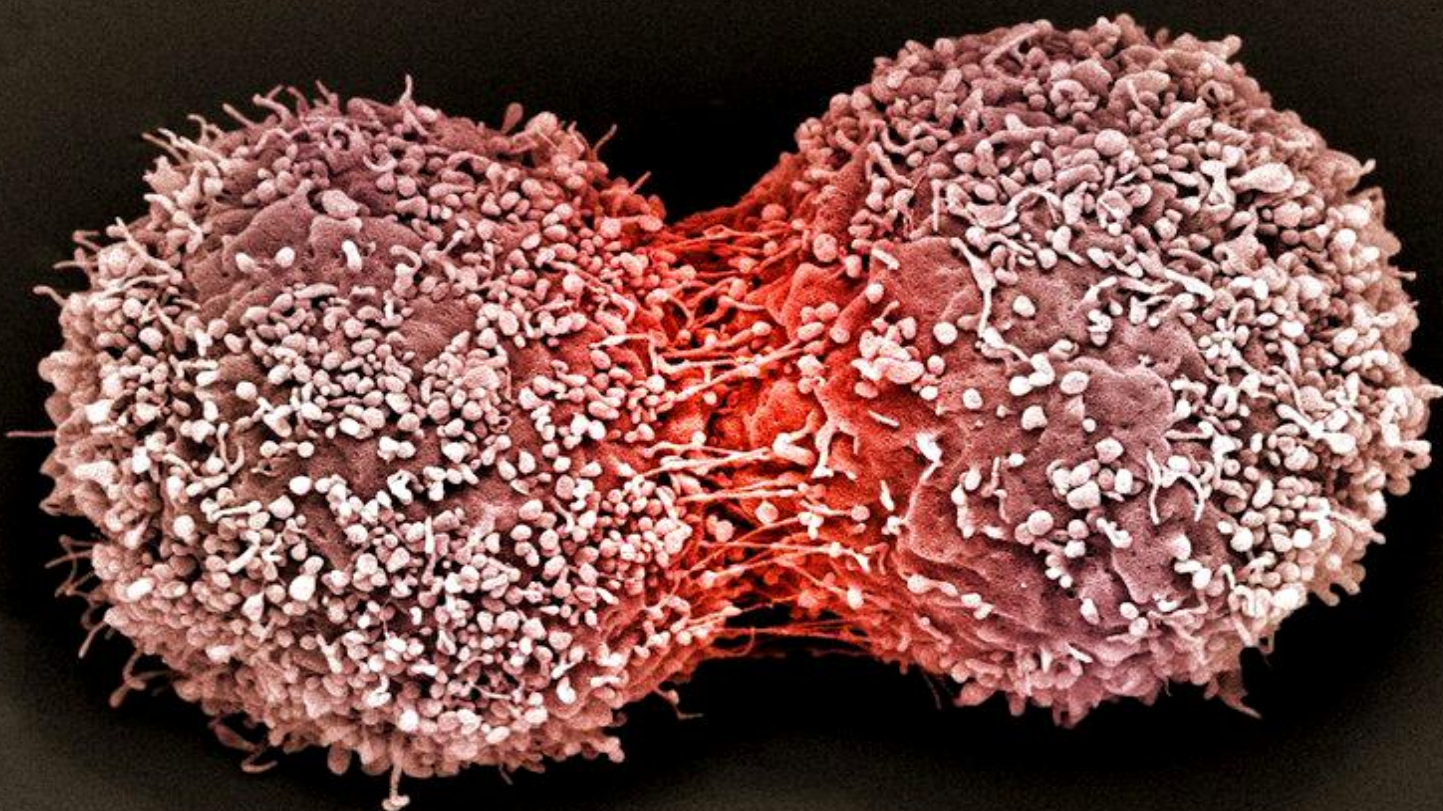




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ : ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ



**Σύνθεση καινοτόμων υβριδικών νανοϋλικών ως
νανοφορείς στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου**

Διπλωματική εργασία

Όνοματεπώνυμο φοιτήτριας : Σαλβάνου Ευαγγελία-Αλεξάνδρα

Επιβλέπων : Χαριτίδης Α. Κωνσταντίνος, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα

2016



NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS

SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING

Department of Materials Science and Engineering

Synthesis of novel hybrid nanomaterials as nanocarriers in targeted cancer treatment

Diploma Thesis

Name : Salvanou Evangelia-Alexandra

Supervisor : Charitidis A. Costantinos, Professor, N.T.U.A.

Athens

2016

Στην αγαπημένη μου γιαγιά...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Σύνθεση υβριδικών POSS νανοϋλικών για εφαρμογή στη θεραπεία του καρκίνου» εκπονήθηκε στο τμήμα Materials and Chemistry του Ερευνητικού Ινστιτούτου SINTEF, στο Όσλο της Νορβηγίας.

Οι τοξικολογικές εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν στο Radium Hospital της Νορβηγίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας κ. Κ.Α. Χαριτίδη, Καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το εξαιρετικά ενδιαφέρον αυτό θέμα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Η. Κούμouλο, τον υποψήφιο διδάκτορα Δ. Δραγατογιάννη και τον Δρ. Ι. Καρτσωνάκη για τη βοήθειά τους, τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους και τη συνεχή στήριξη και ενθάρρυνσή τους.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. κα Α. Δέτση και την Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. κα Μ. Μπεάζη-Κατσιώτη, για το χρόνο που διέθεσαν στην ανάγνωση της διπλωματικής μου εργασίας, για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους και κυρίως για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Research Director του τμήματος Materials and Chemistry κ. Christian Simon, για τη μοναδική ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στη SINTEF. Επιπρόσθετα δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον Research Scientist Nicolas Rival καθώς χωρίς τις γνώσεις, την καθοδήγηση και την υπομονή του, δεν θα είχαν επιτευχθεί όσοι στόχοι τέθηκαν σε αυτή την εργασία. Ακόμα, ήταν τιμή μου που συνεργάστηκα με τους Fuad Karimov, Eirin Langseth, Eva Landsem, Aud Bouzga, Stephan Kubowicz και Mathieu Grandcolas καθώς και πολλούς άλλους υπέροχους ανθρώπους, τους οποίους είχα τη χαρά να γνωρίσω και να συναναστραφώ.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, τα αδέρφια μου αλλά και τους φίλους μου, καθώς δίχως την ανιδιοτελή αγάπη, στήριξη και υπομονή τους, δεν θα μπορούσα να θέτω στόχους και να τους πραγματοποιώ, είτε ως άνθρωπος είτε ως επιστήμονας.

Σας ευχαριστώ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, η νανοτεχνολογία και οι σχετιζόμενες με αυτή επιστήμες αποτελούν διεθνώς έναν πυρήνα έντονων δραστηριοτήτων με πολυάριθμες εφαρμογές στις οποίες επικεντρώνεται πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων και βιομηχανικών επενδύσεων. Η ανάγκη για την αντιμετώπιση ιατρικών προβλημάτων, όπως είναι ο καρκίνος, οδήγησε στην **ανάγκη σύνθεσης νανοφορέων**, με την οποία και ασχολείται το πεδίο της νανοϊατρικής. Οι νανοφορείς έχουν ως σκοπό τη στοχευμένη μεταφορά ενός φαρμάκου απευθείας στη νοσούσα περιοχή, εμποδίζοντας έτσι τις ανεπιθύμητες παρενέργειες των φαρμάκων και την ανεξέλεγκτη βιοδιανομή τους. Οι νανοφορείς αυτοί πρέπει να πληρούν πληθώρα προδιαγραφών, όπως η βιοαποικοδομησιμότητα και η μειωμένη τοξικότητα. Το κάθε σύστημα στοχευμένης αποδέσμευσης που κατασκευάζεται πρέπει να διαθέτει συγκεκριμένο μηχανισμό απελευθέρωσης του φαρμάκου, ο οποίος στην παρούσα εργασία εξαρτάται από τη διακύμανση του **pH**.

Τα **Πολυεδρικά Ολιγομερή Σιλκοξάνια (POSS)** αποτέλεσαν τη βάση των πιθανών νανοφορέων που συντέθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας, λόγω τόσο των εξαιρετικών ιδιοτήτων, καθώς και δυνατοτήτων που διαθέτουν. Μια βασική ιδιότητα που είναι επίσης η τροποποίηση της επιφανείας τους με άλλες αλυσίδες μορίων.

Η επιλογή της **δοξορουβικίνης ως αντικαρκινικό φάρμακο** επηρέασε την επιλογή της σύνθεσης για δύο λόγους: αφενός η δοξορουβικίνη αποτελεί μία από τις πιο ισχυρές αντικαρκινικές ουσίες, στοχεύοντας τύπους καρκίνου που εμφανίζονται σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Αφετέρου η κετόνη του μορίου της μπορεί να αντιδράσει είτε με υδραζίνη σχηματίζοντας υδραζίδιο, είτε με αμίνη σχηματίζοντας ιμίνη.

Η βασική ιδέα ήταν η 100% τροποποίηση του κυβικού βινυλο-POSS μορίου με **υδραζίδιο** με σκοπό τη μέγιστη σύζευξη του φαρμάκου σε ολόκληρο το μόριο. Η προσπάθεια αυτή όμως απέτυχε, καθώς το μόριο με υδραζίδιο σε όλες τις κορυφές ήταν **αδιάλυτο** στο νερό. Με αυτό το κριτήριο ακολούθησε η τροποποίηση με πιο υδρόφιλες ομάδες, όπως η **O-(2-μερκαπτοαιθυλ)-O'-μεθυλ-πολύ(αιθυλενογλυκόλη)**, η **1-θειογλυκερόλη** και τέλος μια **αμφιτεριονική** ένωση. Στις ενώσεις πραγματοποιήθηκε μέτρηση του υδροδυναμικού όγκου, της κυτταροτοξικότητας, καθώς και εκτίμηση της σταθερότητας τους. Σε όλες τις παραπάνω ενώσεις υπήρξε δυσκολία λόγω μειωμένης διαλυτότητας ύστερα από τη δημιουργία του υδραζιδίου.

Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε σύνθεση και προσπάθεια βελτίωσης του **αμινο-POSS**. Ο απώτερος σκοπός ήταν ο ίδιος, η σύζευξη δηλαδή της δοξορουβικίνης με τη διαφορά ότι θα πραγματοποιούνταν μέσω του σχηματισμού ιμίνης. Η σύζευξη του φαρμάκου δεν είναι επιθυμητό να πραγματοποιηθεί με μια ουσία που δεν διαθέτει τις βέλτιστες πιθανές ιδιότητες. Συνεπώς, το αμινο-POSS που συντίθετο μέχρι τη στιγμή έναρξης της εργασίας, δεν ήταν κατάλληλος υποψήφιος.

Τέλος, δεν ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της εργασίας με τη σύζευξη της αντικαρκινικής ουσίας λόγω περιορισμένου χρόνου και μη εύρεσης του τέλει υποψήφιου νανομεταφορέα.

ABSTRACT

During recent years, nanotechnology and all its related sciences, consist an international beehive of multiple applications, where a plethora of research projects and industrial investments is focused on. As a result, the need of dealing with medical issues, such as cancer, led to the synthesis of nanocarriers, a field in which the nanomedicine is focused on. Nanocarriers' role is targeted delivery of a drug directly into the ailing area, preventing the undesired side-effects of conventional medicines and their uncontrolled biodistribution. Nanocarriers must meet numerous standards, such as biodegradability and reduced toxicity. Sustained drug release is controlled by a mechanism, which in this particular project depends on pH fluctuations.

The Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes (POSS) are the basis of potential nanocarriers designed under the context of this project, due to their excellent properties and capabilities. An essential property is their surface alteration with other molecular chains.

The choice of doxorubicin as an anticancer drug affected the synthesis in two ways: firstly, doxorubicin is one of the strongest anticancer substances, targeting very common cancer types. Secondly, the ketone of its molecule can react either with hydrazine, forming a hydrazide, or with amine forming imine.

The basic idea was the 100% modification of cubic vinyl-POSS molecule with hydrazide, aiming to maximum conjugation of the drug on the entire molecule. However, this effort was unsuccessful, since the molecule with the hydrazide on all cubic POSS's vertices was insoluble in water. As a result, a modification with more hydrophilic types was necessary, such as Poly(ethylene glycol) methyl ether thiol, 1-Thioglycerol and a zwitterionic compound. In the aforementioned compounds, hydrodynamic volume was measured, as well as cytotoxicity and stability. However, the reduced solubility of the compounds due to the presence of hydrazide presented an apparent difficulty.

At the same time, synthesis and optimization of POSS-NH₂ was conducted in order to further connect doxorubicin through the imine formation. The conjugation with the drug is pointless to any substance that does not contain the ideal properties. Therefore, POSS-NH₂ which was being synthesized prior to the beginning of this project, was not a suitable candidate.

Finally, the connection of the anticancer substance went beyond the scope of this project due to limited time and inability of finding the ideal nanocarrier.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πρόλογος.....	i
Περίληψη.....	ii
Abstract	iii
Ευρετήριο Εικόνων	vi
Ευρετήριο Σχημάτων.....	vi
Ευρετήριο Γραφημάτων	vii
Πίνακας Αντιστοίχισης Ορολογίας και Συντομεύσεων	ix
Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό Μέρος.....	1
1.1 Νανοτεχνολογία και Νανοϊατρική.....	1
1.1.1 Νανοϋλικά	2
1.1.2 Εφαρμογές.....	3
1.2 Καρκίνος	4
Στατιστικά Στοιχεία.....	5
1.3 Στοχευμένη Αποδέσμευση Φαρμάκου	6
1.3.1 Συστήματα Αποδέσμευσης Φαρμάκου.....	7
1.3.2 Δοξορουβικίνη.....	8
1.4 Κλουβί (POSS Cages) Νανοδιαστάσεων	9
1.4.1 Ιδιότητες	11
1.4.2 Εφαρμογές.....	11
1.5 Πολυλειτουργικότητα.....	12
1.6 1H Γενιάς Νανομεταφορέας – Τροποποίηση Εμπορικών Κελιών με Υδραζίνη	14
1.7 Τεχνικές Χαρακτηρισμού.....	15
1.7.1 Κλικ Χημεία	15
1.7.2 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR).....	16
1.7.3 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC).....	17
1.7.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS).....	18
Κεφάλαιο 2 : Πειραματικό Μέρος	19
2.1 Τροποποίηση Εμπορικών Κελιών με Πολυαιθυλενογλυκόλη	19
2.1.1 Σύνθεση	19
2.2 Τροποποίηση Εμπορικών Κελιών με Διόλη.....	21
2.2.1 Σύνθεση.....	21
2.3 Τροποποίηση Εμπορικών Κελιών με Αμφιτεριόν.....	22
2.3.1 Σύνθεση Αμφιτεριόντος	22

2.3.2	Σύνθεση	24
2.4	Σύνθεση και Βελτιστοποίηση Δομής Κελιού POSS-NH ₂	26
2.4.1	Σύνθεση	26
2.4.2	Προσδιορισμός Αριθμού Αμινομάδων	27
2.4.3	Προσδιορισμός Ισοδύναμου Βάρους	28
Κεφάλαιο 3 : Παρουσίαση και Συζήτηση Αποτελεσμάτων		29
3.1	Τροποποίηση Εμπορικών Κελιών με Πολυαιθυλενογλυκόλη	29
3.1.1	Αποτελέσματα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός	29
3.2	Τροποποίηση Εμπορικών κελιών με Διόλη	31
3.2.1	Αποτελέσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	31
3.2.2	Αποτελέσματα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός	34
3.3	Συγκριτική Μελέτη Κελιών με Πολυαιθυλενογλυκόλη & με Διόλη	35
3.3.1	Διαλυτότητα & Σταθερότητα	35
3.3.2	Αποτελέσματα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός	36
3.3.3	Κυτταροτοξικότητα	37
3.4	Τροποποίηση Εμπορικών Κελιών με Αμφιτεριόν	38
3.4.1	Σύνθεση Αμφιτεριόντος	38
	Αποτελέσματα Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας	38
	Αποτελέσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	39
3.4.2	Σύνθεση	40
	Σταθερότητα και Διαλυτότητα	40
	Αποτελέσματα Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας	40
	Αποτελέσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	41
3.5	Βελτιστοποίηση POSS-NH ₂	42
3.5.1	Επίδραση Νερού	43
3.5.2	Επίδραση Συγκέντρωσης	44
3.5.3	Επίδραση Θερμοκρασίας	45
3.5.4	Μεγαλύτερης κλίμακας σύνθεση	47
3.5.5	Επίδραση διαφορετικού τρόπου προσθήκης νερού	48
3.5.6	Επίδραση Χρόνου Αντίδρασης	49
3.5.7	Επίδραση Διαλύτη	50
3.5.8	Εναλλαγή Παραμέτρων S ₄	51
Κεφάλαιο 4 : Συμπεράσματα		52
4.1	Νανομεταφορείς	52

4.2 Βελτιστοποίηση POSS-NH ₂	53
4.3 Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα.....	55
Παράρτημα.....	56

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Κλάδοι που συνθέτουν τη Νανοϊατρική.....	1
Εικόνα 2: Κυριότερες κατηγορίες νανομεταφορέων.....	2
Εικόνα 3: Βιοϊατρικές εφαρμογές νανοϋλικών.....	3
Εικόνα 4: Έγχρωμες εικόνες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων από Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) α) Μαστού, β) Οστών, γ) Παχέος εντέρου.....	4
Εικόνα 5: Κατάταξη νανομεταφορέων ανάλογα με το μέγεθος.....	6
Εικόνα 6: Δομή πολυλειτουργικότητας.....	12
Εικόνα 7: Μηχανισμός pH-εξαρτώμενος.....	12
Εικόνα 8: Διαδικασία καθαρισμού διαμέσου μεμβρανών.....	20
Εικόνα 9: Απόσταξη ακετόνης.....	22
Εικόνα 10: Ένωση 18	22
Εικόνα 11: Πειραματική διάταξη βελτιστοποίησης.....	26
Εικόνα 12: Τιτλοδότης για τον προσδιορισμό του αριθμού αμινών.....	27
Εικόνα 13: Μηχάνημα μέτρησης της περιεκτικότητας σε στερεό.....	28
Εικόνα 14: Μικρο-εκβολέας.....	35
Εικόνα 15: Έγχρωμη εικόνα HeLa κυττάρου από SEM.....	37
Εικόνα 16: Σύγκριση μεταξύ ένωσης 15 και 16	38
Εικόνα 17: TLC πορείας αντίδρασης για την ένωση 12	40

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Χημική δομή DOX.....	8
Σχήμα 2: Βασικές δομές σιλκοξανίων.....	9
Σχήμα 3: (RSiO _{3/2}) ₈ ή T ₈ R ₈ , όπου R: προπυλαμίνη.....	10
Σχήμα 4: (RSiO _{3/2}) ₁₀ ή T ₁₀ R ₁₀ , όπου R: προπυλαμίνη.....	10
Σχήμα 5: (RSiO _{3/2}) ₁₂ ή T ₁₂ R ₁₂ , όπου R: προπυλαμίνη.....	10
Σχήμα 6 : Δομή DOX-POSS μέσω υδραζόνης.....	13
Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης του υδραζιδίου 4	14
Σχήμα 8: Πορεία αντίδρασης μη αλδολικού τύπου σχηματισμό υδραζόνης με κλικ χημεία.....	15
Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης του υδραζιδίου 10	19
Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση υδραζιδίου 7	21
Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση ένωσης 6	31

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Γράφημα πίτας εκτιμώμενων νέων περιστατικών καρκίνου (αριστερά) και περιστατικών θνησιμότητας (δεξιά) στην Ευρώπη για το 2012	5
Γράφημα 2: Γράφημα πίτας εκτιμώμενων περιστατικών καρκίνου στην Ευρώπη για το 2017	5
Γράφημα 3: Τομείς εφαρμογών κλικ χημείας.	15
Γράφημα 4: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων 10 κατά ένταση σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή	29
Γράφημα 5: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων 10 κατ' όγκο σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή.....	29
Γράφημα 6: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων 10' κατά ένταση σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή	30
Γράφημα 7: : Κατανομή μεγέθους σωματιδίων 10' κατ' όγκο σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή	30
Γράφημα 8: ¹ H NMR του 6 , 400MHz, (<i>D</i> ₂ <i>O</i>)	32
Γράφημα 9: ¹³ C NMR του 6 , 400MHz, (<i>D</i> ₂ <i>O</i>)	32
Γράφημα 10: Συγκριτικό ¹ H NMR του 7 , 400MHz, (<i>D</i> ₂ <i>O</i>), πριν(κόκκινο) και μετά(μπλε) τον καθαρισμό	33
Γράφημα 11: ¹³ C NMR του 7 , 400MHz, (<i>D</i> ₂ <i>O</i>) μετά τον καθαρισμό	33
Γράφημα 12: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων 7 κατά ένταση σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή	34
Γράφημα 13:Κατανομή μεγέθους σωματιδίων 7 κατ' όγκο σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή.....	34
Γράφημα 14: Συγκριτικό γράφημα μεγέθους σωματιδίων 7 (κόκκινο), 10 (πράσινο), 10' (μπλε), και HEPES 10%FBS(μαύρο) κατά ένταση	36
Γράφημα 15: Συγκριτικό γράφημα μεγέθους σωματιδίων 7 (κόκκινο), 10 (πράσινο), 10' (μπλε), και HEPES 10%FBS(μαύρο)κατ' όγκο.....	36
Γράφημα 16: Κυτταροτοξικότητα δειγμάτων 7 (μπλε), 10 (κόκκινο) και 10' (πορτοκαλί)	37
Γράφημα 17: ¹ H NMR του 11 , 400MHz, (<i>D</i> ₂ <i>O</i>)	39
Γράφημα 18: ¹ H NMR του 12 , 400MHz, (<i>D</i> ₂ <i>O</i>)	41
Γράφημα 19: ¹ H NMR του 13 , 400MHz, (<i>DMSO</i>) μετά τον καθαρισμό διαμέσου μεμβρανών.....	41
Γράφημα 20: Επίδραση νερού (-40ppm έως -75ppm)	43
Γράφημα 21: Επίδραση νερού (-60ppm έως -74ppm)	43
Γράφημα 22: Επίδραση συγκέντρωσης (-40ppm έως -75ppm)	44
Γράφημα 23: Επίδραση συγκέντρωσης (-60ppm έως -74ppm)	44
Γράφημα 24 : Επίδραση θερμοκρασίας (-40ppm έως -75ppm) σε συγκέντρωση C ₅	45
Γράφημα 25: Επίδραση θερμοκρασίας (-60ppm έως -74ppm) σε συγκέντρωση C ₅	45
Γράφημα 26: Επίδραση θερμοκρασίας (-40ppm έως -75ppm) σε συγκέντρωση C ₃	46
Γράφημα 27: Επίδραση θερμοκρασίας (-40ppm έως -74ppm) σε συγκέντρωση C ₃	46
Γράφημα 28: Σύνθεση κλίμακας 3L (-40ppm έως -72ppm)	47
Γράφημα 29: Σύνθεση κλίμακας 3L (-60ppm έως -74ppm)	47
Γράφημα 30: Επίδραση τρόπου προσθήκης νερού (-40ppm έως -72ppm)	48
Γράφημα 31: Επίδραση τρόπου προσθήκης νερού (-60ppm έως -74ppm)	48
Γράφημα 32: Επίδραση διαφορετικών χρόνων αντίδρασης (-40ppm έως -72ppm)	49
Γράφημα 33: Επίδραση διαφορετικών χρόνων αντίδρασης (-60ppm έως -74ppm)	49
Γράφημα 34: Επίδραση διαφόρων διαλυτών (-40ppm έως -72ppm)	50

Γράφημα 35: Επίδραση διαφόρων διαλυτών (-60ppm έως -74ppm).....	50
Γράφημα 36: Εναλλαγή παραμέτρων με διαλύτη S ₄ (-40ppm έως -72ppm)	51
Γράφημα 37: Εναλλαγή παραμέτρων με διαλύτη S ₄ (-60ppm έως -74ppm)	51
Γράφημα 38: Σύγκριση NMR αρχικού (κόκκινο) και βελτιωμένου (μπλε) αμινο-POSS (-40ppm έως -72ppm)	53
Γράφημα 39: Σύγκριση NMR αρχικού (κόκκινο) και βελτιωμένου (μπλε) αμινο-POSS (-60ppm έως -74ppm)	53
Γράφημα 40: Συγκριτικό ¹³ C NMR του 7 , 400MHz, (D ₂ O), πριν(κόκκινο) και μετά(μπλε) τον καθαρισμό	56
Γράφημα 41: ¹ H NMR του 7 , 400MHz, (D ₂ O) μετά τον καθαρισμό.....	56
Γράφημα 42: ¹³ C NMR του 11 , 400MHz, (D ₂ O)	57
Γράφημα 43: ¹³ C NMR του 12 , 400MHz, (D ₂ O).....	57

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΣΗΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

Συμβολισμός / Συντόμευση	Ελληνική ονομασία	Αγγλική ονομασία
AcOEt	Αιθανικό αιθυλεστέρα	Ethyl Acetate
AIBN	2,2'-Αζω-δισ-ισοβουτυρο-νιτρίλιο	Azobisisobutyronitrile
APS	3-αμινοπροπυλ(τριμεθοξυ)σιλάνη	(3-aminopropyl) triethoxysilane
DCM	Διχλωρομεθάνιο	Dichloromethane
DMAP	4-(Διμεθυλαμινο)πυριδίνη	4-(Dimethylamino)pyridine
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	Dimethyl Sulfoxide
DOX	Δοξορουβικίνη	Doxorubicin
EPR	Φαινόμενο ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης	Enhanced permeability and retention effect
GAA	Παγόμορφο/Ανυδρο οξικό οξύ	Glacial Acetic Acid
IARC	Διεθνής υπηρεσία για την Έρευνα για τον καρκίνο	International Agency for Research on Cancer
mPEG thiol	O-(2-μερκαπτοαιθυλ)-O'-μεθυλ- πολύ(αιθυλενογλυκόλη)	Poly(ethylene glycol) methyl ether thiol
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών	Phosphate-Buffered Saline
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Poly(ethylene glycol)
PnP	Προπυλαιθέρας της προπυλενογλυκόλης	Propylene Glycol Propyl Ether
POSS	Πολυεδρικά Ολιγομερή Σιλκοξάνια	Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes
POSS-NH ₂ ή Αμινο-POSS ή HAPS	Οκτα(Αμινοπροπυλ)Σιλκοξάνιο	Octa(Aminopropyl)Silsesquioxane
SEM	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης	Scanning Electron Microscopy
THF	Τετραϋδροφουράνιο	Tetrahydrofuran
WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας	World Health Organization

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΪΑΤΡΙΚΗ

Εδώ και μισό αιώνα ο νομπελίστας φυσικός Richard Feynman, εισήγαγε για πρώτη φορά την έννοια της νανοτεχνολογίας στην περίφημη διάλεξή του «There is plenty of room at the Bottom». Από την εποχή εκείνη μέχρι και σήμερα, η επιστήμη αυτή έχει ήδη εισχωρήσει στα νευραλγικότερα πεδία της ιατρικής έρευνας, καθώς επεκτείνεται με ταχείς ρυθμούς και με αναρίθμητες εφαρμογές σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Με τον όρο **νανοτεχνολογία** αναφερόμαστε στο σύνολο των επιστημών οι οποίες μελετάνε τις ιδιότητες και εφαρμογές σωματιδίων με τουλάχιστον μία διάσταση κυμαινόμενη από 1 έως 100nm.

Ως βιοτεχνολογικό παρακλάδι της νανοτεχνολογίας, η **νανοϊατρική** αναφέρεται στην παρακολούθηση, την ανίχνευση, την αποκατάσταση και τον έλεγχο των βιολογικών συστημάτων του ανθρώπου σε μοριακό επίπεδο, με την υψηλής ακρίβειας κατασκευή και χρήση νανοδομών και νανοδιατάξεων. Πρωτοποριακά θεραπευτικά και διαγνωστικά εργαλεία βασισμένα στη νανοτεχνολογία, έχουν εισαγάγει νέες επαναστατικές μεθόδους στην τρέχουσα ιατρική πρακτική και έχουν δώσει την απάντηση σε άλυτα ως τώρα προβλήματα.



Εικόνα 1: Κλάδοι που συνθέτουν τη Νανοϊατρική

Η διαγνωστική προσέγγιση της παραδοσιακής ιατρικής πραγματοποιείται σε επίπεδο ιστού, με την έκφραση των συμπτωμάτων μίας ασθένειας, η οποία μπορεί να βρίσκεται ήδη σε προχωρημένο στάδιο. Από την άλλη πλευρά, στη νανοϊατρική έχουμε τη δυνατότητα ανίχνευσης μεταβολών σε μοριακό επίπεδο. Το γεγονός αυτό κάνει πιο εφικτή την άμεση αντιμετώπιση προβλημάτων, προτού ακόμα παρατηρηθούν με τις συνηθισμένες κλινικές ή εργαστηριακές μεθόδους συμπτώματα ή εμφανή ευρήματα. Η πρόωμη αυτή διαγνωστική και θεραπευτική αντιμετώπιση μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική βελτίωση της πρόγνωσης μιας πληθώρας ασθενειών. Επιπρόσθετα, η κλασική ιατρική μελετάται και σχεδιάζεται θέτοντας ως σημείο αναφοράς κάποιες ομάδες ατόμων που παρουσιάζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά (φυσιολογικά και παθολογικά κριτήρια). Αντίθετα, η νανοϊατρική απευθύνεται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς του συγκεκριμένου ασθενή, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα **στοχευμένης θεραπείας**, με αποτελεσματικότερη δράση και παράλληλα ρύθμιση της δόσης και μείωση των παρενεργειών στον υπόλοιπο οργανισμό.¹

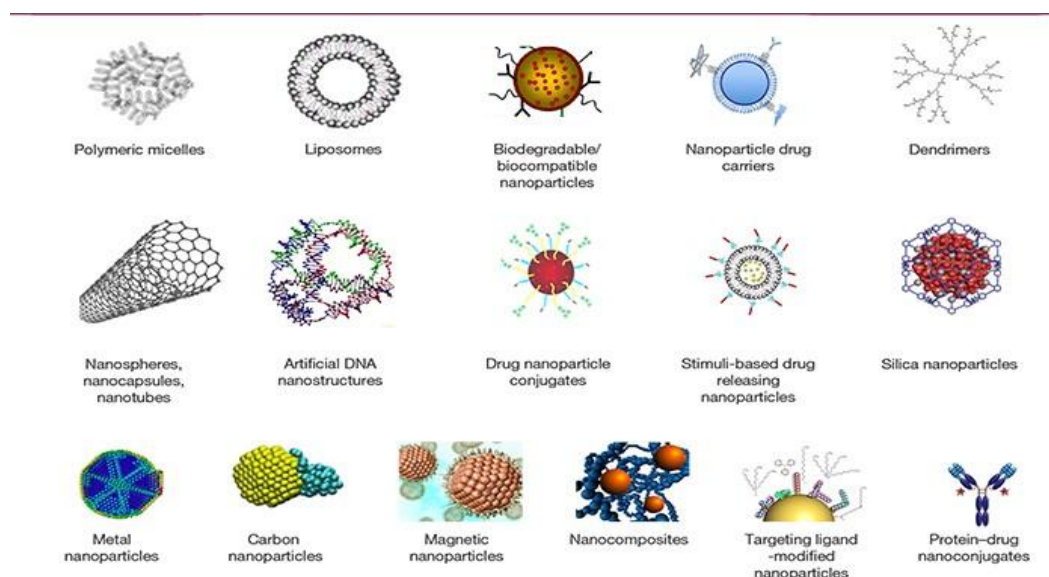
¹ Εισαγωγή στη Νανοϊατρική, e-learning, Ε.Κ.Π.Α, 2014

² **Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y.**, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Delivery. Rev.* 2001, 47, 113–131

1.1.1 ΝΑΝΟΎΛΙΚΑ

Τα υλικά όταν βρίσκονται στη νανο-κλίμακα επιδεικνύουν ενισχυμένες φυσικές, χημικές και μηχανικές ιδιότητες, σε σύγκριση με τις ιδιότητες που έχουν τα ίδια υλικά στη μικροκλίμακα. Τα νανοϋλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο άμεσα όσο και έμμεσα μέσω της ενσωμάτωσής τους σε πολυμερικά συστήματα, σχηματίζοντας έτσι νανოსύνθετα υλικά.

