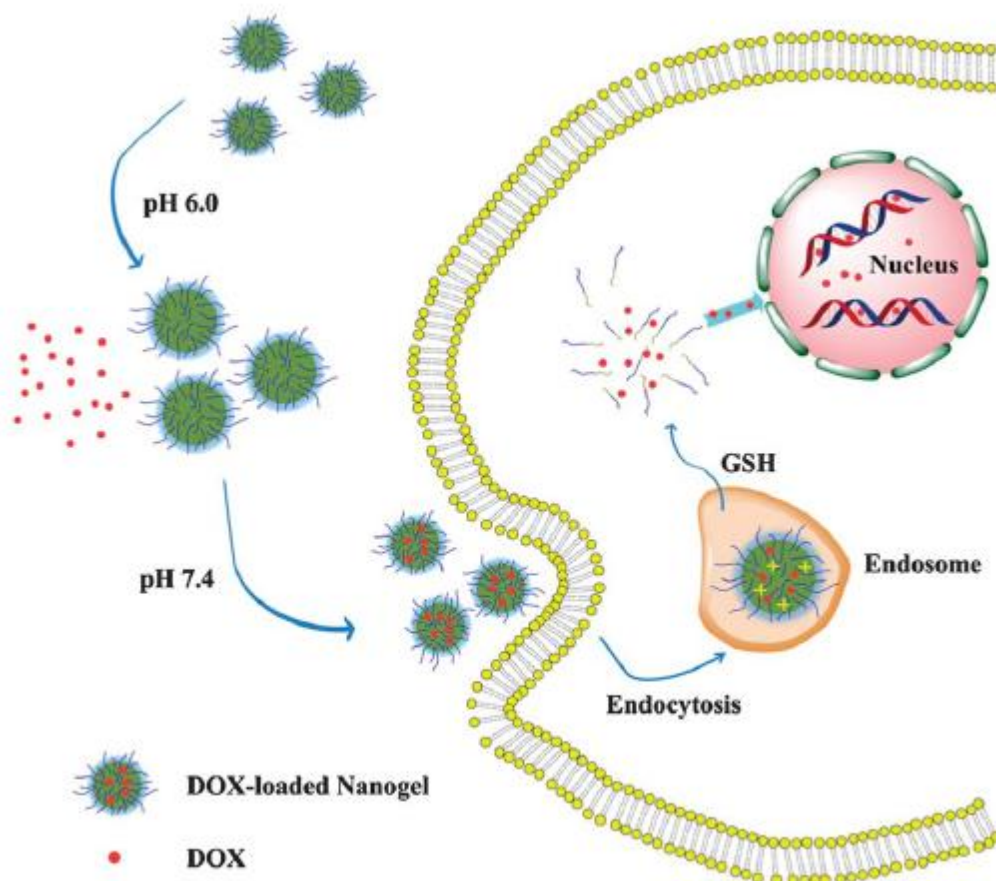
Το 2011, η επιστημονική ομάδα των Xing, Lai, Ye, Yan^[81], συνέθεσε Nanogel δικτυωμένου γ-βενζυλ-L-γλουταμικού, με απαρχητή πολυαιθυλενοξειδίο PEO-NH₂, και ως μέσο δικτύωσης χρησιμοποίησε, τον NCA της κυστίνης, ο οποίος στην πραγματικότητα λειτουργεί και ως μονομερές. Αφού διαπιστώθηκε η συνθεσή του, με τεχνικές IR, NMR, TEM και δυναμικής σκέδασης φωτός, βρέθηκε ότι μπορεί να εγκλωβίσει υδρόφοβο φάρμακο και επιβεβαιώθηκε ότι η δομή σπάει με τη χρήση γλουταθειόνης σε συγκέντρωση 10 mM, όση είναι και στο εσωτερικό των κυτάρων.

Αντίστοιχο Nanogel συντέθηκε το 2013, από την επιστημονική ομάδα των Ding, Shi, Li, Chen, Zhuang^[82], μόνο που το μονομερές για το σχηματισμό του δικτυωμένου πυρήνα αποτέλεσε η ε-βενζυλοξυκαρβόνυλ-L-λυσίνη. Και εδώ ως απαρχητής χρησιμοποιήθηκε το mPEO-NH₂, και ως μέσο δικτύωσης ο NCA της L-κυστίνης. Έγινε εγκλωβισμός του υδρόφοβου φαρμάκου Doxorubicin, και οι μελέτες που έγιναν για την απόκριση στον αναγωγικό παράγοντα γλουταθειόνη, ήταν θετικές και υπήρχε ομαλή αποδέσμευση του φαρμάκου.

Τέλος, το 2013 έγινε ακόμη μια προσπάθεια από την ομάδα του Yan^[83], σχηματισμού nanogel με κυστίνη. Πολυαιθυλενοξειδίο με αζίδιο στο ένα άκρο, και ο NCA της L-κυστίνης, με πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου, σχηματίζουν δικτυωμένο nanogel με αζίδιο στην άκρη. Αυτό το αζίδιο χρησιμοποιείται για να γίνει κλικ αντίδραση, και να συνδεθεί με το nanogel μια αλκυνο-κυανίνη, το μόριο αυτό απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία, και έτσι το nanogel εκτός από μεταφορά φαρμάκου μπορεί να πραγματοποιεί και απεικόνιση μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Η δομή του πολυμερούς διαπιστώθηκε με μια σειρά από μεθόδους χαρακτηρισμού ενώ στη συνέχεια έγινε εγκλωβισμός φαρμάκου (doxorubicin), και επιβεβαιώθηκε και εδώ το σπάσιμο των δισουλφιδικών δεσμών με έκθεση σε γλουταθειόνη, και η ομαλή απελευθέρωση του φαρμάκου.

Στην παρούσα εργασία ο στόχος είναι να συνδυαστούν όλες οι ιδιότητες που αναφέρθηκαν παραπάνω έτσι ώστε να προκύψουν δομές που θα έχουν όλες τις δυνατότητες να χρησιμοποιηθούν ως σύστημα μεταφοράς φαρμάκου.

Όταν το νανοσωματίδιο βρεθεί μέσα στον οργανισμό, με τη διαδικασία της ενδοκύτωσης θα εισαχθεί στο καρκινικό κύτταρο, και λόγω του όξινου pH, θα φουσκώσει ώστε να απελευθερώσει το φάρμακο, ενώ η αυξημένη συγκέντρωση της γλουταθειόνης θα σπάσει τους δισουλφιδικούς δεσμούς καθιστώντας και με αυτό τον τρόπο, την απελευθέρωση του φαρμάκου εφικτή.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας εγκλωβισμού του φαρμάκου, της ενδοκύτωσης, και η απελευθέρωση του φαρμάκου μέσα στο κύτταρο, λόγω της διπλής απόκρισης του nanogel σε pH και αναγωγικές συνθήκες (GSH).

3.6 Νανοσωματίδια Χρυσού [AuNPs, Gold (Au) Nanoparticles]^[84]

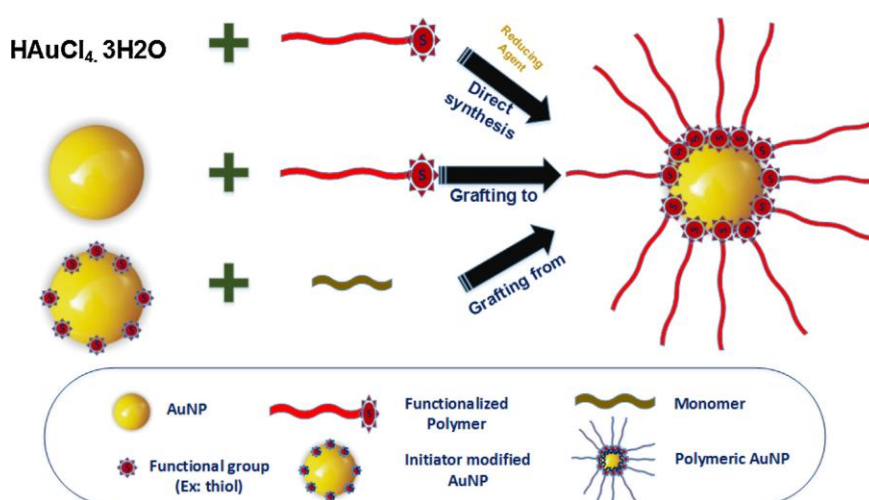
Τα νανοσωματίδια χρυσού αναδεικνύονται ως ένα νέο υλικό, που μπορεί ταυτόχρονα να χρησιμοποιηθεί στη στοχευμένη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων αλλά και στην απεικόνιση, αυτή η εφαρμογή είναι γνωστή ως «theranostics». Έχουν αρκετές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως είναι i) η χημική αδράνεια, ii) ικανότητα προσαρμογής λειτουργικών ομάδων στην

επιφανειά τους, iii) οπτικές ιδιότητες που τα κάνουν κατάλληλα, να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες απεικόνισης.

Σε ότι αφορά τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού, μπορούν να συνδεθούν πολυμερή, τα οποία είναι τα ίδια μεταφορείς φαρμάκων. Με τη σύνδεση αυτή, επιτυγχάνεται η αύξηση του χρόνου ζωής του πολυμερούς στο αίμα, άρα και του φαρμάκου που μεταφέρει, βελτιώνεται η σταθερότητα του πολυμερικού νανοσωματιδίου και μειώνεται την κυτταροτοξικότητα που πιθανώς να υπάρχει σε κάποια τέτοια μόρια.

Εκτός από αυτή την εφαρμογή τα νανοσωματίδια χρυσού μπορούν ταυτόχρονα να χρησιμοποιηθούν ως απεικονιστικοί παράγοντες, ή ως βιοαισθητήρες, για τη διάγνωση του καρκίνου λόγω της ικανότητάς τους να εκπέμπουν φωτόνια κατά την ακτινοβολήση.

Έχουν αναπτυχθεί τρεις τρόποι για τη σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού που είναι συνδεδεμένα με πολυμερικά νανοσωματίδια: i) με την απευθείας αναγωγή του άλατος του χρυσού σε στοιχειακό χρυσό, με τη χρήση πολυμερούς που έχει την ικανότητα να λειτουργήσει ως αναγωγικό ή άλλου αναγωγικού, ii) με την σύνδεση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων χρυσού με λειτουργικές ομάδες, οι οποίες φέρουν συνδεδεμένη πολυμερική αλυσίδα, iii) με την τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων χρυσού με λειτουργικές ομάδες, πάνω στις οποίες μπορούν έπειτα να συντεθούν πολυμερικές αλυσίδες (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Μέθοδοι για τη σύνθεση πολυμερικών νανοσωματιδίων χρυσού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

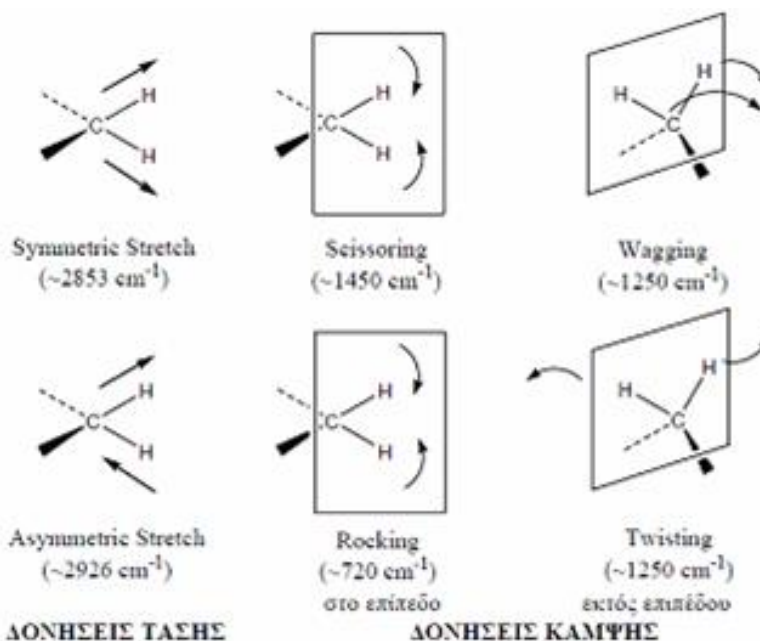
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

4.1 Εισαγωγή

Το κεφάλαιο αυτό αναφέρεται στην κατανόηση των βασικών αρχών και τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των μορίων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα πρόκειται να αναλυθούν οι τεχνικές της φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), του ζ-δυναμικού (ζ-potential), της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), του κυκλικού διχρωϊσμού (CD), ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας (TEM).

4.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

Η υπέρυθη φασματοσκοπία (Infrared Spectroscopy, IR) θεωρείται σημαντική φασματοσκοπική τεχνική στην Οργανική Χημεία, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Στην περιοχή υπερύθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (IR) συμβαίνουν απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις ή κάμψεις των δεσμών των μορίων για ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή, που μεταβάλλεται κατά την παραμόρφωση του μορίου και απορροφούν ισχυρά στην περιοχή υπερύθρου. Εκτός από τις δονήσεις και τις κάμψεις υπάρχουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting), ή έχει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), κ.λπ.



Εικόνα 11: Δονήσεις τάσης και κάμψης των μοριακών δομών και οι περιοχές απορρόφησης στην υπέρυθη περιοχή.

Όλα τα μόρια διαθέτουν κάποια συγκεκριμένη ποσότητα ενέργειας κατανεμημένη σε όλη τη δομή τους, που προκαλεί στους δεσμούς δονήσεις (επιμηκύνσεις) και κάμψεις. Ταυτόχρονα λόγω της ενέργειας αυτής, τα άτομα πάλλονται και περιστρέφονται ενώ παρατηρούνται, και διάφορες άλλες μοριακές δονήσεις, όπως αυτές που προαναφέρθηκαν. Η ποσότητα της ενέργειας που περιλαμβάνει ένα μόριο δεν μεταβάλλεται κατά συνεχή τρόπο, αλλά είναι κβαντισμένη. Δηλαδή ένα μόριο μπορεί να επιμηκύνεται, να πάλλεται, να κάμπτεται, σε συγκεκριμένες συχνότητες που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα ενεργειακά επίπεδα. Στην πραγματικότητα οι δεσμοί συνεχώς δονούνται και κάμπτονται, με συνέπεια το μήκος τους να αυξάνεται και να μειώνεται, έτσι ένας δεσμός που συνδέει δύο άτομα, στην πραγματικότητα πάλλεται σαν ελατήριο. Όταν το μόριο δέχεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφάται ενέργεια όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίδια με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δυο δονητικών συχνοτήτων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίση με εκείνη της ακτινοβολίας, αυξάνει το πλάτος της. Με άλλα λόγια, το «ελατήριο», που συνδέει τα δυο άτομα διαδοχικά, εκτείνεται και συμπιέζεται λίγο περισσότερο. Εφόσον κάθε συχνότητα που απορροφάται από ένα μόριο, αντιστοιχεί σε μια προκαθορισμένη μοριακή κίνηση μπορούν να διαπιστωθούν τις κινήσεις του μορίου, μελετώντας το φάσμα IR. Από την

ερμηνεία αυτών των κινήσεων, μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί (λειτουργικές ομάδες) υπάρχουν στο μόριο.

Οι δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων ενός μορίου είναι ανεξάρτητες της υπόλοιπης δομής του και συνήθως εμφανίζονται σε περιοχές του υπερύθρου φάσματος όπου δεν απορροφούν οι δονήσεις σκελετού.

- Η περιοχή από 4.000 cm^{-1} έως 2500 cm^{-1} αντιστοιχεί σε απορροφήσεις που προκαλούνται από δονήσεις επιμηκύνσεις(τάσεις) των απλών δεσμών N-H, C-H, και O-H . Οι δεσμοί N-H και O-H απορροφούν στην περιοχή $3300-3600\text{ cm}^{-1}$, ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα 3000 cm^{-1}
- Στην περιοχή $2500-2000\text{ cm}^{-1}$ λαμβάνει χώρα η δόνηση επιμήκυνσης(τάσης) του τριπλού δεσμού. Εδώ απορροφούν τα νιτρίλια και τα αλκύνια. Όπως επίσης και η ομάδα $-SH$, που παρουσιάζει χαρακτηριστική απορρόφηση στα 2580 cm^{-1} .
- Στην περιοχή από $2000-1500\text{ cm}^{-1}$ απορροφούν όλοι οι διπλοί δεσμοί. Οι καρβονυλικές ομάδες απορροφούν γενικά στην περιοχή μεταξύ 1680 και 1750 cm^{-1} , ενώ η επιμήκυνση του δεσμού των αλκενίων συμβαίνει συνήθως σε μια περιορισμένη περιοχή μεταξύ 1640 και 1680 cm^{-1} .
- Η περιοχή κάτω από τα 1500 cm^{-1} είναι περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος. Εδώ εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις που οφείλονται σε μια ποικιλία δεσμών C-C, C-O, C-N, C-X.

4.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός [Dynamic Light Scattering (DLS)]

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

Η δυναμική σκέδαση φωτός στηρίζεται στο γεγονός ότι, σε ένα διάλυμα πολυμερούς τα μόριά του βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση, λόγω της θερμικής ενέργειας που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω των συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown), με αποτέλεσμα η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα να συνδέεται ποσοτικά με την κίνηση των μορίων. Η σκέδαση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας από ένα διάλυμα πολυμερούς, οφείλεται κυρίως σε διακυμάνσεις της συγκέντρωσης, οι οποίες συνδέονται με την κίνηση Brown. Συνεπώς η ένταση της σκεδαζόμενης

ακτινοβολιάς μεταβάλλεται συναρτήσει του χρόνου. Οι μεταβολές αυτές μπορούν να περιγραφούν με μια συνάρτηση αυτοσυσχέτισης, η οποία στην απλή περίπτωση ενός συνόλου σφαιρικών, ομοειδών σωματιδίων που δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους έχει την μορφή

$$G(2)(t) = \langle I(0)I(t) \rangle = A + B \exp(-\Gamma t) = A + B \exp(-Dq^2 t)$$

Όπου A και B είναι πειραματικές σταθερές, Γ είναι η ταχύτητα που φθίνει η συνάρτηση και D είναι ο μεταφορικός συντελεστής διάχυσης και q είναι το διάνυσμα σκέδασης.

Ο συντελεστής διάχυσης D περιγράφει την δυσκολία κίνησης ενός σώματος μέσα σε ένα διάλυμα και είναι αντιστρόφως ανάλογος του μεγέθους του πολυμερούς. Με χρήση της εξίσωσης Stokes-Einstein είναι δυνατό να υπολογιστεί η υδροδυναμική ακτίνα του πολυμερούς σε αραιά διαλύματα.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

όπου k η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, η το ιξώδες του διαλύματος και R_h η υδροδυναμική ακτίνα.

Για τον υπολογισμό της υδροδυναμικής ακτίνας από την συνάρτηση αυτοσυσχέτισης, πρέπει να προηγηθεί κατάλληλη μαθηματική ανάλυση. Υπάρχουν δύο μέθοδοι μαθηματικής ανάλυσης που χρησιμοποιούνται ευρέως: η μέθοδος των αθροισμάτων (cumulants method) και οι τεχνικές κανονικοποίησης (regularization methods) μέσω του προγράμματος CONTIN. Στην πρώτη μέθοδο, η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης περιγράφεται με ένα πολυώνυμο, συνήθως 2ης ή 3^{ης} τάξης και από τους συντελεστές του πολυωνύμου προκύπτουν ο συντελεστής διάχυσης (1ος cumulant) και η πολυδιασπορά του συστήματος (2ος cumulant). Στην ανάλυση CONTIN, προκύπτει μια πληθώρα πιθανών λύσεων για την συνάρτηση αυτοσυσχέτισης από τις οποίες απορρίπτονται όσες παρουσιάζουν πολυπλοκότητα ως λιγότερο πιθανές να υπάρξουν σε πραγματικά συστήματα. Κάποιες φορές η

προτεινόμενη λύση δεν είναι μοναδική, για αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν όλες οι λύσεις που προτείνει το πρόγραμμα, σε συνδιασμό με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του προς μελέτη συστήματος.

4.4 ζ- Δυναμικό (Z- potential)^[85]

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη συνεχή τυχαία θερμική κίνηση (κίνηση Brown), που κάνουν τα σωματίδια και οι μετρήσεις γίνονται με το όργανο της δυναμικής σκέδασης φωτός.

Το ζ-δυναμικό των σωματιδίων που μετρά το όργανο είναι το ζ-δυναμικό της επιφάνειας κάλυψης του σωματιδίου που δημιουργείται μεταξύ του φορτίου του σωματιδίου και του μέσου, και όχι το φορτίο επιφανείας του σωματιδίου.

Όταν μια στερεή επιφάνεια έρθει σε επαφή με ένα υδατικό διάλυμα, η ύπαρξη φορτίων στη μεσεπιφάνεια μεταξύ τους προκαλεί αναδιάταξη των τοπικών ελεύθερων ιόντων στο διάλυμα και έτσι δημιουργείται μια λεπτή περιοχή με μη μηδενική καθαρή πυκνότητα φορτίου. Η αναδιάταξη αυτή των φορτίων στη μεσεπιφάνεια μεταξύ στερεού-υγρού μαζί με τα αντισταθμιστικά ιόντα του διαλύματος σχηματίζουν μια ηλεκτρική διπλοστιβάδα.

Αμέσως δίπλα στη φορτισμένη επιφάνεια υπάρχει ένα λεπτό στρώμα από αντισταθμιστικά ιόντα, που ονομάζεται συμπαγές στρώμα ή στρώμα Stern (Stern layer). Το συμπαγές στρώμα αντισταθμιστικών ιόντων είναι ακίνητο λόγω της ισχυρής ηλεκτροστατικής έλξης με την επιφάνεια των σωματιδίων. Τα αντισταθμιστικά ιόντα έξω από το συμπαγές στρώμα είναι ασθενέστερα συνδεδεμένα και συνεπώς κινητά. Αυτό το μέρος της στιβάδας καλείται διάχυτη στιβάδα (Diffuse layer ή slipping plane) και το ηλεκτροστατικό δυναμικό που αντιστοιχεί σε αυτό το στρώμα ονομάζεται ζ-δυναμικό (ζ-potential).

Οι ηλεκτρικές ιδιότητες της επιφάνειας των νανοσωματιδίων μπορούν να μετρηθούν με μικροηλεκτροφόρηση κατά την οποία προκαλείται κίνηση των σωματιδίων αυτών μέσα σε ένα στάσιμο υγρό υπό την επίδραση εξωτερικά εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού. Η κίνηση αυτή μετρείται με τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης φωτός σε ειδικό μηχάνημα και βασίζεται στη

μετατόπιση Doppler που προκαλείται από την πρόσπτωση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας στα κινούμενα σωματίδια.

Η τιμή του ζ-δυναμικού υπολογίζεται βάσει της εξίσωσης Helmholtz-Smoluchowski:

$$Z = \frac{U\eta}{E\varepsilon} = \frac{\mu\eta}{\varepsilon}$$

όπου u (cm/sec) είναι η ταχύτητα μετακίνησης του νανοσωματιδίου στην κυβελίδα της ηλεκτροφόρησης, η (dyne*sec/cm²) είναι το ιξώδες του μέσου, E (mV/cm) η ένταση του εφαρμοζόμενου δυναμικού, ε είναι η διηλεκτρική σταθερά του μέσου, ενώ ο λόγος u/E καλείται και κινητικότητα της ηλεκτροφόρησης (μ_e).

4.5 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR), είναι μέθοδος προσδιορισμού της δομής των μορίων, η οποία παρέχει ένα “χάρτη” του όλου ανθρακικού σκελετού με τα άτομα υδρογόνου σε ένα μόριο. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο, γιατί με τη βοήθειά της προσδιορίζουμε τη στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) του πολυμερούς καθώς και τη γεωμετρική ισομέρεια, τη δομή και τη σύσταση των συμπολυμερών, ενώ επίσης πραγματοποιείται η μελέτη της δυναμικής των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση.

Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εκδηλώνουν όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων. Μόνο οι πυρήνες με άρτιο αριθμό νετρονίων και πρωτονίων δεν προξενούν μαγνητικά φαινόμενα ($I = 0$). Έτσι, οι πυρήνες πολλών ατόμων (¹H, ¹³C) συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα (πυρηνικό spin, $I = 1/2$). Δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 . Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο. Όταν, όμως, ένα δείγμα που περιέχει

αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ο πυρήνας μπορεί να διαταχθεί έτσι ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να είναι είτε παράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με κβαντικό μαγνητικό αριθμό spin, $m_l = 1/2$) είτε αντιπαράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με $m_l = -1/2$) προς το εξωτερικό πεδίο. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού.

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

Όλοι οι πυρήνες στα μόρια περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό.

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

Συνέπεια των παραπάνω είναι ότι οι πυρήνες σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δίνουν διαφορετική γραμμή συντονισμού. Για να εκφραστούν με ενιαίο τρόπο οι μεταβολές των γραμμών συντονισμού, στους διάφορους

πυρήνες, χρησιμοποιούνται πρότυπες ουσίες αναφοράς και εισάγεται η έννοια της χημικής μετατόπισης. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο [TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$], που έχει δώδεκα ισοδύναμα (άρα δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προστατισμένα πρωτόνια.

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι κάθε διαφορετικός πυρήνας (π.χ. ^1H) θα σχηματίζει μία απλή κορυφή. Συχνό φαινόμενο αποτελεί, ωστόσο, η απορρόφηση ενός πυρήνα να διασπάται σε πολλαπλές κορυφές. Το φαινόμενο των πολλαπλών απορροφήσεων αποκαλείται σχάση spin – spin και προκαλείται από την αλληλεπίδραση ή σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών πυρήνων. Εκτός από την ηλεκτρονιακή προστασία, το μαγνητικό πεδίο που υφίσταται ένας πυρήνας επηρεάζεται επίσης από τους γειτονικούς μαγνητικούς πυρήνες. Σύμφωνα με ένα γενικό κανόνα, που αποκαλείται κανόνας $n+1$, πυρήνες με n ισοδύναμους γειτονικούς πυρήνες εμφανίζουν $n+1$ κορυφές στο φάσμα του NMR. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος $(1+x)^n$. Τέλος, στη φασματοσκοπία ^1H -NMR και όχι στη ^{13}C -NMR (λόγω του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, Nuclear Overhauser Effect, NOE) το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι δυνατό να μετρήσουμε το σχετικό αριθμό των κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο. Με τον τρόπο αυτό εξάγονται ποσοτικά συμπεράσματα συγκρίνοντας το εμβαδόν χαρακτηριστικών κορυφών πρωτονίων ενός μορίου (π.χ. αν μία δραστική ομάδα έχει αντιδράσει με όλες τις μακρομοριακές αλυσίδες).

4.6 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διαπερατότητας (TEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας είναι μια τεχνική μικροσκοπίας στην οποία αντί για φως χρησιμοποιείται δέσμη ηλεκτρονίων προκειμένου να δημιουργήσει μεγεθυμένα είδωλα των αντικειμένων που εξετάζονται.

Η τεχνική TEM πλεονεκτεί των άλλων τεχνικών, εξαιτίας του γεγονότος ότι μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων δίνει τη δυνατότητα πολύ μεγάλης διακριτικής ικανότητας. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι με κατάλληλες διατάξεις και συνθήκες η διακριτική ικανότητα της τεχνικής φτάνει σε επίπεδο ατόμου.

Η τεχνική βασίζεται στο διαφορετικό ποσοστό σκέδασης της δέσμης των ηλεκτρονίων ανάλογα με την διαφορετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα ή το διαφορετικό πάχος που έχουν τα υλικά, δημιουργώντας ένα είδωλο με φωτεινές και σκοτεινές περιοχές. Όσο μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα έχει ένα υλικό ή όσο πιο παχύ είναι, τόσο πιο σκοτεινό είναι το είδωλό του στην επιφάνεια καταγραφής.

