

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ  
ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΓΙΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

**Κανδύλη Μαρία**

**Υπεύθυνος Καθηγητής: Αθανάσιος Γ. Κουτσολέλος**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2020**

**UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**TITLE OF POSTGRADUATE PROGRAMME**

**LABORATORY OF BIOINORGANIC CHEMISTRY**



**Master Thesis**

**SYNTHESIS OF SUITABLY MODIFIED PORPHYRIN  
DERIVATIVES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

**Kandyli Maria**

**Master Thesis Supervisor: Athanassios G. Coutsolelos**

**HERAKLION 2020**

## **Εξεταστική Επιτροπή**

**Αθανάσιος Γ. Κουτσολέλος (Επιβλέπων)**

*Καθηγητής του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

**Άννα Μητράκη**

*Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

**Αθηνά Κασσελούρη**

*Professeur à la Faculté de Pharmacie, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, Paris*

## Ευχαριστίες

Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Αθανάσιο Κουτσολέλο, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου διατριβή στο εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας και να γίνω μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Η εμπιστοσύνη του, η απεριόριστη στήριξή του και οι συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, αποτέλεσαν για μένα πολύτιμα εφόδια δίνοντας μου δύναμη να συνεχίσω το “ταξίδι στον κόσμο” της Χημείας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής και συγκεκριμένα την καθηγήτρια κυρία Άννα Μητράκη για τις χρήσιμες συμβουλές της και τα πειράματα αυτο-οργάνωσης που πραγματοποίησα στο εργαστήριό της με τη βοήθεια της υποψηφίου διδάκτορα Χρύσας Αποστολίδου καθώς και την καθηγήτρια κυρία Αθηνά Κασσελούρη για την επικείμενη συνεργασία μας κατά την πρακτική μου άσκηση μέσω του προγράμματος Erasmus+.

Ακόμα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην καθηγήτρια κυρία Véronique Rosilio που δέχτηκε να εργαστώ στο εργαστήριό της για να πραγματοποιήσω την πρακτική μου άσκηση (Erasmus+ Internship) και να ολοκληρώσω τα πειράματα της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Είμαι ευγνώμων στην ερευνήτρια Α' βαθμίδας κυρία Ντίνα Γιαννακοπούλου που μέσω της συνεργασίας μας μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τις μελέτες κυκλικού διχρωισμού, δυναμικής σκέδασης φωτός, συνεστιακής μικροσκοπίας καθώς και τις μετρήσεις ζ δυναμικού στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών “Δημόκριτος”.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοανόργανης Χημείας για την βοήθεια που μου προσέφεραν απλόχερα όλο το διάστημα των πειραμάτων μου αλλά και για το φιλικό κλίμα που διατήρησαν τόσο εντός όσο και εκτός του εργαστηριακού χώρου. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Στέλιο Παναγιωτάκη για τις συμβουλές, την καταλυτική του βοήθεια αλλά και την ψυχική υποστήριξη που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων.



Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου που πάντα με υποστηρίζει συναισθηματικά αλλά και οικονομικά να ακολουθώ τα όνειρά μου και στους φίλους μου που είναι δίπλα μου σε κάθε στιγμή.

## Βιογραφικό Σημείωμα

### Προσωπικά στοιχεία

---

**Όνομα:** Κανδύλη Μαρία  
**Διεύθυνση:** Ολυμπίας 33, Αγία Παρασκευή Αττικής,  
Ελλάδα 15343  
**Ημερομηνία Γέννησης:** 6 Μαΐου 1994, Νέα Ιωνία Αττικής  
**Υπηκοότητα:** Ελληνική  
**Στοιχεία Επικοινωνίας:** *τηλέφωνο:* +30 6940699349  
*e-mail:* [kandylimar@gmail.com](mailto:kandylimar@gmail.com)

### Ακαδημαϊκό Υπόβαθρο

---

**2018-παρόν** **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Χημεία:**  
Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.  
**Τίτλος Μεταπτυχιακής εργασίας:** «Σύνθεση κατάλληλα τροποποιημένων πορφυρινικών παραγώγων για βιοϊατρικές εφαρμογές».

**2013-2017** **Πτυχίο Χημείας:**  
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο. **(7.23/10)**  
**Τίτλος Πτυχιακής εργασίας:** «Σύνθεση και χαρακτηρισμός μεταλλοπορφυρινών με κυανοξικό τελικό άκρο για Dye Sensitized Solar Cell εφαρμογές».

### Εργασιακή Εμπειρία

---

**08/2019-02/2020** Συμμετοχή στο Ερευνητικό πρόγραμμα «Σύνθεση νέων υλικών για την ανάπτυξη φωτο-ηλεκτροχημικών διατάξεων παραγωγής H<sub>2</sub> και αναγωγής CO<sub>2</sub> – ECO CRETE».

### Ερευνητική Εμπειρία

---

**16/12/2019-20/12/2019** Επισκέπτρια ερευνήτρια στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών “Δημόκριτος”, Αθήνα, Ελλάδα. Εργαστήριο Δομικής και Υπερμοριακής Χημείας, Ινστιτούτο Φυσικοχημείας. Ερευνήτρια Α' Κωνσταντίνα Γιαννακοπούλου. Σκοπός της επίσκεψης: “Χαρακτηρισμός νέων πορφυρινικών δυάδων με νιτριλοτριοξικό οξύ για την μεταλλοχηλική σύζευξη με πεπτιδικά παράγωγα”.

### Διδακτική Εμπειρία

---

09/2018-12/2018

Βοηθός στο προπτυχιακό εργαστήριο Ανόργανης Χημείας Ι, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Υπεύθυνη καθηγήτρια Βαρδαλαχάκη Ε.

01/2019-06/2019

Βοηθός στο προπτυχιακό εργαστήριο Ανόργανης Χημείας ΙΙ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Υπεύθυνη καθηγήτρια Βαρδαλαχάκη Ε.

### Ξένες Γλώσσες

---

Άριστη γνώση Αγγλικών: Certificate of Proficiency in English (2017).

Καλή γνώση Γαλλικών: Delf B2 (2019).

### Ικανότητες και Τεχνικές

---

Σχεδιασμός, σύνθεση, απομόνωση και χαρακτηρισμός χρωμοφόρων. Σύνθεση ενώσεων κάτω από αναερόβιες συνθήκες.

Φασματοσκοπία NMR ( $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ ), απορρόφησης (UV-Visible), υπέρυθρου (FT-IR), αέρια χρωματογραφία (GC-MS), υγρή χρωματογραφία (HPLC) και φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS.

Φασματοσκοπία Εκπομπής (Fluorescence), μετρήσεων χρόνου ζωής διεγερμένης κατάστασης (Lifetime) και Κυκλικού Διχρωισμού (Circular Dichroism).

Windows, Microsoft Office (Word, Excel, Access, Power Point, Front Page).

ChemBioOffice, EndNote, OriginPro, TopSpin.

### Δημοσιεύσεις

---

Panagiotakis S., Giannoudis E., Charisiadis A., Paravatou R., Lazaridi M., **Kandyli M.**, Ladomenou K., Angaridis P.A., Bertrand H.C., Sharma G. D., Coutsolelos A. G. (2018). «Increased efficiency of dye-sensitized solar cells by incorporation of a π spacer in donor–acceptor zinc porphyrins bearing cyanoacrylic acid as an anchoring group». *EurJIC*, **20-21**: 2369-2379.

### Σεμινάρια-Συνέδρια

---

1. 21<sup>ο</sup> Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, **Ηράκλειο** 15-17 Μαΐου 2019.
2. Panagiotakis S., Giannoudis E., Charisiadis A., Paravatou R., Lazaridi M., **Kandyli M.**, Ladomenou K., Angaridis P.A., Bertrand H.C., Sharma G. D., Coutsolelos A. G. (2018). "Increased efficiency of dye-sensitized solar cells by incorporation of a π spacer in donor–acceptor zinc porphyrins bearing cyanoacrylic acid as an anchoring group". 10th International Conference on

Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10), 1-6 July 2018, Munich, Germany (*poster presentation*).

3. 20<sup>ο</sup> Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, **Ηράκλειο** 25-27 Ιουνίου 2018 (*poster presentation*).
4. Σεμινάριο *Ασφάλεια Εργαστηρίου* IMBB-ITE, 7 Μαρτίου 2018, **Ηράκλειο**.
5. *Scientific Writing* workshop, Τμήμα Χημείας, **Ηράκλειο**, Μάρτιος 2018.
6. 19<sup>ο</sup> Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, **Ηράκλειο** 2-4 Μαΐου 2017.

#### Συνεισφορά σε διδακτικά βιβλία

---

Images and photos provided and edited by Maria Kandyli in: English for Chemistry EAP, a course for Academic English for International Chemistry student, Kallia Katsamposaki-Hodgetts (ed), Disigma Publications ISBN13: 978-618-5242-14-5.

## Curriculum Vitae

### Personal Information

---

**Name:** Kandyli Maria  
**Address:** Olympias 33, Agia Paraskevi, Athens, Greece, 15343  
**Date of Birth:** May 6th 1994, Nea Ionia, Athens, Greece  
**Nationality:** Greek  
**Contact Information:** *cellular:* +30 6940699349  
*e-mail:* [kandyliमार@gmail.com](mailto:kandyliमार@gmail.com)

### Academic Background

---

**2018-present** **Master degree in Chemistry, University of Crete** Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Chemistry Department, Greece.

**Master Thesis:**

**Title:** "Synthesis of suitably modified porphyrin derivatives for biomedical applications."

**2013-2017**

**Bachelor degree in Chemistry, University of Crete,**  
Department of Chemistry, Greece (7.23/10)

**Undergraduate Thesis:**

**Title:** "Synthesis and characterization of zinc porphyrins bearing cyanoacrylic acid as an anchoring group for Dye Sensitized Solar Cell applications."  
Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Chemistry Department, University of Crete.

### Work Experience

---

**08/2019-02/2020**

Participation in scientific research program "Synthesis of new materials for the development of photo-electrochemical devices for H<sub>2</sub> production and CO<sub>2</sub> reduction- ECO CRETE".

### Research Experience

---

**16/12/2019 -20/12/2019**

Visitor researcher at National Centre for Scientific Research "Dimokritos", Athens, Greece. Laboratory of Structural and Supramolecular Chemistry, Institute of Physical Chemistry . Dr. Researcher A' Konstantina Yannakopoulou. Purpose of visit: "Characterization of new porphyrin dyads with nitrilotriacetic acid for metallochelate coupling with peptide derivatives".

## Teaching Experience

---

**09/2018-12/2018**

Student Practice Inorganic Laboratory assistant: University of Crete, Department of Chemistry in Inorganic Chemistry Laboratory I, supervising by Prof. Vardalachaki E.

**01/2019-06/2019**

Student Practice Inorganic Laboratory assistant: University of Crete, Department of Chemistry in Inorganic Chemistry Laboratory II, supervising by Prof. Vardalachaki E.

## Foreign Languages

---

**Greek:** Native language.

**English:** Certificate of Proficiency in English (2017).

**French:** DELF B2 (2019).

## Technical Skills

---

Design, synthesis, purification and characterization of chromophores. Synthesis under anaerobic conditions.

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR, UV-Visible, FT-IR, spectroscopies, GC-MS, HPLC, and MALDI-TOF MS.

Fluorescence spectroscopy, Circular Dichroism and Lifetime measurements.

Windows, Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint, Access, Front page).

ChemBioOffice, EndNote, OriginPro, TopSpin.

## Publications

---

Panagiotakis S., Giannoudis E., Charisiadis A., Paravatou R., Lazaridi M., **Kandyli M.**, Ladomenou K., Angaridis P.A., Bertrand H.C., Sharma G. D., Coutsolelos A. G. (2018). «Increased efficiency of dye-sensitized solar cells by incorporation of a π spacer in donor–acceptor zinc porphyrins bearing cyanoacrylic acid as an anchoring group». *EurJIC*, **20-21**: 2369-2379.

## Conferences-Seminars

---

1. 21<sup>th</sup> Postgraduate Conference, Chemistry Department, University of Crete, **Heraklion** 15-17 May 2019.
2. Panagiotakis S., Giannoudis E., Charisiadis A., Paravatou R., Lazaridi M., **Kandyli M.**, Ladomenou K., Angaridis P.A., Bertrand H.C., Sharma G. D., Coutsolelos A. G. (2018). 'Increased efficiency of dye-sensitized solar cells by incorporation of a π

spacer in donor–acceptor zinc porphyrins bearing cyanoacrylic acid as an anchoring group". 10th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10), 1-6 July 2018, Munich, Germany (*poster presentation*).

3. 20<sup>th</sup> Postgraduate Conference, Chemistry Department, University of Crete, **Heraklion** 25-27 June 2018 (poster presentation).
4. *Laboratory Safety Seminar*, IMBB-ITE, 07/03/2018, **Heraklion**, Crete.
5. *Scientific Writing* workshop , Department of Chemistry University of Crete, **Heraklion**, 1 March - 26 April 2018.
6. 19<sup>th</sup> Postgraduate Conference, Chemistry Department, University of Crete, **Heraklion** 2-4 May 2017.

### Contribution in textbooks

---

Images and photos provided and edited by Maria Kandyli in: English for Chemistry EAP, a course for Academic English for International Chemistry student, Kallia Katsampoxaki-Hodgetts (ed), Disigma Publications ISBN13: 978-618-5242-14-5.

## Περίληψη

Ο σημαντικός ρόλος της αυτο-οργάνωσης στα βιολογικά συστήματα, ώθησε την επιστημονική κοινότητα στη δημιουργία τεχνητών υλικών με καθορισμένες δομές και προσαρμοσμένες ιδιότητες. Έτσι, τόσο τα βιολογικά όσο και τα συνθετικά δομικά στοιχεία αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας στον τομέα της αυτο-οργάνωσης. Όπως έχει αποδειχθεί από τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η αξία των πεπτιδίων ως αυτο-οργανωμένων δομικών μονάδων έχει αναγνωριστεί τα τελευταία χρόνια σε μεγάλο βαθμό. Συγκεκριμένα, η ομοιοπολική σύζευξη του διπεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης, γνωστού για τις ιδιότητες αυτο-οργάνωσής του, με χρωμοφόρα όπως οι πορφυρίνες έχει μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν οδηγώντας στη δημιουργία καλά οργανωμένων δομών.

Ορμώμενοι από τις προηγούμενες μελέτες, προχωρήσαμε στη σύνθεση μιας υβριδικής τριάδας διφαινυλαλανίνης-πορφυρίνης-λυσίνης, FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> με στόχο τη μελέτη της αυτο-οργάνωσής της. Η σύζευξη τόσο του διπεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης όσο και του αμινοξέος της λυσίνης στο πορφυρινικό παράγωγο πραγματοποιήθηκε μέσω αμιδικού δεσμού. Ο πλήρης χαρακτηρισμός του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε μέσω της φασματομετρίας μάζας (MALDI-TOF), της φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C NMR καθώς και της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis). Η τάση της ένωσης FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> να αυτο-οργανώνεται εξετάστηκε με τη χρήση της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης, η οποία έδειξε το σχηματισμό νανοδομών σφαιρικού σχήματος.

Παράλληλα, η βιο-απεικόνιση απαιτεί συχνά την ειδική επισήμανση των βιομορίων καθιστώντας αναγκαία την ανάπτυξη νέων, μη επεμβατικών μεθόδων ανίχνευσής τους. Μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος που υπακούει στα παραπάνω κριτήρια είναι η φθορίζουσα σήμανση με τη χρήση φθορίζοντων ανιχνευτών (fluorescent probes ή tags). Προκειμένου, να ανιχνευθούν βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια συχνά χρησιμοποιούνται φθορίζουσες πρωτεΐνες ή φθορίζοντα χρωμοφόρα. Μια από τις πιο γνωστές μεθόδους σήμανσης αποτελεί η μεταλλοχηλική σύζευξη φθοροφόρων (fluorophores) με τα κατάλοιπα αμινοξέων (π.χ His) του προς ανάλυση πεπτιδίου/πρωτεΐνης. Ωστόσο, οι αναφορές της βιβλιογραφίας που περιλαμβάνουν



πορφυρίνες ως φθοροφόρα σε περιπτώσεις μεταλλοχηλικής σύζευξης είναι ελάχιστες.

Έτσι, προτείνουμε τη σύνθεση μιας νέας υδατοδιαλυτής δυάδας πορφυρίνης-λυσίνης που φέρει έναν χηλικό υποκαταστάτη (ligand) για τη σήμανση (labeling) πεπτιδίου (RGD-SGAITIG-H) που φέρει ιστιδίνη (His). Η σήμανση του πεπτιδίου επιτυγχάνεται μέσω της μεταλλοχηλικής σύζευξης με δισθενές νικέλιο ( $\text{Ni}^{2+}$ ) του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης και της πορφυρινικής δυάδας που φέρει NTA. Η σύνθεση της δυάδας αυτής,  $\text{TriPyP-Lys}(\text{COOH})_3$ , πραγματοποιείται με το σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ της πορφυρίνης και του χηλικού υποκαταστάτη (Lys-NTA). Ο πλήρης χαρακτηρισμός της  $\text{TriPyP-Lys}(\text{COOH})_3$  πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR, απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), φθορισμού και μέσω μετρήσεων του χρόνου ζωής διεγερμένης κατάστασης. Το τελικό σύμπλοκο-στόχος,  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3+\text{Ni}^{2+}+\text{peptide}$ , χαρακτηρίστηκε με τη χρήση των φασματοσκοπιών UV-Vis, CD και IR. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις DLS και ζ δυναμικού (zeta potential) για τον προσδιορισμό του μεγέθους και του φορτίου των σχηματιζόμενων νανοδομών. Η ικανότητα ενδοκυτταρικής μεταφοράς και ο εντοπισμός του συμπλόκου σε κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος ανθρώπινου μαστού MCF-7 μελετήθηκε με τη χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας.

Η πρωτεΐνη υποδοχέας CD44, βρέθηκε να υπερεκφράζεται από πολλούς όγκους και αναγνωρίζεται ως ένας από τους πιο συνηθισμένους δείκτες της επιφάνειας καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Cancer Stem Cells) καθιστώντας τον πολλά υποσχόμενο υποδοχέα για τη θεραπευτική στόχευση. Ταυτόχρονα, τα απταμερή είναι συνθετικά μονοκλωνικά ολιγονουκλεοτίδια ή πεπτίδια που μπορούν να δράσουν ενάντια σε σχεδόν οποιοδήποτε στόχο συμπεριλαμβανομένων ιόντων, μορίων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών ακόμη και ολόκληρων ζωντανών κυττάρων όπως καρκινικά κύτταρα. Έτσι, τα απταμερή αποτελούν πολλά υποσχόμενα μόρια με προοπτική στις βιοϊατρικές εφαρμογές.

Εμπνευσμένοι από τα παραπάνω, προτείνουμε τη σύνθεση μιας δυάδας πορφυρίνης-πολυαιθυλενογλυκόλης, Zn-TPP-PEG-MAL που φέρει ελεύθερο μαλειμίδιο. Η πορφυρινική δυάδα-στόχος συνδέεται μέσω “κλικ” αντίδρασης θειόλης-μαλειμιδίου (thiol-maleimide “click” reaction) με ένα RNA απταμερές (Apt1) που περιέχει 2'-F-πυριμιδίνη και έχει μελετηθεί ότι δρα ενάντια στο βιο-δείκτη CD44. Έτσι,

στοχεύουμε στη δέσμευση του συστήματος πορφυρίνης-απταμερούς σε καρκινικά κύτταρα και στη μελέτη του ως ειδικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκου οδηγώντας στην κυτταρική απόπτωση μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Λέξεις κλειδιά: αυτο-οργάνωση, διφαινυλαλανίνη, σήμανση (*labeling*), μεταλλοχηλική σύζευξη, φθοροφόρο, πολυαιθυλενογλυκόλη, απταμερές, πορφυρίνη, φωτοδυναμική θεραπεία.

## **Abstract**

The important role of self-assembly in biological systems has inspired the scientific community to create artificial materials with defined structures and customized properties. Thus, both biological and synthetic building blocks are the subject of extensive research in the field of self-assembly. The value of peptides as self-assembled building blocks has been largely recognized in recent years. In particular, the covalent coupling of diphenylalanine, known for its self-assembling properties, has been extensively studied in the past, leading to the creation of well-organized structures.

Motivated by previous studies, we have developed a hybrid triad of diphenylalanine-porphyrin-lysine, FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub>. The coupling of both diphenylalanine and lysine to the porphyrin derivative took place via an amide bond. The complete characterization of the final product was performed through mass spectrometry (MALDI-TOF), <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy as well as UV-Vis absorption spectroscopy. The tendency of the FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> compound to self-assemble was examined using Electronic Scanning Microscopy, which showed the formation of spherical nanostructures.

At the same time, bio-imaging often requires specific labeling of biomolecules, making it necessary to develop new, non-invasive methods for their detection. A very promising method that meets the above criteria is fluorescent labeling using fluorescent probes or tags. In order to detect biomolecules such as proteins and peptides, fluorescent proteins or fluorescent chromophores are often used. One of the most well-known labeling methods is the metallochelate coupling of fluorophores with the amino acid residues (eg His) of the peptide/protein to be analyzed. However, there are few references in the literature that include porphyrins as fluorescents in cases of metallochelate coupling.

Thus, we propose the synthesis of a new water-soluble porphyrin dyad with a chelating ligand for peptide labeling (RGD-SGAIIG-H) bearing histidine (His). Peptide labeling is achieved by metallochelate coupling of the histidine imidazole and the NTA-containing porphyrin dyad via Ni<sup>2+</sup>. The synthesis of the dyad, TriPyP-Lys(COOH)<sub>3</sub>, takes place by the formation of an amide bond between porphyrin and the chelating ligand (Lys-NTA). The complete characterization of the TriPyP-

Lys(COOH)<sub>3</sub> was performed via <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, UV-Vis absorption and fluorescence spectroscopy, and fluorescence life-time. The final complex was characterized by UV-Vis, CD and IR spectroscopies. At the same time, DLS and zeta potential measurements were performed to determine the size and charge of the formed nanostructures. The ability of intracellular transport and the localization of the complex in cell lines of human breast adenocarcinoma MCF-7 were studied using confocal microscopy.

CD44 protein receptor has been found to be overexpressed by many tumors and is recognized as one of the most common Cancer Stem Cells surface markers, making it a promising receptor for therapeutic targeting. At the same time, aptamers are synthetic single-stranded oligonucleotides or peptides that can act against almost any target including ions, molecules, peptides, proteins and even entire living cells such as cancer cells. Thus, aptamers constitute promising molecules with high potential in biomedical applications.

Inspired by the forenamed, we recommend the synthesis of a dyad of porphyrin-polyethylene glycol, Zn-TPP-PEG-MAL that carries free maleimide. The dyad-target is conjugated by a thiol-maleimide "click" reaction to an RNA aptamer (Apt1) containing 2'-F-pyrimidine and has been studied to act against the CD44 biomarker. Thus, we aim to bind the porphyrin-aptamer system to cancer cells and to study it as a specific drug delivery system leading to cell apoptosis through photodynamic therapy.

*Keywords: self-assembly, diphenylalanine, labeling, metallochelate coupling, fluorophore, polyethylene glycol, aptamer, porphyrin, photodynamic therapy.*

## Περιεχόμενα

<b>Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή–Θεωρία</b> .....	<b>1</b>
1.1 Τετραπυρρόλια: Τα χρωμοφόρα της ζωής .....	1
1.2 Πορφυρινικός δακτύλιος και αρωματικότητα .....	3
1.3 Γενικές στρατηγικές σύνθεσης τεχνητών πορφυρινών .....	6
1.3.1 Συνθετική μέθοδος κατά <i>Rothmund</i> .....	7
1.3.2 Συνθετική μέθοδος κατά <i>Adler-Longo</i> .....	7
1.3.3 Συνθετική μέθοδος κατά <i>Lindsey</i> .....	9
1.3.4 Σύνθεση διπυρρομεθανίων .....	10
1.4 Φωτοφυσικές ιδιότητες των πορφυρινών .....	11
1.5 Αυτο-οργάνωση (Self-Assembly) .....	15
1.6 Αυτο-οργάνωση και πεπτιδία .....	17
1.7 Φθορίζουσα σήμανση (Fluorescent labeling-tagging) .....	21
1.8 Μεταλλοχηλική σύζευξη φθοροφόρων με αμινοξέα πεπτιδίου (peptide tags) για site-specific labeling .....	22
1.8.1 Tag ιστιδίνης (His-tag) .....	23
1.8.2 Μεταλλοχηλική σύζευξη πορφυρινών με αμινοξέα πεπτιδίου .....	26
1.9 Εισαγωγή στη φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic Therapy) .....	27
1.10 Μηχανισμοί Φωτοδυναμικής Θεραπείας (PDT) .....	28
1.10.1 Τύπου I μηχανισμός φωτοδυναμικής αντίδρασης .....	28
1.10.2 Τύπου II μηχανισμός φωτοδυναμικής αντίδρασης .....	29
1.11 Πορφυρίνες ως φωτοευαίσθητοποιητές στην PDT .....	31
<b>Κεφάλαιο 2: Στόχος Μεταπτυχιακής Εργασίας</b> .....	<b>33</b>
<b>Κεφάλαιο 3: Συνθετικές Προσεγγίσεις</b> .....	<b>38</b>
3.1 Α΄ Μέρος: Συνθετική προσέγγιση της FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe) <sub>3</sub> (11) .....	38
3.2 Β΄ Μέρος: Συνθετική προσέγγιση της TriPyPLys(COOH) <sub>3</sub> (16) .....	42
3.3 Γ΄ Μέρος: Συνθετική προσέγγιση της ZnTPP-PEG-MAL (20) .....	44
<b>Κεφάλαιο 4: Πειραματικό Μέρος</b> .....	<b>47</b>

4.1	Σύνθεση του 5-(bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino)-6-methoxy-6-oxohexan-1-aminium chloride (NH <sub>2</sub> -Lys-(COOMe) <sub>3</sub> , 1) .....	49
4.2	Σύνθεση της Di-L-phenylalanine methyl ester aminium chloride (NH <sub>2</sub> -FF-(COOMe), 2) .....	50
4.3	Σύνθεση του 2,2'-(mesitylmethylene)bis(1 <i>H</i> -pyrrole) (Mesityl dipyrromethane, 3) .....	50
4.4	Σύνθεση της methyl 4-(10,20-dimesityl-15-(4-nitrophenyl)porphyrin-5-yl)benzoate (NO <sub>2</sub> -DMP-COOMe, 4) .....	51
4.5	Σύνθεση της 4-(10,20-dimesityl-15-(4-nitrophenyl)porphyrin-5-yl)benzoic acid (NO <sub>2</sub> -DMP-COOH, 5).....	52
4.6	Σύνθεση της methyl (4-(10,20-dimesityl-15-(4-nitrophenyl)porphyrin-5-yl)benzoyl)phenylalanylphenylalaninate (NO <sub>2</sub> -DMP-FF-COOMe, 7).....	53
4.7	Σύνθεση της methyl (4-(15-(4-aminophenyl)-10,20-dimesitylporphyrin-5-yl)benzoyl)phenylalanylphenylalaninate (NH <sub>2</sub> -DMP-FF-COOMe, 8).....	54
4.8	Σύνθεση της 4-((4-(10,20-dimesityl-15-(4-((1-(1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamoyl) phenyl)porphyrin-5-yl)phenyl)amino)-4-oxobutanoic acid (FF-DMP-PCP Acid, 9).....	55
4.9	Σύνθεση της dimethyl 2,2'-((6-(4-((4-(10,20-dimesityl-15-(4-((1-(1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamoyl) phenyl)porphyrin-5-yl)phenyl)amino)-4-oxobutanamido)-1-methoxy-1-oxohexan-2-yl)azanediyl)diacetate (FF-DMP-PCP-Lys(COOMe) <sub>3</sub> , 11).....	56
4.10	Σύνθεση της methyl 4-[10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrin-5-yl]benzoate (TriPyP-COOMe, 12) .....	57
4.11	Σύνθεση της 4-[10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrin-5-yl]benzoic acid (TriPyP-COOH, 13) .....	58
4.12	Σύνθεση της dimethyl 2,2'-((1-methoxy-1-oxo-6-(4-(10,15,20-(4-tripyrindyl)porphyrin-5-yl)benzamido)hexan-2-yl)azanediyl)diacetate (TriPyP-Lys-(COOMe) <sub>3</sub> , 15) .....	59
4.13	Σύνθεση της 2,2'-((1-carboxy-5-(4-(10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrin-5-yl)benzamido)pentyl)azanediyl)diacetic acid (TriPyP-Lys-(COOH) <sub>3</sub> , 16) .....	60
4.14	Σύνθεση της 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPP-NH <sub>2</sub> , 17).....	61
4.15	Σύνθεση της 5-(4-azidophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPP-N <sub>3</sub> , 18) .....	62
4.16	Σύνθεση της [5-(4-azidophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrinato]zinc (Zn-TPP-N <sub>3</sub> , 19) .....	63
4.17	Σύνθεση της porphyrin-polyethylene glycol dyad (Zn-TPP-PEG-MAL, 20) .....	64
<b>Κεφάλαιο 5: Ανάλυση &amp; συζήτηση αποτελεσμάτων .....</b>		<b>66</b>

5.1 Χαρακτηρισμός και μελέτη αυτο-οργάνωσης της πορφυρίνης FF-DMP-PCP-Lys(COOMe) <sub>3</sub> .....	66
5.2 Χαρακτηρισμός και μελέτη της πορφυρίνης TriPyPLys(COOH) <sub>3</sub> στη φθορίζουσα σήμανση πεπτιδίου.....	73
5.3 Χαρακτηρισμός της πορφυρίνης Zn-TPP-PEG-MAL για εφαρμογή στη φωτοδυναμική θεραπεία.....	90
<b>Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα.....</b>	<b>94</b>
<b>Παράρτημα.....</b>	<b>96</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>141</b>

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CD	Circular Dichroism
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichloromethane
DCTB	trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile
DIPEA	Diisopropyl ethyl amine
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Et <sub>3</sub> N	Triethylamine
EtOH	Ethanol
F <sub>L</sub> -F <sub>L</sub>	L-Diphenylalanine
FESEM	Field Emission Scanning Electron Microscopy
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-propan-2-ol
His	Histidine
HOBt	1-hydroxybenzotriazole hydrate
hrs	hours
IDA	Iminodiacetic acid
IR	Infrared
Lys	Lysine
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization –Time of Flight
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MeOH	Methanol
min	minute
MS	Mass spectrometry



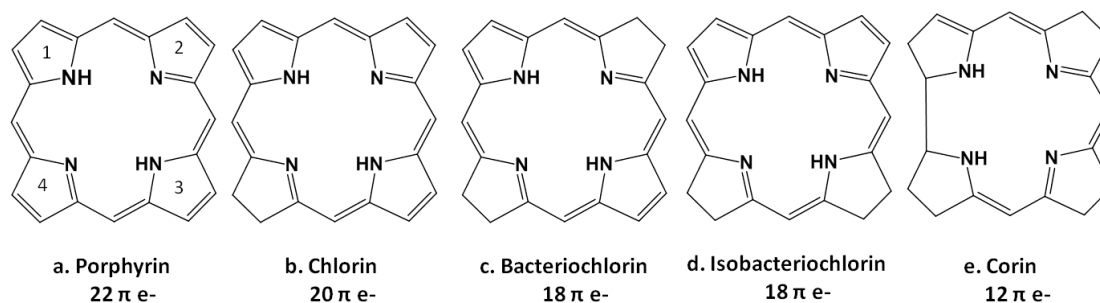
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NTA	Nitrilotriacetic acid
rt	room temperature
SEM	Scanning Electron Microscopy
$\text{SOCl}_2$	thionyl chloride
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin liquid chromatography

## Κεφ.1 Εισαγωγή – Θεωρία

### 1.1 Τετραπυρρόλια: Τα χρωμοφόρα της ζωής

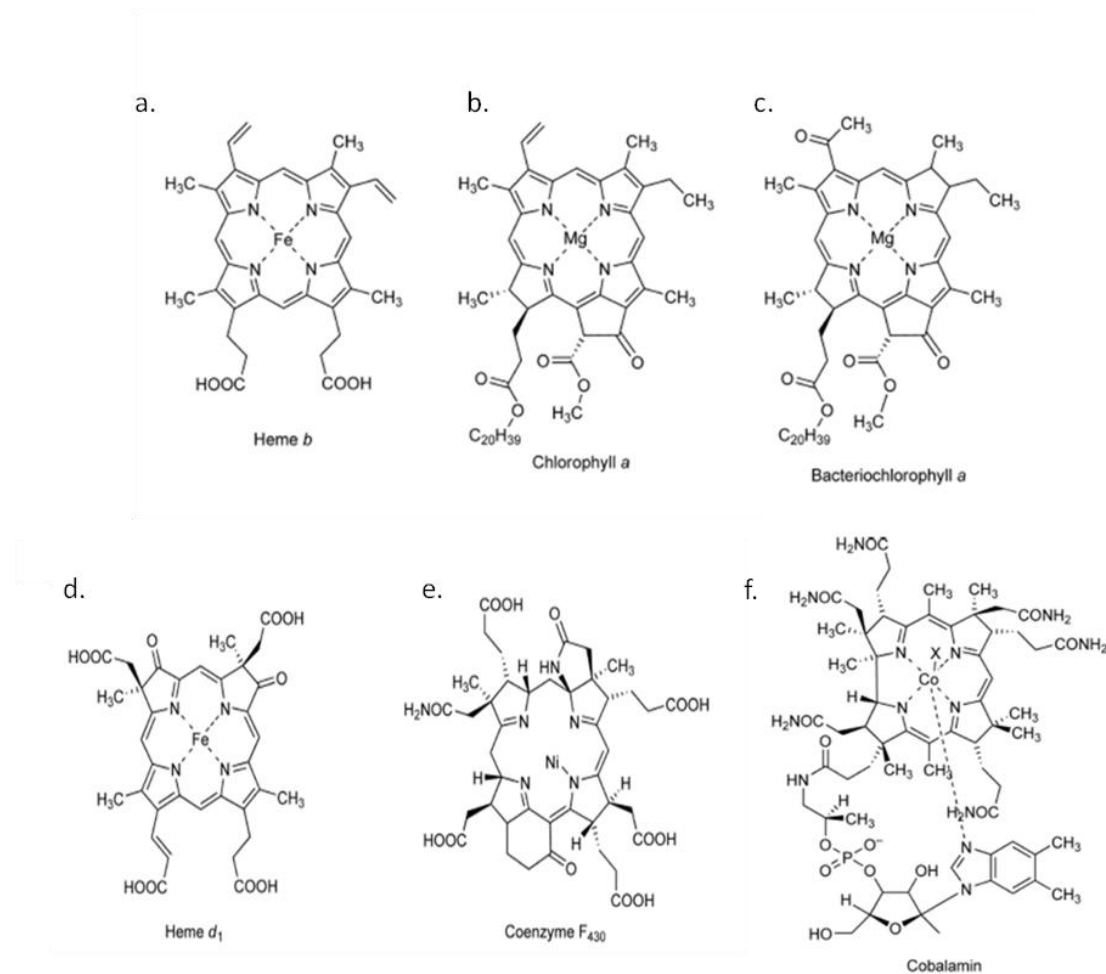
Τα τετραπυρρόλια είναι μια κατηγορία μορίων που δίνουν χρώμα στο κόσμο γύρω μας. Αποτελούνται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους που συνδέονται είτε με γραμμικό είτε με κυκλικό τρόπο μέσω μεθενικών γεφυρών. Πιο συγκεκριμένα, οι πορφυρίνες αποτελούν μακροκυκλικά οργανικά μόρια που διαθέτουν τέσσερις υπομονάδες πυρρολίου οργανωμένες σε ένα δακτύλιο με πλήρως συζυγική δομή εναλλασσόμενων απλών και διπλών δεσμών (**Εικόνα 1.1 a**).<sup>1</sup> Η ετυμολογία της λέξης “πορφυρίνη” έχει ελληνικές ρίζες, καθώς προέρχεται από την λέξη “πορφύρα” η οποία αναφέρεται στο βαθύ μωβ ή ιώδες χρώμα. Τόσο οι πορφυρίνες, όσο και άλλες τετραπυρρολικές χρωστικές διαδραματίζουν συχνά ζωτικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές διεργασίες και για το λόγο αυτό αποκαλούνται “χρωμοφόρα της ζωής”.<sup>2-4</sup>

Στα τετραπυρρολικά συστήματα με διαφοροποιήσεις στη βασική πορφυρινική δομή, συγκαταλέγονται κυρίως ανηγμένα μόρια που αποτελούν μερικώς υδρογονωμένα παράγωγα των πορφυρινών και καλούνται χλωρίνες (**Εικόνα 1.1 b**). Συγκεκριμένα παραδείγματα μορίων χλωρίνης που συναντώνται στη φύση είναι οι χλωροφύλλες, οι βακτηριοχλωροφύλλες (χλωρίνες-βακτηριοχλωρίνες), η αίμη  $d_1$  (ισοβακτηριοχλωρίνη) και το συνένζυμο  $F_{430}$  (**Εικόνα 1.1 c,d**). Σε αντίθεση με τις πορφυρίνες, τετραπυρρόλια όπως η κοβαλαμίνη (βιταμίνη  $B_{12}$ ), που στερούνται μιας γέφυρας άνθρακα η οποία συνδέει τα πυρρόλια 1 και 4 σε μια πλήρως συζυγική δομή, ανήκουν σε μια ξεχωριστή κατηγορία που καλείται κορινοειδή (κορίνες) (**Εικόνα 1.1 e**).<sup>5</sup>



**Εικόνα 1.1** Δομές των δακτυλίων της πορφυρίνης, χλωρίνης, βακτηριοχλωρίνης, ισοβακτηριοχλωρίνης και κορίνης.

Μια σημαντική ιδιότητα των κυκλικών τετραπυρρολίων είναι η ικανότητά τους να συμπλοκοποιούν διάφορα μέταλλα όπως Fe, Mg, Co, ή Ni. Οι μεταλλωμένοι τετραπυρρολικοί δακτύλιοι απαντώνται σε πληθώρα βιολογικών συστημάτων ως δραστικά συστατικά ενώ επιτελούν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες ανάλογα με το συναρμοσμένο στο δακτύλιό τους μέταλλο. Παραδείγματος χάριν, η αίμη (πορφυρίνη σιδήρου) ως προσθετική ομάδα της αιμοσφαιρίνης, μεταφέρει μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) και διοξείδιο του άνθρακα ( $CO_2$ ) μέσω του καρδιαγγειακού συστήματος (**Εικόνα 1.2 a**).<sup>6</sup> Ακόμη, λειτουργεί ως προσθετική ομάδα πολλών ενζύμων όπως καταλασών, υπεροξειδασών και ενζύμων του κυτοχρώματος  $P_{450}$  ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αναπνοή. Είναι γνωστό ότι τα κυτοχρώματα που περιέχουν αίμη αποτελούν αναπόσπαστα τμήματα διαφόρων αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων (π.χ κυτόχρωμα c).<sup>7</sup> Παράλληλα, οι αιμοπρωτεΐνες λειτουργούν ως αισθητήρες, συμβάλλοντας σημαντικά στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι οργανισμοί ανταποκρίνονται στις αλλαγές της διαθεσιμότητας διατομικών μορίων που είναι τοξικά ή και ζωτικής σημασίας για την επιβίωση όπως τα διατομικά αέρια  $O_2$ , CO και NO.<sup>8</sup> Χλωροφύλλες καθώς και βακτηριοχλωροφύλλες αποτελούν απαραίτητα συστατικά του φωτοσυνθετικού συστήματος φυτών και βακτηρίων καθώς απορροφούν το φως του ηλίου συμβάλλοντας στη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική (**Εικόνα 1.2 b,c**).<sup>9</sup> Μια άλλη τετραπυρρολική ένωση του σιδήρου στη φύση είναι η πράσινη αίμη  $d_1$ . Η αίμη  $d_1$  χρησιμεύει ως προσθετική ομάδα του κυτοχρώματος  $cd_1$  (νιτρική ρεδουκτάση) ορισμένων βακτηρίων κατά τη διαδικασία της απονίτρωσης (**Εικόνα 1.2 d**). Πέραν όμως από τις τετραπυρρολικές ενώσεις του σιδήρου, στη φύση συναντώνται και τετραπυρρολικά συστήματα νικελίου και συγκεκριμένα το συνένζυμο  $F_{430}$ . Το κίτρινο συνένζυμο  $F_{430}$  αποτελεί συμπαραγοντα της αναγωγής του μέθυλο-συνενζύμου M που εμπλέκεται στο σχηματισμό μεθανίου (**Εικόνα 1.2 e**).<sup>10</sup> Η πιο πολύπλοκη τετραπυρρολική ένωση στη φύση είναι η κοβαλαμίνη (βιταμίνη  $B_{12}$ ) που περιέχει κοβάλτιο. Η κοβαλαμίνη και τα παράγωγά της χρησιμεύουν ως συμπαραγοντες σε μια πληθώρα ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς μεθυλίου ή σε αντιδράσεις αναδιάταξης ριζών (**Εικόνα 1.2 f**).<sup>11</sup> Σε αντίθεση με τα κυκλικά τετραπυρρόλια, τα γραμμικά δεν περιέχουν κάποιο στενά συνδεδεμένο μέταλλο. Χρησιμεύουν ως χρωμοφορικοί φωτοϋποδοχείς σε κυανοβακτήρια και φυτικά συστήματα συλλογής φωτός.<sup>12</sup>



**Εικόνα 1.2** Δομή σημαντικών τετραπυρρολίων που απαντώνται στη φύση.

## 1.2 Πορφυρινικός δακτύλιος και αρωματικότητα

*One Ring to rule them all,*

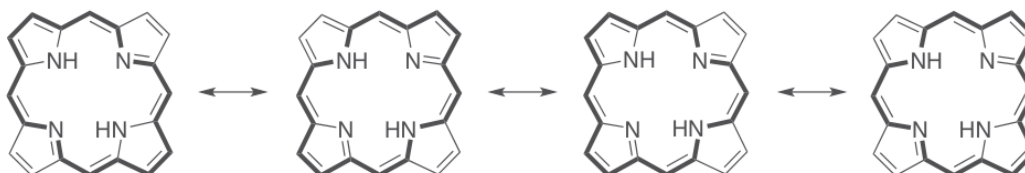
*One Ring to find them,*

*One Ring to bring them all and in the darkness bind them.*

- J. R. R. Tolkien, *The Fellowship of the Ring* <sup>13</sup>

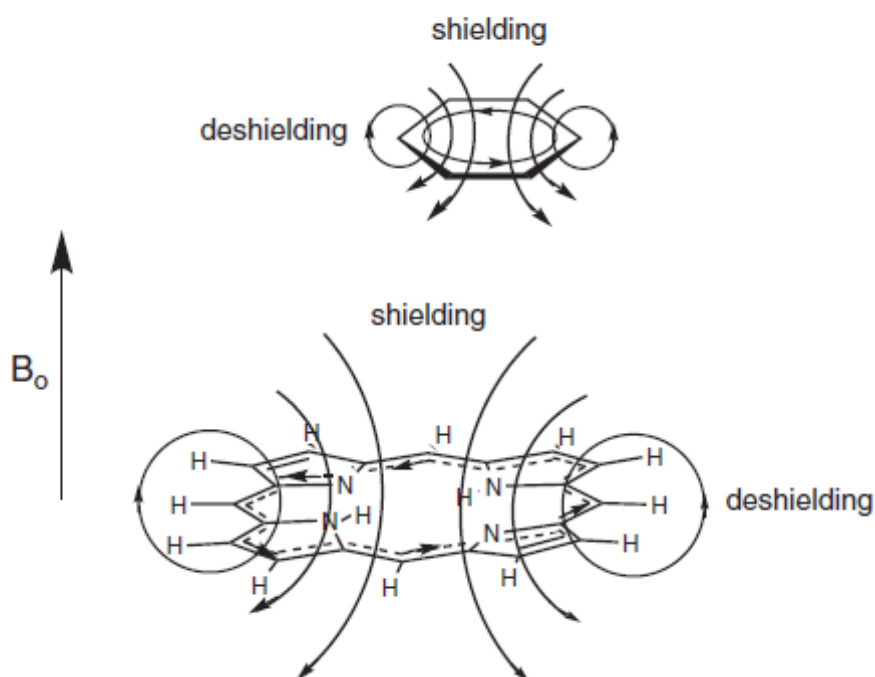
Η αρωματικότητα είναι ο πρωταρχικός λόγος που οι πορφυρίνες και τα παράγωγά τους έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές φυσικές διεργασίες. Οι αρωματικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από μεγάλη σταθερότητα, επιπεδότητα και δραστικότητα, διαθέτοντας μοναδικές φασματοσκοπικές και μαγνητικές ιδιότητες. Οι πορφυρίνες αποτελούν αρωματικά ετεροκυκλικά συστήματα (20 άνθρακες και 4 άζωτα) που περιέχουν 22 π-ηλεκτρόνια. Απαρτίζονται από τέσσερις δακτυλίους πυρρολίου που συνδέονται μεταξύ τους με μεθενικές γέφυρες στις α-θέσεις τους. Ωστόσο, από τα 22 π-ηλεκτρόνια μόνο τα 18 συμμετέχουν στη συζυγία σύμφωνα με τον κανόνα της

αρωματικότητας κατά Hückel ( $4n + 2$  απεντοπισμένα π-ηλεκτρόνια, όπου  $n = 4$ ). Επιπλέον, η επίπεδη δομή των πορφυρινών σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τον τρόπο σύνδεσης των πυρρολικών μονάδων μεταξύ τους ενώ το συζυγιακό σύστημα των 18 π-ηλεκτρονίων είναι υπεύθυνο για την αρωματική συμπεριφορά τους (**Σχήμα 1.1**).



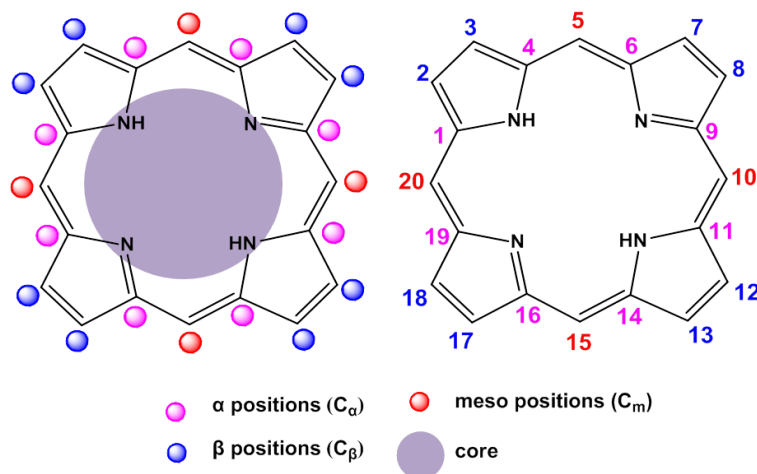
**Σχήμα 1.1** Μονοπάτι απεντοπισμού των 18 π-ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αρωματικότητα του πορφυρινικού δακτυλίου.

Το άκαμπτο αυτό συζυγιακό σύστημα μαζί με τον αποτελεσματικό απεντοπισμό των ηλεκτρονίων μπορεί και αποτρέπει την οξείδωση ή τη αναγωγή του πορφυρινικού δακτυλίου, καθιστώντας έτσι δυνατή τη μεγάλη θερμική του σταθερότητα. Η αρωματικότητα των πορφυρινών μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Όταν εφαρμόζεται εξωτερικό μαγνητικό πεδίο κάθετα στο επίπεδο της πορφυρίνης, το μαγνητικό πεδίο προκαλεί τον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων και συνεπώς την κυκλική τους κίνηση πάνω και κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου που καλείται ρεύμα δακτυλίου.<sup>14</sup> Το ρεύμα δακτυλίου (ring current) επάγει τη δημιουργία ενός δευτερογενούς τοπικού μαγνητικού πεδίου που είναι κάθετο στο επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου. Το τοπικό αυτό μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται λόγω της κυκλοφορίας των αρωματικών ηλεκτρονίων παρουσιάζει ανισοτροπία στο χώρο, καθώς έχει την ίδια φορά με την ένταση του εφαρμοζόμενου εξωτερικού μαγνητικού πεδίου ( $B_0$ ) στα εξωτερικά-περιφερειακά πρωτόνια της πορφυρίνης ενώ έχει αντίθετη φορά με την ένταση ( $B_0$ ) στα εσωτερικά πρωτόνια (NH πρωτόνια).<sup>15</sup> Ως εκ τούτου, τα εξωτερικά πρωτόνια αποπροστατεύονται και απορροφούν σε ασθενέστερα πεδία (υψηλότερες τιμές  $\delta$ ), ενώ τα εσωτερικά πρωτόνια θωρακίζονται-προστατεύονται από την επίδραση του εξωτερικού πεδίου και απορροφούν σε ισχυρότερα πεδία (χαμηλότερες τιμές  $\delta$ ) (**Σχήμα 1.2**).



**Σχήμα 1.2** Το ρεύμα δακτυλίου έχει ως αποτέλεσμα την έντονη θωράκιση των εσωτερικών πρωτονίων της πορφυρίνης και την αποπροστασία των εξωτερικών.<sup>16</sup>

Αρχικά, η δομή των πορφυρινών προτάθηκε από τον Küster W. το 1913 ενώ ακολούθησαν έρευνες που απέδειξαν ότι το NH-ταυτομερές αποτελεί την πιο σταθερή μορφή τους.<sup>17</sup> Οι γεφυρωτικοί μεθενικοί άνθρακες στις θέσεις 5, 10, 15 και 20 ορίζονται ως meso-θέσεις, ενώ οι πυρρολικοί άνθρακες στις θέσεις 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 και 18 ορίζονται ως θέσεις β (**Σχήμα 1.3**). Κάθε παράγωγο πορφυρίνης διαθέτει παρόμοια βασική δομή, αν και πολλές φορές μπορεί να παρουσιάζει διαφορές στους υποκαταστάτες των meso και β θέσεων. Οι πορφυρίνες είναι τετραδοντικοί υποκαταστάτες (ligands) και το μέγεθος του μακροκυκλικού δακτυλίου τους είναι είναι ικανό να συναρμόζει σχεδόν όλα τα μεταλλικά ιόντα. Το επίπεδο τετραγωνικό περιβάλλον τους μαζί με την άκαμπτη κοιλότητα τους είναι ιδανικά για ενσωμάτωση πληθώρας μετάλλων. Έτσι, ένας μεγάλος αριθμός μετάλλων μπορεί να εισαχθεί στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου με μερικά από τα πιο συνηθισμένα να είναι τα εξής: Fe, Zn, Cu, Ni, Hg και Co. Τα πορφυρινικά σύμπλοκα που σχηματίζονται υπό την παρουσία κάποιου μεταλλικού ιόντος καλούνται μεταλλοπορφυρίνες και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στη γεωμετρία τους ανάλογα με τη φύση του μεταλλικού ιόντος που έχει συναρμοστεί στον “πυρήνα” τους.<sup>18</sup>



**Σχήμα 1.3** Αρίθμηση θέσεων στον πορφυρινικό δακτύλιο κατά IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Η χημική τροποποίηση των πορφυρινών καθώς και των παραγώγων τους μπορεί να επιτευχθεί εύκολα τόσο στις β όσο και στις meso-θέσεις, δημιουργώντας έτσι νέες ιδιότητες για στοχευμένες εφαρμογές.<sup>19,20</sup> Συνεπώς, οι πορφυρίνες είναι εξαιρετικά ευέλικτα μόρια από συνθετικής άποψης<sup>21</sup> και έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε πολλούς τομείς της χημείας όπως η οπτο-ηλεκτρονική,<sup>22,23</sup> η κατάλυση<sup>24,25</sup> κλπ. Επιπλέον, η ικανότητα να προσαρμόζονται οι χημικές και φυσικές ιδιότητες των συνθετικών πορφυρινών έχει οδηγήσει στην ευρεία χρήση τέτοιων παραγώγων σε εφαρμογές όπως η ιατρική,<sup>26</sup> η τεχνητή φωτοσύνθεση<sup>27</sup> κ.ο.κ.

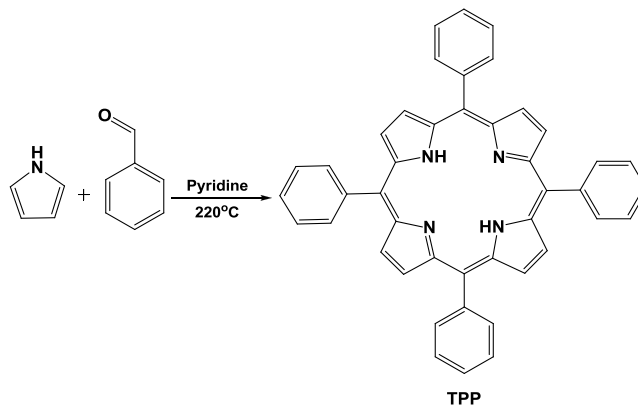
### 1.3 Γενικές στρατηγικές σύνθεσης τεχνητών πορφυρινών

Οι γενικές μεθοδολογίες που αφορούν τη σύνθεση των πορφυρινικών παραγώγων αναπτύχθηκαν σημαντικά τα τελευταία 80 χρόνια, με πρώτη τη συνθετική προσέγγιση πορφυρινών κατά Rothemund που χρονολογείται το 1936.<sup>28</sup> Στην τεχνητή σύνθεση του πορφυρινικού δακτυλίου μπορούν να καταλήξουν πολυάριθμες χημικές στρατηγικές, ενώ εξίσου πολλές είναι και οι βιβλιογραφικές αναφορές σε πειραματικές διαδικασίες αναφορικά με την πορφυρινική σύνθεση ανά τα έτη.<sup>29</sup> Πιο συγκεκριμένα, οι μακροκυκλικοί δακτύλιοι των πορφυρινών μπορούν και συντίθενται μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας δομικών στοιχείων όπως είναι τα πυρρόλια, οι αλδεΐδες, τα διπυρρομεθάνια, τα τριπυράνια, και τα γραμμικά τετραπυρρόλια. Με την παρουσία τους σε πληθώρα φυσικών συστημάτων οι πορφυρίνες μπορεί να θεωρηθεί ότι πηγάζουν από τη φύση. Ειδικότερα, η χλωροφύλλη και η αίμη μπορούν να απομονωθούν από τα φυτά και τα κύτταρα του αίματος αντίστοιχα. Όμως,

χρησιμοποιώντας φυσική χλωροφύλλη και αίμη είναι δυνατή η σύνθεση πορφυρινών που είναι υποκατεστημένες μόνο στις β-θέσεις. Επομένως, για να μπορέσουν να σχηματιστούν διαφορετικά υποκατεστημένα πορφυρινικά παράγωγα, είναι αναγκαία η σύνθεση πορφυρινικών δακτυλίων από την αρχή. Το κυριότερο δομικό στοιχείο για τη σύνθεση των πορφυρινών είναι το πυρρόλιο ενώ υπάρχουν διάφορα συνθετικά πρωτόκολλα που μπορούν να ακολουθηθούν για τη σύνθεση διαφορετικών meso- και β-υποκατεστημένων πορφυρινών. Οι πιο σημαντικές μεθοδολογίες για την παρασκευή τέτοιων παραγώγων πορφυρίνης περιγράφονται παρακάτω.

### 1.3.1 Συνθετική μέθοδος κατά *Rothemund*

Η αρχική σύνθεση υποκατεστημένων πορφυρινών στη meso-θέση αναπτύχθηκε αρχικά από τον Rothemund με την παρασκευή της 5, 10, 15, 20-τετραφαινυλο-πορφυρίνης (TPP).<sup>30</sup> Πιο συγκεκριμένα, η προαναφερθείσα πορφυρίνη συντέθηκε χρησιμοποιώντας πυρρόλιο και βενζαλδεΐδη παρουσία πυριδίνης (σε σφραγισμένο σωλήνα στους 220 °C), για να σχηματιστεί η TPP σε σχεδόν 10% απόδοση (**Σχήμα 1.4**).



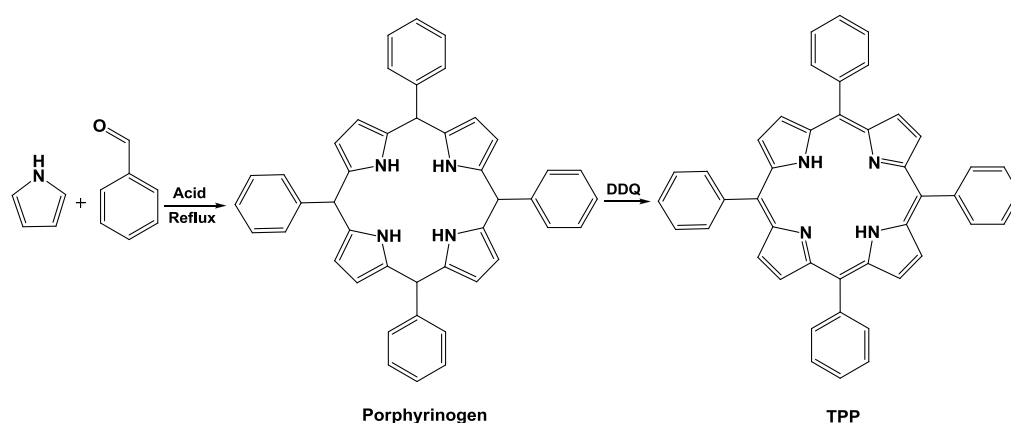
**Σχήμα 1.4** Σύνθεση κατά Rothemund της 5,10,15,20-τετραφαινυλο-πορφυρίνης (TPP).<sup>30</sup>

### 1.3.2 Συνθετική μέθοδος κατά *Adler-Longo*

Οι Adler, Longo και οι συνεργάτες τους ανέφεραν ένα απλό τρόπο για τη σύνθεση συμμετρικών τετραφαινυλο-πορφυρινών το 1964.<sup>31</sup> Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την όξινα καταλυόμενη αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ πυρρολίου και της εκάστοτε κατάλληλης αλδεΐδης. Το οξύ ενεργοποιεί τη βενζαλδεΐδη με την πρωτονίωση της ομάδας καρβονυλίου. Ο ρόλος της 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-πάρρα-βενζοκινόνης (DDQ) είναι η οξειδωση του παραγόμενου πορφυρινογόνου με αποτέλεσμα τον

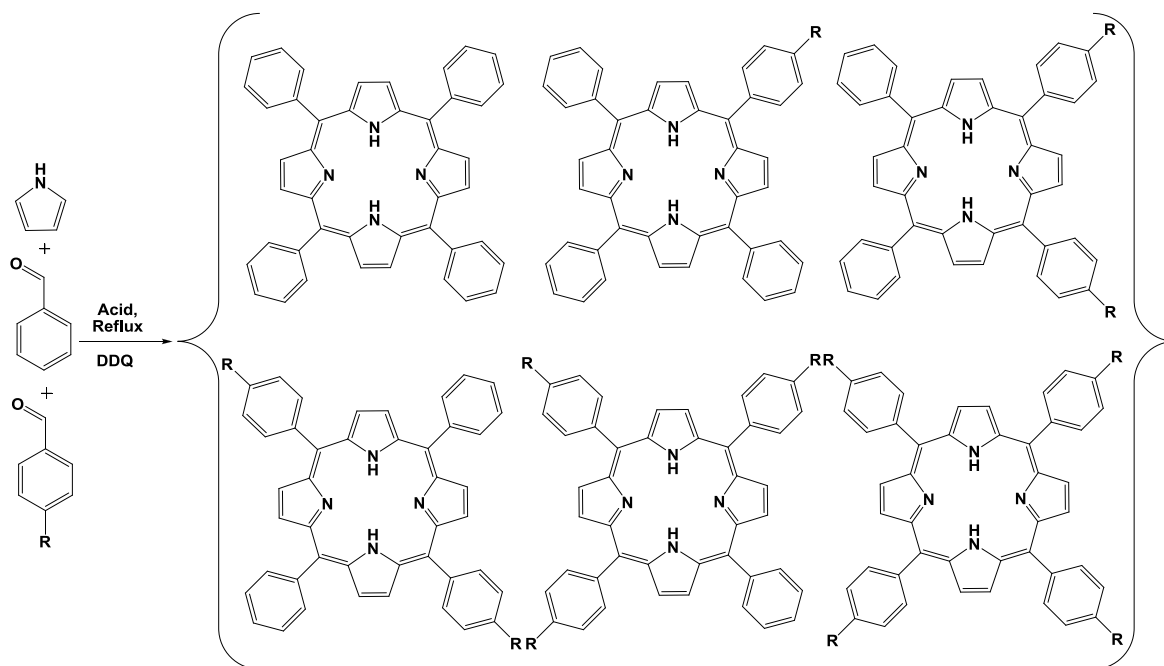


σχηματισμό της τετραφαινυλο-πορφυρίνης (TPP) (**Σχήμα 1.5**). Διαφορετικά οργανικά οξέα δοκιμάστηκαν ως διαλύτες, όπως προπιονικό οξύ, οξικό οξύ, τριφθοροοξικό οξύ και βενζόλιο που περιέχει χλωροοξικό οξύ. Χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο, το οποίο είναι σχετικά απλό και κατάλληλο για παραγωγή μεγάλης κλίμακας, οι τετραφαινυλο-πορφυρίνες μπορούν να παρασκευαστούν σε αποδόσεις σχεδόν 40%. Επιπλέον, μεταβάλλοντας την αλδεΐδη, με την μέθοδο αυτή μπορούν να συντεθούν διάφορες συμμετρικές πορφυρίνες.



**Σχήμα 1.5** Σύνθεση κατά Adler-Longo της 5,10,15,20-τετραφαινυλο-πορφυρίνης (TPP).<sup>31</sup>

Η μέθοδος Adler-Longo μπορεί επίσης να εφαρμοστεί για τη σύνθεση ασύμμετρων πορφυρινικών ενώσεων. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.6** η σύνθεση ασύμμετρων πορφυρινών επιτυγχάνεται μέσω μικτών αντιδράσεων συμπύκνωσης αλδεϋδών παρουσία πυρρολίου. Χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές αλδεΐδες, προκύπτει ένα στατιστικό μίγμα προϊόντων. Εν τούτοις, σε αυτή την περίπτωση, προκειμένου να διαχωριστεί η επιθυμητή πορφυρίνη από τα υπόλοιπα παραγόμενα πορφυρινικά ανάλογα που υπάρχουν στο μίγμα της αντίδρασης, απαιτείται καθαρισμός μέσω χρωματογραφίας στήλης.

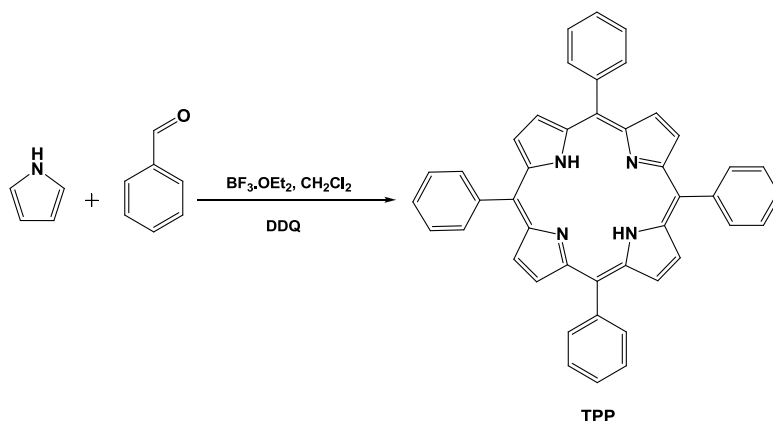


**Σχήμα 1.6** Σύνθεση ασύμμετρων πορφυρινικών παραγώγων μέσω μικτής αντίδρασης συμπύκνωσης δύο διαφορετικών αλδευδών παρουσία πυρρολίου.

### 1.3.3 Συνθετική μέθοδος κατά *Lindsey*

Τη δεκαετία του 1980<sup>32</sup> ο Lindsey και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν ένα διαφορετικό συνθετικό πρωτόκολλο για την παρασκευή της TPP, χρησιμοποιώντας πιο ήπιες συνθήκες αντίδρασης (**Σχήμα 1.7**).<sup>33</sup> Πιο συγκεκριμένα, με αυτή τη συνθετική προσέγγιση, η TPP παρασκευάστηκε σε πρώτο στάδιο χρησιμοποιώντας κάποιο οργανικό διαλύτη ( $\text{CHCl}_3$  ή  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), βενζαλδεΐδη, πυρρόλιο και ένα οξύ κατά Lewis ως καταλύτη (TFA ή  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ). Σε επόμενο στάδιο έγινε η προσθήκη του οξειδωτικού μέσου (DDQ ή *p*-chloranil) για να πραγματοποιηθεί η οξείδωση του ενδιάμεσου πορφυρινογόνου που σχηματίζεται και σε αυτή την περίπτωση κατά την κυκλοποίηση. Επομένως, πρόκειται για μια πιο πρακτική μέθοδο σύνθεσης τεχνητών πορφυρινών συγκριτικά με εκείνη των Adler-Longo, παρά το γεγονός ότι παρουσιάζει σχετικά χαμηλότερες αποδόσεις. Επιπλέον, η συνθετική μέθοδος κατά Lindsey μπορεί να εφαρμοστεί για τη σύνθεση πορφυρινικών παραγώγων που προέρχονται από ασταθείς σε όξινες συνθήκες αλδεΐδες, οι οποίες είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθούν για την τεχνητή παρασκευή πορφυρινών σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Adler και Longo. Τέλος, είναι γεγονός ότι κάποιες πορφυρινικές ενώσεις δεν μπορούν να κρυσταλλωθούν και να καθιζάνουν παρουσία οξέος (π.χ.

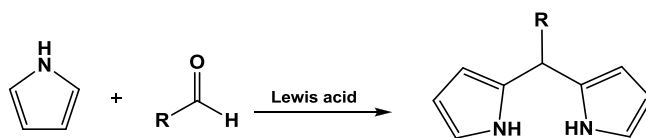
προπιονικό οξύ), εμποδίζοντας το διαχωρισμό και την απομόνωση των νεοσυντιθέμενων πορφυρινών.



**Σχήμα 1.7** Σύνθεση κατά Lindsey της 5,10,15,20-τετραφαινυλο-πορφυρίνης (TPP).

### 1.3.4 Σύνθεση διπυρρομεθανίων

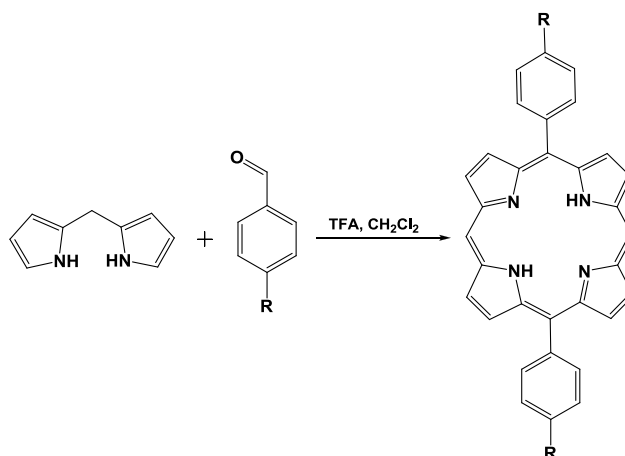
Μια εναλλακτική προσέγγιση για την παρασκευή τόσο συμμετρικών όσο και ασύμμετρων πορφυρινών αποτελεί η αντίδραση συμπύκνωσης με τη χρήση διπυρρομεθανίων αντί πυρρολίων. Τα διπυρρομεθάνια είναι πρόδρομα μόρια με σημαντικό ρόλο στην πορφυρινική σύνθεση καθώς αποτελούνται από δύο υπομονάδες πυρρολίου συνδεδεμένες μέσω μιας μεθυλενικής γέφυρας (**Σχήμα 1.8**). Η σύνθεση των διπυρρομεθανίων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης δύο ισοδυνάμων μη υποκατεστημένων πυρρολίων με οποιαδήποτε αρυλοβενζαλδεύδη. Ο Lindsey και συνεργάτες του πρότειναν τη μέθοδο σύνθεσης των διπυρρομεθανίων χρησιμοποιώντας κάποιο ήπιο οξύ κατά Lewis (π.χ.  $\text{InCl}_3$ ) το οποίο λειτουργεί ως καταλύτης για την αντίδραση.<sup>34</sup>



**Σχήμα 1.8** Σύνθεση διπυρρομεθανίου κατά Lindsey.<sup>34</sup>

Είναι γεγονός ότι τα διπυρρομεθάνια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη χημεία των πορφυρινών ανά τα έτη και κυρίως εκείνα που εμπλέκονται με τη σύνθεση *trans*-υποκατεστημένων πορφυρινών στη *meso*-θέση. Το 1960 για πρώτη φορά ο

MacDonald και οι συνεργάτες του πρότειναν τη σύνθεση διπυρρομεθανίων με τη χρήση διαφόρων αρυλο αλδευδών παρουσία TFA και  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Σχήμα 1.9).<sup>35</sup>

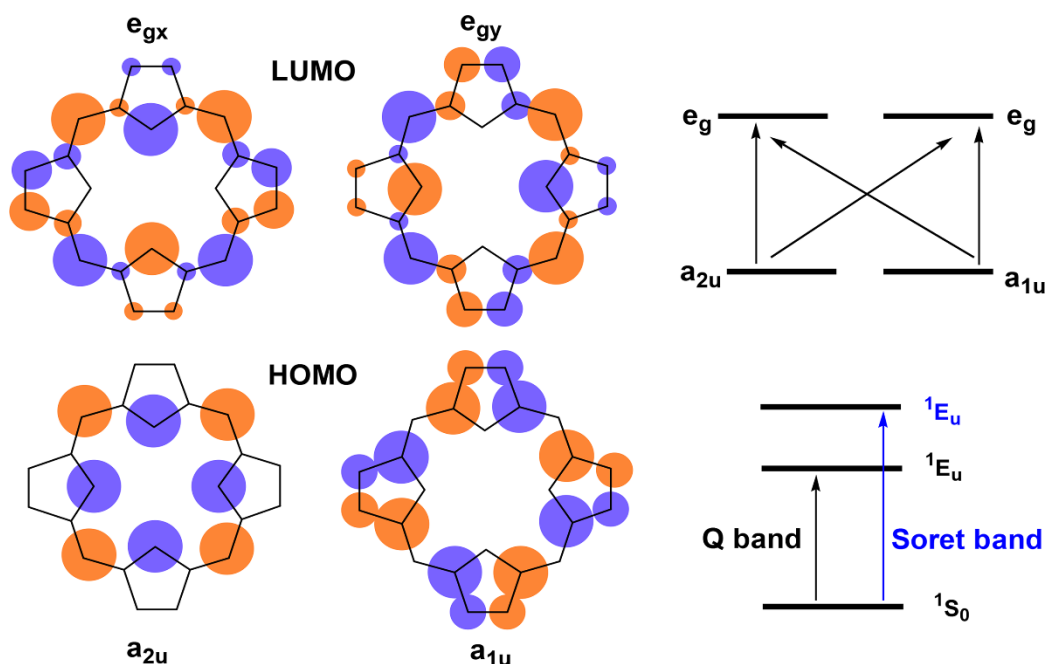


**Σχήμα 1.9** Σύνθεση *trans*-υποκατεστημένης πορφυρίνης στη *meso*-θέση κατά MacDonald.

Ένας μεγάλος αριθμός υποκατεστημένων διπυρρομεθανίων έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε συνθετικά πρωτόκολλα πορφυρινών ενώ παράλληλα έχουν επιτευχθεί πολλές σημαντικές βελτιώσεις που αφορούν τα συγκεκριμένα πρωτόκολλα κατά το πέρασμα των ετών.<sup>29</sup> Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η κατηγορία πρόδρομων ενώσεων ήταν ένας από τους βασικότερους παράγοντες που συντέλεσαν στην ανάπτυξη της σύνθεσης των τετρα *meso*-υποκατεστημένων πορφυρινών.