Μεγάλη ποικιλία νανομεταφορέων με ποικίλα μεγέθη, αρχιτεκτονικές και επιφανειακές ιδιότητες έχουν μελετηθεί έως σήμερα, με σκοπό την απεικόνιση ή τη χορήγηση φαρμάκων αλλά και γονιδίων. Τα λιποσώματα,^{2,3,4,5} τα μικκύλια, τα δενδριμερή,^{6,7} τα πολυμερή, καθώς και τα μαγνητικά νανοσωματίδια και τα νανοσωματίδια χρυσού (gold nanoparticles, AuNPs)⁸ και οι κβαντικές τελείες (quantum dots) είναι ορισμένοι νανομεταφορείς οι οποίοι έχουν διερευνηθεί σε βάθος και προσφέρουν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στις μέχρι τώρα μελέτες.^{9,10}



Εικόνα 2: Κυριότερες κατηγορίες νανομεταφορέων

² **Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y.**, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Delivery. Rev.* 2001, 47, 113–131

³ **Mitra A, Nan A, Line BR, Ghandehari H.**, Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Curr. Pharm. Des.* 2006, 12, 4729–4749.

⁴ **Torchilin VP.**, Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm. Res.* 2007;24:1–16.

⁵ **Allen TM, Cullis PR.** Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science (Washington, D.C.)* 2004, 303, 1818–1822.

⁶ **Svenson S, Tomalia DA.**, Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57, 2106–29

⁷ **Qiu LY, Bae YH.**, Polymer architecture and drug delivery. *Pharm. Res.* 2006, 23, 1–30

⁸ **Han G, Ghosh P, De M, Rotello VM.**, Drug and gene delivery using gold nanoparticles. *NanoBiotech.* 2007, 3, 40–45.

⁹ **Panyam J, Labhasetwar V.**, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55, 329–347.

¹⁰ **Katz E, Willner I.**, Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 2004, 43, 6042–6108.

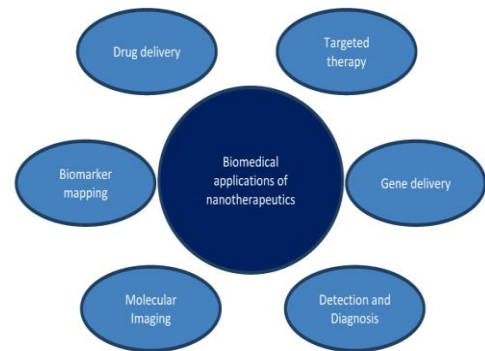
Οι επιφανειακές τροποποιήσεις των νανομεταφορέων έχουν σημαντικές επιπτώσεις στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες καθώς και στη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Μπορούν να τροποποιήσουν τα ζ-δυναμικά των νανοσωματιδίων, την υδροφοβικότητα και τις δυνατότητες στόχευσης, ελέγχοντας έστω και εν μέρει τη φαρμακοκινητική και τη διανομή τους μέσα στον οργανισμό. Είναι επίσης σημαντικό, ότι λόγω του μικρού τους μεγέθους, μπορούν να διαπεράσουν τους βιολογικούς φραγμούς και να προσληφθούν παθητικά μέσω των κυττάρων. Τέλος, πολλές κατηγορίες νανοσωματιδίων έχουν την τάση να συσσωρεύονται σε καρκινικούς όγκους, εστίες φλεγμονής και λοίμωξης, εξαιτίας του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (enhanced permeability and retention effect, EPR), που εμφανίζουν τα αγγεία της πάσχουσας περιοχής, λόγω μη φυσιολογικής λειτουργίας.

1.1.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Οι εφαρμογές της νανοϊατρικής καλύπτουν πολλά διαφορετικά πεδία, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για ορισμένες ειδικότητες, όπως είναι η καρδιολογία, η οφθαλμολογία, η ενδοκρινολογία, η ορθοπαιδική, η νευρολογία, η ογκολογία, η δερματολογία και η αναγεννητική ιατρική.

Ορισμένες βασικές εφαρμογές αναφέρονται παρακάτω:¹¹

- Νανο-απεικονιστικά στην κατευθυνόμενη χειρουργική
- Σκιαγραφικά μέσα (π.χ. MRI, υπολογιστική τομογραφία, υπέρηχοι)
- Ικρίωματα ιστικής μηχανικής
- Νανο-εργαλεία (π.χ. femtosecond laser)
- Οδοντιατρικά νανوسύνθετα
- Καρδιαγγειακά εμφυτεύματα
- Αντιβακτηριακοί παράγοντες
- Εμφυτεύματα μαστού
- Βιοαισθητήρες (ανίχνευση μιας φυσικοχημικής μεταβολής)
- Εμφυτεύσιμες διαγνωστικές συσκευές (π.χ. άμεση ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροβιακών αλληλουχιών)
- Ακριβή συστήματα χορήγησης φαρμάκων που χρησιμοποιούν **νανοφορείς για τη θεραπεία του καρκίνου.**

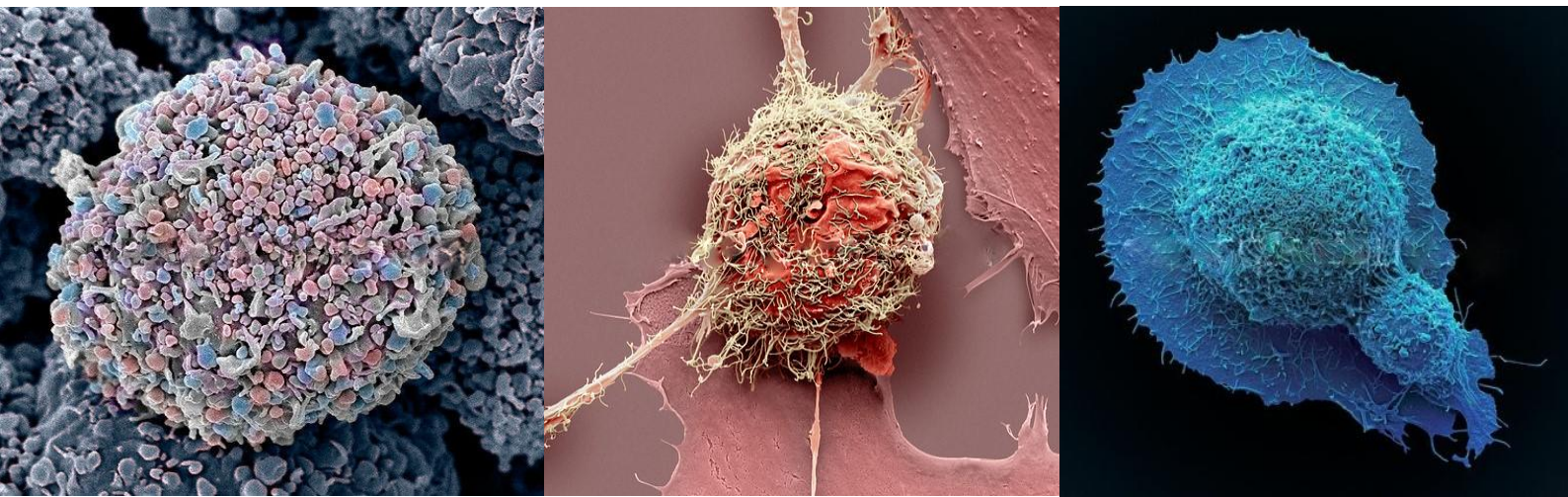


Εικόνα 3: Βιοϊατρικές εφαρμογές νανοϋλικών

¹¹ Sumistha Das, Shouvik Mitra, S.M. Paul Khurana, Nitai Debnath, Nanomaterials for biomedical applications, *Frontiers in Life Science*, 2013, 7, 90-98

1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο όρος «καρκίνος» αποδόθηκε από τον Πατέρα της Ιατρικής, τον Ιπποκράτη, λόγω του ότι οι ακτινωτές μεταστάσεις που δημιουργεί ένας όγκος φέρνει αμυδρά στο μυαλό το καβούρι (καρκίνο). Εναλλακτικά η πάθηση αυτή αναφέρεται και ως κακοήθης όγκος ή νεόπλασμα και περιγράφει μια ομάδα νοσημάτων της οποίας η αιτία βρίσκεται σε κυτταρικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα οφείλεται στην παθολογική ανάπτυξη ιστού που προκαλείται από την ταχεία διαίρεση κυττάρων, τα οποία έχουν υποστεί κάποιου βαθμού μετάλλαξη (εξαλλαγή).



Εικόνα 4: Έγχρωμες εικόνες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων από Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)¹² α) Μαστού, β) Οστών, γ) Παχέος εντέρου

Τα καρκινικά κύτταρα τείνουν να ξεπεράσουν τα συνήθη όρια και να εξαπλωθούν σε παρακείμενα μέρη του σώματος και όργανα δημιουργώντας έτσι μεταστάσεις. Οι παράγοντες οι οποίοι παίζουν σημαντικό αιτιολογικό ρόλο στη γένεση και εξάπλωση του καρκίνου μπορεί να είναι τόσο εσωτερικοί, όπως οι κληρονομικές γενετικές μεταλλάξεις, οι ορμόνες και οι ανοσολογικές διαταραχές όσο και εξωτερικοί όπως το κάπνισμα, η ανθυγιεινή διατροφή και άλλοι πολλοί.

Ο καρκίνος είναι ικανός να προσβάλλει κάθε όργανο και ιστό. Σε πρωταρχικά στάδια μπορεί να είναι αντιμετωπίσιμος ενώ σε προχωρημένα, μη ελεγχόμενα στάδια μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο. Ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση η αντιμετώπιση μπορεί να περιλαμβάνει χειρουργείο, ακτινοβολία, χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία, ανοσολογική θεραπεία αλλά και **στοχευμένη θεραπεία**.

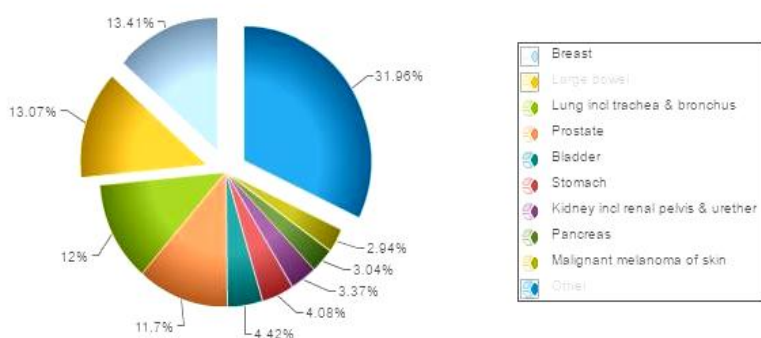
¹² Πηγή: <http://www.sciencephoto.com/>

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

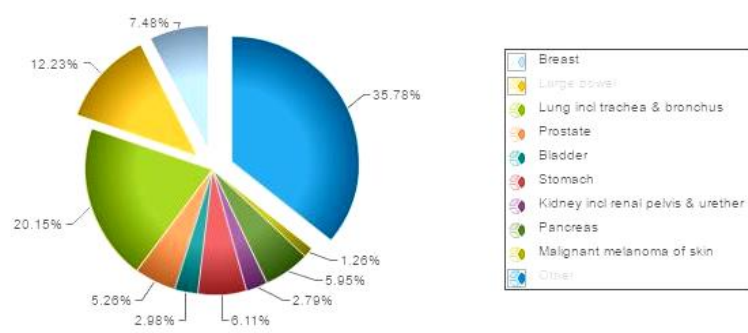
Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις πρωταρχικές αιτίες θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες, σημειώνοντας περίπου 14 εκατομμύρια νέων περιστατικών και 8.2 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως το 2012. Μέσα στις επόμενες 2 δεκαετίες τα περιστατικά καρκίνου αναμένεται να εκτοξευθούν από τα 14 στα 22 εκατομμύρια, ετησίως.¹³

Οι εκτιμήσεις για το έτος 2012 για όλη την Ευρώπη, ανεξαρτήτως φύλου, βάσει του «Globocan Project» της Διεθνούς Υπηρεσίας για την Έρευνα για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), εμφανίζονται στο παρακάτω γραφήματα.¹⁴

Estimated incidence for both sexes in Europe, 2012



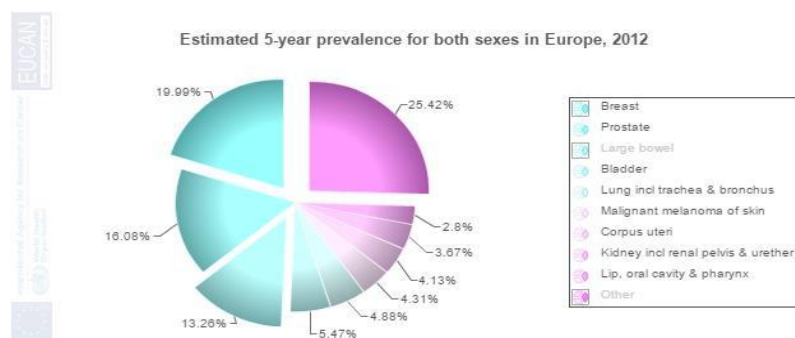
Estimated mortality for both sexes in Europe, 2012



Γράφημα 1: Γράφημα πίτας εκτιμώμενων νέων περιστατικών καρκίνου (αριστερά) και περιστατικών θνησιμότητας (δεξιά) στην Ευρώπη για το 2012

Στο γράφημα 1 εμφανίζονται τα εκτιμώμενα ποσοστά νέων περιστατικών καρκίνου. Τα κομμάτια της πίτας που ξεχωρίζουν αφορούν τις μορφές του καρκίνου που ενδιαφέρουν την παρούσα εργασία. Χαρακτηριστικά με γαλάζιο χρώμα αναφέρεται το ποσοστό που αφορά στον καρκίνο του μαστού, με κίτρινο του παχέος εντέρου και με μπλε άλλους τύπους καρκίνου μέσα στους οποίους περιλαμβάνεται και το οστεοσάρκωμα.

Στο γράφημα 2 γίνεται εύκολα αντιληπτή η αύξηση των περιπτώσεων καρκίνου που εκτιμάται ότι θα υπάρχουν το 2017. Συνεπώς, είναι επιτακτική ανάγκη η ανεύρεση νέων τεχνικών και θεραπευτικών ουσιών, για την αποτελεσματική πρόληψη και καταπολέμηση αυτής της νόσου.



Γράφημα 2: Γράφημα πίτας εκτιμώμενων περιστατικών καρκίνου στην Ευρώπη για το 2017

¹³ World Cancer Report 2014

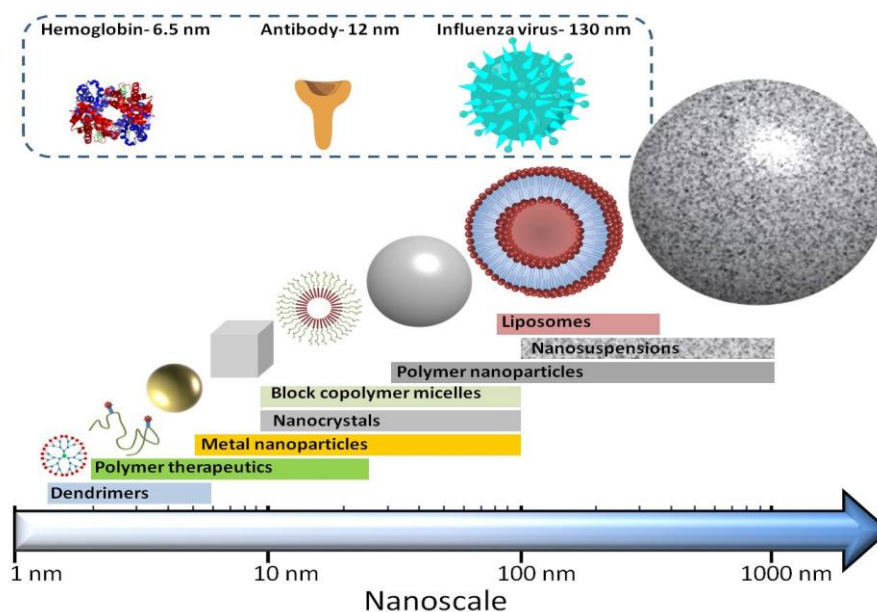
¹⁴ EUCAN, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization

1.3 ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΥ

Εξαιτίας της εντυπωσιακής προόδου της επιστήμης των υλικών και των φαρμάκων, τα πρωτοποριακά συστήματα για την αποτελεσματική διάγνωση αλλά και στοχευμένη θεραπεία φαρμάκων στη νανοκλίμακα, έχουν αρχίσει να καταλαμβάνουν σημαντικό έδαφος. Η πρόοδος στην ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων, σχετίζεται με την ανάπτυξη ειδικών νανοσυστημάτων, για τη στοχευμένη διοχέτευση φαρμάκων και βιομορίων. Η αναγκαιότητα για νανομεταφορείς και θεραπευτικές ουσίες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να στοχεύουν αποτελεσματικά τις πάσχουσες περιοχές στο σώμα χωρίς να εμφανίζουν εκτεταμένες παρενέργειες, αυξάνεται διαρκώς.

Η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων συχνά παρεμποδίζεται από τη μη στοχευμένη διανομή τους προκαλώντας κλινικές παρενέργειες, καθώς και από το γεγονός ότι πολλές φαρμακευτικές ουσίες μεταβολίζονται και αποβάλλονται από το σώμα πολύ γρήγορα μετά τη χορήγησή τους.

Λόγω του μικρού τους μεγέθους, έχουν τη δυνατότητα να διεισδύουν διαμέσου των πόρων των αγγείων, επιτρέποντας έτσι τη συσσώρευση του φαρμάκου στις περιοχές-στόχους. Κατά συνέπεια, με τα συστήματα στοχευμένης αποδέσμευσης φαρμάκου περιορίζεται η δόση του φαρμάκου και οι παρενέργειές του, ενισχύοντας παράλληλα τη σταθερότητά του.¹⁵



Εικόνα 5: Κατάταξη νανομεταφορέων ανάλογα με το μέγεθος

¹⁵ Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C., Nanocapsule technology: a review. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 2002;19:99–134.

1.3.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΥ

Ο τρόπος εισαγωγής των νανοδομών στον οργανισμό είναι πολύ σημαντικός. Μπορεί να επιτευχθεί είτε ενδοφλέβια (π.χ. νανοβελόνες), είτε τοπικά (στους βλεννογόνους) είτε ακόμα μέσω μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων (MEMS) που τοποθετούνται στο δέρμα ή με biochips που εμφυτεύονται στο σώμα.

Η ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου μπορεί να υποκινηθεί είτε εξωγενώς είτε ενδογενώς.¹⁶

Οι κυριότεροι τρόποι εξωγενούς ερεθίσματος μπορεί να περιλαμβάνει:

- Θερμοαποκρινόμενα συστήματα
- Μαγνητο-αποκρινόμενα συστήματα
- Ηλεκτροαποκρινόμενα συστήματα
- Στοχευμένη θεραπεία ενεργοποιούμενη με υπερήχους
- Στοχευμένη θεραπεία που ενεργοποιείται με φως

Ταυτόχρονα τα ενδογενή ερεθίσματα μπορεί να είναι:

- Αυτορρυθμιζόμενα συστήματα
- Ενζυμο-ευαίσθητα συστήματα
- Συστήματα ευαίσθητα στην οξειδοαναγωγή
- **Συστήματα ευαίσθητα στο pH**

Πληθώρα αντικαρκινικών συστημάτων αποδέσμευσης φαρμάκων εκμεταλλεύονται τη μικρή διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στο pH των υγιών ιστών (~7.4) και του εξωκυττάρου περιβάλλοντος ενός καρκίνου (6.5-7.2). Αυτή η διακύμανση του pH οφείλεται στην ανώμαλη αγγειογένεση σε όγκους που αναπτύσσονται γρήγορα, προκαλώντας έτσι ταχεία έλλειψη θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου και παράγοντας κατά συνέπεια όξινους μεταβολίτες.

Δύο είναι οι κύριες στρατηγικές οι οποίες έχουν αναπτυχθεί για συστήματα ευαίσθητα στο pH. Η μεν πρώτη βασίζεται στη χρήση πολυοξέων ή πολυβάσεων με ομάδες που ιονίζονται και υφίστανται αλλαγές στη διαμόρφωση ή/και στη διαλυτότητα. Η δεύτερη στρατηγική βασίζεται σε **πολυμερικά συστήματα με δεσμούς ευαίσθητους στο pH**, η διάσπαση των οποίων επιτρέπει την απελευθέρωση των μορίων που βρίσκονται συνδεδεμένα στο πολυμερές.

¹⁶ **Simona Mura, Julien Nicolas, Patrick Couvreur**, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nature Materials*, 2013, 12, 991-1003

1.3.2 ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗ

Μία από τις πιο ευρέως διαδεδομένες και αποτελεσματικές αντικαρκινικές ενώσεις χρησιμοποιούμενη για περισσότερα από 30 χρόνια σε διάφορους τύπους νεοπλασιών, έχει αποδειχθεί ότι είναι η δοξορουβικίνη (DOX).¹⁷

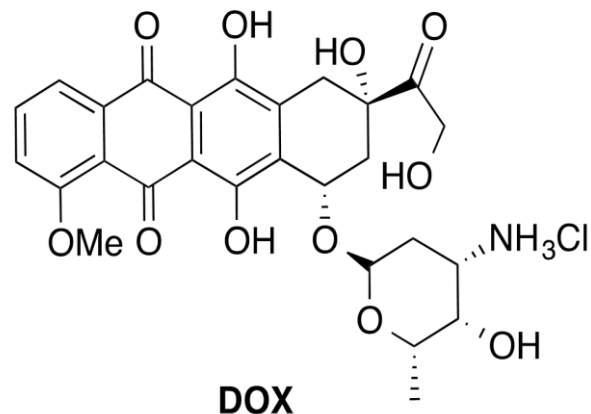
Η δοξορουβικίνη ανήκει στην οικογένεια των ανθρακυκλινών οι οποίες αποτελούν και την κυριότερη ομάδα κυτταροστατικών αντιβιοτικών.¹⁸

Οι ανθρακυκλίνες είναι αντικαρκινικές ενώσεις που έχουν πηγή προέλευσης διάφορα είδη στρεπτομύκητα και οι αντικαρκινικές ιδιότητές τους εδραιώθηκαν τη δεκαετία του 1960. Άλλες σημαντικές ενώσεις που ανήκουν στις ανθρακυκλίνες και είναι αρκετά διαδεδομένες είναι η δαουνορουβικίνη (daunorubicin), επιρουβικίνη (epirubicin), ιδαρουβικίνη (idarubicin) και η βαλρουβικίνη (valrubicin). Οι προαναφερθείσες ενώσεις αποτελούν και αυτές σημαντικούς θεραπευτικούς παράγοντες έχοντας η καθεμία διαφορετικό μηχανισμό δράσης.

Ο τρόπος δράσης των ανθρακυκλινών είναι αυτός που τις καθιστά φαρμακευτικά αποτελεσματικές. Παράλληλα όμως, δεν είναι εκλεκτικές με το μυοκάρδιο προκαλώντας έτσι ποικίλες και βαρύνουσας σημασίας **παρενέργειες**.¹⁹ Παρόλο που σε ορισμένες περιπτώσεις η δοξορουβικίνη μπορεί να θεραπεύσει, στην πλειονότητα των οργάνων προκαλεί τοξικότητα και πιο συγκεκριμένα καρδιοτοξικότητα απειλητική για την ίδια τη ζωή του ασθενούς.²⁰ Άλλη παρενέργεια των ανθρακυκλινών είναι και ο εμετός.

Εξαιτίας αυτού δημιουργούνται περιορισμοί σχετικοί με τη δοσολογία χορήγησης της δοξορουβικίνης η οποία σχετίζεται με τη χημική ουσία, τον τρόπο έγχυσης της καθώς και την αθροιστική δόση καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ασθενούς,²¹

Για το λόγο αυτό είναι **καθοριστικής σημασίας η σύνθεση ενός νανομεταφορέα για σύζευξη με το DOX ώστε να περιοριστούν οι παρενέργειες στο ελάχιστο και να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα στο μέγιστο.**



Σχήμα 1: Χημική δομή DOX

¹⁷ Oktay Tacar, Ponsak Sriamornsak, Crispin R. Dass, Doxorubicin: an update on anticancer molecular action toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013, 65, σσ. 157-170

¹⁸ Φούντζηλας Γ., Μπαρμπούνης Β. *Βασικές Αρχές Θεραπείας του Καρκίνου*. Θεσσαλονίκη : University Studio Press, 1997.

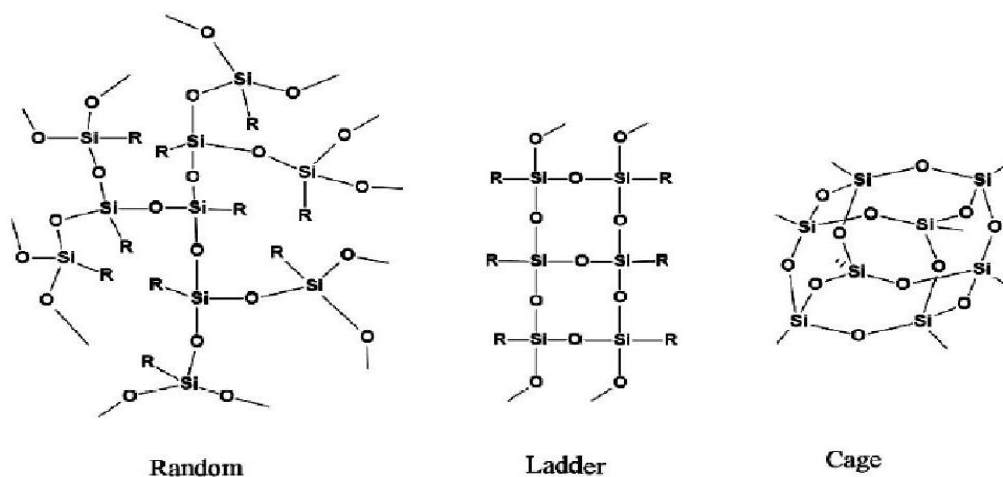
¹⁹ Pommier Y, Capranico G, Orr A, Kohn KW. Local base sequence preferences for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of amsacrine or teniposide. *Nucleic Acids Research*. 1991, 19, σσ. 5973-5980.

²⁰ Feenstra J, Grobbee DE, Remme WJ, Stricker BH. Drug-induced heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999, 33, σσ. 1152-1162.

²¹ Ewer MS, Benjamin RS. Complications of cancer and its treatment. *Cancer Medicine*. 4η, 1997, σσ. 3204-3215.

1.4 ΚΛΟΥΒΙ (POSS CAGES) ΝΑΝΟΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ

Ένα από τα πιο γνωστά και ταυτόχρονα πολλά υποσχόμενα υβριδικό οργανικό-ανόργανο υλικό το οποίο χρησιμοποιείται και για την ανάπτυξη σύνθετων υλικών, ανήκει στην οικογένεια των σιλκοξανίων. Τα πολυεδρικά ολιγομερή σιλκοζάνια (Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes, POSS) κατέχουν εξέχουσα θέση στην ομάδα των καινοτόμων υλικών και δικαιολογημένα. Βασιζόμενα στην αρχιτεκτονική του μορίου, τα σιλκοζάνια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 3 βασικές δομές όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα:



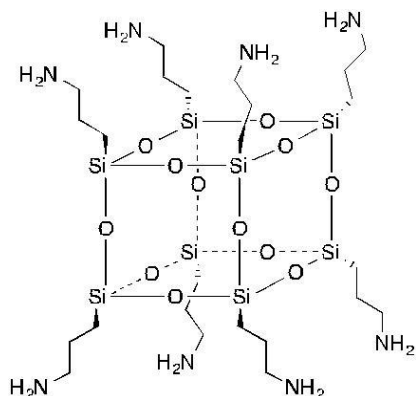
Σχήμα 2: Βασικές δομές σιλκοξανίων

Η δομή κλουβιού (cage structure) είναι αυτή που παρουσιάζει προοπτικές πραγματικά υποσχόμενες. Η διακριτή τρισδιάστατη δομή κλουβιού σε νανοκλίμακα, αποτελείται από έναν εσωτερικό ανόργανο σκελετό από πυρίτιο (Si) και οξυγόνο (O) και ένα εξωτερικό κέλυφος αποτελούμενο από λειτουργικές ομάδες, έχοντας λοιπόν δομή του τύπου $R_nSi_nO_{1.5n}$. Κάθε άτομο πυριτίου συνδέεται με τρία άτομα οξυγόνου με σιλκοξανικό δεσμό καθώς και με ένα άτομο άνθρακα (C) το οποίο μπορεί να είναι αδρανές ή μη, καθιστώντας έτσι ολόκληρη τη νανοδομή συμβατή με πολυμερικά και βιολογικά συστήματα. Οι κορυφές από ένα κυβικό POSS μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς με διαφορετικές οργανικές πλευρικές αλυσίδες όπως για παράδειγμα υδρογόνο, εστέρες, καρβοξύλια, αμίνες κλπ. Η ικανότητά τους λοιπόν να τροποποιούνται με μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών R, τους δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας πολλών διαφορετικών δομών. Ανάλογα με τη φύση του R σχηματίζονται συνήθως εύκαμπτες οργανικές αλυσίδες με διαμέτρους που κυμαίνονται από 1 έως 3nm.^{22,23} Τα POSS αναφέρονται συνήθως ως T_8R_8 , $T_{10}R_{10}$, $T_{12}R_{12}$ όπου το T υποδηλώνει τον αριθμό των ατόμων πυριτίου το οποίο συνδέεται με 3 οξυγόνα και με την πλευρική ομάδα.

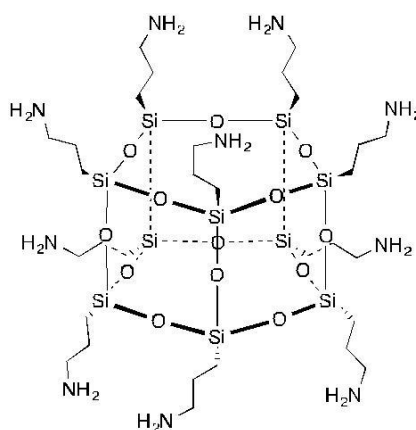
²² Cordes, D. B.; Lickiss, P. D.; Rataboul, F. Recent, Developments in the Chemistry of Cubic Polyhedral Oligosilsesquioxanes, *Chem. Rev*, 2010, 110, σσ. 2081-2173.

