



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εγκλωβισμός Φαρμάκων σε Πολυπεπτίδια

ΒΑΡΛΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε ο εγκλωβισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου Everolimus σε αυτοοργανούμενες κυστιδιακές δομές, αποτελούμενες από το τρισυσταδικό τριπολυμερές PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL. Ο εγκλωβισμός σε αυτούς τους βιοσυμβατούς πολυμερικούς “μεταφορείς” πραγματοποιήθηκε με σκοπό η απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας στον οργανισμό να γίνεται στοχευμένα στα καρκινικά κύτταρα, με ελεγχόμενο τρόπο και αργό ρυθμό αποδέσμευσης, χωρίς παράλληλα την εκδήλωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών που μπορεί να εμφανίσει το φάρμακο κατά τη λήψη του σε μορφή δισκίου. Ο σχηματισμός των κυστιδίων πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους αυτοοργάνωσης σε υδατικό διάλυμα, την μέθοδο της διαπίδυσης και την μέθοδο της διαλυτοποίησης - εξάτμισης. Η σύγκριση των δύο αυτών μεθόδων ως προς την αποτελεσματικότητά τους (ποσοστό εγκλωβισμού και μέγεθος των νανοσωματιδίων) στηρίχτηκε στον μοριακό χαρακτηρισμό των πολυμερικών σωματιδίων μέσω των τεχνικών DLS και SEC, και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος της διαπίδυσης μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα. Τέλος, με την αξιοποίηση όλων των πλεονεκτημάτων αυτής της διαδικασίας και με περεταίρω ερεύνα πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο μπορούν να εξαχθούν σημαντικά φαρμακολογικά αποτελέσματα που αφορούν την θεραπεία κατά του παγκρεατικού καρκίνου.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοπολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: πολυπεπίδια, κυστίδια, everolimus, διαπίδυση, εγκλωβισμός φαρμάκων, τρισυσταδικά τριπολυμερή

ABSTRACT

In the present research project we studied the encapsulation of the anticancer drug Everolimus into self-assembled vesicle structures consisting of the triblock terpolymer PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL. The encapsulation in these biocompatible polymeric “carriers” was structured so that the release of the pharmaceutical substance in the system can be targeted at the cancer cells solely, in controlled manner and at slow release rate, without the presence of undesired side effects that can follow the oral intake of the drug as a tablet. The formation of the vesicles was achieved via two different methods of self-assembly in water solution, the method of dialysis and the method of solubilisation – evaporation. The comparison of these two methods as regards their effectiveness (percentage of encapsulation and size of the nanoparticles) was based on the molecular characterization of the polymeric particles using the DLS and SEC technics, and lead to the conclusion that the method of dialysis can yield better results. Finally, important pharmaceutical results concerning the treatment of pancreatic cancer can be reached by taking advantage of this procedure and by further research on the specific subject.

SUBJECT AREA: Biopolymers

KEY WORDS: polypeptides, vesicles, everolimus, dialysis, drug encapsulation, triblock terpolymers

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη	3
Abstract	4
Πίνακας Περιεχομένων	5
Κατάλογος Εικόνων	6
Κατάλογος Πινάκων	8
Συντομογραφίες	9
1. Εισαγωγή	11
2. Θεωρητικό Μέρος	13
2.1. Αμινοξέα – Πολυπεπίδια και Πρωτεΐνες	13
2.2. Σύνθεση Πολυπεπτιδίων – Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (ROP)	17
2.2.1. Μηχανισμός Αμίνης	18
2.2.2. Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς	19
2.2.3. Σύνθεση του Triblock PEO- <i>b</i> -(PHis-co-PBLG)- <i>b</i> -PLL	21
2.3. Εγκλωβισμός και Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμακευτικών Ουσιών	23
2.4. Τεχνικές Χαρακτηρισμού Πολυμερών	26
2.4.1. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC)	26
2.4.2. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	29
2.4.3. Z-Δυναμικό (Z-Potential)	31
2.5. Everolimus – Ιδιότητες, Μηχανισμός Δράσης και Παρενέργειες	33
3. Πειραματικό Μέρος	36
3.1. Διαπίδυση (Dialysis)	36
3.2. Μέθοδος Διαλυτοποίησης – Εξάτμισης	39
3.3. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών	42
3.4. Δυναμική Σκέδαση Φωτός	44
3.5. Z-Δυναμικό	46
3.6. Πειράματα <i>in vivo</i>	48
4. Αποτελέσματα – Συζήτηση	49
5. Συμπεράσματα	59
Βιβλιογραφία	60

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1.: Η δομή ενός α-αμινοξέος και το L ισομερές των πρωτεϊνών

Εικόνα 2.2.: Τα 20 βασικά αμινοξέα που συντελούν τις πρωτεΐνες

Εικόνα 2.3.: Η δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού

Εικόνα 2.4.: Η δομή μίας α-έλικας (απεικόνιση κορδέλας, πλάγια και εγκάρσια όψη αντίστοιχα)

Εικόνα 2.5.: Η δομή της β-πτυχωτής επιφάνειας

Εικόνα 2.6.: Η τυπική δομή ενός κυστιδίου (οι μπλε στιβάδες είναι υδρόφιλες, ενώ η κόκκινη υδρόφοβη)

Εικόνα 2.7.: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της διαπίδυσης (Dialysis)

Εικόνα 2.8.: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής SEC

Εικόνα 2.9.: Διαχωρισμός μακρομορίων διαφορετικού υδροδυναμικού όγκου

Εικόνα 2.10.: Τυπική διάταξη οργάνου της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)

Εικόνα 2.11.: Το δυναμικό των νανοσωματιδίων συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια τους

Εικόνα 2.12.: Ο συντακτικός τύπος του φαρμάκου Everolimus

Εικόνα 2.13.: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του Everolimus

Εικόνα 3.1.: Η πειραματική διάταξη της μεθόδου της διαπίδυσης (dialysis)

Εικόνα 3.2.: Τα διαλύματα "blank" και "everolimus" των κυστιδίων που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο dialysis

Εικόνα 3.3.: Η πειραματική διάταξη της μεθόδου διαλυτοποίησης - εξάτμισης

Εικόνα 3.4.: Η άμορφη στερεή μάζα που δημιουργήθηκε μετά την εκδίωξη του διαλύτη

Εικόνα 3.5.: Το διάλυμα "everolimus freeze" των κυστιδίων που παρασκευάστηκε με την μέθοδο της διαλυτοποίησης – εξάτμισης

Εικόνα 3.6.: Ο χρωματογράφος της εταιρίας Waters που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των δειγμάτων

Εικόνα 3.7.: Το φασματοφωτόμετρο της δυναμικής σκέδασης φωτός που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του μεγέθους των κυστιδίων

Εικόνα 3.8.: Το όργανο μέτρησης του Z-δυναμικού (Zetasizer 3000HS)

Εικόνα 3.9.: Πειραματόζωα στα οποία έχει γίνει ένεση δείγματος "blank" μέσω υδροτζέλ

Εικόνα 4.1.: Γράφημα DLS της κατανομής μεγεθών των κυστιδίων του δείγματος "dialysis"

Εικόνα 4.2.: Φωτογραφίες SEM του δείγματος που παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της διαπίδυσης

Εικόνα 4.3.: Γράφημα προσδιορισμού του Z-Δυναμικού (σε mV)

Εικόνα 4.4.: Χρωματογράφημα (SEC) 50μL πρότυπου δείγματος σε CHCl₃

Εικόνα 4.5.: Χρωματογράφημα (SEC) 100μL πρότυπου δείγματος σε CHCl₃

Εικόνα 4.6.: Χρωματογράφημα (SEC) 150μL άγνωστου δείγματος σε CHCl₃

Εικόνα 4.7.: Χρωματογράφημα (SEC) 250μL άγνωστου δείγματος σε CHCl₃

Εικόνα 4.8.: Χρωματογράφημα (SEC) 100μL πρότυπου δείγματος σε CHCl₃

Εικόνα 4.9.: Χρωματογράφημα (SEC) 200μL πρότυπου δείγματος σε CHCl₃

Εικόνα 4.10.: Χρωματογράφημα (SEC) 250μL πρότυπου δείγματος σε CHCl₃

Εικόνα 4.11.: Χρωματογράφημα (SEC) 200μL άγνωστου δείγματος σε CHCl₃

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Γενικά στοιχεία που αφορούν το φάρμακο Everolimus

Πίνακας 2: Πειραματικά αποτελέσματα DLS (μηχάνημα Autosizer 4700) για το δείγμα “dialysis” ($\theta=26.8^{\circ}\text{C}$)

Πίνακας 3: Πειραματικά αποτελέσματα DLS (μηχάνημα Zetasizer 3000HS) για το δείγμα “dialysis” ($\theta=25.0^{\circ}\text{C}$)

Πίνακας 4: Πειραματικά αποτελέσματα μέτρησης του Z-Δυναμικού

Πίνακας 5: Πειραματικά αποτελέσματα από τη μέθοδο SEC για το δείγμα "dialysis"

Πίνακας 6: Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων DLS του δείγματος "freeze" σε $\theta=25^{\circ}\text{C}$

Πίνακας 7: Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων DLS του δείγματος "freeze" σε $\theta=37^{\circ}\text{C}$

Πίνακας 8: Πειραματικά αποτελέσματα από τη μέθοδο SEC για το δείγμα "freeze"

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DLS	Δυναμική Σκέδαση Φωτός Dynamic Light Scattering
PHis	πολυιστιδίνη polyistidine
PLL	πολυ-L-λυσίνη poly-L-lysine
PEO	πολυαιθυλενοξείδιο polyethylene oxide
PBLG	πολυ(γ-βενζυλο-d7 L-γλουταμινικό οξύ) poly(γ-benzyl-d7 L-glutamate)
tris	τρικς(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο tris(hydroxymethyl)aminomethane
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο dimethylsulfoxide
SEC	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών Size Exclusion Chromatography
CHCl ₃	χλωροφόρμιο chloroform
Et ₃ N	τριαιθυλαμίνη triethylamine

mTOR	Στόχος της Ραπαμυκίνης στα Θηλαστικά Mammalian Target of Rapamycin
DMF	διμεθυλοφορμαμίδιο dimethylformamide
D_t	Συντελεστής Διάχυσης Diffusion Coefficient
R_h	Υδροδυναμική Ακτίνα Hydrodynamic Radius
I	Δείκτης Πολυδιασποράς Polydispersity Index
ROP	Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου Ring-Opening Polymerization
NCA	N-καρβοξυανυδρίτης N-carboxyanhydrides
SEM	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης Scanning Electron Microscopy

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις προηγούμενες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί τεράστια ανάπτυξη στη χημεία των πεπτιδίων σε σχέση όχι μόνο με την απομόνωση, σύνθεση, ταυτοποίηση δομής και διαλεύκανση του τρόπου δράσης των πεπτιδίων, αλλά επίσης και στην εφαρμογή τους ως εργαλεία στο πλαίσιο των επιστημών υγείας. Τα πεπτίδια παρουσιάζουν ενδιαφέρον όχι μόνο στη βιοχημεία, αλλά και στη βιολογία, τη φαρμακευτική χημεία, τη βιοτεχνολογία και γονιδιακή τεχνολογία.¹

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αναπτύσσεται επίσης, τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο, για την παρασκευή βιοσυμβατών και βιοδιασπώμενων πολυμερών. Τα πολυπεπτίδια, είναι από τα κυριότερα πολυμερή αυτής της κατηγορίας, και πλήθος ερευνών έχουν διενεργηθεί πάνω στην σύνθεση, την διαμόρφωση και τις ιδιότητες τους. Το γεγονός αυτό δεν είναι τυχαίο, αν αναλογιστεί κανείς ότι οι πρωτεΐνες είναι τα πιο διαδεδομένα πολυμερή στη φύση, με την εξαιρετική ικανότητα που διαθέτουν, να οργανώνονται σε περίπλοκες τρισδιάστατες δομές.

Από την δεκαετία κιόλας του 50', αναπτυχθήκαν πολλές μέθοδοι για την σύνθεση πεπτιδίων. Όμως μέχρι και σήμερα, η αποδοτικότερη, γρηγορότερη και οικονομικότερη τεχνική για την σύνθεση μεγάλου μοριακού βάρους πολυπεπτιδίων χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, περιλαμβάνει την διάνοιξη δακτυλίου N-καρβοξυ-ανυδριτών των α -αμινοξέων (NCA's),^{2,3} μέθοδος που αναπτύσσεται στο Κεφάλαιο 2.2 και η οποία εφαρμόστηκε για τη σύνθεση του τρισυσταδικού τριπολυμερούς (triblock) PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πόνημα.

Τα αμφίφιλα κατά συστάδες τριπολυμερή, μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα σε υδατικό διάλυμα, και να οργανωθούν σε μικκύλια,^{4,5} διπλοστιβάδες και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ακόμα και κυστίδια ανάλογα με το μέγεθος του υδρόφοβου και υδρόφιλου τμήματος τους.^{6,7} Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πολυμερικοί μεταφορείς που έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν υδρόφοβα φάρμακα (π.χ. everolimus, paclitaxel), αυξάνοντας τον χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα και οδηγώντας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου στον οργανισμό (Κεφάλαιο 2.3).

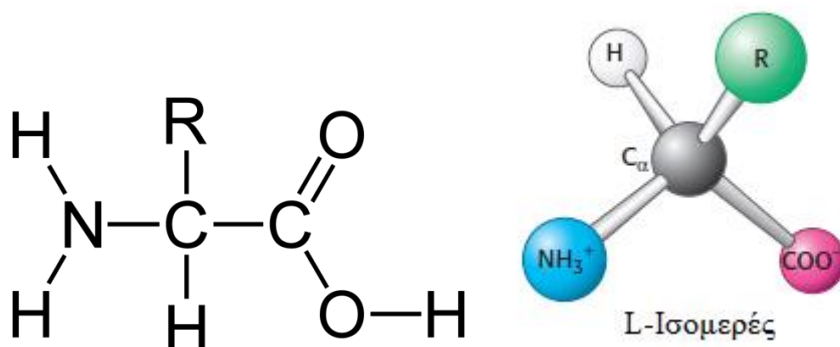
Σε αυτό το ερευνητικό πλαίσιο κινείται και το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας, κατά τη διάρκεια της οποίας πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές εγκλωβισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου Everolimus, η δράση του οποίου εξειδικεύεται στην θεραπεία του παγκρεατικού καρκίνου. Σε δεύτερο στάδιο μελετήθηκε η διαδικασία της συσσωμάτωσης του τριπολυμερούς μέσω των πειραματικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC) (Κεφάλαια 3 και 4), καταλήγοντας σε συμπεράσματα για τα πλεονεκτήματα της μίας μεθόδου έναντι της άλλης.

Τέλος, απώτερος σκοπός του επιβλέποντος της παρούσας εργασίας κ. Ιατρού και των συνεργατών του είναι η στοχευμένη εναπόθεση του φαρμάκου μέσω αυτών των pH-αποκρινόμενων νανομεταφορέων στους καρκινικούς στόχους, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι στην περιοχή κοντά στα καρκινικά κύτταρα το pH είναι χαμηλότερο του φυσιολογικού. Εισάγοντας με αυτό τον τρόπο μία πρωτότυπη ιδέα στον τομέα Πολυμερών και της Βιοτεχνολογίας, η οποία μπορεί να αναπτυχθεί με περεταίρω ερευνά οδηγώντας σε αποτελέσματα ικανά να δώσουν ένα τέλος στη μάστιγα του καρκίνου.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

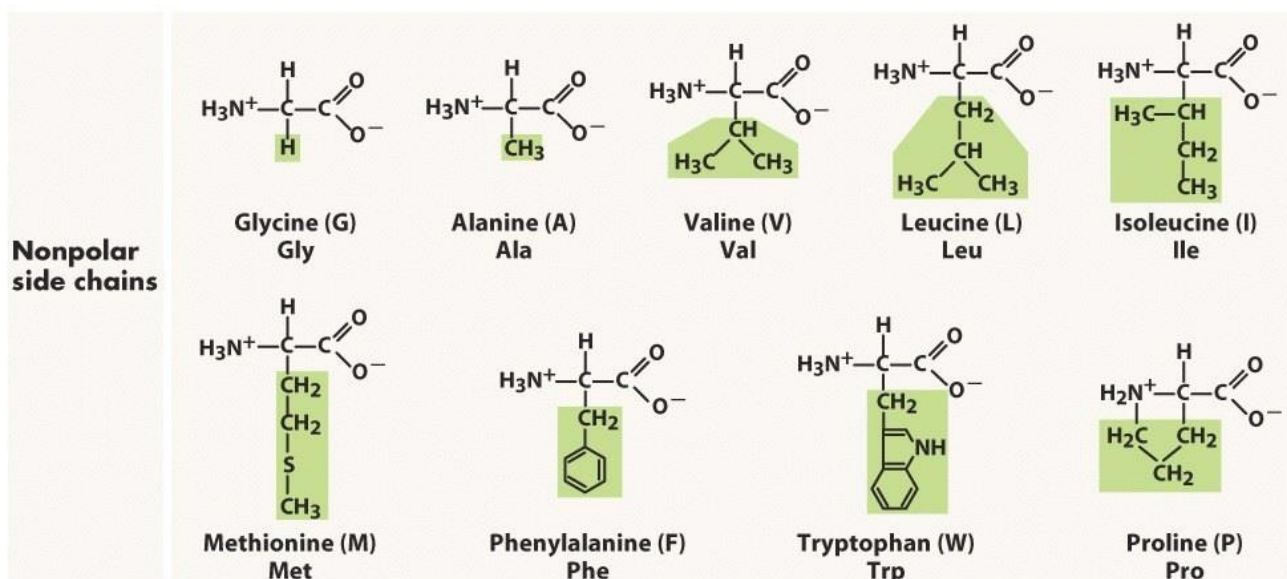
2.1. ΑΜΙΝΟΞΕΑ – ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Τα αμινοξέα είναι οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών και των πολυπεπτιδίων. Ένα α-αμινοξύ αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, συνδεδεμένο με μία αμινομάδα, μία καρβοξυλική ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μία χαρακτηριστική για το κάθε αμινοξύ πλευρική ομάδα R. Λόγω των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες με το άτομο του α-άνθρακα, τα α-αμινοξέα είναι χειρόμορφα. Μάλιστα μόνο τα L-αμινοξέα απαντούν στις πρωτεΐνες.^{8,9}



Εικόνα 2.1.: Η δομή ενός α-αμινοξέος και το L ισομερές των πρωτεϊνών

Υπάρχουν είκοσι διαφορετικά είδη πλευρικών ομάδων, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το σχήμα, το μέγεθος, το φορτίο, την υδροφοβικότητα-υδροφιλικότητα και τη χημική αντιδραστικότητα. Συνεπώς, όλες οι πρωτεΐνες είναι δομημένες από τα ίδια 20 αμινοξέα.^{8,9} Τα είκοσι αυτά βασικά αμινοξέα παρατίθενται ακολούθως:



