

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης  
Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα**

**Σύνθεση βιοσυμβατών και βιοδιασπώμενων  
συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς μέσω  
ενζυμικά καταλύομενου πολυμερισμού  
διάνοιξης δακτυλίου**

**Ελευθερία Δασκαλάκη**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια : Κέλλυ Βελώνια**

**Ηράκλειο 2012**

**UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**



**Synthesis of biocompatible and biodegradable  
protein-polymer conjugates through enzyme  
catalyzed ring opening polymerization**

**Eleftheria Daskalaki**

**Supervisor: Kelly Velonia**

**Master of Science**

**Heraklion 2012**

# **Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης**

## **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης**

1. Κέλλυ Βελώνια, Επίκουρος Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια),  
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών
2. Σπύρος Αναστασιάδης, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα  
Χημείας
3. Ιουλία Σμόνου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Κρήτης,  
Τμήμα Χημείας

## ***Βιογραφικό Σημείωμα***

### **Ελευθερία Δασκαλάκη**

#### **Προσωπικά Στοιχεία**

Ημερομηνία Γέννησης: 17 Ιουνίου 1987, Κρήτη, Ελλάδα

Εθνικότητα: Ελληνική

Τηλέφωνο Εργαστηρίου: +30 2810 54 5088

Διεύθυνση Ηλεκτρονικού Ταχυδρομείου:

[met682@edu.chemistry.uoc.gr](mailto:met682@edu.chemistry.uoc.gr), [d\\_omi\\_no@hotmail.com](mailto:d_omi_no@hotmail.com)

#### **Εκπαίδευση**

Φεβρουάριος 2010-  
Οκτώβριος 2012

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα

2005-2010

Πτυχίο

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα

2005

Απολυτήριο Λυκείου

Λύκειο Νέας Αλικαρνασσού, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

#### **Ερευνητική Εμπειρία**

2010-2012

Μεταπτυχιακή Εργασία Ειδίκευσης, Εργαστήριο Υπερμοριακής Χημείας και Βιοϋλικών, “Σύνθεση βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς μέσω ενζυμικά καταλυόμενου πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου”

2009-2010

Διπλωματική Εργασία, Εργαστήριο Υπερμοριακής Χημείας και Βιοϋλικών,

“Δημιουργία Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων με ταυτόχρονη πραγματοποίηση ATRP πολυμερισμού και [3+2] Huisgen αντίδραση κυκλοπροσθήκης”

#### **Διδακτική Εμπειρία**

2011

Βοηθός Καθηγητή: Προπτυχιακό Εργαστήριο “Οργανική Χημεία Ι”, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα

2009 Βοηθός Καθηγητή: Προπτυχιακό Εργαστήριο “Γενική Χημεία”, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα

#### Γνώσεις

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού  
Φασματοσκοπία Υπερύθρου  
Φασματοσκοπία RAMAN  
Φασματοσκοπία Υπεριώδους  
Ηλεκτροφόρηση  
Χρωματογραφία Διέλευσης Πηκτής  
Μικροσκοπία (Συνεστιακό Μικροσκόπιο )  
MALDI  
Τεχνικές Πολυμερισμού: ειδίκευση στον Πολυμερισμό Μεταφοράς Ριζών (ATRP) και στον Πολυμερισμό Διάνοιξης Δακτυλίου (ROP)  
Χειρισμός Υψηλού Κενού

#### Δημοσιεύσεις

Daskalaki, E., Le Droumaguet, B., Gérard, D., Velonia, K., “*Multifunctional Giant Amphiphiles via simultaneous copper(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition and living radical polymerization*”, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 1586-1588.[2012 Emerging Investigator Issue]

#### Αναρτήσεις σε Συνέδρια

2010 Poster, Macro2010: 43rd IUPAC World Polymer Congress, Glasgow, UK

2011 Παρουσίαση Poster στο 17<sup>th</sup> European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2011), Ηράκλειο, Κρήτη

2011 Ομιλία στο Συνέδριο των μεταπτυχιακών φοιτητών του Τμήματος Χημείας του Παν/μιου Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη

2012 Παρουσίαση Poster, Macro2012, Warwick, UK

2012 Παρουσίαση Poster, NanoPT (2012), Heraklion, Crete (βραβείο καλύτερου poster)

**Θερινό Σχολείο**  
July 2009

Θερινό σχολείο “From chemistry to biology medicine via metals”, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη

**Γλώσσες**

Μητρική Γλώσσα Ελληνικά  
First Certificate in English (Level 1 Certificate in English from *Cambridge University*)

**Γνώσεις Υπολογιστών**

Computer Operating systems: Windows, Linux  
Languages: FORTRAN  
Software: Office, Origin, Agilent VEE

**Δραστηριότητες**

ποδηλασία, χορός

# *Curriculum Vitae*

## **Eleftheria Daskalaki**

### **Personal Data**

Born June 17<sup>th</sup>, 1987 in Crete, Greece  
Nationality: Greek  
Lab phone: +30 2810 54 5088  
e-mail: [met682@edu.chemistry.uoc.gr](mailto:met682@edu.chemistry.uoc.gr),  
[d\\_omi\\_no@hotmail.com](mailto:d_omi_no@hotmail.com)

### **Education**

February 2010-October 2012 MSc student  
Chemistry Department, University of Crete, Greece

2005-2010 Bachelor  
Materials Science and Technology Department, University of Crete, Greece

2005 High-school degree  
High school of New Alikarnassos of Heraklion, Crete, Greece

### **Research Experience**

2010-2012 MSc Thesis "Synthesis of new Biocompatible and Biodegradable *Giant Amphiphilic Molecules*"

2009-2010 Diploma Thesis, Laboratory of Supramolecular Chemistry and Biomaterials  
"Atom Transfer Radical Polymerization Mediated Formation of Multifunctional *Giant Amphiphiles* – Tandem ATRP and "click" chemistry"

### **Teaching Experience**

2011 Teaching assistant: Undergraduate Laboratory of "Organic Chemistry I", Chemistry Department, University of Crete, Greece

2009 Teaching assistant: Undergraduate Laboratory of "Chemistry Lab", Materials Science and Technology

Department, University of Crete, Greece

### Qualifications

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy  
FT-Infrared Spectroscopy  
RAMAN Spectroscopy  
Ultraviolet Spectroscopy  
Electrophoresis  
Gel Permeation Chromatography  
Microscopy (Confocal Microscopy)  
MALDI  
Polymerization Techniques: specialization in Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) and Ring Opening Polymerization (ROP)  
High Vacuum Handling

### Publications

Daskalaki, E., Le Droumaguet, B., Gérard, D., Velonia, K., *"Multifunctional Giant Amphiphiles via simultaneous copper(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition and living radical polymerization"*, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 1586-1588.[2012 Emerging Investigator Issue]

### Conferences

- 2010                      Poster presentation, Macro2010: 43rd IUPAC World Polymer Congress, Glasgow, UK
- 2011                      Poster presentation 17<sup>th</sup> European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2011), Heraklion, Crete
- 2011                      Lecture in the "Master Students Conference" of the Chemistry Department of the University of Crete, Heraklion, Crete
- 2012                      Poster presentation, Macro2012, Warwick, UK
- 2012                      Poster presentation, NanoPT (2012), Heraklion, Crete (best poster award)

### Summer Schools



July 2009 Summer school “From chemistry to biology medicine via metals”, Chemistry Department, University of Crete, Greece

**Languages** Native language Greek  
First Certificate in English (Level 1 Certificate in English from *Cambridge University*)

**Computer Skills** Computer Operating systems: Windows, Linux  
Languages: FORTRAN  
Software: Office, Origin, Agilent VEE

**Hobbies** Literature, cycling, dancing

## Περίληψη

Στόχος της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν η σύνθεση μίας νέας γενιάς αμφίφιλων βιοϋβριδίων πολυμερούς-πρωτεΐνης τα οποία σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να είναι βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα. Η σύνθεση των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μορίων βασίστηκε σε παλαιότερες μελέτες της ερευνητικής ομάδας της Κ. Βελώνια και πραγματοποιήθηκε μέσω του καταλυόμενου από λιπάση (Novozym® 435) πολυμερισμού διάνοιξης (ROP) της ε-καπρολακτόνης και παραραγωγών της.

Η προσέγγιση αυτή σχεδιάστηκε έτσι ώστε να συνδυάσει τα πλεονεκτήματα του ATRP *grafting from* πολυμερισμού με ήπιες συνθήκες αντίδρασης και πιο συγκεκριμένα ενζυμική κατάλυση. Επιπλέον, η ανάπτυξη του υδρόφοβου τμήματος με τη συγκεκριμένη συνθετική προσέγγιση, οδηγεί στο σχηματισμό (πολυ)καπρολακτόνης, γεγονός που καθιστά αυτή τη νέα γενιά *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων* ιδιαίτερα ελκυστική αφού αναμένεται να συνδυάζουν την ικανότητα αυτοοργάνωσης με την ικανότητα βιοδιάσπασης υπό κατάλληλες συνθήκες. Υπερδομές αυτού του τύπου θα μπορούσαν στο μέλλον να βρουν εφαρμογή ως νανοαντιδραστήρες ή ως μέσα μεταφοράς και/ή αποδέσμευσης φαρμάκων και άλλα.

Η ιδέα βασίστηκε στο σχεδιασμό ενός ROP βιομακροεκκινητή (BSA-PEG-OH) ο χαρακτήρας του οποίου συνολικά θα ήταν υδρόφιλος και από τον οποίο με την προσέγγιση *grafting from* θα αναπτυσσόταν η υδρόφοβη πολυμερική αλυσίδα πολυεστέρα. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, καθοριστικοί παράγοντες για την πραγματοποίηση του καταλυόμενου από Novozym 435® πολυμερισμού διάνοιξης ε-καπρολακτόνης από έναν εκκινητή, είναι ο διαλύτης, η θερμοκρασία αλλά και η περιεκτικότητα του μίγματος της αντίδρασης σε νερό. Επομένως δεδομένης της ύπαρξης του ενζύμου και του βιοεκκινητή σε αυτή την μελέτη, σημαντική ήταν η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης ώστε να λαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα. Τελική επιδίωξη ήταν η επιτυχής σύνθεση των μορίων αυτών και η αποικοδόμησή τους. Κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης, παρασκευάστηκε μια σειρά από βιοϋβρίδια που χαρακτηρίστηκαν με χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση, φασματοσκοπία υπερύθρου και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ενώ η αρχιτεκτονική της συσσωμάτωσής τους μελετήθηκε με μικροσκοπία. Επιπλέον, μελετήθηκε και βελτιστοποιήθηκε η ενζυμικά καταλυόμενη αποικοδόμηση των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* κάτω από ήπιες συνθήκες.

Οι μελέτες αυτές απέδειξαν ότι είναι δυνατή η σύνθεση *Γιγάντιων Αμφίφιλων* με τη βοήθεια ενζυμικά καταλυόμενου πολυμερισμού, ότι τα νέα αμφίφιλα παρουσιάζουν κλασσική συμπεριφορά αυτοοργάνωσης και δυνατότητα εγκλεισμού φιλοξενούμενων μορίων και τέλος ότι είναι δυνατή η αποικοδόμησή τους κάτω από ήπιες συνθήκες.

## Summary

Aim of this study was the synthesis of a new generation of protein-polymer bio-conjugates which were designed to be biocompatible and biodegradable. The synthesis of these biohybrids was based on previous studies of the group of Dr. Velonia which proved the efficiency of the *grafting from* approach and was carried out using for the first time an enzyme catalyzed Ring Opening Polymerization (ROP) of  $\epsilon$ -caprolactone and its derivatives.

This new synthetic approach was developed with the aim to evolve the advantages of the *grafting from* Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) toward mild reaction conditions and absence of toxic catalysts that are intrinsic in enzymatic catalysis. Furthermore, the hydrophobic chain growth following this approach leads to the synthesis of polycaprolactone biohybrids, rendering the new generation of *Giant Amphiphiles* especially interesting as they are expected to combine self-assembly with biodegradability under specific conditions. In the future, these superstructures may find numerous applications such as nanoreactors or nanocontainers for drug delivery or/and drug release.

We studied the ROP of  $\epsilon$ -caprolactones using the lipase B from *Candida antarctica* in its immobilized form Novozym® 435. A ROP biomacroinitiator, BSA-PEG-OH, having an overall hydrophilic character was synthesized and was found able to initiate the propagation of the hydrophobic polyester chain through the lipase catalyzed *grafting from* approach. During this project a range of bio-conjugates was synthesized and characterized by chromatography, electrophoresis, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The reaction conditions were optimized by varying solvent, temperature and water content which, according to bibliography, are the determining factors for optimizing the reaction. The self-assembled architectures of the bio-conjugates were studied by electron microscopy. In addition, the enzymatic catalyzed degradation of these *Giant Amphiphiles* was studied and the reaction conditions were optimized under mild conditions.

Overall, during this study we proved the ability of Novozym® 435 to catalyze the enzymatic synthesis of *Giant Amphiphiles* through a ROP *grafting* of caprolactones *from* a protein initiator. We also studied the reverse reaction, i.e. the enzymatic degradation of the polycaprolactone moiety of the *Giant Amphiphiles*, under mild conditions. Finally, we demonstrated the ability of these new biodegradable *Giant Amphiphiles* to self-assemble into well organized superstructures and to encapsulate guest molecules.

## *Ευχαριστίες*

Η διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Υπερμοριακής Χημείας - Βιοϋλικών του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας Κέλλυ Βελώνια.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που με δέχτηκε στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών του καθώς και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε.

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Κέλλυ Βελώνια, για την ανάθεση του θέματος της διατριβής αυτής και την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε. Επίσης την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την συνεχή ενθάρρυνση της κατά την διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ. Σπύρο Αναστασιάδη και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Ιουλία Σμόνου που δέχθηκαν να είναι μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Θεοδωρίδη και την Δρ. Κατερίνα Τζαγκαράκη για την πολύτιμη βοήθειά τους στα μικροσκόπια και την Δρ. Ανθή Ρανέλλα για την πολύτιμη βοήθειά της στις καλλιέργειες κυττάρων.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους πρώην συνεργάτες από το εργαστήριο Ε. Λιάμα και Θ. Ζήση και τους φίλους από τον τομέα Οργανικής Χημείας Άννα Μπαριωτάκη και Τάσο Στεργίου.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένεια μου για την υπομονή και την αμέριστη υποστήριξη τους και όσους με στήριξαν και με στηρίζουν.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

% wt	per cent mass fraction (% w/w)
°C	Celsius degree
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
BSA	Bovine Serum Albumin
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	dichloromethane
cmc	Critical Micellar Concentration
DEAD	diethylazodicarboxylate
DMSO	dimethylsulfoxide
FE-SEM	Field Emission Scanning Electron Microscopy
FT-IR	Fourier Transform Infrared (spectroscopy)
GPC	Gel Permeation Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR-TEM	High Resolution Transmission Electron Microscopy
Hz	hertz
kDa	kilodalton
M	Molar
MW	Molar Weight
MWCO	Molecular Weight Cut Off
nm	nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PCL	polycaprolactone
PEG	polyethyleneglycol
PPh <sub>3</sub>	triphenylphosphine
ppm	part per million
ROP	Ring Opening Polymerization
SEC	Size Exclusive Chromatography
Tg	glass transition temperature
THF	tetrahydrofuran
δ	chemical shift
ε-CL	ε-caprolactone
μm	micrometer

## Περιεχόμενα

Βιογραφικό Σημείωμα.....	4-9
Περίληψη.....	10-11
Ευχαριστίες.....	12
Πίνακας Συντομεύσεων.....	13

### Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή.....	16-17
1.1 Αμφίφιλα Μόρια .....	18
1.2 Αυτοδιάταξη / Αυτοοργάνωση.....	19-20
1.3 Αμφίφιλα Γραμμικά Δισυσταδικά Συμπολυμερή.....	20-21
1.4 <i>Γιγάντια Αμφίφιλα Μόρια</i> .....	21-22
1.5 Μέθοδοι Σύνθεσης των <i>Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων</i> .....	22-24
1.6 Ενζυμική Κατάλυση.....	25
1.6.1 Λιπάσες.....	25-27
1.6.1.1 <i>Candida Antarctica</i> Lipase B, (CALB).....	27-28
1.6.2 Ενζυματικός Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου.....	28-30
1.6.3 Ιδιότητες της ε-καπρολακτόνης και της (πολυ)καπρολακτόνης.....	30
1.6.4 Ιδιότητες της (Πολυ)αιθυλενογλυκόλης.....	31
1.7 Σκοπός Μεταπτυχιακής Εργασίας.....	32-33

### Κεφάλαιο 2 - Αποτελέσματα και Συζήτηση

A. Σύνθεση <i>Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων</i> με Καταλυόμενο Πολυμερισμό Διάνοιξης Δακτυλίου από τη Novozym® 435 (Ακίνητοποιημένη Λιπάση CALB σε Μήτρα Ακρυλικού).....	34
A.1.1 Σύνθεση του βιομακροεκκινητή I.....	35
A.1.1.1 Σύνθεση της Τροποποιημένης με Μαλεϊμίδιο (πολυ)αιθυλενογλυκόλης (1) με Αντίδραση Mitsunobu.....	35-36
A.1.1.2 Σύνθεση Μακροεκκινητή I (BSA-PEG-OH).....	36-37
A.2.1 Σύνθεση Μακροεκκινητή Ia (BSA-PEG-OMe).....	37-39
A.3 Αντιδράσεις Πολυμερισμού Διάνοιξης Δακτυλίου ε-καπρολακτόνης και Παραγώγων της με Εκκινητή BSA-PEG-OH I, για το Σχηματισμό BSA-PEG-PCL II.....	39
A.3.1 Αντιδράσεις ROP Πολυμερισμού ε-καπρολακτόνης και Παραγώγων της Εκκινούμενες από BSA-PEG-OH I.....	40-41
A.3.2 Χαρακτηρισμός Προϊόντων των Αντιδράσεων ROP Πολυμερισμού ε-καπρολακτόνης και Παραγώγων της Εκκινούμενες από BSA-PEG-OH I.....	42
A.3.2.1 Χαρακτηρισμός Προϊόντων με SEC-HPLC Χρωματογραφία και Ηλεκτροφόριση Πηκτής (Πολυ)ακρυλαμιδίου.....	42-43
A.3.2.2 Χαρακτηρισμός Προϊόντων με FT-IR Φασματοσκοπία.....	44-47
A.3.2.3 Μελέτη Αρχιτεκτονικών Συσσωμάτωσης των Προϊόντων με Μικροσκοπία.....	47-50
A.4 Λευκά Πειράματα.....	50
A.4.1 Μελέτη Συμπεριφοράς Φυσικής BSA σε Συνθήκες ROP Πολυμερισμού.....	51-52

A.4.2 Μελέτη Απουσία Βιοεκκινητή: Εκκίνηση ROP Πολυμερισμού από Ίχνη Νερού του Περιβάλλοντος της Αντίδρασης.....	52-53
B. Αποικοδόμηση BSA-Πολυκαπρολακτόνης.....	54
B.1 Ενζυμικά Καταλυόμενη Αποικοδόμηση Πολυκαπρολακτόνης.....	54-55
B.2 Αποικοδόμηση <i>BSA-PEG-PCL (II-VIII)</i> .....	55-58
Γ. “Promiscuous” Κατάλυση; Ενζυμικά Καταλυόμενες Αντιδράσεις Πολυμερισμού Διάνοιξης Δακτυλίου ε-καπρολακτόνης και παραγώγων της με εκκινητή BSA-PEG-OMe για τον σχηματισμό BSA-PEG-PCL.....	58
Γ.1 Αντιδράσεις ε-καπρολακτόνης και Παραγώγων της Εκκινούμενες από BSA-PEG-Me Ia.....	58-59
Γ.2 Χαρακτηρισμός Προϊόντων.....	59
Γ.2.1 Χαρακτηρισμός Προϊόντων με SEC-HPLC Χρωματογραφία και Ηλεκτροφόριση Πηκτής (Πολυ)ακρυλαμιδίου.....	60
Γ.2.2 Χαρακτηρισμός Προϊόντων με FT-IR Φασματοσκοπία.....	61-62
Γ.3 Μελέτη της Συσσωμάτωσης των Προϊόντων με Μικροσκοπία.....	63
Δ. Συμπεράσματα.....	64-65

### Κεφάλαιο 3 - Πειραματικό Μέρος

3.1 Αντιδραστήρια.....	66
3.2 Αναλυτικές Τεχνικές.....	66
3.3 Αναλυτικές Μέθοδοι Σύνθεσης.....	67
3.3.1 Σύνθεση τροποποιημένης με πολυ(αιθυλενογλυκόλης) I.....	67
3.3.2 Σύνθεση του BSA-μακροεκκινητή I.....	67
3.3.3 Σύνθεση του BSA-μακροεκκινητή Ia.....	68
3.3.4 ROP πολυμερισμός - προϊόν II.....	68
3.3.5 ROP πολυμερισμός - προϊόν III.....	68
3.3.6 ROP πολυμερισμός - προϊόν IV.....	69
3.3.7 ROP πολυμερισμός - προϊόν V.....	69
3.3.8 ROP πολυμερισμός - προϊόν VI.....	69
3.3.9 ROP πολυμερισμός - προϊόν VII.....	69
3.3.10 ROP πολυμερισμός για το προϊόν VIII.....	69
3.3.11 Μελέτη Συμπεριφοράς Φυσικής BSA σε Συνθήκες ROP.....	70
3.3.12 Μελέτη Απουσία Βιοεκκινητή: Εκκίνηση ROP Πολυμερισμού από Ίχνη Νερού του Περιβάλλοντος της Αντίδρασης.....	70
3.3.13 Μελέτη συμπεριφοράς ε-καπρολακτόνης σε συνθήκες ROP Πολυμερισμού Απουσία Καταλυτικού Ενζύμου (Novozym® 435).....	70
3.3.14 Ενζυμικά Καταλυόμενη Αποικοδόμηση Πολυκαπρολακτόνης.....	70
3.4.1 Ενζυμικά Καταλυόμενη Αποικοδόμηση Πολυκαπρολακτόνης.....	70
3.4.2 Προϊόν IX.....	71
3.4.3 Προϊόν X.....	71
3.4.4 Προϊόν XI.....	71
3.4.5 Προϊόν XII.....	71
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>72-75</b>
<b>Παράρτημα (<sup>1</sup>H NMR Φάσματα).....</b>	<b>76-82</b>

## Εισαγωγή

Με την πάροδο του χρόνου η επιστήμη και η τεχνολογία εξελίσσονται συνεχώς με στόχο να καλύψουν τις αυξανόμενες ανάγκες για ανάπτυξη νέων μεθόδων, τεχνικών, υλικών καθώς και νέων πεδίων έρευνας. Το πεδίο της νανοτεχνολογίας έχει γνωρίσει ιδιαίτερη άνθιση τις τελευταίες δεκαετίες και έχει επιδείξει σημαντικά επιτεύγματα και συνεισφορές σε όλους τους ερευνητικούς τομείς αιχμής.<sup>1</sup>

Μέσα από τις απλές ή περισσότερο πολύπλοκες διεργασίες που συμβαίνουν στη Φύση χωρίς ανθρώπινη παρέμβαση οι επιστήμονες παίρνουν συχνά γνώση και έμπνευση. Στις μέρες μας η παρατήρηση και μελέτη αρκετών φυσικών διεργασιών έχει οδηγήσει σε μιμητικές με ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Ένα χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα είναι η φωτοσύνθεση, η διεργασία δηλαδή βάσει της οποίας τα φυτά εκμεταλλεύονται την ηλιακή ενέργεια για να εξασφαλίσουν χημική ενέργεια. Αυτή τη διαδικασία προσπαθούν να μιμηθούν οι επιστήμονες για να βοηθήσουν με το ενεργειακό πρόβλημα της Γης.<sup>2</sup>

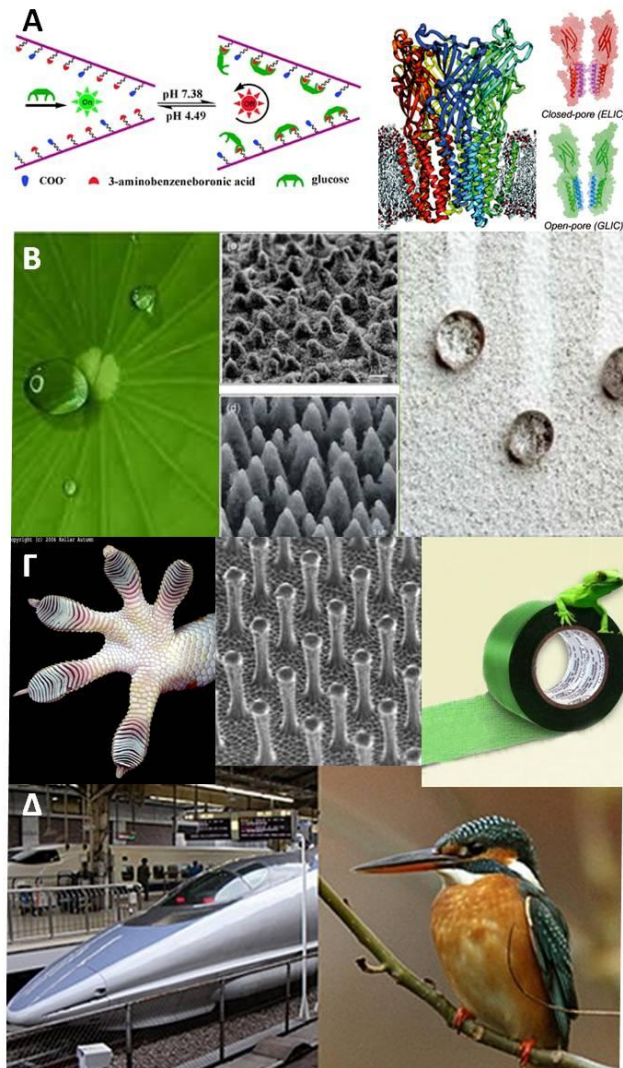
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μίμηση των δομών που παρατηρούνται στη Φύση για τη δημιουργία υλικών και δομών βιολογικού ή βιομιμητικού χαρακτήρα και βιοτεχνολογικού ή ιατρικού ενδιαφέροντος. Τα λιπίδια για παράδειγμα, τα οποία αποτελούν την βασική δομική μονάδα των κυτταρικών μεμβρανών, είναι υπεύθυνα για την διαμερισματοποίηση (compartmentalization) των μεμβρανών εξαιτίας του ότι αποτελούνται δομικά από μία υδρόφιλη κεφαλή και μία ή περισσότερες υδρόφοβες υδρογονανθρακικές αλυσίδες.<sup>3</sup> Η ιδιαιτερότητα του χαρακτήρα τους, τους επιτρέπει να δημιουργούν ενδιαφέρουσες υπερμοριακές δομές χωρίς εξωτερική παρέμβαση. Αυτόν τον αμφίφιλο χαρακτήρα και τη δυνατότητα αυτό-οργάνωσης προσπαθούν να μιμηθούν οι επιστήμονες για να δημιουργήσουν υπερδομές με ιδιότητες και λειτουργίες παρόμοιες με αυτές των λιπιδίων στη φύση.<sup>4</sup>

Εκτεταμένες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τις προηγούμενες δεκαετίες απέδειξαν ότι και τα συνθετικά αμφίφιλα μόρια αυτοοργανώνονται σε ποικίλες υπερδομές που έχουν άμεση εξάρτηση από τη μοριακή τους δομή, γεωμετρία και είναι ανάλογες με αυτές που εμφανίζουν τα φυσικά λιπίδια.<sup>5,6,4</sup> Ένα παράδειγμα εφαρμογής των παραπάνω ιδιοτήτων είναι η σύνθεση κυστιδίων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νανο-αντιδραστήρες αλλά και ως μεταφορείς ουσιών.<sup>7,8,9,10,11</sup> Σημαντική ιδιότητα των σχηματιζόμενων από αμφίφιλα μόρια κυστιδίων είναι η αντιστρεπτή δημιουργία τους με βάση τα εξωτερικά ερεθίσματα ή/και η διαπερατότητά τους. Σαν αποτέλεσμα, οι δομές αυτές προσφέρουν τη δυνατότητα αναγνώρισης, απόκρισης, αποθήκευσης, μεταφοράς και αποδέσμευσης ουσιών και μπορούν να βρουν εφαρμογές στην βιολογία, την ιατρική και την φαρμακευτική.

Τα παραδείγματα τεχνολογικών και τεχνικών επιτευγμάτων που είναι προϊόν της βιομιμητικής είναι αναρίθμητα. Με τυχαία επιλογή μπορούμε να αναφέρουμε μερικά



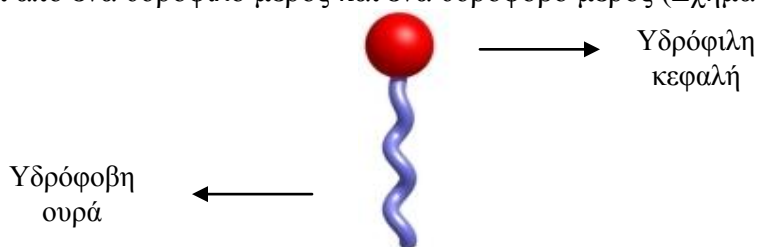
όπως η δημιουργία πολυμερικών επιστρωμάτων αναγνωρίσιμων από τον οργανισμό,<sup>12</sup> νανοκανάλια που ανταποκρίνονται στην αλλαγή του pH<sup>13</sup> ακόμα και αρχιτεκτονικές δομές ή αντικείμενα καθημερινής χρήσης ο σχεδιασμός των οποίων βασίστηκε στην Φύση (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1.** Παραδείγματα επιστημονικών και τεχνολογικών επιτευγμάτων που είναι προϊόν βιομιμικής. (Α) Σχηματική αναπαράσταση ελεγχόμενου από το pH νανοκαναλιού/βιοαισθητήρα γλυκόζης που αναπτύχθηκε με έμπνευση από τα ελεγχόμενα μεμβρανικά κανάλια πρωτεϊνών, όπως το κανάλι της πρωτεΐνης GLIC. (Β) Το φύλλο λωτού, δεν συγκρατεί καθόλου νερό ή λίπη. Με βάση την νανοδομή της επιφάνειας του λωτού, σχεδιάστηκε η εμπορικά διαθέσιμη πλέον μπογιά Lotusan η οποία απωθεί βρωμιά και νερό και εμφανίζει εξαιρετική αντοχή σε καιρικές συνθήκες και υπεριώδη ακτινοβολία ακόμα και για δεκαετίες. (Γ) Η ταινία σχεδιάστηκε ώστε να μιμείται την επιφάνεια των άκρων του gecko κάθε χιλιοστό της οποίας περιέχει ~14000 ακίδες με αποτέλεσμα να δημιουργεί αθροιστικά τεράστιες έλξεις λόγω των van der Waals αλληλεπιδράσεων, οι οποίες επιτρέπουν στο gecko να νικά την δύναμη της βαρύτητας. (Δ) Το Ιαπωνικό τραίνο 500-Shinkansen είναι από τα πιο γρήγορα τραίνα στον κόσμο. Ο σχεδιασμός του βασίστηκε στο φτέρωμα της κουκουβάγιας για τη μείωση του θορύβου από την αντίσταση του αέρα, καθώς και στο ράμφος της αλκυόνας για την διάτρηση του αέρα.

## 1.1 Αμφίφιλα Μόρια

Ο όρος αμφίφιλο σημαίνει «φιλικό και στα δύο»<sup>14</sup> υποδηλώνοντας ταυτόχρονη χημική συγγένεια ενός μορίου προς ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο μόριο ή τμήμα μορίου. Έτσι παραδείγματος χάριν, ο όρος αυτός συχνά αναφέρεται στην ταυτόχρονη φιλικότητα ενός μορίου με το νερό και με κάποιο έλαιο. Πιο συγκεκριμένα, ο όρος υδρόφιλο περιγράφει την φιλική συμπεριφορά ενός μορίου ως προς το νερό και ο όρος υδρόφοβο (ή λιπόφιλο) την αποστροφή του μορίου για το νερό. Μόρια που παρουσιάζουν αμφίφιλο χαρακτήρα αποτελούνται από ένα υδρόφιλο μέρος και ένα υδρόφοβο μέρος (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση ενός αμφίφιλου μορίου.

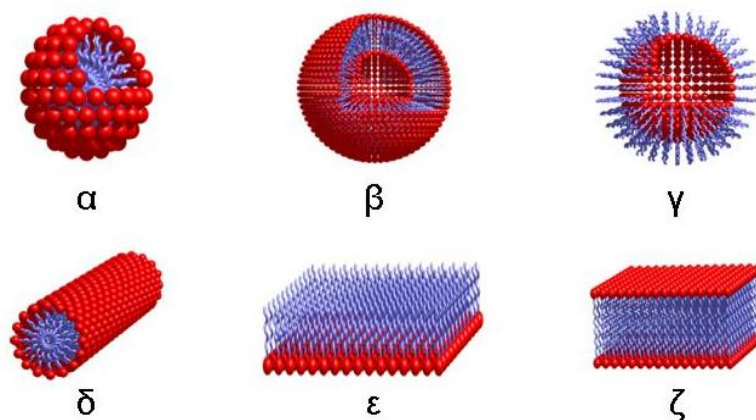
Το υδρόφιλο μέρος ενός αμφίφιλου μορίου είναι εύκολα διαλυτό στο νερό λόγω του ότι διαθέτει φορτισμένα άτομα ή πολικές ομάδες οι οποίες δημιουργούν ηλεκτροστατικούς δεσμούς ή δεσμούς υδρογόνου με τα πολικά μόρια του νερού. Αντίθετα, το υδρόφοβο μέρος είναι αδιάλυτο στο νερό λόγω του ότι η δομή του δεν περιέχει φορτία και δεν μπορεί να δημιουργήσει ισχυρά επαγόμενα φορτία ικανά να δημιουργήσουν διαμοριακούς δεσμούς με μόρια νερού. Αντίθετα, τα υδρόφοβα τμήματα αναγκάζουν τα γειτονικά μόρια του νερού να οργανωθούν ώστε να σχηματιστεί ένας κλωβός γύρω από αυτά και να ελαχιστοποιηθεί η ενέργεια αλληλεπίδρασης (φαινόμενο υδροφοβικότητας). Η τελική υπερμοριακή δομή που σχηματίζουν τα αμφιπαθή μόρια είναι συνολικό αποτέλεσμα των δύο φαινομένων προς την ελαχιστοποίηση της ενέργειας της δομής. Η ενέργεια αυτή ελαχιστοποιείται όταν τα υδρόφιλα μέρη βρίσκονται συναθροισμένα και σε άμεση επαφή με το νερό ενώ τα υδρόφοβα ομαδοποιούνται ώστε να μειώσουν σε οριακό επίπεδο την επαφή τους με τα μόρια του νερού.

Τα αμφίφιλα μόρια στη Φύση και τα πιο μελετημένα συνθετικά αμφίφιλα, έχουν μοριακά βάρη της τάξεως μερικών εκατοντάδων Da και καλούνται *μοριακά αμφίφιλα*. Με την ανάπτυξη των μεθόδων σύνθεσης πολυμερών τις τελευταίες δεκαετίες, δόθηκε η ευκαιρία στους επιστήμονες να μελετήσουν και *αμφίφιλα μακρομόρια* (*super amphiphiles*) τα οποία έχουν μοριακά βάρη 10 έως 1000 φορές μεγαλύτερα από αυτά των μοριακών αμφίφιλων. Τέτοια αμφίφιλα μόρια συχνά είναι συσταδικά συμπολυμερή, όπου συστάδες ενός είδους πολυμερούς συνδέονται με συστάδες ενός άλλου είδους πολυμερούς με απόλυτη συνέχεια. Το μοριακό βάρος παίζει σημαντικό ρόλο και σε αυτή την περίπτωση γιατί το μέγεθος υδρόφοβου/υδρόφιλου τμήματος, σε συνδυασμό με την χημική τους ταυτότητα, επηρεάζει άμεσα την διαμόρφωση της τελικής υπερμοριακής δομής που θα σχηματίσει. Μια σημαντική ιδιότητα αυτών των μορίων την οποία εκμεταλλεύονται οι επιστήμονες είναι η δυνατότητα αυθόρμητης ιεραρχικής αυτόοργάνωσης σε δομές ανάλογες με αυτές των μοριακών αμφίφιλων.<sup>15,16,17</sup> Τέτοιες δομές αποτελούν τα μικκύλια, κυστίδια, σωληνίσκοι, διεπιφάνειες και άλλες.

