

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Εργαστήριο Συνθετικών Βιοϋλικών και Υπερμοριακής Χημείας



Διπλωματική Εργασία

Σύνθεση αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς με στόχο την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων

Παπαγιαννάκη Αργυρή

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Κέλλυ Βελώνια

Περίληψη

Στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν η ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων από νανοδομές αμφίφιλων συνθετικών βιοπολυμερών τα οποία σε υδατικό περιβάλλον σχηματίζουν καλά καθορισμένες αυτοοργανωμένες νανοδομές κυστιδίων. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με την νέα μέθοδο ριζικού πολυμερισμού αντιστρεπτής απενεργοποίησης με την προσέγγιση της ανακατανομής $\text{Cu}^{(I)}$ και μέσω φωτοεπαγόμενου πολυμερισμού με την καταλύτη $\text{Cu}^{(II)}$, οι οποίες διεξάγονται χωρίς ανάγκη απαέρωσης του συστήματος. Για τον χαρακτηρισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία μέσω πηκτώματος (GPC), ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) και τέλος UV-Vis φασματοφωτομετρία.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Θεωρητικό Υπόβαθρο.....	6
1.1 Αμφίφιλα Μόρια	6
1.2 Γιγαντιαία Αμφίφιλα Μόρια	7
1.2 Αυτοοργάνωση.....	8
1.4 Μέθοδοι Σύνθεσης Αμφίφιλων Συζυγών Πρωτεΐνης-Πολυμερούς.....	9
1.5 Ελεγχόμενος Ζωντανός Ριζικός Πολυμερισμός	11
1.6 Μεταφορά Φαρμάκων	14
1.7 pH- Αποκρίσιμα Πολυμερή	17
2.0 Αποτελέσματα - συζήτηση	18
2.1 Σύνθεση BSA-μαλεϊμιδίου βιοεκκινητή	18
2.2 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου (BSA-PS) μέσω φωτοεπαγόμενου ριζικού πολυμερισμού με αντιστρεπτή απενεργοποίηση	19
2.3 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου με την προσέγγιση της ανακατανομής	26
2.4 Διερεύνηση δραστηριότητας της αλβουμίνης ορού βοοειδών(BSA).....	29
2.5 Σύνθεση BSA-πολυ(μεθακρυλικός (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρας), BSA-rDPA	32
2.6 Σύνθεση BSA-πολυ(μεθακρυλικός (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρας), BSA-rDPA παρουσία φλουορεσκεΐναμίνης	35
2.7 Σύνθεση BSA-πολυ(μεθακρυλικού (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρα), BSA-rDPA παρουσία σαλικυλικού οξέος	38
3.0 Πειραματικό μέρος	41
3.1 Αντιδραστήρια	41
3.2 Αναλυτικές τεχνικές	41
3.3 Αναλυτικές Μέθοδοι Σύνθεσης.....	42
3.3.1. Σύνθεση BSA-μακροεκκινητή	42

3.3.2 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου (BSA-PS) μέσω φωτοεπαγώμενου ριζικού πολυμερισμού με αντιστρεπτή απενεργοποίηση	43
3.3.2 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου (BSA-PS) μέσω φωτοεπαγώμενου ριζικού πολυμερισμού με αντιστρεπτή απενεργοποίηση παρουσία χρωστικής Nile Red	44
3.3.3 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου (BSA-PS) με την προσέγγιση της ανακατανομής.....	45
3.3.4 Διερεύνηση δραστηριότητας της BSA	46
3.3.5 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου (BSA-PS) με την προσέγγιση της ανακατανομής παρουσία χρωστικής Nile Red.....	47
3.3.6 Σύνθεση BSA- πολυ(μεθακρυλικός (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρας), BSA-pDPA	48
3.3.7 Σύνθεση BSA-πολυ(μεθακρυλικού (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρα), BSA-pDPA παρουσία φλουορεσκεΐναμίνης	49
3.3.8 Σύνθεση BSA-πολυ(μεθακρυλικού (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρα), BSA-pDPA παρουσία σαλικυλικού οξέος	50
Βιβλιογραφία.....	51

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσά μου επίκουρη καθηγήτρια του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Δρ. Κέλλυ Βελώνια για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο της. Η εμπειρία που αποκόμισα ήταν πολύτιμο εφόδιο και η ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας οφείλεται στην πληθώρα πληροφοριών που μου μετέδωσε και στην συνεχή ενθάρρυνση και υποστήριξη της.

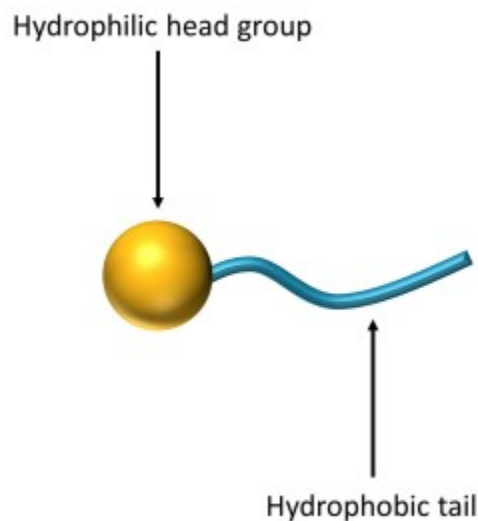
Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον μεταδιδάκτορα και επιβλέπων της πτυχιακής μου εργασίας, Αλέξη Θεοδώρου. Η αμέριστη καθοδήγησή του, ο πολύτιμος χρόνος που μου αφιέρωσε και οι υποδείξεις του με οδήγησαν στην πετυχημένη ολοκλήρωση της διπλωματικής μου. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τον μεταδιδάκτορα Χάρη Γρυπάρη που ήταν πάντα πρόθυμος να μου προσφέρει την βοήθεια του οποιαδήποτε στιγμή τον χρειάστηκα και για τις πολύτιμες συμβουλές του, όπως και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Πέτρο Μανδριώτη. Ακόμα, ευχαριστώ θερμά όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία, η οποία και έκανε αυτόν τον χρόνο ακόμη πιο ευχάριστο.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους φίλους μου είναι πάντα δίπλα μου, η δύναμή μου, σε κάθε μου βήμα και για την στήριξη και την εμπιστοσύνη τους.

Θεωρητικό Υπόβαθρο

1.1 Αμφίφιλα Μόρια

Αμφίφιλα ονομάζονται τα μόρια που αποτελούνται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο μέρος ενωμένα με ομοιοπολικό δεσμό.¹ Η διττή τους μορφή τους προσδίδει ισχυρή έλξη ως προς πολικούς διαλύτες αλλά και ως προς άπολους, καθώς περιέχουν μια πολική (υδρόφιλη) κεφαλή και μια άπολη (υδρόφοβη) ουρά (εικόνα 1).²

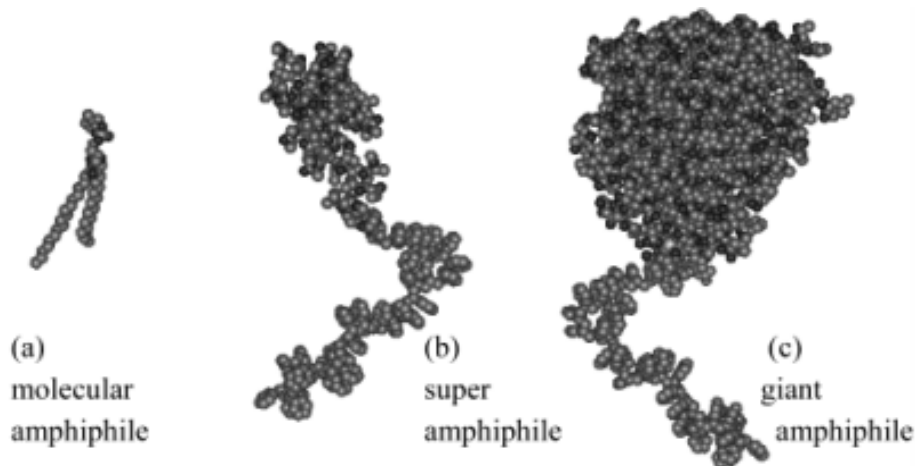


Εικόνα 1: Δομή αμφίφιλων μορίων.

Η υδρόφοβη ουρά αποτελείται από μια ή περισσότερες κορεσμένες ή ακόρεστες αλυσίδες υδρογονανθράκων, ενώ η υδατοδιαλυτή κεφαλή μπορεί να είναι ουδέτερη, φορτισμένη ή και αμφιτεριονική.² Λόγω της αμφίφιλής τους δομής, η πολική ομάδα (κεφαλής) αλληλεπιδρά με το νερό ενώ η μη πολική λιπόφιλη αλυσίδα μεταναστεύει πάνω από την διεπιφάνεια (είτε στον αέρα είτε σε ένα μη πολικό υγρό) ή αυτοοργανώνεται έτσι ώστε να μην έρχεται σε επαφή με το νερό και να ελαχιστοποιείται η ενέργεια του συστήματος. Στην πρώτη περίπτωση, η ευνοείται ένας μικροφασικός διαχωρισμός μεταξύ του εκλεκτικού διαλύτη και της διεσπαρμένης φάσης του αμφίφιλου με το σχηματισμό πολλών μικρότερων κλειστών διεπιφανειών ή συσσωματωμάτων που μοιάζουν με μικύλλια.³

1.2 Γιγαντιαία Αμφίφιλα Μόρια

Μια πρόσφατα ανεπτυγμένη κατηγορία αμφίφιλων μορίων είναι τα γιγαντιαία αμφίφιλα μόρια, τα οποία αποτελούνται από ένα ένζυμο/πρωτεΐνη ως υδρόφιλη κεφαλή και ένα ομοιοπολικά συνδεδεμένο υδρόφοβο πολυμερές ως ουρά. Στην περίπτωση των αμφίφιλων μορίων χαμηλού μοριακού βάρους μελέτες έχουν δείξει ότι το σχήμα του ίδιου του αμφίφιλου μορίου καθορίζει πολύ συχνά τη δομή του συσσωματώματος που προκύπτει έπειτα από αυτοοργάνωση. Παρόμοιοι κανόνες όσον αφορά το σχήμα και την δομή φαίνεται να ισχύουν για την πιο πρόσφατα μελετημένη κατηγορία των μακρομοριακών αμφίφιλων μορίων, τα οποία αποτελούνται από υδρόφιλα-υδρόφοβα δισυσταδικά συμπολυμερή. Όσον αφορά τόσο τον μοριακό όγκο όσο και το μοριακό βάρος τα γιγαντιαία αμφίφιλα είναι σημαντικά μεγαλύτερα από τα χαμηλότερου μοριακού βάρους μοριακά αμφίφιλα και τα πολυμερικά αντίστοιχά τους.⁴ Επιπροσθέτως, τα γιγαντιαία αμφίφιλα έχουν αποδειχθεί ότι διατηρούν μέρος της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου καθώς επίσης παρουσιάζουν ιδιότητες συσσωμάτωσης παρόμοιες με εκείνες των αντίστοιχων αμφίφιλων μορίων μικρότερου μοριακού βάρους.^{5,6}

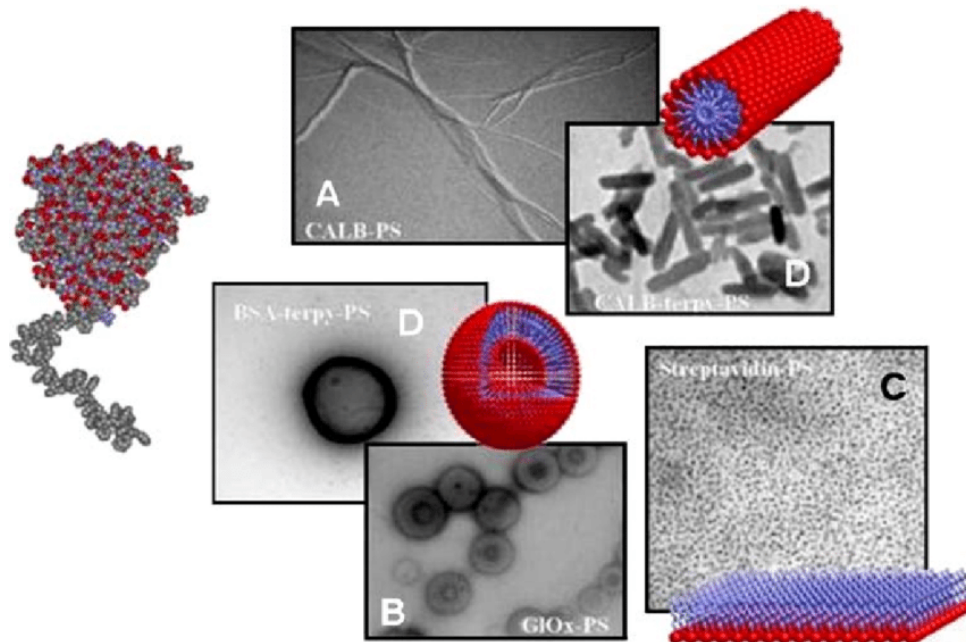


Εικόνα 2: (a) μοριακά αμφίφιλα, (b) μακρομοριακά αμφίφιλα, (c) γιγαντιαία αμφίφιλα.⁴

Συζυγή πρωτεΐνης-πολυμερούς χρησιμοποιούνται ευρέως για εφαρμογές στην ιατρική, τη βιοτεχνολογία και τη νανοτεχνολογία.^{7,8,9} Η ομοιοπολική σύνδεση των πολυμερών με τις πρωτεΐνες βελτιώνει την σταθερότητα της πρωτεΐνης, τη διαλυτότητα και την βιοσυμβατότητα. Επιπλέον, τα πολυμερή προσδίδουν νέες ιδιότητες στα αμφίφιλα μόρια όπως η αυτοοργάνωση και η φασική συμπεριφορά καθώς και πληθώρα χημικών αποκρίσεων.⁷

1.2 Αυτοοργάνωση

Η αυτό-οργάνωση είναι ο αυθόρμητος σχηματισμός διαταγμένων δομών μέσω μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης μεταξύ μορίων, πρωτεϊνών, νανοσωματιδίων ή μικροδομών.¹⁰ Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν ιοντικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-ιόντος ή διπόλου-διπόλου, π-π αλληλεπιδράσεις και van der Waals αλληλεπιδράσεις. Η αυτοοργάνωση είναι μια αυθόρμητη, ενεργειακά ευνοούμενη διαδικασία και οδηγεί σε ακριβείς υπερδομές επιτευχθεί από το σύστημα η χαμηλότερη ενέργεια Gibbs εφόσον η αρχιτεκτονική της αυτοοργάνωσης εξαρτάται από την θερμοδυναμική σταθερότητα.¹¹

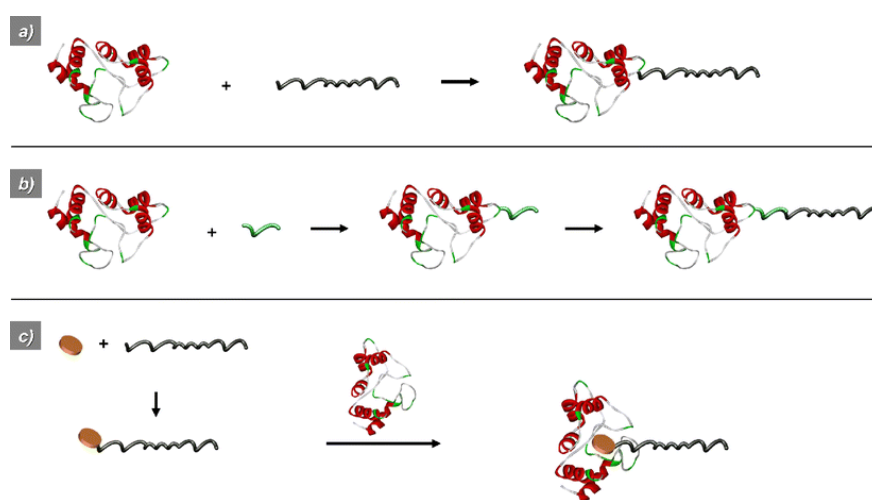


Εικόνα 3: αυτοοργανωμένες δομές: (A) ράβδων CALB-PS, (B) κυστιδίων GOx-PS, (C) επιφάνεια στρεπταβιδίνης-PS, (D) κυστιδίων BSA-PS και ράβδων CALB-PS.¹²

Η αρχιτεκτονική της αυτοοργάνωσης που παρατηρείται σε ένα σύστημα είναι αποτέλεσμα της υδροφοβικής ελεύθερης ενέργειας και τα συσσωματώματα που δημιουργούνται έχουν την ελάχιστη επιφανειακή ενέργεια. Η ελεύθερη ενέργεια είναι αποτέλεσμα του φαινομένου υδροφοβικότητας και του συνόλου των ελκτικών και απωστικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα διαφορετικά τμήματα ενός αμφίφυλου μορίου και μεταξύ διαφορετικών μορίων. Παραδείγματα τέτοιων δομών περιλαμβάνουν κυστίδια, μικκύλια, ανεστραμμένα μικκύλια, ράβδους και μεμβρανικές επιφάνειες (εικόνα 12).^{12,13}

1.4 Μέθοδοι Σύνθεσης Αμφίφιλων Συζυγών Πρωτεΐνης-Πολυμερούς

Η σύζευξη μιας πρωτεΐνης με ένα πολυμερές οδηγεί σε ένα νέο μακρομόριο με σημαντικά μεταβληθέντα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, για αυτό τον λόγο τα γιγαντιαία αμφίφιλα έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Οι κύριες μέθοδοι σύνθεσης των συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς είναι η απευθείας ή έμμεση σύζευξη του πολυμερούς στην πρωτεΐνη (grafting to), η σύζευξη μέσω συμπαράγοντα/υποκαταστάτη (grafting to) και τέλος η απευθείας ανάπτυξη πολυμερούς από μόριο βιοεκκινητή.¹³



Εικόνα 4: Μέθοδοι σύνθεσης αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης - πολυμερούς. a) Απευθείας σύζευξη, b) έμμεση σύζευξη, c) σύζευξη μέσω συμπαράγοντα/υποκαταστάτη.¹³

A) Απευθείας σύζευξη πολυμερούς στην πρωτεΐνη (grafting to)

Στην παρούσα μέθοδο λαμβάνουν χώρα δύο στάδια, η παρασκευή ενός πολυμερούς με κατάλληλο λειτουργικό άκρο και έπειτα η σύζευξη του στην πρωτεΐνη (εικόνα 4a). Το πολυμερές αντιδρά εκλεκτικά με ένα μοναδικό αμινοξύ στην επιφάνεια της πρωτεΐνης (όπως λυσίνη, κυστεΐνη, κ.ο.κ.) αφού φέρει στο άκρο του κατάλληλη λειτουργική ομάδα. Στην περίπτωση όμως που δύο ή περισσότερες πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων είναι εκτεθειμένες, καθίσταται πολύ δύσκολος ο έλεγχος της αντίδρασης βιοσυζεύξης καθώς επίσης είναι απαραίτητο η λειτουργική ομάδα της πρωτεΐνης να βρίσκεται εκτεθειμένη στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και όχι θαμμένη στο εσωτερικό της δομής της. Βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου αποτελεί η ασυμβατότητα διαλυτότητας της υδρόφιλης πρωτεΐνης με το υδρόφοβο