²³ Hartmann-Thompson, C., Ed.; Springer: Dordrecht, *Applications of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes*, Heidelberg London New York, 2011.

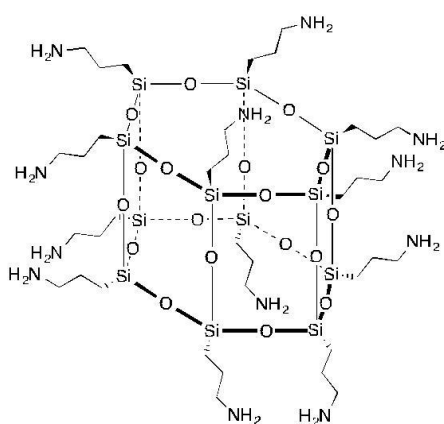
Στην περίπτωση λοιπόν που η πλευρική ομάδα R είναι μια πρωτοταγής αμίνη, οι μορφές Αμινο-POSS (POSS-NH₂) που συναντώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι οι ακόλουθες:



Σχήμα 3: (RSiO_{3/2})₈ ή T₈R₈, όπου R: προπυλαμίνη



Σχήμα 4: (RSiO_{3/2})₁₀ ή T₁₀R₁₀, όπου R: προπυλαμίνη



Σχήμα 5: (RSiO_{3/2})₁₂ ή T₁₂R₁₂, όπου R: προπυλαμίνη

Οι δομές που απεικονίζονται στα σχήματα 1, 2 και 3 προκύπτουν συνήθως με την τεχνική sol-gel, η οποία πραγματοποιείται στα εξής στάδια:



1.4.1 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Τα T_8 φαίνονται να έχουν την ιδανική αναλογία επιφανείας-μεγέθους και μια μεγάλη γκάμα εφαρμογών εξαιτίας της σταθερότητάς τους.²⁴ Κατά την απόκτηση T_{10} και T_{12} , τα κλουβιά είναι κάπως μεγαλύτερα από τα T_8 αλλά συνήθως δεν ξεπερνούν τα 5nm σε διάμετρο. Το μικρό τους μέγεθος και η μεγάλη πυκνότητα φορτίου, αυξάνουν την πιθανότητα αφομοίωσής τους από τα κύτταρα και τους ιστούς αλλά και την απομάκρυνσή τους από το σώμα μέσω των ούρων.²²

Υλικά τα οποία βασίζονται στο πυρίτιο, χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιοϊατρική χάρη στην χημική τους αδράνεια και βιοσυμβατότητα. Τα POSS και τα παράγωγά τους έχει αποδειχθεί ότι αντέχουν σε μεγάλο εύρος θερμικών και χημικών συνθηκών και ως εκ τούτου θα πρέπει να εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα in-vivo.²⁵ Η βιοαποικοδόμηση ταυτόχρονα με τα βελτιωμένα χαρακτηριστικά επιφανείας είναι ορισμένα από τα χαρακτηριστικά που καθιστούν τα POSS νανοσωματίδια ιδανικούς νανοφορείς με μεγάλη ικανότητα διασποράς μέσα στα βιολογικά συστήματα. Κατάλληλα τροποποιημένα POSS σωματίδια, είναι ευδιάλυτα στο νερό, γεγονός που υποδεικνύει ότι φάρμακο βασισμένο στα POSS θα μπορούσε να χορηγηθεί από το στόμα.

1.4.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Οι νανοδομές POSS, όπως και η πλειοψηφία των νανοϋλικών, χρησιμοποιούνται σε πλήθος βιοϊατρικών εφαρμογών. Ορισμένες σημαντικές εφαρμογές περιλαμβάνουν επικαλύψεις σε χειρουργικά εργαλεία²⁶, καρδιαγγειακά εμφυτεύματα, βιοαισθητήρες, ικρίωματα ιστικής μηχανικής, οδοντιατρικές εφαρμογές, βιολογικούς αισθητήρες καθώς και συστήματα στοχευμένης αποδέσμευσης φαρμάκων.²⁷

²⁴ M. Pilz, F. Männle, O.W. Gregersen, *International Journal of Adhesion & Adhesives*, 2012, 151, σσ. 10-16

²⁵ Catherine McCusker, Joseph B. Carroll, Vincent M. Rotello, Cationic polyhedral Oligomeric silsesquioxanes (POSS) units as carriers for drug delivery processes. *Chem. Commun.*, 2005, 996-998

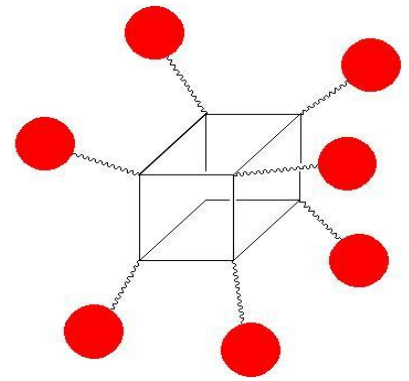
²⁶ A. Duran, A. Conde, A. Gomez Coedo, T. Dorado, C. Garcia, S.Cere, *Journal of Materilas Chemistry*, 2004, 14, 2282

²⁷ Hossein Ghanbari, Brian G. Cousins, Alexander M. Seifalian, A Nanocage for Nanomedicine: Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS), *Macromolecular Rapid Communications*, 2011, 32, 1032-1046

1.5 ΠΟΛΥΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ

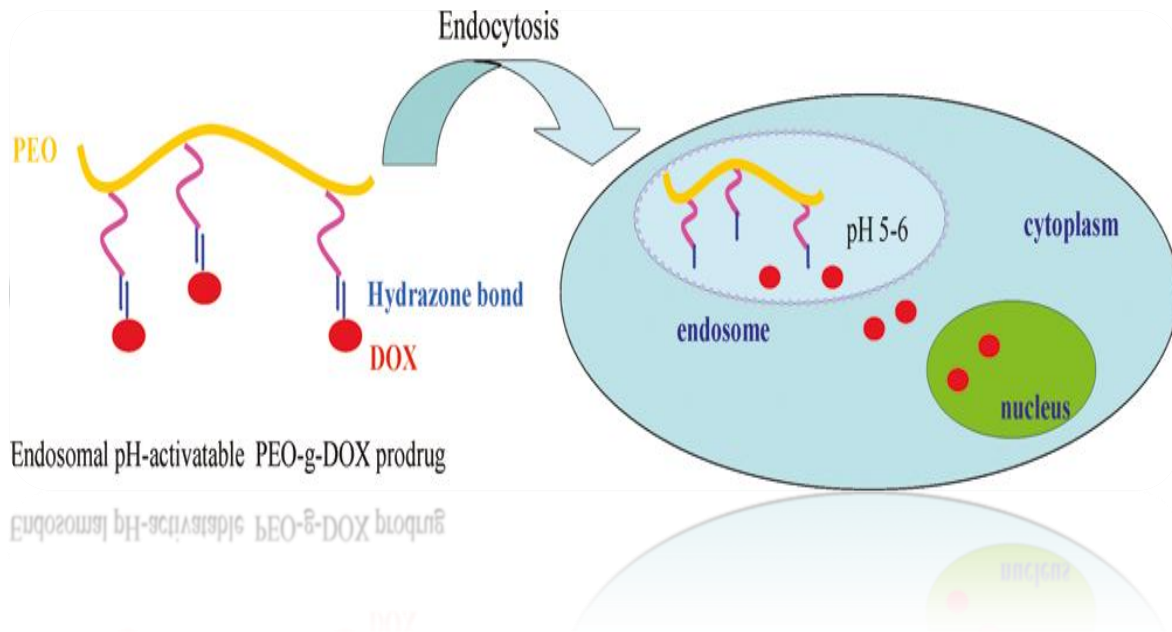
Έχουν αναπτυχθεί πολλές μεθοδολογίες τροποποίησης της επιφανείας με σκοπό να αποδοθεί στους νανομεταφορείς η δυνατότητα να ελέγχουν, έστω και μερικώς, την φαρμακοκινητική καθώς και τη βιο-διανομή τους. Μία από αυτές, είναι η πολυλειτουργικότητα.

Η πολυλειτουργικότητα (multivalency), βασίζεται στη σύνθεση ενός νανοσωματιδίου ικανού να «κουβαλήσει» περισσότερα του ενός ενεργά μόρια και να τα απελευθερώσει αποκλειστικά στα κύτταρα-στόχους.



Εικόνα 6: Δομή πολυλειτουργικότητας

Η δοξορουβικίνη σε συνδυασμό με τα POSS μπορούν να προσφέρουν αυτή τη δυνατότητα για πολυλειτουργικότητα. Η κετόνη που βρίσκεται στην ένωση της δοξορουβικίνης είναι ικανή να συνδεθεί με τα POSS είτε μέσω της δημιουργίας μιας **μίνης** ή μέσω της δημιουργίας **υδραζόνης**.



Εικόνα 7: Μηχανισμός pH-εξαρτώμενος²⁸

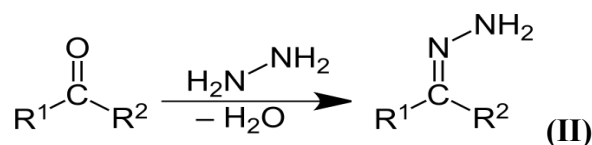
²⁸ Biomacromolecules, 2011, 12, σσ. 1460-1467

Οι **μίνες** ($R_2C=NR$) προκύπτουν από την αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης πρωτοταγών αμινών RNH_2 (ουδέτερα φορτισμένα πυρηνόφιλα) σε αλδεΐδες ή κετόνες όπως φαίνεται στην αντίδραση **(I)**.



Οι μίνες αποτελούν σημαντικά ενδιάμεσα σε πολλές μεταβολικές οδούς αλλά ταυτόχρονα επιδεικνύουν **χαμηλή σταθερότητα** στο νερό.

Η **υδραζόνη** προκύπτει από την αντίδραση κετόνης με υδραζίνη, αντίδραση **(II)**.

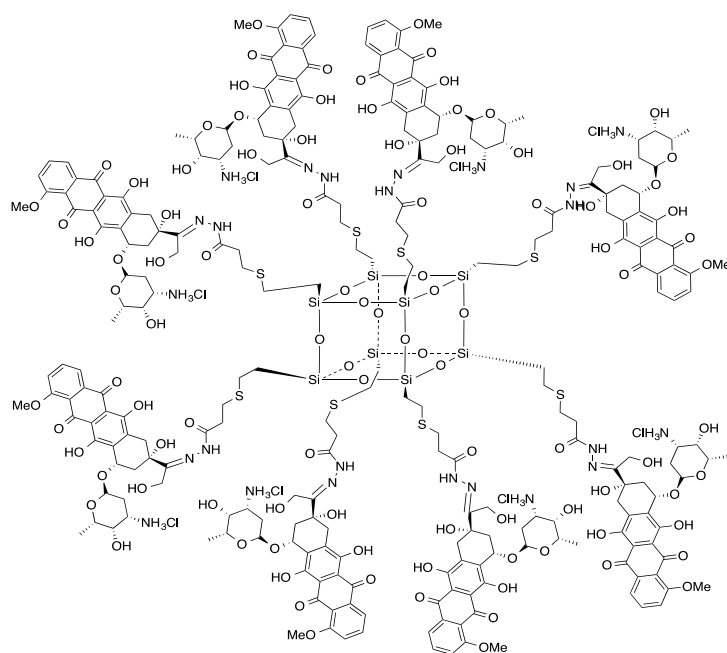


Επιπρόσθετα είναι **σταθερή σε ουδέτερα περιβάλλοντα** και πιο **ευαίσθητη στις μεταβολές του pH**, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για τη μεταφορά και απελευθέρωση του φαρμάκου στο επιθυμητό pH.

Στην προκειμένη περίπτωση, η σύνδεση του DOX με δεσμό υδραζόνης τον καθιστά ευάλωτο σε όξινο περιβάλλον επιτυγχάνοντας στοχευμένη και αποτελεσματική απελευθέρωση του DOX.

Ο δεσμός υδραζόνης έχει αποδειχθεί να είναι σταθερός σε pH ίσο με 7.4 αλλά εύκολα διασπώμενος σε ενδοσωμικό pH.²⁹

Ένας νανομεταφορέας πλήρως τροποποιημένος με DOX και υδραζόνη θα παρουσίαζε τη δομή που φαίνεται στο σχήμα 5.



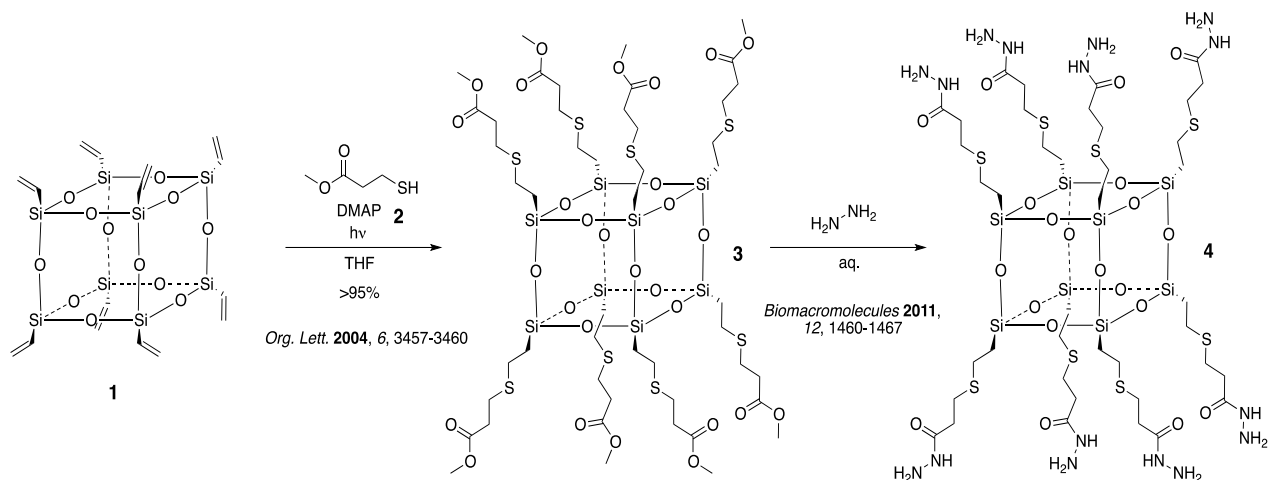
Σχήμα 6 : Δομή DOX-POSS μέσω υδραζόνης

Ο δεσμός μέσω σχηματισμού υδραζόνης, λοιπόν, φαίνεται να αποτελεί την καλύτερη επιλογή σύνδεσης του DOX με τα νανοσωματίδια. Παρόλα αυτά, η σύνθεση και βελτιστοποίηση του POSS-NH₂ και κατά συνέπεια και των ιδιοτήτων του, με σκοπό την περαιτέρω σύνδεσή του μέσω μίνης με το DOX, εξακολουθεί να παρουσιάζει ενδιαφέρον.

²⁹ Biomacromolecules, 2011, 12, σσ. 1460-1467

1.6 1^{ΗΣ} ΓΕΝΙΑΣ ΝΑΝΟΜΕΤΑΦΟΡΕΑΣ – ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΚΕΛΙΩΝ ΜΕ ΥΔΡΑΖΙΝΗ

Η αρχική ιδέα ήταν η ενσωμάτωση του μεθυλικού εστέρα του 3-μερκαπτοπροπιονικού οξέος, **2**, στο βινυλο-POSS **1** μέσω κλικ χημείας υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Το υδραζίδιο **4** προέκυψε ύστερα από αντίδραση υδατικού διαλύματος υδραζίνης με τον μεθυλεστέρα **3**. Η δομή επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).



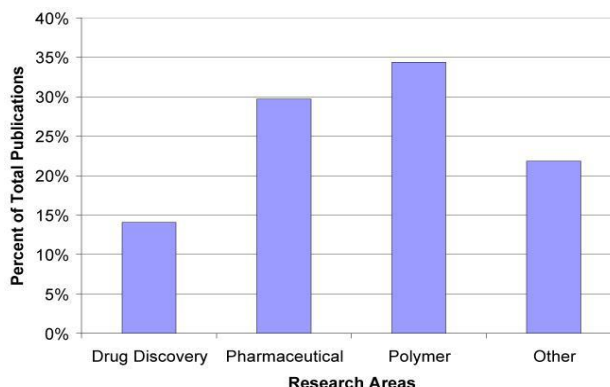
Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης του υδραζιδίου **4**

Το προϊόν **4** ήταν **αδιάλυτο** στο νερό. Συνεπώς η δομή απαιτεί **πιο υδρόφιλα στοιχεία** ώστε να αυξηθεί η διαλυτότητα του υδραζιδίου στο νερό. Πάνω σε αυτόν τον άξονα κινήθηκε η επιλογή των επόμενων μορφών νανομεταφορέων για την τροποποίηση του βινυλο-POSS.

1.7 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

1.7.1 ΚΛΙΚ ΧΗΜΕΙΑ

Ο όρος «κλικ χημεία» (click chemistry) είναι μία σχετικά καινούρια έννοια που εισήγαγε ο Δρ. Barry Sharpless το 1999 στη 217^ο ετήσια συνάντηση του American Chemical Society και άρχισε να γίνεται πιο δημοφιλής κυρίως από το 2004 και ύστερα. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα που ακολουθεί, η κλικ χημεία έχει κερδίσει έδαφος σε διάφορους τομείς και κυρίως στον τομέα των πολυμερών.³⁰



Γράφημα 3: Τομείς εφαρμογών κλικ χημείας.

Ο όρος κλικ, αναφέρεται σε μια ομάδα ισχυρών συνδετικών αντιδράσεων χαρακτηριστικά των οποίων είναι η ταχύτητα, η ευκολία στη χρήση και τον καθαρισμό, η ευελιξία, καθώς και οι υψηλές αποδόσεις. Οι απαιτούμενες συνθήκες περιλαμβάνουν διαθέσιμα αντιδραστήρια, ήπιους διαλύτες (εάν είναι απαραίτητο) που απομακρύνονται εύκολα και απομόνωση απλών και σταθερών προϊόντων που καθαρίζονται με μεθόδους όπως η απόσταξη ή η κρυστάλλωση.

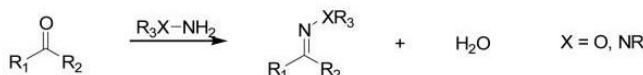
Τέτοιου τύπου αντιδράσεις είναι και οι ακόλουθες:

- κυκλοπροσθήκες ακόρεστων ειδών, ειδικά 1,3-διπολικές κυκλοπροσθήκες, καθώς επίσης και αντιδράσεις Diels-Alder.³¹
- πυρηνόφιλη υποκατάσταση, ιδιαίτερα αντιδράσεις διάνοιξης δακτυλίου ετεροκυκλικών συστημάτων με τάση όπως αζιριδίνες και εποξειδία.²¹
- προσθήκες σε πολλαπλούς δεσμούς άνθρακα- άνθρακα, ειδικά σε οξειδωτικές περιπτώσεις όπως εποξειδωση, αλλά και προσθήκες τύπου Michael.^{21,22}
- σχηματισμό ενώσεων όπως ουρία, θειουρία, αμίδια και υδραζόνες, που περιλαμβάνουν χημεία του καρβονυλίου μη αλδολικού τύπου.³²

Ο τελευταίος τύπος αντιδράσεων είναι αυτός που εφαρμόστηκε.

Non-Aldol Carbonyl Chemistry

Hydrazone/oxime ether formation



Σχήμα 8: Πορεία αντίδρασης μη αλδολικού τύπου προς σχηματισμό υδραζόνης με κλικ χημεία.

³⁰ Christopher D. Hein, Xin-Ming Liu, Dong Wang, Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences, *Pharmaceutical Research*, Οκτώβριος 2008, Vol 25, Issue 10, σσ. 2216-2230

³¹ Kolb HC, Sharpless KB., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today*. 2003, 8, σσ. 1128-1137.

³² Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB., Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem., Int. Ed., Engl.* 2001, 40, σσ. 2004-2021.

1.7.2 ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ

Η τεχνική του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) έχει αναγνωρισθεί ως μία από τις σημαντικότερες φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη λήψη φυσικών, χημικών ηλεκτρονικών και δομικών πληροφοριών των μορίων. Ιδιαίτερα στην Οργανική Χημεία αποτελεί ένα από τα κύρια εργαλεία στην ταυτοποίηση των οργανικών ενώσεων. Οι πληροφορίες που αντλούνται με αυτό το είδος φασματοσκοπίας οφείλονται είτε στη χημική μετατόπιση, το φαινόμενο Zeeman, ή το φαινόμενο της μετατόπισης Knight, είτε ακόμα στο συνδυασμό τους.

Τα ραδιοκύματα και τα στατικά μαγνητικά πεδία διεισδύουν εύκολα σε πολλούς τύπους υλικών. Ιδιαίτερα χρήσιμο είναι και το γεγονός ότι το NMR αποτελεί μία μη καταστρεπτική τεχνική ανάλυσης δειγμάτων.

Πολλά ισότοπα χημικών στοιχείων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανάλυση με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό.³³ Το ^1H , με σπιν $+1/2$, αποτελεί τον πιο συνηθισμένο χρησιμοποιούμενο πυρήνα ιδιαίτερα σε βιολογικά συστήματα. Ο ^{13}C , με σπιν $-1/2$, χρησιμοποιείται ευρέως παρόλο που απαιτεί περισσότερο χρόνο, έχει χαμηλή ευαισθησία και πλατιά χημική μετατόπιση, δίνοντας απότομα σήματα.

Η διαπίστωση για την ύπαρξη ή μη των επιθυμητών δομών γινόταν κατά βάση μέσω ^{29}Si NMR. Σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε και φασματοσκοπία NMR ^1H και ^{13}C τα οποία φάσματα όμως δεν συμπεριλαμβάνονται στην παρούσα εργασία καθώς τα αποτελέσματά τους δεν δίνουν φάσματα που να μπορούμε εύκολα να επεξεργαστούμε.

³³ <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/1d/multi.html>, NMR LAB

1.7.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin-Layer Chromatography), TLC, στην αναλυτική χημεία, αποτελεί μια τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πτητικών μειγμάτων.³⁴ Ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στον ανταγωνισμό της διαλυμένης ουσίας και της κινητής φάσης για σύνδεση σε θέσεις της στατικής φάσης.³⁵ Με δεδομένες λοιπόν δυο ενώσεις με διαφορετική πολικότητα, η πιο πολική ένωση έχει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το οξείδιο του πυριτίου, κατά συνέπεια κατακρατείται ενώ η μη πολική ένωση μετακινείται πιο ψηλά στην πλάκα. Στην οργανική χημεία, η χρωματογραφία αυτού του τύπου προσφέρει μια ποιοτική ανάλυση σε σύντομο χρονικό διάστημα, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη στην παρακολούθηση της εξέλιξης αντιδράσεων, στην ταυτοποίηση προϊόντων καθώς και λειτουργικών ομάδων.³⁶

Οι ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται στην πλάκα με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους και εμφανίζονται διακριτές κηλίδες σε διαφορετικά ύψη.³⁷ Η παρατήρηση των κηλίδων μπορεί να επιτευχθεί είτε με εξέτασή τους στο υπεριώδες φως (254-356nm) είτε μετά από εμβάπτιση ή ψεκασμό της πλάκας με ειδικά αντιδραστήρια.^{38,39,40} Ανάλογα λοιπόν με το χρώμα των κηλίδων στο ορατό, την απορρόφηση στο υπεριώδες και το αντιδραστήριο, μπορούν να εξαχθούν διαφορετικά αποτελέσματα για την κατηγορία των παρατηρούμενων ουσιών.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αποτελεί ένα βασικό αναλυτικό εργαλείο στα εργαστήρια τροφίμων και φαρμάκων και είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στο διαχωρισμό συστατικών φυσικών ουσιών, κυρίως εκείνων που βρίσκονται στους φυτικούς και στους ζωικούς ιστούς.⁴¹

³⁴ **Harry W. Lewis, Christopher J. Moody**, *Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice*, WileyBlackwell, Illustrated έκδοση, σσ. 159-173.

³⁵ **Reich, E., Schibli A.**, *High performance thin-layer chromatography for the analysis of medical plants*, Illustrated έκδοση, New York: Thieme.

³⁶ Thin Layer Chromatography (TLC): Principle with animation

³⁷ **A.I. Vogel, A.R. Tatchell, B.S. Furnis, A.J. Hannaford, P.W.G. Smith**, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5^η έκδοση.

³⁸ Thin Layer Chromatography stains, http://www.reachdevices.com/TLC_stains.html

³⁹ **Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H.**, 1990.

⁴⁰ **Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H.**, 1994.

⁴¹ **Reich, E., Schibli A.**, *High performance thin-layer chromatography for the analysis of medical plants*, Illustrated έκδοση, New York: Thieme.

1.7.4 ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ (DLS)

Η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ένα διάλυμα πολυμερούς τα μόριά του βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση, λόγω της θερμικής ενέργειας που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω των συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown). Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα, συνδέεται κατά συνέπεια ποσοτικά με την κίνηση των μορίων. Η σκέδαση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας από ένα διάλυμα πολυμερούς, οφείλεται κυρίως σε διακυμάνσεις της συγκέντρωσης, οι οποίες συνδέονται και αυτές με την κίνηση Brown. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας λοιπόν, μεταβάλλεται συναρτήσει του χρόνου.^{42, 43, 44}

Με την τεχνική αυτή λοιπόν, είναι δυνατόν να καθοριστεί ο υδροδυναμικός όγκος σωματιδίων, με βάση τις τυχαίες μεταβολές της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε ένα εναιώρημα ή διάλυμα.

⁴² Berne, B.J.; Pecora, R. Dynamic Light Scattering, Wiley-Interscience 1976, New York

⁴³ Chu, B. Laser Light Scattering, Academic Press 1974, New York

⁴⁴ Χατζηχρηστίδης, Ν.; Βύρας, Κ.; Ιατρού, Ε.; Πίτσας, Σ.; Πιτσικάλης, Μ.; Πίσσης, Π. Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών “Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της”, 1998, Αθήνα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

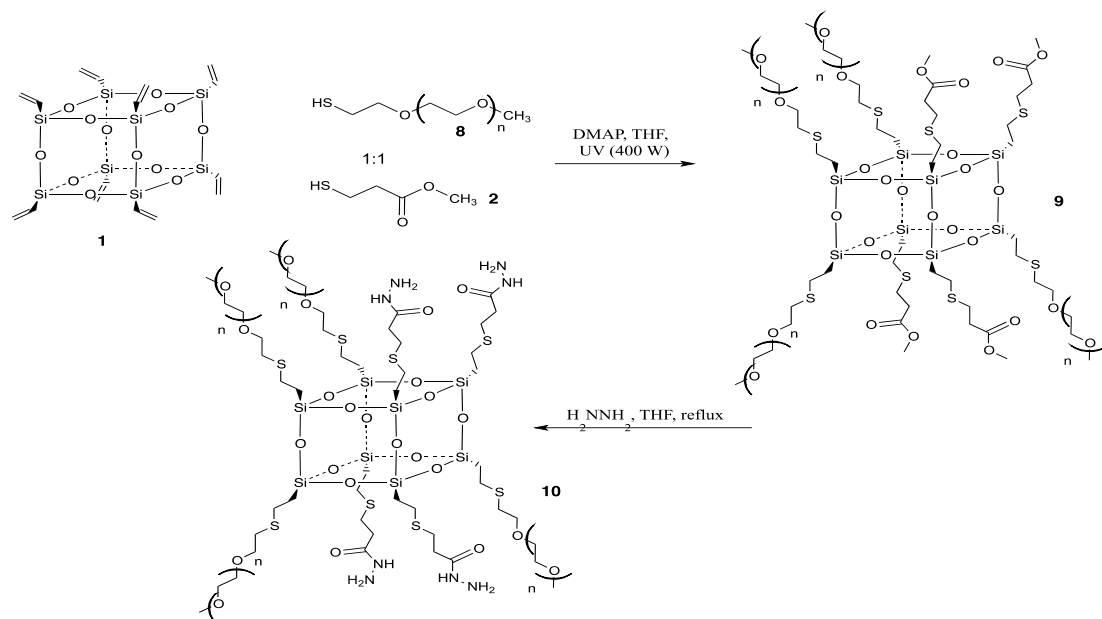
2.1 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΚΕΛΙΩΝ ΜΕ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΟΓΛΥΚΟΛΗ

Η σύζευξη βιοσυμβατών πολυμερών όπως είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) σε θεραπευτικές πρωτεΐνες και πεπτίδια, έχει αποδειχθεί ως μία πολύ αποτελεσματική στρατηγική στη μείωση της ανοσογονικότητας και στην αύξηση της βιοσυμβατότητας.^{45,46} Το PEG έχει χρησιμοποιηθεί ως φορέας χημειοθεραπευτικών παραγόντων.⁴⁷

2.1.1 ΣΥΝΘΕΣΗ

Το βινυλο-POSS (μέσο MB 791.3g/mol) αντέδρασε με 0.5 ισοδύναμα μεθυλικό εστέρα του 3-μερκαπτοπροπionικού οξέος (methyl 3-mercaptopropionate) **2** και 0.5 ισοδύναμα της O-(2-μερκαπτοαιθυλ)-O'-μεθυλ-πολύ(αιθυλενογλυκόλη) (poly(ethylene glycol) methyl ether thiol, mPEG thiol) **8** (μέσο MB ίσο με 800g/mol). Τα ισοδύναμα αναφέρονται ως προς τις ομάδες βινυλίου στο βινυλο-POSS. Οι ομάδες εστέρα αντέδρασαν περαιτέρω με υδραζίνη ώστε να δώσουν το προϊόν POSS-PEG(50)-υδραζίδιο(50) **10**. Το προϊόν αναμενόταν να έχει αναλογία 1:1 μεταξύ του mPEG thiol και των ομάδων υδραζιδίων. Ο καθαρισμός επιτεύχθηκε διαμέσου μεμβρανών σε απιονισμένο νερό, την οποία ακολούθησε λυοφιλίωση.

Μετά την απομάκρυνση του νερού, το προϊόν ήταν ένα κίτρινο ανοιχτό στερεό POSS-PEG(50)-υδραζίδιο(50) **10** το οποίο ήταν αδιάλυτο στο νερό και σταθερό σε θρεπτικό μέσο.



Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης του υδραζιδίου **10**

⁴⁵ **Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM.**, Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54, σσ. 459–76.

⁴⁶ **Veronese FM, Harris JM.**, Peptide and protein PEGylation III: advances in chemistry and clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, 60:1–2.

⁴⁷ **Greenwald RB, Choe YH, McGuire J, Conover CD.**, Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55:217–50.

Η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε άλλη μία φορά με διαφορετική στοιχειομετρία με σκοπό τη βελτίωση της διαλυτότητας του τελικού προϊόντος **10'**. Βινυλο-POSS (μέσο MB 791.3 g/mol) αντέδρασε με 0.25eq μεθυλικό εστέρα του 3-μερκαπτοπροπιονικού οξέος **2** και 0.75eq mPEG thiol **8**. Οι εστερομάδες αντέδρασαν εν συνεχεία με υδραζίνη ώστε να προκύψει POSS-PEG(75)-υδραζίδιο(25) **10'**. Η αναμενόμενη αναλογία μεταξύ PEG και υδραζιδίου ήταν 3:1. Ο καθαρισμός επιτεύχθηκε με καθαρισμό διαμέσου μεμβρανών σε απιονισμένο νερό, την οποία ακολούθησε λυοφιλίωση.