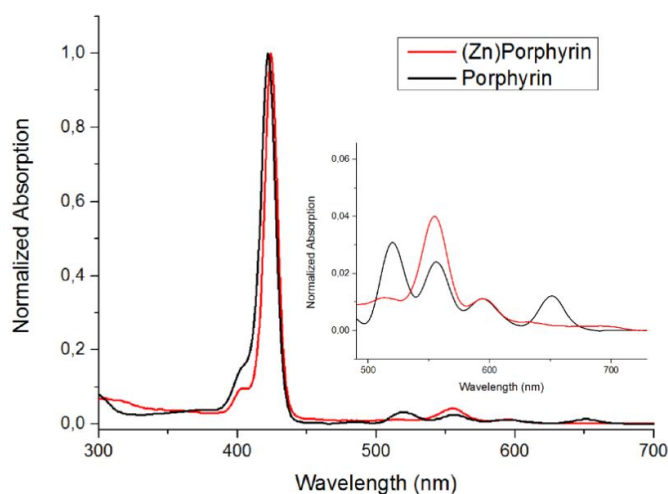
#### 1.4 Φωτοφυσικές ιδιότητες των πορφυρινών

Το πρώτο φάσμα ηλεκτρονικής απορρόφησης πορφυρινικών παραγώγων ερμηνεύθηκε από τον Martin Gouterman το 1961.<sup>36,37</sup> Σύμφωνα με το μοντέλο των “τεσσάρων τροχιακών” του Gouterman, οι πορφυρίνες διαθέτουν δύο υψηλότερης ενέργειας κατειλημμένα π-τροχιακά (HOMO, HOMO-1) και δύο χαμηλότερης ενέργειας μη κατειλημμένα π\*-τροχιακά (LUMO και LUMO+1). Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 1.10, τα δύο HOMOs ( $a_{1u}$  και  $a_{2u}$ ) βρίσκονται κοντά ενεργειακά, ενώ τα LUMOs ( $e_{g,x,y}$ ) είναι διπλά εκφυλισμένα.



**Σχήμα 1.10** Αναπαράσταση του μοντέλου των “τεσσάρων τροχιακών” κατά Gouterman.

Οι χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των πορφυρινών οφείλονται στις μεταβάσεις ενός ηλεκτρονίου ανάμεσα στα HOMOs και στα LUMOs και πιο συγκεκριμένα, οι μεταβάσεις  $a_{1u} \rightarrow e_g$  και  $a_{2u} \rightarrow e_g$  οδηγούν σε δύο ταινίες με διαφορετικά μήκη κύματος και εντάσεις. Οι πορφυρίνες λόγω του εκτεταμένου αρωματικού τους συστήματος διαθέτουν ένα ασυνήθιστο φάσμα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis). Στο σχήμα που ακολουθεί (**Σχήμα 1.11**) απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης μιας πορφυρίνης ελεύθερης βάσης και μιας μεταλλωμένης με ψευδάργυρο πορφυρίνης.

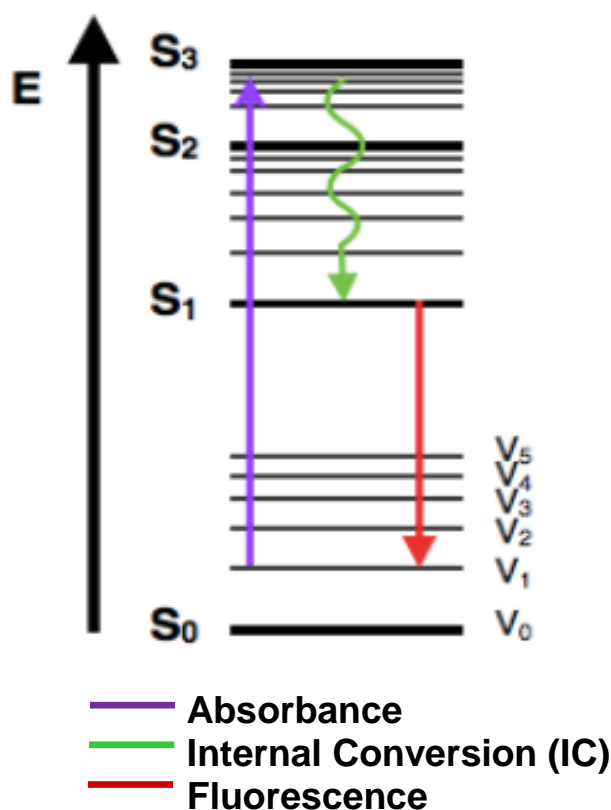


**Σχήμα 1.11** Φάσματα απορρόφησης UV-Vis μιας ελεύθερης πορφυρίνης (μαύρη γραμμή) και μιας μεταλλωμένης πορφυρίνης ψευδαργύρου (κόκκινη γραμμή).

Όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 1.11**, το φάσμα απορρόφησης τόσο της μεταλλωμένης όσο και της μη μεταλλωμένης πορφυρίνης, διακρίνεται σε δύο κύριες περιοχές. Η πρώτη περιοχή, στα 420 nm περίπου, χαρακτηρίζεται από μία έντονη ταινία απορρόφησης η οποία ονομάζεται ταινία B ή ταινία Soret, ενώ η δεύτερη περιοχή εντοπίζεται στην ερυθρή περιοχή του φάσματος (500-700 nm) όπου και παρατηρούνται ταινίες μικρότερης έντασης οι οποίες καλούνται ταινίες Q. Αξίζει να σημειωθεί ότι το εύρος απορρόφησης της Soret ταινίας κυμαίνεται μεταξύ των 380 nm και 450 nm, ανάλογα τη θέση υποκατάστασης του πορφυρινικού δακτυλίου (meso ή β θέση). Συγκεκριμένα, η Soret ταινία οφείλεται στην επιτρεπτή μετάβαση από τη βασική στη δεύτερη διεγερμένη κατάσταση ( $S_0 \rightarrow S_2$ ), ενώ οι ταινίες Q σχετίζονται με τις “ημι-επιτρεπτές” μεταβάσεις από τη θεμελιώδη στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση ( $S_0 \rightarrow S_1$ ). Σύμφωνα με το μοντέλο του Gouterman, το οποίο περιγράφηκε παραπάνω, η ισχυρής έντασης ταινία Soret που εμφανίζεται σε σχετικά μικρά μήκη κύματος οφείλεται στη μετάπτωση  $a_{1u} \rightarrow e_g$  ενώ οι ασθενέστερης έντασης ταινίες Q μεγαλύτερου μήκους κύματος οφείλονται σε μεταπτώσεις  $a_{2u} \rightarrow e_g$ . Στο φάσμα απορρόφησης των ελεύθερων πορφυρινών εντοπίζονται τέσσερις ταινίες Q και ταξινομούνται σύμφωνα με τις αυξανόμενες τιμές μήκους κύματος ( $\lambda$ ) ως IV, III, II και I (**Σχήμα 1.11** ένθετο, μαύρη γραμμή). Ωστόσο, στην περίπτωση των μεταλλωμένων πορφυρινών, η συμμετρία του μορίου αλλάζει από  $D_{2h}$  σε  $D_{4h}$  με αποτέλεσμα να παρατηρείται εκφυλισμός των τεσσάρων ταινιών σε δύο εξαιτίας μιας πιο συμμετρικής ηλεκτρονιακής διαμόρφωσης (**Σχήμα 1.11** ένθετο, κόκκινη γραμμή). Αλλαγές εντοπίζονται επίσης και στη Soret ταινία, η οποία μετατοπίζεται σε μικρότερα ή μεγαλύτερα μήκη κύματος ανάλογα τη φύση του μετάλλου. Η διαφοροποίηση των περιφερειακών υποκαταστατών, τόσο στις meso όσο και στις β θέσεις του πορφυρινικού δακτυλίου, επιφέρει μικρές αλλαγές στην ένταση και στο μήκος κύματος των χαρακτηριστικών απορροφήσεων. Ωστόσο, η πρωτονίωση ή συναρμογή ενός μετάλλου στον πορφυρινικό δακτύλιο επηρεάζει σημαντικά τις σχετικές ενέργειες των παραπάνω μεταβάσεων προκαλώντας αισθητές αλλαγές στα φάσματα απορρόφησης.

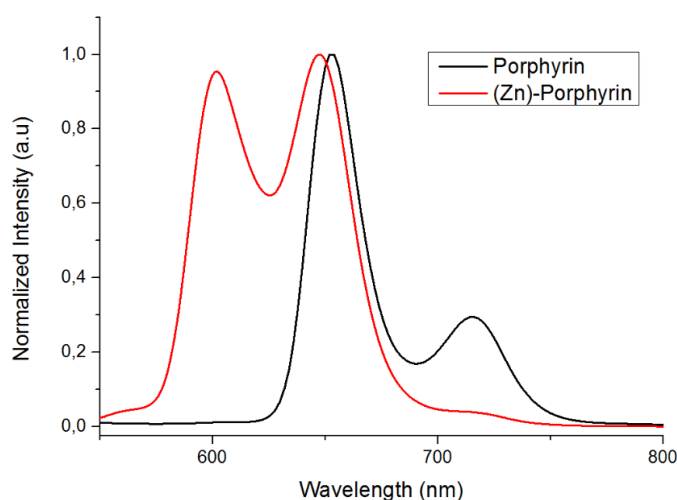
Προκειμένου να αποτυπωθούν οι ηλεκτρονιακές καταστάσεις ενός μορίου καθώς και οι μεταβάσεις μεταξύ τους χρησιμοποιούνται συχνά διαγράμματα ενεργειακών επιπέδων Jablonski (**Σχήμα 1.12**). Σε ένα τέτοιο διάγραμμα απεικονίζονται οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου από ένα

μόριο με αποτέλεσμα τη διέγερση ενός ηλεκτρονίου του από τη βασική κατάσταση,  $S_0$  σε οποιαδήποτε απλή διεγερμένη κατάσταση  $S_x$ . Ένα παράδειγμα μη ακτινοβολικής αποδιέγερσης που μπορεί να λάβει χώρα είναι η εσωτερική μετατροπή (internal conversion, IC). Όταν ένα μόριο διεγείρεται σε ένα δονητικό επίπεδο, τα ηλεκτρόνια του μπορούν να αναδιαταχθούν στο χώρο με τέτοιο τρόπο ώστε να συμβεί μια εσωτερική μετατροπή, δηλαδή μια μετατροπή χωρίς ακτινοβολία προς μια άλλη κατάσταση ίδιας πολλαπλότητας. Επιπλέον, ένα διαφορετικό μονοπάτι το οποίο μπορεί να ακολουθήσει ένα μόριο προκειμένου να αποβάλλει την ενέργεια διέγερσής του είναι μέσω της εκπομπής ακτινοβολίας. Ένα ενδεικτικό παράδειγμα ακτινοβολικής αποδιέγερσης είναι ο φθορισμός, όπου μετά την αρχική απορρόφηση φωτονίου, οι ανώτερες δονητικές καταστάσεις αποδιηγείρονται αποβάλλοντας ενέργεια προς το περιβάλλον χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας. Η μετάβαση που ακολουθεί από τη θεμελιώδη δονητική κατάσταση της ανώτερης ηλεκτρονιακής κατάστασης (π.χ.  $S_1$ ) με εκπομπή ακτινοβολίας δημιουργεί το φαινόμενο του φθορισμού.



**Σχήμα 1.12** Διάγραμμα Jablonski όπου απεικονίζονται οι ηλεκτρονιακές καταστάσεις ενός μορίου.

Τα φάσματα φθορισμού δύο τυπικών πορφυρινικών παραγώγων (ελεύθερης και μεταλλωμένης με ψευδάργυρο) απεικονίζονται στο **Σχήμα 1.13**. Η εκπομπή της πορφυρίνης λαμβάνει χώρα από την ππ-π\* κατάσταση του μακροκυκλικού δακτυλίου. Ειδικότερα, στο φάσμα φθορισμού της ελεύθερης πορφυρίνης παρατηρούνται δύο ταινίες στα 660 nm και στα 720 nm. Από την άλλη πλευρά, οι ταινίες φθορισμού που αντιστοιχούν στο μεταλλωμένο με ψευδάργυρο (Zn) πορφυρινικό παράγωγο βρίσκονται στα 600 nm και 650 nm. Γενικά, τα μέταλλα συμβάλλουν σε μικρές ηλεκτρονιακές διαταραχές με μικρές φασματικές μεταβολές που οδηγούν σε διαφορετικές φθορίζουσες κβαντικές αποδόσεις. Ως φθορίζουσα κβαντική απόδοση  $\Phi$  (fluorescence quantum yield) ορίζεται ο λόγος του αριθμού των φωτονίων που εκπέμπονται προς αυτών που απορροφώνται και αποτελεί μέτρο της απόδοσης του φθορισμού ενός μορίου.

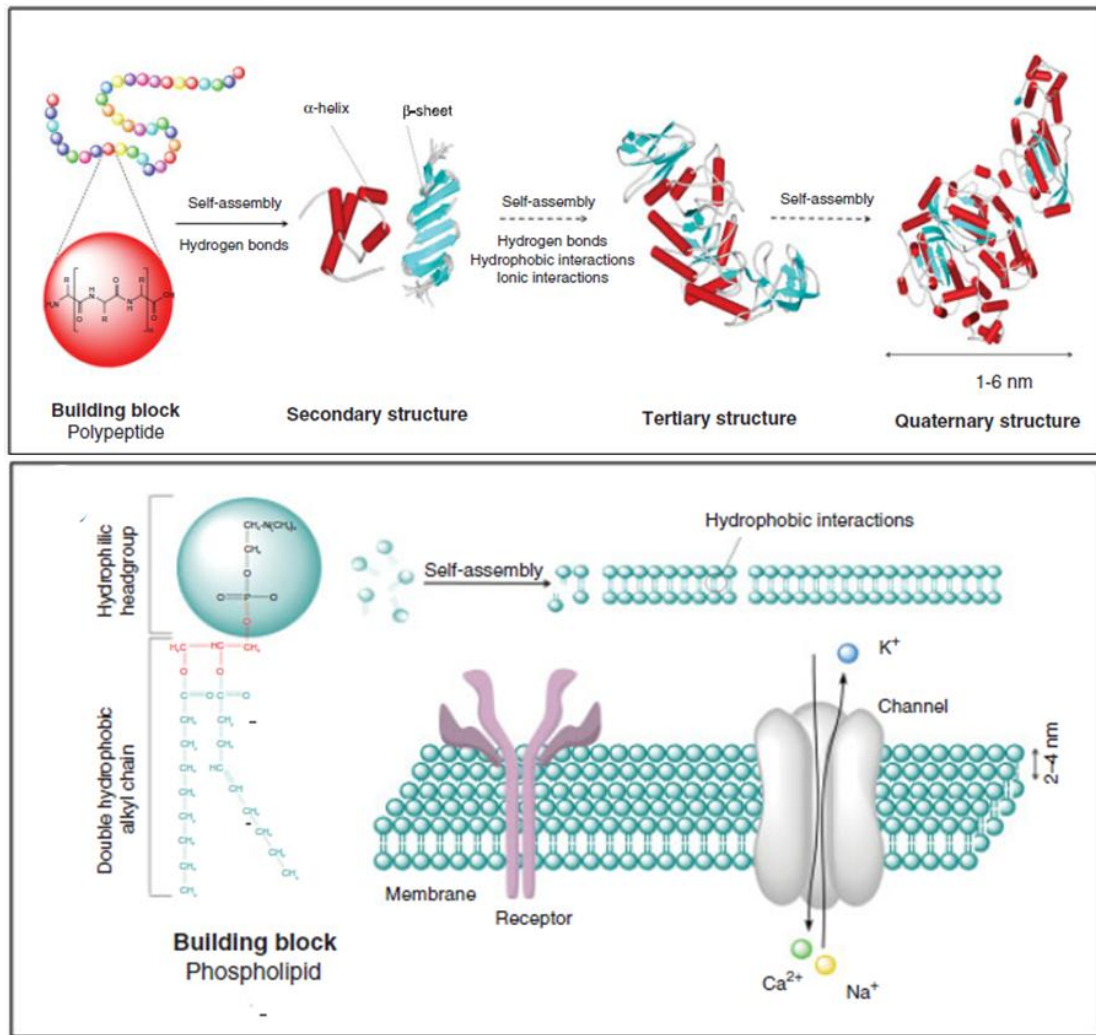


**Σχήμα 1.13** Τυπικά φάσματα φθορισμού μιας ελεύθερης (μαύρη γραμμή) και μιας μεταλλωμένης πορφυρίνης ψευδαργύρου (κόκκινη γραμμή).

### **1.5 Αυτο-οργάνωση (Self-Assembly)**

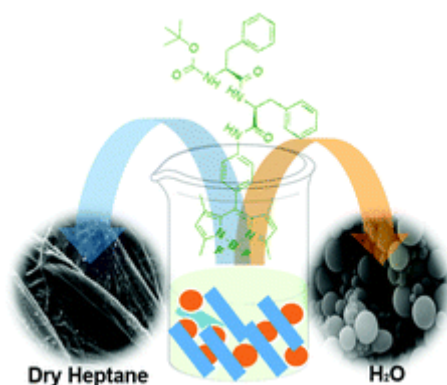
Η μοριακή αυτο-οργάνωση περιγράφει την αυθόρμητη οργάνωση μορίων σε μεγαλύτερες και δομημένες διατάξεις.<sup>38</sup> Είναι μια ευρέως διαδεδομένη διαδικασία στη φύση όπου παίζει σημαντικό ρόλο για τη ζωή και περιλαμβάνει το σχηματισμό εξαιρετικά πολύπλοκων και λειτουργικών βιολογικών δομών νανοκλίμακας (**Εικόνα 1.3**).





**Εικόνα 1.3** Παραδείγματα βιολογικών αυτο-οργανωμένων δομών. Πάνω: Αναδίπλωση πρωτεΐνης. Κάτω: Κυτταρική μεμβράνη.<sup>39</sup>

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η επιστημονική κοινότητα εμπνευσμένη από τις αρχές αυτο-οργάνωσης της φύσης ερευνά το σχηματισμό τεχνητών υλικών από μικρότερα δομικά στοιχεία με ιεραρχικές δομές και προσαρμοσμένες ιδιότητες. Για αυτό το σκοπό, τόσο βιολογικά όσο και συνθετικά δομικά στοιχεία έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς έρευνας στον τομέα της αυτο-οργάνωσης. Εκτός από την επιλογή των κατάλληλων δομικών στοιχείων, διάφορες άλλες παράμετροι όπως ο διαλύτης, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό σαφώς καθορισμένων αυτο-οργανωμένων δομών (**Εικόνα 1.4**).<sup>40,41</sup> Ωστόσο, η πρόβλεψη και ο έλεγχος του σχήματος ή του μεγέθους των αυτο-οργανωμένων νανοδομών παραμένει ένα δύσκολο έργο.<sup>42</sup>



**Εικόνα 1.4** Παράδειγμα επίδρασης του συστήματος διαλυτών στην διαδικασία της αυτο-οργάνωσης, οδηγώντας στο σχηματισμό νανοδομών είτε σχήματος ινιδίων είτε σφαιρών.

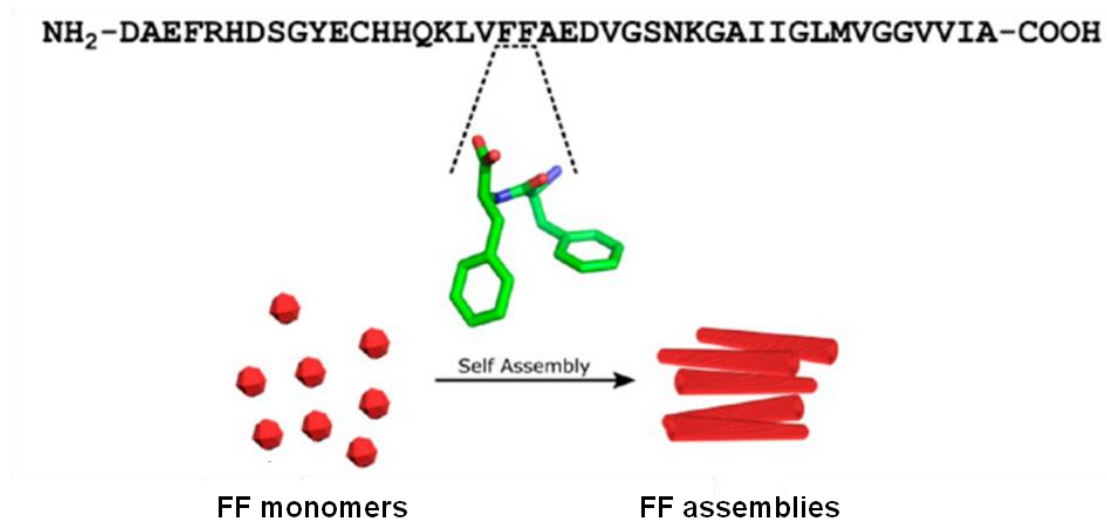
Οι αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με τη μοριακή αυτο-οργάνωση περιλαμβάνουν μη ομοιοπολικές δυνάμεις (ηλεκτροστατικές, υδρόφοβες, δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, π-π stacking, κ.λ.π.). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεμονωμένα είναι σχετικά αδύναμες ( $2\text{-}250 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) σε σύγκριση με τους ομοιοπολικούς δεσμούς ( $100\text{-}400 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), αλλά όταν συνδυαστούν μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό εξαιρετικά σταθερών δομών.

### **1.6 Αυτο-οργάνωση και πεπτίδια**

Ο σημαντικός ρόλος των πεπτιδίων ως δομικά στοιχεία σε διαδικασίες αυτο-οργάνωσης έχει αναγνωριστεί τα τελευταία χρόνια όπως αποδεικνύεται από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία για το θέμα αυτό. Η απλή δομή των πεπτιδίων καθώς και ο εύκολος τρόπος σύνθεσής τους, τα καθιστούν μια εξαιρετική “οικογένεια” δομικών μονάδων για την κατασκευή περίπλοκων νανοβιοϋλικών.<sup>39</sup> Επιπλέον, τα πεπτίδια προσφέρουν μια μεγάλη ποικιλία βιοχημικών (εξειδίκευση, εγγενής βιο-δραστικότητα) και φυσικών ιδιοτήτων (μικρό μέγεθος, διαμόρφωση) στη δημιουργία αυτο-οργανωμένων δομών με διαφορετικές μοριακές διαμορφώσεις.

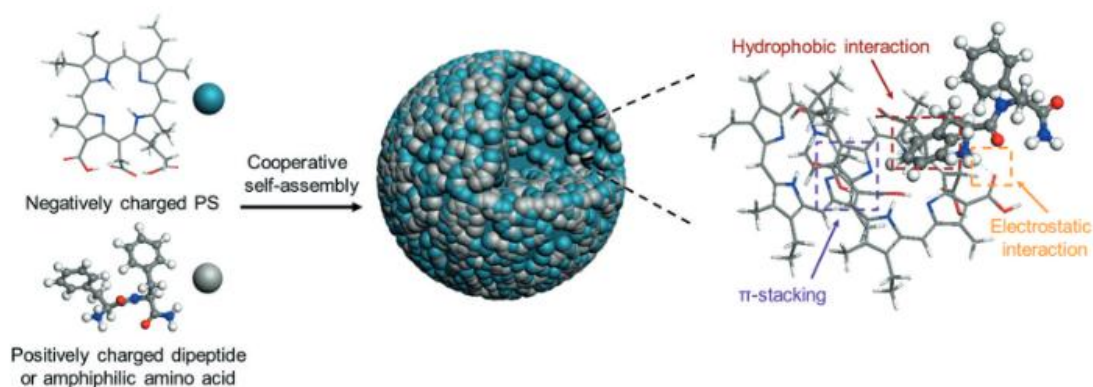
Ένα πολύ κοινό αλλά ιδιαίτερα ενδιαφέρον πεπτίδιο είναι το διπεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης (FF) το οποίο αποτελεί το μικρότερο μοτίβο αναγνώρισης του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου του Alzheimer. Συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί ότι η νόσος του Alzheimer όπως και άλλες αμυλοειδείς ασθένειες (Parkinson, Huntington, Creutzfeldt-Jakob) συνδέονται με τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πεπτιδίων ή πρωτεϊνών που οδηγούν στη συσσωμάτωσή τους. Συστηματική διερεύνηση του β-αμυλοειδούς πολυπεπτιδίου (Aβ) οδήγησε στην αναγνώριση του διπεπτιδίου της

διφαινουλαανίνης (FF) το οποίο αποδείχθηκε ότι σχηματίζει νανοσωλήνες παρόμοιους με τα χαρακτηριστικά ινίδια αμυλοειδούς του Alzheimer (**Σχήμα 1.14**).<sup>43</sup> Πιστεύεται λοιπόν, ότι τα δύο κατάλοιπα φαινουλαανίνης στις θέσεις 19 και 20 του πολυπεπτιδίου Αβ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια του σχηματισμού β-πτυχωτών πλακών. Επιπλέον μελέτες, έδειξαν την ειδική δέσμευση ανασταλτικών παραγόντων στην FF περιοχή του πολυπεπτιδίου πλήρους μήκους παρουσιάζοντας το διπλό ρόλο της FF τόσο ως μοτίβο μοριακής αναγνώρισης όσο και ως αποδεδειγμένο στόχο φαρμάκου για την αποτελεσματική αναστολή της αμυλοειδογόνου διαδικασίας.<sup>44</sup>



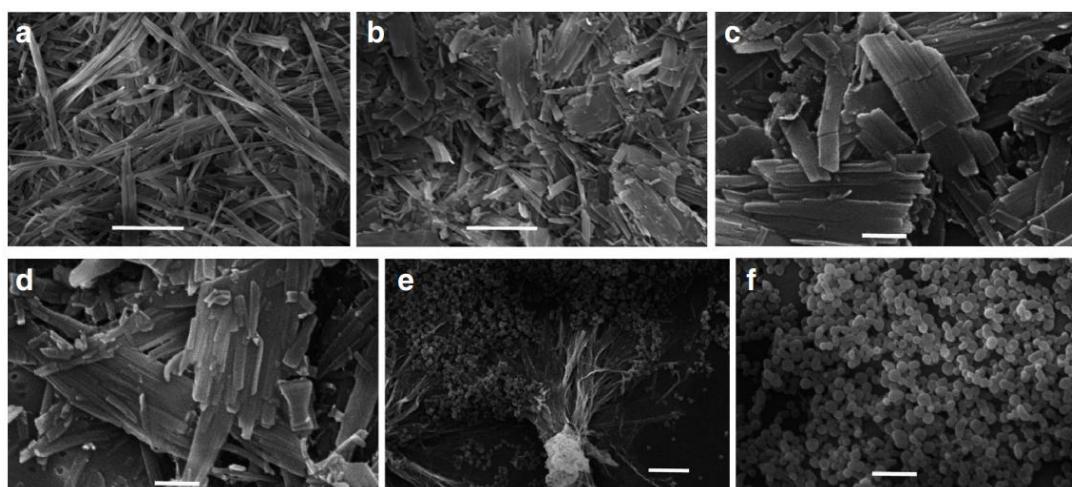
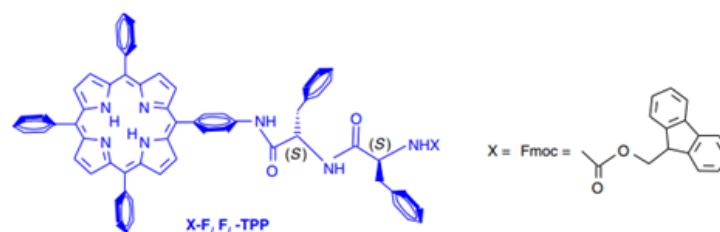
**Σχήμα 1.14** Διάγραμμα που απεικονίζει την ομοιότητα του διπεπτιδίου της FF και του β-αμυλοειδούς πολυπεπτιδίου.

Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό που έχει παρατηρηθεί πειραματικά<sup>45-49</sup> στο πεπτιδίο της διφαινουλαανίνης είναι ότι το ίδιο δομικό στοιχείο μπορεί να αυτο-οργανωθεί είτε σε ινιδιακές είτε σε σφαιρικές δομές που εξαρτώνται από συνθήκες όπως ο διαλύτης και η θερμοκρασία.<sup>50,51</sup> Οι αρωματικοί δακτύλιοι της φαινουλαανίνης φαίνεται να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αυτο-οργάνωση, πιθανώς μέσω π-π\* stacking αλληλεπιδράσεων, όπως πρώτος πρόέβλεψε ο Gazit.<sup>52</sup> Επιπλέον, η FF έχει μελετηθεί σε συνδυασμό με ένα ευρύ φάσμα συμπλόκων, ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά συνδεδεμένων μεταξύ τους ενώ η τάση των συστημάτων αυτών να σχηματίζουν πολυλειτουργικές νανοδομές έχει ερευνηθεί εκτενώς (**Σχήμα 1.15**).<sup>53,54</sup>



**Σχήμα 1.15** Κατασκευή φωτοευαίσθητων νανοσωματιδίων μέσω της αυτο-οργάνωσης αρνητικά φορτισμένων μορίων φωτοευαίσθητοποιητή και θετικά φορτισμένων διπεπτιδίων ή αμφίφυλων αμινοξέων.

Πιο ειδικά, η ομοιοπολική σύνδεση του διπεπτιδίου της FF σε πορφυρίνες (**Σχήμα 1.16**),<sup>55,56</sup> κορρόλες,<sup>57</sup> βόρον-διπυρομεθάνια,<sup>41</sup> PEG (PolyEthylene Glycol) πολυμερή<sup>58</sup> και DNA<sup>59</sup> έχει αποδειχθεί μια επιτυχημένη μεθοδολογία για το σχηματισμό καλά οργανωμένων συσσωματωμάτων (aggregates) με ιδιότητες συγκομιδής φωτός.

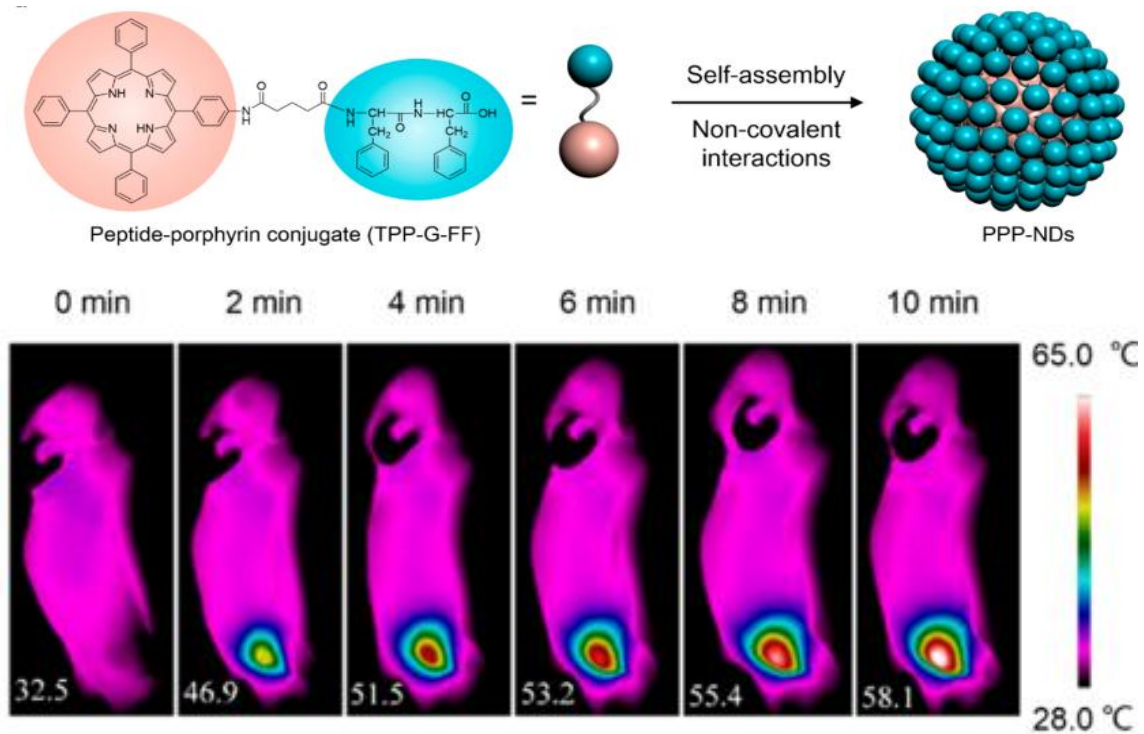


**Σχήμα 1.16** Μεταβολές στη μορφολογία των αυτο-οργανωμένων νανοδομών του Fmoc-F<sub>L</sub>F<sub>L</sub>-TPP με τη σύσταση του διαλύτη. Οι τελικές αναλογίες (v/v) του CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> προς n-Heptane ήταν:



(a) 3: 7, (b) 2: 8, (c) και (d) ίδιο δείγμα όπως στο b που απεικονίζεται σε υψηλότερη μεγέθυνση με πλευρικά συνδεδεμένα ινίδια, (e, f) 5: 5.

Μια νέα υπερμοριακή στρατηγική εμπνευσμένη από τη τη βιολογική οργάνωση πολυπεπτιδίων και πορφυρινών σε ζωντανά συστήματα, έχει αναπτυχθεί για την κατασκευή φωτοθερμικών νανοτελειών μέσω της αυτο-οργάνωσης φωτοενεργών πορφυρινών με κατάλληλα τροποποιημένα πεπτίδια.<sup>60</sup> Η φύση των αυτο-οργανωμένων πορφυρινών επάγει το σχηματισμό J συσσωματωμάτων (aggregates) και έτσι καθιστά δυνατή την κατασκευή νανοτελειών με πλήρως ανεσταλμένη εκπομπή φθορισμού και παραγωγή διεγερμένου μοριακού οξυγόνου απλής κατάστασης (singlet oxygen,  $^1O_2$ ), οδηγώντας σε υψηλή απόδοση μετατροπής του φωτός σε θερμότητα των νανοτελειών. Η θερμογραφική απεικόνιση αποκαλύπτει ότι η μετατροπή του φωτός σε θερμότητα που βασίζεται στις νανοτελείες είναι αποτελεσματική *in vitro* και *in vivo*, επιτρέποντας την εφαρμογή των νανοτελειών στη φωτοθερμική ακουστική απεικόνιση και στην αντικαρκινική θεραπεία (**Σχήμα 1.17**).

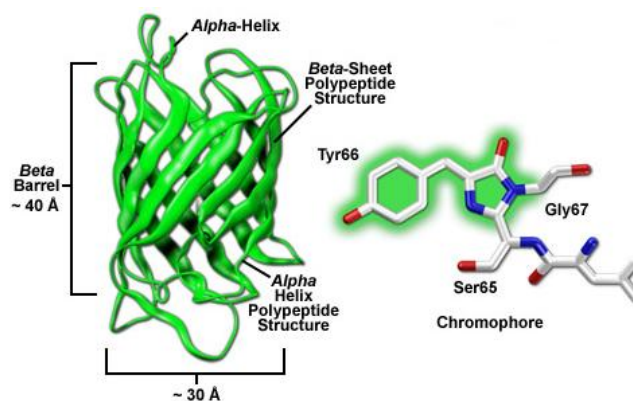


**Σχήμα 1.17** Αυτο-οργάνωση της δυάδας πεπτιδίου-πορφυρίνης (TPP-G-FF) σε φωτοθερμικές νανοτελείες (PPP-NDs). Πάνω: Μοριακή δομή της TPP-G-FF και σχηματική απεικόνιση της αυτο-οργάνωσης. Κάτω: IR θερμικές εικόνες ενδοφλέβια εγχυμένων PPP-NDs σε ποντίκια υπό συνεχή ακτινοβολία.<sup>60</sup>

## 1.7 Φθορίζουσα σήμανση (Fluorescent labeling-tagging)

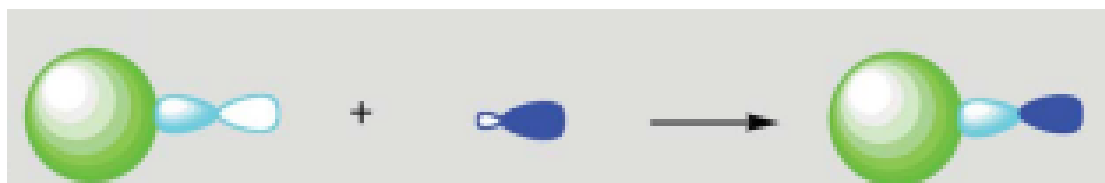
Για την ιχνηθέτηση βιομορίων (πρωτεϊνών, αντισωμάτων, αμινοξέων, πεπτιδίων) με σκοπό τη μελέτη της μοριακής τους δομής, της λειτουργίας και των αλληλεπιδράσεών τους, είναι αναγκαία η επισήμανσή τους. Πιο συγκεκριμένα, έχει ανακαλυφθεί ένα ευρύ φάσμα μεθόδων επισήμανσης που περιλαμβάνει ισοτοπικούς δείκτες,<sup>61</sup> ραδιενεργούς ιχνηθέτες,<sup>62</sup> χρωματομετρικούς βιοαισθητήρες (colorimetric biosensors),<sup>63</sup> φωτομεταβαλλόμενα βιοϋλικά (photoswitchable biomaterials),<sup>64,65</sup> φωτοχρωμικές ενώσεις (photochromic compounds),<sup>66</sup> ηλεκτροχημικούς αισθητήρες (electrochemical sensors)<sup>67</sup> καθώς και φθορίζοντες ανιχνευτές (fluorescent probes).<sup>68,69</sup>

Τα τελευταία χρόνια, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην απεικόνιση ζωντανών κυττάρων λόγω της ραγδαίας ανάπτυξης της εκλεκτικής σήμανσης πρωτεϊνών *in vivo*. Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) (**Σχήμα 1.18**) αποτελεί το πρώτο παράδειγμα φθορίζουσας αναφοράς (fluorescent reporter) που έχει εισαχθεί γενετικά σε πρωτεΐνη ενδιαφέροντος (Protein Of Interest). Παρόλο που η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη καθώς και διάφοροι τύποι τροποποιημένων φθορίζουσών πρωτεϊνών (FPs) έχουν χρησιμοποιηθεί ενεργά για την απεικόνιση ζωντανών κυττάρων για πολλά χρόνια, το μέγεθος αλλά και το περιορισμένο φασματικό παράθυρο φθορισμού της GFP και των παραλλαγών της έχουν περιορίσει σημαντικά το εύρος των πιθανών εφαρμογών. Προκειμένου να βελτιωθούν οι μέθοδοι επισήμανσης που βασίζονται στις φθορίζουσες πρωτεΐνες, έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές προσεγγίσεις που επιτρέπουν την ενσωμάτωση συνθετικών φθορίζοντων ανιχνευτών σε POI-στόχους.



**Σχήμα 1.18** Δομή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP).

Οι συνθετικοί φθορίζοντες ανιχνευτές έχουν μικρότερο μέγεθος από τις φθορίζουσες πρωτεΐνες. Συχνά, εμφανίζουν βελτιωμένες φωτοχημικές ιδιότητες και απορροφούν ή φθορίζουν σε ποικίλα μήκη κύματος. Οι συνθετικοί αυτοί ανιχνευτές δύνανται να συνδεθούν στις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος (POI) εκλεκτικά είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά μέσω πολυάριθμων προσεγγίσεων (Σχήμα 1.19).<sup>70</sup> Οι προσεγγίσεις αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε μεθόδους επισήμανσης βάσει βιολογικής αναγνώρισης (biological recognition-based labeling) και βάσει χημικής αναγνώρισης (chemical recognition-based labeling). Η επισήμανση μέσω χημικής αναγνώρισης περιλαμβάνει κυρίως metal-chelating peptide tags, δηλαδή πεπτιδία μικρής αλλά συγκεκριμένης αλληλουχίας αμινοξέων τα οποία λειτουργούν ως ετικέτα και είναι σε θέση να συμπλοκοποιούν χηλικά το μέταλλο του φθοροφόρου μόριου.<sup>71</sup>



**Σχήμα 1.19** Σχηματική απεικόνιση της φθορίζουσας σήμανσης (χημική αναγνώριση). Το βιομόριο-στόχος (πράσινο) συνδέεται με ένα tag (γαλάζιο) και με το φθοροφόρο (μπλε).

### **1.8 Μεταλλοχηλική σύζευξη φθοροφόρων με αμινοξέα πεπτιδίου (peptide tags) για site-specific labeling**

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα μεθόδων φθορίζουσας σήμανσης. Μια από τις πιο αποτελεσματικές αυτές προσεγγίσεις, βασίζεται στην αλληλεπίδραση πεπτιδικών tags δέσμησης μετάλλου (metal-binding peptide tags) με μεταλλικά συμπλόκα που φέρουν φθοροφόρα μόρια ως υποκαταστάτες (ligands).<sup>71</sup>

Η σήμανση πρωτεϊνών μέσω μεταλλοχηλικής σύζευξης φθοροφόρων με αμινοξέα πεπτιδικού tag, αναπτύχθηκε πρόσφατα και θεωρείται ως μια από τις πιο χρήσιμες τεχνικές φθορίζουσας σήμανσης.<sup>72</sup> Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την εκλεκτική και μη ομοιοπολική σύνδεση του φθοροφόρου μορίου με συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων του πεπτιδικού tag μέσω της χηλικής συμπλοκοποίησης του μετάλλου του φθοροφόρου. Η σήμανση πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τη σύνδεση μετάλλων μετάπτωσης με συγκεκριμένα κατάλοιπα ενός συγκεκριμένου tag παρουσιάζει ένα μεγάλο αριθμό αξιοσημείωτων χαρακτηριστικών, όπως: α) απλότητα της διαδικασίας επισήμανσης, β) υψηλή επιλεκτικότητα, γ) εφαρμογή στην

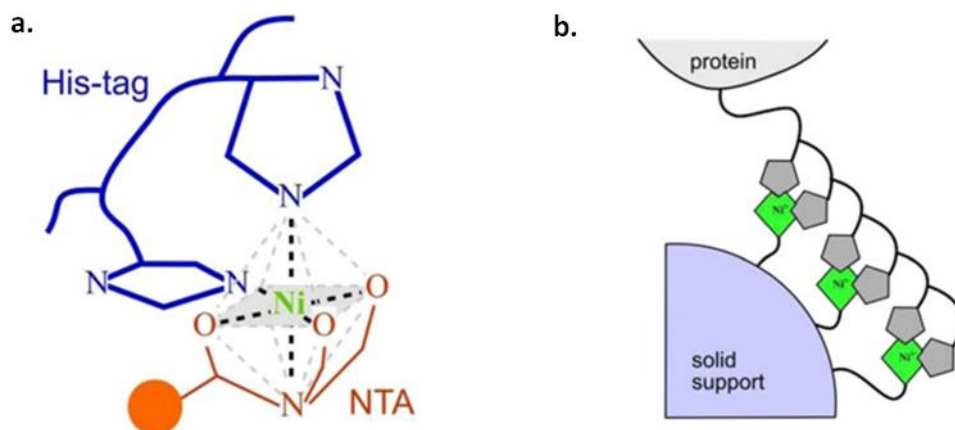
τοπο-ειδική επισήμανση (site-specific labeling) (N-τελικό άκρο, C-τελικό άκρο, εσωτερικές θέσεις) και δ) αποδοτικότητα επισήμανσης. Όλα αυτά τα πλεονεκτήματα καθιστούν τη συγκεκριμένη τεχνική μια ισχυρή και ελκυστική τεχνική για τη φθορίζουσα σήμανση πρωτεϊνών και γενικότερα βιομοριών.<sup>70</sup>

### 1.8.1 Tag ιστιδίνης (His-tag)

Τα tags ιστιδίνης ή κοινώς αποκαλούμενα "His-tags",<sup>73</sup> είναι πεπτίδια που περιλαμβάνουν συνήθως μια αλληλουχία 6-12 διαδοχικών καταλοίπων ιστιδίνης (πολλές φορές και λιγότερων από 6) και αποτελούν τις πιο δημοφιλείς ετικέτες για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και τον καθαρισμό αυτών με χρωματογραφία συγγένειας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η επιλεκτική μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση μεταξύ του His-tag και των μεταλλικών συμπλόκων που συνδέονται με φθοροφόρα μόρια έχει επίσης εφαρμοστεί αποτελεσματικά στην τοπο-ειδική (site-specific) φθορίζουσα σήμανση πρωτεϊνών.<sup>74</sup> Η στρατηγική αυτή έχει σημαντικά και μοναδικά πλεονεκτήματα συμπεριλαμβανομένων της εξειδίκευσης και της δυνατότητας έκφρασης της συγκεκριμένης αλληλουχίας ιστιδινών είτε στο N-τελικό είτε στο C-τελικό άκρο της προς σήμανση πρωτεΐνης.<sup>70</sup>

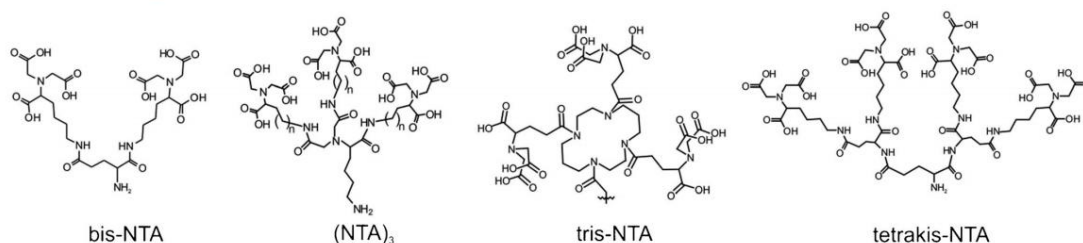
Η επισήμανση μέσω His-tags, εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι η ιστιδίνη (His) είναι σε θέση να συναρμόζει ιόντα μετάλλων μετάπτωσης όπως τα Zn (II), Cu (II), Ni (II) ή Co (II), με υψηλή συγγένεια μέσω του ιμιδαζολίου. Χηλικές ενώσεις, όπως το ιμινοδιοξικό οξύ (IDA)<sup>75</sup> ή το νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA)<sup>76</sup> συμπλοκοποιούν αυτά τα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης, αφήνοντας μη κατειλημμένες 2 ή 3 θέσεις συναρμογής στα μεταλλικά ιόντα (**Εικόνα 1.5 a**). Πολλές φορές η χηλική συναρμογή ενός μεταλλικού ιόντος Ni (II) με δύο διαδοχικά κατάλοιπα ιστιδίνης έχει ως αποτέλεσμα τη σχετικά χαμηλή συγγένεια δέσμησης (σταθερά διάστασης ισορροπίας  $K_D \sim 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ),<sup>77-79</sup> που αντιστοιχεί σε σταθερότητα λίγων δευτερολέπτων.<sup>80</sup> Ωστόσο, σε υψηλές πυκνότητες NTA, όπως στην περίπτωση των ρητινών συγγένειας που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό επισημασμένων με ιστιδίνη πρωτεϊνών, είναι δυνατή η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση του His-tag με πολλαπλά ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (**Εικόνα 1.5 b**). Συνεπώς, λόγω της πολυσθενούς αυτής αλληλεπίδρασης, παρατηρείται συχνά η σταθερή και σχεδόν μη αντιστρεπτή δέσμηση των πρωτεϊνών που περιέχουν τη συγκεκριμένη αλληλουχία ιστιδίνης στις ρητίνες συγγένειας.





**Εικόνα 1.5** a. Μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση του His-tag με ιόντα μετάλλων μετάπτωσης. Το Ni (II) που συμπλοκοποιείται με NTA συναρμόζεται από δύο γειονικά κατάλοιπα ιστιδίνης μιας His-tagged πρωτεΐνης. b. Πολυσθενής δέσμευση των His-tagged πρωτεϊνών σε πυκνά διαμορφωμένες με NTA επιφάνειες.

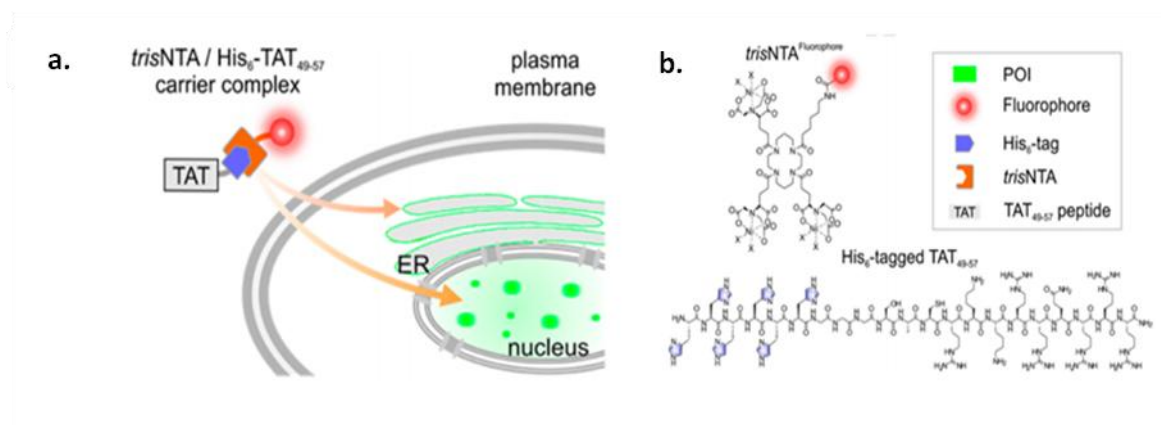
Παρόλο που η πολυσθενής αναγνώριση είναι κατάλληλη μέθοδος για τον καθαρισμό πρωτεϊνών, συχνά δεν εμφανίζει συμβατότητα με πιο απαιτητικές βιοαναλυτικές εφαρμογές (π.χ. επισήμανση με φασματοσκοπικούς ανιχνευτές). Έτσι, η ανάγκη δομικά καθορισμένων μοριακών οντοτήτων για την υψηλής-συγγένειας αναγνώριση πρωτεϊνών με επισήμανση ιστιδίνης, οδήγησε στην ανάπτυξη χηλικών υποκαταστατών πολλαπλού σθένους με δύο ή περισσότερα τμήματα NTA. Πρωτοπόρος αυτής της προσέγγισης ήταν ο Ebright και οι συνεργάτες του,<sup>78</sup> οι οποίοι συνέθεσαν παράγωγα κυανίνης (χρωστική) Cy3 και Cy5, συζευγμένα με δύο μόρια NTA και ουσιαστικά κατέδειξαν την αυξημένη αποτελεσματικότητα της επισήμανσης πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν His-tags. Περιπτώσεις που περιλαμβάνουν φθοροφόρα μόρια συζευγμένα με 2, 3 ή και 4 τμήματα NTA παρουσιάζουν ακόμη πιο αποτελεσματική σήμανση και οδηγούν στο σχηματισμό δενδριμερικών καθώς και κυκλικών δομών (**Εικόνα 1.6**).



**Εικόνα 1.6** Τυπικά παραδείγματα χηλικών υποκαταστατών πολλαπλού σθένους που περιέχουν 2, 3, ή 4 μόρια NTA.

Η χρήση του παραμαγνητικού Ni (II) ως μέσου σύνδεσης του συστήματος φθοροφόρου-NTA και του His-tag, επιφέρει μείωση στον εγγενή φθορισμό του φθοροφόρου μορίου γεγονός το οποίο πιθανώς να οφείλεται είτε στη φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίου (photoinduced electron transfer) είτε στη μεταφορά ενέργειας (energy transfer) από το φθοροφόρο μόριο στο βιομόριο-φορέα του His-tag. Ωστόσο, ακολούθησαν μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά φθοροφόρα καθώς και φθοροφόρα συζευγμένα με 2 ή 3 ομάδες NTA στα οποία ο φθορισμός δεν παρουσίασε σημαντική απόσβεση.<sup>81</sup> Συνεπώς, η απόσβεση του φθορισμού που παρατηρείται μετά τη συμπλοκοποίηση του φθοροφόρου-NTA με το His-tag μέσω του νικελίου Ni (II) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την παραμαγνητικότητα του μετάλλου αλλά και από το φθοροφόρο μόριο και τον αριθμό των ομάδων NTA.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το πλέον χρησιμοποιούμενο μοτίβο μεταλλοχηλικής σύζευξης για τη σήμανση πρωτεϊνών είναι του συστήματος φθοροφόρου-NTA-Ni (II) με τις δύο ιστιδίνες του His-tag. Το tag ιστιδίνης δεν έχει χρησιμοποιηθεί μόνο στην *in vitro* σήμανση αλλά έχει εφαρμοστεί επιτυχώς και στην *in vivo* σήμανση μεμβρανικών πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα (π.χ. στη σήμανση υποδοχέων σεροτονίνης). Επίσης, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις ενδοκυτταρικής σήμανσης όπου το φθοροφόρο μόριο διαπερνά το ίδιο την κυτταρική μεμβράνη ή συνδέεται με αλληλουχία αμινοξέων πεπτιδίου που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη (cell-penetrating peptide) (**Εικόνα 1.7**).<sup>82</sup>

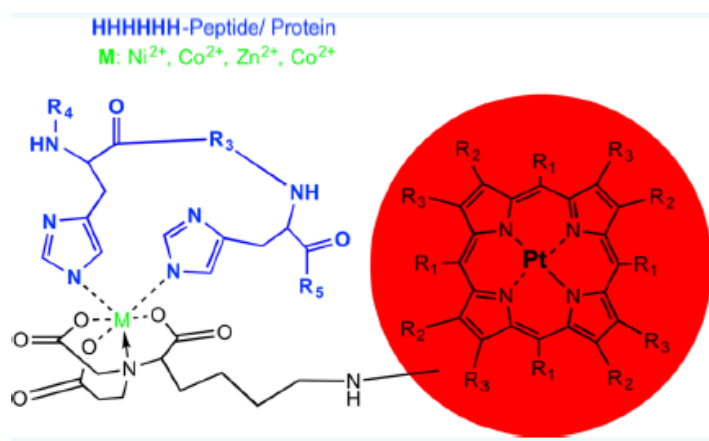


**Εικόνα 1.7** a. Σήμανση επισημασμένων με ιστιδίνη πρωτεϊνών ζωντανού κυττάρου χρησιμοποιώντας ένα μη ομοιοπολικό φορέα τριών ομάδων NTA που διαπερνά τα κύτταρα σχηματισμένο από b. φθορίζον trisNTA και His<sub>6</sub>-Tagged TAT<sub>49-57</sub>.

### 1.8.2 Μεταλλοχηλική σύζευξη πορφυρινών με αμινοξέα πεπτιδίου

Η βιοαπεικόνιση συνήθως απαιτεί την ειδική επισήμανση συγκεκριμένων βιομορίων μέσω της χρήσης φθορίζοντων ανιχνευτών ή άλλων παραγόντων αντίθεσης.<sup>83,84</sup> Πιο ειδικά, για τη μεταλλοχηλική σύζευξη φθοροφόρων με αμινοξέα πεπτιδίου, ως φθοροφόρα κυρίως συμμετέχουν οργανικά μόρια μικρού μεγέθους. Σπάνιες είναι οι αναφορές που σχετίζονται με τη χρήση πορφυρινικών παραγώγων για το συγκεκριμένο σκοπό.

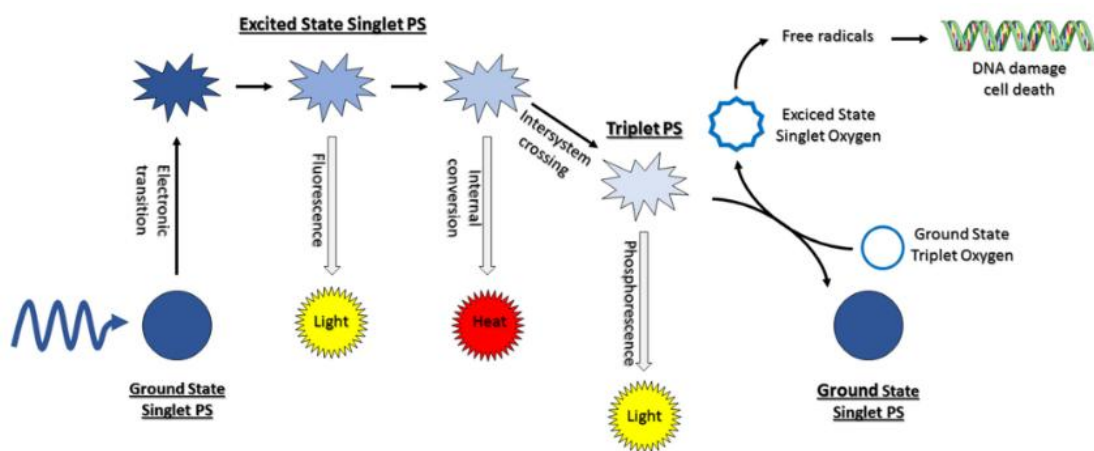
Ο Dmitriev και οι συνεργάτες του το 2016 δημοσίευσαν μια μελέτη, στην οποία χρησιμοποίησαν μια σειρά μεταλλωμένων πορφυρινικών παραγώγων ως φωσφορίζοντες ανιχνευτές. Πιο συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται στο **Σχήμα 1.20**, συνέδεσαν ομοιοπολικά κατάλληλα τροποποιημένες πορφυρίνες της πλατίνας με NTA. Το NTA λόγω της συμπλοκοποίησής του με διάφορα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης ( $Zn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ή  $Cu^{+2}$ ), είχε την ικανότητα να συναρμόζει ορισμένα κατάλοιπα αμινοξέων πεπτιδίου (κυρίως ιστιδίνης,  $K_D \sim 10 \mu M$ ). Σκοπός της μελέτης αυτής, μεταξύ άλλων, ήταν η φθορίζουσα σήμανση (fluorescent labeling) πρωτεϊνών ή/και πεπτιδίων που φέρουν την αλληλουχία ιστιδίνης (His-tag), με στόχο τη δημιουργία διάφορων φωσφορίζοντων ανιχνευτών.<sup>85</sup> Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση μεταλλωμένων πορφυρινικών παραγώγων ως φωσφορίζοντες ανιχνευτές δεν έχει ερευνηθεί εκτενώς στον κλάδο της μοριακής αναγνώρισης.



**Σχήμα 1.20** Γενική δομή της συναρμολογημένης με μεταλλικό ιόν Pt-πορφυρίνης-NTA μέσω του οποίου σχηματίζει μεταλλοχηλικό δεσμό με πεπτιδία που περιέχουν ιστιδίνη. R<sub>1-5</sub> αντιπροσωπεύουν διάφορες ομάδες.

## 1.9 Εισαγωγή στη φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic Therapy)

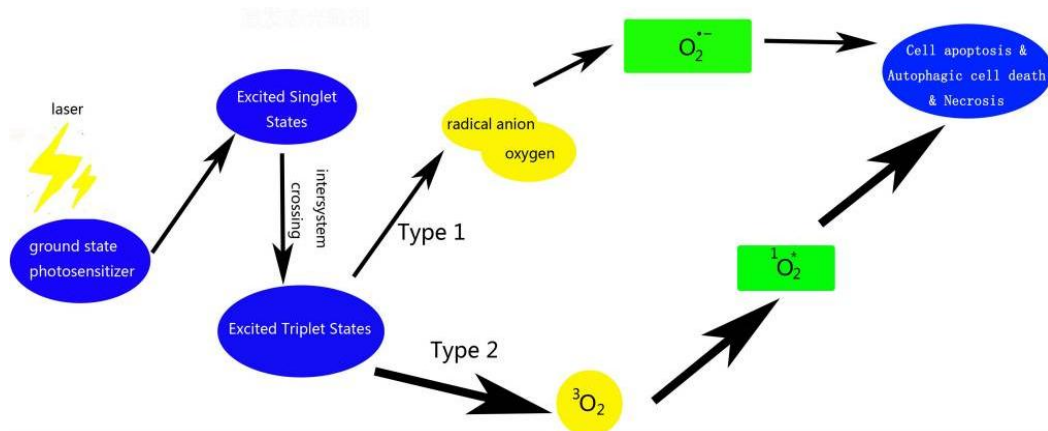
Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) αποτελεί μια μορφή φωτοθεραπείας που περιλαμβάνει φως και έναν φωτοευαισθητοποιητή (PS) που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μοριακό οξυγόνο στοχεύοντας επιλεκτικά κύτταρα (π.χ. καρκινικά κύτταρα) για να προκαλέσει την απόπτωσή τους.<sup>86</sup> Τόσο τα καρκινικά κύτταρα όσο και τα μακροφάγα, έχει μελετηθεί ότι εμφανίζουν μεγάλη προτίμηση στην πρόσληψη φωτοευαισθητοποιητών. Οι συγκεκριμένοι φωτοευαισθητοποιητές ενεργοποιούνται κατά την έκθεσή τους στο φως και μεταπίπτουν στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση κατά την οποία αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο για την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS).<sup>87</sup> Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας άλλος λόγος που οδηγεί στην αντίδραση μεταξύ του φωτοευαισθητοποιητή και του μοριακού οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένης της αντίδρασης Fenton του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η οποία με τη σειρά της παράγει περισσότερες ρίζες υδροξυλίου.<sup>88</sup> Αυτά τα κυτταροτοξικά μόρια επάγουν μια σειρά από βιολογικές αντιδράσεις που τελικά οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο (**Σχήμα 1.21**).<sup>89</sup> Τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας εξαρτώνται από τη φύση των κυττάρων, τις ιδιότητες και τον εντοπισμό του φωτοευαισθητοποιητή καθώς και από τις συνθήκες φωτισμού.<sup>90</sup> Το μεγάλο πλεονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι ότι προκαλεί αμελητέα βλάβη στους περιβάλλοντες φυσιολογικούς ιστούς και έχει ελάχιστα συστημικά αποτελέσματα. Επιπλέον, δεν υπάρχει προφανής μηχανισμός απόκτησης αντίστασης ενάντια στην PDT, γεγονός που την καθιστά ελπιδοφόρο μέσο για τη θεραπεία του καρκίνου καθώς και άλλων μη νεοπλασματικών ασθενειών.<sup>91</sup>



**Σχήμα 1.21** Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης του φωτοευαισθητοποιητή και της παραγωγής ROS που εμπλέκονται στην PDT.

## 1.10 Μηχανισμοί Φωτοδυναμικής Θεραπείας (PDT)

Ο μοριακός μηχανισμός της φωτοδυναμικής θεραπείας βασίζεται στα τρία μη τοξικά συστατικά που παράγουν τα επιθυμητά αποτελέσματα στους παθολογικούς ιστούς μέσω της αμοιβαίας τους αλληλεπίδρασης: του φωτοευαισθητοποιητή (PS), του φωτός με το κατάλληλο μήκος κύματος και του οξυγόνου που βρίσκεται διαλυμένο στα κύτταρα.<sup>92</sup> Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί της φωτοδυναμικής αντίδρασης. Και οι δύο μηχανισμοί εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα μόρια οξυγόνου εντός των κυττάρων. Το πρώτο στάδιο και των δύο μηχανισμών είναι παρόμοιο. Ένας φωτοευαισθητοποιητής μετά την είσοδό του στο κύτταρο, διεγείρεται με φως κατάλληλου μήκους κύματος και μεταβαίνει από την απλή βασική ενεργειακή κατάσταση  $S_0$  στην πρώτη διεγερμένη απλή κατάσταση  $S_1$ . Μέρος της ενέργειας εκπέμπεται με τη μορφή φθορισμού ενώ η ενέργεια που απομένει μέσω ενδοσυστηματικής διασταύρωσης (Intersystem Crossing) οδηγεί στη μετάβαση ενός μορίου φωτοευαισθητοποιητή από την  $S_1$  στην πρώτη διεγερμένη τριπλή κατάσταση  $T_1$  ( $^3PS^*$ ): την κατάλληλη θεραπευτική μορφή της ένωσης (Σχήμα 1.22).<sup>93,94</sup>



Σχήμα 1.22 Μηχανισμοί της φωτοδυναμικής αντίδρασης.

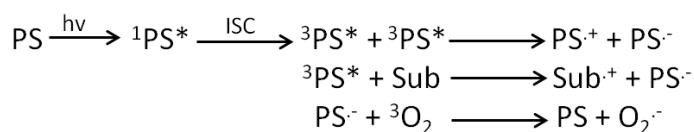
### 1.10.1 Τύπου I μηχανισμός φωτοδυναμικής αντίδρασης

Στην διεγερμένη τριπλή κατάσταση  $T_1$ , ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να μεταφέρει ενέργεια στα βιομόρια από το περιβάλλον του. Μεταξύ του φωτοευαισθητοποιητή στην κατάσταση  $T_1$  ( $^3PS^*$ ) και του καρκινικού ιστού (υπόστρωμα/substrate), μεταφέρεται ένα υδρογόνο ή ένα ηλεκτρόνιο, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών και ριζών ανιόντων τόσο του φωτοευαισθητοποιητή όσο και του

υποστρώματος. Τα ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με τα μόρια οξυγόνου, τα οποία παραμένουν στη βασική ενεργειακή τους κατάσταση ( $^3\text{O}_2$ ).

Αυτή η διαδικασία οδηγεί στην παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), αρχικά με τη μορφή ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), η οποία δημιουργεί την περαιτέρω παραγωγή ROS μέσα στα κύτταρα. Η έναρξη της σειράς αυτών των αντιδράσεων οδηγεί στο οξειδωτικό στρες που έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση των καρκινικών κυττάρων (**Σχήμα 1.23**).<sup>95</sup>

#### Type I

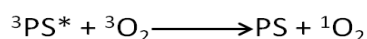


**Σχήμα 1.23** Τύπου I μηχανισμός της φωτοδυναμικής αντίδρασης.

#### 1.10.2 Τύπου II μηχανισμός φωτοδυναμικής αντίδρασης

Οι αντιδράσεις τύπου II βασίζονται σε ένα φαινόμενο που καλείται τριπλή-τριπλή “εξουδετέρωση” (triplet-triplet annihilation). Σύμφωνα με το φαινόμενο αυτό στο μηχανισμό Τύπου II, η  ${}^3\text{PS}^*$  κατάσταση μεταφέρει την ενέργειά της στο μοριακό οξυγόνο, το οποίο βρίσκεται στην βασική τριπλή ενεργειακή κατάσταση ( ${}^3\text{O}_2$ ). Η μεταφορά αυτή της ενέργειας, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του διεγερμένου μοριακού οξυγόνου απλής κατάστασης ( ${}^1\text{O}_2$ , singlet oxygen), το οποίο χαρακτηρίζεται από την εξαιρετικά μεγάλη οξειδωτική του ισχύ. Η άμεση μεταφορά ενέργειας από τον φωτοευαισθητοποιητή στο μοριακό οξυγόνο ( ${}^3\text{PS}^* \rightarrow {}^3\text{O}_2$ ) είναι δυνατή καθώς διαθέτουν τον ίδιο κβαντικό αριθμό spin  $s=1$  (**Σχήμα 1.24**).<sup>96</sup> Οι περισσότερες οργανικές ενώσεις είναι στη θεμελιώδη απλή κατάσταση. Ωστόσο, τα μόρια οξυγόνου χαρακτηρίζονται από την τριπλή τους κατάσταση (ως θεμελιώδη) και την διέγερση στην απλή. Λόγω αυτού του γεγονότος, τα διεγερμένα μόρια φωτοευαισθητοποιητή δεν καταστρέφουν τις οργανικές κυτταρικές δομές και αντιδρούν μόνο με μόρια οξυγόνου διαλυμένα στο κυτταρόπλασμα.<sup>97</sup>

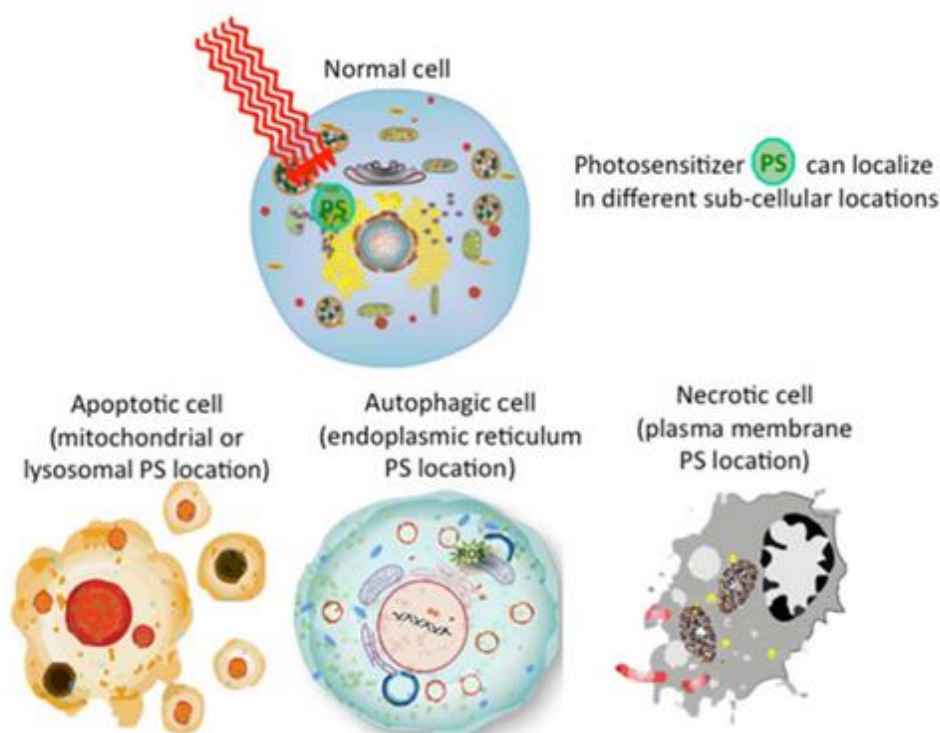
#### Type II



**Σχήμα 1.24** Τύπου II μηχανισμός της φωτοδυναμικής αντίδρασης.



Ο μηχανισμός τύπου II θεωρείται ότι είναι η πιο σημαντική διαδικασία που ρυθμίζει την αποτελεσματικότητα της PDT. Παρόλα αυτά, ο λόγος της συμβολής και των δύο μηχανισμών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η συγκέντρωση οξυγόνου, η διηλεκτρική σταθερά, το pH του ιστού καθώς και η δομή του φωτοευαισθητοποιητή. Καθώς το οξυγόνο εξαντλείται, αρχίζει να υπερισχύει ο πρώτος τύπος του μηχανισμού της αντίδρασης (Τύπος I).<sup>94</sup> Τα δραστικά είδη οξυγόνου προκαλούν τη βλάβη πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων μορίων στην φωτοευαισθητοποιημένη περιοχή. Αυτό οδηγεί στον άμεσο θάνατο των καρκινικών κυττάρων στη διαδικασία απόπτωσης ή/και νέκρωσης.<sup>98</sup> Η αμοιβαία συνεισφορά διαφόρων τύπων κυτταρικού θανάτου εξαρτάται από την ενδοκυτταρική θέση του φωτοευαισθητοποιητή. Πιο συγκεκριμένα, η βλάβη των μιτοχονδρίων μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση ενώ η βλάβη των λυσοσωμάτων ή του ενδοπλασματικού δικτύου μπορεί να προκαλέσει αυτοφαγία. Επιπλέον η καταστροφή κυτταρικής μεμβράνης και η απώλεια ακεραιότητας μπορεί να προκαλέσει νέκρωση (**Εικόνα 1.8**).<sup>99-101</sup>

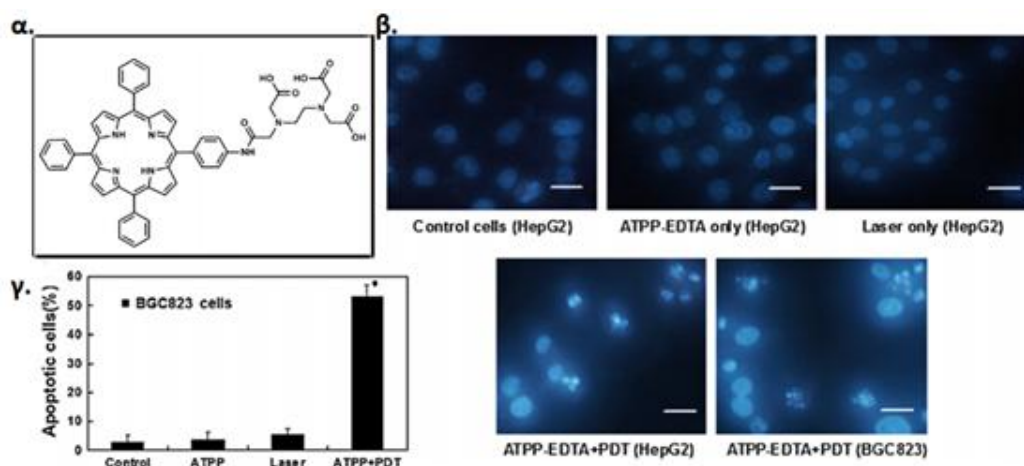


**Εικόνα 1.8** Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου: Ο κυτταρικός εντοπισμός του PS σε διάφορα οργανίδια (μιτοχόνδρια, λυσοσώματα, ενδοπλασματικό δίκτυο, πλασματική μεμβράνη κ.λπ.) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον τύπο του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου που κυριαρχεί.