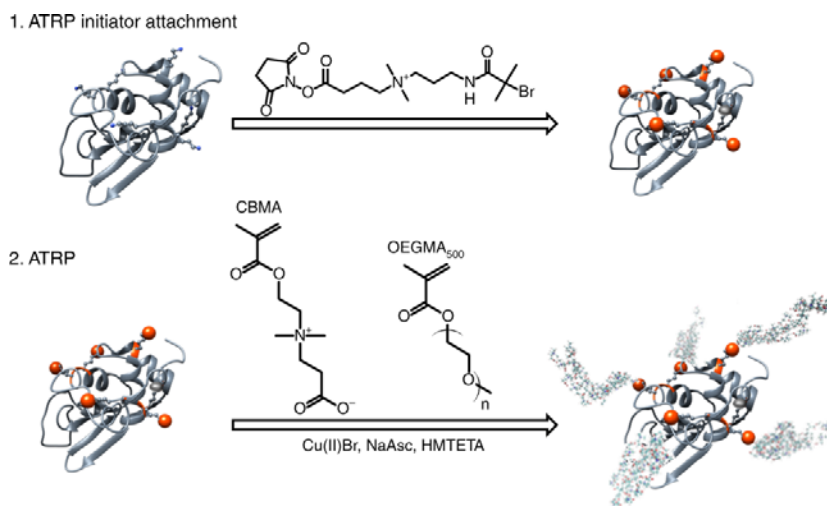
πολυμερές γεγονός το οποίο καθιστά την αντίδραση βιοσύζευξης και την απομόνωση των προϊόντων δύσκολη και έτσι οδηγεί σε ιδιαίτερα χαμηλές αποδόσεις.¹³

B) Έμμεση σύζευξη πολυμερούς στην πρωτεΐνη (grafting to)

Σε αυτή την μέθοδο ένα διλειτουργικό μόριο-συνδέτης που φέρει στο άκρο του κατάλληλη λειτουργική ομάδα αντιδρά εκλεκτικά με ένα μοναδικό αμινοξικό κατάλοιπο της πρωτεΐνης προς τον σχηματισμό ενός ενεργοποιημένου βιοϋβριδίου (εικόνα 4b). Έτσι ενώ το ένα άκρο του μορίου-συνδέτη έχει αντιδράσει εκλεκτικά με την πρωτεΐνη, το άλλο άκρο του είναι εκτεθειμένο και αντιδρά στη συνέχεια με το πολυμερές. Το σημαντικό πλεονέκτημα του μορίου-συνδέτη είναι ότι αποτρέπει προβλήματα που σχετίζονται με τη μειωμένη απόδοση που αναμένεται να υπάρχει σε αντιδράσεις μεταξύ ιδιαίτερα ογκωδών μορίων όπως μία πρωτεΐνη και ένα πολυμερές.¹⁴

Γ) Σύζευξη μέσω συμπαράγοντα/υποκαταστάτη (grafting to)

Στην παρούσα μέθοδο η σύνθεση των γιγαντιαίων αμφίφιλων επιτυγχάνεται με άμεση σύζευξη της υδρόφοβης πολυμερικής αλυσίδας στον συμπαράγοντα μίας πρωτεΐνης που ακολουθείται από ανασύσταση της πρωτεΐνης γύρω από το συμπαράγοντα (εικόνα 4c). Αρχικά επιτυγχάνεται η δημιουργία ενός αποενζύμου με την απομάκρυνση του συμπαράγοντα. Έπειτα κατάλληλα τροποποιημένο πολυμερές ενώνεται ομοιοπολικά με τον ελεύθερο συμπαράγοντα και τέλος πραγματοποιείται ανασύσταση του αποενζύμου γύρω από το μακρομόριο συμπαράγοντα-πολυμερούς. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η τροποποίηση του πολυμερούς μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας παραδοσιακές τεχνικές σύνθεσης και καθαρισμού, όπως οργανικούς διαλύτες και χρωματογραφία στήλης.^{13,15}



Εικόνα 5 : Μέθοδος ανάπτυξης πολυμερικών αλυσίδων από μόρια βιοεκκινητών (grafting from).¹⁸

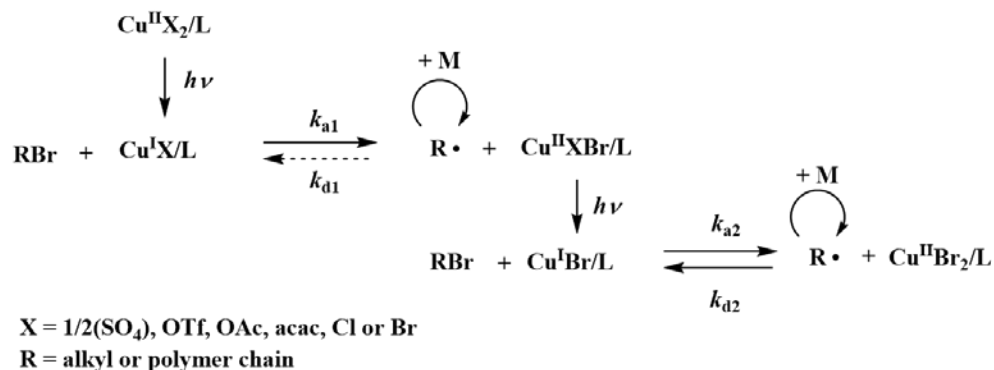
Δ) Ανάπτυξη πολυμερικών αλυσίδων από μόρια βιοεκκινητών (*grafting from*)

Το κύριο χαρακτηριστικό της παρούσας μεθόδου είναι η σύνθεση ενός μορίου βιοεκκινητή ο οποίος αποτελείται από την πρωτεΐνη η οποία έχει τροποποιηθεί εκλεκτικά και ομοιοπολικά με έναν εκκινητή πολυμερισμού. Στη συνέχεια, διεξάγεται ελεγχόμενος ριζικός πολυμερισμός υδρόφοβων μονομερών τα οποία αναπτύσσονται πάνω στον βιοεκκινητή με στόχο την δημιουργία των γιγαντιαίων αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς. Τα αμφίφιλα βιοσυζυγή που συντίθενται με αυτή τη μέθοδο ακολουθώντας την ATRP προσέγγιση, έχει δειχθεί ότι παρουσιάζουν χαμηλή πολυδιασπορά, ποσοτική απόδοση, ευκολία στον καθαρισμό του τελικού προϊόντος και τις χαρακτηριστικές ιδιότητες συσσωμάτωσης των αμφίφιλων βιομακρομορίων. Το πιο αξιοσημείωτο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η ικανότητα της μεθόδου να επιτρέπει την *in situ* κατασκευή βιονανοαντιδραστήρων με αποτελεσματικό εγκλεισμό πρωτεϊνών και άλλων μορίων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των Γιγαντιαίων Αμφίφιλων όπως αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2008 στην βιβλιογραφία από τους B. Le Droumaguet και K. Velonia.^{5,17}

1.5 Ελεγχόμενος Ζωντανός Ριζικός Πολυμερισμός

A) Φωτοεπαγόμενος

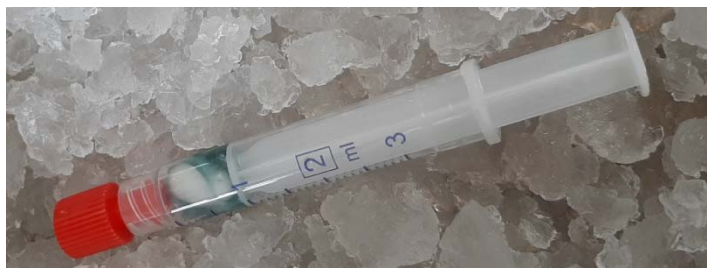
Η ανάπτυξη της μεθόδου ζωντανού ριζικού πολυμερισμού έχει αποτελέσει ορόσημο στην επιστήμη των πολυμερών. Παρέχει την δυνατότητα σύνθεσης καλά ελεγχόμενων πολυμερών με καθορισμένες τελικές ομάδες, μοριακά βάρη και αρχιτεκτονική, συνδυάζοντας παράλληλα τα οφέλη του ριζικού πολυμερισμού δηλαδή υψηλή ανοχή σε ευρύ φάσμα λειτουργικοτήτων μονομερών, υπό ήπιες συνθήκες αντίδρασης.^{19,20} Μια από τις κυριότερες τεχνικές ριζικού πολυμερισμού είναι ο ριζικός πολυμερισμός με μεταφορά ατόμου (ATRP) που βασίζεται στον έλεγχο της ισορροπίας μεταξύ δραστικών και αδρανοποιημένων χημικών ειδών για την μεγιστοποίηση του ελέγχου κατά την διάρκεια του πολυμερισμού. Ο έλεγχος επιτυγχάνεται με την επιλογή ενός κατάλληλου συμπλόκου μετάλλου μετάπτωση (συχνά χαλκού)-υποκαταστάτη για την βελτιστοποίηση του ρυθμού πολυμερισμού και διαχείριση της συγκέντρωσης των χημικών ειδών απενεργοποίησης. Ο φωτοεπαγόμενος πολυμερισμός παρουσιάζει πρόσθετες δυνατότητες έναντι των παραδοσιακών θερμικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων των ταχύτερων ρυθμών πολυμερισμού και χρονικού ελέγχου απλά ενεργοποιώντας/απενεργοποιώντας το υπεριώδες φως.^{20,21}



Εικόνα 6: Μηχανισμός ελέγχου σχηματισμού καταλυτικού συστήματος κατά τη διάρκεια φωτοεπαγόμενου ριζικού πολυμερισμού.³¹

B) Ανακατανομή CuBr με Me₆TREN

Μια νέα προσέγγιση στην κατηγορία των ελεγχόμενων ζωντανών ριζικών πολυμερισμών, οι οποίοι τείνουν να είναι προβληματικοί στο νερό, είναι η προσέγγιση της ανακατανομής (disproportionation). Η διεξαγωγή αυτών των πολυμερισμών βασίζεται στην ταχεία ανακατανομή του Cu^(I) σε πολικούς διαλύτες όπως το νερό, παρουσία ενός υποκαταστάτη (όπως το Me₆TREN). Η ανακατανομή πραγματοποιείται στους 0°C πριν την προσθήκη του μονομερούς και του εκκινητή. Συνέπεια της ανακατανομής είναι ο σχηματισμός εξαιρετικά δραστικού Cu⁽⁰⁾ (στερεό) που λειτουργεί ως ενεργοποιητής και η δημιουργία Cu^(II) ο οποίος είναι υπεύθυνος για τον τερματισμό του πολυμερισμού. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει τον εξαιρετικά γρήγορο σχηματισμό πολυμερών με ελεγχόμενο μήκος αλυσίδας και στενές κατανομές μοριακού βάρους.^{22,23} Η μέθοδος της ανακατανομής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από την γεωμετρία του υποκαταστάτη. Οι στερεοχημικά παρεμποδισμένοι υποκαταστάτες (όπως το Me₆TREN) προκαλούν αποκλίσεις από την προτιμώμενη γεωμετρία δημιουργώντας θέσεις συναρμογής για το νερό και το μονομερές.²³



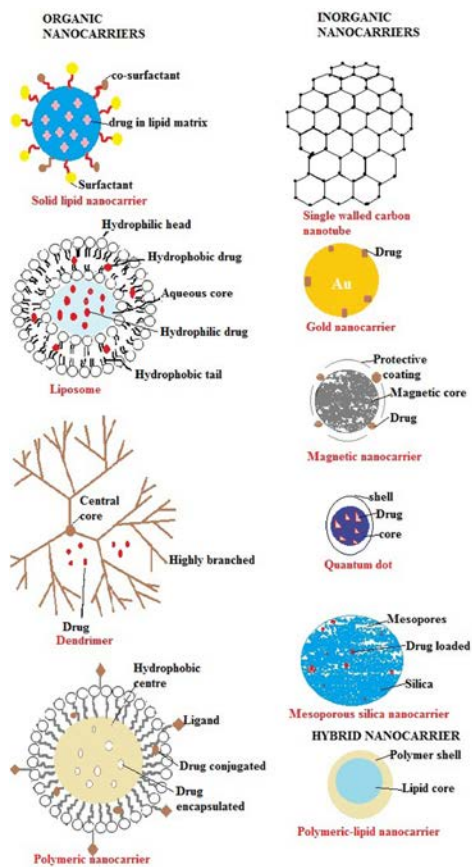
Εικόνα 7: Ανακατανομή CuBr/Me₆TREN σε H₂O (χαρακτηριστικό μπλε χρώμα συμπλόκου).

Γ) Προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία

Όπως προαναφέρθηκε τα αμφίφιλα βιοσυζυγή πρωτεΐνης-πολυμερούς (Γιγαντιαία Αμφίφιλα) είναι συνθετικά μακρομόρια που αποτελούνται από μία πρωτεΐνη εκλεκτικά συνδεδεμένη με ένα υδρόφοβο πολυμερές και αναμένεται να έχουν ποικίλες εφαρμογές καθώς συνδυάζουν τα ενδογενή χαρακτηριστικά τόσο του υδρόφιλου πρωτεϊνικού όσο και του υδρόφοβου πολυμερικού τους τμήματος.²⁴⁻²⁶ Στο παρελθόν, η σύνθεσή τους βασίστηκε τόσο σε *grafting to* όσο και σε *grafting from* προσεγγίσεις.^{4,5,15,27-33} Η απευθείας σύζευξη ενός υδρόφοβου πολυμερούς σε πρωτεΐνη (*grafting to* προσέγγιση) εμφανίζει ιδιαίτερα χαμηλές αποδόσεις καθώς αποτελεί αντίδραση μεταξύ μακρομορίων με μεγάλη διαφορά διαλυτότητας.⁴ Η απευθείας σύνθεση/ανάπτυξη της πολυμερικής αλυσίδας από έναν πρωτεϊνικό μακροεκκινητή ριζικού πολυμερισμού μέσω ATRP πολυμερισμού (*grafting from* προσέγγιση) έχει αποδειχθεί ότι είναι ποσοτική και επιπλέον επιτρέπει τον *in situ* εγκλεισμό φιλοξενούμενων μορίων.⁵ Πρόκειται όμως για μία πειραματικά απαιτητική, χρονοβόρα και ακριβή διαδικασία καθώς απαιτεί πλήρη αποξυγόνωση που συνήθως επιτυγχάνεται με freeze rump thaw μεθόδους. Πρόσφατα αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μια νέα φωτοεπαγόμενη μέθοδο ριζικού πολυμερισμού μέσω αντιστρεπτής απενεργοποίησης (RDRP) η οποία οδηγεί σε ποσοτικό σχηματισμό των προϊόντων χωρίς ανάγκη αποξυγόνωσης του συστήματος, ενώ δεν επηρεάζει τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης.³⁴ Αποδείχθηκε ότι πρόκειται για μία ιδιαίτερα αποτελεσματική μεθοδολογία που εφαρμόζεται με επιτυχία σε διαφορετικές πρωτεΐνες (BSA, HSA, GOx, β-γαλακτοσιδάση) και μία πληθώρα μονομερών όπως ακρυλικοί και μεθακρυλικοί εστέρες, στυρένια και ακρυλαμίδια. Οι πολυμερισμοί πραγματοποιούνται σε πλαστικές σύριγγες, απουσία πρόσθετων μέσων αποξυγόνωσης, δεν απαιτούν οργανικό συνδιαλύτη ενώ η συγκέντρωση του καταλύτη (Cu^{II}) που απαιτείται είναι εξαιρετικά χαμηλή. Περαιτέρω μελέτη της μεθόδου έδειξε ότι είναι αποτελεσματική κάτω από διαφορετικές πηγές ακτινοβολίας όπως το υπεριώδες φως, το μπλε φως, ακόμα και με το ηλιακό φως αλλά και σε ποικίλα μέσα όπως ρυθμιστικά διαλύματα, υπερκάθαρο νερό, νερό βρύσης ή ακόμα και θαλασσινό νερό. Το νέο αυτό συνθετικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των αμφίφιλων βιοϋβριδίων που αναφέρονται σε αυτή τη εργασία.³⁴

1.6 Μεταφορά Φαρμάκων

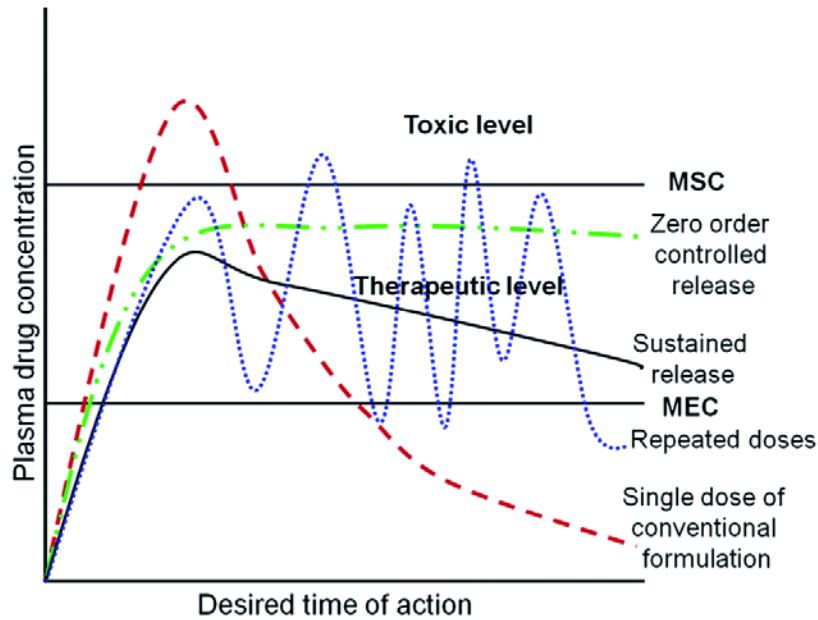
Τα τελευταία χρόνια νανοδιάστατοι φορείς, όπως λιποσώματα, μικκύλια, νανοσφαίρες, νανοκάψουλες και δενδριμερή έχουν μελετηθεί εκτενώς ως η βάση για νέα, αποτελεσματικά συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων. Η εφαρμογή ποικίλων συστημάτων βασιζόμενων σε νανοσωματίδια είναι επί του παρόντος ιδιαίτερα δημοφιλής στους ερευνητικούς τομείς που αφορούν τα βιοϋλικά, την φαρμακευτική, την βιοτεχνολογία καθώς και την βιοϊατρική κυρίως λόγω των εγγενών χαρακτηριστικών τους που αφορούν την ικανότητα παγίδευσης βιολογικά δραστικών ουσιών και την προσαρμογή τους για την παράδοση αυτών των ουσιών σε συγκεκριμένους στόχους.³⁵



Εικόνα 8: Παραδείγματα νανοφορέων ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.³⁷

Πιο συγκεκριμένα, η χρήση πρωτεϊνών και πεπτιδίων ως θεραπευτικές ουσίες είναι επίσης ένας ταχέως αναπτυσσόμενος χώρος έρευνας. Η κύρια αιτία αυτού του ενδιαφέροντος, συμπεριλαμβάνει την ανακάλυψη νέων πεπτιδίων και πρωτεϊνών και της καλύτερης