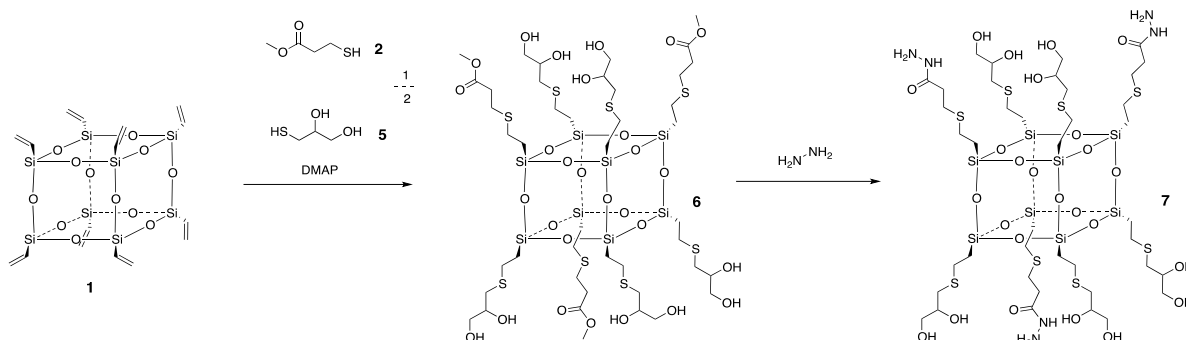
Εικόνα 8: Διαδικασία καθαρισμού διαμέσου μεμβρανών

Το POSS-PEG(75)-υδραζίδιο(25) **10'** ήταν ένα καφέ-κίτρινο στερεό φαινομενικά εξίσου αδιάλυτο στο νερό και σταθερό σε θρεπτικό μέσο.

Και στα δύο προϊόντα (**10** και **10'**) έγιναν μετρήσεις μεγέθους των σωματιδίων και τοξικότητας.

2.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΚΕΛΙΩΝ ΜΕ ΔΙΟΛΗ

Η υδρόφιλη διόλη **5** εισήχθη με κλικ χημεία ταυτόχρονα με τον μεθυλεστέρα **2**, με αναλογία **2/5** ίση με 7/3. Ακολούθησε η σύνθεση του υδραζιδίου το οποίο και καθαρίστηκε από τυχόν άλλες προσμίξεις με καθαρισμό διαμέσου μεμβρανών και παρατηρήθηκε να έχει καλή διαλυτότητα πριν τον καθαρισμό αλλά αρκετά χειρότερη ύστερα από αυτόν. Στη συνέχεια μετρήθηκε το μέγεθος των σωματιδίων καθώς και η τοξικότητα της ένωσης **7** με σκοπό την ενσωμάτωση του DOX αλλά η τάση της ουσίας να δημιουργεί συσσωματώματα, αποτέλεσε καθοριστικό πρόβλημα.



Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση υδραζιδίου **7**

2.2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ

Βινυλο-POSS **1** (522.26mg, 0.66mmol, 1equiv.), μεθυλικός εστέρας του 3-μερκαπτοπροπιονικού οξέος **2** (237.9mg, 1.98mmol, 3equiv.), 1-θειογλυκερόλη **5** (1-Thioglycerol, 500mg, 4.62mmol, 7equiv.) και DMAP (3.96mg, 0.033mmol, 0.05eq) τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο Petri με 80mL of THF. Η αντίδραση έλαβε χώρα υπό UV ακτινοβολία 50 φορές, 99 δευτερόλεπτα η καθεμία. Κατά τη διάρκεια, προστίθεντο THF όποτε χρειαζόταν επιπλέον διαλύτης, όπως επίσης κρίθηκε απαραίτητη και η συμπλήρωση με μεθυλικό εστέρα **2** (47.6mg, 0.39mmol, 0.6equiv.) και 1-θειογλυκερόλη **5** (111mg, 0.93mmol, 1.4equiv.). Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώθηκε με TLC, ο διαλύτης απομακρύνθηκε με περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) και αντλία ελαίου (oil pump) δίνοντας το προϊόν **6**. Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω καθαρισμός πριν το επόμενο βήμα. Η δομή ταυτοποιήθηκε με NMR. Στο τελευταίο βήμα της σύνθεσης, το **6** αντέδρασε με περίσσεια υδραζίνης (22.11g Διάλυμα NH_2NH_2 , 35%) και 20ml THF με σκοπό την απόκτηση των υδραζιδίων στα άκρα. Το μίγμα αντέδρασε με αναρροή για 19 ώρες στη θερμοκρασία των 70 °C. Ύστερα ο διαλύτης απομακρύνθηκε με περιστροφικό εξατμιστήρα και κρυοξηραντήρα, δίνοντας έτσι ένα λευκό παχύρρευστο διάλυμα **7**. Το προϊόν, ύστερα και από υδατόλουτρο με υπερήχους (15min), επιδείκνυε καλή διαλυτότητα στο νερό. Η ταυτοποίηση της δομής επιβεβαιώθηκε με NMR και ακολούθησε η παρατήρηση της σταθερότητας σε θρεπτικά μέσα. Στη συνέχεια το POSS-Thio(70)-υδραζίδιο(30) **7** διαλυτοποιήθηκε σε απιονισμένο νερό, εφόσον είχε προηγηθεί υδατόλουτρο με υπερήχους (30min) και καθαρίστηκε διαμέσου μεμβρανών. Μετά από 24 ώρες ο καθαρισμός ολοκληρώθηκε και ακολούθησε λυοφιλίωση. Στο προϊόν **7** πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του μεγέθους των σωματιδίων με DLS καθώς και δοκιμές κυτταροτοξικότητας.

2.3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΚΕΛΙΩΝ ΜΕ ΑΜΦΙΤΕΡΙΟΝ

Έχοντας λοιπόν ως κύριο εμπόδιο τη μειωμένη διαλυτότητα των προηγούμενων προϊόντων, σκοπός ήταν η σύζευξη μιας ένωσης με ακόμα πιο υδρόφιλη συμπεριφορά από τις προηγούμενες. Για το λόγο αυτό έγινε η επιλογή μια αμφιτεριονικής ένωσης, η οποία είναι ένα «ερμαφρόδιτο» ουδέτερο μόριο το οποίο κατέχει τόσο θετικό όσο και αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο. Η ιδιότητά τους αυτή είναι που τα καθιστά ιδιαίτερος ευδιάλυτα στο νερό καθώς και σε άλλους οργανικούς διαλύτες.

2.3.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΜΦΙΤΕΡΙΟΝΤΟΣ

Η διμεθυλαμίνη **14** (45.08mg, 52mL, 1M) με THF προστέθηκε σε 11-βρωμο-ενδεκ-1-ένιο **15** (233.18mg, 10.4mL) σε στεγνή τρίλαιμη σφαιρική φιάλη και το αντιδρών μίγμα αναδεύονταν για 120 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αδρανή ατμόσφαιρα (N₂). Η ολοκλήρωση της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώθηκε με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα και η οξύτητα απομακρύνθηκε προσθέτοντας καυστικό νάτριο (NaOH, 8.05g σε 200mL H₂O, 1M). Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του μίγματος 2 φορές με Διχλωρομεθάνιο (200mL κάθε φορά) και η ξήρασή του χρησιμοποιώντας Άνδρο Θεϊκό Νάτριο. Το δείγμα στη συνέχεια διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό με περιστροφικό εξατμιστήρα και αντλία ελαίου ώστε να δώσει ένα άχρωμο έλαιο, το **16** με χημικό τύπο C₁₃H₂₇N.

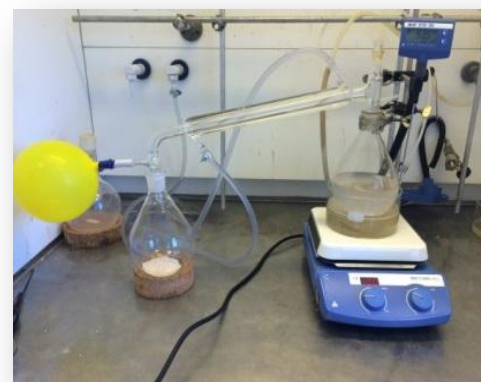
Κατά το 2^ο βήμα, το έλαιο **16** προστέθηκε σε διάλυμα 1,3-προπανοσουλτόνης **17** (122.14, 1.392g, 11.4mmol) σε άνυδρη ακετόνη (75mL).

Η άνυδρη ακετόνη προέκυψε ύστερα από χρήση ζεολίθων ή αλλιώς μοριακών κόσκινων μεγέθους 4Å. Τα μοριακά κόσκινα ξηράθηκαν με υψηλή θερμοκρασία και κενό και ακολούθησε η απόσταξη της ακετόνης όπως φαίνεται στη φωτογραφία.

Το αντιδρών μίγμα αναδεύονταν για 43ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και το προκύπτον στερεό εκπλύθηκε με ακετόνη (2 φορές). Συνεπώς, η ένωση **16** άνοιξε το δακτύλιο της κυκλικής σουλφόνης **17** δίνοντας έτσι την ένωση **18**, με χημικό τύπο C₁₆H₃₃NO₃S, η οποία, εφόσον προηγήθηκε ξήραση με αντλία ελαίου, ήταν ένα λευκό στερεό.

Επιπρόσθετα υπολογίστηκε η απόδοση της αντίδρασης να είναι στο 74%.

Κατά το 3^ο βήμα, η ένωση **18** ύστερα από κλικ χημεία με θειοξικό οξύ (thioacetic acid) **19**, σχημάτισε το θειοεστέρα **20**,



Εικόνα 9: Απόσταξη ακετόνης

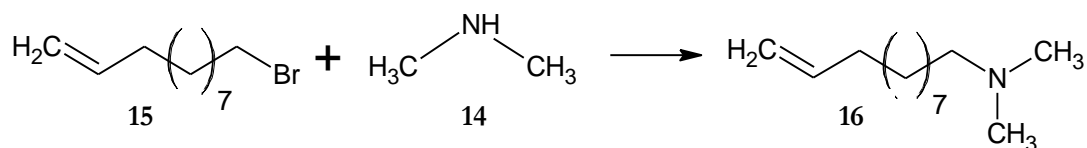


Εικόνα 10: Ένωση **18**

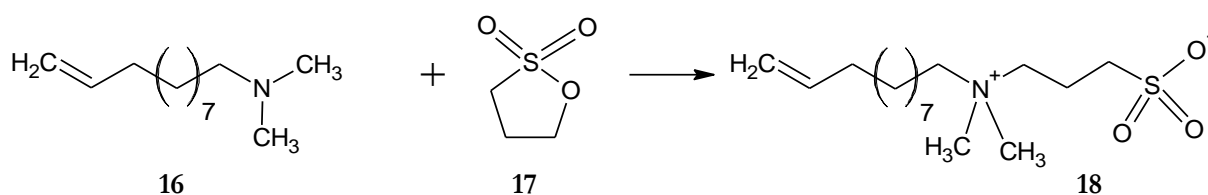
$C_{18}H_{37}NO_4S_2$. Κατά το 4^ο και τελευταίο βήμα, η σαπωνοποίηση του **20** έδωσε το **11**. Αναλυτικότερα, 1g από την ένωση **20** προστέθηκε σε 10mL απιονισμένου νερού και το διάλυμα απαερώθηκε με προσθήκη αδρανούς αερίου (bubbled through N_2) ενώ ταυτόχρονα αναδευόταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10min. Επίσης, 5mL NaOH 1M (0.23g NaOH σε 5mL H_2O) προστέθηκαν στο αντιδρών μίγμα, το οποίο και συνέχισε την ανάδευση για 2 ακόμα ώρες οπότε και οξυνίστηκε με 0.5mL HCl 12M. Τέλος, ακολούθησε διήθηση και λυοφιλίωση του δείγματος μέχρι την επόμενη μέρα οπότε και αποκτήθηκε το επιθυμητό αμφιτεριονικό προϊόν **11**, του οποίου ο χημικός τύπος ήταν $C_{16}H_{35}NO_3S_2$.

Σε κάθε βήμα η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος γινόταν με χρήση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.

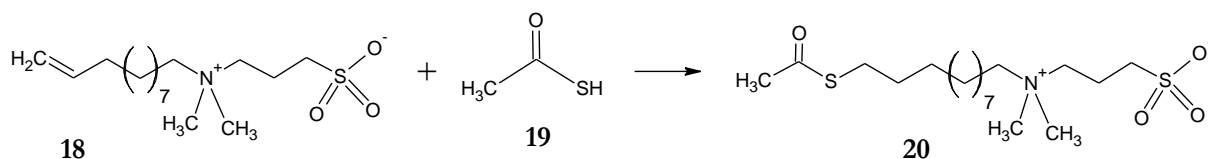
Βήμα 1:



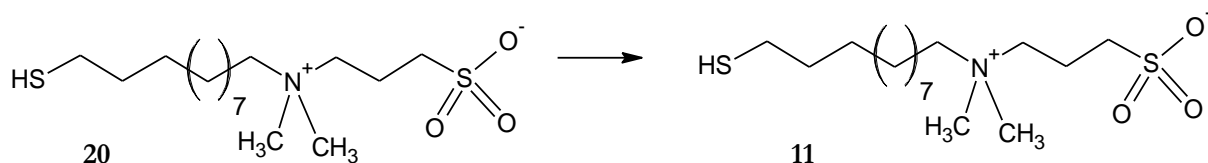
Βήμα 2:



Βήμα 3:

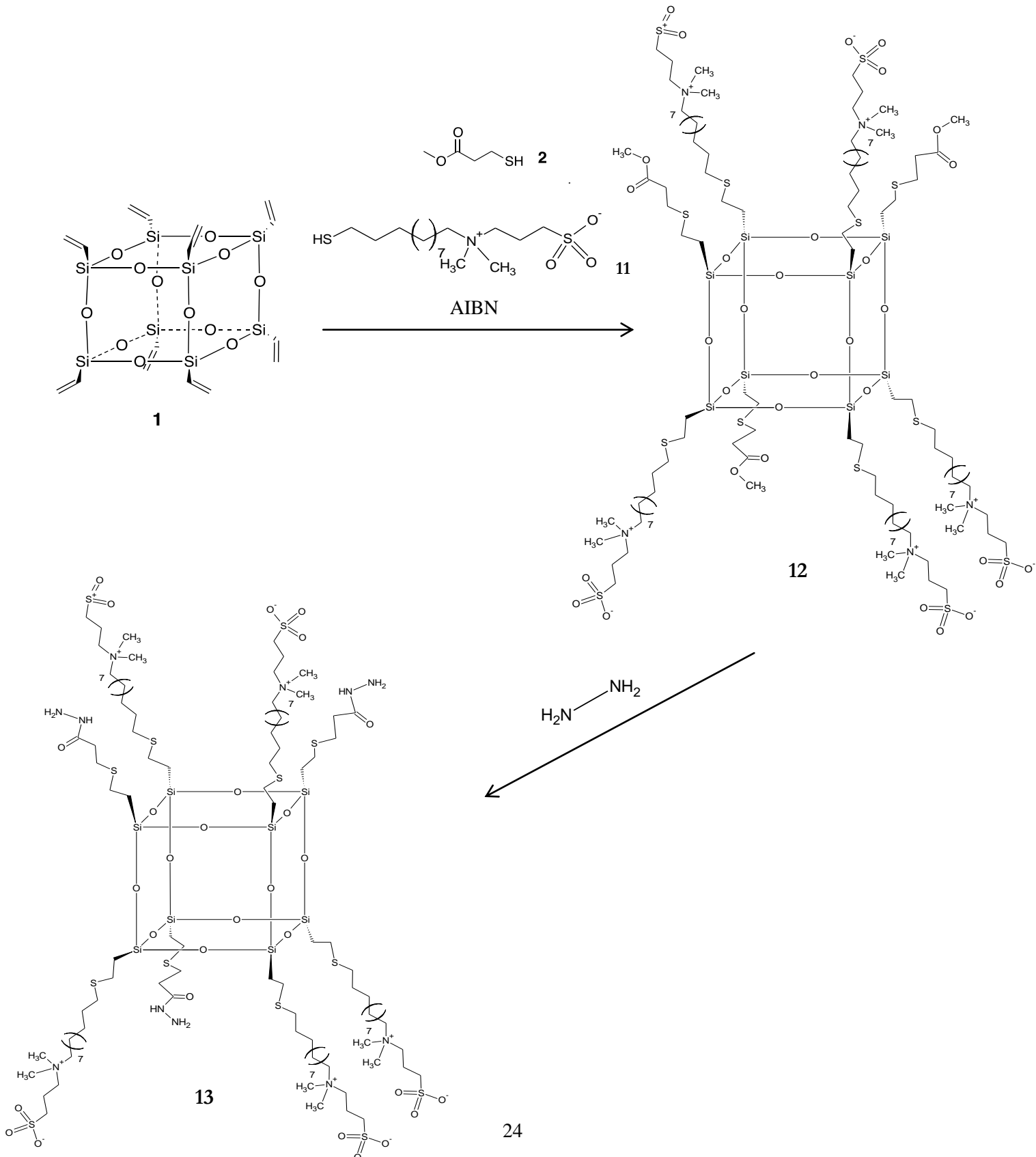


Βήμα 4:



2.3.2 ΣΥΝΘΕΣΗ

Σκοπός της σύνθεσης ήταν η εισαγωγή σε βινυλο-POSS του υδρόφιλου αμφιτεριόντος **11** με κλικ χημεία ταυτόχρονα με το μεθυλεστέρα **2** με αναλογία **11/2** ίση με 3/7. Το τελικό προϊόν **13** θα προκύψει ύστερα από υποκατάσταση του μεθοξυεστέρα από υδραζίνη.



Πιο αναλυτικά, το υδρόφιλο αμφιτεριόν **11**(671.4mg, 1.899mmol, 3eq) καθώς και ο μεθυλικός εστέρας του 3-μερκαπτοπροπιονικού οξέος **2** με αναλογία **11/2** ίση με 3/7, αντέδρασαν με κλικ χημεία μαζί με βινυλο-POSS **1**(501.1, 0.633mmol, 1eq). Τα παραπάνω εισήχθησαν σε τρυβλίο Πετρί μαζί με THF(50ml), 2,2'-Αζω-δισ-ισοβουτυρο-νιτρίλιο (AIBN, 0.0105mg, 0.063mmol, 0.1eq) που χρησιμοποιήθηκε ως εκκινητής. Το μίγμα φαινόταν να μην είναι διαλυτό σε THF οπότε προστέθηκε απιονισμένο νερό(10ml). Νερό και THF προστίθεντο και κατά την εξέλιξη της αντίδρασης όποτε αυτό κρινόταν απαραίτητο. Η πορεία της αντίδρασης επιβεβαιωνόταν με TLC. Κατά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, οι διαλύτες απομακρύνθηκαν από το μίγμα με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα και κρυοξηραντήρα, δίνοντας έτσι το προϊόν **12**. Για τη δημιουργία των τερματικών υποκαταστατών με υδραζίδιο, περίσσεια υδραζίνης καθώς και THF αντέδρασαν με το **12** και πιο συγκεκριμένα με το μεθοξυεστέρα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επαναρροή για 20h στους 70°C. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε με περιστροφικό εξατμιστήρα και λυοφιλίωση δίνοντας έτσι το **13** το οποίο καθαρίστηκε διαμέσου μεμβρανών.

2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΟΜΗΣ ΚΕΛΙΟΥ POSS-NH₂

Η σύνθεση που χρησιμοποιούνταν ως τώρα για την απόκτηση του POSS-NH₂, περιελάμβανε την ανάμιξη 3-αμινοπροπυλ(τριμεθοξυ)σιλάνη ((3-Aminopropyl)triethoxysilane, APS) και υδροχλωρικού οξέος (HCl) παρουσία μεθανόλης. Με αυτό το πρωτόκολλο, επιτυγχανόταν η σύνθεση T₈ κλουβιών αλλά η σύνθεση διαρκούσε από μέρες έως και βδομάδες και η απόδοση έφτανε μόλις το 30%.^{48,49} Επιπλέον, το προϊόν που προέκυπτε με αυτή τη συνθετική πορεία ήταν πρωτονιομένο, άρα ήταν απαραίτητη και η εξουδετέρωσή του πριν τη χρήση. Για τους παραπάνω λόγους λοιπόν και για τον περιορισμό των ανοικτών δομών, ακολουθήθηκε ένα άλλο πρωτόκολλο, το οποίο έχει αναπτυχθεί από τη SINTEF το οποίο είναι αφενός γρηγορότερο και αφετέρου εφαρμόσιμο και σε μεγαλύτερης κλίμακας σύνθεση.

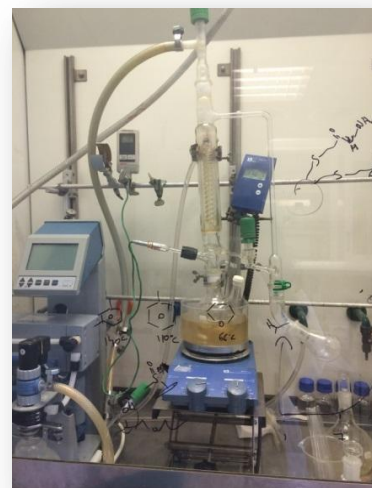
Οι πρώτες ύλες θα πρέπει να αντιδρούν εύκολα με άλλες οργανικές λειτουργικές ομάδες ώστε να είναι εύκολη η τροποποίησή τους. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το POSS-NH₂, λόγω της ικανότητας των ομάδων της αμίνης να τροποποιηθούν με άλλες λειτουργικές ομάδες, όπως για παράδειγμα οι κετόνη που βρίσκεται στο μόριο του DOX.⁵⁰

2.4.1 ΣΥΝΘΕΣΗ

Η σύνθεση του POSS-NH₂ πραγματοποιούνταν σε δίλαμη σφαιρική φιάλη 250mL στην οποία είχε τοποθετηθεί μαγνήτης ανάδευσης. Ο αντιδραστήρας τοποθετούνταν σε λουτρό διοξειδίου του πυριτίου το οποίο με τη σειρά του ήταν τοποθετημένο πάνω σε μαγνητικό αναδευτή και θερμαντήρα. Παράλληλα συνδεόταν με αντλία κενού για να ακολουθήσει απόσταξη. Η διάταξη ήταν όπως φαίνεται και στην εικόνα 11 και οι παράμετροι των οποίων η επίδραση εξετάστηκε ήταν οι ακόλουθοι:

- i. η ποσότητα του νερού
- ii. η συγκέντρωση
- iii. ο τρόπος προσθήκης νερού
- iv. η θερμοκρασία
- v. ο χρόνος αντίδρασης
- vi. ο τύπος του διαλύτη
- vii. η εναλλαγή των παραπάνω παραμέτρων εφόσον είχε επιλεγεί ο κατάλληλος διαλύτης

Μια πιλοτική αντίδραση έλαβε χώρα και στον αντιδραστήρα των 3L έτσι ώστε να γίνει η σύγκριση του αν τα αποτελέσματα της μικρής κλίμακας ανταποκρίνονται και σε μεγαλύτερη.



Εικόνα 11: Πειραματική διάταξη βελτιστοποίησης.

⁴⁸ F.J. Feher, K.D. Wyndham, D. Soulivong, F. Nguyen, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1999, σσ. 1491-1497

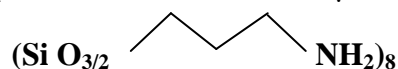
⁴⁹ K. Tanaka, K. Inafuku, K. Naka, Y. Chujo, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2008, Vol. 6, 21, σσ. 3899-3901

⁵⁰ Sumistha Das, Shouvik Mitra, S.M. Paul Khurana, Nitai Debnath, *Nanomaterials for biomedical applications, Frontiers in Life Science*, 2013, 7, 90-98

2.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΑΜΙΝΟΜΑΛΩΝ

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός του αριθμού των αμινών. Ο αριθμός αυτός μπορεί να προσδιοριστεί κάνοντας τιτλοδότηση στο εξεταζόμενο διάλυμα χρησιμοποιώντας διάλυμα HCl κανονικότητας 1N.

Στις καθαρές ουσίες, ο αριθμός των αμινών μπορεί να προσδιοριστεί υπολογίζοντας τα μοριακά βάρη του καθαρού συστατικού και του KOH. Παρόλο που δεν είναι γνωστή η ακριβής αναλογία ανάμεσα στα T₈, T₁₀ και T₁₂ που περιέχονται στο προϊόν, θεωρείται το μοριακό βάρος ως αυτό από τη δομή T₈ το οποίο και είναι ίσο με 110,18692g/mol.



Στην περίπτωση αυτή 1g δείγματος εξουδετερώνεται από KOH και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε mgKOH/g. Στις μετρήσεις αυτές υπολογίζεται ο αριθμός των αμινών του δείγματος καθώς και ο μέσος ως 100%. Αυτές οι δύο τιμές στη συνέχεια συγκρίνονται με τη θεωρητική τιμή και προκύπτουν τα αντίστοιχα συμπεράσματα ανάλογα με το πόσο κοντά βρίσκονται οι τιμές με τις αντίστοιχες της θεωρίας.

$$\text{Θεωρητικός αριθμός αμινών (mgKOH/g)} = \frac{1000 \cdot M}{M_w}$$

$$\text{Μέσος αριθμός αμινών ως 100\% (mgKOH/g)} = \frac{A \cdot N \cdot M}{g \cdot S}$$

$$\text{Αριθμός αμινών στο διάλυμα (mgKOH/g)} = \frac{A \cdot N \cdot M}{g}$$

Όπου, M: μοριακό βάρος του KOH (56,1g/mol)

M_w: μοριακό βάρος του υλικού (~110g/mol)

A: mL του τιτλοδότη HClO₄ που καταναλώθηκαν

N: κανονικότητα του HClO₄

g: μάζα δείγματος (g)

S: περιεκτικότητα σε στερεό



Εικόνα 12: Τιτλοδότης για τον προσδιορισμό του αριθμού αμινών.

Από τα παραπάνω, ο θεωρητικός αριθμός αμινών προκύπτει **510mg KOH/g**.

2.4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΣΟΔΥΝΑΜΟΥ ΒΑΡΟΥΣ

Για να υπολογίσουμε την περιεκτικότητα σε στερεό έγιναν μετρήσεις της περιεκτικότητας των εξεταζόμενων δειγμάτων σε στερεό (Solid content measurements).



Εικόνα 13: Μηχάνημα μέτρησης της περιεκτικότητας σε στερεό.

Το **ισοδύναμο βάρος** αντιστοιχεί στο βάρος του δείγματος το οποίο περιέχει 1mol αμινομάδας και εκφράζεται σε g/mol. Η τιμή αυτή υπολογίζεται από τον αριθμό των αμινών μέσω της παρακάτω σχέσης:

Θεωρητικό ισοδύναμο βάρος = $\frac{1000 * M}{\text{Theoretical amine number}}$ και υπολογίζεται ίσο με **110g/mol**.

Ο υπολογισμός των παραπάνω τιμών πραγματοποιήθηκε διαλύοντας περίπου 0,3g δείγματος σε 50mL Παγόμορφου Οξικού οξέος. Στη συνέχεια ακολουθούσε η τιτλοδότηση του διαλύματος με Υπερχλωρικό οξύ (0,1M σε GAA), τρεις φορές σε κάθε δείγμα έτσι ώστε να υπολογίζεται ένας μέσος όρος και το αποτέλεσμα να είναι πιο ασφαλές.⁵¹

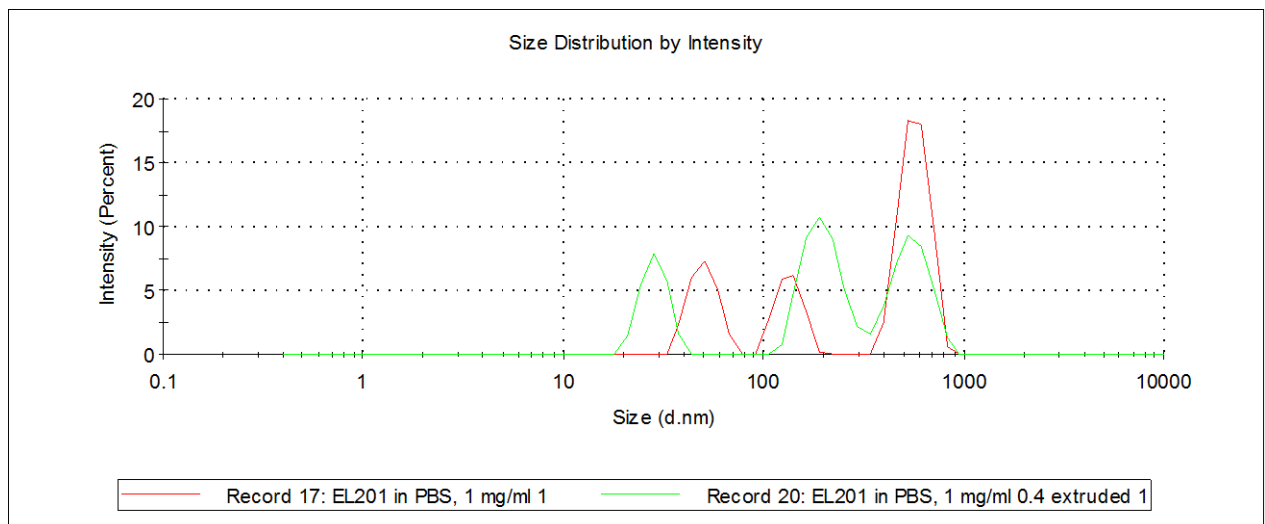
⁵¹ European standard: amine epoxide hardeners, determination of primary, secondary and tertiary amine group nitrogen content (EN ISO 9702), 1998.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

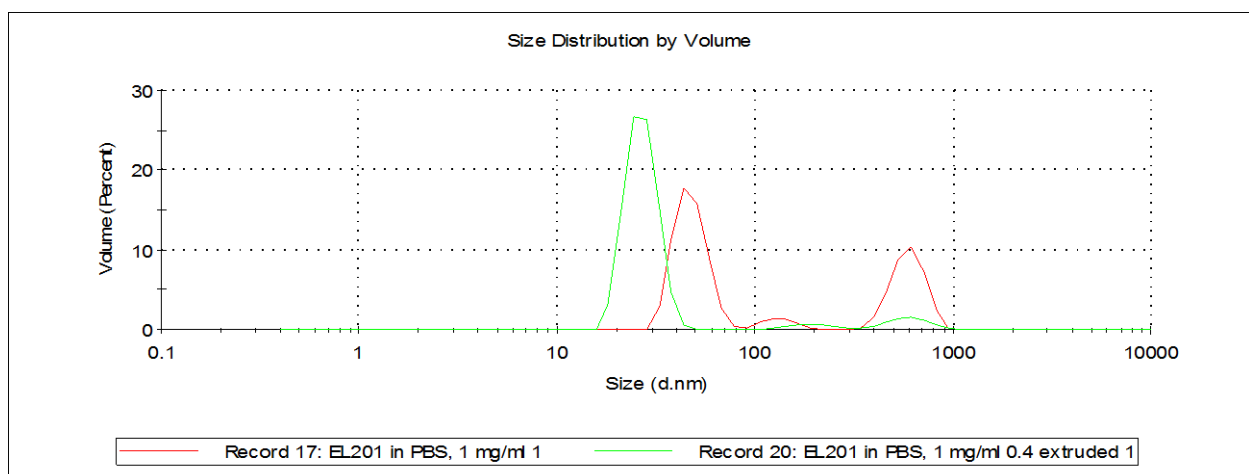
3.1 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΚΕΛΙΩΝ ΜΕ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΟΓΛΥΚΟΛΗ

3.1.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΚΕΛΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ

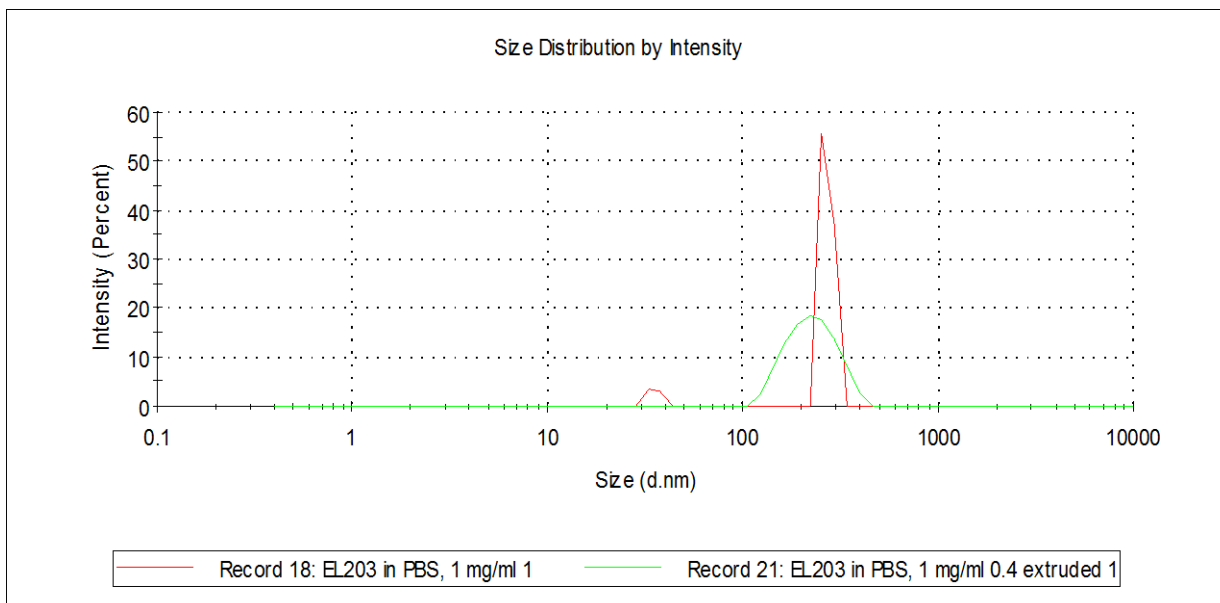
Ο υδροδυναμικός όγκος των σωματιδίων POSS-PEG(50)-υδραζίδιο(50) και POSS-PEG(75)-υδραζίδιο(25) μελετήθηκε με DLS. Τα μεγέθη των σωματιδίων που φαίνονται να βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε ρυθμιστικό διάλυμα με PBS ήταν 50nm και 240nm για τα **10** και **10'** αντίστοιχα. Μετά την εκβολή, τα μεγέθη άλλαξαν σε 28 και 240nm όπως φαίνεται και στα γραφήματα που ακολουθούν.



