

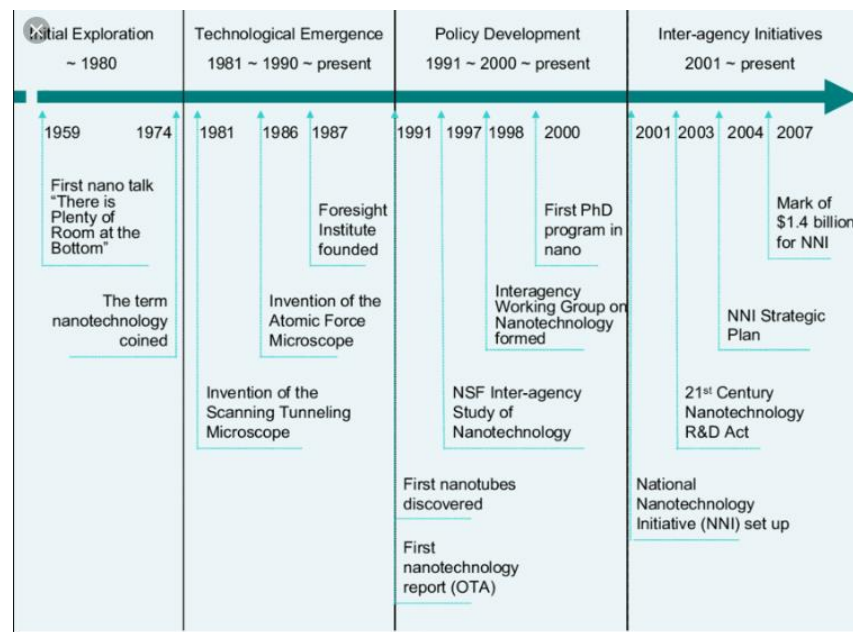
Νανοτεχνολογία

- ▶ Master 2019, Ανόργανη Χημεία και Τεχνολογία
- ▶ Ευθυμιάδου Ελένη,
- ▶ Επ. Καθ. Βιο-Ανόργανης Χημείας