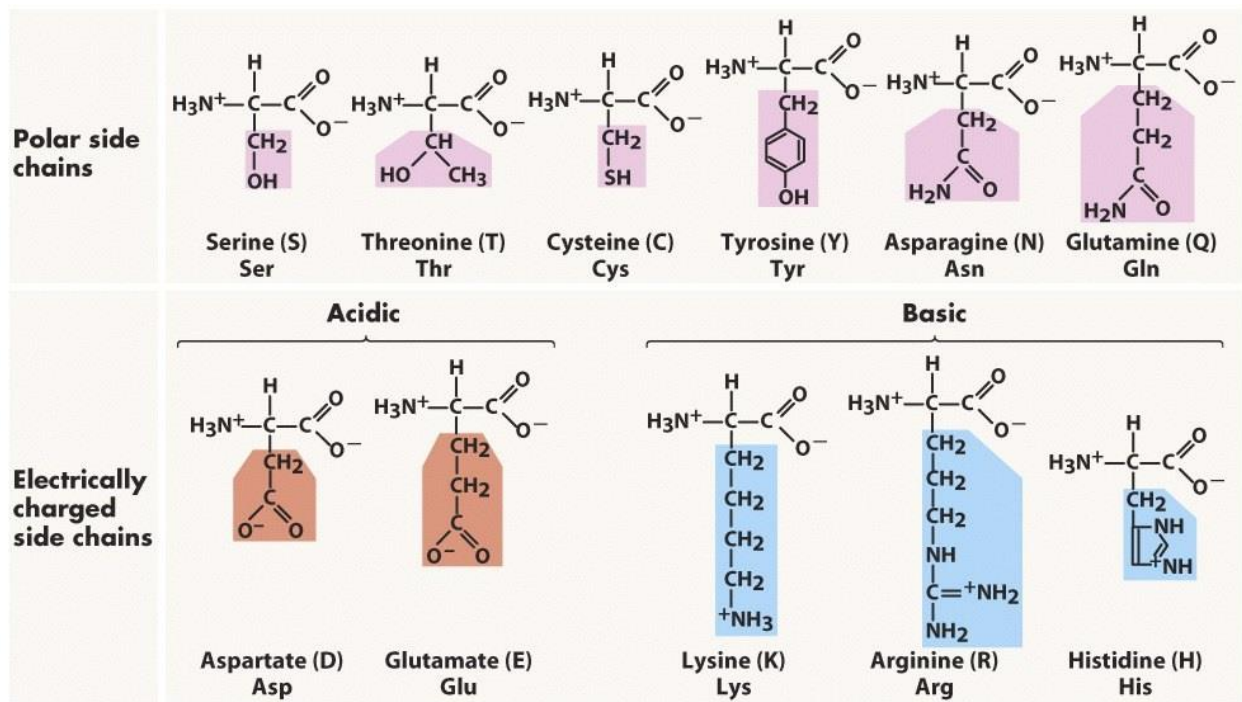
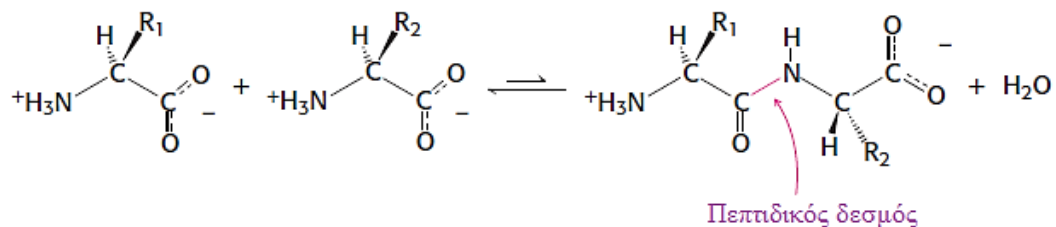


Figure 3-5 Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Εικόνα 2.2.: Τα 20 βασικά αμινοξέα που συντελούν τις πρωτεΐνες

Η σύνδεση της καρβοξυλικής ομάδας ενός αμινοξέος με την αμινική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος συντελεί στη δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού (ονομάζεται και αμιδικός δεσμός), με παράλληλη απώλεια ενός μορίου ύδατος.⁸



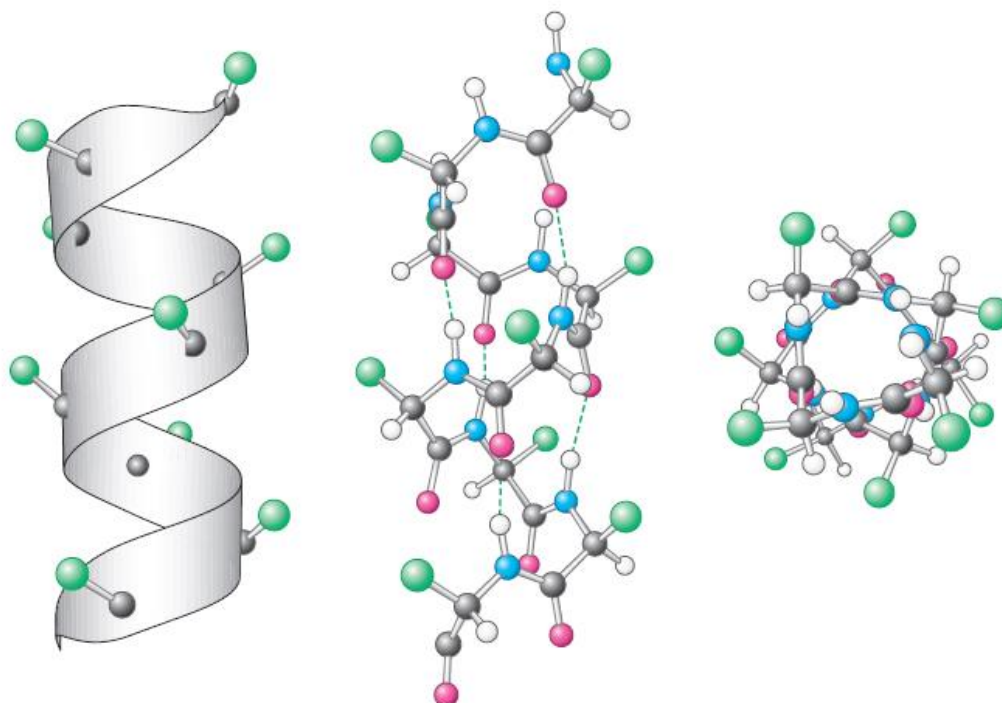
Εικόνα 2.3.: Η δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού

Αξίζει να αναφερθεί ότι ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ του καρβονυλίου και του αζώτου είναι άκαμπτος και επίπεδος έχοντας χαρακτήρα μερικώς διπλού δεσμού (1.32 Å). Το γεγονός αυτό εμποδίζει την ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον δεσμό αυτό και μειώνει την δραστηριότητα του, καθιστώντας τον κινητικά σταθερό.¹⁰

Η βασική διαφορά μεταξύ των πολυπεπτιδίων και των πρωτεϊνών είναι ότι τα πολυπεπτίδια είναι βιοπολυμερή που δημιουργούνται από επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες (μονομερή) ενός μόνο είδους αμινοξέος, ενώ οι πρωτεΐνες είναι σύνολα διαφόρων αμινοξέων με αυστηρά καθορισμένη αλληλουχία (πρωτοταγή δομή).^{11,12}

Βέβαια, αν και τα συνθετικά πολυπεπίδια χαρακτηρίζονται από πολυμοριακότητα, σε αντίθεση με τις φυσικές πρωτεΐνες, έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται και να αποκτούν δευτεροταγή δομή ανάλογη με αυτή των πρωτεϊνών, όπως η α -έλικα που σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου και τα β -φύλλα που αναπτύσσουν δεσμούς υδρογόνου διαμοριακά.¹³⁻¹⁵

Η α -έλικα είναι μία ραβδόμορφη δομή. Ο κορμός που αποτελείται από την κύρια πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει σχήμα σπειράματος και σχηματίζει το εσωτερικό της ράβδου, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες εκτείνονται προς το εξωτερικό σε μία ελικοειδή διάταξη. Η α -έλικα όπως προαναφέρθηκε σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ομάδων $-NH$ και $-CO$ της κύριας αλυσίδας, οι οποίες απέχουν 4 κατάλοιπα ή μία από την άλλη, με κάθε κατάλοιπο να απέχει από το επόμενο 1.5 Å και να είναι περιστρεμμένο κατά 100° σε σχέση με τον κύριο άξονα δίνοντας έτσι 3.6 κατάλοιπα αμινοξέων ανά στροφή της έλικας. Οι δεξιόστροφες έλικες είναι περισσότερο ευνοούμενες ενεργειακά διότι παρουσιάζουν λιγότερες στερεοχημικές παρεμποδίσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων και του κορμού. Έτσι λοιπόν, όλες οι α -έλικες που απαντούν στις πρωτεΐνες είναι δεξιόστροφες.^{8,16}



Εικόνα 2.4.: Η δομή μίας α -έλικας (απεικόνιση κορδέλας, πλάγια και εγκάρσια όψη αντίστοιχα)

Το άλλο σύνηθες δομικό μοτίβο των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και των πρωτεϊνών είναι η β -πτυχωτή επιφάνεια (ή β -φύλλο). Είναι μία δομή ανοικτή και επίπεδη με τους δεσμούς υδρογόνου να σχηματίζονται διαμοριακά μεταξύ $-NH$ και $-CO$ διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι $3,5 \text{ \AA}$ (σε αντίθεση με το $1,5 \text{ \AA}$ της α -έλικας), ενώ οι γειτονικές αλυσίδες σε μία β -πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλες). Τα β -φύλλα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλία από τις α -έλικες, μπορεί να είναι ευθεία ή να εμφανίζονται με την κάθε πτύχωση ελαφρά περιστρεμμένη.^{8,16}

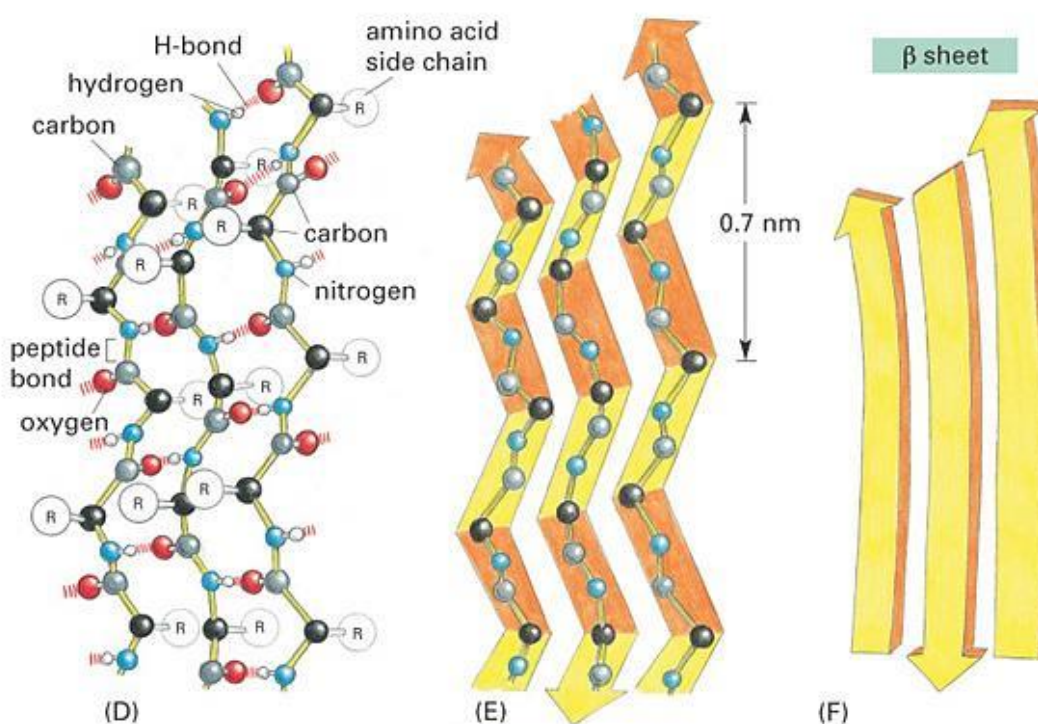


Figure 4-10 part 2 of 2 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

Εικόνα 2.5.: Η δομή της β -πτυχωτής επιφάνειας

Αυτές οι δευτεροταγείς δομές συμβάλλουν σημαντικά στην αυτο-οργάνωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, οδηγώντας σε νέες υπερμοριακές δομές με πιθανές βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές.

Τα πολυπεπτίδια έχουν αποτελέσει αντικείμενο εντατικών μελετών λόγω του θεμελιώδη ρόλου τους στον εγκλωβισμό και στην ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών που έχουν σχεδιαστεί για χρήση στη γονιδιακή και αντικαρκινική θεραπεία.^{17,18}

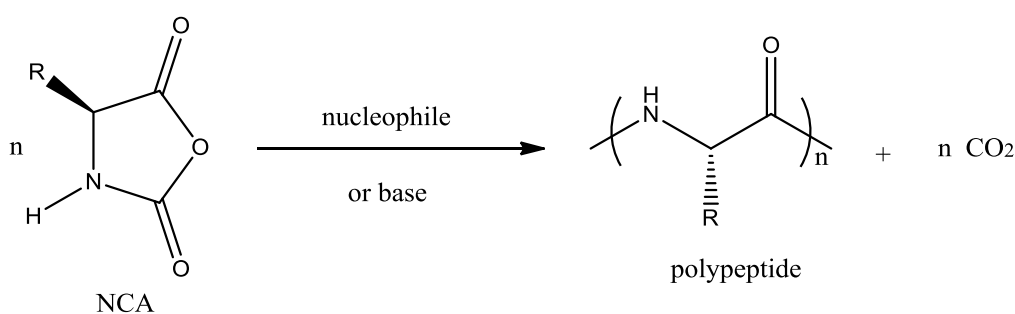
2.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ – ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΝΟΙΞΗΣ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ (RING-OPENING POLYMERIZATION, ROP)

Εκτός από την παρασκευή συνθετικών πεπτιδίων με απόλυτα καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων (πρωτοταγή δομή), την τελευταία δεκαετία παρουσιάζει ενδιαφέρον η δημιουργία πεπτιδίων χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία. Το ενδιαφέρον αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα πολυμερή αυτά είναι βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα και συνεπώς βρίσκουν μεγάλο αριθμό εφαρμογών.^{16,19,20}

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους με καθορισμένο βαθμό πολυμερισμού, μοριακή σύσταση και άρα συγκεκριμένες ιδιότητες, που να μπορούν να μιμηθούν επαρκώς τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών, περιλαμβάνει τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N-καρβοξυανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων.^{10,13}

Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου αποτελεί το είδος πολυμερισμού κατά το οποίο η τελική μακρομοριακή αλυσίδα προέρχεται από ένα κυκλικό πρόδρομο μονομερές, κατόπιν διάνοιξης του δακτυλίου του. Μάλιστα για την περίπτωση των NCAs αυτό το είδος πολυμερισμού είναι συντομότερο, οικονομικότερο και μπορεί να δώσει ένα μεγάλο αριθμό παραγώγων πολυπεπτιδίων σε σχέση με άλλες συνθετικές πορείες, χωρίς την ανεπιθύμητη λήψη ρακεμικού μίγματος των δύο οπτικών αντιπόδων των αμινοξέων.^{10,21,22}

Ο πολυμερισμός των NCAs πραγματοποιείται βάσει της ακόλουθης γενικής αντίδρασης:



Βέβαια, για να επιτευχθεί ο πολυμερισμός των NCAs των αμινοξέων θα πρέπει τα αντιδραστήρια και κυρίως οι ανυδρίτες, οι οποίοι είναι σε στερεή μορφή, να καθαριστούν ενδελεχώς από προσμίξεις με επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις κάτω από υψηλό κενό (High Vacuum Techniques). Χρησιμοποιώντας τις τεχνικές υψηλού κενού ο πολυμερισμός χαρακτηρίζεται ως ζωντανός (απαραίτητη προϋπόθεση για την διατήρηση του ζωντανού χαρακτήρα του πολυμερισμού είναι η

ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου CO_2) και τα πολυπεπίδια που λαμβάνονται έχουν καλά καθορισμένες ιδιότητες.^{10,13,15}

Για την πραγματοποίηση της διάνοιξης του δακτυλίου χρησιμοποιούνται ως απαρχητές είτε πρωτοταγείς αμίνες που είναι ισχυρότερα πυρηνόφιλα παρά βάσεις, ή τριτοταγείς αμίνες και αλκοξειδία μετάλλων που είναι ισχυρότερες βάσεις και έτσι μπορούν να δώσουν πολυπεπίδια μεγάλου μοριακού βάρους.^{13,16}

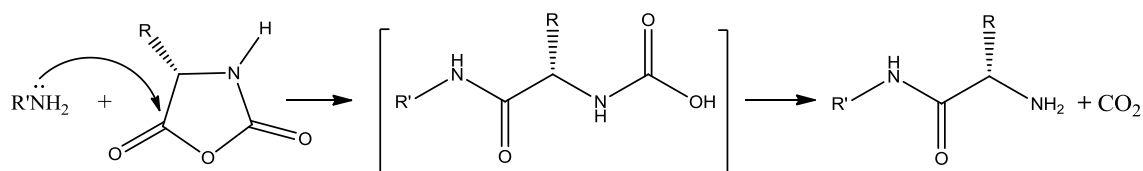
Με βάση το είδος του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί, υπάρχουν δύο κύριες μηχανιστικές πορείες ώστε να παραχθούν τα πολυπεπίδια. Ο πρώτος μηχανισμός είναι γνωστός ως μηχανισμός αμίνης ή κανονικός μηχανισμός (“normal amine”), ενώ ο δεύτερος είναι ο μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (“activated monomer”).^{13,16}

2.2.1. Μηχανισμός Αμίνης (Normal Amine Mechanism):

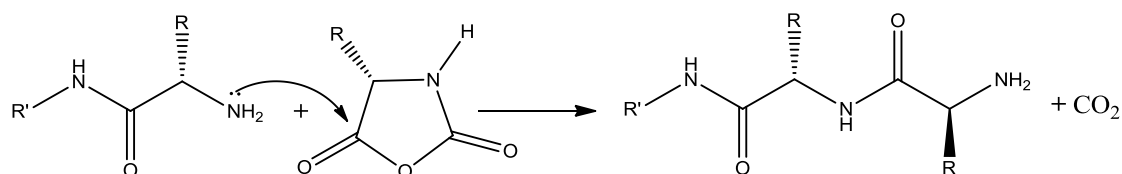
Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται γενικά για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση μη ιοντικών απαρχητών που διαθέτουν τουλάχιστον ένα άτομο υδρογόνου το οποίο μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα (του τύπου βάση-H), όπως είναι οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες (π.χ. η *n*-εξυλαμίνη). Οι απαρχητές αυτοί δρουν ως πυρηνόφιλα με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται κατάλοιπα τους στις τελικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες.^{10,23,24}

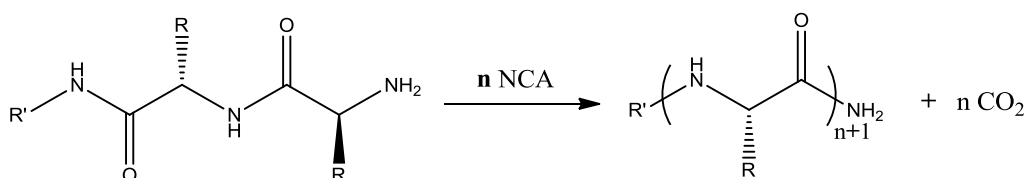
Τα στάδια της έναρξης και της διάδοσης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού δείχνονται ακολούθως:

Στάδιο Έναρξης



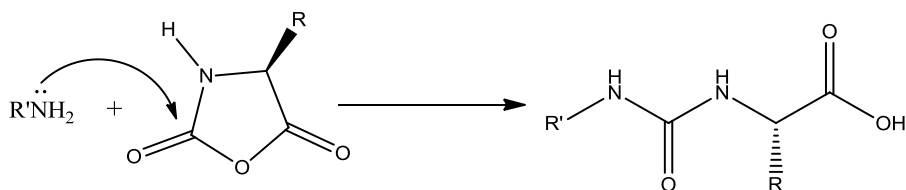
Στάδιο Διάδοσης





Όπως φαίνεται κατά το στάδιο της έναρξης ο πυρηνόφιλος απαρχητής προσβάλλει το καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Το ενδιάμεσο καρβαμιδικό οξύ που παράγεται είναι θερμοδυναμικά ασταθές και αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια ελεύθερη αμινομάδα και εκλυόμενο CO₂. Στο στάδιο της διάδοσης τελική αμινομάδα λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο προσβάλλοντας το καρβονύλιο της θέσης 5 ενός δεύτερου μορίου NCA και η πορεία συνεχίζεται μέχρι πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς.^{13,25}

Βέβαια, εκτός της προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 5 κατά το στάδιο της έναρξης, μπορεί να πραγματοποιηθεί παράπλευρη αντίδραση με προσβολή στη θέση 2 προς σχηματισμό ουρείδο οξέος.