## 1.2 Αυτοδιάταξη / Αυτοοργάνωση

Ο όρος αυτοδιάταξη περιγράφει μία αυτόνομη διαδικασία κατά την οποία τα συστατικά στοιχεία ενός συστήματος οργανώνονται χωρίς την ανάγκη εξωτερικής παρέμβασης ώστε να δημιουργήσουν σύνθετες δομές. Οι διαδικασίες αυτοδιάταξης είναι κοινές σε Φύση, επιστήμη και τεχνολογία. Περιλαμβάνουν συστατικά από τη μοριακή έως την πλανητική κλίμακα και βασίζονται σε πολλά διαφορετικά είδη αλληλεπιδράσεων. Τέτοιες δομές είναι για παράδειγμα στη Φύση και οι κυτταρικές μεμβράνες και οι ιοί, ή σε μοριακό επίπεδο η τρισδιάστατη, λειτουργική δομή των πρωτεϊνών.

Η αυθόρμητη διαδικασία της αυτοδιάταξης προς δημιουργία υπερδομών των βιολογικών ή συνθετικών μορίων σε κάποιο μέσο προκαλείται από διάφορες διαμοριακές και ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως οι δεσμοί υδρογόνου, οι ιοντικές, οι π-π και οι van der Waals αλληλεπιδράσεις καθώς και το φαινόμενο υδροφοβικότητας. Σύνηθες κίνητρο που οδηγεί τα μόρια να αυτοδιαταχθούν είναι η ελαχιστοποίηση της ενέργειας Gibbs. Η μορφή και το μέγεθος των δομών που προκύπτουν είναι αποτέλεσμα της υδροφοβικής ελεύθερης ενέργειας ενώ τα συσσωματώματα που δημιουργούνται είναι αυτά που έχουν την ελάχιστη δυνατή επιφανειακή ενέργεια. Η ελεύθερη ενέργεια αυξάνεται από έναν αριθμό παραγόντων που έχουν παρόμοια ισχύ: μεταξύ αυτών είναι απωστικές δυνάμεις μεταξύ της κεφαλής και της ουράς (υδρογονανθρακική αλυσίδα) του μορίου που προκύπτουν από τη γεωμετρία του μορίου ενάντια στις ελκτικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων που ενισχύονται από τις μοριακές δυνάμεις ανάμεσα στα συσσωματώματα. Τέτοιες δομές αποτελούν τα σφαιρικά, κυλινδρικά (ίνες) και πεπλατυσμένα μικκύλια, τα κυστίδια με ένα ή πολλαπλά τοιχώματα (ή αλλιώς λιπосώματα), οι μικροράβδοι, οι μεμβρανικές επιφάνειες, οι ανεστραμμένες δομές και οι πεταλιώδεις (ή αλλιώς φυλλωτές) φάσεις (Σχήμα 3). Όπως είναι αναμενόμενο η αυτό-διάταξη στη φύση ακολουθεί πιο περίπλοκες διαδικασίες εξαιτίας της περιπλοκότητας των δομών και του περιβάλλοντός τους.



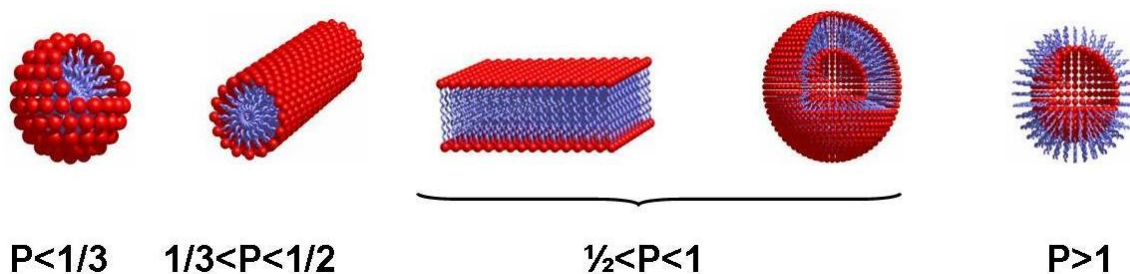
**Σχήμα 3.** Σχηματική αναπαράσταση συνήθων υπερμοριακών δομών που παρατηρούνται στη Φύση: (α) μικκύλιο, (β) κυστίδιο, (γ) ανεστραμμένο μικκύλιο, (δ) μικκυλιακή ράβδος, (ε) επιφάνεια, (στ) διεπιφάνεια .

Εκτενείς μελέτες<sup>5,6</sup> απέδειξαν ότι για αραιά διαλύματα μοριακών αμφίφιλων μορίων, η τελική υπερμοριακή δομή είναι αποτέλεσμα της καμπυλότητας που υπάρχει μεταξύ της υδρογονανθρακικής αλυσίδας και του νερού στη διεπαφή τους. Η δομή η οποία δημιουργείται καθορίζεται από έναν τασιενεργό παράγοντα πακεταρίσματος P:

$$P = \frac{V}{\alpha \cdot l},$$

όπου V είναι ο όγκος της αλυσίδας υδρογονανθράκων, l είναι το βέλτιστο μήκος του υδρόφοβου τμήματος (που προσεγγίζει το αναμενόμενο για πλήρως εκτεταμένες αλυσίδες) και α είναι η επιφάνεια της κεφαλής.

Δείχθηκε ότι για τα μοριακά αμφίφιλα μόρια ανάλογα με την τιμή της παραμέτρου P σχηματίζονται οι παρακάτω δομές:



**Σχήμα 4.** Σχέση της τιμής παραμέτρου πακεταρίσματος P και της δομής που προκύπτει: Από αριστερά σφαιρικό μικκύλιο για  $P < 1/3$ , ραβδόμορφο μικκύλιο για  $1/3 < P < 1/2$ , επίπεδη μεμβρανική επιφάνεια ή κυστίδιο για  $1/2 < P < 1$ , ανεστραμμένο σφαιρικό μικκύλιο για  $P > 1$ .

### 1.3 Αμφίφιλα Γραμμικά Δυσυσταδικά Συμπολυμερή

Τα συμπολυμερή έχουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες λόγω του ότι μπορούν να συνδυάσουν τις ιδιότητες των διαφορετικών τμημάτων που απαρτίζουν την πολυμερική τους αλυσίδα. Κατηγορίες συμπολυμερών αποτελούν τα *τυχαία συμπολυμερή*, τα *εναλλασσόμενα συμπολυμερή*, τα *ενοφθαλμισμένα* και τα *συσταδικά συμπολυμερή*. Εξαιτίας της δομής τους τα συσταδικά συμπολυμερή μπορούν και διατηρούν αρκετές ιδιότητες από αυτές των αντίστοιχων συστατικών ομοπολυμερών τους.

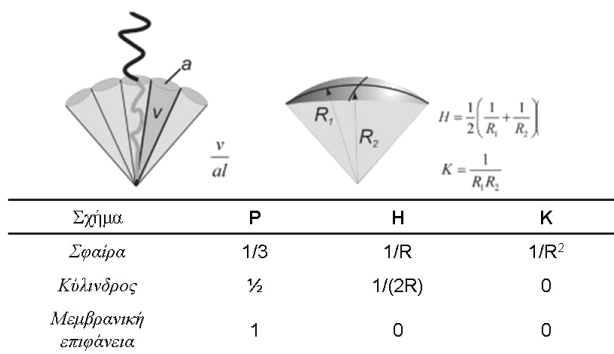
Ιδιαίτερη κατηγορία τέτοιων πολυμερών είναι τα *αμφίφιλα συσταδικά συμπολυμερή* (μακρομοριακά αμφίφιλα) τα οποία διαθέτουν μία υδρόφιλη και μία υδρόφοβη συστάδα. Έχειδειχθεί ότι τα μεγαλομόρια αυτά αυτοδιατάσσονται με τρόπο παρόμοιο με αυτόν των μοριακών αμφίφιλων μορίων.<sup>18</sup> Μία σημαντική διαφορά εντοπίζεται στα αμφίφιλα συσταδικά συμπολυμερή και αφορά την κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλιοποίησης (CMC) η οποία είναι συνήθως είναι αρκετά μικρότερη αφού η κίνηση μίας πολυμερικής αλυσίδας είναι πολύ μικρότερη λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους, της πιθανότητας εναγκαλισμών της αλυσίδας και της χαμηλής κινητικότητας της

αλυσίδας κοντά στον πυρήνα. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα που οφείλεται στις παραπάνω ιδιότητες είναι οι υπερδομές που προκύπτουν από την αυτο-διάταξη των αμφίφιλων συσταδικών συμπολυμερών είναι πιο ανθεκτικές και σταθερές σε υδατικά διαλύματα σε σχέση με τις δομές που προκύπτουν από μόρια με μικρό μοριακό βάρος.<sup>19</sup> Το χαρακτηριστικό αυτό τα καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικά για εφαρμογές.

Η μορφολογία των υπερμοριακών δομών που δημιουργούν τα αμφίφιλα δυσυσταδικά συμπολυμερή μπορεί να προβλεφθεί από ένα νεότερο μοντέλο σύμφωνα με το οποίο:

$$P = \frac{V}{l \cdot a} = 1 - H \cdot l + \frac{K \cdot l^2}{3}$$

όπου V είναι ο όγκος του υδρόφοβου τμήματος του αμφίφιλου μορίου, a είναι η επιφανειακή τάση, l το μήκος της υδρόφοβης αλυσίδας, H είναι η μέση καμπυλότητα και K η γκαουσιανή καμπυλότητα στη διεπιφάνεια υδρόφιλου-υδρόφοβου μέρους (Σχήμα 5).<sup>20,21,22,23</sup>



**Σχήμα 5.** Περιγραφή του σχήματος του αμφίφιλου μορίου σε σχέση με την παράμετρο P και συσχέτιση με την μέση καμπυλότητα (H) και την Γκαουσιανή καμπυλότητα (K).

## 1.4 Γιγάντια Αμφίφιλα Μόρια

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία σχετικά νέα υποκατηγορία αμφίφιλων μορίων τα *Γιγάντια Αμφίφιλα Μόρια* τα οποία αποτελούνται από μία υδρόφοβη, συνθετική πολυμερική αλυσίδα και από μία υδρόφιλη κεφαλή, το ρόλο της οποίας παίζει μία πρωτεΐνη ή ένζυμο.<sup>9,10,24,25,26,27</sup> Τα αμφίφιλα αυτά βιοϋβρίδια έχουν μοριακά βάρη και μοριακά μεγέθη σημαντικά μεγαλύτερα από αυτά των μοριακών αμφίφιλων μορίων και των συσταδικών συμπολυμερών. Το ενδιαφέρον για την δημιουργία και την μελέτη τέτοιων βιομακρομορίων έγκειται στο γεγονός ότι παρέχουν τη δυνατότητα συνδυασμού των ιδιοτήτων του βιολογικού τμήματος με αυτές του συνθετικού τμήματος.<sup>28</sup> Η Φύση συνθέτει τις πρωτεΐνες με ιδιαίτερη ακρίβεια ως προς την δομή και λειτουργία και επομένως το βιολογικό κομμάτι των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* έχει το εγγενές πλεονέκτημα της μονοδιασποράς σε αντίθεση με το συνθετικό πολυμερές το οποίο μπορεί συχνά να εμφανίζει σημαντική πολυδιασπορά. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες εφόσον διατηρήσουν την δομή και λειτουργικότητά τους και στα παραγόμενα βιοϋβρίδια, αναμένεται να τους προσδώσουν ιδιότητες όπως καταλυτική ενεργότητα και εξειδίκευση, αναγνώριση

υποδοχέων, επεξεργασία πληροφοριών ή/και απόκριση. Ωστόσο, η βιολογική συστάδα των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μπορεί επίσης να εισαγάγει και μειονεκτήματα ή περιορισμούς στα βιοϋβρίδια. Έτσι για παράδειγμα, κάποιες πρωτεΐνες μπορούν να προκαλέσουν αρνητικές αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος, υπόκεινται εύκολα σε χημική ή ενζυμική αποδόμηση, εμφανίζουν περιορισμένη διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες και μικρή σταθερότητα σε μεταβολές του pH ή της θερμοκρασίας. Ένα συνθετικό, πολυμερικό τμήμα θα μπορούσε να προσδώσει στο βιοσυζυγές πρωτεΐνης-πολυμερούς τα χημικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του, προσφέροντας έτσι την προοπτική της μείωσης των ανεπιθύμητων βιολογικών αποκρίσεων και της ενίσχυσης της σταθερότητας, βιοκατανομής και διαλυτότητας των πρωτεϊνών για την δημιουργία λειτουργικών βιοϋλικών. Επιπλέον, η ραγδαία εξέλιξη του τομέα της σύνθεσης πολυμερών επιτρέπει πλέον τον πολυμερισμό ενός μεγάλου εύρους (ως προς την δομή) μονομερών δημιουργώντας πολυμερή με χαμηλό δείκτη πολυδιασποράς, και καθορισμένες δομές οι οποίες φέρουν διαφορετικές λειτουργικές ομάδες ή τελικές ομάδες.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει μελετηθεί μια πληθώρα βιοσυζυγών πολυμερούς-πρωτεΐνης αποτελούμενων από μία πρωτεΐνη συνδεδεμένη με ένα ή περισσότερα υδρόφιλα πολυμερή. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μάλιστα βρει ήδη σημαντική εφαρμογή στην βιοϊατρική, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την PEG-Intron για την καταπολέμηση της ηπατιτίδας.<sup>29</sup> Τα *Γιγάντια Αμφίφιλα Μόρια* που αποτελούν επίκεντρο αυτής της εργασίας, έχουν σαν ιδιαίτερο χαρακτηριστικό την προκαθορισμένη αναλογία βιολογικού τμήματος (ένζυμο, πρωτεΐνη)/πολυμερούς και το καλά καθορισμένο σημείο σύνδεσης του πολυμερούς στην πρωτεϊνική δομή. Παράλληλα, χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη του υδρόφοβου πολυμερικού τμήματος που είναι υπεύθυνο για τον ενδογενή αμφίφιλο χαρακτήρα τους και επομένως την αυθόρμητη αυτοδιάταξή τους. Αυτά τα βιομακρομόρια πλεονεκτούν σε σχέση με τα μοριακά και τα πολυμερικά αμφίφιλα μόρια στην ύπαρξη του λειτουργικού βιολογικού τμήματος που αναμένεται να εκφράζει τις ιδιότητές του (όπως κατάλυση, αναγνώριση και μεταφορά).

## 1.5 Μέθοδοι Σύνθεσης των *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων*

Την τελευταία δεκαετία αναπτύχθηκαν διαφορετικές μέθοδοι για την σύνθεση των *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων*.<sup>9,10,24,25,26,27,30,31,32</sup> Οι μέθοδοι αυτές βασίστηκαν κυρίως σε αντιδράσεις εκλεκτικής σύζευξης των πολυμερών με μοναδικά αντίτυπα αμινοξέων της πρωτεϊνικής δομής καθώς και στις σύγχρονες εξελίξεις στην χημεία πολυμερών και περιγράφονται συνοπτικά στα επόμενα:<sup>30,31</sup>

**A. Απευθείας σύζευξη μίας πολυμερικής αλυσίδας με το ένζυμο ή την πρωτεΐνη.**<sup>24</sup> Η μέθοδος αυτή προϋποθέτει προηγούμενη σύνθεση πολυμερούς που φέρει στο ένα άκρο του μία λειτουργική ομάδα επιλεγμένη κατάλληλα για να αντιδράσει με -μοναδική- λειτουργική ομάδα στην επιφάνεια της πρωτεΐνης ή του ενζύμου.<sup>30,31</sup> Η εκλεκτική αντίδραση των δύο τμημάτων οδηγεί στην δημιουργία των *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων*. Η μέθοδος αυτή αποτέλεσε την πρώτη επιτυχή προσέγγιση για τη σύνθεση *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων*, χαρακτηρίζεται όμως από ιδιαίτερα χαμηλές αποδόσεις

εξαιτίας της ασυμβατότητας στην διαλυτότητα των δύο συστατικών μακρομορίων. Η αντίδραση βιοσύζευξης προϋποθέτει επομένως την εύρεση συστήματος διαλυτών καλών και για τα δύο μακρομόρια που παράλληλα δεν επηρεάζουν την λειτουργική δομή της πρωτεΐνης. Επιπλέον, προβλήματα παρουσιάζονται και κατά την απομόνωση του προϊόντος εξαιτίας του αμφίφιλου χαρακτήρα του.

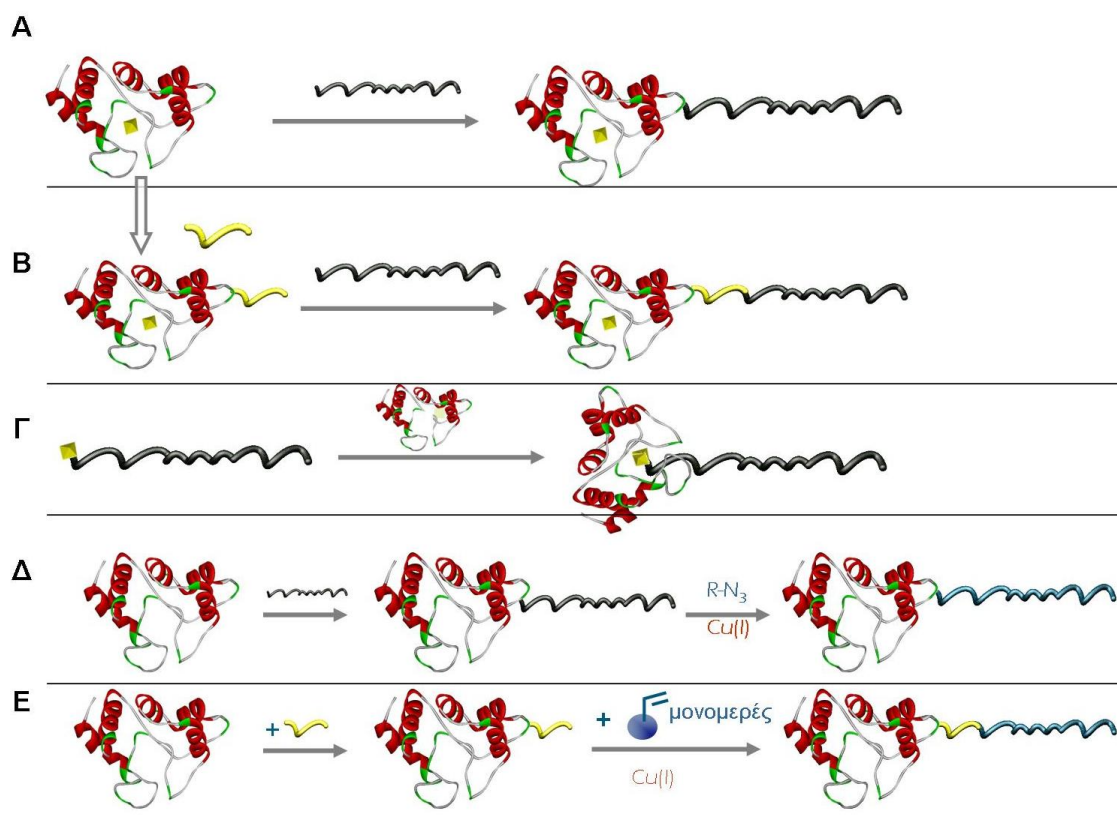
**Β. Σύνθεση Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων σε δύο στάδια - λειτουργικοποίηση πρωτεΐνης.**<sup>33</sup> Κατά το πρώτο στάδιο, ένα διλειτουργικό μόριο-συνδέτης αντιδρά με μοναδικό αντίτυπο αμινοξέος της πρωτεϊνικής δομής προς τον σχηματισμό ενός υδρόφιλου, ενεργοποιημένου βιοϋβριδίου. Το μόριο-συνδέτης σχεδιάζεται έτσι ώστε το ένα άκρο του να φέρει λειτουργική ομάδα η οποία αντιδρά εκλεκτικά με την πρωτεΐνη, ενώ στο άλλο άκρο φέρει λειτουργική ομάδα που αντιδρά εκλεκτικά με κατάλληλα λειτουργικοποιημένο πολυμερές. Η αρχική εκλεκτική πρόσδεση του συνδέτη με την πρωτεΐνη, δημιουργεί ένα ενεργοποιημένο βιοϋβρίδιο το οποίο απομονώνεται εύκολα και στη συνέχεια αντιδρά εκλεκτικά με το πολυμερές. Η αντίδραση αυτή παρουσιάζει μεγαλύτερες αποδόσεις από την πρώτη προσέγγιση, συνοδεύεται όμως από προβλήματα απομόνωσης του τελικού προϊόντος.

**Γ. Μέθοδος αναδιάταξης ενζύμου** - εφαρμόζεται σε ένζυμα που φέρουν συμπαράγοντα.<sup>25,26,27</sup> Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την δημιουργία μίας *αποπρωτεΐνης* η οποία επιτυγχάνεται με απομάκρυνση του συμπαράγοντα από την πρωτεϊνική δομή. Ακολουθεί ομοιοπολική σύζευξη του συμπαράγοντα με κατάλληλα λειτουργικοποιημένη τελική ομάδα πολυμερικής αλυσίδας και ανασύσταση του αποενζύμου γύρω από την λειτουργικοποιημένη με τον συμπαράγοντα πολυμερική αλυσίδα προς τον σχηματισμό του *Γιγάντιου Αμφίφιλου Μορίου*.

**Δ. Σύνθεση ενός υδρόφιλου βιοπολυμερούς που ακολουθείται από αντίδραση παραγοντοποίησης του πολυμερούς και δημιουργία υδρόφοβου χαρακτήρα (*post-functionalization approach*).**<sup>9</sup> Σε αυτή τη μέθοδο απαιτείται προηγούμενη σύνθεση κατάλληλα σχεδιασμένου πολυμερούς. Έτσι για παράδειγμα, στην σύνθεση *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μορίων με την βοήθεια αυτής της μεθόδου, συντέθηκε πολυμερές το οποίο έφερε πολλαπλές ομάδες αλκινίου-1 ενοφθαλμισμένες κατά μήκος της ανθρακικής αλυσίδας και λειτουργικό άκρο μαλεϊμιδίου για εκλεκτική αντίδραση με κυστεΐνες πρωτεϊνών.<sup>9</sup> Σε αυτή την προσέγγιση, η αντίδραση βιοσύζευξης του πολυμερούς με την πρωτεΐνη διεξάγεται σε υδατικό διάλυμα, έχει ποσοτική απόδοση και επιπλέον το παραγόμενο βιοϋβρίδιο απομονώνεται εύκολα με ένα απλό στάδιο διαπίδυσης. Για τη δημιουργία των υδρόφοβων βιοπολυμερών απαιτείται εισαγωγή υδρόφοβου χαρακτήρα στην πολυμερική αλυσίδα η οποία επιτεύχθηκε στην πρώτη βιβλιογραφική αναφορά με πολλαπλή αντίδραση [3+2] Huisgen κυκλοπροσθήκης<sup>34,35,36</sup> του βιοπολυμερούς με οργανικά αζίδια. Τα παραγόμενα *Γιγάντια Αμφίφιλα* απομονώνονται εύκολα με διαπίδυση. Μοναδικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι προϋποθέτει την σύνθεση κατάλληλου, υψηλά λειτουργικοποιημένου, πολυμερούς.

**Ε. Ανάπτυξη πολυμερικών αλυσίδων από μόρια βιοεκκινητών (*grafting from*).**<sup>10,11</sup> Η προσέγγιση αυτή αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο για την σύνθεση *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μορίων. Ο σχεδιασμός της βασίστηκε στην απόδειξη από την ομάδα της Η.

Maynard<sup>37</sup>, και στην συνέχεια άλλες ερευνητικές ομάδες,<sup>38</sup> ότι ο ATRP πολυμερισμός (Atom Transfer Radical Polymerization) υδρόφιλων μονομερών από ένα βιοεκκινητή μπορεί να οδηγήσει στην επιτυχή σύνθεση υδρόφιλων βιοϋβριδίων σε υδατικά διαλύματα. Για την σύνθεση των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* αρχικά δημιουργείται ένα μακρομόριο βιοεκκινητή που αποτελείται από μια πρωτεΐνη ομοιοπολικά και εκλεκτικά συνδεδεμένη με έναν εκκινητή ATRP πολυμερισμού. Η συγκεκριμένη αντίδραση είναι ποσοτική, το προϊόν της αντίδρασης απομονώνεται εύκολα και μπορεί να αποθηκευτεί μετά από λυοφιλοποίηση για μεγάλα διαστήματα σε χαμηλή θερμοκρασία χωρίς να χάσει τις ιδιότητές του. Ακολουθεί η ATRP αντίδραση πολυμερισμού βινυλικών μονομερών κατά την οποία σχηματίζονται ποσοτικά και με ιδιαίτερα χαμηλό δείκτη πολυδιασποράς τα *Γιγάντια Αμφίφιλα* μόρια.<sup>10,11</sup> Μοναδική προϋπόθεση για την επιτυχία της αντίδρασης είναι η απουσία οξυγόνου, ο πολυμερισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία ή απουσία οργανικού συνδιαλύτη, ενώ για την απομόνωση των προϊόντων απαιτείται ένα απλό στάδιο διαπίδυσης. Αποδείχθηκε ότι η μέθοδος αυτή έχει ευρύ φάσμα εφαρμογής, αφού χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία τόσο με διαφορετικές πρωτεΐνες όσο και με διαφορετικά βινυλικά μονομερή. Αξίζει να τονιστεί ότι πρόκειται για τη μοναδική μέθοδο σύνθεσης *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μορίων η οποία επιτρέπει τον εγκλεισμό άλλων πρωτεϊνών ή μορίων μέσα στις σχηματιζόμενες νανοδομές για την δημιουργία νανοαντιδραστήρων ή νανομεταφορέων.



**Σχήμα 6.** Σχηματική περιγραφή των διαφορετικών συνθετικών προσεγγίσεων που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία για τον σχηματισμό *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων*.



## 1.6 Ενζυμική Κατάλυση

Τα ένζυμα είναι βιολογικά μακρομόρια τα οποία καταλύουν πληθώρα χημικών αντιδράσεων. Χρησιμοποιούνται ευρέως σαν καταλύτες και στην οργανική σύνθεση λόγω των πλεονεκτημάτων και των ιδιοτήτων που τα χαρακτηρίζουν. Περιληπτικά, τα ένζυμα<sup>39</sup> είναι:

- *αποτελεσματικοί καταλύτες*

Οι αντιδράσεις που καταλύουν είναι γρηγορότερες κατά έναν παράγοντα της τάξης  $10^8$ - $10^9$  ενώ σε μερικές περιπτώσεις φτάνουν να είναι  $10^{12}$  φορές γρηγορότερες από τους χημικούς καταλύτες. Συνήθως ένα ποσοστό (mole fraction) της τάξης του 0.1-1% είναι ικανό να πραγματοποιήσει κατάλυση γεγονός που καθιστά τα ένζυμα ιδιαίτερα χρήσιμους καταλύτες.

- *εξαιρετικά εξειδικευμένα ως προς το είδος την αντίδρασης που καταλύουν και ως προς τη δομή και στεροχημεία των υποστρωμάτων και προϊόντων*
- *αποδεκτά από το περιβάλλον*

Σε αντίθεση με τα βαρέα μέταλλα οι βιοκαταλύτες είναι αβλαβείς για το περιβάλλον και πλήρως αποικοδομήσιμοι.

- *αποτελεσματικά κάτω από ήπιες συνθήκες*

Στην γενική περίπτωση δρουν σε εύρος pH 5-8, τυπικά γύρω στο pH 7 και σε εύρος θερμοκρασιών 20-40°C, με βέλτιστη θερμοκρασία γύρω στους 30°C.

- *ικανά να συνεργαστούν για κατάλυση αλυσιδωτών αντιδράσεων*

Σε περίπτωση που τα ένζυμα είναι δραστικά και δρουν σε ίδιες ή παρόμοιες συνθήκες, διαφορετικές βιοκαταλυόμενες αντιδράσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονα ή στη σειρά (cascade) όπως ακριβώς συμβαίνει και στη Φύση

- *καταλυτικά ενεργά και για υποστρώματα διαφορετικά από τα φυσικά.*

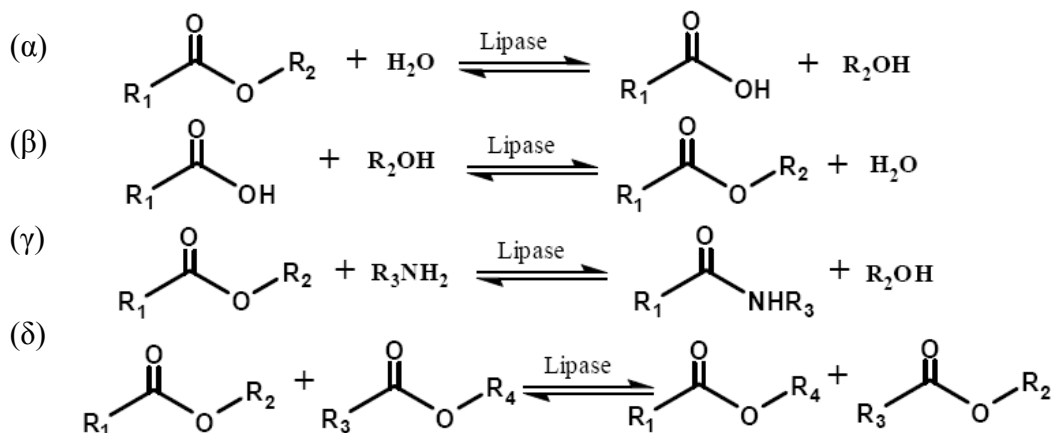
Έχει αποδειχθεί ότι πολλά ένζυμα επιδεικνύουν μεγάλη ανθεκτικότητα ως προς το εύρος των υποστρωμάτων αντιδράσεις των οποίων καταλύουν και συχνά καταλύουν διαφορετικούς τύπους αντιδράσεων καθώς και αντιδράσεις σε οργανικούς διαλύτες, ιοντικά υγρά ακόμα και supercritical CO<sub>2</sub> όταν χρησιμοποιηθούν κατάλληλα στο εργαστήριο.

### 1.6.1 Λιπάσες

Οι λιπάσες είναι ένζυμα τα οποία στη Φύση καταλύουν τη δημιουργία ή την αποικοδόμηση αδιάλυτων στο νερό εστέρων των λιπαρών οξέων (λιπιδίων). Αποτελούν υποκατηγορία των εστερασών, ρόλος των οποίων είναι η διάσπαση των εστέρων σε ένα οξύ και μία αλκοόλη μέσω υδρόλυσης. Οι λιπάσες δρουν σε υδατικό περιβάλλον στα έμβια συστήματα, αλλά όπως έχει αποδειχθεί, αρκετές είναι σταθερές και λειτουργικές σε οργανικούς διαλύτες και μπορούν να καταλύσουν αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης.<sup>40,41,42,43,44,45,46</sup>

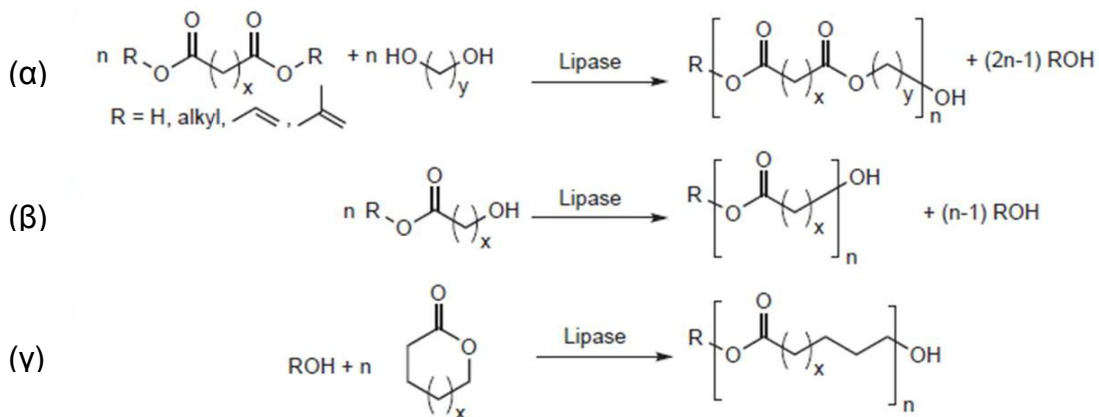
Τα πλεονεκτήματα των λιπασών είναι πολλά. Έχουν απομονωθεί από διαφορετικούς οργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, ζώα και άλλα), κάποιες είναι σταθερές

σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και εύρος οργανικών διαλυτών ή/και είναι συμβατές με ένα μεγάλο εύρος φυσικών είτε συνθετικών υποστρωμάτων διατηρώντας την εκλεκτικότητά τους. Σημαντικό πλεονέκτημά τους είναι ότι καταλύουν μεγάλο εύρος αντιδράσεων όπως η υδρόλυση εστέρων, η εστεροποίηση, εσωτερική εστεροποίηση, ο πολυμερισμός και η αντίδραση αμιδίωσης (Σχήμα 7).<sup>47</sup>



**Σχήμα 7.** Σύνθεστοι τύποι ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων, (α) υδρόλυση εστέρα, (β) εστεροποίηση, (γ) αμιδίωση και (δ) μετεστεροποίηση.

Για την συγκεκριμένη εργασία το ενδιαφέρον μας κέντρισαν οι καταλυόμενες από λιπάσες αντιδράσεις πολυμερισμού (Σχήμα 8) κατά τις οποίες δημιουργούνται πολυεστέρες. Μείζονος σημασίας χαρακτηριστικό των πολυεστέρων είναι η βιοσυμβατότητα και η ικανότητα βιοδιάσπασης και για το λόγο αυτό παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε τομείς όπως η φαρμακολογία και οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές της νανοτεχνολογίας.



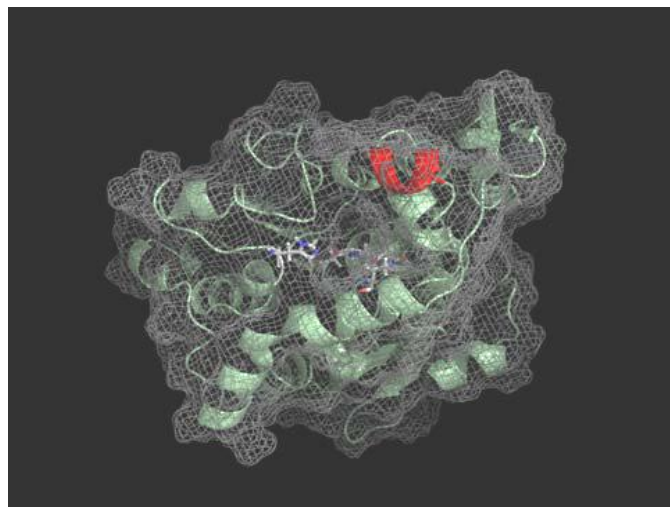
**Σχήμα 8.** Σύνθεστοι τύποι καταλυόμενων από λιπάσες αντιδράσεων πολυμερισμού, (α) αντίδραση πολυεστεροποίησης, (β) αντίδραση πολυσυμπύκνωσης, (γ) αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου.