Τα μεταλλικά σωματίδια οδηγούν σε πολύ σκοτεινές περιοχές, ενώ οι ενώσεις με υδρογόνο και άνθρακα σκεδάζουν ελάχιστα. Επίσης, όσο πιο παχύ είναι ένα υλικό, επειδή αυξάνεται η διαδρομή που ακολουθεί η δέσμη των ηλεκτρονίων μέσα στο υλικό, τόσο πιο σκοτεινό είναι το είδωλό του στην εικόνα που καταγράφεται.

Η τεχνική TEM χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μελέτη πολλών συστημάτων και ιδιαίτερα στο πεδίο της νανοτεχνολογίας, δίνοντας τη δυνατότητα του μορφολογικού χαρακτηρισμού των υλικών που συντίθενται. Τα προς μελέτη υλικά εναποτίθενται πάνω σε κατάλληλες επιφάνειες οι οποίες σκεδάζουν ελάχιστα την δέσμη ηλεκτρονίων. Η εναπόθεση γίνεται χρησιμοποιώντας αραιά διαλύματα των υλικών ώστε να είναι ομοιογενής η διασπορά των νανσωματιδίων. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στο μικροσκόπιο ώστε να καταγραφεί η μορφολογία τους.

4.7 Κυκλικός διχρωϊσμός (Circular Dichroism)

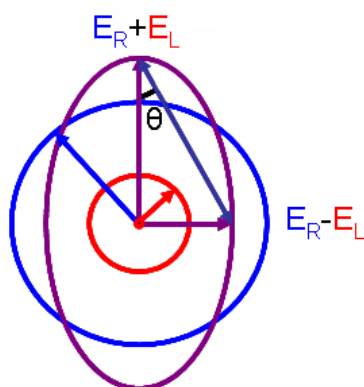
Οι πρωτεΐνες (οπτικά ενεργές ενώσεις) και γενικότερα τα μόρια, απορροφούν κβάντα φωτός, προάγοντας τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερες διεγερμένες καταστάσεις. Το εξερχόμενο φως έχει την ίδια συχνότητα αλλά έχει επιβραδυνθεί, εισάγοντας μια διάφορα φάσης, που είναι ανάλογη της ποσότητας του υλικού.

Στην τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού, μετράται η διαφορά της μοριακής απορροφητικότητας ($\epsilon_R - \epsilon_L$), κατά την απορρόφηση από την πρωτεΐνη, κυκλικά πολωμένης (αριστερόστροφα ή δεξιόστροφα) μονοχρωματικής ακτινοβολίας φωτός στην περιοχή του far-UV, που οδηγεί σε π-π* ηλεκτρονιακές μεταβάσεις. Αυτές αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς των

πεπτιδίων (χρωμοφόρα) και επηρεάζονται σημαντικά από την δευτεροταγή δομή.

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

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



Πίνακας 1: Οι απορροφήσεις των τριων διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Διάμόρφωση	Ταινία 1(nm)	Ταινία 2(nm)	Ταινία 3(nm)
α-έλικα	191(θετική)	208(αρνητική)	222(αρνητική)
B-φύλλο	195(θετική)	217(αρνητική)	-
Τυχαίο σπείραμα	197(αρνητική)	217(θετική)	-

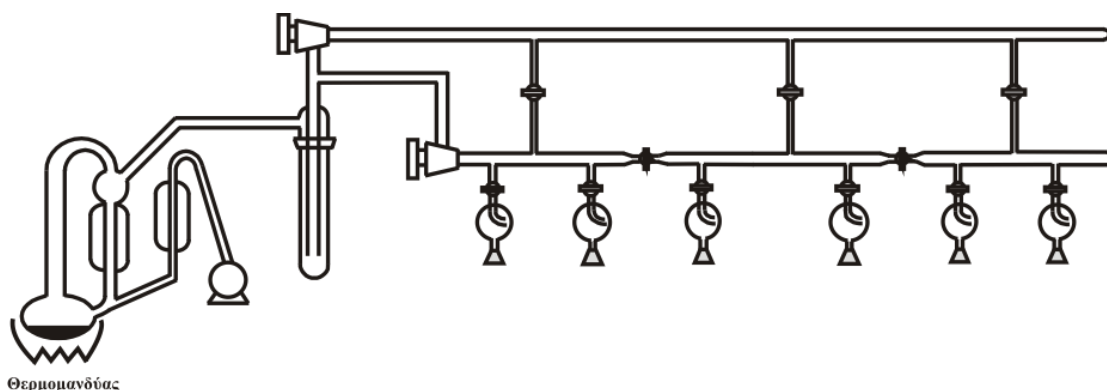
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 Τεχνική υψηλού κενού (ΗΝΤ)^{[86], [87]}

Όλα τα πολυμερή στην παρούσα εργασία συντέθηκαν με την τεχνική υψηλού κενού, σε ειδικά σχεδιασμένες συσκευές πολυμερισμού. Χρησιμοποιείται η τεχνική αυτή, γιατί είναι η μόνη που μπορεί να εξασφαλίσει την πλήρη απομάκρυνση των προσμίξεων από τα συστήματα των αντιδράσεων, η ύπαρξη των οποίων, θα οδηγούσε σε πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις. Εξασφαλίζοντας 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, με αποτέλεσμα να ληφθεί ένα μη καθαρό προϊόν. Επιπλέον, με την τεχνική του υψηλού κενού, γίνονται και οι καθαρισμοί όλων των διαλυτών και των αντιδραστηρίων, ώστε να απομακρυνθούν οι πιθανές δραστικές προσμίξεις που περιέχονται στα αντιδραστήρια του εμπορίου (αλκοόλες, αμίνες και οξέα).

Τα κύρια μέρη μιας γραμμής υψηλού κενού, είναι γυάλινοι σωλήνες (Pyrex), στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (Rotaflon HP 10 mm, 10^{-8} mm Hg), μία αντλία ελαίου και μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου.

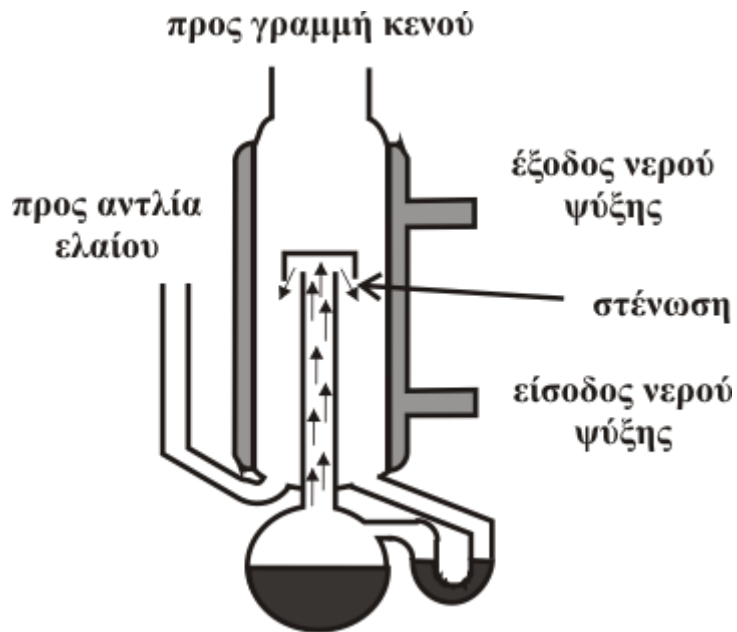


Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού.

Η αντλία ελαίου δημιουργεί κενό της τάξης των $10^{-2} - 10^{-3}$ mm Hg. Το προκαταρκτικό αυτό κενό είναι απαραίτητο για να αποστάξει ο υδραργύρος, που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως (σχήμα 4.2), σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία. Καθώς τα μόρια του υδραργύρου κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξηση της ταχύτητάς τους με ταυτόχρονη ελάττωση της πίεσής τους, σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli.

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 υδραργύρος 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.

Ουσιαστικά, η αντλία ελαίου χρησιμοποιείται για να μειώσει την πίεση στο σύστημα, σ'ένα σημείο όπου η εξάτμιση του υδραργύρου με θέρμανση μέσω ενός μανδύα θερμάνσεως, να είναι δυνατή. Αφού επιτευχθεί η απόσταξη του υδραργύρου, η αντλία διάχυσης μπορεί να φέρει την πίεση σε μια τιμή 10^{-6} mm Hg.



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου.

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

Το κενό της γραμμής ελέγχεται με τη βοήθεια πηνίου Tesla, όταν ο θόρυβος κατά την επαφή του πηνίου με τα γυάλινα τμήματα της γραμμής είναι αμελητέος, μόνο τότε η γραμμή έχει απαερωθεί σωστά.

Ο χειρισμός της γραμμής υψηλού κενού, ελοχεύει πολλούς κινδύνους, γι' αυτό κάθε φορά πρέπει να λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα προστασίας, όπως χρήση προστατευτικών γυαλιών κ.ά.

5.2 Καθαρισμός Διαλυτών^[88]

Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF): Το DMF (σ.ζ. 153° C), είναι ο διαλύτης στον οποίο έγιναν όλοι οι πολυμερισμοί, στην παρούσα εργασία. Το DMF υπόκειται τόσο σε θερμική αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική παράγεται διμεθυλαμίνη αλλά και μονοξειδίο του άνθρακα. Επίσης υδρολύεται αργά παρουσία νερού παράγοντας διμεθυλαμίνη και φορμικό οξύ. Η υδρόλυσή του σε διμεθυλαμίνη, είναι αρκετά 'επικίνδυνη' για την πορεία ενός πολυμερισμού, καθώς μπορεί να αποτελέσει απαρχηγή πολυμερισμού, για το μονομερές-NCA που θα διαλυσουμε μέσα στο μη καθαρό DMF. Γι' αυτούς τους λόγους, φυλάσσεται στο glove box ώστε να παραμένει υπό αδρανή ατμόσφαιρα και είναι υψηλής καθαρότητας (extra dry με H₂O < 50 ppm). Για τον καθαρισμό του το μεταγγίζουμε με γυάλινο χωνάκι σε σφαιρική φιάλη η οποία έχει ξηρανθεί στη γραμμή κενού και απαερώνουμε δύο φορές. Η απόσταξη γίνεται κλασματικά και συλλέγεται μόνο το μεσαίο κλάσμα, το οποίο φυλάσσεται στο ψυγείο στους -20° C προστατευμένο από το φως.

Οξεικός αιθυλεστέρας: Ο οξεικός αιθυλεστέρας (σ.ζ.: 77° C) χρησιμοποιείται ως διαλύτης στη σύνθεση του μονομερούς της ιστιδίνης. Ο διαλύτης αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε φιάλη 2L με πεντοξειδίο του φωσφόρου (P₂O₅) για μια ημέρα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή κενού, απαερώνεται και εν συνεχεία αποστάζεται σε διπλανή φιάλη 2L με στρόφιγγα που απαερώνεται άλλη μια φορά.

Βενζόλιο: Το βενζόλιο (σ.ζ.: 80° C) αφήνεται υπό ανάδευση για μια μέρα σε σφαιρική φιάλη που περιέχει λεπτότατα διαμερισμένο CaH₂ , για την απομάκρυνση ιχνών νερού και υγρασίας. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή κενού, το διάλυμα απαερώνεται και αποστάζεται σε φιάλη που περιέχει n- BuLi όπου και αφήνεται υπό ανάδευση για μια μέρα ώστε να αντιδρούν τα τελευταία ίχνη προσμίξεων με αυτό.

Τετραϋδροφουράνιο (THF) : Το τετραϋδροφουράνιο αφήνεται για μια μέρα να αντιδράσει παρουσία μεταλλικού νατρίου, απαερώνεται και μεταφέρεται σε νέα σφαιρική φιάλη 1000 ml που περιέχει κράμα μεταλλικού καλίου-νατρίου σε αναλογία 3:1, όπου και αφήνεται υπό ανάδευση. Η εμφάνιση κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη της καθαρότητας του THF. Όπως είναι γνωστό, το αρνητικό ιόν καλίου επιδιαλυτώνεται στο THF και

σχηματίζει διάλυμα με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Έχει προταθεί ότι το χρώμα αυτό, προέρχεται από σύμπλοκα του καθαρού διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια) σύμφωνα με την αντίδραση :

Τριαιθυλαμίνη: Αφήνεται να αντιδράσει για ένα βράδυ με CaH_2 και την επομένη αφού απαερωθεί, αποστάζεται σε γειτονική συσκευή 250 ml με εσμύρισμα που περιέχει λεπτά κομμένες πλάκες μεταλλικούνάτρίου. Κάθεφορά, αποστάζουμε την ποσότητα τριαιθυλαμίνης που θέλουμε σε γειτονική μικρή αμπούλα με εσμύρισμα και κόβουμε την στένωση.

5.3 Σύνθεση και καθαρισμός των N-καρβοξυανυδριτών

Τα μονομερή που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των πολυπεπτιδίων, οι N-Καρβοξυανυδρίτες, δεν είναι εμπορικά διαθέσιμοι, αλλά συντίθενται στο εργαστήριο. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιούνται ο NCA της Ιστιδίνης και ο NCA της κυστίνης.

5.3.1 Σύνθεση του NCA της κυστίνης^[83]

Χρησιμοποιείται δίκλιμη σφαιρική φιάλη, των 100 ml, η οποία ξηραίνεται στη γραμμή κενού. Στη συνέχεια προστίθενται, υπό ροή αργού, 3g (5.9 mmol) $(\text{Z-Cys-OH})_2$ και τα αφήνονται να ξηρανθούν στη γραμμή κενού, όλο το βράδυ. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται απόσταξη 60 ml καθαρού διαλύτη, διχλωρομεθανίου (DCM), και μετά από καλή απαέρωση η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή κενού. Όσο η φιάλη ξεπαγώνει, με νερό βρύσης, παρατηρείται γαλακτοειδές διάλυμα, λόγω του ότι η $(\text{Z-Cys-OH})_2$, είναι σχεδόν αδιάλυτη στο DCM. Η φιάλη τοποθετείται στον απαγωγό, εφαρμόζεται ψυκτήρας από το ένα στόμιο της φιάλης και συνεχής ροή Αργού (Ar) από το άλλο.

Στη συνέχεια, νέα φιαλή των 50 ml, ξηραίνεται στη γραμμή κενού, στην οποία αποστάζονται 20 ml DCM, και ξεπαγώνει με νερό βρύσης. Έπειτα, τα 20 ml

DCM, μεταγγίζονται σε γυάλινο χωνί με στρόφιγγα, και μέσα σ' αυτά διαλύονται 1.1 ml (14.75 mmol) θειόνυλοχλωριδίου (SOCl_2). Τα mol του SOCl_2 που χρησιμοποιούνται, είναι διπλάσια από τα mol της κυστίνης, ακριβώς γιατί το SOCl_2 , δίνει μόνο το ένα Cl στην κυστίνη, το άλλο αντιδρά με το H που φεύγει, για να δώσει HCl. Οπότε για να αντικατασταθούν και τα δύο -OH της κυστίνης, με Cl απαιτούνται τα διπλάσια mol SOCl_2 .

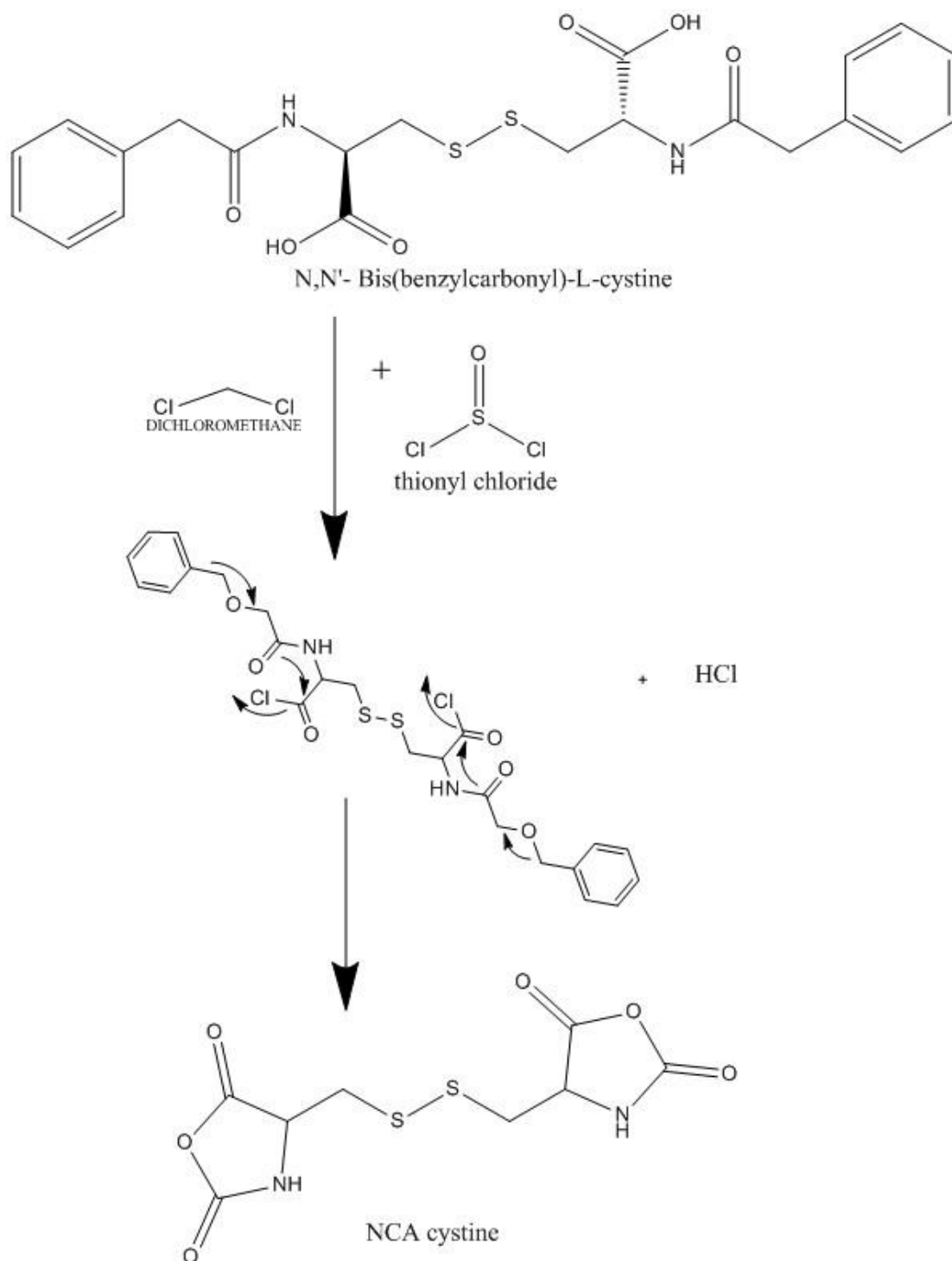
Σε αυτή τη φάση, προστίθεται στάγδην το SOCl_2 , ανοίγοντας τη στρόφιγγα του χωνιού, στην πρώτη φιάλη με την κυστίνη που βρίσκεται διαλυμένη στο DCM. Παρατηρείται ότι το γαλακτοειδές διάλυμα που υπήρχε αρχικά, αρχίζει να διαλυτοποιείται. Γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο, γιατί τα ενδιάμεσα χλωρίδια τα οποία σχηματίζονται, είναι πλήρως διαλυτά στο DCM. Το τελικό προϊόν δεν είναι διαλυτό στο DCM, οπότε όσο η αντίδραση προχωράει και αρχίζει να ολοκληρώνεται, περίπου μετά από 2 ώρες, το διάλυμα αρχίζει και ξαναγίνεται θολό και έχει υποκίτρινο χρώμα. Η αντίδραση αφήνεται να προχωρήσει για 20 ώρες. Παρατηρείται, λευκό στερεό και κίτρινο υπερκείμενο διάλυμα.

Ακολουθεί ο καθαρισμός του NCA, ο οποίος γίνεται στη γραμμή Αργού-κενού. Θερμαίνεται η φιάλη για να διαλυθεί ότι ενδιάμεσο μπορεί να έχει εγκλωβιστεί στο στερεό, έτσι ώστε να φύγει μαζί με το υπερκείμενο και να μην μείνει στο προϊόν. Στο ένα στόμιο της φιάλης τοποθετείται επίθεμα που συνδέει τη φιάλη με ροή αργού, και στο άλλο τοποθετείται αντίστροφο φίλτρο, από το οποίο περνάει το υπερκείμενο, και μεταγγίζεται σε άλλη φιάλη στην οποία υπάρχει κενό. Στη συνέχεια γίνεται πλύση με DCM για δεύτερη φορά, και απομάκρυνση του υπερκείμενου από το αντίστροφο φίλτρο. Παρατηρείται ότι το υπερκείμενο στην πρώτη πλύση, ήταν αρκετά σκούρο κίτρινο, ενώ στη δεύτερη πλύση ήταν πολύ πιο ανοιχτό κίτρινο. Τέλος απομονώνεται λευκό στερεό, το οποίο αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή κενού όλο το βράδυ.

Την επόμενη μέρα, η φιάλη με το στερεό, μεταφέρεται στο Glove box, όπου τελικά ζυγίζονται 1.1 g (2.2 mmol) από τον NCA της κυστίνης. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 37%.

Για να διαπιστωθεί ότι έχει συντεθεί ο NCA, γίνεται λήψη δείγματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης για να ληφθεί φάσμα IR, με το οποίο εξακριβώνεται η

πρόδος της. Και από το τελικό προϊόν λαμβάνεται φάσμα NMR.



Σχήμα 17 : Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του NCA της κυστίνης

5.3.2 Σύνθεση του NCA της ιστιδίνης^[77].

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, του 1L η οποία έχει αφεθεί προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού, προστίθενται 20g (40.2 mmol) της Boc-His(trt)-OH, υπό ροή Αργού. Η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού έτσι ώστε το στερεό να ξηρανθεί για μια ημέρα. Την επόμενη μέρα αποστάζονται περίπου 100 ml καθαρού THF, στη φιάλη με την Boc-His(trt)-OH. Παρατηρείται ότι το στερεό διαλύεται αμέσως στο THF. Στη συνέχεια η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή, και ξεπαγώνει με νερό βρύσης. Το διάλυμα είναι διαυγές και υποκίτρινο. Στη συνέχεια η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό και προετοιμάζεται η διάταξη για την αντίδραση. Η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο, ώστε να επιβραδυνθούν πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις, και από τη μια είσοδο της φιάλης τοποθετείται, εσμύρισμα που είναι συνδεδεμένο με παροχή αργού.

Σε άλλη φιάλη, των 50 ml, αποστάζονται στη γραμμή υψηλού κενού, 25 ml THF. Τα 25 ml THF, αφού ξεπαγώσουν με νερό βρύσης, μεταγγίζονται σε γυάλινο χωνί με στρόφιγγα, το οποίο έχει ξηρανθεί σε φούρνο των 150°C. Εκεί μέσα προστίθεται με σύριγγα και διαλύεται η ποσότητα του SOCl₂ που θα χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση. Θα χρησιμοποιηθούν 3.25 ml (44.2 mmol) SOCl₂, δηλαδή 1.1 φορές τα mol της Boc-His(trt)-OH.

Έπειτα, το χωνί προσαρμόζεται με επίθεμα πάνω από την άλλη είσοδο της φιάλης, και ανοίγεται η στρόφιγγά του έτσι ώστε το, διαλυμένο SOCl₂ στο THF, να πέφτει στάγδην στη φιάλη. Η προσθήκη ολοκληρώνεται μέσα σε περίπου, 20 λεπτά. Παρατηρείται ότι μόλις η προσθήκη ολοκληρωθεί, το χρώμα του διαλύματος από κίτρινο γίνεται πορτοκαλί, και αρχίζει να αποκτά ιξώδες. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η προοδός της. Ένδειξη για το τέλος της αντίδρασης αποτελεί η μείωση της κορυφής στα 1710 cm⁻¹, η οποία οφείλεται στην καρβοξυλική ομάδα του αρχικού αντιδρώντος. Η αντίδραση διαρκεί 2,5 ώρες, ενώ στη μια ώρα παρατηρείται ήδη πολύ πηχτό διάλυμα και λευκό στερεό.

Στο σημείο αυτό, στη φιάλη υπάρχει: ο NCA της ιστιδίνης (N^{im} -trityl-His NCA.), χλωρίδιο της Boc-His(trt)-OH, που δεν έχει κλείσει, και το υδροχλωρικό άλας του NCA της ιστιδίνης. Γι' αυτό το λόγο προστίθεται διαιθυλαιθέρας, έτσι ώστε σ' αυτόν να διαλυθεί το χλωρίδιο της Boc-His(trt)-OH, που δεν έχει κλείσει, και τυχόν SOCl_2 που έχει απομείνει. Στη συνέχεια γίνεται διήθηση, σε χωνί Buchner, έτσι ώστε να συλλεχθεί το στερεό (έχει υποκίτρινο χρώμα), το οποίο μεταφέρεται σε φιάλη που έχει ξηρανθεί στη γραμμή υψηλού κενού, και αφήνεται προς ξήρανση όλο το βράδυ. Στο στερεό αυτό, υπάρχει πλέον ο NCA της ιστιδίνης και το υδροχλωρικό άλας του NCA. Με προσθήκη οξεικού αιθυλεστέρα AcOEt, την επόμενη μέρα, γίνεται ο διαχωρισμός τους.

Την επόμενη μέρα αποστάζονται μέσα στη φιάλη με το στερεό, 250- 300 ml AcOEt. Η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή, και ξεπαγώνει με νερό βρύσης. Το διάλυμα έχει χρώμα υποκίτρινο, και είναι γαλακτοειδές. Αυτό συμβαίνει γιατί: Ο NCA της ιστιδίνης είναι αδιάλυτος στον οξεικό αιθυλεστέρα, ενώ το υδροχλωρικό άλας του NCA, δεν είναι. Η φιάλη τοποθετείται στον απαγωγό σε υδατόλουτρο 45°C , για περίπου μια ώρα, έτσι ώστε να διαλυθεί ο NCA. Και στη συνέχεια μπαίνει σε παγόλουτρο έτσι ώστε να πέσει το ίζημα.

Εν συνεχεία, γίνεται διήθηση σε χωνί Buchner, συλλέγεται το στερεό (το οποίο είναι το υδροχλωρικό άλας του NCA της ιστιδίνης), τοποθετείται σε προζυγισμένη φιάλη, και αφήνεται όλο το βράδυ στη γραμμή κενού προς ξήρανση.

Την επόμενη μέρα ζυγίζεται η φιάλη με το στερεό, αφού έχει ξηρανθεί όλο το βράδυ. Το στερεό είναι 13.54 g (29 mmol). Στη συνέχεια θα τιτλοδοτηθεί η ποσότητα αυτή του NCA-His:HCl, με 1:1 ποσότητα τριαιθυλαμίνης (Et_3N), έτσι ώστε να αντιδράσει η Et_3N , με το HCl, και να μείνει ο καθαρός NCA.

Στη φιάλη με τον NCA-His:HCl, αποστάζονται 250 ml οξεικού αιθυλεστέρα, και λαμβάνεται γαλακτοειδές διάλυμα το οποίο ξεπαγώνει με νερό βρύσης. Σε άλλη φιάλη των 50 ml αποστάζονται περίπου 40 ml AcOEt, στον οποίο θα διαλυθεί η ποσότητα της τριαιθυλαμίνης που θα προστεθεί στο άλας του NCA. Αποστάζεται στη γραμμή υψηλού κενού μικρή ποσότητα καθαρής τριαιθυλαμίνης σε δοκιμαστικό σωλήνα που έχει προσαρμοστεί στη γραμμή.