κατανόησης του μηχανισμού της δράσης τους *in vivo*. Παρ' όλα αυτά, τα περισσότερα μόρια που βασίζονται σε πεπτίδια έχουν ιδιότητες που δεν ευνοούν την χορήγηση διά του στόματος και, ως εκ τούτου, πρέπει να εγχέονται μέσω σύριγγας με μεγάλο κόστος και δυσφορία για τους ασθενείς. Παρά την πρόοδο σε αυτόν τον τομέα, η χορήγηση τέτοιων φαρμάκων και άλλων βιολογικά δραστικών πρωτεϊνών στους επιθυμητούς στόχους παραμένει ένας σημαντικός περιορισμός αυτών των νέων θεραπειών, καθώς οι συμβατικοί τρόποι χορήγησής τους μπορεί να οδηγήσουν σε ταχεία απώλεια της βιολογικής τους δραστηριότητας είτε μπορεί να καταστραφούν γρήγορα από το πεπτικό σύστημα. Η πιο κοινή προσέγγιση για τη χημική τροποποίηση μιας πρωτεΐνης είναι η σύζευξη πρωτεϊνών στην πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG) και τα πρώτα παραδείγματα φαρμάκων PEG-πρωτεΐνης διατέθηκαν στο εμπόριο στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Έκτοτε, ένας μεγάλος αριθμός κλινικών δοκιμών που αφορούν συζυγή πολυμερούς φαρμάκων έχουν δείξει πολύ ελπιδοφόρα αποτελέσματα για την αποφυγή των προαναφερθέντων προβλημάτων.³⁶ Τα συζυγή πρωτεΐνης-πολυμερούς παρουσιάζουν έναν μοναδικό συνδυασμό των ιδιοτήτων που προέρχονται τόσο από τα βιολογικά όσο και από τα συνθετικά υλικά, τα οποία μπορούν να συντονιστούν ξεχωριστά για να προκαλέσουν ένα επιθυμητό αποτέλεσμα. Η έμφυτη βιολογική αναγνώριση της πρωτεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις θεραπείες όπου υπάρχει έλλειψη των φυσικών πρωτεϊνών, για την ρύθμιση των υφιστάμενων μεταβολικών οδών ή για την αναστολή των μορίων και των οργανισμών. Οι πρωτεΐνες μπορούν να λειτουργούν σε χημειοθεραπευτικές συσκευές χορήγησης ως παράγοντες-στόχοι. Επιπροσθέτως, ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καταλύουν χημικές αντιδράσεις τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Η μακρομοριακή δομή του συζυγούς πολυμερούς έχει επίσης αποδειχθεί κρίσιμη για τις ιδιότητες των αντίστοιχων βιοσυζυγών. Το μοριακό βάρος και η πολυδιασπορά των συζευγμένων πολυμερών είναι επίσης σημαντικές παράμετροι, καθώς η πολυδιασπορά των πολυμερών αντικατοπτρίζεται και στην πολυδιασπορά του συζυγούς πεπτιδίου-πολυμερούς. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα που σχετίζονται με τη χρήση των συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς περιλαμβάνουν αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα και ημιζωή στο πλάσμα, μειωμένη ανοσογονικότητα, μειωμένη πρωτεόλυση και αυξημένη διαλυτότητα και σταθερότητα.^{35,36}

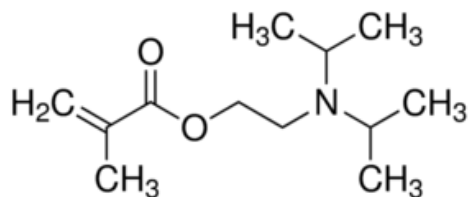


Εικόνα 9: Σχηματικό διάγραμμα για συμβατική και ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου (MSC = μέγιστη ασφαλής συγκέντρωση, MEC = ελάχιστη αποτελεσματική συγκέντρωση).³⁸

Τα ελεγχόμενα συστήματα χορήγησης φαρμάκων σχεδιάζονται κυρίως για την απελευθέρωση των φαρμάκων με ελεγχόμενο ρυθμό. Έτσι διατηρούνται ασφαλή και αποτελεσματικά τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα για μια περίοδο όσο το σύστημα συνεχίζει την απελευθέρωση του φαρμάκου (εικόνα 9). Αυτός ο προκαθορισμένος ρυθμός απελευθέρωσης φαρμάκου βασίζεται στην επιθυμητή θεραπευτική συγκέντρωση και την φαρμακοκινητική του φαρμάκου. Εκτός αυτού, η δράση του φαρμάκου μπορεί να τοποθετηθεί στο στοχευμένο σημείο απελευθέρωσης. Τα ελεγχόμενα συστήματα χορήγησης φαρμάκων μειώνουν ή εξαλείφουν τοπικές και συστηματικές παρενέργειες, μειώνουν την υπερβολική αύξηση της συγκέντρωσης φαρμάκων σε χρόνιες χρήσεις καθώς και δεν απαιτούν την συμμόρφωση του ασθενούς στην χορήγησή τους. Επίσης, βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και μειώνουν τη διακύμανση των επιπέδων των φαρμάκων.³⁸

1.7 pH- Αποκρίσιμα Πολυμερή

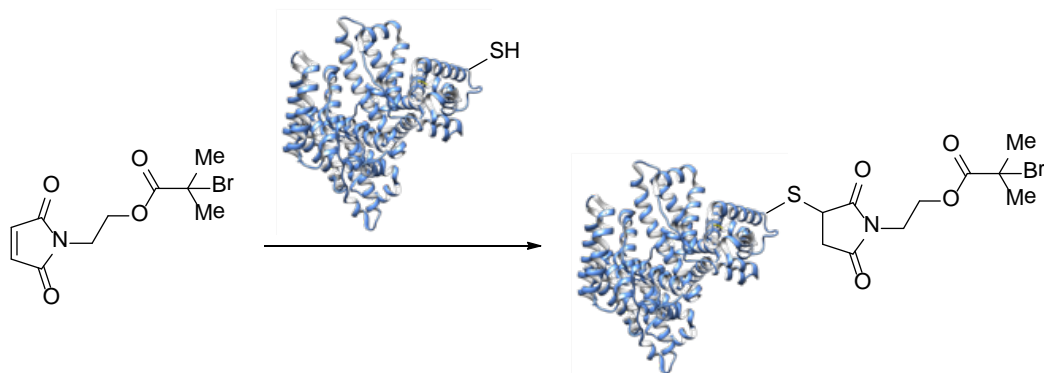
Όπως προαναφέρθηκε η ανάπτυξη νέων συστημάτων παροχής φαρμάκων έχει μεγάλη σημασία για τη φαρμακευτική/ ιατρική βιομηχανία και την υγειονομική περίθαλψη. Στις πρόσφατες δεκαετίες, τα «έξυπνα» συστήματα που ρυθμίζουν την απελευθέρωση του φαρμάκου ως απόκριση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το pH, συγκεκριμένα ένζυμα ή το φως, που παράγονται από τους παθολογικούς στόχους ή τις εξωτερικές πηγές διέγερσης έχουν προσελκύσει αυξανόμενο ενδιαφέρον. Έχουν την ιδιότητα να εγκλωβίζουν και να μεταφέρουν φάρμακα στους θεραπευτικούς στόχους χωρίς σημαντική απελευθέρωση, ενώ τα φάρμακα μπορούν να απελευθερωθούν επιλεκτικά στους επιλεγμένους στόχους όταν το σύστημα φορέων πυροδοτείται από τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα.³⁹ Συγκεκριμένα, η χρήση ενός pH αποκρίσιμου πολυμερούς ως συστατικό σε συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων βασίζεται στην αλλαγή της διαλυτότητας του η οποία συμβαίνει σε μια κρίσιμη τιμή pH. Ένα τέτοιο πολυμερές είναι ο πολυ(μεθακρυλικός (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρας), PDPA, έχει $pK_a \sim 6,3$ και διαλύεται στο νερό κάτω από $pH = 6$ ως αδύναμος κατιονικός πολυηλεκτρολύτης αλλά καθίσταται αδιάλυτο σε αυξημένο pH ως αποτέλεσμα της αποπρωτονίωσης της τριτοταγούς αμίνης του.⁴⁰



Εικόνα 10: Δομή DPA.

2.0 Αποτελέσματα - συζήτηση

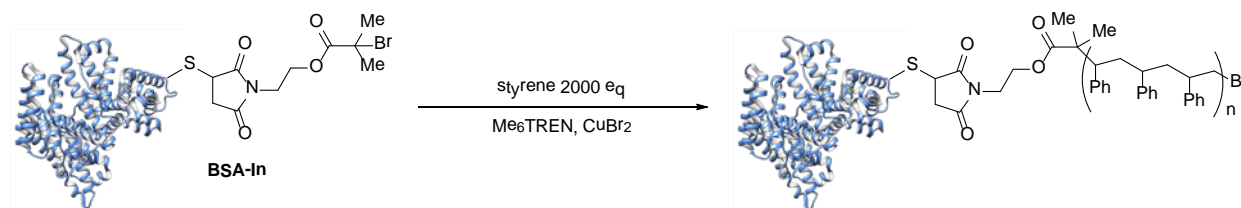
2.1 Σύνθεση BSA-μαλεϊμιδίου βιοεκκινητή



Σχήμα 1: Αντίδραση BSA-μακροεκκινητή

Για την σύνθεση των συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς ήταν απαραίτητη η σύνθεση του κατάλληλου βιοεκκινητή για τον πολυμερισμό. Η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) επιλέχθηκε καθώς φέρει μια μοναδική ελεύθερη κυστεΐνη στην επιφάνειά της στην θέση 34 που είναι υπεύθυνη για την εκλεκτική σύνδεση με τον μαλεϊμιδο-εκκινητή (ο οποίος είχε ήδη παρασκευαστεί στο εργαστήριο).⁵ Αρχικά προστέθηκε BSA (1 ισοδύναμο) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4 συγκέντρωσης 20mM. Ακολούθησε αργή προσθήκη του μαλεϊμιδίου ως διάλυμα DMSO C=70mM (20 ισοδ.) στο διάλυμα της BSA και το τελικό διάλυμα αφέθηκε σε ήπια ανάδευση για 48 ώρες. Το τελικό προϊόν τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης με σκοπό τον εμπλουτισμό του μίγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4, 10% διμέθυλοσουλφοξειδιο (DMSO), έπειτα σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 και τελικά σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στους 7°C. Το προϊόν χαρακτηρίστηκε επιτυχώς με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

2.2 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου (BSA-PS) μέσω φωτοεπαγόμενου ριζικού πολυμερισμού με αντιστρεπτή απενεργοποίηση

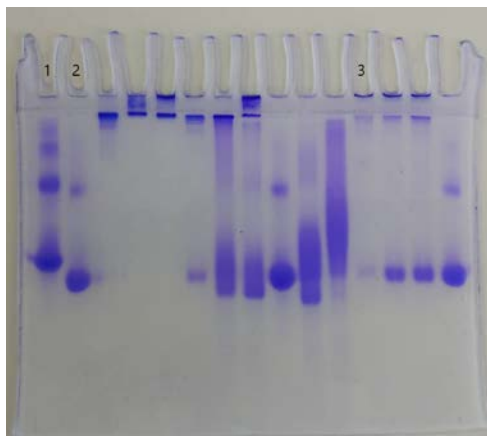


Σχήμα 2: Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου

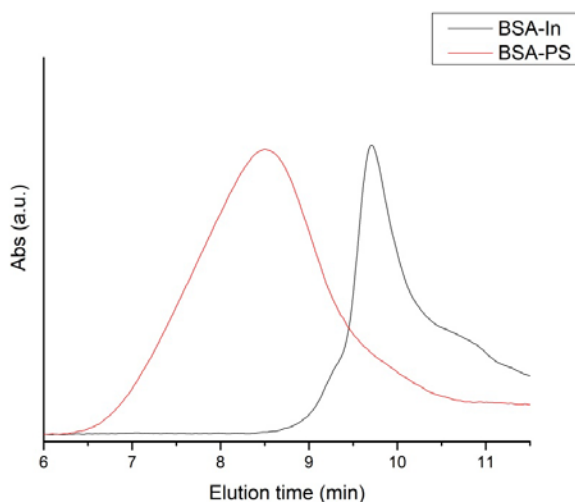
Το πρώτο βήμα του πειραματικού μέρους της παρούσας διπλωματικής ήταν η σύνθεση αμφίφιλων μορίων με στυρένιο ως το υδρόφοβο μονομερές μέσω φωτοεπαγόμενου ριζικού πολυμερισμού με αντιστρεπτή απενεργοποίηση. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε και παρουσία της επίσης υδρόφοβης⁴⁴ χρωστικής Nile Red με σκοπό να μελετηθεί εάν προσκολλάται ή εγκλείεται στην υδρόφοβη επιφάνεια του σχηματιζόμενου αμφίφιλου κυστιδίου.

Αρχικά σε μια πλαστική σύριγγα τοποθετήθηκε ο βιοεκκινητής (1 ισοδύναμο) με ένα μαγνητάκι και έπειτα ετοιμάστηκε διάλυμα βρωμιούχου χαλκού(II) (1.5 ισοδύναμα), ως καταλύτη, σε νερό στο οποίο προστέθηκε ο υποκαταστάτης Me₆TREN (12 ισοδ.). Στη συνέχεια σε ένα errendorf αναμίχθηκε νερό, στυρένιο (2000 ισοδ.) και η χρωστική Nile red (3.6 ισοδ.) (στην περίπτωση που η αντίδραση λαμβάνει μέρος παρουσία της) και αφέθηκε σε λουτρό υπερήχων προς σχηματισμό γαλακτώματος. Τέλος, 100ml του διαλύματος βρωμιούχου χαλκού(II) μεταφέρθηκαν στο γαλάκτωμα και όλο το τελικό διάλυμα στην σύριγγα με τον βιοεκκινητή όπου, αφού ελαχιστοποιήθηκε ο υπερκείμενος χώρος για την απομάκρυνση του οξυγόνου και πωματίστηκε, αφέθηκε σε ελαφρά ανάδευση για 5 ώρες στην λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης με σκοπό τον εμπλουτισμό του μίγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4, 10% ακετονιτρίλιο και 2% αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), έπειτα σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 και τελικά σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4. Μετά την επιτυχή απομάκρυνση της περίσσειας του αντιδρώντος μονομερούς καθώς και του συμπλόκου Cu(II) το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (εικόνα 11) και χρωματογραφία μέσω πηκτώματος (GPC) (εικόνα 12). Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο, με αραιώσεις 10% της αρχικής συγκέντρωσης, σε

ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20mM, pH=7.4, σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και τετραϋδροφουράνιο(THF). Ακολουθούν κάποια διαγράμματα ενδεικτικά.



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου PAGE σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.
Θέση 1: φυσική BSA, θέση 2: BSA-μακροεκκινητή, θέση 3: BSA-πολυστυρένιο

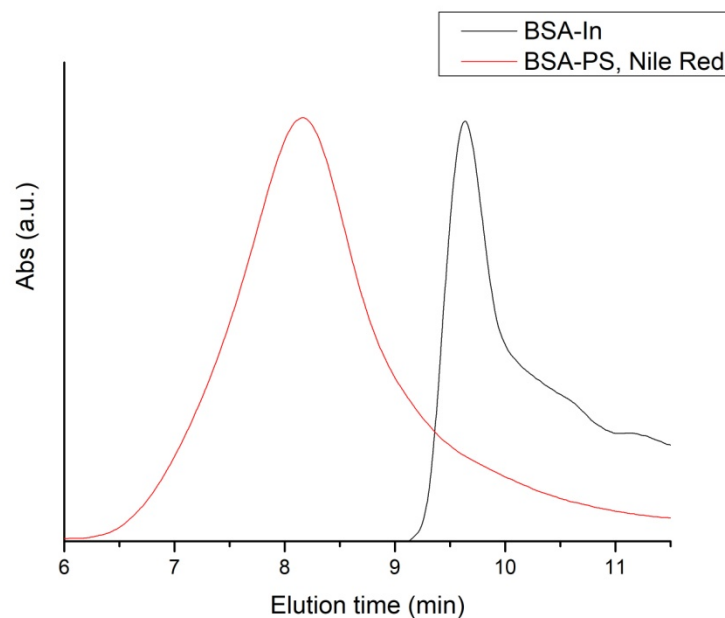


Εικόνα 12 : Γράφημα χρωματογραφίας GPC, BSA-PS συγκριτικά με τον βιοεκκινητή

Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 11, θέση 3) του προϊόντος της σύνθεσης BSA-PS υπήρχε μια καινούργια μπάντα στο τμήμα της πηκτής επιστοίβασης (αραιό τζελ) ενώ η μπάντα του βιοεκκινητή (Εικόνα 1, θέση 2) στη πηκτή διαχωρισμού (πυκνό τζελ) είχε σχεδόν εξαφανιστεί (φαίνεται ένα μικρό υπόλειμμα). Επομένως το προϊόν που έχει σχηματιστεί δεν είχε ικανότητα μετανάστευσης μέσα στην πηκτή γεγονός που καταδεικνύει την αύξηση του μοριακού του βάρους αλλά και τον αμφίφιλο χαρακτήρα του. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από χρωματογράφημα GPC (Εικόνα 12) όπου το προϊόν λόγω του μεγαλύτερου υδροδυναμικού του όγκου (μεγαλύτερο μόριο) εκλύεται σε μικρότερους χρόνους από τον βιοεκκινητή (μικρότερο μόριο).

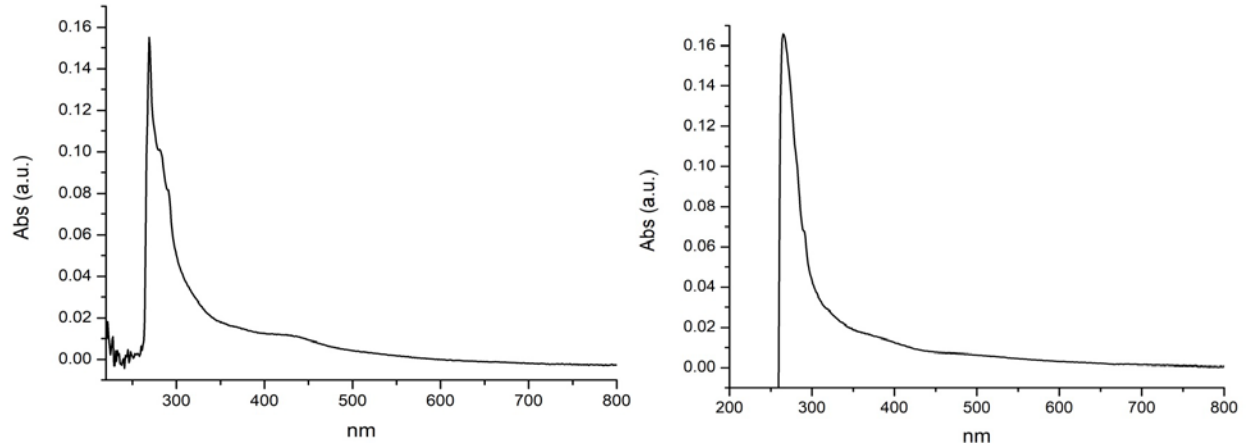


Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου PAGE σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Θέση 1: BSA-PS παρουσία Nile Red, θέση 2: BSA-μακροεκκινητή, θέση 3: φυσική BSA

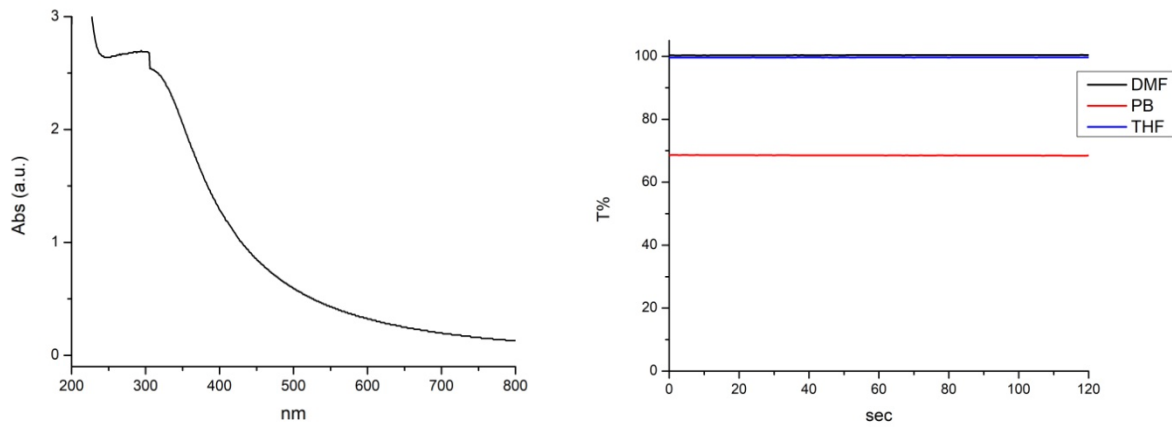


Εικόνα 14 : Γράφημα χρωματογραφίας GPC, BSA-PS παρουσία Nile Red συγκριτικά με τον βιοεκκινητή

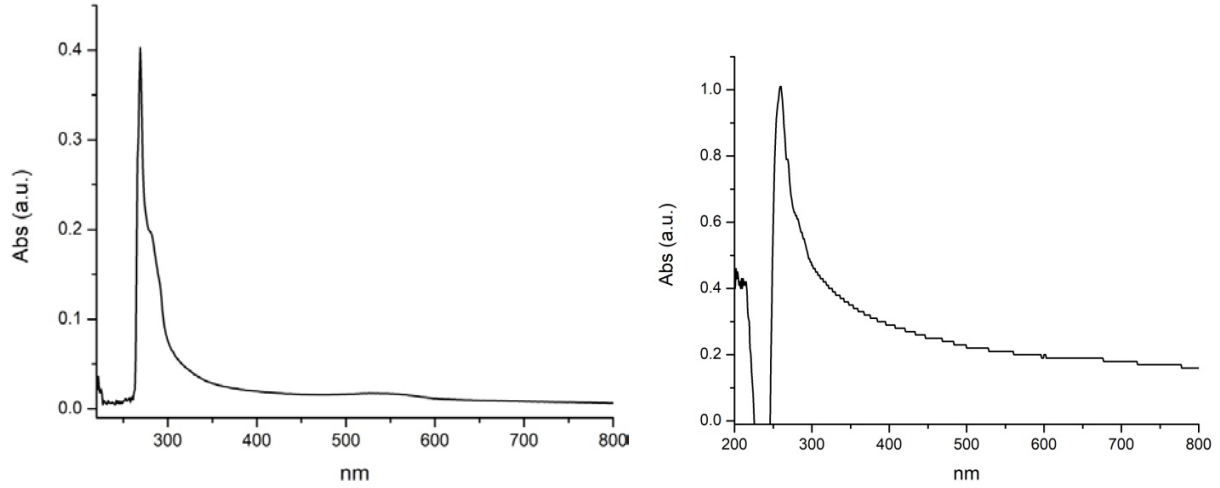
Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 13, θέση 1) παρατηρήθηκε η εμφάνιση μια καινούργιας μπάντας στην πηκτή επιστοίβασης και εμφανίζεται και στην αρχή της πηκτής διαχωρισμού, ενώ απουσιάζει η χαρακτηριστική μπάντα του βιοεκκινητή. Επομένως η αντίδραση είναι ποσοτική με το προϊόν να παρουσιάζει αυξημένο μοριακό βάρος και αμφίφιλο χαρακτήρα. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από χρωματογράφημα GPC (Εικόνα 14) όπου το προϊόν λόγω του μεγαλύτερου υδροδυναμικού του όγκου (μεγαλύτερο μόριο) εκλύεται σε μικρότερους χρόνους από τον βιοεκκινητή (μικρότερο μόριο).