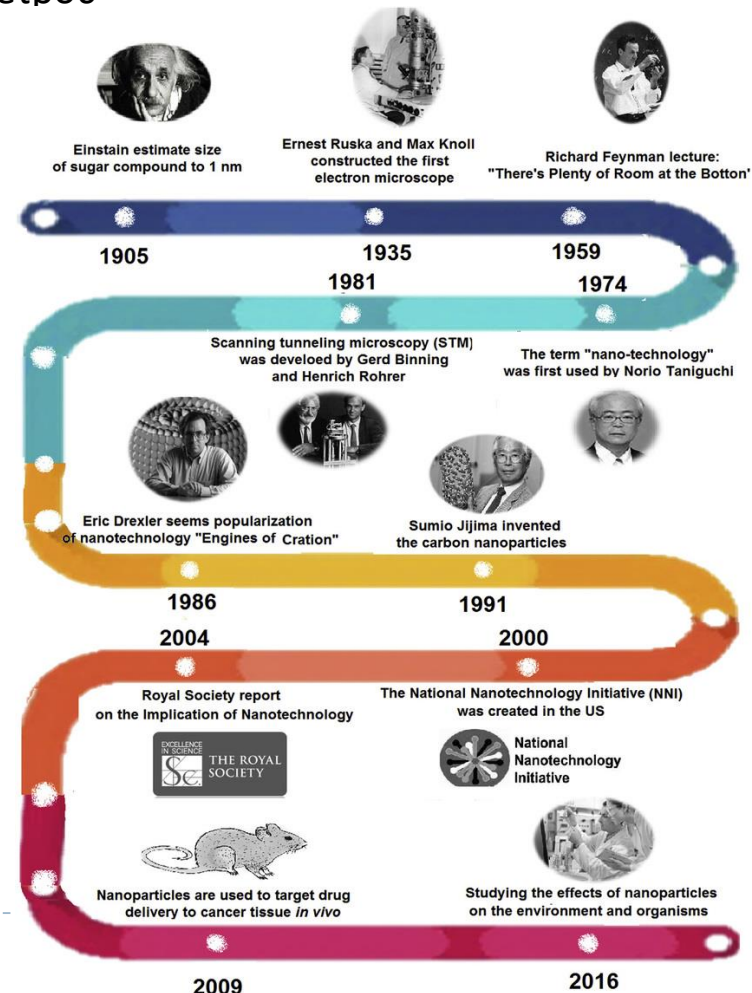
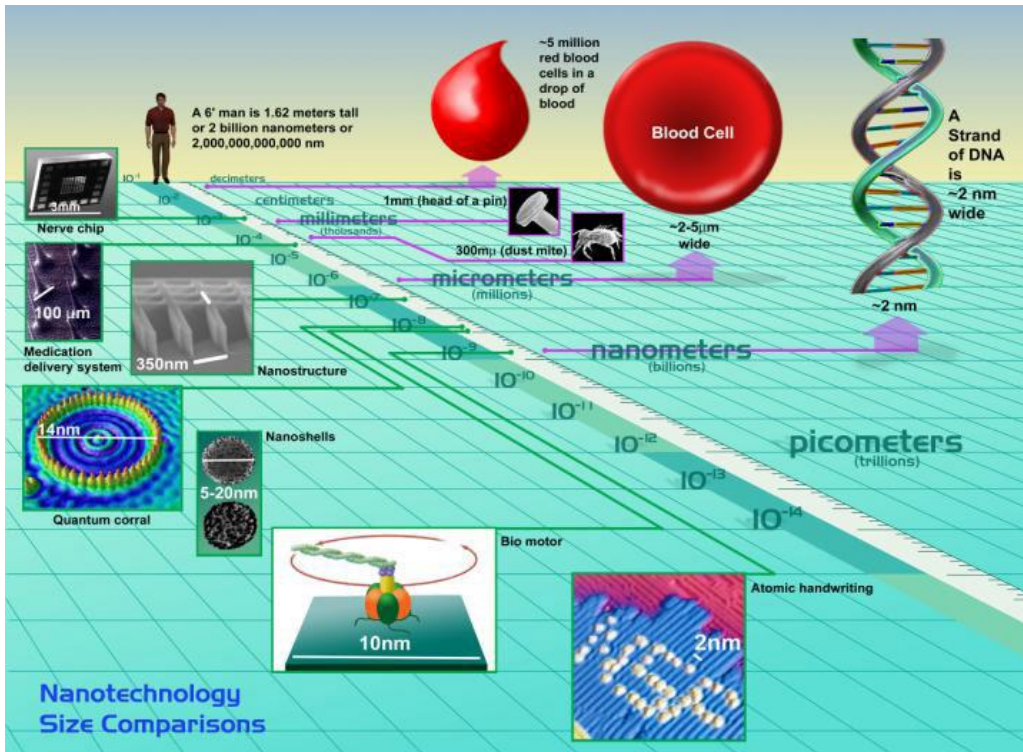
A Brief History of Nanotechnology

- On **December 29, 1959**, physicist **Richard Feynman** gave a radical lecture at an American Physical Society meeting at Caltech titled **"There's Plenty of Room at the Bottom"**.
- Feynman suggested that it should be possible to **make machines at a nano-scale that "arrange the atoms the way we want", and do chemical synthesis by mechanical manipulation.**
- This lecture was the **birth of the idea and study of nanotechnology.**



Από το άτομο στο νανόμετρο.....

- ▶ Ο υλικός κόσμος αποτελείται από άτομα. Τον ισχυρισμό αυτό διατύπωσε ήδη πριν από 2.400 χρόνια ο έλληνας διανοητής Δημόκριτος.
- ▶ Ένα νανόμετρο είναι ένα εκατομμυριοστό του χιλιοστομέτρου



Known Technology from Ancient years!

Gold Building Blocks

Atoms:
colorless, 1 Å



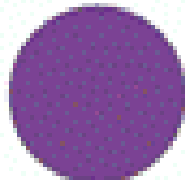
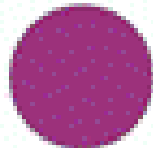
Gold clusters:
orange, nonmetallic,
<1 nm



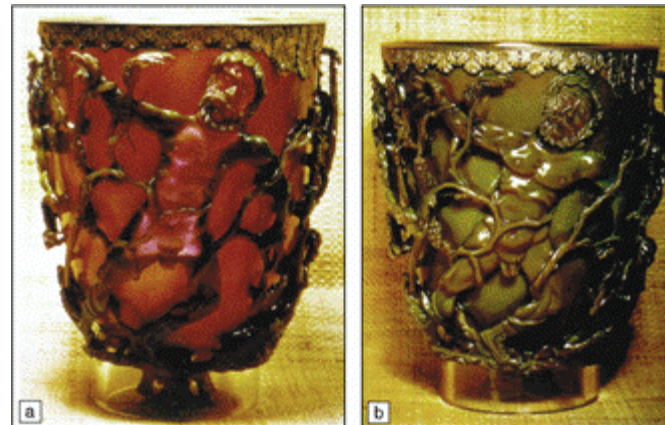
Gold nanoparticles:
3–30 nm, red, metallic,
"transparent"