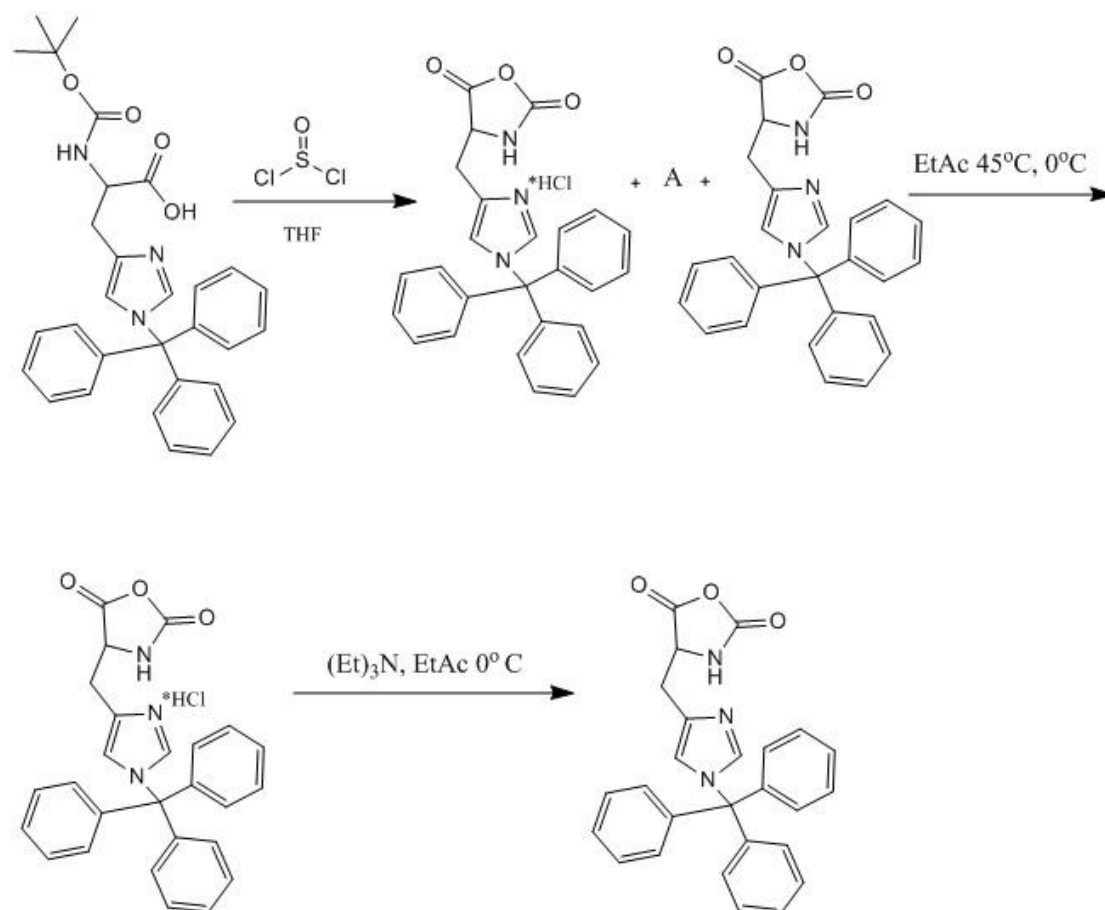
Τα 50 ml του οξεικού αιθυλεστέρα και 4.035 ml (29mmol) Et₃N (1:1 ποσότητα με τα mol του NCA-His:HCl), διαλύονται σε γυάλινο χωνί με στρόφιγγα, το οποίο έχει ξηρανθεί στο φούρνο των 150° C.

Η φιάλη με τον NCA-His:HCl τοποθετείται σε παγόλουτρο, γιατί θα προστεθεί Et₃N, η οποία μπορεί να ξεκινήσει πολυμερισμό όταν υπάρχει NCA. Το χωνί προσαρμόζεται με επίθεμα στη φιάλη, και ανοίγεται η στρόφιγγα, έτσι ώστε να πέσει στάγδην το διάλυμα Et₃N-AcOEt. Η προσθήκη ολοκληρώνεται σε 15 min περίπου και αφήνεται για να γίνει η αντίδραση για μια ώρα.

Ο N^{im}-trityl-His NCA είναι διαλυτός στον AcOEt, ενώ το άλας Et₃N:HCl, δεν είναι διαλυτό. οπότε σ' αυτή τη μια ώρα, αρχικά το διάλυμα είναι γαλακτοειδές, στη συνέχεια γίνεται για πολύ λίγο διαυγές και στη συνέχεια παίρνει ξάνα γαλακτοειδή μορφή γιατί το Et₃N:HCl πέφτει σαν ίζημα.

Σε φιάλη των 2L, που , έχει ξηρανθεί στη γραμμή κενού, προστίθεται περίπου 1L εξανίου, και προσαρμόζεται σ' αυτή διηθητικό χωνί στο οποίο διηθείται το περιεχόμενο της παραπάνω φιάλης. Στο χωνί μένει το υδροχλωρικό άλας της Et₃N. Στο εξάνιο καταβυθίζεται ο καθαρός πλέον NCA της Ιστιδίνης, με λευκό χρώμα. Αμέσως διηθείται σε άλλη φιάλη των 2L, στην οποία έχει προσαρμοστεί φίλτρο. Ο καθαρός NCA, μένει στο φίλτρο και αμέσως συλλέγεται, τοποθετείται σε φιάλη των 250 ml η οποία έχει υποστεί ξήρανση στη γραμμή κενού, και αφήνεται να ξηρανθεί όλο το βράδυ στη γραμμή κενού.

Την επόμενη μέρα, η φιάλη αποπροσαρμόζεται από τη γραμμή κενού, και μεταφέρεται στο glove box, όπου ο NCA, ζυγίζεται και στη συνέχεια φυλάσσεται εκεί. Ζυγίστηκαν 9.4 g. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 57.1%.



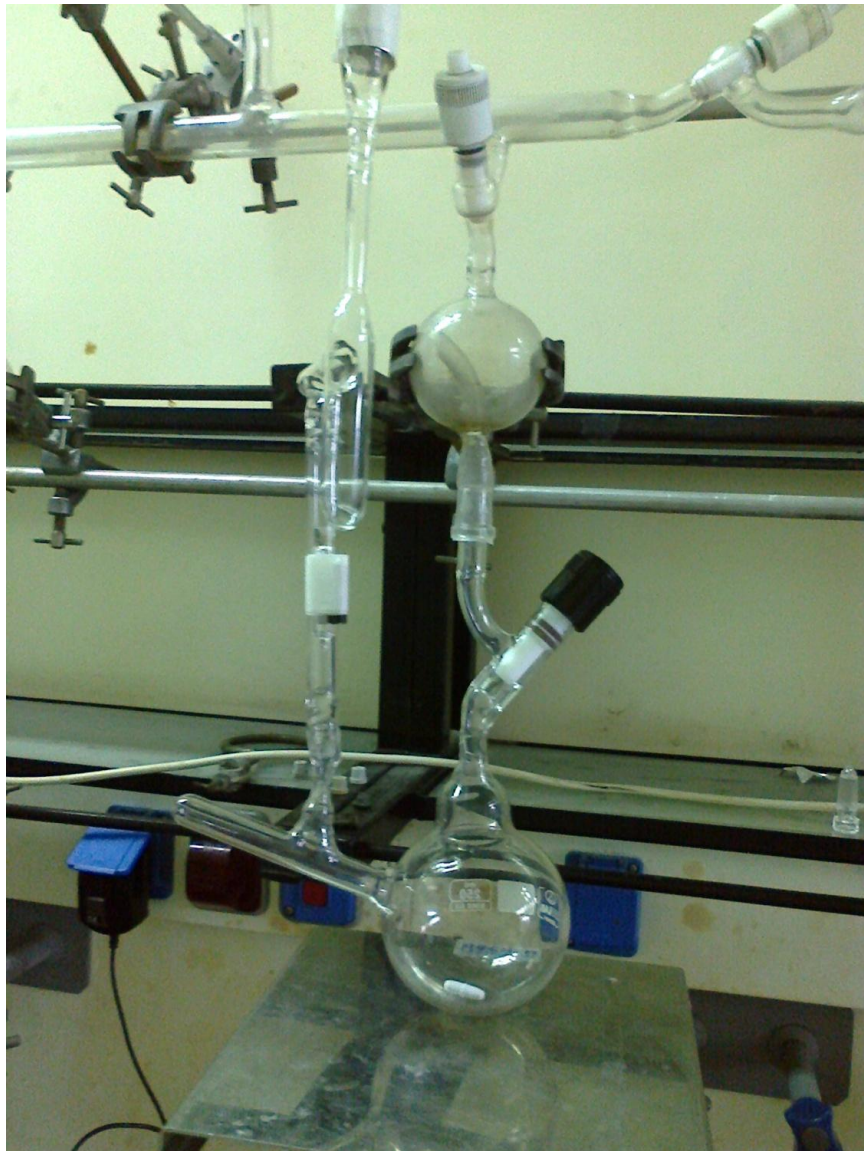
Σχήμα 18: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του N^{im}-trityl-His NCA.

5.4 Σύνθεση δικτυωμένων μικκυλίων ιστιδίνης με δισουλφιδικούς δεσμούς (NANO GEL).

5.4.1 Σύνθεση NANO GEL με ποσοστό κυστίνης 35%

ΞΗΡΑΝΣΗ ΤΟΥ mPEO-NH₂

Σε ειδικά σχεδιασμένη συσκευή πολυμερισμού, η οποία έχει ελεγχθεί για την ύπαρξη μικροοπών και έχει υποστεί ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού, προστίθενται 0.25 g (0.05mmol) πολυαιθυλενοξειδίου με αμινομάδα, (mPEO-NH₂), με μοριακό βάρος 5000. Το mPEO-NH₂, αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού όλο το βράδυ. Θα χρησιμοποιηθεί ως απαρχητής πολυμερισμού.



Εικόνα 14: Η συσκευή στην οποία γίνεται ο πολυμερισμός, προσαρμοσμένη στη γραμμή υψηλού κενού.

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ mPEO-NH₂ ΜΕ ΒΕΝΖΟΛΙΟ

Σ' αυτό το σημείο, γίνεται απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας από το mPEO-NH₂, με την προσθήκη βενζολίου. Το βενζόλιο σχηματίζει αζεοτροπικό μείγμα με το H₂O, και στη συνέχεια αποστάζουν μαζί σε άλλη φιάλη, και έτσι το H₂O απομακρύνεται από το πολυαιθυλενοξειδίο. Η καθαρότητα τόσο του απαρχητή όσο και των μονομερών κρίνεται απαραίτητη για τον ελεγχόμενο χαρακτήρα του πολυμερισμού και για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων.

Έτσι, την επόμενη μέρα, καθαρό βενζόλιο, αποστάζει στη φιάλη με το πολυαιθυλενοξειδίο, μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Μόλις ληφθεί ικανή ποσότητα να διαλύσει το mPEO-NH₂, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού, και αφού ξεπαγώσει με νερό βρύσης, τοποθετείται σε υδρόλουτρο 40° C, έτσι ώστε να διαλυθεί πλήρως το mPEO-NH₂. Το διάλυμα αφήνεται υπο ανάδευση για δύο ώρες. Στη συνέχεια επαναπροσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, και όλο το βενζόλιο αποστάζει σε κενή φιάλη, που έχει επίσης προσαρμοστεί στη γραμμή υψηλού κενού. Στη φιάλη του πολυμερισμού έχει πλέον απομείνει μόνο το καθαρό πλέον από υγρασία, mPEO-NH₂, το οποίο αφήνεται στη γραμμή υψηλού κενού όλο το βράδυ.

ΕΝΑΡΞΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ

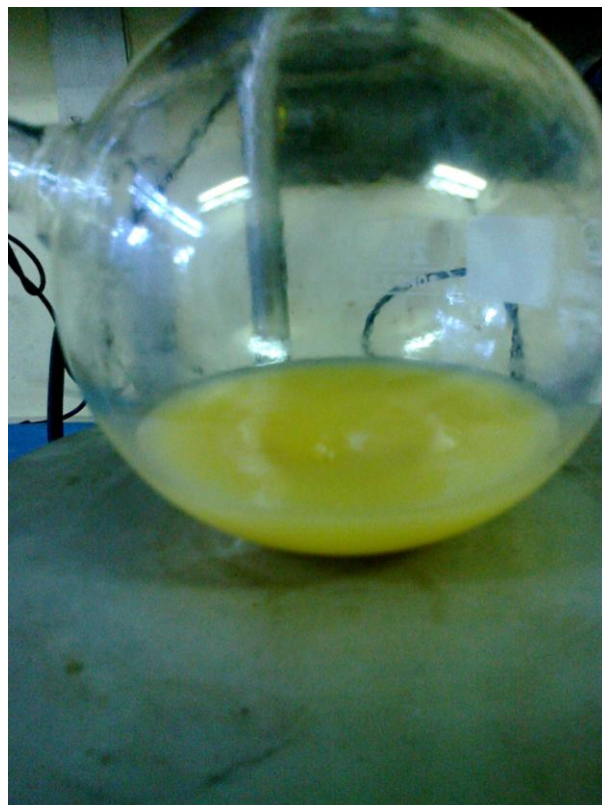
Την επόμενη μέρα, γίνεται η έναρξη του πολυμερισμού. Περίπου 20 ml DMF αποστάζουν στη φιάλη του πολυμερισμού έτσι ώστε να διαλύσουν το mPEO-NH₂. Η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού, και αφού ξεπαγώσει το DMF, εισάγεται στο Glove Box, όπου ζυγίζονται και εισάγονται στην πλευρά του break seal, οι ποσότητες των μονομερών. Εισήχθησαν στη συσκευή πολυμερισμού, 0.8 g (2 mmol) N^{im}-trityl-His NCA, και 0.23 g NCA-cystine. Σε ότι αφορά την εισαγωγή της φιάλης στο Glove Box, αρχικά γίνονται τρεις κύκλοι αργού-κενού, διαδικασία που διαρκεί τουλάχιστον μισή ώρα. Η διαδικασία είναι αναγκαία ώστε να μην εισέλθει στον κύριο θάλαμο υγρασία ή αέρας από το περιβάλλον. Η προσθήκη των μονομερών γίνεται με τη βοήθεια χωνιού, αφού πρώτα έχει προηγηθεί σχολαστικός καθαρισμός του λίπους από το εσμύρισμα.

Η συσκευή πολυμερισμού, προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού από την πλευρά του break seal, και αποστάζεται σ' αυτή ποσότητα καθαρού DMF, ικανή να διαλύσει τις ποσότητες των μονομερών. Όσο ακόμα το DMF είναι παγωμένο, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού. Όταν το DMF ξεπαγώσει και τα μονομερή διαλυθούν πλήρως, το break seal σπάει με τη βοήθεια γυάλινου breaker που υπάρχει στη φιάλη. Έτσι το διάλυμα των μονομερών ενώνεται με τον απαρχητή και ο πολυμερισμός ξεκινάει. Αμέσως υπάρχει έκλυση CO₂, η οποία συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια του

πολυμερισμού. Η έκλυση CO_2 , είναι κινητήριος δύναμη για τον πολυμερισμό. Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού αρκετές φορές με σκοπό να απομακρυνθεί και να εκτονωθεί το αέριο CO_2 που έχει παραχθεί ώστε η ισορροπία να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου.



Εικόνα 15: Το διάλυμα της αντίδρασης κατά την έναρξη του πολυμερισμού.



Εικόνα 16: Το διάλυμα της αντίδρασης, προς το τέλος του πολυμερισμού

ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ

Για να καταβυθιστεί το πολυμερές, χρησιμοποιείται ένας κακός για το συγκεκριμένο πολυμερές διαλύτης, διαιθυλεθέρας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, σε ποτήρι ζέσεως των 2L, αποχύνεται όλο το περιεχόμενο της φιάλης του πολυμερισμού, και αμέσως παρατηρείται καταβύθιση στερεού. Η



Εικόνα 17: Διήθηση του πολυμερούς στο χωνί Buchner.

καταβύθιση υποβοηθάται, με ψύξη του ποτηριού ζέσεως για 30 λεπτά. Ακολουθεί διήθηση σε χωνί Buchner, με υδρόφοβο φίλτρο. Από το χωνί συλλέγεται η ποσότητα του στερεού, χρώματος πορτοκαλί, η οποία φυλλάσσεται σε σφαιρική φιάλη των 50 ml, με πώμα μέχρι την επόμενη μέρα οπότε και θα γίνει η αποπροστασία του πολυμερούς.



Εικόνα 18: Διήθηση στο χωνί Buchner.

ΑΠΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ

Το πολυμερές διαλύεται σε καλό διαλύτη γι' αυτό, σε διχλωρομεθάνιο (περίπου 20 ml). Στη συνέχεια προστίθεται 20 ml τριφθοροξικού οξέος (TFA), το οποίο προστίθεται με σκοπό να γίνει η αποπροστασία των μονάδων της ιστιδίνης από τις τρίτυλο ομάδες. Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί, ότι οι τρίτυλο ομάδες που έχουν «κοπεί», δεν θα επανασυνδεθούν, λόγω της δραστηρότητάς τους ως καρβοκατιόντα, προστίθενται 2 σταγόνες τρισσοπρόπυλο σιλάνιο, το οποίο σχηματίζει δεσμό μαζί τους και τις καθιστά ανενεργές. Η ποσότητα τρισσοπρόπυλοσιλανίου, που προστίθεται, είναι πάρα πολύ μικρή, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι οι δισουλφιδικό δεσμοί που υπάρχουν στο πολυμερές, θα μείνουν ανεπηρέαστοι. Έπειτα η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και ο διαλύτης απομακρύνεται σε λίγα λεπτά. Έτσι πλέον στη φιάλη μένει μόνο το πολυμερές. Ακολουθούν πλύσεις με διαιθυλαιθέρα (εως ότου το υπερκείμενο να είναι αρκετά διαυγές) έτσι ώστε μαζί του να παρασυρθούν και οι τρίτυλο ομάδες που έχουν «κοπεί».

Στη συνέχεια, το πολυμερές διαλύεται σε νερό milliQ, και μπαίνει σε μεμβράνη dialysis με όριο 3500 MB. Η μεμβράνη μπαίνει, σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει, 2L H₂O milliQ, και το pH του ρυθμίζεται στο 10 (με προσθήκη NaOH). Τις επόμενες ημέρες παρατηρείται μείωση του pH του νερού, λόγω όξινων μορίων που φεύγουν από τη μεμβράνη και αντιδρούν με το NaOH. Γίνονται αλλαγές του νερού και προσθήκη NaOH, μέχρι να παρατηρηθεί σταθεροποίηση του pH στην περιοχή 7-8, οπότε και σταματά η προσθήκη NaOH, και γίνονται μόνο αλλαγές νερού. Όλη η διαδικασία διαρκεί 7-8 ημέρες.

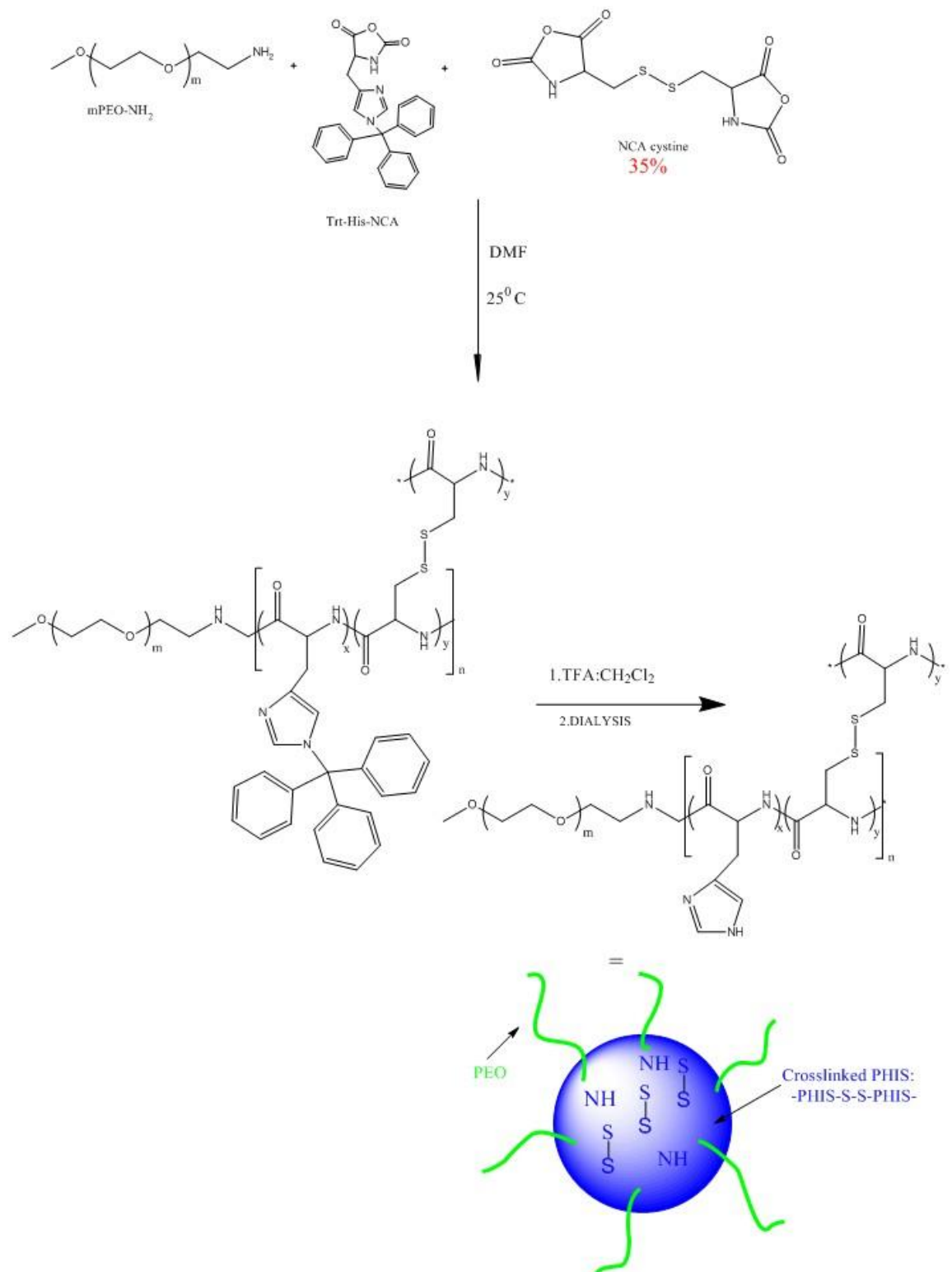


Εικόνα 19: Dialysis σε μεμβράνη με 3500 MB cut off

Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία του freeze drying, για την εκδίωξη του νερού από το πολυμερές: όπου το περιεχόμενο της μεμβράνης (πολυμερές διαλυμένο σε νερό), αποχύνεται σε φιάλη των 50 ml, παγώνει με τη βοήθεια υγρού αζώτου και προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού. Επίσης στη γραμμή υψηλού κενού, προσαρμόζεται και κενή φιάλη, η οποία παγώνει με υγρό άζωτο και έτσι το νερό από τη πρώτη φιάλη πηγαίνει στη δεύτερη. Τέλος παραλαμβάνουμε και ζυγίζουμε 350 mg πολυμερούς.



Εικόνα 20: Απομάκρυνση του H_2O , από το πολυμερές με την τεχνική του freeze drying.



Σχήμα 19 : Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του nanogel 35% .

Στη συνέχεια πραγματοποιούνται άλλα δύο πειράματα με την ίδια διαδικασία, αλλά με διαφορετικά ποσοστά δικτύωσης, άρα και διαφορετικά ποσοστά κυστίνης.

➤ **NANO GEL 12 % ΚΥΣΤΙΝΗ**

Ζυγίζονται 1 g Ιστιδίνης (23.6 mmol), 0.083g κυστίνης (0.28 mmol) και 0.25g mPEO-NH₂ (0.05 mmol), και τελικά λαμβάνονται 320 mg πολυμερούς.

➤ **NANO GEL 7% ΚΥΣΤΙΝΗ**

Ζυγίζονται 1g Ιστιδίνης (23.6 mmol), 0.048g κυστίνης (0.16 mmol) και 0.25g mPEO-NH₂ (0.05 mmol), και τελικά λαμβάνονται 225 mg πολυμερούς.

Οι διαδικασίες που ακολουθούνται είναι οι εξής:

1. Ξήρανση του mPEO-NH₂ στη γραμμή υψηλού κενού.
2. Καθαρισμός του mPEO-NH₂ με βενζόλιο.
3. Προθήκη των μονομερών και του διαλύτη (DMF).
4. Έναρξη του πολυμερισμού.
5. Καταβύθιση του πολυμερούς.
6. Αποπροστασία του πολυμερούς.
7. Dialysis.
8. Freeze Drying.

Όπως περιγράφηκαν παραπάνω.

5.5 Νανοσωματίδια χρυσού

5.5.1 Δημιουργία νανοσωματιδίων χρυσού στο Nanogel 12% κυστίνη

Ζυγίζονται 10.4 mg του nanogel 12%, και διαλύονται σε 7 ml H₂O, μέσα σε μικρό φιαλίδιο με πώμα. Στο φιαλίδιο προστίθεται ποσότητα 1:1 κατά βάρος από το H₂AuCl₄:3H₂O, (δηλ. 1ml από διάλυμα 29.7 mg του άλατος σε 3 ml H₂O). Το pH της αντίδρασης ρυθμίζεται στο 7.1, με προσθήκη μερικών σταγόνων του NaOH 0.1N. Το φιαλίδιο τοποθετείται σε ελαιόλουτρο των 80° C^[89]. Αρχικά το διάλυμα έχει έντονο κίτρινο χρώμα, μετά από 10 min θέρμανσης παρατηρείται ότι γίνεται άχρωμο και μέσα σε 20 min από την

έναρξη της αντίδρασης το διάλυμα γίνεται μωβ (χαρακτηριστικό χρώμα που δίνουν τα νανοσωματίδια χρυσού), και πέφτει μωβ ίζημα.

Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα nanogel 35% και 7%. Ο χρόνος στον οποίο συντελείται η αντίδραση είναι ίδιος. Το μόνο που αλλάζει είναι το ότι στα νανοσωματίδια που δημιουργούνται σε αυτά τα δύο πολυμερή, δεν πέφτει ίζημα αλλά υπάρχει πολύ καλή διασπορά.

Το πείραμα επαναλήφθηκε και με διαφορετικά ποσοστά από το άλας του χρυσού. Αυτό που αλλάζει είναι ο χρόνος στον οποίο συντελείται η αντίδραση. Συγκεκριμένα η οριακή ποσότητα του άλατος με την οποία μπορούν να σχηματιστούν νανοσωματίδια χρυσού, είναι το 38% κατα βάρος της ποσότητας του πολυμερούς και ο χρόνος της αντίδρασης είναι 3 ώρες.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε τυφλό πείραμα χωρίς πολυμερές, μόνο με την ποσότητα του mPEO-NH₂ η οποία υπάρχει στο πολυμερές, για να αποδειχθεί ότι τα νανοσωματίδια χρυσού δημιουργούνται λόγω της ύπαρξης της ιστιδίνης και όχι του mPEO-NH₂.

Ζυγίζονται 7.3 mg mPEO-NH₂ (MB 5000), και 17 mg H₂AuCl₄:3H₂O. Το pH της αντίδρασης ρυθμίζεται στο 7.1 και τοποθετείται σε ελαιόλουτρο των 80° C. Το διάλυμα αρχικά είναι ελαφρώς κίτρινο . Σε μια ώρα από την έναρξη της αντίδρασης το χρώμα γίνεται λίγο πιο σκούρο κίτρινο. Μετά από 34 ώρες το χρώμα του διαλύματος είναι σκούρο λαδί. Κάτι που αποδεικνύει ότι τα νανοσωματίδια χρυσού στο nanogel δημιουργούνται σίγουρα λόγω της παρουσίας της ιστιδίνης.



T: 0 min



T: 10 min



T: 20 min

Εικόνα 21: Η πειραματική πορεία σύνθεσης νανοσωματιδίων χρυσου.