### 1.11 Πορφυρίνες ως φωτοευαισθητοποιητές στην PDT

Τις τελευταίες δεκαετίες, μακροκυκλικά πορφυρινικά συστήματα χρησιμοποιούνται ως φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία, κυρίως σε κλινικό επίπεδο. Τα πορφυρινικά αυτά συστήματα είναι κατάλληλα τροποποιημένα και φέρουν ως λειτουργικές ομάδες κυρίως καρβοξυλικά οξέα (-COOH), σάκχαρα καθώς επίσης και ομάδες με άτομα αζώτου. Η συγκεκριμένη κατηγορία φωτοευαισθητοποιητών, έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την κβαντική απόδοση του διεγερμένου μοριακού οξυγόνου απλής κατάστασης ( $^1\text{O}_2$ , singlet oxygen), εμφανίζει έντονη φωτοτοξικότητα εναντίων πληθώρας καρκινικών κυτταρικών σειρών, αναστέλλει την ανάπτυξη όγκων και δεν είναι τοξική απουσία φωτός.<sup>102</sup>

Σε μια πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκε ως φωτοευαισθητοποιητής μια πορφυρίνη που έφερε αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και εμφάνισε έντονη *in vitro* φωτοτοξικότητα στις κυτταρικές σειρές HepG2 (ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του ήπατος) και BGC823 (ανθρώπινο ενδοκοιλιακό αδενοκαρκίνωμα). Επιπρόσθετα, μπόρεσε να αναστείλει περαιτέρω την ανάπτυξη BGC823 όγκων σε γυμνά ποντίκια. Μελέτες του μηχανισμού έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος φωτοευαισθητοποιητής (ATPP-EDTA) μπορεί να επάγει κυτταρικό θάνατο μέσω της μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού που προκαλείται κυρίως λόγω λυσοσωμικής φωτο-βλάβης (**Εικόνα 1.9**).<sup>102,103</sup>

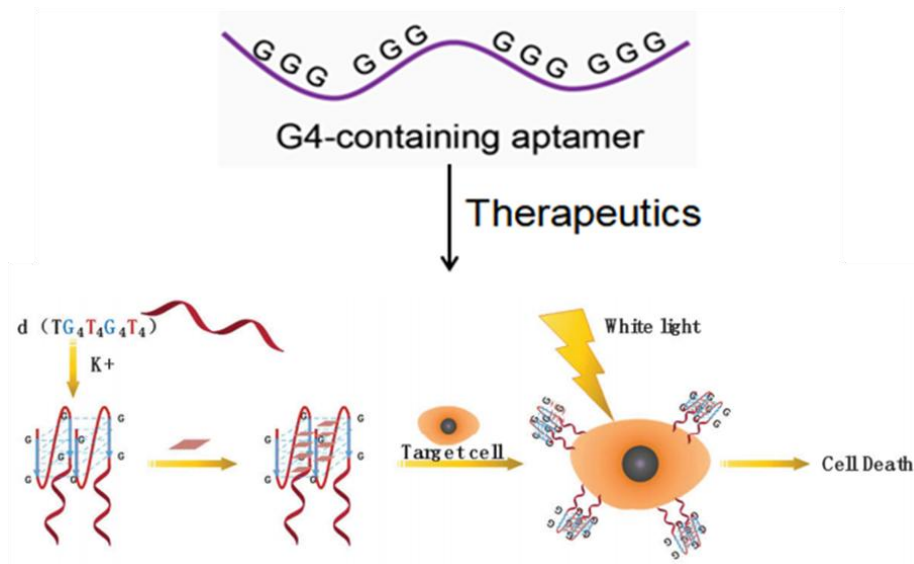


**Εικόνα 1.9 α.** Χημική δομή της ATPP-EDTA. **β.** Κυτταρική απόπτωση όπως αποκαλύφθηκε από την Hoechst 33342 χρώση των καταμημένων πυρήνων των αποπτωτικών κυττάρων. **γ.** Ποσοτική ανάλυση του ποσοστού αποπτωτικών κυττάρων μέσω FACS.

Μια νέα στρατηγική μεταφοράς φαρμάκων με τη χρήση απταμερούς για τη φωτοδυναμική θεραπεία αναπτύχθηκε το 2010 από τον Shieh και τους συνεργάτες



του. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε μια εξειδικευμένη πλούσια σε γουανίνη (G) δομή DNA, το τετράπολο G (G-quadruplex), για τα ιδιαίτερα φυσικά της χαρακτηριστικά και τις βιολογικές της επιδράσεις. Ένα τετράπολο G που οδηγεί στο σχηματισμό του απταμερούς AS<sub>1411</sub><sup>1</sup> είναι κατά κύριο λόγο συζευγμένο με έξι μόρια της 5,10,15,20-τετρακισ(1-μεθυλοπυριδινιο-4-υλο) πορφυρίνης (TMPyP<sub>4</sub>), σχηματίζοντας apt-TMP (Σχήμα 1.25). Τα μόρια της TMPyP<sub>4</sub> στο σύμπλοκο φαίνεται να συνδέονται στο απταμερές μέσω παρεμβολής και εξωτερικής σύνδεσης. Επειδή η δομή του τετραπόλου G είναι γνωστό ότι στοχεύει την υπερεκφρασμένη νουκλεολίνη<sup>2</sup> καρκινικών κυττάρων, σε αυτή τη μελέτη ερευνήθηκε η επίδραση της δομής του G-τετραπόλου ως φορέα για τη μεταφορά της TMPyP<sub>4</sub> σε καρκινικά κύτταρα από την ενσωμάτωση της μεσολαβούμενης νουκλεολίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύμπλοκο apt-TMP παρουσίασε υψηλότερη συσσώρευση της TMPyP<sub>4</sub> σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF<sub>7</sub> απ' ότι στα κανονικά κύτταρα επιθηλίου M<sub>10</sub>. Μετά από επεξεργασία με φως για 180 δευτερόλεπτα, η φωτο-βλάβη σε κύτταρα MCF<sub>7</sub> ήταν μεγαλύτερη από ότι σε κύτταρα M<sub>10</sub>. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταφορά και η πρόσληψη της TMPyP<sub>4</sub> στα κύτταρα εξαρτάται από την ειδική αλληλεπίδραση του apt-TMP με τη νουκλεολίνη στην κυτταρική επιφάνεια και ότι η χρήση του απταμερούς AS<sub>1411</sub> ως φορέα φαρμάκου μπορεί να είναι μια πιθανή τακτική στην θεραπεία του καρκίνου.<sup>104,105</sup>



**Σχήμα 1.25** Δομή και μοντέλο μηχανισμού δράσης του συμπλόκου apt-TMP.

<sup>1</sup> μονοκλωνικό ολιγονουκλεοτίδιο 26 αμινοξέων που σχηματίζει μια δομή διμερούς τετραπόλου G

<sup>2</sup> πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που υπερεκφράζεται στην επιφάνεια ορισμένων καρκινικών κυττάρων

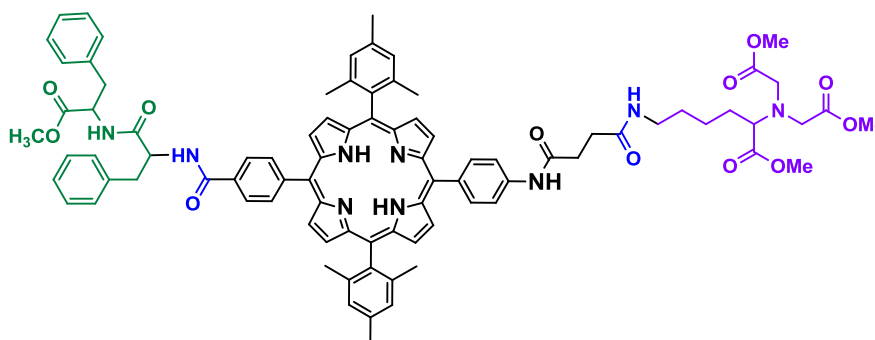
## Κεφάλαιο 2: Στόχος Μεταπτυχιακής Εργασίας

Εμπνευσμένη από τις πολυάριθμες καλά οργανωμένες δομές που απαντώνται στα φυσικά συστήματα, η επιστημονική κοινότητα έχει διερευνήσει εκτενώς την ικανότητα διαφόρων δομικών στοιχείων να αυτο-οργανώνονται σε νάνο- (nano-) και μικρο- (micro-) υλικά με βελτιωμένες ιδιότητες. Η οργάνωση μικρών μορίων σε μεγαλύτερες δομές είναι μια καλά θεμελιωμένη “bottom-up” προσέγγιση. Παρόλο που έχει μελετηθεί μια μεγάλη ποικιλία μοριακών συστατικών, η πρόβλεψη αλλά και η βελτίωση των χαρακτηριστικών που εμφανίζουν οι αυτο-οργανωμένες δομές παραμένουν πρόκληση. Επομένως, η επιλογή των κατάλληλων δομικών στοιχείων είναι κρίσιμη για την κατανόηση των μη ομοιοπολικών, των π-π (π-π stacking) και των van der Waals αλληλεπιδράσεων.

Τα πεπτιδία λόγω των φυσικών και χημικών τους χαρακτηριστικών, αποτελούν ελκυστικούς παράγοντες για τη μοριακή αυτο-οργάνωση και επιπλέον έχουν αναπτυχθεί σε έναν από τους κύριους κλάδους της βιο-νανοτεχνολογίας. Το πιο ευρέως μελετημένο πεπτιδίο για την κατασκευή αυτο-οργανωμένων νανοδομών είναι η διφαινυλαλανίνη ( $F_L$ - $F_L$ ), το βασικό δομικό μοτίβο για το β-αμυλοειδές πολυπεπτιδίο του Alzheimer. Η ομοιοπολική σύζευξη αυτού του διπεπτιδίου με χρωμοφόρα όπως πορφυρίνες, βόριο-διπυρομεθάνια, κορρόλες αλλά και το φεροκένιο έδειξαν ότι η F-F είναι εκείνη που καθορίζει τις ιδιότητες των προκυπτόντων υβριδίων διατηρώντας τις ιδιότητές της. Οι νανοδομές που πορκύπτουν μπορεί να έχουν πιθανές εφαρμογές στη φωτοδυναμική θεραπεία, στην κατάλυση και στα φωτοευαίσθητα ηλιακά κελιά (dye-sensitized solar cells).

Ορμώμενοι από τις προηγούμενες αυτές μελέτες, στόχος μας είναι η κατασκευή νέων υβριδικών υλικών ικανών να αυτο-οργανώνονται σε συστήματα μικτών διαλυτών. Έτσι επιλέγουμε ένα μόριο, γνωστό για την ικανότητά του να αυτο-οργανώνεται, και το συνδυάζουμε με ένα αμινοξύ και ένα χρωμοφόρο, στοχεύοντας σε βιοιατρικές εφαρμογές συλλογής φωτός, όπως είναι δυνητικά η φωτοδυναμική θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, στο Μέρος Α' της παρούσας διατριβής λαμβάνει χώρα η σύνθεση μιας υβριδικής τριάδας, **FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub>** (Σχήμα 2.1). Η σύζευξη τόσο του διπεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης ( $F_L$ - $F_L$ ) όσο και του αμινοξέος της λυσίνης (Lys) στο πορφυρινικό παράγωγο πραγματοποιείται μέσω αμιδικού δεσμού. Επιπλέον, εξετάζεται αν η ικανότητα αυτο-οργάνωσης του διπεπτιδίου διατηρείται και μετά τη

σύζευξη καθώς και ποιες διαφορετικές ιδιότητες εμφανίζουν οι προκύπτουσες νανοδομές.



**FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub>**

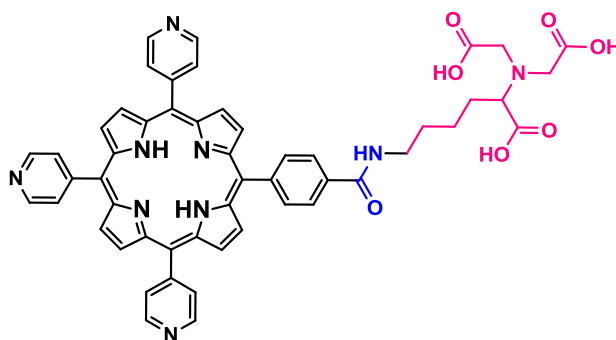
**Σχήμα 2.1** Δομή της τριάδας διφαινυλαλανίνης-πορφυρίνης-λυσίνης **FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub>**.

Όσον αφορά τη βιο-απεικόνιση, συνήθως απαιτεί την ειδική και σταθερή επισήμανση συγκεκριμένων βιομορίων με τη χρήση φθορίζοντων ανιχνευτών ή άλλων παραγόντων αντίθεσης. Ιδανικά, αυτό θα πρέπει να λαμβάνει χώρα *in situ*, με ελάχιστη προσπάθεια και επεμβατικότητα και μέγιστη ευελιξία. Παραδοσιακές μέθοδοι χημικής σύζευξης, γενετικά κωδικοποιημένα παράγωγα που βασίζονται στις φθορίζουσες πρωτεΐνες καθώς και νέες μέθοδοι βιο-ορθογώνιας χημείας βασισμένες στην αλληλεπίδραση υψηλής συγγένειας διερευνώνται ενεργά για τέτοιους σκοπούς.

Η μεταλλοχηλική σύζευξη είναι μια ευρέως διαδεδομένη προσέγγιση, η οποία χρησιμοποιεί την ικανότητα των συμπλόκων του ιμινοδιοξικού (IDA) και του νιτριλοτριοξικού (NTA) οξέος με ιόντα μετάλλων μετάπτωσης ( $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) να συναρμόζουν ορισμένα κατάλοιπα αμινοξέων, κυρίως ιστιδίνης (His) σε μεγάλο εύρος pH. Η βασισμένη στο νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA) μεταλλοχηλική χημεία έχει προταθεί για την ακινητοποίηση/καθαρισμό πρωτεϊνών, τη νανοδιάταξη (nanopatterning) και την τοποειδική σήμανση με φθορίζουσες χρωστικές, κβαντικές τελείες (quantum dots), φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες και πρωτεΐνες.

Εμπνευσμένοι από τα βιβλιογραφικά δεδομένα που σχετίζονται με τη μεταλλοχηλική σύζευξη, στο Μέρος Β' της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής στοχεύουμε στη σύνθεση μιας δυάδας πορφυρίνης με έναν χηλικό υποκαταστάτη (ligand) για τη σήμανση (labeling) πεπτιδίου (RGD-SGAIIG-H) που στο C-τελικό άκρο φέρει ιστιδίνη (His). Η

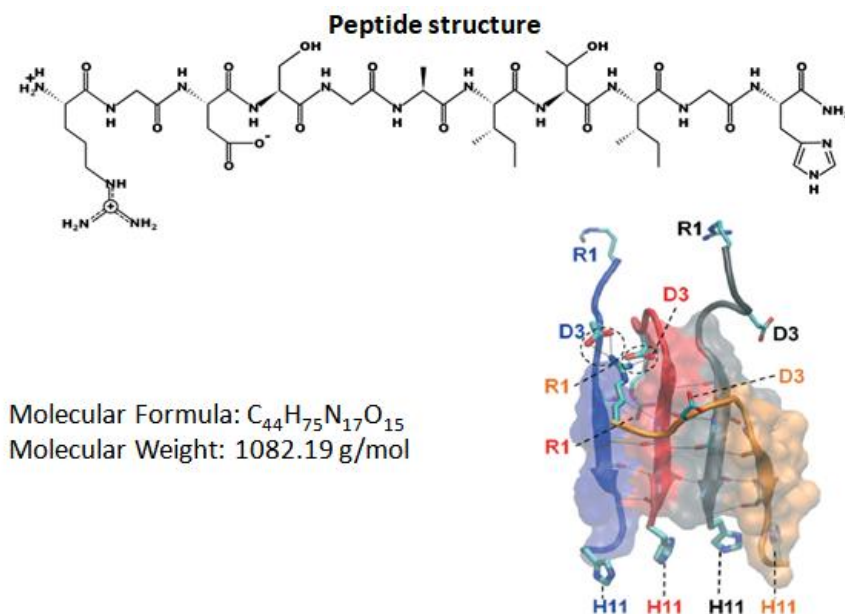
σήμανση του RGD-SGAITIG-H επιτυγχάνεται μέσω της μεταλλοχηλικής σύζευξης με δισθενές νικέλιο ( $\text{Ni}^{2+}$ ) του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης και της πορφυρινικής δυάδας που φέρει NTA. Για το σχηματισμό της δυάδας αυτής,  $\text{TriPyP-Lys}(\text{COOH})_3$  (Σχήμα 2.2), είναι απαραίτητη η σύνθεση του κατάλληλου πορφυρινικού παραγώγου καθώς και του χηλικού υποκαταστάτη (λυσίνη-NTA), η σύζευξη των οποίων πραγματοποιείται μέσω αμιδικού δεσμού.



$\text{TriPyP-Lys}(\text{COOH})_3$

**Σχήμα 2.2** Δομή της δυάδας πορφυρίνης-λυσίνης-NTA  $\text{TriPyP-Lys}(\text{COOH})_3$ .

Το πεπτίδιο που στοχεύουμε να επισημάνουμε μέσω της μεταλλοχηλικής σύζευξης του με την  $\text{TriPyP-Lys}(\text{COOH})_3$ , εκτός από την ιστιδίνη (His) φέρει και την αλληλουχία RGD (Arg-Gly-Asp). Το μοτίβο RGD είναι το κύριο τμήμα σύνδεσης ιντεγκρίνης που υπάρχει εντός των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) όπως η ινονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, οστεοποντίνη και ινωδογόνο. Εξαιτίας της ικανότητας της αλληλουχίας RGD να δεσμεύεται σε πολλά είδη ιντεγκρίνης, τα συνθετικά πεπτίδια που φέρουν το μοτίβο αυτό προσφέρουν πολλά πελονεκρήματα σε εφαρμογές των βιοϋλικών (Σχήμα 2.3).



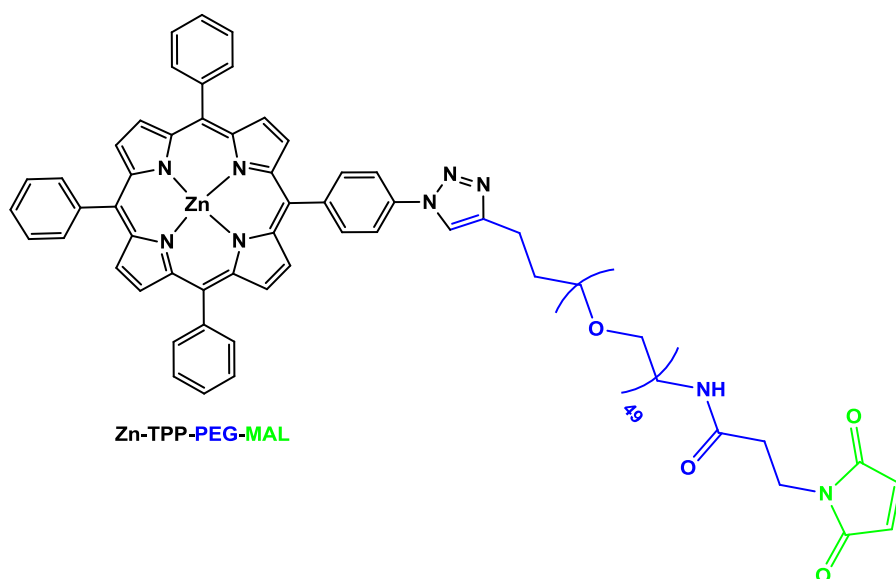
**Σχήμα 2.3** Πάνω: Δομή του πεπτιδίου RGD-SGAIITIG-H. Κάτω: Απεικόνιση της αναδιπλωμένης διαμόρφωσης του πεπτιδίου RGD-SGAIITIG-H μετά την αυτο-οργάνωσή του.

Οι περισσότερες από τις τρέχουσες θεραπείες κατά του καρκίνου στοχεύουν στον περιορισμό του πολλαπλασιασμού και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, πολλές από αυτές τις θεραπείες αποτυγχάνουν να εξαλείψουν τους όγκους εξαιτίας ενός μικρού πληθυσμού βλαστικών κυττάρων που παρουσιάζουν ιδιαίτερη ανθεκτικότητα σε αυτές και συμβάλλουν στη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά, γνωστά ως Cancer Stem Cells (CSCs), χαρακτηρίζονται από την ικανότητα αυτο-ανανέωσης, έναρξης καθώς και πολλαπλασιασμού όγκων. Πολλοί επιφανειακοί δείκτες των CSCs, όπως CD133, EpCAM και CD44, έχουν αναγνωρισθεί και αποτελούν ισχυρούς στόχους για την ειδική και επιλεκτική στόχευση των CSCs. Μεταξύ όλων των επιφανειακών δεικτών των CSCs, ο CD44 έχει χαρακτηριστεί ως ο πιο κοινός βιο-δείκτης καθώς υπερεκφράζεται από πολλούς όγκους συμπεριλαμβανομένου του παχέος εντέρου, του μαστού και του παγκρέατος. Πιο ειδικά, ο CD44 είναι μια πολυδομική και λειτουργική γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου και συμμετέχει στην κυτταρική επικοινωνία μεταξύ των γειτονικών κυττάρων αλλά και μεταξύ της εξωκυττάριας μήτρας.

Τα απταμερή είναι συνθετικά μονοκλωνικά ολιγονουκλεοτίδια ή πεπτίδια που μπορούν να δράσουν ενάντια σε σχεδόν οποιοδήποτε στόχο συμπεριλαμβανομένων

ιόντων, μικρών χημικών μορίων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών ακόμη και ολόκληρων ζωντανών κυττάρων όπως βακτήρια και καρκινικά κύτταρα. Η αρχή της μοριακής δέσμησης βασίζεται στην ικανότητα του απταμερούς να αναδιπλώνεται σε σύνθετες τρισδιάστατες δομές και σχήματα και στη συνέχεια να συνδέεται ειδικά με υψηλή συγγένεια στον επιθυμητό στόχο. Επιπλέον, τα απταμερή εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των μακροχρόνιων ανταγωνιστών τους μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπως χαμηλή τοξικότητα, ανοσογονικότητα, εύκολες χημικές τροποποιήσεις, αποτελεσματική αναπαραγωγή με μεγάλη διάρκεια ζωής και λογικό κόστος. Επομένως, τα απταμερή αποτελούν πολλά υποσχόμενα μόρια με προοπτική στις βιοϊατρικές εφαρμογές.

Έτσι, σκοπός του Μέρους Γ' της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής είναι η σύνθεση μιας δυάδας πορφυρίνης-πολυαιθυλενογλυκόλης, **Zn-TPP-PEG-MAL** που φέρει ελεύθερο μαλεϊμίδιο (Σχήμα 2.4). Η πορφυρινική δυάδα-στόχος συνδέεται μέσω "κλικ" αντίδρασης θειόλης-μαλεϊμιδίου (thiol-maleimide "click" reaction) με ένα RNA απταμερές (Apt1) που περιέχει 2'-F-πυριμιδίνη και έχει μελετηθεί ότι δρα ενάντια στο βιο-δείκτη CD44. Συνεπώς, στοχεύουμε στη δέσμηση του συστήματος πορφυρίνης-απταμερούς σε καρκινικά κύτταρα και στη μελέτη του ως ειδικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκου οδηγώντας στην κυτταρική απόπτωση μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας.



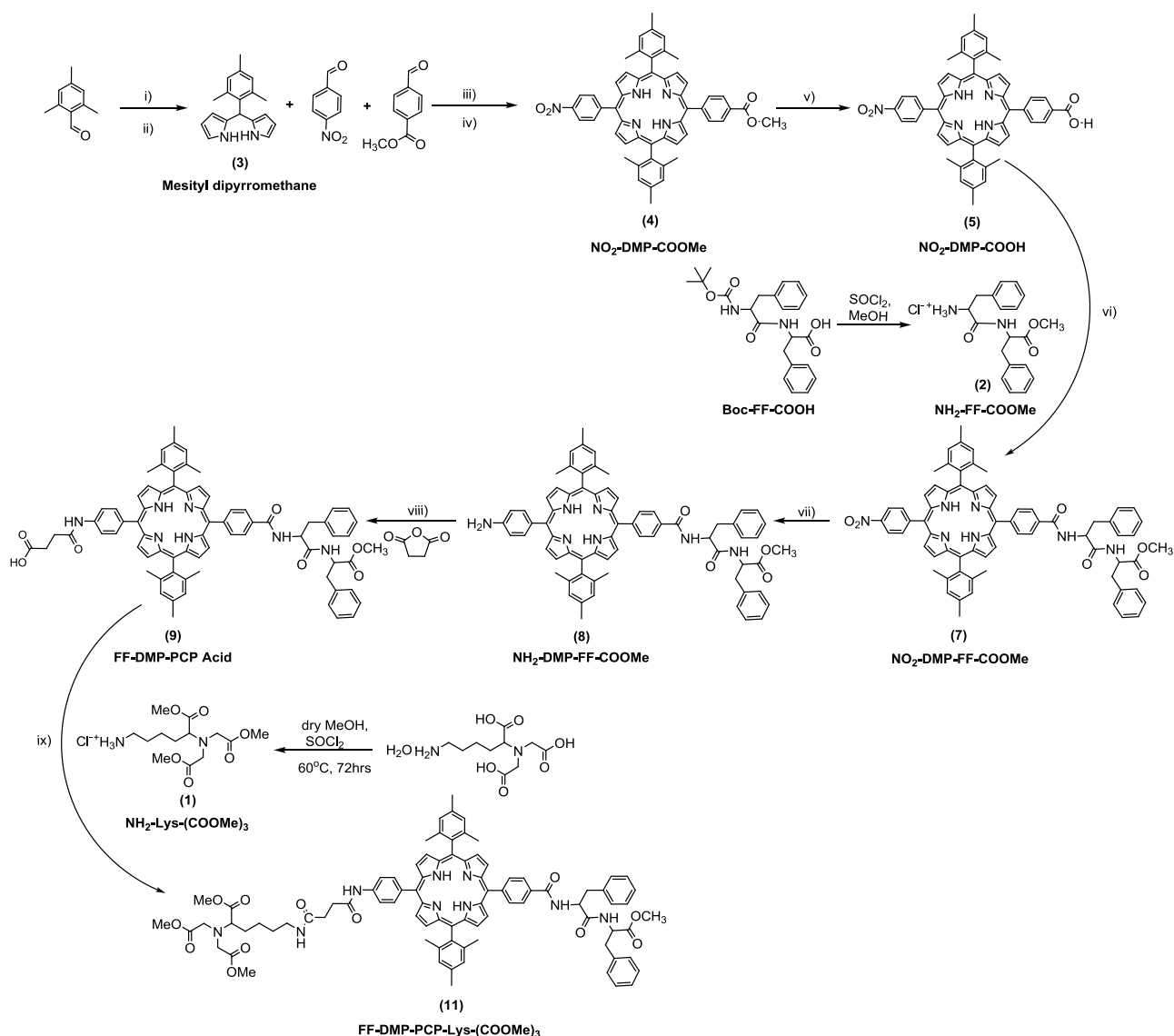
**Σχήμα 2.4** Δομή της δυάδας πορφυρίνης-πολυαιθυλενογλυκόλης **Zn-TPP-PEG-MAL**.

### **Κεφ.3 Συνθετικές Προσεγγίσεις**

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία απαρτίζεται από τρία διακριτά μέρη. Πιο ειδικά, η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για όλες τις ενώσεις του κάθε μέρους περιλαμβάνει το μικρότερο δυνατό αριθμό συνθετικών σταδίων για την σύνθεση και απομόνωση των τελικών προϊόντων. Έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης αρκετών παραμέτρων των αντιδράσεων αυτών για την βελτιστοποίηση την απόδοσης όπου αυτό ήταν εφικτό.

#### **3.1 Α' Μέρος: Συνθετική προσέγγιση της FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (11)**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σκοπός του Α' Μέρους της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η σύνθεση μιας τριάδας διφαινυλαλανίνης-πορφυρίνης-λυσίνης και η μελέτη των ιδιοτήτων της ως νέο αυτοοργανωμένο υβριδικό υλικό. Για τη σύνθεση της **FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11)**, πραγματοποιήθηκε αρχικά η σύνθεση του κατάλληλου πορφυρινικού παραγώγου **(5)** και ακολούθησε η σύνθεση της άμινο αποπροστατευμένης διφαινυλαλανίνης **(2)** καθώς και η εστεροποίηση των τριών καρβοξυλομάδων της λυσίνης **(1)** για τη σύζευξη. Η σύζευξη τόσο του διπεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης όσο και του αμινοξέος της λυσίνης στο πορφυρινικό παράγωγο έγινε μέσω αμιδικού δεσμού. Ο χαρακτηρισμός του τελικού προϊόντος-στόχου αλλά και των ενδιάμεσων πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF), φασματοσκοπία NMR καθώς και φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis). Στο ακόλουθο σχήμα (**Σχήμα 3.1**) παρουσιάζεται η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η σύνθεση της ένωσης-στόχου **(11)**.

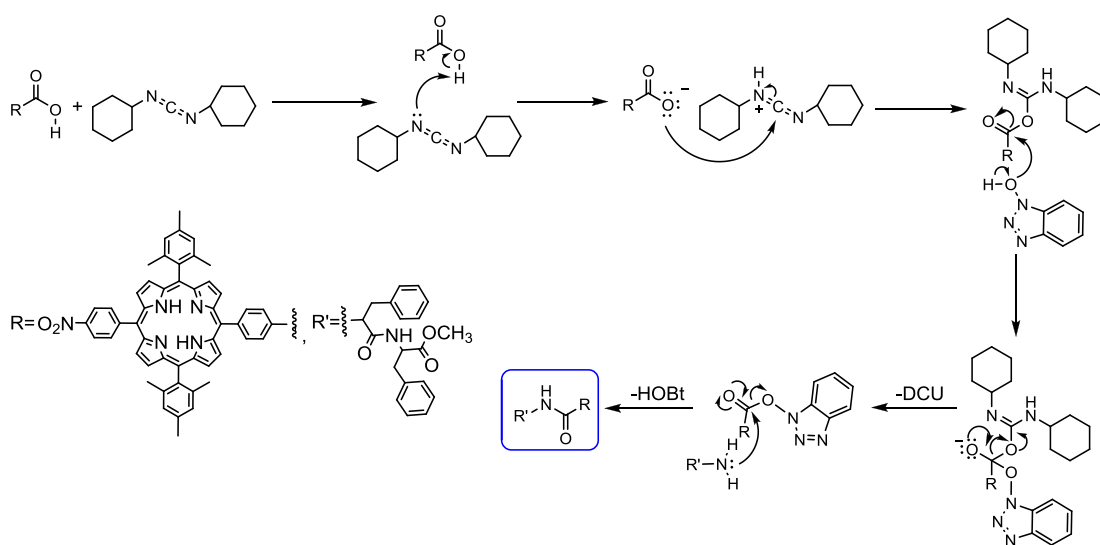


**Σχήμα 3.1** Συνθετική προσέγγιση της τριάδας **FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (11)**. i) Pyrrole, MgBr<sub>2</sub>, ii) NaOH, iii) MeOH, HCl/H<sub>2</sub>O, iv) EtOH, HCl/H<sub>2</sub>O v) THF, MeOH, KOH, H<sub>2</sub>O, vi) THF, DCC, HOBT, Et<sub>3</sub>N, vii) dry THF, dry Et<sub>3</sub>N, Pd/C, H<sub>2</sub>, viii) dry DMF, succinic anhydride, ix) dry DMF, HATU, DIPEA.

Όπως παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3.1**, για τη σύνθεση της τριάδας **FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (11)** αρχικά απαραίτητη είναι η σύνθεση του meso-υποκατεστημένου διπυρρομεθανίου (**3**). Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει μια όξινα καταλυόμενη αντίδραση συμπύκνωσης ανάμεσα στη 2,4,6 trimethylbenzaldehyde και στο πυρρόλιο, οδηγώντας στο σχηματισμό του διπυρρομεθανίου (**3**). Έπειτα, μέσω αντίδρασης κυκλοποίησης κατά Balaban, ακολουθεί η σύνθεση του trans-AB<sub>2</sub>C πορφυρινικού παραγώγου (**4**). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται μια όξινα



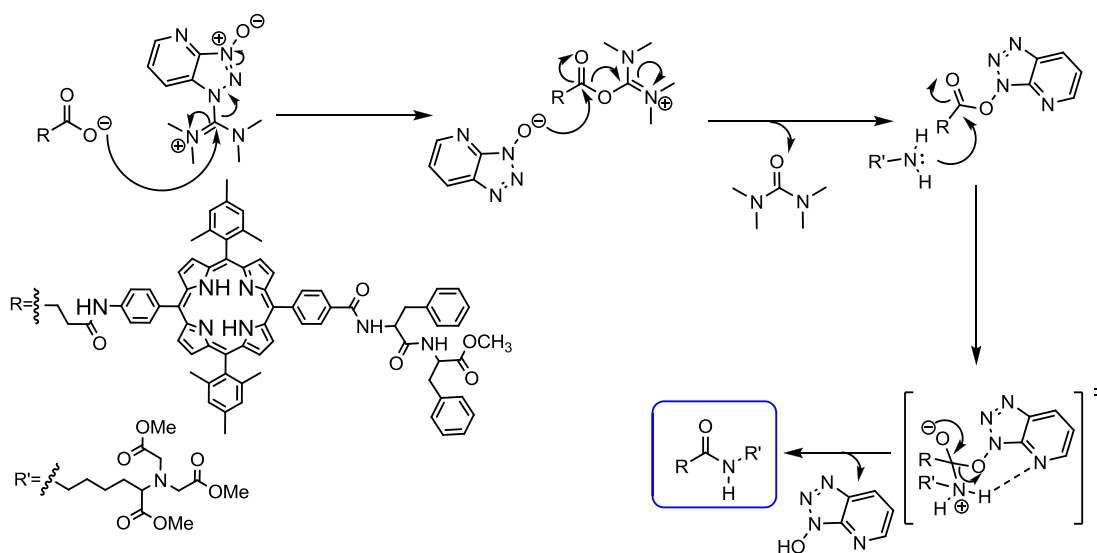
καταλυόμενη αντίδραση συμπύκνωσης ανάμεσα στο διπυρρομεθάνιο (**3**) και την 4-nitrobenzaldehyde προς σχηματισμό του ενδιάμεσου βιλανίου. Στη συνέχεια, μέσω συμπύκνωσης του προκύπτοντος βιλανίου με το methyl-4-formylbenzoate και οξείδωσης του σχηματισθέντος πορφυρινογόνου με τη χρήση *p*-chloranil, λαμβάνεται το παράγωγο (**4**).<sup>106</sup> Κατόπιν, πραγματοποιείται βασική υδρόλυση του μεθυλεστέρα της πορφυρίνης (**4**) οδηγώντας στο σχηματισμό της NO<sub>2</sub>-DMP-COOH (**5**). Ο σχηματισμός του πορφυρινικού παραγώγου (**7**) είναι αποτέλεσμα της αμιδικής σύζευξης μεταξύ της καρβοξυλομάδας της πορφυρίνης (**5**) και της αμινομάδας της διφαινυλαλανίνης NH<sub>2</sub>-FF-OMe (**2**). Για τη δημιουργία του αμιδικού δεσμού είναι απαραίτητη η χρήση κλασικών αντιδραστηρίων σύζευξης όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση των Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) και 1-Hydroxybenzotriazole (HOBT).<sup>107</sup> Μέσω της χρήσης αυτών των αντιδραστηρίων προκύπτει ο ενεργοποιημένος εστέρας (**6**), σύμφωνα με το μηχανισμό που παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 3.2).



**Σχήμα 3.2** Μηχανισμός αμιδικής σύζευξης με DCC/HOBT.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αναγωγή της -NO<sub>2</sub> ομάδας της NO<sub>2</sub>-DMP-FF-COOMe (**7**) σε -NH<sub>2</sub> δίνοντας το πορφυρινικό παράγωγο (**8**). Μετέπειτα, μέσω πυρηνόφιλης προσβολής στο καρβονύλιο του succinic anhydride από το άζωτο της -NH<sub>2</sub> ομάδας της πορφυρίνης (**8**), συντίθεται το πορφυρινικό παράγωγο καρβοξυλικού οξέος (**9**).<sup>108</sup> Τέλος, για τη σύνθεση της επιθυμητής ένωσης (**11**) λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός αμιδικού δεσμού μεταξύ της καρβόξυ-πορφυρίνης (**8**) και της λυσίνης-τριμέθυλ-εστέρα NTA, NH<sub>2</sub>-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (**1**). Για το σχηματισμό του αμιδικού

δεσμού και την επιτυχή σύνθεση της πορφυρίνης **FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub>** χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο σύζευξης 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU).<sup>109</sup> Μέσω της χρήσης του HATU προκύπτει ο ενεργοποιημένος εστέρας σύμφωνα με το μηχανισμό που παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα (**Σχήμα 3.3**).

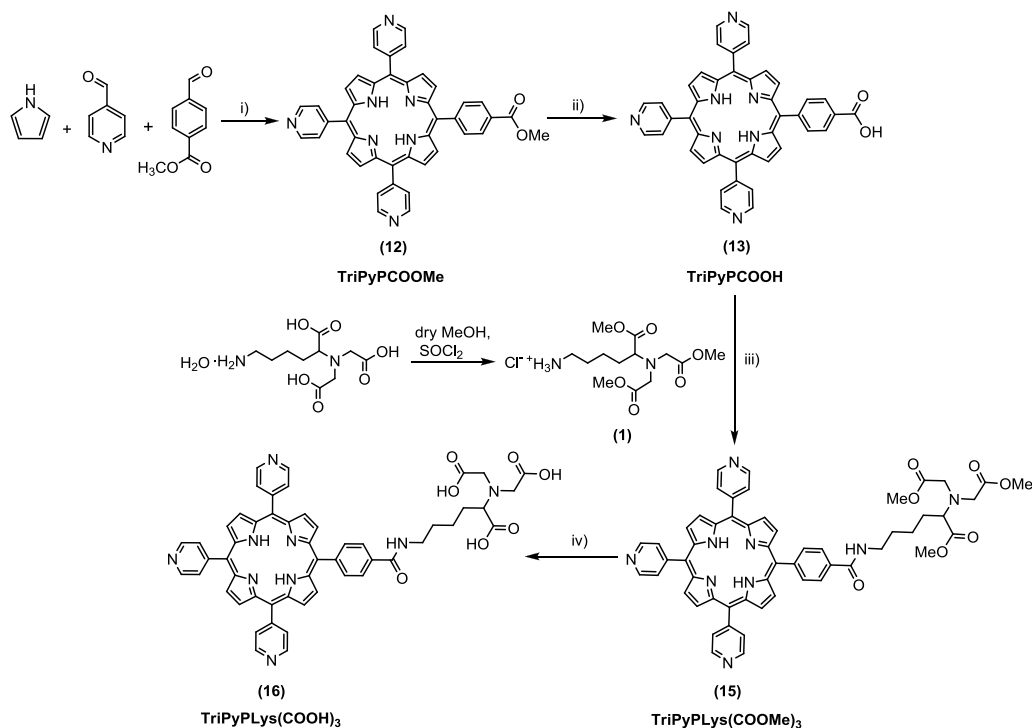


**Σχήμα 3.3** Μηχανισμός αμιδικής σύζευξης με HATU.

Αξίζει να σημειωθεί ότι για την επιτυχή αμιδική σύζευξη μεταξύ του διπεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης και του πορφυνικού παραγώγου (**5**) είναι αναγκαία η άμινο (–NH<sub>2</sub>) αποπροστασία και η καρβόξυ (–COOH) προστασία-εστεροποίηση της Boc-FF-COOH. Η αντίδραση αυτή, για το σχηματισμό της ένωσης (**2**), μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία οξέος και αλκοόλης. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος ήταν αυτή κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε θειονυλοχλωρίδιο (SOCl<sub>2</sub>) και μεθανόλη (MeOH). Η ίδια συνθετική πορεία ακολουθήθηκε και για την προστασία-εστεροποίηση των τριών καρβόξυ (–COOH) ομάδων της N,N-Bis(carboxymethyl)-L-lysine hydrate (εμπορικά διαθέσιμη) προκειμένου να παραχθεί η NH<sub>2</sub>-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (**1**).<sup>110</sup>

### **3.2 Β' Μέρος: Συνθετική προσέγγιση της TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (16)**

Σκοπός του Β' Μέρους της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής ήταν η σύνθεση μιας δυάδας πορφυρίνης με έναν χηλικό υποκαταστάτη (ligand) για τη σήμανση (labeling) πεπτιδίου (RGD-SGAIIG-H) που στο C-τελικό άκρο φέρει ιστιδίνη (His). Η σήμανση του RGD-SGAIIG-H επιτυγχάνεται μέσω της μεταλλοχηλικής σύζευξης με διασθενές νικέλιο (Ni<sup>2+</sup>) του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης και της πορφυρινικής δυάδας που φέρει NTA. Για το σχηματισμό της δυάδας αυτής, ήταν απαραίτητη η σύνθεση του κατάλληλου πορφυρινικού παραγώγου καθώς και του χηλικού υποκαταστάτη που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το νιτριλοτριοξικό οξύ (nitrilotriacetic acid, NTA). Για να καταστεί δυνατή η σύνθεση της επιθυμητής δυάδας, πρέπει να προηγηθεί η C-προστασία της εμπορικά διαθέσιμης N,N-Bis(carboxymethyl)-L-lysine hydrate για να ακολουθήσει η σύνδεσή της με την πορφυρίνη μέσω αμιδικού δεσμού. Ο χαρακτηρισμός της TriPyPLys(COOMe)<sub>3</sub> (**16**) πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR, φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), φασματοσκοπία φθορισμού καθώς και μελέτες προσδιορισμού/μέτρησης του χρόνου ζωής της διεγερμένης κατάστασης. Το τελικό σύμπλοκο της πορφυρίνης με το νικέλιο και το πεπτίδιο, TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup>+peptide, χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), κυκλικού διχρωισμού και IR. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις DLS και ζ δυναμικού (zeta potential) για τον προσδιορισμό του μεγέθους και του φορτίου των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων. Στο ακόλουθο σχήμα (**Σχήμα 3.4**) παρουσιάζεται η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η σύνθεση της πορφυρινικής δυάδας (**16**).



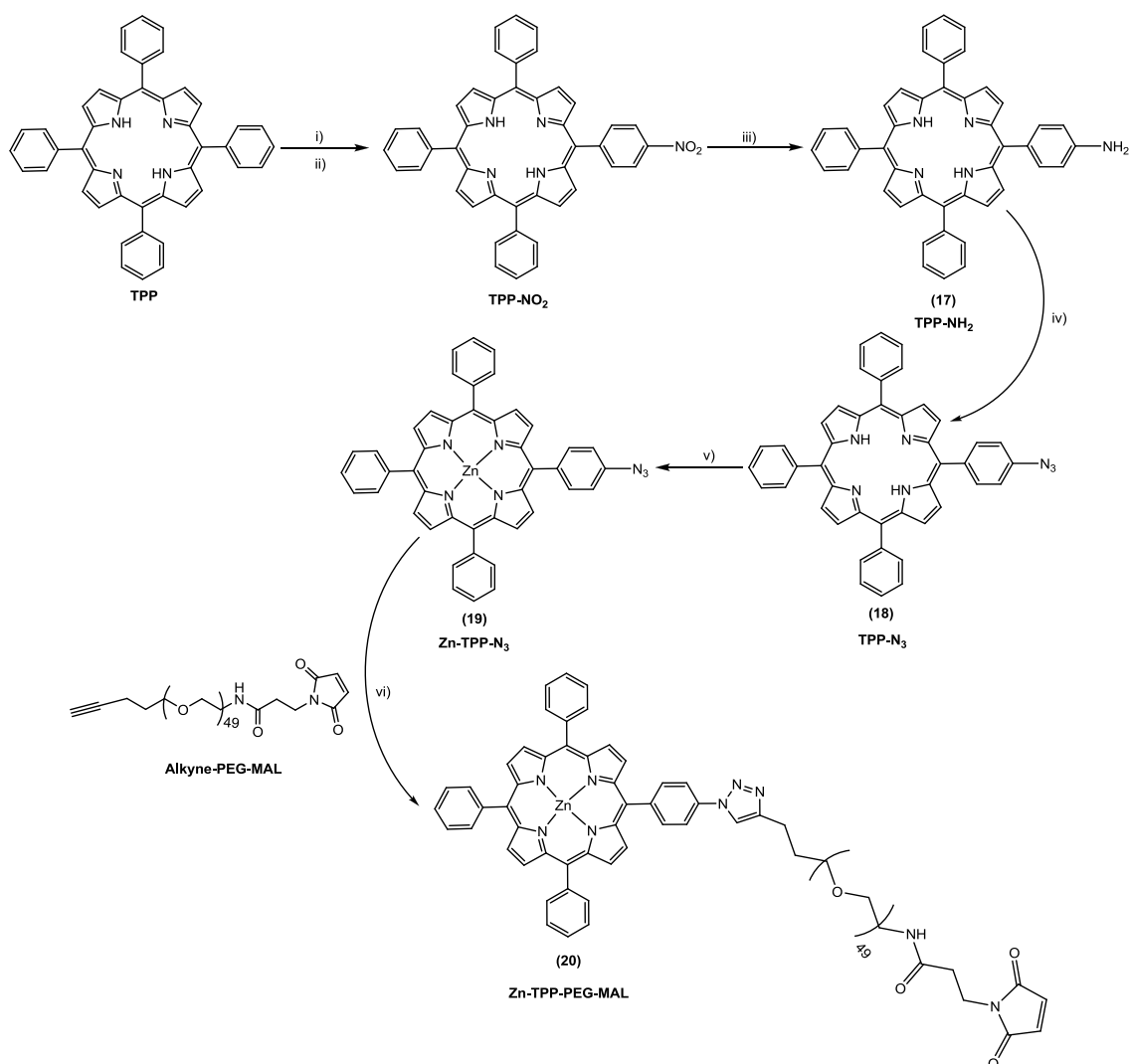
**Σχήμα 3.4** Συνθετική προσέγγιση της δυάδας **TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>** (16). i) propionic acid, reflux, 1.5 h, ii) THF, MeOH, KOH, H<sub>2</sub>O, iii) dry DMF, HATU, DIPEA, iv) LiOH, MeOH/THF, 96 h.

Προκειμένου να συντεθεί η δυάδα-στόχος (16), αρχικά σχηματίζεται το πορφυρινικό παράγωγο (12). Η σύνθεση της TriPyPCOOMe (12) περιλαμβάνει μια όξινα καταλυόμενη αντίδραση μικτής συμπύκνωσης κατά Adler και Longo ανάμεσα στο πυρρόλιο, την 4-pyridylaldehyde και το methyl 4-formylbenzoate.<sup>31,111</sup> Ακολουθεί βασική υδρόλυση της εστερομάδας του φαινυλίου στη meso θέση της πορφυρίνης (12) που οδηγεί στο σχηματισμό της TriPyPCOOH (13). Ο σχηματισμός της TriPyPLys(COOMe)<sub>3</sub> (15) είναι αποτέλεσμα της αμιδικής σύζευξης μεταξύ της –COOH ομάδας της πορφυρίνης (13) και της –NH<sub>2</sub> ομάδας της NH<sub>2</sub>-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (1). Προκειμένου να παραχθεί/συντεθεί η NH<sub>2</sub>-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (1), πραγματοποιείται η προστασία-εστεροποίηση των τριών καρβόξυ (–COOH) ομάδων της N,N-Bis(carboxymethyl)-L-lysine hydrate. Για τον επιτυχή σχηματισμό του αμιδικού δεσμού χρησιμοποιείται το HATU (coupling reagent) ώστε να σχηματιστεί ο ενδιάμεσος ενεργοποιημένος εστέρας σύμφωνα με το μηχανισμό που έχει παρουσιαστεί σε προηγούμενο σχήμα (Σχήμα 3.3 HATU). Τέλος, πραγματοποιείται βασική υδρόλυση των τριών εστερικών ομάδων της TriPyPLys(COOMe)<sub>3</sub> (15) προς

σχηματισμό της τελικής δυάδας **TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (16)**, η οποία φέρει τον επιθυμητό χηλικό υποκαταστάτη ΝΤΑ.

### **3.3 Γ' Μέρος: Συνθετική προσέγγιση της ZnTPP-PEG-MAL (20)**

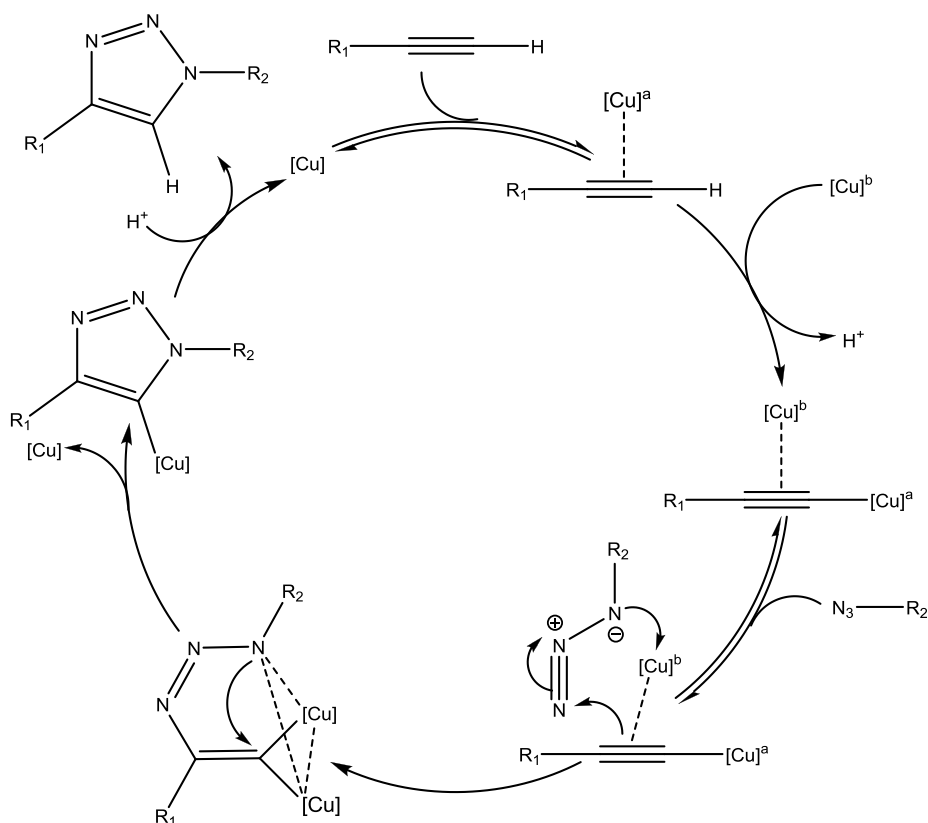
Στο Γ' Μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, στόχος μας ήταν η σύνθεση μιας δυάδας πορφυρίνης-πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) που φέρει ελεύθερο μαλεϊμίδιο. Η παρουσία της ομάδας μαλεϊμιδίου καθιστά εφικτή τη σύζευξη της δυάδας-στόχου με ένα RNA απταμερές (Apt1) μέσω "κλικ" αντίδρασης θειόλης-μαλεϊμιδίου (thiol-maleimide "click" reaction). Απώτερος σκοπός αυτού του μέρους της μεταπτυχιακής διατριβής είναι η δέσμευση του συστήματος πορφυρίνης-απταμερούς σε καρκινικά κύτταρα και η μελέτη του ως ειδικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκου, στοχεύοντας στην κυτταρική απόπτωση μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας. Η **Zn-TPP-PEG-MAL (20)** χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR, ενώ θα χαρακτηριστεί περαιτέρω σε επόμενο στάδιο πειραμάτων μετά τη σύζευξή της με το RNA απταμερές (Apt1). Στο ακόλουθο σχήμα (**Σχήμα 3.5**) παρουσιάζεται η σύνθεση της Zn-TPP-PEG-MAL (**20**).



**Σχήμα 3.5** Συνθετική προσέγγιση της δυάδας **Zn-TPP-PEGMAL (20)**. i) HNO<sub>3</sub> 65%, DCM, 2.5 h, 0°C, ii) NaHCO<sub>3</sub> (aq), r.t, 12 h, iii) HCl 37%, SnCl<sub>2</sub>, reflux, 12 h, iv) TFA, NaNO<sub>2</sub>, NaN<sub>3</sub>, v) Zn(OAc)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, vi) CuI, Et<sub>3</sub>N, dry DCM.

Για το σχηματισμό της **Zn-TPP-PEG-MAL (20)** αρχικά πραγματοποιείται η σύνθεση της πορφυρίνης TPP, μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης κατά Adler και Longo.<sup>31,111</sup> Ακολουθεί αντίδραση νίτρωσης στην πάρα (p-) θέση του φαινυλίου της TPP και κατόπιν η αναγωγή της νίτρο (-NO<sub>2</sub>) ομάδας σε άμινο (-NH<sub>2</sub>) οδηγεί στο σχηματισμό του πορφυρινικού παραγώγου (17).<sup>112,113</sup> Στη συνέχεια, η άμινο ομάδα της TPP-NH<sub>2</sub> (17) μετατρέπεται σε άζιδο (-N<sub>3</sub>) στην p-θέση του φαινυλίου.<sup>114</sup> Έπειτα, λαμβάνει χώρα μετάλλωση του πορφυρινικού παραγώγου (18) με ψευδάργυρο δίνοντας την Zn-TPP-N<sub>3</sub> (19). Τέλος, για το σχηματισμό της επιθυμητής δυάδας **Zn-**

**TRP-PEG-MAL (20)** πραγματοποιείται αντίδραση “κλικ”. Η συγκεκριμένη αντίδραση αποτελεί μια 1,3 διπολική κυκλοπροσθήκη του αζιδίου της πορφυρίνης (**19**) στο αλκίνιο του PEG-Maleimide προς σχηματισμό του δακτυλίου της τριαζόλης.<sup>115</sup> Στο παρακάτω σχήμα (**Σχήμα 3.6**) παρουσιάζεται το προτεινόμενο καταλυτικό μοντέλο της κλικ κυκλοπροσθήκης με δύο άτομα χαλκού (Cu) που δρουν συνεργιστικά για τον τοποεκλεκτικό σχηματισμό του 1,4-υποκατεστημένου δακτυλίου της 1,2,3-τριαζόλης.<sup>116</sup>



**Σχήμα 3.6** Προτεινόμενο καταλυτικό μοντέλο της κλικ αντίδρασης .

## **Κεφάλαιο 4: Πειραματικό Μέρος**

### **Φάσματα NMR**

Όλα τα φάσματα NMR καταγράφηκαν στα φασματοόμετρα Bruker AVANCE III-500 MHz και Bruker DPX-300 MHz χρησιμοποιώντας διαλύματα δευτεριωμένων διαλυτών και επιλέγοντας κάθε φορά την κορυφή του εκάστοτε διαλύτη ως εσωτερικό πρότυπο.

### **Φάσματα Μάζας**

Τα φάσματα μάζας υψηλής ανάλυσης καταγράφηκαν σε φασματοόμετρο Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF χρησιμοποιώντας ως μήτρα trans-2-[3-(4-tert-butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile (DCTB).

### **Φωτοφυσικές Μετρήσεις**

Τα φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους σε διάλυμα καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1700 PharmaSpec χρησιμοποιώντας κυψελίδες μήκους διαδρομής 10 mm. Τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε στερεά κατάσταση ελήφθησαν (σε πλακίδια χαλαζία 2x2 cm<sup>2</sup>) χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο UV/Vis/NIR Lambda 19, Perkin-Elmer. Τα φάσματα εκπομπής καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού JASCO FP-6500 εξοπλισμένο με φωτοπολλαπλασιαστή WRE-343 (εύρος μήκους κύματος 200-850 nm). Οι μετρήσεις του χρόνου ημιζωής διεγερμένης κατάστασης (lifetime measurements) πραγματοποιήθηκαν σε φασματοόμετρο χρόνου ζωής φθορισμού Mini-tau (Edinburgh Instruments) εξοπλισμένο με λέιζερ EPL 405 nm. Οι μετρήσεις DLS όσον αφορά το μέγεθος (d, nm) και το δυναμικό ζ (z, mV) πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Ltd), εξοπλισμένο με τριχοειδείς αναδιπλούμενες κυψελίδες (DTS 1060/DTS 106). Το μήκος κύματος της ανίχνευσης ήταν 633 nm και η θερμοκρασία όλων των πειραμάτων ήταν 25°C. Τα πειραματικά δεδομένα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας την Έκδοση 7.02 του λογισμικού Zetasizer (Malvern Instruments Ltd).

Τα φάσματα υπερύθρου (IR) ελήφθησαν με τη χρήση ενός Perkin Elmer Spectrum 100 φασματοόμετρο εξοπλισμένο με εξάρτημα εξασθετισμένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR). Η σάρωση πραγματοποιήθηκε στην περιοχή



4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού συλλέχθηκαν στην περιοχή 550-200 nm σε ένα φασματοπολαρίμετρο Jasco J-715 εξοπλισμένο με σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας Peltier. Για όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία μήκους διαδρομής 1 mm, εύρος ζώνης (band width) 5.0 nm, ανάλυση (resolution) 0.5 nm, απόκριση (response) 4 sec, ευαισθησία (sensitivity) 20 mdeg και ταχύτητα σάρωσης (scan speed) 100 nm/min. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 25 °C. Τα φάσματα CD αναλύθηκαν με το πρόγραμμα CDNN.

### **Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM & FESEM)**

Τα πορφυρινικά παράγωγα διαλύθηκαν σε ένα χαοτροπικό διαλύτη (chaotropic solvent) όπως είναι το διχλωμεθάνιο (DCM) ή η 1,1,1,3,3,3-εξαφθορο-2-προπανόλη (HFIP) και ακολούθως αραιώθηκαν με τον διαλύτη που επάγει την αυτο-οργάνωση σε διάφορες αναλογίες. Η τελική συγκέντρωση του κάθε διαλύματος διατηρήθηκε σταθερή και ίση με 1 mM. Όλα τα δείγματα παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM & FESEM) έπειτα από επώαση για 24 ώρες. Διαλύματα δείγματος (8  $\mu\text{L}$ ) εναποτέθηκαν σε γυάλινα πλακίδια και αφέθηκαν στον αέρα να στεγνώσουν. Τα δείγματα στη συνέχεια καλύφθηκαν με 10 nm Au/Pd (μέσω sputtering) και παρατηρήθηκαν άμεσα. Τα πειράματα SEM και FESEM πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο JEOL JSM-6390LV που λειτουργεί στα 15 και 20 kV (για παρατηρήσεις SEM) και ένα JEOL JSM-7000F (για παρατηρήσεις FESEM) που λειτουργεί στα 15 kV.

### **Κυτταρική καλλιέργεια**

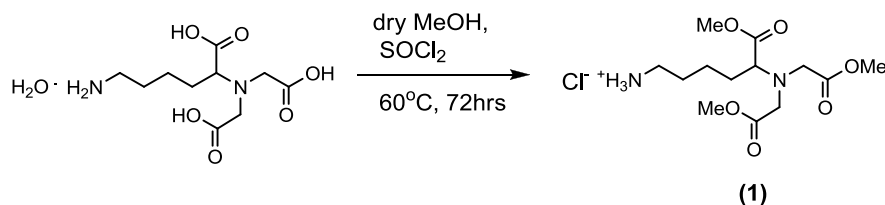
Οι κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος ανθρώπινου μαστού MCF-7 αναπτύχθηκαν σε μέσο ανάπτυξης DMEM pH 7,4 με 10% FBS, πενικιλίνη (100 U/mL), γλουταμίνη (2 mM) και στρεπτομυκίνη (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Οι κυτταρικές καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε φιάλες και αναπτύχθηκαν στους 37 °C σε ατμόσφαιρα υγρασίας 5%  $\text{CO}_2$ . Τα κύτταρα αποσπάζονταν χρησιμοποιώντας διάλυμα θρυψίνης 0,25% (w/v) - 0,03% (w/v) EDTA και η αναλογία διαίρεσης ήταν 1: 3-1: 5. Τα αποθεματικά διαλύματα (stock solutions) του συμπλόκου της πορφυρίνης με το νικέλιο και το πεπτιδίο ή της πορφυρίνης μόνης της σε συγκέντρωση 2,31 mM (σε  $\text{H}_2\text{O}$ , pH = 7) αραιώθηκαν με το μέσο ανάπτυξης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις όπως απαιτείται.

### Συνεστιακή μικροσκοπία (Confocal Microscopy)

Κύτταρα MCF-7 τοποθετήθηκαν σε γυάλινες πλάκες βάσης ( $1 \times 10^5$  κύτταρα ανά τριβλίο) και αναπτύχθηκαν για 16 ώρες (overnight) σε 2 mL DMEM πλήρους μέσου στις ίδιες συνθήκες όπως περιγράφεται λεπτομερώς στην ενότητα της κυτταρικής καλλιέργειας. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διαλύματα του συμπλόκου  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+} + \text{peptide}$  ή της αντίστοιχης μητρικής πορφυρίνης,  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$  (τελική συγκέντρωση 4,62  $\mu\text{M}$  σε σχέση με την πορφυρίνη σε κάθε περίπτωση) για 24 ώρες. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε ένα πολυφωτονικό συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP (Wetzlar, Γερμανία) εξοπλισμένο με λέιζερ Argon (γραμμές διέγερσης στα 458, 476, 488, 496, 561 και 643 nm), σε λέιζερ DPSS 514 (γραμμή διέγερσης στα 514 nm, λέιζερ: 5,5% ένταση) και ένα IR MaiTai DeepSee Ti: Sapphire laser (Spectra-Physics, Santa Clara, CA, USA) για εφαρμογές πολλαπλών φωτογραφιών.

### Σύνθεση των ενώσεων

#### 4.1 Σύνθεση του 5-(bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino)-6-methoxy-6-oxohexan-1-aminium chloride ( $\text{NH}_2\text{-Lys-(COOMe)}_3$ , **1**)

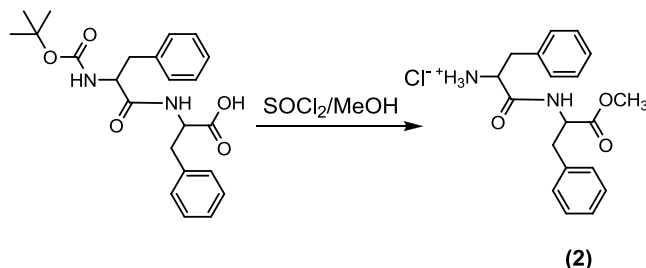


Σε δίλαιμη βιδωτή σφαιρική φιάλη εισάγονται 101.2 mgr N,N-Bis(carboxymethyl)-L-lysine hydrate (0.39 mmol) και 30 mL άνυδρου διαλύτη MeOH. Κατόπιν, η σφαιρική τοποθετείται σε παγόλουτρο και στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται στάγδην 0.62 mL  $\text{SOCl}_2$ . Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του  $\text{SOCl}_2$  το παγόλουτρο απομακρύνεται. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση και στους 60 °C για 72 ώρες. Μετά το πέρας 72 ωρών, το μίγμα στη φιάλη αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα πραγματοποιείται απόσταξη της MeOH και του  $\text{SOCl}_2$  υπό κενό. Τέλος, η  $\text{NH}_2\text{-Lys-(COOMe)}_3$ , (**1**) συλλέγεται ως υποκίτρινο λάδι και φυλάσσεται στο ψυγείο προστατευμένο από το φως. Απόδοση: 98%.

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, MeOD):  $\delta = 3.73$  (s, 4H), 3.71 (s, 3H), 3.69 (s, 6H), 3.56 (t,

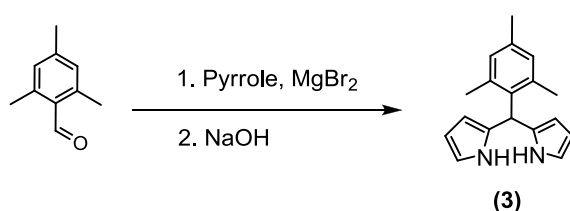
$J=7.44$  Hz, 1H), 2.93 (m, 2H), 1.76-1.48 (m, 6H) ppm.

#### 4.2 Σύνθεση της Di-L-phenylalanine methyl ester aminium chloride ( $\text{NH}_2\text{-FF-COOMe}$ , 2)<sup>117</sup>



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL εισάγονται 100 mg της αμινο-προστατευμένης (tert-Butoxycarbonyl)di-L-phenylalanine (0.24 mmol) και 8.2 mL MeOH. Κατόπιν, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο και ακολουθεί στάγδην προσθήκη 1 mL  $\text{SOCl}_2$  υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την προσθήκη του  $\text{SOCl}_2$ , το παγόλουτρο αφαιρείται και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Μετά το πέρας των 16 ωρών, πραγματοποιείται απόσταξη υπό κενό για την απομάκρυνση της MeOH και του  $\text{SOCl}_2$ . Για την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος λαμβάνει χώρα καταβύθιση με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και Hexane. Τέλος, η ένωση (2) καταβυθίζεται ως ίζημα και διηθείται υπό κενό. Απόδοση: 97%.

#### 4.3 Σύνθεση του 2,2'-(mesitylmethylene)bis(1H-pyrrole) (Mesityl dipyrromethane, 3)

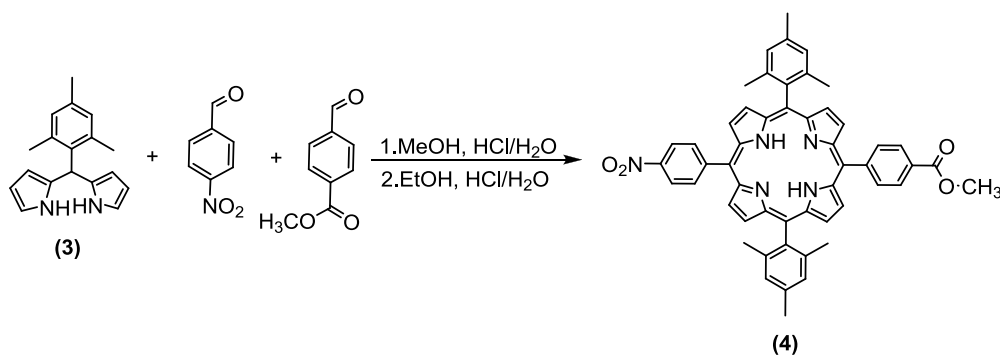


Σε δίλαιμη βιδωτή σφαιρική φιάλη των 500 mL εισάγονται 1.97 mL 2,4,6-trimethyl benzaldehyde (13.5 mmol) και 93.3 mL pyrrole (1.35 mol). Στη συνέχεια, το διάλυμα απαιερώνεται με συνεχή ροή  $\text{N}_2$  για 15 λεπτά και σε αυτό προστίθενται 1.242 gr  $\text{MgBr}_2$  (6.75 mmol). Η σφαιρική φιάλη πωματίζεται και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 ώρα προστατευμένο από το φως. Μετά το πέρας της 1.5 ώρας, στη φιάλη προστίθενται 1.620 gr NaOH σε pellets (40.5 mmol) και το σύστημα αφήνεται και πάλι υπό ανάδευση για 1 ώρα. Έπειτα, το ίζημα που σχηματίζεται, διηθείται σε χωνί Buchner με διηθητικό χαρτί και το διήθημα

συλλέγεται και μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη. Ακολουθεί απόσταξη του pyrrole με παγίδα και συλλέκτη σε cooling bath υγρού N<sub>2</sub> (-196 °C) στην αντλία υψηλού κενού με τη χρήση ψυκτήρα. Το εναπομείναν στερεό φυλάσσεται στους 0 °C προστατευμένο από το φως. Την επόμενη ημέρα, το στερεό διαλύεται σε μίγμα Hexane:Ethyl acetate (4:1) και φιλτράρεται μέσω χρωματογραφίας στήλης με υλικό πλήρωσης SiO<sub>2</sub> (silica gel). Τα κλάσματα του επιθυμητού προϊόντος (κίτρινου χρώματος) συλλέγονται σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης αποστάζεται μέχρι ξηρού. Κατόπιν, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με μίγμα H<sub>2</sub>O:EtOH (6:2) και θέρμανση του μίγματος στους 100°C για 5 λεπτά. Μετά το πέρας 5 λεπτών, η σφαιρική φιάλη αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και το τελικό προϊόν καταβυθίζεται ως ίζημα, διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με Hexane. Τέλος, το 2,2'-(mesitylmethylene)bis(1*H*-pyrrole) φυλάσσεται στους 0 °C προστατευμένο από το φως. Απόδοση: 59%.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.94 (s, 2H), 6.86 (s, 2H), 6.66 (m, 2H), 6.18 (m, 2H), 6.01 (br. s, 2H), 5.92 (s, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.06 (s, 6H) ppm.