Ιδιαίτερα όσον αφορά στις αντιδράσεις διάνοιξης δακτυλίου (ROP, Σχήμα 8γ), έχει αναφερθεί επιτυχής κατάλυση από διαφορετικές λιπάσες. Πρέπει να θεωρηθεί ότι η κάθε μία από αυτές έχει το δικό της μηχανισμό. Σε αυτή την εργασία επιλέχθηκε να μελετηθεί η καταλυόμενη από λιπάση Β από *Candida antarctica* (CALB) αντίδραση. Η πιο διαδεδομένη μορφή της CALB είναι αυτή στην οποία βρίσκεται ακινητοποιημένη σε Lewatit (Novozym® 435), λόγω της ασυνήθιστης δραστηριότητας που επιδεικνύει σε υποστρώματα λακτονών και της ικανότητάς της να καταλύει αντιδράσεις με υψηλό βαθμό τοποεκλεκτικότητας κατά το στάδιο της εκκίνησης του πολυμερισμού. Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι η CALB καταλύει σε υδατικό διάλυμα και την αντίστροφη διαδικασία, την υδρόλυση/αποικοδόμησή των πολυεστέρων. Η διαδικασία της αποικοδόμησης έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό.<sup>48,49</sup>

### 1.6.1.1 *Candida Antarctica* Lipase B, (CALB)

Η λιπάση Β από *Candida antarctica* (CALB) είναι ένα ευέλικτο ένζυμο για εναντιο- και τοποεκλεκτικό μετασχηματισμό υποστρωμάτων με μικρή μοριακή μάζα καθώς και πολυμερισμών και έχει βρεθεί ότι διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα καταλυτικής δραστηριότητας στη χημική σύνθεση.<sup>50,51,52,53,54</sup> Η CALB έχει επιπλέον τα παρακάτω πλεονεκτήματα: (i) σταθερότητα σε όξινο εύρος pH, (ii) υψηλή καθαρότητα του τελικού προϊόντος, (iii) λιγότερα παραπροϊόντα σε σχέση με άλλες λιπάσες και (iv) δυνατότητα διεξαγωγής χημικών αντιδράσεων σε υψηλές θερμοκρασίες.

Η δομή του ενζύμου CALB έχει λυθεί από την ομάδα του Uppenberg<sup>55</sup> το 1994. Η CALB αποτελείται από 317 κατάλοιπα αμινοξέων με μοριακό βάρος of 33.273 Da. Είναι μία σφαιρική πρωτεΐνη α/β τύπου με διαστάσεις, κατά προσέγγιση, 30Å×40Å×50Å, όπως υπολογίστηκε με τη βοήθεια κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X (Σχήμα 9).



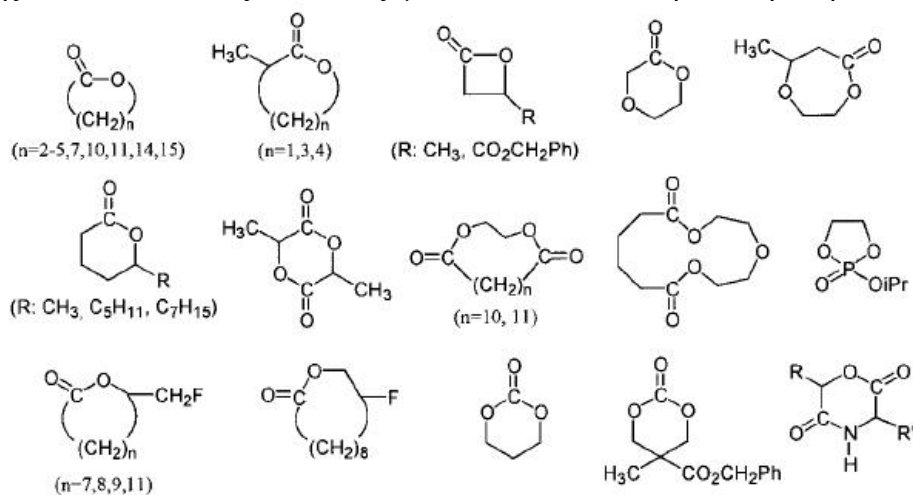
Σχήμα 9. Τριτοταγής δομή του ενζύμου CALB και της επιφάνειάς του.

Η αλληλουχία των αμινοξέων δεν δείχνει σημαντική ομολογία με αλληλουχίες άλλων λιπασών και αποκλίνει στην αλληλουχία γύρω από τη σερίνη που βρίσκεται στην ενεργή περιοχή, σε σχέση με τις άλλες λιπάσες. Από τις δομές που αποδείχθηκαν για άλλες λιπάσες, η CALB είναι πολύ πιθανό να περιέχει την αλληλουχία αμινοξέων Ser-His-Asp/Glu ως καταλυτική τριάδα (ενεργό κέντρο τονίζεται στο Σχήμα 9). Στη δομή της CALB, η ενεργή περιοχή είναι προσβάσιμη σε διαλύτη εξωτερικά, μέσω ενός στενού καναλιού. Είναι περίπου  $10\text{\AA}\times 4\text{\AA}$  στο πλάτος και  $12\text{\AA}$  βάθος. Τα τοιχώματα του καναλιού έχουν ιδιαίτερα αυξημένη υδροφοβικότητα αφού περιέχουν κυρίως αλειφατικά κατάλοιπα. Το συγκεκριμένο ένζυμο δεν διαθέτει κάποιας μορφής κάλυμμα/σκέπασμα (lid) και επομένως δεν μπορεί να ελέγξει την είσοδο στην ενεργή περιοχή όπως άλλες λιπάσες. Η CALB έχει μία μεγάλη υδρόφοβη επιφάνεια η οποία περιβάλλει την είσοδο του διαύλου που οδηγεί στην ενεργή περιοχή και είναι πιθανό η επιφάνεια αυτή να βρίσκεται σε στενή επαφή με την επιφάνεια του λιπιδίου κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Ιδιαίτερα σταθερή και διαδεδομένη είναι η ακινητοποιημένη μορφή της CALB ή οποία διατίθενται στο εμπόριο με την ονομασία Novozym® 435 (όταν έχει ακινητοποιηθεί σε ακρυλικό υπόστρωμα).

### 1.6.2 Ενζυματικός Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου

Η πρώτη αναφορά για την πραγματοποίηση καταλυόμενου από ένζυμο πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (Ring Opening Polymerization, ROP) ήταν το 1993,<sup>56,57</sup> με υπόστρωμα την  $\epsilon$ -caprolactone και καταλύτη μία λιπάση. Ακολούθησαν μελέτες που απέδειξαν ότι οι λιπάσες μπορούν να καταλύσουν αποτελεσματικά τον πολυμερισμό μίας πληθώρας λακτονών (μερικές εκ των οποίων φαίνονται στο Σχήμα 10) που διαφέρουν σημαντικά ως προς τη δομή, οδηγώντας στους αντίστοιχους πολυεστέρες.

Οι S.Kobayashi, H. Uyama και S. Kimura μελέτησαν εκτενώς των πολυμερισμό μεγάλου αριθμού κυκλικών εστέρων, την κινητική της αντίδρασης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου καθώς και τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση.<sup>58</sup>

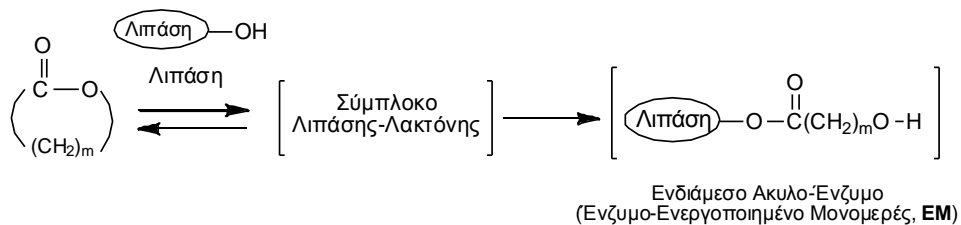


Σχήμα 10. Κυκλικά μονομερή που πολυμερίζονται από λιπάσες.

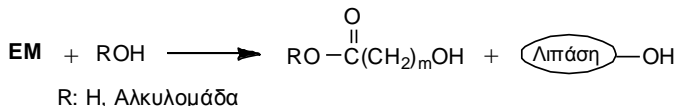
Όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια, στην συγκεκριμένη εργασία επιλέχθηκε η μελέτη του καταλυόμενου από CALB πολυμερισμού διάνοιξης του δακτυλίου της ε-καπρολακτόνης (ε-CL). Για τον συγκεκριμένο ενζυματικό πολυμερισμό διάνοιξης έχουν μελετηθεί διάφορες εμπορικά διαθέσιμες λιπάσες (όπως η CALB) καθώς και παρασκευάσματα λιπασών όπως η *Porcine pancreatic lipase* (PPL), *Candida rugosa lipase* (CRL), *Pseudomonas cepasia* (PCL) και η *Pseudomonas fluorescens* (PFL).<sup>58,59,60</sup> Αποδείχθηκε ότι μη απομονωμένες λιπάσες απαιτούν μεγάλες ποσότητες ενζύμου (40% wt για την ε-caprolactone) για την πραγματοποίηση του πολυμερισμού, ενώ η CALB απαιτείται σε κλάσμα 1% wt για τον αποτελεσματικό πολυμερισμό της ε-καπρολακτόνης.

Εκτός από το μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων και την ποικιλία των λιπασών έχει μελετηθεί η επίδραση του διαλύτη στην ενζυματικά καταλυόμενη ROP. Σημαντική επίδραση στον πολυμερισμό έχει η υδροφοβικότητα του διαλύτη. Ανάμεσα στην πλειάδα διαλυτών που μελετήθηκαν καταλληλότερος διαλύτης για τον πολυμερισμό της ε-καπρολακτόνης αποδείχτηκε το τολουόλιο για το οποίο αναφέρεται στην βιβλιογραφία σχηματισμός (πολυ)καπρολακτόνης μεγάλου μοριακού βάρους. Η βέλτιστη αναλογία για τον σχηματισμό πολυστερά μεγάλου μοριακού βάρους τολουολίου/ε-καπρολακτόνης αναφέρθηκε να είναι 2:1 σε θερμοκρασία 70°C. Ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται και η επιτυχία στην ανακύκλωση του παρασκευάσματος της CALB, η οποία παραμένει λειτουργική για πέντε κύκλους πολυμερισμού.<sup>61</sup>

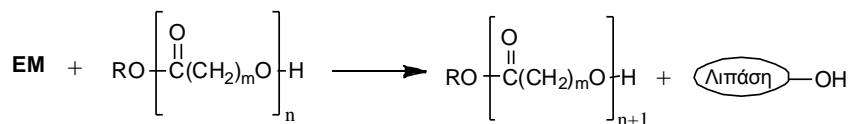
Είναι γνωστό ότι η καταλυτική δράση της λιπάσης βασίζεται στη δράση ενός καταλοΐπου σερίνης και η έναρξη/διάδοση του πολυμερισμού γίνεται μέσω του ενδιάμεσου άκυλο-ενζύμου. Ο ενζυματικός πολυμερισμός των λακτονών περιγράφεται από τις παρακάτω αντιδράσεις (Σχήμα 11).<sup>62,63,64</sup>



Στάδιο Έναρξης Πολυμερισμού



Στάδιο Διάδοσης Πολυμερισμού



**Σχήμα 11.** Αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την διεξαγωγή του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου καταλυόμενου από λιπάσες.

Το στάδιο «κλειδί» για τον πολυμερισμό είναι η αντίδραση της λακτόνης με τη λιπάση που οδηγεί στον σχηματισμό του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου, δηλαδή του ακυλο-ενζύμου (enzyme-activated monomer, EM). Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα στο στάδιο της έναρξης του πολυμερισμού είναι μία πυρηνόφιλη προσβολή του ακυλο-ενζύμου από το νερό (ή άλλη ένωση που διαθέτει μία υδροξυλομάδα), για την δημιουργία του ω-υδρόξυ-καρβοκυλικού παραγώγου ( $n=1$ ). Στο στάδιο της διάδοσης, η τελική υδροξυλομάδα της αναπτυσσόμενης πολυμερικής αλυσίδας κάνει πυρηνόφιλη προσβολή του EM για το σχηματισμό μίας αυξημένης κατά μία δομική μονάδα πολυμερικής αλυσίδας. Στις κυκλικές ενώσεις, η δραστηριότητα εξαρτάται από το μέγεθος του δακτυλίου. Οι τάσεις δεσμών στους δακτυλίους μικρού και μεσαίου μεγέθους είναι μεγαλύτερη από αυτή στους μεγάλους με αποτέλεσμα η διάνοιξη του δακτυλίου να γίνεται πιο εύκολα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 11, εκκινητής για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου είναι η υδροξυλομάδα.<sup>65</sup>

### 1.6.3 Ιδιότητες της ε-καπρολακτόνης και της (πολυ)καπρολακτόνης

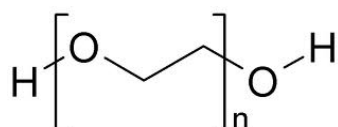
Το μονομερές που επιλέξαμε να μελετήσουμε είναι η ε-καπρολακτόνη, η οποία είναι ένας επταμελής κυκλικός εστέρας, μέλος της οικογένειας των λακτονών. Είναι διάφανο υγρό σε θερμοκρασία δωματίου και διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Ο λόγος που επιλέχθηκε είναι η δυνατότητα δημιουργίας (πολυ)καπρολακτόνης, η οποία έχει πολύ ενδιαφέρουσες ιδιότητες.

Η (πολυ)καπρολακτόνη, PLC, είναι ένας αλειφατικός πολυεστέρας που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έχει μελετηθεί εντατικά για βιοεφαρμογές.<sup>66,67,68,69,70,71</sup> Το πολυμερές αυτό έχει χαμηλό σημείο τήξης ( $57^{\circ}\text{C}$ , MW 2 kDa) και χαμηλό σημείο υαλώδους μετάβασης ( $-62^{\circ}\text{C}$ ), είναι επομένως στερεό σε θερμοκρασία δωματίου. Το κύριο και πιο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της (πολυ)καπρολακτόνης είναι η βιοσυμβατότητά της και η δυνατότητα αποικοδόμησής της.

Η (πολυ)καπρολακτόνη μπορεί να αποικοδομηθεί από μικροοργανισμούς στη Φύση και με υδρολυτικούς μηχανισμούς όξινης ή βασικής κατάλυσης σε ήπιες συνθήκες στο εργαστήριο,<sup>72</sup> μια αντίδραση που μπορεί να επιταχυνθεί σημαντικά και από ένζυμα.<sup>73,74</sup> Η PLC επιδεικνύει σημαντικά μικρότερο ρυθμό αποικοδόμησης σε σχέση με άλλα βιοαποικοδομήσιμα υλικά, γεγονός που την καθιστά κατάλληλο υλικό για το σχεδιασμό εμφυτευμάτων με μακρά παραμονή στον οργανισμό, όπως ο η συσκευή Capronor.<sup>66</sup> Η τοξικότητα της PLC έχει μελετηθεί εκτενώς, ως μέρος του Capronor, και θεωρείται μη τοξική και συμβατή με τους ιστούς από τον FDA (Food and Drug Administration). Επιπρόσθετα, τμήματα (πολυ)καπρολακτόνης μικρού μοριακού βάρους μπορούν να απορροφηθούν από τα μακροφάγα με ενδοκύττωση.<sup>75</sup> Ανάμεσα στους βιοαποικοδομήσιμους αλειφατικούς (πολυ)εστέρες, η (πολυ)καπρολακτόνη έχει χρησιμοποιηθεί πιο πολύ λόγω της μεγάλης της μηχανικής συμβατότητας με πολλά πολυμερή<sup>76</sup> και της δυνατότητας πρόσδεσης σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων.<sup>77</sup> Για τους παραπάνω λόγους, η PLC βρίσκει εφαρμογές στη αποδέσμευση φαρμάκων και σε άλλες βιοεφαρμογές.<sup>78,66</sup>

#### 1.6.4 Ιδιότητες της (Πολυ)αιθυλενογλυκόλης

Η πολυαιθυλενογλυκόλη (Σχήμα 12), PEG, είναι ένας συνθετικός (πολυ)αιθέρας που βρίσκεται πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία των φαρμάκων. Είναι, επίσης, γνωστή με το όνομα (πολυ)αιθυλενοξείδιο (polyethylene oxide, PEO) ή (πολυ)οξυαιθυλένιο (polyoxyethylene, POE) ανάλογα με το μοριακό της βάρος. Υλικά τέτοιου τύπου με μοριακό βάρος  $M_w < 100.000$  είναι γνωστά σαν PEGs, ενώ πολυμερή με μεγαλύτερο μοριακό βάρος είναι γνωστά ως PEOs. Τα πολυμερή αυτά επιδεικνύουν αμφίφιλο χαρακτήρα και είναι διαλυτά στο νερό αλλά και σε πολλούς οργανικούς διαλύτες. Χαμηλού μοριακού βάρους ( $M_w < 1.000$ ) PEGs είναι παχύρρευστα και άχρωμα υγρά, ενώ υψηλότερου μοριακού βάρους PEGs είναι κηρώδη, λευκά στερεά με τα σημεία τήξης ανάλογα με το μοριακό βάρος τους, με ένα ανώτατο όριο των περίπου  $67^\circ\text{C}$ .<sup>79</sup>



Σχήμα 12. Δομή (πολυ)αιθυλενογλυκόλης.

Οι PEG είναι μη τοξικά υλικά και έχουν εγκριθεί από τον FDA για χρήση ως έκδοχα ή ως φορείς σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα, σε τρόφιμα και καλλυντικά.<sup>80</sup> Οι περισσότερες PEG με  $M_w > 1.000$  αποβάλλονται γρήγορα από τον οργανισμό με την αρχική ταχύτητα απομάκρυνσης να είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυμερούς.<sup>81</sup> Η ιδιότητα αυτή, σε συνδυασμό με τη διαθεσιμότητα λειτουργικοποιημένων PEG με ένα ευρύ φάσμα τελικών λειτουργικών ομάδων, συμβάλλει στην ευρεία χρήση τους στη βιοϊατρική έρευνα, με εφαρμογές στην αποδέσμευση φαρμάκων, στη μηχανική ιστών για την κατασκευή ικριωμάτων και πολλές άλλες εφαρμογές.<sup>82,83</sup>

## 1.7 Σκοπός Εργασίας

Η δημιουργία, η παραγοντοποίηση και η βελτιστοποίηση συνθετικών μεμβρανών και κυστιδίων με στόχο την εξυπηρέτηση σύγχρονων (βιο)νανοτεχνολογικών αναγκών που απαιτούν διαμερισματοποίηση (ανάλογη με αυτή που παρατηρείται στην Φύση, π.χ. στο κύτταρο) έχει όπως αναφέρθηκε προηγούμενα αποτελέσει αντικείμενο έντονης μελέτης τις τελευταίες δεκαετίες<sup>1,2</sup>. Για την δημιουργία συνθετικών, (πολυ)λειτουργικών μεμβρανών έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ένα ευρύ φάσμα αμφίφιλων φυσικών (λιπίδια) ή συνθετικών μορίων και πολυμερών.

Προς αυτή την κατεύθυνση δημιουργήθηκε και μία νέα κατηγορία αμφίφιλων μορίων –τα *Γιγάντια Αμφίφιλα (ΓΑ)*- στα οποία η ενδογενής αμφιφιλία που επάγει τον σχηματισμό υπερδομών μεμβρανικού τύπου, οφείλεται στην ομοιοπολική σύνδεση μίας πρωτεΐνης με ένα υδρόφοβο πολυμερές. Την τελευταία δεκαετία, η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου της Κ. Βελώνια επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη των μεθόδων εκείνων που επιτρέπουν αποδοτικό σχηματισμό και επαρκή χαρακτηρισμό των αμφίφιλων βιομακρομορίων και των υπερμοριακών τους δομών.<sup>10,11,24,25,26,27,28,30</sup> Οι πρώτες οικογένειες *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μακρομορίων αποδείχθηκε ότι σχηματίζουν πολύ σταθερότερες υπερδομές από τα λιπίδια, οι οποίες είναι επιπλέον διαπερατές και υπερτερούν των συμπολυμερών στην ύπαρξη της εξωτερικής πρωτεϊνικής επιφάνειας η οποία εξασφαλίζει βιοσυμβατότητα και/ή λειτουργικότητα όπως μεταφορά, κατάλυση και αναγνώριση.

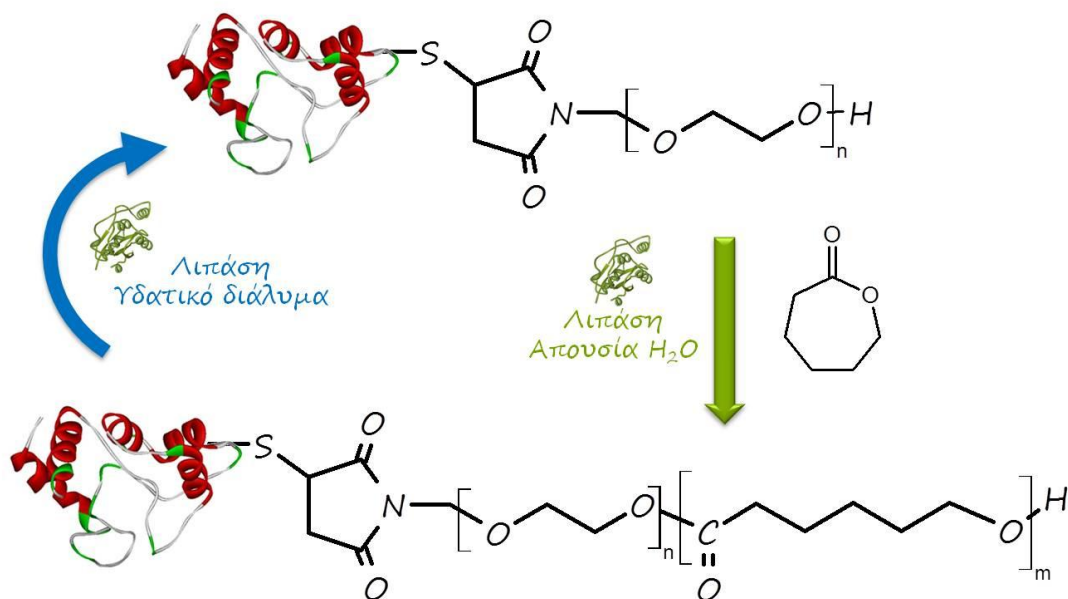
Πρόσφατα επιτεύχθηκε για πρώτη φορά και η δημιουργία μίας νέας γενιάς χημικά πολυλειτουργικών *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μορίων με άριστες αποδόσεις και πολυδιασπορά ακολουθώντας ταυτόχρονο ή σταδιακό ζώντα ATRP πολυμερισμό ριζών και την click, καταλυόμενη από χαλκό (I), αντίδραση κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκινίου (CuAAC).<sup>11</sup> Η νέα αυτή προσέγγιση επιτρέπει χημική τροποποίηση των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* υβριδίων πολυμερούς-πρωτεΐνης και τον *in situ* σχηματισμό νανομεταφορέων και νανοατιδραστήρων .

Η επίτευξη της ποσοτικής σύνθεσης των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μορίων με τις παραπάνω μεθόδους, δημιούργησε ικανές ποσότητες για την μελέτη αυτών των υβριδίων και των υπερδομών τους. Οι πιθανές εφαρμογές τους όμως στην φαρμακολογία και βιοϊατρική δεν ήταν δυνατόν να μελετηθούν αφού προϋποθέτουν *υψηλή καθαρότητα, βιοσυμβατότητα και βιοδιασπασιμότητα*. Η χρήση Cu(I) (ή άλλων βαρέων μετάλλων) είναι απαγορευτική για τέτοιες εφαρμογές λόγω της ιδιαίτερης τοξικότητάς του ενώ δεν μπορεί να διασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνσή του. Επιπλέον, ο πολυμερισμός βινυλικών υποστρωμάτων οδηγεί σε μη βιοδιασπόμενες πολυμερικές αλυσίδες.

Σε αυτή την εργασία επομένως, στόχος ήταν να δημιουργηθεί μία νέα οικογένεια *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μορίων η οποία σχεδιάστηκε έτσι ώστε να διαθέτει χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη εφαρμογών. Πιο συγκεκριμένα στοχεύσαμε την σύνθεση *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μορίων τα οποία αποτελούνται από πρωτεΐνες ομοιοπολικά συνδεδεμένες με βιοσυμβατά/βιοδιασπώμενα πολυμερή και την αντικατάσταση των βαρέων μετάλλων που απαιτούνται στην ATRP με «πράσινους» καταλύτες.



Για την επίτευξη των στόχων μας επιλέξαμε να αντικαταστήσουμε τις κλασικές μεθόδους ζώντα πολυμερισμού με ενζυμικά καταλυόμενο πολυμερισμό και πιο συγκεκριμένα την καταλυόμενη από CALB αντίδραση διάνοιξης δακτυλίου λακτονών. Με τον τρόπο αυτό, αποφεύγεται η χρήση χαλκού και επιπλέον δημιουργείται ένα πολυεστερικό πολυμερές το οποίο είναι βιοδιασπώμενο.



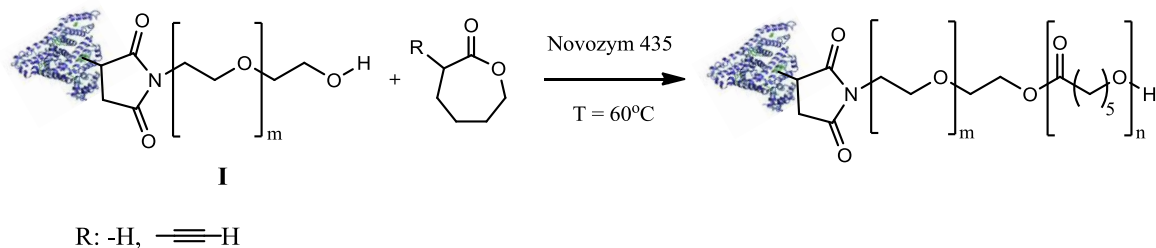
Όπως φαίνεται και στο σχήμα, ο σχεδιασμός της σύνθεσης των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μορίων περιλαμβάνει αρχικά την σύνθεση βιοϋβριδίου που φέρει υδροξυλομάδα ικανή να δράσει σαν εκκινητής στον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου. Ακολουθεί η αντίδραση πολυμερισμού της καπρολακτόνης και παραγώγων της απουσία νερού. Αξίζει να σημειωθεί η προτεινόμενη σύνθεση επιτρέπει και την μελέτη βιοδιάσπασης των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μορίων αφού η ίδια λιπάση μπορεί να καταλύσει την υδρόλυση του πολυμερικού τμήματος σε υδατικά διαλύματα.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας θα παρουσιαστεί αναλυτικά η μελέτη της προτεινόμενης σύνθεσης και ο χαρακτηρισμός των προϊόντων με διαφορετικές χρωματογραφικές, φασματοσκοπικές και μικροσκοπικές μεθόδους και η μελέτη της αποικοδόμησης των πολυεστέρων. Τέλος, θα παρουσιαστούν πειράματα που υποστηρίζουν μία μη αναμενόμενη ενεργότητα της λιπάσης κατά την αλληλεπίδρασή της με αιθέρα παρουσία της καπρολακτόνης. Η μη αναμενόμενη ενεργότητα της λιπάσης αναφέρεται ως promiscuous συμπεριφορά.<sup>84,85,86</sup>

## Αποτελέσματα και Συζήτηση

## Α. Σύνθεση Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων με Καταλυόμενο Πολυμερισμό Διάνοιξης Δακτυλίου από τη Novozym® 435 (Ακίνητοποιημένη Λιπάση CALB σε Μήτρα Ακρυλικού)

Σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης ήταν η σύνθεση μίας νέας γενιάς αμφίφιλων βιοϋβριδίων πολυμερούς-πρωτεΐνης μέσω του καταλυόμενου από λιπάση (Novozym® 435) πολυμερισμού διάνοιξης (ROP) της ε-καπρολακτόνης και παραγώγων της (Σχήμα 12). Στόχο αποτέλεσε καταρχήν η ανάπτυξη μίας νέας προσέγγισης για τη σύνθεση Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων η οποία σχεδιάστηκε ώστε να συνδυάζει τα πλεονεκτήματα του ATRP *grafting from* πολυμερισμού<sup>10,11</sup> με βιοσυμβατές συνθήκες αντίδρασης και πιο συγκεκριμένα ενζυμική κατάλυση.<sup>58,61,62,63</sup> Επιπλέον, η ανάπτυξη του υδρόφοβου τμήματος με τη συγκεκριμένη συνθετική προσέγγιση, οδηγεί στο σχηματισμό πολυκαρπολακτόνης (Σχήμα 12), γεγονός που καθιστά αυτή τη νέα γενιά Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων ιδιαίτερα ελκυστική αφού αναμένεται να συνδυάζουν την ικανότητα αυτοοργάνωσης με την ικανότητα βιοδιάσπασης υπό κατάλληλες συνθήκες. Υπερδομές αυτού του τύπου θα μπορούσαν στο μέλλον να βρουν εφαρμογή ως νανοαντιδραστήρες ή ως μέσα μεταφοράς και/ή αποδέσμευσης φαρμάκων και άλλα.



**Σχήμα 12.** Καταλυόμενος από λιπάση (Novozym® 435) ROP πολυμερισμός ε-καπρολακτόνης και παραγώγων της. Οι πολυμερικές αλυσίδες αναπτύσσονται από τον βιομακροεκκινητή I.

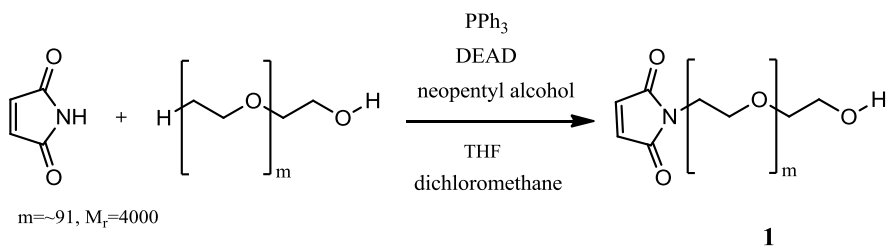
Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται στο Σχήμα 12, η προσέγγιση που ακολουθήθηκε απαιτεί τη σύνθεση ενός βιοϋβριδίου ικανού να δράσει σαν εκκινητής ROP πολυμερισμού (βιοεκκινητής). Η επιλογή της δομής του βιοεκκινητή καθορίστηκε από την ανάγκη για εκλεκτική αντίδραση ενός μορίου-συνδέτη (*linker*) με την πρωτεΐνη (BSA, Cys34) καθώς και την ανάγκη δημιουργίας ενός τμήματος ικανού να «ξεκινήσει» ROP πολυμερισμό στο τελικό μόριο του βιοεκκινητή I.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 12, σε αυτή την προσέγγιση εκμεταλλευτήκαμε την ικανότητα της λιπάσης CALB να καταλύει αντιδράσεις διάνοιξης δακτυλίου της ε-καπρολακτόνης και των παραγώγων της.<sup>45,56,58,61,62,63,64</sup> Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η λιπάση Novozym® 435 σαν καταλύτης και η ε-καρπολακτόνη και τα παράγωγά της σαν μονομερή.

### A.1.1 Σύνθεση του βιομακροεκκινητή I

Επιλέξαμε να συνθέσουμε τον βιοεκκινητή **I** προσδένοντας ένα μόριο συνδέτη (*linker 1*) στη μοναδική ελεύθερη κυστεΐνη της πρωτεΐνης BSA (Cys34). Για το λόγο αυτό, συνθέσαμε τον συνδέτη **1** ο οποίος στο ένα άκρο φέρει μαλεϊμίδιο έτσι ώστε να μπορεί να πραγματοποιήσει εκλεκτική αντίδραση με κυστεΐνη σε κατάλληλο pH και στο άλλο άκρο φέρει ομάδα-εκκινητή ROP πολυμερισμού, δηλαδή μία υδροξυλομάδα. Επιλέξαμε να παρεμβάλουμε την (πολυ)αιθυλενογλυκόλη ανάμεσα στα δύο λειτουργικά άκρα λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα της και της βιοσυμβατότητάς της. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο είχαν αποδείξει ότι το μόριο-συνδέτης έπρεπε να είναι πολυμερές ικανού μοριακού βάρους ώστε να επιτρέπεται η προσέγγιση του καταλύτη Novozym για το στάδιο του πολυμερισμού. Βιοεκκινητές παράγωγα της τρι- και πεντα-αιθυλενογλυκόλης, δεν επέτρεψαν τον πολυμερισμό της ε-καπρολακτόνης, πιθανά λόγω στερικών παρεμποδίσεων.

#### A.1.1.1 Σύνθεση της Τροποποιημένης με Μαλεϊμίδιο (πολυ)αιθυλενογλυκόλης (**1**) με Αντίδραση Mitsunobu.



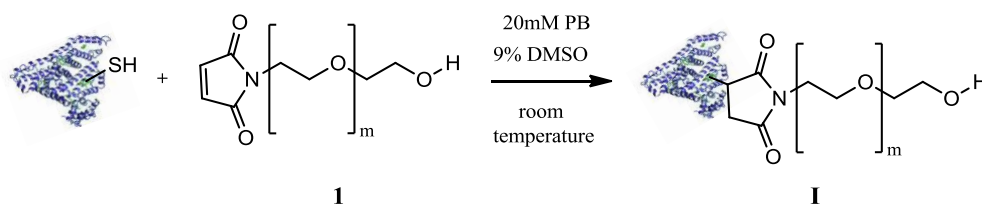
**Σχήμα 13.** Mitsunobu αντίδραση (πολυ)αιθυλενογλυκόλης με μαλεϊμίδιο για το σχηματισμό του μορίου (**1**).

Η σύνθεση του εκκινητή ROP πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, σε ένα διάλυμα τριφαινυλοφωσφίνης σε ξηρό THF και θερμοκρασία  $-78^\circ\text{C}$  προστέθηκε στάγδην διάλυμα DEAD υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά από πέντε λεπτά και υπό ατμόσφαιρα αζώτου, με τη βοήθεια προσθετικής χοάνης προστέθηκε διάλυμα της (πολυ)αιθυλενογλυκόλης σε ξηρό THF και διχλωρομεθάνιο. Μετά το τέλος της προσθήκης και υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου, προστέθηκε διάλυμα της 2,2-διμεθυλο-1-προπανόλης (νεοπέντυλο-αλκοόλης) σε THF και στη συνέχεια διάλυμα του μαλεϊμιδίου σε THF (δεύτερο στάδιο). Με δεδομένο ότι στοχεύαμε σε μονοϋποκατεστημένη (πολυ)αιθυλενογλυκόλη, επιλέχθηκε η αναλογία moles (πολυ)αιθυλενογλυκόλης/μαλεϊμιδίου να είναι 1:0.95. Το διάλυμα της αντίδρασης αφέθηκε να θερμανθεί σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση σε αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης απομακρύνθηκαν οι διαλύτες με τη βοήθεια απόσταξης υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης διαλύθηκε σε  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και ανακτήθηκε έπειτα από καταβύθιση με παγωμένο διαιθυλαιθέρα. Το προϊόν

χαρακτηρίστηκε με την βοήθεια φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR. Χαρακτηριστική κορυφή, ενδεικτική της ύπαρξης προϊόντος ήταν η κορυφή στα 6.625 ppm η οποία αποδίδεται στα βινυλικά πρωτόνια του προϊόντος (Παράρτημα, Φάσμα 1). Προσεκτική ολοκλήρωση των κορυφών επιβεβαίωσε ότι η αντίδραση ήταν επιτυχής. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν >90%. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός διϋποκατεστημένης (πολυ)αιθυλενογλυκόλης (TLC,  $^1\text{H}$  NMR).