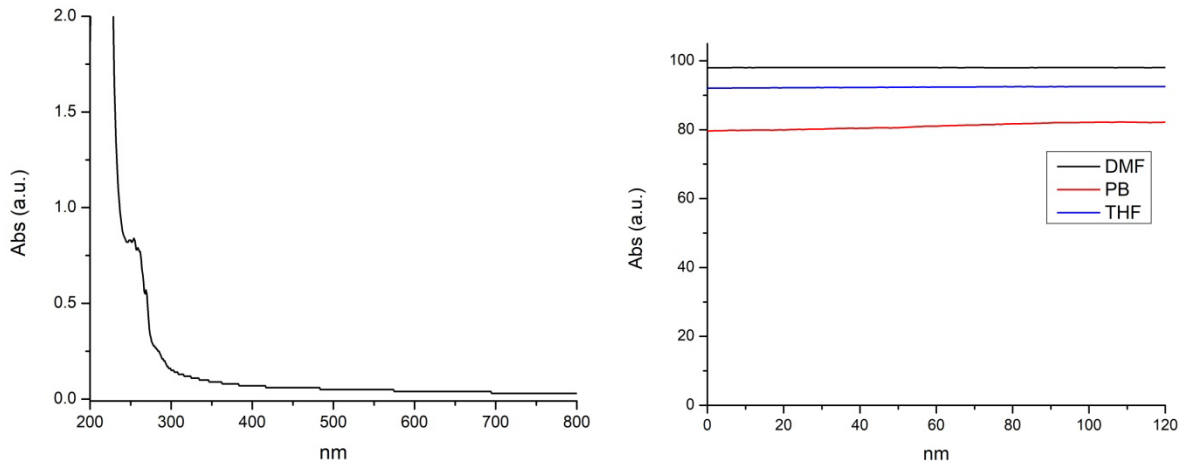
Εικόνα 15: αριστερά φάσμα BSA-PS σε DMF, δεξιά φάσμα BSA-PS σε THF



Εικόνα 16: αριστερά φάσμα BSA-PS σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, δεξιά φάσμα διαπερατότητας συναρτήσει χρόνου στα 665nm BSA-PS σε DMF (μαύρη γραμμή), THF (μπλε γραμμή), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (κόκκινη γραμμή)

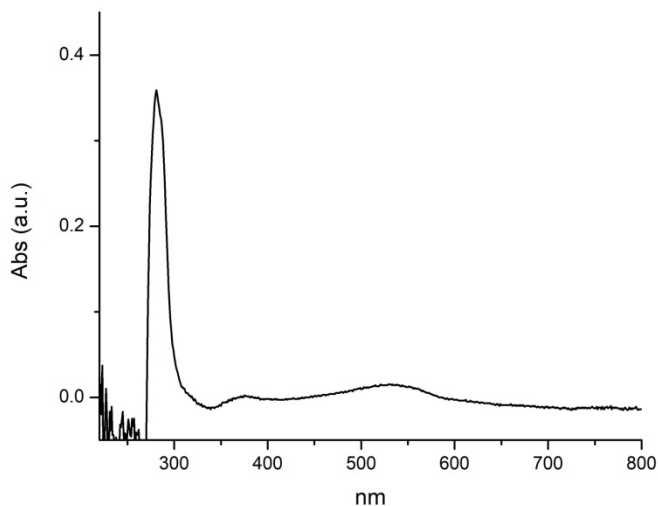


Εικόνα 17: αριστερά φάσμα BSA-PS παρουσία Nile Red σε DMF, δεξιά φάσμα BSA-PS παρουσία Nile Red σε THF



Εικόνα 18: αριστερά φάσμα BSA-PS σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών παρουσία Nile Red, δεξιά φάσμα διαπερατότητας συναρτήσει χρόνου BSA-PS παρουσία Nile Red σε DMF (μαύρη γραμμή) στα 650nm, THF (μπλε γραμμή) στα 740nm, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (κόκκινη γραμμή) στα 685nm

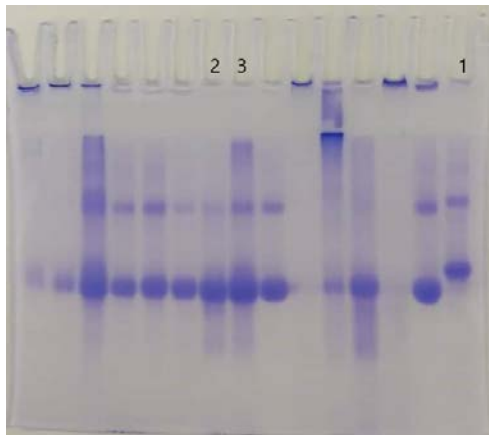
Σαν πρώτο αποτέλεσμα από τα διαγράμματα του φασματοφωτόμετρου παρατηρήθηκε αυξανόμενη απορρόφηση σε όλο το φάσμα στο THF(στις περισσότερες περιπτώσεις) και στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ως αποτέλεσμα σκέδασης του φωτός. Εν αντιθέσει, στο DMF μέσω του φάσματος της διαπερατότητας συναρτήσε του χρόνου αποδεικνύεται ότι είναι διαλυτό σε αυτό το BSA-πολυστυρένιο, εφόσον όσο μεγαλύτερη διαπερατότητα έχουμε τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η διαλυτότητα και σε αυτή την περίπτωση υπάρχει σχεδόν 100% διαπερατότητα σε όλες τις δοκιμές σε DMF. Επιπροσθέτως, όπως φαίνεται στα φάσματα στο DMF παρουσία Nile Red υπάρχει απορρόφηση στο μήκος κύματος που απορροφάει η χρωστική σύμφωνα με την βιβλιογραφία στα 550nm, ενώ στο διάλυμα φωσφορικών δεν υπάρχει η αντίστοιχη. Για περαιτέρω απόδειξη του παραπάνω ισχυρισμού αναφορικά με τον εγκλεισμό ή την προσκόλληση της χρωστικής (στην μεμβράνη) των νανοσωματιδίων έγινε ένα επιπλέον πείραμα BSA-πολυστυρενίου παρουσία Nile Red υπό τις ίδιες συνθήκες και αναλογίες με μόνη διαφορά ότι δεν προστέθηκε καταλύτης CuBr_2 και συνεπώς όπως φάνηκε και από τον χαρακτηρισμό της αντίδρασης δεν είχαμε τον σχηματισμό σωματιδίων (εικόνα 21,22). Η απορρόφηση στο DMF στα 550nm σε αυτή την περίπτωση ήταν $A= 0.012$ a.u. (εικόνα 19) ενώ στην αρχική αντίδραση (παρουσία καταλύτη) $A= 0.02$ a.u (εικόνα 17). Εν κατακλείδι, υπάρχει μια σημαντική διαφορά στην απορρόφηση (σχεδόν διπλάσια) οπότε μπορούμε να συμπεράνουμε τον επιτυχή εγκλεισμό στα σωματίδια των συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς. Εντούτοις, σε επόμενα πειράματα στη συνέχεια της διπλωματικής για να ενισχύσουμε τον ισχυρισμό μας ότι εργαζόμαστε πάνω στα σωματίδια του βιοπολυμερούς πραγματοποιείται φυγοκέντρηση και οποιεσδήποτε μετρήσεις παίρνουν μέρος διενεργούνται στο ίζημα που προκύπτει.



Εικόνα 19: Φάσμα BSA-PS σε DMF παρουσία Nile Red χωρίς χρήση καταλύτη.



Εικόνα 20: δεξιά BSA-PS παρουσία Nile Red, αριστερά BSA-PS παρουσία Nile Red απουσία καταλύτη



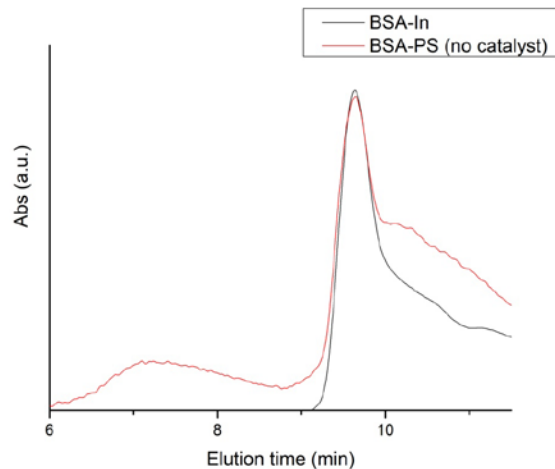
Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου

PAGE σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.

Θέση 1: φυσική BSA,

θέση 2: BSA-μακροεκκινητή

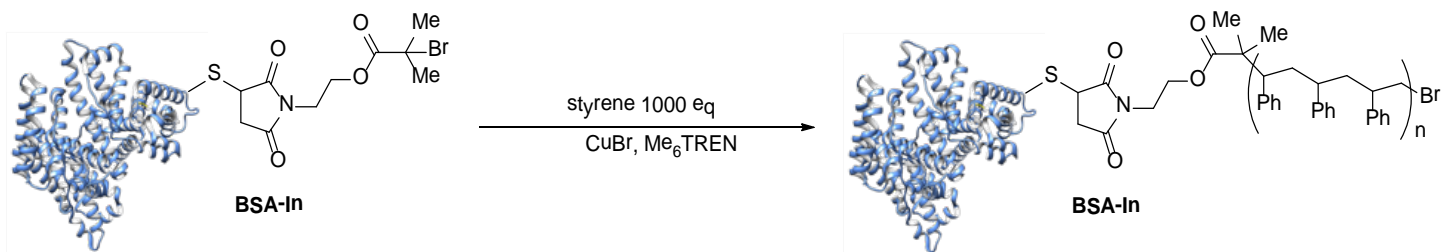
θέση 3: BSA-PS απουσία καταλύτη



Εικόνα 22: Γράφημα χρωματογραφίας GPC, BSA-PS απουσία καταλύτη

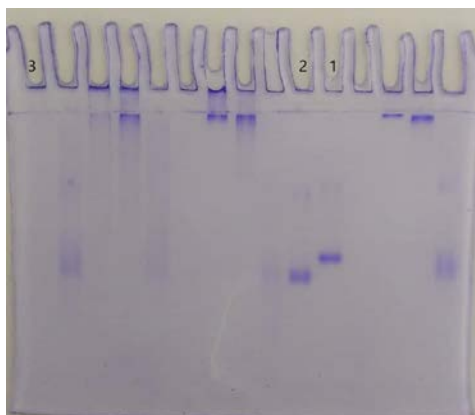
Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 21, θέση 3) του προϊόντος της σύνθεσης BSA-PS δεν εμφανίζεται κάποια καινούργια μπάντα στο τμήμα της πηκτής επιστοίβασης (αραιό τζελ) και η μπάντα του βιοεκκινητή (Εικόνα 21, θέση 2) στη πηκτή διαχωρισμού (πυκνό τζελ) φαίνεται να παραμένει ως έχει και στην θέση του προϊόντος. Επομένως δεν έχουμε τον σχηματισμό αφμίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από το χρωματογράφημα GPC (Εικόνα 22) όπου το προϊόν εκλούεται ακριβώς σε ίδιους χρόνους με τον βιοεκκινητή, καθώς δεν υπάρχει διαφορά στον υδροδυναμικό τους όγκο.

2.3 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου με την προσέγγιση της ανακατανομής



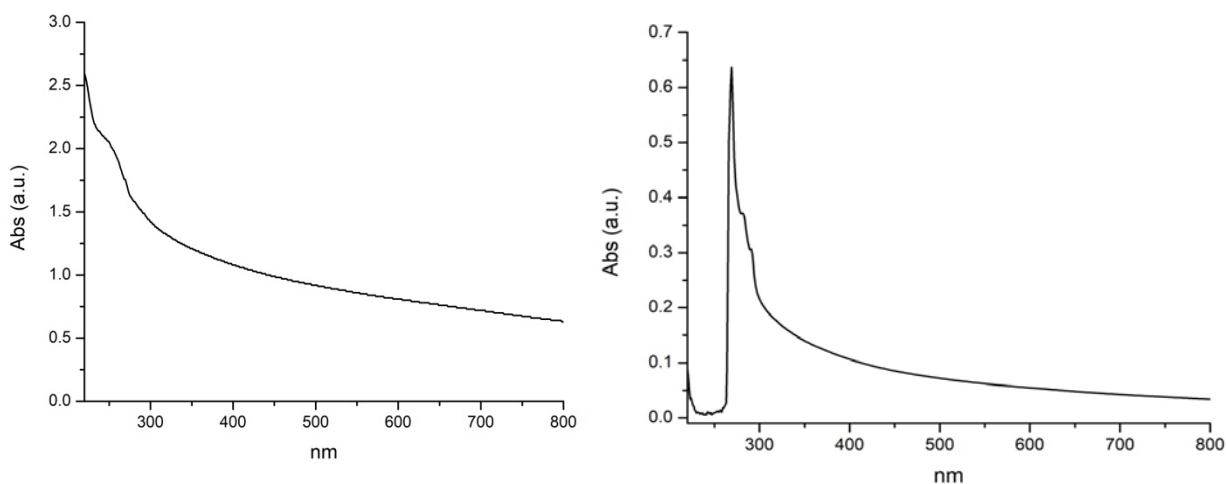
Σχήμα 3: Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου

Πραγματοποιήθηκε ακόμη η σύνθεση BSA-πολυστυρενίου και BSA-πολυστυρενίου παρουσία Nile Red αυτή την φορά με την προσέγγιση της ανακατανομής. Για την σύνθεση των αμφίφιλων μορίων BSA-πολυστυρενίου προστέθηκαν διαδοχικά σε μια πλαστική σύριγγα που περιείχε μαγνητάκι, ο βρωμιούχος χαλκός CuBr (40 ισοδ.), το νερό και ο υποκαταστάτης Me₆TREN (40 ισοδ.). Στη συνέχεια η πλαστική σύριγγα αφού σφραγίστηκε μεταφέρθηκε σε παγόλουτρο για 3 λεπτά με έντονη ανάδευση ώστε να διασφαλιστεί η αντίδραση ανακατανομής του Cu(I). Μετά το πέρας των 3 λεπτών προστέθηκε το στυρένιο (1000ισοδ.) μαζί με νερό και Nile Red (3.1ισοδ) αφού είχαν αφεθεί σε λουτρό υπερήχων προς σχηματισμό γαλακτώματος και ο βιοεκκινητής (1 ισοδ.). Μετά το πέρας της αντίδρασης, το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης με σκοπό τον εμπλουτισμό του μίγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4, 10% ακετονιτρίλιο και 2% αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), έπειτα σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 και τελικά σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4.

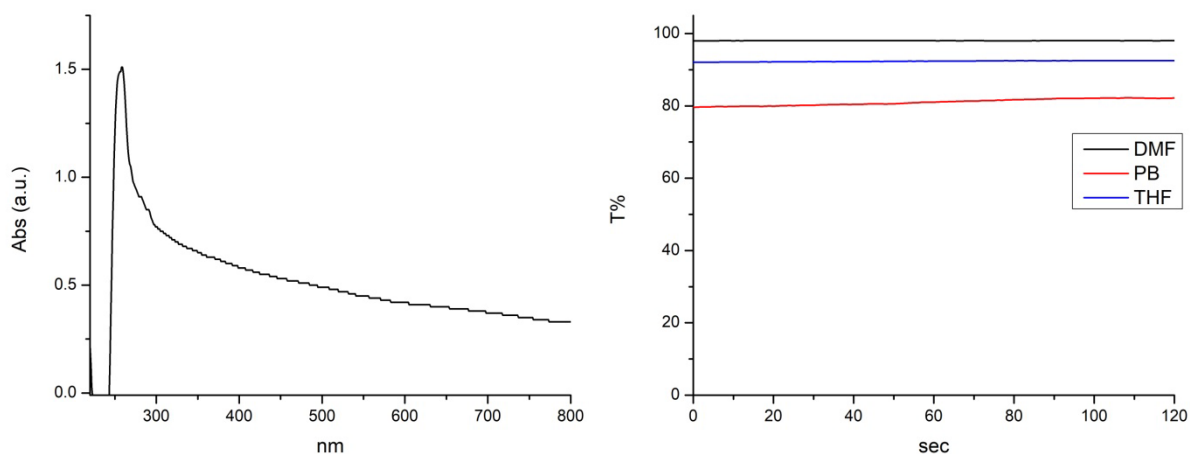


Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου PAGE σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.
 Θέση 1: φυσική BSA, θέση 2: BSA-μακροεκκινητή, θέση 3: BSA-PS

Μετά την επιτυχή απομάκρυνση της περίσσειας του αντιδρώντος μονομερούς καθώς και του συμπλόκου Cu(II) το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου (Εικόνα 23, θέση 3) παρατηρήθηκε η εμφάνιση μια καινούργιας μπάντας στο πηγάδι της πηκτής επιστοίβασης ενώ απουσιάζει η χαρακτηριστική μπάντα του βιοεκκινητή. Επομένως η αντίδραση είναι ποσοτική με το προϊόν να παρουσιάζει αυξημένο μοριακό βάρος και αμφίφιλο χαρακτήρα.