Με αυτό τον τρόπο επέρχεται πρόωρος τερματισμός του πολυμερισμού καθώς η αμίνη δεν μπορεί να αναγεννηθεί. Το ποσοστό πραγματοποίησης της αντίδρασης τερματισμού μειώνεται όσο ισχυρότερο πυρηνόφιλο είναι ο απαρχητής που θα χρησιμοποιηθεί.¹³

2.2.2. Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (Activated Monomer Mechanism):

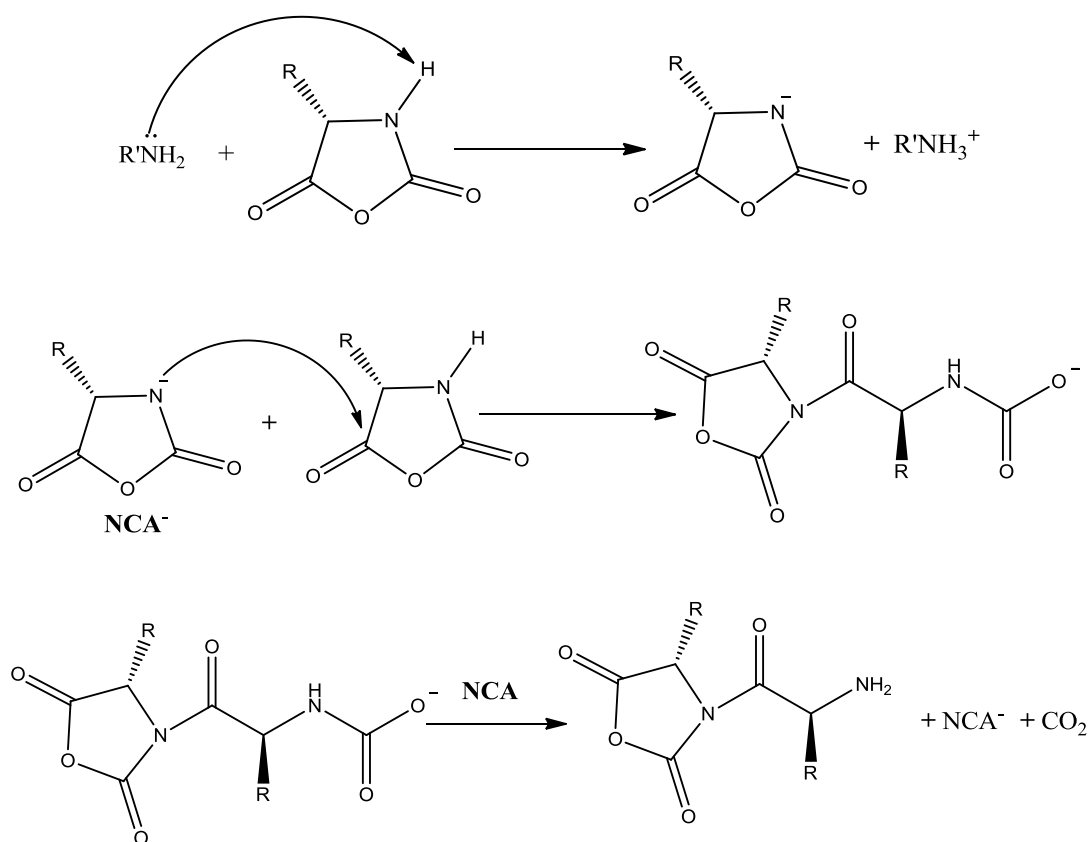
Αυξάνοντας την βασικότητα του απαρχητή, χρησιμοποιώντας τριτοταγείς αμίνες καθώς και δευτεροταγείς υψηλής βασικότητας, το σύστημα ακολουθεί ένα διαφορετικό μηχανισμό. Σε αυτόν ο απαρχητής δεν δρα ως πυρηνόφιλο δίνοντας ζεύγος ηλεκτρονίων, αλλά ως καταλύτης. Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση είναι ότι το άζωτο στη θέση 3 του NCA πρέπει να μην είναι υποκατεστημένο και να διαθέτει ένα ευκίνητο υδρογόνο.^{10,13}

Επειδή ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς προχωρά μέσω ανιόντων έχει αποδειχθεί ότι είναι ταχύτερος από τον αντίστοιχο μηχανισμό αμίνης,

και τα πολυπεπτίδια που παράγονται έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος αλλά και μεγαλύτερη κατανομή μοριακών βαρών λόγω του ότι το ανιόν NCA^- δεν έχει εκλεκτικότητα και μπορεί να αντιδράσει με την μακρομοριακή αλυσίδα ή με νέο μονομερές δίνοντας έτσι προϊόντα με μεγάλη ανομοιογένεια.^{13,15,26-28}

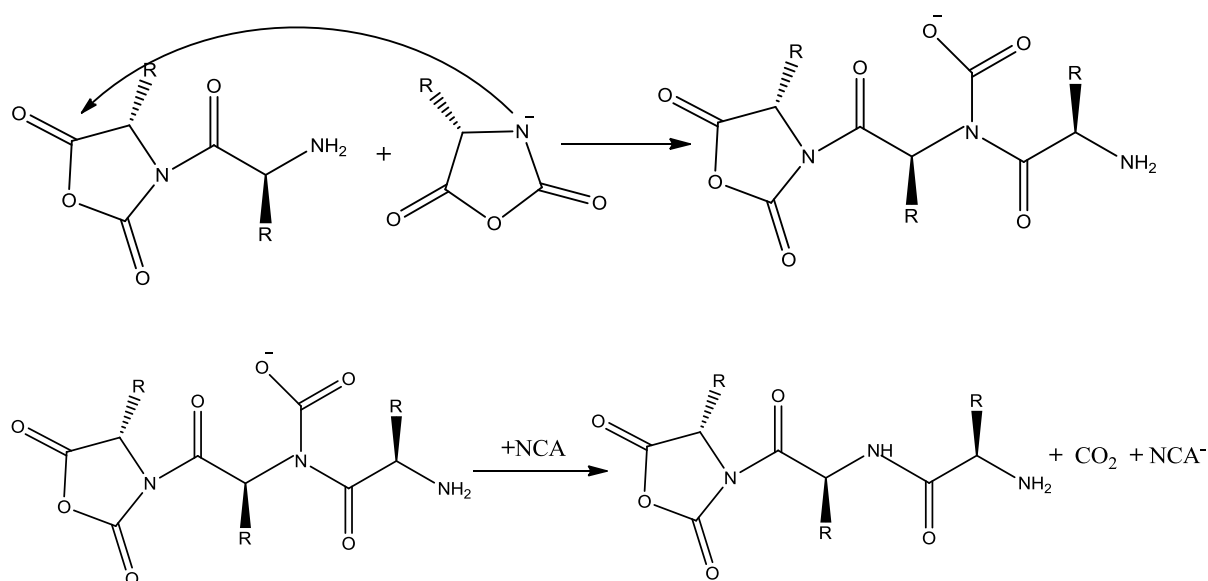
Συνοπτικά ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς παρατίθεται ακολούθως:

Στάδιο Έναρξης



Ο μηχανισμός έναρξης περιλαμβάνει την αποπρωτονίωση του δεσμού N-H του NCA από τον απαρχητή-βάση και την πυρηνόφιλη προσβολή το ανιόντος σε ένα δεύτερο μόριο μονομερούς στον άνθρακα 5', ανοίγοντας τον δακτύλιο και δίνοντας ένα διμερές. Το καρβαμιδικό ανιόν που σχηματίζεται πρωτονιώνεται από ένα τρίτο μόριο μονομερούς, σχηματίζοντας το ασταθές καρβαμιδικό οξύ το οποίο και αποκαρβοξυλιώνεται, παράγοντας ενεργές αμινομάδες ενώ αναγεννάται και ο καταλύτης.^{13,26}

Στάδιο Διάδοσης



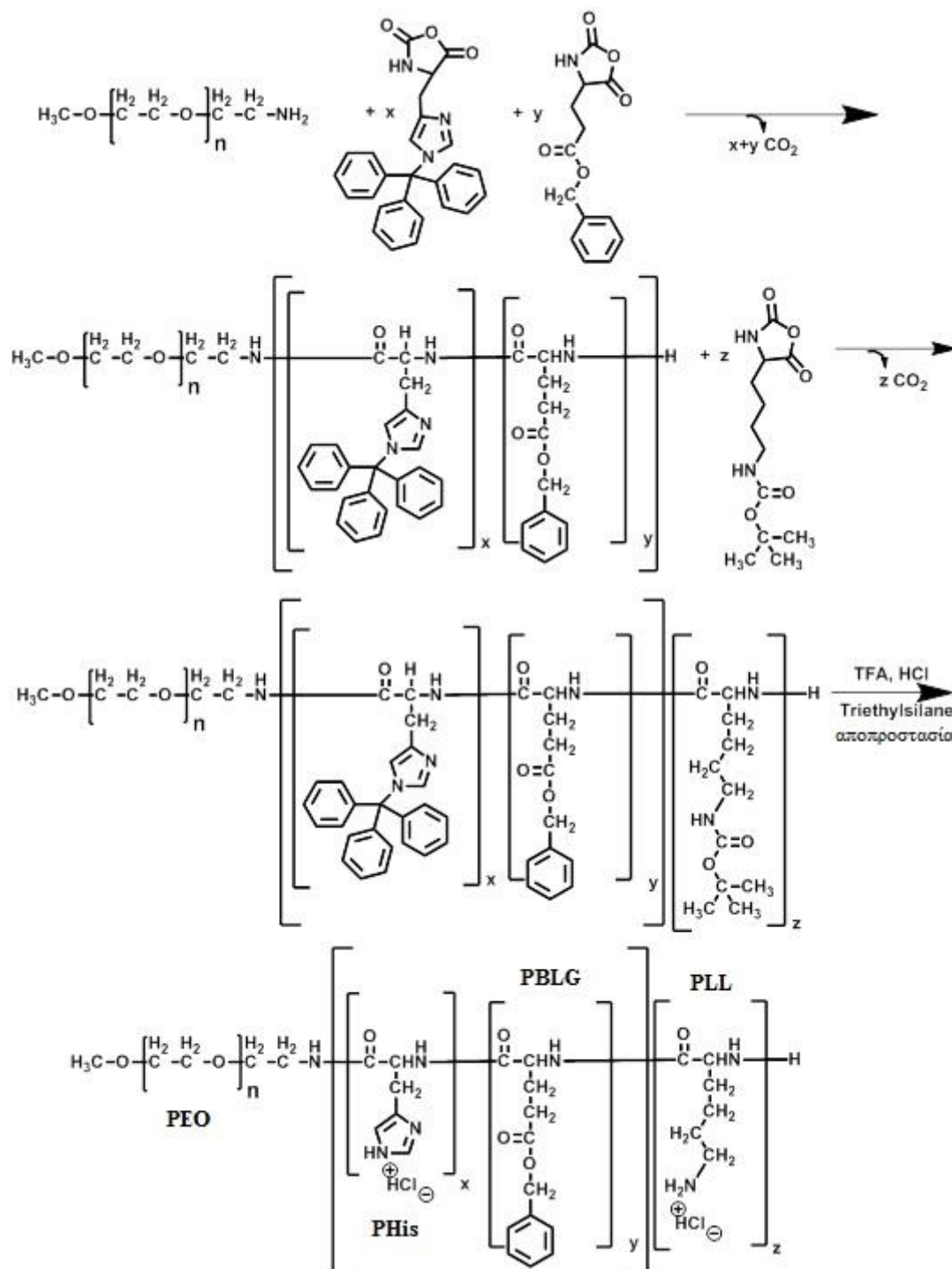
Κατά το στάδιο της διάδοσης το διμερές που σχηματίστηκε προσβάλλεται από ένα άλλο ανιόν NCA⁻ για να δώσει ένα τριμερές, κ.ο.κ., με το NCA⁻ να αναγεννάται σε κάθε αντίδραση.

2.2.3. Σύνθεση του Triblock PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL:

Το τρισυσταδικό τριπολυμερές PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL που χρησιμοποιείται στην παρούσα έρευνα έχει συντεθεί μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβοξυανυδριτών των αντίστοιχων αμινοξέων (της ιστιδίνης (His), της λυσίνης (PLL) και του γ-βενζυλο-*d*7 L-γλουταμινικού (PBLG)) και εν συνεχεία απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων που φέρουν (π.χ. BOC ομάδα).

Το συγκεκριμένο πολυπεπτίδιο αποτελείται από δύο υδατοδιαλυτές συστάδες, αυτές του PEO και της PLL και από μία συστάδα η οποία σε pH>6.5 είναι υδρόφοβη λόγω του PBLG αλλά και της PHis που σε αυτό το pH είναι αποπρωτονιωμένη και άρα υδρόφοβη. Συνεπώς, η διεξαγωγή των πειραμάτων σε pH=7.4 (τιμή pH του ανθρώπινου αίματος) θα οδηγήσει σε αυτοοργάνωση του τριπολυμερούς προς σχηματισμό ανώτερων υπερμοριακών δομών. Το PBLG είναι 15% κατά mol σε σχέση με την PHis και τα μοριακά βάρη των υδρόφιλων συστάδων είναι αντίστοιχα $M_{w_{PEO}}=10000$ και $M_{w_{PLL}}=7000$.

Όπως προαναφέρθηκε απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων είναι η ποσοτική απομάκρυνση του CO₂ καθ'όλα τα στάδια παραγωγής του. Έτσι λοιπόν, οι αντιδράσεις σύνθεσης του πολυμερούς παρατίθενται στο ακόλουθο σχήμα:

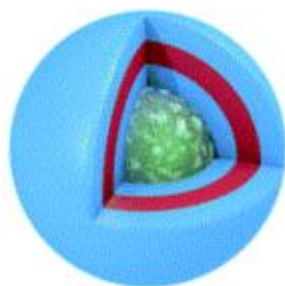


2.3. ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Η τεχνολογία ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών αποτελεί μία από τις ταχύτερα αναπτυσσόμενες επιστημονικές περιοχές, εξαιτίας των πολλαπλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους δοσολογίας. Οι φορείς φαρμάκων μακράς κυκλοφορίας χρησιμοποιούνται για να διατηρήσουν το απαιτούμενο επίπεδο της φαρμακευτικής ουσίας στο αίμα για εκτεταμένα χρονικά διαστήματα με σκοπό την αποτελεσματικότερη δράση του φαρμάκου.

Τα νανοσωματίδια ή τα μακρομοριακά συσσωματώματα μακράς κυκλοφορίας όταν διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς, συσσωρεύονται σταδιακά στις παθολογικές θέσεις (καρκινικοί όγκοι, φλεγμονές κλπ) και βελτιώνουν ή ενισχύουν την αποδέσμευση των φαρμάκων στις περιοχές αυτές. Η κυκλοφορία των δραστικών ουσιών για μακρό χρονικό διάστημα μπορεί να συντελέσει στην καλύτερη στόχευση, εφόσον αυξάνει τη συνολική ποσότητα του φορέα που συναντά το στόχο και τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκου και περιοχής δράσης του.²⁹⁻³¹

Για τη βελτίωση της εξειδικευμένης αποδέσμευσης των φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί διάφοροι φορείς, όπως τα λιποσώματα, τα νανοσωματίδια, τα νανосуσσωματώματα και τα πολυμερικά μικκύλια και κυστίδια. Πρόσφατα τα πολυμερικά κυστίδια (vesicles) αποτέλεσαν το αντικείμενο έντονης ερευνητικής απασχόλησης. Τα κυστίδια είναι κλειστές διπλοστιβάδες με κενό υδρόφιλο χώρο στο εσωτερικό τους και με πάχος μόνο μερικά νανόμετρα, οι οποίες μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο ως “νανομεταφορείς”. Έχουν αναδειχθεί ως δυνητικοί φορείς φαρμακευτικών ουσιών αδιάλυτων στο νερό, εξαιτίας της ικανότητάς τους να εγκλωβίζουν τις ουσίες αυτές στο υδρόφοβο τμήμα τους λόγω χημικής συγγένειας, προστατεύοντας τις με τις εξωτερικές υδατοδιαλυτές αλυσίδες που διαθέτουν.^{29,32,33}



Εικόνα 2.6.: Η τυπική δομή ενός κυστιδίου (οι μπλε στιβάδες είναι υδρόφιλες, ενώ η κόκκινη υδρόφοβη)

Οι κυστιδιακές δομές, ως φορείς φαρμάκων προσφέρουν μερικά πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα. Έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν μη υδατοδιαλυτά φάρμακα, αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα τους και έχουν μικρό σχετικά μέγεθος (~250 nm) αποτρέποντας την καταστροφή τους από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι μπορούν να παραμείνουν στο αίμα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα παρέχοντας σταδιακή συσσωμάτωση της δραστικής ουσίας στην επιθυμητή περιοχή. Επιπλέον είναι δυνατό να παρασκευασθούν σε σχετικά μεγάλες ποσότητες εύκολα και επαναλήψιμα.^{29,33}

Μία ακόμα σημαντική ιδιότητα των κυστιδίων, που έχει ιδιαίτερη σημασία στη φαρμακευτική είναι η ικανότητά τους να αυξάνουν τη διαλυτότητα των ελάχιστα διαλυτών ουσιών. Γι' αυτό το λόγο τα πολυμερικά κυστίδια έχουν βρει αρκετές φαρμακευτικές εφαρμογές, όπως την από στόματος λήψη φαρμάκων, την ελεγχόμενη αποδέσμευση και την εξειδικευμένη δράση. Ωστόσο η πιο σημαντική εφαρμογή τους είναι η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων χωρίς την εκδήλωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών που μπορεί να εκδηλωθούν στον ανθρώπινο οργανισμό αν αυτά εισαχθούν ελεύθερα στο κυκλοφορικό σύστημα.³³

Η ενσωμάτωση των φαρμάκων στη δομή των κυστιδίων πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της διαπίδυσης (dialysis), είτε με τη μέθοδο της διαλυτοποίησης - εξάτμισης, μέθοδοι που και οι δύο πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας έρευνας.