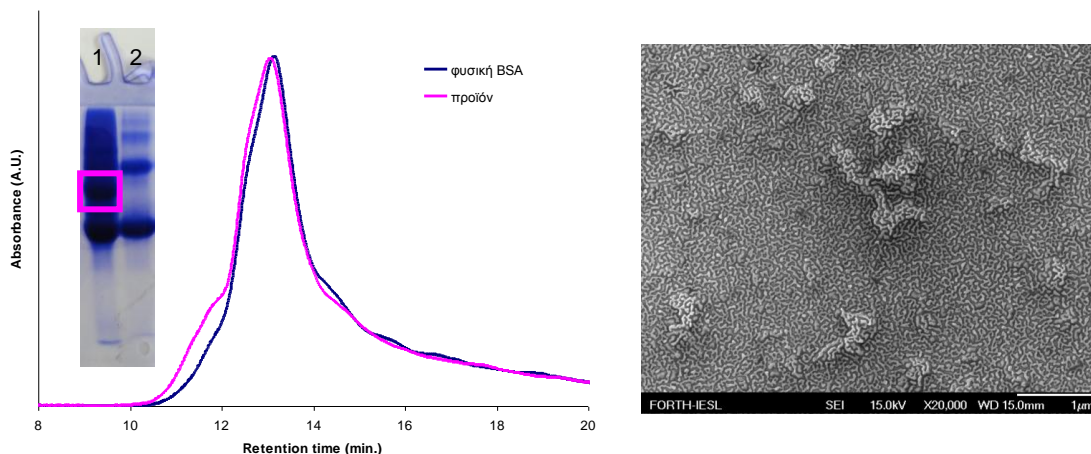
#### A.1.1.2 Σύνθεση Μακροεκκινητή I (BSA-PEG-OH)



Σχήμα 14. Σύνθεσης του BSA-PEG-OH μακροεκκινητή I.

Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτά είναι η αλβουμίνη πλάσματος βοοειδούς (Bovine Serum Albumin, BSA). Η πρωτεΐνη αυτή επιλέχθηκε λόγω της ύπαρξης μίας ελεύθερης ομάδας κυστεΐνης στη θέση 34. Η θέση της κυστεΐνης είναι ιδανική γιατί βρίσκεται εκτεθειμένη στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και μπορεί εύκολα να αντιδράσει με το μαλεϊμίδιο του εκκινητή **1** (Σχήμα 14).<sup>24</sup> Αξίζει να αναφερθεί ότι η αντίδραση μαλεϊμίδης-θειόλης, είναι ποσοτική σε συγκεκριμένο εύρος οξύτητας του διαλύματος και συχνά χαρακτηρίζεται σαν “click” αντίδραση.<sup>87</sup>

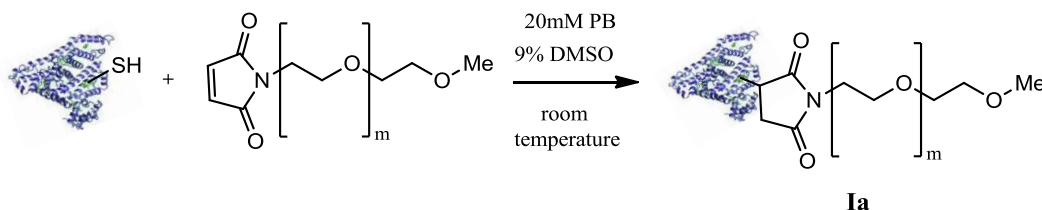
Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης σύζευξης της πρωτεΐνης με τον εκκινητή **1** αρχικά παρασκευάστηκε ένα διάλυμα του προϊόντος **1** σε DMSO ή νερό. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε διάλυμα πρωτεΐνης BSA σε 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.4 και ακολούθησε στάγδην προσθήκη του διαλύματος του προϊόντος **1** στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ήπια ανάδευση για 24 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος BSA-μακροεκκινητή **I** εφαρμόζοντας τη μέθοδο της διαπίδυσης. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης με MWCO 10 kDa και η διαπίδυση έγινε αρχικά ως προς ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 5 mM, pH 7.4 και στη συνέχεια ως προς ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM, pH 7.4. Με τη βοήθεια SEC-HPLC χρωματογραφίας και ηλεκτροφόρησης με πηκτή (πολυ)ακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός του προϊόντος.



**Σχήμα 15.** Αριστερά: SEC-HPLC χρωματογράφημα της φυσικής BSA (μπλε ίχνος) και του BSA-μακροεκκινητή **I** (φούξια ίχνος). Ένθετο αριστερά: Ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα(πολύ)ακρυλαμιδίου, κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες: Θέση 1: BSA, Θέση 2: BSA-μακροεκκινητής **I**. Δεξιά: Μικρογραφία, FE-SEM.

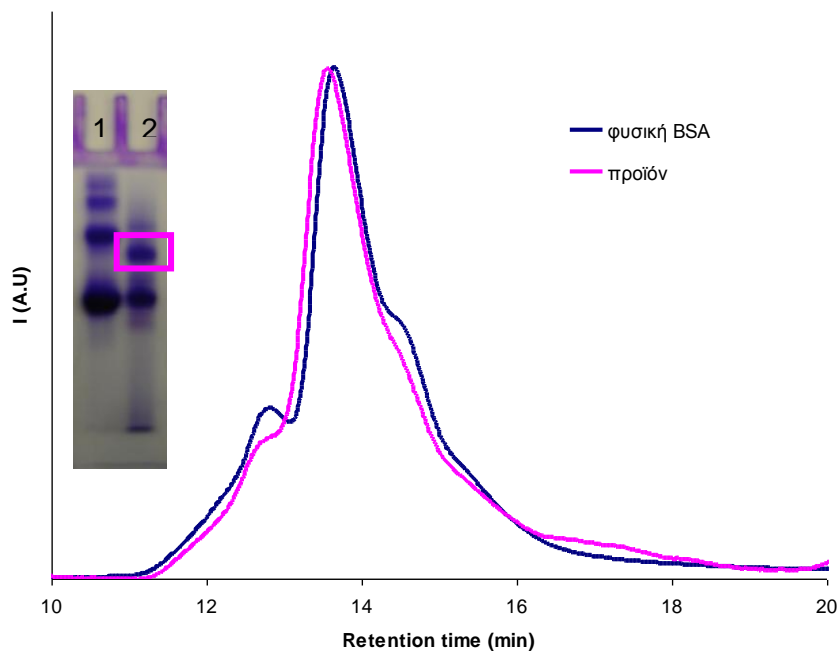
Στο Σχήμα 15 (αριστερά, ένθετο) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης για το προϊόν BSA-μακροεκκινητή **I**. Παρατηρούμε ότι το προϊόν **I** παρουσιάζει διαφορετική ικανότητα μετανάστευσης (μικρότερη κινητικότητα) πάνω στο πήκτωμα από ότι η φυσική πρωτεΐνη όπως αναμένεται εξαιτίας του αυξημένου μοριακού του βάρους. Η χρωματογραφία SEC-HPLC (Σχήμα 15, αριστερά) δεν έδειξε σημαντική διαφορά στο χρόνο έκλουσης αντιδρώντος και προϊόντος, όπως ήταν αναμενόμενο βάσει προηγούμενων μελετών υδρόφιλων παραγώγων BSA στην συγκεκριμένη στήλη χρωματογραφίας. Επιπρόσθετα, ελέγχθηκε με FE-SEM (Σχήμα 15, δεξιά) και TEM η πιθανότητα συσσωμάτωσης του βιοϋβριδίου **I** (λόγω του μερικά υδρόφοβου χαρακτήρα της PEG). Στη μικρογραφία (FE-SEM) παρατηρήθηκε πλήρης απουσία δομών αυτοοργάνωσης για τον BSA-μακροεκκινητή **I**, γεγονός που αναμένεται από τον συνολικά υδρόφιλο χαρακτήρα του βιοϋβριδίου. Τελος, ακολούθησε λυοφιλοποίηση ώστε να είναι δυνατή η αποθήκευση του δείγματος και μετέπειτα χρήση του σε στερεή/καθαρή μορφή.

### A.2.1 Σύνθεση Μακροεκκινητή **Ia** (BSA-PEG-OMe)



**Σχήμα 18.** Σύνθεση του BSA-μακροεκκινητή **Ia**.

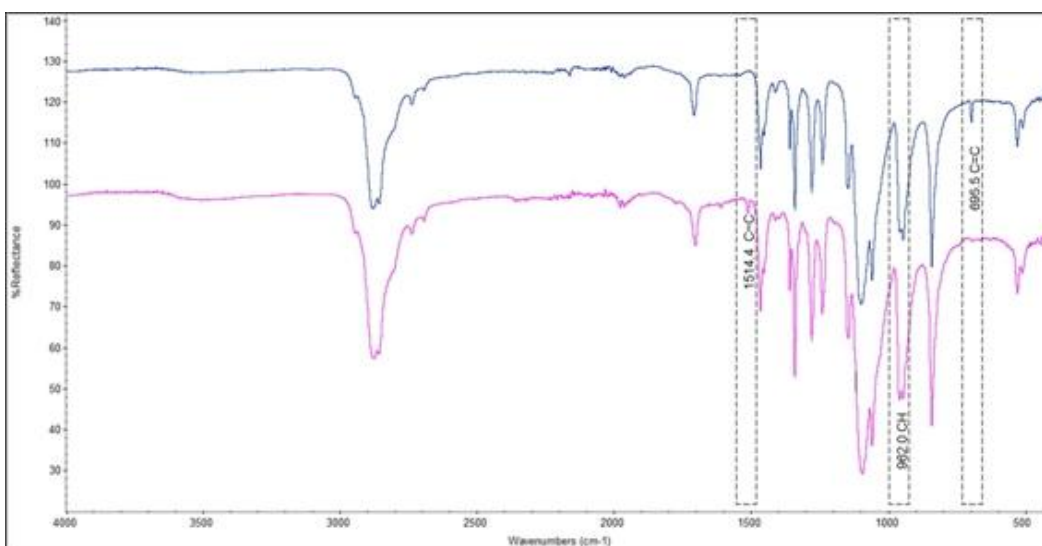
Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης σύζευξης της πρωτεΐνης με την O-(μαλεϊμιδοεθυλ)-O'-μεθυλ-πολυεθυλενογλυκόλη αρχικά παρασκευάστηκε ένα διάλυμα O-(μαλεϊμιδοεθυλ)-O'-μεθυλ-πολυεθυλενογλυκόλη σε DMSO ή νερό. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε διάλυμα πρωτεΐνης BSA σε 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH=7.4 και ακολούθησε στάγδην προσθήκη του διαλύματος O-(μαλεϊμιδοεθυλ)-O'-μεθυλ-πολυεθυλενογλυκόλη στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ήπια ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος BSA-μακροεκκινητή **Ia** εφαρμόζοντας τη μέθοδο της διαπίδυσης. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης με MWCO 10 kDa και η διαπίδυση έγινε αρχικά ως προς ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 5 mM, pH 7.4 και στη συνέχεια ως προς ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM, pH 7.4. Ακολούθησε λυοφιλοποίηση ώστε να είναι δυνατή η αποθήκευση του δείγματος και μετέπειτα χρήση του σε στερεή/καθαρή μορφή. Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αντίδρασης έγινε ηλεκτροφόρηση με πηκτική (πολυ)ακρυλαμίδιου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.



**Σχήμα 16.** Αριστερά: Ηλεκτροφόρηση με πηκτώμα (πολυ)ακρυλαμίδιου, κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες: Θέση 1: BSA, Θέση 2: BSA-μακροεκκινητής **Ia**. Δεξιά: SEC-HPLC χρωματογράφημα της φυσικής BSA (μπλε ίχνος) και του BSA-μακροεκκινητή **Ia** (φούξια ίχνος).

Στο Σχήμα 16 (ένθετο) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης για το προϊόν BSA-μακροεκκινητής **Ia**. Στη θέση 2 έχει τοποθετηθεί BSA-μακροεκκινητής **Ia** ενώ στη θέση 1 η φυσικής –μη τροποποιημένη– BSA. Παρατηρήθηκε ότι η ουσία στη θέση 2 παρουσιάζει διαφορετική ικανότητα μετανάστευσης (μικρότερη κινητικότητα) πάνω στο πηκτώμα από ότι η φυσική πρωτεΐνη και επομένως συμπεραίνουμε ότι ο BSA-μακροεκκινητής **Ia** έχει σχηματισθεί με επιτυχία. Η χρωματογραφία SEC-HPLC δεν έδειξε σημαντική διαφορά στο χρόνο έκλουσης αντιδρώντος και προϊόντος, όπως ήταν αναμενόμενο.

Μετρήσεις με φασματοσκοπία υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier αποκάλυψαν την εμφάνιση κορυφών που αντιστοιχούν στον τροποποιημένο εκκινητή και πιο συγκεκριμένα στα βινυλικά υδρογόνα που χαρακτηρίζουν το νέο μόριο (Σχήμα 17). Για την Ο-(μαλειμιδοεθυλ)-Ο'-μεθυλ-πολυεθυλενογλυκόλη (Σχήμα 17, μπλε ίχνος) παρατηρήθηκε η εμφάνιση κορυφής σε  $695.5\text{cm}^{-1}$  που είναι αποτέλεσμα της κάμψης του δεσμού C=C του μαλειμιδίου ενώ η κορυφή απουσιάζει από το φάσμα του προϊόντος **Ia**. Στο φάσμα του προϊόντος **Ia** παρατηρούμε επίσης την εμφάνιση μίας κορυφής σε  $1514.4\text{cm}^{-1}$  η οποία είναι αποτέλεσμα της έκτασης του δεσμού C-C του μαλειμιδίου για το προϊόν **Ia** και σε  $962.0\text{cm}^{-1}$  μία κορυφή η οποία οφείλεται στην κάμψη του δεσμού C-H του μαλειμιδίου που δεν υπήρχε πριν τη σύζευξη της πρωτεΐνης με την Ο-(μαλειμιδοεθυλ)-Ο'-μεθυλ-πολυεθυλενογλυκόλη. Οι παραπάνω μετρήσεις επιβεβαιώνουν την επιτυχία της αντίδρασης.

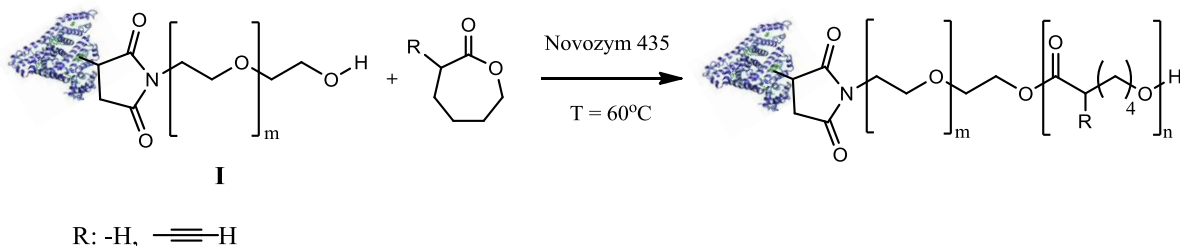


**Σχήμα 17.** Φάσματα Υπερόθρου του προϊόντος **Ia** (φούξια ίχνος) και της Ο-(μαλειμιδοεθυλ)-Ο'-μεθυλ-πολυεθυλενογλυκόλης (μπλε ίχνος) από τους  $1100\text{-}3400\text{cm}^{-1}$ .

### **A.3 Αντιδράσεις Πολυμερισμού Διάνοιξης Δακτυλίου ε-καπρολακτόνης και Παραγώγων της με Εκκινητή BSA-PEG-OH I, για το Σχηματισμό BSA-PEG-PCL II.**

Η σύνθεση των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* BSA-PEG-PCL, όπως έχει αναφερθεί και προηγούμενα επιλέχθηκε να διεξαχθεί με την βοήθεια ενζυμικής κατάλυσης. Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν αρχικά η καλά μελετημένη Novozym σαν καταλύτης και η καπρολακτόνη για μονομερές.<sup>61,64,47,59</sup> Δεδομένου ότι σε αυτές τις μελέτες έχει αποδειχτεί ότι η υγρασία, η θερμοκρασία και οι διαλύτες επηρεάζουν την έκβαση του πολυμερισμού,<sup>59</sup> ο πολυμερισμός μελετήθηκε κάτω από διαφορετικές συνθήκες.

### A.3.1 Αντιδράσεις ROP Πολυμερισμού ε-καπρολακτόνης και Παραγώγων της Εκκινούμενες από BSA-PEG-OH I



**Σχήμα 18.** Γενική αντίδραση ενζυμικά καταλυόμενου ROP πολυμερισμού κυκλικού μονομερούς ξεκινώντας από το βιοπολυμερές **I**.

Με στόχο την δημιουργία των βιοδιασπόμενων *Γιγάντιων Αμφίφιλων* BSA-PEG-PCL (**II-VIII**) πραγματοποιήθηκε μία σειρά αντιδράσεων υπό διαφορετικές συνθήκες (Πίνακας 1). Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσία διαλύτη, ο διαλύτης που επιλέχθηκε ήταν τολουόλιο με βάση τα αποτελέσματα πειραμάτων που είχαν πραγματοποιηθεί προηγούμενα στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας εκκινητές μικρού μοριακού βάρους.<sup>88</sup> Επίσης, μελετήθηκαν δύο διαφορετικά μονομερή, η ε-καπρολακτόνη και η ο-αλλυλο-καπρολακτόνη. Με στόχο την μελέτη των συσσωματωμάτων των βιοπολυμερών με συνεστιακή μικροσκοπία και φθορισμό, μελετήθηκε επίσης ο εγκλεισμός φθορίζουσων ουσιών όπως η φλουορεσείνης (fluorescein). Τέλος, σημαντική για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης ήταν και η μελέτη της αντίδρασης υπό διαφορετικές συνθήκες περιεκτικότητας σε νερό.

Προϊόν	Εκκινητής	Μονομερές	Διαλύτης	Φιλοξενούμενη ουσία	Συνθήκες
<b>II</b>	Βιο-υβρίδιο <b>I</b>	E-CL	Τολουόλιο	-	A
<b>III</b>	Βιο-υβρίδιο <b>I</b>	E-CL	Τολουόλιο	fluorescein	A
<b>IV</b>	Βιο-υβρίδιο <b>I</b>	E-CL	-	-	A
<b>V</b>	Βιο-υβρίδιο <b>I</b>	ε-CL και ο-άλλυλο-CL	Τολουόλιο	-	A
<b>VI</b>	Βιο-υβρίδιο <b>I</b>	E-CL	Τολουόλιο	-	B
<b>VII</b>	Βιο-υβρίδιο <b>I</b>	E-CL	-	-	B
<b>VIII</b>	Βιο-υβρίδιο <b>I</b>	ε-CL και ο-άλλυλο-CL	Τολουόλιο	-	B

**Πίνακας 1.** Περιεχόμενα των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν παρουσία καταλύτη, Novozym® 435, και θερμοκρασία 60 °C.



Σύμφωνα με την βιβλιογραφία,<sup>59</sup> καθοριστικοί παράγοντες για την πραγματοποίηση του καταλυόμενου από Novozym 435® πολυμερισμού διάνοιξης ε-καπρολακτόνης από έναν εκκινητή, είναι ο διαλύτης, η θερμοκρασία αλλά και η περιεκτικότητα του μίγματος της αντίδρασης σε νερό. Η πλήρης απουσία νερού έχει αποτέλεσμα το «ξεγύμνωμα» του ενζύμου από τα μόρια εκείνα του νερού που είναι απαραίτητα για την διατήρηση της δομικής, επομένως και λειτουργικής, του ακεραιότητας. Αντίθετα η ύπαρξη νερού σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες μίας κρίσιμης συγκέντρωσης, έχει σαν αποτέλεσμα τον ανταγωνισμό με τον εκκινητή. Δεδομένης της ύπαρξης του ενζύμου και βιοεκκινητή σε αυτή την μελέτη σημαντική ήταν η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης ώστε να λαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα. Οι αντιδράσεις που μελετήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 1.

Οι αντιδράσεις με προϊόντα τα **II**, **III**, **IV** και **V** (Συνθήκες A) πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την παρακάτω πειραματική διαδικασία. Σε γυάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκε ο λυοφιλοποιημένος BSA-μακροεκκινητής **I** και η λιπάση CALB στην εμπορική διαθέσιμη μορφή της, Novozym® 435. Το φιαλίδιο τοποθετήθηκε σε φιάλη Schlenk εφοδιασμένη με μοριακά κόσκινα, θειικό μαγνήσιο και πεντοξειδίου του φωσφόρου. Ακολούθησε απομάκρυνση του νερού με τη βοήθεια υψηλού κενού για 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και για 2 ώρες σε θερμοκρασία 60°C. Στη συνέχεια, προστέθηκε ξηρό τολουόλιο όπου αυτό ήταν απαραίτητο, ξηρό μονομερές/μονομερή και η φθορίζουσα ουσία εάν ήταν απαραίτητη. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 12 τουλάχιστον ώρες υπό αδρανείς συνθήκες αζώτου και θερμοκρασία 60°C.

Οι αντιδράσεις με προϊόντα **VI**, **VII** και **VIII** πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την παρακάτω πειραματική διαδικασία. Σε γυάλινη φιάλη τοποθετήθηκε ο λυοφιλοποιημένος BSA-μακροεκκινητής **I** και η λιπάση Novozym® 435. Ακολούθησε απομάκρυνση του νερού με τη βοήθεια κενού για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε ξηρό τολουόλιο εάν αυτό ήταν απαραίτητο, μονομερές/μονομερή και η φθορίζουσα ουσία εάν ήταν απαραίτητη. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 12 ώρες υπό αδρανείς συνθήκες σε θερμοκρασία 60°C.

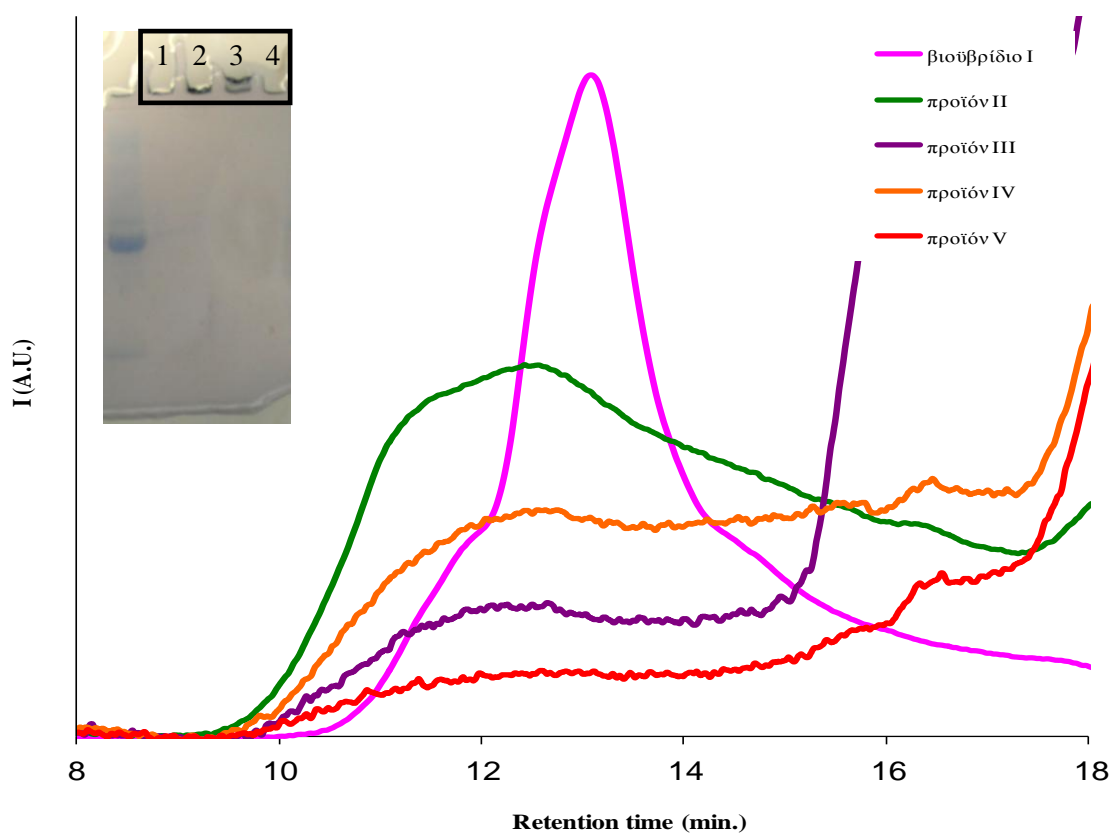
Σε όλες τις επιτυχείς αντιδράσεις παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του διαλύματος της αντίδρασης με την πάροδο του χρόνου, ενώ σε μερικές περιπτώσεις το μείγμα της αντίδρασης στερεοποιήθηκε μετά από ορισμένο χρόνο επώασης.

Για τον καθαρισμό των βιοϋβριδίων εφαρμόστηκε η μέθοδος της διαπίδυσης αρχικά ως προς 5 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων και στη συνέχεια ως προς 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων με τη βοήθεια μεμβράνης διαπίδυσης με όριο αποκλεισμού μοριακών βαρών (MWCO) ~25 kDa. Η επιτυχία της αντίδρασης επιβεβαιώθηκε με συνδυασμό διαφορετικών μεθόδων χαρακτηρισμού που αναλύονται στην επόμενη παράγραφο.

### A.3.2 Χαρακτηρισμός Προϊόντων των Αντιδράσεων ROP Πολυμερισμού ε-καπρολακτόνης και Παραγώγων της Εκκινούμενες από BSA-PEG-OH I

Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την σύνθεση των βιοϋβριδίων (II, III, IV, V, VI, VII και VIII) ιδιαίτερα σημαντική αποδείχθηκε η διαδικασία χαρακτηρισμού των προϊόντων. Δεδομένου ότι τα προϊόντα είναι αμφίφιλα βιομακρομόρια, αυτός ο χαρακτηρισμός είναι ιδιαίτερα απαιτητικός. Για τον πλήρη και ικανό χαρακτηρισμό των προϊόντων ήταν αναγκαίος ο συνδυασμός SEC-υγρής χρωματογραφίας, ηλεκτροφόρησης με πηκτή (πολυ)ακρυλαμιδίου και FT-IR φασματοσκοπίας. Τέλος, η αρχιτεκτονική της συσσωμάτωσης των προϊόντων μελετήθηκε με FE-SEM και HR-TEM μικροσκοπία.

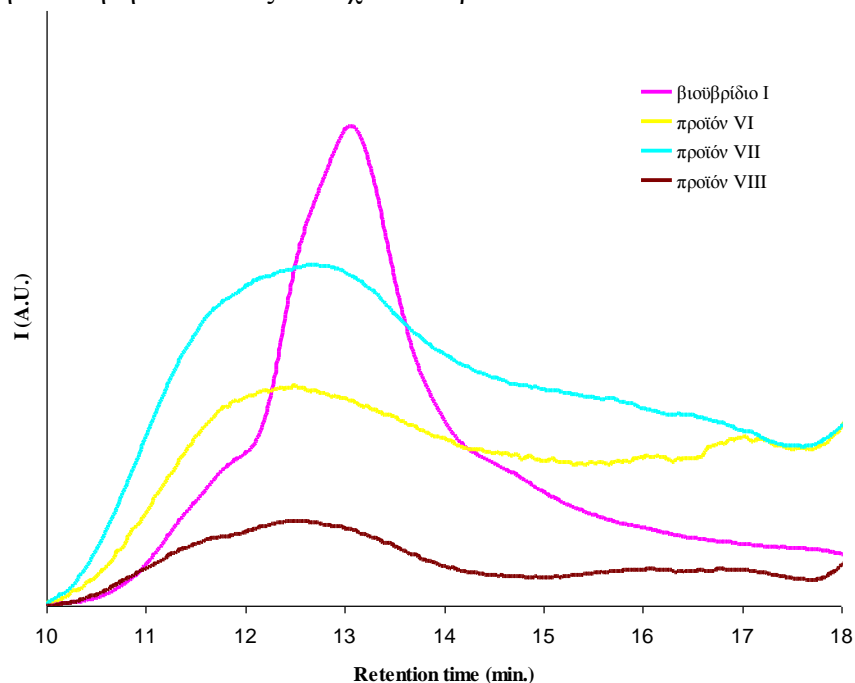
#### A.3.2.1 Χαρακτηρισμός Προϊόντων με SEC-HPLC Χρωματογραφία και Ηλεκτροφόρηση Πηκτής (Πολυ)ακρυλαμιδίου



**Σχήμα 19.** SEC-HPLC χρωματογράφημα του βιοϋβριδίου I BSA-PEG-OH (φούξια ίχνος), της BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολυ)καπρολακτόνης II (αντίδραση παρουσία διαλύτη, πράσινο ίχνος), της BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολυ)καπρολακτόνης III (αντίδραση παρουσία διαλύτη και της χρωστικής Fluorescein, μωβ ίχνος), της BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολυ)καπρολακτόνης IV (αντίδραση απουσία διαλύτη, πορτοκαλί ίχνος) και της της BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολυ)καπρολακτόνης-co-αλλυλο(πολυ)καπρολακτόνης V (αντίδραση παρουσία διαλύτη, κόκκινο ίχνος). Στο ένθετο: ηλεκτροφόρηση των προϊόντων με πηκτή (πολυ)ακρυλαμιδίου. Στη θέση 1 της πηκτής βρίσκεται το προϊόν II, στη θέση 2 το προϊόν III, στη θέση 3 το προϊόν IV και στη θέση 4 το προϊόν V.

Με τη βοήθεια SEC χρωματογραφίας (Σχήμα 19) παρατηρήθηκε για όλα τα προϊόντα (**II**, **III**, **IV**, **V**) η εμφάνιση μίας νέας κορυφής με χρόνο έκλουσης μικρότερο (μεγαλύτερη υδροδυναμική ακτίνα) από την πρότυπη κορυφή που εμφανίζεται για τη φυσική BSA και τον βιοεκκινητή **I**. Η κορυφή αυτή αποδίδεται στο μεγαλύτερο μοριακό βάρος του εκάστοτε προϊόντος και αποτελεί ένδειξη για την επιτυχία της αντίδρασης πολυμερισμού. Από την μορφή των κορυφών όλων των προϊόντων (bimodal) μπορούμε να υποθέσουμε την ύπαρξη ποσότητας εκκινητή **I** ο οποίος δεν έχει αντιδράσει. Στο ένθετο του Σχήματος 19 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόριση των προϊόντων με πηκτική (πολυ)ακρυλαμίδιου. Στη θέση 1 της πηκτής βρίσκεται το προϊόν **II**, στη θέση 2 το προϊόν **III**, στη θέση 3 το προϊόν **IV** και στη θέση 4 το προϊόν **V**. Παρατηρούμε ότι και τα τέσσερα προϊόντα έχουν παραμείνει στην κορυφή της πηκτής (ελάχιστη μετανάστευση κατά μήκος της γέλης) γεγονός χαρακτηριστικό του αμφίφιλου χαρακτήρα και της συσσωμάτωσης των βιουβριδίων.<sup>9,10,11,24,25,26</sup>

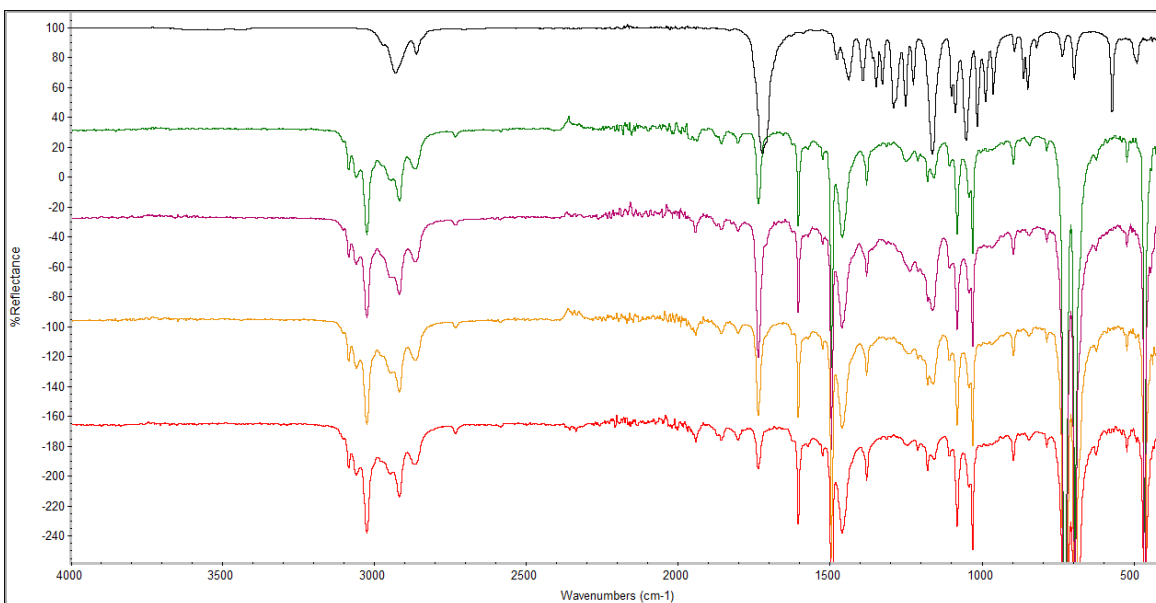
Ανάλογα αποτελέσματα πήραμε και από το χαρακτηρισμό των προϊόντων **VI**, **VII** και **VIII**. Με SEC χρωματογραφία (Σχήμα 20) παρατηρήθηκε για όλα τα προϊόντα (**VI**, **VII**, **VIII**) η εμφάνιση μίας νέας κορυφής με χρόνο έκλουσης μικρότερο (μεγαλύτερη υδροδυναμική ακτίνα) από την πρότυπη κορυφή που εμφανίζεται για τον βιοεκκινητή **I**. Η κορυφή αυτή αποδίδεται στο μεγαλύτερο μοριακό βάρος του εκάστοτε προϊόντος και αποτελεί ένδειξη για την επιτυχία της αντίδρασης πολυμερισμού. Από την μορφή των κορυφών όλων των προϊόντων (bimodal) μπορούμε και πάλι να υποθέσουμε την ύπαρξη εκκινητή **I** ο οποίος δεν έχει αντιδράσει.