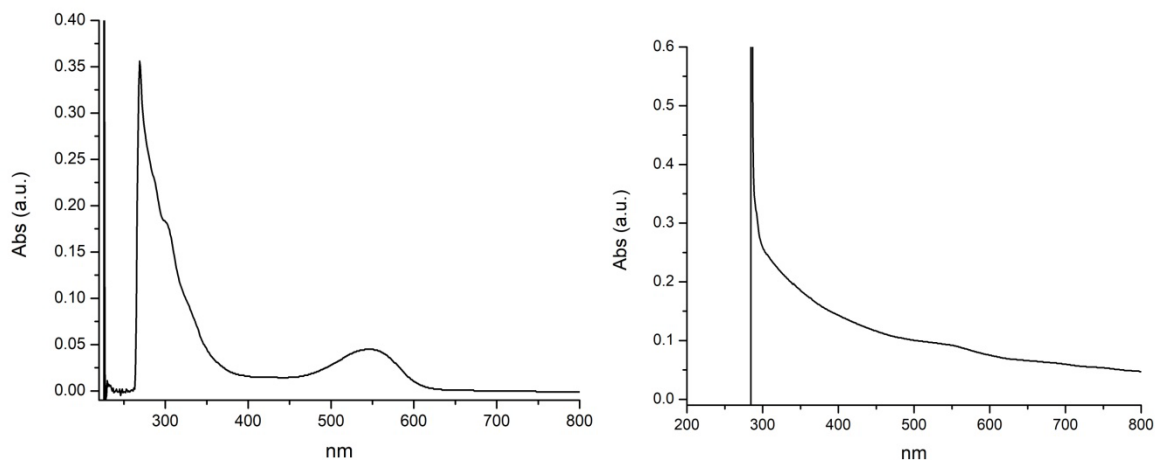


Εικόνα 24: Φάσμα BSA-PS αριστερά σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, δεξιά φάσμα BSA-PS σε DMF.



Εικόνα 25: Αριστερά φάσμα BSA-PS σε THF, δεξιά φάσμα διαπερατότητας συναρτήσει χρόνου BSA-PS στα 735nm σε DMF (μαύρη γραμμή), THF (μπλε γραμμή), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (κόκκινη γραμμή).

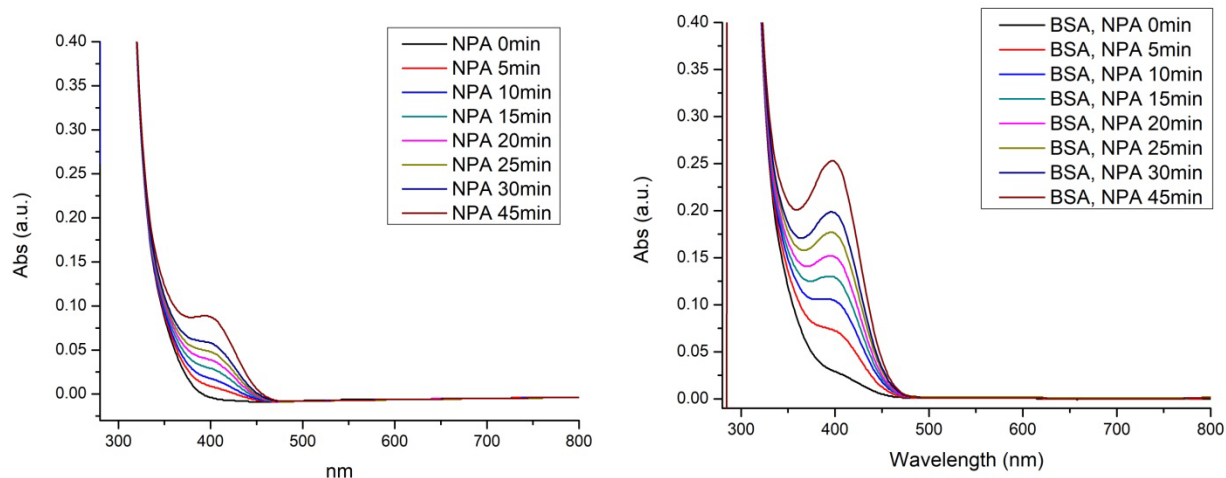
Τα αποτελέσματα από την φασματοφωτομετρία ήταν όμοια με του φωτοεπαγόμενου πολυμερισμού. Τα προκύπτοντα αμφίφιλα μόρια είναι διαλυτά στο DMF και με τις δύο μεθόδους καθώς επίσης παρατηρείται και πάλι η χαρακτηριστική απορρόφηση της χρωστικής στα 550nm στα φάσματα της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος.



Εικόνα 26: Αριστερά φάσμα BSA-PS παρουσία Nile Red σε DMF, δεξιά φάσμα BSA-PS παρουσία Nile Red σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

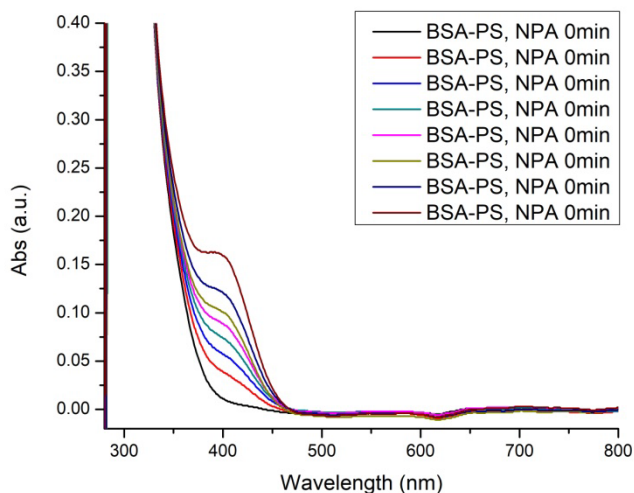
2.4 Διερεύνηση δραστηριότητας της αλβουμίνης ορού βοοειδών(BSA)

Η BSA, αποτελεί την πλέον άφθονη πρωτεΐνη στο πλάσμα του αίματος και σε αντίθεση με πολλές άλλες πρωτεΐνες πλάσματος δεν καλύπτεται από το υδατανθρακικό τμήμα και ως εκ τούτου, χρησιμεύει ως μεταφορέας για ποικίλες ενδογενείς και εξωγενείς ενώσεις. Επίσης, καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την τύχη πολλών φαρμάκων ή τοξικών ουσιών μεταφέροντάς τα στον τόπο δράσης ή βιομετατροπής τους. Εκτός από την ικανότητά της να δεσμεύει και να διανέμει διαφορετικές ενώσεις, η BSA μπορεί να συμμετέχει ενεργά στον μετασχηματισμό τους. Μπορεί να καταλύσει την υδρόλυση μίας ποικιλίας οργανικών μορίων όπως εστέρων, αμιδίων και φωσφορικών αλάτων.⁴¹ Στην παρούσα μελέτη έγινε διερεύνηση της υδρόλυσης του οξικού νιτροφαινυλο εστέρα (p-NPA) από την φυσική BSA και από το BSA-πολυστυρένιο και τον BSA-μακροεκκινητή, έχοντας ως αναφορά σκέτο p-NPA (καθώς υδρολύεται μόνο του στο νερό). Ακολουθούν φάσματα μετρήσεων φασματοφωτομετρίας όπου φαίνεται η χαρακτηριστική κορυφή στην οποία υπάρχει η απορρόφηση του προϊόντος της υδρόλυσης, η οξική νιτροφαινόλη, σε μήκος κύματος 400nm. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε διάλυμα BSA συγκέντρωσης 3 μ M και διάλυμα NPA σε μεθανόλη συγκέντρωσης 300mM το οποίο αραιώνεται σε νερό (1:100) ακριβώς πριν την αντίδραση προς σχηματισμό διαλύματος τελικής συγκέντρωσης 3mM. Δεν αξιολογήθηκε η αρχική δραστηριότητα (initial activity) η οποία φαίνεται στα πρώτα πέντε λεπτά.

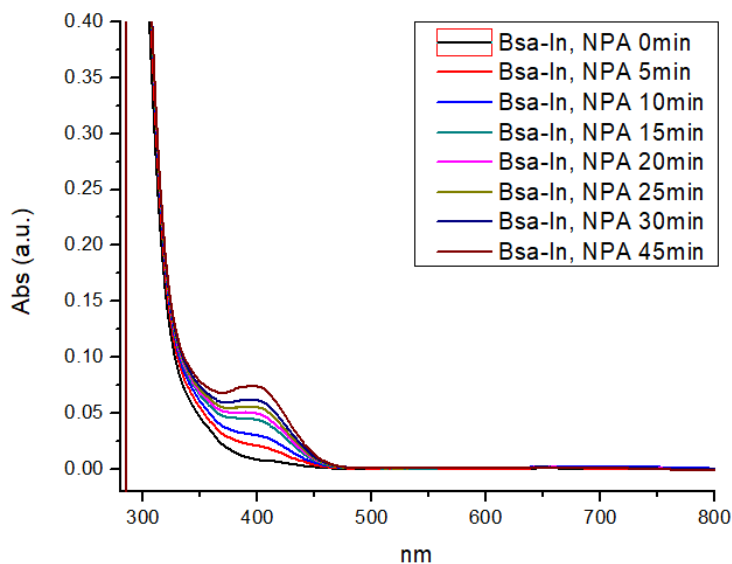


Από τα παραπάνω φάσματα φαίνεται η καταλυτική ικανότητα της BSA καθώς υπάρχει αυξητική τάση της απορρόφησης στα 400nm κατά το πέρασμα του χρόνου άρα όλο και μεγαλύτερη συγκέντρωση του προϊόντος της αντίδρασης. Συγκρίνοντας με το φάσμα

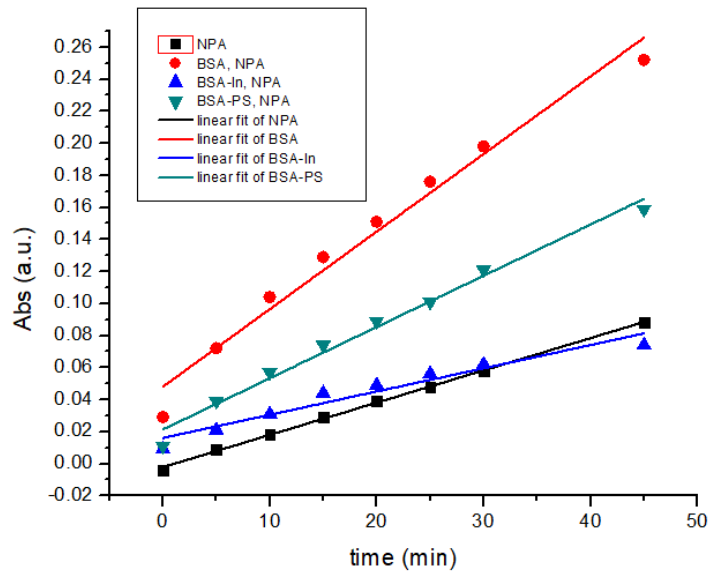
αναφοράς NPA, φαίνονται σχεδόν διπλάσιες οι τιμές της απορρόφησης στην υδρόλυση με την BSA.



Ακόμη, και στην περίπτωση των νανοφορέων BSA-PS η BSA φαίνεται να διατηρεί την καταλυτική της ικανότητα καθώς οι τιμές απορρόφησης που προκύπτουν είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες του NPA.



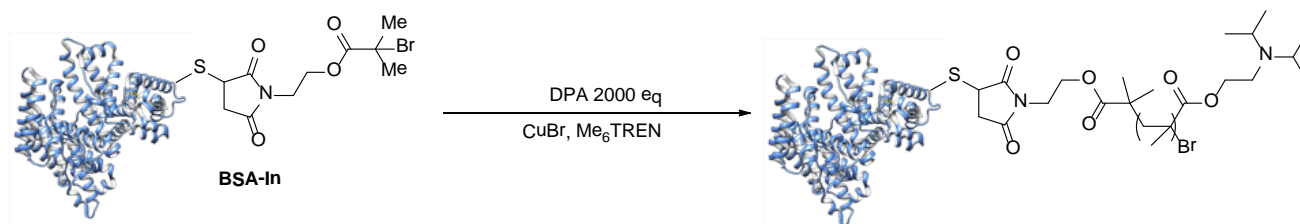
Το ίδιο συμπέρασμα παρόλα αυτά δεν προκύπτει και στην περίπτωση του BSA-μακροεκκινητή όπου φαίνεται η καταλυτική του ικανότητα να είναι η μικρότερη από όλα τα προηγούμενα πειράματα. Εντούτοις, μετά τον πολυμερισμό στην περίπτωση του BSA-πολυστευρενίου φαίνεται, όπως προαναφέρθηκε, οι νανοφορείς να έχουν ξανά καταλυτική δραστηριότητα. Αυτή η διαφορά στην καταλυτική τους ικανότητα πιθανότατα οφείλεται σε παράγοντες όπως η δομή και το μοριακό βάρος.



Equation	y = a + b*x			
Weight	No Weighting			
Residual Sum of Squares	6.57143E-6	7.90143E-4	1.82218E-4	2.11874E-4
Adj. R-Square	0.99873	0.97416	0.9358	0.98399
		Value	Standard Error	
NPA	Intercept	-0.00214	6.29093E-4	
Blank	Slope	0.00201	2.71347E-5	
BSA	Intercept	0.04807	0.0069	
	Slope	0.00484	2.97542E-4	
BSA-In	Intercept	0.01605	0.00331	
	Slope	0.00145	1.42887E-4	
BSA-PS	Intercept	0.02139	0.00357	
	Slope	0.0032	1.54076E-4	

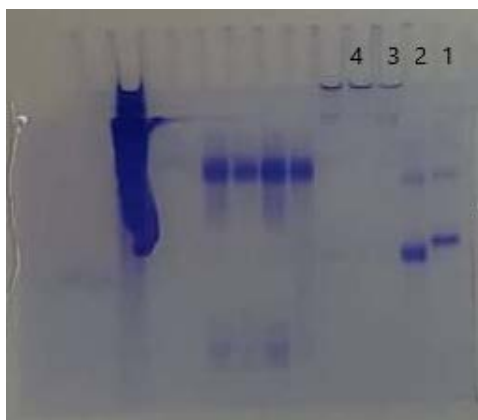
Για την εξακρίβωση των παραπάνω αποτελεσμάτων υπολογίστηκε και η κλίση των φασμάτων στο μήκος κύματος των 400nm, όπου η τιμή της κλίσης για την BSA είναι η μεγαλύτερη ακολουθεί το BSA-P, το NPA και τέλος ο BSA-μακροεκκινητής.

2.5 Σύνθεση BSA-πολυ(μεθακρυλικού (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρα), BSA-pDPA



Σχήμα 4: Σύνθεση BSA-pDPA

Για την σύνθεση των αμφίφιλων μορίων BSA-pDPA προστέθηκαν διαδοχικά σε μια πλαστική σύριγγα που περιείχε μαγνητάκι, ο βρωμιούχος χαλκός CuBr (40 ισοδ.), το νερό και ο υποκαταστάτης Me₆TREN (40 ισοδ.). Στη συνέχεια η πλαστική σύριγγα αφού σφραγίστηκε μεταφέρθηκε σε παγόλουτρο για 3 λεπτά με έντονη ανάδευση ώστε να διασφαλιστεί η αντίδραση ανακατανομής του Cu(I). Μετά το πέρας των 3 λεπτών προστέθηκε το DPA (2000ισοδ.) και τέλος ο βιοεκκινητής (1 ισοδ.). Μετά το πέρας της αντίδρασης, το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης με σκοπό τον εμπλουτισμό του μίγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4, 10% ακετονιτρίλιο και 2% αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), έπειτα σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 και τελικά σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4. Μετά την επιτυχή απομάκρυνση της περίσσειας του αντιδρώντος μονομερούς καθώς και του συμπλόκου Cu(II) το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (εικόνα 27).



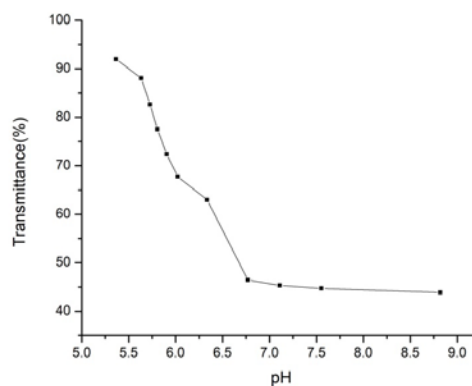
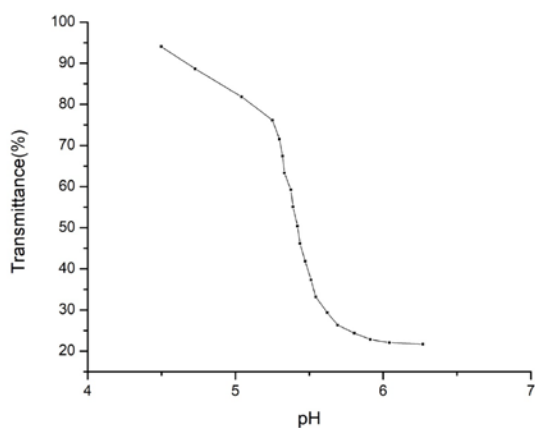
Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου PAGE σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.
Θέση 1: φυσική BSA, θέση 2: BSA-μακροεκκινητή, θέση 3: BSA-PDPA

Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 27, θέση 3) παρατηρήθηκε η εμφάνιση μια καινούργιας μπάντας στο πηγάδι της πηκτής επιστοίβασης και εμφανίζεται και στην αρχή της πηκτής διαχωρισμού, ενώ απουσιάζει η χαρακτηριστική μπάντα του βιοεκκινητή. Επομένως η αντίδραση είναι ποσοτική με το προϊόν να παρουσιάζει αυξημένο μοριακό βάρος και αμφίφιλο χαρακτήρα.

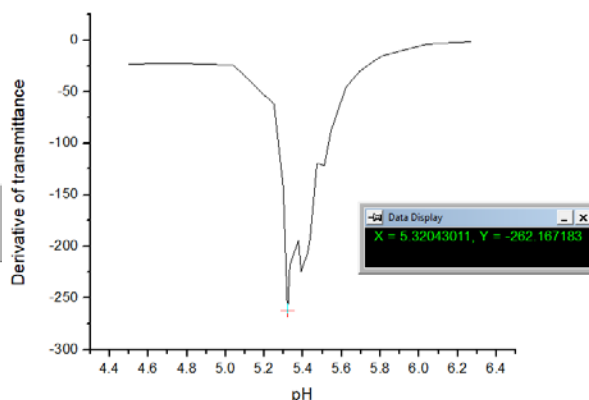
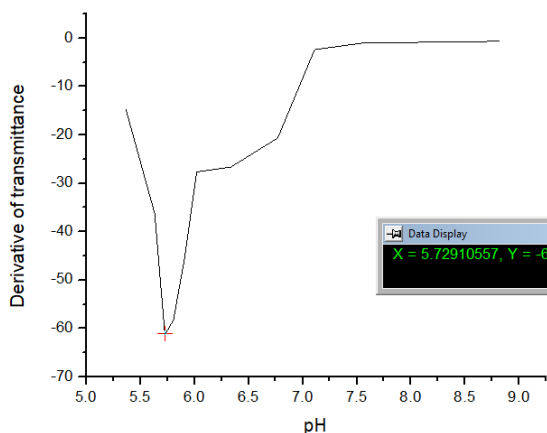
Το DPA επιλέχθηκε καθώς είναι ένα pH αποκρίσιμο μονομερές. Όπως έχει προαναφερθεί σε υψηλές τιμές pH παρουσιάζει υδρόφοβη συμπεριφορά σε υδατικά διαλύματα, αλλά γίνεται υδρόφιλο και υδατοδιαλυτό καθώς οι τιμές του pH πέφτουν κάτω από το σημείο καμπής, μια διαδικασία η οποία είναι αναστρέψιμη. Αυτοί οι λόγοι το καθιστούν ιδανικό μονομερές για την αποδέσμευση φαρμάκων καθώς προσαρμόζοντας αναλόγως το pH υπάρχει ο απαραίτητος έλεγχος της αποδέσμευσης. Για τον εντοπισμό του σημείου καμπής έγινε αραιώση του βιοπολυμερούς σε νερό (0.25:30) και μέτρηση της διαπερατότητας και του pH του δείγματος κάθε φορά μετά την προσθήκη μικρών ποσοτήτων HCl(0.02M). Η αλλαγή ήταν φανερή και οπτικά καθώς το δείγμα από θολό γινόταν σταδιακά διαυγές. Η διαδικασία έπειτα αναστράφηκε με την χρήση NaOH(0.05M) όπου το διάλυμα επιστρέφει στην αρχική του κατάσταση.