Gold particles:
30–500 nm
metallic, turbid,
crimson to blue

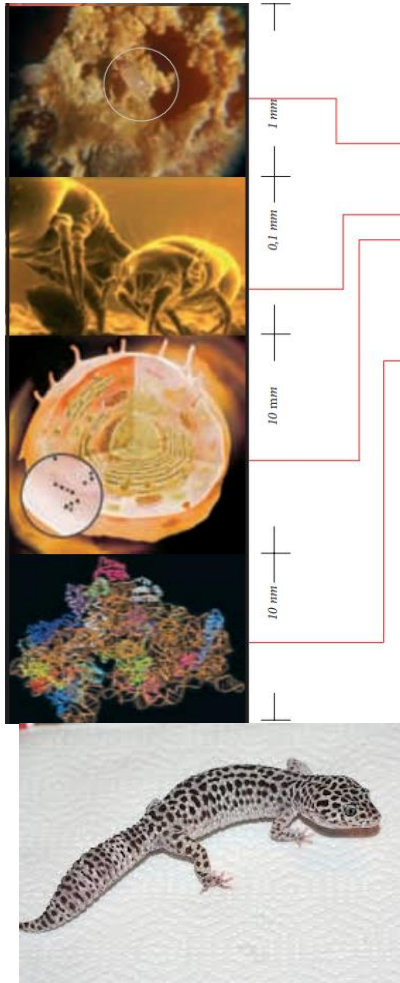


Bulk gold film



Το "ποτήρι του Λυκούργου"

Νανοτεχνολογία στον φυσικό κόσμο...

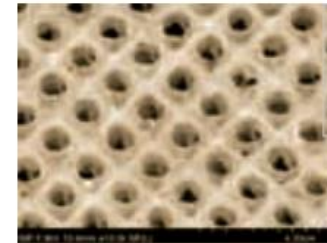


- ▶ Το μέγεθος των ακάρεων είναι μόλις ένα δέκατο του χιλιοστομέτρου. Με το ειδικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ESEM, είναι μάλιστα δυνατή η παρατήρηση των ακάρεων.
- ▶ Το μέγεθος για τη μέτρηση των κυττάρων είναι το μικρόν του μέτρου. Ο μηχανισμός του κυττάρου είναι άκρως πολύπλοκος.
- ▶ Σημαντικό συστατικό αυτού του μηχανισμού είναι τα ριβοσώματα, που παράγουν όλα τα πιθανά μόρια πρωτεϊνών σύμφωνα με τις οδηγίες του γενετικού υλικού DNA. Η τάξη μεγέθους του ριβοσώματος είναι 20 νανόμετρα. Μέρη της δομής του ριβοσώματος έχουν πλέον καθοριστεί μέχρις επιπέδου μεμονωμένων ατόμων.
- ▶ Οι πρώτοι καρποί αυτού του είδους νανοβιοτεχνολογίας είναι νέα φάρμακα που δεσμεύουν τα ριβοσώματα βακτηρίων.

Οι σαύρες γκέκο μπορούν να αναρριχηθούν σε οποιονδήποτε τοίχο εξαιτίας της νανοτεχνολογίας. Το πέλμα του γκέκο είναι εφοδιασμένο με λεπτότατα τριχίδια τα οποία είναι τόσο εύκαμπτα ώστε για μεγάλα διαστήματα να προσεγγίζουν το υπόβαθρο μερικά μόλις νανόμετρα. Τότε αρχίζουν να δρουν οι διαμοριακοί δεσμοί Van-der-Waals, δυνάμεις οι οποίες, παρότι είναι ασθενέστερες, είναι ικανές να φέρουν το βάρος της σαύρας λόγω των εκατομμυρίων σημείων πρόσφυσης. Οι δεσμοί χαλαρώνουν εύκολα όπως όταν αποκολλάται συγκολλητική ταινία.