#### **4.4 Σύνθεση της methyl 4-(10,20-dimesityl-15-(4-nitrophenyl)porphyrin-5-yl)benzoate (NO<sub>2</sub>-DMP-COOMe, 4)**



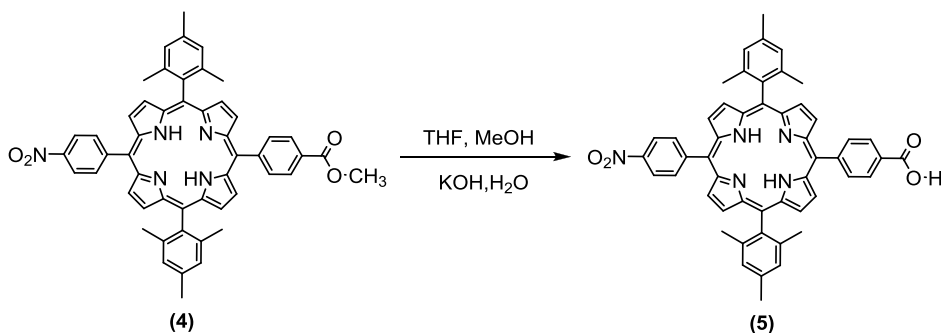
Σε σφαιρική φιάλη του 1L εισάγεται 1 gr 2,2'-(mesitylmethylene)bis(1*H*-pyrrole) (3.8 mmol) και 285 mgr 4-nitrobenzaldehyde (1.9 mmol), τα οποία διαλύονται σε 200 mL MeOH. Αφού πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση του μίγματος, στη φιάλη προστίθεται υδατικό διάλυμα 0.57 N HCl (HCl/H<sub>2</sub>O, 10:200 mL) και το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα προστατευμένο από το φως. Μετά το πέρας 1 ώρας, ακολουθεί διήθηση του μίγματος της αντίδρασης και εκπλύσεις αρχικά με 200 mL υδατικού διαλύματος MeOH (MeOH/H<sub>2</sub>O, 1:1) και στη συνέχεια με 200 mL H<sub>2</sub>O. Κατόπιν, πραγματοποιείται συλλογή και μεταφορά του ιζήματος σε σφαιρική

φιάλη όπου προστίθενται 310 mgr methyl-4-formylbenzoate (1.9 mmol) και 200 mL EtOH. Έπειτα, το προκύπτον διάλυμα απαερώνεται με N<sub>2</sub> για 10 λεπτά και σε αυτό προστίθεται υδατικό διάλυμα 2. 35 N HCl (HCl/H<sub>2</sub>O, 1:50 mL). Το σύστημα αφήνεται για 16 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένο από το φως. Μετά το πέρας των 16 ωρών, πραγματοποιούνται εκχυλίσεις αρχικά με CHCl<sub>3</sub> (200 mL), στη συνέχεια με H<sub>2</sub>O (3 x 100 mL) και έπειτα με υδατικό διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> (100 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται και σε αυτή προστίθεται αν χρειαστεί ξηραντικό (MgSO<sub>4</sub>). Μόλις ολοκληρωθεί η διήθηση, το διάλυμα της αντίδρασης εισάγεται σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 500 mL μαζί με 1.4 gr p-chloranil (5.7 mmol) και αφήνεται υπό ανάδευση και συνθήκες reflux για 1 ώρα. Τέλος, ακολουθεί ο καθαρισμός και η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος (4) με χρωματογραφία στήλης (silica gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexane, 6:4). Απόδοση: 13%.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.73 (m, 8H), 8.63 (d, J=8.70 Hz, 2H), 8.42 (m, 4H), 8.31 (d, J=8.25 Hz, 2H), 7.29 (s, 4H), 4.11 (s, 3H), 2.63 (s, 6H), 1.83 (s, 12H), -2.64 (s, 2H) ppm.

HRMS (MALDI-TOF): calcd for C<sub>52</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: 801,33 [M]<sup>+</sup>, found 802,65 [M+H]<sup>+</sup>.

#### **4.5 Σύνθεση της 4-(10,20-dimesityl-15-(4-nitrophenyl)porphyrin-5-yl)benzoic acid (NO<sub>2</sub>-DMP-COOH, 5)**

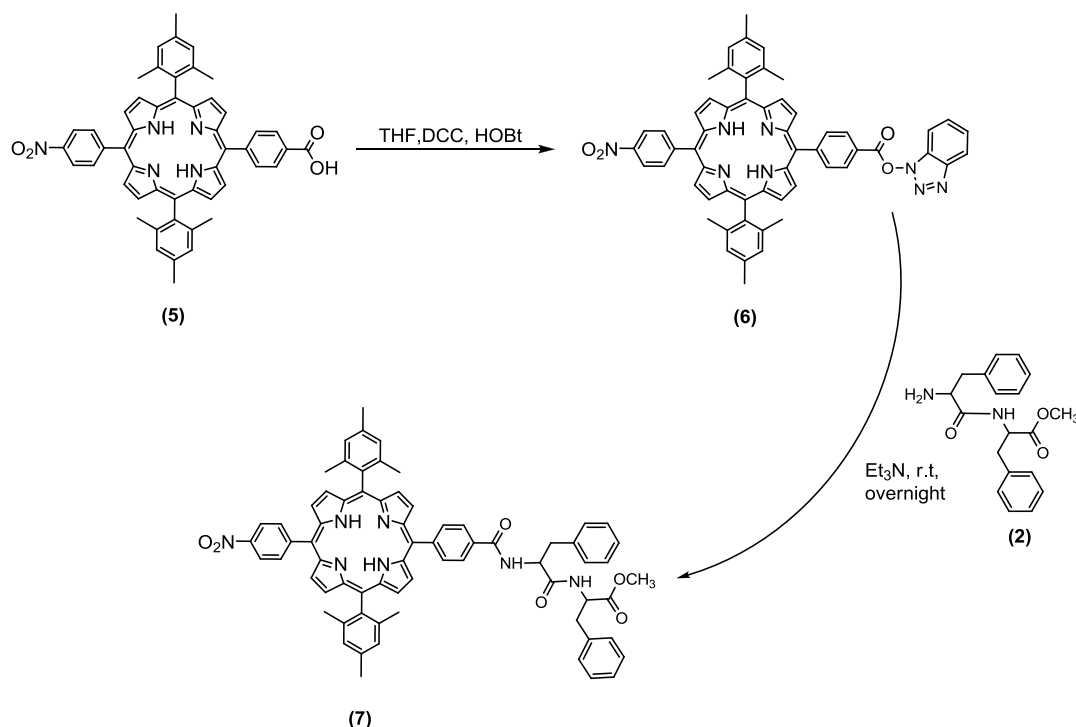


Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται αρχικά, 100 mgr του πορφυρινικού παραγώγου (4) (0.13 mmol) και εν συνεχεία 60 mL THF και 24 mL MeOH. Έπειτα, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα KOH (1.8 gr KOH σε 30 mL H<sub>2</sub>O) και προστίθεται στη φιάλη της αντίδρασης. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά το πέρας 24 ωρών, ακολουθεί απόσταξη των διαλυτών MeOH και THF. Κατόπιν, στο μίγμα προστίθενται περίπου 60 mL H<sub>2</sub>O και αφήνεται στο ψυγείο για 1 ώρα ώστε να καταβυθιστεί το πορφυρινικό προϊόν ως ίζημα. Ακολούθως, στη φιάλη

προστίθεται διάλυμα 3N HCl έως ότου το pH του διαλύματος γίνει ελαφρώς όξινο (pH~ 5.5-6). Ακολουθεί διήθηση του μίγματος και εκπλύσεις του ιζήματος με H<sub>2</sub>O. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν (5) συλλέγεται ως μωβ στερεό Απόδοση: 98 %.

HRMS (MALDI-TOF): calcd for C<sub>51</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: 787,32 [M]<sup>+</sup>, found 787,63 [M]<sup>+</sup>.

#### **4.6 Σύνθεση της methyl (4-(10,20-dimesityl-15-(4-nitrophenyl)porphyrin-5-yl)benzoyl)phenylalanylphenylalaninate (NO<sub>2</sub>-DMP-FF-COOMe, 7)**



Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 80 mgr του πορφυρινικού παραγώγου (5) (0.1 mmol) και 4 mL THF. Έπειτα, η φιάλη της αντίδρασης τοποθετείται σε παγόλουτρο και ακολουθεί αρχικά η προσθήκη 27.5 mgr DCC (0.13 mmol) και εν συνεχεία 18 mgr HOBt (0.13 mmol). Το διάλυμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 30 λεπτά ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου εστέρα (6). Μετά το πέρας 30 λεπτών, στο μίγμα προστίθενται 43.5 mgr NH<sub>2</sub>-FF-(COOMe) (2) (0.13 mmol) και καταλυτική ποσότητα Et<sub>3</sub>N (40 μL). Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Αφού η αντίδραση ολοκληρωθεί, πραγματοποιείται απόσταξη του διαλύτη THF και κατόπιν προσθήκη CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> για να ακολουθήσουν εκχυλίσεις με H<sub>2</sub>O και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl. Τέλος το επιθυμητό προϊόν (7) απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) και συλλέγεται ως στερεό ιώδους χρώματος. Απόδοση: 58%

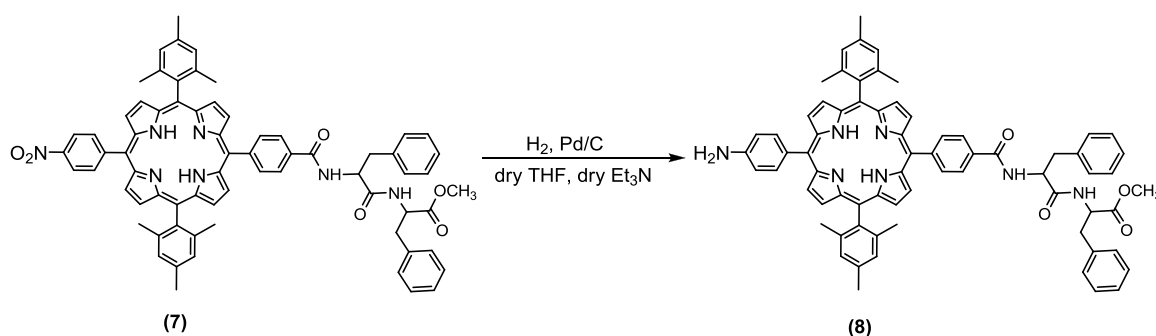
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.72 (m, 8H), 8.62 (d, *J*=8.59 Hz, 2H), 8.40 (d, *J*=8.48 Hz, 2H), 8.29 (d, *J*=8.06 Hz, 2H), 8.07 (d, *J*=8.10 Hz, 2H), 7.38 (m, 4H), 7.29 (m, 6H), 7.25 (m, 2H), 7.08 (d, *J*=7.74 Hz, 2H), 7.05 (d, *J*=6.61 Hz, 1H), 6.37 (d,

$J=7.51$  Hz, 1H), 5.00 (m, 1H), 4.86 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.36 (d-d,  $J=6.66$  Hz, 1H), 3.26 (d-d,  $J=7.18$  Hz, 1H), 3.19 (d-d,  $J=6.51$  Hz, 1H), 3.06 (d-d,  $J=6.86$  Hz, 1H), 2.63 (s, 6H), 1.84, 1.83 (s, 12H), -2.62 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171.48, 170.58, 167.33, 149.13, 147.83, 145.74, 139.43, 138.15, 136.56, 135.70, 135.22, 134.78, 133.24, 131.30, 130.94, 130.78, 129.68, 129.38, 129.00, 128.82, 128.00, 127.38, 125.63, 122.02, 119.26, 118.68, 116.41, 54.91, 53.69, 52.62, 38.45, 38.06, 21.78, 21.61$  ppm.

HRMS (MALDI-TOF): calcd for  $\text{C}_{70}\text{H}_{61}\text{N}_7\text{O}_6$ : 1095,47  $[\text{M}]^+$ , found 1094,86  $[\text{M}-\text{H}]^+$ .

#### **4.7 Σύνθεση της methyl (4-(15-(4-aminophenyl)-10,20-dimesitylporphyrin-5-yl)benzoyl)phenylalanylphenylalaninate ( $\text{NH}_2$ -DMP-FF-COOMe, 8)**



Σε σφαιρική δίλαιομη φιάλη των 50 mL εισάγονται αρχικά 70 mg του πορφυρινικού παραγώγου (7) (0.06 mmol) και στη συνέχεια 23 mL άνυδρου διαλύτη THF και 0.84 mL άνυδρης  $\text{Et}_3\text{N}$ . Κατόπιν, στη φιάλη της αντίδρασης προστίθεται 35 mg 10%  $\text{Pd/C}$  (0.35 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου ( $\text{H}_2$ ) και έντονη ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας 3 ωρών, το προκύπτον μίγμα φιλτράρεται μέσω/από Celite και το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό μειωμένη πίεση. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν (8) απομονώνεται μέσω χρωματογραφίας στήλης ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (98:2)), αυξάνοντας σταδιακά την πολικότητα στην  $\text{EtOH}$ ) και συλλέγεται ως ιώδες στερεό. Απόδοση: 93%

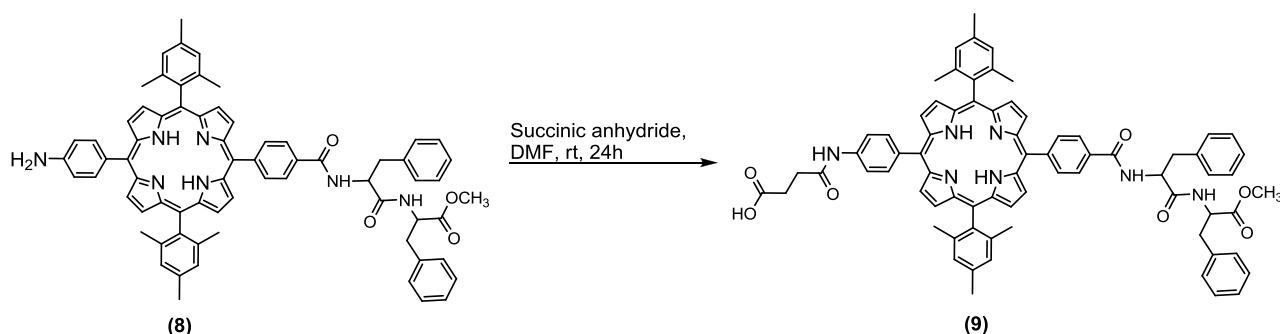
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.90, 8.71$  (m, 8H), 8.30 (d,  $J=8.12$  Hz, 2H), 8.07 (d,  $J=8.14$  Hz, 2H), 8.00 (d,  $J=8.30$  Hz, 2H), 7.38 (m, 5H), 7.29 (m, 5H), 7.25 (m, 2H), 7.09 (d,  $J=7.67$  Hz, 2H), 7.06 (d,  $J=8.31$  Hz, 2H), 7.04 (d,  $J=2.31$  Hz, 1H), 6.44 (d,  $J=7.51$  Hz, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.02 (br. s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.37 (d-d,  $J=6.69$  Hz, 1H), 3.28 (d-d,  $J=7.15$  Hz, 1H), 3.20 (d-d,  $J=6.52$  Hz, 1H), 3.07 (d-d,  $J=6.84$  Hz, 1H), 2.63 (s, 6H), 1.85, 1.84 (s, 12H), -2.59 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171.50, 170.64, 167.46, 146.14, 139.52, 138.57, 137.87, 136.60, 135.74, 134.82, 132.99, 132.24, 130.53, 129.67, 129.38, 128.99, 128.81, 127.90, 127.36, 125.57, 120.58, 118.49, 117.36, 113.63, 54.88, 53.69, 53.60, 52.59, 38.37, 38.08, 21.77, 21.61$  ppm.



**HRMS (MALDI-TOF):** calcd for  $C_{70}H_{63}N_7O_4$ : 1065,49  $[M]^+$ , found 1065,89  $[M]^+$ .

**4.8 Σύνθεση της 4-((4-(10,20-dimesityl-15-(4-((1-((1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamoyl)phenyl)porphyrin-5-yl)phenyl)amino)-4-oxobutanoic acid (FF-DMP-PCP Acid, 9)**



Σε δίλαιο σφαιρική φιάλη των 50 mL εισάγονται 60 mgr του πορφυρινικού παραγώγου (8) (0.07 mmol) και 1.5 mL άνυδρου διαλύτη DMF. Στη συνέχεια, στη φιάλη της αντίδρασης προστίθενται 38 mgr Succinic Anhydride (0.38 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ατμόσφαιρα  $N_2$  και ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος, TLC ( $SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH$  (95:5)). Μετά το πέρας των 24 ωρών, η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί και στη φιάλη προστίθενται 15 ml Ethyl Acetate. Κατόπιν, ακολουθούν εκχυλίσεις με  $H_2O$  (x3) και η συλλεχθείσα οργανική φάση αποστάζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν (9) απομονώνεται μέσω χρωματογραφίας στήλης ( $SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH$  (98:2) και έπειτα  $CH_2Cl_2/MeOH$  (93:7), αυξάνοντας σταδιακά την πολικότητα στην  $MeOH$ ) και συλλέγεται ως μωβ στερεό. Απόδοση: 92%

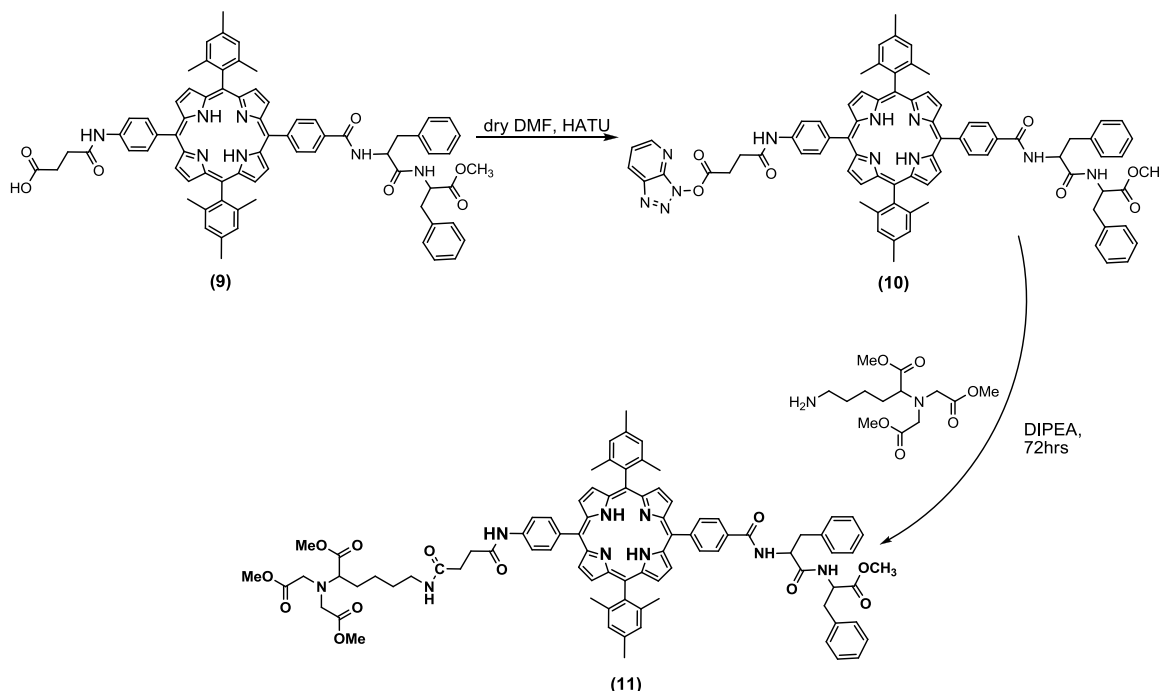
**$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  = 8.69 (m, 8H), 8.29 (d,  $J=7.89$  Hz, 2H), 8.07 (d,  $J=8.01$  Hz, 2H), 8.00 (d,  $J=7.57$  Hz, 2H), 7.74 (d,  $J=6.30$  Hz, 2H), 7.36 (m, 5H), 7.30-7.19 (m, 9H), 7.09 (d,  $J=7.73$  Hz, 2H), 6.58 (d,  $J=7.68$  Hz, 1H), 5.06 (m, 1H), 4.88 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.35 (d-d,  $J=6.74$  Hz, 1H), 3.27 (d-d,  $J=7.10$  Hz, 1H), 3.19 (d-d,  $J=6.49$  Hz, 1H), 3.07 (d-d,  $J=7.09$  Hz, 1H), 2.93 (m, 2H), 2.85 (m, 2H), 2.58 (s, 6H), 1.79 (s, 12H), -2.65 (s, 2H) ppm.

**$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  = 176.25, 171.56, 170.84, 170.70, 167.54, 146.01, 139.44, 138.38, 137.91, 137.61, 136.55, 135.70, 135.02, 134.79, 133.03, 130.76, 130.40, 129.65, 129.40, 128.96, 128.80, 127.89, 127.36, 125.66, 119.21, 118.70, 118.08, 117.74, 54.92, 53.72, 52.63, 38.43, 38.10, 32.43, 29.82, 21.74, 21.56, 21.35 ppm.

**HRMS (MALDI-TOF):** calcd for  $C_{74}H_{67}N_7O_7$ : 1165,51  $[M]^+$ , found 1167,21  $[M+2H]^+$ .



**4.9 Σύνθεση της dimethyl 2,2'-((6-(4-((4-(10,20-dimesityl-15-(4-((1-((1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamoyl)phenyl)porphyrin-5-yl)phenyl)amino)-4-oxobutanamido)-1-methoxy-1-oxohexan-2-yl)azanediy)diacetate (FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub>, 11)**



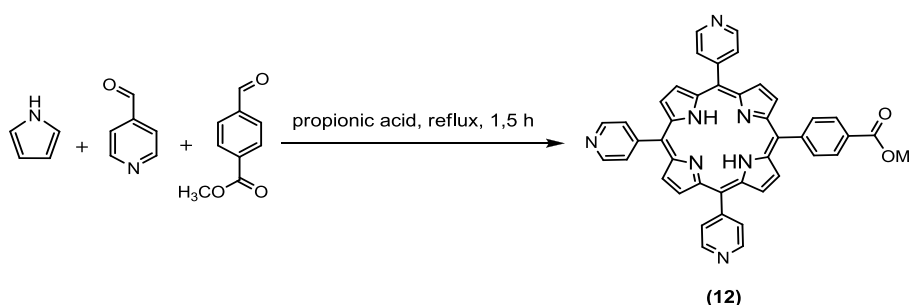
Σε σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα Ar, εισάγονται 50 mgf του πορφυρινικού παραγώγου (9) (0.04mmol) και 6 mL άνυδρου DMF. Έπειτα, στο σύστημα της αντίδρασης προστίθενται 115 mgf HATU (0.3 mmol) σε θερμοκρασία 0 °C. Το διάλυμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 1 ώρα ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου εστέρα (10). Μετά το πέρας της 1 ώρας, στο μίγμα προστίθενται 26 mgf NH<sub>2</sub>-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (1) (0.15 mmol) και καταλυτική ποσότητα DIPEA (0.25 mL). Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 72 ώρες. Αφού η αντίδραση ολοκληρωθεί, πραγματοποιείται απόσταξη του DMF και της DIPEA και κατόπιν προσθήκη CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> για να ακολουθήσουν εκχυλίσεις με H<sub>2</sub>O (x2). Τέλος, το επιθυμητό προϊόν (11) απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης (SiO<sub>2</sub>, διαλύτης έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και έπειτα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (97:3), αυξάνοντας σταδιακά την πολικότητα στις MeOH)) και συλλέγεται ως μωβ στερεό. Απόδοση: 60%

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.41 (s, 1H), 8.83, 8.71 (m, 8H), 8.29 (d, J=8.30 Hz, 2H), 8.16 (d, J=8.45 Hz, 2H), 8.06 (d, J=8.30 Hz, 2H), 7.96 (d, J=8.40 Hz, 2H), 7.37 (m, 5H), 7.28 (m, 3H), 7.24 (m, 4H), 7.08 (d, J=7.71 Hz, 2H), 7.05 (d, J=7.56 Hz, 1H), 6.50 (t, J=5.21 Hz, 1H), 6.44 (d, J=7.60 Hz, 1H), 5.01 (m, 1H), 4.87 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.70 (s, 6H), 3.67 (s, 3H), 3.64 (d, J=3.39 Hz, 4H), 3.48 (t, J=7.73 Hz, 1H), 3.37 (m, 3H), 3.27 (d-d, J=7.15 Hz, 1H), 3.19 (d-d, J=6.50 Hz, 1H), 3.06 (d-d, J=6.86 Hz, 1H), 2.87 (m, 2H), 2.80 (m, 2H), 2.62 (s, 6H), 1.84, 1.83 (s, 12H), 1.74 (m, 4H), 1.57 (m, 2H), -2.62 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 173.27, 172.97, 172.07, 171.36, 171.29, 170.50, 167.30, 145.95, 139.37, 138.35, 138.21, 137.78, 137.35, 136.49, 135.62, 134.99, 134.67, 132.93, 130.36, 129.54, 129.24, 128.85, 128.67, 127.78, 127.25, 127.22, 125.44, 119.45, 118.53, 117.92, 117.54, 63.98, 54.76, 53.57, 52.64, 52.43, 51.81, 51.52, 39.41, 38.23, 37.96, 33.65, 31.78, 29.33, 27.95, 22.54, 21.63, 21.46$  ppm.

HRMS (MALDI-TOF): calcd for  $\text{C}_{87}\text{H}_{89}\text{N}_9\text{O}_{12}$ : 1451,66  $[\text{M}]^+$ , found 1452,13  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

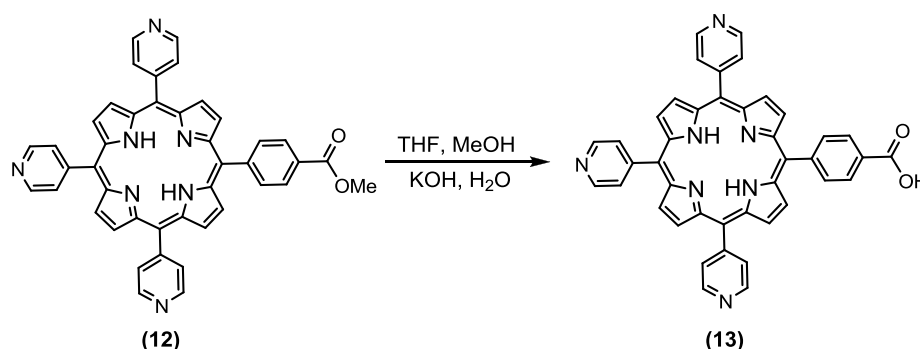
#### 4.10 Σύνθεση της methyl 4-[10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrin-5-yl]benzoate (TriPyP-COOMe, 12)



Σε σφαιρική μονόλαιμη φιάλη των 250 mL εισάγονται 2.1 gr του methyl-formyl-ester (13 mmol), 2.5 mL 4-pyridyl aldehyde (26 mmol) και 100 mL προπιονικού οξέος. Η αντίδραση θερμαίνεται στους 140 °C και ακολουθεί στάγδην προσθήκη 2.6 mL πυρρολίου (37 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση και σε συνθήκες αναρροής για 1.5 ώρα, απουσία φωτός. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απόσταξη της περίσσειας του προπιονικού οξέος και του πυρρολίου υπό κενό. Έπειτα, το μίγμα της αντίδρασης φιλτράρεται σε χρωματογραφία στήλης ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5)). Τα κλάσματα που συλλέγονται από τη στήλη φιλτραρίσματος καθαρίζονται περαιτέρω σε δεύτερη χρωματογραφία στήλης για να πραγματοποιηθεί η επιτυχή απομόνωση του τελικού προϊόντος. Τέλος, για τη χρωματογραφία στήλης καθαρισμού χρησιμοποιείται ως στατική φάση  $\text{SiO}_2$  και ως διαλύτης έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5). Έτσι, το επιθυμητό πορφυρινικό παράγωγο (12) απομονώνεται ως σκούρο ιώδες στερεό. Απόδοση: 10%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 9.06$  (d,  $J=4.51$  Hz, 6H), 8.85 (m, 8H), 8.46 (d,  $J=8.17$  Hz, 2H), 8.29, 8.17 (m, 8H), 4.12 (s, 3H), -2.90 (s, 2H) ppm.

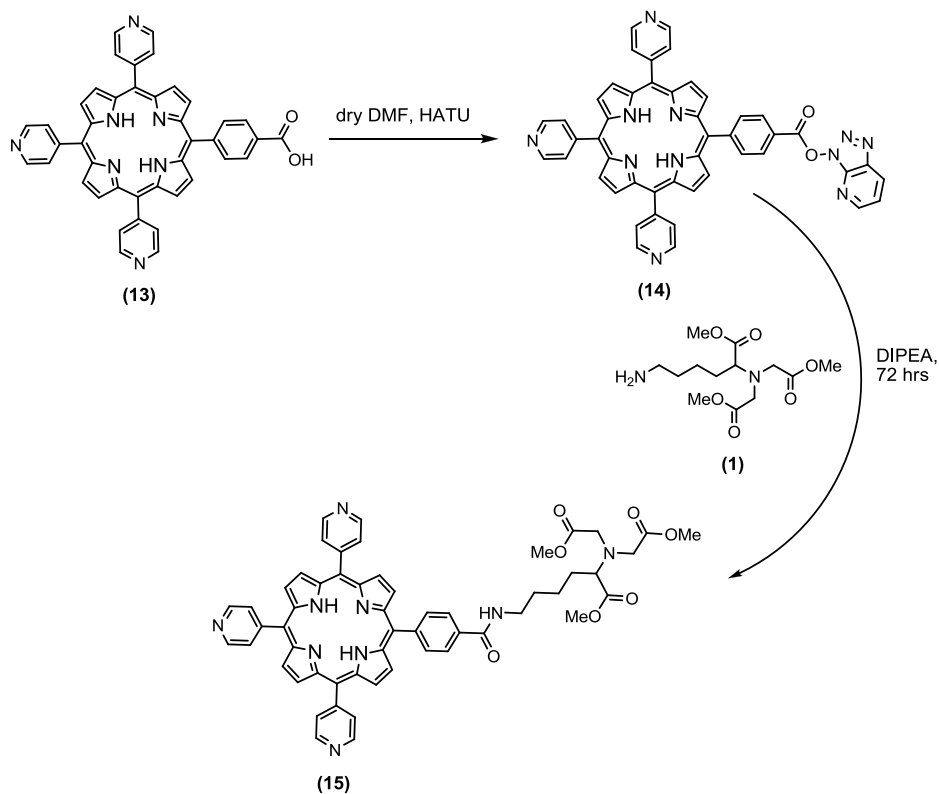
HRMS (MALDI-TOF): calcd for  $\text{C}_{43}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_2$ : 675,24  $[\text{M}]^+$ , found 676,08  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**4.11 Σύνθεση της 4-[10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrin-5-yl]benzoic acid (TriPyP-COOH, 13)**

Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται, αρχικά 100 mg του πορφυρινικού παραγώγου (12) (0.15 mmol) και εν συνεχεία 72 mL THF και 29 mL MeOH. Έπειτα, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα KOH (2.2 gr KOH σε 36 mL H<sub>2</sub>O) το οποίο προστίθεται στη φιάλη της αντίδρασης. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά το πέρασ 24 ωρών, ακολουθεί απόσταξη των διαλυτών MeOH και THF. Κατόπιν, στο μίγμα προστίθενται περίπου 60 mL H<sub>2</sub>O και αφήνεται στους 2 °C για 1 ώρα ώστε να καταβυθιστεί το πορφυρινικό προϊόν ως ίζημα. Ακολούθως, στη φιάλη προστίθεται διάλυμα 3N HCl έως ότου το pH του διαλύματος γίνει ελαφρώς όξινο (pH~ 5.5-6). Ακολουθεί διήθηση του μίγματος και εκπλύσεις του ιζήματος με H<sub>2</sub>O. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν (13) συλλέγεται ως μωβ στερεό Απόδοση: 98 %.

**HRMS (MALDI-TOF):** calcd for C<sub>42</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>: 661,22 [M]<sup>+</sup>, found 662,14 [M+H]<sup>+</sup>.

**4.12 Σύνθεση της dimethyl 2,2'-((1-methoxy-1-oxo-6-(4-(10,15,20-(4-tripyridyl)porphyrin-5-yl)benzamido)hexan-2-yl)azanediy)diacetate (TriPyP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub>, 15**



Σε σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα Ar, μεταφέρονται 80 mgr του πορφυρινικού παραγώγου (13) (0.12 mmol) και 12 mL άνυδρου DMF. Έπειτα, το σύστημα της αντίδρασης τοποθετείται σε παγόλουτρο (0 °C) και ακολουθεί προσθήκη 184 mgr HATU (0.48 mmol). Το διάλυμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 1 ώρα ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου εστέρα (14). Μετά το πέρας της 1 ώρας, στο μίγμα προστίθενται 74.5 mgr NH<sub>2</sub>-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (1) (0.25 mmol) και καταλυτική ποσότητα DIPEA (0.34 mL). Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 72 ώρες. Αφού η αντίδραση ολοκληρωθεί, λαμβάνει χώρα απόσταξη του DMF και της DIPEA και κατόπιν προσθήκη 30 ml Ethyl Acetate για να ακολουθήσουν εκχυλίσεις με 30 ml H<sub>2</sub>O (x2). Τέλος, το επιθυμητό προϊόν (15) απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95:5)) και συλλέγεται ως ιώδες στερεό. Απόδοση: 60%

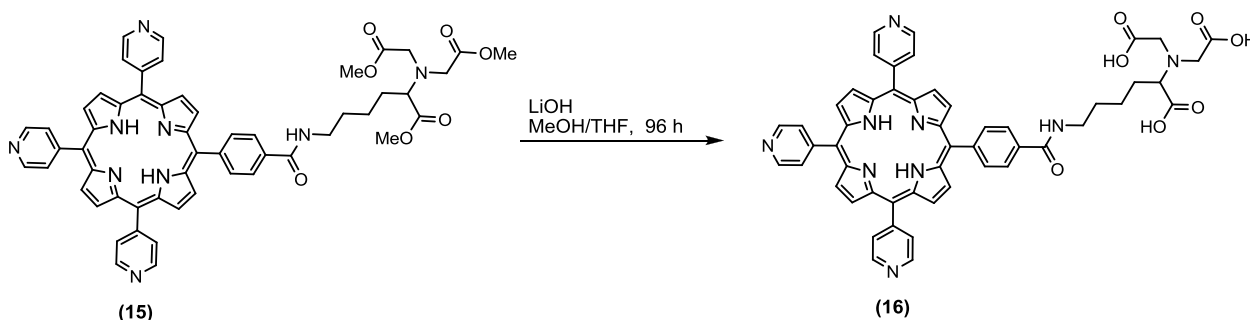
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.05 (m, 6H), 8.85 (m, 8H), 8.27 (m, 4H), 8.16 (m, 6H), 6.99 (t, J=5.27 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.69 (s, 6H), 3.68 (s, 4H), 3.63 (m, 2H),

3.54 (t, 1H), 1.80 (m, 6H), -2.89 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 173.41, 172.15, 167.74, 150.03, 148.51, 144.60, 134.74, 134.64, 131.35, 129.48, 125.83, 120.51, 117.71, 117.47, 64.44, 52.79, 51.90, 51.71, 40.13, 29.84, 28.66, 23.16 ppm.

HRMS (MALDI-TOF): calcd for  $\text{C}_{55}\text{H}_{49}\text{N}_9\text{O}_7$ : 947,38  $[\text{M}]^+$ , found 948,22  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 4.13 Σύνθεση της 2,2'-((1-carboxy-5-(4-(10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrin-5-yl)benzamido)pentyl)azanediy)diacetic acid (TriPyP-Lys-(COOH)<sub>3</sub>, 16)



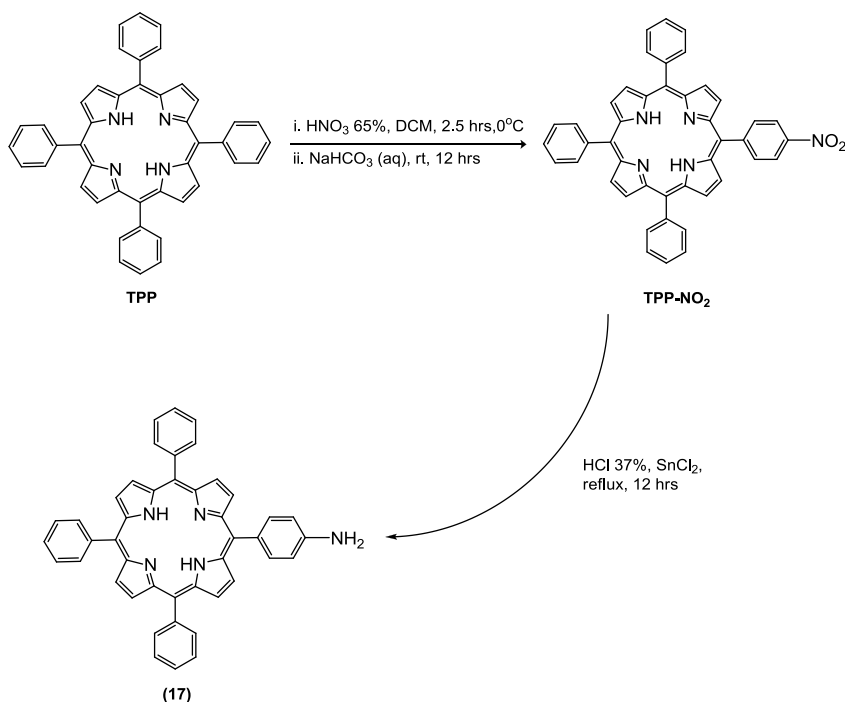
Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL εισάγονται 42 mgr του πορφυρινικού παραγώγου (15) (0.044 mmol), 6.2 mL διαλύτη THF, 149 mgr  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (3.55 mmol) και 6.2 mL MeOH. Το μίγμα αναδεύεται για 10 λεπτά στους 0 °C. Στη συνέχεια, το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση και ήπια θέρμανση (~40 °C) για 96 ώρες. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος TLC ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5)). Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση υδρόλυσης, στη φιάλη προστίθενται ~15 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απόσταξη των διαλυτών MeOH και THF υπό μειωμένη πίεση και κατόπιν, προσθήκη στη φιάλη διαλύματος  $\text{HCl}$  3M για εξουδετέρωση της βάσης (pH~ 3.5-4). Το επιθυμητό προϊόν καταβυθίζεται ως ίζημα και ακολουθεί διήθηση του μίγματος και εκπλύσεις με  $\text{H}_2\text{O}$ . Τέλος, το επιθυμητό προϊόν (16) απομονώνεται και συλλέγεται ως μωβ στερεό. Απόδοση: 96 %.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 9.04 (d,  $J=4.35$  Hz, 6H), 8.90 (m, 8H), 8.84 (t,  $J=5.42$  Hz, 1H), 8.27 (m, 10H), 3.43 (m, 4H), 1.60 (m, 6H), -3.03 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 174.26, 173.13, 166.25, 148.90, 148.41, 143.54, 134.21, 131.75, 129.23, 125.97, 120.29, 117.70, 117.46, 69.35, 62.68, 39.51, 28.75, 24.50, 23.53 ppm.

UV-Vis (DMF):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon/10^3$ ,  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 416.5 (386.0), 512.0 (18.4), 546.0 (6.3), 587.5 (5.8), 643.0 (3.2) nm.

HRMS (MALDI-TOF): calcd for  $\text{C}_{52}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_7$ : 905,33  $[\text{M}]^+$ , found 906,20  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**4.14 Σύνθεση της 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPP-NH<sub>2</sub>, 17)**

Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη εισάγονται 2 gr TPP (3.25 mmol), 300 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και το προκύπτον διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C. Κατόπιν, στη δίλιμη σφαιρική φιάλη προσαρτάται προσθετική φιάλη η οποία περιέχει 8.2 mL HNO<sub>3</sub> 65% και το οξύ προστίθεται στάγδην στο μίγμα της αντίδρασης. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του οξέος, σε διάστημα περίπου 3 ωρών, το παγόλουτρο απομακρύνεται και το σύστημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η εξέλιξη της αντίδρασης σχηματισμού της TPP-NO<sub>2</sub> ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexane (40:60)). Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση, γίνεται προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NaHCO<sub>3</sub> και λαμβάνει χώρα η εξουδετέρωση του οξέος. Στη συνέχεια, η φιάλη αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Μετά το πέρας των 12 ωρών το μίγμα εκχυλίζεται, αρχικά με κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> (1 x 150 mL) και έπειτα με H<sub>2</sub>O (3x 150 mL). Κατόπιν, η οργανική φάση συλλέγεται προς απόσταξη για απομάκρυνση του CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Δίχως περαιτέρω καθαρισμό, πραγματοποιείται η αναγωγή της -NO<sub>2</sub> ομάδας σε -NH<sub>2</sub>. Πιο συγκεκριμένα, το στερεό υπόλειμμα εισάγεται σε σφαιρική φιάλη στην οποία προστίθενται ~ 65 mL HCl 37% και 2 gr SnCl<sub>2</sub> (10.5 mmol). Η φιάλη αφήνεται υπό συνθήκες αναρροής και ανάδευσης για 12 ώρες. Μετά το πέρας των 12 ωρών, το μίγμα στη φιάλη αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί

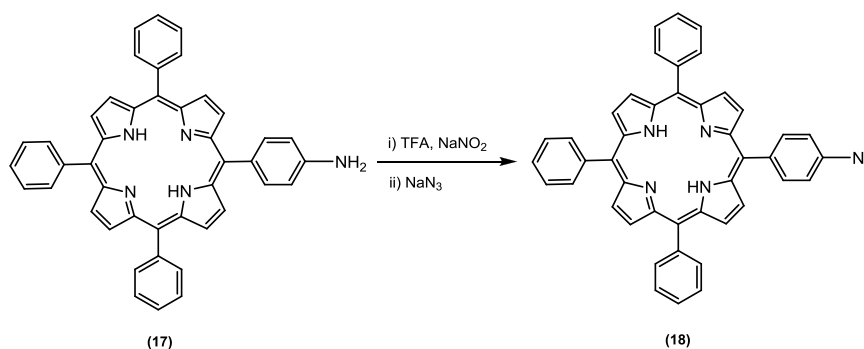
εξουδετέρωση του οξέος με ~ 85 mL υδατικού διαλύματος  $\text{NH}_4\text{OH}$  25%. Στη φιάλη προστίθενται ~ 60 mL  $\text{CHCl}_3$  και το σύστημα αφήνεται υπό συνθήκες αναρροής και ανάδευσης για 12 ώρες. Έπειτα από 12 ώρες, το μίγμα στη φιάλη αφήνεται να ηρεμήσει σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και έπειτα εκχυλίζεται με  $\text{H}_2\text{O}$  (3 x 150 mL). Κατόπιν, η οργανική φάση συλλέγεται προς απόσταξη μέχρι ξηρού. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν (17) απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) και συλλέγεται ως μωβ στερεό. Απόδοση: 31 %.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.95 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 2H), 8.85 (s, 6 H), 8.23 (m, 6H), 8.00 (m, 2H), 7.75 (m, 9H), 7.05 (m, 2H), 3.99 (br. s, 2H), -2.73 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 146.1, 142.4, 135.8, 134.7, 132.5, 131.1, 127.8, 126.8, 121.0, 120.1, 119.9, 113.6 ppm.

HRMS (MALDI-TOF): calcd for  $\text{C}_{44}\text{H}_{31}\text{N}_5$ : 629,26  $[\text{M}]^+$ , found 630,45  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

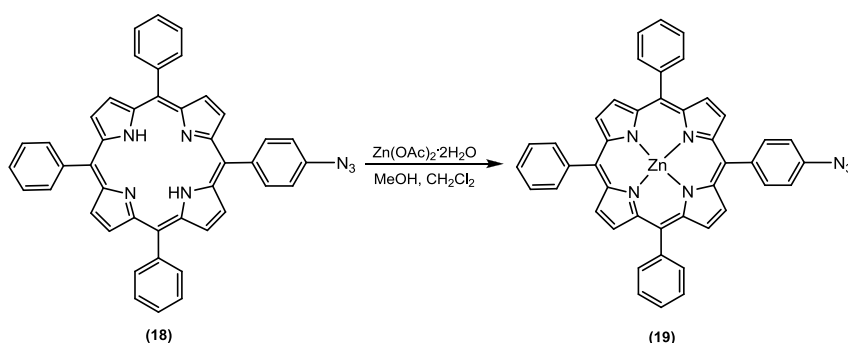
#### 4.15 Σύνθεση της 5-(4-azidophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPP-N<sub>3</sub>, 18)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL εισάγονται 100 mg του πορφυρινικού παραγώγου (17) (0.16 mmol), 1 mL TFA και το προκύπτον διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C. Στο μίγμα προστίθεται στάγδην υδατικό διάλυμα (0.5 mL)  $\text{NaNO}_2$  (30 mg, 0.435 mmol) και το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση για 10 λεπτά στους 0 °C. Μετά το πέρασ 10 λεπτών, στη φιάλη προστίθεται στάγδην υδατικό διάλυμα (0.5 mL)  $\text{NaN}_3$  (50 mg, 0.769 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση τους 0 °C για 45 λεπτά. Αφού τα 45 λεπτά ολοκληρωθούν, στη φιάλη της αντίδρασης προστίθενται 30 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και το διάλυμα μεταφέρεται σε εκχυλιστική χωάνη των 250 mL. Κατόπιν, στην εκχυλιστική χωάνη προστίθενται με προσοχή 30 mL υδατικού διαλύματος  $\text{NaHCO}_3$  και ακολουθεί ήπια ανάδευση του μίγματος. Έπειτα, ακολουθούν εκχυλίσεις (x3) με προσοχή καθώς πραγματοποιείται ταυτόχρονη εξουδετέρωση του μίγματος λόγω του TFA. Στην οργανική φάση που συλλέγεται

προστίθεται ποσότητα ξηραντικού  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  κατάλληλη ώστε να δεσμεύσει την υγρασία που μπορεί να υπάρχει στο διάλυμα και ακολουθεί διήθηση. Το διήθημα συλλέγεται προς απόσταξη μέχρι ξηρού. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν (18) απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Hexane}$  (50:50)) και συλλέγεται ως ιώδες στερεό. Απόδοση: 80 %.

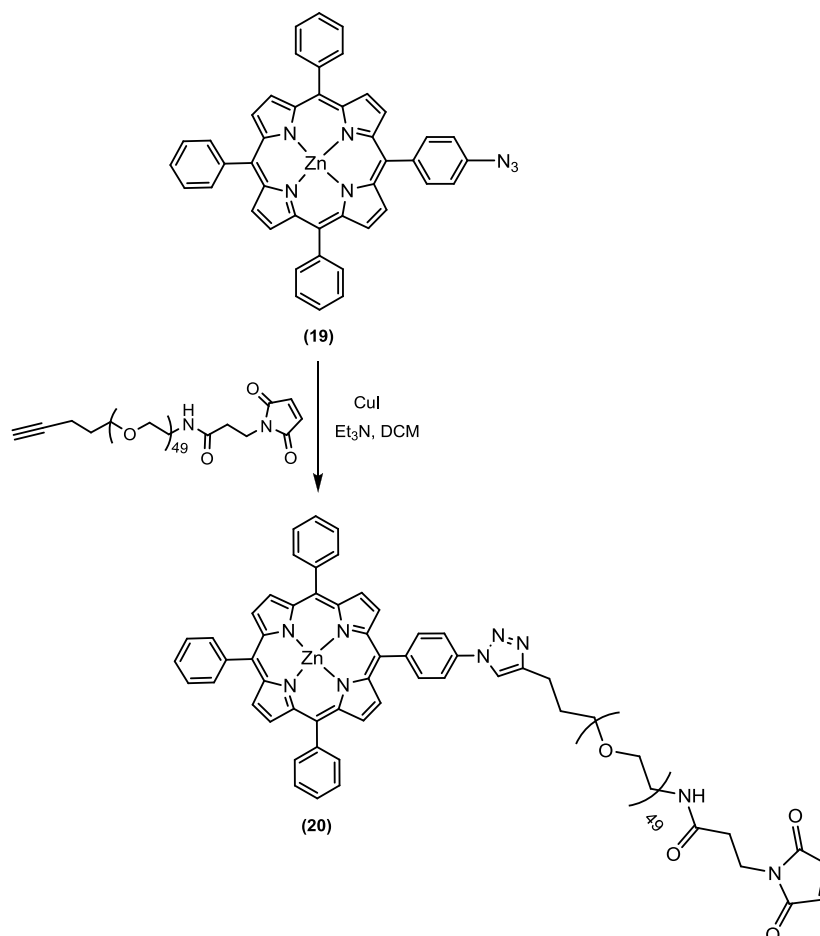
#### **4.16 Σύνθεση της [5-(4-azidophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrinato]zinc (Zn-TPP-N<sub>3</sub>, 19)**



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, 50 mgr του πορφυρινικού παραγώγου (18) (0.076 mmol) διαλύονται σε ~15 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (167 mgr, 0.76 mmol) σε MeOH (2.75 mL). Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών, στη φιάλη προστίθενται ~30 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρεται σε εκχυλιστική χοάνη όπου πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 30 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται προς απόσταξη μέχρι ξηρού. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν (19) απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Hexane}$  (60:40)) και συλλέγεται ως ιώδες στερεό. Απόδοση: 90 %.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.95 (m, 8H), 8.21 (m, 8H), 7.76 (m, 9H), 7.38 (d,  $J$  = 7.60 Hz, 2H) ppm.



**4.17 Σύνθεση της porphyrin-polyethylene glycol dyad (Zn-TPP-PEG-MAL, 20)**

Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα Ar, 11 mgr του πορφυρινικού παραγώγου (19) (0.042 mmol) διαλύονται σε άνυδρο απαερωμένο CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (~5 mL). Κατόπιν, προστίθενται 6 mol % CuI, Et<sub>3</sub>N (0.3 mL) και 30 mgr Alkyne-PEG-Maleimide<sub>2000</sub> (0.015 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος TLC (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95:5)). Στη συνέχεια, στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται υδατικό διάλυμα EDTA (0.1 M) και ακολουθούν εκχυλίσεις με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Η οργανική φάση συλλέγεται προς απόσταξη μέχρι ξηρού. Κατόπιν, το ακατέργαστο στερεό ξεπλένεται με diethyl ether και διηθείται υπό κενό. Το κατακρημνισθέν ιώδες στερεό Zn-TPP-PEG-MAL (20) απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης (SiO<sub>2</sub>, διαλύτης έκλουσης: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95:5) και έπειτα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (85:15)).

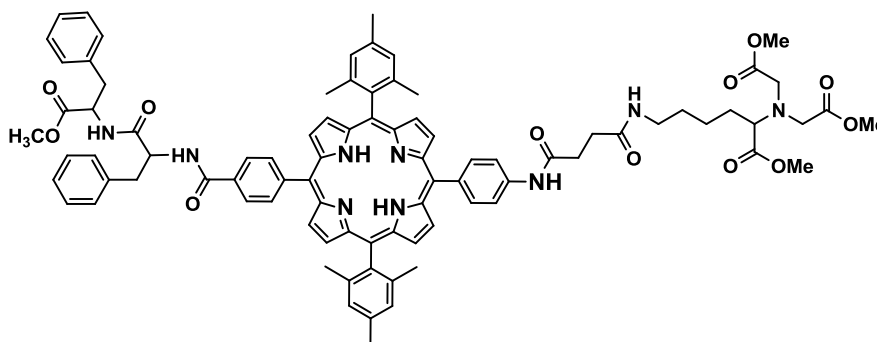
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 8.93, 8.91, 8.89, 8.87, 8.34, 8.32, 8.30, 8.21, 8.20, 8.03, 8.01, 7.96, 7.94, 7.83, 7.75, 6.69, 6.68, 6.46, 6.35, 3.63-3.44 ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 174.44, 171.62, 171.14, 150.36, 149.90, 146.32, 144.50, 143.78, 143.16, 135.54, 134.63, 134.12, 133.27, 132.33, 132.13, 131.46, 129.88, 127.58, 126.66, 121.40, 121.27, 119.41, 119.37, 119.22, 119.18, 118.96, 118.57, 118.42, 70.65, 70.60, 70.48 ppm.

HRMS (MALDI-TOF): calcd for Zn-TPP-PEG-MAL: 3109  $[\text{M}]^+$ , found 3109  $[\text{M}]^+$ .

## Κεφ.5 Ανάλυση & συζήτηση αποτελεσμάτων

### 5.1 Χαρακτηρισμός και μελέτη αυτο-οργάνωσης της πορφυρίνης FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub>



FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11)

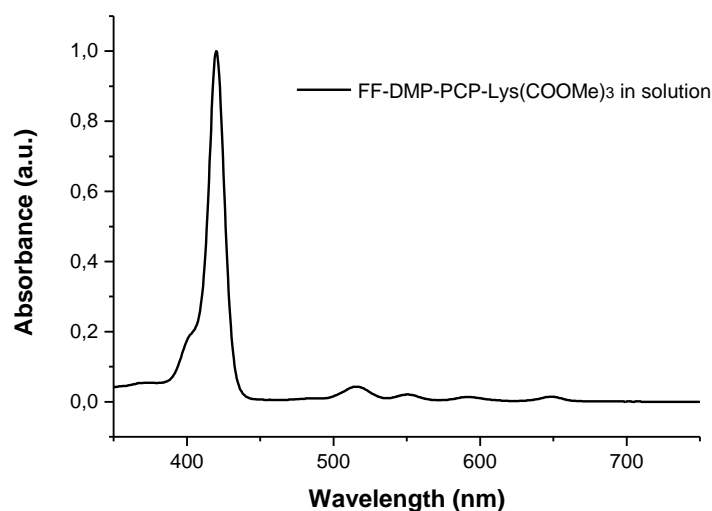
Η επιτυχής σύνθεση της τελικής τριάδας διφαινυλαλανίνης-πορφυρίνης-λυσίνης (11) επιβεβαιώθηκε μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (<sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C), της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF. Η αρχική ένδειξη σχετικά με τον σχηματισμό του τελικού προϊόντος προήλθε από το φάσμα μάζας του. Ειδικότερα, το μοριακό βάρος της FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11) είναι 1452.69 g/mol ενώ η κορυφή που παρατηρείται στο καταγεγραμμένο φάσμα μάζας βρέθηκε στα 1452.13. Η κορυφή αυτή αναφέρεται στο πειραματικό Μοριακό Ιόν [M+H]<sup>+</sup> το οποίο προκύπτει έπειτα από πρωτονίωση του θεωρητικού Μοριακού Ιόντος [M]<sup>+</sup> που έχει υπολογιστεί στα 1451.66. Το φάσμα μάζας της τελικής τριάδας (**Σχήμα S8**) παρατίθεται στο παράρτημα όπως και τα φάσματα μάζας MALDI-TOF όλων των ενδιάμεσων σταδίων.

Τα φάσματα NMR τόσο του επιθυμητού προϊόντος (11) όσο και όλων των ενδιάμεσων παρουσιάζονται στο παράρτημα (**Σχήματα S27-S52**) ενώ η πλήρης αποτίμησή τους δίνεται στο πειραματικό μέρος. Με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR επιβεβαιώνεται η επιτυχής αμιδική σύζευξη της πορφυρίνης με τη διφαινυλαλανίνη καθώς και μέσω γέφυρας σύζευξης με τη λυσίνη. Ειδικότερα, στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR της FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11) (**Σχήμα S48**) εντοπίζονται τέσσερις χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στα -NH πρωτόνια των τεσσάρων συνολικά αμιδικών δεσμών που απαντώνται στην ένωση-στόχο. Η αμιδική

σύζευξη της πορφυρίνης με τη διφαινυλαλανίνη επιβεβαιώνεται με την παρουσία της διπλής κορυφής στα 7.05 ppm η οποία αντιστοιχεί στο –NH πρωτόνιο του συγκεκριμένου αμιδικού δεσμού. Η απλή κορυφή που εντοπίζεται στα 9.41 ppm του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της τελικής τριάδας αντιστοιχεί στο –NH πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού που σχηματίζεται μεταξύ της πορφυρίνης και της γέφυρας σύζευξης με τη λυσίνη. Οι κορυφές των δύο επιπλέον αμιδικών πρωτονίων του τελικού προϊόντος-στόχου εντοπίζονται στα 6.44 (διπλή) και 6.50 ppm (τριπλή) και ανήκουν στον αμιδικό δεσμό μεταξύ των μονάδων φαινυλαλανίνης που συγκροντούν το διπεπτίδιο της FF και στον αμιδικό δεσμό που σχηματίζεται μεταξύ της λυσίνης και της γέφυρας σύζευξης της με την πορφυρίνη, αντίστοιχα.

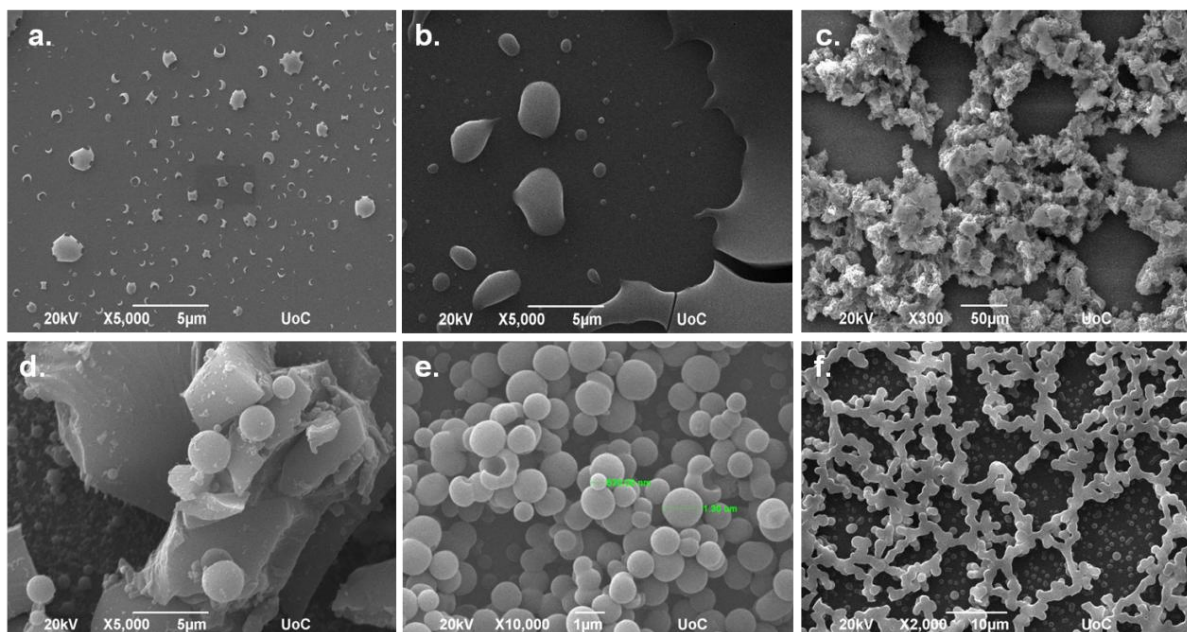
Στο φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11) που παρατίθεται στο παράρτημα (**Σχήμα S50**) διακρίνονται στα 172.97, 171.36, 170.50 και 167.30 ppm οι κορυφές που ανήκουν στους καρβονυλικούς άνθρακες των αμιδικών δεσμών (C<sub>40</sub>, C<sub>37</sub>, C<sub>21</sub> και C<sub>13</sub> αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, στο φάσμα αυτό εντοπίζονται στα 173.27 και 172.07 ppm οι κορυφές των καρβονυλικών ανθράκων (C<sub>50</sub> και C<sub>48</sub> αντίστοιχα) που οφείλονται στις εστερικές ομάδες της λυσίνης, ενώ στα 171.29 ppm βρίσκεται η κορυφή του καρβονυλικού άνθρακα της εστερομάδας της διφαινυλαλανίνης (C<sub>29</sub>). Στο ίδιο φάσμα, οι κορυφές που διακρίνονται στα 51.81 και 51.52 ppm (C<sub>49</sub> και C<sub>51</sub> αντίστοιχα), οφείλονται στην παρουσία των μεθυλικών ομάδων (–CH<sub>3</sub>) του τριεστέρα της λυσίνης. Ο επιτυχής σχηματισμός της τελικής τριάδας επιβεβαιώθηκε περαιτέρω μέσω της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων (2D) με τη χρήση πειραμάτων COSY, HSQC και HMBC.

Περαιτέρω χαρακτηρισμός της τελικής πορφυρινικής τριάδας με διφαινυλαλανίνη και λυσίνη πραγματοποιήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) σε διάλυμα (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Στο **Σχήμα 5.1** που ακολουθεί παρατίθεται το φάσμα απορρόφησης UV-Vis της ένωσης-στόχου (11) το οποίο αποτελεί ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα απορρόφησης ελεύθερης πορφυρίνης. Ειδικότερα, παρατηρείται η Soret ταινία στα 420 nm περίπου, καθώς και οι τέσσερις Q ταινίες στην περιοχή 500-650 nm περίπου.



**Σχήμα 5.1** Φάσμα απορρόφησης UV-Vis (normalized) της ένωσης FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub>.

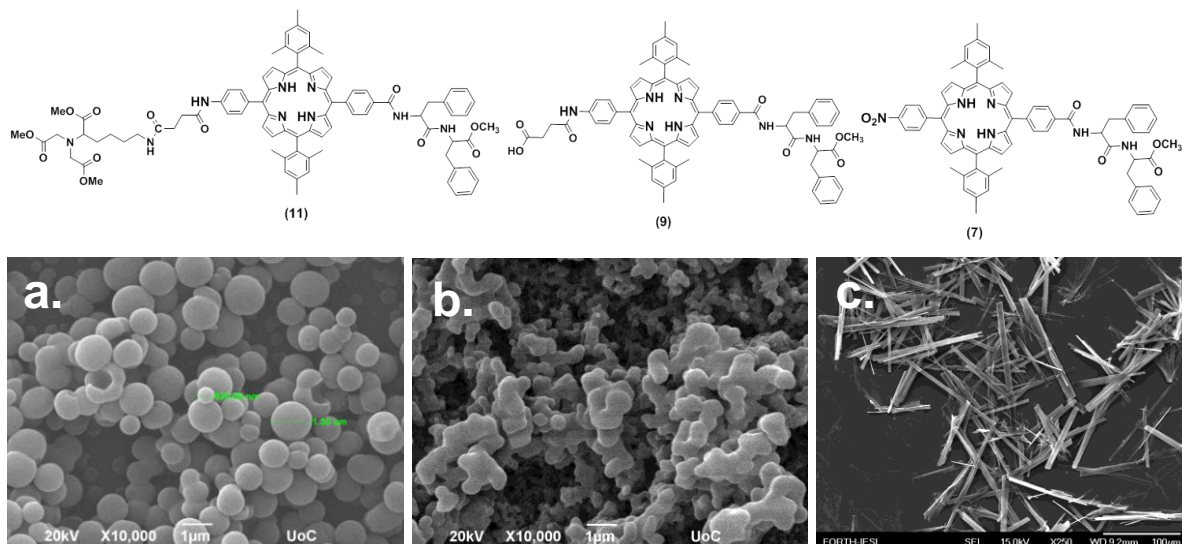
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η συμπεροφορά αυτο-οργάνωσης της τριάδας FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11) μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM). Για την παρασκευή των δειγμάτων προς ανάλυση, η τελική ένωση (11) διαλύθηκε σε ένα χαοτροπικό διαλύτη (chaotropic solvent) όπως είναι το διχλωμεθάνιο (DCM) ή η 1,1,1,3,3,3-εξαφθορο-2-προπανόλη (HFIP) και ακολούθως αραιώθηκε με τον διαλύτη που επάγει την αυτο-οργάνωση. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν έξι συστήματα που περιλάμβαναν τα εξής μίγματα διαλυτών: a) HFIP/Methanol (2:8), b) HFIP/H<sub>2</sub>O (2:8), c) HFIP/H<sub>2</sub>O (1:1), d) DCM/Heptane (2:8), e) DCM/ethanol (2:8) και f) DCM/Methanol (1:1). Η τελική συγκέντρωση της FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11) σε όλα τα μίγματα διαλυτών ήταν 1mM. Τα έξι δείγματα αφέθηκαν 24 ώρες για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου.



**Σχήμα 5.2** Μοτίβα αυτο-οργανωμένων δομών της FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> : a. HFIP/Methanol (2:8), b. HFIP/H<sub>2</sub>O (2:8), c. HFIP/H<sub>2</sub>O (1:1), d. DCM/Heptane (2:8), e. DCM/Ethanol (2:8) και f. DCM/Ethanol (1:1).

Όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 5.2**, στα περισσότερα συστήματα διαλυτών οι σχηματιζόμενες νανοδομές δεν αυτο-οργανώνονται με κάποιο καθορισμένο μοτίβο. Παρόλα αυτά, στην περίπτωση του συστήματος όπου στο μίγμα περιέχεται 20% διχλωρομεθάνιο (DCM) και 80% εθανόλη (Ethanol) παρατηρείται ο σχηματισμός αυτο-οργανωμένων νανοσωματιδίων με σφαιρικό σχήμα και διάμετρο 500 nm-1 μm περίπου. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σφαιρικές νανοδομές έχουν παρατηρηθεί ξανά στο παρελθόν για υβριδικά μόρια πορφυρίνης-FF σε διαφορετικές συνθήκες διαλυτών.<sup>55,57</sup> Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το διπεπτιδίο FF διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αυτο-οργάνωση των συζευγμένων με διφαινυλαλανίνη πορφυρινών.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της παρουσίας της λυσίνης καθώς και της γέφυρας σύζευξης της με την πορφυρίνη στην αυτο-οργάνωση του τελικού προϊόντος (11) πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης Εκπομπής Πεδίου (FESEM) για τα προϊόντα των δύο προηγούμενων σταδίων σύνθεσης. Ειδικότερα, μελετήθηκε η συμπεροφορά αυτο-οργάνωσης των προφυρινικών παραγώγων FF-DMP-PCP Acid (9) και FF-DMP-NO<sub>2</sub> (7) στο σύστημα διαλυτών DCM/Ethanol (2:8), όπου η τελική συγκέντρωση της εκάστοτε προφυρίνης ήταν 1mM.



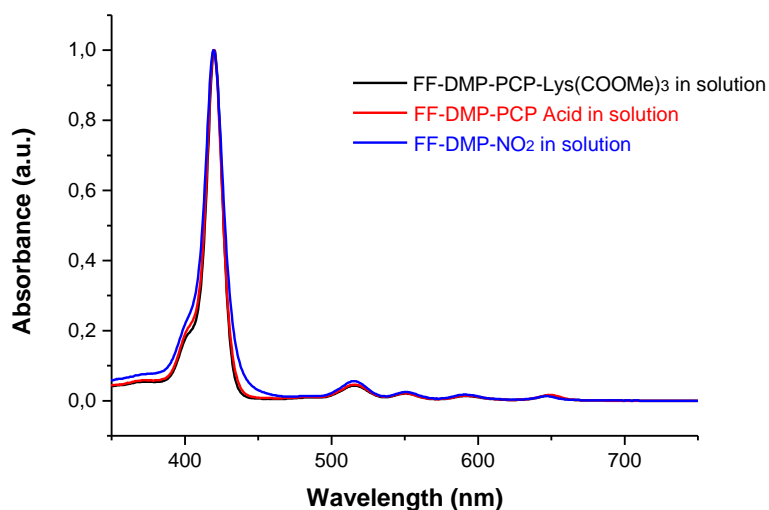
**Σχήμα 5.3** Μοτίβα αυτο-οργανωμένων δομών των: a. FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub>, b. FF-DMP-PCP Acid και c. FF-DMP-NO<sub>2</sub> σε DCM/Ethanol (2:8).

Όπως διαπιστώνεται από την ανάλυση της Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM και FESEM), τα μοτίβα των αυτο-οργανωμένων νανοδομών των τριών ενώσεων που μελετήθηκαν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους (**Σχήμα 5.3**). Στην περίπτωση της τριάδας διφαινυλαλανίνης-πορφυρίνης-λυσίνης FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11), όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παρατηρείται ο σχηματισμός σφαιρικών νανοδομών, ενώ στην περίπτωση της FF-DMP-PCP Acid (9) απουσία λυσίνης προκύπτει ο σχηματισμός νανοδομών ακαθόριστης μορφής. Σε αντίθεση με την περίπτωση της FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11) όπου σχηματίζονται σφαιρικές νανοδομές, το πορφυρινικό παράγωγο της FF-DMP-NO<sub>2</sub> (7) στο οποίο η πορφυρίνη είναι συζευγμένη μέσω αμιδικού δεσμού μόνο με το διπεπτίδιο FF παρατηρείται ο σχηματισμός νανοσωλήνων. Συγκρίνοντας, τα μοτίβα των αυτο-οργανωμένων νανοδομών των τριών ενώσεων επιβεβαιώνεται ότι η παρουσία τόσο των πεπτιδικών ομάδων (δεσμοί υδρογόνου) όσο και των εκτεταμένων π-συζυγιακών συστημάτων που επάγουν επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις (όπως π-π stacking), επηρεάζει έντονα τον τρόπο της αυτο-οργάνωσης.

Για τη μελέτη των ιδιοτήτων των αυτο-οργανωμένων πορφυρινών που έχουν συζευχθεί με αμινοξέα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες απορρόφησης σε διάλυμα καθώς και σε στερεά κατάσταση κατόπιν αυτο-οργάνωσης. Λόγω των διαφόρων μορφολογιών των νανοδομών αναμένονται διαφορετικά φασματικά χαρακτηριστικά των δοκιμασμένων παραγώγων ως αποτέλεσμα των διακριτών ηλεκτρονικών και



στερεοχημικών ιδιοτήτων τους.<sup>118</sup> Τα φάσματα UV/Vis όλων των ενώσεων σε διάλυμα διχλωρομεθανίου ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) αποτελούνται από μια ισχυρή ταινία Soret και τέσσερις ταινίες Q που είναι χαρακτηριστικές για τις πορφυρίνες ελεύθερης βάσης (**Σχήμα 5.4**).