Η μέθοδος της διαπίδυσης συνίσταται στη μεταφορά του φαρμάκου και του πολυμερούς από έναν κοινό καλό διαλύτη (π.χ. DMSO) σε υδατικό διάλυμα (buffer νερού-αλάτων), που είναι εκλεκτικός διαλύτης μόνο για τις υδρόφιλες συστάδες του πολυμερούς. Καθώς ο καλός διαλύτης αντικαθίσταται από νερό δια μέσου κατάλληλης μεμβράνης διαπίδυσης, η υδρόφοβη συστάδα συσσωματώνεται ενσωματώνοντας έτσι τη φαρμακευτική ουσία. Η διαπίδυση λαμβάνει χώρα για αρκετές ημέρες, ώστε να είναι σίγουρη η πλήρης απομάκρυνση του κοινού καλού διαλύτη και η αντικατάστασή του από τον εκλεκτικό. Για ακόμη καλύτερα αποτελέσματα είναι θεμιτό να πραγματοποιείται αλλαγή του εκλεκτικού διαλύτη από το δοχείο που πραγματοποιείται η dialysis με νέα ποσότητα ανά τακτά χρονικά διαστήματα.^{29,34,35}

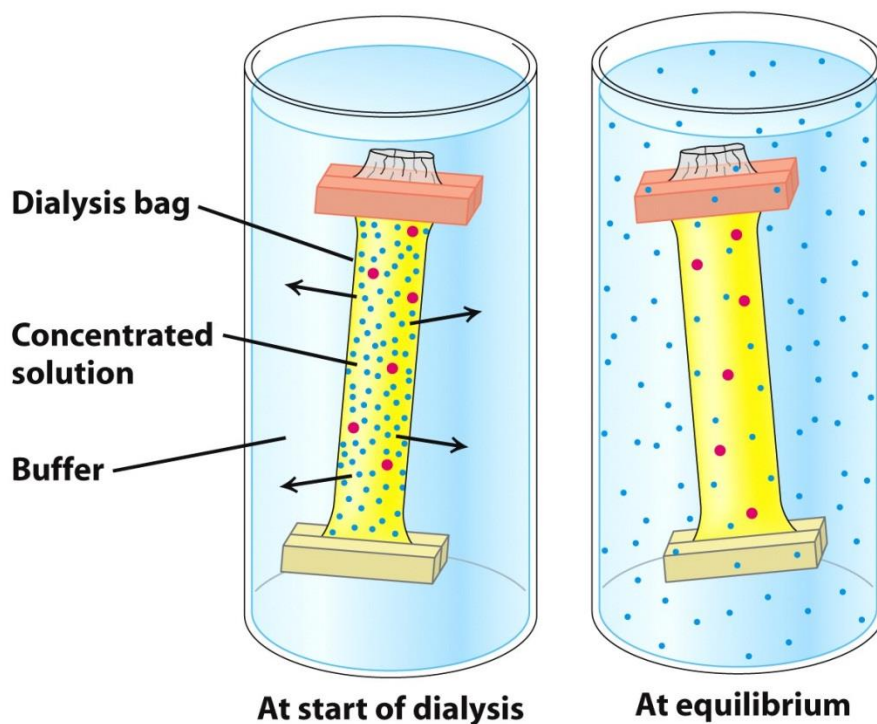


Figure 3.2
Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company

Εικόνα 2.7.: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της διαπίδυσης (Dialysis)

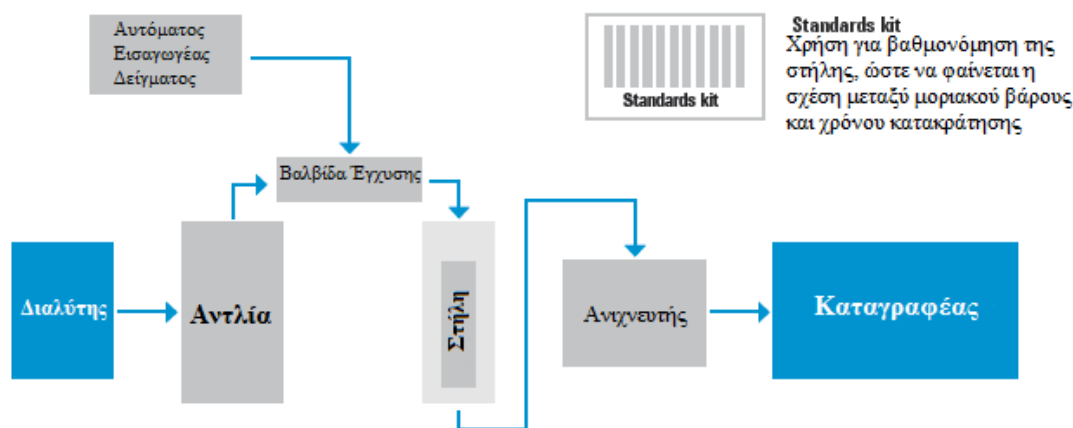
Από την άλλη, η μέθοδος της διαλυτοποίησης - εξάτμισης συνίσταται στην προετοιμασία ενός διαλύματος του τρισυσταδικού τριπολυμερούς μαζί με το προς μελέτη φάρμακο σε ένα μη υδατικό και πτητικό διαλύτη, ώστε να σχηματιστεί ένα γαλάκτωμα. Ο εγκλωβισμός του φαρμάκου στα νανοσωματίδια πραγματοποιείται με την εξάτμιση του πτητικού οργανικού διαλύτη στη γραμμή κενού ώστε να δημιουργηθεί μία άμορφη στερεή μάζα, και εν συνεχεία με προσθήκη νερού (ουσιαστικά buffer) για τον σχηματισμό των κυστιδίων.^{36,37}

2.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

2.4.1. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography):

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) ή χρωματογραφία διαπερατότητας μέσω πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC) αποτελεί σήμερα μία από τις δυναμικότερες μεθόδους χαρακτηρισμού των πολυμερών τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα, όσο και στη βιομηχανία. Πρόκειται ουσιαστικά για μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προσαρμοσμένης για την ανάλυση μεγαλομορίων. Η σχετική απλότητα της μεθόδου, η ταχύτητα με την οποία πραγματοποιούνται οι αναλύσεις, η δυνατότητα εύρεσης οποιασδήποτε μέσης τιμής μοριακού βάρους και της κατανομής μοριακών βαρών, αλλά και η δυνατότητα διασύνδεσης με άλλες μεθόδους χαρακτηρισμού (όπως η ιξωδομετρία τριχοειδούς σωλήνα) για τη λήψη περισσότερων πληροφοριών είναι ενδεικτικά της σπουδαιότητας της μεθόδου και εξηγεί την ευρεία χρήση της.^{38,39}

Σχηματικά η διάταξη της οργανολογίας σε μία συσκευή SEC φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:

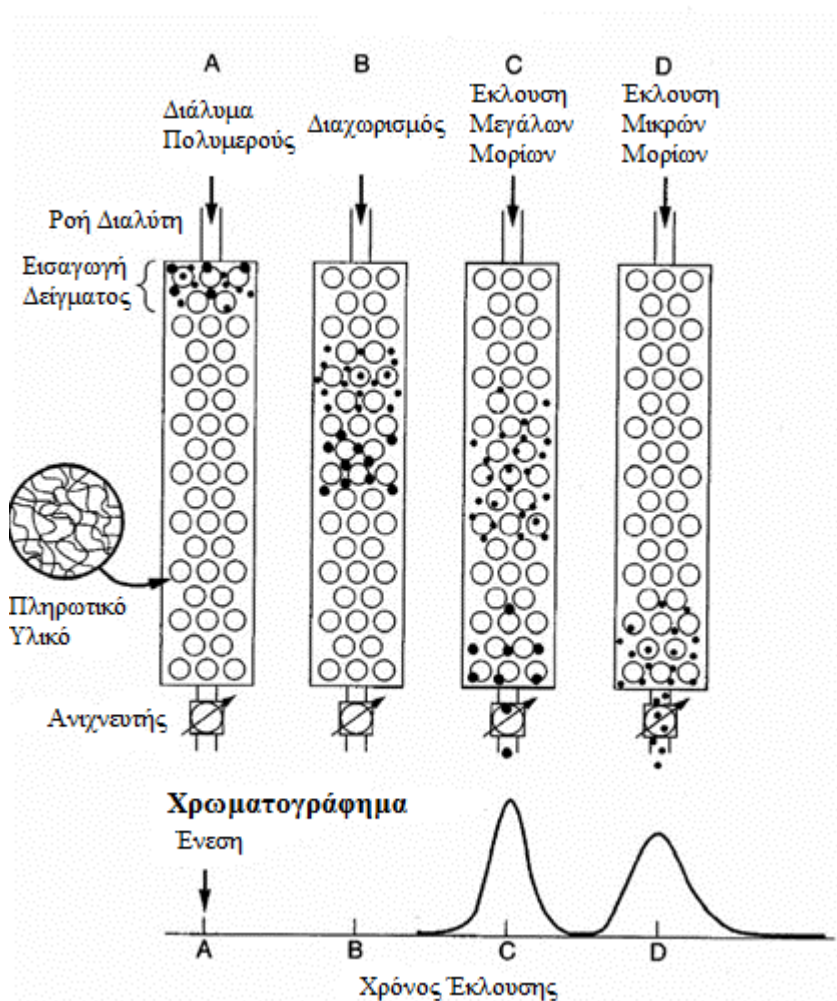


Εικόνα 2.8.: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής SEC

Αραιό διάλυμα πολυμερούς ενίεται σε ποσότητα διαλύτη που κινείται με σταθερή ροή, η οποία εξασφαλίζεται από κατάλληλη αντλία. Το πολυμερές παρασύρεται από το διαλύτη στις στήλες του οργάνου, όπου πραγματοποιείται η διαδικασία διαχωρισμού. Οι στήλες περιέχουν τη στατική φάση, δηλαδή κόκκους από

ένα πορώδες πληρωτικό υλικό (με εύρος διαστάσεων πόρων $500-10^6 \text{ \AA}$). Το υλικό πλήρωσης των στηλών μπορεί να είναι οργανικής φύσεως (π.χ. δικτυωμένο πολυστυρένιο) ή ανόργανο (π.χ. silica gel ή πορώδες γυαλί).

Τα μικρά μόρια του πολυμερούς (μικρότερος υδροδυναμικός όγκος) μπορούν να περνούν τόσο μεταξύ των κόκκων, όσο και να εισχωρούν μέσα στους πόρους των κόκκων με αποτέλεσμα να καθυστερεί η έκλουσή τους από τη στήλη. Αντίθετα τα μεγάλα σωματίδια με διαστάσεις μεγαλύτερες από το μέγεθος των πόρων δε μπορούν να διέλθουν μέσα από αυτούς με συνέπεια να κινούνται μόνο μεταξύ των κόκκων και να εκλούνται σε μικρότερους χρόνους. Μόρια με ενδιάμεσο μέγεθος μπορούν να εισχωρούν σε μερικούς από τους πόρους του κοκκώδους υλικού εμφανίζοντας διαφορετικό βαθμό καθυστέρησης στο υλικό της στήλης. Έτσι τελικά ο διαχωρισμός των διαλυμένων στην κινητή φάση υλικών επιτυγχάνεται ανάλογα με το μέγεθος τους με τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους να εκλούνται πρώτα και να ακολουθούν κατόπιν μόρια κατά σειρά μειούμενου μεγέθους.⁴⁰⁻⁴²



Εικόνα 2.9.: Διαχωρισμός μακρομορίων διαφορετικού υδροδυναμικού όγκου

Η πορεία του διαχωρισμού παρακολουθείται συνεχώς μέσω κατάλληλων ανιχνευτών, που συνδέονται σε σειρά με τις στήλες. Οι χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές πρέπει να χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία και να αποκρίνονται στη συγκέντρωση του διαλυμένου συστατικού. Η πιο κοινή περίπτωση είναι η χρήση διαφορικού διαθλασιμέτρου, που μετρά συνεχώς τη διαφορά στο δείκτη διάθλασης μεταξύ του διαλύτη και του διαλύματος, που περιέχει τα εκλούόμενα συστατικά. Άλλοι ανιχνευτές που έχουν χρησιμοποιηθεί στηρίζονται σε διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους, όπως η φασματοσκοπία υπεριώδους (UV) ή υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR). Τέλος, το επιθυμητό χρωματογράφημα αποτυπώνεται με τη βοήθεια ενός καταγραφέα.⁴⁰⁻⁴²

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί έμμεση και όχι απόλυτη μέθοδο για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών, εξαιτίας της σύνδεσης μεταξύ μεγέθους και μοριακού βάρους. Γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση των στηλών, η οποία πραγματοποιείται με μέτρηση του χρόνου έκλουσης δειγμάτων γνωστού μοριακού βάρους (π.χ. πρότυπα πολυστυρένια). Επειδή όμως ο όγκος έκλουσης δεν εξαρτάται άμεσα από το μοριακό βάρος, αλλά από το μέγεθος των μακρομορίων, θα πρέπει τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και τα αγνώστου μοριακού βάρους δείγματα να έχουν την ίδια χημική σύσταση και την ίδια αρχιτεκτονική (π.χ. γραμμικά ή κυκλικά ή αστεροειδή με ίδιο αριθμό κλάδων κλπ.) και οι μετρήσεις των όγκων έκλουσης σε όλα τα δείγματα να γίνονται υπό τις ίδιες ακριβώς πειραματικές συνθήκες.^{38,40}

Ο όγκος έκλουσης V_e εκάστου μακρομορίου του πολυμερούς δίνεται από την εξίσωση:

$$V_e = V_o + K_{SEC} V_E$$

όπου V_o είναι ο νεκρός όγκος, ο όγκος δηλαδή της στήλης που δεν καταλαμβάνεται από το πορώδες υλικό, K_{SEC} είναι το ποσοστό του πολυμερούς που μπορεί να περάσει από τους πόρους (μπορεί να θεωρηθεί και ως η σταθερά κατανομής ενός συστατικού μεταξύ κινητής και στατικής φάσης), και V_E είναι ο συνολικός εσωτερικός όγκος όλων των πόρων. Για μακρομόρια που δεν μπορούν να περάσουν κανένα πόρο της στήλης ($K_{SEC}=0$) $V_e=V_o$ και για μακρομόρια που μπορούν να περάσουν όλους τους πόρους ($K_{SEC}=1$) $V_e=V_o+V_E$. Στις περιπτώσεις αυτές δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός και πρέπει να αλλαχθούν οι στήλες. Καλό διαχωρισμό έχουμε όταν ο K_{SEC} για όλα τα μακρομόρια που υπάρχουν στο πολυμερές κυμαίνεται μεταξύ 0 και 1.⁴⁰

2.4.2. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering):

Η δυναμική σκέδαση φωτός (ή φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων - Photon Correlation Spectroscopy, PCS) στηρίζεται στο γεγονός ότι, σε ένα διάλυμα πολυμερούς τα μόριά του βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση, λόγω της θερμικής ενέργειας που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω των συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown), με αποτέλεσμα η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα να συνδέεται ποσοτικά με την κίνηση των μορίων. Η σκέδαση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας από ένα διάλυμα πολυμερούς, οφείλεται κυρίως σε διακυμάνσεις της συγκέντρωσης, οι οποίες συνδέονται με την κίνηση Brown. Συνεπώς, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μεταβάλλεται συναρτήσει του χρόνου.^{16,29,43}

Μέσω της μεθόδου DLS μπορεί να υπολογισθεί ο μεταφορικός συντελεστής διάχυσης D_t , ο οποίος περιγράφει την δυσκολία κίνησης ενός σώματος μέσα σε ένα διάλυμα και είναι αντιστρόφως ανάλογος του μεγέθους του πολυμερούς. Από την ίδια μέθοδο χαρακτηρισμού προκύπτει και η υδροδυναμική ακτίνα (R_h). Η R_h αποτελεί μέτρο του υδροδυναμικού όγκου του πολυμερούς στο διάλυμα όπως αυτός καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-διαλύτη, από την θερμοκρασία κ.α. και εκφράζει την ακτίνα μίας υποθετικής σφαίρας που έχει τον ίδιο συντελεστή διάχυσης με το υπό εξέταση μακρομοριακό σύστημα.^{29,43-45}

Ο συντελεστής διάχυσης σε άπειρη αραιώση (D_t^0) δίνεται από τη σχέση Stokes-Einstein:

$$D_t^0 = \frac{kT}{f}$$

όπου k η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία σε βαθμούς K και f ο μοριακός συντελεστής τριβής. Για τον συντελεστή f στην περίπτωση μη αλληλεπιδρώντων σωματιδίων ισχύει ότι $f = 3\pi\eta d$, όπου η το ιξώδες του διαλύτη και d η διάμετρος των σωματιδίων ($d=2R_h$).

Στην περίπτωση ύπαρξης αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων ο D_t εμφανίζει σημαντική εξάρτηση από την συγκέντρωση, οπότε:

$$D_t = D_t^0(1 + k_D c + \dots) \quad \text{με} \quad k_D = 2A_2M - k_f - \frac{N_A V_1}{M}$$

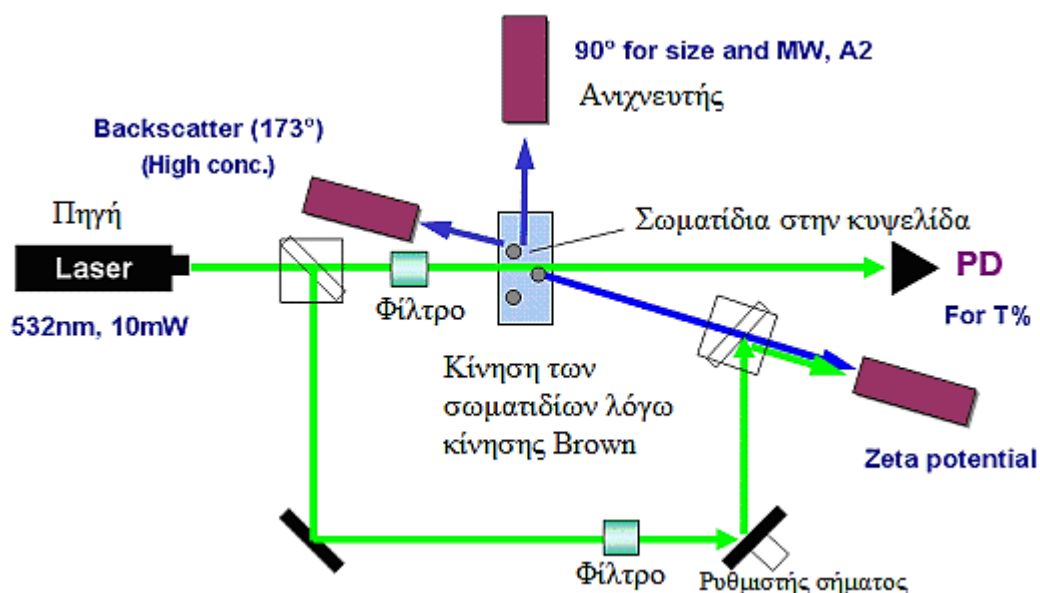
όπου A_2 ο δεύτερος συντελεστής Virial, M το μοριακό βάρος των σωματιδίων, V_1 ο όγκος του μορίου του πολυμερούς και k_f ο συντελεστής αναλογίας στη σχέση που

δίνει την εξάρτηση του μοριακού συντελεστή τριβής (f) του πολυμερούς από τη συγκέντρωση στο συγκεκριμένο διαλύτη, $f = f_0 (1 + k_f c)$.

Με βάση όσα προαναφέρθηκαν μπορεί να υπολογισθεί η υδροδυναμική ακτίνα R_h των πολυμερικών σωματιδίων (μικκύλια, κυστίδια κλπ) σε αραιά διαλύματα από τη σχέση:²⁹

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_t^0}.$$

Η βασική οργανολογία ενός μηχανήματος DLS δείχνεται στο ακόλουθο σχήμα (η μέτρηση του μεγέθους και του μοριακού βάρους των σωματιδίων γίνεται με ανιχνευτή τοποθετημένο στις 90° από την πηγή φωτός-laser):

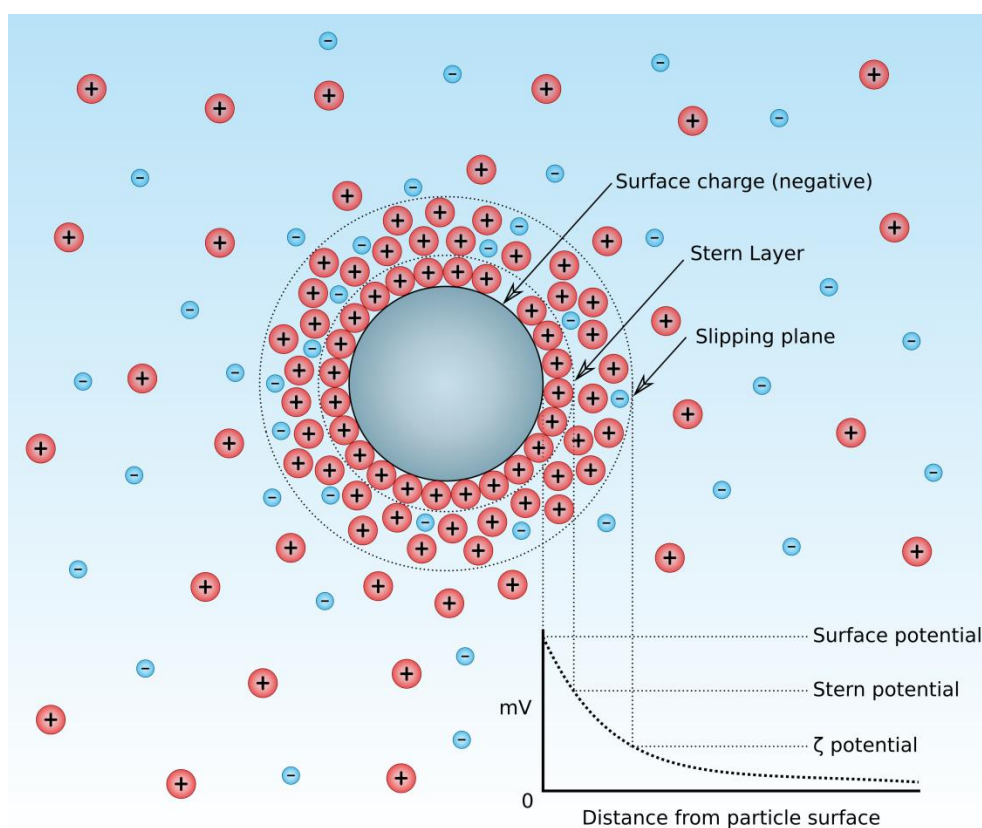


Εικόνα 2.10.: Τυπική διάταξη οργάνου της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)

2.4.3. Z-Δυναμικό (Z-Potential):

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

Αμέσως δίπλα στη φορτισμένη στερεή επιφάνεια υπάρχει ένα λεπτό στρώμα από αντισταθμιστικά ιόντα, που ονομάζεται συμπαγές στρώμα ή στρώμα Stern (Stern layer). Το συμπαγές αυτό στρώμα αντισταθμιστικών ιόντων είναι ακίνητο λόγω της ισχυρής ηλεκτροστατικής έλξης με την επιφάνεια των σωματιδίων. Τα αντισταθμιστικά ιόντα έξω από το συμπαγές στρώμα είναι ασθενέστερα συνδεδεμένα και συνεπώς κινητά. Αυτό το μέρος της διπλοστιβάδας καλείται διάχυτη στιβάδα (diffuse layer ή slipping plane) και το ηλεκτροστατικό δυναμικό που αντιστοιχεί σε αυτό το στρώμα ονομάζεται Z-δυναμικό (Z-potential).⁴⁶⁻⁴⁸



Εικόνα 2.11.: Το δυναμικό των νανοσωματιδίων συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια τους

Οι ηλεκτρικές ιδιότητες της επιφάνειας των νανοσωματιδίων (κυστιδίων ή μικκυλίων) μπορούν να μελετηθούν με μικροηλεκτροφόρηση κατά την οποία προκαλείται κίνηση των σωματιδίων αυτών μέσα σε στάσιμο υγρό υπό την επίδραση εξωτερικά εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού. Η κίνηση αυτή μετριέται με τη μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) σε ειδικό μηχάνημα (Zetasizer 3000HS) και βασίζεται στη μετατόπιση Doppler που προκαλείται από την πρόσπτωση μονοχρωματικής ακτινοβολίας (laser He-Ne, 5 mW, 633 nm) στα κινούμενα σωματίδια.