Εφαρμογές της νανοτεχνολογίας

- ▶ **Στον κλάδο των ηλεκτρονικών υπολογιστών, λιθογραφία** σημαίνει την τεχνική διαμόρφωσης ολοκληρωμένων κυκλωμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών (τσιπ) με τη βοήθεια του φωτός. Η τεχνική αυτή συνίσταται στην επικάλυψη τέλεια στιλβωμένης επιφάνειας ημιαγωγού υλικού - πλακιδίων πυριτίου (wafer) - με φωτοευαίσθητο επίστρωμα επί του οποίου προβάλλεται η εικόνα κυκλώματος. Μετά την εμφάνιση του φωτοευαίσθητου επιστρώματος αποκαλύπτονται οι περιοχές του πλακιδίου που εκτέθηκαν (ή δεν εκτέθηκαν) στο φως, οι οποίες εν συνεχεία αποκτούν τις επιθυμητές ηλεκτρικές ιδιότητες, με διεργασίες όπως η χημική χάραξη, η εμφύτευση ξένων ατόμων και η εναπόθεση.
- ▶ **Ηλεκτρισμός από θερμότητα, θερμότητα από ηλεκτρισμό – Θερμοηλεκτρικά συστήματα:** Οικονομίες à la nano: μεγαλύτερη άνεση με μικρότερη δαπάνη υλικών. Και οι δύο αυτές τεχνικές παρέχουν δυνατότητες περιορισμού της ενεργειακής κατανάλωσης κατά 90 %. Οι LED και οι OLED κατασκευάζονται με τη βοήθεια της νανοτεχνολογίας. Εάν εκατομμύρια νοικοκυριά εξοικονομούν kilowatt, το άθροισμα ανέρχεται σε gigawatt – η ισχύς πολλών μεγάλων σταθμών ηλεκτροπαραγωγής. Ημιαγωγός: υλικό του οποίου οι ηλεκτρικές ιδιότητες είναι δυνατό να ρυθμίζονται σκοπίμως μεταξύ των ηλεκτρικών ιδιοτήτων του μονωτή και του αγωγού. Οι ημιαγωγοί είναι από τα σπουδαιότερα συστατικά σύγχρονων βιομηχανικών προϊόντων, όπως υπολογιστές, κινητά τηλέφωνα, κ.λπ.
- ▶ **Θερμοφωτοβολταϊκά συστήματα:**