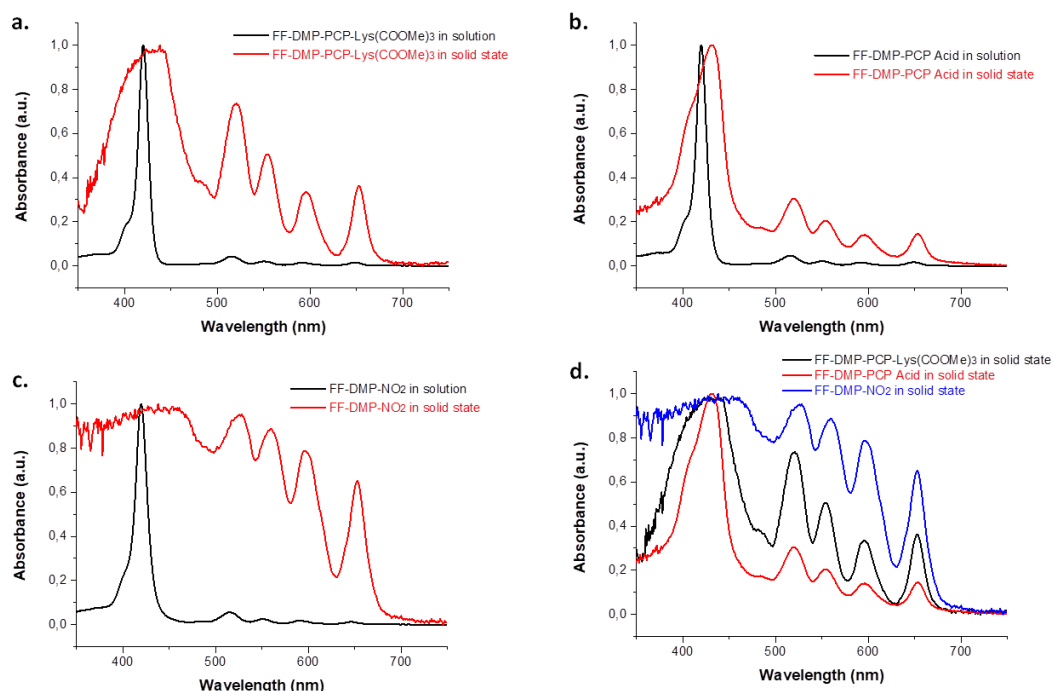
**Σχήμα 5.4** Φάσματα απορρόφησης UV-Vis (normalized) των ενώσεων: FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (μαύρη γραμμή), FF-DMP-PCP Acid (κόκκινη γραμμή), FF-DMP-NO<sub>2</sub> (μπλε γραμμή).

Στη στερεά κατάσταση των αυτο-οργανωμένων νανοδομών, οι ταινίες απορρόφησης μετατοπίζονται βαθοχρωμικά, δίνοντας σαφείς ενδείξεις για το σχηματισμό συσσωματωμάτων (*j* aggregates). Επιπρόσθετα, τα φάσματα των αυτο-οργανωμένων πορφυρινικών παραγώγων σε στερεά κατάσταση παρατηρούνται σημαντικά διευρυμένα σε σχέση με τα φάσματα των ίδιων παραγώγων σε διάλυμα, τα οποία φαίνεται να βρίσκονται σε μονομερική μορφή. Μέσω της σύγκρισης των φασμάτων απορρόφησης των τριών ενώσεων, διαπιστώνεται ότι η παρουσία της γέφυρας σύζευξης της πορφυρίνης με τη λυσίνη στο παράγωγο (9) “καταστρέφει” τους νανοσωλήνες μεγάλου μεγέθους που σχηματίζονται κατά την αυτο-οργάνωση της FF-DMP-NO<sub>2</sub> (7) (**Σχήμα 5.5**). Αντίθετα, η σύζευξη του τριεστέρα της λυσίνης στο πορφυρινικό παράγωγο (9) επάγει το σχηματισμό σφαιρικών νανοσωματιδίων καθώς οδηγεί σε ένα ισχυρότερο μοτίβο πακεταρίσματος στην κατάσταση συσσωμάτωσης. Παράλληλα, η πιθανότητα σχηματισμού πολλαπλών δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις -NH ομάδες του πορφυρινικού δακτυλίου και των αμιδικών δεσμών και στις –



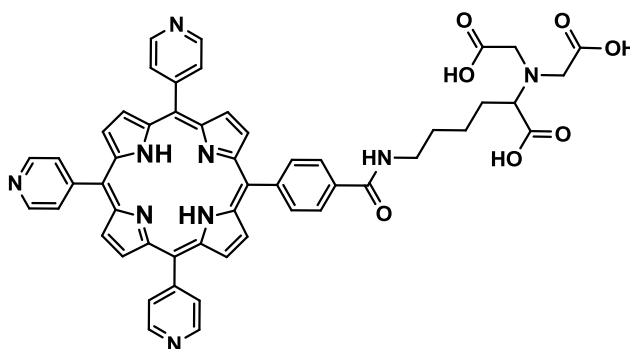
C=O ομάδες που φέρουν οι αμιδικοί και οι εστερικοί δεσμοί, ενισχύει το πακετάρισμα των πορφυρινικών παραγώγων μεταξύ τους.

Είναι γνωστό από πολυάριθμες μελέτες σχετικά με την αυτο-οργάνωση βακτηριοχλωροφυλλών c, d και e, συνθετικών χλωροφυλλών<sup>119</sup> καθώς και απλούστερων αναλόγων τους<sup>120,121</sup> ότι η διαδικασία της αυτο-οργάνωσής τους οδηγεί σε σημαντική αύξηση της έντασης των Q ταινιών. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται για τις χρωστικές FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub>, FF-DMP-PCP Acid και FF-DMP-NO<sub>2</sub> και λειτουργεί ως πρόσθετη απόδειξη της ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ των χρωμοφώρων.



**Σχήμα 5.5** Φάσματα απορρόφησης UV-Vis (normalized) των: a) FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (μονομερική μορφή) σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (μαύρη γραμμή) και (αυτο-οργανωμένη μορφή) σε στερεά κατάσταση (κόκκινη γραμμή), b) FF-DMP-PCP Acid (μονομερική μορφή) σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (μαύρη γραμμή) και (αυτο-οργανωμένη μορφή) σε στερεά κατάσταση (κόκκινη γραμμή), c) FF-DMP-NO<sub>2</sub> (μονομερική μορφή) σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (μαύρη γραμμή) και (αυτο-οργανωμένη μορφή) σε στερεά κατάσταση (κόκκινη γραμμή), d) FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (μαύρη γραμμή), FF-DMP-PCP Acid (κόκκινη γραμμή) και FF-DMP-NO<sub>2</sub> (μπλε γραμμή) σε στερεά κατάσταση.

## 5.2 Χαρακτηρισμός και μελέτη της πορφυρίνης TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> στη φθορίζουσα σήμανση πεπτιδίου



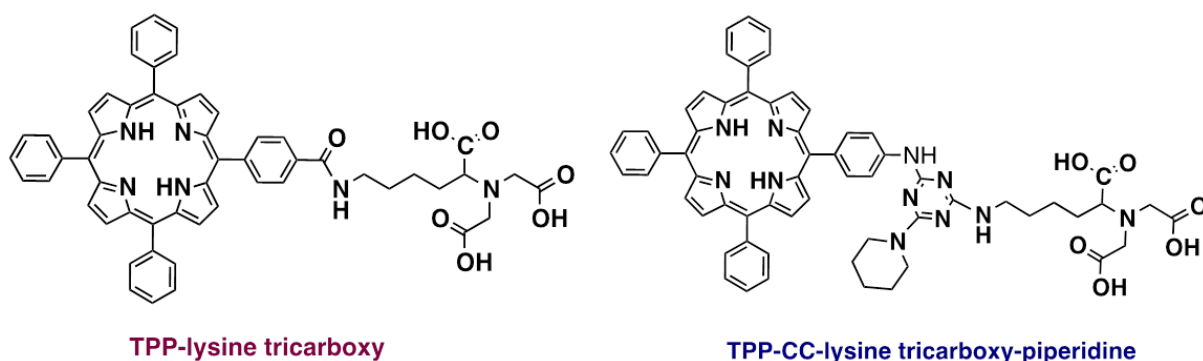
TriPyP-Lys(COOH)<sub>3</sub>

Η επιτυχής σύνθεση της δυάδας πορφυρίνης-λυσίνης-NTA (16) επιβεβαιώθηκε μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (<sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C), της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), της φασματοσκοπίας φθορισμού καθώς και μέσω μετρήσεων του χρόνου ημιζωής διεγερμένης κατάστασης. Η αρχική πληροφορία σχετικά με τον επιτυχή σχηματισμό του τελικού προϊόντος προήλθε από το φάσμα <sup>1</sup>H NMR το οποίο παρουσιάζεται στο παράρτημα όπως και όλων των ενδιάμεσων ενώσεων (**Σχήματα S53-S63**) ενώ η πλήρης αποτίμησή τους δίνεται στο πειραματικό μέρος. Πιο συγκεκριμένα, η σύζευξη της πορφυρίνης με τη λυσίνη επιβεβαιώνεται από την παρουσία της τριπλής κορυφής στα 8.84 ppm του φάσματος (**Σχήμα S61**) που ανήκει στο -NH πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού.

Στο φάσμα <sup>13</sup>C NMR της TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (16) που παρατίθεται στο παράρτημα (**Σχήμα S63**), διακρίνεται στα 166.25 ppm η κορυφή που αντιστοιχεί στον καρβονυλικό άνθρακα (C<sub>10</sub>) του αμιδικού δεσμού. Ακόμη, στο φάσμα αυτό εντοπίζονται στα 174.26 και 173.13 ppm οι κορυφές των καρβονυλικών ανθράκων (C<sub>18</sub> και C<sub>19</sub> αντίστοιχα) που ανήκουν στις καρβοξυλικές ομάδες της λυσίνης. Ο επιτυχής σχηματισμός της δυάδας TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (16) επιβεβαιώθηκε περαιτέρω μέσω της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων (2D) με τη χρήση πειραμάτων COSY, ROESY και HSQC.

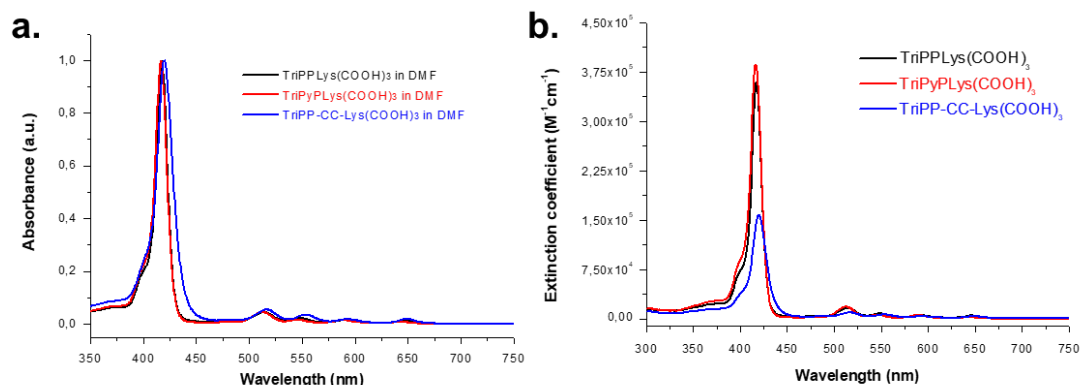
Στη συνέχεια, ακολούθησαν μελέτες απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), φθορισμού και χρόνου ημιζωής διεγερμένης κατάστασης για τον περαιτέρω

χαρακτηρισμό του πορφυρινικού προϊόντος που φέρει πυρίδουλ-ομάδες TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (16) σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν σε σύγκριση με δύο ακόμη πορφυρινικές δυάδες που φέρουν φαίνυλ-ομάδες και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τρόπο σύζευξης με τη λυσίνη-NTA. Στην περίπτωση της TriPPLys(COOH)<sub>3</sub>, η σύζευξη της πορφυρίνης με τη λυσίνη πραγματοποιείται απευθείας μέσω αμιδικού δεσμού ενώ στην περίπτωση της TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> η πορφυρίνη συνδέεται με τη λυσίνη-NTA μέσω μιας γέφυρας τριαζίνης που φέρει πιπεριδίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δύο αυτές πορφυρινικές δυάδες έχουν συντεθεί παλαιότερα στο εργαστήριο βιοανόργανης χημείας και χαρακτηρίστη με τη χρήση της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF και της φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C NMR στις μη υδρολυμένες μορφές. Τόσο τα φάσματα μάζας (**Σχήματα S1-S2**) των τελικών δυάδων όσο και τα φάσματα NMR (**Σχήματα S14-S24**) των εστερικών, μη υδρολυμένων πορφυρινικών παραγώγων παρατίθενται στο παράρτημα.



Στο **Σχήμα 5.6** που ακολουθεί απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) καθώς και τα φάσματα του συντελεστή απορροφητικότητας των τριών πορφυρινικών δυάδων με λυσίνη που περιγράφηκαν παραπάνω σε διάλυμα (DMF). Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των δυάδων όπου η πορφυρίνη συνδέεται με τη λυσίνη μέσω αμιδικού δεσμού (TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> και TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>) τα φάσματα που παρατίθενται αποτελούν χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης πορφυρινών ελεύθερης βάσης. Αντίθετα, στην περίπτωση της δυάδας όπου η πορφυρίνη συνδέεται με τη λυσίνη μέσω της γέφυρας τριαζίνης, το φάσμα απορρόφησης παρουσιάζεται βαθοχρωμικά μετατοπισμένο και ελαφρώς διευρυμένο σε σχέση τα φάσματα των δυάδων που φέρουν αμιδικό δεσμό. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην γέφυρα τριαζίνης με πιπεριδίνη η οποία εξαιτίας του

φαινομένου της αρωματικότητας και της παρουσίας των αζώτων ενδεχομένως επάγει το σχηματισμό συσσωματωμάτων μικρού μεγέθους και πληθυσμού.



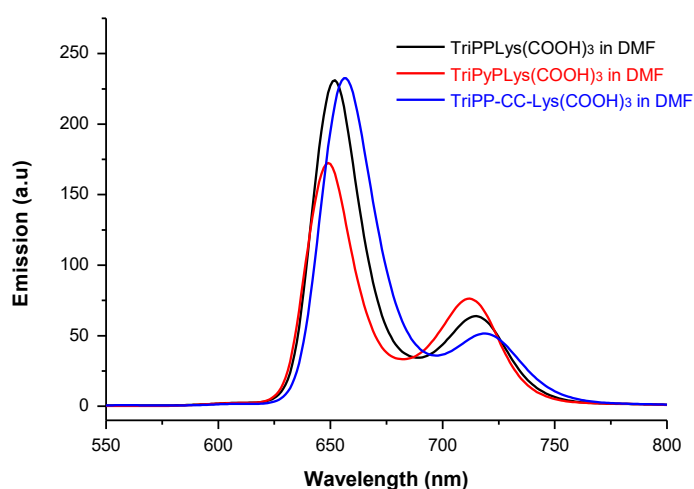
**Σχήμα 5.6** α. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis (normalized) των ενώσεων: TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> (μαύρη γραμμή), TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (κόκκινη γραμμή) και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> (μπλε γραμμή). β. Διαγράμματα συντελεστή απορροφητικότητας των ενώσεων: TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> (μαύρη γραμμή), TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (κόκκινη γραμμή) και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> (μπλε γραμμή).

Επιπλέον, στα φάσματα του συντελεστή απορροφητικότητας εκτός από τη μικρή μετατόπιση και διεύρυνση των κορυφών παρατηρείται μείωση της απορρόφησης για την TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> σε αντίθεση με τα άλλα δύο πορφυρινικά παράγωγα. Αυτή η διαφοροποίηση επιβεβαιώνεται και από τις μετρήσεις ε που προέκυψαν για τις 3 ενώσεις σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Οι μετρήσεις ε πραγματοποιήθηκαν με την εξίσωση Beer-Lambert  $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ , όπου b η οπτική διαδρομή. Στον πίνακα που ακολουθεί, παρατίθενται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις απορρόφησης UV-Vis των ενώσεων TriPPLys(COOH)<sub>3</sub>, TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> σε διαλύτη DMF (Πίνακας 5.1).

**Πίνακας 5.1** Σύνοψη των φασματοσκοπικών δεδομένων για τις πορφυρινικές δυάδες με λυσίνη TriPPLys(COOH)<sub>3</sub>, TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub>.

Porphyrin	Soret band $\lambda_{max}$	Q bands $\lambda_{max}$ ( $\epsilon/10^3 M^{-1} cm^{-1}$ )			
	( $\epsilon/10^3 M^{-1} cm^{-1}$ )	Q <sub>(1,0)</sub>	Q <sub>(0,0)</sub>	Q <sub>(0,1)</sub>	Q <sub>(0,0)</sub>
TriPPLys(COOH) <sub>3</sub>	417.5 (359.5)	513.5 (16.3)	548.0 (8.2)	590.0 (5.4)	645.5 (5.1)
TriPyPLys(COOH) <sub>3</sub>	416.5 (386.0)	512.0 (18.4)	546.0 (6.3)	587.5 (5.8)	643.0 (3.2)
TriPP-CC-Lys(COOH) <sub>3</sub>	420.0 (157.9)	516.0 (9.6)	553.0 (6.5)	592.5 (3.8)	648.5 (4.0)

Περαιτέρω φωτοφυσικές μελέτες των τριών δυάδων πορφυρίνης-λυσίνης πραγματοποιήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού (fluorescence spectroscopy). Στο **Σχήμα 5.7** που παρατίθεται ακολούθως, παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής των TriPPLys(COOH)<sub>3</sub>, TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> σε διαλύματα ίσης απορρόφησης ( $A=0,1$  στα 515 nm) με διαλύτη DMF. Όπως παρατηρείται, έπειτα από φωτοδιέγερση των τριών ενώσεων, προκύπτουν δύο σήματα εκπομπής σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (περίπου στα 650 και 720 nm) χαρακτηριστικά για το φθορισμό των πορφυρινών ελεύθερης βάσης.

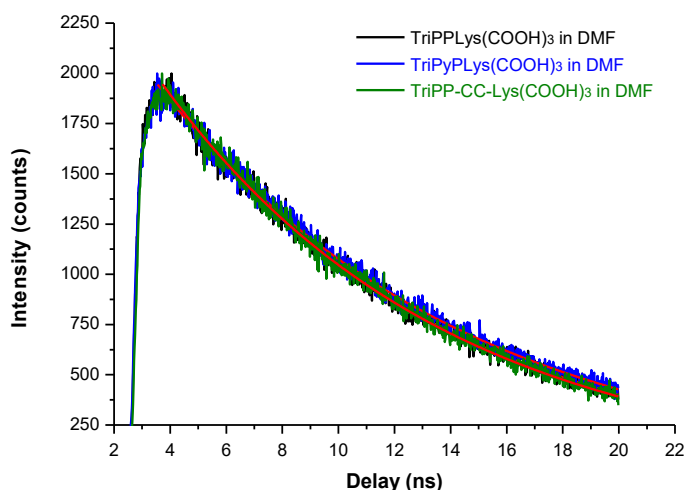


**Σχήμα 5.7** Φάσματα εκπομπής σε διαλύματα ίσης απορρόφησης ( $0,1 A$  στα 515 nm) των ενώσεων: TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> (μαύρη γραμμή), TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (κόκκινη γραμμή) και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> (μπλε γραμμή).

Κατόπιν, για να προσδιοριστεί η κβαντική απόδοση των τριών πορφυρινικών δυάδων με λυσίνη, χρησιμοποιήθηκε η TPP (Tetraphenylporphyrin) ως ένωση αναφοράς. Συγκρίνοντας τις τιμές του συντελεστή κβαντικής απόδοσης ( $\Phi$ ) των τριών πορφυρινών, παρατηρείται ότι και οι τρεις έχουν παραπλήσιες κβαντικές αποδόσεις πολύ κοντά στην τιμή της ένωσης αναφοράς ( $\Phi_{TPP}=0,11$  σε DMF). Μικρή απόκλιση από την τιμή της κβαντικής απόδοσης που αφορά την TPP (ένωση αναφοράς) φαίνεται να παρουσιάζει η TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> λόγω της διαφορετικής υποκατάστασης του πορφυρινικού δακτυλίου με πυρίδουλ-ομάδες.

Ακολούθησαν μετρήσεις του χρόνου ημιζωής διεγερμένης κατάστασης για τις τρεις πορφυρινικές ενώσεις σε διαλύτη DMF. Πιο ειδικά, στο ακόλουθο σχήμα (**Σχήμα 5.8**)

απεικονίζονται τα φάσματα του χρόνου αποδιέγερσης των τριών δυάδων πορφυρίνης-λυσίνης από όπου παρατηρείται ότι και οι τρεις ενώσεις εμφανίζουν πολύ κοντινές τιμές  $\tau$  (σε ns). Οι χρόνοι ημιζωής των διεγερμένων καταστάσεων των τριών ενώσεων παρουσιάζονται πιο αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.2) και είναι χαρακτηριστικοί χρόνοι ημιζωής για τις πορφυρίνες ελεύθερης βάσης. Επιπλέον, αυτό που παρατηρείται από τον Πίνακα 5.2 είναι ότι η TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> έχει τη μεγαλύτερη διαφορά ενέργειας Stokes  $\Delta E_{SS}$ , με αποτέλεσμα την πιθανότητα να εμφανίσει την μεγαλύτερη απώλεια στο φθορισμό συγκριτικά με τις άλλες δύο πορφυρίνες, TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> και TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>, η οποία πιθανότατα να οφείλεται σε μετατροπή της ενέργειας σε θερμική.



**Σχήμα 5.8** Φάσματα χρόνου ημιζωής διεγερμένης κατάστασης σε DMF των ενώσεων: TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> (μαύρη γραμμή), TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (μπλε γραμμή) και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> (πράσινη γραμμή). Η κόκκινη γραμμή αντιστοιχεί στο exponential fit.

**Πίνακας 5.2** Σύνοψη των φασματοσκοπικών δεδομένων εκπομπής για τις πορφυρινικές δυάδες με λυσίνη TriPPLys(COOH)<sub>3</sub>, TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub>.

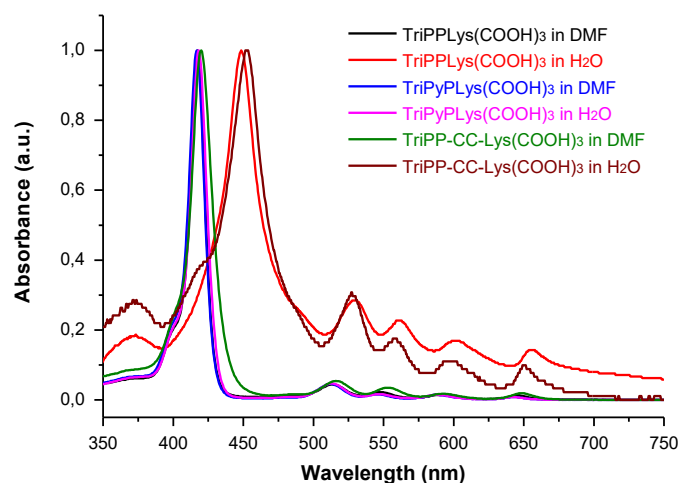
Porphyrin	Emission $\lambda_{\max}$ (nm)		$\Phi$	$\tau$ (ns)	$\Delta E_{SS}$ (cm <sup>-1</sup> )	$K_{Fl}$ (x10 <sup>6</sup> s <sup>-1</sup> )
TriPPLys(COOH) <sub>3</sub>	652	715	0.100	10.11	154.44	9.89
TriPyPLys(COOH) <sub>3</sub>	650	712	0.084	10.94	167.48	7.68
TriPP-CC-Lys(COOH) <sub>3</sub>	656	719	0.110	10.07	176.30	10.92

Η πορφυρινική δυάδα-στόχος με λυσίνη που φέρει νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA), παρατηρήθηκε ότι παρουσιάζει υψηλή υδροφοβικότητα καθώς κατά την αντίδραση

βασικής υδρόλυσης των τριών εστερικών ομάδων της λυσίνης προς το σχηματισμό του χηλικού υποκαταστάτη NTA, η TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> σε υδατικό διάλυμα ελαφρώς όξινου αλλά και ουδέτερου pH καταβυθίζεται ως ίζημα. Από την άλλη πλευρά, σε βασικό pH είναι πλήρως υδατοδιαλυτή. Έτσι, προκειμένου το φθοροφόρο πορφυρινικό παράγωγο (16) με λυσίνη-NTA που φέρει πυρίδουλ-ομάδες να διαλυθεί στο νερό και να συμμετέχει στη σήμανση πρωτεϊνών μέσω της μεταλλοχηλικής σύζευξης με αμινοξέα πεπτιδίου, ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο.

Αρχικά, 1 mgr της TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (16) τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη των 10 mL. Έπειτα, στο εσωτερικό της σφαιρικής φιάλης προστέθηκαν 2 mL απιονισμένου νερού και η φιάλη αφέθηκε για λίγα λεπτά σε λουτρό υπερήχων. Αφού επιβεβαιώθηκε ότι η δυάδα πορφυρίνης-λυσίνης με NTA δεν διαλύεται στο νερό, στη φιάλη προστέθηκαν μερικές σταγόνες (περίπου 5-6) υδατικού διαλύματος αμμωνίας (NH<sub>3</sub>) 25% έως ότου να παρατηρηθεί η πλήρης διάλυση της TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (16) στο υδατικό διάλυμα. Τέλος, ακολούθησε απόσταξη του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση και δοκιμή διαλυτότητας με απιονισμένο νερό ουδέτερου pH για την επιβεβαίωση της επιτυχούς υδροφιλικότητας της πορφυρίνης μετά την κατεργασία με το υδατικό διάλυμα αμμωνίας.

Η ίδια διαδικασία έλαβε χώρα και για τις άλλες δύο πορφυρινικές δυάδες με λυσίνη-NTA που φέρουν φαίνυλ-ομάδες χωρίς την επιτυχή διάλυσή τους στο νερό μετά την πορσθήκη του διαλύματος αμμωνίας. Προκειμένου, να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη συσσωματωμάτων και η διατήρηση του υδρόφοβου χαρακτήρα στην περίπτωση των δυάδων TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> πραγματοποιήθηκαν μελέτες απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis). Στο σχήμα που ακολουθεί (**Σχήμα 5.9**) απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis και των τριών δυάδων πορφυρίνης-λυσίνης-NTA σε διάλυμα DMF καθώς και σε υδατικό διάλυμα (H<sub>2</sub>O).



**Σχήμα 5.9** Φάσματα απορρόφησης UV-Vis (normalized) σε DMF και H<sub>2</sub>O των ενώσεων: TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> (μαύρη γραμμή σε DMF/κόκκινη γραμμή σε H<sub>2</sub>O), TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (μπλε γραμμή σε DMF/ροζ γραμμή σε H<sub>2</sub>O) και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> (πράσινη γραμμή σε DMF/καφέ γραμμή σε H<sub>2</sub>O).

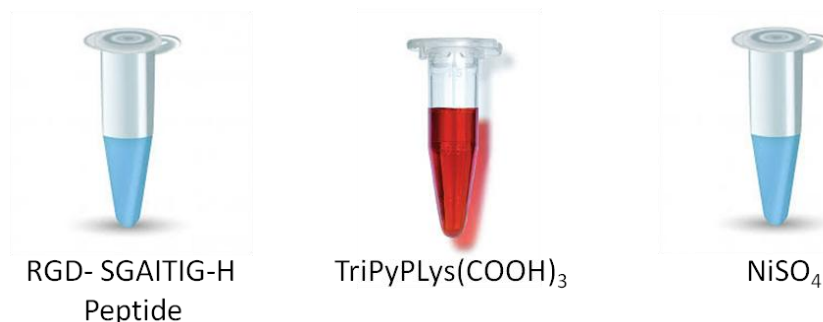
Όπως παρατηρείται από το παραπάνω σχήμα και συγκεκριμένα από το φάσμα της TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (16) σε νερό, η πορφυρίνη που φέρει πυρίδουλ-ομάδες παρουσιάζει καλή διαλυτότητα στην περίπτωση του υδατικού διαλύματος. Αντίθετα, τα φάσματα των δύο δυάδων πορφυρίνης-λυσίνης που φέρουν φαίνυλ-ομάδες παρουσιάζονται βαθοχρωμικά μετατοπισμένα (περίπου 30 nm) και εμφανώς διευρυμένα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε DMF. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την παρουσία συσσωματωμάτων (J aggregates) στα υδατικά διαλύματα των δυάδων TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> και TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub>.

Συνεπώς, ως φθοροφόρο για την αντίδραση συμπλοκοποίησης με νικέλιο (Ni<sup>+2</sup>) και πεπτιδίο που στο C-τελικό άκρο φέρει His-tag χρησιμοποιήθηκε μόνο η πορφυρινική δυάδα TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (16) η οποία μπορεί να διαλυθεί καλύτερα στο νερό. Έτσι, για τη συμπλοκοποίηση της TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> με Ni<sup>+2</sup>-NTA και τα ιμιδαζόλια διαδοχικών ιστιδινών πεπτιδίου με αλληλουχία RGD-SGAIIG-H που αυτο-οργανώνεται έπειτα από επώαση 72 ωρών αρχικά παρασκευάστηκαν τρία stock διαλύματα. Τα stock αυτά διαλύματα είχαν ίδια συγκέντρωση ίση με 9.24 mM και ήταν τα εξής (**Εικόνα 5.1**):

- υδατικό διάλυμα πεπτιδίου RGD-SGAIIG-H
- υδατικό διάλυμα πορφυρίνης TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>

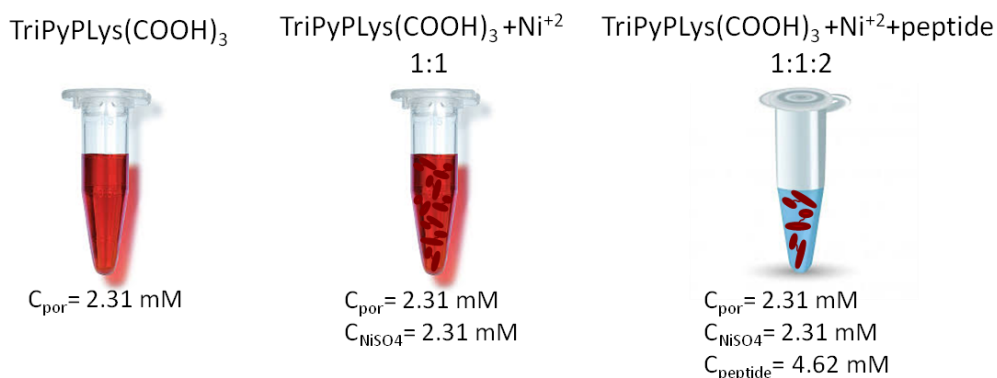


- υδατικό διάλυμα θειικού νικελίου ( $\text{NiSO}_4$ ).

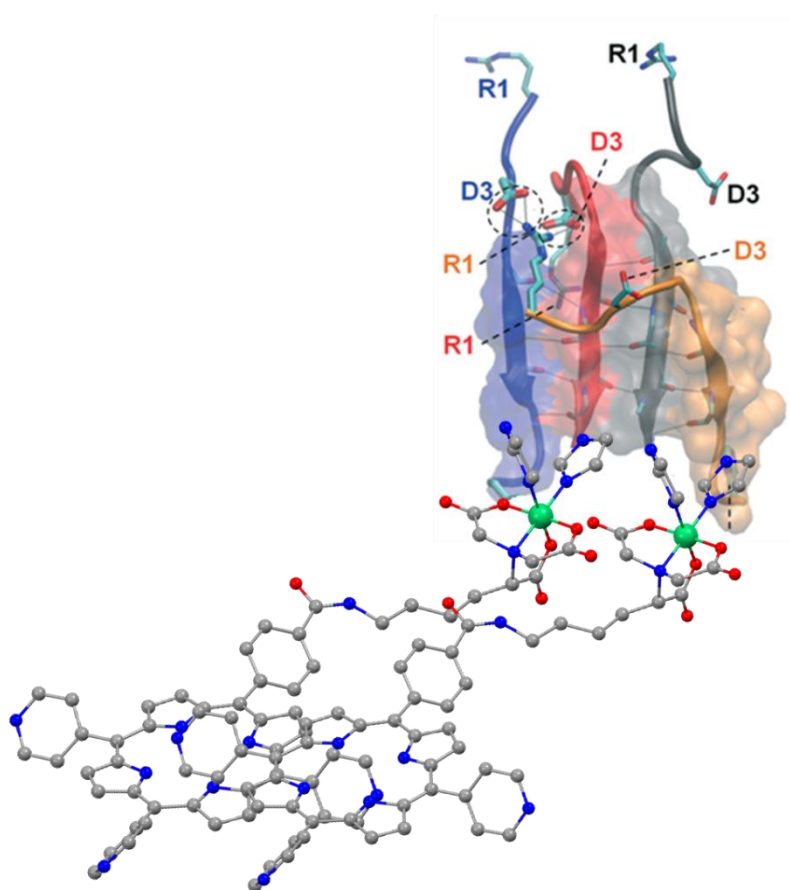


**Εικόνα 5.1** Stock υδατικά διαλύματα: πεπτιδίου RGD-SGAITIG-H (αριστερά), πορφυρίνης TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (μέση) και θειικού νικελίου ( $\text{NiSO}_4$ ) (δεξιά).

Το παραπάνω stock υδατικό διάλυμα της πορφυρίνης TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> αραιώθηκε προς σχηματισμό νέου διαλύματος TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> μικρότερης συγκέντρωσης και συγκεκριμένα ίσης με 2.31 mM. Έπειτα, από το stock διάλυμα τόσο της πορφυρίνης όσο και του θειικού νικελίου ( $\text{NiSO}_4$ ) παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα που περιείχε πορφυρίνη και νικέλιο ( $\text{Ni}^{2+}$ ) σε αναλογία 1:1 ώστε η συγκέντρωση της κάθε ουσίας να είναι ίση με 2.31 mM. Τέλος, χρησιμοποιώντας και τα τρία stock διαλύματα παρασκευάστηκε διάλυμα πεπτιδίου-πορφυρίνης-νικελίου με αναλογία 2:1:1 προκειμένου οι τελικές τους συγκεντρώσεις στο διάλυμα να είναι 4.62 mM, 2.31 mM και 2.31 mM, αντίστοιχα (**Εικόνα 5.2**). Για να πραγματοποιηθεί η επιτυχής μεταλλοχηλική σύζευξη μεταξύ πορφυρίνης-NTA, νικελίου ( $\text{Ni}^{2+}$ ) και πεπτιδίου που φέρει His-tag, αρχικά αναμίχθηκε το διάλυμα της πορφυρίνης με του νικελίου σχηματίζοντας το σύμπλοκο πορφυρίνης-NTA- $\text{Ni}^{2+}$  και κατόπιν στο μίγμα αυτό προστέθηκε το διάλυμα του πεπτιδίου το οποίο είχε αυτο-οργανωθεί (επώαση 72h). Στην **Εικόνα 5.3** που ακολουθεί παρατηρείται το προτεινόμενο μοντέλο σχηματισμού του συμπλόκου πορφυρίνης-νικελίου-πεπτιδίου TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+ $\text{Ni}^{2+}$ +peptide μετά τη δημιουργία του δεσμού συναρμογής μεταξύ του χηλικού (τετραδοντικού) υποκαταστάτη της πορφυρίνης-λυσίνης-NTA με το νικέλιο και τα ιμιδαζόλια των ιστιδινών του πεπτιδίου μετά την αυτο-οργάνωσή του.



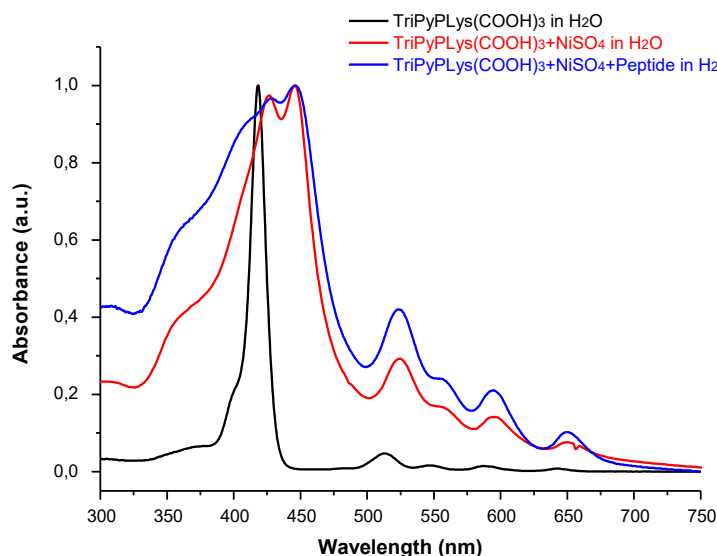
**Εικόνα 5.2** Τελικά stock υδατικά διαλύματα: TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (αριστερά), TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>+2</sup> (μέση) και TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>+2</sup>+peptide (δεξιά).



**Εικόνα 5.3** Πιθανό μοντέλο της δομής του συμπλόκου TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>+2</sup>+peptide.

Τα τρία νέα υδατικά διαλύματα, παρασκευάστηκαν με σκοπό την μελέτη της συμπεριφοράς τους στο νερό (H<sub>2</sub>O) αρχικά με τη χρήση της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis). Τα νέα διαλύματα αραιώθηκαν περαιτέρω προς μικρότερες συγκεντρώσεις, προκειμένου να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν με επιτυχία τα πειράματα απορρόφησης. Πιο ειδικά, στο

παρακάτω σχήμα (**Σχήμα 5.10**) παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης της πορφυρίνης-λυσίνης-NTA ( $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$ ), του συμπλόκου της πορφυρίνης-λυσίνης-NTA με το νικέλιο ( $\text{Ni}^{2+}$ ) καθώς και του συμπλόκου που προκύπτει από τη μεταλλοχηλική σύζευξη της  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$  που φέρει NTA με το νικέλιο και το πεπτιδίο (RGD-SGAIIG-H).



**Σχήμα 5.10** Φάσματα απορρόφησης UV-Vis (normalized) σε  $\text{H}_2\text{O}$  των ενώσεων:  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$  (μαύρη γραμμή),  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+}$  (κόκκινη γραμμή) και  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+} + \text{peptide}$  (μπλε γραμμή).

Από το παραπάνω σχήμα διαπιστώνεται για ακόμα μια φορά ότι η  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$  εμφανίζει καλή διαλυτότητα στο  $\text{H}_2\text{O}$ . Αντίθετα, στην περίπτωση του συμπλόκου πορφυρίνης-λυσίνης-NTA- $\text{Ni}^{2+}$  αλλά και στην περίπτωση του συμπλόκου με το πεπτιδίο, παρατηρείται η παρουσία δύο ταινιών Soret οι οποίες εμφανίζουν ώμους υποδηλώνοντας την ύπαρξη συσσωματωμάτων διαφορετικού είδους στα δείγματα. Επιπλέον, τα φάσματα των συμπλόκων αυτών παρατηρούνται αρκετά πιο διευρυμένα και βαθοχρωμικά μετατοπισμένα συγκριτικά με το φάσμα απορρόφησης UV-Vis της  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$ . Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του συμπλόκου πορφυρίνης-λυσίνης-NTA- $\text{Ni}^{2+}$  η πρώτη ταινία Soret εμφανίζει απόκλιση 10.5 nm ενώ η δεύτερη 29.5 nm από την κορυφή Soret του φάσματος της πορφυρίνης,  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$  (**Πίνακας 5.3**). Παρόμοιες αποκλίσεις παρατηρούνται και στην περίπτωση του συμπλόκου πορφυρίνης-NTA- $\text{Ni}^{2+}$ -πεπτιδίου, καθώς οι ταινίες Soret του φάσματος του συμπλόκου αυτού βρίσκονται

στα ίδια σχεδόν νανόμετρα με εκείνες του συμπλόκου της πορφυρίνης-λυσίνης-NTA με το νικέλιο χωρίς την παρουσία του πεπτιδίου (**Πίνακας 5.3**).

**Πίνακας 5.3** Σύνοψη των  $\lambda_{\max}$  των ταινιών Soret της  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$  και των συμπλόκων  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+}$  και  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+} + \text{peptide}$ .

Compound	Soret band $\lambda_{\max}$ (nm)	
$\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$	416.5	
$\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+}$	427.0	446.0
$\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+} + \text{peptide}$	428.5	446.0

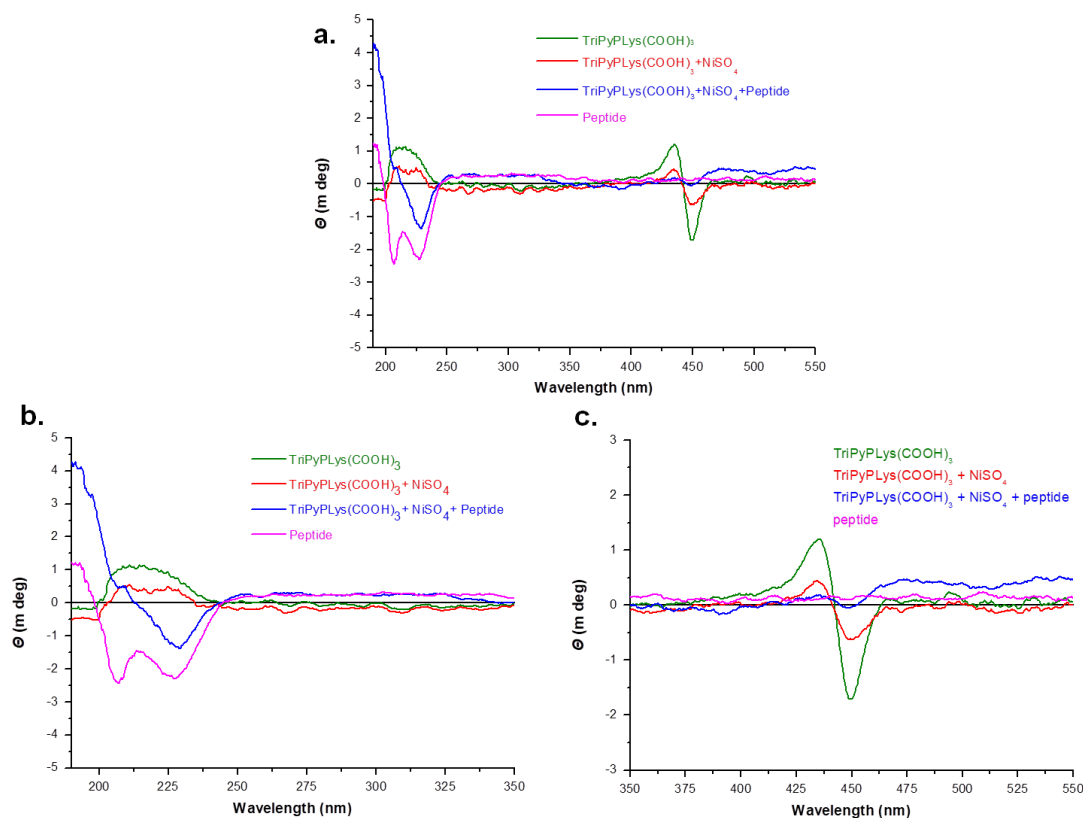
Ακολούθησαν πειράματα φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωσμού (Circular Dichroism Spectroscopy) με σκοπό να μελετηθεί η επιτυχής μεταλλοχηλική σύζευξη της πορφυρίνης  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$  που φέρει νιτριλοτριοξικό οξύ με το νικέλιο ( $\text{Ni}^{2+}$ ) και το πεπτίδιο RGD-SGAIIG-H που φέρει His-tag. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωσμού μελετήθηκαν τέσσερα υδατικά διαλύματα σταθερού pH των παρακάτω ενώσεων:

- i.  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$
- ii.  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+}$
- iii.  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+} + \text{peptide}$
- iv. Peptide

Ένα φαινόμενο που παρατηρείται συχνά στα φάσματα κυκλικού διχρωσμού είναι το φαινόμενο Cotton (Cotton Effect). Το φαινόμενο αυτό περιλαμβάνει την χαρακτηριστική αλλαγή στην οπτική περιστροφική διασπορά κοντά στη ζώνη απορρόφησης μιας ουσίας. Σε μια περιοχή μήκους κύματος όπου απορροφάται φως, το απόλυτο μέγεθος της οπτικής περιστροφής αρχικά μεταβάλλεται γρήγορα με το μήκος κύματος, διασχίζει το μηδέν στο μέγιστο της απορρόφησης και κατόπιν μεταβάλλεται και πάλι γρήγορα με το μήκος κύματος αλλά προς την αντίθετη κατεύθυνση. Το φαινόμενο Cotton καλείται θετικό εάν η αρχικά οπτική περιστροφή αυξάνεται καθώς το μήκος κύματος μειώνεται και αρνητικό αν η περιστροφή αρχικά μειώνεται.

Όπως παρατηρείται από το **Σχήμα 5.11** που παρατήθεται ακολούθως και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η δευτεροταγής δομή του πεπτιδίου (RGD-SGAIIG-H) φαίνεται να έχει β-πτυχωτή αλλά και τυχαία διαμόρφωση στο χώρο.<sup>122</sup> Με τον τρόπο αυτό

επιβεβαιώνονται και οι θεωρητικές μελέτες που έχουν προηγηθεί από την ομάδα της Mitraki et. all.<sup>123</sup> σύμφωνα με τις οποίες η εισαγωγή αρωματικών ομάδων (Tyr, Trp, Phe) ή ομάδων δακτυλίου ιμιδαζόλης (His) στο κατάλοιπο 11 του πεπτιδίου που φέρει στο C-τελικό κυστεΐνη RGD-SGAITIG-C ήταν μεταξύ των πλέον ενεργειακά ευνοϊκών μεταλλάξεων σε παράλληλα συνδεδεμένα πεπίδια που εμφανίζουν β-πτυχωτή διαμόρφωση όπως το παραπάνω. Στην περίπτωση του φάσματος της TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>, παρατηρείται σήμα στον κυκλικό διχρωισμό καθώς η χειρομορφία μεταφέρεται από το αμινοξύ της λυσίνης στην πορφυρίνη είτε ενδομοριακά, αφού συνδέονται ομοιοπολικά μέσω αμιδικού δεσμού, είτε υπερμοριακά μέσω πολύ μικρών ασταθών νανοσωματιδίων. Από το φάσμα κυκλικού διχρωισμού του υδατικού διαλύματος που περιέχει TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup>, είναι εμφανές ότι η προσθήκη του νικελίου (Ni<sup>2+</sup>) μειώνει το σήμα της πορφυρίνης καθώς και το σήμα που οφείλεται στη λυσίνη παρόλο που στο διάλυμα δημιουργούνται συσσωματώματα τύπου J. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η συμμετρία των καρβοξυλικών ομάδων (-COOH) της TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> στο χώρο διαφοροποιείται με τη συναρμογή του νικελίου και κατά συνέπεια αλλάζει η χειρομορφία καθώς και η διπολική ροπή τους.<sup>124</sup> Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώνεται η επιτυχής αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων νικελίου και της λυσίνης-NTA που φέρει η TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>. Τέλος με την προσθήκη του πεπτιδίου, παρατηρείται αλλαγή στη μορφολογία του φάσματος και συγκεκριμένα μείωση στο σήμα του πεπτιδίου αλλά και της πορφυρίνης, ένδειξη της αλληλεπίδρασης του νικελίου με τα ιμιδαζόλια της ιστιδίνης. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι η συναρμογή του νικελίου με το πεππίδιο και την TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> ενισχύει το σχηματισμό β-πτυχωτής διαμόρφωσης.

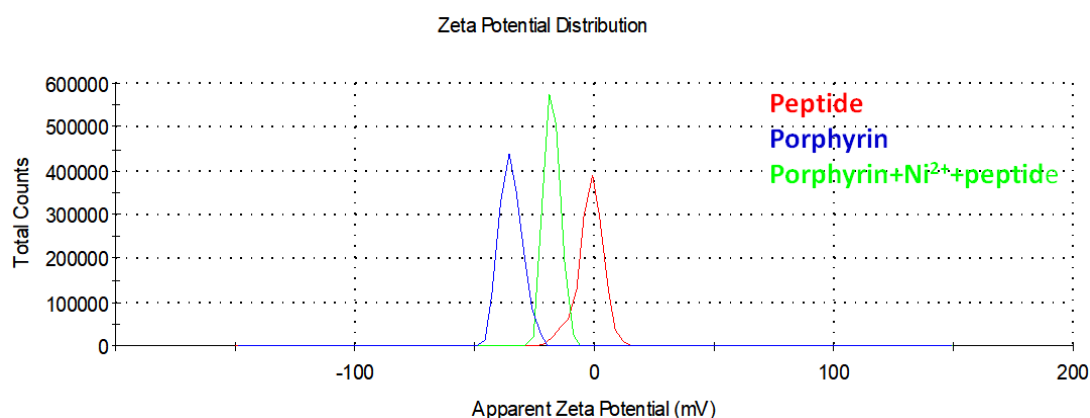


**Σχήμα 5.11** Φάσματα κυκλικού διχρωισμού σε υδατικά διαλύματα των ενώσεων: TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (πράσινη γραμμή), TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup> (κόκκινη γραμμή), TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup>+peptide (μπλε γραμμή) και peptide RGD-SGAIIG-H (ροζ γραμμή).

Προκειμένου να μελετηθεί το μέγεθος των νανοδομών που σχηματίζονται αλλά και το φορτίο στην επιφάνειά τους, πραγματοποιήθηκαν μελέτες Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering/DLS) καθώς και μετρήσεις ζ δυναμικού (zeta potential). Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές με τουλάχιστον 13 σαρώσεις (scans) κάθε φορά, τόσο για τις μελέτες DLS όσο και για τις μετρήσεις ζ δυναμικού. Οι τριπλέτες που αφορούν τα γραφήματα DLS για τις ενώσεις TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> και RGD-SGAIIG-H (peptide) παρατίθενται στο παράρτημα (**Σχήμα S75**).

Στο παρακάτω γράφημα απεικονίζονται συγκεντρωτικά οι καμπύλες ζ δυναμικού της πορφυρίνης με λυσίνη-NTA (TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>), του πεπτιδίου (RGD-SGAIIG-H) και του συμπλόκου πορφυρίνης-NTA-Ni<sup>2+</sup>-πεπτιδίου (**Σχήμα 5.12**). Πιο ειδικά, το ζ δυναμικό του πεπτιδίου (RGD-SGAIIG-H) σε υδατικό διάλυμα είναι ελαφρώς αρνητικό (-1.71 mV) γεγονός που αναμένεται από τη στιγμή που σχηματίζει κατά κύριο λόγο β-πτυχωτή δομή καθώς επηρεάζεται από το φορτίο των ομάδων των αμινοξέων που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της δομής (**Πίνακας 5.4**).<sup>125</sup>

Στην περίπτωση της πορφυρίνης το δυναμικό ζ σε υδατικό διάλυμα έχει επίσης αρνητική τιμή ίση με  $-34.37$  mV (Πίνακας 5.4). Το γεγονός αυτό οφείλεται στις ελεύθερες καρβοξυλικές ομάδες που φέρει ο χηλικός υποκαταστάτης της λυσίνης-NTA. Όσον αφορά το σύμπλοκο πορφυρίνης-NTA- $\text{Ni}^{2+}$ -πεπτιδίου, φαίνεται να διαθέτει αρνητικό φορτίο ( $-16.73$  mV), παρουσιάζοντας διαφορές συγκριτικά με το φορτίο του πεπτιδίου (RGD-SGAIIG-H) και της πορφυρίνης ( $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$ ) λόγω της συμπλοκοποίησης που έχει λάβει χώρα με το νικέλιο (Πίνακας 5.4). Οι τριπλέτες που αφορούν τα γραφήματα ζ δυναμικού (zeta potential) που προέκυψαν για τις ενώσεις:  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$ , RGD-SGAIIG-H (peptide) και  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3+\text{Ni}^{2+}$ +peptide ξεχωριστά παρατίθενται στο παράρτημα (Σχήματα S72-S74).



**Σχήμα 5.12** Διαγράμματα ζ δυναμικού (zeta potential) σε υδατικά διαλύματα του πεπτιδίου RGD-SGAIIG-H (κόκκινη γραμμή), της πορφυρίνης ( $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$ ) (μπλε γραμμή) και του συμπλόκου πορφυρίνης-νικελίου-πεπτιδίου (πράσινη γραμμή).

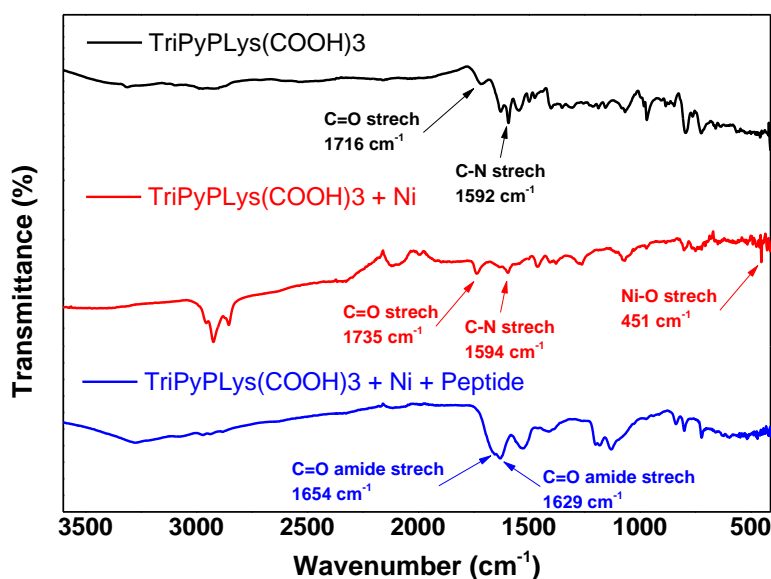
**Πίνακας 5.4** Αποτελέσματα μετρήσεων ζ δυναμικού (zeta potential) σε υδατικά διαλύματα του πεπτιδίου RGD-SGAIIG-H, της πορφυρίνης ( $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$ ) και του συμπλόκου  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+} + \text{peptide}$ .

Compound	Zeta potential (mV)
Peptide	$-1.71 \pm 0.98$
Porphyrin	$-34.37 \pm 0.85$
Porphyrin+ $\text{Ni}^{2+}$ +Peptide	$-16.73 \pm 2.23$

Περαιτέρω χαρακτηρισμός της  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3$ , του συμπλόκου πορφυρίνης-νικελίου,  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3+\text{Ni}^{2+}$ , αλλά και του συμπλόκου πορφυρίνης-νικελίου-πεπτιδίου,  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3+\text{Ni}^{2+}$ +peptide, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της

φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR). Πιο συγκεκριμένα, στο παρακάτω γράφημα (**Σχήμα 5.13**) με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το φάσμα IR της TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> όπου παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή που οφείλεται στη δόνηση του δεσμού υδρογόνου ελεύθερου καρβονυλίου ( $\nu$  C=O) της λυσίνης-NTA στους 1716 cm<sup>-1</sup>.<sup>126</sup> Ακόμη, παρατηρείται η κορυφή στους 1592 cm<sup>-1</sup>, χαρακτηριστική για τη δόνηση έκτασης του δεσμού έκτασης C-N της ελεύθερης πυριδίνης.<sup>127</sup> Αμέσως μετά, με κόκκινο χρώμα, παρατίθεται το φάσμα του συμπλόκου της πορφυρίνης με το νικέλιο, TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup>. Στο συγκεκριμένο φάσμα εμφανίζεται η κορυφή στα 451 cm<sup>-1</sup> που αντιστοιχεί στη δόνηση έκτασης του δεσμού Ni-O. Επιπλέον, όμοια με το προηγούμενο φάσμα, στους 1594 cm<sup>-1</sup> εμφανίζεται η κορυφή που ανήκει στη δόνηση έκτασης του δεσμού C-N της ελεύθερης πυριδίνης, αποκλείοντας το ενδεχόμενο συναρμογής του νικελίου με το άζωτο των πυριδουλ-ομάδων της πορφυρίνης TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>. Παρόλα αυτά, εμφανίζεται κι άλλη μια νέα κορυφή που οφείλεται στη δόνηση υδρογόνου των καρβονυλίων της λυσίνης-NTA η οποία βρίσκεται μετατοπισμένη κατά 19 κυματάρια (1735 cm<sup>-1</sup>) σε σχέση με το φάσμα IR της πορφυρίνης. Η χαρακτηριστική δόνηση του δεσμού Ni-O επιβεβαιώνει την επιτυχή συναρμογή του νικελίου στις καρβοξυλικές ομάδες της λυσίνης-NTA. Τέλος, με μπλε χρώμα εμφανίζεται το φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup>+peptide στο οποίο κυριαρχούν οι κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις των καρβονυλικών ομάδων οι οποίες ανήκουν στους αμιδικούς δεσμούς μεταξύ των αμινοξέων του πεπτιδίου RGD-SGAIITIG-H (1654 cm<sup>-1</sup> και 1629 cm<sup>-1</sup>).

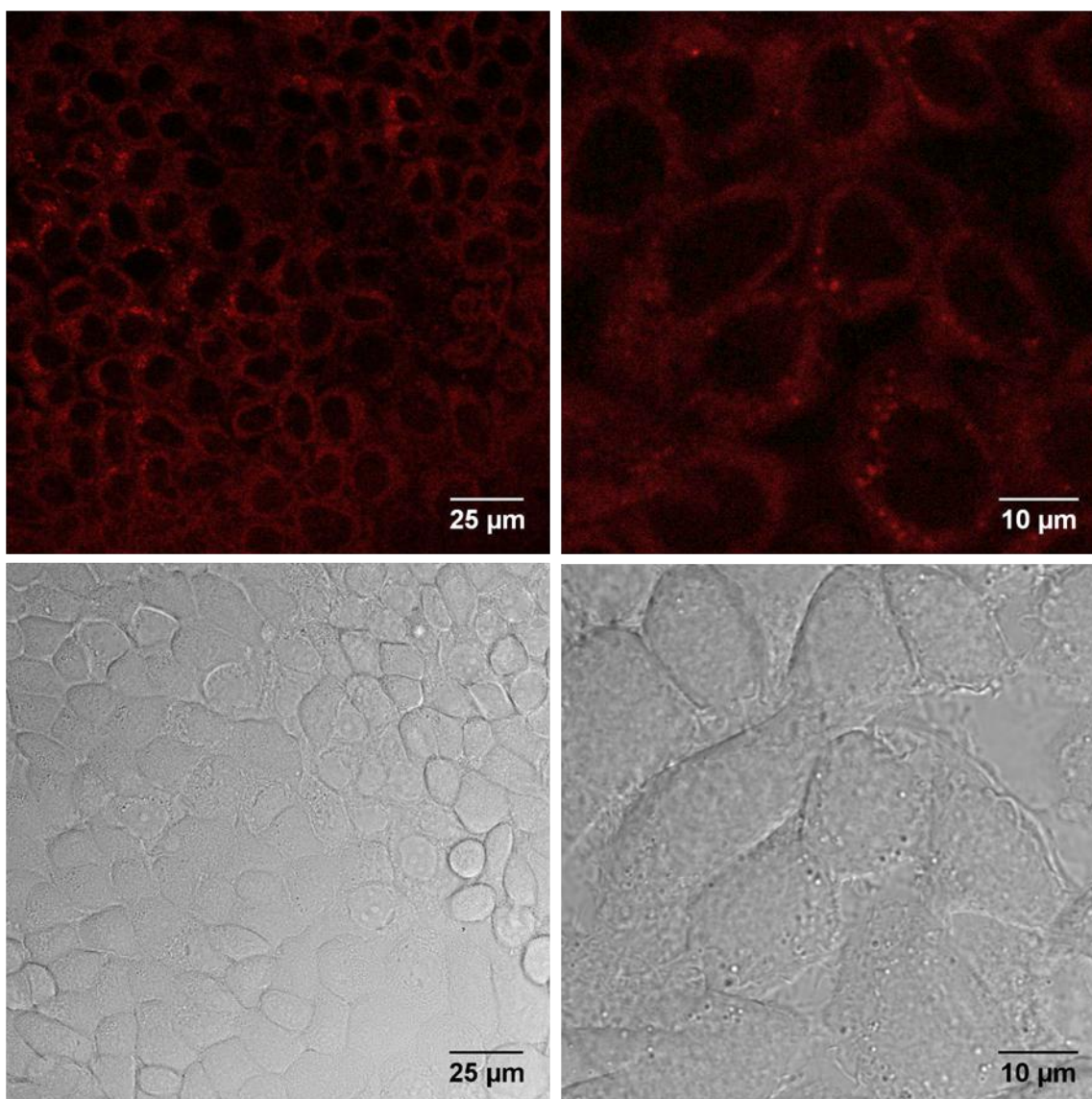




**Σχήμα 5.13** Φάσματα υπέρυθρου (IR) των: TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (μαύρη γραμμή), TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup> (κόκκινη γραμμή), TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup>+peptide (μπλε γραμμή).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ικανότητα της ενδοκυτταρικής μεταφοράς καθώς και ο εντοπισμός του συμπλόκου της πορφυρίνης TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> με το δισθενές νικέλιο και τα ιμιδαζόλια των ιστιδινών (His) που φέρει το αυτο-οργανωμένο πεπτιδίο RGD-SGAIIG-H. Προκειμένου να λάβει χώρα η συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος ανθρώπινου μαστού MCF-7 οι οποίες επωάστηκαν σε κατάλληλο μέσο ανάπτυξης (DMEM) στους 37 °C σε ατμόσφαιρα υγρασίας 5% CO<sub>2</sub> για 16 ώρες (overnight). Η ικανότητα της ενδοκυτταρικής μεταφοράς μελετήθηκε ακόμα και για την μητρική πορφυρίνη TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> που δεν έχει υποστεί συμπλοκοποίηση με το νικέλιο και το πεπτιδίο. Έτσι, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διαλύματα τόσο του συμπλόκου TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup>+peptide όσο και της πορφυρίνης TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> μόνης της (τελική συγκέντρωση 4,62 μM σε σχέση με την πορφυρίνη σε κάθε περίπτωση) για 24 ώρες. Στην **Εικόνα 5.4** που ακολουθεί παρατίθενται οι εικόνες που λήφθηκαν κατά τη μελέτη των κυττάρων με τη χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας. Μέσω των συνεστιακών εικόνων σημειώνεται η μεταφορά των δύο ενώσεων στο εσωτερικό του κυττάρου ενώ δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφορές στο ενδοκυτταρικό εντοπισμό μεταξύ του συμπλόκου

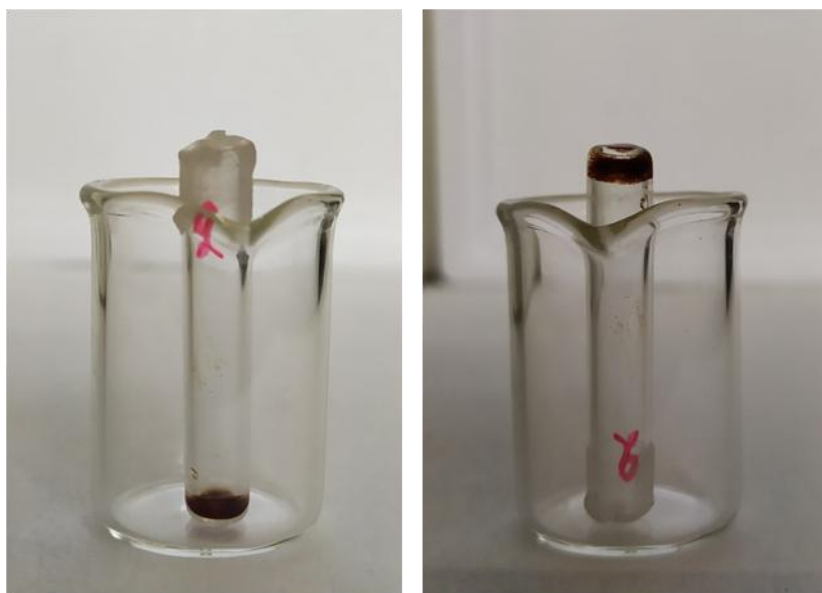
TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup>+peptide και της πορφυρίνης TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> αφού και οι δύο ενώσεις εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα.



**Εικόνα 5.4** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας κυτταρικής σειράς MCF-7 που έχει πραγματοποιηθεί επώαση 24 ωρών της πορφυρίνης TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> (αριστερή στήλη) και της δομής TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup>+peptide (δεξιά στήλη).

Ακολούθως, μελετήθηκε η ικανότητα του συμπλόκου της πορφυρίνης με το νικέλιο και το πεπτιδίο (RGD-SGAITIG-H) στο σχηματισμό υδρογέλης. Πιο ειδικά για την παρασκευή της υδρογέλης, η πορφυρίνη TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> διαλύθηκε σε νερό ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 4.62 mM. Κατόπιν, στο παραπάνω μίγμα προστέθηκε υδατικό διάλυμα NiSO<sub>4</sub> προκειμένου η αναλογία του νικελίου (Ni<sup>2+</sup>) ως

προς την πορφυρίνη να είναι 1:1 (4.62 mM). Τέλος, στο μίγμα πορφυρίνης-νικελίου προστέθηκε υδατικό διάλυμα πεπτιδίου RGD-SGAIIG-H αφού είχε προηγηθεί η επώαση του για 72 ώρες ώστε να αυτο-οργανωθεί σε δίκτυο ινιδίων. Η τελική συγκέντρωση του πεπτιδίου στο μίγμα της υδρογέλης ήταν ίση με 9.24 mM ενώ η αναλογία του ως προς την πορφυρίνη και το νικέλιο ήταν 2:1:1. Το μίγμα αναδεύτηκε διεξοδικά με έναν αναδευτήρα στροβιλισμού (vortex mixer) για λίγα δευτερόλεπτα στη μέγιστη ισχύ και η υδρογέλη σχηματίστηκε αφού το μίγμα φυλάχθηκε ακίνητο για 8 ημέρες (Εικόνα 5.5).



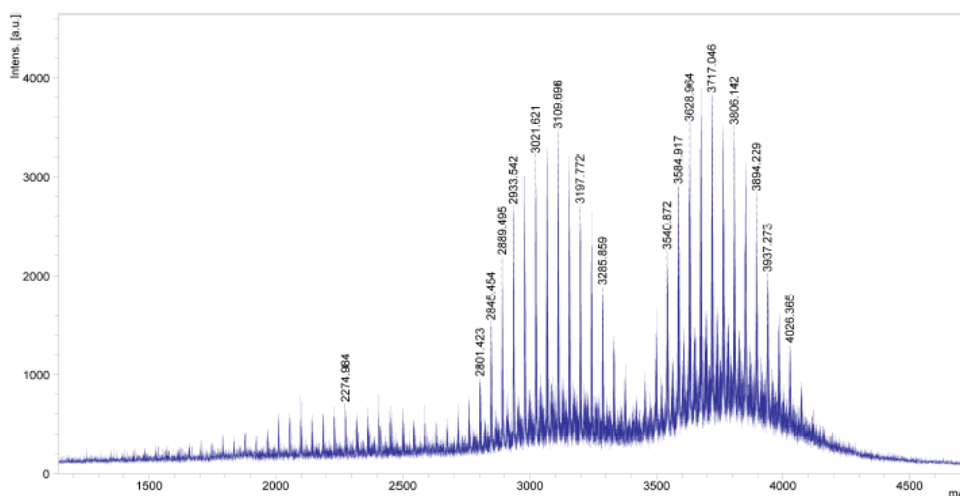
**Εικόνα 5.5** Οπτικές εικόνες της υδρογέλης που σχηματίζει το σύμπλοκο  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+} + \text{peptide}$ .

### 5.3 Χαρακτηρισμός της πορφυρίνης Zn-TPP-PEG-MAL για εφαρμογή στη φωτοδυναμική θεραπεία

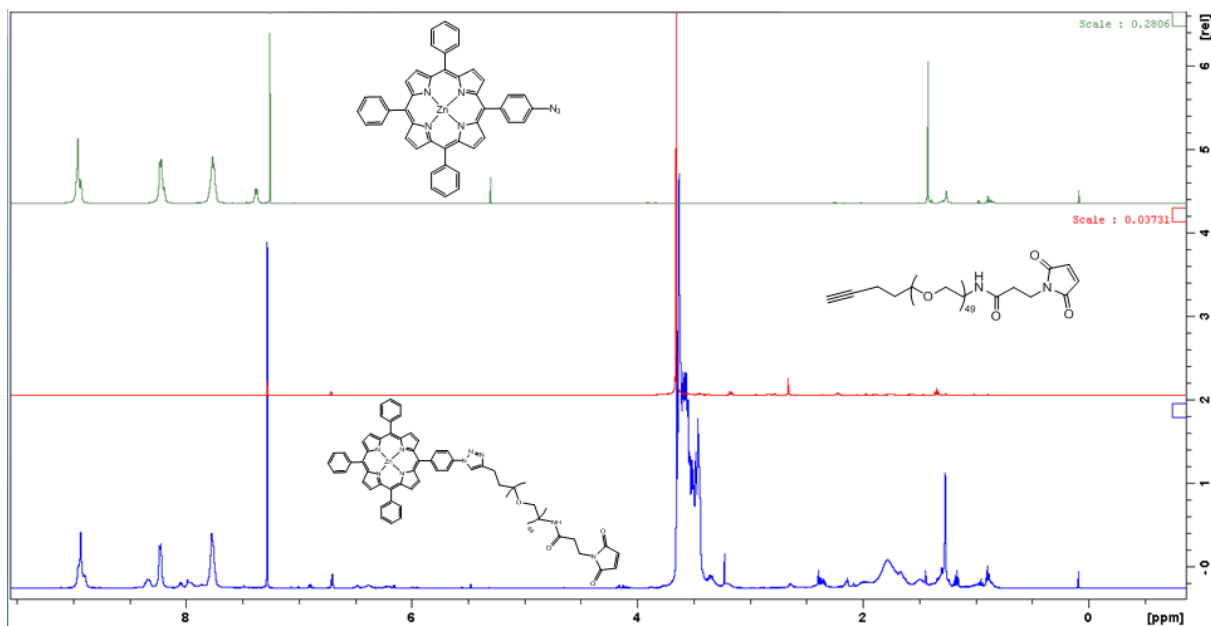
Η επιτυχής σύνθεση της τελικής δυάδας πορφυρίνης-πολυαιθυλενογλυκόλης (20) επιβεβαιώθηκε μέσω της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF και της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR ( $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ ). Περαιτέρω χαρακτηρισμός της δυάδας Zn-TPP-PEG-MAL (20) θα πραγματοποιηθεί σε επόμενο στάδιο πειραμάτων όπως και η σύζευξή της μέσω “κλικ” αντίδρασης θειόλης-μαλεϊμιδίου (thiol-maleimide “click” reaction) με ένα RNA απταμερές (Apt1) που φέρει



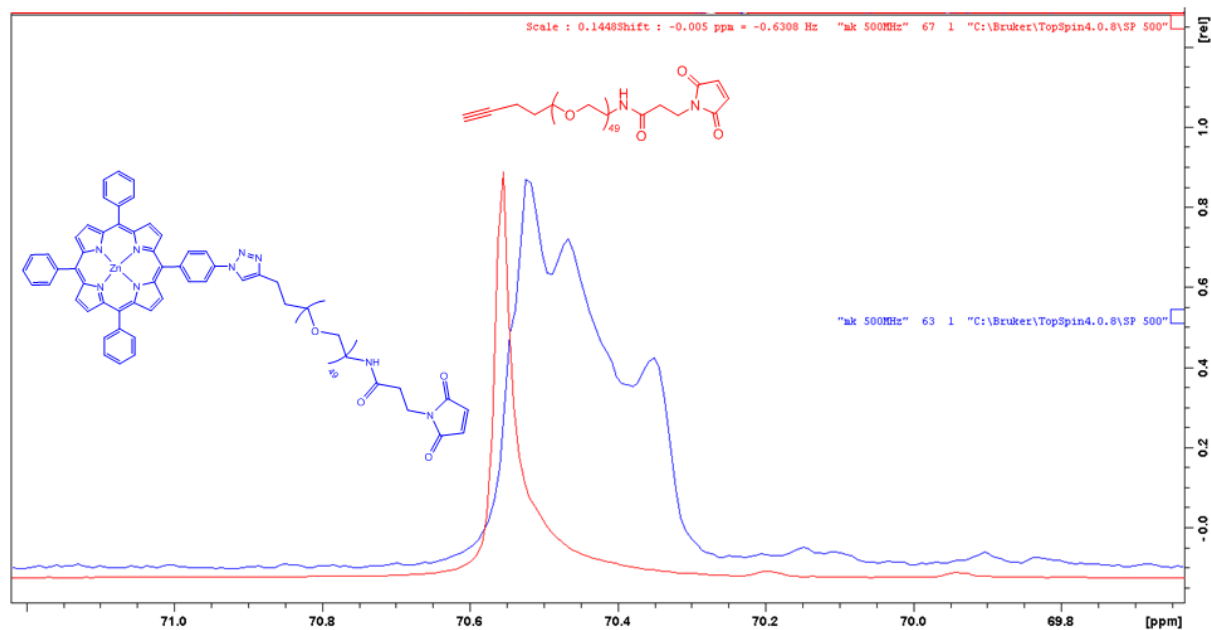
συντονισμού NMR. Συγκρίνοντας τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης Zn-TPP- $\text{N}_3$ , του Alkyne-PEG-Maleimide και τελικής ένωσης Zn-TPP-PEG-MAL (Σχήμα 5.16), στο φάσμα της τελευταίας παρατηρείται η παρουσία μιας κορυφής στα 8.05 ppm η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της γέφυρας τριαζόλης. Παράλληλα στο φάσμα αυτό είναι εμφανείς τόσο οι κορυφές που αντιστοιχούν στην αρχική μεταλλωμένη με Zn πορφυρίνη όσο και εκείνες που ανήκουν στην αλυσίδα της πολυαιθυλενογλυκόλης. Επιπλέον πληροφορία για την επιτυχή σύζευξη της Zn-TPP- $\text{N}_3$  με την Alkyne-PEG-Maleimide μέσω της γέφυρας τριαζόλης, δίνεται από το φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR και συγκεκριμένα από την κορυφή των ανθράκων της επαναλαμβανόμενης  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$  ομάδας της πολυαιθυλενογλυκόλης. Όπως παρατηρείται στα φάσματα  $^{13}\text{C}$  NMR που παρατίθενται παρακάτω, η κορυφή που αντιστοιχεί στους συγκεκριμένους ισοδύναμους άνθρακες εμφανίζεται τόσο στο φάσμα του αρχικού Alkyne-PEG-Maleimide όσο και στο φάσμα της τελικής δυάδας (Σχήμα 5.17). Πιο ειδικά, στο φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της Zn-TPP-PEG-MAL εμφανίζει διαφορετική μορφολογία εξαιτίας της διαφοράς που υπάρχει στο χημικό της περιβάλλον της λόγω της σύζευξης με την πορφυρίνη.