Γενικά, δύο είναι οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν την επιφάνεια των κυστιδίων και μπορούν να υπολογισθούν από τις μετρούμενες κινητικότητες: το δυναμικό στο επίπεδο ολίσθησης ή Z-δυναμικό και η πυκνότητα επιφανειακού φορτίου (surface charge density).

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

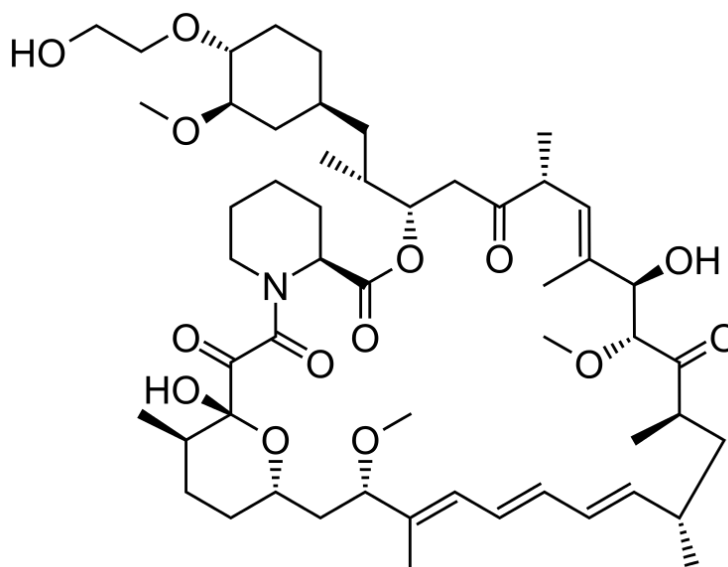
$$Z = \frac{u \cdot \eta}{E \cdot \epsilon} = \frac{\mu_e \cdot \eta}{\epsilon}$$

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

Το Z-δυναμικό σχετίζεται ποσοτικά με την ύπαρξη ή μη φορτίων στην επιφάνεια των σωματιδίων και επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων των κολλοειδών συστημάτων όπως είναι η σταθερότητα τους, η αλληλεπίδραση τους με βιοδραστικές ενώσεις καθώς επίσης και οι ρεολογικές ιδιότητες των εναιωρημάτων. Η τιμή του Z-δυναμικού αποτελεί ένδειξη για την εκτίμηση της σταθερότητας των κολλοειδών διασπορών και είναι παράμετρος χαρακτηρισμού των βιοϊατρικών πολυμερών. Γενικά, διασπορές με μεγάλη τιμή Z-δυναμικού (θετική ή αρνητική) παρουσιάζουν απωστικές δυνάμεις που εμποδίζουν την συσσωμάτωση και κατακρήμνιση των σωματιδίων τους.⁴⁶⁻⁴⁸

2.5. EVEROLIMUS – ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ, ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Η φαρμακευτική ουσία που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία είναι το αντικαρκινικό φάρμακο Everolimus. Το Everolimus (RAD-001) είναι παράγωγο του Sirolimus και λειτουργεί παρόμοια με αυτό ως αναστολέας του στόχου της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mTOR). Στην αγορά παρέχεται από την εταιρία Novartis με τις εμπορικές ονομασίες Zortress (Η.Π.Α.) και Certican (Ευρώπη και άλλες χώρες) στην μεταμοσχευτική ιατρική, και Afinitor στην ογκολογία.⁴⁹ Είναι ένα φάρμακο αδιάλυτο στο νερό, γεγονός που καθιστά τον εγκλωβισμό του σε κυστίδια μία διαδικασία τεράστιας σημασίας ώστε να μπορεί να μεταφέρεται στο αίμα και να εισάγεται στα κύτταρα-στόχους διαμέσω της κυτταρικής μεμβράνης τους, με την διαδικασία της ενδοκύττωσης.³⁶ Η υδροφοβικότητα του φαρμάκου γίνεται εμφανής αν μελετηθεί ο συντακτικός του τύπος:



Εικόνα 2.12.: Ο συντακτικός τύπος του φαρμάκου Everolimus

Οι κυριότερες ιδιότητες του Everolimus παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:⁴⁹

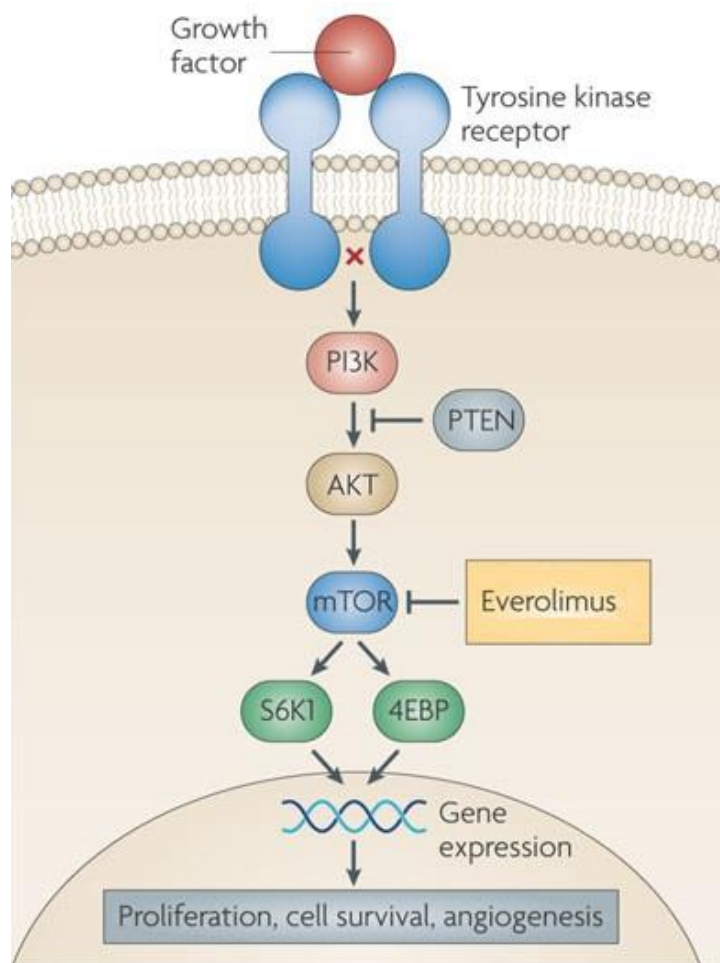
Πίνακας 1: Γενικά στοιχεία που αφορούν το φάρμακο Everolimus

Εμπορική Ονομασία	Afinitor
Μοριακός Τύπος	C ₅₃ H ₈₃ NO ₁₄
CAS number	159351-69-6
Μοριακό Βάρος	958.224 g/mol
Ημερομηνία Πρώτης Έγκρισης	03 Αυγούστου 2009

Χρησιμοποιείται κυρίως ως ανοσοκατασταλτικό για την πρόληψη της απόρριψης των μεταμοσχευμένων οργάνων και τη θεραπεία του καρκίνου των νεφρικών κυττάρων και άλλων όγκων (π.χ. καρκίνος του μαστού).⁵⁰ Το Everolimus ενδείκνυται, επίσης, για τη θεραπεία ανεγχείρητου ή μεταστατικού, πολύ ή μετρίως διαφοροποιημένου παγκρεατικού νευροενδοκρινικού όγκου σε ενήλικες με προϊούσα νόσο.⁴⁹ Η θεραπεία αυτού του είδους όγκου αποτελεί τον κύριο στόχο όλης της έρευνας που πραγματοποιείται από τον κ. Ιατρού και τους συνεργάτες του. Μεγάλο μέρος της μελέτης πάνω στο αντικείμενο έχει επίσης διεξαχθεί σχετικά με την δράση του Everolimus και άλλων mTOR αναστολέων σε άλλους τύπους καρκίνων.

Όπως προαναφέρθηκε το Everolimus είναι εκλεκτικός αναστολέας της mTOR. Η mTOR είναι μια βασική κινάση σερίνης-θρεονίνης, η δράση της οποίας είναι γνωστό πως επαναρρυθμίζεται στην πλειονότητα των ανθρώπινων καρκίνων. Το everolimus δεσμεύεται με την ενδοκυτταρική πρωτεΐνη FKBP-12, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο το οποίο αναστέλει την δράση του mTOR συμπλόκου-1 (mTORC1). Η αναστολή της μεταγωγής σημάτων του mTORC1 παρεμβαίνει με τη μετάφραση και τη σύνθεση των πρωτεϊνών μειώνοντας τη δράση της ριβοσωμικής κινάσης S6 (S6K1) και του ευκαριωτικού παράγοντα επιμήκυνσης της 4E-προσδένουσας πρωτεΐνης (4EBP-1), οι οποίοι ρυθμίζουν τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την αγγειογένεση και τη γλυκόλυση. Η S6K1 θεωρείται ότι φωσφορυλιώνει τον τομέα 1 του υποδοχέα οιστρογόνων, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την, ανεξάρτητη από το συνδεδεμένο μόριο, ενεργοποίηση του υποδοχέα αυτού. Συνεπώς, τα μόρια mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και στη γλυκολυτική πορεία τροποποιούνται ή μειώνονται, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του όγκου.⁵¹⁻⁵³

Το everolimus μειώνει τα επίπεδα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), ο οποίος ενισχύει τις διαδικασίες αγγειογένεσης νεοπλασιών. Επιπρόσθετα, το everolimus είναι ισχυρός αναστολέας της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού νεοπλασματικών κυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών και σχετιζόμενων με αιμοφόρα αγγεία λείων μυϊκών κυττάρων και έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη γλυκόλυση σε συμπαγείς όγκους *in vitro* και *in vivo*.⁵¹⁻⁵³ Σχηματικά ο μηχανισμός δράσης του φαρμάκου φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 2.13.: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του Everolimus

Το συγκεκριμένο φάρμακο αν χορηγηθεί σε μορφή δισκίων χωρίς την εκλεκτική τοποθέτηση του στα καρκινικά κύτταρα στόχους μπορεί να παρουσιάσει αρκετές ανεπιθύμητες δράσεις και παρενέργειες. Ορισμένες από τις ανεπιθύμητες αυτές ενέργειες είναι: διάφορες λοιμώξεις, στοματίτιδα, μη λοιμώδης πνευμονίτιδα, ουδετεροπενία, θρομβοπενία, μεταβολικά επεισόδια (π.χ. υπογλυκαιμία, δυσλιπιδαιμία), υπέρταση, αϋπνία και πυρεξία.⁴⁹

Για να ξεπερασθούν, λοιπόν, όλα αυτά τα ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά είναι θεμιτό να πραγματοποιείται στοχευμένη εναπόθεση της δραστικής ουσίας στα καρκινικά κύτταρα μέσω “έξυπνων” αυτοοργανούμενων συστημάτων, όπως τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν στην παρούσα ερευνητική μελέτη.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ (DIALYSIS)^{34,35}

Κατά το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων με τη μέθοδο Dialysis χωρίς να γίνει σ' αυτά ο εγκλωβισμός του φαρμάκου (δείγμα blank), έτσι ώστε να μελετηθεί το είδος της αυτοοργάνωσης και να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς τη φύση και το μέγεθος των σωματιδίων, αλλά και να γίνει εξακρίβωση για το ποια συστάδα του triblock βρίσκεται στην επιφάνεια τους.

Έτσι, ζυγίστηκαν 5.5 mg του triblock PEO-*b*-(Phis-co-PBLG)-*b*-PLL και διαλύθηκαν σε 1mL DMSO, που είναι καλός διαλύτης για όλες τις συστάδες του πολυμερούς, υπό συνεχή ανάδευση (1100 rpm και στους 35°C για μίμηση της φυσιολογικής θερμοκρασίας του ανθρώπινου οργανισμού και επειδή ο διαλύτης σε θερμοκρασία μικρότερη των 25°C παγώνει). Έπειτα, στο φιαλίδιο που βρίσκεται διαλυμένο το πολυμερές γίνεται προσθήκη 2mL tris-buffer^a ανά 100 μL και σε διάρκεια 2 ωρών.

Μετά το πέρας των προσθηκών το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία επιτρέπει στα μόρια του DMSO να εξέρχονται από αυτήν ενώ στα μόρια του νερού να εισέρχονται, και η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε υάλινη πηγάδα που περιέχονται τα 4L του buffer. Το διάλυμα της μεμβράνης αφήνεται εκεί υπό ανάδευση για μία μέρα ώστε να πραγματοποιηθεί η ανταλλαγή των διαλυτών DMSO-H₂O λόγω διαφοράς στην ωσμωτική πίεση. Την επόμενη μέρα γίνεται αλλαγή του tris-buffer για ανανέωση του διαλύτη και διευκόλυνση της εξόδου του εναπομείναντος DMSO. Το διάλυμα των νανοσωματιδίων απομακρύνεται από την μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετείται σε φιαλίδιο με την σήμανση “blank triblock” για περαιτέρω μελέτη του μεγέθους των σχηματισθέντων σωματιδίων μέσω του DLS

^a Το buffer αυτό αποτελείται από 4L απιονισμένο νερό, το οποίο θα λειτουργήσει ως εκλεκτικός διαλύτης για τις συστάδες του PEO και της PLL οι οποίες είναι υδρόφιλες και έτσι θα επέλθει η αυτοοργάνωση, στο οποίο έχουν διαλυθεί 4.84g tris(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο συγκέντρωσης 10 mM και 35.064g άλατος NaCl 150 mM. Το pH του ρυθμιστικού αυτού διαλύματος είναι βασικό λόγω του tris που είναι αμίνη και έτσι με προσθήκη σταγόνων π. HCl κατέβηκε στο επιθυμητό pH=7.37 (για προσομοίωση του pH του ανθρώπινου αίματος).

αλλά και του Z-δυναμικού για εξακρίβωση της συστάδας που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυστιδίων.

Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον εγκλωβισμό του φαρμάκου Everolimus στις κυστιδιακές δομές. Ο εγκλωβισμός στηρίζεται στο ότι το Everolimus ως υδρόφοβη ένωση και αδιάλυτη στο νερό κατά την διαδικασία της διαπίδυσης θα ενσωματωθεί στην υδρόφοβη στιβάδα των αυτοοργανούμενων σωματιδίων που αποτελείται από την συστάδα (PHis-co-PBLG) του triblock λόγω χημικής συγγένειας.

Έτσι, αρχικά διαλύθηκαν 5.5 mg του triblock σε 1mL DMSO και εν συνεχεία σε αυτό το διάλυμα προστέθηκαν 0.93 mg everolimus (διαλυτό στο DMSO έως 100 mg/mL). Η διάλυση πραγματοποιείται υπό συνεχή ανάδευση στις 900 rpm και στους 40°C. Στο φιαλίδιο vial που περιέχει διαλυμένα το πολυμερές με το φάρμακο προστίθενται σταδιακά 1.4mL του tris-buffer ανά 200 μ L και κάθε 15 λεπτά.

Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του buffer το διάλυμα μεταφέρεται μέσα σε μεμβράνη διαπίδυσης μαζί με αναδευτήρα, και στη συνέχεια τοποθετείται σε υάλινο δοχείο που περιέχει το tris-buffer για να γίνει η ανταλλαγή διαλυτών διαμέσω της μεμβράνης, όπου και αφήνεται για μία ημέρα. Η πειραματική διάταξη φαίνεται ακολούθως:

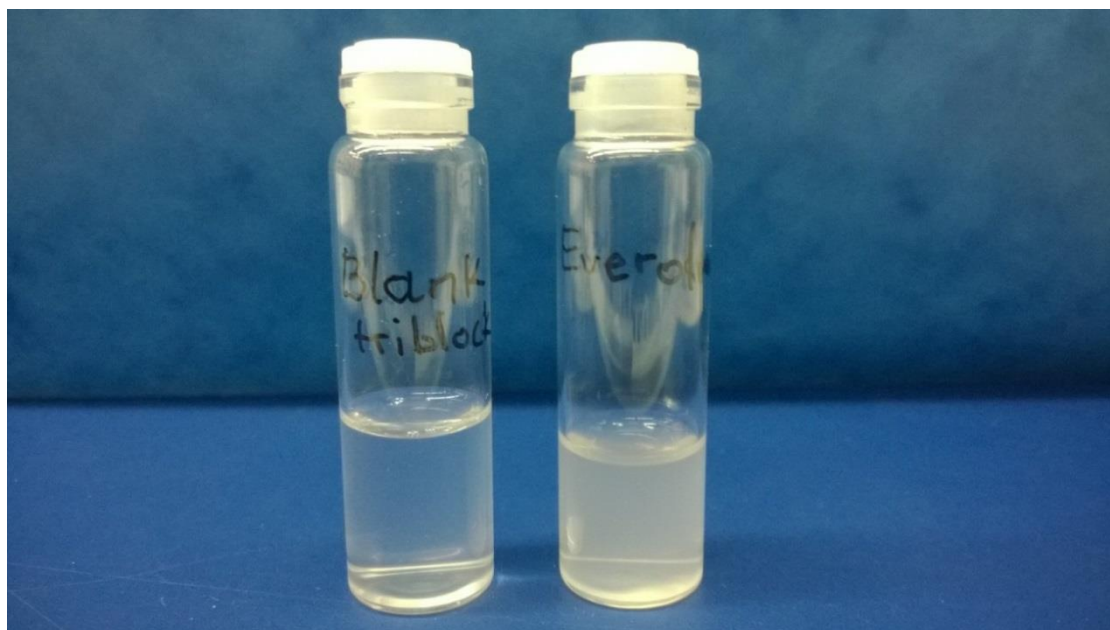


Εικόνα 3.1.: Η πειραματική διάταξη της μεθόδου της διαπίδυσης (dialysis)

Το buffer της πηγιάδας ανανεώνεται την επόμενη μέρα και η μεμβράνη αφήνεται εκεί για ακόμα τρεις ώρες. Έπειτα, το θολό διάλυμα που παρασκευάστηκε (ένδειξη ότι πραγματοποιήθηκε ο εγκλωβισμός του φαρμάκου στα σωματίδια) μεταφέρεται ποσοτικά με τη χρήση μικροπιπέτας σε vial φιαλίδιο και αφήνεται σε ηρεμία για δύο ημέρες ώστε να ελεγχθεί αν καταβυθίστηκε κάποια ποσότητα φαρμάκου.