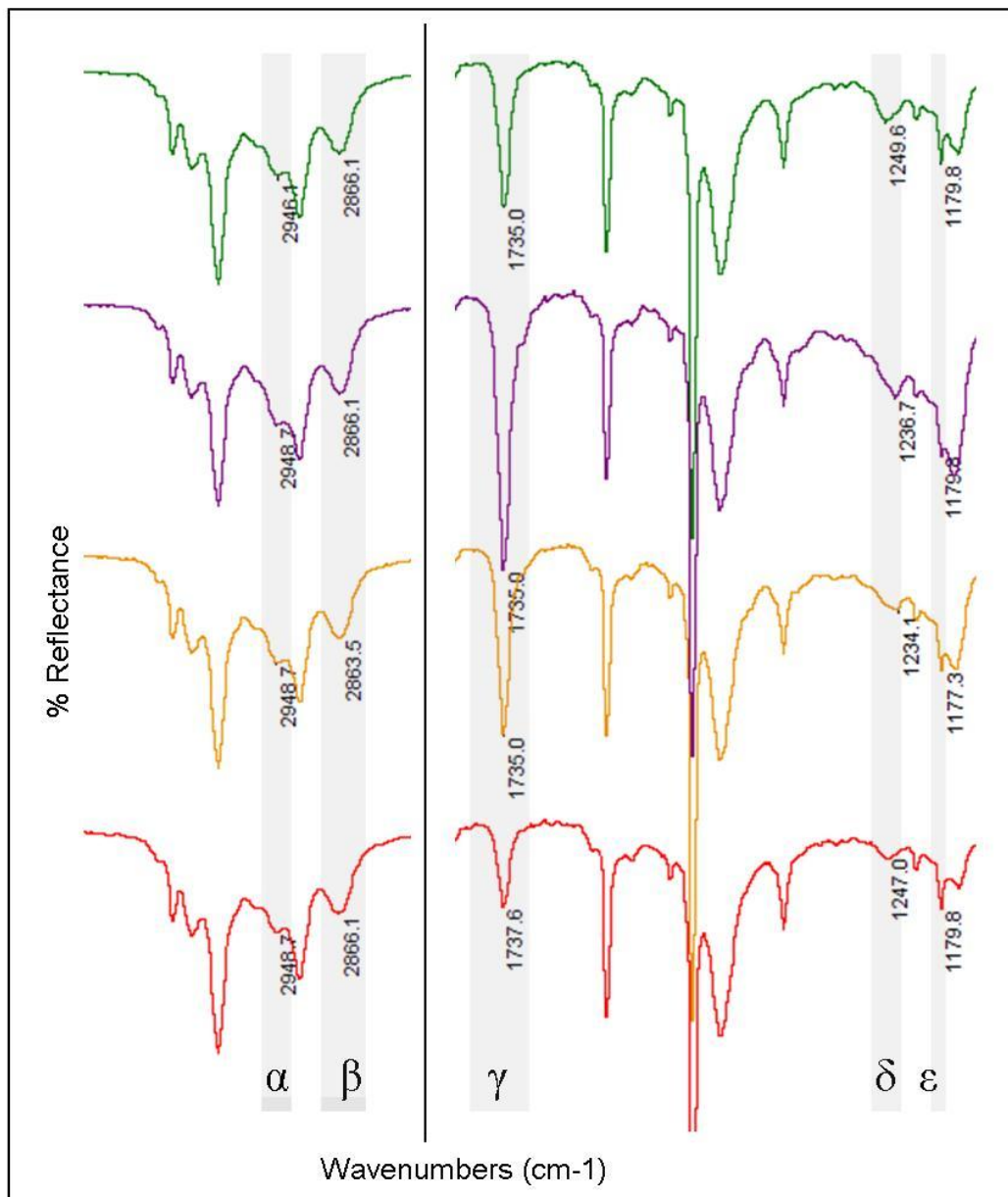
**Σχήμα 20.** SEC-HPLC χρωματογράφημα του βιουβρίδιο **I** BSA-PEG-OH (μπλε ίχνος), της BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολύ) καπρολακτόνης **VI** (αντίδραση παρουσία διαλύτη, κίτρινο ίχνος), της BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολύ) καπρολακτόνης **VII** (αντίδραση απουσία διαλύτη, γαλάζιο ίχνος) και της BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολύ)καπρολακτόνης-co-άλλυλο(πολύ)καπρολακτόνης **VIII** (αντίδραση παρουσία διαλύτη, καφέ ίχνος).

### A.3.2.2 Χαρακτηρισμός Προϊόντων με FT-IR Φασματοσκοπία

Τα αποτελέσματα μετρήσεων με SEC χρωματογραφία και ηλεκτροφόριση πηκτής (πολυ)ακρυλαμιδίου αποτέλεσαν τις πρώτες ενδείξεις για την επιτυχία των αντιδράσεων του ROP πολυμερισμού και τη σύνθεση των νέων βιουβριδίων. Θέλοντας μία πιο εμπειρισταωμένη μελέτη χαρακτηρίσαμε τα προϊόντα **II** έως **VII** με τη βοήθεια της μεθόδου Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier. Επικεντρωθήκαμε, στην μελέτη των χαρακτηριστικών κορυφών για την (πολυ)καπρολακτόνη (Σχήμα 21, 22,23 και 24).<sup>89</sup> Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στην απομάκρυνση της περισσειας του μονομερούς πριν από τις μετρήσεις (διαπίδυση, κενό), εξαιτίας της ομοιότητας στους δεσμούς ε-καπρολακτόνης και (πολυ)καπρολακτόνης. Όλες οι μετρήσεις έγιναν με διαλύτη τολουόλιο.

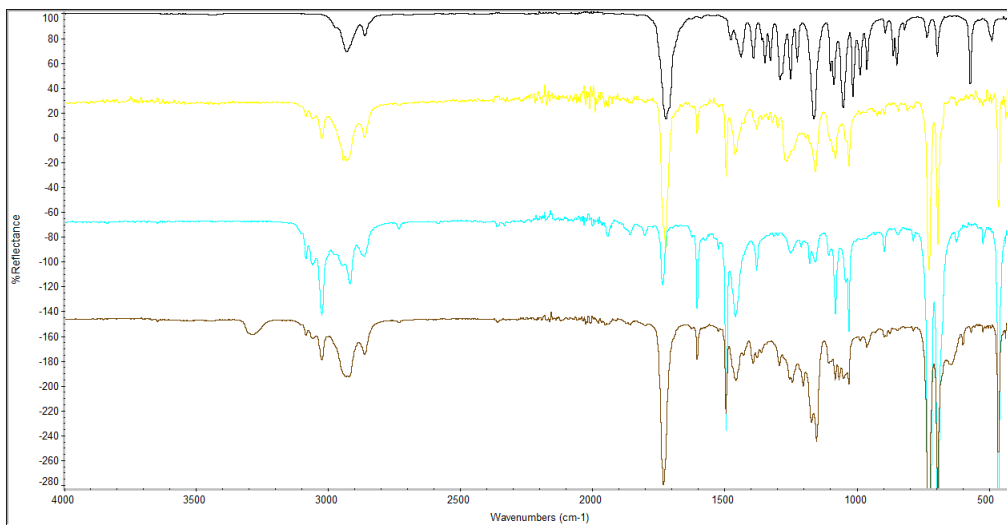


**Σχήμα 21.** Φάσματα Υπερύθρου των προϊόντων **II**, **III**, **IV**, **V** και της ε-καπρολακτόνης {1100-4000cm<sup>-1</sup>}: μονομερές ε-καπρολακτόνη (μαύρο ίχνος), BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολύ) καπρολακτόνης **II** (αντίδραση παρουσία διαλύτη, πράσινο ίχνος), BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολύ) καπρολακτόνης **III** (αντίδραση παρουσία διαλύτη και της χρωστικής Fluorescein, μωβ ίχνος), BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολύ) καπρολακτόνης **IV** (αντίδραση απουσία διαλύτη, πορτοκαλί ίχνος) και BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολύ)καπρολακτόνης-co-άλλυλο(πολυ)καπρολακτόνης **V** (αντίδραση παρουσία διαλύτη, κόκκινο ίχνος).

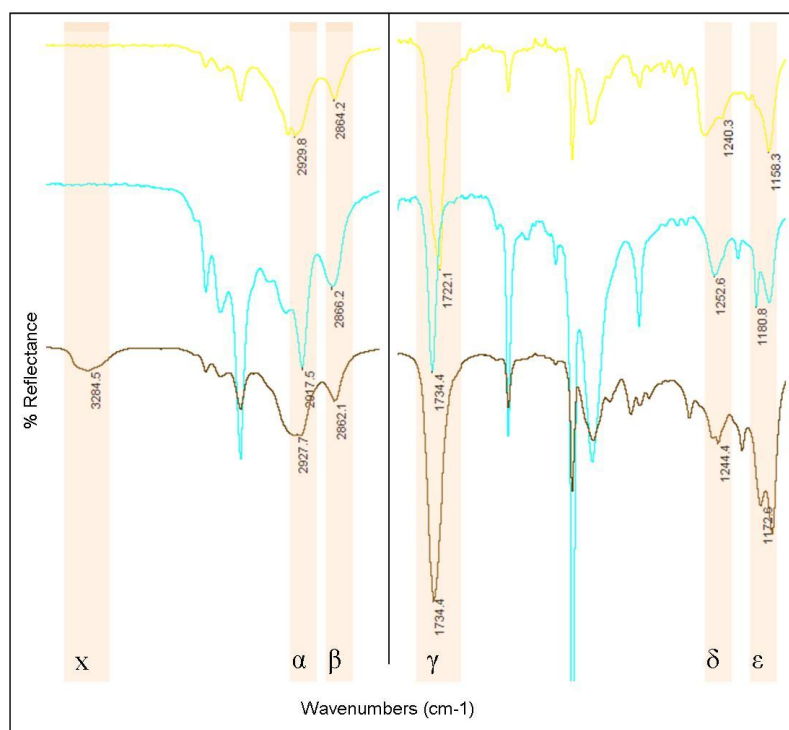


**Σχήμα 22.** Μεγένθυση στα φάσματα Υπερύθρου των προϊόντων **II**, **III**, **IV**, **V**.

Για τα προϊόντα **II-V**, παρατηρήθηκε (Σχήμα 22) η εμφάνιση κορυφών που αντιστοιχούν στην έκταση χαρακτηριστικών δεσμών της δομικής μονάδας της (πολυ)καπρολακτόνης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η κορυφή *α* που οφείλεται στην μη συμμετρική έκταση του δεσμού C-H της ομάδας CH<sub>2</sub>, η κορυφή *β* οφείλεται στη συμμετρική έκταση του δεσμού C-H της ομάδας CH<sub>2</sub>, η κορυφή *γ* οφείλεται στην έκταση του δεσμού C=O, η κορυφή *δ* οφείλεται στη μη συμμετρική έκταση του δεσμού C-O-C και η κορυφή *ε* οφείλεται στην έκταση του δεσμού O-CO. Αξίζει να τονιστεί ότι στο προϊόν **V** δεν παρατηρήθηκε η έκταση του δεσμού C-H του άνθρακα του τριπλού δεσμού της άλλυλο-(πολυ)καπρολακτόνης παρόλο που έγιναν διαφορετικές μετρήσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο συγκεκριμένο παρασκεύασμα ή στη δομή του.



**Σχήμα 23.** Φάσματα Υπερύθρου των προϊόντων **VI**, **VII**, **VIII** και της ε-καρπολακτόνης από τους 1100-3400 $\text{cm}^{-1}$ : ε-καρπολακτόνη (μαύρο ίχνος), BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολύ)καρπολακτόνης **VI** παρουσία διαλύτη (κίτρινο ίχνος), BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολύ)καρπολακτόνης **VII** απουσία διαλύτη (γαλάζιο ίχνος) και BSA-(πολυ)αιθυλενογλυκόλης-co-(πολύ)καρπολακτόνης-co-άλλυλο(πολυ)καρπολακτόνης **VIII** παρουσία διαλύτη (καφέ ίχνος).



**Σχήμα 24.** Μεγένθυση στα φάσματα Υπερύθρου των προϊόντων **VI**, **VII**, **VIII**.

Για τα προϊόντα **VI-VIII**, παρατηρήθηκαν κορυφές ανάλογες με αυτές που αναφέρθηκαν προηγούμενα και χαρακτηρίζουν την έκταση των χαρακτηριστικών δεσμών που συναντάμε στη δομική μονάδα της (πολυ)καπρολακτόνης. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε η κορυφή α που οφείλεται στην μη συμμετρική έκταση του δεσμού C-H της ομάδας CH<sub>2</sub>, η κορυφή β οφείλεται στη συμμετρική έκταση του δεσμού C-H της ομάδας CH<sub>2</sub>, η κορυφή γ οφείλεται στην έκταση του δεσμού C=O, η κορυφή δ οφείλεται στη μη συμμετρική έκταση του δεσμού C-O-C και η κορυφή ε οφείλεται στην έκταση του δεσμού O-CO. Η κορυφή x που παρουσιάζεται μόνο στο προϊόν **VIII**, είναι χαρακτηριστική της έκτασης του δεσμού C-H του άνθρακα του τριπλού δεσμού της άλλυλο-(πολυ)καπρολακτόνης και επιβεβαιώνει πέρα από κάθε αμφιβολία την δημιουργία του βιοϋβριδικού συμπολυμερούς (Πίνακας 2).

cm <sup>-1</sup>	Κορυφή α (asymmetric CH <sub>2</sub> stretch)	Κορυφή β (symmetric CH <sub>2</sub> stretch)	Κορυφή γ (C=O stretch)	Κορυφή δ (asymmetric COC stretch)	Κορυφή ε (O-CO stretch)	Κορυφή x (C-H stretch of triple bond)
Προϊόν <b>II</b>	2946.1	2866.1	1735.0	1249.6	1179.8	-
Προϊόν <b>III</b>	2948.7	2866.1	1735.0	1236.7	1179.8	-
Προϊόν <b>IV</b>	2948.7	2863.5	1735.0	1234.1	1177.3	-
Προϊόν <b>V</b>	2948.7	2866.1	1737.6	1247.0	1179.8	-
Προϊόν <b>VI</b>	2929.8	2864.2	1722.1	1249.6	1240.3	-
Προϊόν <b>VII</b>	2917.5	2866.2	1734.4	1236.7	1252.6	-
Προϊόν <b>VIII</b>	2927.7	2862.1	1734.4	1247.0	1244.4	3284.5

**Πίνακας 2.** Αναλυτική ανάλυση κορυφών α, β, γ, δ, ε και x βάσει του Σχήματος 21 έως 24.

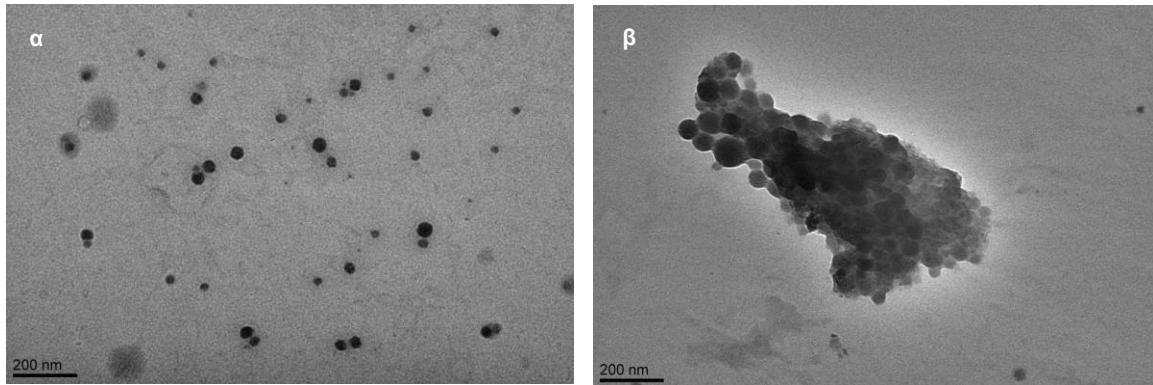
Με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας IR, μέσω της ταυτοποίησης των χαρακτηριστικών δονήσεων των δεσμών της (πολυ)καπρολακτόνης, επιβεβαιώθηκαν οι μετρήσεις της χρωματογραφίας και της ηλεκτροφόρησης γεγονός που πιστοποιεί την επίτευξη των πολυμερισμών.

### A.3.2.3 Μελέτη Αρχιτεκτονικών Συσσωμάτωσης των Προϊόντων με Μικροσκοπία

Τα *Γιγάντια Αμφίφιλα Μόρια* BSA-PEG-PCL είναι στην ουσία τρισυσταδικά συμπολυμερή θεωρώντας ότι η μία συστάδα αποτελείται από την πρωτεΐνη BSA, η άλλη από (πολυ)αιθυλενογλυκόλη και η τρίτη από την (πολυ)καπρολακτόνη. Το τμήμα των πρώτων δύο συστάδων (BSA-μακροεκκινητής **I**) αναμένεται να προσδίδει έναν συνολικά υδρόφιλο χαρακτήρα στο μόριο ενώ η πολυμερική συστάδα (πολυ)καπρολακτόνης

υδρόφοβο χαρακτήρα με αποτέλεσμα τον τελικό αμφιφιλικό χαρακτήρα των προϊόντων. Τα *Γιγάντια Αμφίφιλα Μόρια* που συντέθηκαν και περιγράφηκαν παραπάνω αναμένεται να αυτοοργανώνονται με αποτέλεσμα να δημιουργούν ποικίλες υπερδομές η αρχιτεκτονική των οποίων μελετήθηκε με τη βοήθεια της FE-SEM και HR-TEM μικροσκοπίας. Οι μετρήσεις έγιναν μετά από απομάκρυνση των αλάτων από το διάλυμα του εκάστοτε προϊόντος με διαπίδυση του μίγματος της αντίδρασης ως προς νερό υψηλής καθαρότητας και ως προς τολουόλιο. Αναμένεται η συσσωμάτωση των αμφιφίλων μορίων να είναι διαφορετική σε υδατικά διαλύματα και οργανικούς διαλύτες και για το λόγο αυτό η συσσωμάτωση μελετήθηκε ξεχωριστά σε κάθε διαλύτη.

Οι μικρογραφίες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM) φαίνονται στο Σχήμα 25 και του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης εκπομπής πεδίου (FE-SEM) στο Σχήμα 26 και 27.

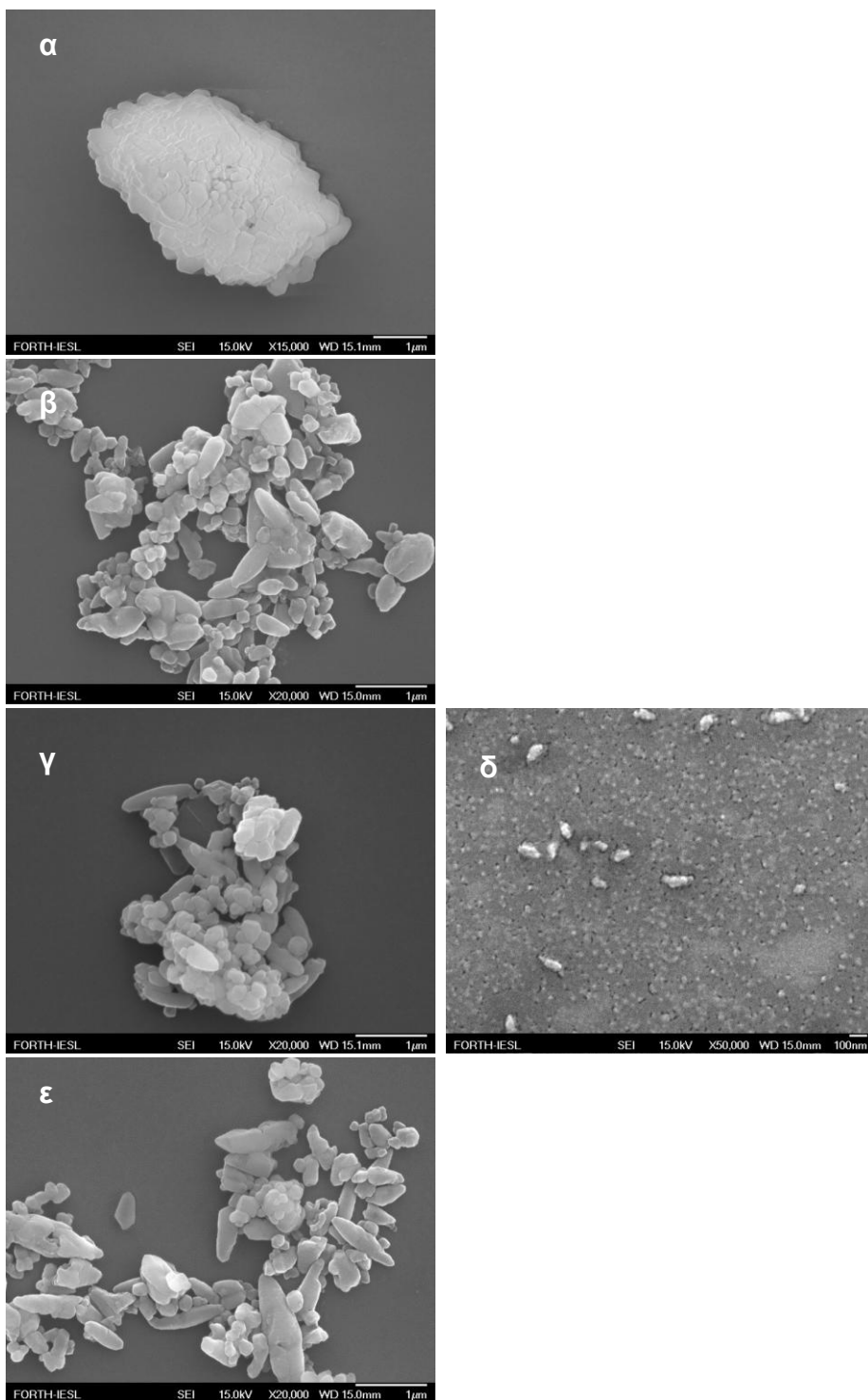


**Σχήμα 25.** Μικρογραφία TEM για το βιοϋβρίδιο **VII** σε νερό.

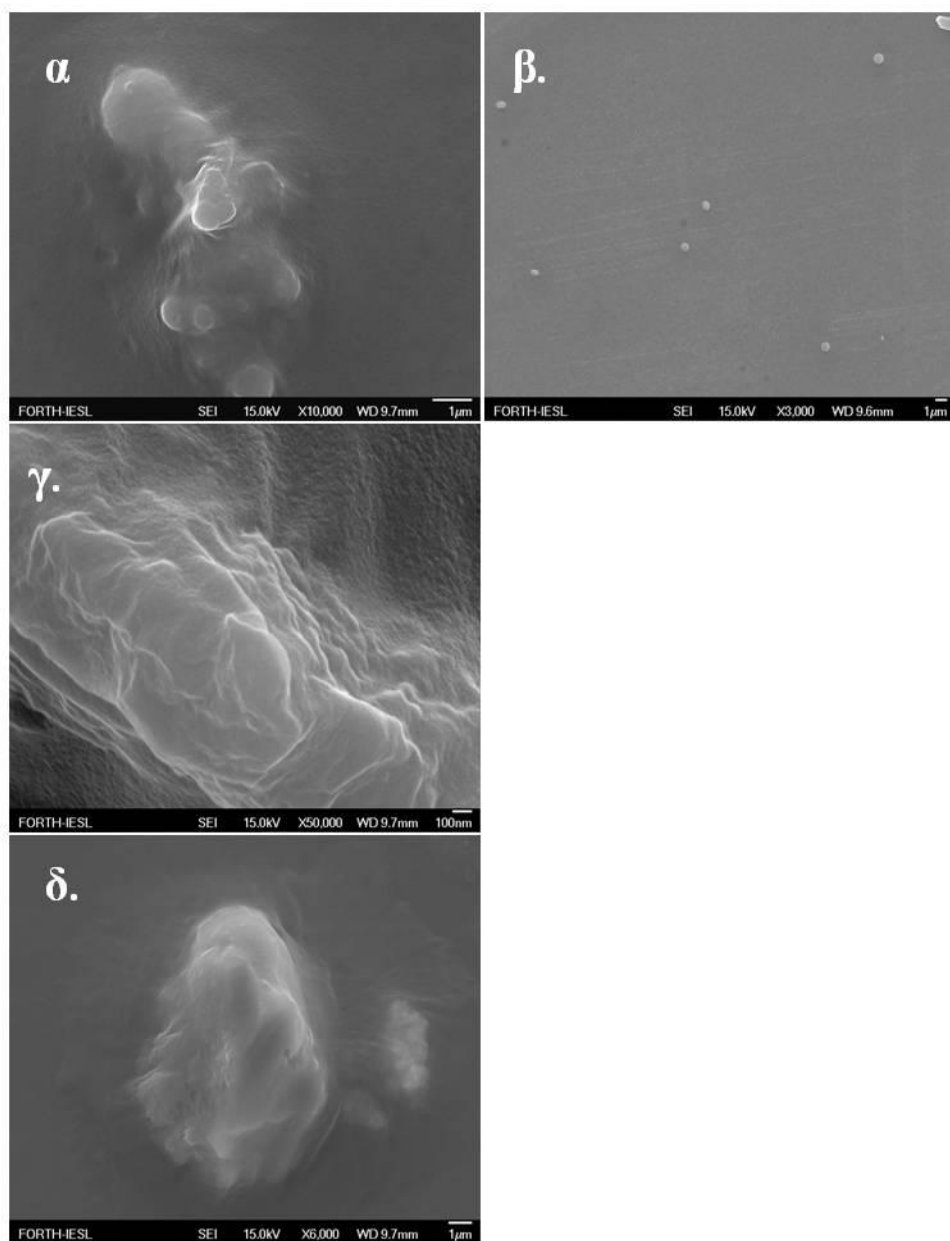
Όπως φαίνεται και στις μικρογραφίες (Σχήμα 25), το προϊόν BSA-PEG-PCL (**VII**) δημιουργεί σφαιρικές δομές με διάμετρο που κυμαίνεται από 20 έως 150 nm. Παρόμοιες δομές παρατηρήθηκαν σχεδόν σε όλα τα προϊόντα που μετρήθηκαν στο νερό. Το σχήμα και το μέγεθος των δομών παραπέμπει σε μικύλλια ή κυστίδια και συμφωνεί με δομές που είχαν παρατηρηθεί στο παρελθόν για άλλα αμφίφιλα της BSA. Δομές ίδιας αρχιτεκτονικής παρατηρήθηκαν και με FE-SEM –ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών των μετρήσεων φαίνεται για το προϊόν **IV** (Σχήμα 26) και στο προϊόν **VI** (Σχήμα 27).

Αντίθετα, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στα Σχήματα 26 και 27, όταν μελετήθηκε η αυτοοργάνωση σε τολουόλιο, χαρακτηριστικός ήταν ο σχηματισμός πολυμεμβρανικών επιφανειών. Η αλλαγή του διαλύτη από νερό (φιλικός προς το ένζυμο) σε οργανικό (φιλικός προς το υδρόφοβο πολυμερές) έχει και στο παρελθόν δείξει αλλαγή της αρχιτεκτονικής της αυτοοργάνωσης των *Γιγάντιων Αμφιφίλων*.<sup>90</sup>





**Σχήμα 26.** Μικρογραφίες FE-SEM.  
(α) βιοϋβρίδιο **II** σε τολουόλιο, (β) βιοϋβρίδιο **III** τολουόλιο, (γ) βιοϋβρίδιο **IV** σε τολουόλιο,  
(δ) προϊόν **IV** α σε νερό, (ε) προϊόν **V** σε τολουόλιο.



**Σχήμα 27.** Μικρογραφίες FE-SEM: (α) βιοϋβρίδιο VI σε τολουόλιο, (β) βιοϋβρίδιο VI σε νερό, (γ) βιοϋβρίδιο VII σε τολουόλιο, (δ) προϊόν σε τολουόλιο.

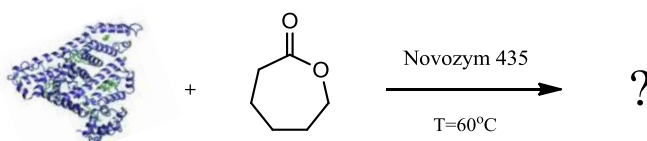
#### A.4 Λευκά Πειράματα

Με στόχο να επιβεβαιωθεί ότι η αντίδραση πολυμερισμού της ε-καπρολακτόνης καταλύεται από την λιπάση και ότι ο πολυμερισμός αναπτύσσεται από την λειτουργική ομάδα του εκκινητή (υδροξύλιο) διεξήχθησαν πειράματα σε συνθήκες πολυμερισμού, απουσία του εκκινητή ή του καταλύτη.

#### A.4.1 Μελέτη Συμπεριφοράς Φυσικής BSA σε Συνθήκες ROP Πολυμερισμού

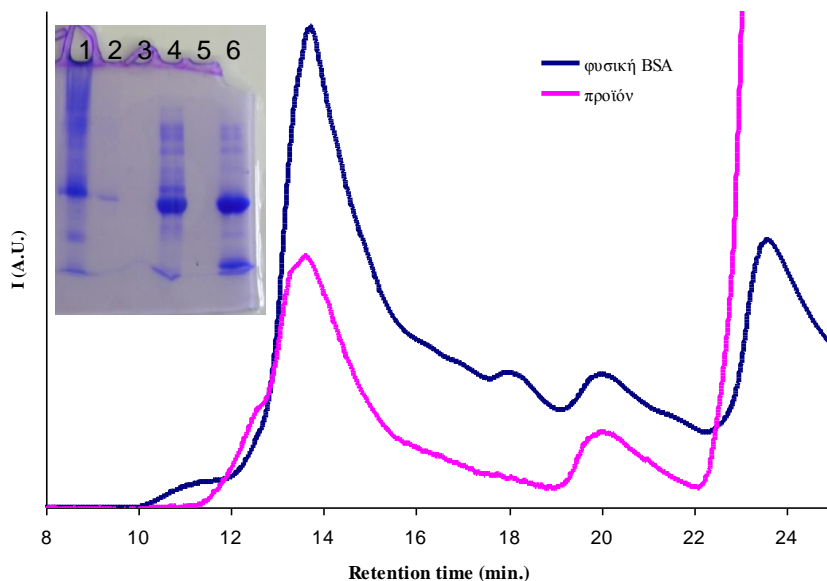
Η πρωτεΐνη BSA στη φυσική της μορφή διαθέτει μεγάλο αριθμό λειτουργικών ομάδων (μεταξύ των οποίων και υδροξυλομάδες) οι οποίες θα μπορούσαν να δράσουν σαν εκκινητές ROP πολυμερισμού. Για το σκοπό της παρούσας μελέτης ήταν απαραίτητη η απόδειξη ότι ο ROP πολυμερισμός δεν ξεκινάει από λειτουργικές ομάδες της φυσικής BSA αλλά από το υδροξύλιο που φέρει στο τελικό του άκρο ο BSA-μακροεκκινητής **I**. Για αυτό το λόγο διεξάχθηκε η αντίδραση που περιγράφεται στο Σχήμα 28, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε φυσική BSA σε συνθήκες ROP πολυμερισμού.

Σε γυάλινη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν η πρωτεΐνη, ξηρή ε-καπρολακτόνη και η Novozym® 435. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 ώρες στους 60°C. Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός ότι το διάλυμα της αντίδρασης δεν παρουσίασε αύξηση ιξώδους.



**Σχήμα 28.** Σχηματική αναπαράσταση αντίδρασης της φυσικής BSA με την ε-καπρολακτόνη.

Με τη βοήθεια της SEC χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την ηλεκτροφόρηση με πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Σχήμα 29) αποδείχτηκε ότι οι υδροξυλομάδες που φέρει η φυσική BSA δεν είναι ικανές να ξεκινήσουν ROP πολυμερισμό.

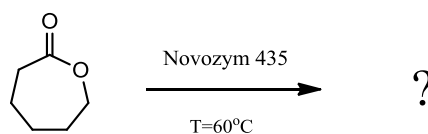


**Σχήμα 29.** SEC-HPLC χρωματογράφημα της φυσικής BSA (μπλε ίχνος) και του προϊόντος (φούξια ίχνος). *Ένθετο:* Ηλεκτροφόρηση με πηκτώμα πολυακρυλαμιδίου, κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες: Θέση 1: προϊόν, Θέση 6: Φυσική BSA.

Η ελάχιστη μετατόπιση της κορυφής στο χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στο προϊόν σε σχέση με αυτή της φυσικής BSA μπορεί να οφείλεται σε πιθανή αλλαγή του φορτίου της πρωτεΐνης κατά την διάρκεια της αντίδρασης.<sup>10,11</sup> Από την ηλεκτροφόριση με πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρατηρήθηκε ότι η ικανότητα μετανάστευσης της BSA και του προϊόντος της αντίδρασης είναι ίδιες. Αυτό αποδεικνύει αποτυχία εκκίνησης ROP πολυμερισμού από τη φυσική BSA. Στην θέση 1 της πηκτής πολυακρυλαμίδιου, παρατηρήθηκε επίσης η ύπαρξη συσσωματωμάτων (προϊόντα που δεν μεταναστεύουν). Τα συσσωματώματα αυτά αποδόθηκαν σε πολυκαπρολακτόνη που δημιουργήθηκε με ROP πολυμερισμό ο οποίος μπορεί να έχει ξεκινήσει μόνο από το νερό του περιβάλλοντος της αντίδρασης. Για την επιβεβαίωση των παραπάνω, έγινε εκχύλιση των οργανικών προϊόντων της αντίδρασης με διχλωρομεθάνιο, και απομάκρυνση του διαλύτη και της ε-καπρολακτόνης με απόσταξη υπό κενό. Το <sup>1</sup>H-NMR του προϊόντος επιβεβαίωσε τον σχηματισμό πολυκαπρολακτόνης (κορυφές όμοιες με αυτές της εμπορικά διαθέσιμης (πολυ)καπρολακτόνης, Παράρτημα Φάσμα 2).

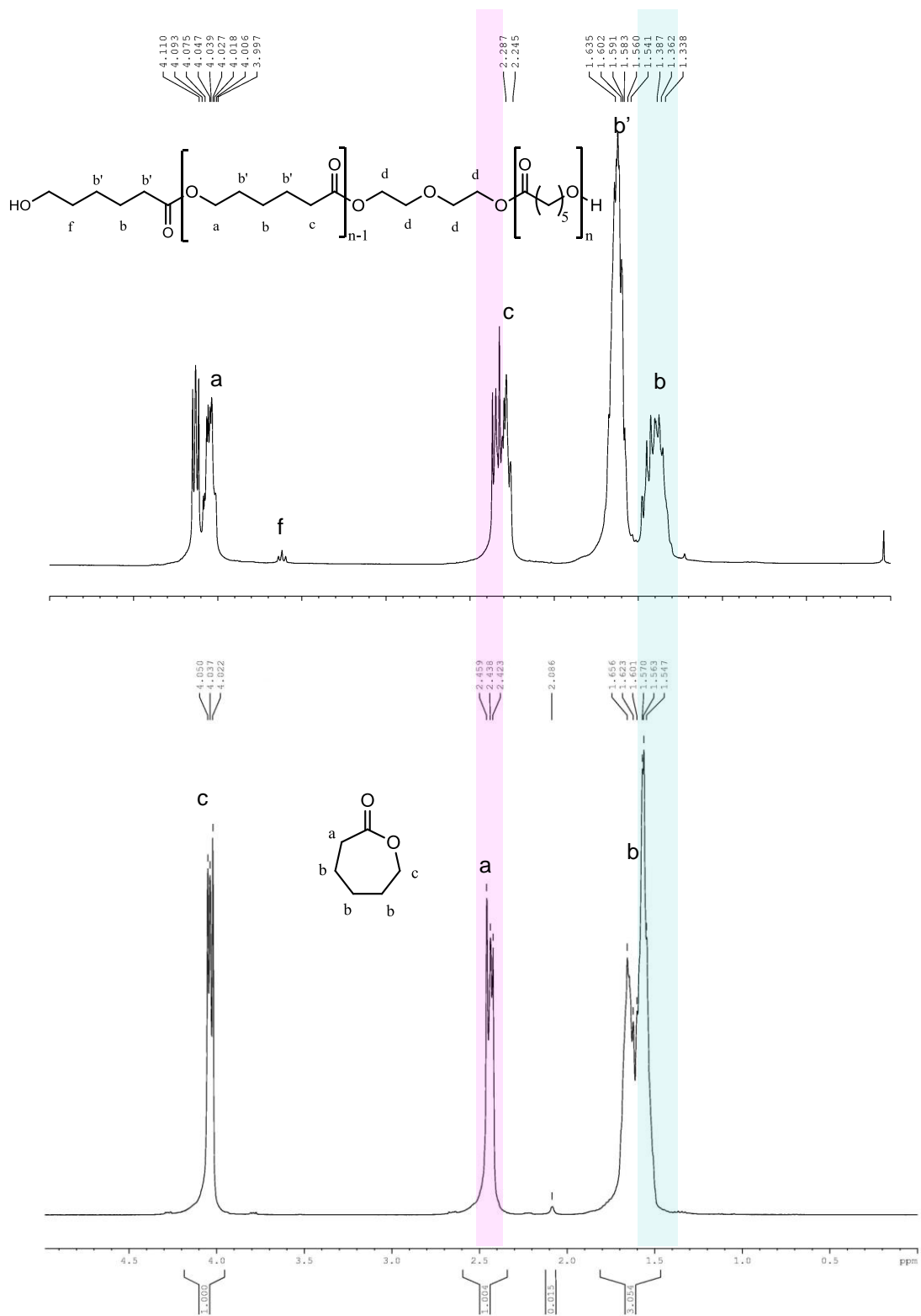
#### A.4.2 Μελέτη Απουσία Βιοεκκινητή: Εκκίνηση ROP Πολυμερισμού από Ίχνη Νερού του Περιβάλλοντος της Αντίδρασης

Το νερό έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί καλό εκκινητή ROP πολυμερισμού.<sup>59</sup> Για το σκοπό της παρούσας εργασίας ήταν απαραίτητη η πραγματοποίηση ενός πειράματος το οποίο θα αποδείκνυε εάν ο πολυμερισμός μπορεί να ξεκινήσει και από τα ίχνη νερού που βρίσκονται στο περιβάλλον της αντίδρασης, ώστε να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες της αντίδρασης (απομάκρυνση νερού και ελαχιστοποίηση παραπροϊόντων). Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση που περιγράφεται στο Σχήμα 30 και χαρακτηρίζεται από την απουσία βιοεκκινητή. Σε ένα γυάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκε η Novozym® 435, προστέθηκε ξηρή ε-καπρολακτόνη και ακολούθησε απομάκρυνση του νερού σύμφωνα με τις συνθήκες Α. Η αντίδραση επωάστηκε σε θερμοκρασία 60°C για 2 ημέρες υπό αδρανείς συνθήκες.