5.6 Χαρακτηρισμός των πολυμερών που συντέθηκαν

Η σύνθεση τόσο των μονομερών, όσο και των πολυμερών ελέγχθηκε τόσο με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), όσο και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Στη συνέχεια οι δομές τους ελέγχθηκαν με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλο φασματοφωτόμετρο της εταιρείας Malvern Instr. (μοντέλο Autosizer 4700), το οποίο διαθέτει laser μεταβλητής ισχύος Ar^+ που λειτουργεί στα 488nm, αντλία φιλτραρίσματος νερού RR98 και μονάδα ελέγχου θερμοκρασίας τύπου PCS8. Η κυψελίδα εισαγωγής του δείγματος αποτελείται από χαλαζία quartz, ενώ όλες οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων έγιναν, σε γωνίες 90° , 60° , 120° , για να ελεγχθεί η ύπαρξη γωνιακής εξάρτησης, σε θερμοκρασίες $25^\circ C$, $37^\circ C$, $41^\circ C$ για να παρατηρηθεί τυχόν απόκριση στη

μεταβολή θερμοκρασίας και σε pH 7.4, 6.5, 5.0, για να παρατηρηθεί επίσης τυχόν απόκριση στο pH.

Το μέγεθος και το σχήμα των πολυμερών ελέγχθηκε και με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διαπερατότητας (TEM).

Ακολούθησαν μετρήσεις του ζ-δυναμικού των πολυμερών, σε αντίστοιχο όργανο Zetasizer 3000HS, για να επιβεβαιωθεί ότι το PEO, βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά των διαμορφώσεων που έχουν δημιουργηθεί.

Επιπλέον ελήφθησαν φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού, όπου παρατηρήθηκε η δευτεροταγής δομή των πολυμερών και οι αλλαγές οι οποίες συμβαίνουν σε αυτή καθώς το pH μεταβάλλεται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Σύνθεση των N- καρβοξυανυδριτών

Η σύνθεση των NCA's αποτελεί το πρώτο και απαραίτητο στάδιο της παρούσας εργασίας, καθώς αποτελούν τα μονομερή τα οποία θα πολυμεριστούν. Ο έλεγχος της σύνθεσης τους έγινε με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

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

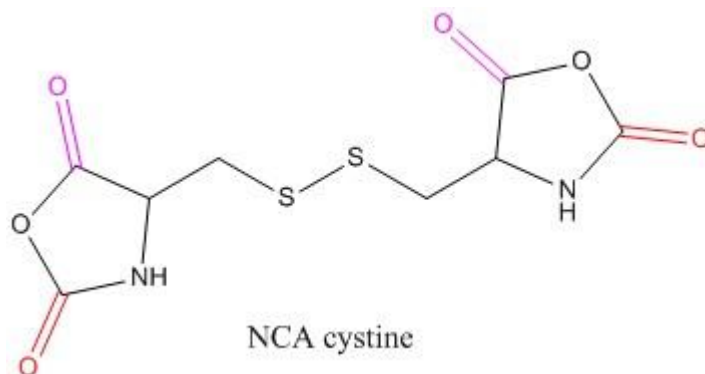
6.1.1 Σύνθεση του NCA της κυστίνης

Αρχικά λαμβάνεται φάσμα IR του αρχικού αντιδρώντος N,N' Δις(Βενζυλοξυκαρβόνυλο)-L-κυστίνη [N,N'- Bis(Benzyloxycarbonyl) - L-cystine] ή (Z-Cys-OH)₂, στο οποίο παρατηρούνται δύο χαρακτηριστικές κορυφές: μια στα 1694 cm⁻¹, η οποία αφορά τη δόνηση του καρβονυλίου του καρβοξυλικού οξέος (με πράσινο χρώμα) και , μια στα 1525 cm⁻¹, η οποία αφορά τη δόνηση του αζώτου που συνδέεται με καρβονύλιο (με μπλέ χρώμα).



Σχήμα 20: Η δομή της N,N' Δις(Βενζυλοξυκαρβόνυλο)-L-κυστίνης ή (Z-Cys-OH)₂.

Στη συνέχεια καθώς η αντίδραση προχωράει και έχουμε σχηματισμό του NCA, λαμβάνονται φάσματα IR ανά μια ώρα, όπου βλέπουμε σταδιακά τη μείωση των παραπάνω κορυφών και σχηματισμό χαρακτηριστικών κορυφών N-καρβόξυανυδρίτη, στα 1827 cm^{-1} , 1782 cm^{-1} και στα 1852 cm^{-1} . Οι δύο πρώτες κορυφές οφείλονται στη δόνηση του καρβονυλίου που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του ανυδρίτη (κόκκινο χρώμα), δηλ. του C₃ και η τρίτη οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου του C₅ άνθρακα (ροζ χρώμα) .

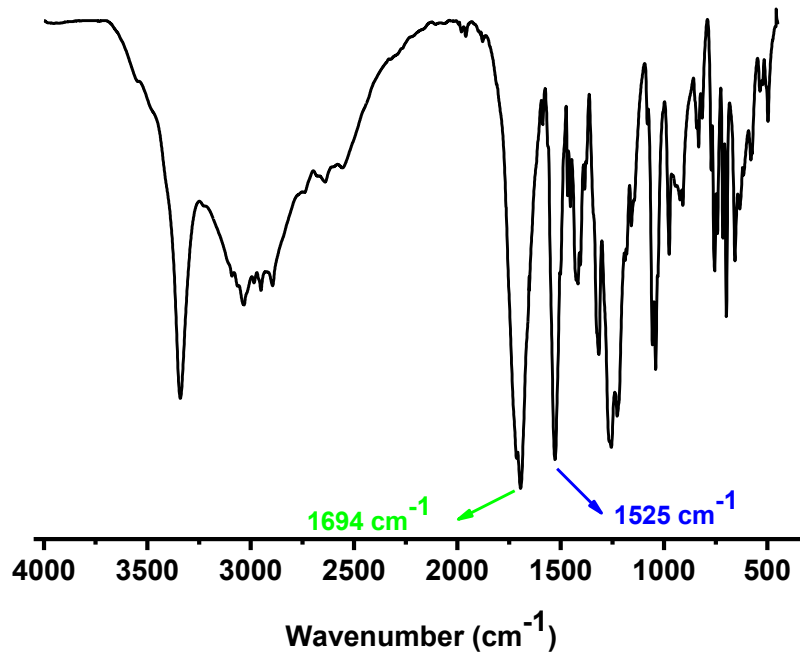


Σχήμα 21: Η δομή του NCA της κυστίνης

Στα 1632 cm^{-1} , συναντάμε την κορυφή που οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου της ενδιάμεσης ένωσης – του χλωριδίου- που δεν έχει κλείσει. Η οποία καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης μειώνεται.

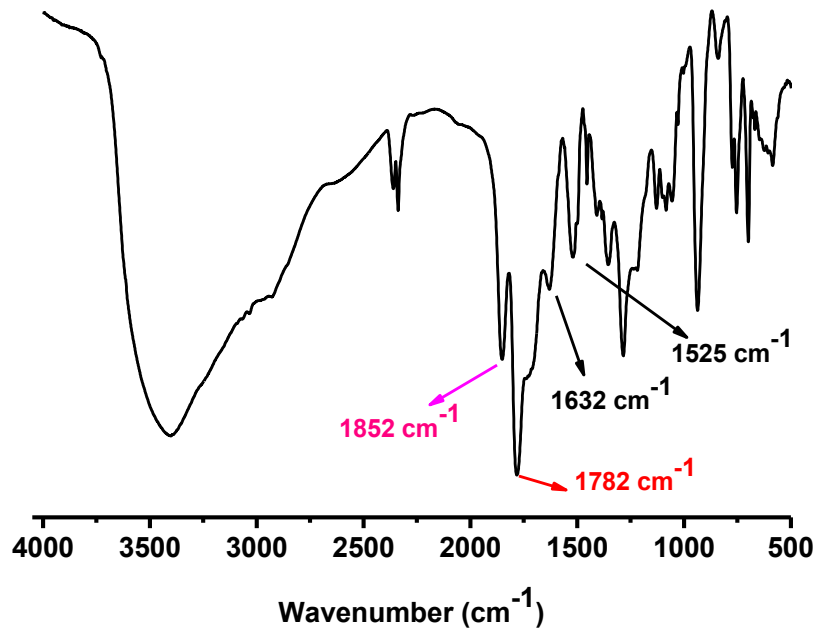
Παρακάτω φαίνονται τα φάσματα IR, και είναι ορατές οι μεταβολές των κορυφών που περιγράφονται.

22



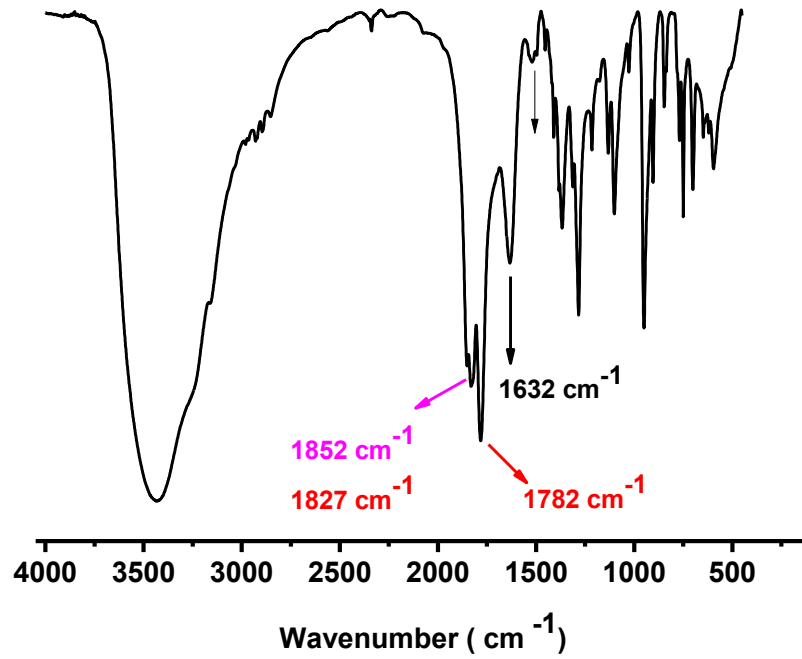
Εικόνα 22: Φάσμα IR της αρχικής ένωσης (Z-Cys-OH)₂

23



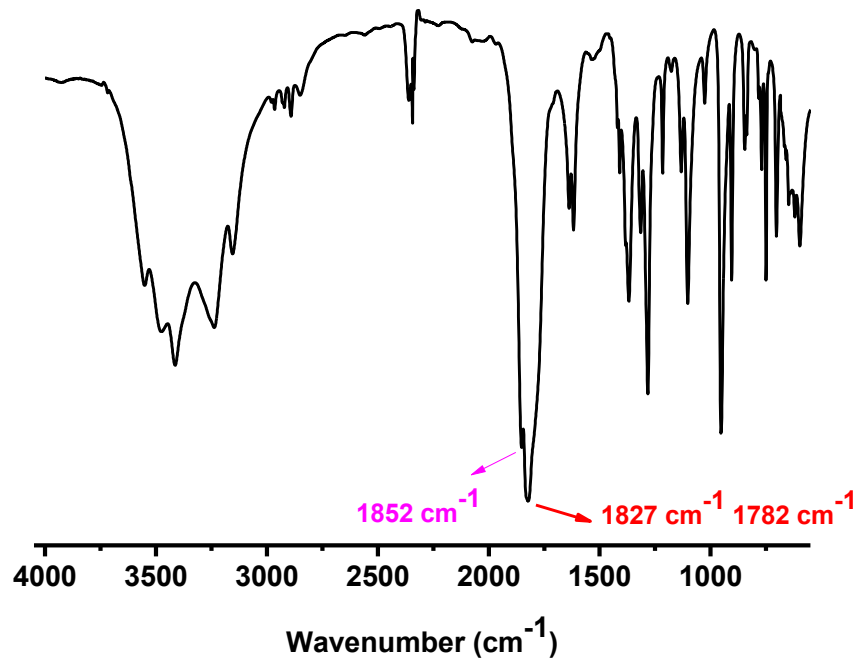
Εικόνα 23 : Φάσμα IR, μια ώρα μετά την έναρξη της σύνθεσης του NCA της κυστίνης.

24



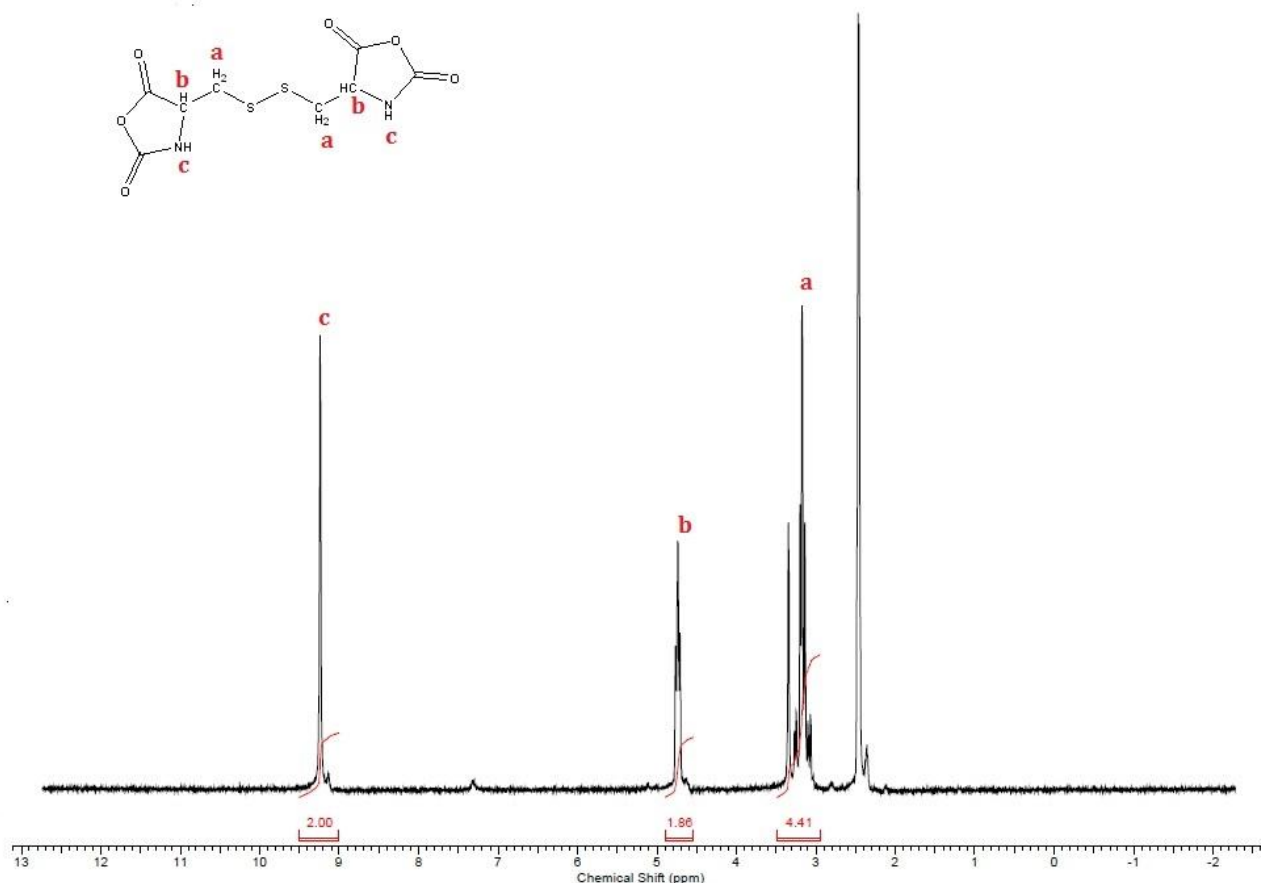
Εικόνα 24: Φάσμα IR, τρεις ώρες μετά την έναρξη της σύνθεσης του NCA της κυστίνης.

25



Εικόνα 25: Τελικό φάσμα IR του NCA της κυστίνης.

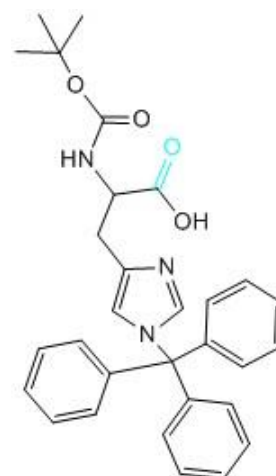
Τέλος έγινε λήψη φάσματος NMR από το τελικό προϊόν, σε διαλύτη DMSO όπου στα 3.2 ppm φαίνονται τα μεθυλениκά υδρογόνα, στα 4.5 ppm φαίνονται τα υδρογόνα των ανθράκων C₅, και στα 9.5 ppm φαίνονται τα λιγότερο ηλεκτρονιακά προστατευμένα υδρογόνα του αζώτου του ανυδρίτη.



Εικόνα 26: Φάσμα ¹H-NMR, του NCA της κυστίνης

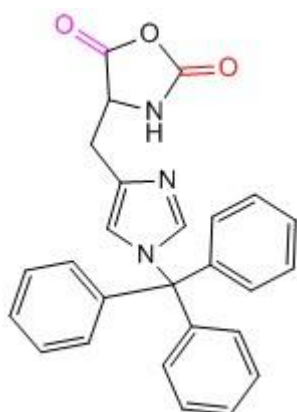
6.1.2 Σύνθεση του NCA της ιστιδίνης

Αρχικά λαμβάνεται ένα φάσμα IR του αρχικού αντιδρώντος, N_α-Boc-N_{im}-trityl-L-ιστιδίνης, το οποίο δίνει μια χαρακτηριστική κορυφή στα 1710 cm⁻¹, η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου του αμινοξέος της ιστιδίνης (γαλάζιο χρώμα).



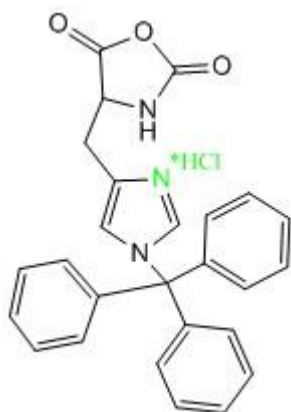
Σχήμα 22: N_α-Boc-N_{im}-Trityl-L-ιστιδίνη

Μιά ώρα μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου κυκλοποίησης, του θειόνυλοχλωριδίου, λαμβάνεται ξανά φάσμα IR, όπου είναι ορατή η μείωση της κορυφής στα 1710 cm^{-1} , και η εμφάνιση των δυο χαρακτηριστικών κορυφών του N- καρβοξυανυδρίτη, στα 1785 cm^{-1} και 1852 cm^{-1} . Η εμφάνιση αυτών των δύο κορυφών, υποδηλώνει την επιτυχή σύνθεση του N- καρβόξυ ανυδρίτη. Η κορυφή στα 1785 cm^{-1} , που αφορά το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του ανυδρίτη (κόκκινο χρώμα), δηλ. τον C₃, και η δεύτερη στα 1850 cm^{-1} , αφορά το καρβονύλιο του C₅ άνθρακα (ροζ χρώμα).



Σχήμα 23: Trt-NCA της ιστοιδίνης

Επιπλέον είναι ορατή και μία κορυφή στα 1620 cm^{-1} , η οποία οφείλεται σε έκταση δόνησης του δεσμού –N-H με το HCl (πράσινο χρώμα), στον ιμιδαζολικό δακτύλιο του N-καρβόξυανυδρίτη ιστοιδίνης.



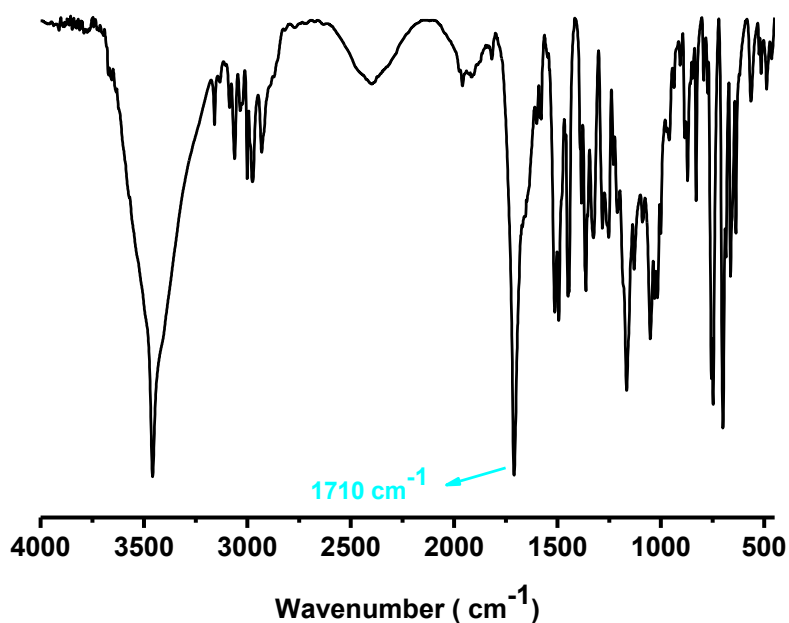
Σχήμα 24: Ενδιάμεσο άλας της πορείας σχηματισμού του Trt NCA της ιστοιδίνης.

Στα $675\text{ cm}^{-1} - 730\text{ cm}^{-1}$, εμφανίζονται κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών –CH=CH–, των βενζολικών δακτυλίων της τρίτυλο ομάδας.

Στο τελικό φάσμα, δεν υπάρχουν: η κορυφή στα 1710 cm^{-1} , που σημαίνει ότι το αρχικό αμινοξύ της ιστοιδίνης έχει απομακρυνθεί πλήρως, και η κορυφή στα

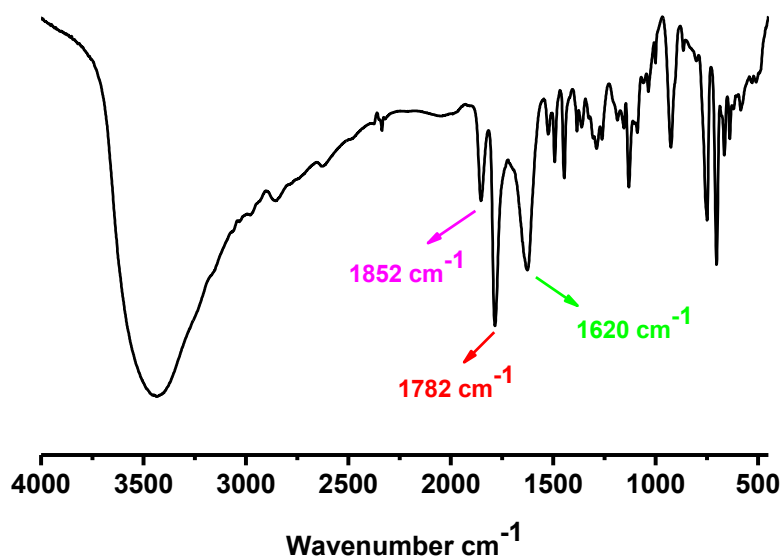
1620 cm^{-1} , κάτι το οποίο δείχνει ότι μετά την προσθήκη ισομοριακής ποσότητας τριαιθυλαμίνης, το HCl δεσμεύτηκε και απομακρύθηκε επιτυχώς.

27

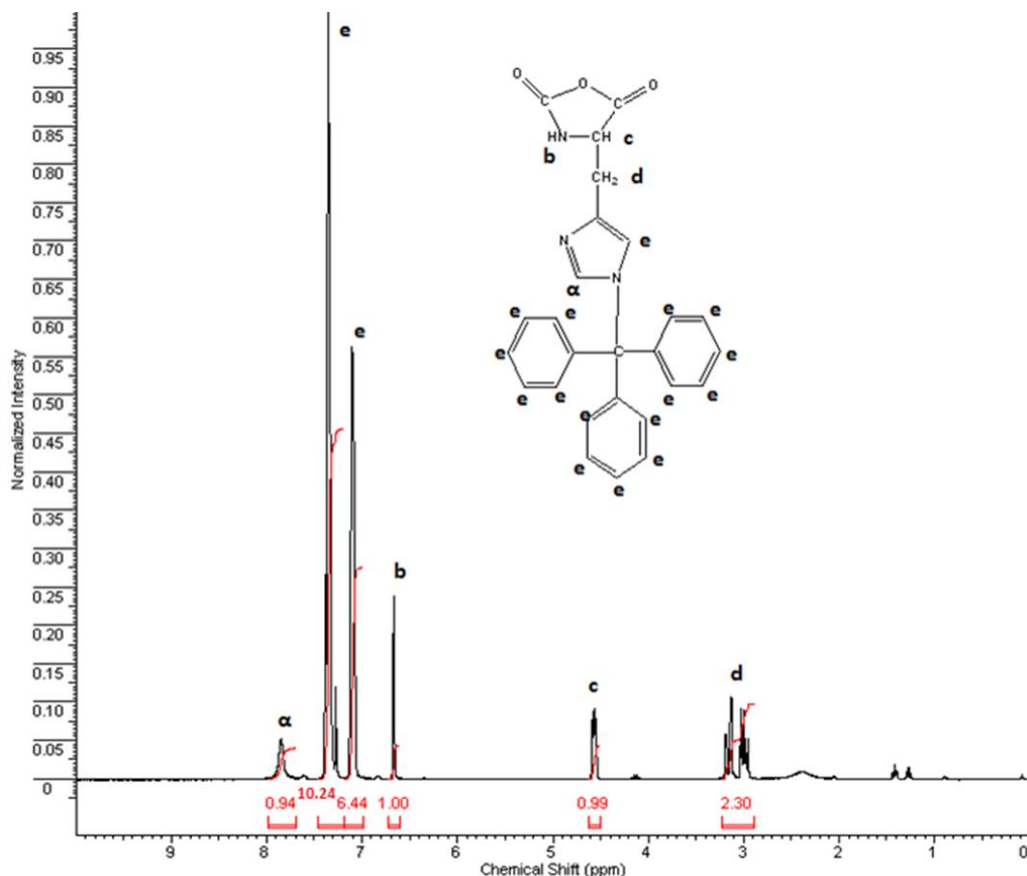


Εικόνα 27: Φάσμα IR, της αρχικής ένωσης N_{α} - Boc - N_{im} - trityl - L - ιστιδίνης.

28



Εικόνα 28: Φάσμα IR, μια ώρα μετά την έναρξη της σύνθεσης του NCA της ιστιδίνης.



Εικόνα 29: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$, του NCA της ισιτιδίνης

6.2 Χαρακτηρισμός Πολυμερών

6.2.1 Φάσματα IR και NMR κατά τη διάρκεια των πολυμερισμών

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού και των τριων πολυμερών που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία (35%, 12% και 7% ποσοστό κυστίνης), λήφθησαν φάσματα IR, τα οποία, λόγω της χαρακτηριστικής κορυφής που δίνει η δόνηση του αμιδικού δεσμού (που σχηματίζεται στα εν λόγω πολυμερή), δίνουν τη δυνατότητα, να παρακολουθηθεί η πορεία του πολυμερισμού με επιτυχία.

Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και των τριών πολυμερών, αρχικά λαμβάνονται φάσματα IR, όπου είναι ευδιάκριτες οι κορυφές που δίνουν οι δονήσεις των καρβονυλίων των N- καρβόξυαμιδών, στα 1785 cm^{-1} , (που αφορά το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του αμιδίου), δηλ. τον C_3 , και η δεύτερη στα 1850 cm^{-1} , αφορά το καρβονύλιο

του C₅ άνθρακα. Ενώ αρχίζει να εμφανίζεται στα 1660 cm⁻¹ (με μπλε χρώμα), η κορυφή της δόνησης του αμιδικού δεσμού των πολυμερών, δηλαδή η δόνηση του αζώτου της μίας μονομερικής μονάδας που συνδέεται με το καρβονύλιο της επόμενης. Όσο ο πολυμερισμός προχωράει, η κορυφή του αμιδικού δεσμού γίνεται μεγαλύτερη, ενώ οι αυτές των NCA's εξαφανίζονται σταδιακά.