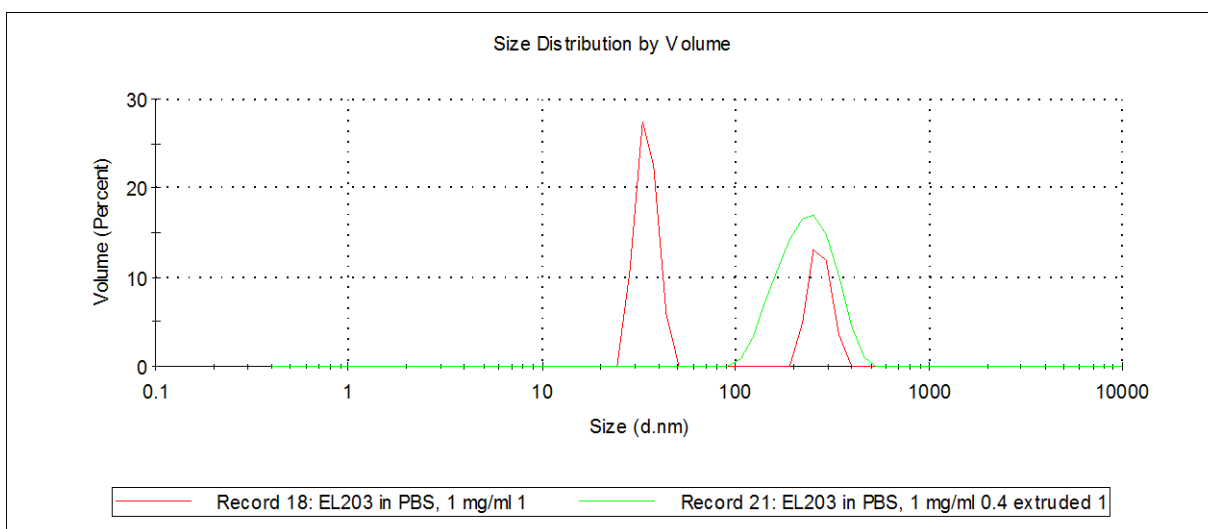
Γράφημα 4: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων **10** κατά ένταση σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή



Γράφημα 5: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων **10** κατ' όγκο σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή



Γράφημα 6: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων 10⁷ κατά ένταση σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή

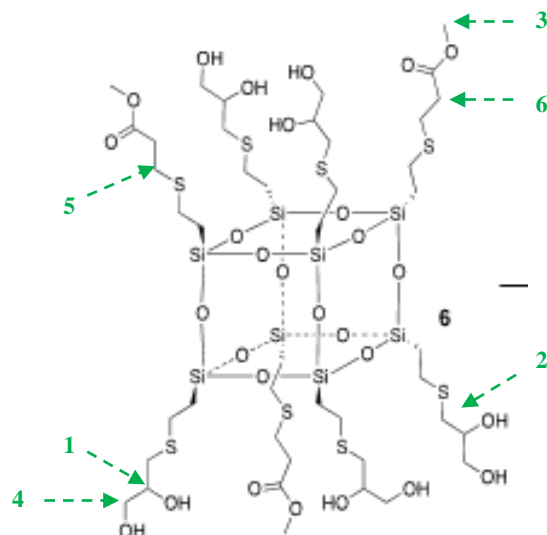


Γράφημα 7: : Κατανομή μεγέθους σωματιδίων 10⁷ κατ' όγκο σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή

3.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΚΕΛΙΩΝ ΜΕ ΔΙΟΛΗ

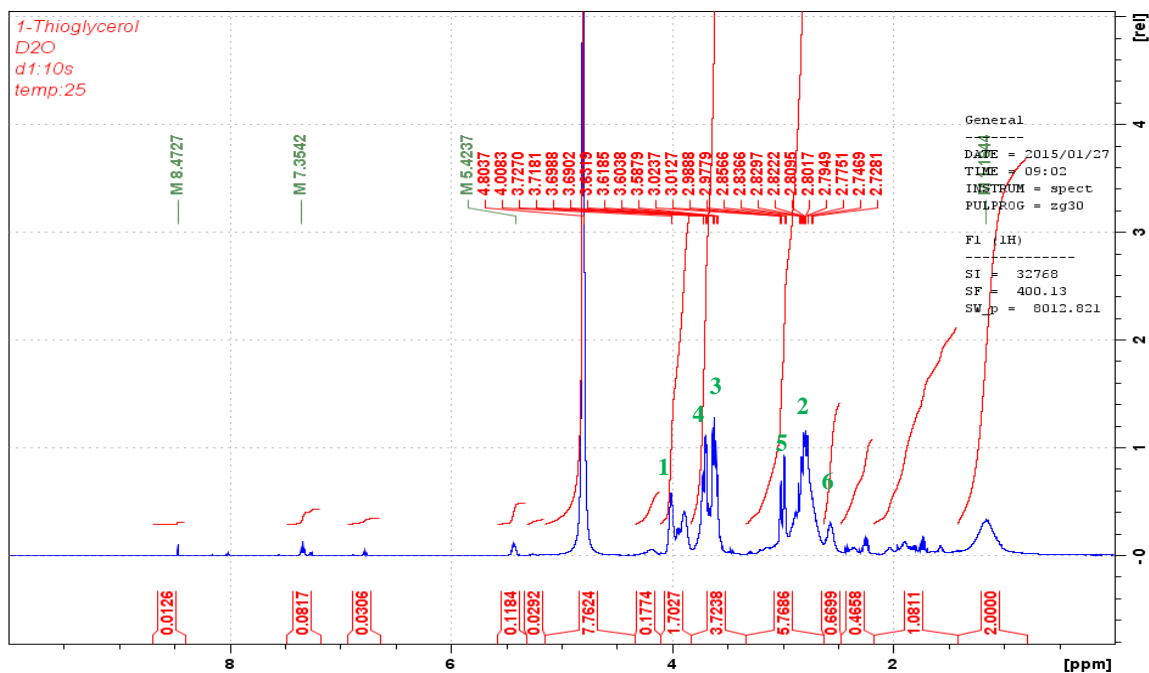
3.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

Το γράφημα 9, παρόλο που διαθέτει πολλές κορυφές οι οποίες δεν είναι εύκολα διακριτές, είναι δυνατόν να ταυτοποιήσουμε την ολοκλήρωση της αντίδρασης για το σχηματισμό της ένωσης **6** η οποία απεικονίζεται και στο σχήμα 8, μέσω ορισμένων κορυφών.



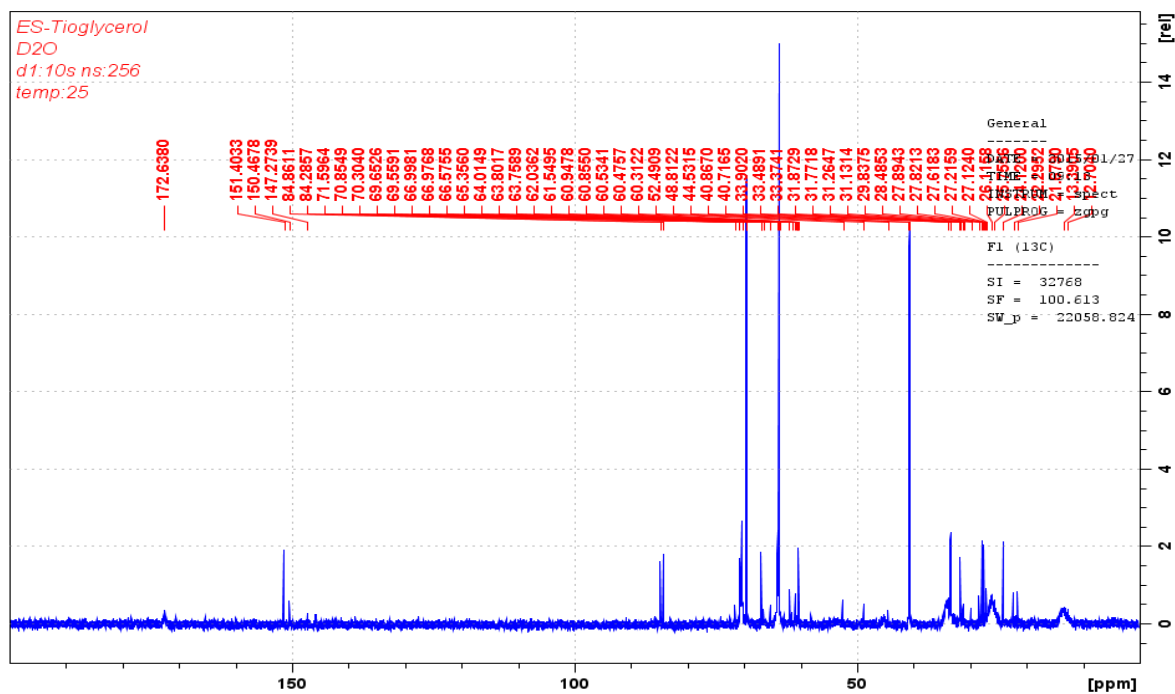
Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση ένωσης **6**

Η μεγάλη κορυφή που εμφανίζεται στα 4.80ppm οφείλεται στο διαλύτη (D_2O). Αξίζει επίσης να επισημανθεί ότι οι κορυφές που δίνουν οι ομάδες $-CH_2$ τα οποία βρίσκονται κοντά στα Si του βινυλο-POSS εμφανίζονται περίπου στα 1.1ppm και ότι τα υδροξύλια της διόλης δεν είναι δυνατόν να εντοπιστούν στο δευτεριωμένο νερό.



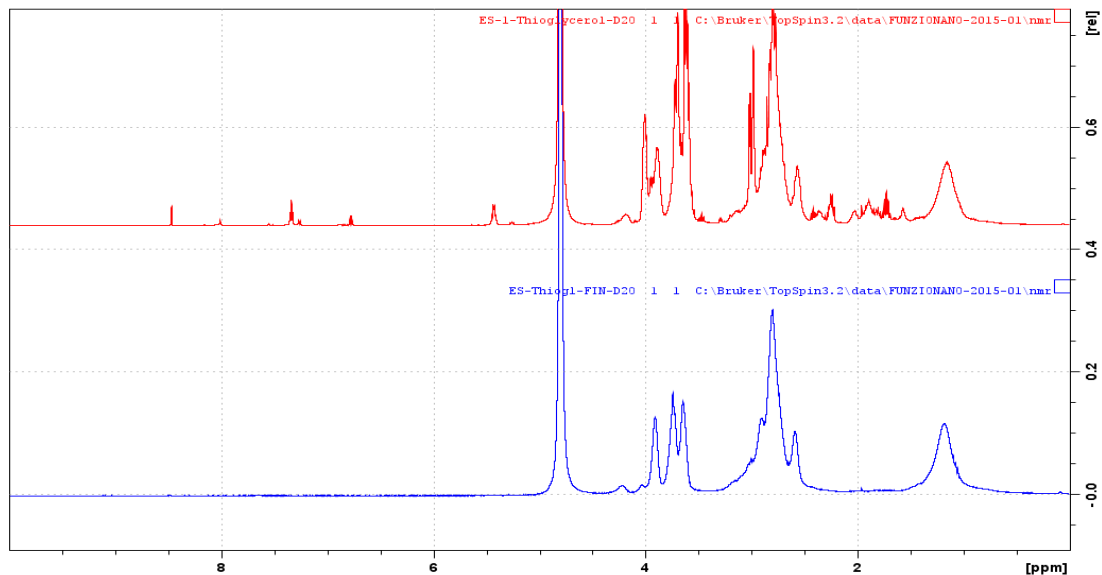
Γράφημα 8: ^1H NMR του 6, 400MHz, (D_2O)

Το γράφημα 10 παρατίθεται για να σημειωθεί ότι ο άνθρακας της μεθόξυ ομάδας (3 όπως σημειώθηκε και στο σχήμα 8) αναμένεται να είναι στο διάστημα 40-50ppm όπου προφανώς υπάρχουν κορυφές, άρα και η μεθόξυ ομάδα.



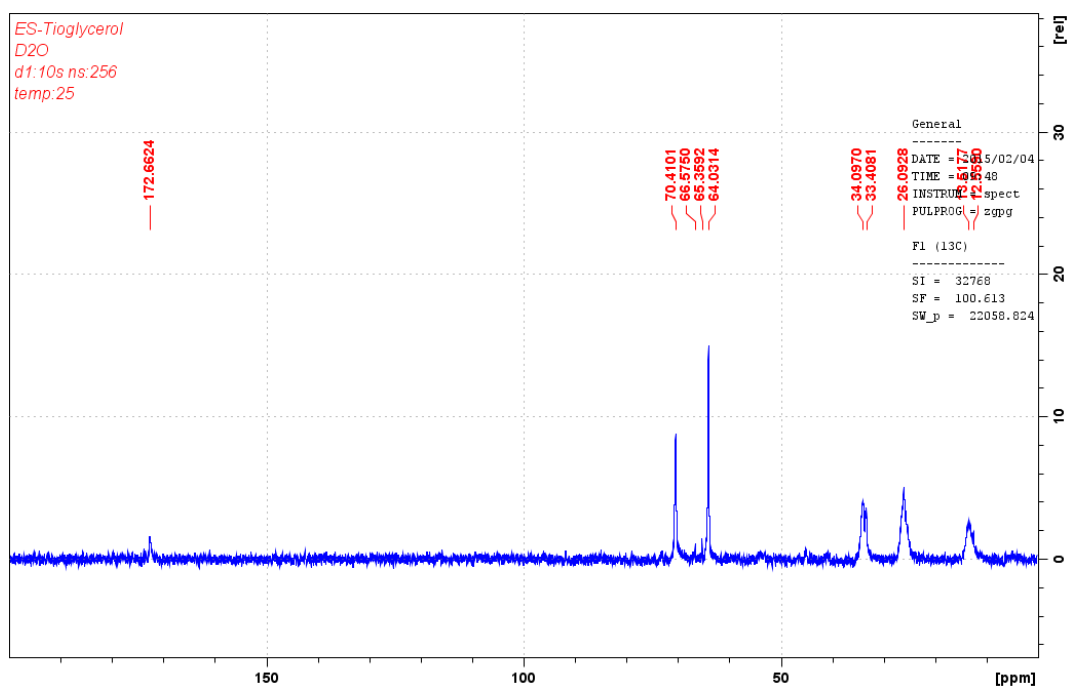
Γράφημα 9: ^{13}C NMR του 6, 400MHz, (D_2O)

Το γράφημα 11 που ακολουθεί επισημαίνει τη διαφορά που υπάρχει στην ένωση **7**, POSS-Thio(70)-υδραζίδιο(30), με τον καθαρισμό διαμέσου μεμβρανών. Παρατηρείται ότι από τη γραμμή βάσης έχουν απομακρυνθεί τυχόν προσμίξεις και οι κορυφές είναι σαφώς πιο ξεκάθαρες.



Γράφημα 10: Συγκριτικό ^1H NMR του **7**, 400MHz, (D_2O), πριν(κόκκινο) και μετά(μπλε) τον καθαρισμό

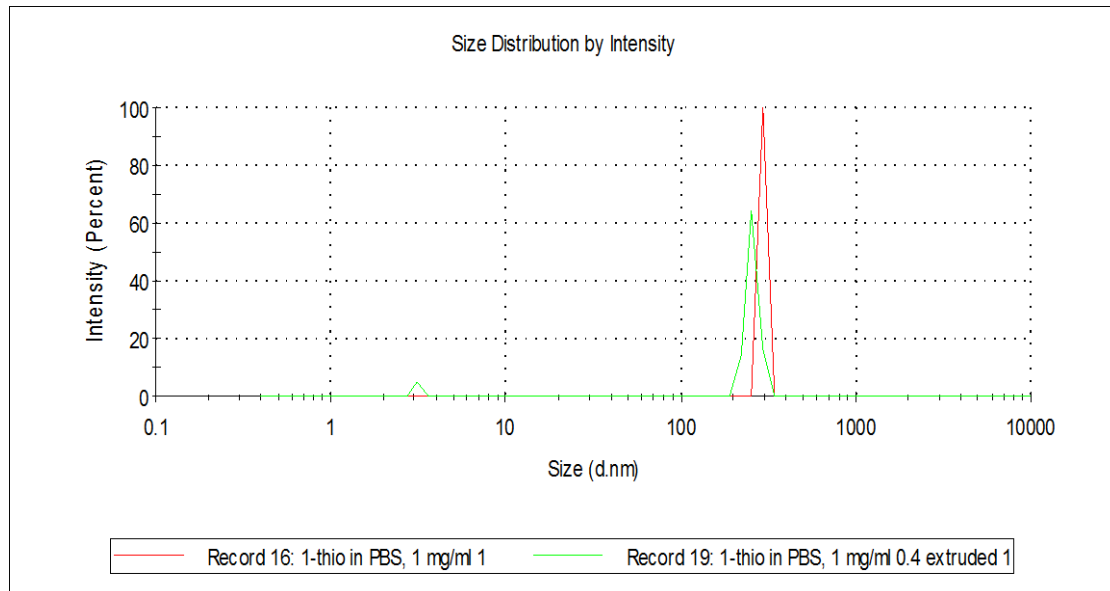
Για την ταυτοποίηση της απόκτησης της ένωσης **7**, αρκεί να επιβεβαιωθεί η απομάκρυνση της μεθόξυ ομάδας. Όπως φαίνεται και από το γράφημα 13, στο διάστημα 40-50ppm δεν υπάρχει κάποια κορυφή συνεπώς μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αντίδραση ολοκληρώθηκε και σχηματίστηκε το υδραζίδιο.



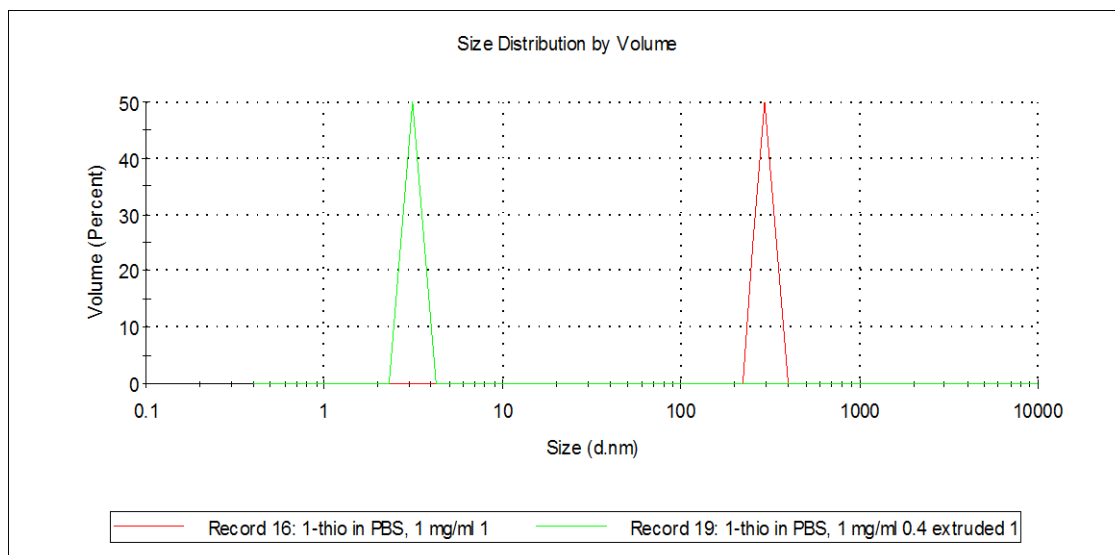
Γράφημα 11: ^{13}C NMR του **7**, 400MHz, (D_2O) μετά τον καθαρισμό

3.2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΚΕΛΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ

Τα μεγέθη των νανοσωματιδίων τα οποία φαίνονταν να βρίσκονται σε αφθονία σε ρυθμιστικό διάλυμα με PBS ήταν 300 nm. Μετά την εκβολή, τα μεγέθη κυμαίνονταν στα 3nm.



Γράφημα 12: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων 7 κατά ένταση σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή



Γράφημα 13: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων 7 κατ' όγκο σε PBS, πριν(κόκκινο) και μετά(πράσινο) την εκβολή

3.3 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΕΛΙΩΝ ΜΕ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΟΓΛΥΚΟΛΗ & ΜΕ ΔΙΟΛΗ

3.3.1 ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ & ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Η παρατήρηση της **σταθερότητας** και της **διαλυτότητας** των ενώσεων που συντέθηκαν (**7, 10, 10'**) πραγματοποιήθηκε με διαφορετικές συγκεντρώσεις και σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Τα μέσα αυτά ήταν HEPES, HEPES +10%FBS και PBS. Στη συνέχεια τα δείγματα φυλάσσονταν σε σταθερή θερμοκρασία 37°C, η οποία προσομοιάζει τη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος και ελέγχονταν κάθε 1h, 2h, 3h καθώς και μετά από 1 ημέρα και 4 ημέρες. Στους χρόνους αυτούς, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα δείγματα όπως δημιουργία νέων συσσωματωμάτων με την πάροδο του χρόνου.

Υπήρξαν προκλήσεις σχετιζόμενες με τη συσσωμάτωση αυτών των POSS νανοσωματιδίων και κατά συνέπεια με τη διαλυτότητα/διασπορά τους στα υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα.

Κανένα από τα τρία δεν επέδειξε καλή διαλυτότητα/διασπορά σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS buffer).

Ορισμένη ποσότητα από το POSS-Thio(70)-υδραζίδιο(30) ζυγίστηκε (2-4mg) και ακολούθησε η διασπορά του σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS τελικής συγκέντρωσης 1mg/mL. Συσκευή υπερήχων Branson χρησιμοποιήθηκε για να βελτιώσει τη διασπορά των σωματιδίων, αλλά το αποτέλεσμα δεν ήταν ικανοποιητικό, καθώς μετά από 60min στους υπερήχους δεν παρατηρήθηκε καμία σχεδόν διασπορά.

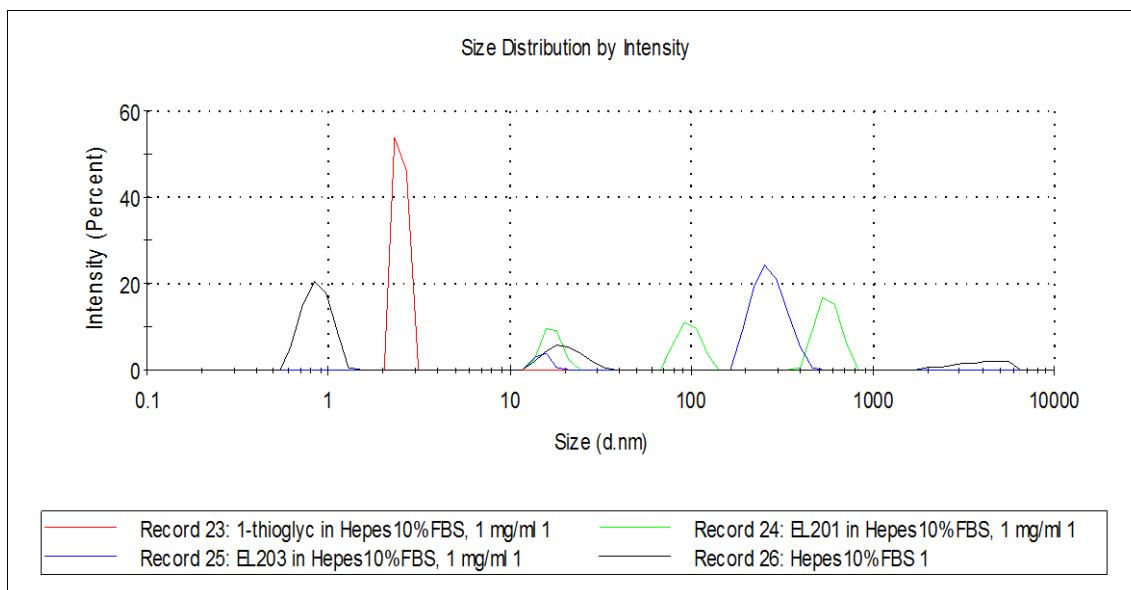
Στη συνέχεια επιλέχθηκε μία συσκευή υπερήχων με ακίδα (Output, 50%, 5W; 1 min./ 2 sec. pulses) και φάνηκε να έχει αποτελέσματα. Τα νανο-συσσωματώματα διαχωρίστηκαν σε POSS νανοσωματίδια με τη βοήθεια ενός μικρο-εκβολέα (5 φορές) χρησιμοποιώντας μεμβράνη 0.4μm. Το αποτέλεσμα ήταν το φιλτράρισμα των συσσωματωμάτων και όχι τόσο ο διαχωρισμός τους. Τα μεγάλα συσσωματώματα (>100nm) φαινομενικά μεταβλήθηκαν.



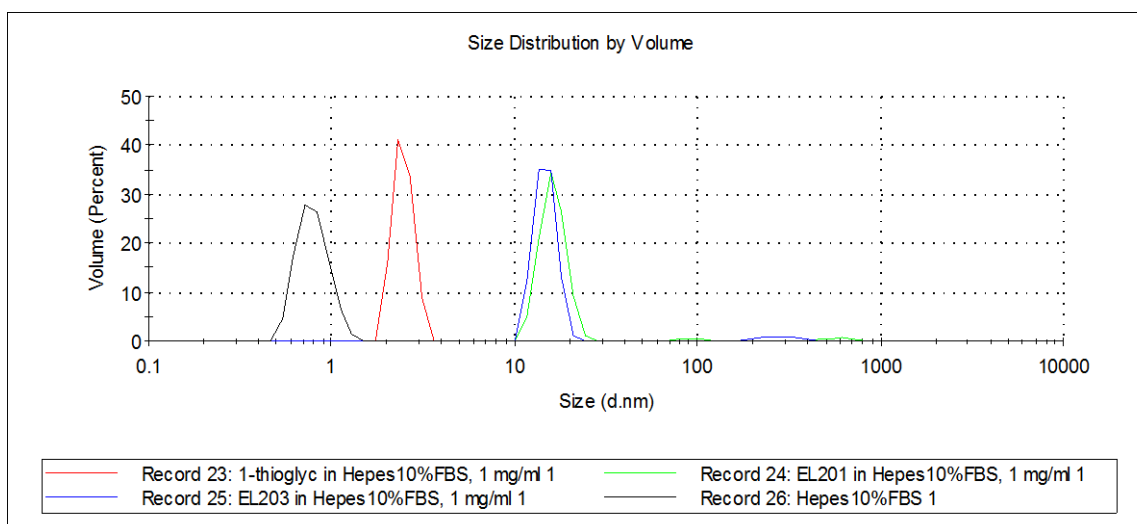
Εικόνα 14: Μικρο-εκβολέας

3.3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΚΕΛΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ

Το μέγεθος των σωματιδίων των δειγμάτων **7**, **10** και **10'** μετρήθηκε και σε θρεπτικό μέσο HEPES 10%FBS όπου φάνηκε να υπάρχει καλύτερη διασπορά. Όντως τα δεδομένα από τη μέτρηση του μεγέθους με DLS αποδεικνύει ότι υπάρχουν συσσωματώματα μικρότερου όμως μεγέθους απ' ότι στο PBS. Όπως φαίνεται και παρακάτω η ουσία **7** φαίνεται να έχει το μικρότερο υδροδυναμικό όγκο (~3nm) και ακολουθεί ένα μικρό μέρος των **10** και **10'** (~20nm). Ο υδροδυναμικός όγκος των υπολοίπων σωματιδίων φαίνεται να είναι όπως και στο PBS, δηλαδή γύρω στα 100nm και 240nm και πάνω.