Εικόνα 28: αρχικό θολό διάλυμα BSA-PDPA, δεξιά διαυγές διάλυμα σε pH μικρότερο του σημείου καμπής



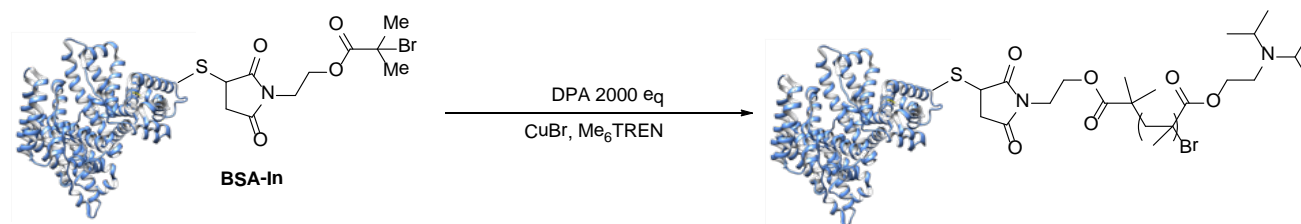
Εικόνα 29: Φάσματα διαπερατότητας συναρτήσεσι του pH, αριστερά: από μεγαλύτερο στο μικρότερο pH, δεξιά: από το μικρότερο pH στο μεγαλύτερο



Εικόνα 30: Φάσματα πρώτης παραγώγου της διαπερατότητας συναρτήσεσι του pH, αριστερά: από μεγαλύτερο στο μικρότερο pH, δεξιά: από το μικρότερο pH στο μεγαλύτερο

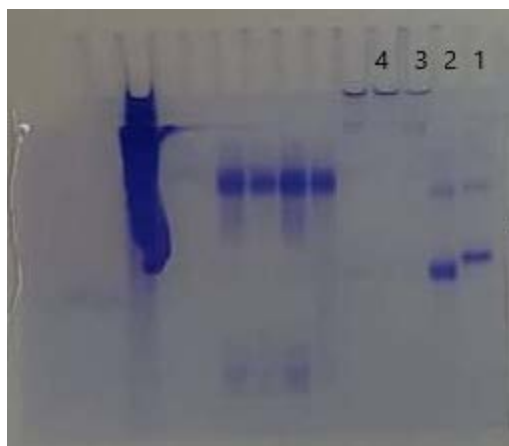
Από τα φάσματα (εικόνα 29) φαίνεται η απότομη αλλαγή από την υδρόφοβη στην υδρόφιλη κατάσταση. Για τον ακριβή εντοπισμό του pH στο οποίο λαμβάνει μέρος η αλλαγή υπολογίστηκε η πρώτη παράγωγος της διαπερατότητας (εικόνα 30) με μια μικρή απόκλιση στις δύο περιπτώσεις, στα όρια του πειραματικού σφάλματος. Συμπερασματικά το σημείο αλλαγής του βιοπολυμερούς από υδρόφοβο σε υδρόφιλο είναι περίπου σε μια μέση τιμή των δύο στο 5.5.

2.6 Σύνθεση BSA-πολυ(μεθακρυλικού (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρα), BSA-pDPA παρουσία φλουορεσκεΐναμίνης



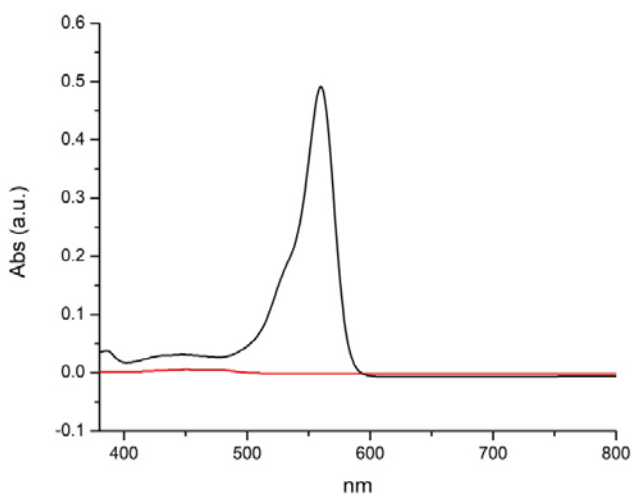
Σχήμα 5: Σύνθεση BSA-pDPA παρουσία φλουορεσκεΐναμίνης

Για την σύνθεση των αμφίφιλων μορίων BSA-pDPA προστέθηκαν διαδοχικά σε μια πλαστική σύριγγα που περιείχε μαγνητάκι, ο βρωμιούχος χαλκός CuBr (40 ισοδ.), το νερό και ο υποκαταστάτης Me₆TREN (40 ισοδ.). Στη συνέχεια η πλαστική σύριγγα αφού σφραγίστηκε μεταφέρθηκε σε παγόλουτρο για 3 λεπτά με έντονη ανάδευση ώστε να διασφαλιστεί η αντίδραση ανακατανομής του Cu(I). Μετά το πέρας των 3 λεπτών προστέθηκε το DPA (2000ισοδ.) και τέλος ο βιοεκκινητής (1 ισοδ.) μαζί με την φλουορεσκεΐναμίνη (fluoresceinamine, 6.1 ισοδ.). Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολούθησε φυγοκέντρηση έγινε απόχυση του υπερκευμένου και αποθηκεύτηκε το ίζημα. Το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου(εικόνα 21). Η φλουορεσκεΐναμίνη είναι μια υδρόφιλη χρωστική⁴² η οποία εγκλείεται στα σωματίδια (τα οποία βρίσκονται στο προκύπτον ίζημα), προσομοιάζοντας τον εγκλεισμό φαρμάκου, με σκοπό την μέτρηση της απελευθέρωσης. Χρησιμοποιώντας την ιδιότητα του DPA ως pH αποκρινόμενο και έχοντας προσδιορίσει το σημείο όπου τα σωματίδια γίνονται υδρόφιλα και διαλυτά σε pH≈5.5 και άρα το εύρος pH στο οποίο θα απελευθερώνεται η χρωστική αφού θα ανοίγουν τα κυστίδια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος στο φασματοφωτόμετρο. Για την μέτρηση της απελευθέρωσης το φυγοκεντρημένο προϊόν διαλύθηκε (συγκέντρωση 1mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20mM και τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης, σε 100ml υπερκάθαρο νερό. Ανά 1 ώρα για 3 ώρες πάρθηκε δείγμα για μέτρηση της απορρόφησης όπου φάνηκε να έχει αυξανόμενη τάση στο μήκος κύματος απορρόφησης της χρωστικής λ=496nm. Έπειτα, το pH μειώθηκε (με προσθήκη μικρών ποσοτήτων HCL) αρχικά με σκοπό να βρισκόμαστε λίγο υψηλότερα από το σημείο αλλαγής διαλυτότητας του BSA-PDPA και έπειτα στο σημείο αλλαγής, για την διερεύνηση της αύξησης της απορρόφησης. Η μελέτη εντούτοις καταστάθηκε ανεπιτυχής καθώς η φλουορεσκεΐναμίνη δεν είχε απορρόφηση σε όξινο διάλυμα (εικόνα 32), κάτι το οποίο φαίνεται και από την βιβλιογραφία.⁴³

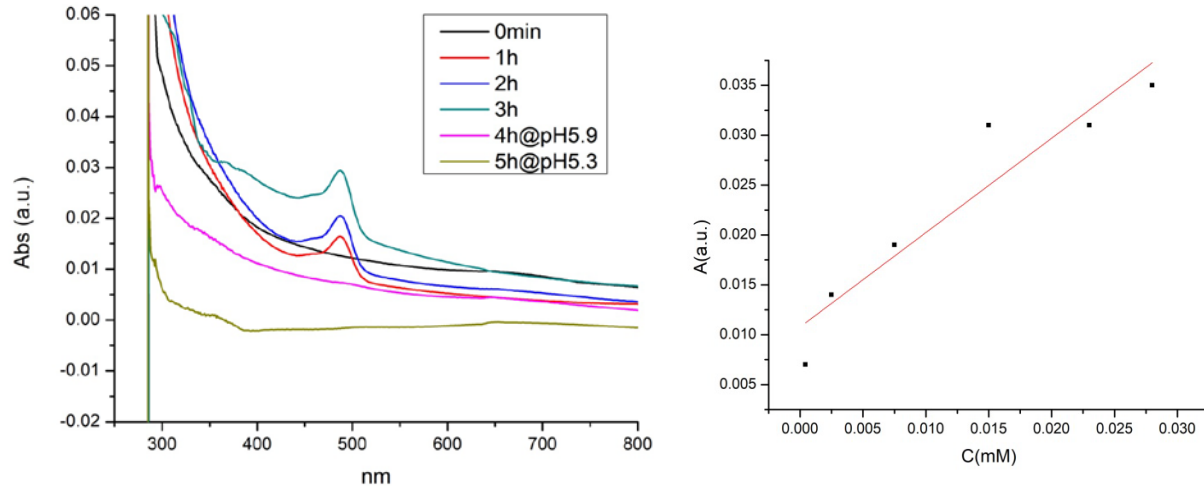


Εικόνα 31 : Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου PAGE σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.
 Θέση 1: φυσική BSA, θέση 2: BSA-μακροεκκινητή, θέση 4: BSA-PDPA παρουσία φλουρεσκεΐναμίνης

Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 31, θέση 3) παρατηρήθηκε η εμφάνιση μια καινούργιας μπάντας στο πηγάδι της πηκτής επιστοίβασης και εμφανίζεται και στην αρχή της πηκτής διαχωρισμού, ενώ απουσιάζει η χαρακτηριστική μπάντα του βιοεκκινητή. Επομένως η αντίδραση είναι ποσοτική με το προϊόν να παρουσιάζει αυξημένο μοριακό βάρος και αμφίφιλο χαρακτήρα.



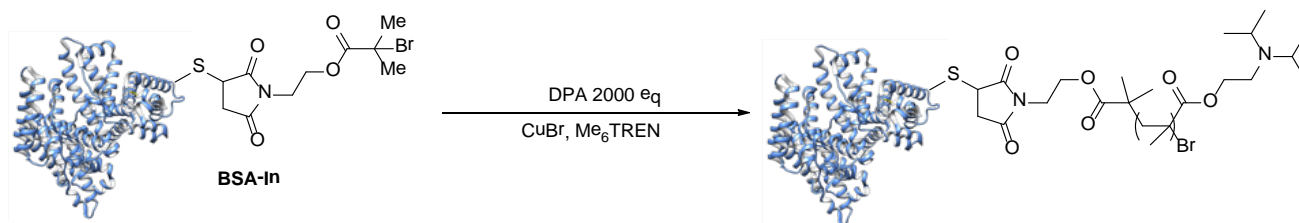
Εικόνα 32: μαύρη γραμμή φλουρεσκεΐναμίνη σε pH=7.4, κόκκινη γραμμή φλουρεσκεΐναμίνη σε pH=4.8



Εικόνα 33: Αριστερά φάσμα απορρόφησης της απελευθέρωσης της φλουορεσκεΐναμίνης, δεξιά καμπύλη βαθμονόμησης φλουορεσκεΐναμίνης συναρτήσει συγκέντρωσης.

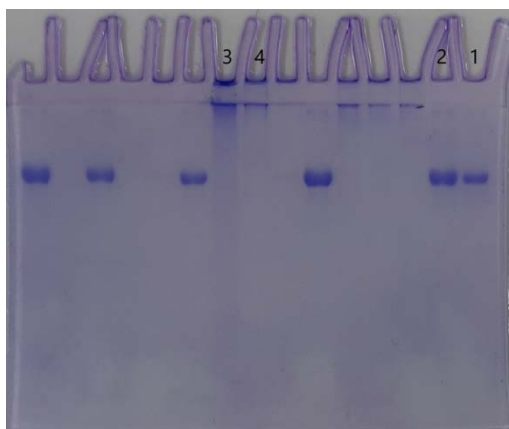
Από τα παραπάνω φάσματα (εικόνα 33) φαίνεται η αργή απελευθέρωση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων της χρωστικής συγκριτικά και με το φάσμα της καμπύλης βαθμονόμησης αλλά παρατηρείται και πάλι η μηδενική απορρόφηση της φλουορεσκεΐναμίνης σε pH= 5.9 στις 4 ώρες και σε pH=5.3 στις 5 ώρες. Συμπερασματικά η μελέτη της απελευθέρωσης της φλουορεσκεΐναμίνης δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση της ιδιότητας του pDPA ως pH αποκρίσιμου πολυμερούς.

2.7 Σύνθεση BSA-πολυ(μεθακρυλικού (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρα), BSA-PDPA παρουσία σαλικυλικού οξέος



Σχήμα 5: Σύνθεση BSA-pDPA παρουσία σαλικυλικού οξέος

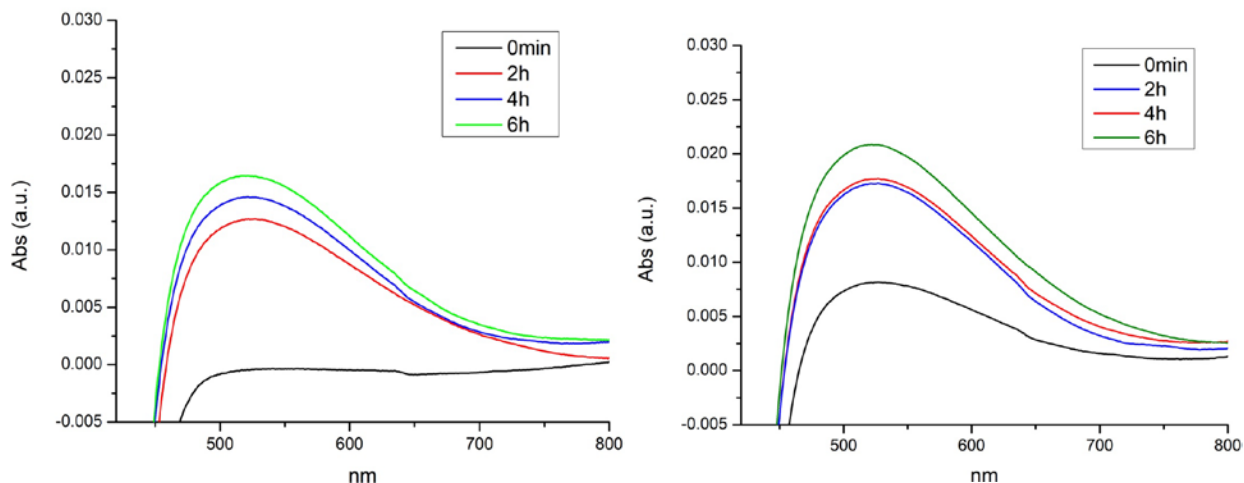
Για την σύνθεση των αμφίφιλων μορίων BSA-pDPA προστέθηκαν διαδοχικά σε μια πλαστική σύριγγα που περιείχε μαγνητάκι, ο βρωμιούχος χαλκός CuBr (40 ισοδ.), το νερό και ο υποκαταστάτης Me₆TREN (40 ισοδ.). Στη συνέχεια η πλαστική σύριγγα αφού σφραγίστηκε μεταφέρθηκε σε παγόλουτρο για 3 λεπτά με έντονη ανάδευση ώστε να διασφαλιστεί η αντίδραση ανακατανομής του Cu(I). Μετά το πέρας των 3 λεπτών προστέθηκε το DPA (2000ισοδ.) και τέλος ο βιοεκκινητής (1 ισοδ.) μαζί με το σαλικυλικό οξύ (122 ισοδ.). Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολούθησε φυγοκέντρηση έγινε απόχυση του υπερκειμένου και αποθηκεύτηκε το ίζημα. Το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (εικόνα 34).



Εικόνα 34: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου PAGE σε αποδιατακτικές συνθήκες.
Θέση 1: φυσική BSA, θέση 2: BSA-μακροεκκινητή, θέση 3: BSA-PDPA παρουσία σαλικυλικού, θέση 4: BSA-PDPA

Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 34, θέση 3) παρατηρήθηκε η εμφάνιση μια καινούργιας μπάντας στο πηγάδι της πηκτής επιστοίβασης και εμφανίζεται και στην αρχή της πηκτής διαχωρισμού, ενώ απουσιάζει η χαρακτηριστική μπάντα του βιοεκκινητή. Επομένως η αντίδραση είναι ποσοτική με το προϊόν να παρουσιάζει αυξημένο μοριακό βάρος και αμφίφιλο χαρακτήρα.

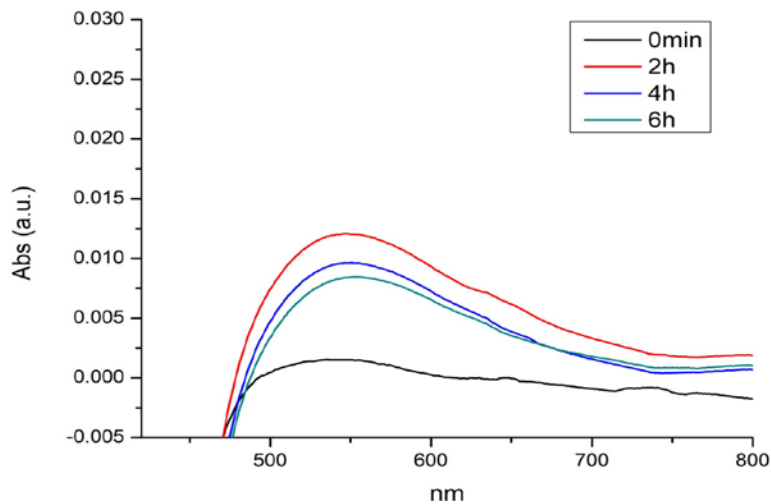
Για την μελέτη της απελευθέρωσης του σαλικυλικού οξέος το τελικό προϊόν μετά την φυγοκέντρηση (ίζημα) διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20mM και τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης, σε 100mL υπερκάθαρο νερό. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. Στην μια περίπτωση, ως σημείο αναφοράς, λήφθηκαν δείγματα ανά 2 ώρες (χωρίς καμία αλλαγή σε pH). Στην δεύτερη περίπτωση έγιναν τα ίδια βήματα με την διαφορά ότι το pH του διαλύματος ήταν pH=6 (με την προσθήκη σταγόνων HCL) έτσι ώστε να είναι λίγο μεγαλύτερο από το pH του σημείου καμπής της διαλυτότητας του PDPA και στην τελευταία περίπτωση το pH, pH=4.2, ήταν πολύ χαμηλότερο από εκείνο του σημείου καμπής. Τα δείγματα συμπλοκοποιήθηκαν με το ιόν μετάλλου μεταπτώσεως Fe^{3+} . Το σύμπλοκο αυτό έχει μωβ χρώμα (στις πολύ μικρές συγκεντρώσεις που έγιναν οι μετρήσεις δεν υπήρχε σημαντική μεταβολή του χρώματος) και μέγιστη απορρόφηση κοντά στα 535nm.



Εικόνα 35: Αριστερά φάσμα απορρόφησης συμπλόκου χωρίς μεταβολή του pH, δεξιά φάσμα απορρόφησης συμπλόκου σε διάλυμα με pH=6

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω φάσματα (εικόνα 35) φαίνεται ότι προσαρμόζοντας το pH μπορούμε να έχουμε έλεγχο πάνω στην ποσότητα του φαρμάκου που απελευθερώνεται, καθώς υπάρχει μια μικρή απελευθέρωση απλά και μόνο με το πέρασμα του χρόνου η οποία

αμέσως αυξάνεται με την πτώση του pH καθώς τα σωματίδια πλησιάζουν στο σημείο διαλυτότητας (υδρόφιλης κατάστασής) τους.