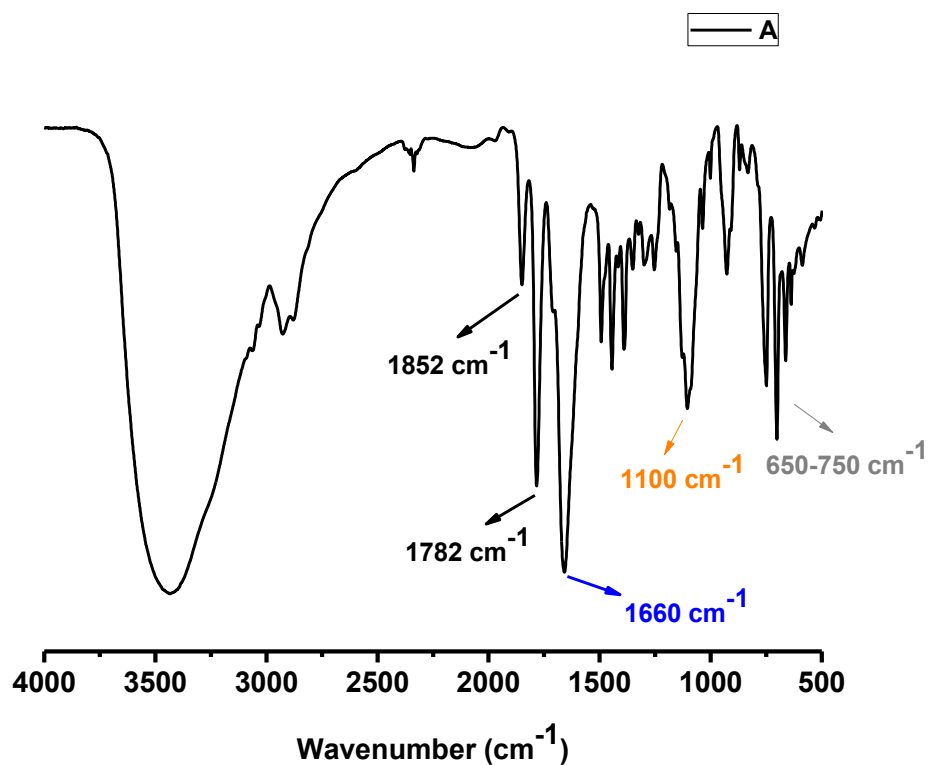
Άλλη ευδιάκριτη κορυφή, είναι αυτή στα 1100 cm⁻¹, όπου βρίσκεται ο αιθερικός δεσμός του πολυαιθυλενοξειδίου (πορτοκαλί χρώμα).

Στα 675 cm⁻¹ – 730 cm⁻¹, εμφανίζονται κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών –CH=CH-, των βενζολικών δακτυλίων της τρίτυλο ομάδας (γκρι χρώμα), οι οποίες λείπουν στο τελικό φάσμα των πολυμερών καθώς έχουν απομακρυνθεί με τη διαδικασία της αποπροστασίας.

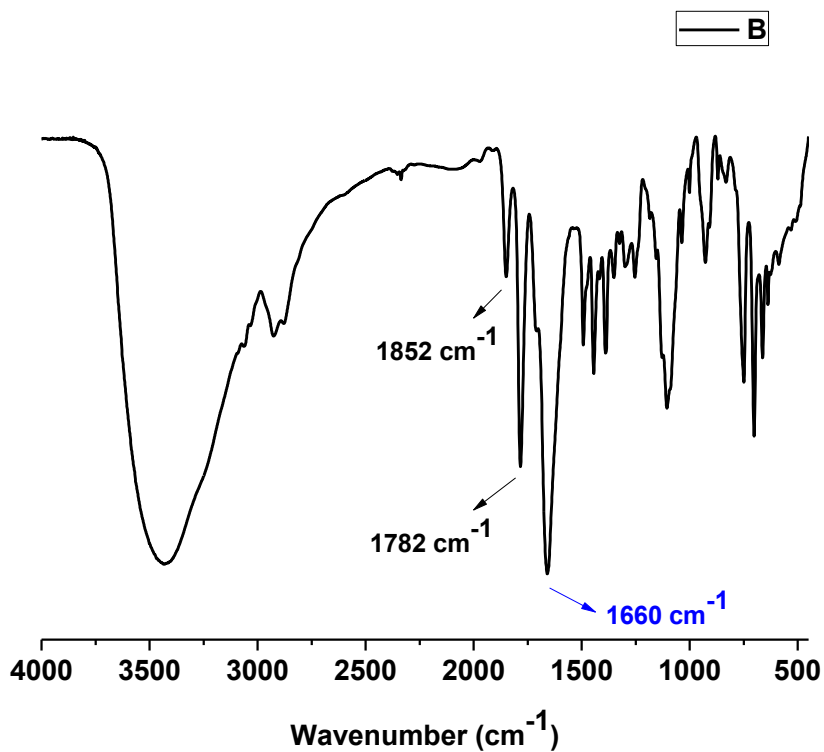
Σε ότι αφορά τα φάσματα NMR, μπορούν να διακριθούν οι χαρακτηριστικές μετατοπίσεις περίπου στα 4.0 ppm, για τα υδρογόνα (b) των –CH₂ (μεθυλενομάδων), του πολυαιθυλενοξειδίου, όπως επίσης και του α πρωτονίου, της πολυιστιδίνης, στα 5.2 ppm. Επιπλέον τα αρκετά αποπροστατευμένα υδρογόνα, (–CH), του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης, εντοπίζονται ψηλά, στα 8.75 ppm (d), και στα 7.5 ppm (e), ενώ τα λιγότερο αποπροστατευμένα πρωτόνια της ιστιδίνης (f), εμφανίζονται πιο χαμηλά, στα 3.5 ppm. Στα 3.1 και 3.2 ppm, είναι ορατές οι κορυφές που οφείλονται στα μεθυλενικά (–CH₂), υδρογόνα της κυστίνης (c). Επιπλέον στην περιοχή από 7.2 - 8.2 ppm, είναι ορατές κορυφές που οφείλονται στα αρωματικά υδρογόνα των τρίτυλο ομάδων (προστατευτικών ομάδων της ιστιδίνης), κάτι το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα πως λόγω δικτύωσης, δεν έχει γίνει καλή αποπροστασία- η οποία πιθανώς απαιτεί περισσότερο χρόνο.

Επομένως, επιβεβαιώνεται και με αυτό τον τρόπο ο σχηματισμός των δικτυωμένων πολυμερών. Παρ' όλα αυτά, δεν μπορούν να ληφθούν ασφαλείς πληροφορίες, από την ολοκλήρωση, σε ότι αφορά τα ποσοστά των συστατικών.

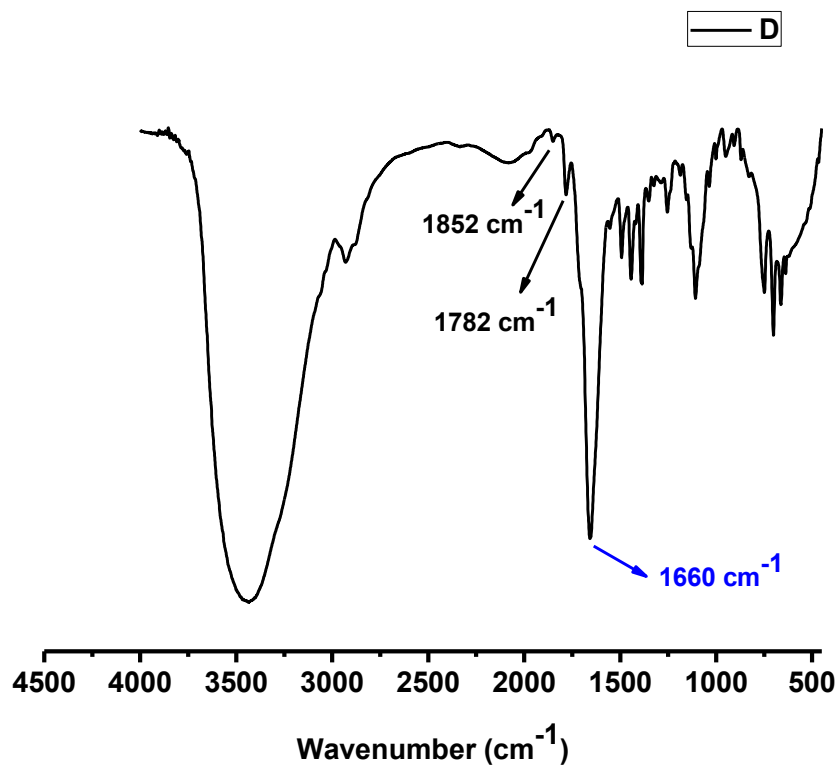
ΦΑΣΜΑΤΑ IR ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΟ NANO GEL 12%



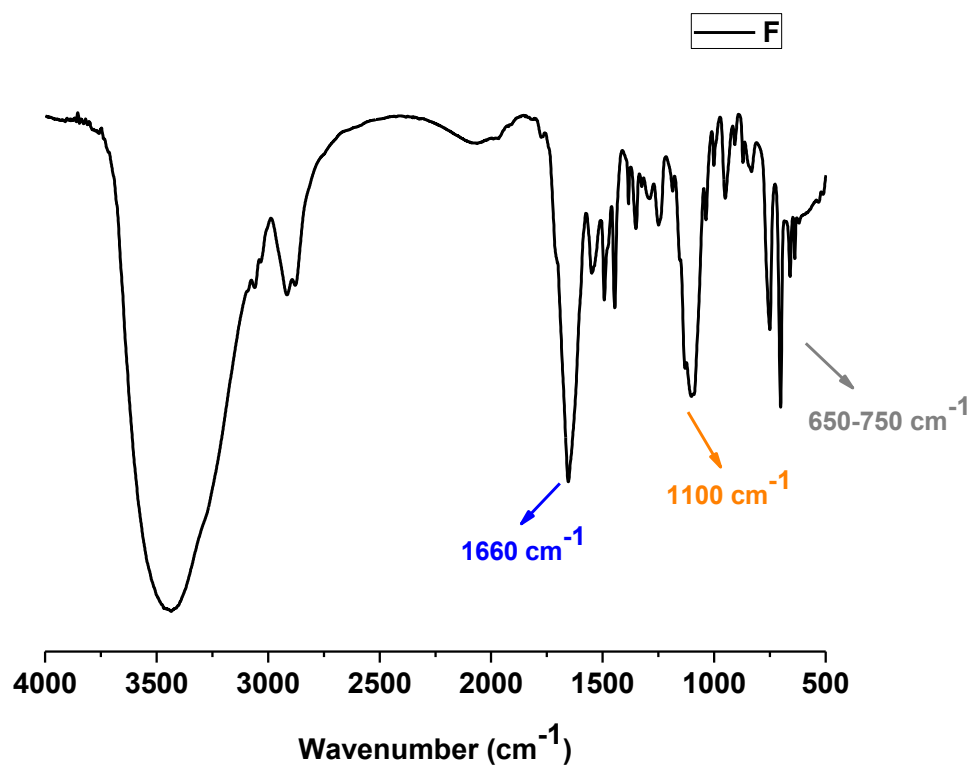
Εικόνα 30: Φάσμα IR, μια μέρα μετά την έναρξη του πολυμερισμού



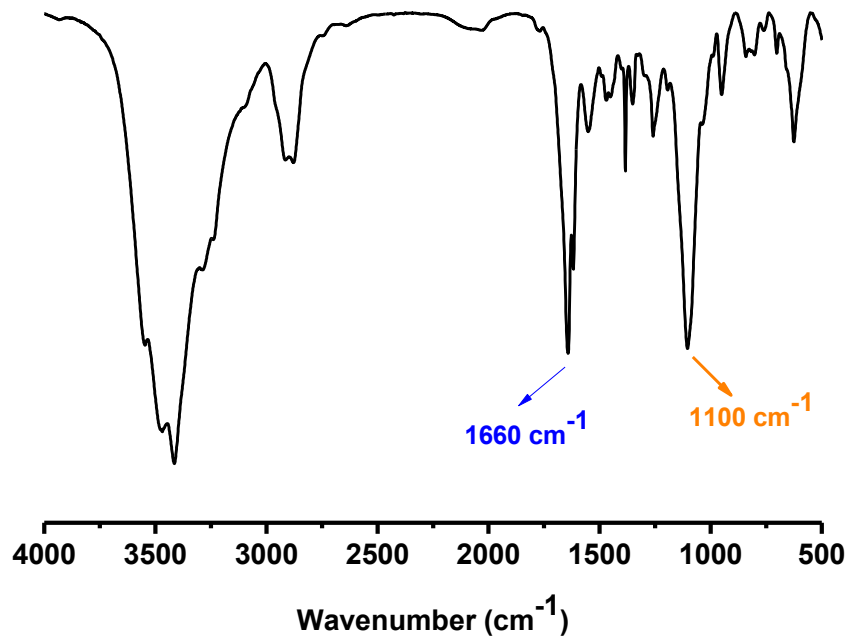
Εικόνα 31: Φάσμα IR, πέντε ημέρες μετά την έναρξη του πολυμερισμού.



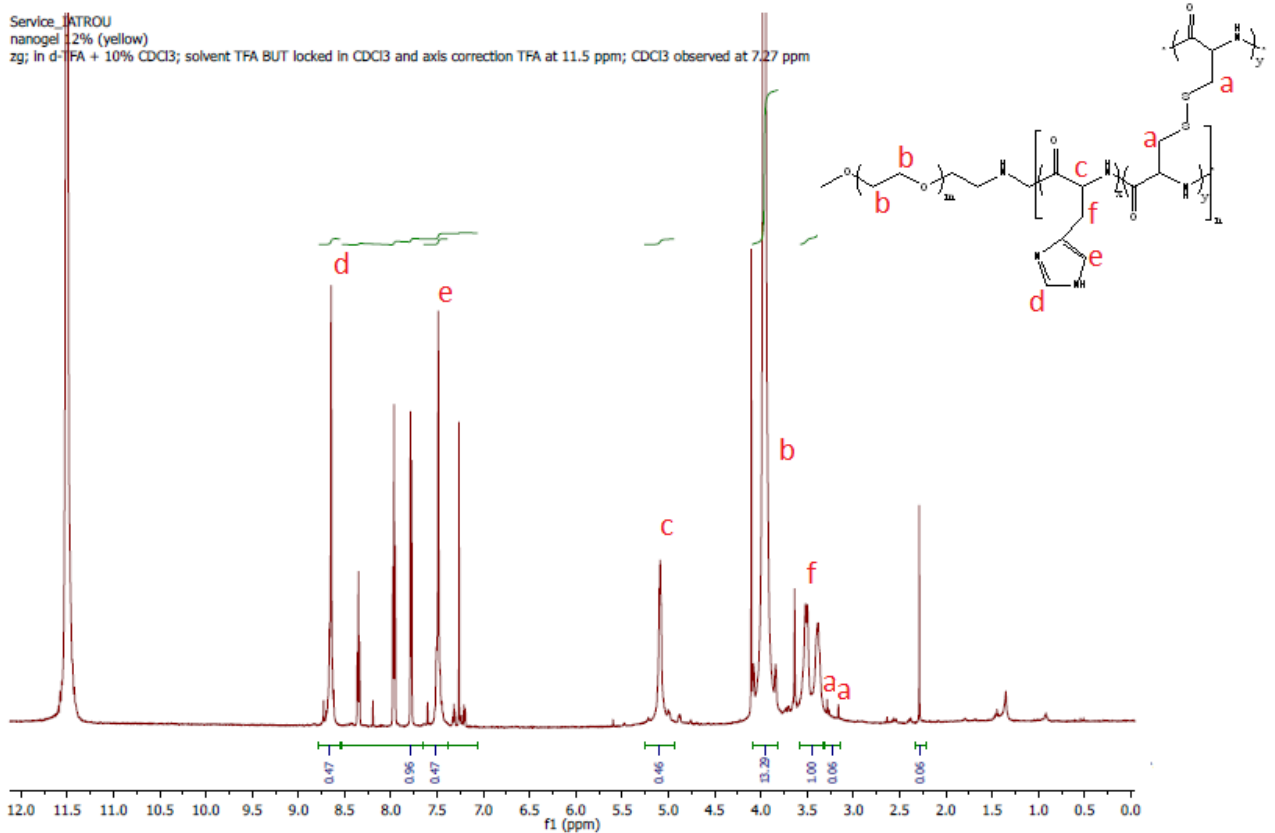
Εικόνα 32: Φάσμα IR, δεκατρείς ημέρες μετά την έναρξη του πολυμερισμού, πριν από την καταβύθιση.



Εικόνα 33: Φάσμα IR, μετά την καταβύθιση σε διαιθυλαιθέρα.



Εικόνα 34: Φάσμα IR, μετά την αποπροστασία του πολυμερούς.



Εικόνα 35: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$, του τελικού nanogel 12%.

Όμοια φάσματα λαμβάνονται και για τα Nanogel 35% και 7%.

6.2.2 Μελέτη των Nanogel με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός

Αφού πιστοποιήθηκε με τα φάσματα IR, η σύνθεση των πολυμερών, στη συνέχεια μελετήθηκε η δομή που αυτά υιοθετούν αλλά και το μέγεθος αυτής, μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός. Για κάθε δείγμα, έγιναν μετρήσεις σε pH=7.4, 6.5, 5.0. Δηλαδή τις τιμές pH που μπορεί να συναντήσει ως πιθανό σύστημα μεταφοράς φαρμάκου: του αίματος (pH=7.4), στην περιοχή εξωτερικά ενός καρκινικού κυττάρου (pH=6.5), και στο καρκινικό κύτταρο (pH=5.0). Η απόκριση σε αυτές τις τιμές pH, είναι τεράστιας σημασίας για τον προσδιορισμό των δυνατοτήτων των συστημάτων αυτών. Σε προηγούμενες μελέτες^[77] έχει παρατηρηθεί ότι η Poly-His, έχει την ιδιότητα να πρωτονιώνεται σε $\text{pH} \leq 6.5$, με συνέπεια να αλλάζει η δευτεροταγής δομή της και να παρατηρείται το λεγόμενο «φούσκωμα».

Σε κάθε pH, έγιναν μετρήσεις σε τρεις θερμοκρασίες: 25°C, 37°C, 41°C. Δηλαδή, τη θερμοκρασία δωματίου (storage stability), τη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, και τη θερμοκρασία της φλεγμονής – που κάνουν τα καρκινικά κύτταρα. Έτσι ώστε να ελεγχθεί η απόκριση των πολυμερών στην αύξηση της θερμοκρασίας, κάτι το οποίο συμβαίνει με την Poly-His.

Επιπλέον σε κάθε pH και σε κάθε θερμοκρασία μετρήθηκε η διαμέτρος των σωματιδίων σε τρεις γωνίες: 60°, 90°, 120°, για να διαπιστωθεί αν υπάρχει γωνιακή εξάρτηση.

Οι μετρήσεις όλων των δειγμάτων έγιναν σε συγκέντρωση: 1.5 mg/ml για το Nanogel 35%, και 0.5 mg/ml για τα Nanogel 12% και 7%. Αυτές ήταν οι συγκεντρώσεις που έδιναν ικανοποιητικό σήμα. Όσες αραιώσεις και αν έγιναν, αυτό που άλλαζε ήταν μόνο ο αριθμός των Kcounts, το μέγεθος των δομών παρέμενε ίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν Buffer pH=7.4, που παρασκευάστηκε με ισοτονικό διάλυμα Tris 10 mM και Buffer pH=6.5 και 5.0, που παρασκευάστηκαν με διάλυμα Mes 10 mM. Κανένα από τα δείγματα δεν διηθήθηκε σε φίλτρο.

Πίνακας 2: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 35% σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.

Nanogel 35% σε pH: 7.4							
Θερμοκρασία	Γωνία	Κορυφές	Area (%)	Mean (nm)	Width	KCounts	poly. Index
25°C	60°	1	81.7	49	0.2		
		2	~	~	~	400.5	0.842
	90°	1	91.3	46.4	2.4		
		2	~	~	~	159.7	0.598
	120°	1	93.8	45.3	1.8		
		2	~	~	~	177.0	0.393
37°C	60°	1	80.8	55.4	0.4		
		2	~	~	~	430.9	0.753
	90°	1	92.5	56.5	3.0		
		2	~	~	~	136.0	0.540
	120°	1	93.5	53.9	2.2		
		2	~	~	~	108.3	0.393
41°C	60°	1	83.4	69.2	0.6		
		2	~	~	~	400.2	0.9
	90°	1	95.0	60.1	2.6		
		2	~	~	~	174.2	0.863
	120°	1	94.8	65.6	2		
		2	~	~	~	112	0.501

Πίνακας 3: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 35% σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.

Nanogel 35% σε pH: 6.5							
Θερμοκρασία	Γωνία	Κορυφές	Area (%)	Mean (nm)	Width	KCounts	poly. Index
25°C	60°	1	79.6	52.3	0.5		
		2	18.4	564.1	152.7	458.9	0.720
	90°	1	95.9	59.8	3		
		2	~	~	~	230.3	0.673
	120°	1	92.9	54.1	1.8		
		2	~	~	~	159.4	0.423
37°C	60°	1	76.5	61.5	3.7		
		2	19.5	374.4	62.6	456.2	0.8
	90°	1	95.5	61.1	4		
		2	~	~	~	194.1	0.8
	120°	1	94.6	64.8	1.5		
		2	~	~	~	138.4	0.675
41°C	60°	1	76.1	71.6	3.7		
		2	20.8	423.1	79.6	434.7	0.884
	90°	1	94.2	71.8	1.1		
		2	~	~	13.9	200.5	0.7
	120°	1	92.6	71.2	1.2		
		2	~	~	~	134.9	0.529

Πίνακας 4: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 35% σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.

Nanogel 35% σε pH: 5.0							
Θερμοκρασία	Γωνία	Κορυφές	Area (%)	Mean (nm)	Width	KCounts	poly. Index
25°C	60°	1	78.1	70.6	0.5		
		2	17.9	548.9	131.8	442.9	0.745
	90°	1	93.9	67.3	0.5		
		2	~	~	~	153.4	0.647
	120°	1	95.4	70.7	3.4		
		2	~	~	~	129.0	0.501
37°C	60°	1	88.2	81.9	5		
		2	8.7	562.4	87	395.3	0.961
	90°	1	92.6	86.2	2.1		
		2	~	~	~	132.7	0.562
	120°	1	97.1	84.4	5		
		2	~	~	~	113.8	0.670
41°C	60°	1	79.1	89.1	2.9		
		2	15.9	454.4	81	415.2	0.780
	90°	1	95.1	84	2.5		
		2	~	~	~	143.8	0.613
	120°	1	96	89.2	2.3		
		2	~	~	~	118.1	0.373

Πίνακας 5: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 12% σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.

Nanogel 12% σε pH: 7.4							
Θερμοκρασία	Γωνία	Κορυφές	Area (%)	Mean (nm)	Width	KCounts	poly. Index
25°C	60°	1	65.2	60.6	0.7		
		2	34.8	444.4	116.0	444.0	0.598
	90°	1	79.4	62.2	2.7		
		2	15.9	306.2	70.5	175.0	0.580
	120°	1	86.8	50.8	1.7		
		2	13.2	318.2	71.5	104.4	0.554
37°C	60°	1	72.5	69.4	3.4		
		2	27.5	388.0	75.7	428.4	0.603
	90°	1	84.8	69.7	2.2		
		2	15.2	350.5	62.5	170.6	0.570
	120°	1	79.2	68.7	5.8		
		2	20.8	279.9	122.9	100.5	0.525
41°C	60°	1	69.1	72.0	0.7		
		2	30.9	482.0	107.7	408.7	0.582
	90°	1	90.3	75.4	2.9		
		2	9.7	356.0	47.0	169.3	0.479
	120°	1	92.7	69.3	2.7		
		2	7.3	430.8	16.5	98.3	0.280

Πίνακας 6: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 12% σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.

Nanogel 12% σε pH: 6.5							
Θερμοκρασία	Γωνία	Κορυφές	Area (%)	Mean (nm)	Width	KCounts	poly. Index
25°C	60°	1	58.9	67	3.4		
		2	41.1	347.2	87.1	341.8	0.639
	90°	1	71.8	67.8	3.2		
		2	27.5	388.3	104.1	134.1	0.601
	120°	1	80.8	62.6	1.5		
		2	19.2	328.9	75.9	97.5	0.626
37°C	60°	1	51.8	86.8	3.6		
		2	48.2	480.8	129.6	346.8	0.583
	90°	1	62.0	75.7	7.1		
		2	38.0	364.8	121.4	125.2	0.606
	120°	1	76.0	69.1	31		
		2	24.0	484	274	106.7	0.688
41°C	60°	1	90.8	112.2	2.6		
		2	9.2	541.8	276	358.7	0.542
	90°	1	64.2	87.8	4.2		
		2	35.8	561	277.4	144.3	0.594
	120°	1	94.8	119.1	4.5		
		2	~	~	~	95.5	0.688

Πίνακας 7: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 12% σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.

Nanogel 12% σε pH: 5.0							
Θερμοκρασία	Γωνία	Κορυφές	Area (%)	Mean (nm)	Width	KCounts	poly. Index
25°C	60°	1	49.6	102.1	1.7		
		2	44.7	544.6	247.7	306.7	0.6
	90°	1	68	100.7	2.1		
		2	23.6	325.1	131	134.6	0.9
	120°	1	75.3	82.3	2.2		
		2	17.4	378.9	101.8	113.6	0.7
37°C	60°	1	89.3	144.8	7.3		
		~	~	~	~	312.0	0.987
	90°	1	100	130.3	1.5		
		~	~	~	~	143.8	0.890
	120°	1	93.7	155.8	1.8		
		~	~	~	~	108.9	1.00
41°C	60°	1	89.6	246.1	5.2		
		~	~	~	~	340.6	1.00
	90°	1	96.6	228	4.7		
		~	~	~	~	128.9	0.9
	120°	1	94.2	263.3	3		
		2	~	~	~	100.5	1.00

Πίνακας 8: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 7% σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.

Nanogel 7% σε pH: 7.4							
Θερμοκρασία	Γωνία	Κορυφές	Area (%)	Mean (nm)	Width	KCounts	poly. Index
25°C	60°	1	71.5	65.1	3.8		
		2	21	324.0	66.0	427.3	0.700
	90°	1	79.0	64.3	0.6		
		2	11.1	213.1	41.3	158.7	0.599
	120°	1	81.7	64.9	5.2		
		2	2.9	169.8	33.3	128.1	0.430
37°C	60°	1	52.1	67.6	1.8		
		2	32.5	196.5	55.2	438.4	0.678
	90°	1	72.3	73	4.6		
		2	14.6	153.3	45.8	160.1	0.445
	120°	1	84.5	74.7	5.4		
		2	15.5	384.6	197.7	135.6	0.501
41°C	60°	1	60	92.2	5.6		
		2	34.9	211.9	130.2	386.2	0.760
	90°	1	92.9	95.8	3.8		
		2	7.1	736.8	45.6	165.3	0.465
	120°	1	85	83.6	5.3		
		2	15	382.4	171.1	117.8	0.415

Πίνακας 9: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 7% σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.

Nanogel 7% σε pH: 6.5							
Θερμοκρασία	Γωνία	Κορυφές	Area (%)	Mean (nm)	Width	KCounts	poly. Index
25°C	60°	1	39.7	79.2	4.4		
		2	56.6	413.1	120.3	355.8	0.762
	90°	1	64.4	76.3	4		
		2	32	400.3	104.9	138.4	0.845
	120°	1	71.1	77.6	3.7		
		2	25.8	514.7	158.3	128.6	0.794
37°C	60°	1	39.9	97.2	0.7		
		2	54.8	397.8	127.6	348.9	0.641
	90°	1	58.6	89	5.7		
		2	37.7	486.5	149.9	135.2	0.751
	120°	1	71.4	87.5	3.7		
		2	24.3	474.4	124.6	125.4	0.719
41°C	60°	1	49.4	105.7	12.4		
		2	50.6	622.1	284.5	339.1	0.728
	90°	1	60.3	92.2	8.3		
		2	39.1	507.9	192.4	139.1	0.726
	120°	1	68.6	100.7	14.1		
		2	25.2	362.9	126.3	120.8	0.702

Πίνακας 10: Μετρήσεις DLS, για το Nanogel 7% σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες και σε τρεις γωνίες.