Γράφημα 14: Συγκριτικό γράφημα μεγέθους σωματιδίων **7**(κόκκινο), **10**(πράσινο), **10'**(μπλε), και HEPES 10%FBS(μαύρο) κατά ένταση

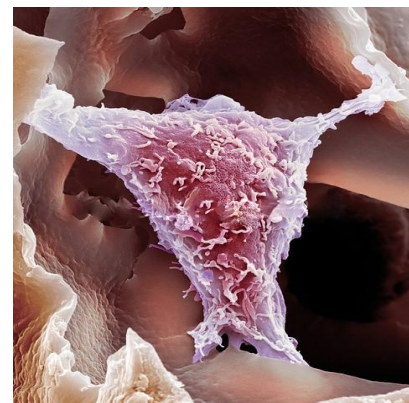


Γράφημα 15: Συγκριτικό γράφημα μεγέθους σωματιδίων **7**(κόκκινο), **10**(πράσινο), **10'**(μπλε), και HEPES 10%FBS(μαύρο)κατ' όγκο

3.3.3 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

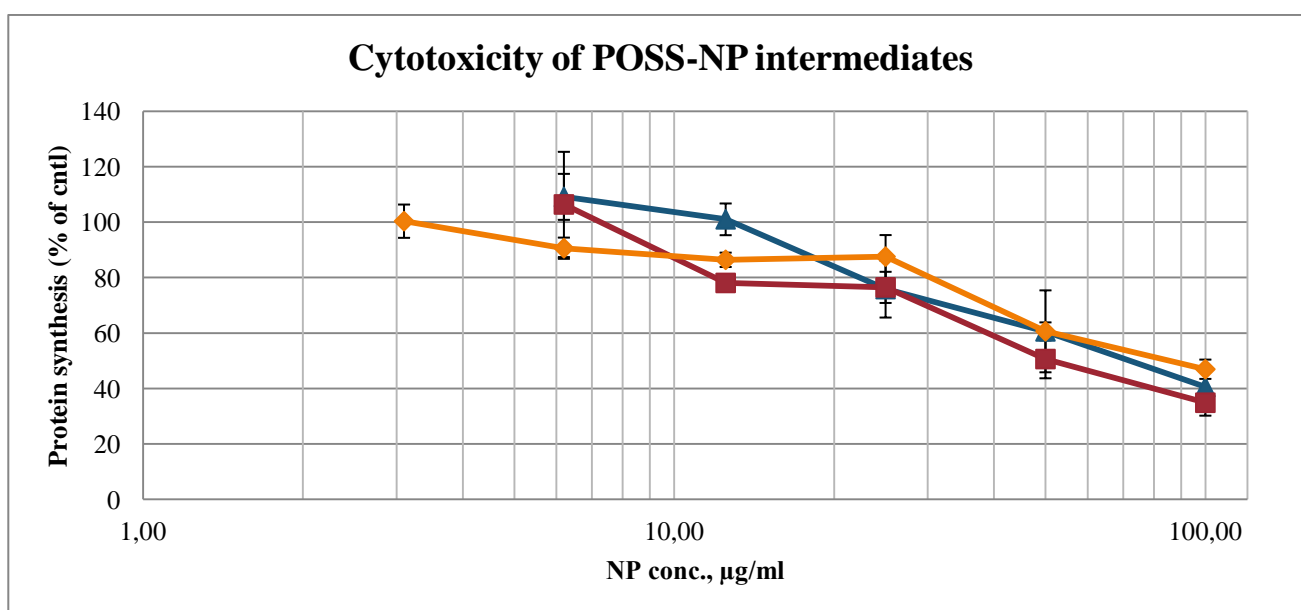
Η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας επιτυγχάνεται μέσω του ελέγχου της επίδρασης των δειγμάτων POSS-PEG(50)-υδραζίδιο(50), POSS-PEG(75)-υδραζίδιο(25) και POSS-Thio(70)-υδραζίδιο(30) στην πρωτεϊνοσύνθεση.

Προετοιμάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS χρησιμοποιώντας συσκευή υπερήχων με ακίδα (tip-sonicator, Output 50%, 5W, 2 sec. Pulses για 1 min; 2-4 ml). Στη συνέχεια τα POSS νανοσωματίδια αραιώθηκαν διαδοχικά σε Λευκίνη απουσία θρεπτικού μέσου HEPES (-ορό/FCS) σε κυτταρικές σειρές HeLa: την επώαση των POSS νανοσωματιδίων στους 37°C για 2.5 ώρες, ακολούθησε η προσθήκη της 3H-Λευκίνης και η μέτρηση της ενσωμάτωσής της στην πρωτεϊνοσύνθεση.



Εικόνα 15: Έγχρωμη εικόνα HeLa κυττάρου από SEM

Και τα τρία δείγματα μείωσαν την πρωτεϊνοσύνθεση με τη μέγιστη συγκέντρωση σωματιδίων $IC_{50}=50-70\mu\text{g/ml}$. Ωστόσο, η τοξική επίδραση των δειγμάτων POSS-PEG(50)-υδραζίδιο(50), POSS-PEG(75)-υδραζίδιο(25) και POSS-Thio(70)-υδραζίδιο(30) που συντέθηκαν δεν είναι άκρως αντιπροσωπευτική καθώς τα μεγάλα συσσωματώματα που υπήρχαν σε αυτά περιείχαν πιθανόν κάποιες εκατοντάδες νανοσωματίδια. Η τοξικότητα αυτή είναι πιθανώς διαφορετική από αυτή των τελικών προϊόντων τα οποία θεωρητικά θα περιέχουν ορισμένα μόνο μόρια POSS και συνεπώς θα έχουν και λιγότερη συσσωμάτωση. Η κυτταρική πρόσληψη, αλληλεπίδραση και βιοαποικοδόμηση είναι επίσης πιθανό να διαφέρει από αυτή ενός μόνο POSS νανοσωματιδίου. Όσον αφορά τη μορφολογία των κυττάρων ανάλογα με τη συγκέντρωση των 7, 10 και 10', δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή.



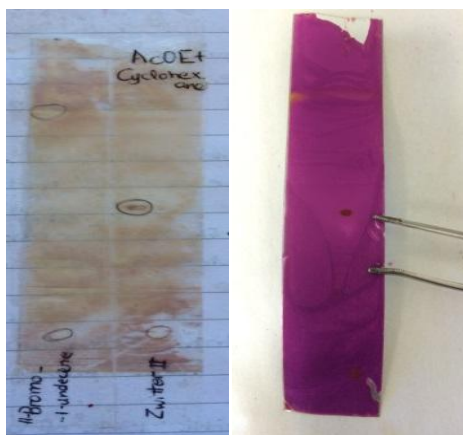
Γράφημα 16: Κυτταροτοξικότητα δειγμάτων 7 (μπλε), 10(κόκκινο) και 10'(πορτοκαλί)

3.4 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΚΕΛΙΩΝ ΜΕ ΑΜΦΙΤΕΡΙΟΝ

3.4.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΜΦΙΤΕΡΙΟΝΤΟΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

Το διάλυμα για τη Χρωματογραφία Λεπτής στοιβάδας αποτελούνταν από Αιθανικό αιθυλεστέρα και Κυκλοεξάνιο με αναλογία 1:9 (2.02g AcOEt:18.04g Κυκλοεξάνιο). Εφόσον δεν υπάρχει στίγμα στο ύψος του **15** που αποτελεί πρώτη ύλη, σημαίνει ότι το **16** δεν περιέχει 11-βρωμο-ενδεκ-1-ένιο, συνεπώς η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί.

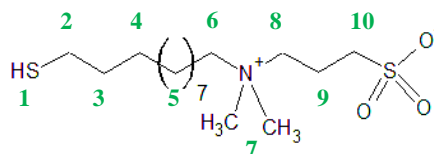


Εικόνα 16: Σύγκριση μεταξύ ένωσης **15** και **16**

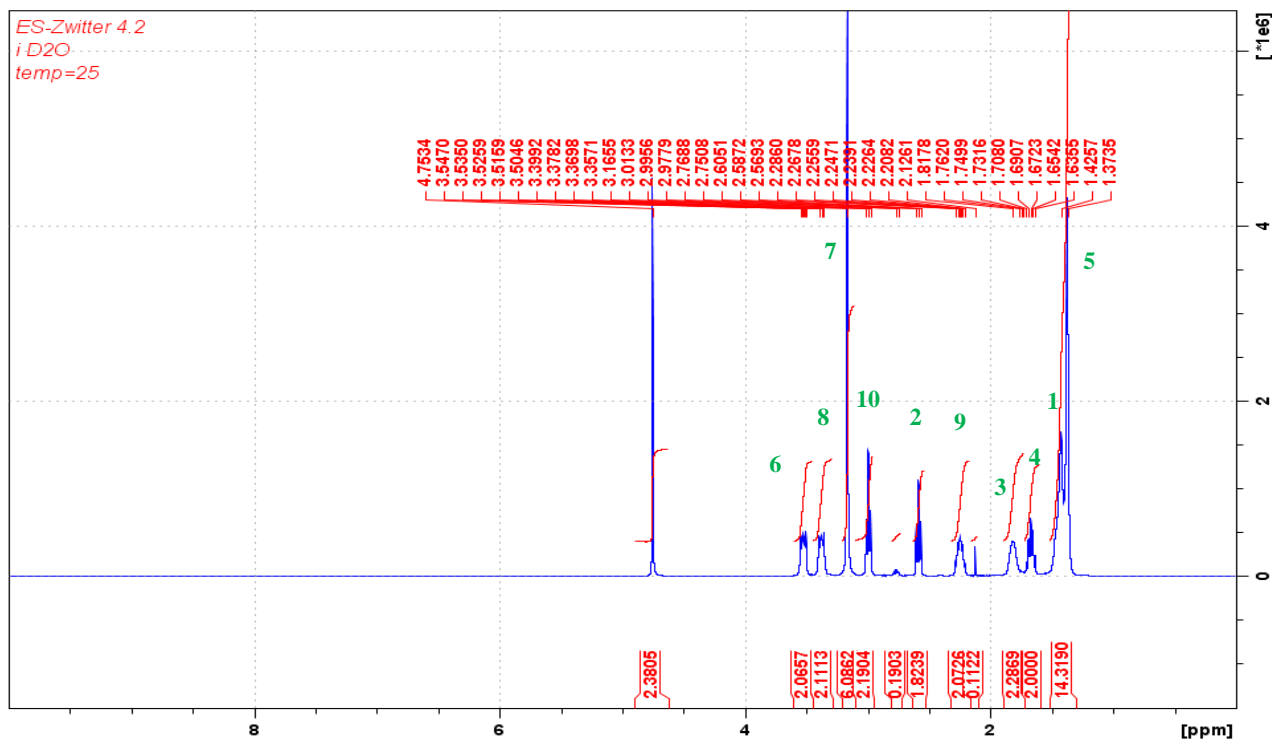
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

Τα γραφήματα NMR του **11** ανταποκρίνονται στα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας.⁵² Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιούνταν ¹H καθώς και ¹³C NMR. Κάποια γραφήματα είτε υδρογόνου είτε άνθρακα, ανάλογα με την περίπτωση, παρατίθενται ως συμπληρωματικά στο παράρτημα.

Στο γράφημα 18 επιβεβαιώνεται η επιτυχής σύνθεση της αμφιτεριονικής ένωσης **11** με μοριακό τύπο $C_{16}H_{35}NO_3S_2$ και συντακτικό τύπο:



Η χημική μετατόπιση και η ολοκλήρωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της δομής της ένωσης. Η ολοκλήρωση αποκαλύπτει το σχετικό αριθμό των H που είναι υπεύθυνα για μια κορυφή NMR. Συνεπώς τα υδρογόνα της ένωσης **11** έδωσαν τις κορυφές όπως είναι αριθμημένες στο γράφημα 18.



Γράφημα 17: ¹H NMR του **11**, 400MHz, (D₂O)

⁵² R. Erik Holmlin, Xiaoxi Chen, Robert G. Chapman, Shuichi Takayama, George M. Whitesides, Zwitterionic SAMs that Resist Nonspecific Adsorption of Protein from Aqueous Buffer, *Langmuir* 2001, 17, σσ. 2841-2850

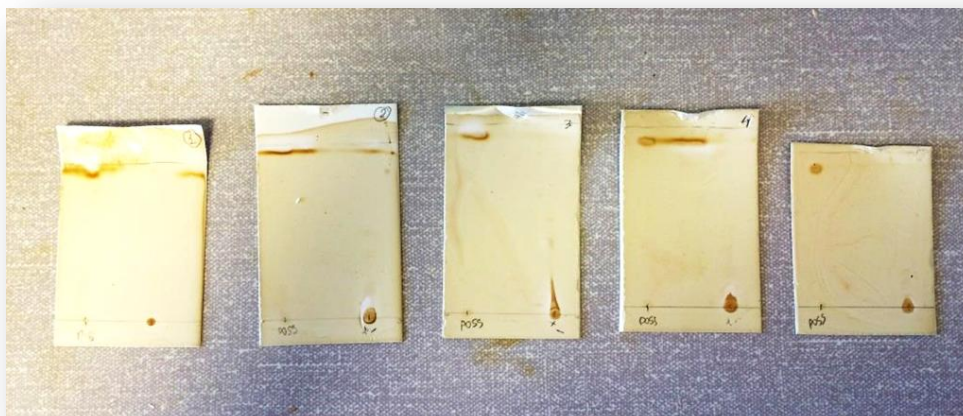
3.4.2 ΣΥΝΘΕΣΗ

ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ

Στις δοκιμές σταθερότητας και διαλυτότητας που πραγματοποιήθηκαν καθ' όλη τη συνθετική πορεία, τα σωματίδια POSS-Zwitter επεδείκνυαν πλήρη διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα μέχρι και το σημείο δημιουργίας της υδραζόνης. Το υδραζίδιο φαίνεται να μειώνει δραστικά τη διαλυτότητα της ένωσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

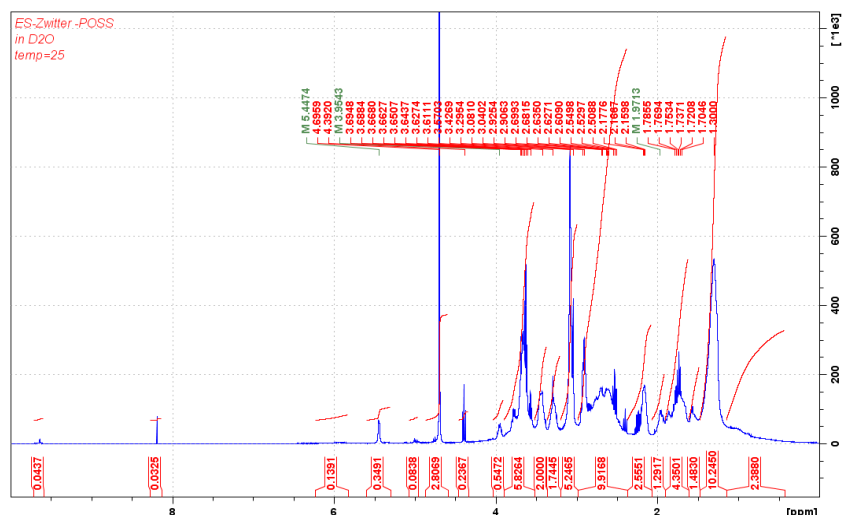
Κάθε 5 κλικ, διάρκειας 99sec το καθένα, η πορεία της αντίδρασης επιβεβαιωνόταν με TLC ορισμένα από τα οποία φαίνονται και στην εικόνα 18. Παρατηρείται στην αριστερή πλευρά της TLC πλάκας όπου βρίσκεται το POSS χωρίς καμία τροποποίηση και στη δεξιά το τροποποιημένο. Είναι προφανές λοιπόν ότι στους πρώτους ελέγχους το POSS δεν έχει τροποποιηθεί πλήρως, καθώς υπάρχει ένδειξη του στην κορυφή της πλάκας. Στον τελευταίο έλεγχο με TLC, δεν εμφανίζεται τίποτα στην πάνω δεξιά πλευρά της πλάκας, οπότε και φαίνεται να έχει ολοκληρωθεί η αντίδραση. Ύστερα από 35 συνολικά κλικ προέκυψε το προϊόν **12**.



Εικόνα 17: TLC πορείας αντίδρασης για την ένωση **12**

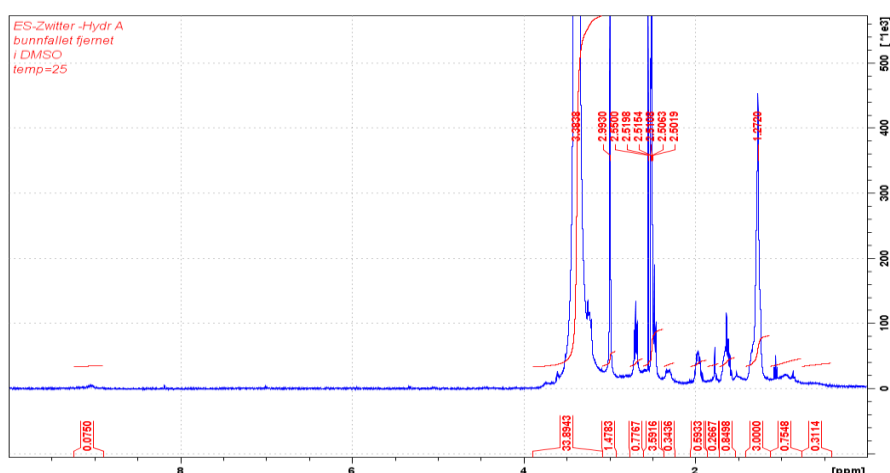
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

Η ερμηνεία του γραφήματος 19 φαίνεται να είναι αρκετά πολύπλοκη λόγω της πολλαπλότητας των κορυφών και της καθόλου ομαλής γραμμής βάσης. Οι κορυφές του μεθυλεστερά **2** επιβεβαιώθηκαν όπως και στην περίπτωση της ένωσης **6** (βλέπε γράφημα 9).



Γράφημα 18: ^1H NMR του **12**, 400MHz, (D_2O)

Στο γράφημα 20 διακρίνεται η χημική μετατόπιση που προκαλούν τα υδρογόνα του DMSO στα 2.5ppm καθώς και το νερό του DMSO περίπου στα 3.3ppm. Τα υδρογόνα της μεθόξυ ομάδας αναμένεται να εμφανίσουν κορυφή περίπου στα 3.7ppm, επομένως η απουσία κορυφής μπορεί να αποτελεί ένδειξη του σχηματισμού του υδραζιδίου, άρα και της ένωσης **13**.



Γράφημα 19: ^1H NMR του **13**, 400MHz, (DMSO) μετά τον καθαρισμό διαμέσου μεμβρανών

Επισημαίνεται ότι το συγκεκριμένο γράφημα δεν είναι αρκετά αξιόπιστο λόγω του ότι η ένωση **13** δεν ήταν ιδιαίτερος διαλυτή οπότε δημιουργούσε ιζήματα. Για το λόγο αυτό έγινε η προσπάθεια εκ νέου σύνθεσης POSS-Zwitter-υδραζίδιο με λόγο αμφιτεριόν/υδραζίδιο ίσο με 1/1 και όχι 3/7 όπως στο **13**.

3.5 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ POSS-NH₂

Για να γίνει σωστή διερεύνηση των παραμέτρων και της συμβολής τους στη σύνθεση του τελικού προϊόντος, η αλλαγή γινόταν σε μία παράμετρο σε κάθε πείραμα, ενώ οι υπόλοιπες παράμετροι παρέμεναν σταθερές.

Με αυτή τη συνθετική πορεία που εφαρμόστηκε, όλα τα ισομερή σιλκοξάνια λαμβάνονται (T₈, T₁₀, T₁₂) τα οποία και παρατηρούνται στα γραφήματα NMR ²⁹Si στις εξής κορυφές:

Είδος δομής	Κορυφές NMR (ppm)
T ₈	-66
T ₁₀	-67
T ₁₂	-65 & -68
APS	-45
Ανοιχτές δομές	-50 έως -60

Οι κορυφές οι οποίες υποδεικνύουν την ύπαρξη APTS που δεν έχει αντιδράσει βρίσκονται στα -45ppm καθώς και μη πλήρως συμπυκνωμένα σιλκοξάνια, οι ανοιχτές δομές μπορούν να εντοπιστούν στο εύρος μεταξύ -50 και -60ppm.

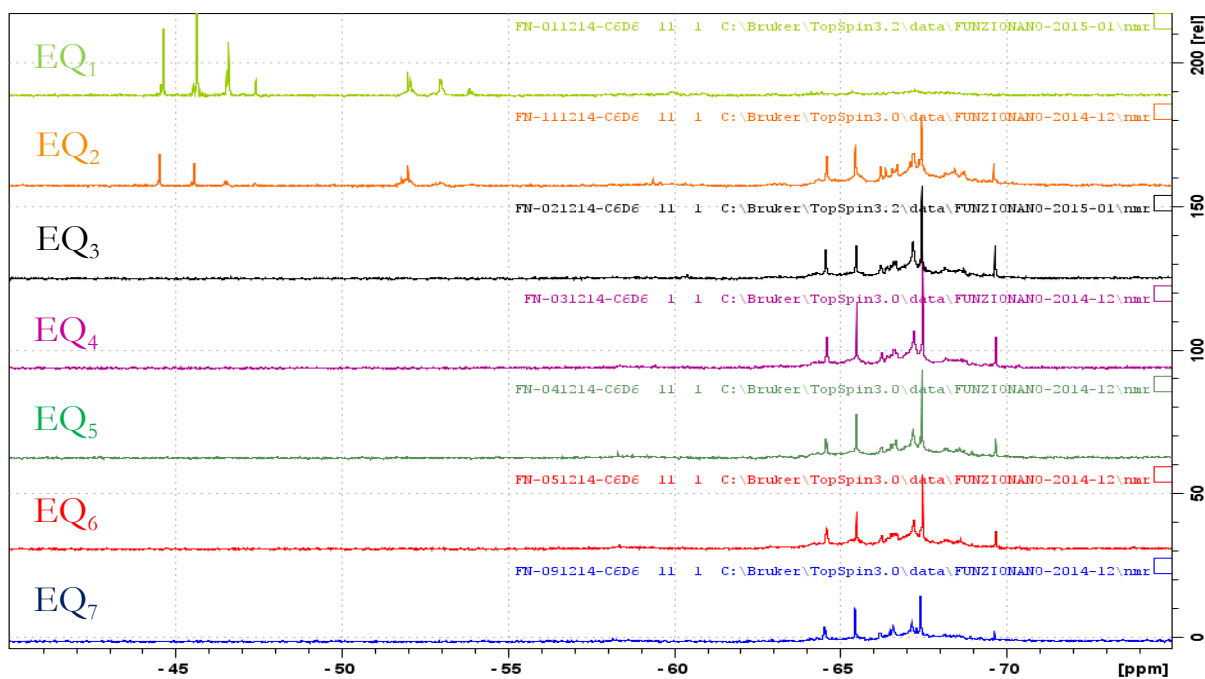
Σε κάθε περίπτωση, περιλαμβάνονται τα γραφήματα NMR από -40ppm έως -75ppm καθώς και τα αντίστοιχα ζουμαρισμένα από -60ppm έως -74ppm διότι στα μεν πρώτα φαίνεται η ύπαρξη ή όχι ανοιχτών δομών και APS αλλά στα δεύτερα είναι πολύ πιο εύκολη η αξιολόγηση των κορυφών (διακρίσιμότητα, εύρος, αναλογία).

Ο προσδιορισμός του αριθμού των αμινών και του ισοδύναμου βάρους χρησιμοποιούνταν στην προκειμένη εργασία ως ενδεικτικά της ποιότητας των ενώσεων που συντίθεντο και γενικά ως ένα επιπλέον κριτήριο επιλογής της κατάλληλης ένωσης. Εάν ο αριθμός των αμινών υπολογιζόταν περίπου ίσος με 510mg KOH/g και το ισοδύναμο βάρος προέκυπε περίπου ίσο με 110g/mol, τότε επιβεβαιωνόταν η καλή ποιότητα της ένωσης.

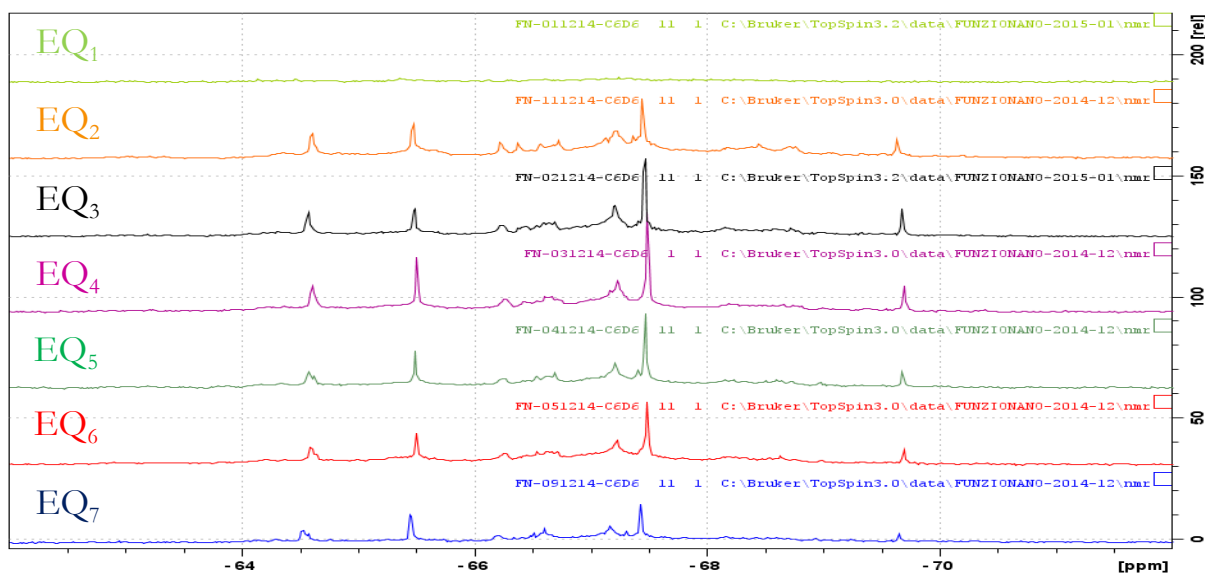
Οι παράμετροι που αλλάζουν αξιολογήθηκαν ως αποκλειστικές πληροφορίες οπότε και δεν δημοσιοποιούνται, αλλά αναφέρονται ως EQ₁, T₂, R₃ και ούτω καθεξής.

3.5.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΝΕΡΟΥ

Σταθερές παράμετροι: APS (20g), PnP (20g), Χρόνος αντίδρασης (2h), Θερμοκρασία (100°C)



Γράφημα 20: Επίδραση νερού (-40ppm έως -75ppm)

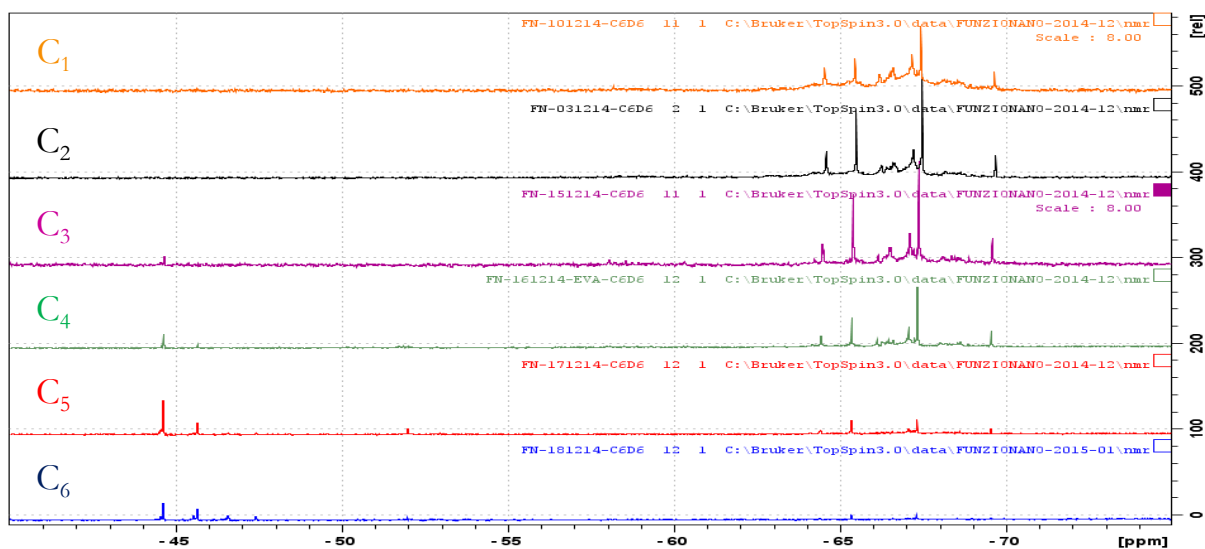


Γράφημα 21: Επίδραση νερού (-60ppm έως -74ppm)

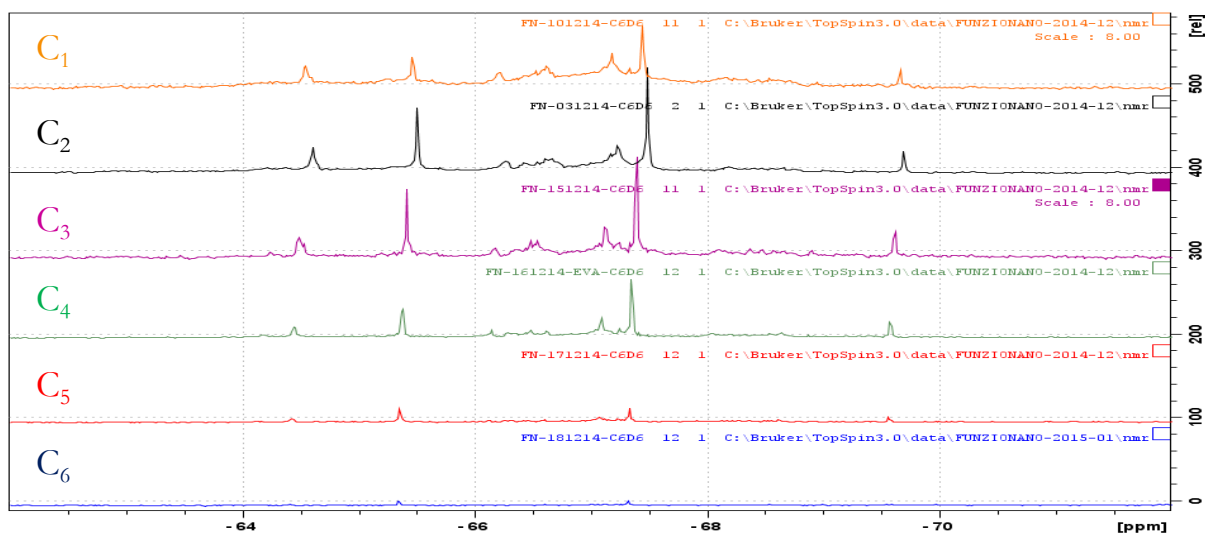
Επισημαίνεται ότι αφενός μεν, τα EQ₁ και EQ₂ φαίνονται ότι δεν επαρκούν για το σχηματισμό των κελιών, αφετέρου δε, περίσσεια νερού, δηλαδή EQ₇ (και πάνω) θα μπορούσε να σπάσει τις κλειστές δομές, υδρολύοντας τους δεσμούς Si-O. Επομένως ανάμεσα στα EQ₃, EQ₄, EQ₅ και EQ₆ **επιλέγεται το EQ₄** καθώς αφενός δεν φαίνονται να υπάρχουν ανοιχτές δομές αλλά και η αναλογία των κορυφών των T₈, T₁₀ και T₁₂ φαίνεται να είναι η καλύτερη.