**Σχήμα 5.15** Φάσμα μάζας MALDI-TOF για το προϊόν της “κλικ” αντίδρασης μεταξύ Zn-TPP- $\text{N}_3$  και Alkyne-PEG-Maleimide.



**Σχήμα 5.16** Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR των ενώσεων: Zn-TPP- $\text{N}_3$  (πράσινο), Alkyne-PEG-Maleimide (κόκκινο) και Zn-TPP-PEG-MAL (μπλε).



**Σχήμα 5.17** Φάσματα  $^{13}\text{C}$  NMR των ενώσεων: Alkyne-PEG-Maleimide (κόκκινο) και Zn-TPP-PEG-MAL (μπλε).



## **Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα**

Στο Α' Μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής συνθέσαμε μια υβριδική τριάδα διφαινυλαλανίνης-πορφυρίνης-λυσίνης FF-DMP-PCP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητά της να αυτο-οργανώνεται σε καθορισμένες νανοδομές. Πιο ειδικά, η σύζευξη τόσο της διφαινυλαλανίνης όσο και της λυσίνης στο πορφυρινικό παράγωγο πραγματοποιήθηκε μέσω αμιδικού δεσμού. Το τελικό προϊόν χαρακτηρίστηκε πλήρως με τη χρήση των φασματοσκοπιών NMR και UV-Vis και της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF, ενώ μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης παρατηρήθηκε η αυτο-οργάνωσή του σε νανοδομές σφαιρικού σχήματος. Συγκρίνοντας αυτές τις νανοδομές με τις αυτο-οργανωμένες δομές των προϊόντων των δύο προηγούμενων σταδίων σύνθεσης, FF-DMP-PCP Acid και FF-DMP-NO<sub>2</sub> στο ίδιο σύστημα διαλυτών, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της λυσίνης καθώς και της γέφυρας σύζευξης της με την πορφυρίνη επηρεάζει σημαντικά τον τρόπο της αυτο-οργάνωσης. Ακολούθως, από τα φάσματα απορρόφησης των τριών πορφυρινικών παραγώγων σε στερεά κατάσταση κατόπιν αυτο-οργάνωσης, επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός συσσωματωμάτων (j aggregates).

Στο Β' Μέρος της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας καταφέραμε να συνθέσουμε μια υδατοδιαλυτή δυάδα πορφυρίνης με τον χηλικό υποκαταστάτη λυσίνη-NTA στοχεύοντας στη σήμανση (labeling) πεπτιδίου (RGD-SGAIIG-H) που στο C-τελικό άκρο φέρει ιστοδίνη (His). Για το σχηματισμό της δυάδας TriPyP-Lys(COOH)<sub>3</sub>, ο χηλικός υποκαταστάτης (λυσίνη-NTA) συνδέθηκε ομοιοπολικά μέσω του σχηματισμού αμιδικού δεσμού με το πορφυρινικό παράγωγο. Η TriPyP-Lys(COOH)<sub>3</sub> χαρακτηρίστηκε πλήρως με τη χρήση των φασματοσκοπιών NMR, UV-Vis, φθορισμού καθώς και με τη μελέτη προσδιορισμού/μέτρησης του χρόνου ζωής της διεγερμένης κατάστασης. Η σήμανση του RGD-SGAIIG-H επετεύχθη μέσω της μεταλλοχηλικής σύζευξης με δισθενές νικέλιο (Ni<sup>2+</sup>) του ιμιδαζολίου της ιστοδίνης (που φέρει το πεπτίδιο) και της πορφυρινικής δυάδας που φέρει NTA. Το τελικό σύμπλοκο, TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>+Ni<sup>2+</sup>+peptide, χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), κυκλικού διχρωισμού και IR. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις DLS για τον προσδιορισμό του μεγέθους και του φορτίου των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων. Η ικανότητα της ενδοκυτταρικής μεταφοράς και ο εντοπισμός του συμπλόκου σε κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος ανθρώπινου μαστού MCF-7 μελετήθηκε με τη χρήση της

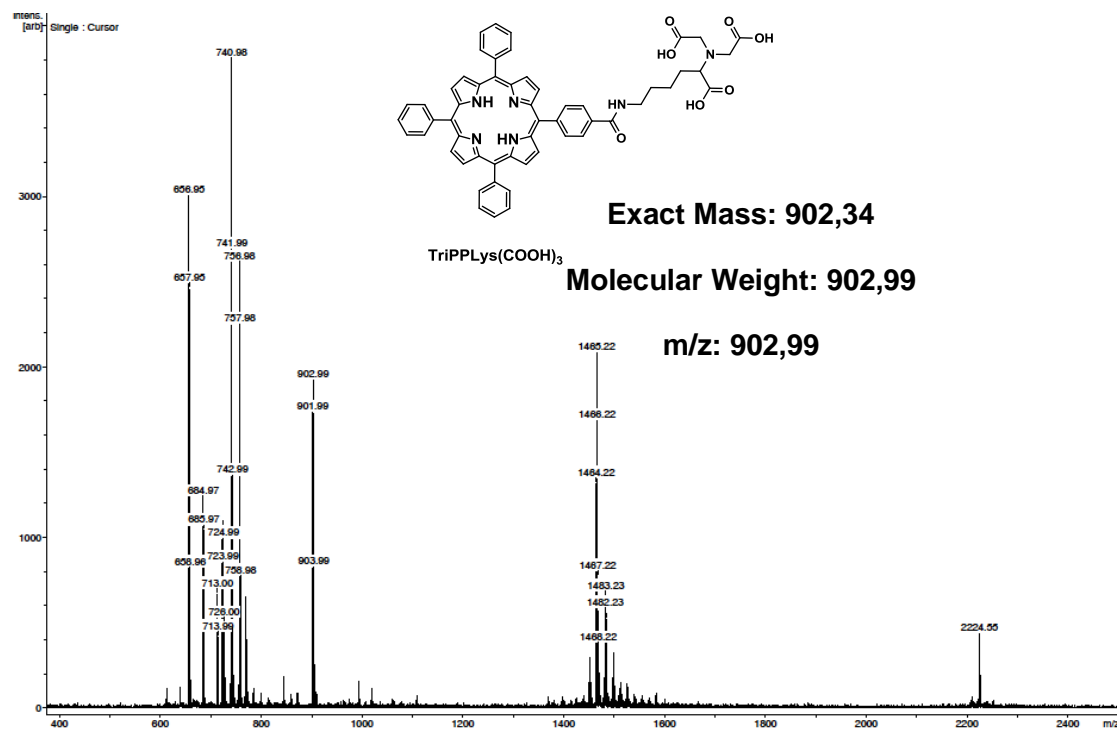
συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης παρέχοντας πληροφορίες για τον εντοπισμό του συμπλόκου στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, για το σύμπλοκο  $\text{TriPyPLys}(\text{COOH})_3 + \text{Ni}^{2+} + \text{peptide}$ , παρατηρήθηκε ο σχηματισμός υδρογέλης.

Στο Γ' Μέρος της παρούσας εργασίας συνθέσαμε μια δυάδα πορφυρίνης-πολυαιθυλενογλυκόλης, Zn-TPP-PEG-MAL που φέρει ελεύθερο μαλεϊμίδιο. Η παρουσία της ομάδας μαλεϊμιδίου καθιστά εφικτή τη σύζευξη της δυάδας-στόχου με ένα RNA απταμερές (Apt1) μέσω "κλικ" αντίδρασης θειόλης-μαλεϊμιδίου (thiol-maleimide "click" reaction) και έχει μελετηθεί ότι δρα ενάντια στο βιο-δείκτη CD44. Η δυάδα Zn-TPP-PEG-MAL χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR, ενώ θα χαρακτηριστεί περαιτέρω σε επόμενο στάδιο πειραμάτων μετά τη σύζευξη με το RNA απταμερές. Στόχο μας αποτελεί η δέσμευση του συστήματος πορφυρίνης-απταμερούς σε καρκινικά κύτταρα και στη μελέτη του ως ειδικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκου οδηγώντας στην κυτταρική απόπτωση μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας.

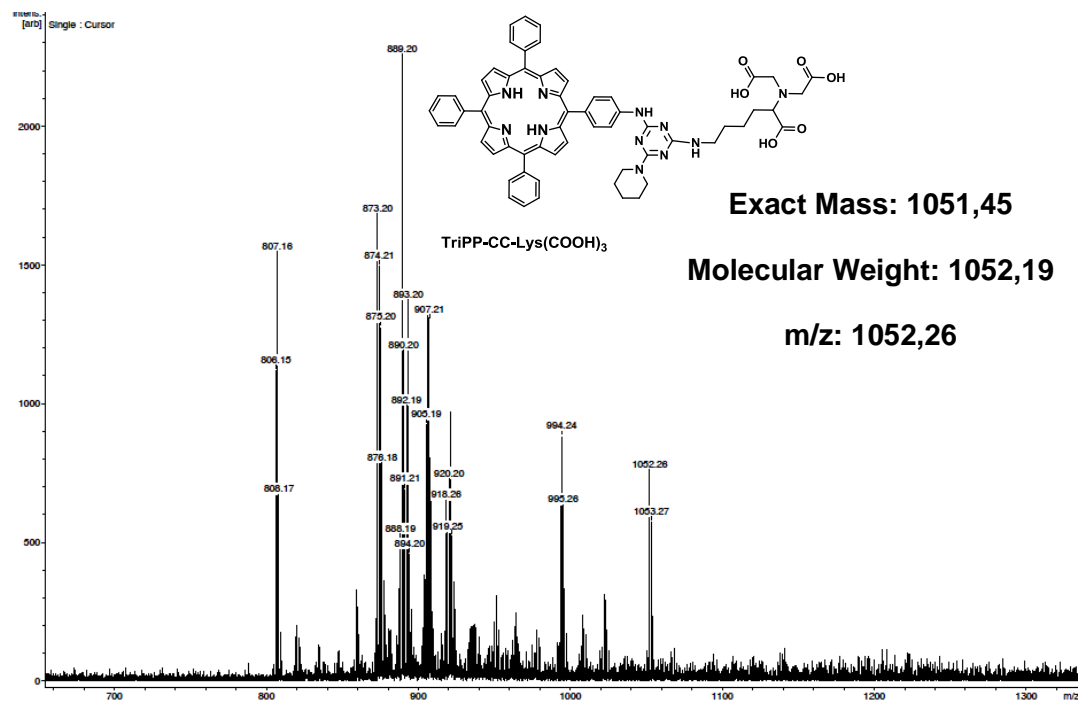


Παράρτημα

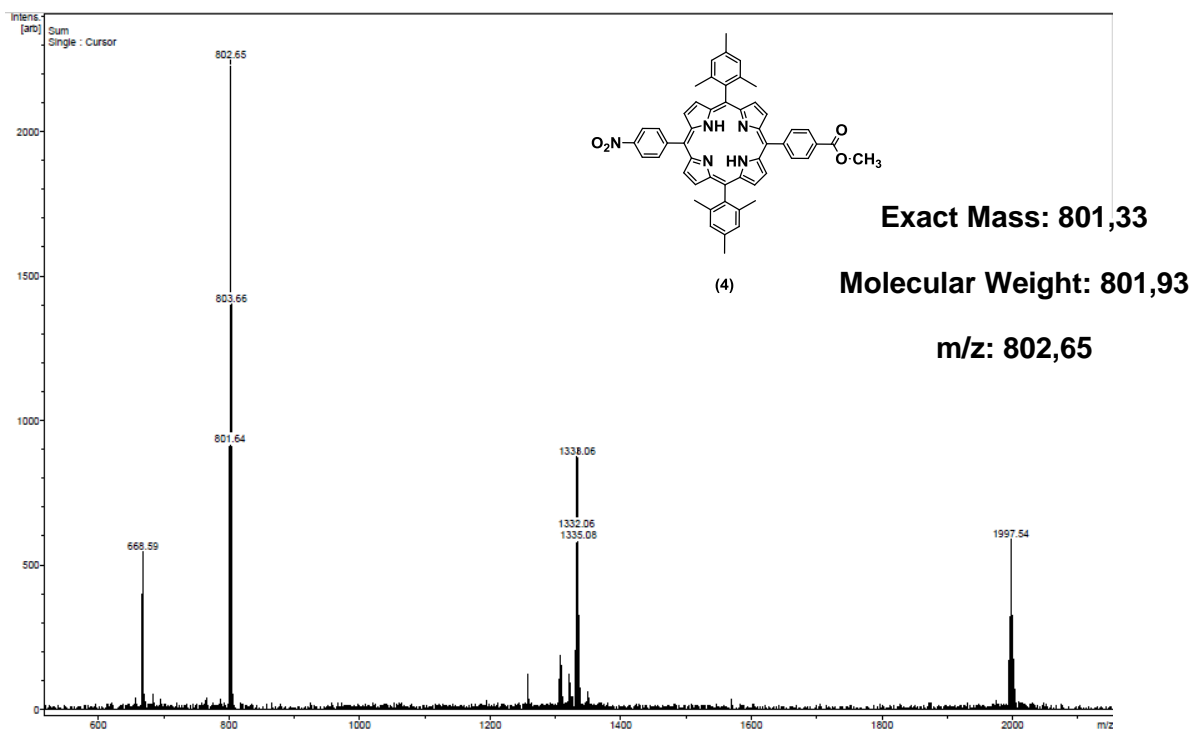
Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF



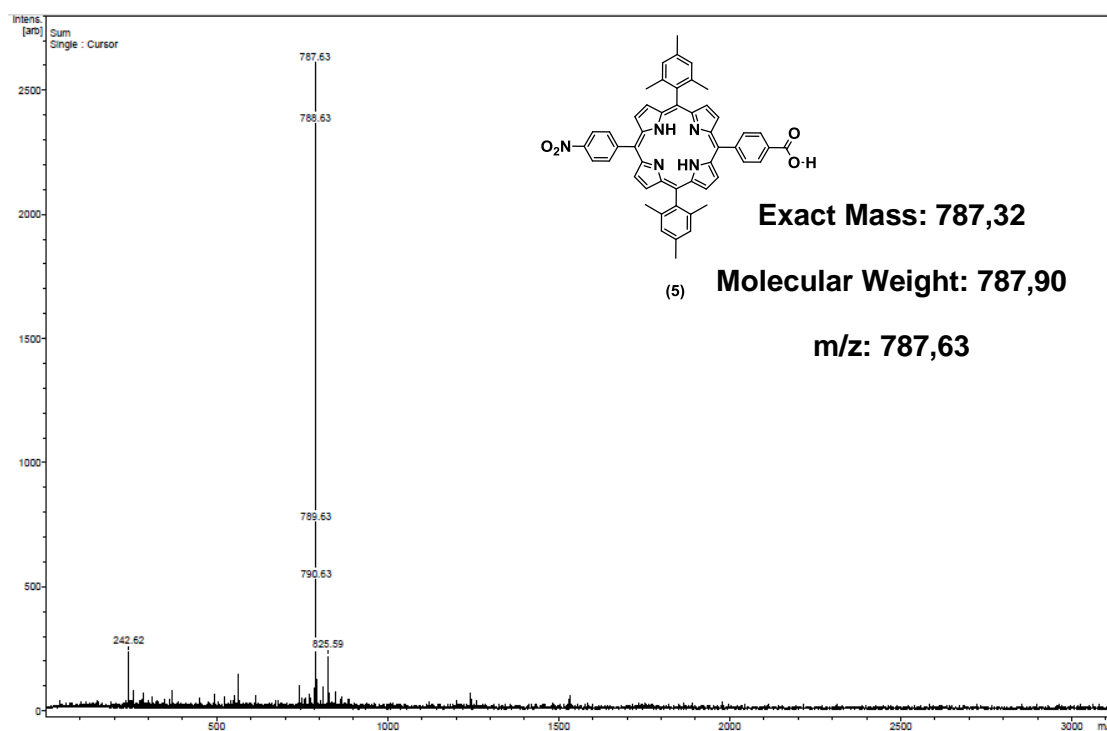
Σχήμα S1 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης TriPPLys(COOH)<sub>3</sub>.



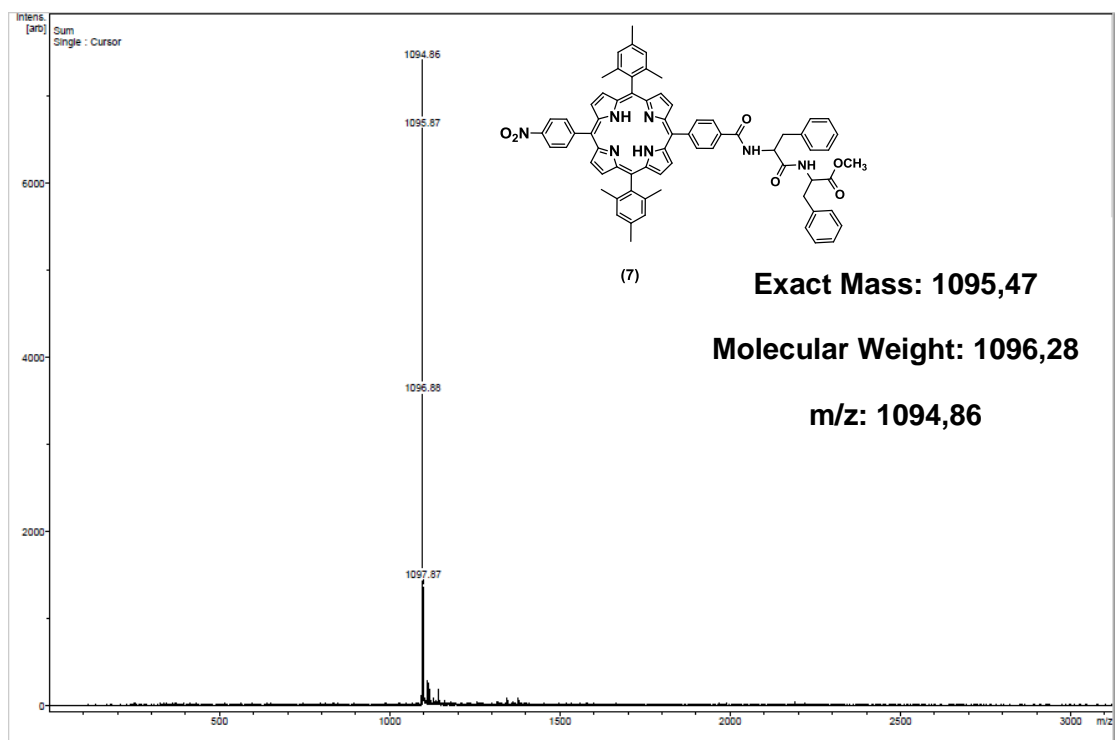
Σχήμα S2 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub>.



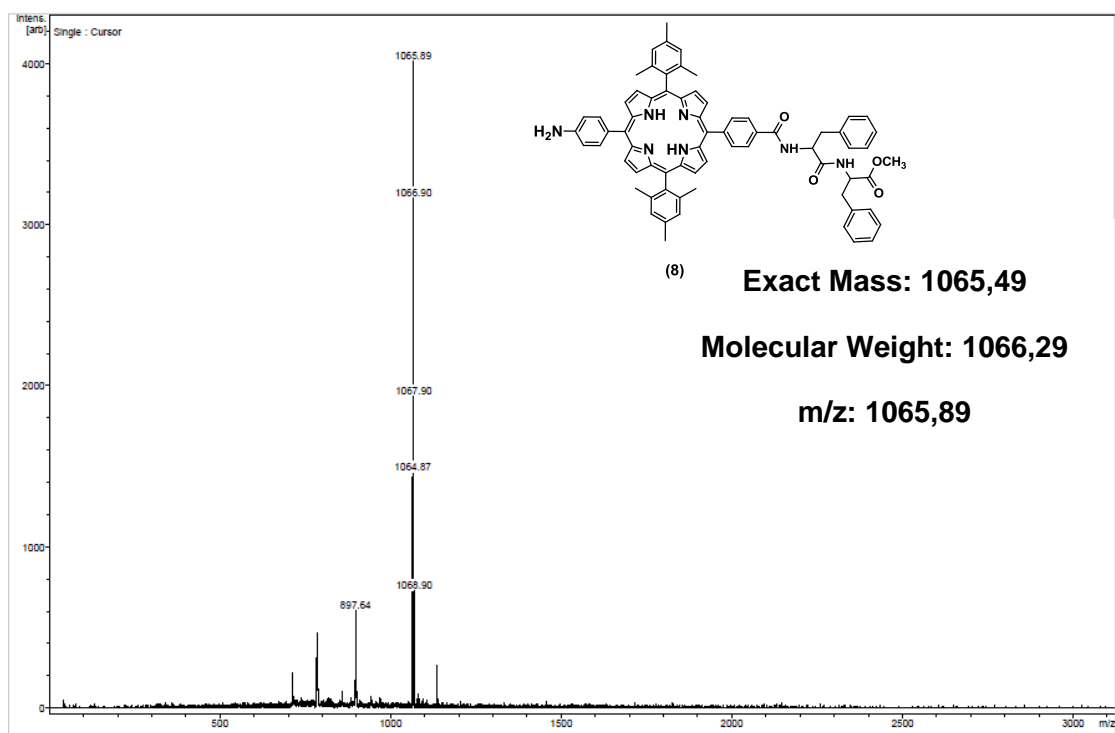
Σχήμα S3 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 4.



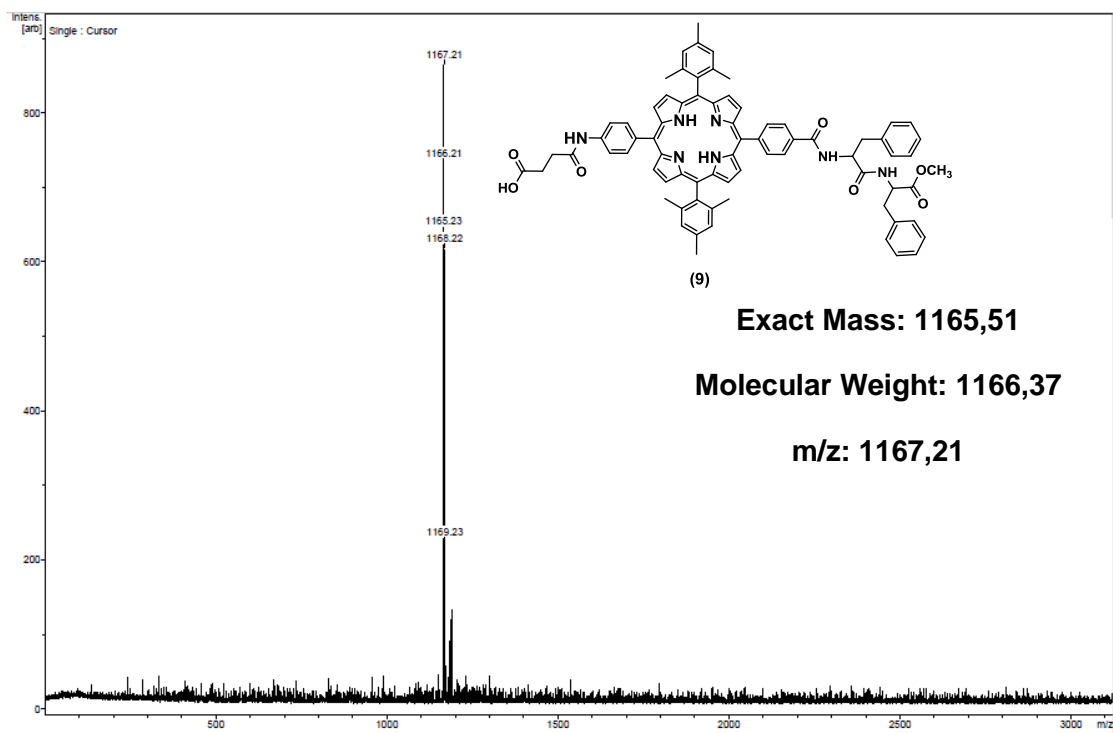
Σχήμα S4 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 5.



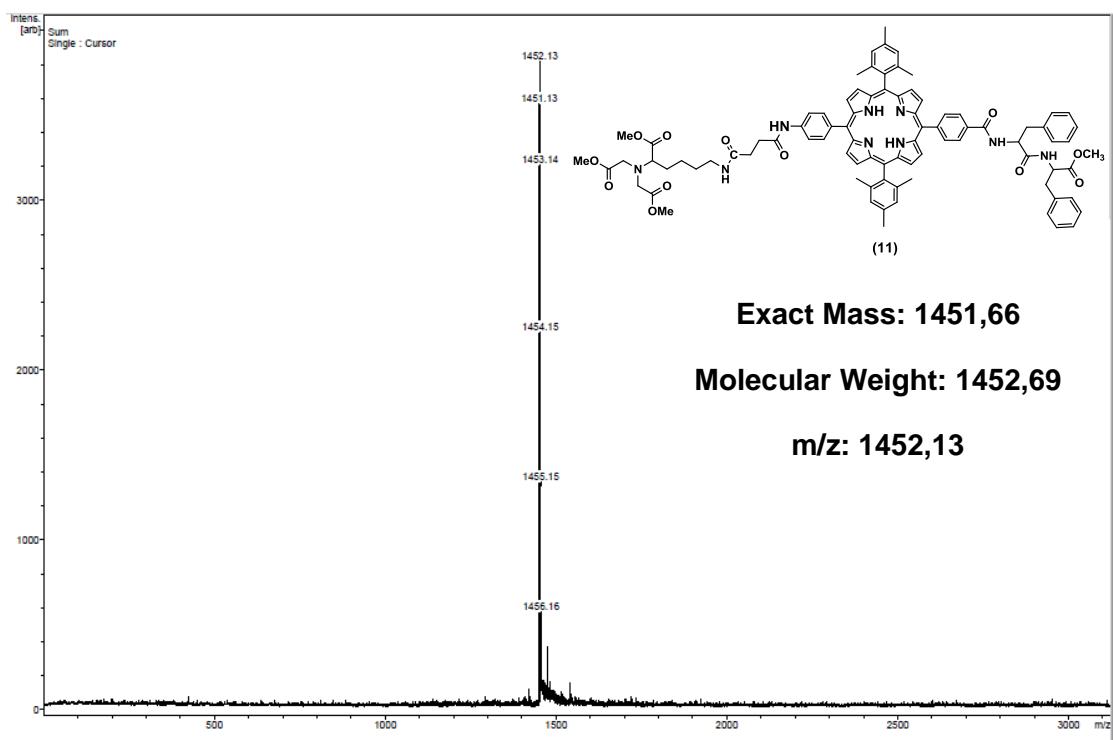
Σχήμα S5 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 7.



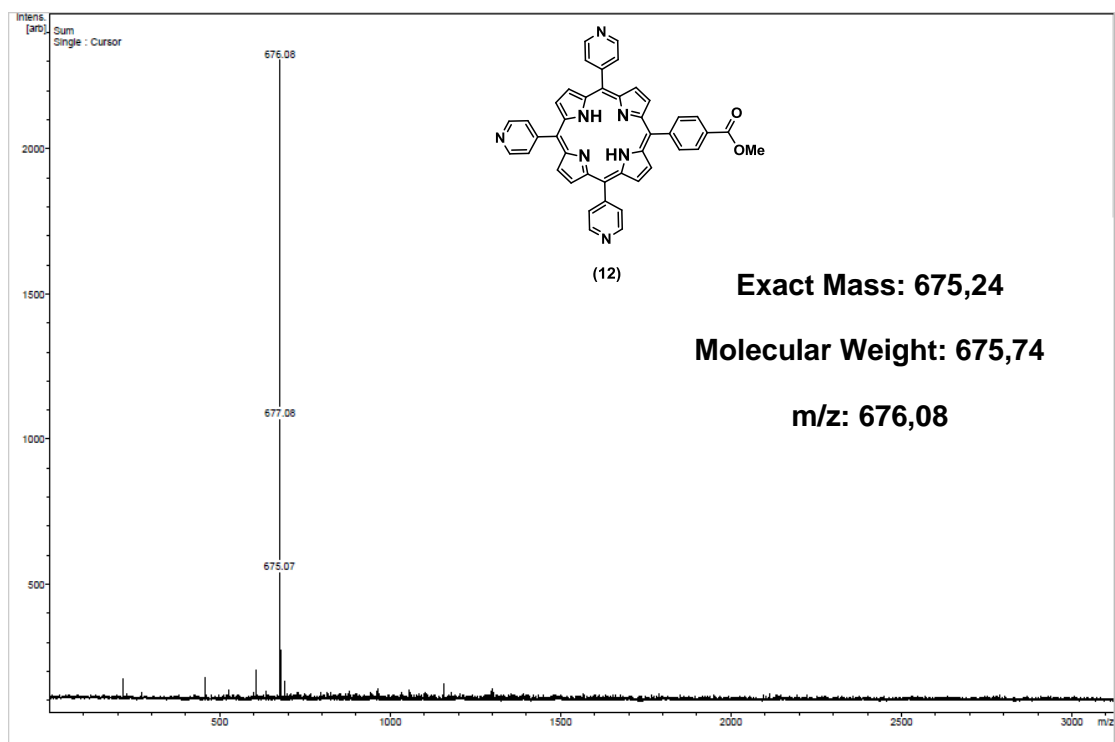
Σχήμα S6 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 8.



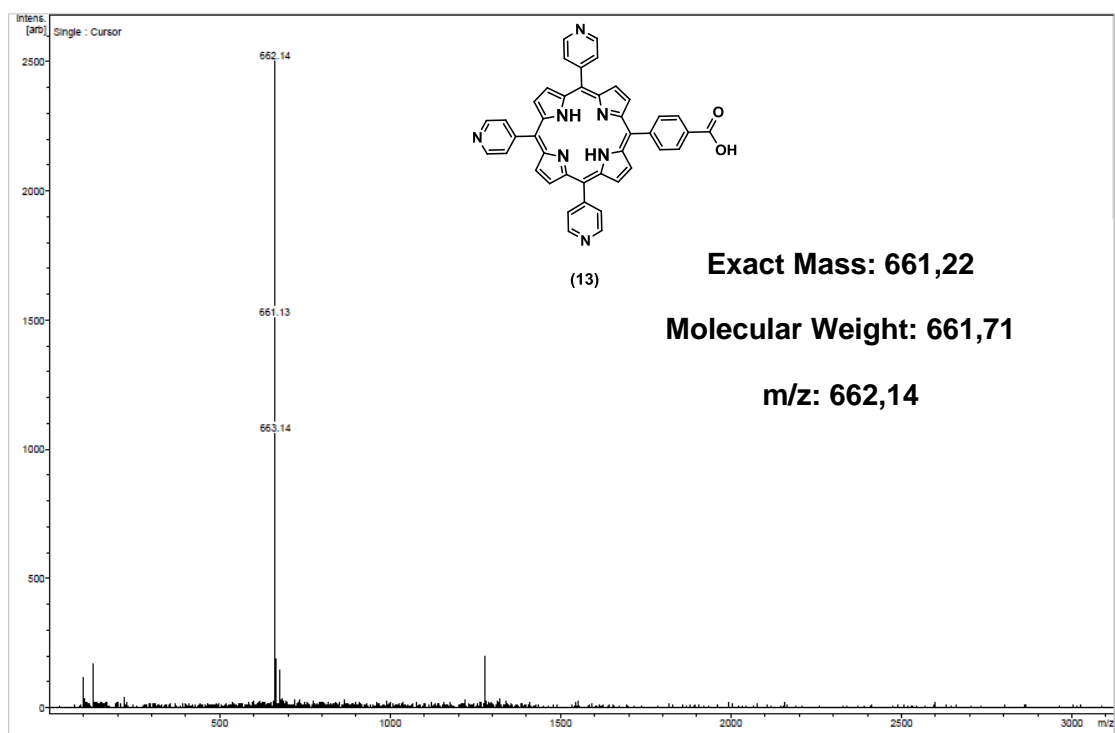
Σχήμα S7 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 9.



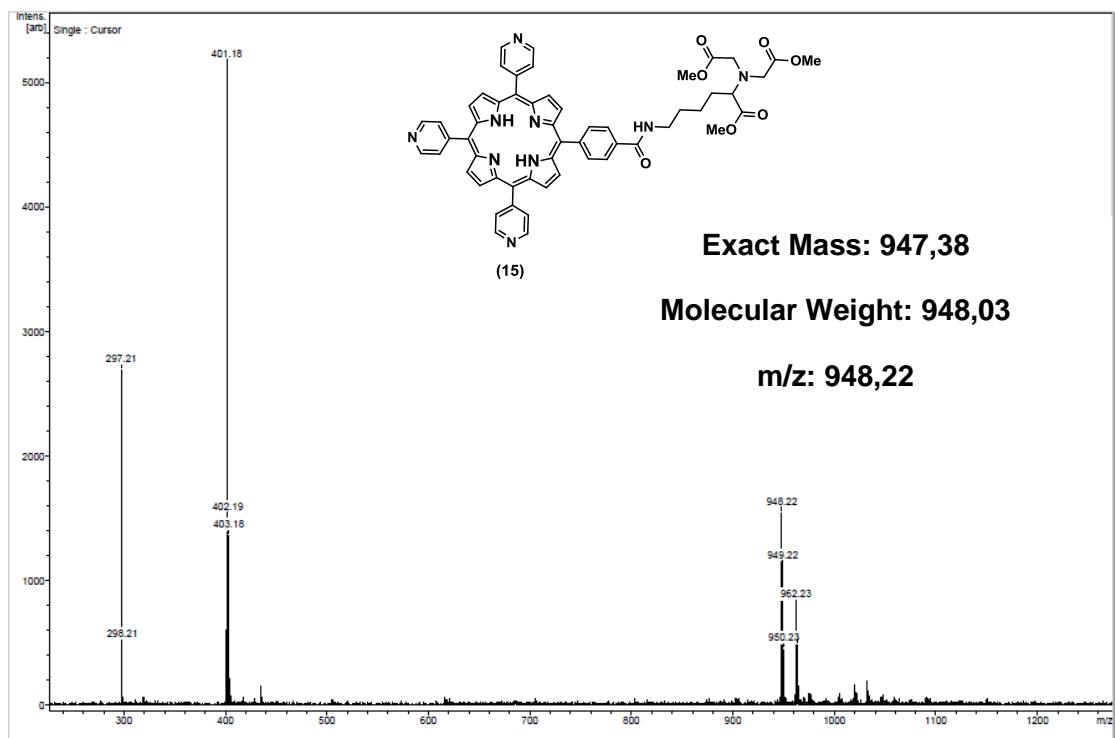
Σχήμα S8 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 11.



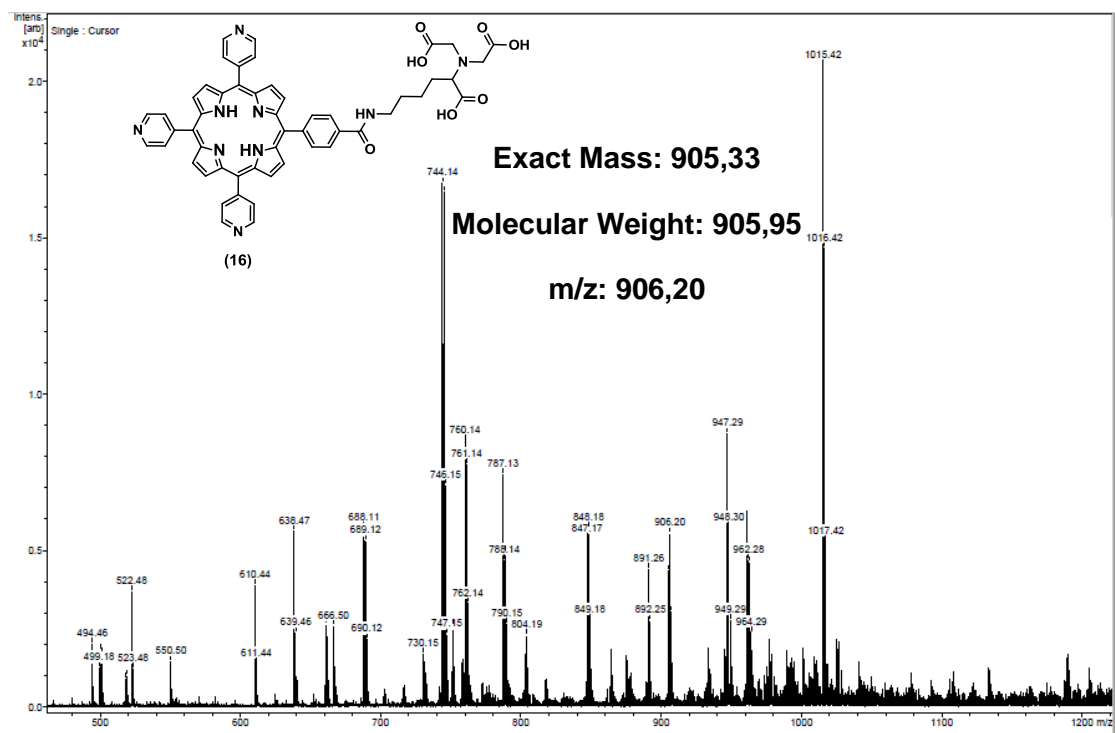
Σχήμα S9 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 12.



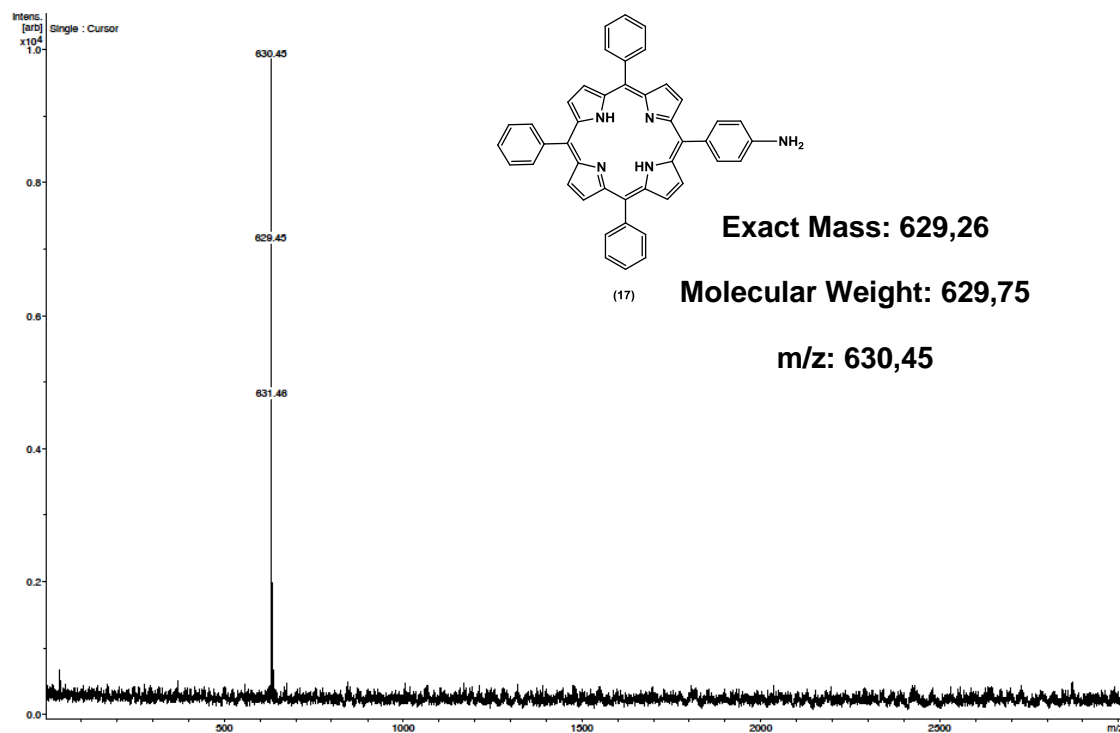
Σχήμα S10 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 13.



Σχήμα S11 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 15.



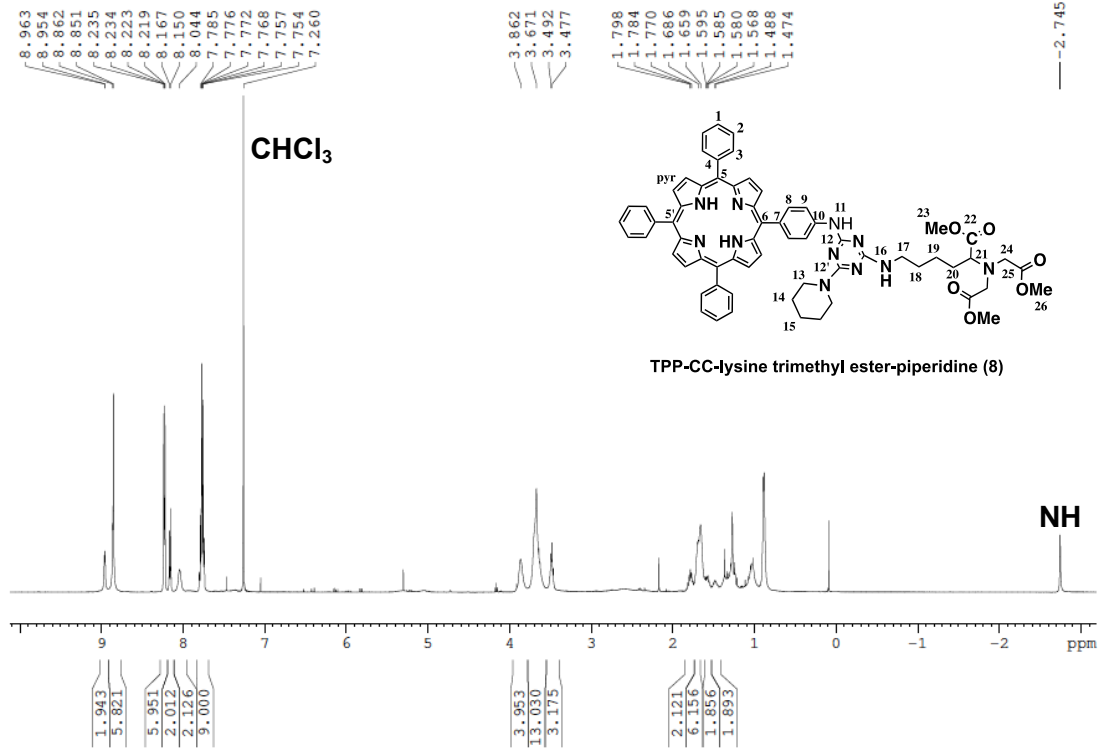
Σχήμα S12 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 16.



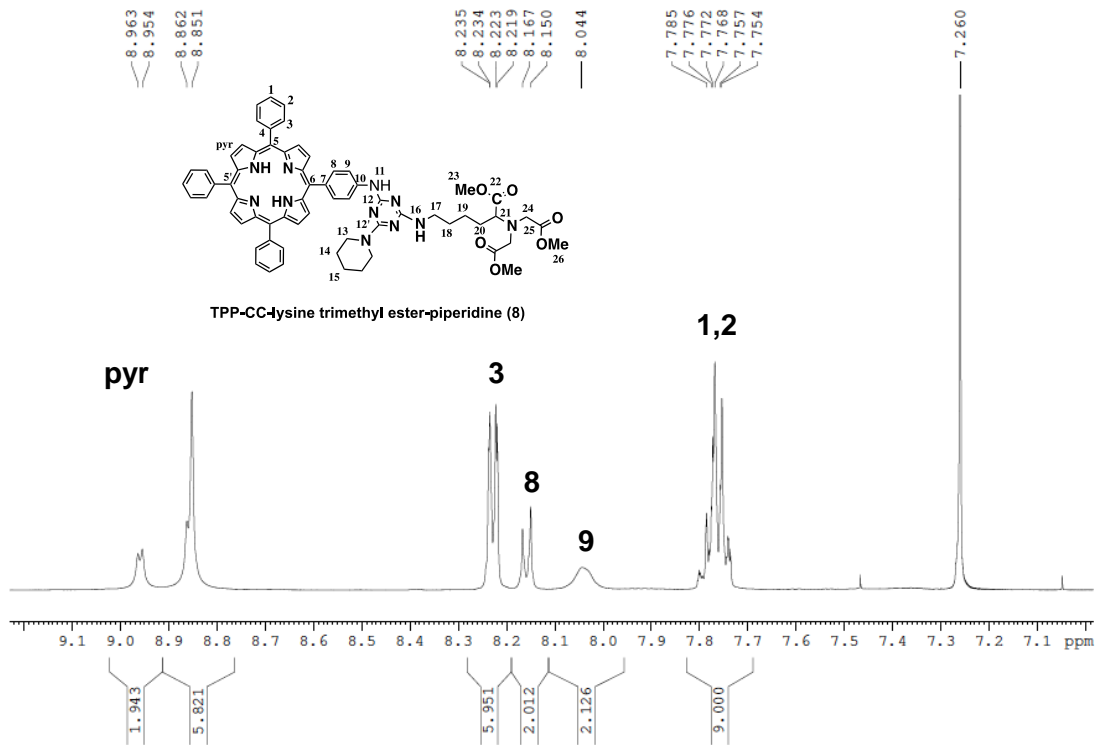
Σχήμα S13 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 17.



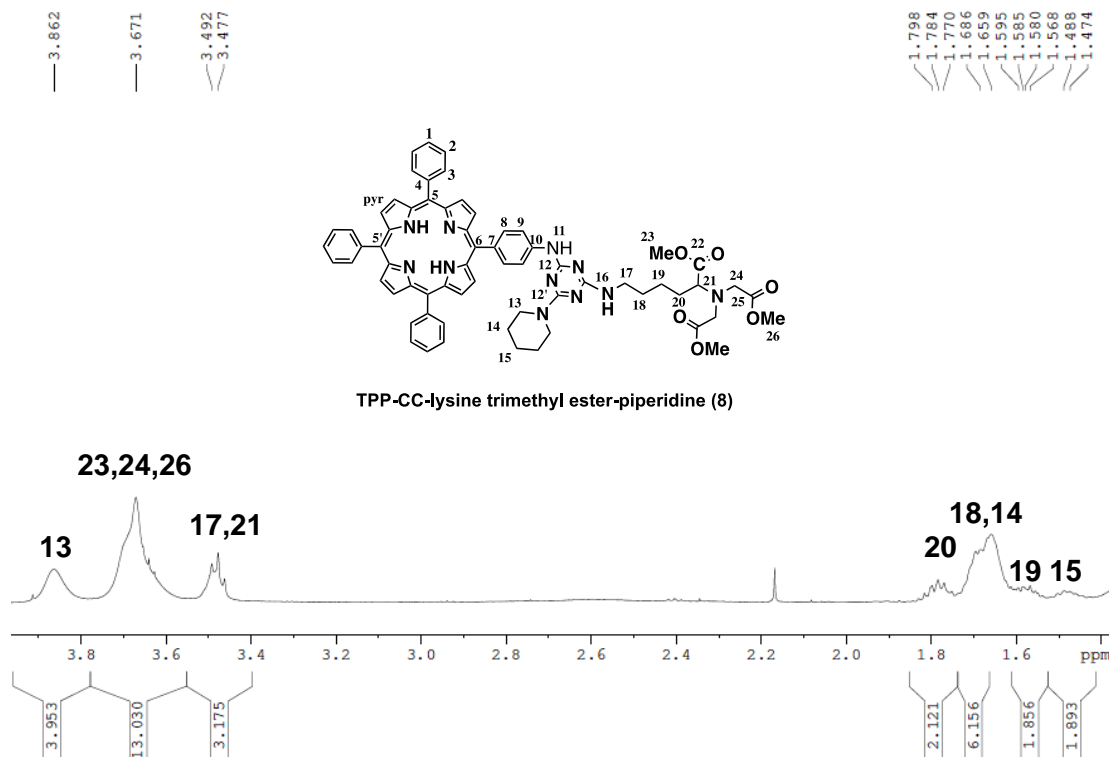
Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR Spectroscopy)



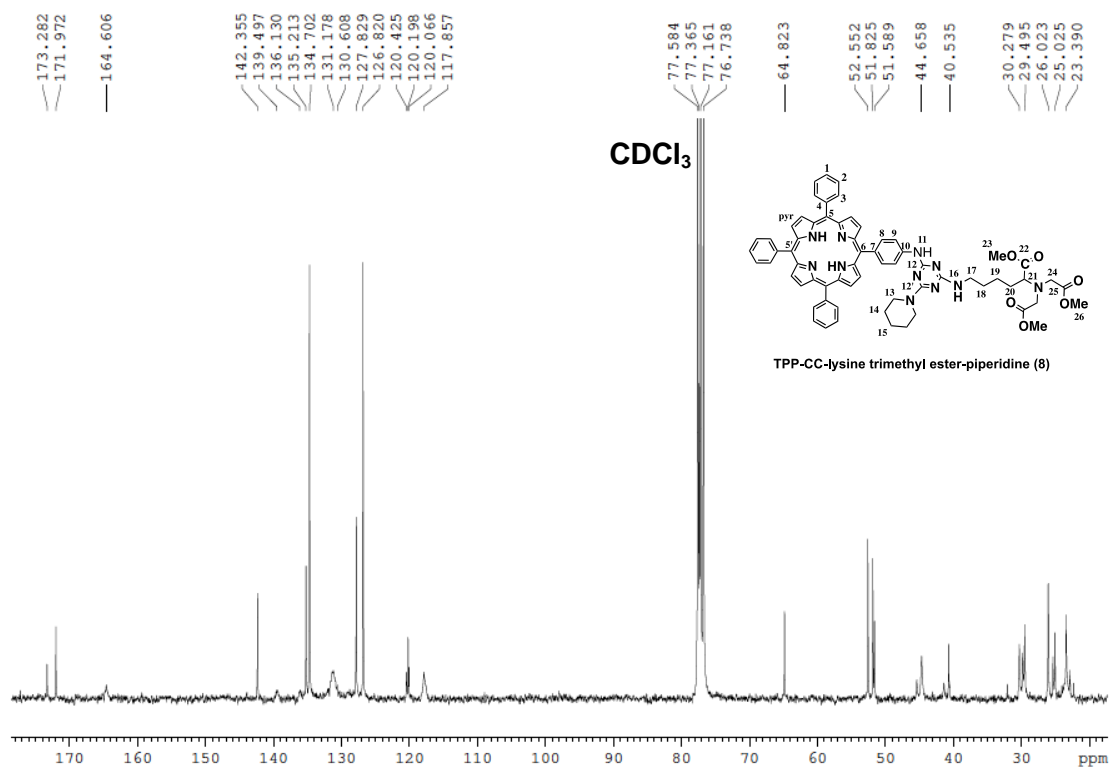
Σχήμα S14 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{TriPP-CC-Lys}(\text{COOH})_3$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



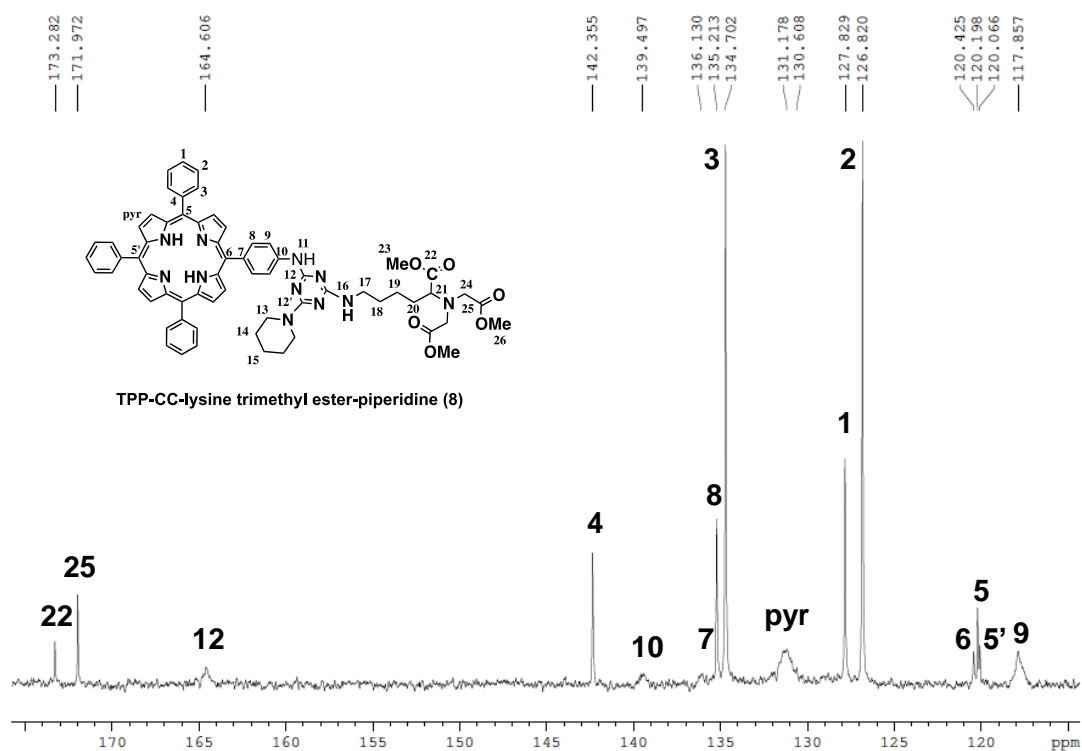
Σχήμα S15 Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{TriPP-CC-Lys}(\text{COOH})_3$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



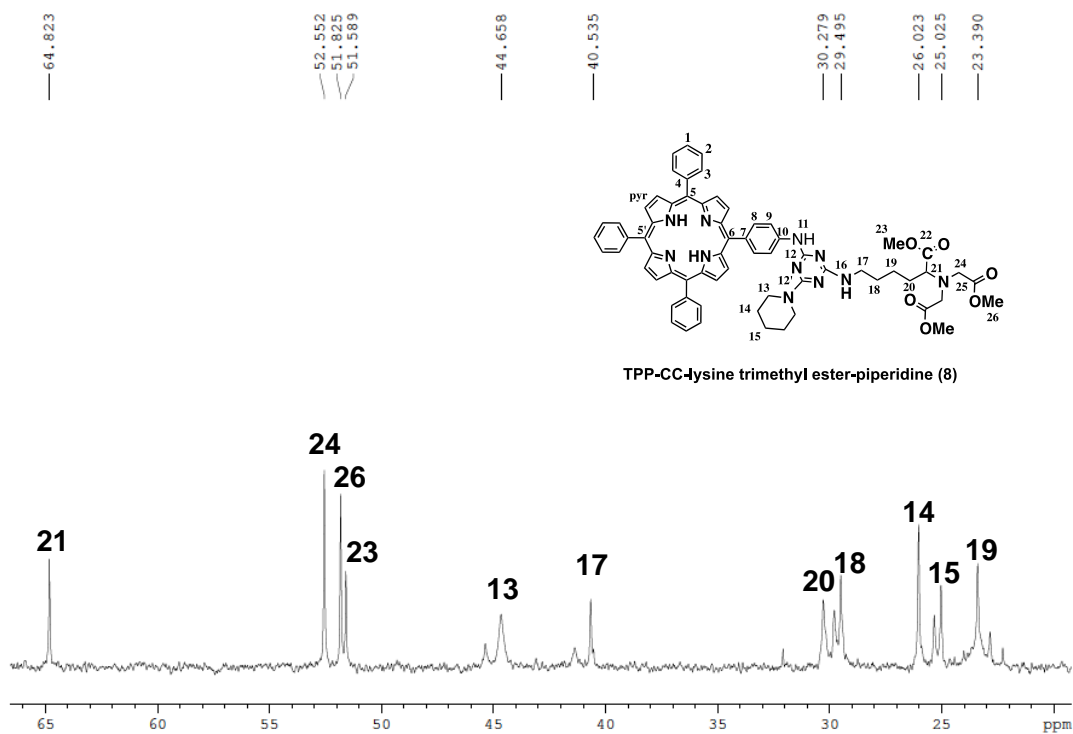
**Σχήμα S16** Αλειφατική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης **TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub>** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



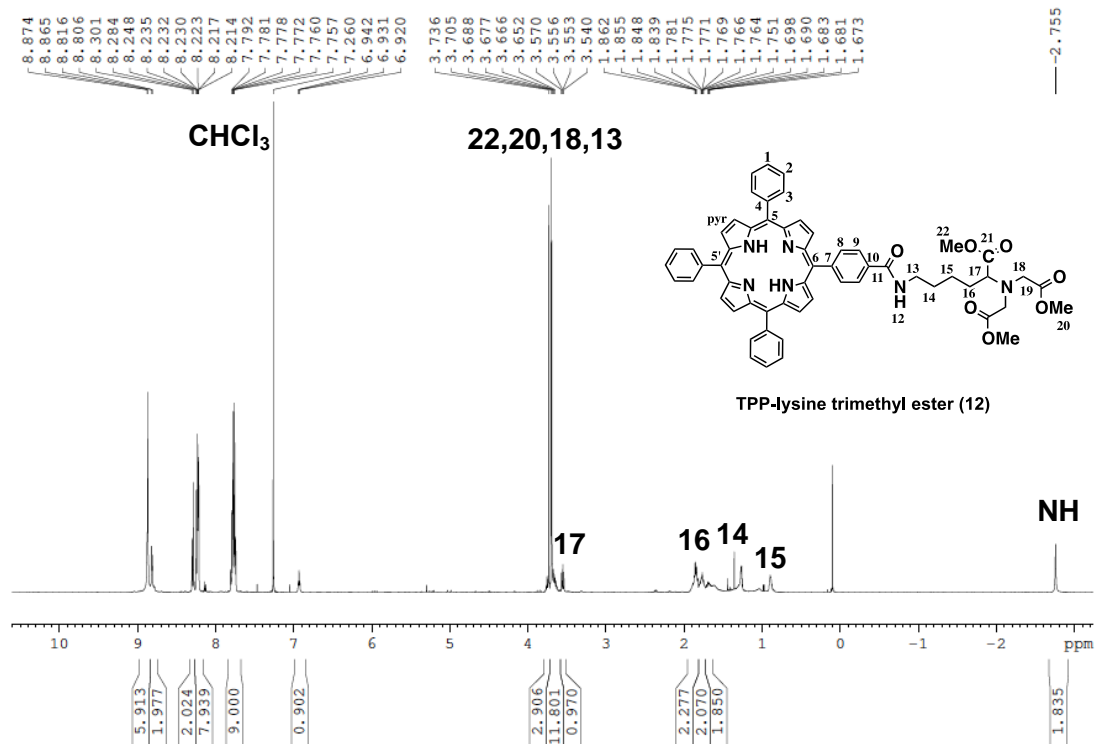
**Σχήμα S17** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης **TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub>** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



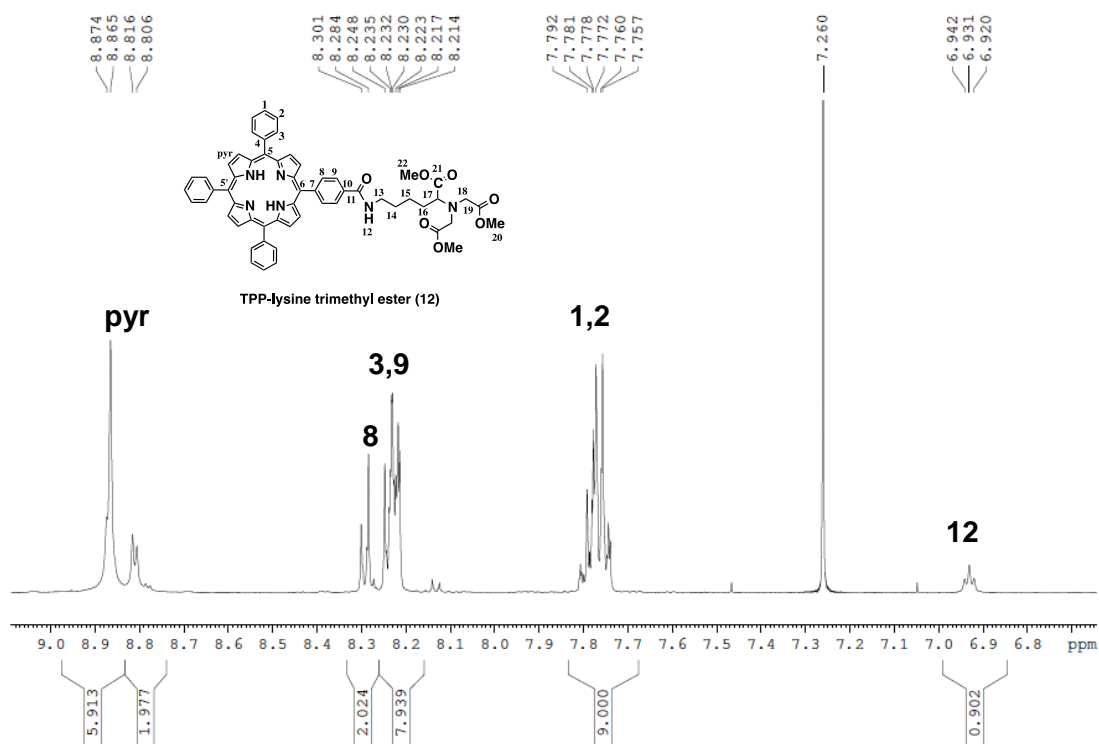
Σχήμα S18 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



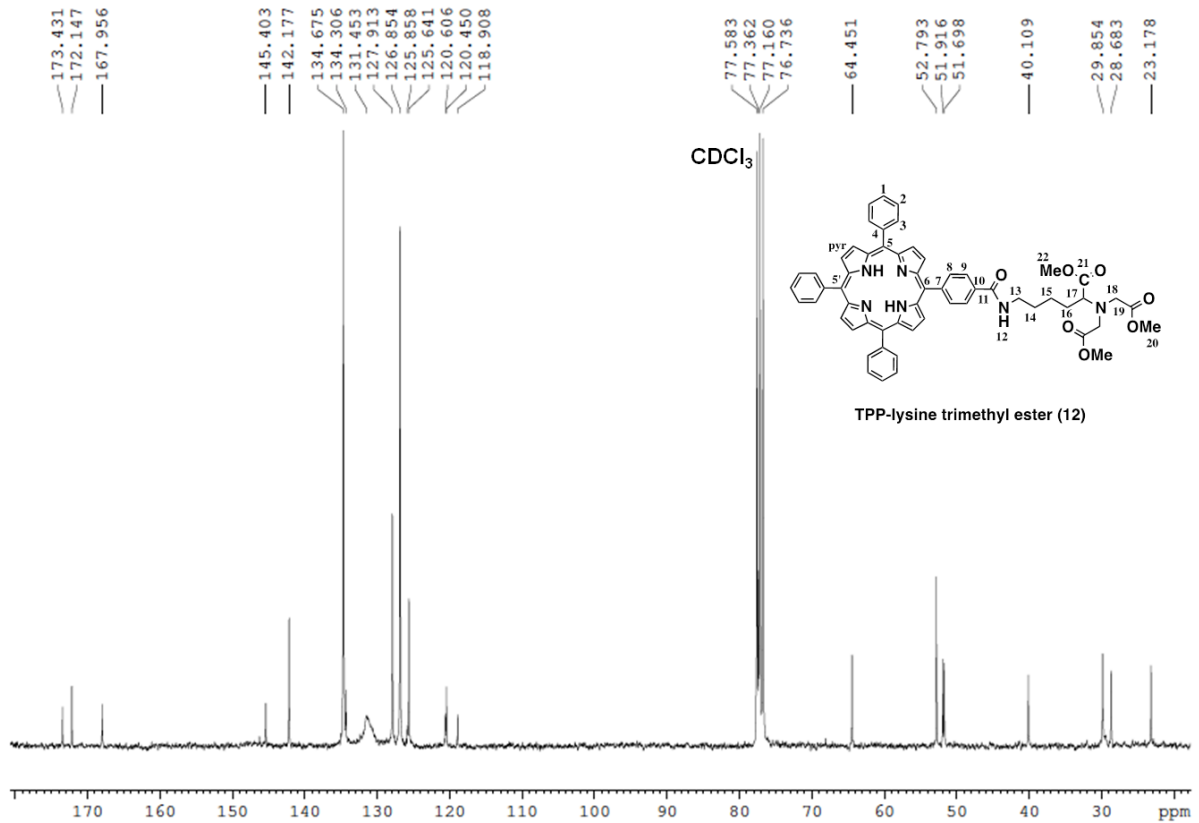
Σχήμα S19 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης TriPP-CC-Lys(COOH)<sub>3</sub> (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



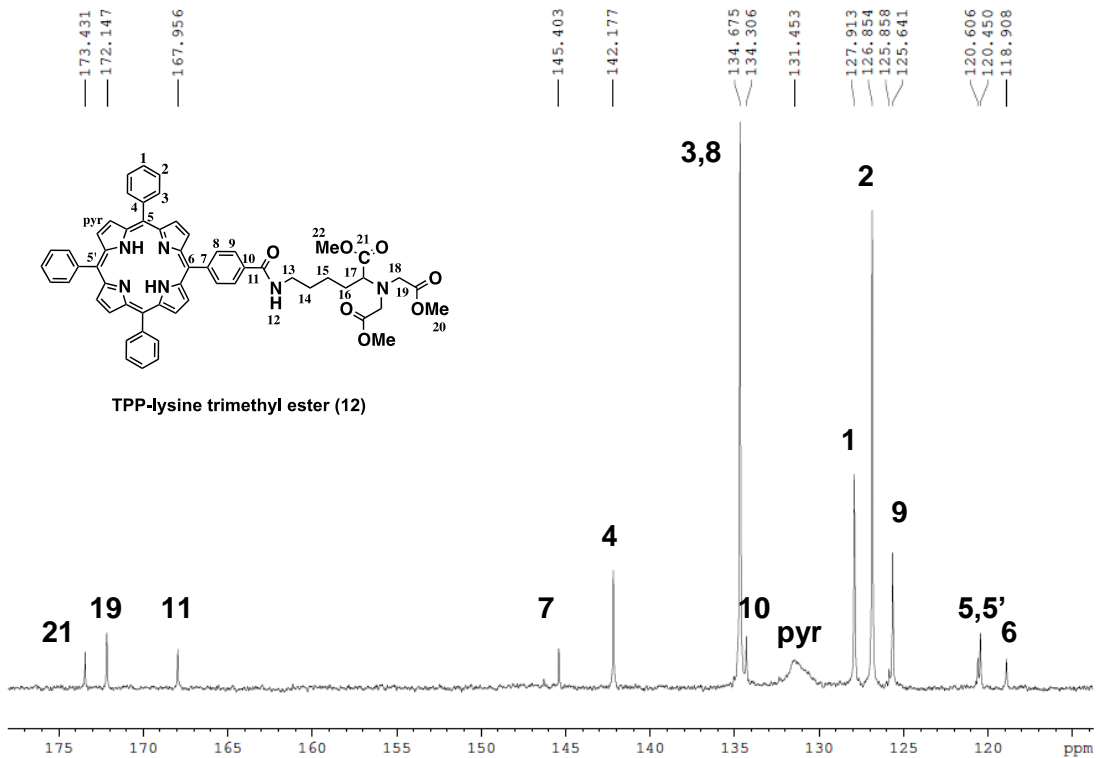
Σχήμα S20 Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της πορφυρίνης TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



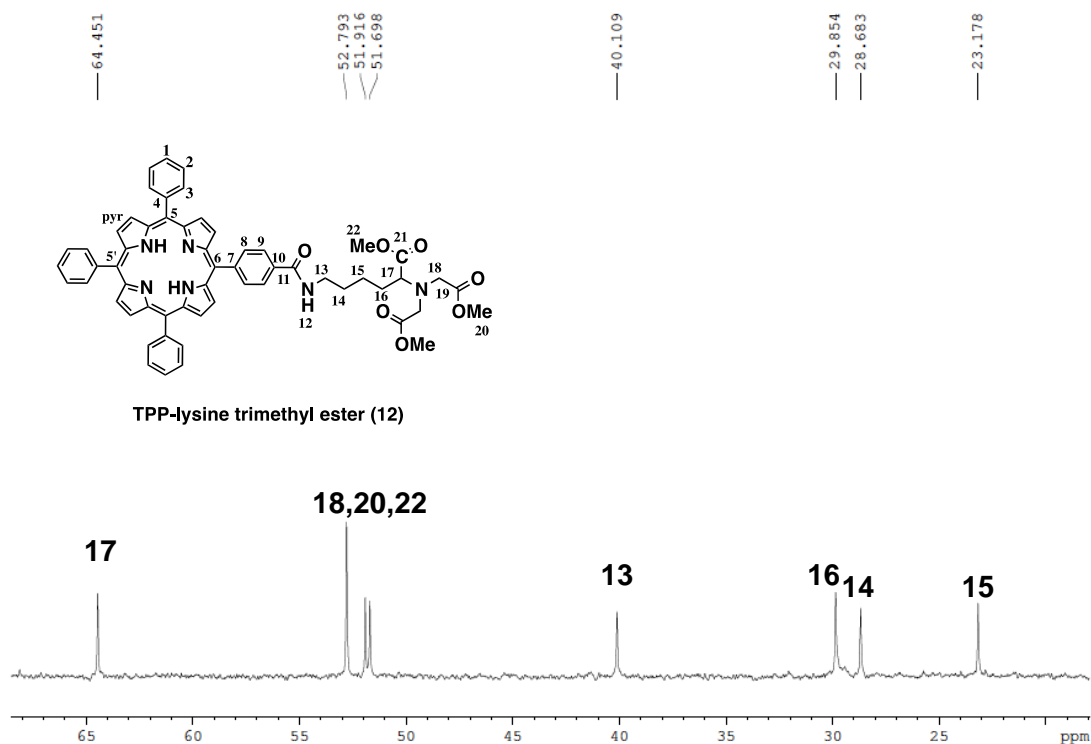
Σχήμα S21 Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR της πορφυρίνης TriPPLys(COOH)<sub>3</sub> (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



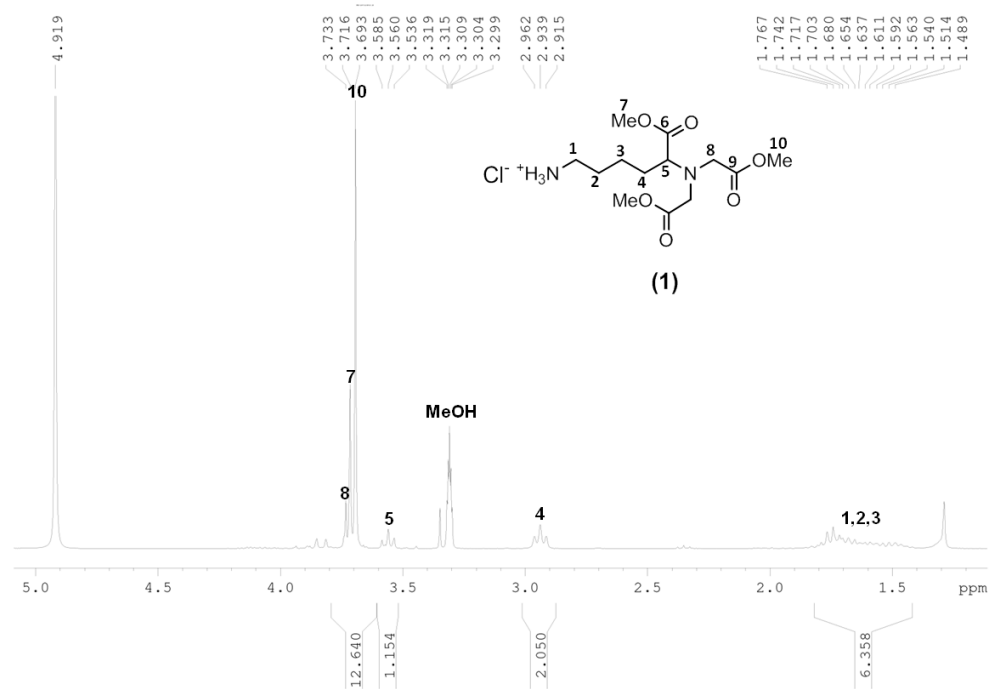
Σχήμα S22 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{TriPPlys}(\text{COOH})_3$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



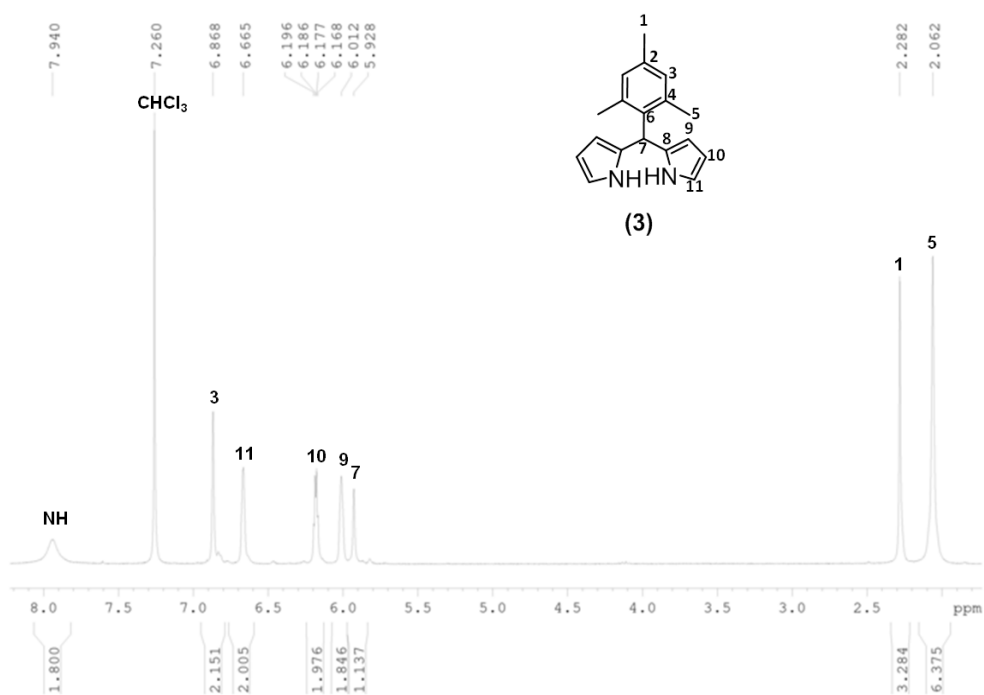
Σχήμα S23 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{TriPPlys}(\text{COOH})_3$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



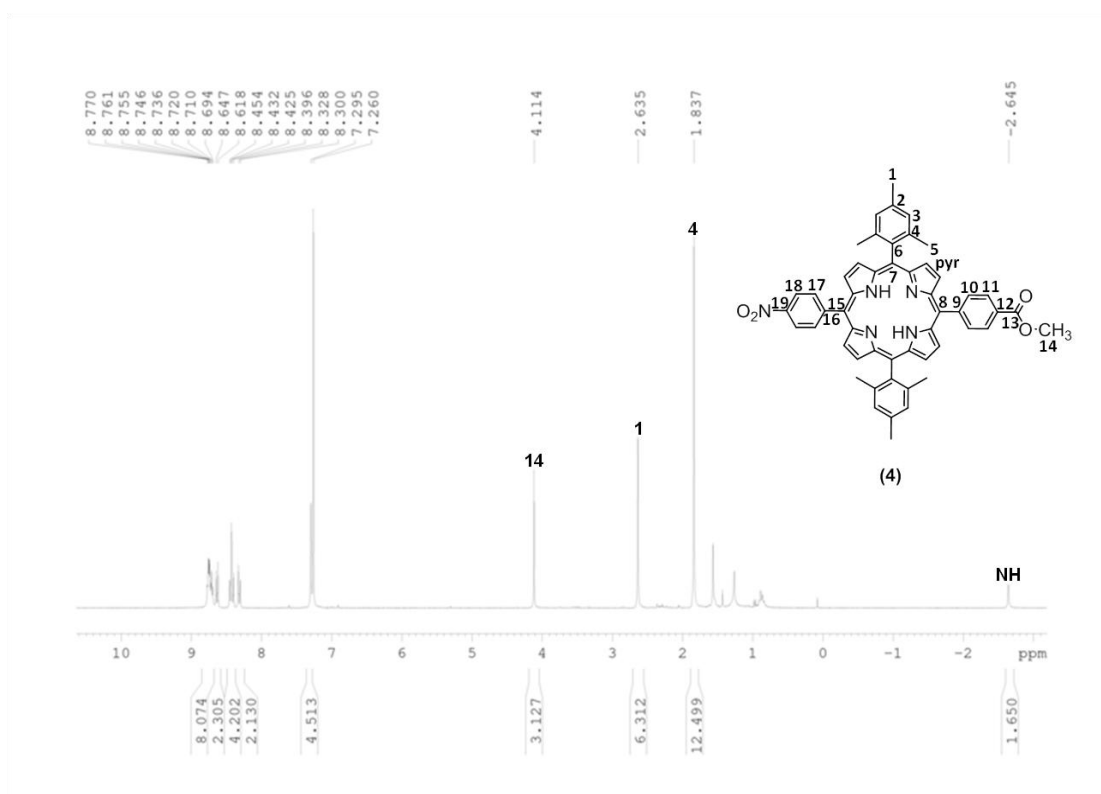
Σχήμα S24 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{TriPPlys}(\text{COOH})_3$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



Σχήμα S25 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης  $\text{NH}_2\text{-Lys}-(\text{COOMe})_3$  (1) (300 MHz,  $\text{MeOD}$ ).