**Σχήμα 30.** Αντίδραση ROP πολυμερισμού της ε-καπρολακτόνης απουσία βιοεκκινητή.

Τα οργανικά προϊόντα, μετά την απομάκρυνση της ε-καπρολακτόνης, μελετήθηκαν με τη βοήθεια <sup>1</sup>H-NMR (Σχήμα 31) αποδείχθηκε ο σχηματισμός (πολυ)καπρολακτόνης και επομένως ότι ίχνη νερού είναι παρόντα στο διάλυμα της αντίδρασης ακόμα και υπό τις συνθήκες Α μπορούν να ξεκινήσουν ROP πολυμερισμό.



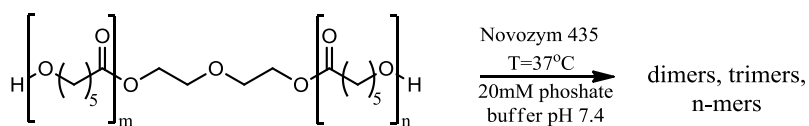
Σχήμα 30. Φάσμα  $^1\text{H NMR}$ : (α) της αντίδρασης του ενζυμικά καταλυόμενου ROP πολυμερισμού

της ε-καπρολακτόνης με εκκινητή τα ίχνη νερού του περιβάλλοντος της αντίδρασης, (β) της ε-καπρολακτόνης.

## B. Αποικοδόμηση BSA-Πολυκαπρολακτόνης

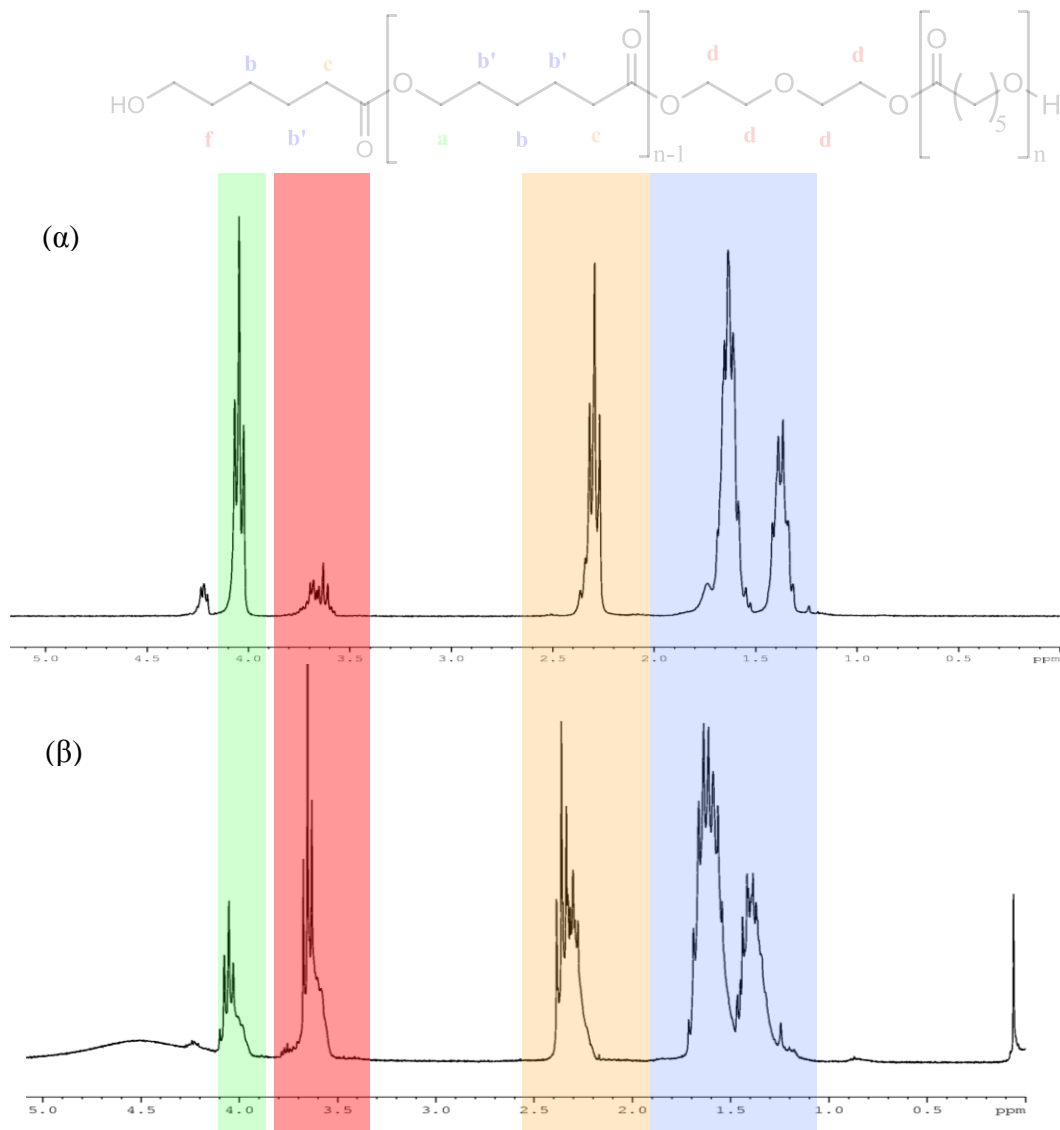
### B.1 Ενζυμικά Καταλύομενη Αποικοδόμηση Πολυκαπρολακτόνης

Οι πολυεστέρες μπορούν να υδρολυθούν εύκολα σε υδατικό περιβάλλον. Η υδρόλυση μπορεί να είναι, είτε υποβοηθούμενη από το pH ή από κάποιο ένζυμο όπως η CALB. Με σκοπό να ελέγξουμε την καταλυτική ικανότητα της Novozym® 435 οσον αφορά την υδρόλυση (πολυ)εστέρων πραγματοποιήθηκε αντίδραση υδρόλυσης ενός εμπορικά διαθέσιμου (πολυ)εστέρα (Mw 2000) σε συνθήκες που επιλέχθηκαν κατάλληλα ώστε να προσομοιώνουν αυτές που επικρατούν, για παράδειγμα, στο ανθρώπινο σώμα (37°C και pH είτε ουδέτερο ή ελαφρά όξινο προσομοιάζοντας το μειωμένο pH του κυτταροπλάσματος). Η υδρόλυση μελετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων με pH 7.4 όπου ο (πολυ)εστέρας, το ένζυμο Novozym® 435 και ο διαλύτης (ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων) προστέθηκαν σε γυάλινη σφαιρική φιάλη. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 16 τουλάχιστον ώρες σε θερμοκρασία 37°C.



**Σχήμα 31.** Ενζυμικά καταλύομενη υδρόλυση εμπορικά διαθέσιμου (πολυ)εστέρα, μοριακού βάρους MW 2000.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, έγινε εκχύλιση των οργανικών προϊόντων με διχλωρομεθάνιο και απομάκρυνση του διαλύτη με απόσταξη υπό κενό. Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, έδειξε την παραγωγή τουλάχιστον τριών νέων προϊόντων και η <sup>1</sup>H-NMR επιβεβαίωσαν την υδρόλυση. Χαρακτηριστική όπως φαίνεται και στο Σχήμα 32 είναι η αύξηση των πρωτονίων των τελικών ομάδων HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- του (πολυ)εστέρα.

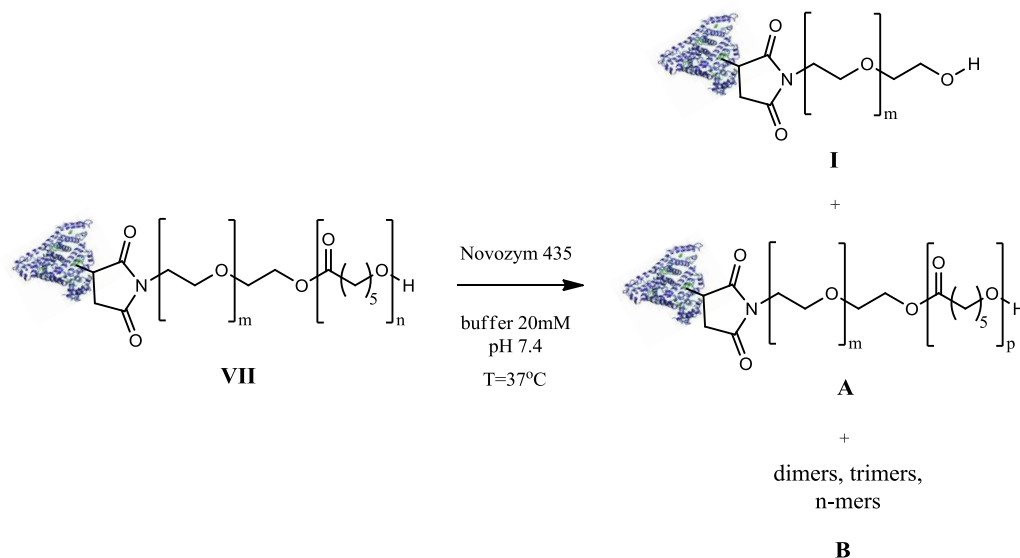


**Σχήμα 32.** Φάσμα <sup>1</sup>HNMR της ενζυμικά καταλυόμενης υδρόλυσης εμπορικά διαθέσιμου (πολυ)εστέρα, μοριακού βάρους MW 2000. Εικόνα (α) εμπορικά διαθέσιμος (πολυ)εστέρας, (β) προϊόν αντίδρασης υδρόλυσης σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4.

## B.2 Αποικοδόμηση BSA-PEG-PCL (II-VIII)

Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο<sup>91,92</sup> έδειξαν ότι υπερμοριακές δομές που προκύπτουν από την αυτόοργάνωση των *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων* BSA-πολυμερούς είναι βιοσυμβατές. Προκαταρκτικές μελέτες και με τα νέα αμφίφιλα μόρια (που δεν περιλαμβάνονται σε αυτή την εργασία) έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά. Η νέα όμως γενιά γιγάντιων αμφίφιλων μορίων, περιέχει σαν υδρόφιλο τμήμα την πολυκαπρολακτόνη, η οποία όπως έχει και προηγούμενα αναφερθεί, είναι από τα πλέον μελετημένα βιοσυμβατά/βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή. Η δυνατότητα της

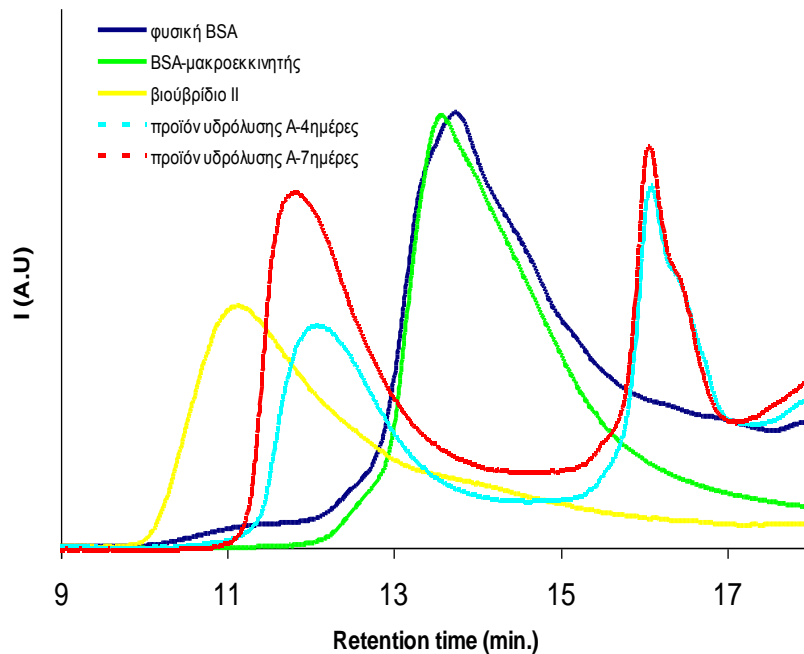
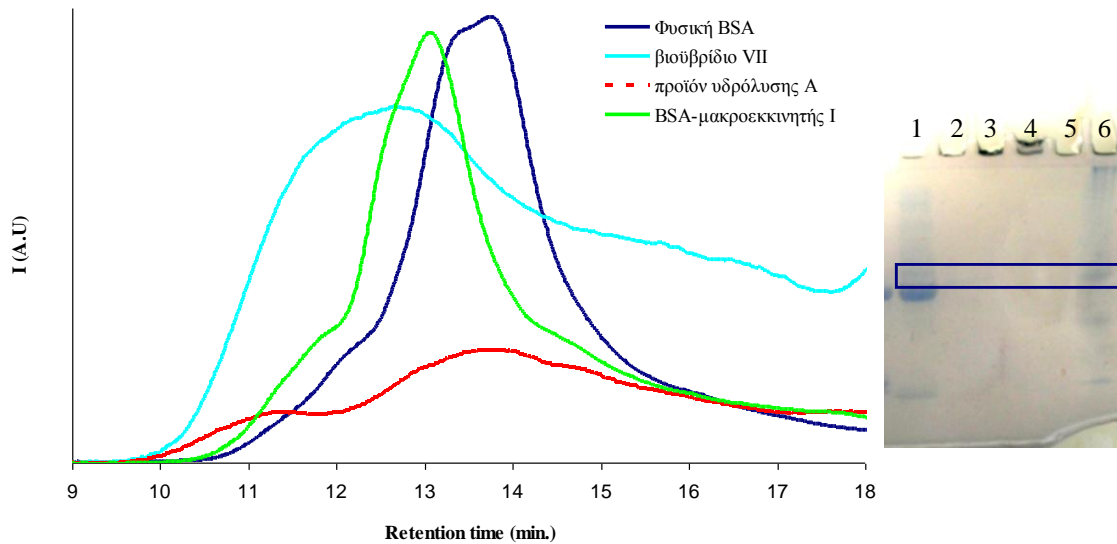
αποικοδόμησης των σχηματιζόμενων νανοδομών είναι εξέχουσας σημασίας, λόγω του ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν νανοαντιδραστήρες ή νανοκάψουλες για την αποδέσμευση ουσιών σε έμβιους οργανισμούς. Αναγκαία επομένως θεωρήθηκε και η μελέτη αποικοδόμησης των βιοπολυμερών. Κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης ο μόνος περιορισμός που τέθηκε ήταν βιοσυμβατές συνθήκες. Επιλέχθηκαν προϊόντα από αντιδράσεις που είχαν πραγματοποιηθεί προηγούμενα (παράγραφος A.3.1) και μελετήθηκε η αντίδραση υδρόλυσής τους (Σχήμα 33).



**Σχήμα 33.** Καταλυόμενη από Novozym® 435 αντίδραση υδρόλυσης του βιοϋβριδίου **VII**.

Σε γυάλινη φιάλη τοποθετήθηκε Novozym® 435 και διάλυμα του προϊόντος **VII** σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για έξι ημέρες σε θερμοκρασία 37°C. Μία επιπλέον αντίδραση υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την παρακολούθηση της πορείας της με τη μέτρηση του pH. Ακολούθησε χαρακτηρισμός των προϊόντων αποικοδόμησης με SEC χρωματογραφία και ηλεκτροφόριση με πηκτή (πολυ)ακρυλαμιδίου.





**Σχήμα 34.** SEC-HPLC χρωματογράφημα, *Πάνω*: της ενζυμικά καταλυόμενης υδρόλυσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4, *Κάτω*: της ενζυμικά καταλυόμενης υδρόλυσης σε νερό. *Πάνω δεξιά ένθετο*: ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες: Θέση 1: βιοϋβρίδιο I, Θέση 5: βιοϋβρίδιο πριν την υδρόλυση, Θέση 6: προϊόν υδρόλυσης.

Η χρωματογραφία SEC-HPLC έδειξε για την ενζυμικά καταλυόμενη υδρόλυση που πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (Σχήμα 34, *Πάνω*) την εμφάνιση μίας νέας κορυφής με χρόνο έκλυσης παρόμοιο με αυτόν που εμφανίζεται η πρότυπη κορυφή για τη φυσική BSA. Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι η κορυφή δεν είναι μονοδιάσπαρτη και περιλαμβάνει μία κορυφή με χρόνο έκλυσης όμοιο με αυτό της

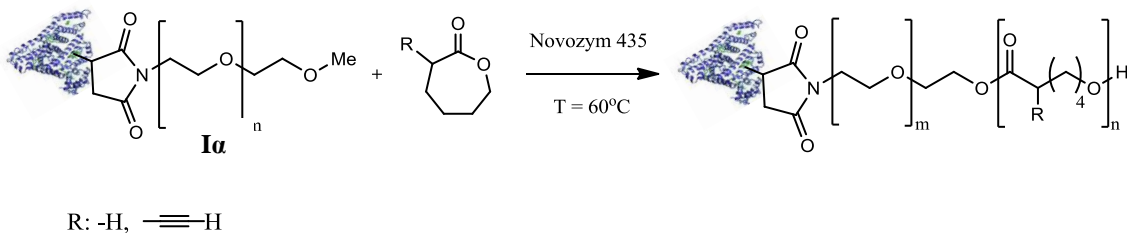
φυσικής BSA και μία κορυφή με χρόνο έκλυσης όμοιο με αυτόν του BSA-PEG-PCL. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η πολυμερική αλυσίδα του πολυεστέρα υδρόλυθηκε προς τον αρχικό BSA-μακροεκκινητή **I** ενώ έχει παραμείνει και ποσότητα BSA-PEG-PCL η οποία δεν έχει υδρόλυθεί πλήρως. Η ηλεκτροφόρηση με πηκτή (πολυ)ακρυλαμιδίου επιβεβαίωσε την υδρόλυση του βιοϋβριδίου. Παρατηρήθηκε ότι το βιοϋβρίδιο (θέση 5 της γέλης) έχει μετανάστευσει ελάχιστα έως καθόλου κατά μήκος της γέλης παραμένοντας στην κορυφή της (Σχήμα 34, Πάνω δεξιά ένθετο) γεγονός που είναι χαρακτηριστικό του αμφίφιλου χαρακτήρα και της συσσωμάτωσης των βιοϋβριδίων. Σε αντίθεση, μετά την αντίδραση υδρόλυσης παρατηρείται αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης (Σχήμα 34, Πάνω δεξιά ένθετο, θέση 6) που οφείλεται στην αποικοδόμησή του αρχικού βιοϋβριδίου. Επιπλέον, εμφανίζεται η χαρακτηριστική μπάντα του εκκινητή η οποία ανιχνεύτηκε και με τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθων, όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένα. Η δημιουργία ν-μερών επιβεβαιώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας έπειτα από απομόνωση των οργανικών προϊόντων με εκχύλιση. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν με SEC χρωματογραφία και για την αντίδραση υδρόλυσης σε νερό. Με το γαλάζιο ίχνος (Σχήμα 34, Κάτω) παρατηρούμε το προϊόν υδρόλυσης μετά από τέσσερις ημέρες, το οποίο εμφανίζει χρόνο έκλυσης μικρότερο από το βιοϋβρίδιο **II**, γεγονός που οφείλεται στη μείωση του μοριακού βάρους του αρχικού προϊόντος κατά την υδρόλυση. Αξίζει να αναφερθεί ότι το pH στην αρχή της αντίδρασης υδρόλυσης μετρήθηκε και βρέθηκε ίσο με 6, ενώ κατά την έβδομη ημέρα το pH μειώθηκε στο 3-4. Η μείωση του pH είναι αναμενόμενη αφού από την υδρόλυση παράγονται ν-μερή και οξέα.

## Γ. “Promiscuous” Κατάλυση;

### Ενζυμικά Καταλυόμενες Αντιδράσεις Πολυμερισμού Διάνοιξης Δακτυλίου ε-καπρολακτόνης και παραγώγων της με εκκινητή BSA-PEG-OMe για τον σχηματισμό BSA-PEG-PCL

Στα πλαίσια των μελετών μας και για τις ανάγκες των λευκών πειραμάτων, συντέθηκε το βιοϋβρίδιο BSA-PEG-OMe **Ia**, το οποίο φέρει τελική μεθόξυ ομάδα. Αδυναμία έναρξης του πολυμερισμού από το βιοϋβρίδιο **Ia** θα μπορούσε να στηρίξει επιπλέον τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες παραγράφους. Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα μη αναμενόμενα αποτελέσματα αυτής της μελέτης.

#### Γ.1 Αντιδράσεις ε-καπρολακτόνης και Παραγώγων της Εκκινούμενες από BSA-PEG-Me **Ia**



**Σχήμα 35.** Γενική αντίδραση ενζυμικά καταλύομένου ROP πολυμερισμού ε-καπρολακτόνης από το βιοπολυμερές **Ia**.

Πραγματοποιήθηκε σειρά αντιδράσεων κατά τις οποίες μελετήθηκαν η επίδραση του διαλύτη, (ο διαλύτης που επιλέχθηκε ήταν τολουόλιο με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων) και δύο διαφορετικά μονομερή, η ε-καπρολακτόνη και η ο-αλλυλο-καπρολακτόνη. Με στόχο την μελέτη των συσσωματωμάτων των βιοπολυμερών με συνεστιακή μικροσκοπία και φθορισμό, μελετήθηκε επίσης ο εγκλεισμός φθορίζουσών ουσιών όπως η fluorescein. Οι αντιδράσεις που μελετήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

Για τις αντιδράσεις με προϊόντα τα **IX**, **X**, **XI** και **XII** ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία. Σε γυάλινη φιάλη τοποθετήθηκε το **Ia**, η Novozym® 435 και μοριακά κόσκινα. Στη συνέχεια, προστέθηκε ξηρό τολουόλιο όπου αυτό ήταν απαραίτητο, ξηρό μονομερές/μονομερή και η φθορίζουσα ουσία εάν ήταν απαραίτητη. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 12 ώρες υπό αδρανείς συνθήκες αζώτου και θερμοκρασία 60°C. Παρατηρήθηκε στερεοποίηση του διαλύματος της αντίδρασης μετά από ορισμένο χρόνο επώασης.

Για την απομόνωση όλων των προϊόντων έγινε διαπίδυση αρχικά ως προς 5mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7.4 και στη συνέχεια ως προς 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων pH 7.4 με τη βοήθεια μεμβράνης με όριο αποκλεισμού μοριακών βαρών ~25 kDa.

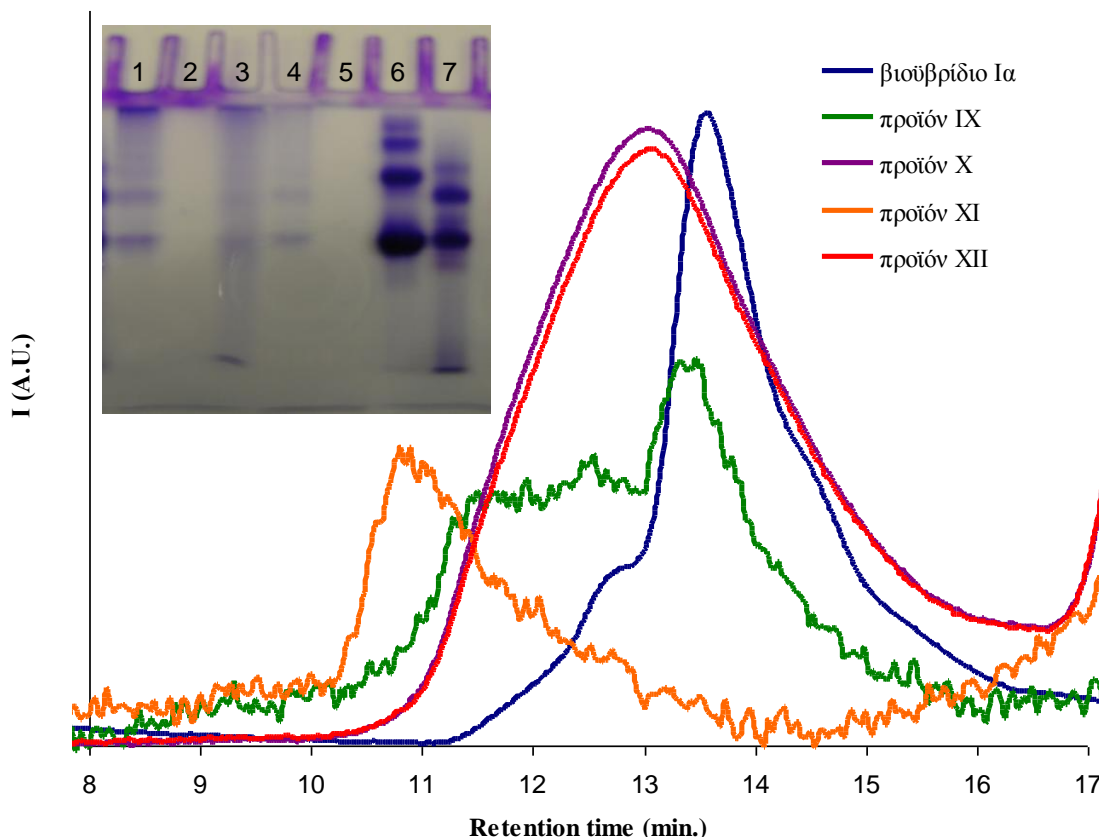
Προϊόν	Εκκινητής	Μονομερές	Διαλύτης	Φιλοξενούμενη ουσία
<b>IX</b>	Βιο-υβρίδιο <b>Ia</b>	ε-καπρολακτόνη	ξηρό τολουόλιο	-
<b>X</b>	Βιο-υβρίδιο <b>Ia</b>	ε-καπρολακτόνη	ξηρό τολουόλιο	Fluorescein
<b>XI</b>	Βιο-υβρίδιο <b>Ia</b>	ε-καπρολακτόνη	-	-
<b>XII</b>	Βιο-υβρίδιο <b>Ia</b>	ε-καπρολακτόνη και άλλυλο-καπρολακτόνη	ξηρό τολουόλιο	-

**Πίνακας 3.** Συνθήκες αντιδράσεων του **Ia** παρουσία καταλύτη, Novozym® 435, και θερμοκρασία 60 °C.

## Γ.2 Χαρακτηρισμός Προϊόντων

Δεδομένου ότι τα προϊόντα είναι αμφίφιλα βιομακρομόρια, αυτός ο χαρακτηρισμός είναι ιδιαίτερα απαιτητικός. Για τον πλήρη και ικανό χαρακτηρισμό των προϊόντων ήταν αναγκαίος ο συνδυασμός SEC-υγρής χρωματογραφίας, ηλεκτροφόρησης με πηκτική (πολυ)ακρυλαμίδιου και FT-IR φασματοσκοπίας. Τέλος, η αρχιτεκτονική της συσσωμάτωσης των προϊόντων μελετήθηκε με FE-SEM μικροσκοπία.

## Γ.2.1 Χαρακτηρισμός Προϊόντων με SEC-HPLC Χρωματογραφία και Ηλεκτροφόριση Πηκτής (Πολυ)ακρυλαμιδίου

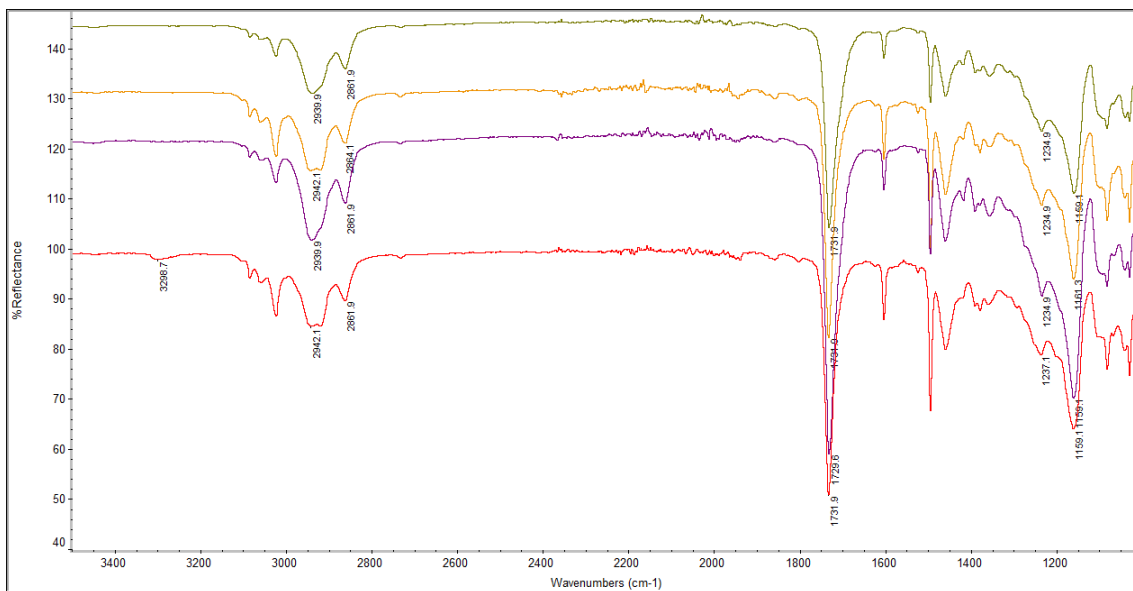


**Σχήμα 36.** SEC-HPLC χρωματογράφημα του βιοϋβριδίου Ia, BSA-PEG-OMe (μπλε ίχνος), και των προϊόντων IX-XII .

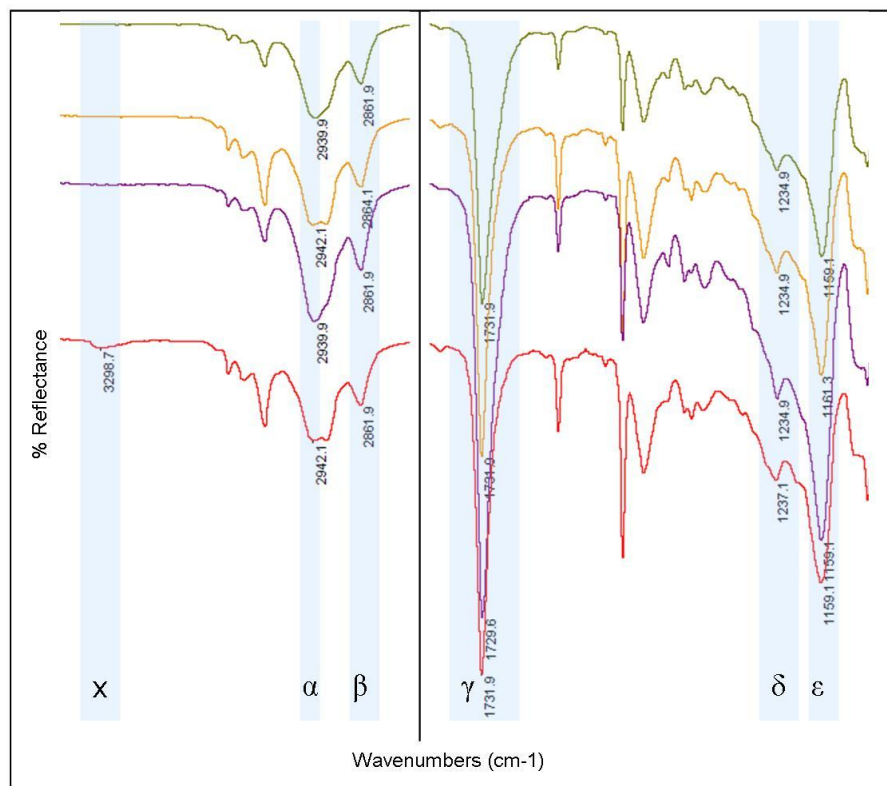
Με τη βοήθεια SEC χρωματογραφίας (Σχήμα 36) παρατηρήθηκε για όλα τα προϊόντα (IX, X, XI, XII) η εμφάνιση μίας νέας κορυφής με χρόνο έκλυσης μικρότερο (μεγαλύτερη υδροδυναμική ακτίνα) από την πρότυπη κορυφή που εμφανίζεται για τη φυσική BSA και τον βιοεκκινητή Ia. Η κορυφή αυτή έχει επιπλέον χρόνους έκλυσης παρόμοιους με αυτούς που είχαν παρατηρηθεί στα βιοπολυμερή II-VIII. Η κορυφή αυτή αποδίδεται στο μεγαλύτερο μοριακό βάρος του εκάστοτε προϊόντος ενώ από την μορφή των κορυφών όλων των προϊόντων (bimodal) μπορούμε να υποθέσουμε την ύπαρξη ποσότητας εκκινητή Ia ο οποίος δεν έχει αντιδράσει. Στο ένθετο του σχήματος 36 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόριση των προϊόντων με πηκτή (πολυ)ακρυλαμιδίου. Στη θέση 2 της πηκτής βρίσκεται το προϊόν IX, στη θέση 2 το προϊόν X, στη θέση 3 το προϊόν XI και στη θέση 4 το προϊόν XII. Παρατηρούμε ότι και τα τέσσερα προϊόντα έχουν παραμείνει στην κορυφή της πηκτής (ελάχιστη μετανάστευση κατά μήκος της γέλης) γεγονός χαρακτηριστικό του αμφίφιλου χαρακτήρα και της συσσωμάτωσης των βιοϋβριδίων.<sup>9,10,11,24,25,26</sup>

## Γ.2.2 Χαρακτηρισμός Προϊόντων με FT-IR Φασματοσκοπία

Θέλοντας μία πιο εμπειριστατωμένη μελέτη χαρακτηρίσαμε τα προϊόντα **IX** έως **XII** με τη βοήθεια FT-IR. Επικεντρωθήκαμε, στην μελέτη των χαρακτηριστικών δονήσεων των δεσμών της (πολυ)καπρολακτόνης (Σχήμα 37, και 38)<sup>89</sup>. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι εξαιτίας της ομοιότητας στους δεσμούς ε-καπρολακτόνης και (πολυ)καπρολακτόνης, η περίσσεια του μονομερούς απομακρύνθηκε πλήρως πριν από κάθε μέτρηση (διαπίδυση ή κενό). Όλες οι μετρήσεις έγιναν με διαλύτη τολουόλιο.



Σχήμα 37. Φάσματα FT-IR των προϊόντων **IX**, **X**, **XI**, **XII** από 1100 έως 3500 cm<sup>-1</sup>.