3.5.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

Σταθερές παράμετροι: Νερό (EQ₄), Χρόνος αντίδρασης (2h), Θερμοκρασία (100°C)



Γράφημα 22: Επίδραση συγκέντρωσης (-40ppm έως -75ppm)

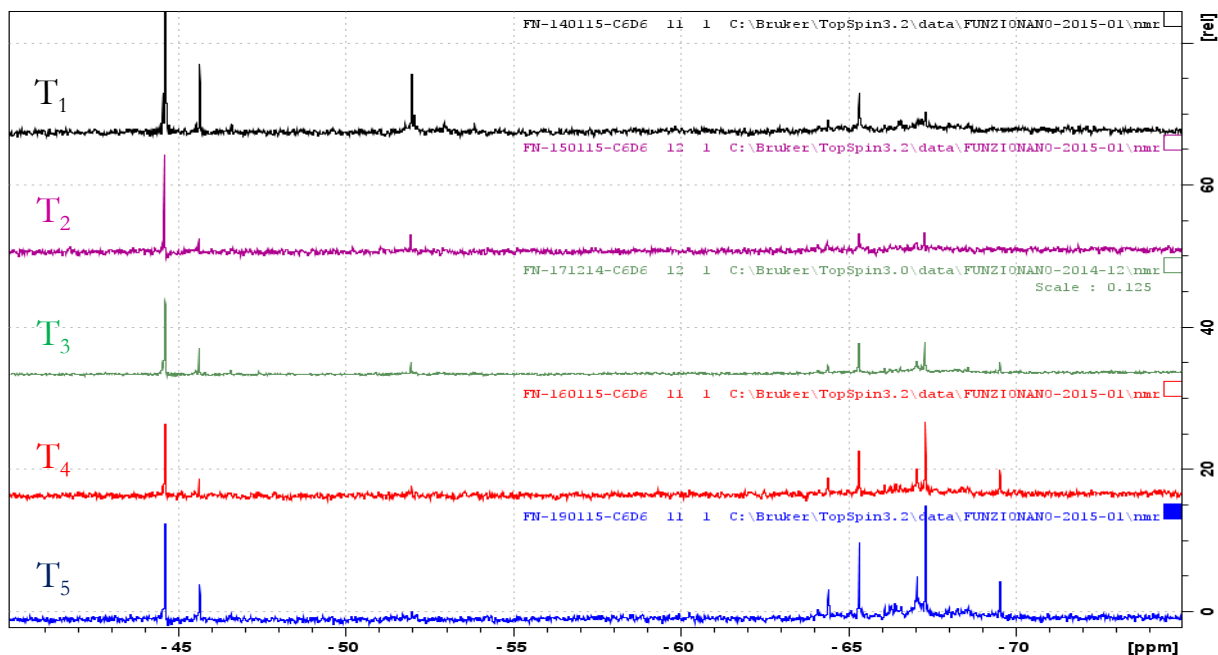


Γράφημα 23: Επίδραση συγκέντρωσης (-60ppm έως -74ppm)

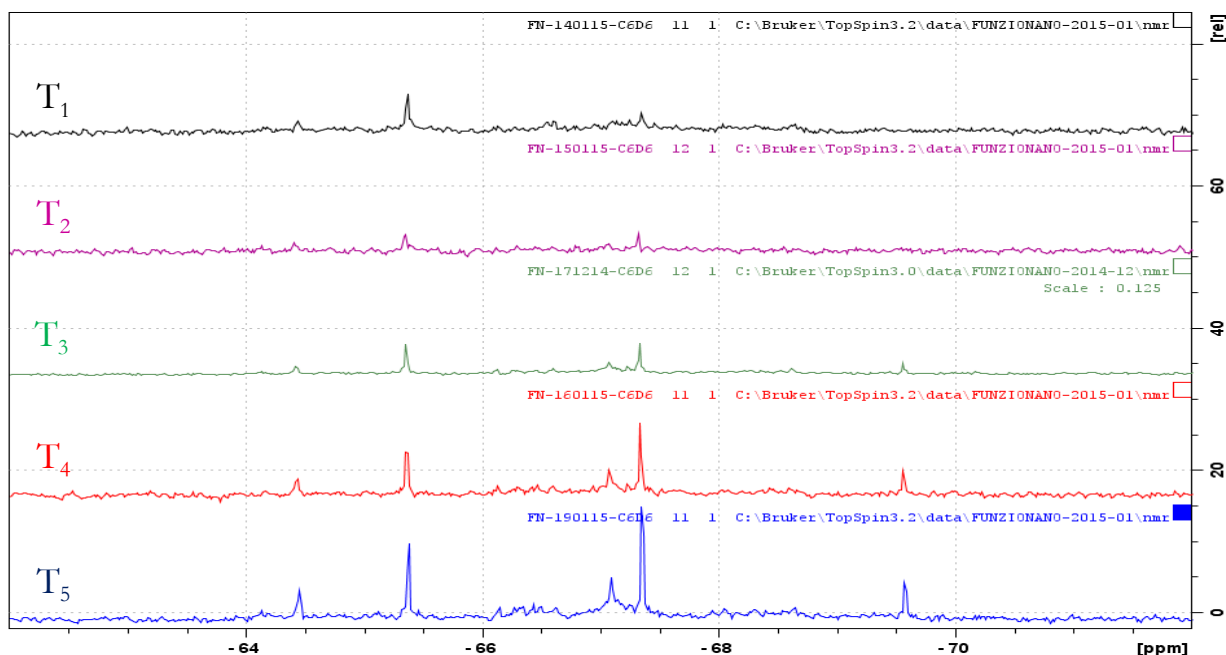
Ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις APS:PhP που δοκιμάστηκαν, στις C₁ και C₂ φαίνεται να έχει αντιδράσει όλο το APS και δεν διακρίνονται ανοικτές δομές. Παρόλα αυτά οι κορυφές έχουν μεγαλύτερο εύρος και δεν είναι τόσο καθορισμένες όπως στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Το ακριβώς αντίθετο βέβαια συμβαίνει στο C₆ όπου δεν έχουν συντεθεί σχεδόν καθόλου POSS καθώς το ύψος των κορυφών είναι αμελητέο. Ανάμεσα λοιπόν στα C₃, C₄, C₅ **επιλέχθηκαν δύο πιθανές συγκεντρώσεις για το επόμενο βήμα της βελτιστοποίησης.** Η μία ήταν η C₃ καθώς εμφανίζει ικανοποιητικό ύψος και αναλογία κορυφών, συνεπώς και T₈, T₁₀ και T₁₂. Επίσης, επιλέχθηκε **και η C₅** για περαιτέρω διερεύνηση καθώς παρουσιάζει ενδιαφέρον να φανεί τι θα συμβεί στις τόσο διακριτές κορυφές εάν έχει αντιδράσει όλο το APS.

3.5.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

Σταθερές παράμετροι: Συγκέντρωση (C₅), Νερό (EQ₄), Χρόνος αντίδρασης (2h)



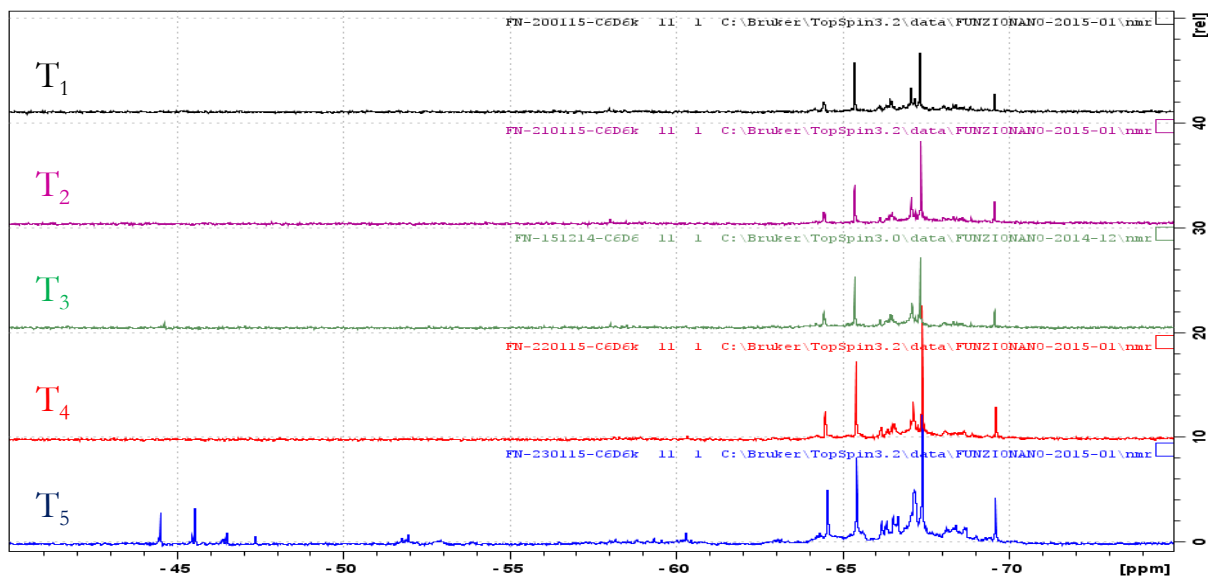
Γράφημα 24 : Επίδραση θερμοκρασίας (-40ppm έως -75ppm) σε συγκέντρωση C₅



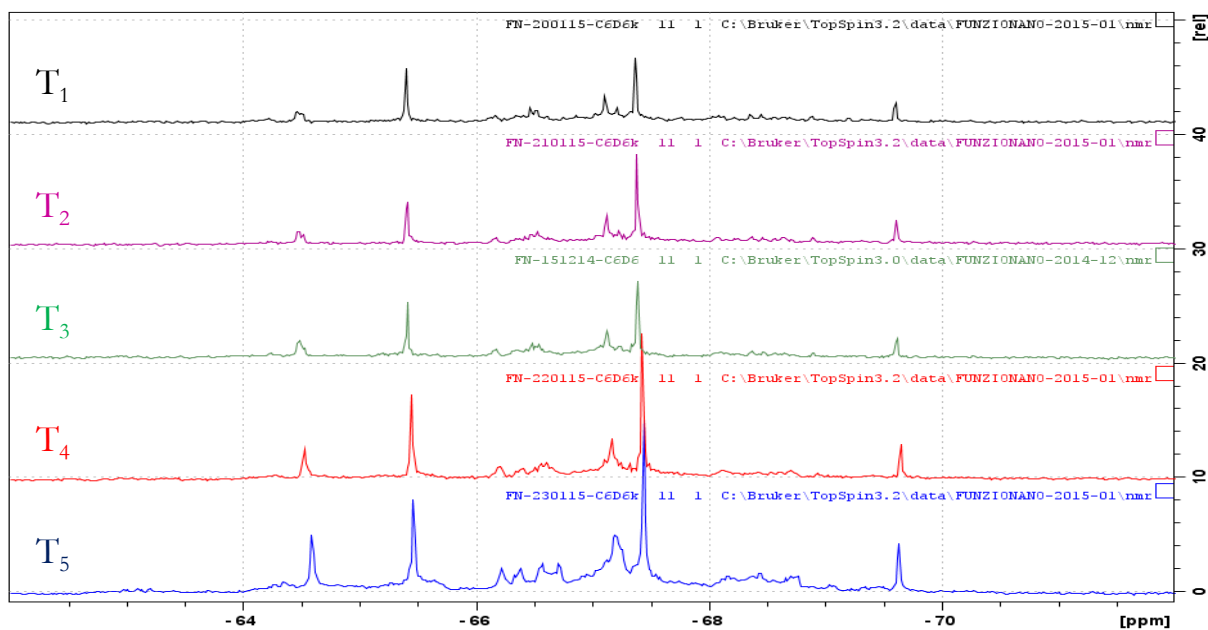
Γράφημα 25: Επίδραση θερμοκρασίας (-60ppm έως -74ppm) σε συγκέντρωση C₅

Είναι πολύ εύκολο να συμπεράνει κανείς ότι καμία θερμοκρασία με αυτή τη συγκέντρωση (C₅) δε δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα, οπότε και ακολούθησε η δοκιμή της C₃ στις θερμοκρασίες αυτές.

Σταθερές παράμετροι: Συγκέντρωση (C_3), Νερό (EQ_4), Χρόνος αντίδρασης (2h)



Γράφημα 26: Επίδραση θερμοκρασίας (-40ppm έως -75ppm) σε συγκέντρωση C_3

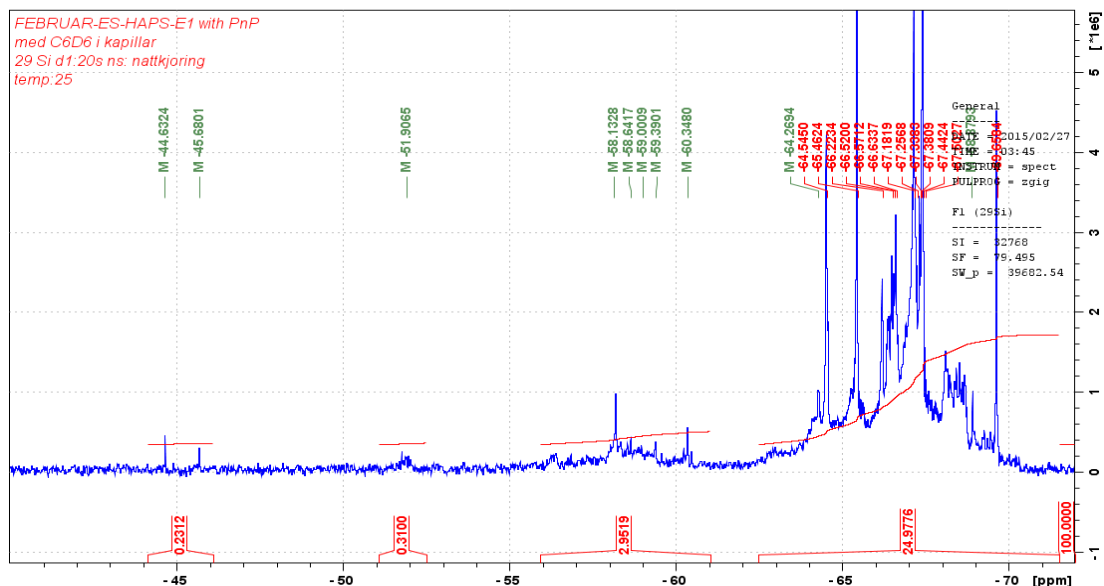


Γράφημα 27: Επίδραση θερμοκρασίας (-40ppm έως -74ppm) σε συγκέντρωση C_3

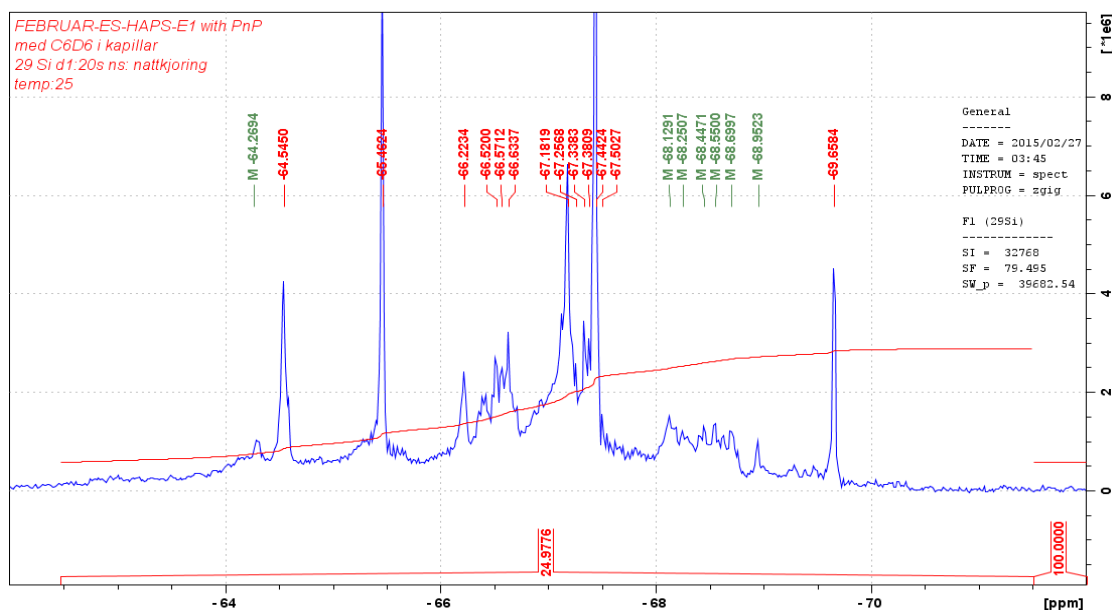
Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με την προηγούμενη συγκέντρωση, με τη C_3 φαίνεται να υπάρχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε πολλές θερμοκρασίες. Η θερμοκρασία η οποία **επιλέχθηκε** ήταν η T_2 καθώς έχει αντιδράσει όλο το APS, δεν υπάρχουν ανοικτές δομές, εμφανίζει καλό ύψος και αναλογία κορυφών αλλά και κάτι άλλο πολύ σημαντικό είναι ότι δεν είναι πολύ υψηλή. Αυτό είναι ένα πλεονέκτημα καθώς όσο το δυνατόν χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία σε μια διεργασία σύνθεσης, τόσο πιο γρήγορη, ασφαλής και εύκολη είναι όλη η διαδικασία.

3.5.4 ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗ

Σταθερές παράμετροι: Συγκέντρωση (C₃), PnP (1000g) Νερό (EQ₄), Χρόνος αντίδρασης (2h), Θερμοκρασία (T₂)



Γράφημα 28: Σύνθεση κλίμακας 3L (-40ppm έως -72ppm)



Γράφημα 29: Σύνθεση κλίμακας 3L (-60ppm έως -74ppm)

Με τη σύνθεση αυτή επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι παρόλο που μια σύνθεση μπορεί να γίνεται κάτω από τις ίδιες συνθήκες (πίεση, θερμοκρασία, συγκέντρωση κλπ.), τα αποτελέσματα δεν ανταποκρίνονται απόλυτα σε αυτά της μικρότερης κλίμακας. Στην προκειμένη περίπτωση, φαίνονται να έχουν σχηματιστεί T₈, T₁₀ και T₁₂ αλλά ταυτόχρονα υπάρχει APS που δεν έχει αντιδράσει, ανοικτές δομές αλλά και η μορφή των κορυφών που σχηματίστηκαν απέχουν πολύ από το ιδανικό.

3.5.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΝΕΡΟΥ

Προκαταρκτικές μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί πριν από μερικά χρόνια, έδειχναν ότι η απόκτηση λιγότερων ανοικτών δομών επιτυγχάνονταν όταν το νερό προστίθεντο στάγδην στο μίγμα APS και διαλύτη. Για τη διερεύνηση αυτής της υπόθεσης λοιπόν, δοκιμάστηκε η προσθήκη νερού με 3 διαφορετικούς τρόπους. Σε κάθε περίπτωση, το νερό προστίθεντο όταν το μίγμα έφτανε την επιθυμητή θερμοκρασία.

Κανονικά: Το νερό προστίθεται στο μίγμα με σύριγγα.

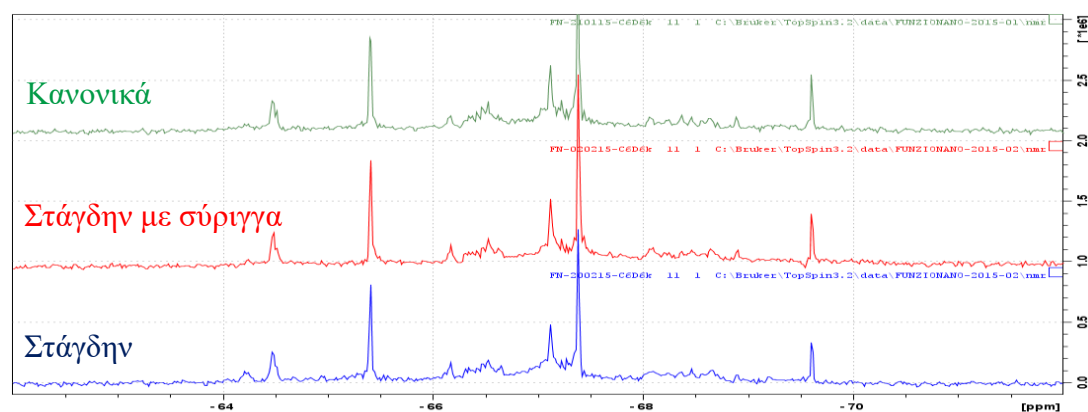
Στάγδην με σύριγγα: Το νερό προστίθεται με σύριγγα αλλά σταγόνα-σταγόνα μέσα σε διάστημα 30min.

Στάγδην: Η προσθήκη γίνεται στάγδην με χρήση σταγονομετρικής χοάνης.

Σταθερές παράμετροι: Συγκέντρωση (C₃), Νερό (EQ₄), Χρόνος αντίδρασης (2h), Θερμοκρασία (T₂)



Γράφημα 30: Επίδραση τρόπου προσθήκης νερού (-40ppm έως -72ppm)

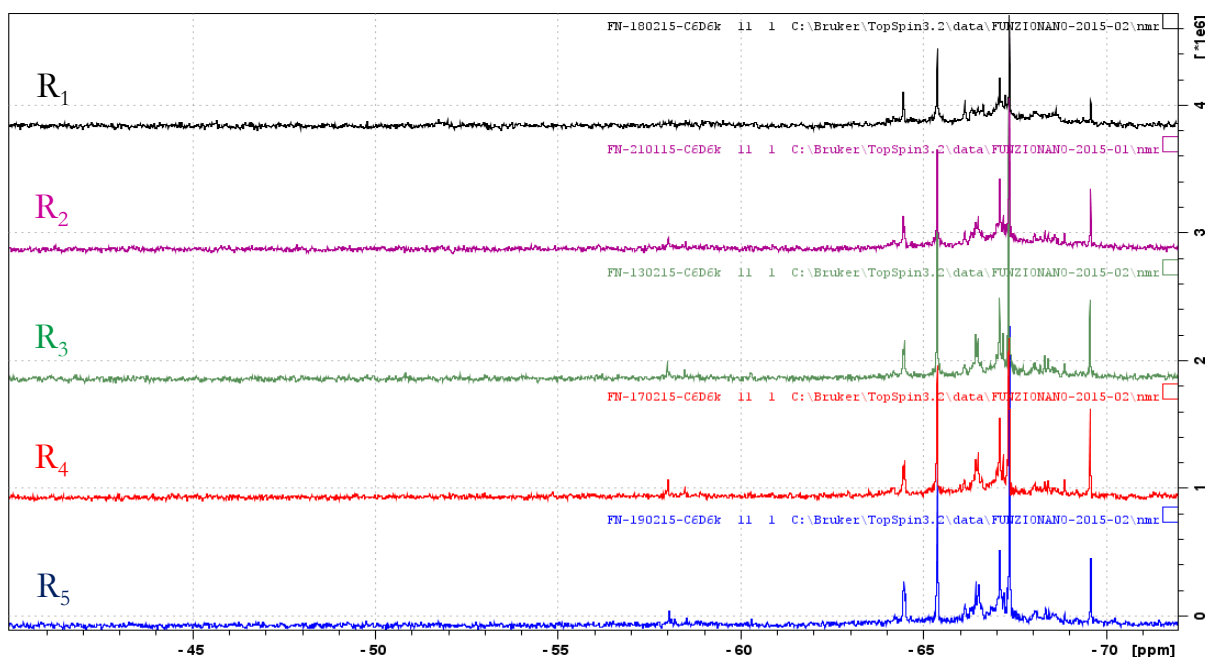


Γράφημα 31: Επίδραση τρόπου προσθήκης νερού (-60ppm έως -74ppm)

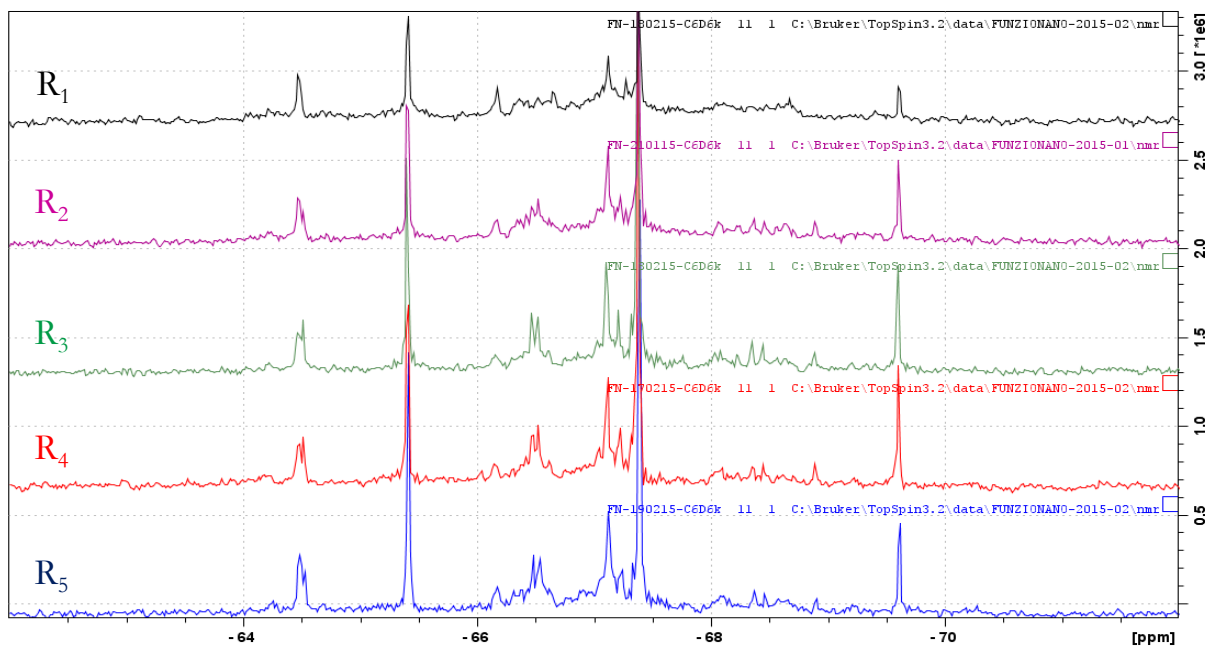
Όπως είναι προφανές, οι διαφορές που παρατηρούνται είναι αμελητέες οπότε ο συνηθισμένος τρόπος προσθήκης νερού με σύριγγα (όχι στάγδην) συνεχίστηκε να εφαρμόζεται για τα υπόλοιπα πειράματα.

3.5.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΡΟΝΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Σταθερές παράμετροι: Συγκέντρωση (C₃), Νερό (EQ₄), Θερμοκρασία (T₂)



Γράφημα 32: Επίδραση διαφορετικών χρόνων αντίδρασης (-40ppm έως -72ppm)

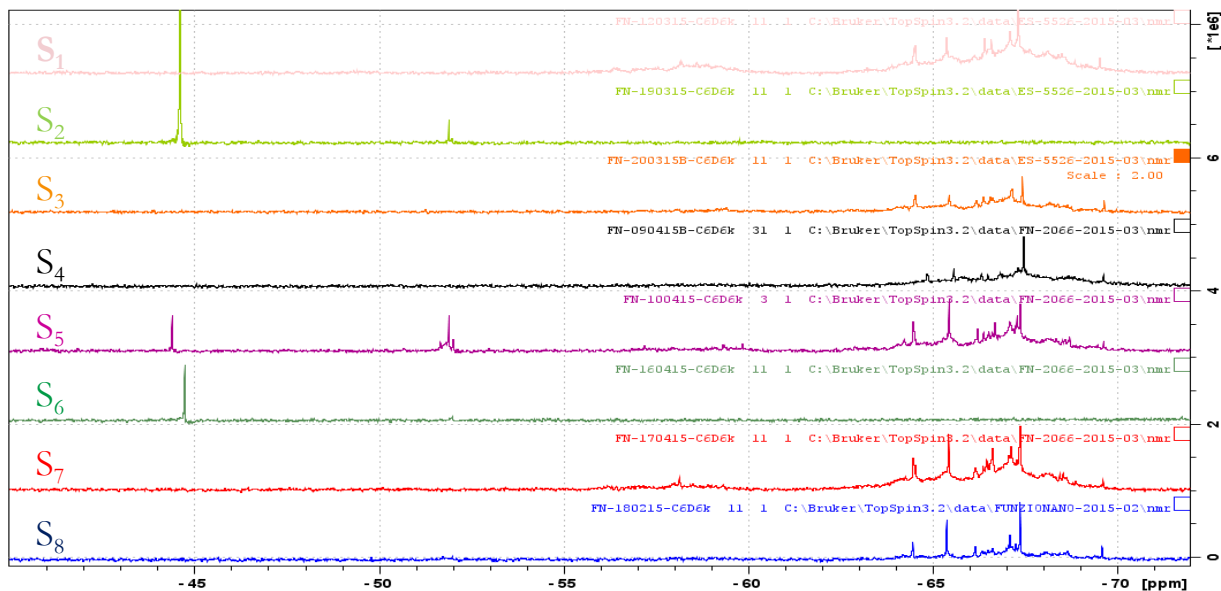


Γράφημα 33: Επίδραση διαφορετικών χρόνων αντίδρασης (-60ppm έως -74ppm)

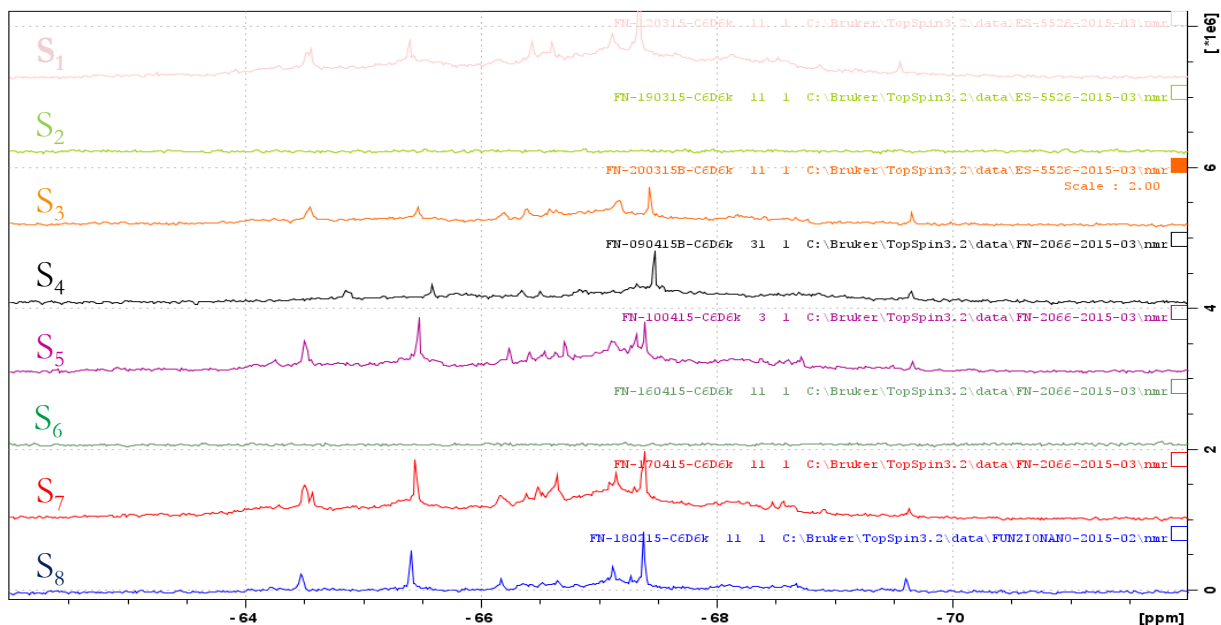
Ενώ θα ανέμενε κανείς την εμφάνιση των ανοιχτών δομών σε μικρότερους χρόνους αντίδρασης, φαίνεται στο R₁ που ήταν και ο μικρότερος χρόνος, ότι δεν υπάρχουν ανοιχτές δομές σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα. Επίσης, στο R₁ το εύρος και η αναλογία των κορυφών είναι αρκετά ικανοποιητική, συνεπώς δεν υπάρχει κάποιος λόγος για μεγαλύτερο χρόνο αντίδρασης.