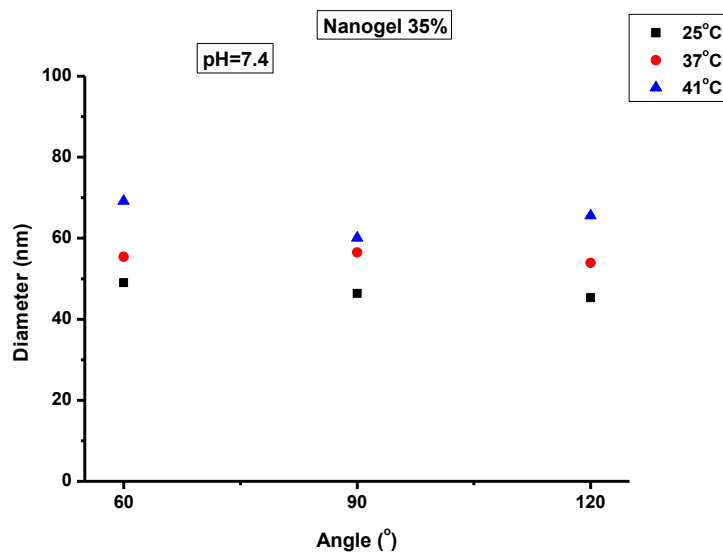
Nanogel 7% σε pH: 5.0							
Θερμοκρασία	Γωνία	Κορυφές	Area (%)	Mean (nm)	Width	KCounts	poly. Index
25°C	60°	1	33.4	105.9	2.3		
		2	61.5	430.4	142.5	351.1	0.733
	90°	1	33.7	108.8	12.3		
		2	55.8	336.1	131.3	148.9	0.700
	120°	1	52.8	106.1	4.3		
		2	40.2	418.2	163.8	113.2	0.720
37°C	60°	1	14.7	152.6	2.4		
		2	78.3	377.4	194.9	349.2	0.584
	90°	1	45.9	143.1	12.4		
		2	49.9	446.7	273.9	150.2	0.583
	120°	1	58.9	125.9	36.2		
		2	35.2	462	235.4	114.4	0.684
41°C	60°	1	93.5	241.5	8.9		
		~	~	~	~	352,6	0.712
	90°	1	81	241.5	6.1		
		~	~	~	~	149.3	0.628
	120°	1	43	141.2	5.2		
		2	51.8	317.9	175.4	128.9	0.811

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

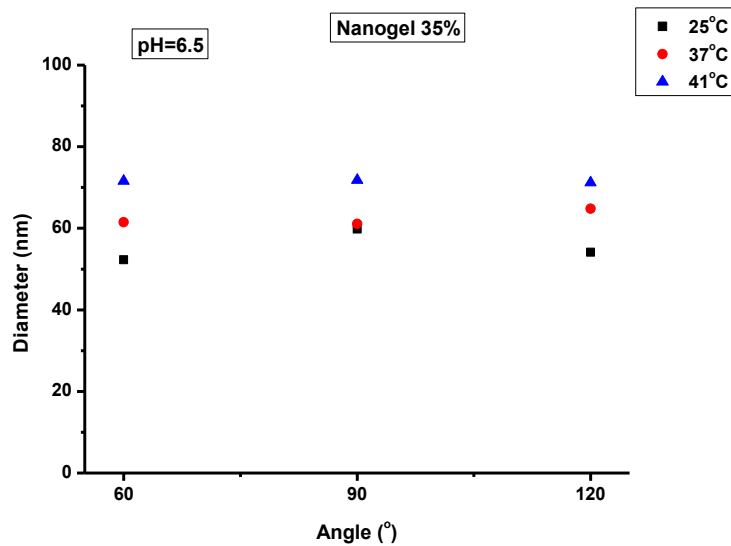
1. Το μέγεθος των σωματιδίων δεν ξεπερνά τα 100 nm, γεγονός που τους δίνει τη δυνατότητα, σε περίπτωση ενδοφλέβιας χορήγησης, να εγκαταλείψουν γρήγορα το αίμα, και να διαχυθούν σε όλα τα κύτταρα του σώματος.
2. Πουθενά δεν παρατηρείται γωνιακή εξάρτηση, κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι τα σωματίδια πιθανώς, είναι σφαιρικά.
3. Φαίνεται πως, όσο μειώνεται το pH, τα νανοσωματίδια αυξάνουν το μέγεθός τους. Γεγονός που είναι αναμενόμενο, όπως ειπώθηκε παραπάνω καθώς η Poly-His πρωτονιώνεται, και αλλάζει η δευτεροταγής δομή της.
4. Υπάρχει μια μικρή, κάποιες φορές αμελητέα αύξηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων, με την αύξηση της θερμοκρασίας.
5. Με την αύξηση της θερμοκρασίας σε $T=41^{\circ}\text{C}$, pH 5.0, παρατηρούνται αρκετά μεγάλες δομές σε σχέση με τις δομές που υπάρχουν στα υπόλοιπα pH και θερμοκρασίες. Πιθανώς στις συνθήκες αυτές, λόγω της αλλαγής της δευτεροταγούς δομής της ιστιδίνης, η οποία οφείλεται και στην πρωτονίωση της σε αυτό το pH, αλλά και στην υψηλή θερμοκρασία, να δημιουργείται έντονη διόγκωση. Επιπλέον πιθανολογείται, στις συνθήκες αυτές, λόγω της θερμικής ενέργειας που δίνεται στο σύστημα για μεγάλο χρονικό διάστημα, να ευνοείται η δημιουργία συσσωματωμάτων.
6. Η συμπεριφορά του δεύτερου πληθυσμού που εμφανίζεται στα Nanogel 12% και 7%, δεν μπορεί να εξηγηθεί επαρκώς καθώς δεν παρουσιάζει κάποια συνέπεια. Είναι ικανοποιητικό το γεγονός ότι αποτελεί μειοψηφία χωρίς να επηρεάζει τη συμπεριφορά του κύριου πληθυσμού.

Τα παραπάνω συμπεράσματα, αποτυπώνονται σε μια σειρά από διαγράμματα, με συνδυασμό των παραπάνω παράγοντων:

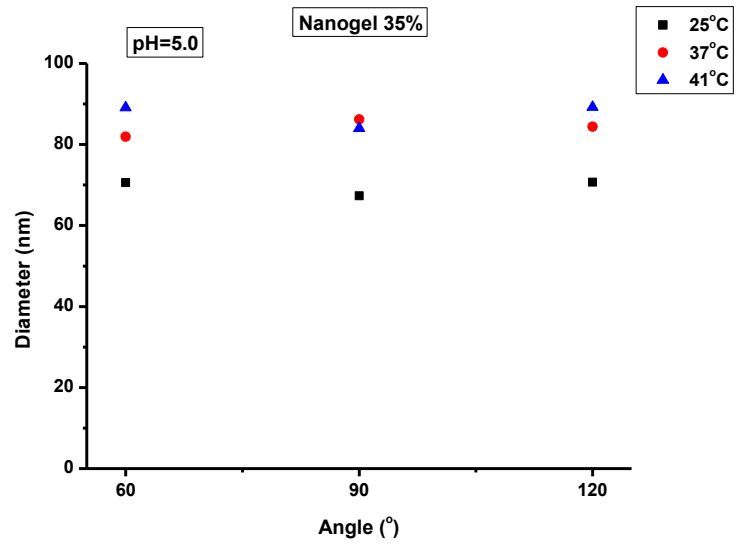
Διαγράμματα γωνιακής εξάρτησης.



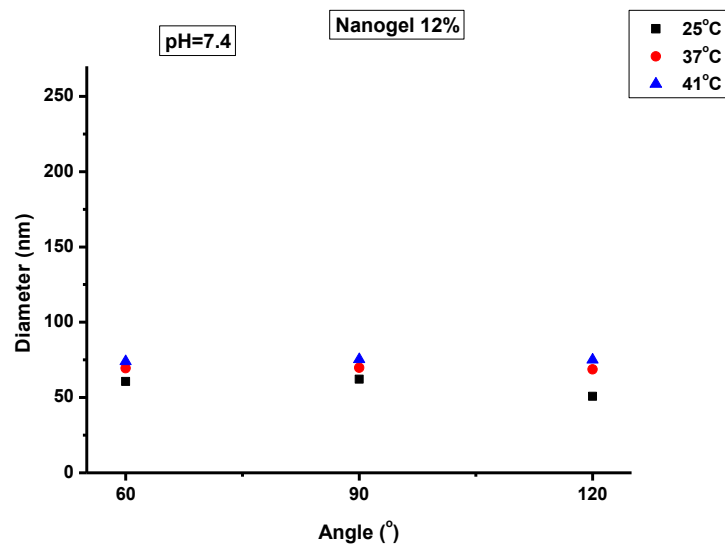
Σχήμα 25: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 35%, σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες



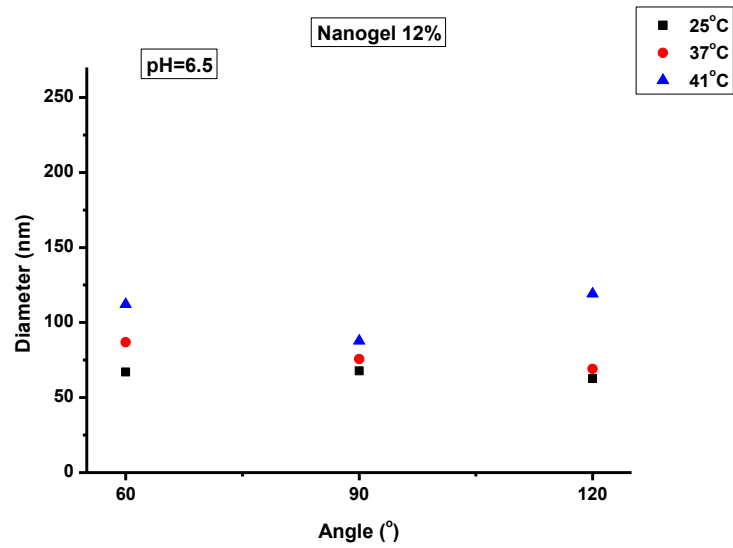
Σχήμα 26: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 35%, σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες



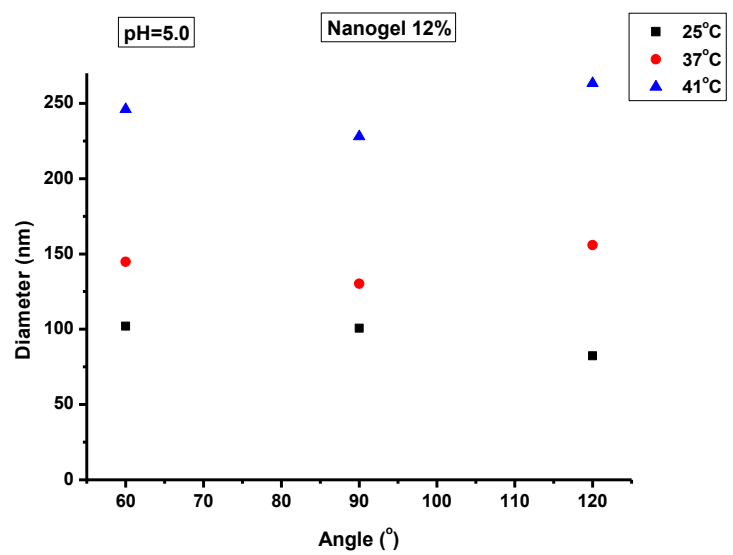
Σχήμα 27: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 35%, σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες



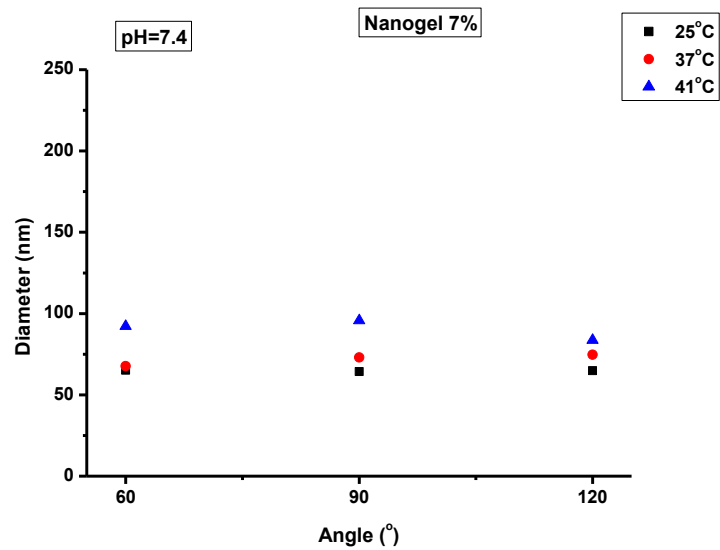
Σχήμα 28: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 12%, σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες



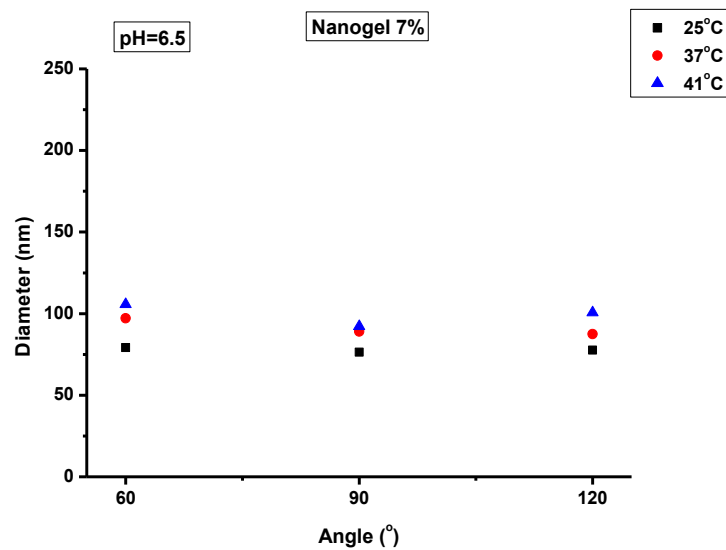
Σχήμα 29: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 12%, σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες.



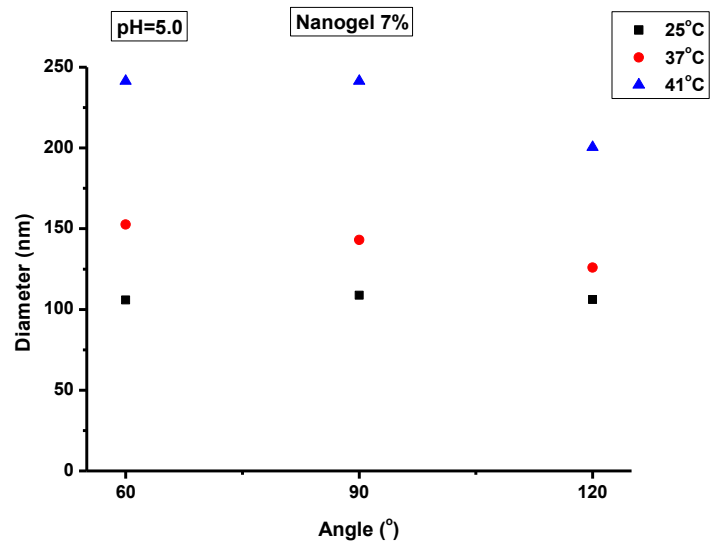
Σχήμα 30: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 12%, σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες.



Σχήμα 31: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 7%, σε pH 7.4, σε τρεις θερμοκρασίες.

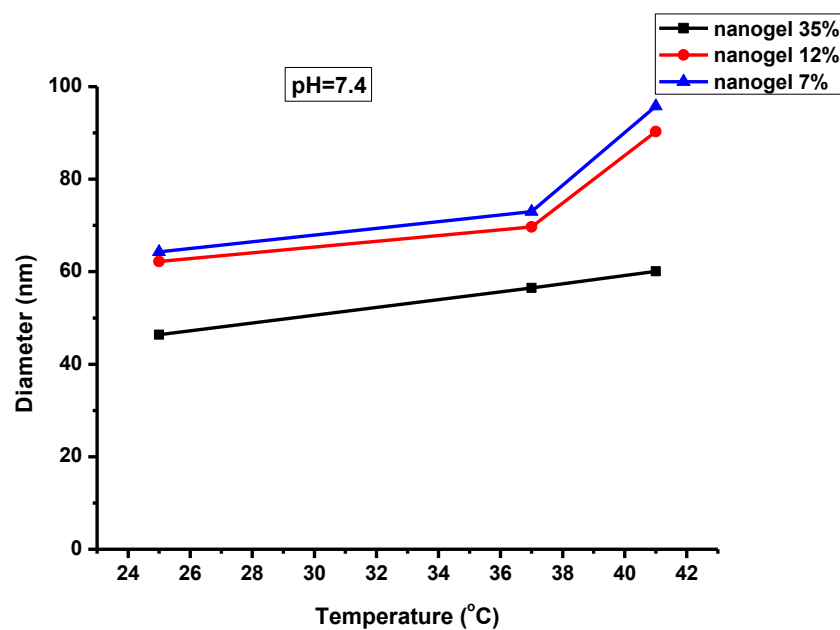


Σχήμα 32: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 7%, σε pH 6.5, σε τρεις θερμοκρασίες.

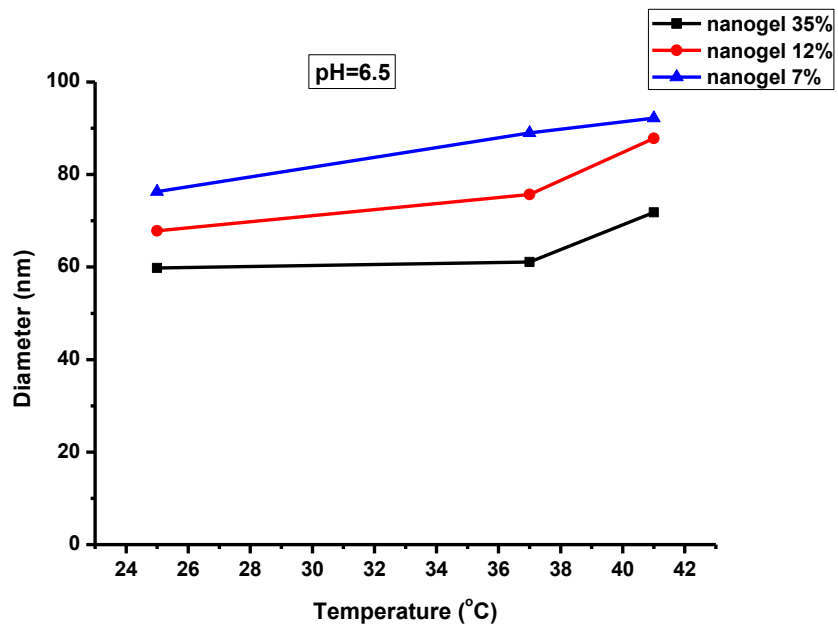


Σχήμα 33: Διάγραμμα Γωνιακής Εξάρτησης του Nanogel 7%, σε pH 5.0, σε τρεις θερμοκρασίες

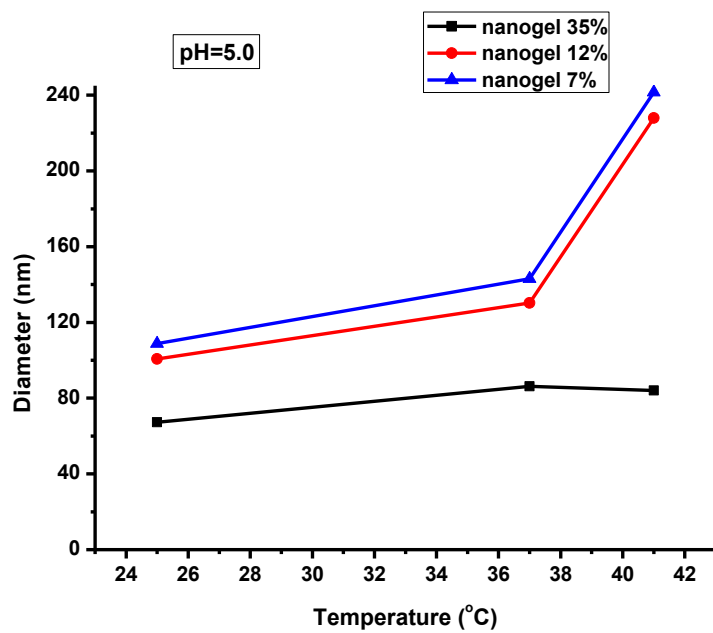
Διαγράμματα θερμοκρασιακής εξάρτησης.



Σχήμα 34: Διάγραμμα Θερμοκρασιακής Εξάρτησης σε pH 7.4, και για τα τρία nanogel

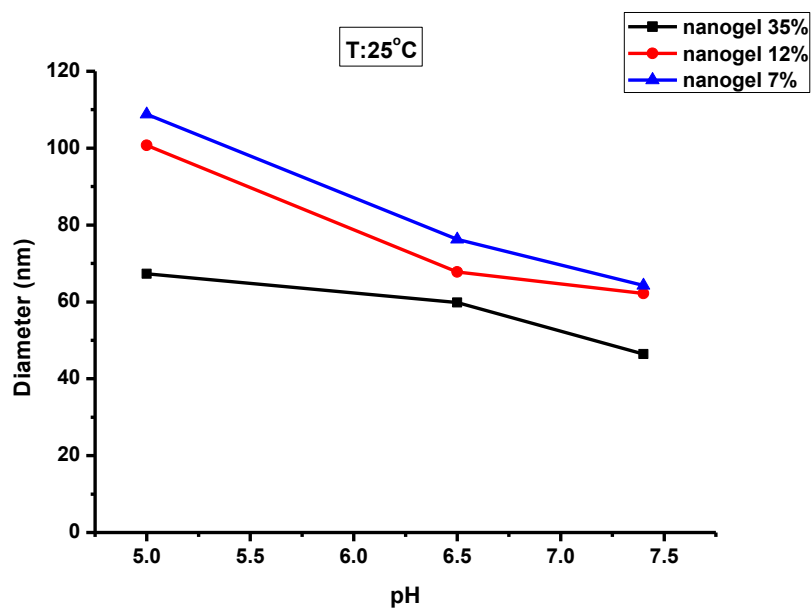


Σχήμα 35: Διάγραμμα Θερμοκρασιακής Εξάρτησης σε pH 6.5, και για τα τρία nanogel

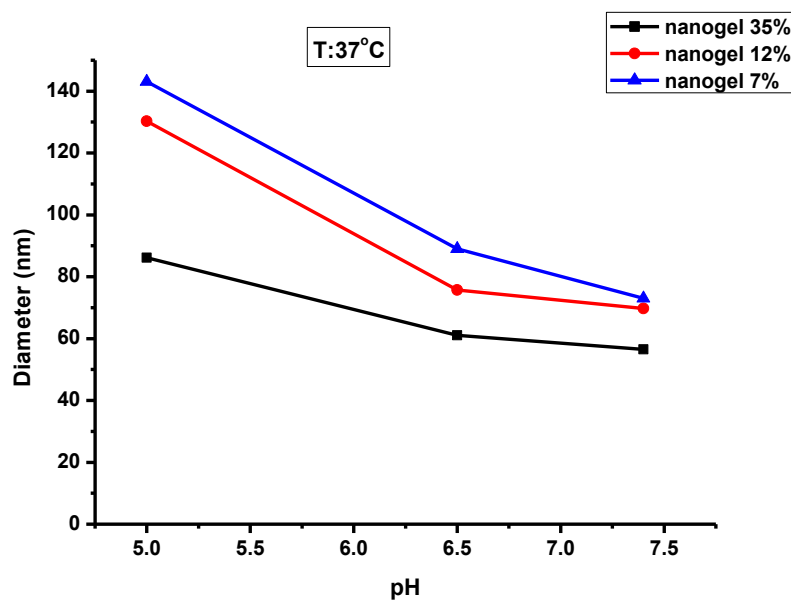


Σχήμα 36: Διάγραμμα Θερμοκρασιακής Εξάρτησης σε pH 5.0, και για τα τρία nanogel

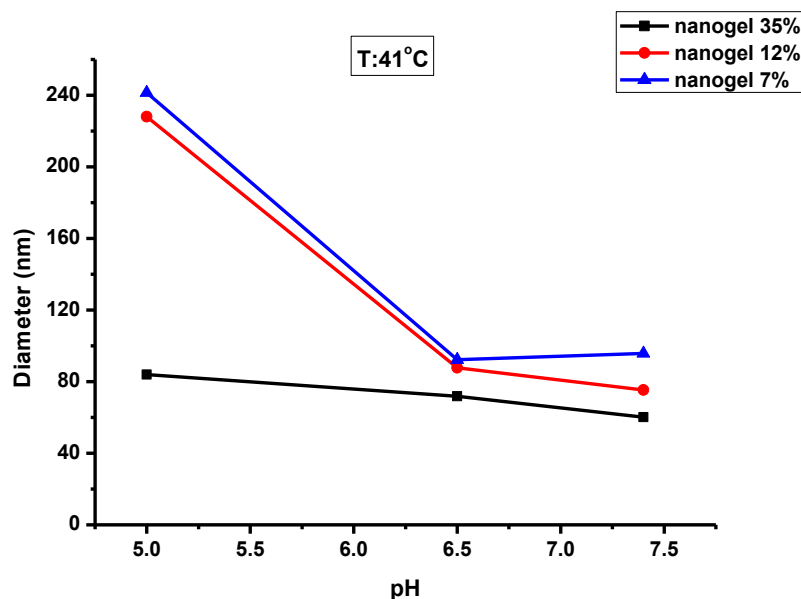
Διαγράμματα pH εξάρτησης



Σχήμα 37: Διάγραμμα pH εξάρτησης σε T: 25°C, και για τα τρία nanogel



Σχήμα 38: Διάγραμμα pH εξάρτησης σε T: 37°C, και για τα τρία nanogel



Σχήμα 39: Διάγραμμα pH-εξάρτησης, σε θερμοκρασία 41° C, και για τα τρία nanogel

6.2.3 Μελέτη των Nanogel με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός κατά την προσθήκη GSH

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη γλουταθειόνης στα παραπάνω διαλύματα των πολυμερών, έτσι ώστε να ελεγχθεί η απόκριση των δομών στην παρουσία της. Δεδομένου του ότι η ποσότητα της γλουταθειόνης που συναντάται στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που συναντάται στο αίμα, στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να χρησιμοποιηθούν οι πραγματικές τιμές γλουταθειόνης που συναντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό. Άρα, αρχικά ελέγχθηκε η απόκριση των συστημάτων σε pH=7.4, το οποίο είναι το pH που θα συναντήσει ένα πιθανά εισερχόμενο σύστημα στο αίμα. Εκεί η συγκέντρωση της γλουταθειόνης, είναι 0.2 mM, δηλαδή αμελητέα. Οι μετρήσεις που έγιναν με αυτή τη συγκέντρωση, ήταν συγκρίσιμες με τις μετρήσεις που έγιναν χωρίς γλουταθειόνη. Κάτι που σημαίνει, ότι το σύστημα επηρεάζεται καθόλου από τη παρουσία της γλουταθειόνης σε αυτή τη φάση.

Στη συνέχεια παραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε pH=6.5, το pH που έχει η περιοχή γύρω από το καρκινικό κύτταρο, όπου η ποσότητα της γλουταθειόνης γίνεται μεγαλύτερη, περίπου 10mM. Εκεί αυτό που παρατηρήθηκε, ήταν,

απότομη πτώση των Kcounts, αλλά και μετρήσεις της διαμέτρου των σωματιδίων, που δεν έμοιαζαν με αυτές χωρίς γλουταθειόνη.