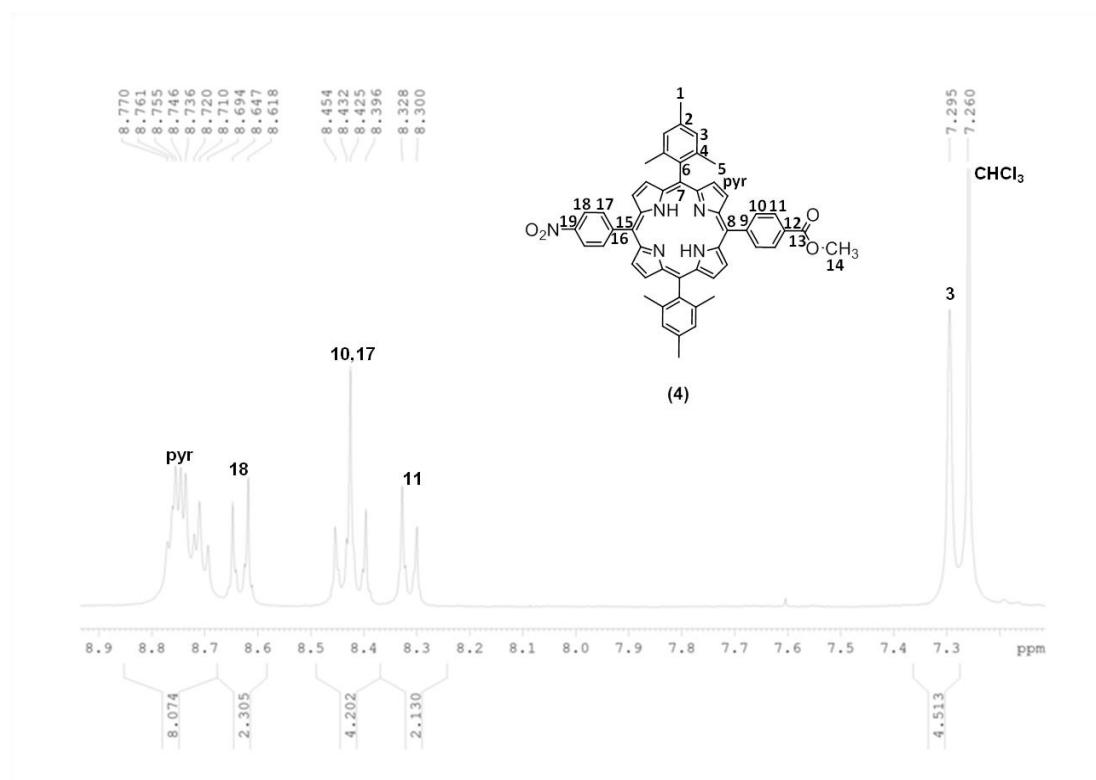


Σχήμα S26 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **Mesityl dipyrromethane (3)** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

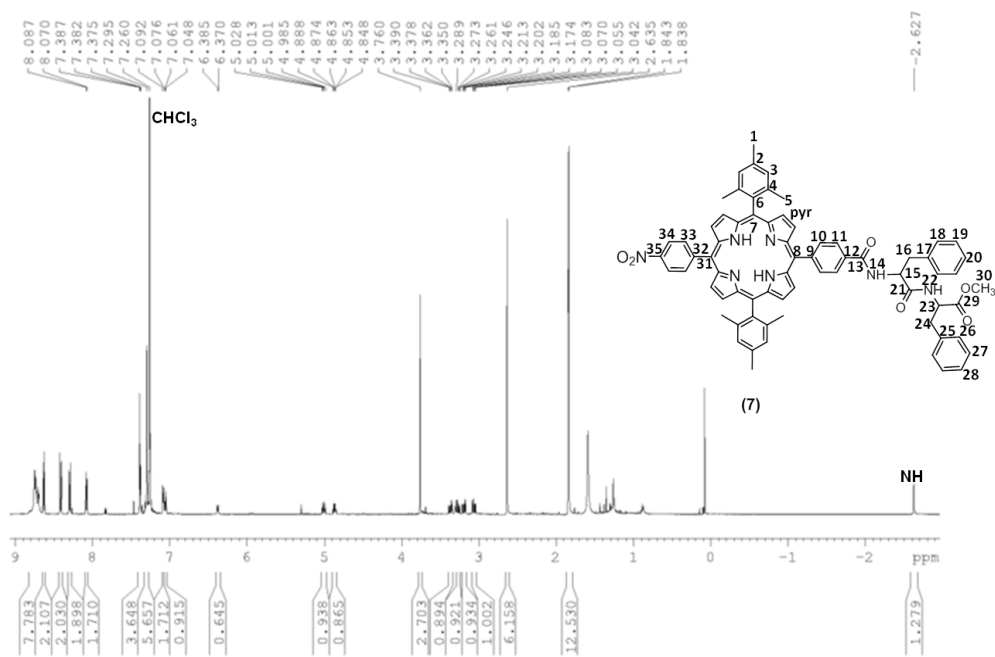


Σχήμα S27 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης **NO<sub>2</sub>-DMP-COOMe (4)** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

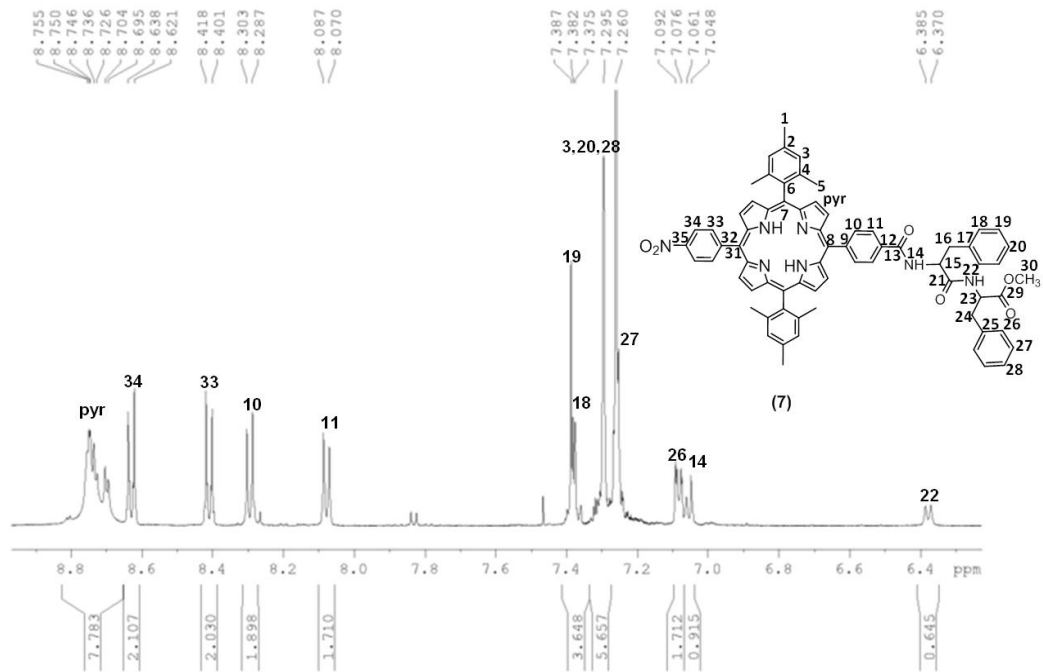




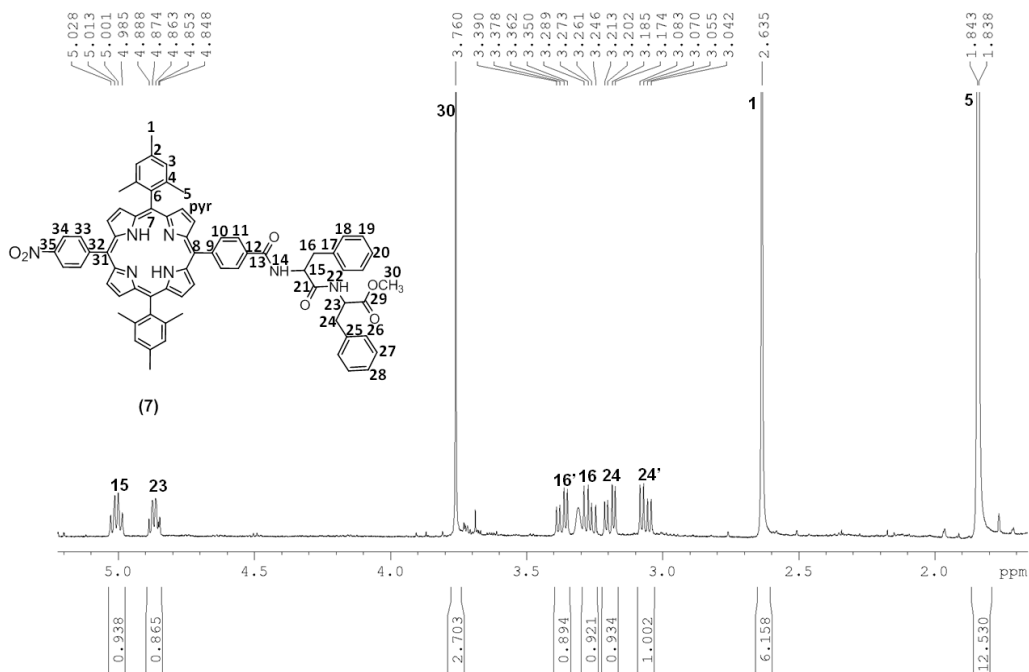
**Σχήμα S28** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης **NO<sub>2</sub>-DMP-COOMe (4)** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



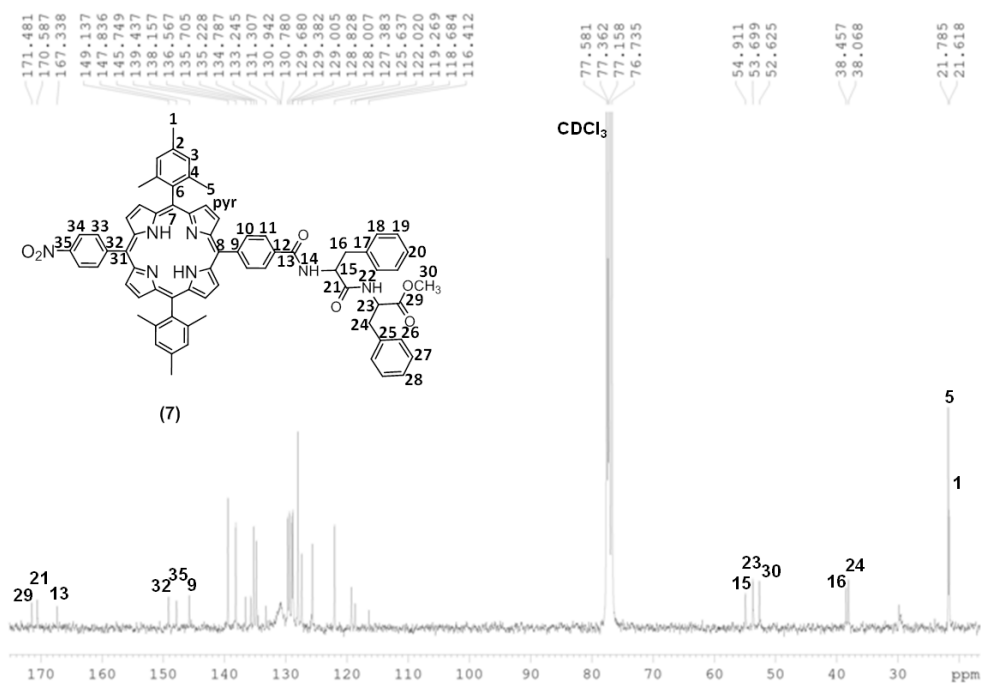
**Σχήμα S29** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης **NO<sub>2</sub>-DMP-FF-COOMe (7)** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



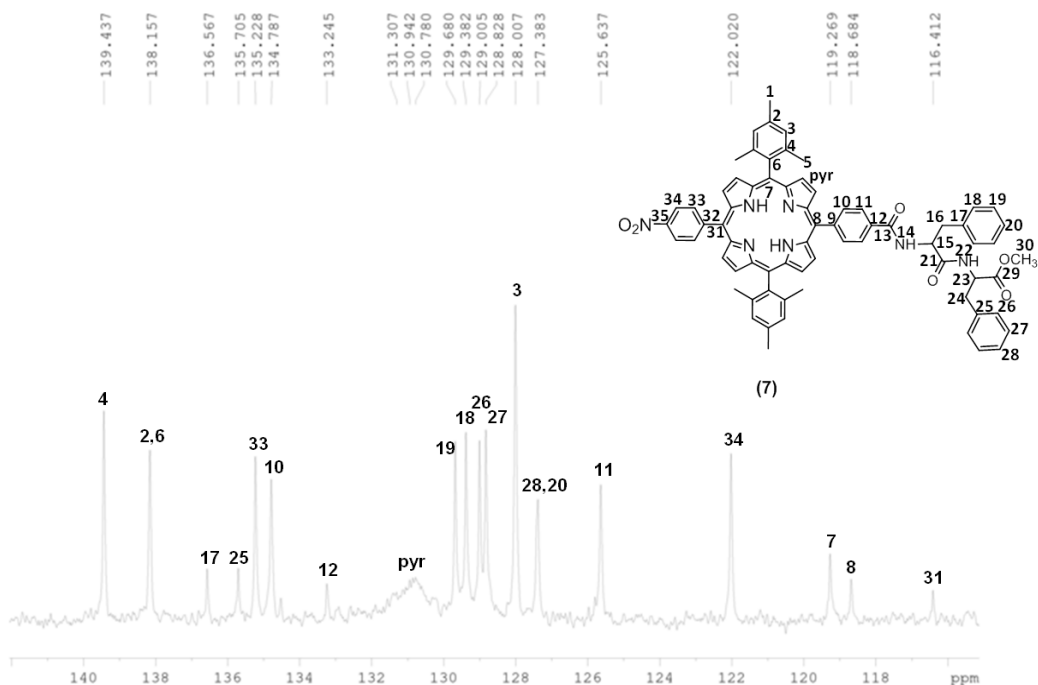
Σχήμα S30 Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{NO}_2\text{-DMP-FF-COOMe}$  (7) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



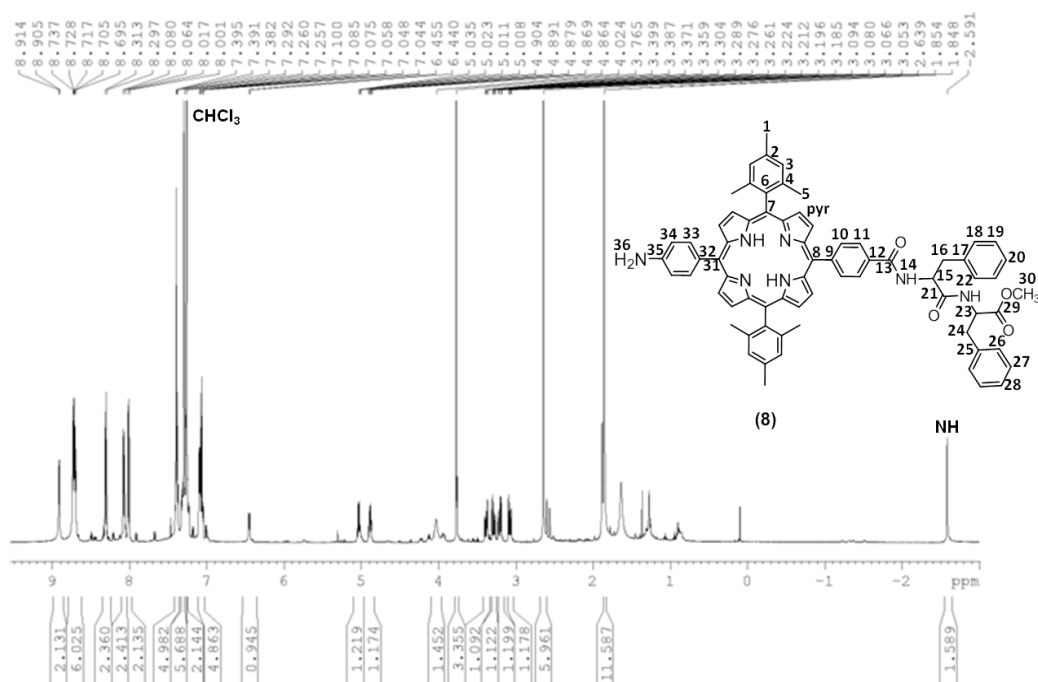
Σχήμα S31 Αλειφατική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{NO}_2\text{-DMP-FF-COOMe}$  (7) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



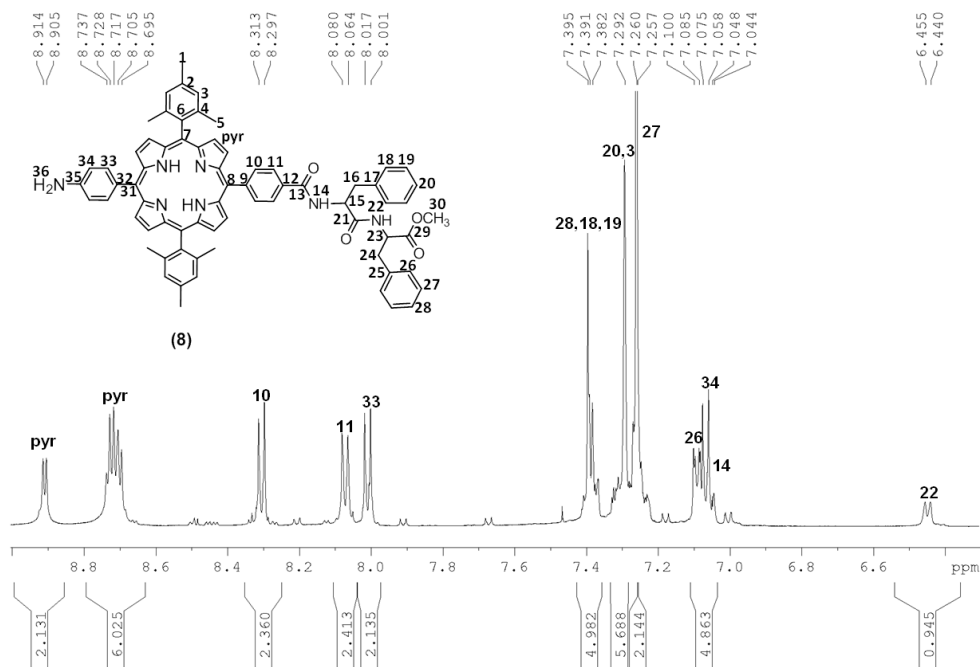
Σχήμα S32 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{NO}_2\text{-DMP-FF-COOMe}$  (7) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



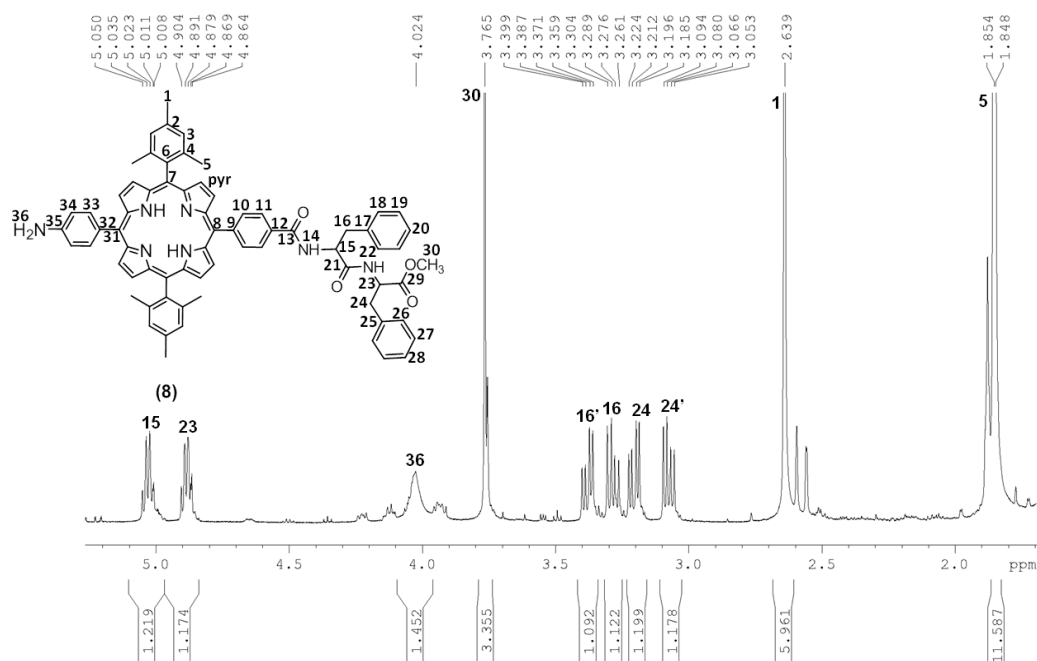
Σχήμα S33 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{NO}_2\text{-DMP-FF-COOMe}$  (7) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



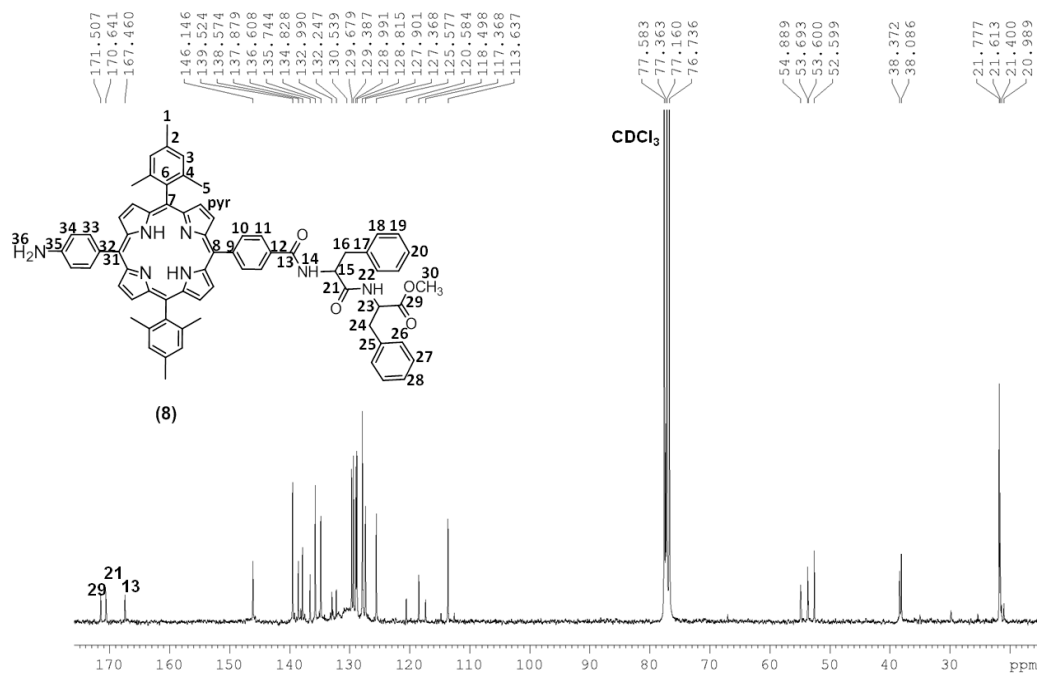
Σχήμα S34 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{NH}_2\text{-DMP-FF-COOMe}$  (8) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



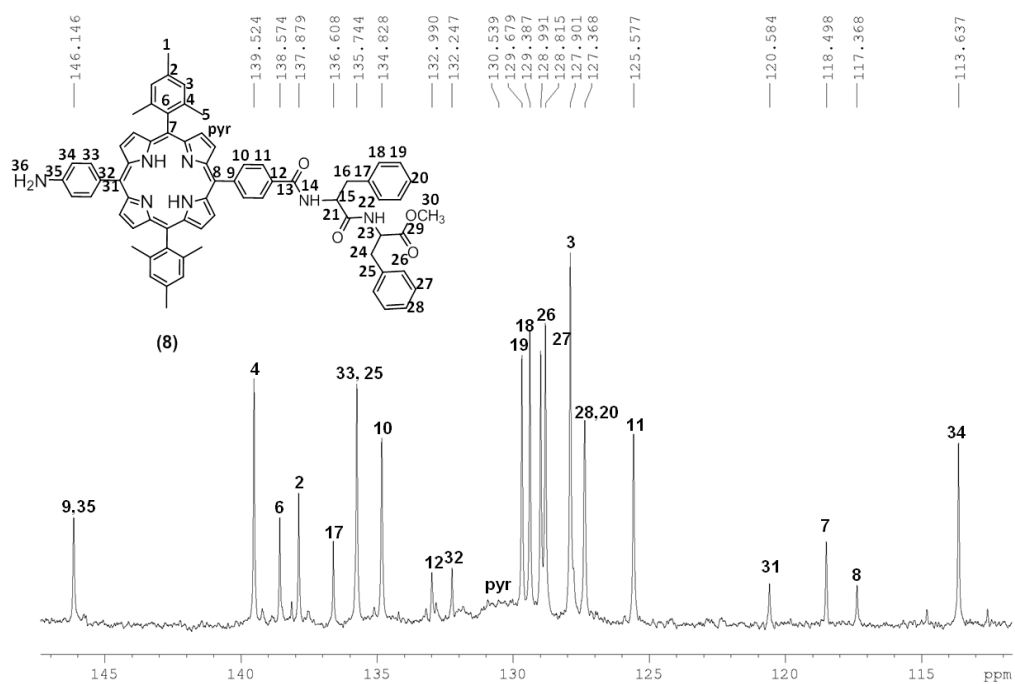
Σχήμα S35 Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{NH}_2\text{-DMP-FF-COOMe}$  (8) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



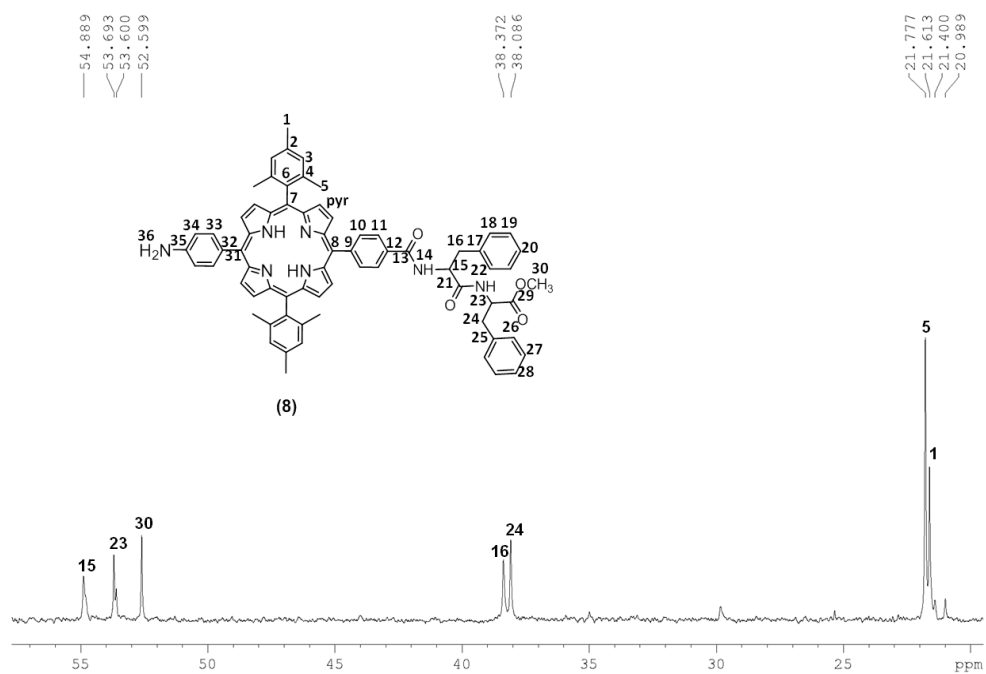
**Σχήμα S36** Αλειφατική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR της πορφυρίνης NH<sub>2</sub>-DMP-FF-COOMe (8) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



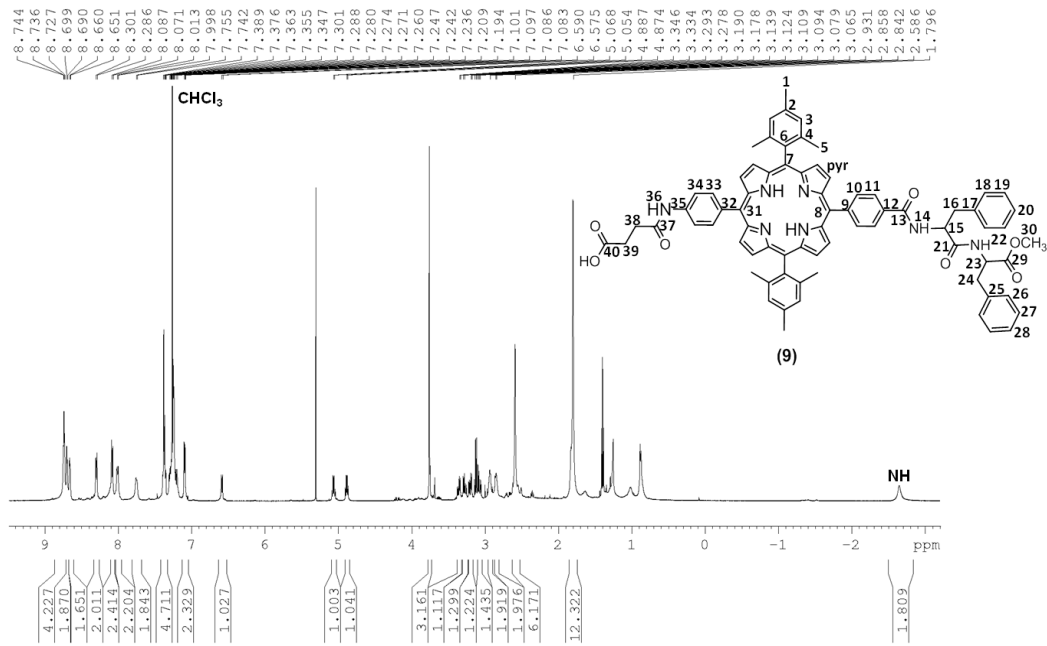
**Σχήμα S37** Φάσμα <sup>13</sup>C NMR της πορφυρίνης NH<sub>2</sub>-DMP-FF-COOMe (8) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



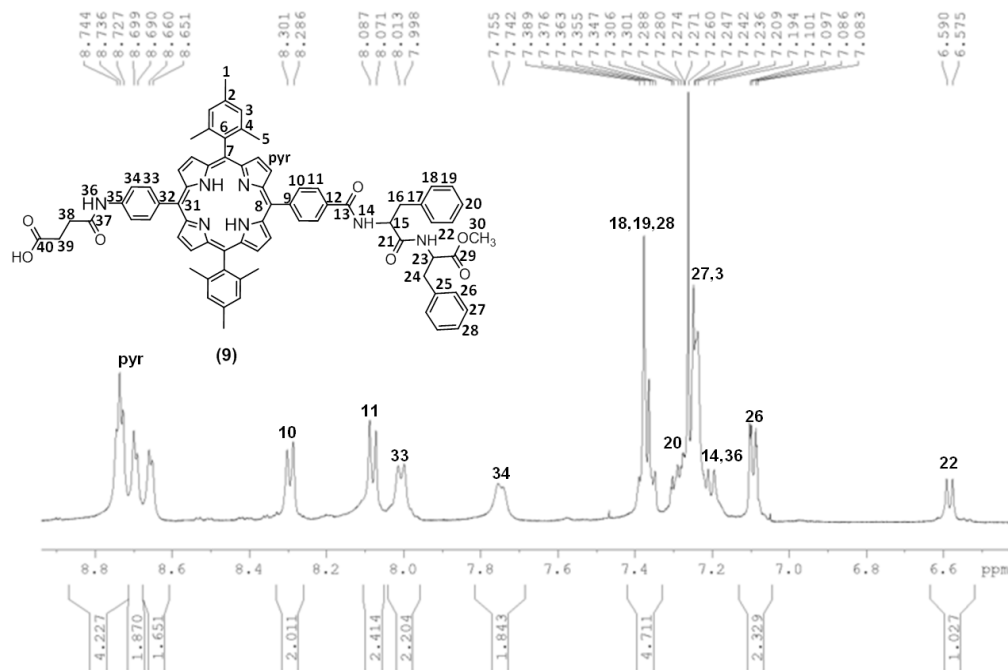
Σχήμα S38 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{NH}_2\text{-DMP-FF-COOMe}$  (8) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



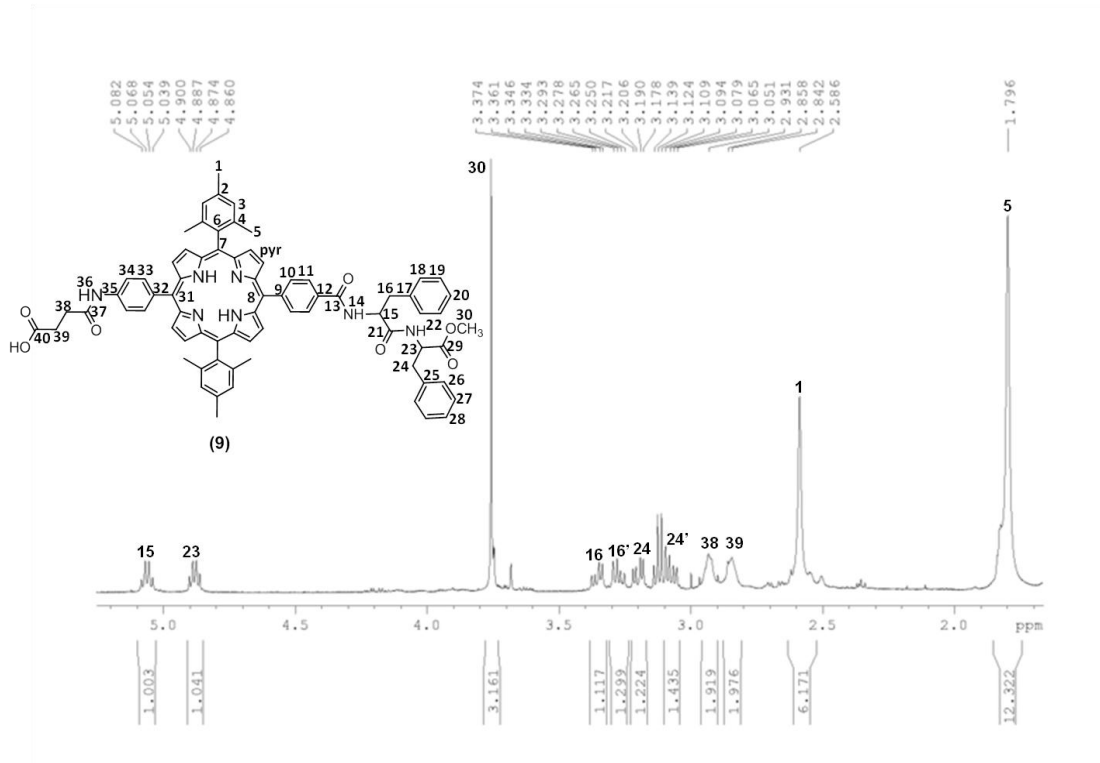
Σχήμα S39 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{NH}_2\text{-DMP-FF-COOMe}$  (8) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



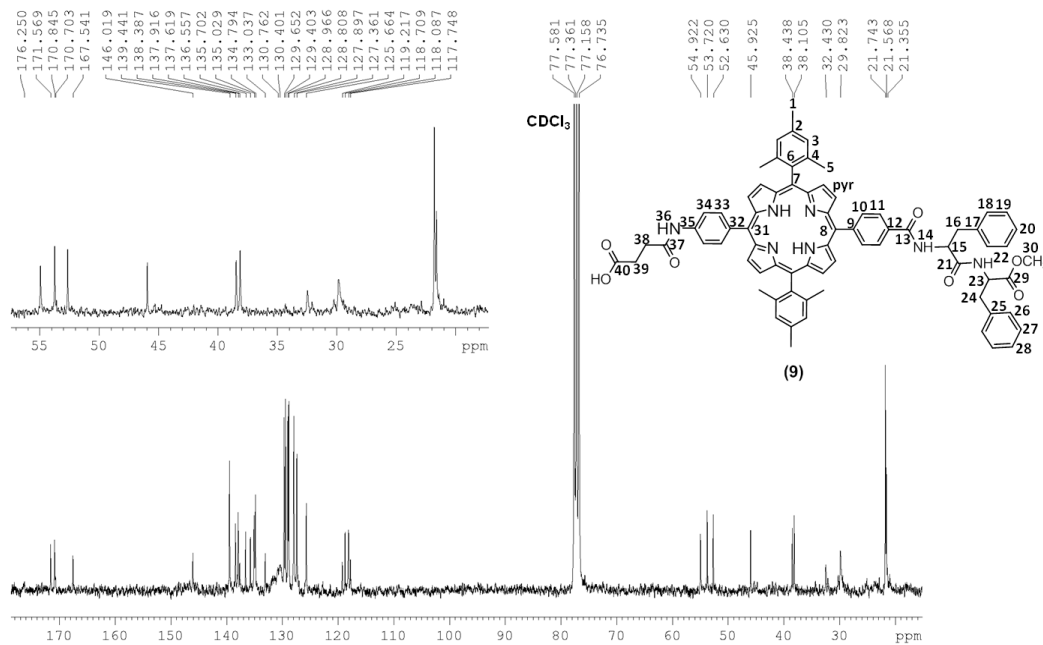
Σχήμα S40 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης **FF-DMP-PCP Acid (9)** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Σχήμα S41 Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης **FF-DMP-PCP Acid (9)** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

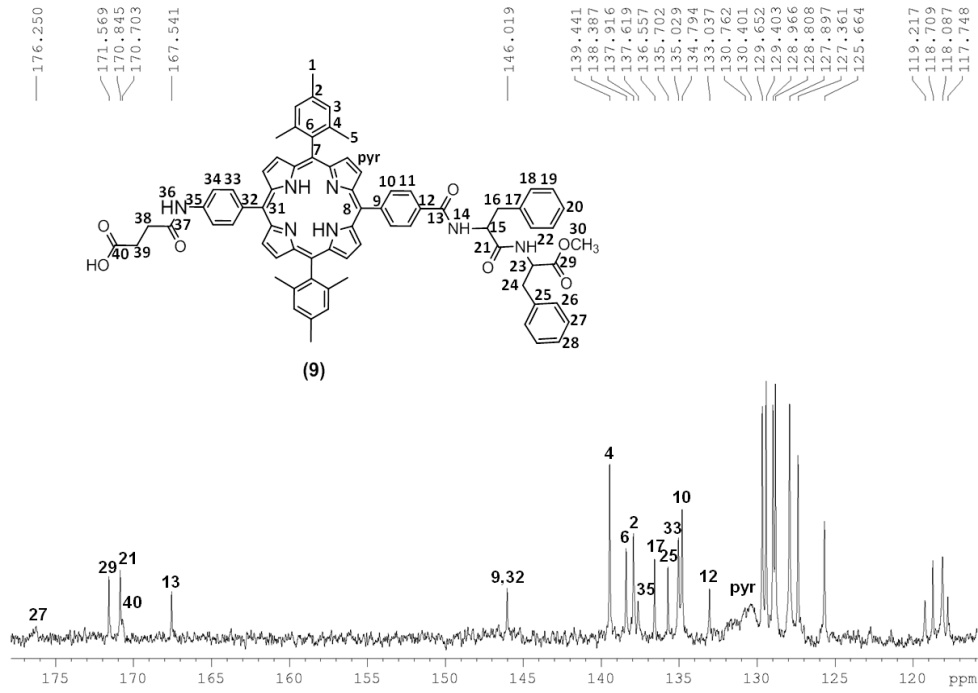


Σχήμα S42 Αλειφατική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης FF-DMP-PCP Acid (9) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

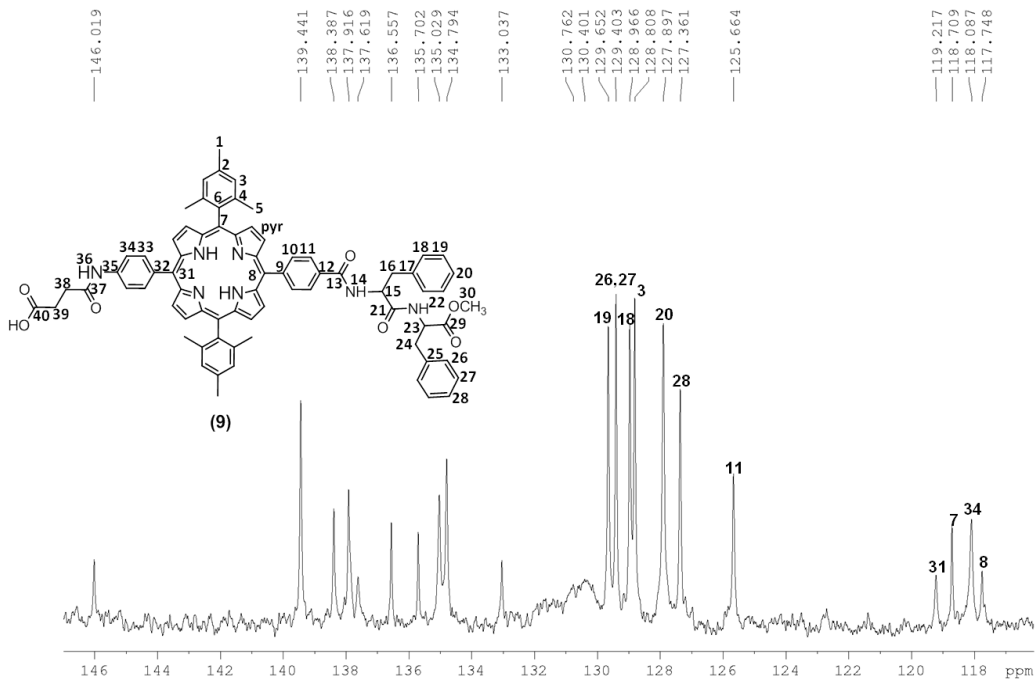


Σχήμα S43 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης FF-DMP-PCP Acid (9) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

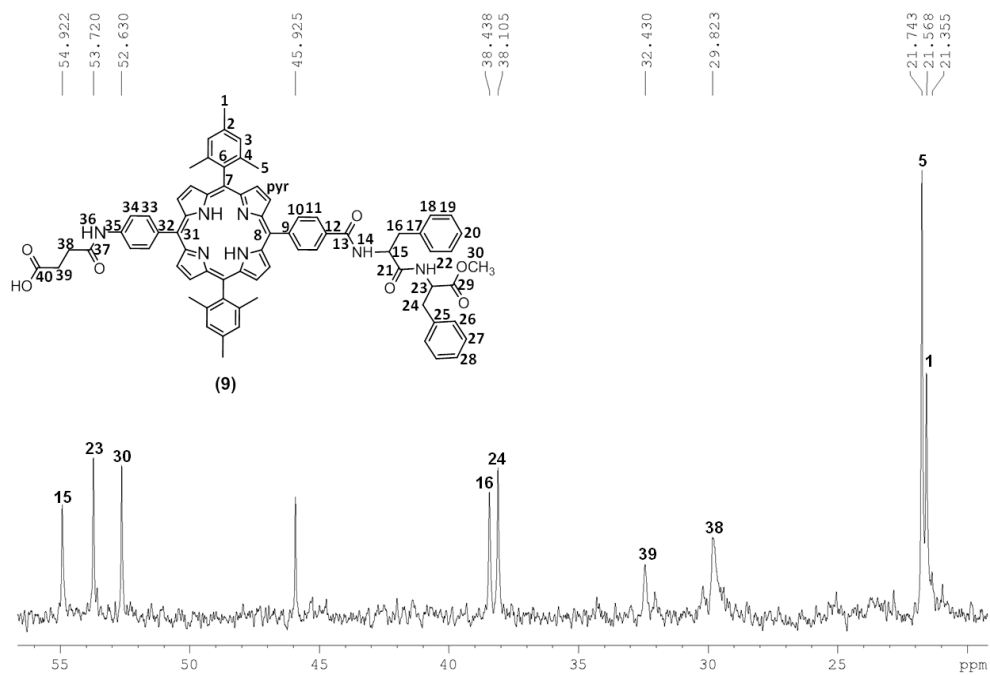




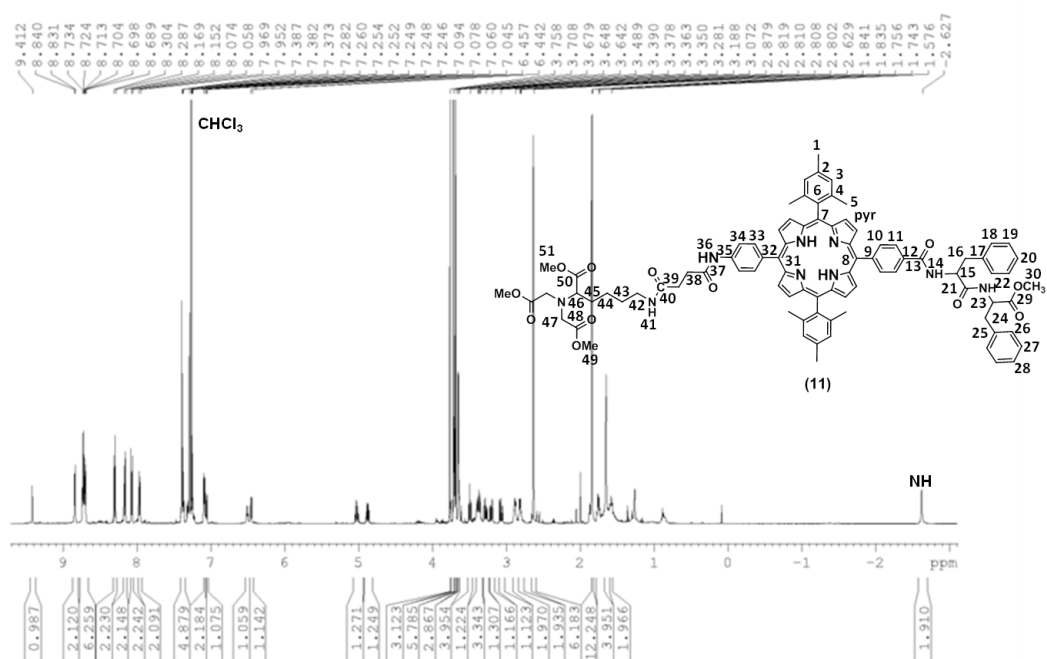
Σχήμα S44 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης FF-DMP-PCP Acid (9) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



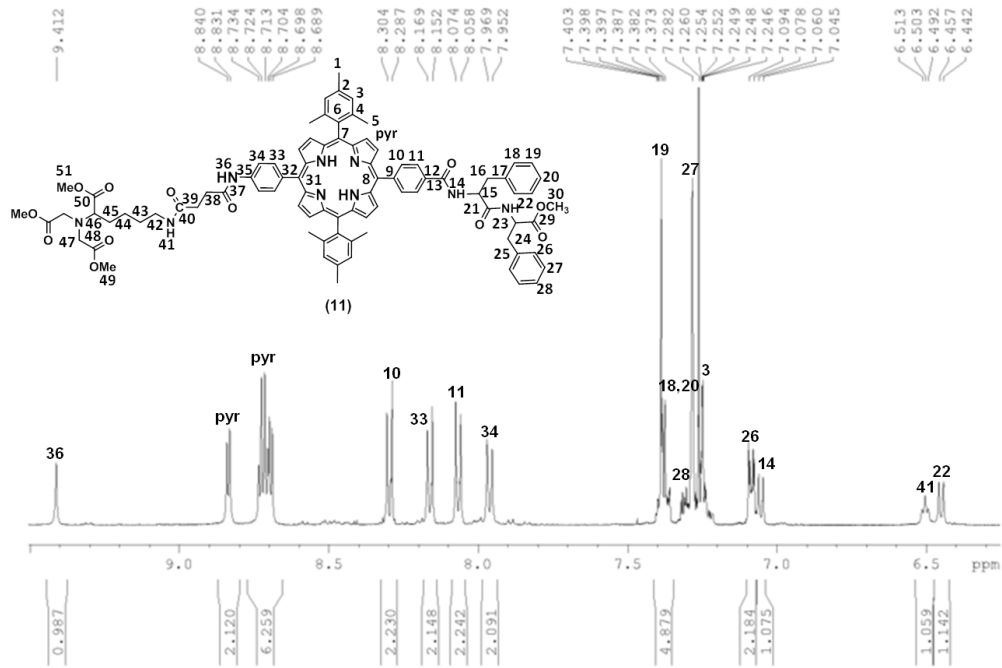
Σχήμα S45 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης FF-DMP-PCP Acid (9) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



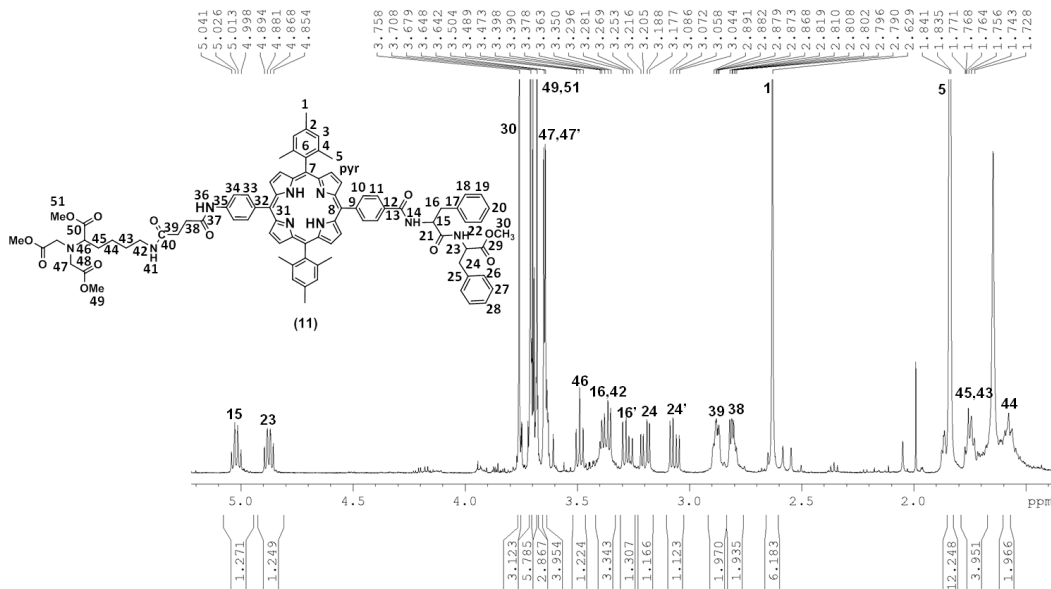
Σχήμα S46 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης **FF-DMP-PCP Acid (9)** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



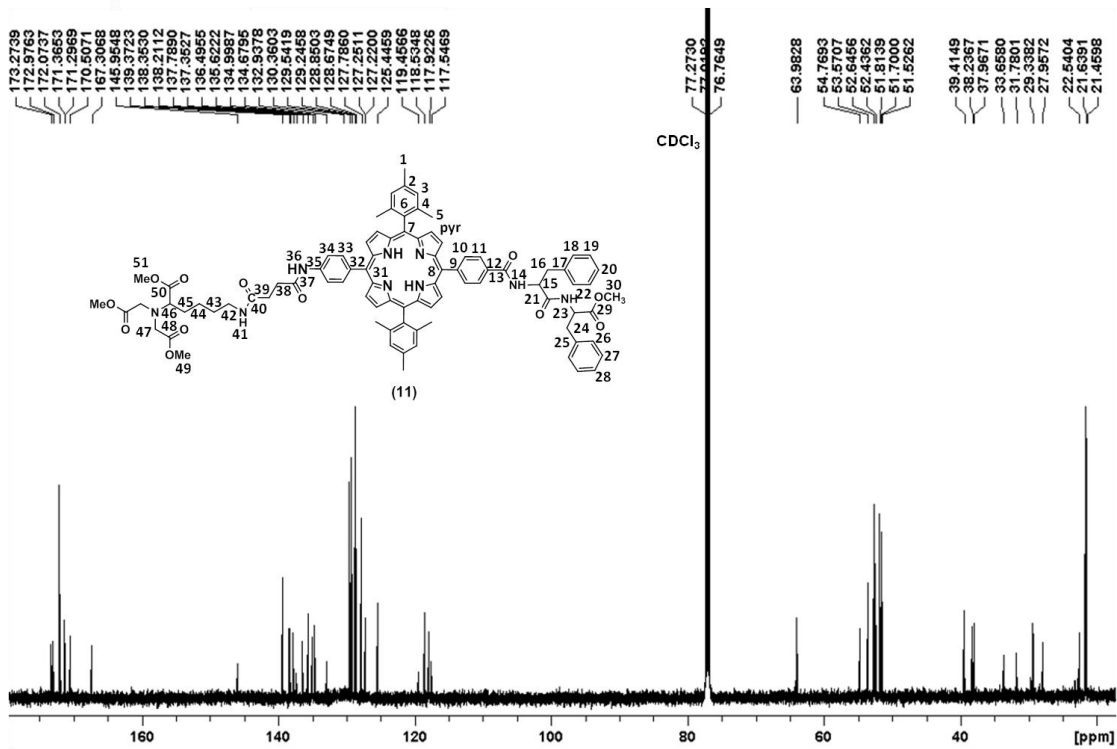
Σχήμα S47 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης **FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11)** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



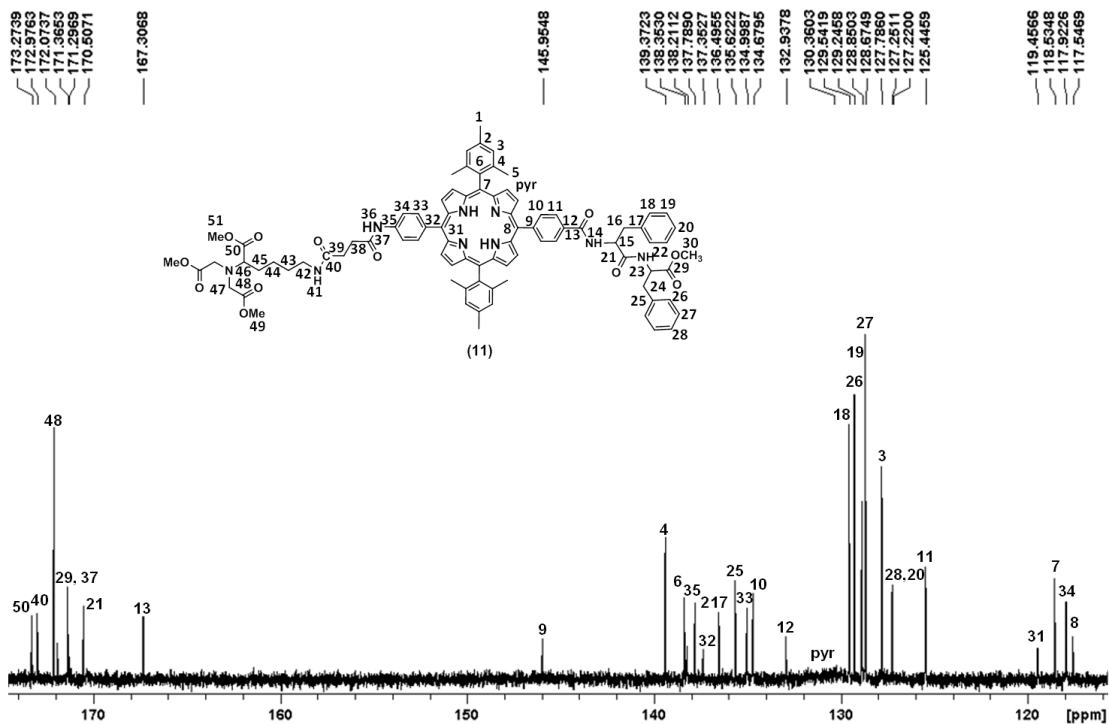
Σχήμα S48 Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης **FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11)** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



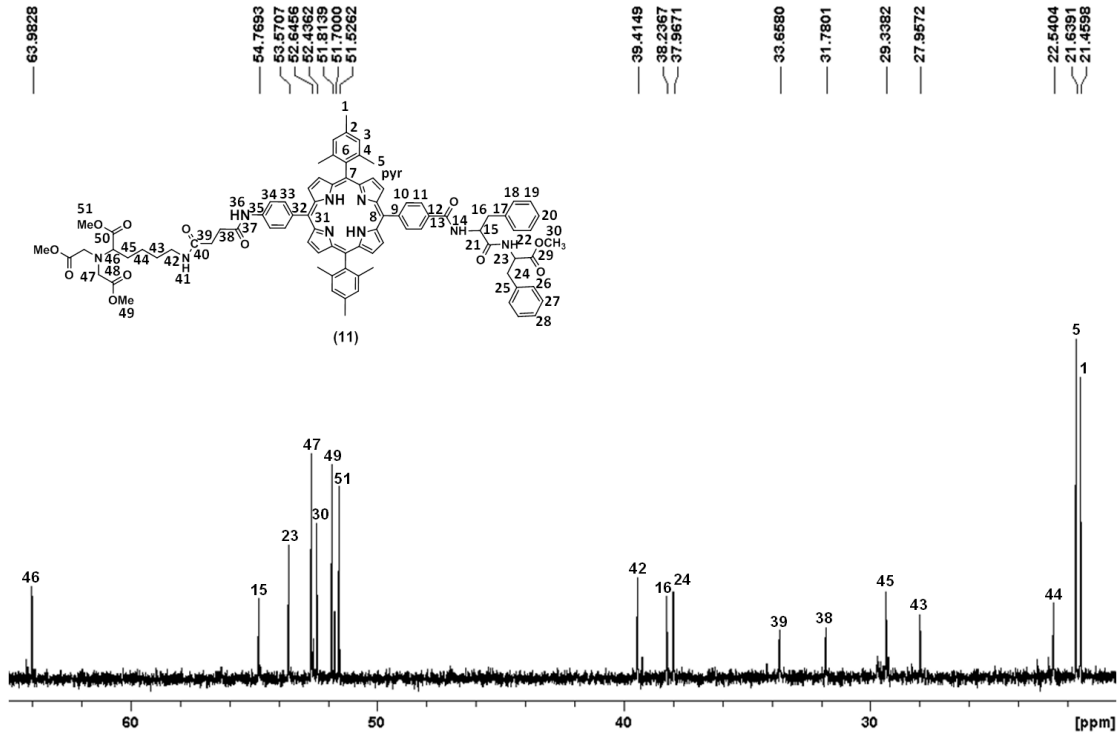
Σχήμα S49 Αλειφατική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης **FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11)** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



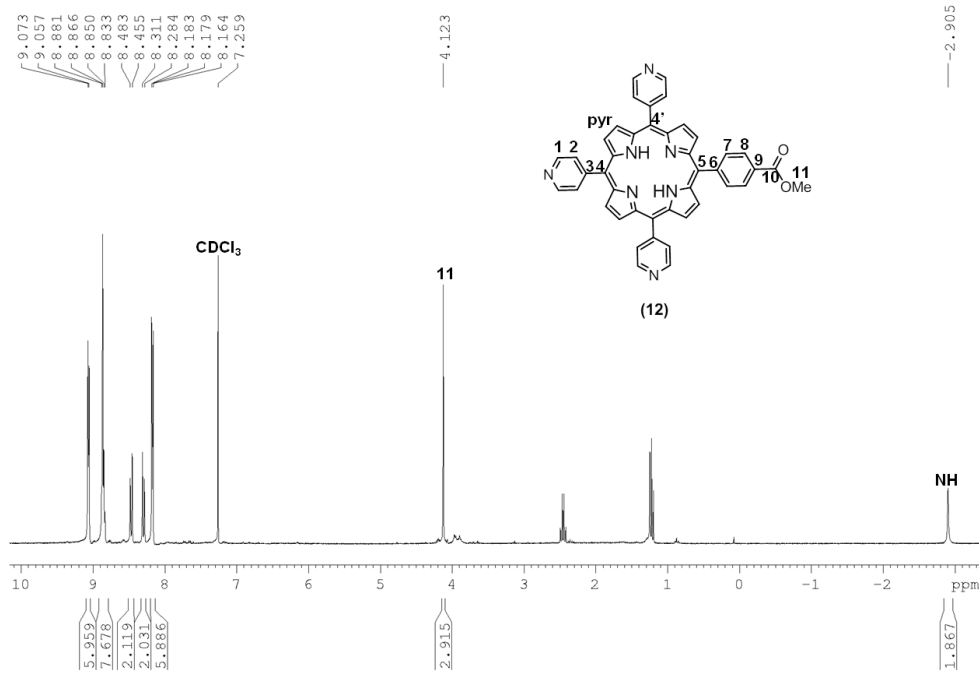
Σχήμα S50 Φάσμα <sup>13</sup>C NMR της πορφυρίνης FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



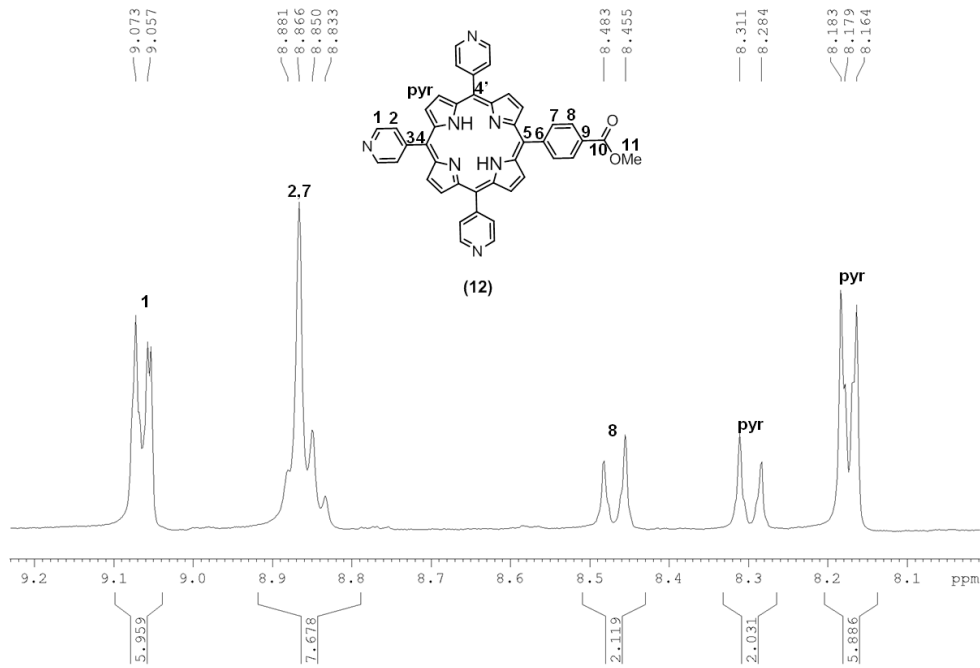
Σχήμα S51 Φάσμα <sup>13</sup>C NMR της πορφυρίνης FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) zoom.