Εικόνα 36: Φάσμα απορρόφησης συμπλόκου σε pH=4

Ενώ θα περιμέναμε σε pH=4.2 όπου είναι διαλυτό το BSA-PDPA να υπάρχει η μεγαλύτερη απορρόφηση λόγω αύξησης των συγκεντρώσεων του σαλικυλικού οξέος που απελευθερώνονται, αυτό δεν επιβεβαιώνεται από την φασματοφωτομετρία. Πιθανότατα οι τόσο χαμηλές τιμές του pH να επηρεάζουν το σύμπλοκο FeCl_3 – σαλικυλικού και έτσι να μην αντικατοπτρίζονται οι αναμενόμενες τιμές στα προκύπτοντα φάσματα.

3.0 Πειραματικό μέρος

3.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν των εταιρειών Sigma-Aldrich και Fluka Chemica. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε το Mini-PROTEAN TetraCell από την εταιρία Bio-Rad και από τη Spectrum Labs οι μεμβράνες διαπίδυσης (Bioteck Regenerated Cellulose Dialysis Membranes) με μοριακό βάρος αποκοπής (MWCO) 10kDa και 25kDa.

3.2 Αναλυτικές τεχνικές

Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 4% stacking gel και 10% resolving gel και το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Mini-PROTEAN TetraCell της BIO-RAD. Τα δείγματα διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε Tris-HCl, glycerol και bromo phenol blue (Premixed Sample Buffer for Native PAGE της BIO-RAD) και η χρώση των gels πραγματοποιήθηκε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue.

Χρωματογραφία μέσω πηκτώματος (GPC)

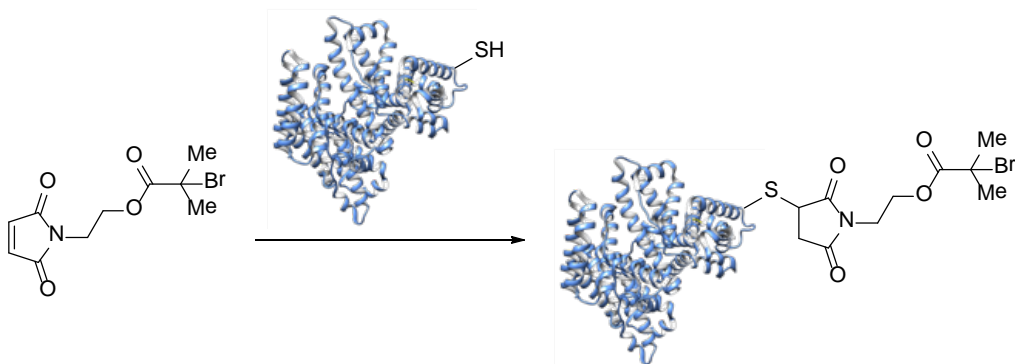
Η χρωματογραφία μέσω πηκτώματος πραγματοποιήθηκε με το σύστημα της εταιρείας Shimadzu, το οποίο αποτελείται από ένα απαερωτή διαλυτών DGU-14A, μία αντλία LC-10AD, έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης RID-10A, έναν αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10AD, ένα φασματόμετρο SPD-10A UV-vis και ένα φούρνο κολώνας CTO-10A. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από 5% ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100mM (pH=7.4) και 10% MeCN σε φιλτραρισμένο υπερκάθαρο νερό. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με κολώνα από την ThermoFisher Scientific, με σταθερή ροή 1 ml/min σε μήκος κύματος 254nm.

Φασματοφωτομετρία (UV-Vis)

Η φασματοφωτομετρία πραγματοποιήθηκε με το φασματοφωτόμετρο UV-1900 της εταιρείας Shimadzu και η επεξεργασία των φασμάτων με το πρόγραμμα UV Probe 2.70.

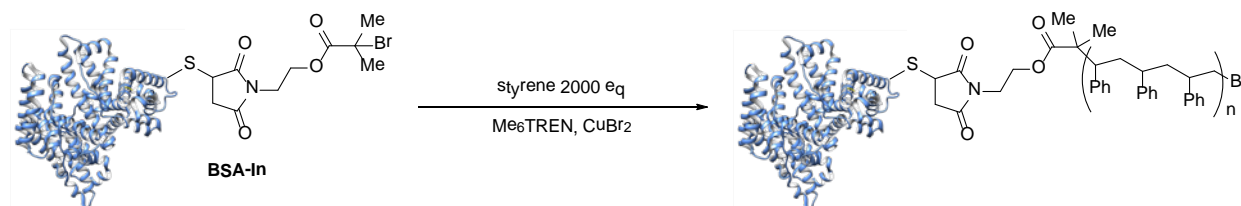
3.3 Αναλυτικές Μέθοδοι Σύνθεσης

3.3.1. Σύνθεση BSA-μακροεκκινητή



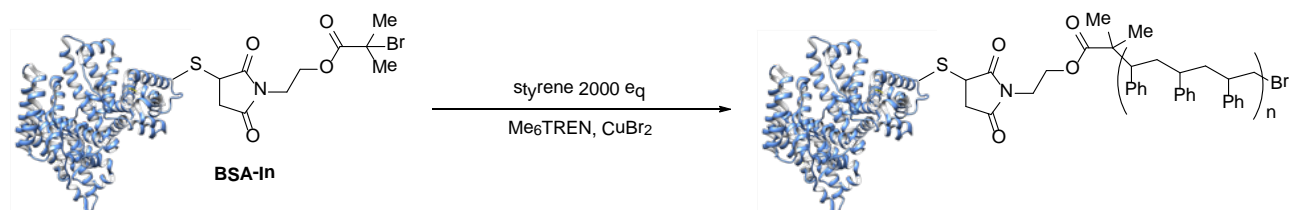
Αρχικά σε ένα falcon (15ml) προστέθηκαν 220mg BSA (0.033 mmole, 1ισοδ.) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 9.5mL (20mM, pH= 7.4) προς παρασκευή διαλύματος συγκέντρωσης 0.35mM και αφέθηκε υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθησε αργή προσθήκη του μαλεϊμιδίου ως διάλυμα DMSO C=70mM (0.065mmol, 20 ισοδ.) στο διάλυμα της BSA και το τελικό διάλυμα αφέθηκε σε ήπια ανάδευση για 48 ώρες. Το τελικό προϊόν τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 25kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μίγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4, 10% διμέθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) για όλο το βράδυ, έπειτα σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 ώρες και τελικά σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 επιπλέον ώρες. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στους 7°C. Το προϊόν χαρακτηρίστηκε επιτυχώς με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

3.3.2 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου (BSA-PS) μέσω φωτοεπαγόμενου ριζικού πολυμερισμού με αντιστρεπτή απενεργοποίηση



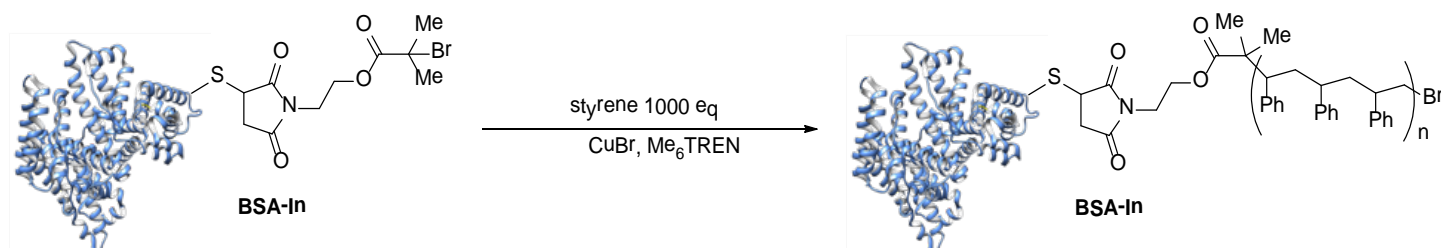
Σε μια πλαστική σύριγγα τοποθετήθηκαν 1.25ml βιοεκκινητή (0.437×10^{-3} mmol, 1 ισοδ.) με ένα μαγνητάκι. Σε ένα falcon ετοιμάστηκε διάλυμα βρωμιούχου χαλκού(II) 15mg σε 10ml υπερκάθαρο νερό και σε ένα errendorf αναμίχθηκαν 0.45ml υπερκάθαρο νερό και 0.1ml στυρένιο (0.872 mmol, 2000 ισοδ.). Σε ένα νέο errendorf προστέθηκε 1ml από το διάλυμα του CuBr_2 και 14μl Me_6TREN (το διάλυμα απέκτησε ανοιχτό μπλε χρώμα). Αφού αφέθηκε σε λουτρό υπερήχων το μίγμα στυρένιο- νερό προς σχηματισμό γαλακτώματος, 100μl του διαλύματος CuBr_2 (0.655×10^{-3} mmol, 1.5 ισοδ.) - Me_6TREN (5.244×10^{-3} mmol, 12 ισοδ.) μεταφέρθηκαν στο γαλάκτωμα και όλο το τελικό διάλυμα στην σύριγγα με τον βιοεκκινητή με γυάλινη σύριγγα. Τέλος, ελαχιστοποιήθηκε ο υπερκείμενος χώρος για την απομάκρυνση του οξυγόνου, η σύριγγα πωματίστηκε και αφέθηκε σε ελαφρά ανάδευση για 5 ώρες στην λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 25kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μίγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4, 10% MeCN, 2% EDTA για όλο το βράδυ, έπειτα σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 ώρες και τελικά σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 επιπλέον ώρες.

3.3.2 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου (BSA-PS) μέσω φωτοεπαγόμενου ριζικού πολυμερισμού με αντιστρεπτή απενεργοποίηση παρουσία χρωστικής Nile Red



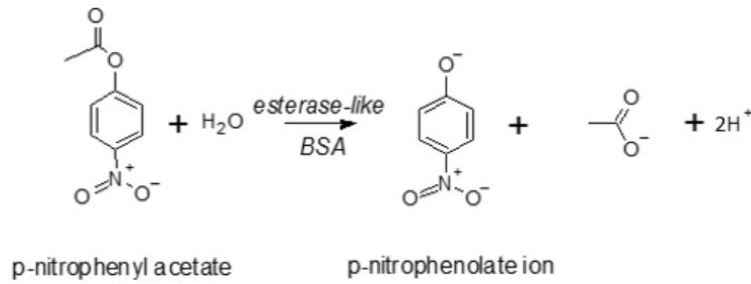
Σε μια πλαστική σύριγγα τοποθετήθηκαν 1.25ml βιοεκκινητή (0.437×10^{-3} mmol, 1 ισοδ.) με ένα μαγνητάκι. Σε ένα falcon ετοιμάστηκε διάλυμα βρωμιούχου χαλκού(II) 15mg σε 10ml υπερκάθαρο νερό. Σε ένα errendorf αναμίχθηκαν 0.45ml υπερκάθαρο νερό, 0.1ml στυρένιο (0.872 mmol, 2000 ισοδ.) και 0.5mg χρωστική Nile Red (1.57×10^{-3} mmol, 3.6 ισοδ.). Σε ένα νέο errendorf προστέθηκε 1ml από το διάλυμα του CuBr₂ και 14μl Me₆TREN (το διάλυμα απέκτησε ανοιχτό μπλε χρώμα). Αφού αφέθηκε σε λουτρό υπερήχων το μίγμα στυρένιο- νερό- Nile Red προς σχηματισμό γαλακτώματος, 100μl του διαλύματος CuBr₂ (0.655×10^{-3} mmol, 1.5 ισοδ.) - Me₆TREN (5.244×10^{-3} mmol, 12 ισοδ.) μεταφέρθηκαν στο γαλάκτωμα και όλο το τελικό διάλυμα στην σύριγγα με τον βιοεκκινητή με γυάλινη σύριγγα. Τέλος, ελαχιστοποιήθηκε ο υπερκείμενος χώρος για την απομάκρυνση του οξυγόνου, η σύριγγα πωματίστηκε και αφέθηκε σε ελαφρά ανάδευση για 5 ώρες στην λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 25kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μίγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4, 10% MeCN, 2% EDTA για όλο το βράδυ, έπειτα σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 ώρες και τελικά σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 επιπλέον ώρες.

3.3.3 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου (BSA-PS) με την προσέγγιση της ανακατανομής



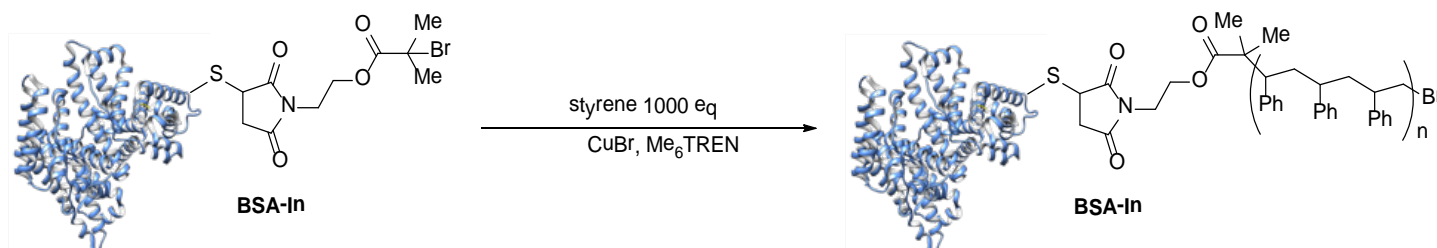
Μια πλαστική σύριγγα των 3mL σταθεροποιήθηκε σε ένα ορθοστάτη με την χρήση μεταλλικής λαβίδας. Στο στόμιο της σύριγγας τοποθετήθηκε ένα τιπ πιπέτας των 200μL και χαρτί ζύγισης σε σχήμα χωνιού, αρχικά για την εξασφάλιση της σωστής προσθήκης CuBr (1.6 mg, 11.76×10^{-3} mmol, 40 ισοδ.). Έπειτα αφού αφαιρέθηκε το χαρτί ζύγισης, με την βοήθεια του τιπ εισήχθησαν το υπερκάθαρο νερό (740μL) και ο υποκαταστάτης Me₆TREN (3.14μL, 11.76×10^{-3} mmol, 40 ισοδ.). Έπειτα η σύριγγα πωματίστηκε και τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο με ισχυρή ανάδευση για 3 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η οξειδοαναγωγή. Στο διάστημα αυτό, προετοιμάστηκε μίγμα στυρενίου 33.8μl (0.294 mmol, 1000 ισοδ.) με νερό 101.4μl, όπου μεταφέρθηκε σε λουτρό υπερήχων προς σχηματισμό γαλακτώματος. Μετά το πέρας των 3 λεπτών προστέθηκε στη σύριγγα το γαλάκτωμα και τέλος 840μL βιοεκκινητή (0.294×10^{-3} mmol, 1 ισοδ.) και αφέθηκε 3 ώρες υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 25kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μίγματος. Η διαπίδυση πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4, 10% MeCN, 2% EDTA για όλο το βράδυ, έπειτα σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 ώρες και τελικά σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 επιπλέον ώρες.

3.3.4 Διερεύνηση δραστηριότητας της BSA



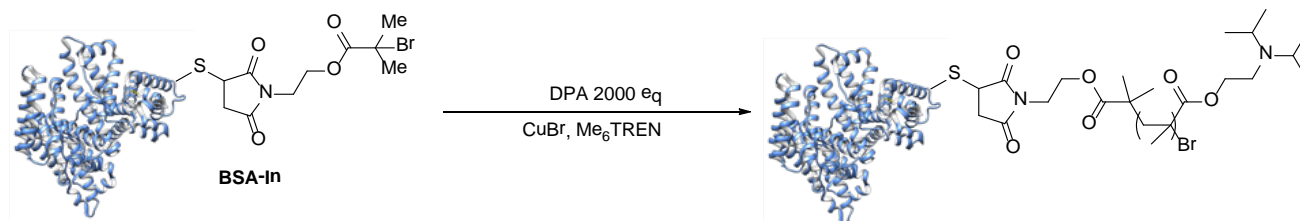
Για την μέτρηση της δραστηριότητας της BSA χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρία. Αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα BSA, όπου 4 mgr BSA διαλύθηκαν σε 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 20 mM ώστε η συγκέντρωση της να είναι C=3μM. Επίσης παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα του p-NPA, όπου 2,7 mg p-NPA διαλύθηκαν σε 50 μL μεθανόλης, ώστε η συγκέντρωση του να είναι C=300μM. Ακριβώς πριν την αντίδραση BSA-NPA, 5 μL από το πρότυπο διάλυμα του p-NPA αραιώθηκαν σε 495 μL υπερκάθαρο νερό. Στην κυψελίδα τοποθετήθηκε όλο το διάλυμα αυτό καθώς και 2 ml από το διάλυμα της BSA, για την μέτρηση της απορρόφησης. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στην περίπτωση του BSA-PS όπου παρασκευάστηκε επίσης πρότυπο διάλυμα τοποθετώντας 130 μL BSA-PS σε 10 mL διαλύματος φωσφορικών 20 mM, έτσι ώστε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να διατηρείται στα 3μM, όπως και στον BSA-μακροεκκινητή όπου αραιώθηκαν 59μL σε 6mL διαλύματος φωσφορικών 20 mM. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες έγιναν σε πολύ ταχείς ρυθμούς καθώς η υδρόλυση ξεκινάει αμέσως. Πριν από κάθε μέτρηση το δείγμα στην κυψελίδα αναδεύεται καλά με μηχανική πιπέτα. Μετρήσεις πραγματοποιούνταν ανά 5 λεπτά για συνολική διάρκεια 45 λεπτών.

3.3.5 Σύνθεση BSA-πολυστυρενίου (BSA-PS) με την προσέγγιση της ανακατανομής παρουσία χρωστικής Nile Red



Μια πλαστική σύριγγα των 3mL σταθεροποιήθηκε σε ένα ορθοστάτη με την χρήση μεταλλικής λαβίδας. Στο στόμιο της σύριγγας τοποθετήθηκε ένα τιπ πιπέτας των 200μL και χαρτί ζύγισης σε σχήμα χωνιού, αρχικά για την εξασφάλιση της σωστής προσθήκης 1.6 mg CuBr (11.76×10^{-3} mmol, 40 ισοδ.). Έπειτα αφού αφαιρέθηκε το χαρτί ζύγισης, με την βοήθεια του τιπ εισήχθησαν το υπερκάθαρο νερό (740μL) και 3.14μL υποκαταστάτη Me₆TREN (11.76×10^{-3} mmol, 40 ισοδ.). Έπειτα η σύριγγα πωματίστηκε και τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο με ισχυρή ανάδευση για 3 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η οξειδοαναγωγή. Στο διάστημα αυτό, προετοιμάστηκε μίγμα στυρενίου 33.8μL (0.294 mmol, 1000 ισοδ.), Nile Red 0.3mg (0.942×10^{-3} mmol, 3.1 ισοδ.) με νερό 101.4μl, όπου μεταφέρθηκε σε λουτρό υπερήχων προς σχηματισμό γαλακτώματος. Μετά το πέρας των 3 λεπτών προστέθηκε στη σύριγγα το γαλάκτωμα και τέλος 840μL βιοεκκινητή (0.294×10^{-3} mmol, 1 ισοδ.) και αφέθηκε 3 ώρες υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 25kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μίγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4, 10% MeCN, 2% EDTA για όλο το βράδυ, έπειτα σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 ώρες και τελικά σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 επιπλέον ώρες.