3.5.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΛΥΤΗ

Σταθερές παράμετροι: Συγκέντρωση (C_3), Νερό (EQ₄), Θερμοκρασία: **θερμοκρασία βρασμού**, Χρόνος αντίδρασης (R_1)



Γράφημα 34: Επίδραση διαφόρων διαλυτών (-40ppm έως -72ppm)



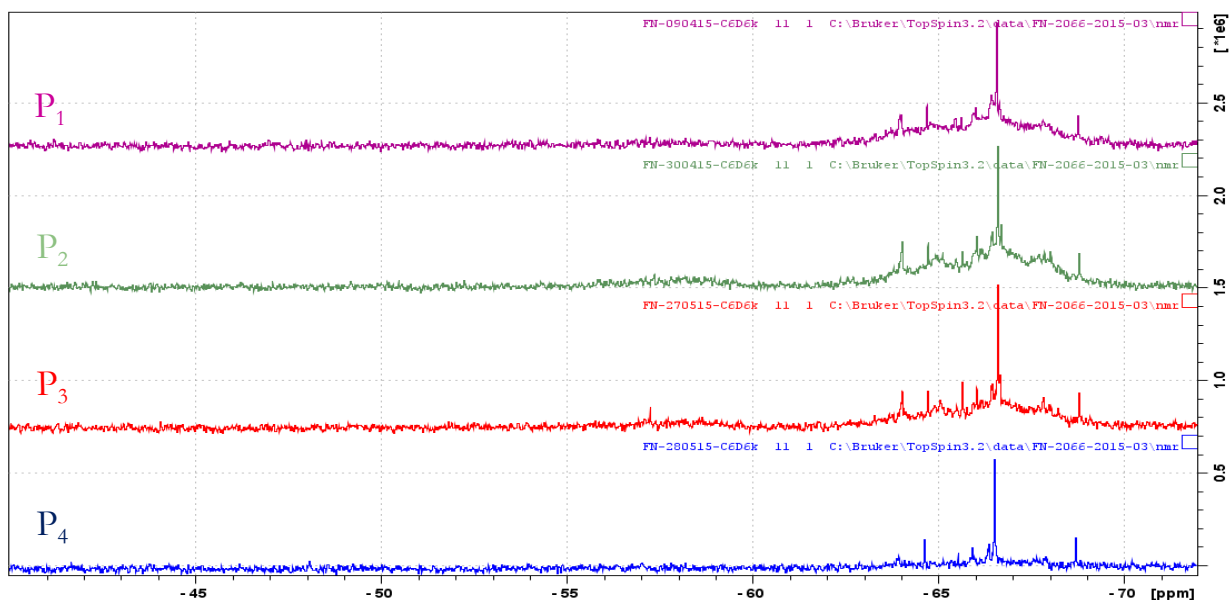
Γράφημα 35: Επίδραση διαφόρων διαλυτών (-60ppm έως -74ppm)

Η αναζήτηση του καταλληλότερου διαλύτη βάσει των γραφημάτων NMR ήταν απλή. Οι S₂, S₅, S₆ απορρίπτονται λόγω του ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του APS δεν έχει αντιδράσει και μάλιστα στα S₂ και S₆, η αντίδραση δεν έχει πραγματοποιηθεί καθόλου. Η επιλογή ανάμεσα στα υπόλοιπα, θα γίνει από το ζουμαρισμένο συγκριτικό γράφημα. Σε αυτό παρατηρείται ότι οι κορυφές των S₁, S₃, S₅ και S₇ έχουν πολύ μεγάλο πλάτος και δεν είναι τόσο καθορισμένες όσο των S₄ και λίγο λιγότερο S₈. Η βελτιστοποίηση λοιπόν θα συνεχιστεί με το διαλύτη S₄.

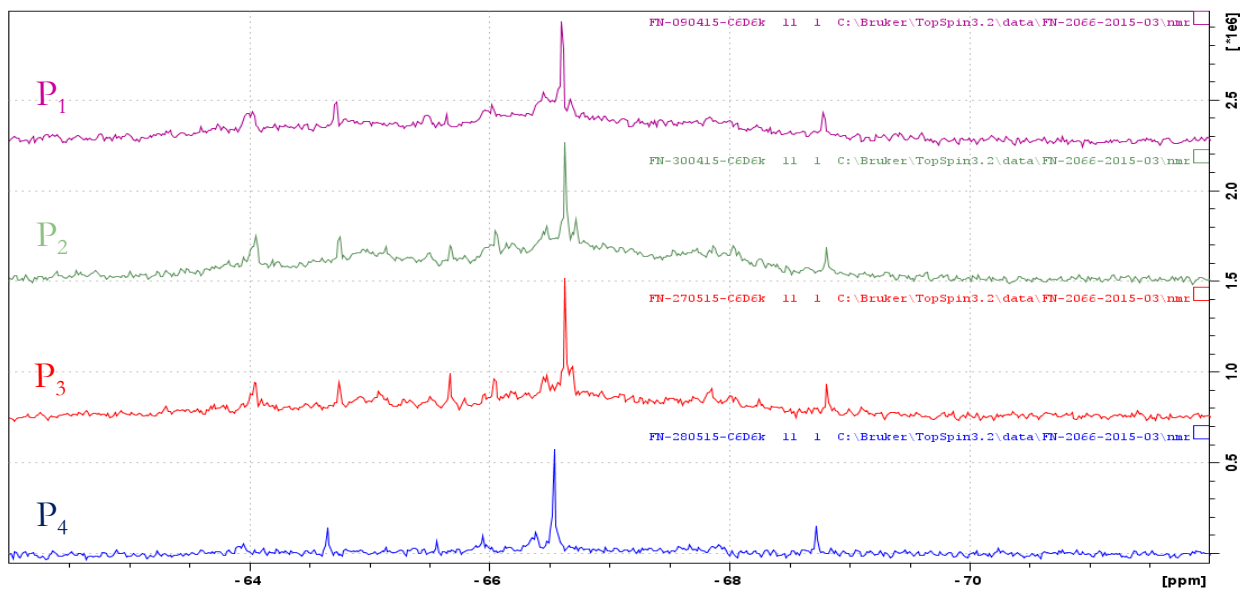
3.5.8 ΕΝΑΛΛΑΓΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ S_4

Η εναλλαγή των παραμέτρων περιελάμβανε κατά βάση εναλλαγή της αναλογίας των συγκεντρώσεων ανάμεσα στο APS και στον S_4 , καθώς και της θερμοκρασίας ανάμεσα στο σημείο ζέσεως και χαμηλότερη θερμοκρασία πιο κοντά στην T2.

Σταθερές παράμετροι: Διαλύτης (S_4), Νερό (EQ_4)



Γράφημα 36: Εναλλαγή παραμέτρων με διαλύτη S_4 (-40ppm έως -72ppm)



Γράφημα 37: Εναλλαγή παραμέτρων με διαλύτη S_4 (-60ppm έως -74ppm)

Στο P_4 , οι κορυφές είναι απόλυτα διακριτές, πιο ευθυγραμμισμένες με το υπόλοιπο γράφημα και δε φαίνεται να υπάρχουν ανοιχτές δομές ή APS που να μην έχει αντιδράσει. Συνεπώς το P_4 αποτελεί τη βέλτιστη μορφή POSS-NH₂ που έχει συντεθεί από την έναρξη των πειραμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 ΝΑΝΟΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ

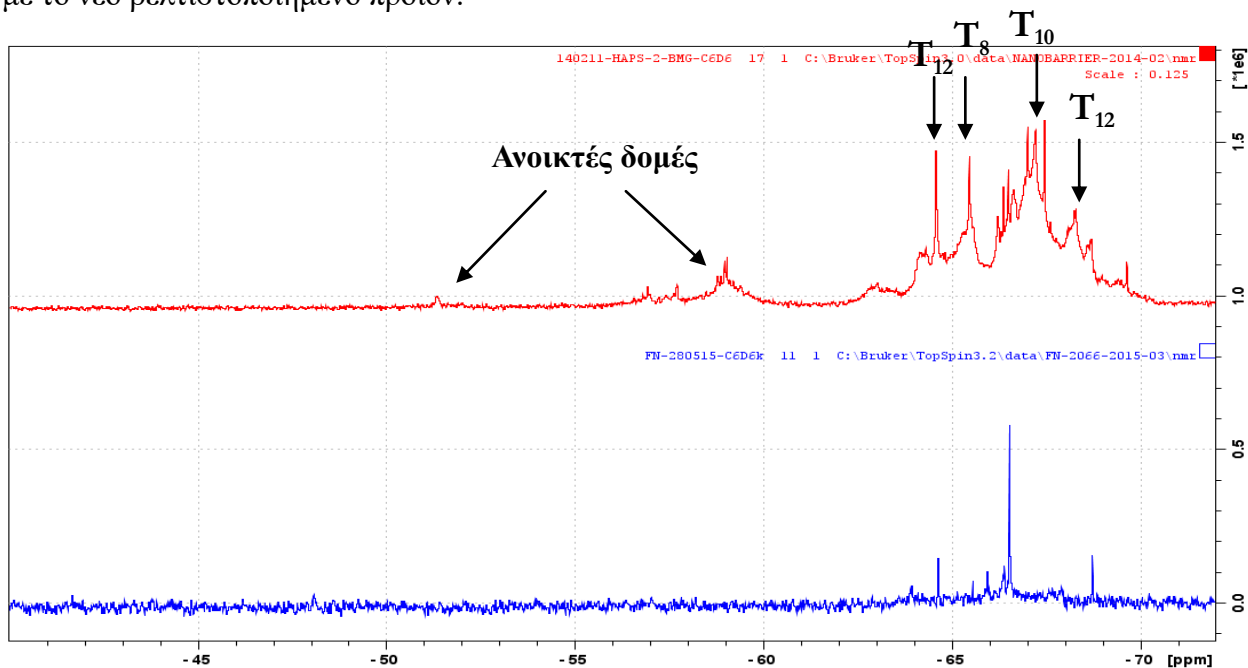
Λόγω του περιορισμένου χρόνου, δεν υπήρξε η δυνατότητα για την ολοκλήρωση των πειραμάτων μέχρι και τη σύζευξη του φαρμάκου στους υποψήφιους νανομεταφορείς. Εάν θα έπρεπε να επιλεγεί ένας νανομεταφορέας από τους προαναφερθέντες, αυτός θα ήταν με την αμφιτεριονική ένωση.

Η χρήση μιας ένωσης όπως είναι τα **αμφιτεριόντα**, που αποσκοπεί στην υπερπήδηση του μεγάλου εμποδίου της μειωμένης διαλυτότητας σε υδατικά διαλύματα, φαίνεται ενθαρρυντική. Η ένωση που συντέθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, **13**, δεν είχε την αναμενόμενη διαλυτότητα. Για το λόγο αυτό, ξεκίνησε και η σύνθεση της ίδιας ουσίας αλλά με λόγο αμφιτεριόντος ως προς το υδραζίδιο 50-50 με σκοπό να αυξηθεί η υδροφιλικότητα της ένωσης. Αυτή είναι και η χαμηλότερη δυνατή αναλογία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλους τους υποψήφιους νανομεταφορείς που συντέθηκαν, καθώς εάν το ποσοστό του υδραζιδίου και κατά συνέπεια και του DOX με το οποίο θα γίνει η σύζευξη στη συνέχεια είναι ακόμα μικρότερο από αυτό, δεν είναι ουσιαστική η ποσότητα του μεταφερόμενου φαρμάκου, άρα και τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

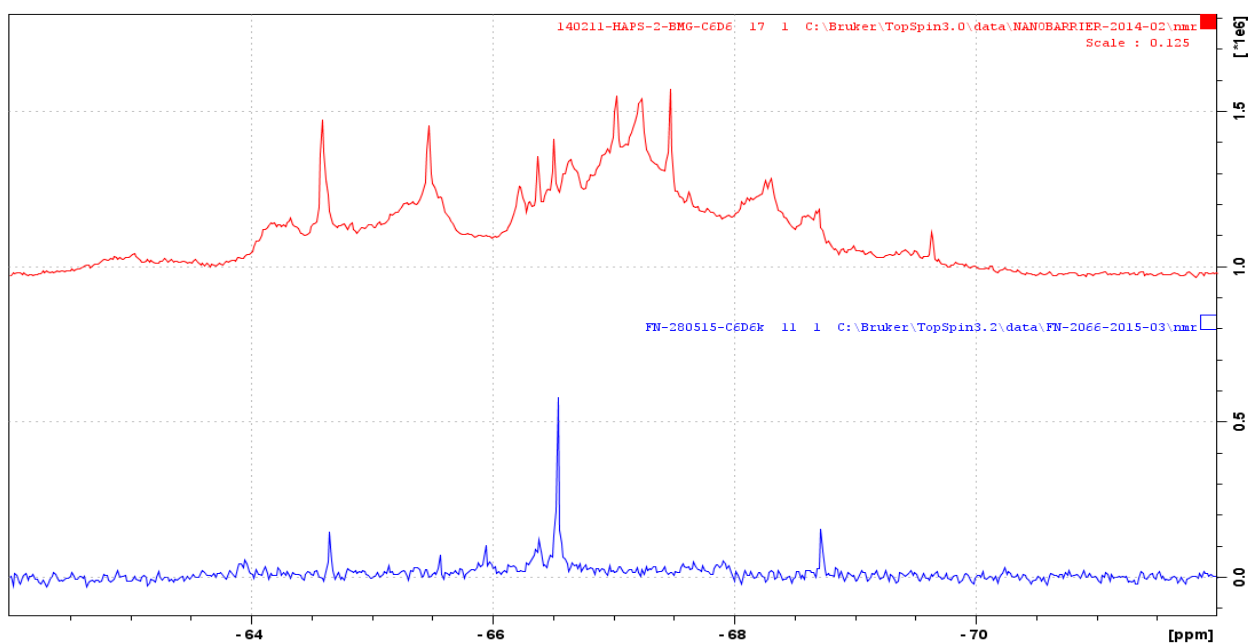
Εάν λοιπόν τα αποτελέσματα της νέας σύνθεσης είναι θετικά και η διαλυτότητα καλή, θα ακολουθήσει η σύζευξη της δοξορουβικίνης στις ομάδες υδραζίνης.

4.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ POSS-NH₂

Η συστηματική εναλλαγή των παραμέτρων όπως εφαρμόστηκε απέφερε τα επιθυμητά αποτελέσματα, τη βελτιστοποίηση δηλαδή σε μεγάλο βαθμό του POSS-NH₂. Το συμπέρασμα αυτό καθίσταται ακόμα πιο σαφές στο παρακάτω γράφημα, όπου παρατίθεται το NMR γράφημα του αμινο-POSS που συντίθεντο πριν την έναρξη αυτής της εργασίας σε σύγκριση με το νέο βελτιστοποιημένο προϊόν.



Γράφημα 38: Σύγκριση NMR αρχικού (κόκκινο) και βελτιωμένου (μπλε) POSS-NH₂ (-40ppm έως -72ppm)



Γράφημα 39: Σύγκριση NMR αρχικού (κόκκινο) και βελτιωμένου (μπλε) POSS-NH₂ (-60ppm έως -74ppm)

Είναι προφανής, λοιπόν, η διαφορά στη διάκριση και το εξαιρετικά **μειωμένο εύρος των κορυφών** ταυτόχρονα με τον **περιορισμό των ανοιχτών δομών**.

Παρά την αλματώδη μεταβολή της εικόνας που παρουσιάζει η ένωση $(\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}_{3/2})_8$, υπάρχουν περιθώρια για επιπρόσθετες μεταβολές.

Η συνθετική πορεία που επιλέχθηκε, παρατηρείται ότι δίνει **μικρό ποσοστό T₈** ενώ όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι κυβικές δομές των POSS είναι οι πιο επιθυμητές λόγω της σταθερότητάς τους. Συνεπώς επιδέχεται περαιτέρω έρευνας.

Μία ακόμα μεταβολή στο ήδη βελτιστοποιημένο προϊόν, θα μπορούσε να είναι η **επιλογή διαφορετικού διαλύτη**. Παρόλο που ο διαλύτης ο οποίος επιλέχθηκε ήταν εκείνος με τα φαινομενικά καλύτερα αποτελέσματα, η επιλογή του διαλύτη μιας ένωσης όπως είναι το αμινο-POSS, η οποία χρησιμοποιείται σε πληθώρα εφαρμογών, δεν είναι απλή υπόθεση. Εκτός από καλά αποτελέσματα, ο διαλύτης πρέπει να μην είναι πολύ δραστικός, ώστε να μην αντιδρά με όσες ουσίες έρθει σε επαφή και να έχει και ένα σχετικά χαμηλό σημείο ζέσεως. Χαμηλό σημείο ζέσεως συνεπάγεται γρήγορη, εύκολη απομάκρυνση του διαλύτη αλλά και πιο ασφαλής καθώς η ανάπτυξη υπερβολικά υψηλών θερμοκρασιών σε μεγαλύτερη κλίμακα και σε συνθήκες κενού, απαιτεί αρκετή προσοχή.

Συνεπώς, θα ήταν πολύ ενδιαφέρουσα η συνέχιση της βελτιστοποίησης με τον αμέσως επόμενο καλύτερο διαλύτη S₈.

4.3 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΈΡΕΥΝΑ

- ◆ Τα συστήματα στοχευμένης αποδέσμευσης φαρμάκου που βασίζονται σε στοχευμένους νανοφορείς έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε προκλινικά ζωικά μοντέλα. Παρόλα αυτά, το φαινόμενο της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης, η αναγνώριση των υποδοχέων, η απουσία αποικοδομησιμότητας καθώς και η ανεπαρκής βιοσυμβατότητα σε κλινικό στάδιο, είναι θέματα τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις παραμένουν αμφισβητήσιμα. Νανοφορείς με βελτιωμένη διείσδυση στους ιστούς και στόχευση θα μπορούσαν να αποτρέψουν τη βλάβη υγείων ιστών.
- ◆ Πολύπλοκα σχέδια μορίων καθιστούν την πιθανή ανάπτυξη φαρμακευτικού προϊόντος (διαδικασία παραγωγής, αναπαραγωγιμότητα, έλεγχος ποιότητας) αρκετά πολύπλοκη. Στόχος της έρευνας για νέους νανομεταφορείς, φάρμακα κλπ θα πρέπει να είναι μόρια με όσο το δυνατόν απλούστερη σύνθεση.⁵³
- ◆ Η συσσωμάτωση που προκύπτει φυσικά σε πολυμερικά συστήματα, αποτελεί ένα θέμα προς επίλυση για τα μόρια POSS τα οποία, παρά το μικρό τους μέγεθος, σχηματίζουν διασπορές νανοσωματιδίων που κυμαίνονται από 10-100nm σε διάμετρο.⁵⁴
- ◆ Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 5% της προσληφθείσας δόσης φαρμάκου θα καταλήξει στο στόχο.⁵⁵ Αυτό συμβαίνει όταν περισσότερο απ' το 95% της εγχυόμενης δόσης των νανοσωματιδίων με υδροδυναμική διάμετρο μεγαλύτερη από 10nm, θα διανεμηθεί σε διαφορετικά σημεία στο σώμα και πιθανόν να αποτελέσει και πηγή τοξικών αντιδράσεων. Η απαίτηση μικρότερης ποσότητας δειγμάτων σημαίνει ελαχιστοποίηση της επέμβασης στον ανθρώπινο οργανισμό για την εξαγωγή του δείγματος, που αποτελεί μία από τις κύριες επιδιώξεις της νανοϊατρικής.
- ◆ Φάρμακα τα οποία έχουν φτάσει στο σημείο των κλινικών δοκιμών, όπως για παράδειγμα το ThermoDOX, αποδεικνύουν ότι οι ενδογενείς διεγέρσεις είναι δύσκολα ελεγχόμενες καθώς τα χαρακτηριστικά τους μπορεί να διαφέρουν από τον έναν ασθενή στον άλλον, όπως λόγω χάρη το pH ενός όγκου ή η παρουσία ειδικών ανοσοκατασταλτικών παραγόντων στην κυκλοφορία του αίματος. Ως εκ τούτου, συστήματα στοχευμένης αποδέσμευσης φαρμάκων που συνδυάζουν **και εξωγενή και ενδογενή ερεθίσματα**, θα ήταν πιο αποτελεσματικά.
- ◆ Οι μελέτες της τοξικότητας των νανοσωματιδίων θα πρέπει επίσης να βελτιωθούν καθώς έχει υπάρξει περίπτωση ένδειξης τοξικότητας *in vitro* η οποία όμως δεν υπήρχε όταν τα νανοσωματίδια αυτά ελέγχθηκαν *in vivo*.⁵⁶

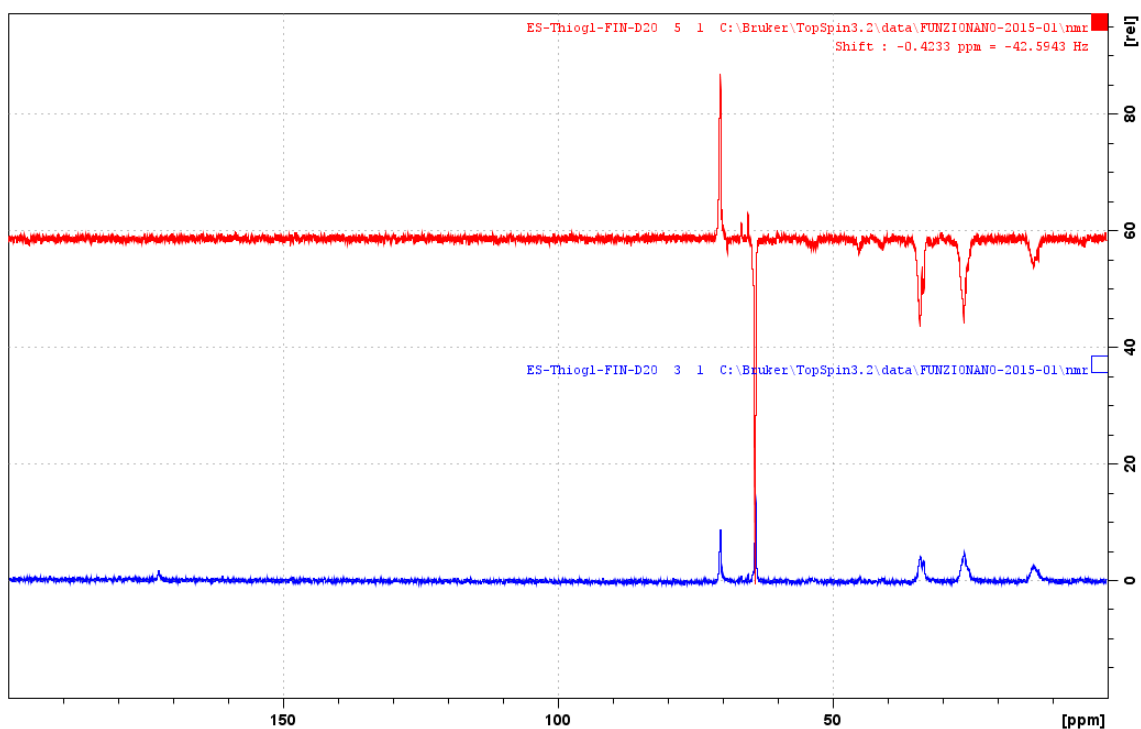
⁵³ Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB., Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem., Int. Ed., Engl.* 2001;40:2004–2021.

⁵⁴ G.Z. Li, L.C. Wang, H.L. Ni, C.U. Pittman, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 2001, 11, 123.

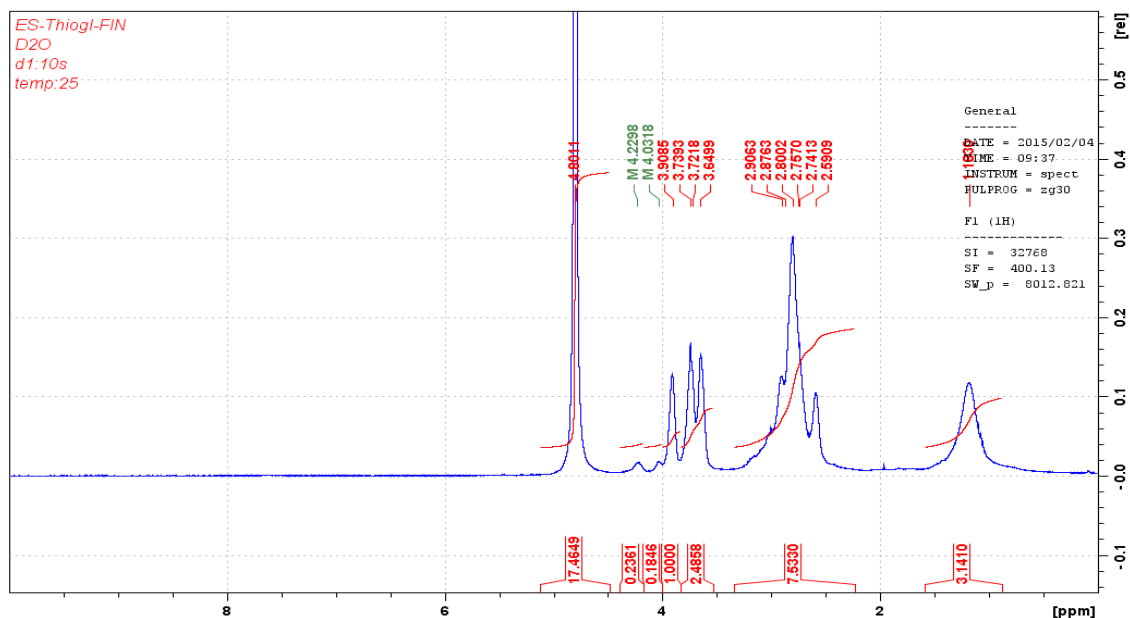
⁵⁵ Simona Mura, Julien Nicolas, Patrick Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nature Materials*, 2013, 12, 991-1003

⁵⁶ Ling Ye, Ken-Tye Yong, Liwei Liu et al., A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots, *Nature Nanotechnology*, 2012, 7, 453-458

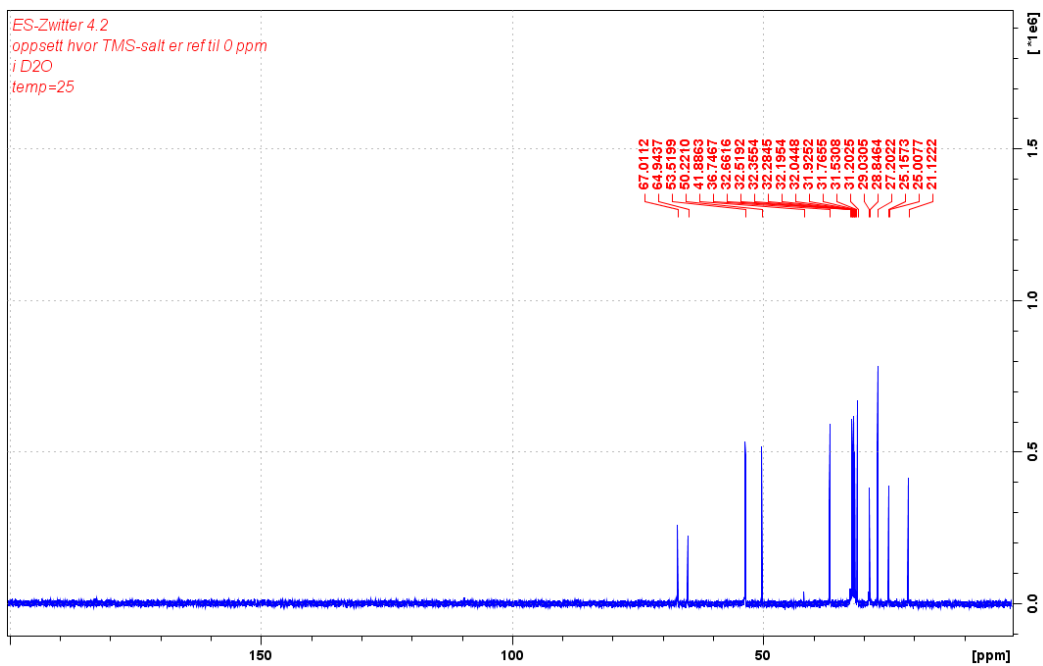
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



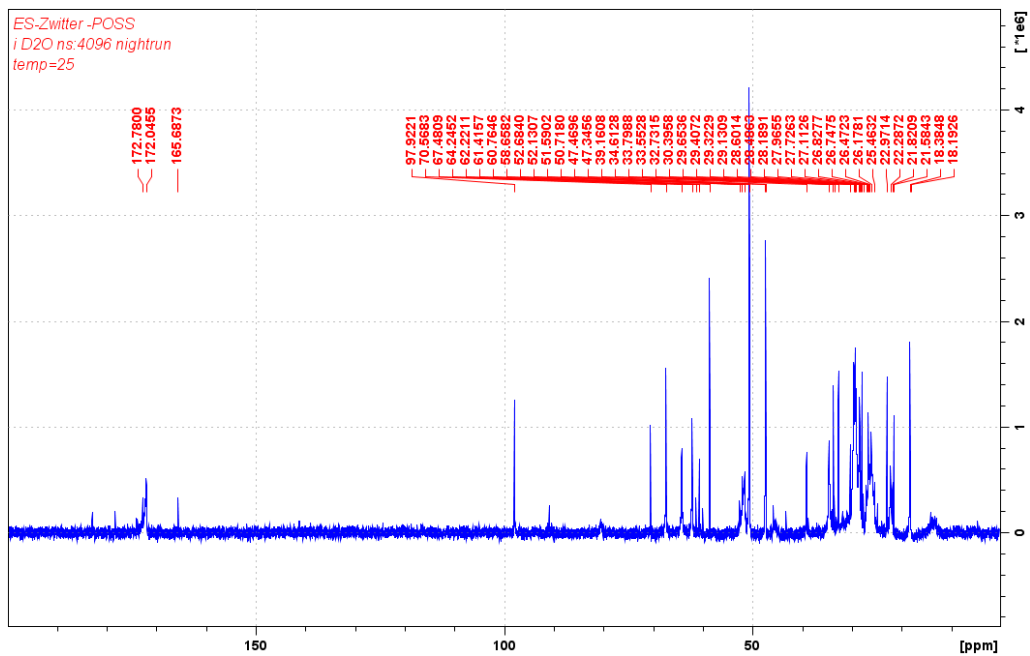
Γράφημα 40: Συγκριτικό ^{13}C NMR του **7**, 400MHz, (D_2O), πριν(κόκκινο) και μετά(μπλε) τον καθαρισμό



Γράφημα 41: ^1H NMR του **7**, 400MHz, (D_2O) μετά τον καθαρισμό



Γράφημα 42: ^{13}C NMR του **11**, 400MHz, (D_2O)



Γράφημα 43: ^{13}C NMR του **12**, 400MHz, (D_2O)