**Σχήμα 38.** Φάσματα Υπερύθρου των προϊόντων προϊόντων **IX, X, XI, XII.**

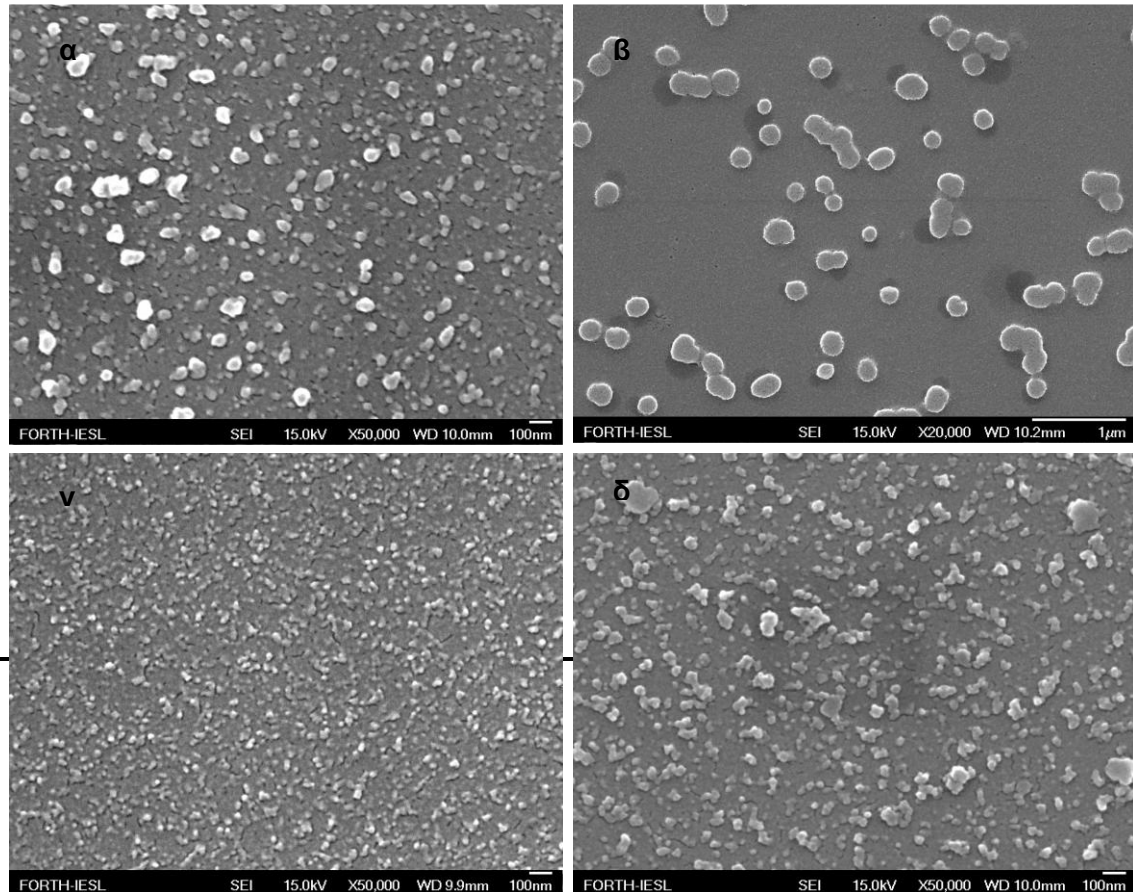
Παρατηρήθηκε (Σχήμα 38) η εμφάνιση κορυφών που αντιστοιχούν στην έκταση χαρακτηριστικών δεσμών της δομικής μονάδας της (πολυ)καπρολακτόνης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η κορυφή α που οφείλεται στην μη συμμετρική έκταση του δεσμού C-H της ομάδας CH<sub>2</sub>, η κορυφή β οφείλεται στη συμμετρική έκταση του δεσμού C-H της ομάδας CH<sub>2</sub>, η κορυφή γ οφείλεται στην έκταση του δεσμού C=O, η κορυφή δ οφείλεται στη μη συμμετρική έκταση του δεσμού C-O-C, η κορυφή ε οφείλεται στην έκταση του δεσμού O-CO και η κορυφή x που παρουσιάζεται μόνο στο προϊόν **XII** και οφείλεται στην έκταση του δεσμού C-H του άνθρακα του τριπλού δεσμού της άλλυλο-(πολυ)καπρολακτόνης (Πίνακας 4).

cm <sup>-1</sup>	Κορυφή α (asymmetric CH <sub>2</sub> stretch)	Κορυφή β (symmetric CH <sub>2</sub> stretch)	Κορυφή γ (C=O stretch)	Κορυφή δ (asymmetric COC stretch)	Κορυφή ε (O-CO stretch)	Κορυφή x (C-H stretch of triple bond)
<b>Προϊόν IX</b>	2939.9	2861.9	1731.9	1234.9	1159.1	-
<b>Προϊόν X</b>	2942.1	2864.1	1731.9	1234.9	1161.3	-
<b>Προϊόν XI</b>	2939.9	2861.9	1729.6	1234.9	1159.1	-
<b>Προϊόν XII</b>	2942.1	2861.9	1731.9	1237.1	1159.1	3298.7

**Πίνακας 4.** Αναλυτική ανάθεση κορυφών για τις περιοχές α, β, γ, δ και x βάσει του Σχήματος 38.

### Γ.3 Μελέτη της Συσσωμάτωσης των Προϊόντων με Μικροσκοπία

Τα προϊόντα της αντίδρασης μελετήθηκαν με μικροσκοπία. Τα μικρογραφήματα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης εκπομπής πεδίου (FE-SEM) στο Σχήμα 39.



**Σχήμα 39.** Μικρογραφίες FE-SEM Εικόνα: (α) προϊόν IX, (β) προϊόν X σε, (γ) προϊόν XI, (δ) προϊόν XII, σε νερό.

Όπως φαίνεται και στις μικρογραφίες (Σχήμα 39), τα προϊόντα δημιουργούν σφαιρικές δομές με διάμετρο που κυμαίνεται από 20 έως 150 nm. Παρόμοιες δομές παρατηρήθηκαν σχεδόν σε όλα τα προϊόντα που μετρήθηκαν στο νερό. Το σχήμα και το μέγεθος των δομών παραπέμπει σε μικύλλια ή κυστίδια και συμφωνεί με δομές που είχαν παρατηρηθεί στο παρελθόν για αμφίφιλα της BSA.

Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στην δημιουργία βιοϋβριδικών νανοδομών. Περαιτέρω πειράματα βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριο για να επιβεβαιώσουν ή να απορρίψουν αυτή την promiscuous συμπεριφορά της Novozym® 435.

## Δ. Συμπεράσματα

Κεντρική ιδέα της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η σύνθεση μίας νέας γενιάς *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων* με μία προσέγγιση η οποία σχεδιάστηκε έτσι ώστε να συνδυάσει τα πλεονεκτήματα του *grafting from* πολυμερισμού με μη τοξικά αντιδραστήρια και να δημιουργήσει για πρώτη φορά βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα βιοϋβρίδια.. Με αυτούς τους στόχους σχεδιάστηκε μία προσέγγιση που βασίστηκε σε ενζυμική κατάλυση πολυμερισμού διάνοιξης ε-καπρολακτόνης και παραγώγων της από έναν βιοεκκινητή (BSA-PEG-OH), και συντέθηκαν επιτυχώς βιοσυμβατά *Γιγάντια Αμφίφιλα Μόρια* τα οποία συνδυάζουν την ικανότητα αυτοοργάνωσης με την ικανότητα αποικοδόμησης υπό κατάλληλες συνθήκες. Κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης, βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες του ενζυμικά καταλυόμενου πολυμερισμού της καπρολακτόνης ο οποίος έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία, ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία και σε βιοεκκινητές διασφαλίζοντας παράλληλα καλές αποδόσεις και απουσία παραπροϊόντων.

Αναλυτικότερα, διεξάχθηκε μία σειρά λευκών πειραμάτων που είχαν στόχο να πιστοποιήσουν την επιτυχία του πολυμερισμού της ε-καπρολακτόνης από τον βιοεκκινητή και να προσδιορίσουν τις βέλτιστες για την αντίδραση συνθήκες. Διασφαλίστηκε μέσω αυτών των πειραμάτων ότι οι λειτουργικές ομάδες που βρίσκονται στην φυσική BSA δεν είναι δραστικές ως προς την εκκίνηση του πολυμερισμού καθώς επίσης και ότι η BSA δεν μπορεί να δράσει σαν καταλύτης για τον πολυμερισμό. Αποδείχθηκε επιπλέον ότι το νερό ανταγωνίζεται τον εκκινητή και επομένως είναι σημαντική η διεξαγωγή της αντίδρασης σε συνθήκες στις οποίες η περιεκτικότητα σε νερό είναι ελάχιστη, ώστε να διατηρούν τα βιομόρια την τρισδιάστατη, λειτουργική τους διαμόρφωση και να εκκινείται ο πολυμερισμός από την λειτουργική υδροξυλομάδα του εκκινητή.

Η σύνθεση του ROP βιοεκκινητή **I** ήταν επιτυχής και οδήγησε στη σύνθεση βιοϋβριδίων μέσω του καταλυόμενου από λιπάση (Novozym® 435) ROP πολυμερισμού της ε-καπρολακτόνης και της ο-αλλυλο-καπρολακτόνης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν παρουσία/απουσία τολουολίου, μελετήθηκαν δύο διαφορετικά μονομερή, διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης (Συνθήκες A και B) και ο εγκλεισμός φθορίζουσων ουσιών όπως η φλουορεσίνη. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά για όλες τις αντιδράσεις και η σύνθεση των *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων* έγινε με καλές αποδόσεις όπως επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια SEC-HPLC χρωματογραφίας, ηλεκτροφόρησης με ηλεκτρική (πολυ)ακρυλαμίδιου και FT-IR φασματοσκοπίας.

Επιπρόσθετα, με μεθόδους μικροσκοπίας (HR-TEM και FE-SEM) μελετήθηκε η αρχιτεκτονική της αυτοοργάνωσης των *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων*. Με TEM παρατηρήθηκε ότι τα βιοϋβρίδια αυτόοργανώνονται σε ενδιαφέρουσες δομές με σφαιρική αρχιτεκτονική στο νερό με διάμετρο που κυμαίνεται από 20 έως 150 nm. Παρόμοιες δομές παρατηρήθηκαν σχεδόν σε όλα τα προϊόντα που μελετήθηκαν στο νερό. Το σχήμα και το μέγεθος των δομών παραπέμπει σε μικύλλια ή κυστίδια και είναι σε συμφωνία με τις δομές που είχαν παρατηρηθεί στο παρελθόν για άλλα αμφίφιλα της BSA. Δομές ίδιας αρχιτεκτονικής παρατηρήθηκαν και με FE-SEM. Αντίθετα, όταν μελετήθηκε η αυτοοργάνωση σε τολουόλιο, χαρακτηριστικός ήταν ο σχηματισμός



πολυμεμβρανικών επιφανειών. Η αλλαγή του διαλύτη από νερό (φιλικός προς το ένζυμο) σε οργανικό (φιλικός προς το υδρόφοβο πολυμερές) έχει και στο παρελθόν δείξει αλλαγή της αρχιτεκτονικής της αυτοοργάνωσης των *Γιγάντιων Αμφίφιλων*.

Μετά την επιτυχή σύνθεση των *Γιγάντιων Αμφίφιλων* μελετήθηκε η δυνατότητα της ενζυμικά καταλυόμενης αποικοδόμησης των σχηματιζόμενων νανοδομών, με στόχο να δειχθεί αν θα μπορούσαν να αποτελέσουν νανοαντιδραστήρες ή νανοκάψουλες για την αποδέσμευση ουσιών σε έμβιους οργανισμούς. Η μελέτη αποικοδόμησης των δομών πραγματοποιήθηκε σε νερό και ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων και ήπιες συνθήκες. Η χρωματογραφία SEC-HPLC επιβεβαίωσε την ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση υδρόλυσης και στις δύο περιπτώσεις.

Τα πειράματα που περιλαμβάνονται σε αυτή την εργασία επιβεβαίωσαν τον αρχικό σχεδιασμό. Δείχθηκε ότι είναι εφικτή η ενζυμικά καταλυόμενη δημιουργία *Γιγάντιων Αμφίφιλων Μορίων* καθώς και ότι τα *Γιγάντια Αμφίφιλα* που προκύπτουν είναι βιοδιασπώμενα. Επιπλέον, η συνολική μελέτη επιβεβαιώνει την πιθανή χρηστικότητα των νανοδομών αυτών σε βιοϊατρικές και φαρμακολογικές εφαρμογές στις οποίες η σύνθεση (ROP πολυμερισμός) γίνεται απουσία νερού και επιτρέπει τον εγκλεισμό ουσιών προς μεταφορά, ενώ η αποικοδόμηση (υδρόλυση) γίνεται παρουσία νερού και έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωσή τους. Και οι δύο διαδικασίες είναι εξίσου σημαντικές και καταλύονται από τη Novozym® 435.

Στα πλαίσια των μελετών και για τις ανάγκες των λευκών πειραμάτων συντέθηκε και η ένωση BSA-PEG-OMe. Η αδυναμία έναρξης ROP πολυμερισμού από τη μεθόξυ ομάδα του βιοϋβριδίου θα μπορούσε να στηρίξει επιπλέον τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες παραγράφους. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε η σύνθεση προϊόντων και η αρχιτεκτονική αυτοοργάνωσή τους σε σφαιρικές δομές με διάμετρο που κυμαίνεται από 20 έως 150 nm. Παρόμοιες δομές παρατηρήθηκαν σχεδόν σε όλα τα προϊόντα που μετρήθηκαν στο νερό. Περαιτέρω πειράματα βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριο για να επιβεβαιώσουν ή να απορρίψουν αυτή την promiscuous συμπεριφορά της Novozym® 435.

### Πειραματικό μέρος

#### 3.1 Αντιδραστήρια

Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν των εταιριών Fisher Scientific, Fluka Chemica, Sigma-Aldrich, Merck, Polysciences, Inc. και δεν χρειάστηκαν περαιτέρω καθαρισμό εκτός και αν αναφέρεται το αντίθετο. Την Bovine Serum Albumin (BSA) την προμηθευτήκαμε από την AppliChem και τη Novozym 435 από την Novozymes. Για τη μέθοδο της διαπίδυσης χρησιμοποιήσαμε μεμβράνες (Biotech Regenerated Cellulose Dialysis Membranes), MWCO 10 και 25 kDa της εταιρίας Spectrum Labs. Η σύνθεση της ο-αλλυλο-καπρολακτόνης έγινε από τον Dr. Vincent Darcos (Max Mousseron Institute of Biomolecules, UMR, CNRS, University of Montpellier, Faculty of Pharmacy).

#### 3.2 Αναλυτικές Τεχνικές

##### **Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC)**

Χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφικό σύστημα της Shimadzu: DGU-14A απαερωτή διαλύτη, LC-10AD αντλία, CTO-10A φούρνο κολώνας, SIL-10AD αυτόματο εισαγωγή δείγματος, RID-10A ανιχνευτή δείκτη διάθλασης και SPD-10A U.V. Vis φασματογράφο. Το σύστημα ήταν εξοπλισμένο με Polymer Laboratories 30 x 7.8 mm 5 μm BioBasic SEC-300 κολώνα. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν μείγμα αποτελούμενο από 90% ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 5 mM με pH 7.4 σε milliQ το οποίο το φιλτράραμε και 10% ακετονιτρίλιο. Τα χρωματογραφήματα έγιναν σε μήκος κύματος 254 nm και επεξεργάστηκαν με το EZStart 7.3 λογισμικό χρωματογραφίας. Για την προετοιμασία των δειγμάτων και την αραιώσή τους χρησιμοποιήσαμε διάλυμα από 80% ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 5 mM με pH 7.4 σε milliQ και 20% DMSO.

##### **Ηλεκτροφόρηση**

Το σύστημα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήσαμε ήταν το Mini-PROTEAN Tetra Cell της εταιρίας BIO-RAD. Η ηλεκτροφόρηση με Native Polyacrilamide Gel έγινε σε 4% stacking gel και 10% resolving gel υπό φυσικές συνθήκες. Η χρώση των gels έγιναν με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue.

##### **Φασματοσκοπία υπερύθρου**

Η καταγραφή των φασμάτων ATR-FT-IR έγινε σε οπτικό φωτόμετρο Thermo-Electron Nicolet 6700 FT-IR με ανιχνευτή DTGS KBr και διακριτική ικανότητα  $2 \text{ cm}^{-1}$ .

##### **Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης Εκπομπής Πεδίου FE-SEM**

Η μελέτη της αυτοοργάνωσης με FESEM έγινε με JEOL 7000F FESEM μικροσκόπιο.

##### **Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης**

Η μελέτη της αυτοοργάνωσης με HR-TEM έγινε με JEOL 2100 TEM μικροσκόπιο.

### 3.3 Αναλυτικές Μέθοδοι Σύνθεσης

#### 3.3.1 Σύνθεση τροποποιημένης με πολυ(αιθυλενογλυκόλης) 1

Σε μία γυάλινη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 0.386 gr (1.47 mmol) τριφαινυλοφωσφίνης, 2 ml ξηρού THF και η θερμοκρασία του διαλύματος που προέκυψε ρυθμίστηκε στους  $-78^{\circ}\text{C}$  με τη βοήθεια λουτρού ξηρού πάγου-ακετόνης. Σε αυτό το διάλυμα προστέθηκαν 670  $\mu\text{l}$  (4.27 mmol) diethylazodicarboxylate, υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου, με τη βοήθεια σύριγγας και το διάλυμα αφέθηκε για πέντε λεπτά υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, προστέθηκε σε διάστημα μίας ώρας διάλυμα πολυ(αιθυλενογλυκόλης) 124 mM (6.483 gr, 1.62 mmol,  $M_w = 4000$  gr/mol, 9 ml ξηρό THF και 4ml ξηρό διχλωρομεθάνιο) με τη βοήθεια προσθετικής φιάλης. Τα υπολείμματα του διαλύματος της πολυ(αιθυλενογλυκόλης προστέθηκαν στο διάλυμα της αντίδρασης με τη βοήθεια 1.2 ml ξηρού THF. Μετά την προσθήκη του διχλωρομεθανίου το διάλυμα της αντίδρασης πάγωσε με αποτέλεσμα να χρειαστεί περαιτέρω χρόνο ανάδευσης ώστε να ξεπαγώσει. Για να βοηθήσουμε τη διαδικασία, το λουτρό ξηρού πάγου-ακετόνης αντικαταστάθηκε με λουτρό πάγου-ακετόνης και προστέθηκαν επιπλέον 3 ml ξηρού διχλωρομεθανίου έως ότου ξεπαγώσει το διάλυμα. Με το πέρας πέντε λεπτών ανάδευσης του διαλύματος που προέκυψε, προστέθηκαν διαδοχικά διάλυμα 2,2-διμέθυλο-1-προπανόλης 415 mM (0.074 gr, 0.83 mmol, σε 2 ml ξηρού THF) και διάλυμα μαλεϊμιδίου 735 mM (0.143 gr, 1.47 mmol, 2 ml ξηρό THF). Το διάλυμα της αντίδρασης αναδεύτηκε ακόμα πέντε λεπτά σε λουτρό πάγου-ακετόνης και στη συνέχεια αφέθηκε μέχρι την επίτευξη θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Το τελικό προϊόν απομονώθηκε με τη βοήθεια καταβύθισης. Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αντίδρασης ακολούθησε χαρακτηρισμός του προϊόντος με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας και της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.  $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz):  $\delta$  3.350 (t,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ),  $\delta$  3.595 (t,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $\delta$  3.822 (t,  $\text{CH}_2\text{N}$ ),  $\delta$  6.625 (s,  $\text{C}=\text{CH}$ ).

#### 3.3.2 Σύνθεση του BSA-μακροεκκινητή I

Σε πρώτο στάδιο, προετοιμάστηκε διάλυμα BSA 0.35 mM σε 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4). Στη συνέχεια, προετοιμάστηκε διάλυμα του τροποποιημένου Μαλεϊμιδο-ROP εκκινητή 1 (128 mM, 180  $\mu\text{l}$ ) σε DMSO και ακολούθησε στάγδιν προσθήκη του στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Το μίγμα της αντίδρασης τέθηκε υπό ελαφρά ανάδευση για 48 ώρες, στους  $25^{\circ}\text{C}$ . Το τελικό προϊόν απομονώθηκε με τη μέθοδο της διαπίδυσης αρχικά ως προς 5 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4) και τελικά ως προς 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4). Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν όριο μοριακού βάρους MWCO 10 kDa (regenerated cellulose dialysis membranes). Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με ηλεκτροφόρηση κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η τελική ποσότητα του προϊόντος χωρίστηκε σε ποσότητες του 1 ml και τοποθετήθηκε σε κατάλληλα δοχεία για λυοφιλοποίηση. Τα λυοφιλοποιημένα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και ήταν σταθερά για χρήση για αρκετούς μήνες. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές και FE-SEM μικροσκοπία.

### 3.3.3 Σύνθεση του BSA-μακροεκκινητή Ια

Σε πρώτο στάδιο, προετοιμάστηκε διάλυμα BSA 0.35 mM σε 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4). Στη συνέχεια, προετοιμάστηκε διάλυμα της O-(μαλεϊμιδοεθυλ)-O'-μεθλ-πολυεθυλενογλυκόλη (128 mM, 180 μl) σε DMSO και ακολούθησε στάγδιν προσθήκη του στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Το μίγμα της αντίδρασης τέθηκε υπό ελαφρά ανάδευση για 48 ώρες, στους 25 °C. Το τελικό προϊόν απομονώθηκε με τη μέθοδο της διαπίδωσης αρχικά ως προς 5 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4) και τελικά ως προς 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4). Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν όριο μοριακού βάρους MWCO ~10 kDa (regenerated cellulose dialysis membranes). Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με ηλεκτροφόρηση κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η τελική ποσότητα του προϊόντος χωρίστηκε σε ποσότητες του 1 ml και τοποθετήθηκε σε κατάλληλα δοχεία για λυοφιλοποίηση. Τα λυοφιλοποιημένα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C και ήταν σταθερά για χρήση για αρκετούς μήνες. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές και FE-SEM μικροσκοπία.

### 3.3.4 ROP πολυμερισμός - προϊόν ΙΙ

Σε ένα γυάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκαν ο BSA-μακροεκκινητής Ι (0.0875 μmol) και 8 mg Novozym® 435. Σε μία φιάλη Schlenk τοποθετήθηκαν μοριακά κόσκινα με διάμετρο οπής 4Å, ένα γυάλινο φιαλίδιο που περιείχε θεικό μαγνήσιο, ένα γυάλινο φιαλίδιο που περιείχε πεντοξείδιο του φωσφόρου και το αρχικό φιαλίδιο με τον BSA-μακροεκκινητή Ι και το ένζυμο-καταλύτη. Η φιάλη Schlenk τοποθετήθηκε σε υψηλό κενό για 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και 2 ώρες στους 60°C, ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία των περιεχομένων της. Στη συνέχεια, στο φιαλίδιο με τον BSA-μακροεκκινητή Ι και το καταλύτη προστέθηκαν 200 μl (1.8 mmol) ξηρής ε-καπρολακτόνης και 100 μl ξηρό τολουόλιο. Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση για 2 ημέρες υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Με το πέρας των 2 ημερών έγινε τερματισμός της αντίδρασης με απομάκρυνση της Novozym® 435 μέσω διήθησης. Το τελικό προϊόν ήταν στερεό. Πριν από κάθε μέτρηση για τον χαρακτηρισμό του προϊόντος γινόταν καθαρισμός με τη μέθοδο της διαπίδωσης αρχικά ως προς 5 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4) και τελικά ως προς 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4) ή τολουόλιο. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν όριο μοριακού βάρους MWCO ~25 kDa (regenerated cellulose dialysis membranes). Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες και η συσσωμάτωση μελετήθηκε με μικροσκοπία TEM και FE-SEM.

### 3.3.5 ROP πολυμερισμός - προϊόν ΙΙΙ

Η πειραματική διαδικασία είναι ανάλογη της διαδικασίας σύνθεσης του προϊόντος ΙΙ, με τη διαφορά ότι στο διάλυμα της αντίδρασης προστέθηκαν 2 μl, 100 mM διαλύματος χρωστικής fluorescein. Ο καθαρισμός είναι ανάλογος με αυτόν του προϊόντος ΙΙ. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές και η συσσωμάτωση αυτού με TEM και FE-SEM μικροσκοπία.

### **3.3.6 ROP πολυμερισμός - προϊόν IV**

Η πειραματική διαδικασία είναι ανάλογη της διαδικασίας σύνθεσης του προϊόντος **II**, με τη διαφορά ότι η αντίδραση πραγματοποιήθηκε απουσία διαλύτη. Ο καθαρισμός είναι ανάλογος με αυτόν του προϊόντος **II**. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές και η συσσωμάτωση αυτού με TEM και FE-SEM μικροσκοπία.

### **3.3.7 ROP πολυμερισμός - προϊόν V**

Η πειραματική διαδικασία είναι ανάλογη της διαδικασίας σύνθεσης του προϊόντος **II**, με τη διαφορά ότι στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης προστέθηκαν 40 μl (0.288 mmol) ο-αλλυλο-καπρολακτόνης (αναλογία ε-CP/ο-αλλυλο-CP 1:0.16). Ο καθαρισμός είναι ανάλογος με αυτόν του προϊόντος **II**. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές και η συσσωμάτωση αυτού με TEM και FE-SEM μικροσκοπία.

### **3.3.8 ROP πολυμερισμός - προϊόν VI**

Σε μία γυάλινη σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν ο BSA-μακροεκκινητής **I** (0.0875 μmol) και 0.007 gr ενζύμου, Novozym® 435. Η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε υψηλό κενό για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία που περιεχομένων της. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 μl (0.451 mmol) ξηρής ε-καπρολακτόνης και 100μl ξηρό τολουόλιο. Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση για 8 ώρες υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Με το πέρας των 8 ωρών έγινε τερματισμός της αντίδρασης με απομάκρυνση της Novozym® 435 μέσω διήθησης. Το τελικό προϊόν ήταν στερεό. Πρίν από κάθε μέτρηση για τον χαρακτηρισμό του προϊόντος γινόταν καθαρισμός με τη μέθοδο της διαπίδυσης αρχικά ως προς 5 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4) και τελικά ως προς 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4) ή τολουόλιο. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν όριο μοριακού βάρους MWCO ~25 kDa (regenerated cellulose dialysis membranes). Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες και η συσσωμάτωση μελετήθηκε με μικροσκοπία TEM και FE-SEM.

### **3.3.9 ROP πολυμερισμός - προϊόν VII**

Η πειραματική διαδικασία είναι ανάλογη της διαδικασίας σύνθεσης του προϊόντος **VI**, με τη διαφορά ότι η αντίδραση πραγματοποιήθηκε απουσία διαλύτη. Ο καθαρισμός είναι ανάλογος με αυτόν του προϊόντος **VI**. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές και η συσσωμάτωση αυτού με TEM και FE-SEM μικροσκοπία.

### **3.3.10 ROP πολυμερισμός για το προϊόν VIII**

Η πειραματική διαδικασία είναι ανάλογη της διαδικασίας σύνθεσης του προϊόντος **VI**, με τη διαφορά ότι στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης προστέθηκαν 10 μl (0.072 mmol) ο-αλλυλο-καπρολακτόνης (αναλογία ε-CP/ο-αλλυλο-CP 1:0.16). Ο καθαρισμός είναι ανάλογος με αυτόν του προϊόντος **VI**. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές και η συσσωμάτωση αυτού με TEM και FE-SEM μικροσκοπία.

### 3.3.11 Μελέτη Συμπεριφοράς Φυσικής BSA σε Συνθήκες ROP

Σε μία γυάλινη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν η πρωτεΐνη (10 mg), 400 μl (3.6096 mmol) ξηρή ε-καπρολακτόνη και 9mg ενζύμου. Η αντίδραση αφείθηκε υπό ανάδευση για 24 ώρες στους 60°C. Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός ότι το διάλυμα της αντίδρασης δεν επέδειξε αύξηση ιξώδους. Ο καθαρισμός είναι ανάλογος με αυτόν του προϊόντος VI.O χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία και ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες.

### 3.3.12 Μελέτη Απουσία Βιοεκκινητή: Εκκίνηση ROP Πολυμερισμού από Ίχνη Νερού του Περιβάλλοντος της Αντίδρασης

Σε ένα γυάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 5mg Novozym® 435. Σε μία φιάλη Schlenk τοποθετήθηκαν μοριακά κόσκινα με διάμετρο οπής 4Å, θεικό μαγνήσιο και το αρχικό φιαλίδιο το ένζυμο-καταλύτη. Η φιάλη Schlenk τοποθετήθηκε σε υψηλό κενό για 7 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία των περιεχομένων της. Στη συνέχεια, στο φιαλίδιο με τον καταλύτη προστέθηκαν 200μl (1.8 mmol) ξηρής ε-καπρολακτόνης. Το μίγμα της αντίδρασης αφείθηκε υπό ανάδευση για 2 ημέρες υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Με το πέρας των 2 ημερών έγινε τερματισμός της αντίδρασης με απομάκρυνση της Novozym® 435 μέσω διήθησης. Το τελικό προϊόν ήταν στερεό. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με <sup>1</sup>HNMR φασματοσκοπία. <sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): δ 1.362 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), δ 2.260 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), δ 2.260 (t, CH<sub>2</sub>C=O), δ 3.602 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), δ 4.022 (t, OCH<sub>2</sub>), δ 4.093 (t, CH<sub>2</sub>OH).

### 3.3.13 Μελέτη συμπεριφοράς ε-καπρολακτόνης σε συνθήκες ROP Πολυμερισμού Απουσία Καταλυτικού Ενζύμου (Novozym® 435)

Σε ένα γυάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκε ο BSA-μακροεκκινητής I (0.0875 μmol). Σε μία φιάλη Schlenk τοποθετήθηκαν μοριακά κόσκινα με διάμετρο οπής 4Å, θεικό μαγνήσιο και το αρχικό φιαλίδιο με τον BSA-μακροεκκινητή I. Η φιάλη Schlenk τοποθετήθηκε σε υψηλό κενό για 7 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία των περιεχομένων της. Στη συνέχεια, στο φιαλίδιο με τον BSA-μακροεκκινητή I προστέθηκαν 200 μl (1.8 mmol) ξηρής ε-καπρολακτόνης. Το μίγμα της αντίδρασης αφείθηκε να αναδεύεται για 2 ημέρες υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία.

### 3.3.14 Ενζυμικά Καταλύσιμη Αποικοδόμηση Πολυκαπρολακτόνης

Σε μία γυάλινη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 101mg polycaprolactone diol (MW 2000), και 1 ml απιονισμένο νερό ή φωσφορικό διάλυμα αλάτων pH 7.46 mg (20 mM) και 6mg Novozym® 435. Η αντίδραση αφείθηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 30°C. Ο χαρακτηρισμός του εκάστοτε προϊόντος έγινε με <sup>1</sup>HNMR.

### 3.4.1 Ενζυμικά Καταλύσιμη Αποικοδόμηση Πολυκαπρολακτόνης

Σε μία γυάλινη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 5 Novozym® 435 και όλο η το προϊόν από μία αντίδραση η διαδικασία της οποίας περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3.4. Η αντίδραση αφείθηκε υπό ανάδευση για 10 ημερες στους 30°C. Ο έλεγχος της πορεία της αντίδρασης έγινε με SEC χρωματογραφία.

### 3.4.2 Προϊόν IX

Σε μία γυάλινη φιάλη τοποθετήθηκε ο BSA-μακροεκκινητής **Ia** (0.0875  $\mu\text{mol}$ ), 6 mg Novozym® 435 και μοριακά κόσκινα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν ξηρή 100  $\mu\text{l}$  (0.902 mmol) ε-καπρολακτόνη και 100 $\mu\text{l}$  ξηρό τολουόλιο. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 12 ώρες υπό αδρανείς συνθήκες αζώτου και θερμοκρασία 60°C. Σε όλες τις επιτυχείς αντιδράσεις παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του διαλύματος της αντίδρασης (ενώ σε μερικές περιπτώσεις το μείγμα της αντίδρασης στερεοποιήθηκε μετά από ορισμένο χρόνο επώασης). Με το πέρας των 12 ωρών έγινε τερματισμός της αντίδρασης με απομάκρυνση της Novozym® 435 μέσω διήθησης. Το τελικό προϊόν ήταν στερεό. Πρίν από κάθε μέτρηση για τον χαρακτηρισμό του προϊόντος γινόταν καθαρισμός με τη μέθοδο της διαπίδωσης αρχικά ως προς 5 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4) και τελικά ως προς 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH7.4). Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν όριο μοριακού βάρους MWCO ~25 kDa Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες και η συσσωμάτωση μελετήθηκε με μικροσκοπία FE-SEM.

### 3.4.3 Προϊόν X

Η πειραματική διαδικασία είναι ανάλογη της διαδικασίας σύνθεσης του προϊόντος **IX**, με τη διαφορά ότι στο διάλυμα της αντίδρασης προστέθηκαν 2  $\mu\text{l}$ , 100 mM διαλύματος χρωστικής fluorescein. Ο καθαρισμός είναι ανάλογος με αυτόν του προϊόντος **IX**. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές και η συσσωμάτωση αυτού με TEM και FE-SEM μικροσκοπία.

### 3.4.4 Προϊόν XI

Η πειραματική διαδικασία είναι ανάλογη της διαδικασίας σύνθεσης του προϊόντος **IX**, με τη διαφορά ότι η αντίδραση πραγματοποιήθηκε απουσία διαλύτη. Ο καθαρισμός είναι ανάλογος με αυτόν του προϊόντος **II**. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές και η συσσωμάτωση αυτού με TEM και FE-SEM μικροσκοπία.

### 3.4.5 Προϊόν XII

Η πειραματική διαδικασία είναι ανάλογη της διαδικασίας σύνθεσης του προϊόντος **IX**, με τη διαφορά ότι στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης προστέθηκαν 20  $\mu\text{l}$  (0.144 mmol) ο-αλλυλο-καπρολακτόνης (αναλογία ε-CP/ο-αλλυλο-CP 1:0.17). Ο καθαρισμός είναι ανάλογος με αυτόν του προϊόντος **II**. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος έγινε με SEC χρωματογραφία, FT-IR φασματοσκοπία, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές και η συσσωμάτωση αυτού με FE-SEM μικροσκοπία.