Αντίστοιχη ήταν η συμπεριφορά των συστημάτων και στο pH=5.0, το pH δηλαδή ενός καρκινικού κυττάρου, με αντίστοιχη ποσότητα γλουταθειόνης.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε ακραίες τιμές γλουταθειόνης, 20 mM, στα pH=6.5 και 5.0, όπου παρατηρήθηκε απότομη πτώση των kcounts με το χρόνο, ενώ πλέον αυτό που εμφανίζεται ως διάμετρος είναι ένα αφύσικο νούμερο.

Αυτές οι ενδείξεις, υποδηλώνουν πως το σύστημα, με τιμές συγκέντρωσης γλουταθειόνης από 10 mM και πάνω, «σπάει», ή «αποδιατάσσεται», με αποτέλεσμα αυτή του η ιδιότητα να το κάνει χρήσιμο για μεταφορά φαρμάκου σε καρκινικά κύτταρα.

Παρακάτω φαίνονται οι πίνακες με τις μετρήσεις:

Πίνακας 11: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 35%, σε pH 7.4.

	κορυφές	Area	Mean	Width	Kcounts	Poly.Index
37 °C						
χωρίς GSH	1	92.5	56.5	3.0	136.0	0.540
	2	7.5	715.2	37.5		
0.2 mM GSH	1	94.7	53.1	4	140	1
	2	3.2	433.1	65.5		
41 °C						
χωρίς GSH	1	95.0	60.1	2.6	174.2	0.863
	2	2.4	426.1	59.8		
0.2 mM GSH	1	91.7	67.5	3.5	170.1	1
	2	3.2	385.3	58.3		

Πίνακας 12: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 35%, σε pH 6.5.

	κορυφές	Area	Mean	Width	Kcounts	Poly.Index
37 °C						
χωρίς GSH	1	95.5	61.1	4	214.1	1
	2	4.5	1911.8	133.7		
0.2 mM GSH	1	89.4	55.7	3.7	231.8	1
	2	6.2	316.5	47.9		
10 mM GSH	1	85.5	102.6	4.9	100.7	1
	2	9.1	395.2	83.9		
20 mM GSH	1	90.9	153.7	6.6	80	1
	2	5.1	556.1	120.5		
41 °C						
χωρίς GSH	1	94.2	71.8	11.1	205	0.7
	2	5.4	1996.6	139.6		
0.2 mM GSH	1	89.7	50.7	2.6	195.4	0.953
	2	8	311.9	46		
10 mM GSH	1	85.9	171.9	5.1	97.3	1
	2	9.2	428.5	88.9		
20 mM GSH	1	89.3	219.1	9	78.5	0.932
	2	5.9	648.4	120.8		

Πίνακας 13: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 35%, σε pH 5.0.

	κορυφές	Area	Mean	Width	kcounts	Poly.Index
37 °C						
χωρίς GSH	1	92.6	86.2	2.1	132.7	0.562
	2	7.4	896.6	47.8		
10 mM GSH	1	86.1	597	40.3	80.9	1
	2	13.9	18716.1	1308.5		
20 mM GSH	1	88.4	627.4	8.5	75.4	1
	2	6.7	740.8	121.2		
41 °C						
χωρίς GSH	1	95.1	84	2.9	120.1	0.613
	2	4.9	1228.8	68.3		
10 mM GSH	1	90.3	303.7	3.7	85.6	1
	2	9.7	9181.9	641.9		
20 mM GSH	1	89.8	435.6	8.1	78.1	1
	2	1.2	898.1	135.8		

Πίνακας 14: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 12%, σε pH 7.4.

	κορυφές	Area	Mean	Width	Kcounts	Poly.Index
37 °C						
χωρίς GSH	1	84.8	69.7	2.2	120.6	0.570
	2	15.2	350.5	62.5		
0.2 mM GSH	1	90.2	65.1	3	119.1	0.6
	2	8.1	302.8	70.1		

41 °C						
χωρίς GSH	1	90.3	75.4	2.9	109.3	0.479
	2	9.7	356.0	47.0		
0.2 mM GSH	1	85.5	70.5	2.8	115	0.589
	2	4	379.2	55		

Πίνακας 15: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 12%, σε pH 6.5.

	κορυφές	Area	Mean	Width	Kcounts	Poly.Index
37 °C						
χωρίς GSH	1	62	67.8	7.1	80	0.606
	2	38	364.8	121.4		
0.2 mM GSH	1	92.5	73.5	8.8	95.2	1
	2	1.8	517.9	134.3		
10 mM GSH	1	91.7	388.6	122.8	57.9	1
	2	8.3	3797.8	140		
20 mM GSH	1	92.5	473.9	9.2	49.9	1
	2	7.5	8390	586.6		
41 °C						
χωρίς GSH	1	64.2	87.8	14.2	105.4	0.594
	2	35.8	561	277.4		
0.2 mM GSH	1	76.4	117.9	2.5	102.3	1
	2	17.6	334.3	142.6		
10 mM GSH	1	94.5	227.3	191.4	50.6	1
	2	5.5	3732.4	11.2		
20 mM GSH	1	82	596	37.4	38.9	1
	2	18	18591	1299.7		

Πίνακας 16: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 12%, σε pH 5.0.

	κορυφές	Area	Mean	Width	Kcounts	Poly.Index
37 °C						
χωρίς GSH	1	100	130.3	151.9	213.8	1
	~					
10 mM GSH	1	85.8	517.9	43.3	123.4	1
	2	14.2	16218	1133.8		
20 mM GSH	1	82.6	519.6	9.2	108.1	1
	2	17.4	15820.1	11060		
41 °C						
χωρίς GSH	1	86.6	328.3	54.7	308	1
	2	13.4	23039.9	1610.6		
10 mM GSH	1	87.7	514.8	21.9	271.8	1
	2	12.3	15832.1	1106.8		
20 mM GSH	1	84.2	512.2	29.3	120.1	1
	2	15.8	15903.9	1111.8		

Πίνακας 17: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 7%, σε pH 7.4.

	κορυφές	Area	Mean	Width	Kcounts	Poly.Index
37 °C						
χωρίς GSH	1	72.3	73	14.6	205.9	0.445
	2	14.6	153.3	45.8		
0.2 mM GSH	1	43.8	60.5	10.3	200.1	0.681
	2	47.3	168.3	69.5		
41 °C						

χωρίς GSH	1	92.9	95.8	39.8	186.2	0.465
	2	7.1	736.8	45.6		
0.2 mM GSH	1	45.4	95.4	44	188.6	0.671
	2	48.3	246.5	144.3		

Πίνακας 18: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 7%, σε pH 6.5.

	κορυφές	Area	Mean	Width	Kcounts	Poly.Index
37 °C						
χωρίς GSH	1	58.6	89	5.7	103.9	0.75
	2	37.7	468.5	149.9		
0.2 mM GSH	1	62.6	91.2	4.5	110.8	0.782
	2	37.4	490.6	153.7		
10 mM GSH	1	94.4	388.9	157.8	82	1
	2	5.6	3088.3	142.5		
20 mM GSH	1	87.1	790.2	36.4	77.2	1
	2	12.9	15496	1083.3		
41 °C						
χωρίς GSH	1	60.3	92.2	8.3	99	0.726
	2	39.1	507.9	192.4		
0.2 mM GSH	1	50.3	90.8	6.2	100	0.8
	2	49.2	500	180.6		
10 mM GSH	1	90.7	535.3	26.4	74	1
	2	9.3	6722.1	469.9		
20 mM GSH	1	89.3	656.9	14.1	57	1
	2	10.7	10958	766.1		

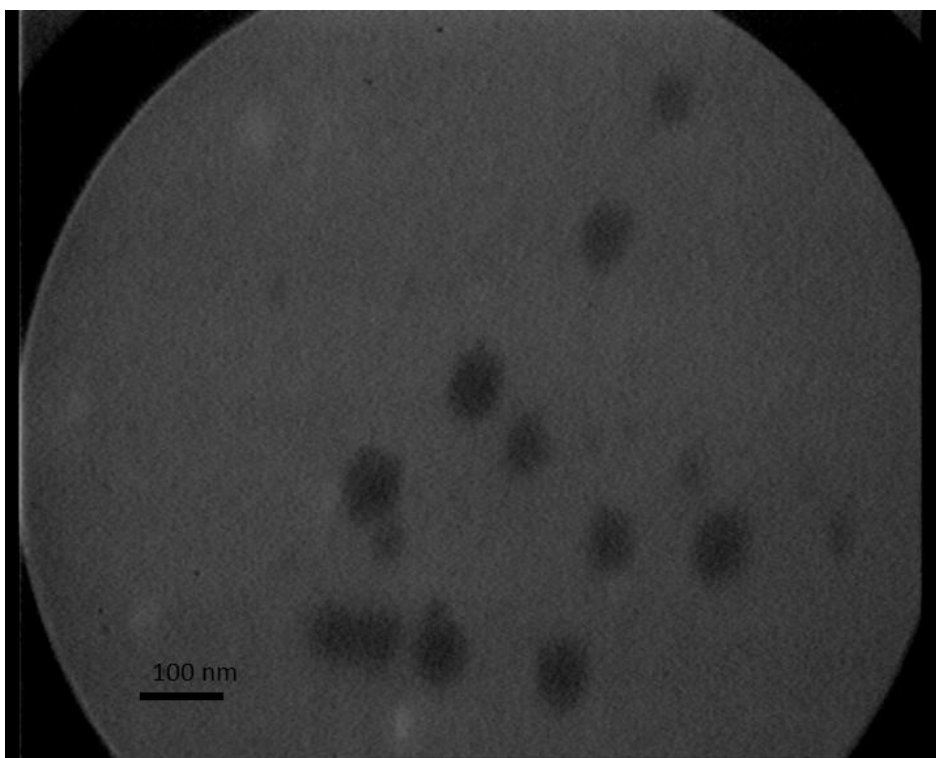
Πίνακας 19: Σύγκριση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες με το μέγεθος τους μετά την προσθήκη 0.2, 10 και 20 mM γλουταθειόνης, στο Nanogel 7%, σε pH 5.0.

	κορυφές	Area	Mean	Width	Kcounts	Poly.Index
37 °C χωρίς GSH	1	45.9	143.1	62.4	95.2	0.583
	2	49.9	446.7	273.9		
10 mM GSH	1	50.8	200	65.7	85.8	0.69
	2	45.6	1005	290.1		
20 mM GSH	1	91.9	420	16	52.3	1
	2	8.1	6936	484.8		
41 °C χωρίς GSH	1	81	241.5	206.1	76.9	0.628
	2	19	1049.4	925.1		
10 mM GSH	1	90	550.9	205.2	65.1	0.796
	2	5	1189	785		
20 mM GSH	1	88.2	739.3	16.6	34.9	1
	2	11.8	13203.9	923.1		

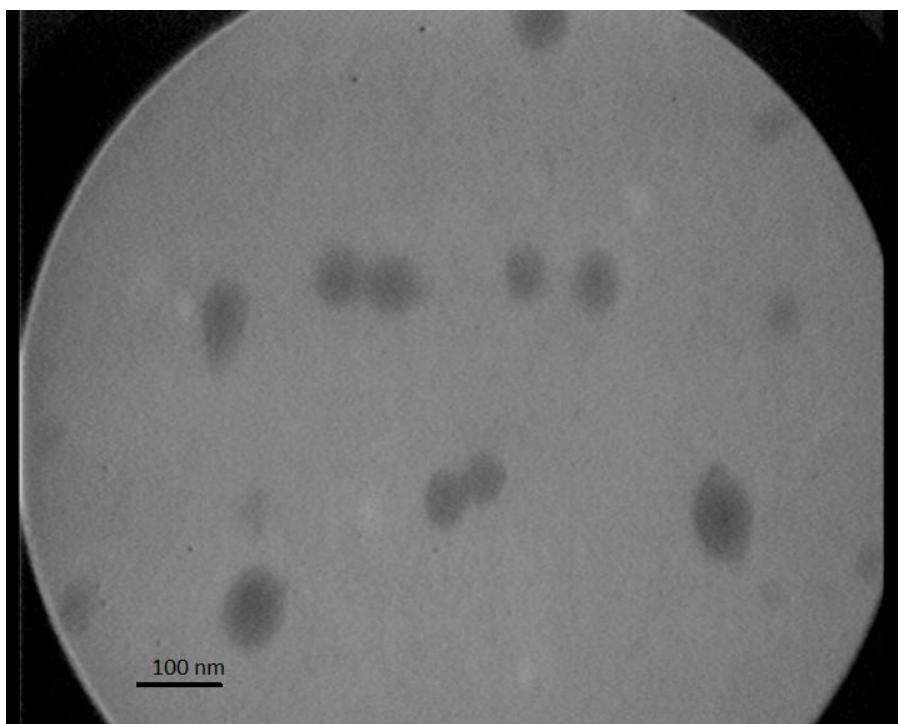
6.2.4 Εικόνες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διαπερατότητας (TEM)

Οι μετρήσεις του μεγέθους των δικτυωμένων μικυλλίων με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός, επιβεβαιώθηκαν, καθώς τα δείγματα ελέγχθηκαν με μικροσκοπία TEM. Συγκεκριμένα το Nanogel 12%, όπως φαίνεται παρακάτω, είναι περίπου 60 nm, όπως είχε παρατηρηθεί και στις μετρήσεις Δυναμικής Σκέδασης Φωτός, σε φυσιολογικές συνθήκες (pH=7.4, T= 25°C).

Παρακάτω φαίνονται οι εικόνες που ελήφθησαν.



Εικόνα 36: Εικόνα που έδωσαν τα νανοσωματίδια, με την τεχνική της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διαπερατότητας.



Εικόνα 37: Εικόνα που έδωσαν τα νανοσωματίδια, με την τεχνική της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διαπερατότητας.

6.2.5 ζ- Δυναμικό

Το ζ-Δυναμικό είναι μια άλλη σημαντική παράμετρος που μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες σε ότι αφορά τη δομή των νανοσωματιδίων.

Ουσιαστικά, το ζ-Δυναμικό, αφορά το επιφανειακό φορτίο που έχει το πολυμερές. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το επιφανειακό φορτίο του πολυμερούς επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις του, με τα συστατικά του αίματος, εφόσον το σύστημα προορίζεται για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων. Ένα ουδέτερο φορτίο εξασφαλίζει,την αποφυγή της ενεργοποίησης του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος.

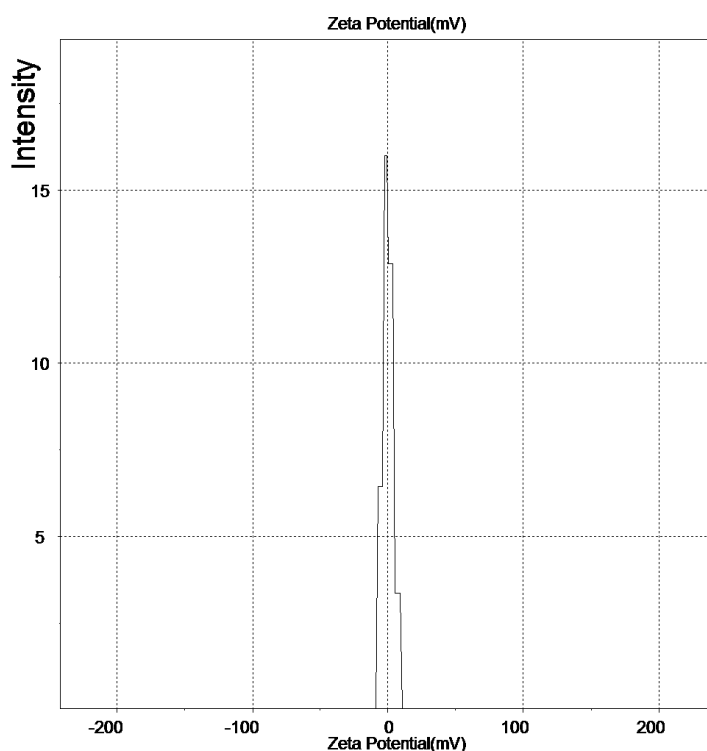
Θεωρητικά, η υδρόφιλη συστάδα του PEO, θα πρέπει να σχηματίζει ένα «κέλυφος» γύρω από τα δικτυωμένα μικύλλια. Η αναμενόμενη τιμή σε περίπτωση που το PEO, βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά των μικυλλίων, πρέπει να είναι παραπλήσια των 0 mV, γεγονός που συμπίπτει με τα ληφθέντα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται παρακάτω. Σε αντίθετη περίπτωση, η ύπαρξη φορτίων της Poly-His, θα οδηγούσε σε αρκετά θετική τιμή του ζ-Δυναμικού.

Τα δείγματα μετρήθηκαν σε συγκεντώσεις: 1.5 mg/ml για το Nanogel 35%, και 0.5 mg/ml για τα Nanogel 12% και 7%. Τα πολυμερή διαλύθηκαν σε buffer Tris 20 mM, pH=7.4 και 6.5, τα οποία φτιάχτηκαν μόνο με την προσθήκη HCl χωρίς την προσθήκη NaCl, το οποίο πιθανώς θα «έκριβε» το πραγματικό φορτίο των νανοσωματιδίων.

Πιθανώς οι λίγο πιο θετικές τιμές που εμφανίζονται στο pH=6.5 οφείλονται, στη μικρή διόγκωση που εμφανίζουν τα νανοσωματίδια σε αυτό το pH, το οποίο κάνει τις αλυσίδες της πολυ-ιστιδίνης να «φαίνονται» πιο πολύ.

Πάντα όμως οι τιμές βρίσκονται μέσα στα όρια τιμών ζ-δυναμικού, που κάνουν ένα μόριο αόρατο για τις πρωτεΐνες του αίματος.

Nanogel 35% pH:7.4

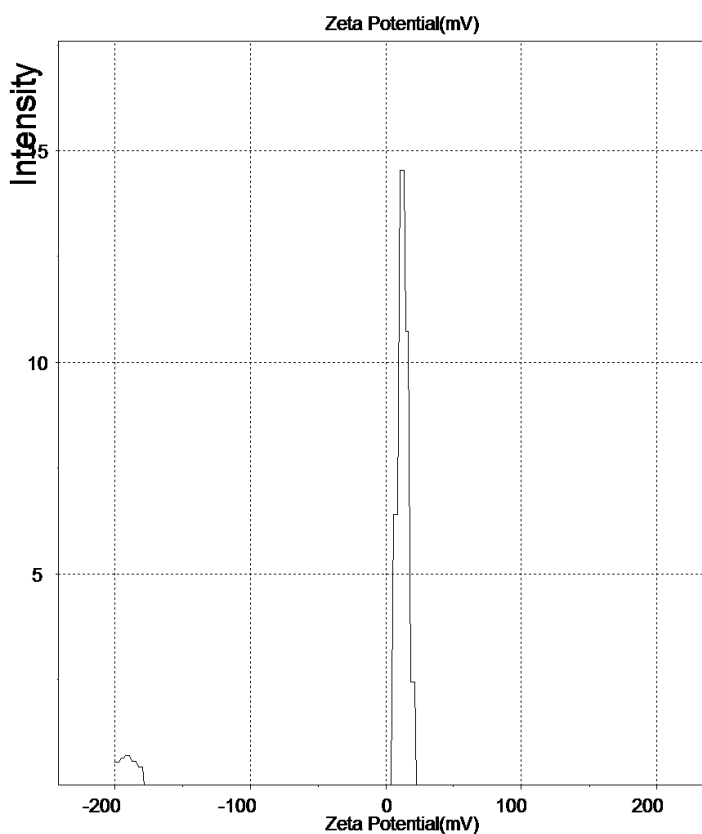


Εικόνα 38: Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 35%, σε pH: 7.4

Πίνακας 20 : Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 35% σε pH 7.4

α/α μέτρησης	Pos.	KCps	Zeta	Width
1	50.0	173.6	-0.2	1.6
2	50.0	207.6	-0.1	1.6
3	50.0	197.1	-0.0	1.6
M. Όρος		192.7	-0.1	1.6
+/-		17.4	0.1	0.0

Nanogel 12% pH:7.4

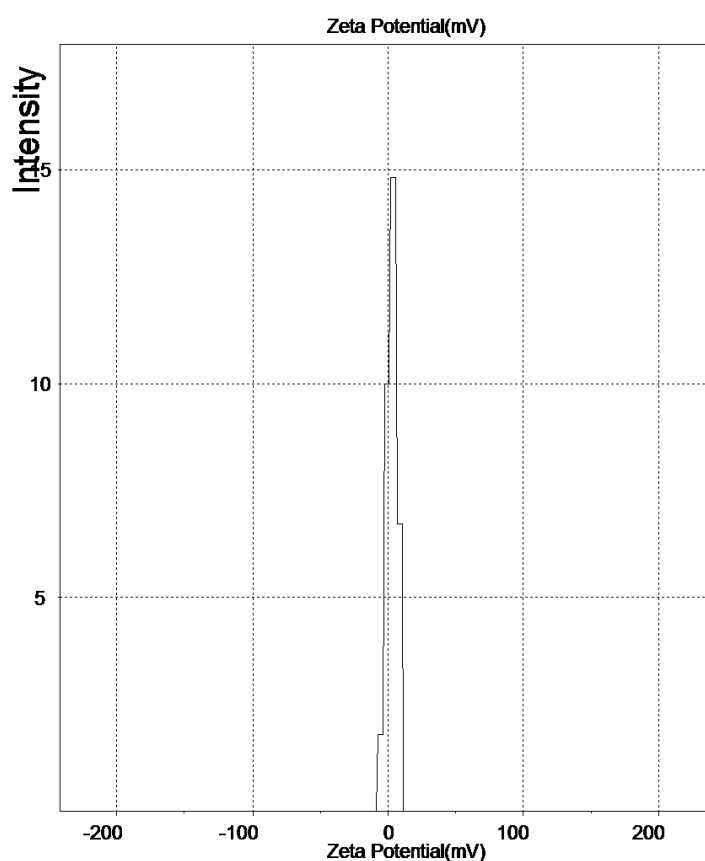


Εικόνα 39 : Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 12%, σε pH: 7.4

Πίνακας 21: Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 12% σε pH 7.4

α/α μέτρησης	Pos.	KCps	Zeta	Width
1	50.0	152.8	2.4	1.6
2	50.0	151.4	2.7	1.6
3	50.0	152.3	2.7	42.9
M. Όρος		152.1	2.6	15.3
+/-		2.0	0.2	23.8

Nanogel 7% pH:7.4

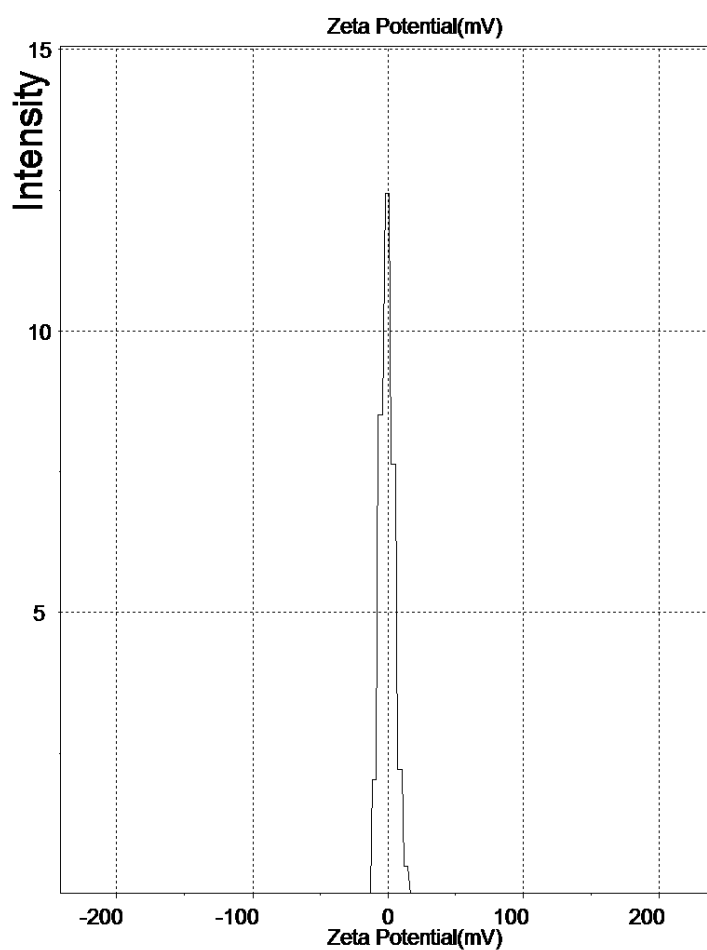


Εικόνα 40: Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 7%, σε pH: 7.4

Πίνακας 22: Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 7% σε pH 7.4

α/α μέτρησης	Pos.	KCps	Zeta	Width
1	50.0	148.7	2.6	1.6
2	50.0	145.2	2.9	1.6
3	50.0	146.6	2.7	1.6
M. Όρος		146.8	2.8	1.6
+/-		1.8	0.2	0.0

Nanogel 35% pH:6.5

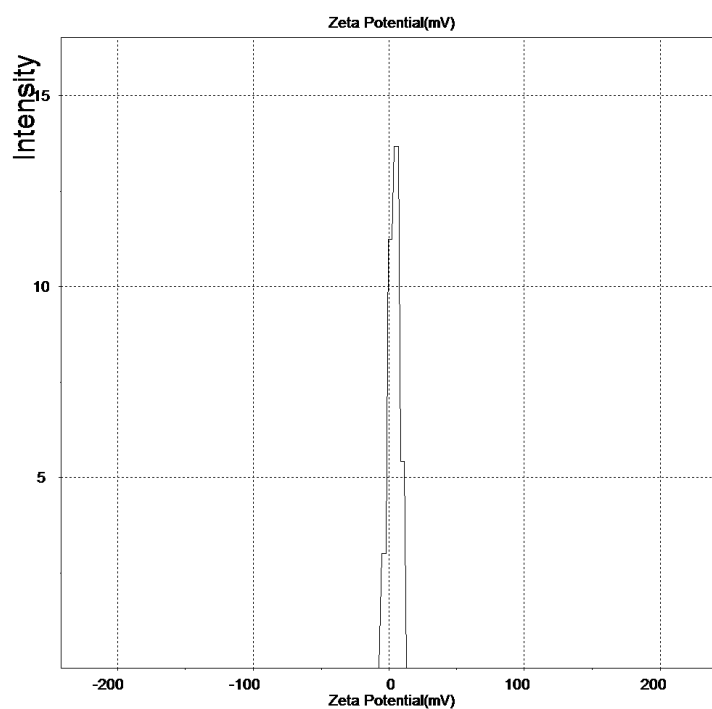


Εικόνα 41: Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 35%, σε pH: 6.5

Πίνακας 23 : Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 35% σε pH 6.5

α/α μέτρησης	Pos.	KCps	Zeta	Width
1	50.0	113.7	0.5	1.6
2	50.0	120.2	-0.1	1.6
3	50.0	114.0	-0.6	1.6
M. Όρος		116.0	-0.1	1.6
+/-		3.7	0.6	0.0