3.3.6 Σύνθεση BSA- πολυ(μεθακρυλικός (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρας), BSA-pDPA

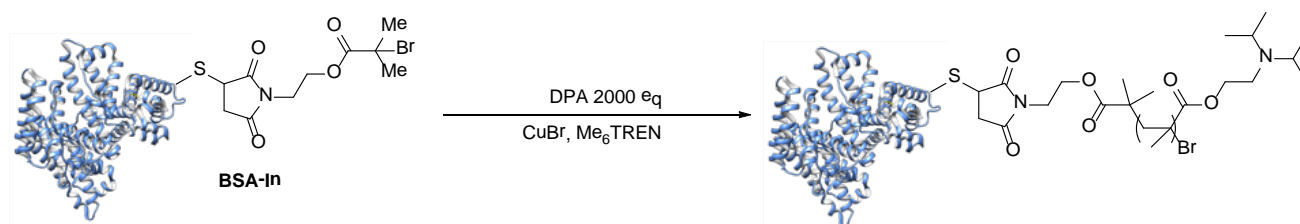


Μια πλαστική σύριγγα των 3mL σταθεροποιήθηκε σε ένα ορθοστάτη με την χρήση μεταλλικής λαβίδας. Στο στόμιο της σύριγγας τοποθετήθηκε ένα τιπ πιπέτας των 200μL και χαρτί ζύγισης σε σχήμα χωνιού, αρχικά για την εξασφάλιση της σωστής προσθήκης 0.8 mg CuBr (5.88×10^{-3} mmol, 40 ισοδ.). Έπειτα αφού αφαιρέθηκε το χαρτί ζύγισης, με την βοήθεια του τιπ εισήχθησαν το υπερκάθαρο νερό (370μL) και 1.57μL υποκαταστάτη Me₆TREN (5.88×10^{-3} mmol, 40 ισοδ.). Έπειτα η σύριγγα πωματίστηκε και τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο με ισχυρή ανάδευση για 3 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η οξειδοαναγωγή. Μετά το πέρας των 3 λεπτών προστέθηκαν στη σύριγγα 70μL DPA (0.294 mmol, 2000 ισοδ.) και τέλος 420μL βιοεκκινητή (0.147×10^{-3} mmol, 1 ισοδ.) και αφέθηκε 1.5 ώρα υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 25kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μίγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4, 10% MeCN, 2% EDTA για όλο το βράδυ, έπειτα σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 ώρες και τελικά σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=7.4 για 2 επιπλέον ώρες.

Η ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε και σε διπλάσια κλίμακα, όπου το τελικό προϊόν φυγοκεντρήθηκε για 40 λεπτά στις 10.000 στροφές και αποθηκεύτηκε το ίζημα.

Για τον εντοπισμό του σημείου καμπής 25μL του προϊόντος αραιώθηκαν σε 75μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και όλο το διάλυμα αυτό(100μL) αραιώθηκε σε 2900μL, προς συνολικό όγκο 3mL και άρα τελική συγκέντρωση 0.0048mM. Κάθε φορά μετά την προσθήκη μικρών ποσοτήτων(10μL) HCl(0.02M) έγινε μέτρηση της διαπερατότητας και του pH του δείγματος κάθε φορά μετά την προσθήκη μικρών ποσοτήτων HCl(0.02M). Η αλλαγή της υδροφοβικότητας του DPA ήταν φανερή και οπτικά καθώς το δείγμα από θολό γινόταν σταδιακά διαυγές. Τέλος, η διαδικασία αναστράφηκε με την χρήση NaOH(0.05M) ακολουθώντας ακριβώς τα ίδια βήματα.

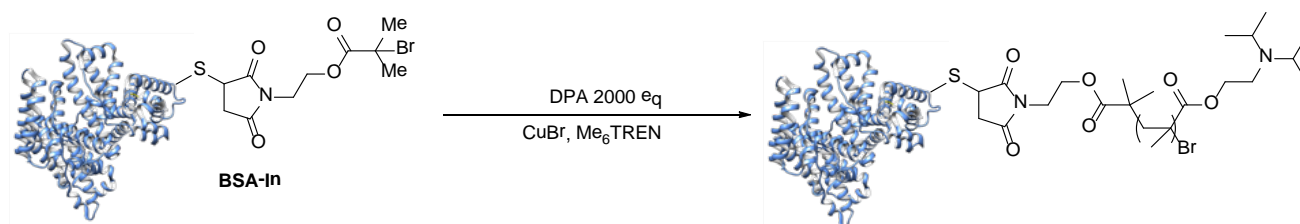
3.3.7 Σύνθεση BSA-πολυ(μεθακρυλικού (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρα), BSA-pDPA παρουσία φλουορεσκεϊναμίνης



Μια πλαστική σύριγγα των 6mL σταθεροποιήθηκε σε ένα ορθοστάτη με την χρήση μεταλλικής λαβίδας. Στο στόμιο της σύριγγας τοποθετήθηκε ένα τιπ πιπέτας των 200μL και χαρτί ζύγισης σε σχήμα χωνιού, αρχικά για την εξασφάλιση της σωστής προσθήκης 3.2 mg CuBr (23.5×10^{-3} mmol, 40 ισοδ.). Έπειτα αφού αφαιρέθηκε το χαρτί ζύγισης, με την βοήθεια του τιπ εισήχθησαν το υπερκάθαρο νερό (1.48mL) και 6.28μL υποκαταστάτη Me_6TREN (23.5×10^{-3} mmol, 40 ισοδ.). Έπειτα η σύριγγα πωματίστηκε και τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο με ισχυρή ανάδευση για 3 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η οξειδοαναγωγή. Σε ένα erpendorf διαλύθηκαν 1.2mg φλουορεσκεϊναμίνη (3.46×10^{-3} mmol, 5.9 ισοδ.) σε 1.68mL βιοεκκινητή (0.588×10^{-3} mmol, 1 ισοδ.). Μετά το πέρασ των 3 λεπτών προστέθηκαν στη σύριγγα 280μL DPA (1.176 mmol, 2000 ισοδ.) και τέλος ο βιοεκκινητής με την φλουορεσκεϊναμίνη και αφέθηκε 1.5 ώρα υπό ανάδευση. Το τελικό προϊόν χωρίστηκε σε τέσσερα ίσα μέρη (έτσι ώστε να καταλήξει στην επιθυμητή κλίμακα όσον αφορά τις ποσότητες), φυγοκεντρήθηκε για 40 λεπτά στις 10.000 στροφές και αποθηκεύτηκε το ίζημα.

Για την μέτρηση της απελευθέρωσης το φυγοκεντρημένο προϊόν διαλύθηκε (προς συγκέντρωση 1mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20mM και τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης, σε κύλινδρο με 100mL υπερκάθαρο νερό. Ανά 1 ώρα για 4 ώρες πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία απομονώνοντας με μηχανική πιπέτα 2.5mL από τον κύλινδρο, τα οποία επιστρέφονταν πίσω μετά την μέτρηση της απορρόφησης. Έπειτα στις 4 ώρες, το pH μειώθηκε με προσθήκη μικρών ποσοτήτων HCl(0.1M) για μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο.

3.3.8 Σύνθεση BSA-πολυ(μεθακρυλικού (2-δισοπροπυλαμινο) αιθυλεστέρα), BSA-pDPA παρουσία σαλικυλικού οξέος



Μια πλαστική σύριγγα των 6mL σταθεροποιήθηκε σε ένα ορθοστάτη με την χρήση μεταλλικής λαβίδας. Στο στόμιο της σύριγγας τοποθετήθηκε ένα τιπ πιπέτας των 200μL και χαρτί ζύγισης σε σχήμα χωνιού, αρχικά για την εξασφάλιση της σωστής προσθήκης 5.4 mg CuBr (3.53×10^{-3} mmol, 40 ισοδ.). Έπειτα αφού αφαιρέθηκε το χαρτί ζύγισης, με την βοήθεια του τιπ εισήχθησαν το υπερκάθαρο νερό (2.220mL) και 9.42μL υποκαταστάτη Me_6TREN (3.53×10^{-3} mmol, 40 ισοδ.). Έπειτα η σύριγγα πωματίστηκε και τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο με ισχυρή ανάδευση για 3 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η οξειδοαναγωγή. Σε ένα erpendorf διαλύθηκαν 15mg σαλικυλικού οξέος (0.109 mmol, 122.5 ισοδ.) σε 2.522mL βιοεκκινητή (0.882×10^{-3} mmol, 1 ισοδ.). Μετά το πέρας των 3 λεπτών προστέθηκαν στη σύριγγα 420μL DPA (1.764mmol, 2000 ισοδ.) και τέλος ο βιοεκκινητής με το σαλικυλικό οξύ και αφέθηκε 1.5 ώρα υπό ανάδευση. Το τελικό προϊόν χωρίστηκε σε 3 ίσα μέρη (έτσι ώστε να καταλήξει στην επιθυμητή υποδιπλάσια κλίμακα όσον αφορά τις ποσότητες), φυγοκεντρήθηκε για 40 λεπτά στις 10.000 στροφές και αποθηκεύτηκε το ίζημα.

Για την μέτρηση της απελευθέρωσης το φυγοκεντρημένο προϊόν διαλύθηκε σε 1.72ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20mM όπου η συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος να είναι 0.02mM, μέχρι την οποία είναι διαλυτό στο νερό. Αμέσως τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδωσης, σε κύλινδρο με 100mL υπερκάθαρο νερό. Ανά 2 ώρες για 6 ώρες συνολικά πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία απομονώνοντας με μηχανική πιπέτα 0.5mL από τον κύλινδρο και μεταφέρονταν σε κυψελίδα όπου υπήρχε 1ml FeCl_3 (1% w/v σε 0.1M HCL) και 1ml υπερκάθαρο νερό. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τα υπόλοιπα 2 μέρη στα οποία είχε χωριστεί το προϊόν. Στην πρώτη περίπτωση με την προσθήκη σταγόνων HCL μειώθηκε το pH σε pH=6.1 και στην δεύτερη περίπτωση pH=4.2.

Βιβλιογραφία

- ¹ X. Zhang, C. Wang. (2011) 'Supramolecular Amphiphiles'. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 94-101
- ² K. Velonia, J. J. L. M. Cornelissen, M. C. Feiters, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte. (2005) 'Aggregation of Amphiphiles as a Tool to Create Novel Functional Nano-Objects'. *Nanoscale Assembly* pp 119-185
- ³ D. Lombardo, M. A. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra. (2015) 'Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches'. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015**, 151683.
- ⁴ K. Velonia, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte. (2002) 'Lipase Polystyrene Giant Amphiphiles'. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 4224–4225
- ⁵ B. Le Droumaguet, K. Velonia, G. Mantovani, D. M. Haddleton. (2008) 'In Situ ATRP-Mediated Hierarchical Formation of Giant Amphiphile Bionanoreactors'. *Angew. Chem. Int.* **47**, 6263–6266
- ⁶ A. T. J. Dirks, R. J. M. Nolte, J. J. L. M. Cornelissen. (2008) 'Protein-polymer hybrid amphiphiles' *Adv. Mat.* **20**, 3953-3957
- ⁷ K. L. Heredia, H. D. Maynard. (2007) 'Synthesis of protein-polymer conjugates'. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 45-53
- ⁸ C. Boyer, V. Bulmus, J. Liu, T. P. Davis, M. H. Stenzel, C. Barner-Kowollik. (2007) 'Well-Defined Protein-Polymer Conjugates via in Situ RAFT Polymerization'. *J. Am. Chem. Soc.* **129**(22), 7145-7154
- ⁹ J. Liu, V. Bulmus, D. L. Herlambang, C. Barner-Kowollik, M. H. Stenzel, T. P. Davis. (2007) 'In Situ Formation of Protein-Polymer Conjugates through Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization'. *Angew. Chem.* **46**, 3099-3103
- ¹⁰ D. J. Lockwood (2005) 'Nanoscale Assembly: Chemical Techniques'
- ¹¹ M. L. Tong, X. M. Chen. (2017) 'Synthesis of Coordination Compounds and Coordination Polymers'. *Modern Inorganic Synthetic Chemistry*, chapter 8, 189-217
- ¹² J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham. (1976) 'Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers'. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **72**, 1525-1568

- ¹³ P. Thordarson, B. Le Droumaguet, K. Velonia. (2006) 'Well-defined protein–polymer conjugates—synthesis and potential applications'. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**(2), 243-254
- ¹⁴ A. J. 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. (2005) 'Preparation of biohybrid amphiphiles via the copper catalysed Huisgen [3 + 2] dipolar cycloaddition reaction'. *Chem. Commun.*, 4172-4174
- ¹⁵ 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. (2002) 'Giant Amphiphiles by Cofactor Reconstitution'. *Angew. Chem.* **41**, 4239-4241
- ¹⁶ M. J. Boerakker, N. E. Botterhuis, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, E. M. Meijer, R. J. M. Nolte, N. A. J. M. Sommerdijk. (2006) 'Aggregation Behavior of Giant Amphiphiles Prepared by Cofactor Reconstitution'. *Chem. European J.* **12**, 6071-6080
- ¹⁷ D. J. Siegwart, J. Kwon Oh, K. Matyjaszewski. (2012) 'ATRP in the design of functional materials for biomedical applications'. *Prog Polym Sci.*, 37, 18–37
- ¹⁸ S. L. Baker, A. Munasinghe, B. Kaupbayeva, N. R. Kang, M. Certiat, H. Murata, K. Matyjaszewski, P. Lin, C. M. Colina, A. J. Russel. (2019) 'Transforming protein-polymer conjugate purification by tuning protein solubility'. *Nature Com.* **10**, 4718
- ¹⁹ E. Frick, A. Anastasaki, D. M. Haddleton, C. Barner-Kowollik. (2015) 'Enlightening the Mechanism of Copper mediated PhotoRDRP via High–Resolution Mass Spectrometry'. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 6889-6896
- ²⁰ A. Anastasaki, V. Nikolaou, Q. Zhang, J. Burns, S. R. Samanta, C. Waldron, A. J. Haddleton, R. McHale, D. Fox, V. Percec, P. Wilson, D. M. Haddleton. (2014) 'Copper(II)/Tertiary Amine Synergy in Photoinduced Living Radical Polymerization: Accelerated Synthesis of ω -Functional and α,ω -Heterofunctional Poly(acrylates)'. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 1141-1149
- ²¹ G. R. Jones, R. Whitfield, A. Anastasaki, D. M. Haddleton. (2016) 'Aqueous Copper(II) Photoinduced Polymerization of Acrylates: Low Copper Concentration and the Importance of Sodium Halide Salts'. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 7346-7352
- ²² V. Percec, T. Guliashvili, J. S. Ladislaw, A. Wistrand, A. Stjerndahl, M. J. Sienkowska, M. J. Monteiro, S. Sahoo. (2006) 'Ultrafast Synthesis of Ultrahigh Molar Mass Polymers by Metal-Catalyzed Living Radical Polymerization of Acrylates, Methacrylates, and Vinyl Chloride Mediated by SET at 25 °C'. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14156-14165

- ²³ Q. Zhang, P. Wilson, Z. Li, R. McHale, J. Godfrey, A. Anastasaki, C. Waldron, D. M. Haddleton. (2013) 'Aqueous Copper Mediated Living Polymerization: Exploiting Rapid Disproportionation of CuBr with Me6TREN' *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 7355-7363
- ²⁴ R. Duncan. (2003) 'The dawning era of polymer therapeutics'. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 347-360
- ²⁵ L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp. (1981) 'Polymeric antitumor agents on a molecular and on a cellular level'. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20**, 305-325
- ²⁶ R. P. Welch, H. Lee, M. A. Luzuriaga, O. R. Brohlin, J. J. Gassensmith. (2018) 'Protein-polymer delivery: Chemistry from the cold chain to the clinic'. *Bioconjugate Chem.* **29**, 2867-2883
- ²⁷ 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. (2001) 'Protein-polymer hybrid amphiphiles'. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 4732-4734
- ²⁸ B. Le Droumaguet, G. Mantovani, D. M. Haddleton, K. Velonia. (2005) 'Formation of giant amphiphiles by post-functionalization of hydrophilic protein-polymer conjugates'. *J. Mater. Chem.* **17**, 1916-1922
- ²⁹ T. Lee, M. Chae, C. Lee, J. Jung, A. K. Mohanty, M. A. Kadir, J. E. Choi, J. K. Song, H. J. Paik. (2018) 'Multi-scale simulation of single crystal hollow turbine blade manufactured by liquid metal cooling process'. *Sci. Adv. Mater.* **10**, 78-84
- ³⁰ J. S. Kim, A. R. Sirois, A. J. Vazquez Cegla, E. Jumai'an, N. Murata, M. E. Buck, S. J. Moore. (2019) 'Protein-polymer conjugates synthesized using water-soluble azlactone-functionalized polymers enable receptor-specific cellular uptake toward targeted drug delivery'. *Bioconjugate Chem.* **30**, 1220-1231
- ³¹ K. L. Heredia, D. Bontempo, T. Ly, J. T. Byers, S. Halstenberg, H. D. Maynard (2005) 'In situ preparation of protein-"smart" polymer conjugates with retention of bioactivity'. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 16955-16960
- ³² B. S. Lele, H. Murata, K. Matyjaszewski, A. J. Russell. (2005) 'Synthesis of uniform protein-polymer conjugates' *Biomacromolecules.* **6**, 3380-3387
- ³³ E. Daskalaki, B. Le Droumaguet, D. Gérard, K. Velonia. (2012) 'Multifunctional giant amphiphiles via simultaneous copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition and living radical polymerization'. *Chem. Commun.* **48**, 1586-1588
- ³⁴ A. Theodorou, E. Liarou, D. M. Haddleton, I. G. Stavrakaki, P. Skordalidis, R. Whitfield, A. Anastasaki, K. Velonia. (2020) 'Protein-Polymer Bioconjugates via a Versatile Oxygen Tolerant

Photoinduced Controlled Radical Polymerization Approach'. *Nat. Commun.* accepted for publication.

³⁵ A. Tsatsakis, A.K. Stratidakis, A.V. Goryachaya, M.N. Tzatzarakis, P.D. Stivaktakis, A.O. Docea, Ai Berdiaki, D. Nikitovic, K. Velonia, M.I. Shtilman, A.K. Rizos, A.N. Kuskov. (2019) 'In vitro blood compatibility and in vitro cytotoxicity of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles'. *Food and Chem. Toxic.* **127**, 42-52

³⁶ G. Mantovani, F. Lecolley, L. Tao, D. M. Haddleton, J. Clerx, J. J. L. M. Cornelissen, K. Velonia. (2005) 'Design and Synthesis of N-Maleimido-Functionalized Hydrophilic Polymers via Copper-Mediated Living Radical Polymerization: A Suitable Alternative to PEGylation Chemistry'. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2966-2973

³⁷ M. Chamundeeswari, J. Jeslin, M. Lal Verma. (2019) 'Nanocarriers for drug delivery applications'. *Env. Chem. Letters* **17**, 849-865

³⁸ D. Das, S. Pal. (2015) 'Modified biopolymer-dextrin based crosslinked hydrogels: application in controlled drug delivery'. *RSC Adv.* **5**, 25014-25050

³⁹ C.-Y. Chen, H.-L. Wang. (2014) 'Dual Thermo- and pH-Responsive Zwitterionic Sulfobetaine Copolymers for Oral Delivery System'. *Macromol. Rapid Commun.* **35**, 1534-1540

⁴⁰ L. Shen, J. Du, S. P. Armes, S. Liu. (2008) 'Kinetics of pH-Induced Formation and Dissociation of Polymeric Vesicles Assembled from a Water-Soluble Zwitterionic Diblock Copolymer'. *Langmuir* **24**, 10019-10025

⁴¹ M. Kowacz, P. Warszyński. (2019) 'Beyond esterase-like activity of serum albumin. Histidine-(nitro)phenol radical formation in conversion cascade of p-nitrophenyl acetate and the role of infrared light'. *J. Mol. Recognit.* **32**, 2780

⁴² F. Meng, C. Hiemstra, G. H. M. Engbers, J. Feijen. (2003) 'Biodegradable Polymersomes'. *Macromolecules* **36**, 3004-3006

⁴³ C. Munkholm, D. R. Parkinson, D. R. Walt. (1990) 'Intramolecular fluorescence self-quenching of fluoresceinamine'. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 2608-2612

⁴⁴ F. Meng, C. Hiemstra, G. H. M. Engbers, J. Feijen. (2003) 'Biodegradable Polymersomes'. *Macromolecules* **36**, 3004-3006