Λόγω της παρατηρούμενης καταβύθισης μικρής ποσότητας του φαρμάκου πραγματοποιήθηκε ποσοτική λήψη του υπερκείμενου διαλύματος με τη βοήθεια μικροπιπέτας και μετάγγιση του σε νέο φιαλίδιο με την σήμανση “everolimus”. Τελικά παραλήφθηκαν 3.8mL διαλύματος των κυστιδίων με εγκλωβισμένο το φάρμακο, στα οποία μελετήθηκαν οι ιδιότητές τους με τη βοήθεια τεχνικών χαρακτηρισμού των πολυμερών.

Τα δύο διαλύματα που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο dialysis φαίνονται στην εικόνα:



Εικόνα 3.2.: Τα διαλύματα "blank" και "everolimus" των κυστιδίων που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο dialysis

3.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ – ΕΞΑΤΜΙΣΗΣ

Ως μέθοδος αναφοράς για την υλοποίηση της δεύτερης μεθόδου εγκλωβισμού του everolimus χρησιμοποιήθηκε η έρευνα του Wang και των συνεργατών του, οι οποίοι εργάστηκαν πάνω στο αντικαρκινικό φάρμακο paclitaxel και στη δημιουργία πολυμερικών νανοσωματιδίων για τον εγκλωβισμό του.³⁷

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην διάλυση τόσο του φαρμάκου όσο και του πολυμερούς σε έναν κοινά καλό διαλύτη (στη συγκεκριμένη περίπτωση DMSO), έπειτα εκδίωξη του διαλύτη αυτού στη γραμμή κενού μέσω freeze-drying και εν συνεχεία προσθήκη νερού για σχηματισμό των κυστιδίων.^{36,37} Η πραγματοποίησή της έγινε για σύγκριση της απόδοσης δεσμεύσεως του φαρμάκου αλλά και του μεγέθους των σωματιδίων σε σχέση με αυτά που προήλθαν από την μέθοδο dialysis.

Αναλυτικότερα, έγινε ζύγιση 6 mg του triblock και 1 mg everolimus τα οποία τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο μαζί με 2mL DMSO. Για να γίνει πολύ καλή διάλυση των συστατικών το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ημέρα, και μετά την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος το διάλυμα τοποθετείται στην γραμμή κενού για να εκδιωχθεί ποσοτικά το πτητικό DMSO. Η απομάκρυνση του διαλύτη είναι απαραίτητο να γίνει σταδιακά και όχι απότομα γι' αυτό το διάλυμα ψύχεται με υγρό άζωτο και αφήνεται για μία εβδομάδα πάνω στη γραμμή κενού για ολοκλήρωση της απομάκρυνσης (διαδικασία freeze-drying). Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε δείχνεται ακολούθως:



Εικόνα 3.3.: Η πειραματική διάταξη της μεθόδου διαλυτοποίησης - εξάτμισης

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.4 μετά την εκδίωξη του DMSO παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μίας άμορφης στερεάς μάζας του πολυμερούς μαζί με τη φαρμακευτική ουσία, γεγονός που συμπίπτει και με τις παρατηρήσεις του Wang.



Εικόνα 3.4.: Η άμορφη στερεή μάζα που δημιουργήθηκε μετά την εκδίωξη του διαλύτη

Σε επόμενο στάδιο παρασκευάστηκε tris-buffer 20 mM σε 250 mL νερό milli-Q (το buffer περιείχε 0.6057g tris και 2.19g NaCl). Το pH του buffer ρυθμίστηκε στο επιθυμητό 7.38 με προσθήκη π.HCl^b και έπειτα σταθεροποιήθηκε η θερμοκρασία του στους 50°C. Ακολούθησε η προσθήκη 2mL από το buffer στη φιάλη που βρίσκονταν αναμεμιγμένα το πολυμερές με το φάρμακο υπό συνεχή ανάδευση στις 1000 rpm.

Το παραχθέν εναιώρημα που προέκυψε αφήνεται σε ηρεμία για μία μέρα και ύστερα μεταγγίζεται το υπερκείμενο υγρό σε νέο φιαλίδιο για απομάκρυνση του φαρμάκου που δεν εγκλωβίστηκε και καταβυθίστηκε ως ίζημα. Πραγματοποιήθηκε και μία δεύτερη μετάγγιση σε φιαλίδιο με επισημάνση “everolimus freeze” και τελικά η ποσότητα του διαλύματος των κυστιδίων που συλλέχθηκε ήταν 1.84g, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη της αυτοοργάνωσης με δυναμική σκέδαση φωτός και SEC.

^b Η προσθήκη π.HCl επηρέασε το pH μειώνοντας το σε pH=6.6. Σε αυτή την τιμή η His που συντελεί την υδρόφοβη συστάδα του triblock (μαζί με το PBLG) πρωτονιώνεται και μετατρέπεται σε υδρόφιλη και έτσι δεν μπορεί να ενσωματωθεί το φάρμακο. Για αντιμετώπιση του προβλήματος προστέθηκε εκ νέου ποσότητα του tris μέχρι το τελικό pH=7.38.

Το εναιώρημα των νανοσωματιδίων στα οποία περιέχεται το everolimus που προέκυψε από την δεύτερη μέθοδο εγκλωβισμού φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 3.5.: Το διάλυμα “everolimus freeze” των κυστιδίων που παρασκευάστηκε με την μέθοδο της διαλυτοποίησης - εξάτμισης

3.3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕΓΕΘΩΝ

Με τη μέθοδο της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών παρακολουθήθηκε η πορεία της αυτοοργάνωσης του πολυμερούς και ο εγκλωβισμός του φαρμάκου σε αυτό, μέσω του υπολογισμού του ποσοστού εγκλωβισμού από τα ληφθέντα χρωματογραφήματα, και για τις δύο τεχνικές που ακολουθήθηκαν. Ο χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων έχει ως φέρον διαλύτη CHCl_3 μαζί με μικρή ποσότητα Et_3N (για σπάσιμο των συσσωματωμάτων), η ροή του οποίου έχει ορισθεί στο 1.00 ml/min και η πίεση στα 1900 psi, και φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 3.6.: Ο χρωματογράφος της εταιρίας Waters που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των δειγμάτων

Και στις δύο περιπτώσεις εγκλωβισμού της φαρμακευτικής ουσίας, σε πρώτη φάση κατασκευάζεται καμπύλη βαθμονόμησης ύστερα από ενέσεις διαφορετικών ποσοτήτων πρότυπου δείγματος (ποσότητα φαρμάκου διαλυμένη στον φέροντα διαλύτη) και βάσει του εμβαδού (area) των χαρακτηριστικών κορυφών του. Η ανάλυση πραγματοποιείται ύστερα από εκχύλιση του προς εξέταση διαλύματος των σωματιδίων που περιέχουν το φάρμακο σε μικρή ποσότητα του φέροντος διαλύτη. Με αυτό τον τρόπο καταστρέφονται τα κυστίδια και σχηματίζεται μία υδατική

υπερκεείμενη φάση και μία οργανική υποκείμενη φάση λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας του χλωροφορμίου έναντι του νερού ($d_{\text{CHCl}_3} = 1.483\text{g/cm}^3$) στην οποία βρίσκεται διαλυμένο το everolimus (η διαλυτότητα του everolimus στο CHCl_3 είναι 100mg/mL). Πραγματοποιώντας, λοιπόν, ένεση συγκεκριμένης ποσότητας της οργανικής φάσης και ύστερα από επεξεργασία των παραληφθέντων χρωματογραφημάτων μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του φαρμάκου που εγκλωβίστηκε μέσα στις κυστιδιακές δομές.

Ειδικότερα, κατά την ανάλυση του δείγματος της μεθόδου dialysis για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης έγινε διάλυση 1mg everolimus σε 2mL CHCl_3 και πραγματοποιήθηκαν ενέσεις $50\mu\text{L}$ και $100\mu\text{L}$ του προτύπου διαλύματος. Για την εκχύλιση του άγνωστου δείγματος χρησιμοποιήθηκε 1mL CHCl_3 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν ενέσεις $150\mu\text{L}$ και $250\mu\text{L}$ από την οργανική φάση.

Σε πλήρη αντιστοιχία με τα παραπάνω, για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης για την ανάλυση του δείγματος της μεθόδου διαλυτοποίησης – εξάτμισης έγινε διάλυση 1mg του φαρμάκου σε 2mL CHCl_3 και πραγματοποιήθηκαν ενέσεις των $100\mu\text{L}$, $200\mu\text{L}$ και $250\mu\text{L}$ από το πρότυπο διάλυμα. Η εκχύλιση του αγνώστου έγινε με 1mL χλωροφορμίου και ενύθηκαν $200\mu\text{L}$ από την παραληφθείσα οργανική φάση στον χρωματογράφο. Όλα τα ληφθέντα χρωματογραφήματα καθώς και οι αντίστοιχοι πίνακες των πειραματικών αποτελεσμάτων παρατίθενται και αναλύονται στο Κεφάλαιο 4.

3.4. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ

Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός, πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλο φασματοφωτόμετρο της εταιρίας Malvern Instr. (μοντέλο Autosizer 4700) το οποίο διαθέτει laser μεταβλητής ισχύος Ar^+ που λειτουργεί στα 488 nm, αντλία φιλτραρίσματος νερού RR98 και μονάδα ελέγχου θερμοκρασίας τύπου PCS8. Η κυψελίδα εισαγωγής του δείγματος αποτελείται από χαλαζία (quartz), ενώ όλες οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων έγιναν σε γωνία 90° και υπό αυστηρή θερμοστάτηση του νερού φιλτραρίσματος. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε δείχνεται στην παρακάτω φωτογραφία:



Εικόνα 3.7.: Το φασματοφωτόμετρο της δυναμικής σκέδασης φωτός που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του μεγέθους των κυστιδίων

Αρχικά, προσδιορίστηκε το μέγεθος των σωματιδίων χωρίς το εγκλωβισμένο φάρμακο (δείγμα “blank”), οπότε και αποδείχτηκε η αρχική υπόθεση για σχηματισμό κυστιδίων λόγω της αυξημένης τιμής του (89nm , $\Theta_{\text{H}_2\text{O}}=26.8^\circ\text{C}$). Η τιμή αυτή αποκλείει την ύπαρξη μικκυλίων στο διάλυμα το μέγεθος των οποίων θα ήταν αρκετά μικρότερο. Η οριστική επαλήθευση έγινε μετά και από τον προσδιορισμό του Z-δυναμικού.

Τα ληφθέντα πειραματικά αποτελέσματα από την μέτρηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων με ενσωματωμένο το everolimus και για τις δύο μεθόδους παρατίθενται σε μορφή πινάκων στο Κεφάλαιο 4 των αποτελεσμάτων. Μάλιστα για το δείγμα της dialysis πραγματοποιήθηκε συμπληρωματική μέτρηση με το όργανο Zetasizer 3000HS του καθηγητή Κ. Δεμέτζου του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών αλλά και μέτρηση με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM), για σύγκριση με τα αποτελέσματα του οργάνου του Τομέα Πολυμερών.

3.5. Z-ΔΥΝΑΜΙΚΟ

Με σκοπό να εξακριβωθεί ποια από τις δύο υδρόφιλες συστάδες (PEO ή PLL) του πολυμερούς βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά των κυστιδίων, είναι απαραίτητη η μέτρηση του Z-δυναμικού. Βέβαια, θεωρητικά η συστάδα που έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος θα βρίσκεται απ' έξω κατά την διαδικασία της αυτοοργάνωσης. Έτσι επειδή το PEO έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος ($M_w=10000$) έναντι της PLL ($M_w=7000$) αναμένεται να σχηματίσει το εξωτερικό υδρόφιλο κέλυφος των κυστιδίων, πράγμα επιθυμητό λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων που παρουσιάζει το PEO (βιοσυμβατό, δυνατότητα προσαρμογής υποδοχέων για τους καρκινικούς στόχους).³⁴

Για επαλήθευση αυτής της θεωρητικής προσέγγισης πραγματοποιήθηκε πειραματικά η μέτρηση του Z-δυναμικού στο δείγμα των νανοσωματιδίων-φαρμάκου που προέκυψαν από την μέθοδο dialysis και σε συνεργασία με τον καθηγητή Κ. Δεμέτζο του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, ο οποίος μας διέθεσε το όργανο Zetasizer 3000HS που φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 3.8.: Το όργανο μέτρησης του Z-δυναμικού (Zetasizer 3000HS)

Η αναμενόμενη τιμή του Z-δυναμικού στην περίπτωση που το PEO βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά των κυστιδίων πρέπει να είναι παραπλήσια των 0 mV, γεγονός που συμπίπτει με τα ληφθέντα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται

στο Κεφάλαιο 4 ($Z_{\text{πειρ.}}=5.0\pm0.5$ mV). Σε αντίθετη περίπτωση η ύπαρξη φορτίων της PLL στην εξωτερική πλευρά των σωματιδίων θα οδηγούσε σε αρκετά θετική τιμή του Z-δυναμικού (~50 mV) και άρα σε ένα ασταθές σύστημα λόγω της άπωσης των ηλεκτρικών φορτίων.

Στα πλαίσια της μέτρησης του Z-δυναμικού προσδιορίστηκε, με χρήση του ίδιου οργάνου, και η πολυδιασπορά στο ίδιο δείγμα των νανοσωματιδίων, στα οποία είναι ενσωματωμένο το φάρμακο everolimus, που προέκυψε από τη διαδικασία της διαπίδυσης (δείγμα “everolimus”), η τιμή της οποίας είναι αρκετά μικρή και μέσα στο αποδεκτό όριο (polydisp.= 0.16).

3.6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ *IN VIVO*

Στα πλαίσια της έρευνας πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο και σε συνεργασία με τον αναπληρωτή καθηγητή Κ. Δήμα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τους συνεργάτες του, εξετάστηκε αν το χρησιμοποιούμενο triblock εμφανίζει *in vivo* τοξικότητα σε πειραματόζωα (ποντίκια).

Έτσι, δόθηκε στα πειραματόζωα δείγμα “blank” του πολυμερούς (δηλαδή PEO-PHIs με παράλειψη της υδρόφοβης συστάδας) αλλά και δείγμα άδειων κυστιδίων σε μεγάλη συγκέντρωση χωρίς την εμφάνιση κάποιας τοξικότητας. Το “φόρτωμα” των δειγμάτων στους οργανισμούς έγινε με τη βοήθεια υδροτζέλ (hydrogel) ώστε η αποδέσμευση να γίνεται με βραδύ ρυθμό για καλύτερη αποτελεσματικότητα.³⁴



Εικόνα 3.9.: Πειραματόζωα στα οποία έχει γίνει ένεση δείγματος “blank” μέσω υδροτζέλ

Σε επόμενο στάδιο στόχος της ερευνητικής ομάδας του κ. Δήμα είναι η ανάπτυξη xenografts (δηλαδή ανθρώπινων καρκινικών ιστών του παγκρέατος) σε πειραματόζωα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα για μελέτη της αποτελεσματικότητας των κυστιδίων που περιέχουν το αντικαρκινικό φάρμακο everolimus και που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο dialysis στην καρκινική θεραπεία.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- Πειραματικά Αποτελέσματα της Μεθόδου Διαπίδυσης:

Αρχικά, ύστερα από τη λήψη του διαλύματος των κυστιδιακών δομών μαζί με το everolimus της μεθόδου dialysis, προσδιορίστηκε σε αυτό το δείγμα το μέγεθος των σωματιδίων μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) τόσο με το μηχάνημα Autosizer 4700 όσο και με το μηχάνημα Zetasizer 3000HS. Τα αποτελέσματα από τα δύο όργανα συμπίπτουν σε μεγάλο βαθμό και παρατίθενται στους ακόλουθους πίνακες:

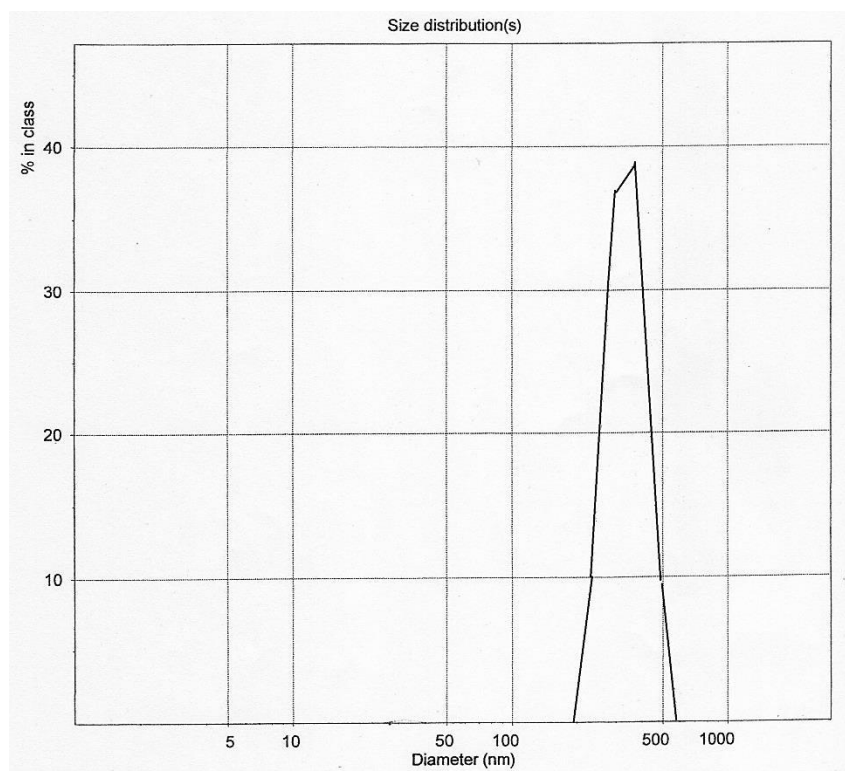
Πίνακας 2: Πειραματικά αποτελέσματα DLS (μηχάνημα Autosizer 4700) για το δείγμα “dialysis” ($\theta=26.8^\circ\text{C}$)

α/α μέτρησης	Μέγεθος (nm)	KCounts	Area (%)
1	294.3	45.8	100
2	284.4	44.4	100
3	267.4	42.9	100
4	272.2	43.3	100
Μέσος Όρος	279.6	44.1	100

Πίνακας 3: Πειραματικά αποτελέσματα DLS (μηχάνημα Zetasizer 3000HS) για το δείγμα “dialysis” ($\theta=25.0^\circ\text{C}$)

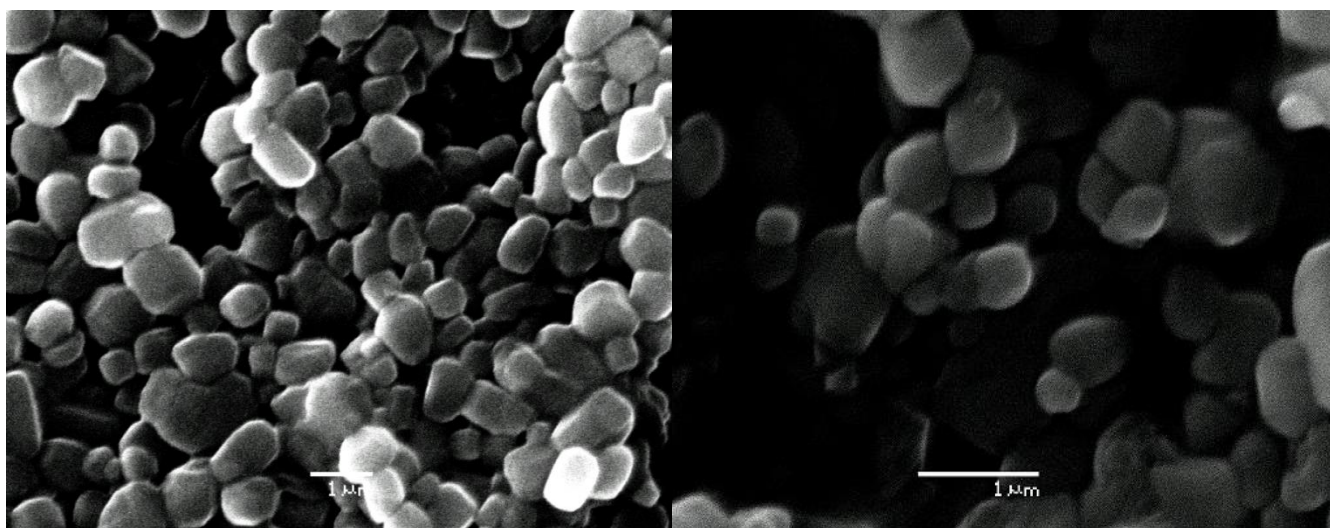
α/α μέτρησης	Angle	KCps	Z _{ave} (nm)	Poly. Index
1	90.0	230.3	344.6	0.160
2	90.0	186.0	340.9	0.210
3	90.0	203.3	335.0	0.165
Μέσος Όρος	-	204.5	340.2	0.181
+/-	-	25.1	4.8	0.033

Βάσει των αποτελεσμάτων του Πίνακα 3 προέκυψε το ακόλουθο γράφημα κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων ως τη διάμετρο τους (σε nm):



Εικόνα 4.1.: Γράφημα DLS της κατανομής μεγεθών των κυστιδίων του δείγματος "dialysis"

Για επιπλέον ακρίβεια στη μέτρηση του μεγέθους των κυστιδίων που προήλθαν από την διαπίδυση αλλά και για παρατήρηση του είδους αυτοοργάνωσης αλλά και τυχόν ύπαρξης συσσωματωμάτων, το δείγμα ελέγχθηκε με τη βοήθεια οργάνου ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). Στις δύο φωτογραφίες που ακολουθούν γίνεται εμφανές ότι ο βαθμός συσσωμάτωσης είναι μικρός, το δείγμα χαρακτηρίζεται από καλή πολυδιασπορά και το μέγεθος των σωματιδίων συμφωνεί με τα αποτελέσματα της τεχνικής DLS (~350 nm).