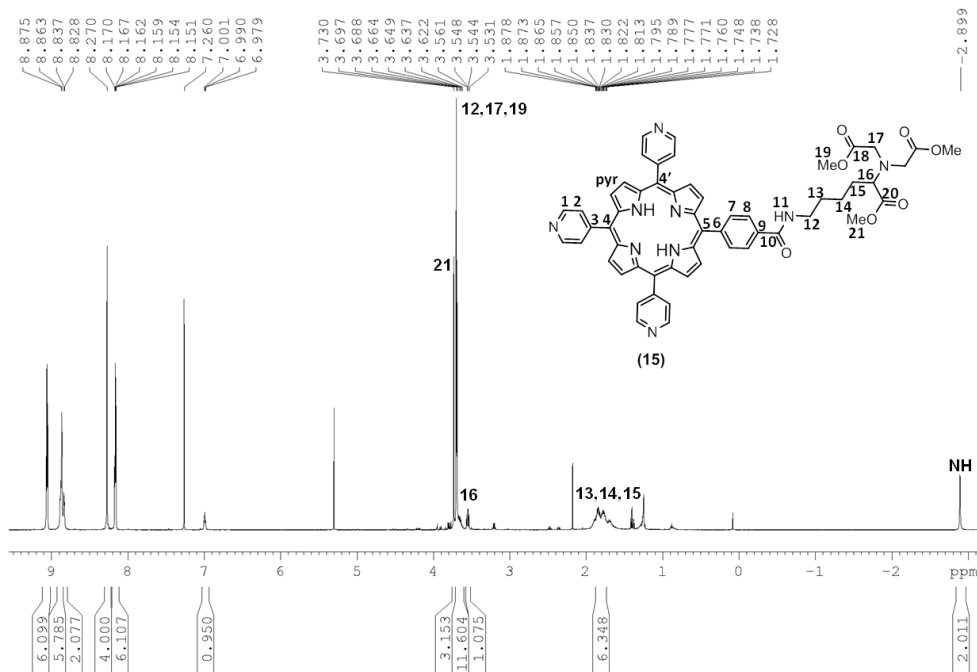
Σχήμα S52 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης FF-DMP-PCP-Lys(COOMe)<sub>3</sub> (11) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) zoom.



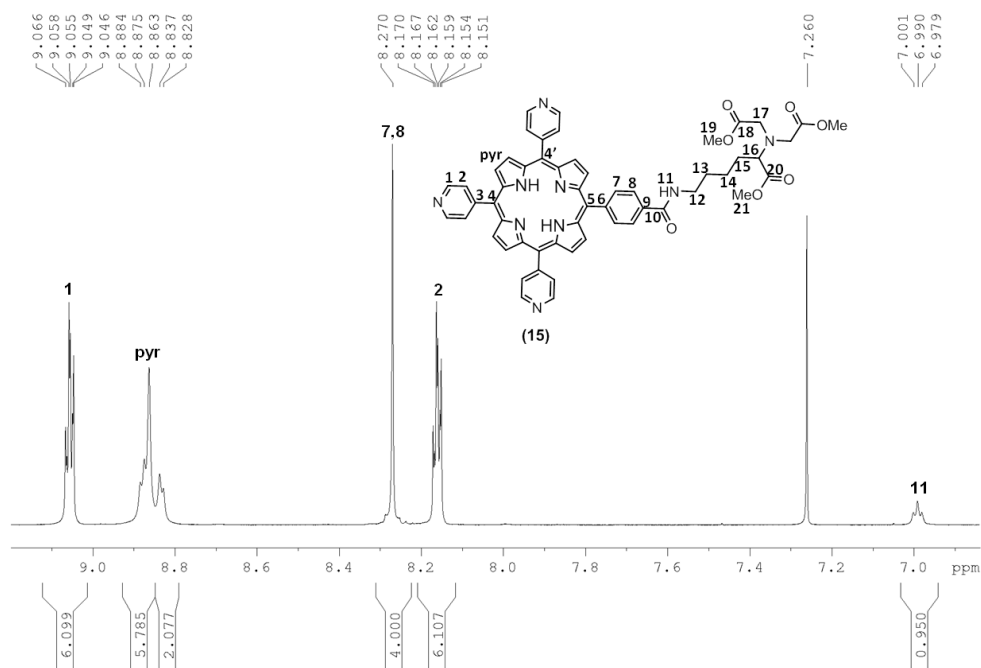
Σχήμα S53 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης TriPyP-COOMe (12) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



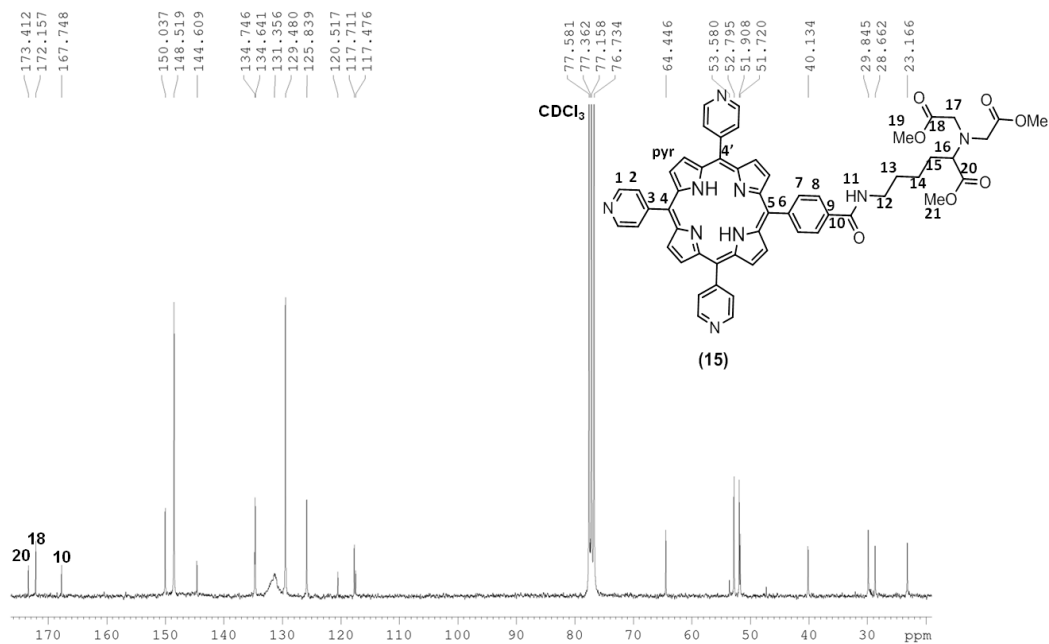
**Σχήμα S54** Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR της πορφυρίνης **TriPyP-COOMe (12)** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



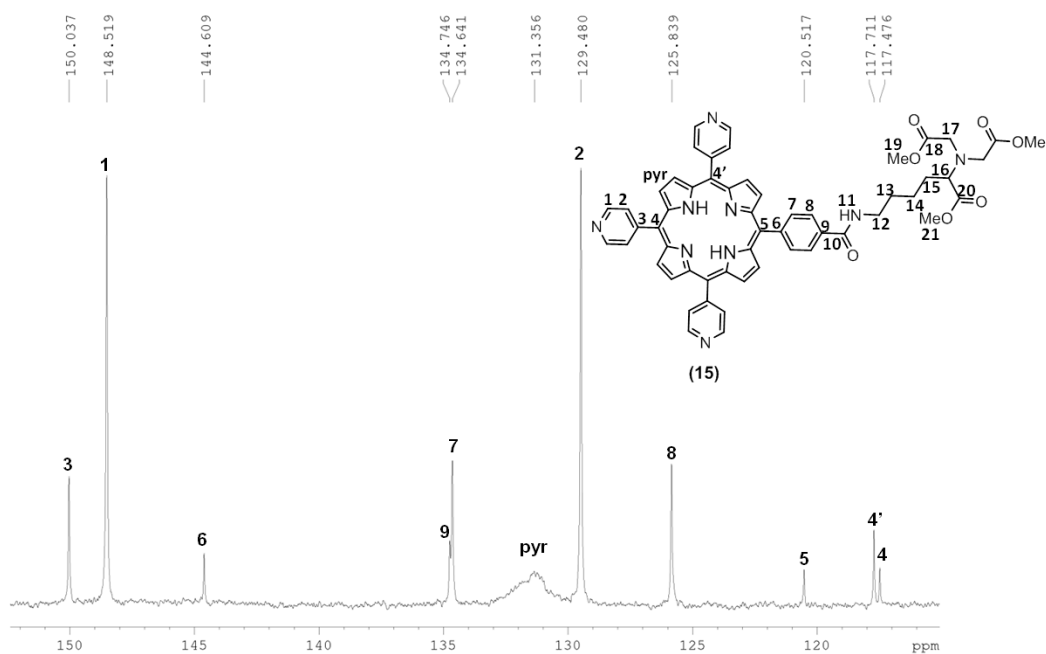
**Σχήμα S55** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της πορφυρίνης **TriPyP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (15)** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



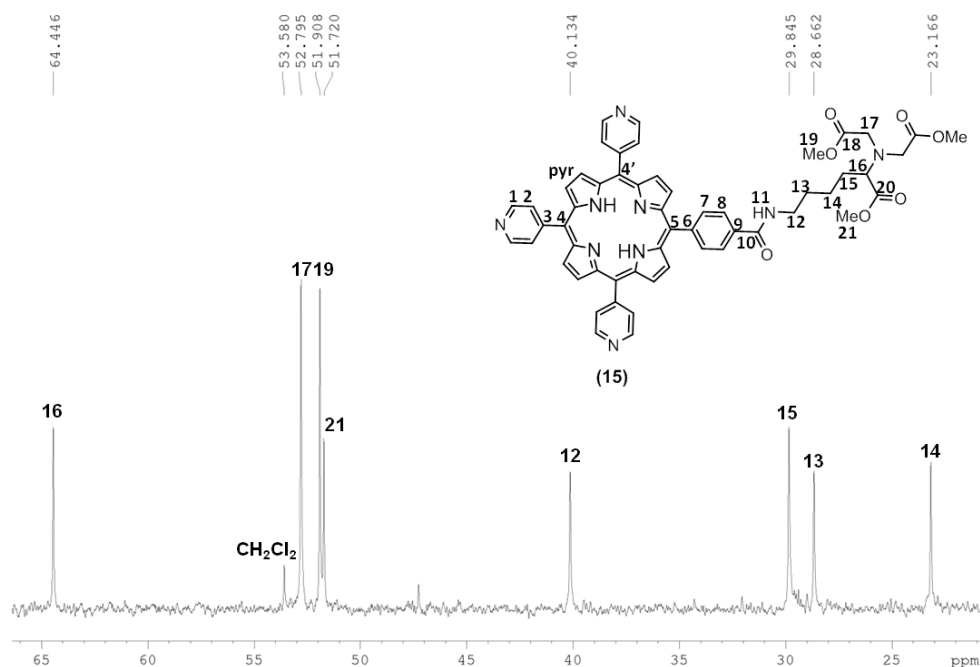
**Σχήμα S56** Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR της πορφυρίνης TriPyP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (15) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Σχήμα S57** Φάσμα <sup>13</sup>C NMR της πορφυρίνης TriPyP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (15) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

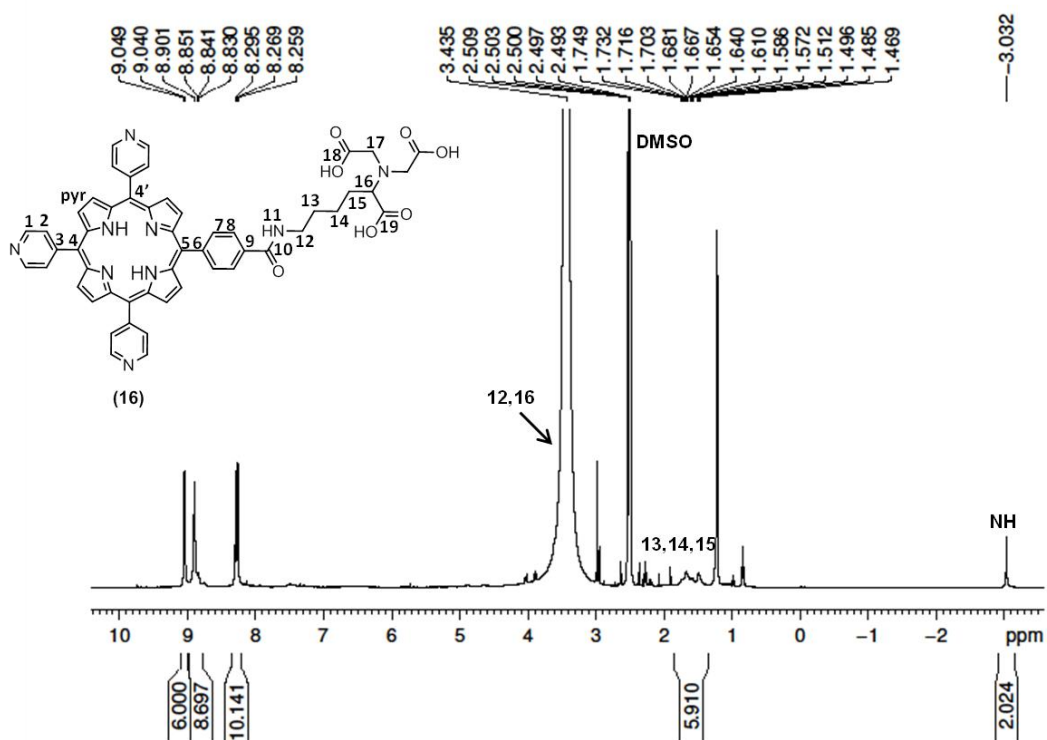


Σχήμα S58 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης **TriPyP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (15)** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.

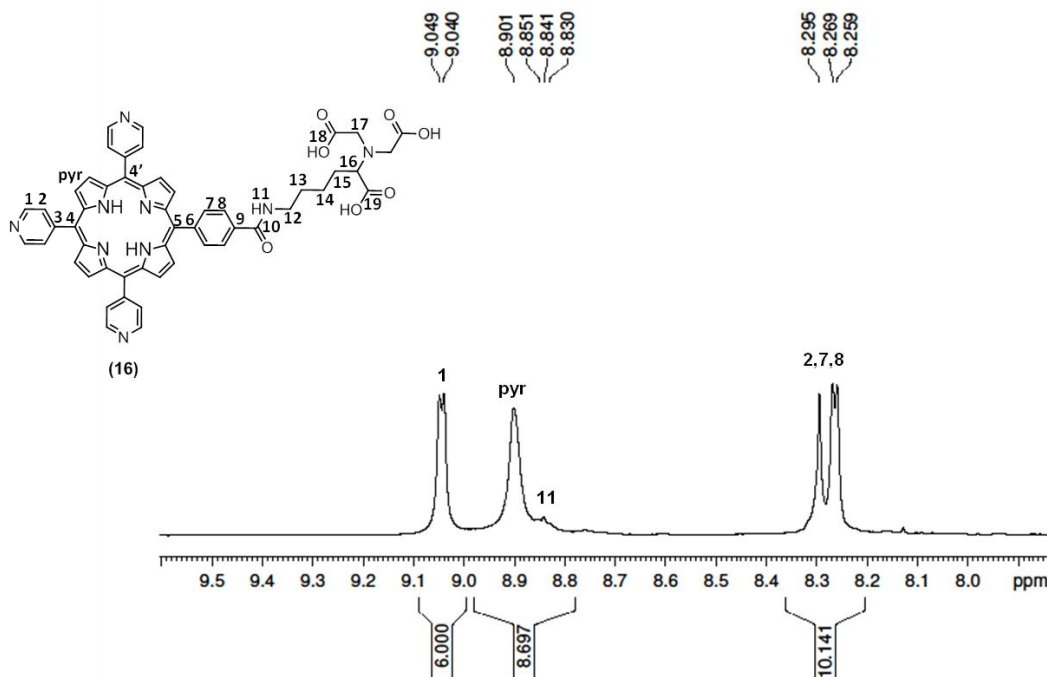


Σχήμα S59 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης **TriPyP-Lys-(COOMe)<sub>3</sub> (15)** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.

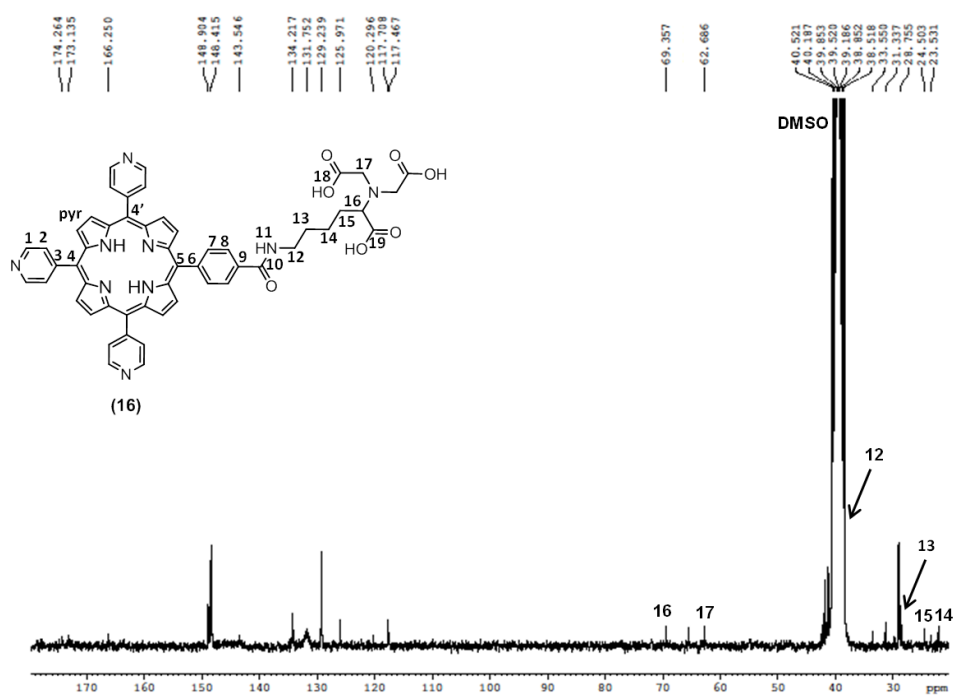




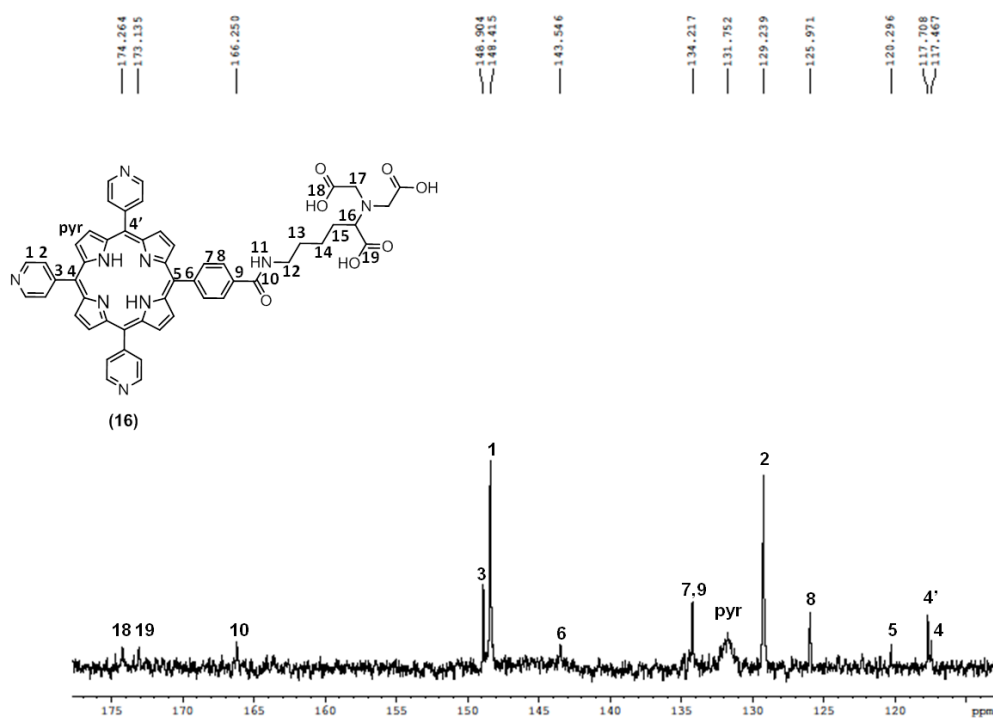
Σχήμα S60 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{TriPyP-Lys-(COOH)}_3$  (16) (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).



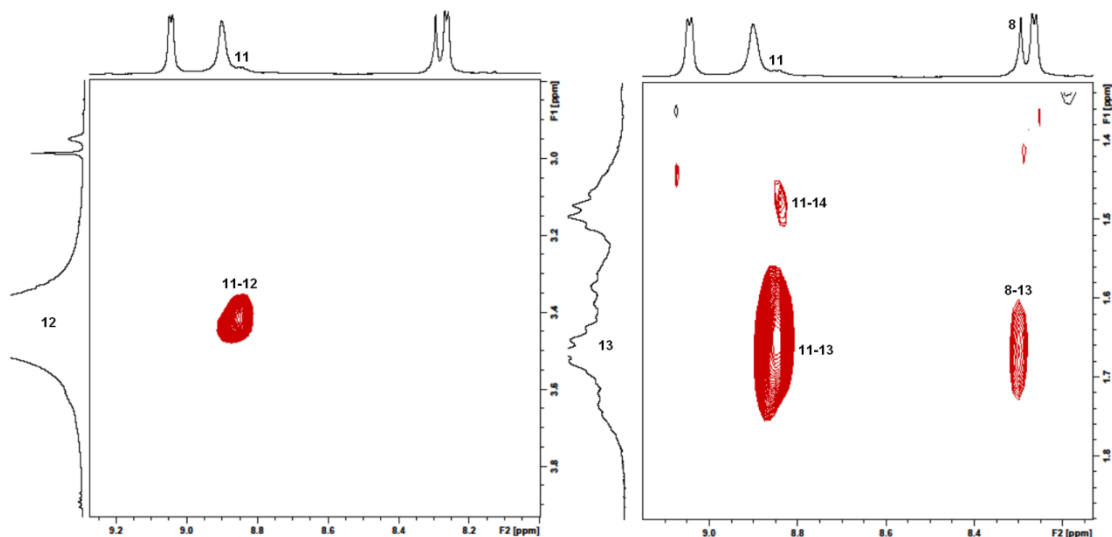
Σχήμα S61 Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης  $\text{TriPyP-Lys-(COOH)}_3$  (16) (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).



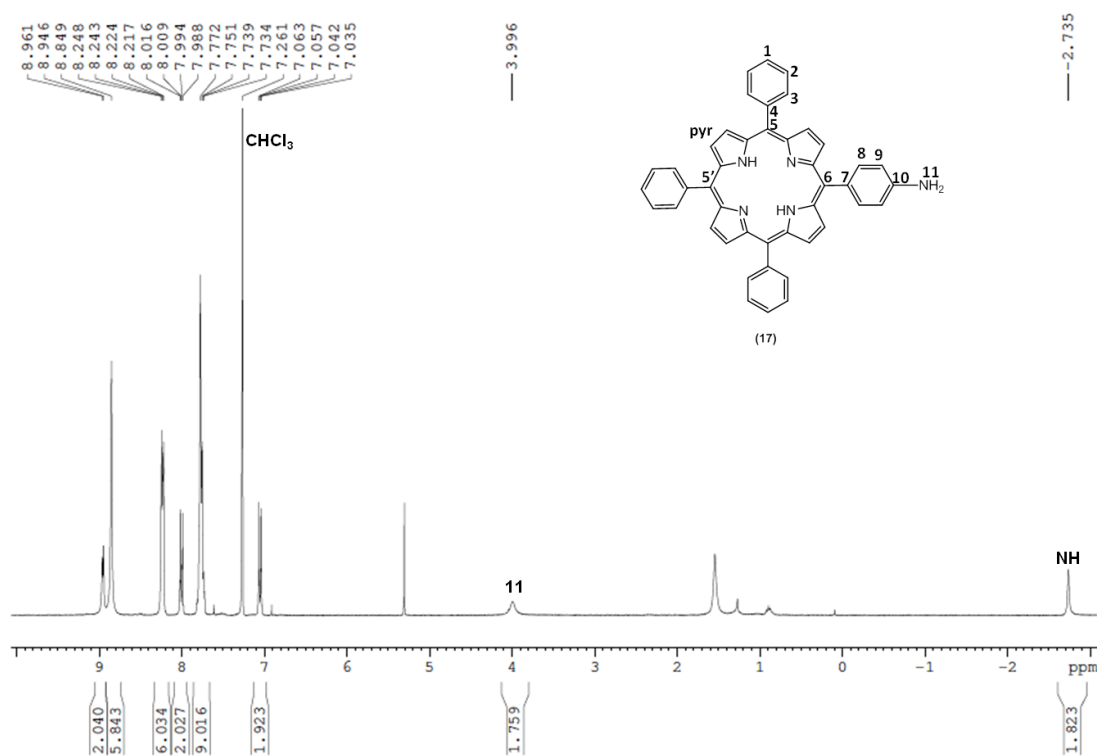
Σχήμα S62 Φάσμα <sup>13</sup>C NMR της πορφυρίνης TriPyP-Lys-(COOH)<sub>3</sub> (16) (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).



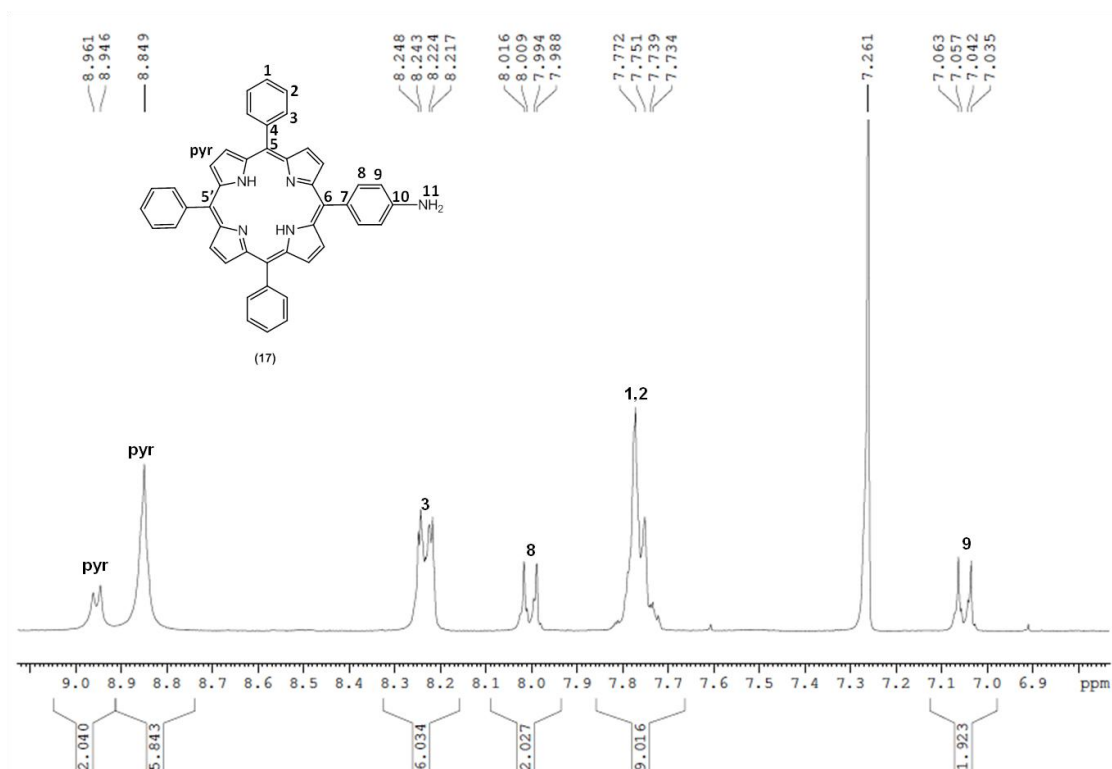
Σχήμα S63 Φάσμα <sup>13</sup>C NMR της πορφυρίνης TriPyP-Lys-(COOH)<sub>3</sub> (16) (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) zoom.



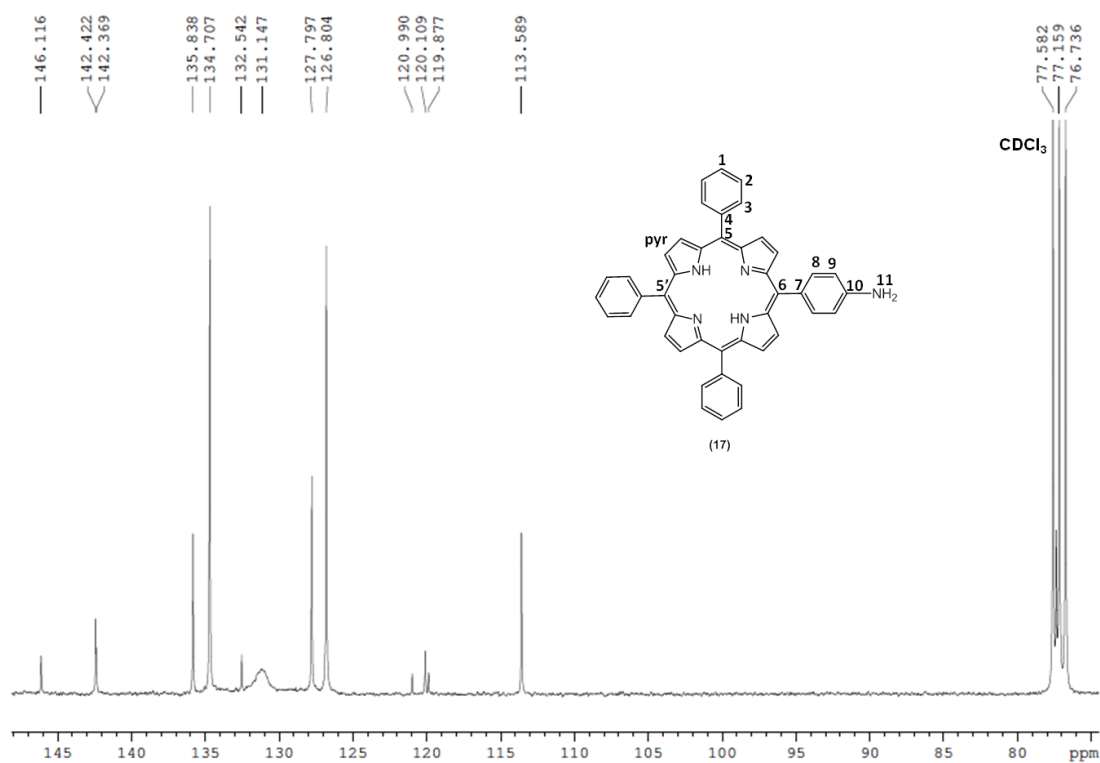
Σχήμα S64 Φάσμα ROESY NMR της πορφυρίνης **TriPyP-Lys-(COOH)<sub>3</sub> (16)** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).



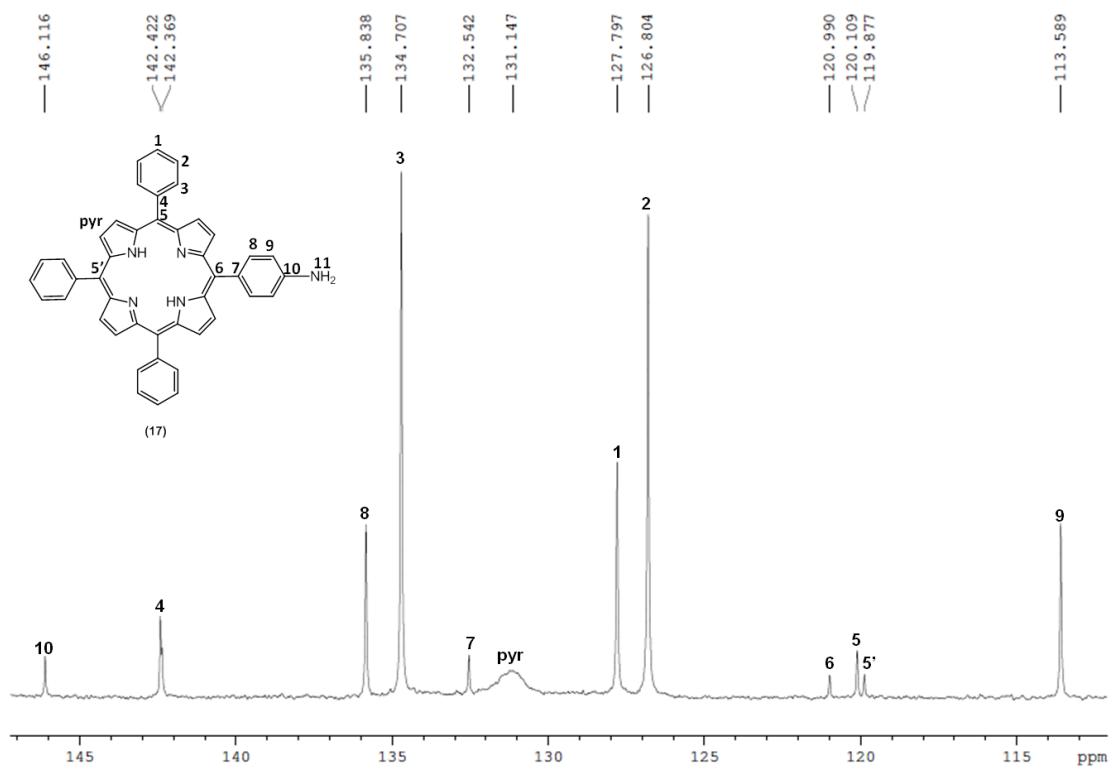
Σχήμα S65 Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της πορφυρίνης **TPP-NH<sub>2</sub> (17)** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



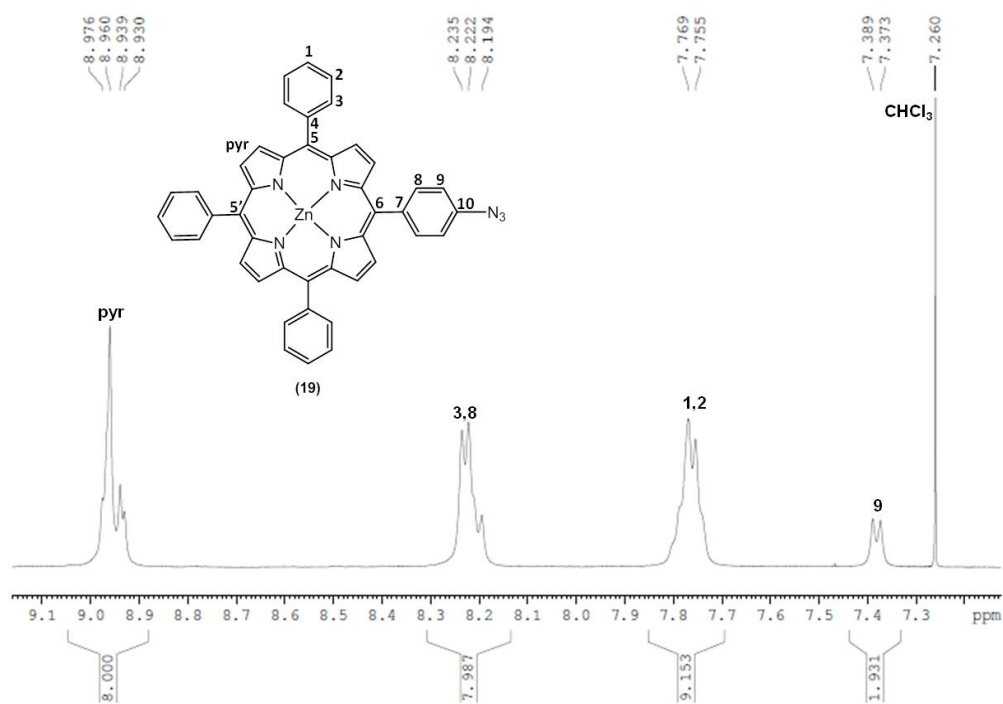
**Σχήμα S66** Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR της πορφυρίνης **TPP-NH<sub>2</sub>** (17) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Σχήμα S67** Φάσμα <sup>13</sup>C NMR της πορφυρίνης **TPP-NH<sub>2</sub>** (17) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



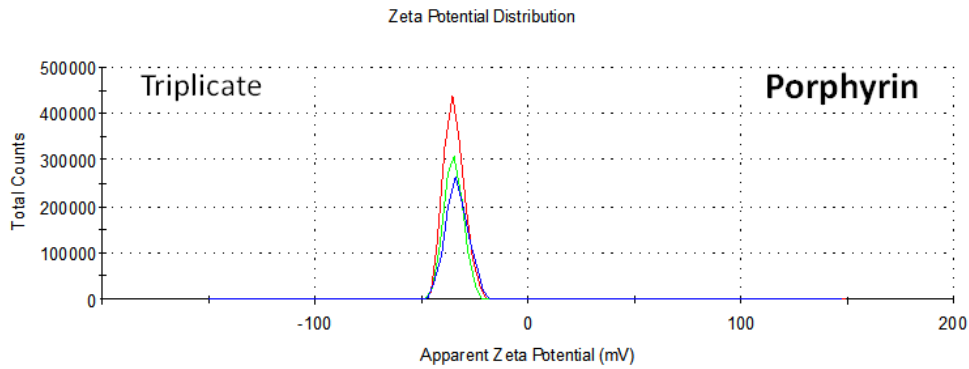
Σχήμα S68 Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της πορφυρίνης TPP-NH<sub>2</sub> (17) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) zoom.



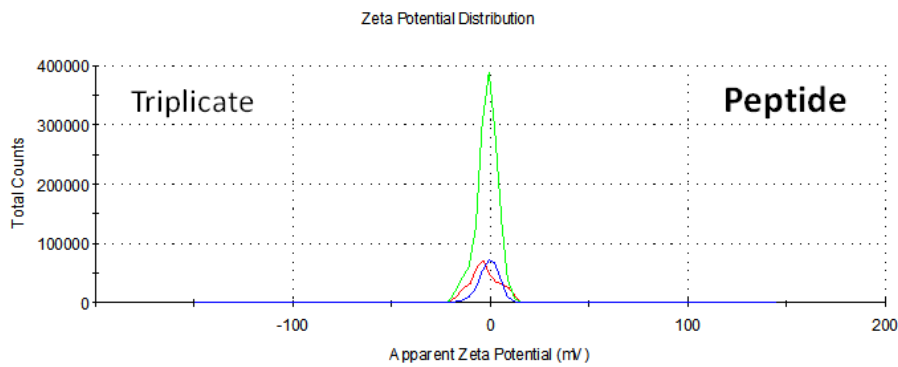
Σχήμα S69 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της πορφυρίνης Zn-TPP-N<sub>3</sub> (19) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



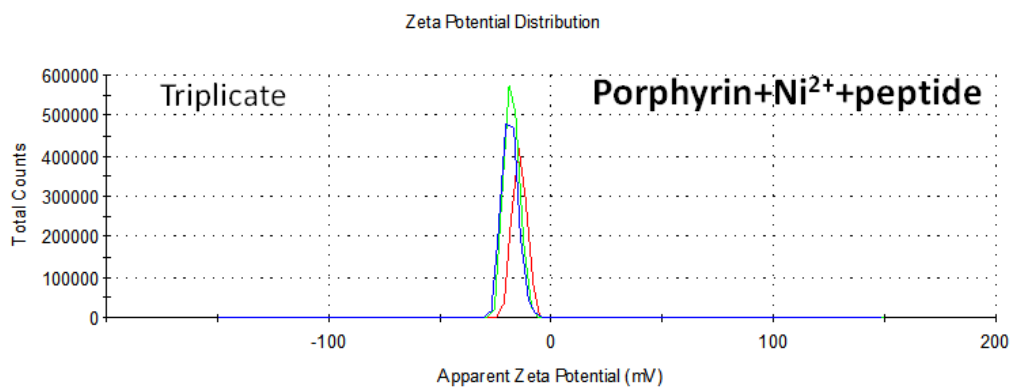
Μετρήσεις ζ δυναμικού (zeta potential measurements)



**Σχήμα S72** Διάγραμμα (triplicate) ζ δυναμικού (zeta potential) της πορφυρίνης TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> σε υδατικό διάλυμα.



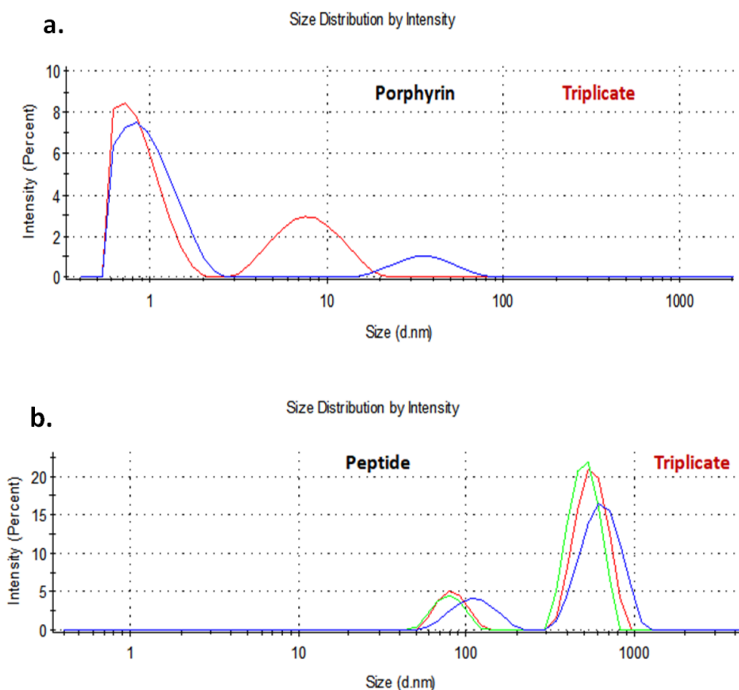
**Σχήμα S73** Διάγραμμα (triplicate) ζ δυναμικού (zeta potential) του πεπτιδίου RGD-SGAITIG-H σε υδατικό διάλυμα.



**Σχήμα S74** Διάγραμμα (triplicate) ζ δυναμικού (zeta potential) του συμπλόκου πορφυρίνης-νικελίου-πεπτιδίου σε υδατικό διάλυμα.



Μελέτες Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)



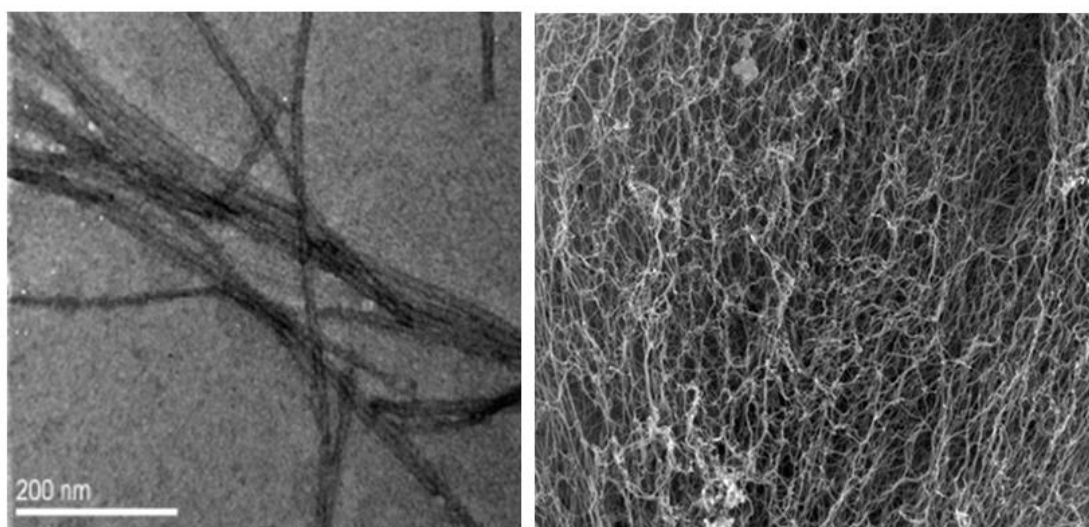
**Σχήμα S75** Διαγράμματα DLS σε υδατικά διαλύματα των: a. TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> και b. RGD-SGAITIG-H.

Σύμφωνα με τα παραπάνω γραφήματα που αφορούν τα πειράματα DLS (**Σχήμα S75**), στην περίπτωση της πορφυρίνης παρατηρείται η παρουσία μη σταθερών νανοδομών στο υδατικό διάλυμα που μελετήθηκε. Συγκεκριμένα, το μέγεθος των νανοδομών είναι της τάξεως των 23 nm κατά μέσο όρο σε σχεδόν αμελητέο ποσοστό ίσο με 6.7%, επιβεβαιώνοντας την υδατοδιαλυτότητα της πορφυρίνης (**Πίνακας S1**). Αντίθετα, στην περίπτωση του πεπτιδίου παρατηρείται ο σχηματισμός δύο νανοδομών 92 nm (18.7%) και 573 nm (81.3%) (**Πίνακας S1**). Η παρουσία δύο διαφορετικών νανοδομών στο διάλυμα του πεπτιδίου πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το πεπτίδιο (RGD-SGAITIG-H) αυτο-οργανώνεται σχηματίζοντας ένα πορώδες δίκτυο μη διακλαδισμένων ινιδίων αμυλοειδούς (amyloid fibrils) και όχι σωματίδια σφαιρικού σχήματος (**Εικόνα S1**).<sup>123</sup> Επομένως, μέσω των πειραμάτων DLS ανιχνεύονται τα ινίδια αμυλοειδούς είτε κατά μήκος είτε κατά πλάτος δίνοντας δύο διαφορετικές τιμές για το μέγεθος των νανοδομών. Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι νανοδομές του αυτο-οργανωμένου πεπτιδίου που μελετήθηκαν μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) έχουν την ίδια τάξη μεγέθους με τα ινίδια του ίδιου πεπτιδίου που έχουν μελετηθεί στο παρελθόν μέσω πειραμάτων TEM και FESEM από την Mitraki και την ομάδα της (**Εικόνα S1**).<sup>123</sup> Στην περίπτωση του συμπλόκου

TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> με Ni<sup>2+</sup> και πεπτιδίο, τα συσσωματώματα που σχηματίζονται έχουν μέγεθος περίπου 1.5 μm, αρκετά μεγάλο ώστε να μπορέσουν να ανιχνευθούν μέσω πειραμάτων DLS (Πίνακας S1) . Παρόλο που λόγω μεγάλου μεγέθους δεν δύναται να σχηματιστεί γράφημα DLS για το σύμπλοκο TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>-Ni<sup>2+</sup>-πεπτιδίου, παρατηρήθηκε μεγάλη επαναληψιμότητα στις τιμές που προέκυψαν μετά από κάθε τριπλέτα πειραμάτων.

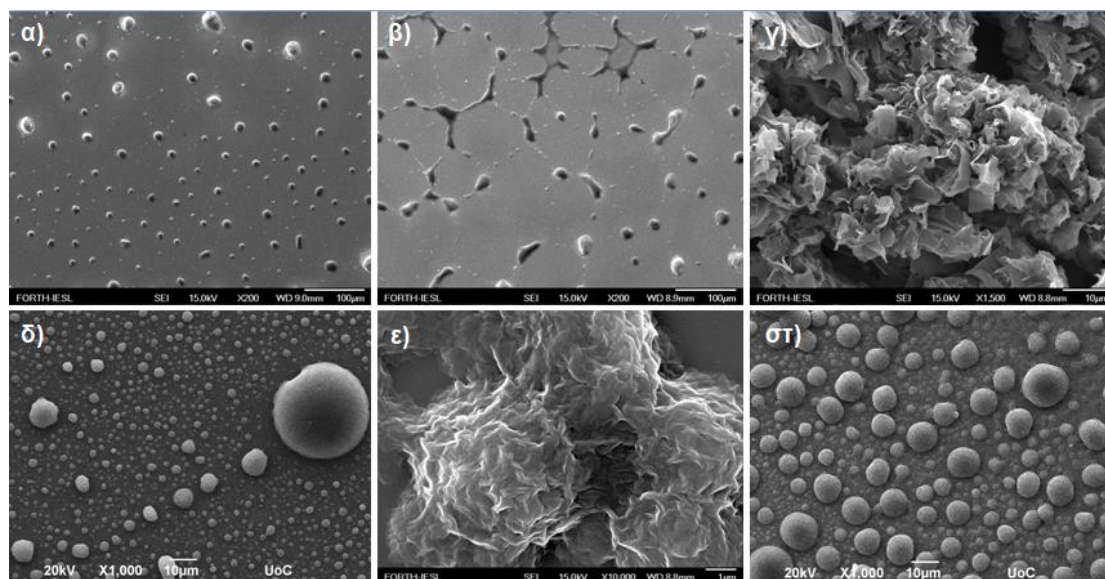
**Πίνακας S1** Αποτελέσματα μετρήσεων DLS σε υδατικά διαλύματα του πεπτιδίου RGD-SGAIIG-H, της πορφυρίνης (TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub>) και του συμπλόκου TriPyPLys(COOH)<sub>3</sub> + Ni<sup>2+</sup> + peptide.

Compound	Size (nm)
Peptide	92 (18.7%), 573 (81.3%)
Porphyrin	Soluble, 23 (6.7%)
Porphyrin+Ni <sup>2+</sup> +Peptide	>1500



**Εικόνα S1** Αριστερά: Εικόνα TEM του πεπτιδίου (RGD-SGAIIG-H) μετά από 24 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (10mM-pH=7.4). Δεξιά: Εικόνα FESEM του RGD-SGAIIG-H μετά από 24 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (10mM-pH=7.4).

Μελέτη αυτο-οργάνωσης της TriPyPLys(COOMe)<sub>3</sub>



**Εικόνα S2** Μοτίβα αυτο-οργανωμένων δομών της  $\text{TriPyPLys}(\text{COOMe})_3$ : α) HFIP/Ethanol (2:8), β) HFIP/Methanol (2:8), γ) HFIP/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:8), δ) HFIP/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1), (ε) DCM/Ethanol (2:8) και στ) DCM/Ethanol (1:1).

Η συμπεριφορά αυτο-οργάνωσης της δυάδας πορφυρίνης-λυσίνης στην εστερική μορφή της μελετήθηκε μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης Εκπομπής Πεδίου (FESEM). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρασκευή των δειγμάτων προς ανάλυση σύμφωνα με το πρωτόκολλο “καλού-κακού” διαλύτη, η  $\text{TriPyPLys}(\text{COOMe})_3$  (15) διαλύθηκε σε ένα χαοτροπικό διαλύτη (chaotropic solvent) όπως είναι το διχλωμεθάνιο (DCM) ή η 1,1,1,3,3,3-εξαφθορο-2-προπανόλη (HFIP) και ακολούθως αραιώθηκε με τον διαλύτη που επάγει την αυτο-οργάνωση. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν έξι συστήματα που περιλάμβαναν τα εξής μίγματα διαλυτών: α) HFIP/Ethanol (2:8), β) HFIP/Methanol (2:8), γ) HFIP/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:8), δ) HFIP/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1), (ε) DCM/Ethanol (2:8) και στ) DCM/Ethanol (1:1). Η τελική συγκέντρωση της  $\text{TriPyPLys}(\text{COOMe})_3$  (15) σε όλα τα μίγματα διαλυτών ήταν 1mM. Τα έξι δείγματα αφέθηκαν 24 ώρες για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα S2**, στα περισσότερα συστήματα διαλυτών οι σχηματιζόμενες νανοδομές δεν αυτο-οργανώνονται με κάποιο καθορισμένο μοτίβο. Παρόλα αυτά, από την ανάλυση της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) μπορεί να διαπιστωθεί ότι στις περιπτώσεις όπου στο μίγμα διαλυτών περιέχεται HFIP/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) και DCM/Ethanol (1:1) σχηματίζονται αυτο-οργανωμένες νανοδομές σχήματος “σταγόνας” (droplet) διαφόρων μεγεθών.

## Βιβλιογραφία

- (1) Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R. *The Porphyrin Handbook*, 2012; Vol. 11.
- (2) Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R. *Handbook of porphyrin science: With applications to chemistry, physics, materials science, engineering, biology and medicine-volume 45: Phthalocyanine synthesis and computational design of functional tetrapyrroles*, 2019.
- (3) Wohrle, D. *Advanced Materials* **1997**, *9*, 1191.
- (4) Battersby, A. R. *Natural Product Reports* **2000**, *17*, 507.
- (5) Layer, G.; Jahn, D.; Deery, E.; Lawrence, A. D.; Warren, M. J. In *Comprehensive Natural Products II*; Liu, H.-W., Mander, L., Eds.; Elsevier: Oxford, 2010, p 445.
- (6) Matsunaga, I.; Shiro, Y. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*, 127.
- (7) Drenth, W. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1995**, *114*, 77.
- (8) Rodgers, K. R. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, *3*, 158.
- (9) Bollivar, D. W. *Photosynthesis Research* **2006**, *89*, 1.
- (10) Moore, S. J.; Sowa, S. T.; Schuchardt, C.; Deery, E.; Lawrence, A. D.; Ramos, J. V.; Billig, S.; Birkemeyer, C.; Chivers, P. T.; Howard, M. J.; Rigby, S. E. J.; Layer, G.; Warren, M. J. *Nature* **2017**, *543*, 78.
- (11) and, R. B.; Ragsdale, S. W. *Annual Review of Biochemistry* **2003**, *72*, 209.
- (12) Frankenberg, N.; Moser, J.; Jahn, D. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, *63*, 115.
- (13) Dayan, F. E.; Dayan, E. A. *American Scientist* **2011**, *99*, 236.
- (14) Gomes, J. A. N. F.; Mallion, R. B. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 1349.
- (15) Abraham, R. J.; Hawkes, G. E.; Hudson, M. F.; Smith, K. M. *J Chem Soc Perk T 2* **1975**, 204.
- (16) Smith, K. M.; Unsworth, J. F. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 367.
- (17) Küster, W.; Deihle, H. *Z. physiol. Chem* **1913**, 82.
- (18) Harvey, P. D.; Stern, C.; Gros, C. P.; Guillard, R. *Coordination Chemistry Reviews* **2007**, *251*, 401.
- (19) Bhyrappa, P. *Tetrahedron Lett* **2016**, *57*, 5150.
- (20) Pratviel, G. *Coordination Chemistry Reviews* **2016**, *308*, 460.
- (21) Hiroto, S.; Miyake, Y.; Shinokubo, H. *Chemical Reviews* **2017**, *117*, 2910.
- (22) Li, Y.; Wang, W.; Leow, W. R.; Zhu, B.; Meng, F.; Zheng, L.; Zhu, J.; Chen, X. *Small* **2014**, *10*, 2776.
- (23) Chen, Y.; Royal, G.; Flahaut, E.; Cobo, S.; Bouchiat, V.; Marty, L.; Bendiab, N. *Advanced Materials* **2017**, *29*, 1605745.
- (24) Zhang, W.; Lai, W.; Cao, R. *Chemical Reviews* **2017**, *117*, 3717.
- (25) Panagiotopoulos, A. A.; Fasoulakis, E. G.; Vardalachaki, E. E.; Coutsolelos, A. G. *J Porphyr Phthalocya* **2016**, *20*, 1200.
- (26) BERG, K.; SELBO, P. K.; WEYERANG, A.; DIETZE, A.; PRASMICKAITE, L.; BONSTED, A.; ENGESAETER, B. Ø.; ANGELL-PETERSEN, E.; WARLOE, T.; FRANDBSEN, N.; HØGSET, A. *Journal of Microscopy* **2005**, *218*, 133.
- (27) Fukuzumi, S. *Phys Chem Chem Phys* **2008**, *10*, 2283.
- (28) Rothmund, P. *J Am Chem Soc* **1936**, *58*, 625.
- (29) Tanaka, T.; Osuka, A. *Chemical Reviews* **2017**, *117*, 2584.
- (30) Rothmund, P.; Menotti, A. R. *J Am Chem Soc* **1941**, *63*, 267.
- (31) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Shergalis, W. *J Am Chem Soc* **1964**, *86*, 3145.
- (32) Lindsey, J. S.; Hsu, H. C.; Schreiman, I. C. *Tetrahedron Lett* **1986**, *27*, 4969.
- (33) Lindsey, J. S. In *Metalloporphyrins Catalyzed Oxidations*; Montanari, F., Casella, L., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1994, p 49.
- (34) Littler, B. J.; Miller, M. A.; Hung, C.-H.; Wagner, R. W.; O'Shea, D. F.; Boyle, P. D.; Lindsey, J. S. *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 1391.
- (35) Arsenault, G. P.; Bullock, E.; MacDonald, S. F. *J Am Chem Soc* **1960**, *82*, 4384.
- (36) Gouterman, M. *J Mol Spectrosc* **1961**, *6*, 138.
- (37) Gouterman, M.; Wagnière, G. H.; Snyder, L. C. *J Mol Spectrosc* **1963**, *11*, 108.

- (38) Zhao, X.; Pan, F.; Xu, H.; Yaseen, M.; Shan, H.; Hauser, C. A. E.; Zhang, S.; Lu, J. R. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 3480.
- (39) Mendes, A. C.; Baran, E. T.; Reis, R. L.; Azevedo, H. S. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2013**, *5*, 582.
- (40) Noorduyn, W. L.; Grinthal, A.; Mahadevan, L.; Aizenberg, J. *Science* **2013**, *340*, 832.
- (41) Karikis, K.; Butkiewicz, A.; Folias, F.; Charalambidis, G.; Kokotidou, C.; Charisiadis, A.; Nikolaou, V.; Nikoloudakis, E.; Frelek, J.; Mitraki, A.; Coutsolelos, A. G. *Nanoscale* **2018**, *10*, 1735.
- (42) Izzet, G.; Abécassis, B.; Brouri, D.; Piot, M.; Matt, B.; Serapian, S. A.; Bo, C.; Proust, A. *J Am Chem Soc* **2016**, *138*, 5093.
- (43) Brahmachari, S.; Arnon, Z. A.; Frydman-Marom, A.; Gazit, E.; Adler-Abramovich, L. *ACS Nano* **2017**, *11*, 5960.
- (44) Frydman-Marom, A.; Rechter, M.; Shefler, I.; Bram, Y.; Shalev, D. E.; Gazit, E. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 1981.
- (45) Mahler, A.; Reches, M.; Rechter, M.; Cohen, S.; Gazit, E. *Advanced Materials* **2006**, *18*, 1365.
- (46) Reches, M.; Gazit, E. *Science* **2003**, *300*, 625.
- (47) Görbitz, C. H. *Chem Commun* **2006**, 2332.
- (48) Görbitz, C. H. *Chemistry – A European Journal* **2007**, *13*, 1022.
- (49) Görbitz, C. H. *Chemistry – A European Journal* **2001**, *7*, 5153.
- (50) Song, Y.; Challa, S. R.; Medforth, C. J.; Qiu, Y.; Watt, R. K.; Peña, D.; Miller, J. E.; Swol, F. v.; Shelnutt, J. A. *Chem Commun* **2004**, 1044.
- (51) Reches, M.; Gazit, E. *Nano Letters* **2004**, *4*, 581.
- (52) GAZIT, E. *The FASEB Journal* **2002**, *16*, 77.
- (53) Liu, K.; Xing, R.; Zou, Q.; Ma, G.; Möhwald, H.; Yan, X. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 3036.
- (54) Zou, Q.; Zhang, L.; Yan, X.; Wang, A.; Ma, G.; Li, J.; Möhwald, H.; Mann, S. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 2366.
- (55) Charalambidis, G.; Kasotakis, E.; Lazarides, T.; Mitraki, A.; Coutsolelos, A. G. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 7213.
- (56) Charalambidis, G.; Georgilis, E.; Panda, M. K.; Anson, C. E.; Powell, A. K.; Doyle, S.; Moss, D.; Jochum, T.; Horton, P. N.; Coles, S. J.; Linares, M.; Beljonne, D.; Naubron, J.-V.; Conradt, J.; Kalt, H.; Mitraki, A.; Coutsolelos, A. G.; Balaban, T. S. *Nature Communications* **2016**, *7*, 12657.
- (57) Karikis, K.; Georgilis, E.; Charalambidis, G.; Petrou, A.; Vakuliuk, O.; Chatziioannou, T.; Raptaki, I.; Tsovolas, S.; Papakyriacou, I.; Mitraki, A.; Gryko, D. T.; Coutsolelos, A. G. *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22*, 11245.
- (58) Diaferia, C.; Gianolio, E.; Accardo, A.; Morelli, G. *Journal of Peptide Science* **2017**, *23*, 122.
- (59) Gour, N.; Kedracki, D.; Safir, I.; Ngo, K. X.; Vebert-Nardin, C. *Chem Commun* **2012**, *48*, 5440.
- (60) Zou, Q.; Abbas, M.; Zhao, L.; Li, S.; Shen, G.; Yan, X. *J Am Chem Soc* **2017**, *139*, 1921.
- (61) Ong, S.-E.; Mann, M. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2650.
- (62) Varki, A. *The FASEB Journal* **1991**, *5*, 226.
- (63) Li, H.; Rothberg, L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 14036.
- (64) Kumita, J. R.; Smart, O. S.; Woolley, G. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 3803.
- (65) Harrington, W. N.; Novoselova, M. V.; Bratashov, D. N.; Khlebtsov, B. N.; Gorin, D. A.; Galanzha, E. I.; Zharov, V. P. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 12439.
- (66) Soh, N.; Yoshida, K.; Nakajima, H.; Nakano, K.; Imato, T.; Fukaminato, T.; Irie, M. *Chem Commun* **2007**, 5206.
- (67) van Staveren, D. R.; Metzler-Nolte, N. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 5931.
- (68) Zimmer, M. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 759.
- (69) Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y. *Science* **2006**, *312*, 217.
- (70) Sahoo, H. *Rsc Adv* **2012**, *2*, 7017.
- (71) Jung, D.; Min, K.; Jung, J.; Jang, W.; Kwon, Y. *Molecular BioSystems* **2013**, *9*, 862.

- (72) You, C.; Piehler, J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406*, 3345.
- (73) Ueda, E. K. M.; Gout, P. W.; Morganti, L. *Journal of Chromatography A* **2003**, *988*, 1.
- (74) Soh, N. *Sensors* **2008**, *8*, 1004.
- (75) Porath, J.; Carlsson, J. A. N.; Olsson, I.; Belfrage, G. *Nature* **1975**, *258*, 598.
- (76) Hochuli, E.; Döbeli, H.; Schacher, A. *Journal of Chromatography A* **1987**, *411*, 177.
- (77) Dorn, I. T.; Neumaier, K. R.; Tampé, R. *J Am Chem Soc* **1998**, *120*, 2753.
- (78) Kapanidis, A. N.; Ebricht, Y. W.; Ebricht, R. H. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 12123.
- (79) Guignet, E. G.; Hovius, R.; Vogel, H. *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 440.
- (80) Lata, S.; Reichel, A.; Brock, R.; Tampé, R.; Piehler, J. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 10205.
- (81) Goldsmith, C. R.; Jaworski, J.; Sheng, M.; Lippard, S. J. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 418.
- (82) Wieneke, R.; Labòria, N.; Rajan, M.; Kollmannsperger, A.; Natale, F.; Cardoso, M. C.; Tampé, R. *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 13975.
- (83) Wolfbeis, O. S. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 9864.
- (84) James, M. L.; Gambhir, S. S. *Physiological Reviews* **2012**, *92*, 897.
- (85) Dmitriev, R. I.; O'Donnell, N.; Papkovsky, D. B. *Bioconjugate Chem* **2016**, *27*, 439.
- (86) Lee, D. K.; Choi, Y.; Shon, S.-M.; Schellingerhout, D.; Park, J. E.; Kim, D.-E. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2011**, *10*, 1587.
- (87) Ochsner, M. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1997**, *39*, 1.
- (88) St. Denis, T. G.; Dai, T.; Izikson, L.; Astrakas, C.; Anderson, R. R.; Hamblin, M. R.; Tegos, G. P. *Virulence* **2011**, *2*, 509.
- (89) Josefsen, L. B.; Boyle, R. W. *British journal of pharmacology* **2008**, *154*, 1.
- (90) Płonka, J.; Latocha, M. *Pol Merkur Lekarski* **2012**, *33*, 173.
- (91) Kou, J.; Dou, D.; Yang, L. *Oncotarget* **2017**, *8*, 81591.
- (92) Allison, R. R.; Moghissi, K. *Clin Endosc* **2013**, *46*, 24.
- (93) Robertson, C. A.; Evans, D. H.; Abrahamse, H. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, *96*, 1.
- (94) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2*, 1.
- (95) Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *106*, 1098.
- (96) Calixto, G.; Bernegossi, J.; de Freitas, L.; Fontana, C.; Chorilli, M. *Molecules* **2016**, *21*, 342.
- (97) Fonseca, S. M.; Pina, J.; Arnaut, L. G.; Seixas de Melo, J.; Burrows, H. D.; Chattopadhyay, N.; Alcácer, L.; Charas, A.; Morgado, J.; Monkman, A. P.; Asawapirom, U.; Scherf, U.; Edge, R.; Navaratnam, S. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 8278.
- (98) Kessel, D.; Oleinick, N. L. In *Photodynamic Therapy: Methods and Protocols*; Gomer, C. J., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2010, p 35.
- (99) Plaetzer, K.; Kiesslich, T.; Verwanger, T.; Krammer, B. *Medical Laser Application* **2003**, *18*, 7.
- (100) Buytaert, E.; Dewaele, M.; Agostinis, P. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2007**, *1776*, 86.
- (101) Mehraban, N.; Freeman, H. S. *Materials* **2015**, *8*, 4421.
- (102) Zhang, J.; Jiang, C.; Figueiró Longo, J. P.; Azevedo, R. B.; Zhang, H.; Muehlmann, L. A. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2018**, *8*, 137.
- (103) Chen, J.-J.; Hong, G.; Gao, L.-J.; Liu, T.-J.; Cao, W.-J. *Journal of cancer research and clinical oncology* **2015**, *141*, 1553.
- (104) Meng, H.-M.; Liu, H.; Kuai, H.; Peng, R.; Mo, L.; Zhang, X.-B. *Chemical Society Reviews* **2016**, *45*, 2583.
- (105) Shieh, Y.-A.; Yang, S.-J.; Wei, M.-F.; Shieh, M.-J. *ACS Nano* **2010**, *4*, 1433.
- (106) Nowak-Krol, A.; Plamont, R.; Canard, G.; Edzang, J. A.; Gryko, D. T.; Balaban, T. S. *Chem-Eur J* **2015**, *21*, 1488.
- (107) Karikis, K.; Georgilis, E.; Charalambidis, G.; Petrou, A.; Vakuliuk, O.; Chatziioannou, T.; Raptaki, I.; Tsovolas, S.; Papakyriacou, I.; Mitraki, A.; Gryko, D. T.; Coutsolelos, A. G. *Chem-Eur J* **2016**, *22*, 11245.



- (108) Sibrian-Vazquez, M.; Jensen, T. J.; Fronczek, F. R.; Hammer, R. P.; Vicente, M. G. H. *Bioconjugate Chem* **2005**, *16*, 852.
- (109) Biron, E.; Voyer, N. *Chem Commun* **2005**, 4652.
- (110) Boyle, T. P.; Bremner, J. B.; Coates, J.; Deadman, J.; Keller, P. A.; Pyne, S. G.; Rhodes, D. I. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11270.
- (111) Adler, A. D.; Sklar, L.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Finarelli, M. G. *J Heterocyclic Chem* **1968**, *5*, 669.
- (112) Kruper, W. J.; Chamberlin, T. A.; Kochanny, M. *The Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54*, 2753.
- (113) Ladomenou, K.; Lazarides, T.; Panda, M. K.; Charalambidis, G.; Daphnomili, D.; Coutsolelos, A. G. *Inorg Chem* **2012**, *51*, 10548.
- (114) Nikolaou, V.; Angaridis, P. A.; Charalambidis, G.; Sharma, G. D.; Coutsolelos, A. G. *Dalton T* **2015**, *44*, 1734.
- (115) Chinnusamy, T.; Rodionov, V.; Kuhn, F. E.; Reiser, O. *Adv Synth Catal* **2012**, *354*, 1827.
- (116) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, *340*, 457.
- (117) Lahmar, S.; Sarciron, M. E.; Chehida, F. B.; Hammou, A.; Gharbi, H. A.; Gherardi, A.; Lahmar, J.; Ghannay, A.; Pétavy, A. F. *Veterinary Research Communications* **2006**, *30*, 379.
- (118) Kasha, M. *Radiation Research* **1963**, *20*, 55.
- (119) Shoji, S.; Hashishin, T.; Tamiaki, H. *Chem-Eur J* **2012**, *18*, 13331.
- (120) Balaban, T. S.; Linke-Schaetzel, M.; Bhise, A. D.; Vanthuyne, N.; Roussel, C.; Anson, C. E.; Buth, G.; Eichhofer, A.; Foster, K.; Garab, G.; Gliemann, H.; Goddard, R.; Javorfi, T.; Powell, A. K.; Rosner, H.; Schimmel, T. *Chem-Eur J* **2005**, *11*, 2267.
- (121) Balaban, T. S.; Linke-Schaetzel, M.; Bhise, A. D.; Vanthuyne, N.; Roussel, C. *European Journal of Organic Chemistry* **2004**, 3919.
- (122) Wei, Y.; Thyparambil, A. A.; Latour, R. A. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, *1844*, 2331.
- (123) Jonnalagadda, S. V. R.; Ornithopoulou, E.; Orr, A. A.; Mossou, E.; Trevor Forsyth, V.; Mitchell, E. P.; Bowler, M. W.; Mitraki, A.; Tamamis, P. *Molecular Systems Design & Engineering* **2017**, *2*, 321.
- (124) Benchouaia, R.; Cissé, N.; Boitrel, B.; Sollogoub, M.; Le Gac, S.; Ménand, M. *J Am Chem Soc* **2019**, *141*, 11583.
- (125) Shaw, K. L.; Grimsley, G. R.; Yakovlev, G. I.; Makarov, A. A.; Pace, C. N. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2001**, *10*, 1206.
- (126) Palacios, E. G.; Juárez-López, G.; Monhemius, A. J. *Hydrometallurgy* **2004**, *72*, 139.
- (127) Köse, D.; Necefoglu, H. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2008**, *93*, 509.