Nanogel 12% pH:6.5

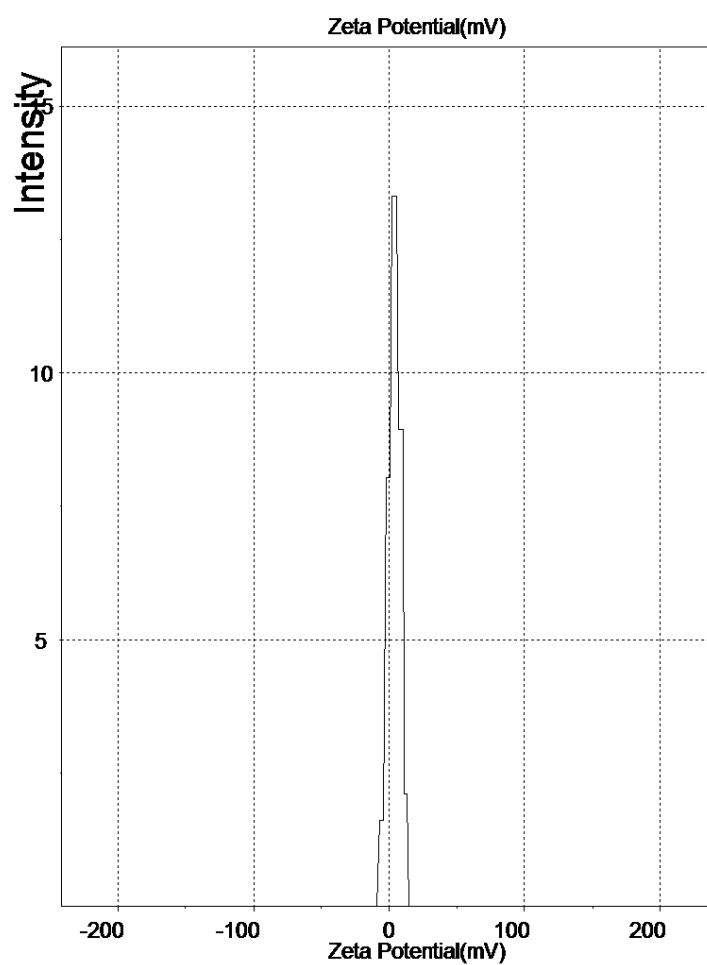


Εικόνα 42: Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 12%, σε pH: 6.5

Πίνακας 24: Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 12% σε pH 6.5

α/α μέτρησης	Pos.	KCps	Zeta	Width
1	50.0	147.8	3.9	1.6
2	50.0	148.6	3.3	1.6
3	50.0	149.7	3.7	1.6
M. Όρος		148.7	3.6	1.6
+/-		1.0	0.3	0.0

Nanogel 7% pH:6.5



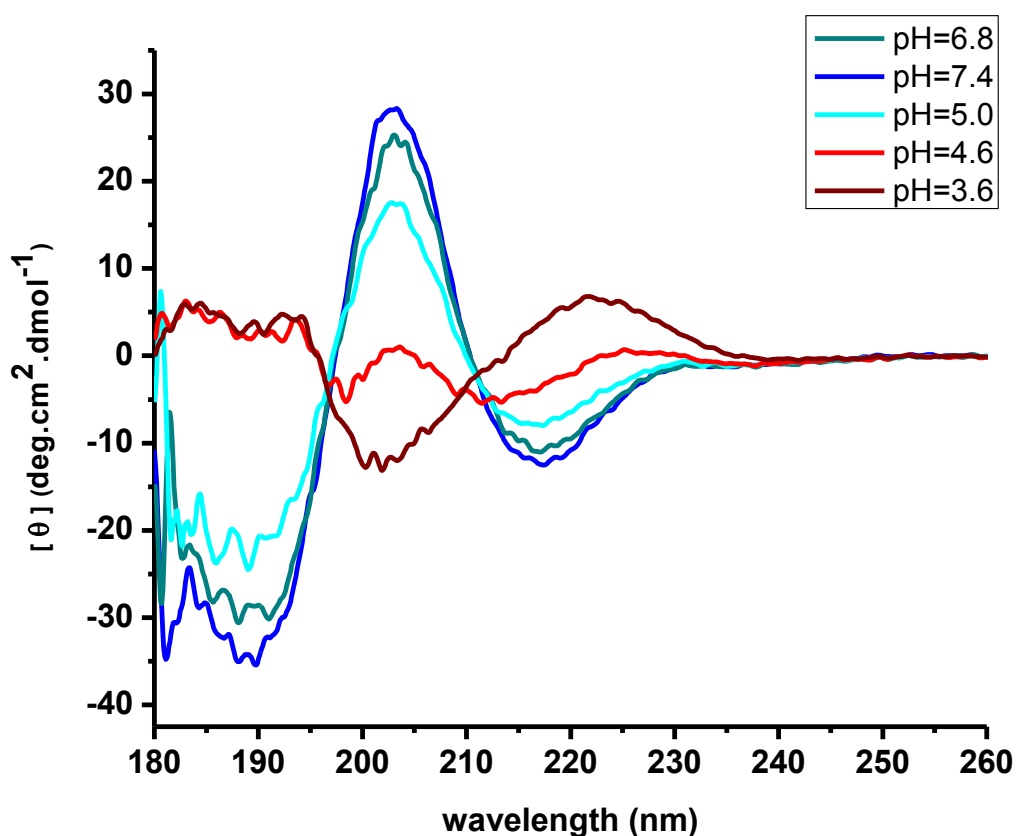
Εικόνα 43: Γράφημα για το ζ-Δυναμικό του Nanogel 7%, σε pH: 6.5

Πίνακας 25: Μετρήσεις της τιμής του ζ-δυναμικού του nanogel 35% σε pH 6.5

α/α μέτρησης	Pos.	KCps	Zeta	Width
1	50.0	88.2	3.6	1.6
2	50.0	85.0	4.4	1.6
3	50.0	93.3	3.8	1.6
M. Όρος		88.8	4.0	1.6
+/-		4.2	0.4	0.0

6.2.6 Κυκλικός Διχρωϊσμός

Η λήψη των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού πραγματοποιήθηκε σε διαλύματα συγκέντρωσης 2×10^{-4} g/ml, με χρήση κυψελίδας 0.1 Quartz Suprasil. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στη θερμοκρασία των 37°C, μόνο για το ένα Nanogel, αυτό με το ποσοστό κυστίνης 12%. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε με τη χρήση ειδικής ψηφιακής συσκευής θερμοστάτησης και παροχή του αζώτου στα 15 l/min. Πραγματοποιείται σάρωση στην περιοχή των μηκών κύματος 260-185 nm. Επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις από το μηχάνημα 10 φορές ώστε να έχουμε μείωση του θορύβου. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε διάφορες τιμές pH, το οποίο μετρήθηκε με ψηφιακό πεχάμετρο, ξεκινώντας από νερό milliQ, με προσθήκη HCl 0.1N, έτσι ώστε να μειώνεται το pH, και να λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα για κάθε τιμή.



Εικόνα 44: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού για το Nanogel 12%.

Από τα παραπάνω διαγράμματα λαμβάνονται ενδιαφέρουσες πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή που σχηματίζει το πολυμερές. Επιπλέον, ο τρόπος

με τον οποίο αλλάζει η δευτεροταγής δομή του, σχετίζεται με την ικανότητα του να αποκρίνεται στη μεταβολή του pH.

Παρατηρείται ότι, σε pH=7.4, 6.8, και 5.0, το πολυμερές σχηματίζει δομή β-φύλλου, η οποία όσο αυξάνεται το pH, γίνεται εντονότερη.

Ενώ σε pH=3.6, παρατηρείται δομή τυχαίου σπειράματος. Το pH=4.6, είναι εκείνο στο οποίο, υπάρχει μια ενδιάμεση διαμόρφωση ανάμεσα σε β-φύλλο και τυχαίο σπείραμα.

Σε pH=7.4 οι αλυσίδες της ιστιδίνης δεν είναι πρωτονιωμένες, άρα είναι ακόμα υδρόφοβες, όσο το pH χαμηλώνει, η ιστιδίνη πρωτονιώνεται, χάνει σταδιακά τον υδρόφοβο χαρακτήρα της και το μόριο γίνεται υδρόφιλο. Το μεγάλο εύρος της δυνατότητας πρωτονίωσης του πολυμερούς της ιστιδίνης και μάλιστα δικτυωμένου, σε σχέση με το αμινοξύ της ιστιδίνης όπου το εύρος είναι πολύ μικρότερο (μια τυπική σιγμοειδής καμπύλη), κάτι το οποίο οφείλεται στη δευτεροταγή δομή που λαμβάνουν στο διάλυμα οι πολυμερικές αλυσίδες, η οποία αποδεικνύεται με τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού^[90].

Τα φάσματα σε αυτές τις τιμές pH, είναι συγκρίσιμα, με πρότυπα μοντέλα που έχουν αυτή τη διαμόρφωση^{[90], [91]}.

6.2.7 Νανοςωματίδια Χρυσού

Αποδείχθηκε με μια απλή πειραματική διαδικασία, ο σχηματισμός νανοςωματιδίων χρυσού από το δικτυωμένο πυρήνα της πολυιστιδίνης, επιβεβαιώνοντας την ιδιότητά της να ανάγει τον υποχλωριώδη χρυσό και να σχηματίζει νανοςωματίδια χρυσού. Το συμπέρασμα αυτό είναι θετικό, καθώς τα πολυμερή που πρόκειται να εισαχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό, αποκτούν μεγαλύτερη σταθερότητα όταν φέρουν νανοςωματίδια χρυσού στην επιφάνειά τους, καθώς και λόγω των οπτικών ιδιοτήτων τους μπορούν να δώσουν τη δυνατότητα απεικόνισης, παράλληλα με την αντικαρκινική θεραπεία. Παρ' όλα αυτά πρέπει μελλοντικά να ληφθούν εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διαπερατότητας που θα επιβεβαιώνουν τη συνθεσή τους και το πως αυτά έχουν κατανεμηθεί στο πολυμερές.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Διαπιστώθηκε ότι η σύνθεση των nanogel ολοκληρώθηκε με επιτυχία, και οι ιδιότητες τους είναι τέτοιες που δίνουν τη δυνατότητα για εφαρμογή στο πεδίο της στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων.

Το επόμενο στάδιο αναμένεται να είναι ο εγκλωβισμός αντικαρκινικού φαρμάκου, και οι μελέτες για την συμπεριφορά με την οποία το φάρμακο αποδεσμεύεται. Λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από την παρούσα εργασία.

Επιπλέον το σύστημα θα μπορούσε να βελτιωθεί ακόμα περισσότερο, με την εισαγωγή φολικού οξέος στα άκρα των αλυσίδων του πολυαιθυλενοξειδίου, καθώς υποδοχείς του φολικού οξέος υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα. Πλέον το σύστημα παίζει ενεργό ρόλο στη στόχευση των καρκινικών κυττάρων, δε στοχεύει παθητικά λόγω των ιδιοτήτων του τα κύτταρα αυτά.

Υπάρχουν πολλά περιθώρια βελτίωσης, με την προσδοκία να αποτελέσει υλικό που θα μπορέσει να εισαχθεί σε κυτταρικές σειρές ή ακόμα και σε ζωντανούς οργανισμούς, όπως τα ποντίκια.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

PEO	Πολυαιθυλενοξειδίο
NCA	N-Καρβοξυανυδρίτης
GSH	Γλουταθειόνη
ROP	Ring Opening Polymerization
BOC ομάδα	Τριτοταγής Βουτόξυ Καρβονυλομάδα
DCC	Δικυκλοέξυλοκαρβοδιϊμίδιο
NAM	Normal Amine Mechanism
AMM	Active Monomer Mechanism
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
Z-ομάδα	Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα
Broc	2-(4-δифαινυλο-)-ισοπροποξυ καρβονυλομάδα
Fmoc	9-φλουορενυλ- βουτόξυκαρβονυλομάδα
Trt	Τρίτυλο ή Τριφαίνυλο
Tos	Τοζυλομάδα
TFA	Τριφθοροξικό
PNIPAM	Πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο)
PBA	Φαινυλοβορονικό οξύ
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
MMA	Μεθακρυλικός Μεθυλεστέρας
n-BA	n-Βουτυλοακρυλικό
PHIS	Πολυιστιδίνη
PEI	Πολυαιθυλενιμίνη
GOx	Οξειδάση της Γλυκόζης
TEM	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διαπερατότητας
AuNPs	Νανοδοσμάτια Χρυσού
PBLG	Πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικό)
PLys	Πολυλυσίνη
PLeu	Πολυλευκίνη
EPR	Enhanced Permeability and Retention Effect

AAPBA	(Ακρυλαμιδοφαινυλο)βορονικό οξύ
HPC	Υδροξυπροπυλοκυτταρίνη
DLS	Dynamic Light Scattering
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
CD	Circular Dichroism
IR	Infra Red
HVT	High Vacuum Technique
THF	Τετραϋδροφουράνιο
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DMA	Διμεθυλαμίνη

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, M. Amiji, A review of stimuli responsive nanocarriers for drug and gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 2008, 126, 187-204
2. J. McMurry, *Οργανική Χημεία, Τομος II, Κεφ.27* , Βιομόρια: αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες, Σελ. 1289-1308, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2008
3. J. McMurry, *Οργανική Χημεία, Τομος II, Κεφ.27* , Βιομόρια: αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες, Σελ. 1309-1328, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2008
4. M. Bodansky, *Πεπτιδοχημεία, Κεφ.Χ, Σελ. 149-165*, Springer-Verlag, 2^η Έκδοση
5. M. Bodansky, *Πεπτιδοχημεία, Κεφ.ΧΙ, Σελ. 171-174*, Springer-Verlag, 2^η Έκδοση
6. M. Bodansky, *Πεπτιδοχημεία, Κεφ.Χ, Σελ. 166-170*, Springer-Verlag, 2^η Έκδοση
7. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, and G. Sakellariou, Synthesis of Well-Defined Polypeptide-Based Materials via the Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, *Chem.Rev.*, 2009, 109, 5528-5578
8. J. Cheng and T. Deming, Synthesis of Polypeptides by Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides, 2011, 310, 1-26
9. M. Goodman and U. Hutchison, The mechanisms of polymerization of N-Unsubstituted N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 88, 3627
10. D. G. Ballard, C. H. Bamford, and F. J. Weymouth, New Observations on the Chemistry of N-Carboxy- α -Amino-Acid Anhydrides, *Nature*, 1954, 174, 173-175
11. D. J. Ballard, C. H. Bamford, F. J. Weymouth, Studies in Polymerization VIII. Reactions of N-Carboxy- α -Acid Anhydrides Initiated by Metal Cations, *Proc. R. Soc*, 1955, 227, 155-183

- 12.D. Thunig, J. Semen and H. G. Elias, Carbon Dioxide influence on NCA polymerizations, *Macromol. Chem.*, 1977, 178, 603-607
- 13.D. J. Ballard, C. H. Bamford, The Polymerization of α -Benzyl-L-Glutamate N-Carboxy Anhydride, *J.Am.Chem.Soc.*, 1957, 79, 2336-2338
- 14.F. Z. Wessely, Untersuchungen über α -Amino-N-Carbonsäureanhydride. I., *Physiol. Chem*, 1925, 146, 72
- 15.F. Sigmund , F. Z. Wessely, Untersuchungen über α -Amino-N-Carbonsäureanhydride. II. , *Physiol. Chem.*, 1926, 157, 91
- 16.F. Sigmund , F.Z Wessely, Untersuchungen über α -Amino-N-Carbonsäureanhydride. III., *Physiol. Chem.* 1926, 159, 102
- 17.F. Sigmund, M. Z. John, Untersuchungen über α -Amino-N-Carbonsäureanhydride. IV., *Physiol. Chem.* 1927, 170, 38
- 18.F. Sigmund, K. Riedl, K. Z. Tuppy, Untersuchungen über alpha-Amino-N-Carbonsäureanhydride, *Monatsh. Chem.* 1950, 81, 861
- 19.D. Bartlett, H. J. Jones, *Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 2153
- 20.D. Bartlett, C. J. Dittmer, *Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 2159
- 21.E. Katchalski, Y. Shalitin, M. Gehatia, Molecular weight distribution of linear and multichain polyamino acids. A statistical analysis, *J. Am. Chem. Soc.* 1955, 77, 1925
- 22.E. R. Bloutand, M. Idelson, Polypeptides XVII, A Kinetic Study of the Polymerization of Aminoacid N-Carboxyanhydrides Initiated by Strong Bases, *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 2387-2393
- 23.H. G. Ballard, H. C. Bamford, Additional comments of the amine-initiated polymerization, *J. Am. Chem. Soc.* 1956, 79, 2338
- 24.C. Bamford, H. Block, The polymerization of α -Amino Acid N-Carbonic Anhydrides in Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins, Stahmann, M. A., Ed. , *Wisconsin University Press: Madison, WI*, 1962, 80, 70-71
- 25.M. Szwarc, *Adv. Polym. Sci.*, 1965, 4, 1
- 26.T. J. Deming, Facile Synthesis of Block Copolypeptides of defined architecture, *Nature*, 1997, 390, 386-389
- 27.T. J. Deming, Amino Acid Derived Nickelacycles: Intermediates in Nickel Mediated Polypeptides Synthesis, *Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 4240-4241

28. T. J. Deming, Cobalt and Iron Initiators For the Controlled Polymerization of alpha-Amino Acid-N-Carboxyanhydrides, *Macromolecules*, 1999, 32, 4500-4502
29. T. Aliferis, H. Iatrou, and N. Hadjichristidis, Living Polypeptides, *Biomacromolecules*, 2004, 5, 1653-1656
30. T. Aliferis, H. Iatrou, and N. Hadjichristidis, Well-Defined Linear Multiblock and Branched Polypeptides by Linking Chemistry, *J. Polym. Sci.* 2005, Part A, 43, 4670-4673
31. T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, N. Messman and J. Mays, Synthesis and Characterization of 3- and 4- Arm Star-Block Copolypeptides using Multifunctional Initiators and high Vacuum Techniques, *L. Macromol. Symp.* 2006, 240, 12-17
32. N. Χατζηχρηστίδης, Ε. Ιατρού, Μ. Πιτσικάλης, Σημειώσεις του Μαθήματος «Βιομηχανική Χημεία-Πολυμερή», ΕΚΠΑ, 2008
33. A. C. Farthing, and R. J. W. Reynolds, Anhydro-n-Carboxy-DL-β-phenylalanine, *Nature*, 1950, 165, 645-657
34. A. L. Levy, Anhydro-n-Carboxy-DL-β-phenylalanine, *Nature*, 1950, 165, 152-153
35. D. Coleman, and A. C. Farthing, Synthetic Polypeptides, Part I. Synthesis of Oxazolid-2,5-diones and a New Reaction of Glycine, *J. Chem. Soc.* 1950, 32, 3218-3222
36. M. Bodansky, Πεπτιδοχημεία, Κεφ. VI, Σελ. 74-85, Springer-Verlag, 2^η Έκδοση
37. 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, 3223-3230
38. S. K. Sahoo and V. Labhasetwar, Nanotech approaches to drug delivery and imaging, 2003, 24, 1112-1120
39. O. C. Farokhzad, and R. Langer, Impact of Nanotechnology on Drug Delivery, *Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 2469-2471
40. J. Huang and A. Heise, Stimuli responsive synthetic polypeptides derived from N-carboxyanhydride (NCA) polymerization, *Chem Soc Rev*, 2013, 42, 7373

41. S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama and K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 6001
42. Y. Y. Choi, J. H. Jang, M. H. Park, B. G. Choi, B. Chi and B. Jeong, Block length affects, secondary structure, nanoassembly and thermosensitivity of poly(ethylene-glycol)-b-poly(L-alanine) block copolymers, *J. Mater. Chem.*, 2010, 20, 3416
43. H. J. Oh, M. K. Joo, Y. S. Sohn and B. Jeong, Secondary structure effect of polypeptide on reverse thermal gelation and degradation of l/dl poly(alanine)-poloxamer-l/dl poly(alanine) copolymers, *Macromolecules*, 2008, 41, 8204
44. Y. Jeong, M. K. Joo, K. H. Bahk, Y. Y. Choi, H. T. Kim, W. K. Kim, H. J. Lee, Y. S. Sohn and B. Jeong, Enzymatically degradable temperature-sensitive polypeptide as a new in situ gelling biomaterial, *J. controlled release*, 2009, 137, 25
45. M. K. Joo, M. H. Park, B. G. Choi and B. Jeong, Reverse thermogelling biodegradable polymer aqueous solutions, *J. Mater Chem*, 2009, 19, 5891
46. A. Carlsten and S. Lecommandoux, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2009, 14, 329
47. J. Rodriguez-Hernandez and S. Lecommandoux, Reversible inside-out micellization of pH-responsive water-soluble vesicles based on polypeptides diblock copolymers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 2026
48. Y. Zhao, Photo-responsive block copolymer micelles: design and behavior, *Macromolecules*, 2012, 45, 3647
49. O. Pieroni, A. Fissi, N. Angelini and F. Lenci, Photo-responsive polypeptides, *Acc. Chem. Res.*, 2001, 34, 9
50. A. J. Williams and V. K. Gupta, Incorporation of a photochromic hinge in a Rodlike polypeptide and its influence on dielectric and optical properties, *J. Polym. Sci, Part B: Polym. Phys.*, 2001, 39, 2759
51. M. Goodman and M. L. Falxa, Conformational aspects of polypeptide structure, Photochromic isomerization of azoaromatic polypeptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 3863

- 52.A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai and T. Osa, Photocontrol of polypeptide helix sense by cis-trans isomerism of side chain azobenzene moieties, *Macromolecules*, 1980, 13, 459
- 53.H. Yamamoto, A. Nishida and T. Kawaura, Photoresponsive peptide and polypeptide systems: 10. Synthesis and reversible photochromism of azoaromatic poly(L- α,β -diaminopropionic acid), *Int. J. Biol. Macromol*, 1990, 12, 257
- 54.L. Zha, B. Banik, and F. Alexis, Stimulus responsive nanogels for drug delivery, *Soft Matter*, 2011, 7, 5908
- 55.P. Vaupel, F. Kallinowski and P. Okunieff, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review, *Cancer Res.*, 1989,49, 6449
- 56.E. S. Gil and S. M. Hudson, Stimuly responsive polymers and their bioconjugates, *Prog. Polym. Sci.*, 2004, 29, 1173
- 57.S. Bontha, A. V. Kabanov and T. K Bronich, Polymer micelles, with cross-linked ionic cores for delivery of anticancer drugs, *J. controlled release*, 2006, 114, 163
- 58.T. Bronich, S. Vinogradov and A. Kabanov, Interaction of nanosized copolymer networks with oppositely charged amphiphilic molecules, *Nano Letters*, 2001, 1, 535
- 59.P. Sazani, M. Adam, M. J. Cho, M. Rubinstein, R. J. Samulski and J. M. DeSimone, Polymeric Nanogels produced via inverse microemulsion polymerization as potential gene and antisense delivery agents, *K. McAllister, J. Am. Chem. Soc.* , 2002, 124, 15198
- 60.D.Schmaljohann, Thermo- and pH responsive polymers in drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2006, 58, 1655
- 61.R. Pelton, Temperature-sensitine aqueous microgels, *Adv. Colloid interface Sci.*, 2000, 85, 1
- 62.J. K. Li, N. Wang and X. S. Wu, Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing thawing process for protein/peptide drug delivery, *J. Controlled release*, 1998, 56, 117
- 63.C. Wu and S. Zhou, Volume phase transition of swollen gels: Discontinuous or continuous?, *Macromolecules* 1997,30, 574-576

64. M. H. Li and P. Keller, Stimuly responsive polymer vehicles, *Soft Matter*, 2009, 5, 927
65. T. Kawano, Y. Nidome, T. Mori, Y. Katayama and T. Nidome, Gold nanorods as molecular probes for light-based imaging techniques, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 209
66. T. Nakamura, A. Tamura, H. Murotani, M. Oishi, Y. Jinji, K. Matsuishi and Y. Nagasaki, Large payloads of gold nanoparticles into the polyamine network core of stimuly responsive PEGylated nanogels for selective and noninvasive cancer photothermal therapy, *Nanoscale*, 2010, 2, 739
67. W. T. Wu, J. Shen, P. Banerjee and S. Q. Zhou, Investigation of Ag nanoparticles Loading temperature responsive hybrid microgels and their temperature controlled catalytic activity, *Biomaterials*, 2010, 31, 7555
68. H. Sun, L. Zhang, X. Zhang, Z. Wei and S. Yao, 188-Relabeled mPEG-modified superparamagnetic nanogels: preparation and targeting application in rabbits, *Biomed. Microdevices*, 2008, 10, 81
69. V. Ravaine, C. Ancla and B. Catargi, Chemically controlled closed-loop insulin delivery, *J Controlled Release*, 2008, 132, 2
70. A. Rehor, N. E. Botterhuis, J. A. Hubbell, N. Sommerdijk and N. Tirelli, Glucose sensitivity through oxidation responsiveness, an example of cascade responsive nano-sensors, *J. Mater. Chem.*, 2005, 15, 4006
71. M. Motornov, J. Zhou, M. Pita, V. Gopishetty, I. Tokarev, E. Katz and S. Minko, "Chemical Transformers" from nanoparticle ensembles operated with logic, *Nano Lett*, 2008, 8, 2993
72. T. Hoare and R. Pelton, Charge switching, amphoteric glucose responsive microgels with physiological swelling activity, *Macromolecules*, 2008, 40, 670
73. J. K. Oh, R. Drumright, D. J. Siegwart, K. Matyjaszewski, The development of microgels/nanogels for drug delivery applications, *Progress in Polymer Science*, 2008, 33, 448-477
74. I. S. Kim, Y. I. Jeong and S. H. Kim, Self-assembled hydrogel nanoparticles composed of dextran and poly(ethylene glycol) macromonomer, *Int. J. Pharm.*, 2000, 205, 109

75. S. Bhattacharya, F. Eckert, V. Boyko, and A. Pich, Temperature-, pH-, and magnetic field sensitive hybrid microgels, *Small*, 2007, 3, 650
76. S. Salmaso and P. Caliceti, Stealth Properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers, *Journal of drug delivery*, 2013, article ID 374252, 1-19
77. D. Mavrogiorgis, P. Bilalis, A. Karatzas, D. Skoulas, G. Fotinogiannopoulou and 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, 6256-6278
78. S. Hehir and N. R. Cameron, Recent advances in drug delivery systems based on polypeptides polypeptides prepared from N-carboxyanhydrides, *Society of Chemical Industry*, 2014, 63, 943-954
79. G. Saito, J. A. Swanson, K. D. Lee, Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55, 199-215
80. H. Iatrou, K. Dimas, M. Gkikas, C. Tsimplouli, S. Sofianopoulou, Polymersomes from Polypeptide Containing Triblock co- and Terpolymers for Drug Delivery against Pancreatic Cancer: Asymetry of the External Hydrophilic Blocks, *Macromolecular Bioscience*, 2014, 14, 1222-1238
81. T. Xing, B. Lai, X. Ye, L. Yan, Disulfide Core Cross-Linked PEGylated Polypeptide Nanogel Prepared by a one-step Ring Opening Copolymerization of N-Carboxyanhydrides for drug Delivery, *Macr.Bioscience*, 2011, 11, 962-969
82. J. Ding, F. Shi, D. Li, L. Chen, X. Zhuang and X. Chen, Enhanced endocytosis of acid-sensitive doxorubicin derivatives with intelligent nanogel for improved security and efficacy, *Biomaterials Science*, 2013, 65, 471-496
83. T. Xing, B. Lai, L. Yan, Disulfide Cross-Linked Polypeptide Nanogel Conjugated with a Fluorescent Probe as a Potential Image-Guided Drug Delivery Agent, *Macrom. Chem. Phys.*, 2013, 214, 578-588

84. O. S. Muddineti, B. Ghosh, S. Biswas, Current Trends in Using Polymer coated Gold Nanoparticles For Cancer Therapy, International Journal of Pharmaceutics, 2015
85. Σ. Βάρλας, Εγκλωβισμός Φαρμάκων σε Πολυπεπτίδια, Πτυχιακή Εργασία, Αθήνα, 2014
86. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, A. Pispas, M. Pitsikalis, Anionic Polymerization: High Vacuum Techniques, J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 2000, 38, 3211-3224
87. D. Uhrig, J. Mays, Experimental Techniques in High Vacuum Anionic Polymerization, J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2005, 43, 6179-6222
88. J. Riddick and W. Bunger, Organic Solvents: Physical Properties and Methods of Purification, Έκδοση 3^η, Τόμος II, Wiley-Interscience, New York, 1970
89. T. Maruyama, Y. Fujimoto, T. Maekawa, Synthesis of gold nanoparticles using various amino acids, Journal of Colloid and Interface Science, 2015
90. Γ. Φωτεινογιαννοπούλου, Σύνθεση συμπολυμερών Πολυαιθυλενοξειδίου και Πολυιστιδίνης με Πολυλευκίνη. Μελέτη επίδρασης της επίδρασης της πολυλευκίνης στο pKa της Πολυιστιδίνης, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Αθήνα, 2014
91. 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