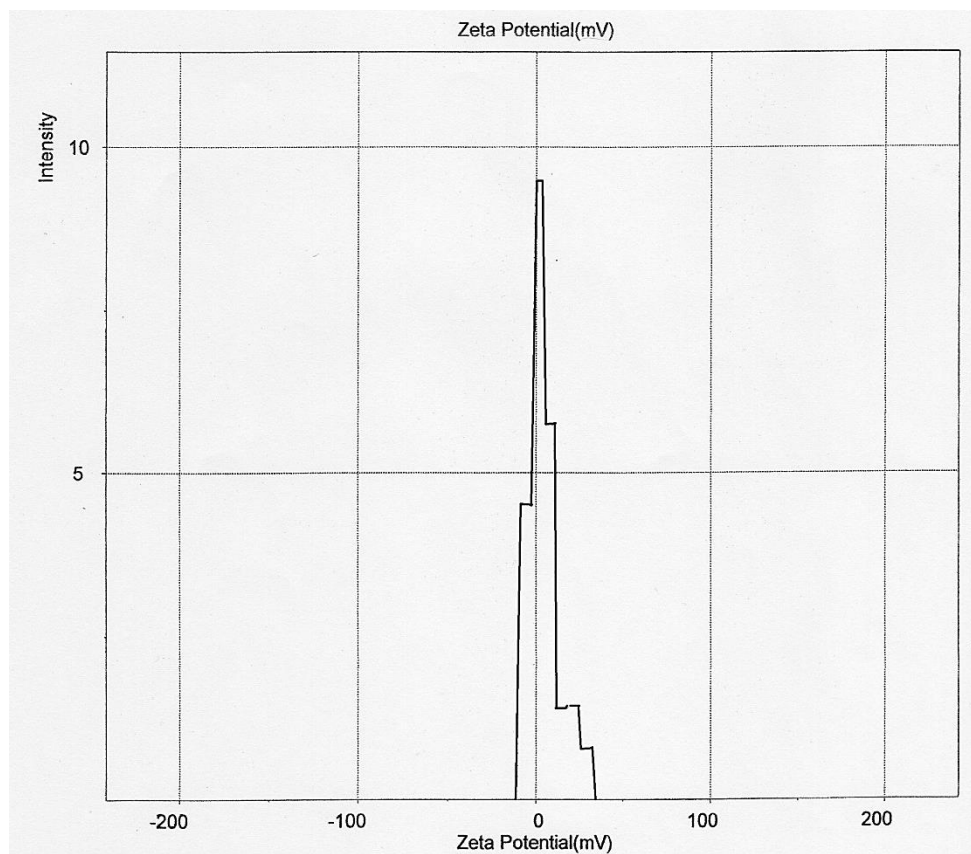


Εικόνα 4.2.: Φωτογραφίες SEM του δείγματος που παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της διαπίδυσης

Στο ίδιο δείγμα πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός του Z-Δυναμικού και όπως φαίνεται από τα πειραματικά αποτελέσματα του Πίνακα 4 αλλά και από το διάγραμμα του Z-Δυναμικού (Εικόνα 4.3), αποδεικνύεται λόγω της τιμής του Z-Δυναμικού που είναι κοντά στα 0 mV ότι δεν υπάρχουν ηλεκτρικά φορτία στην επιφάνεια των σχηματισθέντων κυστιδίων και άρα ότι το PEO έχει σχηματίσει την εξωτερική στιβάδα τους.

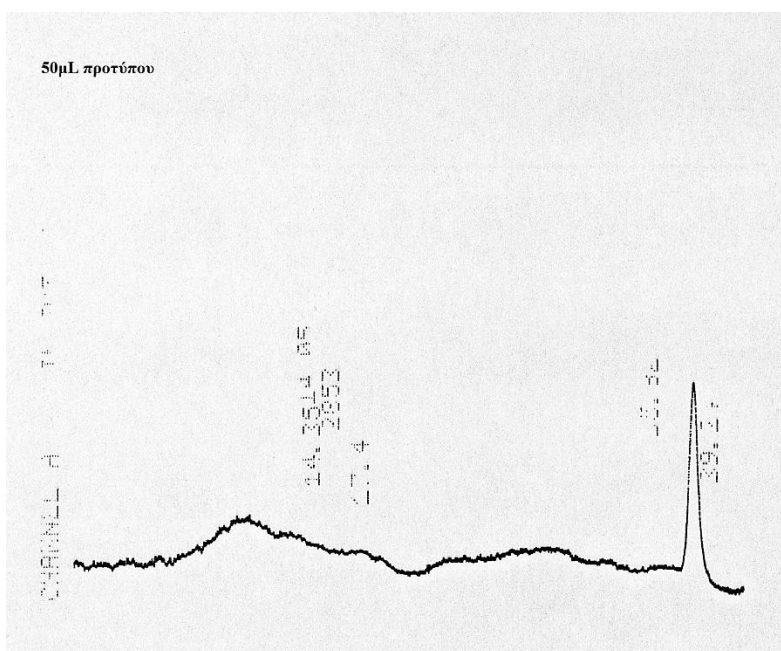
Πίνακας 4: Πειραματικά αποτελέσματα μέτρησης του Z-Δυναμικού

α/α Μέτρησης	Pos.	KCps	Zeta	Εύρος
1	50.0	105.2	4.5	2.4
2	50.0	102.7	5.6	2.4
3	50.0	100.5	4.9	7.1
Μέσος Όρος	-	102.8	5.0	3.9
+/-	-	2.3	0.5	2.7

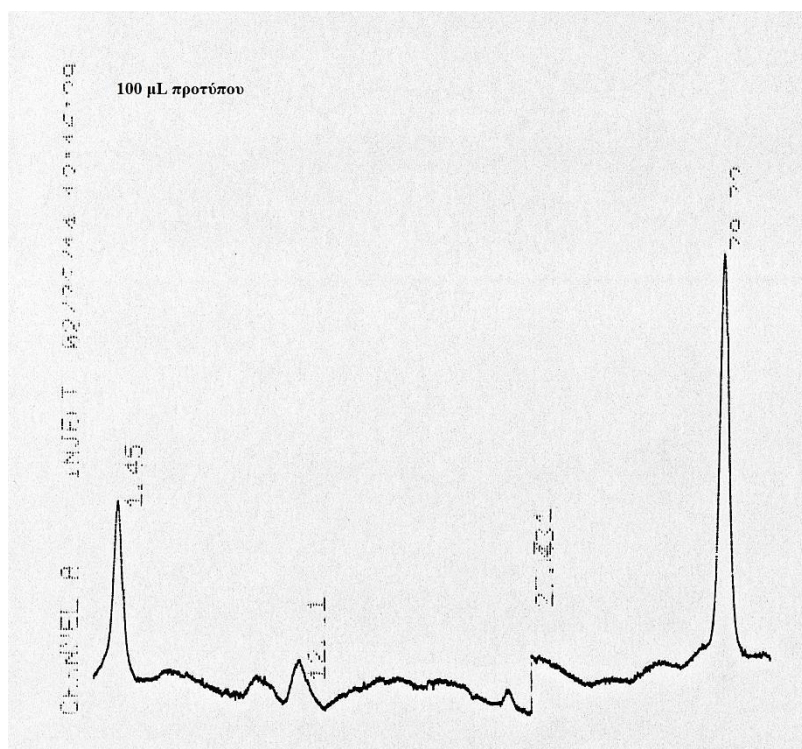


Εικόνα 4.3.: Γράφημα προσδιορισμού του Z-Δυναμικού (σε mV)

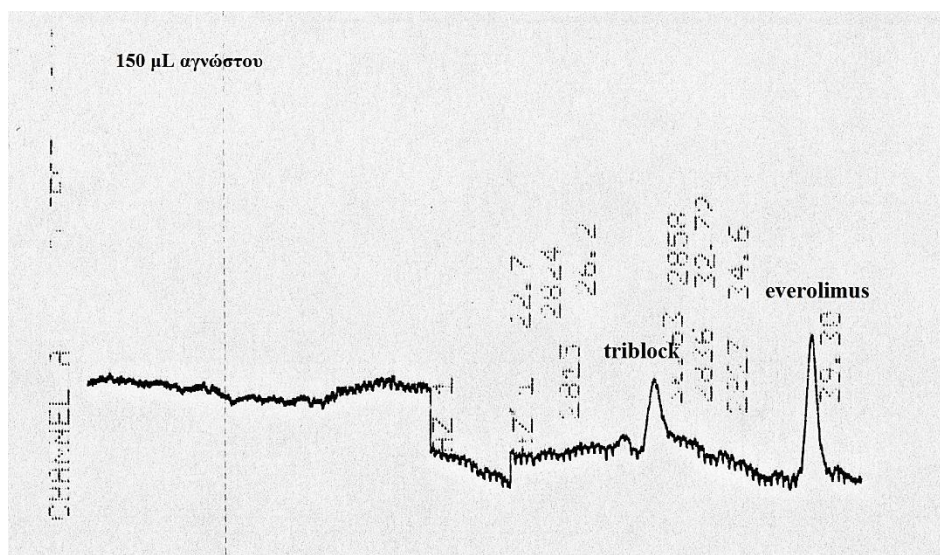
Στη συνέχεια για ανάλυση του δείγματος και για υπολογισμό του ποσοστού δέσμευσης του φαρμάκου μέσα στα κυστίδια προσδιορίζονται τα ποσοστά loading efficiency και loading capacity, ύστερα από κατασκευή της αντίστοιχης καμπύλης βαθμονόμησης βάσει των χρωματογραφημάτων των προτύπων δειγμάτων που φαίνονται παρακάτω και υπολογίζοντας πόσα mg everolimus δεσμεύτηκαν στο άγνωστο δείγμα.



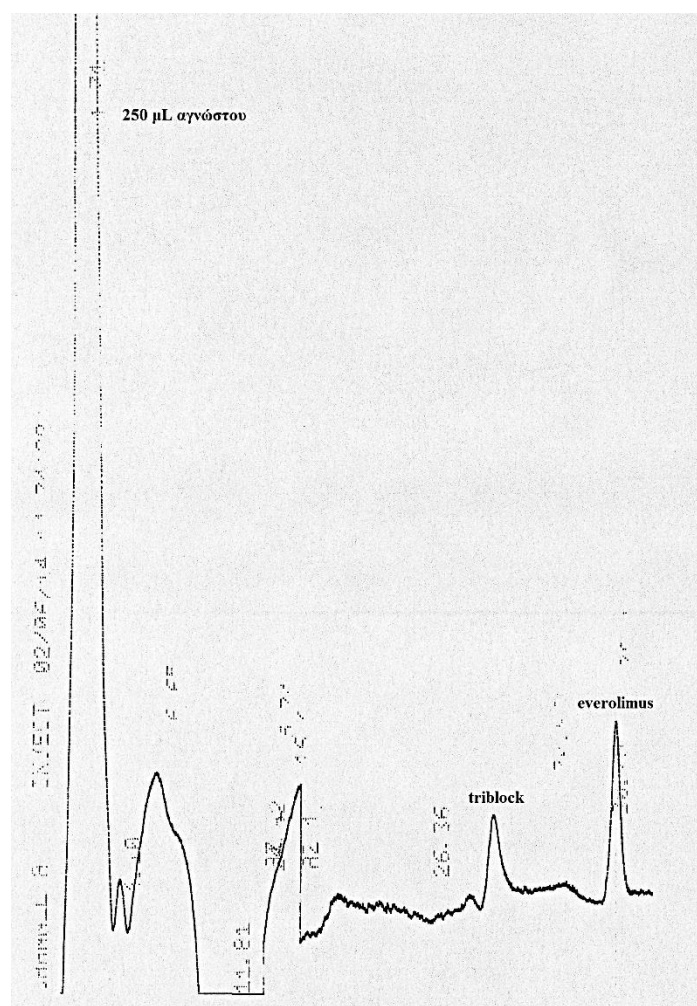
Εικόνα 4.4.: Χρωματογράφημα (SEC) 50μL πρότυπου δείγματος σε CHCl_3



Εικόνα 4.5.: Χρωματογράφημα (SEC) 100μL πρότυπου δείγματος σε CHCl_3



Εικόνα 4.6.: Χρωματογράφημα (SEC) 150 μ L αγνώστου δείγματος σε CHCl_3



Εικόνα 4.7.: Χρωματογράφημα (SEC) 250 μ L αγνώστου δείγματος σε CHCl_3

Τα πειραματικά αποτελέσματα της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών συνοψίζονται στο Πίνακα 5 και έτσι υπολογίζονται τα ποσοστά loading efficiency και loading capacity.

Πίνακας 5: Πειραματικά αποτελέσματα από τη μέθοδο SEC για το δείγμα "dialysis"

Δείγμα	Χρόνος Έκλουσης (min)	Area
50μL προτύπου	39.24	212795
100μL προτύπου	39.32	417509
150μL αγνώστου	39.3	137198
250μL αγνώστου	39.42	243245

$$\text{loading efficiency} = \frac{\text{mg everolimus που δεσμεύτηκαν}}{\text{mg everolimus που χρησιμοποιήθηκαν}} * 100 = \frac{0.160}{0.93} * 100 = 17.2\%$$

$$\text{loading capacity} = \frac{\text{mg everolimus που δεσμεύτηκαν}}{\text{mg triblock που χρησιμοποιήθηκαν}} * 100 = \frac{0.160}{5.5} * 100 = 2.9\%$$

- Πειραματικά Αποτελέσματα της Μεθόδου Διαλυτοποίησης – Εξάτμισης:

Ο προσδιορισμός του μεγέθους των κυστιδίων που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της διαλυτοποίησης – εξάτμισης πραγματοποιήθηκε με το όργανο Autosizer 4700 και έγινε σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (25°C και 37°C). Έτσι έχουμε τα εξής:

Για θ=25°C:

Πίνακας 6: Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων DLS του δείγματος "freeze" σε θ=25°C

α/α μέτρησης	Κορυφή	Μέγεθος (nm)	Area (%)	KCounts	Z _{ave} (nm)
1	1	46.9	67.4	97.9	176.6
	2	274.6	29.4		
2	1	57.5	70.6	113.6	176.6
	2	278.0	23.0		
3	1	43.5	71.1	95.1	151.6

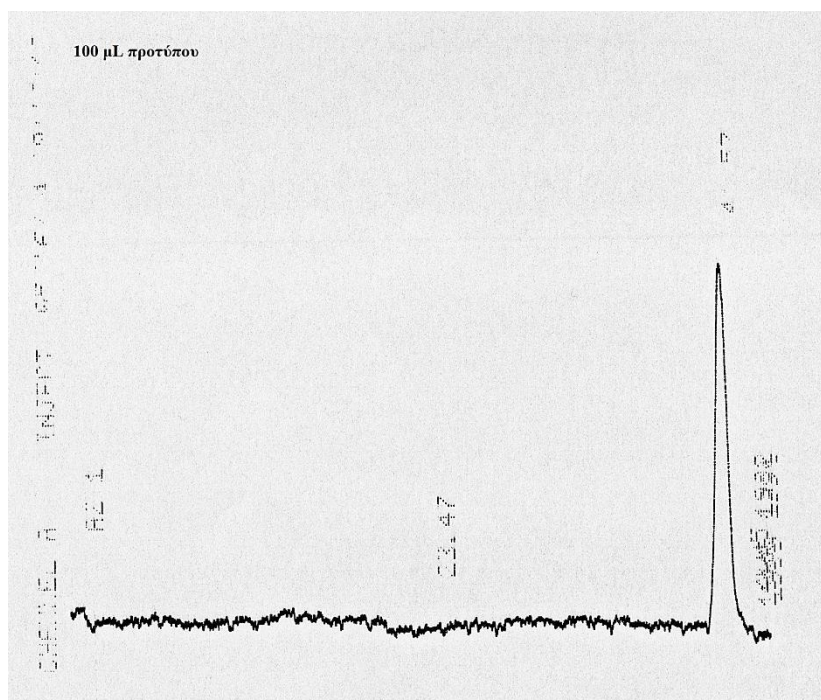
	2	305.1	28.9		
4	1	42.8	73.4	93.4	158.4
	2	306.3	26.6		
5	1	49.3	71.3	90.7	158.3
	2	288.8	26.1		

Για $\theta=37^{\circ}\text{C}$:

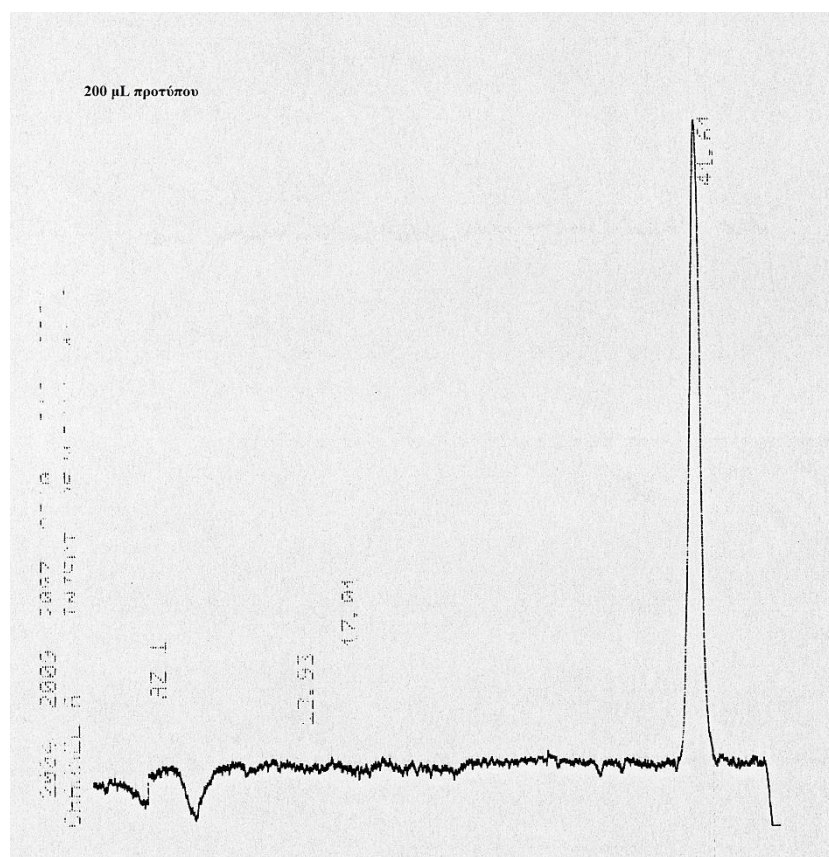
Πίνακας 7: Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων DLS του δείγματος "freeze" σε $\theta=37^{\circ}\text{C}$