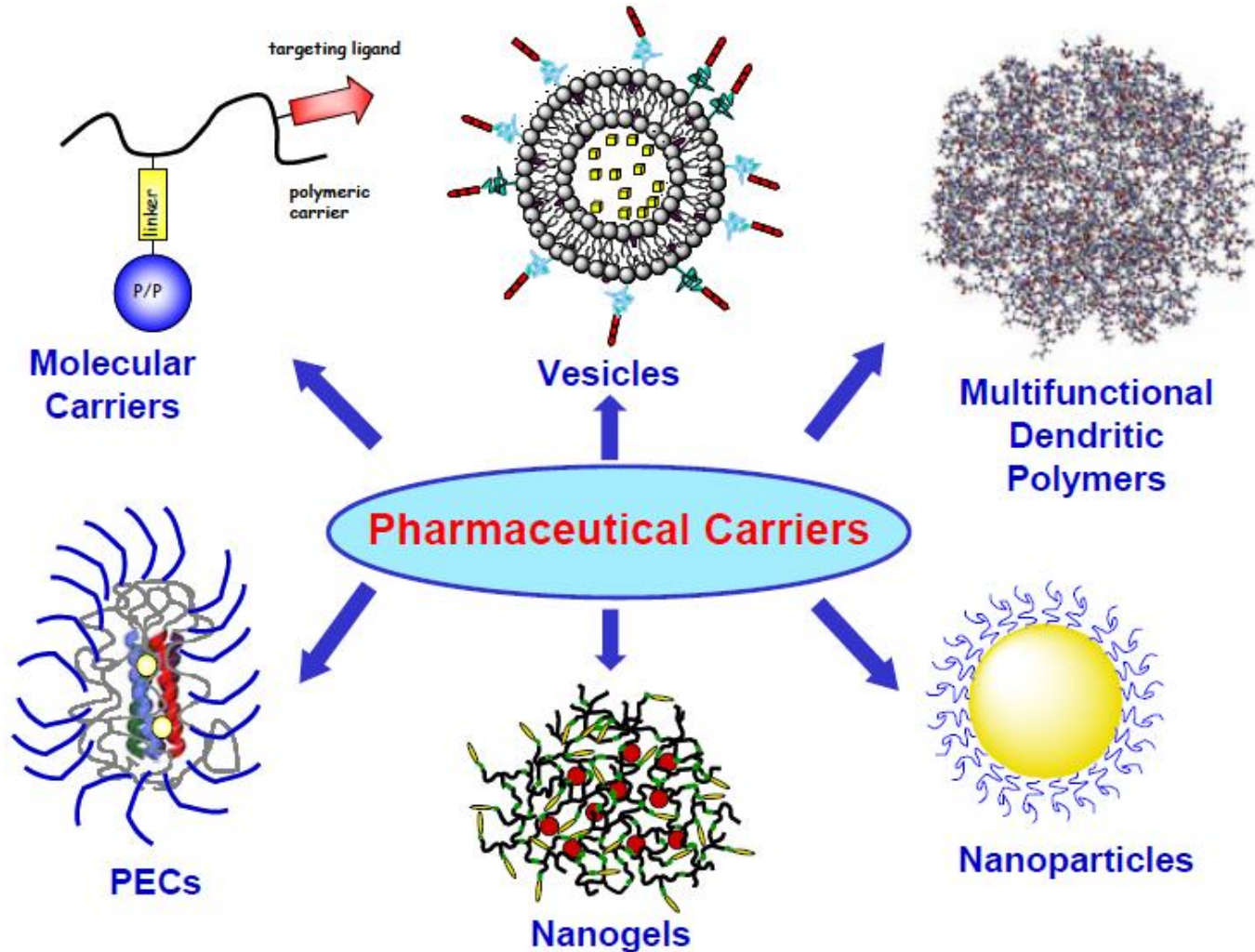


Πομπός βολφραμίου με νανοδομημένη επιφάνεια για την προσαρμογή του φάσματος υπέρυθρου.

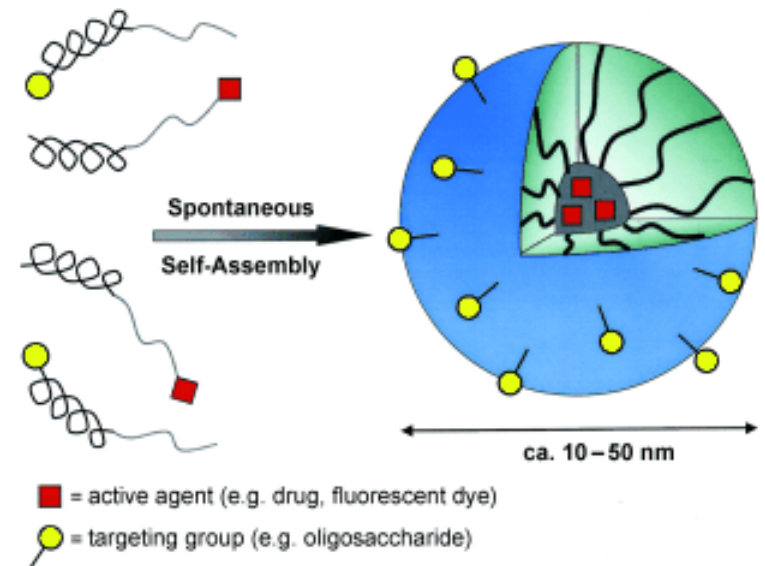
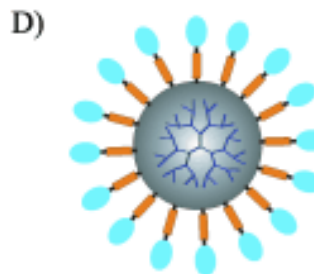
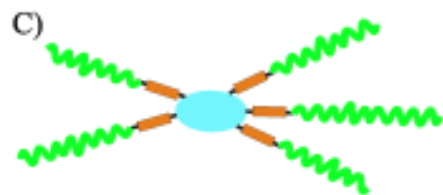
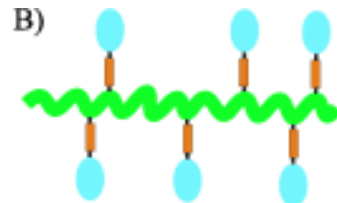
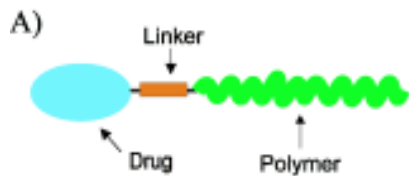
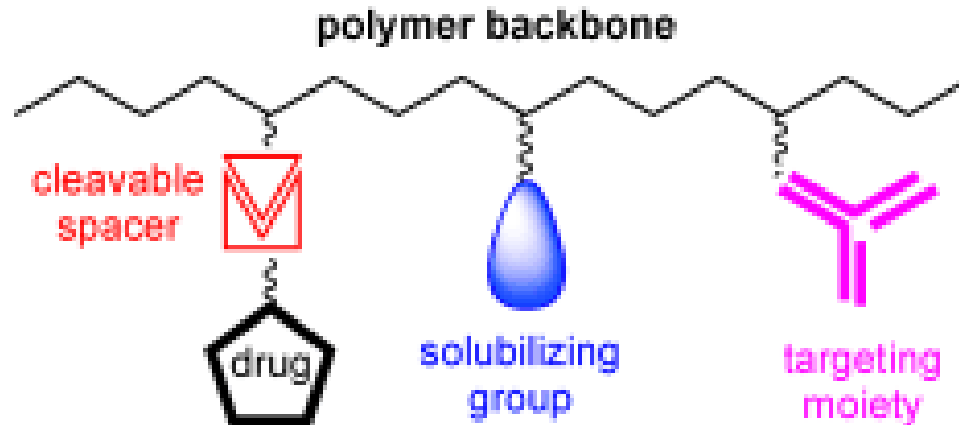
Οι εφαρμογές της νανοτεχνολογίας