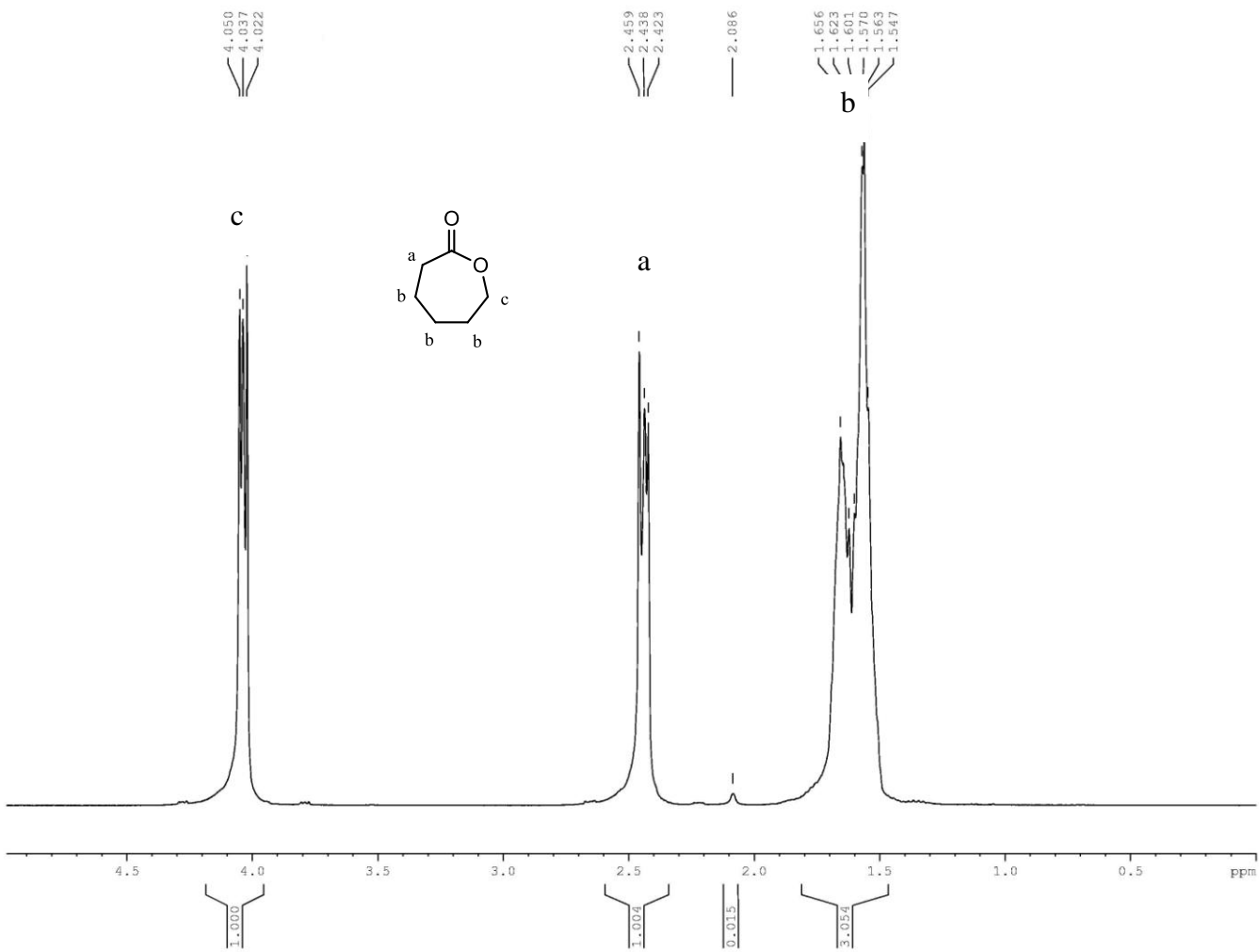
- <sup>1</sup> H. Z. Zeng, *Current Opinion in Chemical Engineering* **2012**,*1*, 89–90 καθώς και όλες οι αναφορές στο συγκεκριμένο τεύχος που είναι αφιερωμένο στη νανοτεχνολογία.
- <sup>2</sup> A. W. Rutherford, T. A. Moore, *Nature* **2008**, 453, 449.
- <sup>3</sup> B. Alberts, L. Johnson, R. Roberts, , Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, τόμος Β, 409-410, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- <sup>4</sup> K. Velonia, J.J.L.M.Cornelissen, M.C. Feiters, A. E. Rowan, R.J.M.Nolte *Supramolecular Self-Assembly*. Chapter in *Nanoscale Assembly, Chemical Techniques*, Series: Nanostructure Science and Technology, Huck, Wilhelm T.S. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, **2005**, 119-185.
- <sup>5</sup> D.J. Israelachvili, Mitchell, B. W. Winham, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1976**, 2, 1525-1568.
- <sup>6</sup> D. J. Israelachvili, S.Maeclja, R.G. Horn, *Q. Rev. Biophys.* **1980**, 13, 121-200.
- <sup>7</sup> Kyoung Taek Kim, Silvie A. Meeuwissen, Roeland J. M. Nolte, Jan C. M. van Hest, *Nanoscale*, **2010**, 2, 844–858.
- <sup>8</sup> D.M. Vriezema, J. Hoogboom, K. Velonia, K. Takazawa, P.C.M. Christianen, J.C. Maan, A.E. Rowan, R.J.M. Nolte *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 772-776.
- <sup>9</sup> B. Le Droumaguet, G. Mantovani, D.M. Haddleton, K. Velonia *J. Mater. Chem.*, **2007**, 17, 1916-1922.
- <sup>10</sup> B. Le Droumaguet, K.Velonia *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 6263-6266.
- <sup>11</sup> E.Daskalaki, B. Le Droumaguet, D.Gérard, K.Velonia, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 1586-1588.
- <sup>12</sup> Martin E. Lyngge , Rebecca van der Westen , Almar Postma and Brigitte Städler, *Nanoscale*, **2011**, 3, 4916-4928.
- <sup>13</sup> Zhongyue Sun , Cuiping Han , Long Wen , Demei Tian , Haibing Li and Lei Jiang *Chem. Commun.*, **2012**.
- <sup>14</sup> <http://en.wikipedia.org/wiki/Amphiphile>
- <sup>15</sup> Γενικά με τον όρο “*ιεραρχική αυτοοργάνωση*” εννοούμε τον σχηματισμό μίας οργανωμένης υπερδομής μέσω διαφορετικών, διακριτών επιπέδων διεργασιών αυτοοργάνωσης που διαφέρουν στην ισχύ.
- <sup>16</sup> G.M. Whitesides et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2002**, 99, 4769
- <sup>17</sup> I.S. Choi, N. Bowden, G. M. Whitesides *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 3078-3081.
- <sup>18</sup> a) H. Gao, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2006**, 39, 4960; b) Q. Liu, P. Zhao, Y. Chen, *J. Polym. Sci. Part A.* **2007**, 45, 3330; c) C. N. Urbani, C. A. Bell, D. Lonsdale, M. R. Whittaker, M. J. Monteiro, *Macromolecules* **2008**, 41, 76; d) J. A. Johnson, M. G. Finn, J. T. Koberstein, N. J. Turro, *Macromolecules* **2007**, 40, 3589; e)W. Van Camp, V. Germonpre, L. Mespouille, P. Dubois, E. J. Goethals, F. E. Du Prez, *React. Funct. Polym.* **2007**, 67, 1168; f) X. He, L. Liang, M. Xie, Y. Zhang, S. Lin, D. Yan, *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, 208, 1797; g) H. Gao, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6633; h) V. Ladmiral, G. Mantovani, J. Clarkson Guy, S. Cauet, L. Irwin Jacob, M. Haddleton David, J. Am. Chem. Soc. **2006**, 128, 4823; i) B. A. Laurent, S. M. Grayson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4238; j) J.- F. Lutz, H. G. Boerner, K. Weichenhan, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, 26, 514; k) J. Geng, J. Lindqvist, G. Mantovani, G. Chen, C. T. Sayers, G. J. Clarkson, D. M. Haddleton, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, 26, 1220; l) J. Geng, G. Mantovani, L. Tao, J. Nicolas, G. Chen, R. Wallis, D. A. Mitchell, B. R. G. Johnson, S. D. Evans, D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15156.
- <sup>19</sup> F. Ahmed, P. J. Photos, D. E. Discher *Drug Dev. Res.* **2006**, 67, 4-14.
- <sup>20</sup> A. V. Kabanov, T. K. Bronich, V. A. Kabanov, K. Yu, A. Eisenberg *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9941-9942.

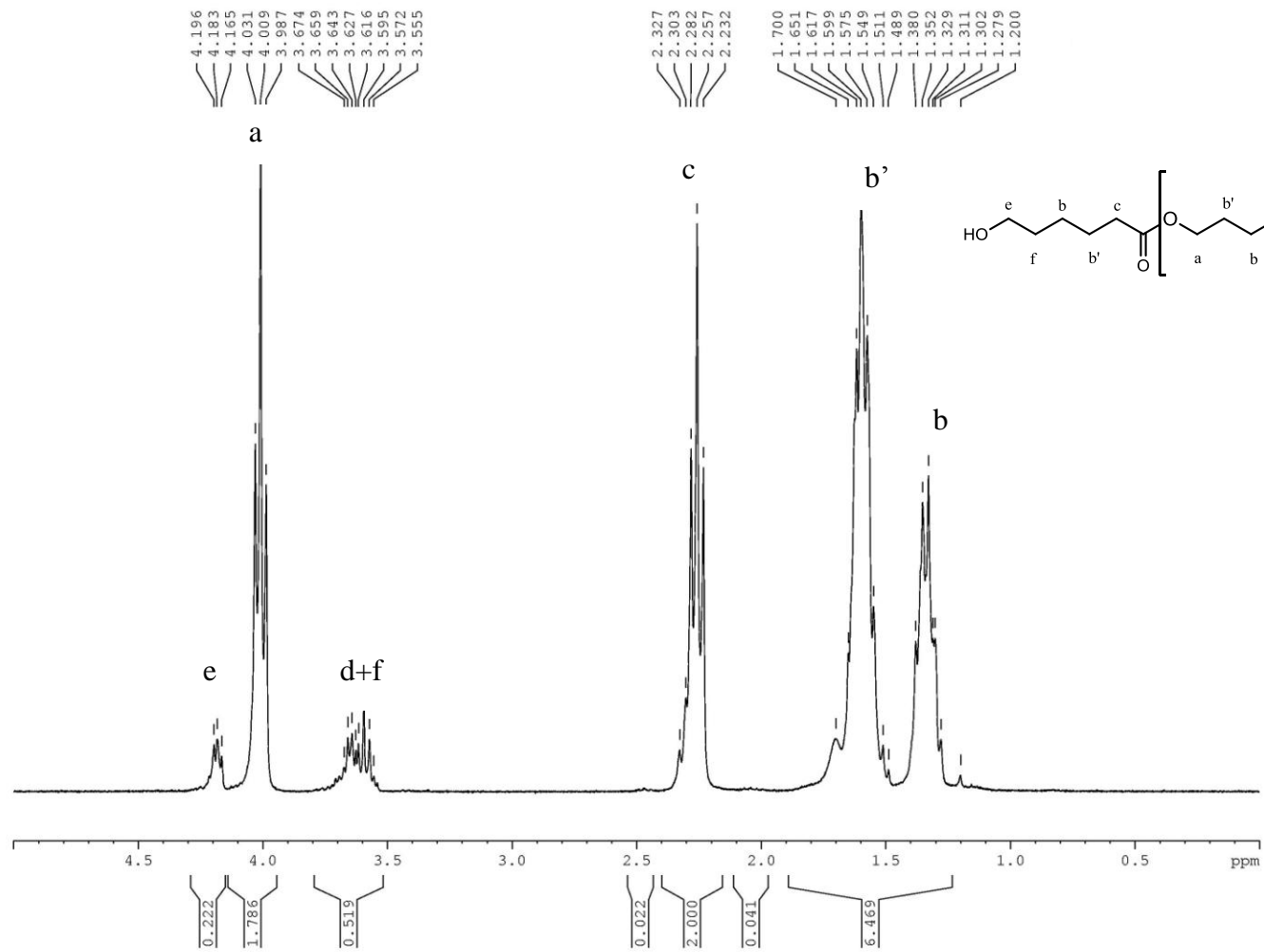


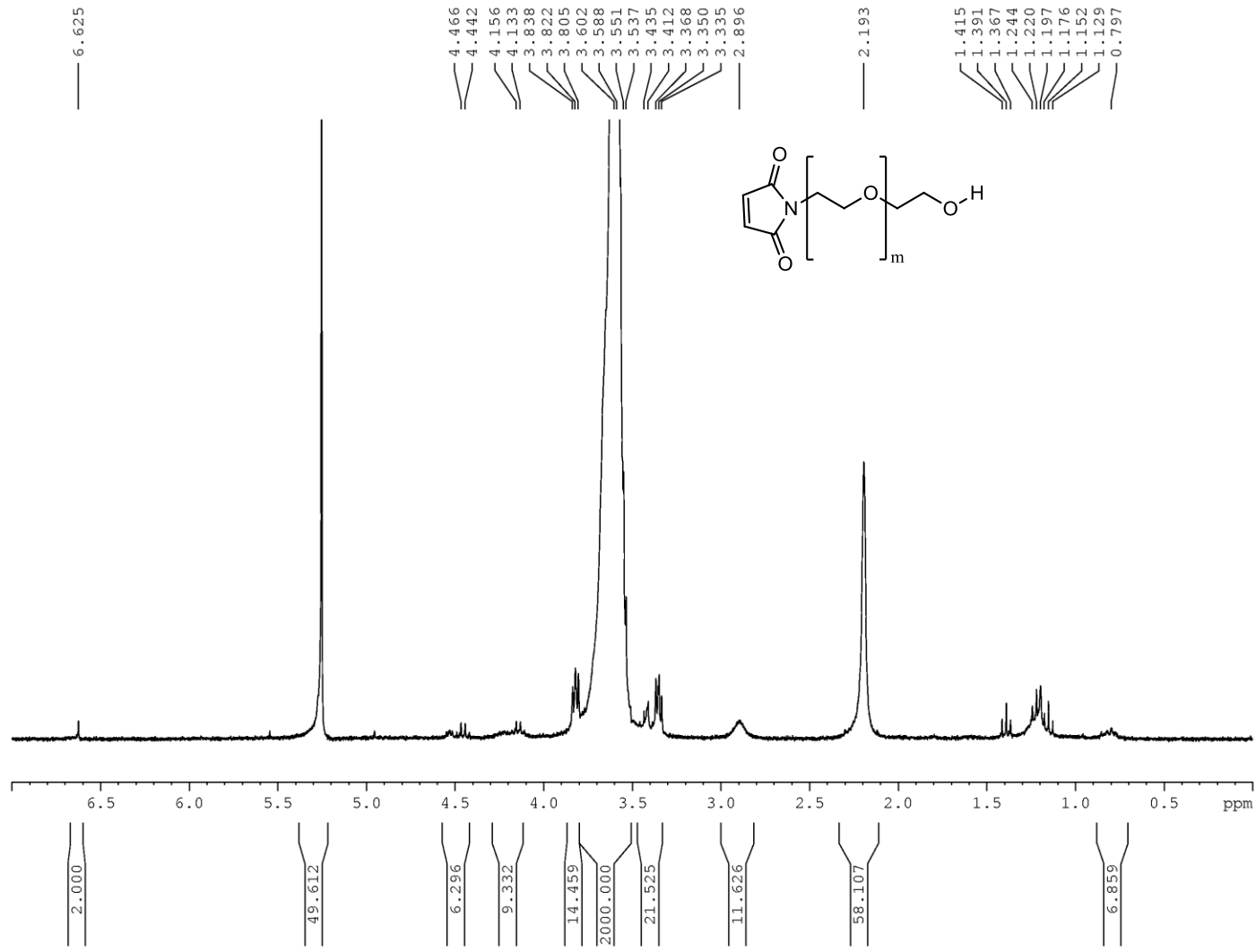
- 21 S. T. Hyde *J. Phys. (Paris)* **1990**, *51*, C7209
- 22 M. Antonietti, S. Förster *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1323-1333.
- 23 A. Choucair, A. Eisenberg *Eur. Phys. J.* **2003**, *10*, 37-44.
- 24 K. Velonia, A.E. Rowan, R.J.M. Nolte *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4224-4225.
- 25 M.J. Boerakker, J.M. Hannink, P.H.H. Bomans, P.M. Frederik, R.J.M. Nolte, E.M. Meijer, N.A.J.M. Sommerdijk *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4239-4241.
- 26 J.M. Hannink, J.J.L.M. Cornelissen, J.A. Farrera, P. Foubert, F.C. De Schryver, N.A.J.M. Sommerdijk, R.J.M. Nolte *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4732-4734.
- 27 N. A. J. M. Sommerdijk, J. M. Hannink, M. J. Boerakker, F. Brustolin, R. J. M. Nolte, *Polym. Mater. Sci. Eng.* **2001**, *84*, 72-73.
- 28 K. Velonia *Polym. Chem.*, **2010**, *1*, 944-952.
- 29 F. M. Veronese, G. Pasut *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1451-1458.
- 30 P. Thordarson, B. Le Droumaguet, K. Velonia, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2006**, *73*, 243-254.
- 31 K. Velonia, *Polym. Chem.*, **2010**, *1*, 944
- 32 B. Le Droumaguet, K. Velonia, **2008**, *29*, 1073-1089.
- 33 A.J.T. Dirks, S.S. van Berkel, N.S. Hatzakis, J.A. Opsteen, F.L. van Delft, J.J.L.M. Cornelissen, A.E. Rowan, J.C.M. van Hest, F.P.J.T. Rutjes, R.J.M. Nolte *Chem. Commun.* **2005**, 4172-4174.
- 34 R.Huisgen *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565-598.
- 35 R. Huisgen *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 633-645.
- 36 R. Huisgen, in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry (Ed.: A. Padwa)*, Wiley, New York, **1984**, 1-176.
- 37 a) K. L. Heredia, H. D. Maynard, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 45 – 53; b) D. Bontempo, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 6508 – 6509; c) K. L. Heredia, D. Bontempo, T. Ly, J. T. Byers, S. Halstenberg, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 16955 – 16960; d) H. D. Maynard, K. L. Heredia, R. C. Li, D. P. Parra, V. Vazquez-Dorbatt, *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 4015 – 4017; e) R. M. Broyer, G. M. Quaker, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 1041 – 1047.
- 38 a) J. Nicolas, V. San Miguel, G. Mantovani, D. M. Haddleton, *Chem. Commun.*, **2006**, 4697 – 4699; b) B. S. Lele, H. Murata, K. Matyjaszewski, A. J. Russell, *Biomacromolecules*, **2005**, *6*, 3380 – 3387.
- 39 K. Faber, “*Biotransformations in Organic Chemistry*”, Springer, 5<sup>th</sup> edition, 3-4.
- 40 Z. Xie, *Tetrahedron Asymmetry* **1991**, *2*, 733.
- 41 K. Jaeger, S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel, O. Misset, *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *15*, 29.
- 42 F. Theil, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2203.
- 43 R.D Schmid, R. Verger, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1608.
- 44 V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, 2189.
- 45 S. Kobayashi, H. Uyama, In *Biopolyesters*, **2001**, 241-262.
- 46 U.T Bornsheyer, R.J Kazlauskas, “*Hydrolases in Organic Chemistry*”; P. Woley, S.B. Petersen. “*Lipases, their structure, biochemistry and applications*”, Cambridge University Press.
- 47 (a) R.A. Gross, A. Kumar, B. Kalra, *Chem. Rev.* **101** (2001) 2097-2124, (b) L.W. Schwab, R. Kroon, A.J. Schouten, K. Loos, *Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, *29* 794-797.
- 48 F. He, S. Li, M. Vert, R. Zhuo, *Polymer*, **2003**, *44*, 5145-5151.
- 49 A. Cretu, R. Gattin, L. Brachaisa, D. Barbier-Baudry, *Polymer Degradation and Stability*, **2004**, *83*, 399-404.
- 50 B.L. Zamost, H.K. Nielsen, R.L. Starnes, *J. Ind. Microbiol.* **1991**, *8*, 71-81.
- 51 E.M. Anderson, M. Karin, O. Kirk, *Biocatal. Biotransform.*, **1998**, *16*, 181-204.

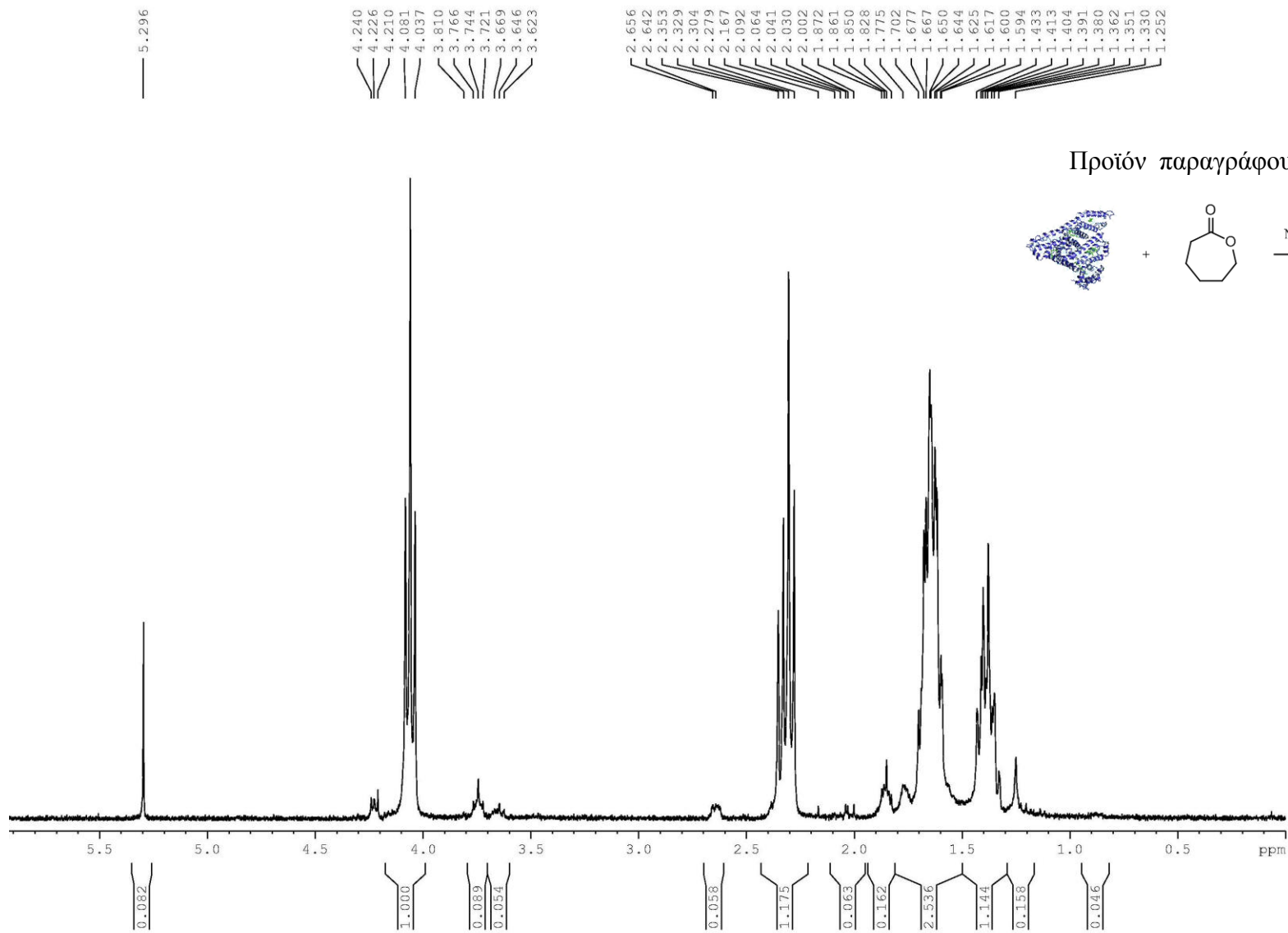
- 52 T.B. Nielsen, M. Ishii, O. Kirk, in: R. Margesin, S. Schinner (Eds.), *Biotechnological Applications of Cold-adapted Organisms*, Landes Bioscience, Austin, **1999**, 49–61.
- 53 Y. Naoshima, M. Kamezawa, T. Kimura, F. Okimoto, M. Watanabe, H. Tachibana, T. Ohtani, in: S.G. Pandalai (Ed.), *Recent Research Developments in Organic & Bioorganic Chemistry, Research Signpost*, Trivandrum, **2001**, 1–16.
- 54 F. Secundo, G. Carrea, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2002**, *19*, 93–102.
- 55 J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T.A. Jones, *Structure*, **1994**, *2*, 293-308.
- 56 H. Uyama, S. Kobayashi, *Chem. Lett.*, **1993**, 1149.
- 57 D. Knani, A.L. Gutman, D.H. Kohn, *J. Polym. Chem., Polym. Chem. Ed.*, **1993**, *31*, 1221.
- 58 S. Kobayashi, H. Uyama, S. Kimura, *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3793-3818.
- 59 Y. Mei, A. Kumar, R. A. Gross, *Macromolecules*, **2002**, *35*, 5444-5448.
- 60 Y. Mei, A. Kumar, R. A. Gross, *Macromolecules*, **2003**, *36*, 5530-5536.
- 61 S. Kobayashi, K. Takeya, S. Suda, H. Uyama, *Macromol. Chem. Phys.*, **1998**, *199*, 1729.
- 62 H. Uyama, K. Takeya, S. Kobayashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1995**, *68*, 56.
- 63 S. Namekawa, S. Suda, H. Uyama, S. Kobayashi, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1999**, *25*, 145.
- 64 S. Kobayashi, H. Uyama, *Macromol. Symp.*, **1999**, *144*, 237.
- 65 H. Uyama, S. Suda, S. Kobayashi, *Acta Polym.*, **1998**, *49*, 700.
- 66 G. D. Lye, P. A. Daldy, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Devel.*, **2002**, *6*, 434-440.
- 67 V. Gotor, *Org. Process Res. Devel.*, **2002**, *6*, 420-426.
- 68 T. Tomohiro, J. Sawada, C. Sawa, H. Nakura, S. Yoshida, M. Kodaka, et. al., *Bioconj. Chem.*, **2002**, *13*, 163-166.
- 69 L. S. Nair, C. T. Laurencin, *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 762.
- 70 T. Artham, M. Doble, *Macromol. Biosci.*, **2008**, *8*, 14.
- 71 Pitt C. G., Poly-caprolactone and its copolymers, *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (New York: Dekker), 71-119.
- 72 Pitt C. G., Chasalow F. I., Hibionada Y. M., Klimas D. M., Schindler A., *J. Appl. Polym. Sci.*, **1983**, *28*, 3779–87.
- 73 Mochizuki M., Hirano M., Kanmuri Y., Kudo K., Tokiwa Y., *Appl. Polym. Sci.*, **1995**, *55*, 289-296.
- 74 Pastorino L., Pioli F., Zilli M., Converti A., Nocolini C., *Enzyme and Microbial Technology*, **2004**, *35*, 321-326.
- 75 Woodward S. C., Brewer P. S., Montarned F., Schindler A. Pitt C. G., *J. Biomedical Mater. Res.*, **1985**, *19*, 437–444.
- 76 J. V. Koleske, *Blends containing poly-caprolactone and related polymers*, (New York: Academic), **1978**, 369–89.
- 77 H. Tsuji, Y. Ikada, *J. Appl. Polymer Sci.*, **1996**, *60*, 2367-2375.
- 78 C. G. Pitt, A. L. Andrady, Y. T. Bao, N.K. Sarnuei, *Pharmaceutical Application*, **1987**, 49–77.
- 79 F. E. Bailey, J. V. Koleske, *Poly(Ethylene Oxide)*, Academic Press, New York, **1976**.
- 80 Fuertges, F., Abuchowski A., *Journal of Controlled Release*, **1990**, *11*, 139.
- 81 P. KWorking. et al., Safety of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene glycol) derivatives. In Harris, J.M., and Zalipsky, S. (eds), *Polyethylene Glycol Chemistry and Biological Applications*, American Chemical Society, Washington DC, **1997**, 45.
- 82 R.I. Mahato, *Biomaterials for delivery and targeting of proteins and nucleic acids*, CRC Press (**2005**) (Ald. Cat. No. Z705102).
- 83 A. Abuchowski, T. Van Es, N. C. Palczuk F. F Davis, *The Journal of Biological Chemistry*, **1977**, *252*, 3578-3581.
- 84 A. Taglieber, H. Hbenreich, J. D. Carballeira, R. J. G. Mondiere, M. T. Reetz, *Angew. Chem.*, **2007**, *119*, 8751 –8754.
- 85 M. Svedendahl Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 3391–3401.

- 
- <sup>86</sup> K. Hult, P. Berglund, *TRENDS in Biotechnology*, **2007**, 231-238.
- <sup>87</sup> H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004–2021
- <sup>88</sup> Ε. Λιάμας, *Σύνθεση νέων γιγάντιων βιοδιασπόμενων και βιοσυμβατών αμφίφιλων μορίων πολυμερούς - πρωτεΐνης*, Διπλωματική Εργασία, **2011**.
- <sup>89</sup> A. Elzubair, C. N. Elias, J. C. M. Suarez, H. P. Lopes, M. V. B. Vieira, *Journal of dentistry*, **2006**, 34, 784–789.
- <sup>90</sup> Κ. Χατζημανώλης, *Μελέτη βιοϋβριδίων πολυμερούς-πρωτεΐνης σε οργανικούς διαλύτες*, Διπλωματική Εργασία, **2011**.
- <sup>91</sup> Θ. Ζήσης, *Μελέτη συμπεριφοράς και αλληλεπίδρασης κυστιδίων βιοπολυμερών με κυτταρικές καλλιέργειες προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων*, Διπλωματική Εργασία, **2011**.
- <sup>92</sup> B. Le Droumaguet, *Design and Synthesis of novel, Functional Polymer-Protein Nanoarchitectures*, Doctoral Thesis, **2008**.

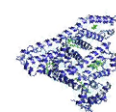




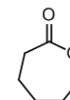




Προϊόν παραγράφου Α.4.1



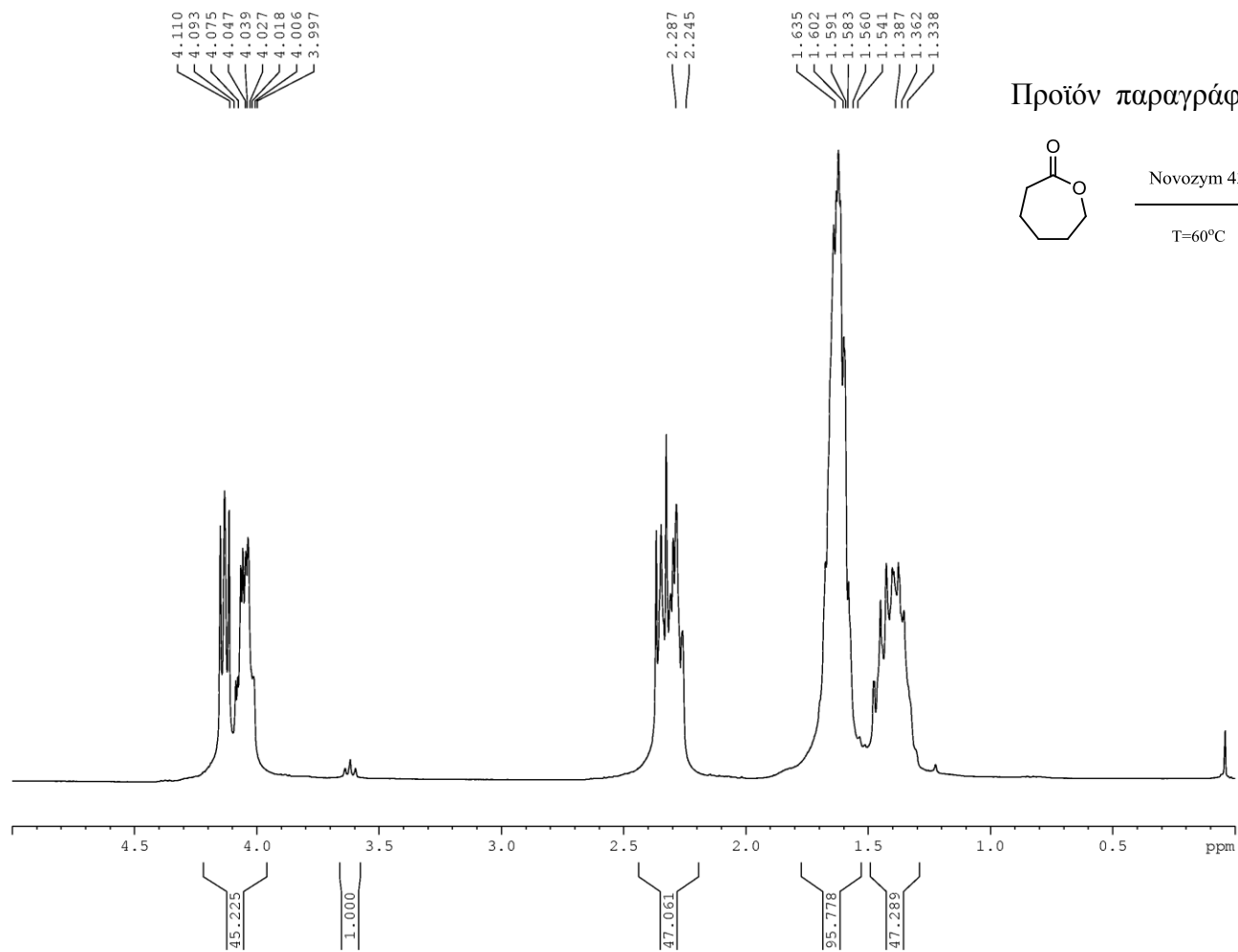
+



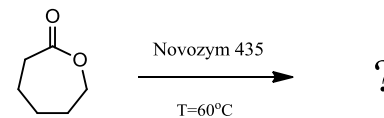
Novozym 435

T=60°C

?

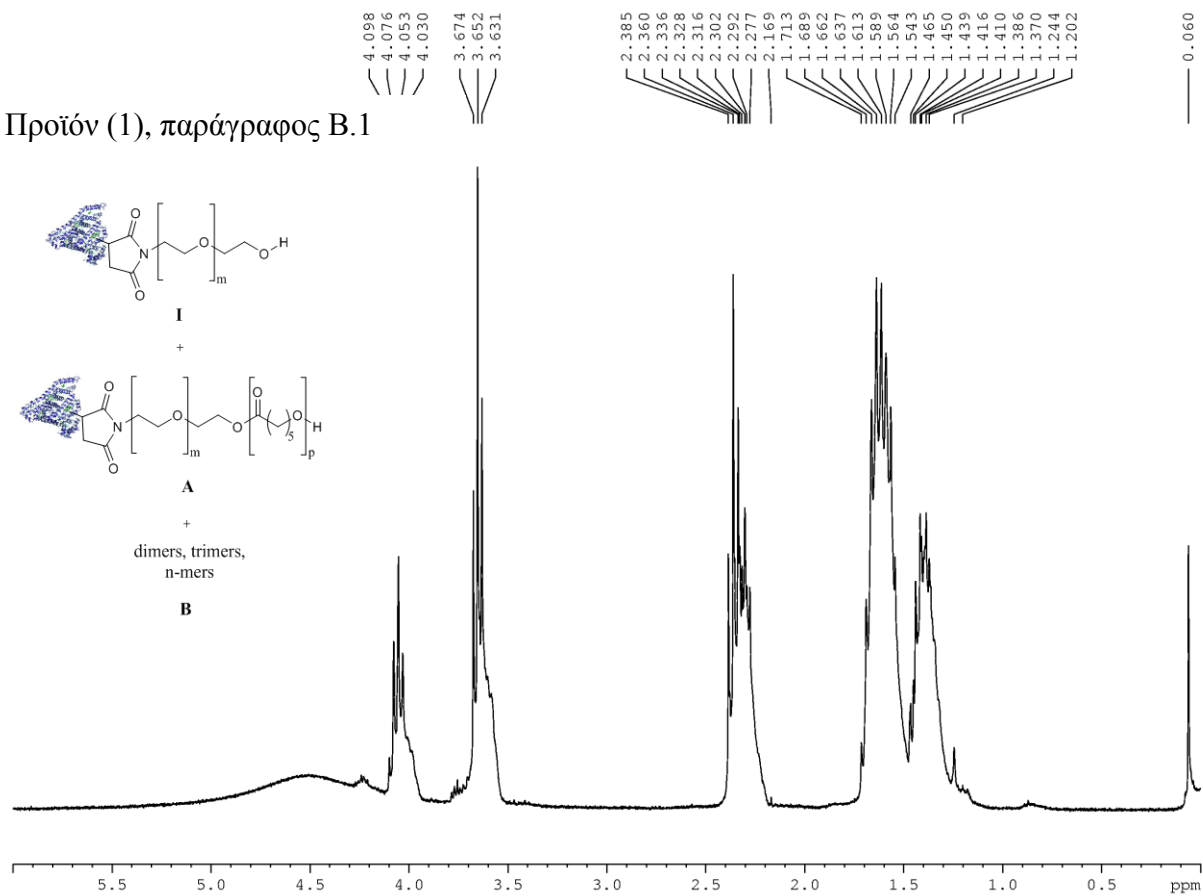


Προϊόν παραγράφου Α.4.2

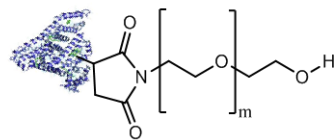




Προϊόν (1), παράγραφος Β.1

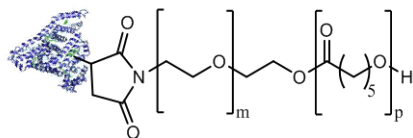


Προϊόν (2), παράγραφος Β.1



**I**

+



**A**

+

dimers, trimers,  
n-mers

**B**

4.214  
4.064  
4.043  
4.020  
3.657  
3.634  
3.615

2.339  
2.316  
2.291  
2.267  
1.650  
1.629  
1.606  
1.581  
1.411  
1.384  
1.361