α/α μέτρησης	Κορυφή	Μέγεθος (nm)	Area (%)	KCounts	Z_{ave} (nm)
1	1	54.8	76.8	67.8	196.1
	2	370.9	20.6		
2	1	58.0	82.1	65.2	179.0
	2	458.1	17.9		
3	1	61.7	79.5	66.6	231.3
	2	454.1	20.5		
4	1	56.0	78.0	67.2	199.0
	2	348.5	17.1		
5	1	55.6	80.8	65.2	161.7
	2	463.4	19.2		

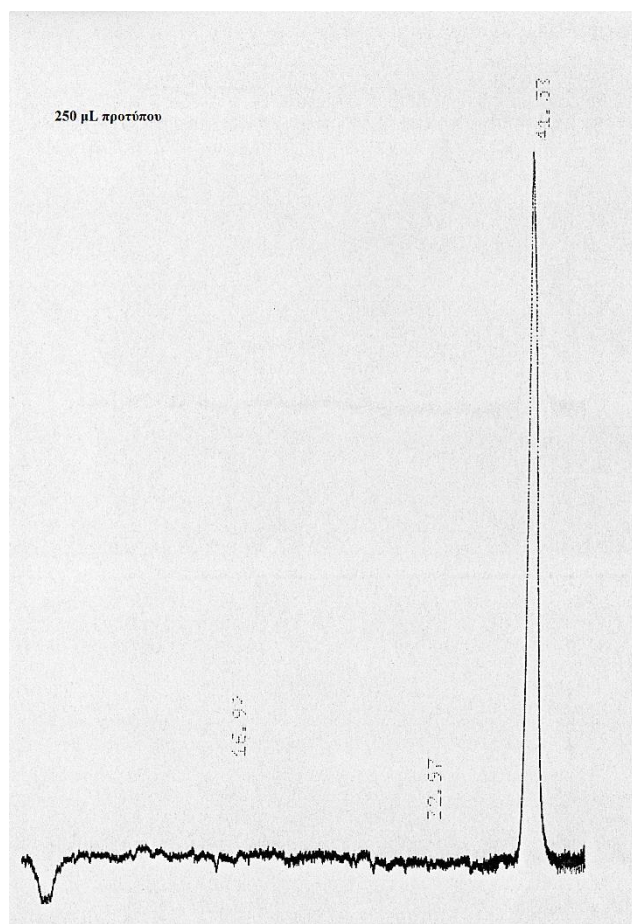
Για την ανάλυση του δείγματος “freeze” και για υπολογισμό του ποσοστού δέσμευσης του φαρμάκου μέσα στα κυστίδια προσδιορίζονται τα αντίστοιχα ποσοστά loading efficiency και loading capacity, ύστερα από κατασκευή της κατάλληλης καμπύλης βαθμονόμησης βάσει των χρωματογραφημάτων των προτύπων δειγμάτων που φαίνονται παρακάτω και υπολογίζοντας πόσα mg everolimus δεσμεύτηκαν στο άγνωστο δείγμα αυτής της μεθόδου.



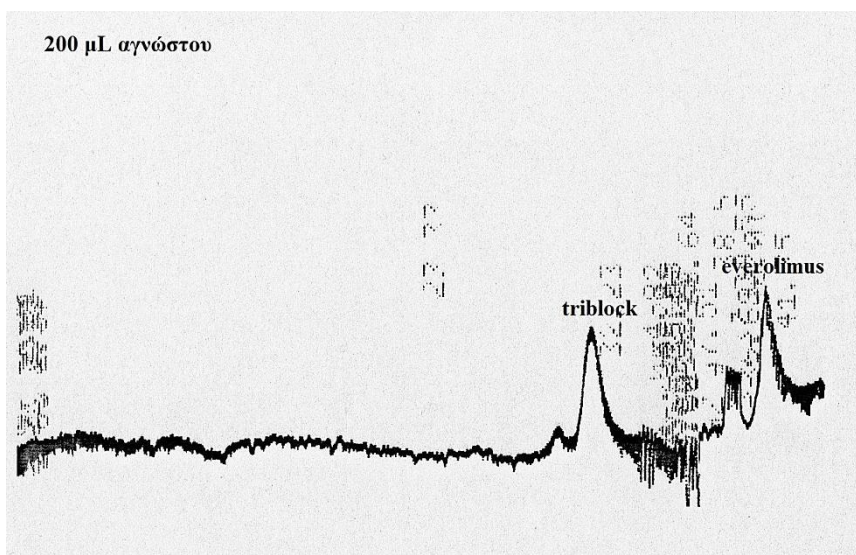
Εικόνα 4.8.: Χρωματογράφημα (SEC) 100 μ L πρότυπου δείγματος σε CHCl_3



Εικόνα 4.9.: Χρωματογράφημα (SEC) 200 μ L πρότυπου δείγματος σε CHCl_3



Εικόνα 4.10.: Χρωματογράφημα (SEC) 250μL πρότυπου δείγματος σε CHCl_3



Εικόνα 4.11.: Χρωματογράφημα (SEC) 200μL αγνώστου δείγματος σε CHCl_3

Σε πλήρη αντιστοιχία με τη μέθοδο dialysis, τα πειραματικά αποτελέσματα της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών για το δείγμα “freeze” συνοψίζονται στο

Πίνακα 8 και έτσι προκύπτουν τα εμφανώς χαμηλότερα ποσοστά loading efficiency και loading capacity αυτής της μεθόδου.

Πίνακας 8: Πειραματικά αποτελέσματα από τη μέθοδο SEC για το δείγμα "freeze"

Δείγμα	Χρόνος Έκλουσης (min)	Area
100μL προτύπου	41.57	497748
200μL προτύπου	41.61	955509
250μL προτύπου	41.53	1244503
200μL αγνώστου	41.35	136336

$$\text{loading efficiency} = \frac{\text{mg everolimus που δεσμεύτηκαν}}{\text{mg everolimus που χρησιμοποιήθηκαν}} * 100 = \frac{0.0605}{1.06} * 100 = 5.7\%$$

$$\text{loading capacity} = \frac{\text{mg everolimus που δεσμεύτηκαν}}{\text{mg triblock που χρησιμοποιήθηκαν}} * 100 = \frac{0.0605}{6.11} * 100 = 1.0\%$$

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ολοκληρώνοντας την παρουσίαση των αποτελεσμάτων και την περιγραφή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας, συνοψίζονται τα συμπεράσματα από τον εγκλωβισμό του αντικαρκινικού φαρμάκου Everolimus σε κυστίδια που συντελούνται από το τρισυσταδικό τριπολυμερές PEO-*b*-(PHis-co-PBLG)-*b*-PLL.

Το βασικότερο στοιχείο που εξάχθηκε είναι ότι η μέθοδος της διαπίδυσης για τον εγκλωβισμό του φαρμάκου έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με την δεύτερη μέθοδο που ακολουθήθηκε. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος της διαπίδυσης έδωσε μεγαλύτερο ποσοστό δεσμεύσεως του φαρμάκου (17.2% έναντι 5.7% της δεύτερης μεθόδου), που βρίσκεται μέσα στα αποδεκτά όρια για χαρακτηρισμό της μεθόδου ως αποτελεσματικής. Αυτή η μεγάλη διαφορά ανάμεσα στις δύο τιμές του loading efficiency μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι το δεύτερο σύστημα που αναπτύχθηκε δεν βρισκόταν σε κατάσταση ισορροπίας και δεν ήταν θερμοδυναμικά σταθερό, έτσι δεν μπόρεσε να συγκρατηθεί ικανοποιητική ποσότητα της φαρμακευτικής ουσίας κατά τη διάρκεια της αυτοοργάνωσης. Επιπλέον η dialysis είναι μία διαδικασία που μπορεί να αναπαραχθεί εύκολα και επαναλήψιμα εφόσον τηρηθεί το ίδιο πρότυπο εργασίας. Ακόμη, οι τιμές για το μέγεθος των κυστιδίων βρέθηκαν παραπλήσιες και στις δύο μεθόδους (340nm έναντι 290nm στους 25°C). Όλα αυτά τα στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι σε περίπτωση μελλοντικής έρευνας και ενασχόλησης πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο θα πρέπει να ακολουθηθεί η μέθοδος της διαπίδυσης.

Ένα ακόμα πολύ σημαντικό συμπέρασμα της εργασίας είναι η απόδειξη μέσω της μέτρησης του Z-δυναμικού ότι η συστάδα του PEO βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά των κυστιδίων. Η απόδειξη αυτή είναι υψίστης σημασίας γιατί με αυτό τον τρόπο θα μπορούν να προσαρτηθούν πάνω στα κυστίδια ειδικοί υποδοχείς που θα στοχεύουν εξειδικευμένα τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα απελευθερώνοντας τότε την φαρμακευτική ουσία, χωρίς η απελευθέρωση της να γίνεται πρόωρα μέσα στον οργανισμό εμφανίζοντας τυχόν ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Κλείνοντας πρέπει να τονισθεί ότι ο τομέας των βιοπολυμερών και η χημεία των πολυπεπτιδίων αναπτύσσονται τάχιστα τα τελευταία χρόνια δείχνοντας το σωστό μονοπάτι που πρέπει να στραφεί η επιστημονική έρευνα για την εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας ενάντια στον καρκίνο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sewald, N.; Jakubke, H-D. *Peptides: Chemistry and Biology*, 2nd ed. Wiley-VCH: Weinheim, **2002**.
2. Floudas, G.; Spiess, H.W. Self-assembly and dynamics of polypeptides. *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, 30, 278-298.
3. Gkikas, M.; Das, B.; Tsianou, M.; Iatrou, H.; Sakellariou, G. Surface initiated ring-opening polymerization of L-proline N-carboxy anhydride from single and multi-walled carbon nanotubes. *Eur. Polym. J.* **2013**, 49, 3095-3103.
4. Rodriguez-Hernandez, J.; Checot, F.; Gnanou, Y.; Lecommandoux, S. Toward 'Smart' Nano-Objects by Self-Assembly of Block Copolymers in Solution. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, 69-72.
5. Checot, F.; Rodriguez-Hernandez, J.; Gnanou, Y.; Lecommandoux, S. pH-Responsive Micelles and Vesicles Nanocapsules Based on Polypeptide Diblock Copolymers. *J. Bioeng.* **2007**, 24, 81-85.
6. Disher, B.; Won, Y-Y.; Ege, D.; Lee, J. C-M.; Bates, F.; Disher, D.; Hammer, D. Polymersomes: Vesicles Made from Diblock Copolymers. *Science*. **1999**, 284, 1143-1146.
7. Efthimiadou, E.K.; Tziveleka, L.; Bilalis, P.; Kordas, G. Novel PLA modification of organic microcontainers based on ring opening polymerization: Synthesis, characterization, biocompatibility and drug loading/release properties. *Int. J. Pharm.* **2012**, 428, 134-142.
8. Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. *Biochemistry*, 6th ed. W. H. Freeman: New York, **2007**.
9. Nelson, D.; Cox, M. *Principles of Biochemistry*, 5th ed. W. H. Freeman: New York, **2008**.
10. Γκίκας, Ε. *Αμφίφιλα Πολυπεπίδια: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Μελέτη Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ, **2012**.
11. Kumbar, G.S.; Laurencin, C.T.; Deng, M. *Natural and synthetic biomedical polymers*, 1st ed. Elsevier Inc.: Burlington, **2014**.
12. Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E. *Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine*, 2nd ed. Elsevier Academic Press: San Diego, California, **2004**.

13. Hadjichristidis, N.; Iatrou, H.; Pitsikalis, M.; Sakellariou, G. Synthesis of well-defined polypeptide-based materials via the ring-opening polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5528-5578.
14. Duncan, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2003**, *2*, 347-360.
15. Zhao, L.; Li, N.; Wang, K.; Shi, C.; Zhang, L.; Luan, Y. A review of polypeptide-based polymersomes. *Biomaterials.* **2014**, *35*, 1284-1301.
16. Καρατζάς, Α. *Μακρομοριακή Αρχιτεκτονική Πολυπεπτιδίων*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ, **2007**.
17. Mondeshki, M.; Spiess, H.W.; Aliferis, T.; Iatrou, H. Hadjichristidis, N.; Floudas, G. Hierarchical self-assembly in diblock copolypeptides of poly(γ -benzyl-L-glutamate) with poly(L-leucine) and poly(O-benzyl-L-tyrosine). *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 668-674.
18. Kricheldorf, H.R. Polypeptides and 100 years of chemistry of α -amino acid N-carboxyanhydrides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5752-5784.
19. Yang, D.; Li, W.; Qu, J.; Luo, S-W.; Wu, Y-D. A new strategy to induce γ -turns: peptides composed of alternating α -aminoxy acids and α -amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *43*, 13018-13019.
20. Floudas, G.; Papadopoulos, P.; Klok, H.-A.; Vandermeulen, G. W. M.; Rodriguez-Hernandez, J. Hierarchical self-assembly of poly(γ -benzyl-L-glutamate)-poly(ethylene glycol) - poly(γ -benzyl-L-glutamate) rod-coil-rod triblock copolymers. *Macromolecules.* **2003**, *36*, 3673-3683.
21. Kricheldorf, H. R. *α -Aminoacid N-carboxyanhydrides and Related Materials*, 1st ed. Springer-Verlag: New York, **1987**.
22. Vayaboury, W.; Giani, O.; Cottet, H.; Deratani, A.; Schue, F. Living Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides (NCA) upon Decreasing the Reaction Temperature. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1221-1224.
23. Goodman, M.; Hutchison, J. The mechanisms of polymerization of N-unsubstituted N-carboxyanhydrides. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3627-3630.
24. Peggion, E.; Terbojevich, M.; Cosani, A.; Colombini, C. Mechanism of N-carboxyanhydride (NCA) polymerization in dioxane. Initiation by carbon-14-labeled amines. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3630-3632.
25. Ballard, D.; Bamford, C. Studies in Polymerization. The Polymerization of N-carboxy- α -amino acid anhydrides. *Proc. R. Soc. Lond. A.* **1954**, *223*, 495-520.

26. Ballard, D.; Bamford, C.; Weymouth, F. Studies in Polymerization. Reactions of N-Carboxy-alpha-amino acid anhydrides initiated by metal cations. *Proc. R. Soc. Lond. A.* **1955**, 227, 155-183.
27. Ballard, D.; Bamford, C. Studies in Polymerization. 'The Chain-Effect'. *Proc. R. Soc. Lond. A.* **1956**, 236, 384-396.
28. Peggion, E.; Cosani, E.; Mattuchi, A.; Scoffone, E. Polymerization of γ -ethyl-L-glutamate-N-carboxyanhydride initiated by di-n-butyl and di-isopropyl amine. *Biopolymers.* **1964**, 2, 69-78.
29. Πιτσικάλης, Μ.; Χατζηχρηστίδη, Μ. *Ειδικά Θέματα Επιστήμης Πολυμερών*. Αθήνα, **2010**.
30. Ye, F.; Barrefelt, A.; Asem, H.; Abedi-Valugerdi, M.; El-Serafi, I.; Saghafian, M.; Abu-Salah, K.; Alrokayan, S.; Muhammed, M.; Hassan, M. Biodegradable polymeric vesicles containing magnetic nanoparticles, quantum dots and anticancer drugs for drug delivery and imaging. *Biomaterials.* **2014**, 35, 3885-3894.
31. Ding, J.; Xiao, C.; Zhuang, X.; He, C.; Chen, X. Direct formation of cationic polypeptide vesicle as potential carrier for drug and gene. *Mater. Lett.* **2012**, 73, 17-20.
32. Iatrou, H.; Frielinghaus, H.; Hanski, S.; Ferderigos, N.; Ruokolainen, J.; Ikkala, O.; Richter, D.; Mays, J.; Hadjichristidis, N. Architecturally induced multiresponsive vesicles from well-defined polypeptides. Formation of gene vehicles. *Biomacromolecules.* **2007**, 8, 2173-2181.
33. Huang, Y-C.; Arham, M.; Jan, J-S. Bioactive vesicles from saccharide- and hexanoyl-modified poly(L-lysine) copolypeptides and evaluation of the cross-linked vesicles as carriers of doxorubicin for controlled drug release. *Eur. Polym. J.* **2013**, 49, 726-737.
34. Iatrou, H.; Dimas, K.; Gkikas, M.; Tsimblouli, C.; Sofianopoulou, S. Polymersomes from polypeptide containing triblock co- and terpolymers for drug delivery against pancreatic cancer: asymmetry of the external hydrophilic blocks. *Macromol. Biosci.* **2014**.
(DOI: 10.1002/mabi.201400137)
35. Jo, Y.; van der Vlies, A.; Gantz, J.; Antonijevic, S.; Demurtas, D.; Velluto, D.; Hubbell, J. RAFT Homo- and Copolymerization of N-Acryloyl-morpholine,

- piperidine, and azocane and their self-assembled structures. *Macromolecules*. **2008**, *41*, 1140-1150.
36. Mishra, G.; Doddapaneni, B.; Nguyen, D.; Alani, A. Antiangiogenic effect of Docetaxel and Everolimus as individual and dual-drug-loaded micellar nanocarriers. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 660-669.
 37. Wang, C.; Wang, Y.; Wang, Y.; Fan, M.; Luo, F.; Qian, Z. Characterization, pharmacokinetics and disposition of novel nanoscale preparations of paclitaxel. *Int. J. Pharm.* **2011**, *414*, 251-259.
 38. Μπιλάλης, Π. *Σύνθεση και Χαρακτηρισμός Γραμμικών Τρισυσταδικών Πολυμερών*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ, **2008**.
 39. Barth, G.H.; Mays, W.J. *Modern Methods of Polymer Characterization*, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1991**.
 40. Χατζηχρηστίδης, Ν.; Πιτσικάλης, Μ.; Ιατρού, Ε. *Βιομηχανική Χημεία*. Αθήνα, **2011**.
 41. Skoog, A.D.; Holler, F.J.; Crouch, R.S. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed. Thomson, Brooks/Cole: Belmont, CA, **2007**.
 42. Teraoka, I. *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **2002**.
 43. Μεριστούδη, Α. *Ανάπτυξη Υβριδικών Φωτονικών Υλικών για Εφαρμογές σε Οπτικούς Αισθητήρες*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Επιστήμης των Υλικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, **2009**.
 44. Chu, B. Laser light scattering of polymer solutions. *Applied Optics*. **1997**, *36*, 7650-7656.
 45. Berne, B.J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering*, 1st ed. Wiley-Interscience: New York, **1976**.
 46. Sze, A.; Erickson, D.; Ren, L.; Li, D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *261*, 402-410.
 47. Παπαδιά, Κ. *Παρασκευή και μελέτη σταθερότητας ανοσολιποσωμάτων με μονοκλωνικό αντίσωμα OX26 και πεπτίδια ApoE3 στην επιφάνειά τους*. Διατριβή Ειδίκευσης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, **2012**.
 48. Ζώη, Α. *Εναπόθεση και ηλεκτρικός χαρακτηρισμός δομών κολλοειδών νανοσωματιδίων Au*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, ΕΜΠ, **2007**.

49. http://www.ema.europa.eu/docs/el_EL/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001038/WC500022814.pdf
(European Medicines Agency)
50. Watson, C.; Bradley, A. Sirolimus and everolimus: inhibitors of mammalian target of rapamycin in liver transplantation. *Transplant. Rev.* **2006**, *20*, 104-114.
51. Amato, R.; Flaherty, A.; Zhang, Y.; Ouyang, F.; Mohlrec, V. Clinical prognostic factors associated with outcome in patients with renal cell cancer with prior tyrosine kinase inhibitors or immunotherapy treated with everolimus. *Urologic Oncology*. **2014**, *32*, 345–354.
52. Ravaud, A.; Urva, S.; Grosch, K.; Cheung, W.; Anak, O.; Sellami, D. Relationship between everolimus exposure and safety and efficacy: Meta-analysis of clinical trials in oncology. *Eur. J. Cancer*. **2014**, *50*, 486-495.
53. Meric-Bernstam, F.; Gonzalez-Angulo, A.M. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 2278–87.