- ▶ **Κολλοειδή Διαλύματα:**
- ▶ **Αεροπηκτώματα:** Το διαλυτικό μέσο ενός πηκτώματος είναι δυνατό, υπό προϋποθέσεις, να αφαιρεθεί, ώστε το καθαυτό πήκτωμα να διατηρήσει τον εξωτερικό του όγκο και να προκύψει εξαιρετικά πορώδες υλικό πολύ μικρής πυκνότητας, δηλαδή αεροπήκτωμα.
- ▶ **Υπερμοριακές κάψουλες φαρμάκων:** Τα χορηγούμενα φάρμακα μπορούν επίσης να τελειοποιηθούν σε εξαιρετικό βαθμό. Θα τοποθετούνται μέσα σε κενά κοίλα υπερμόρια (υπό εξέλιξη), δοχεία μεταφοράς σε νανοκλίμακα, που θα διαθέτουν κεραίες, στις οποίες θα είναι στερεωμένες αισθητήριες πρωτεΐνες παρόμοιες με αντισώματα. Όταν αυτές θα έρχονται σε επαφή με δομές που χαρακτηρίζουν τον παθογόνο παράγοντα – τοιχώματα καρκινικών κυττάρων, βακτηρίων –, θα συνδέονται και θα μεταδίδουν ένα σήμα στο κοίλο μόριο· τότε αυτό θα ανοίγει και θα απελευθερώνει το περιεχόμενό του. Με τη συγκεκριμένη νανοτεχνολογία θα μπορούσαν να χορηγούνται υψηλές δόσεις φαρμάκων κατευθείαν στην εστία της νόσου, χωρίς να επιβαρύνεται ο υπόλοιπος οργανισμός.
- ▶ **Μαγνητικά σωματίδια για τη θεραπεία του καρκίνου:** Με ανάλογα τεχνάσματα είναι δυνατόν να οδηγηθούν στις εστίες καρκίνου μαγνητικά σωματίδια νανοκλίμακας, τα οποία κατόπιν θερμαίνονται με την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικού πεδίου και μπορούν να καταστρέψουν τον όγκο. Τα νανοσωματίδια διέρχονται επίσης από το σύστημα φίλτρου που ονομάζεται «αιματεγκεφαλικός φραγμός», με αποτέλεσμα να μπορούν να κατευθυνθούν και προς όγκους του εγκεφάλου. Αυτή η λεγόμενη «υπερθερμία μαγνητικού ρευστού» αναπτύχθηκε από την ομάδα εργασίας με επικεφαλής τον βιολόγο Αντρέας Τζόρνταν και τώρα αρχίζουν οι κλινικές δοκιμές της

Structures used in Drug delivery systems



Other structures



Nanospheres as Drug Delivery Systems

Therapeutic Benefits

Carrier for hydrophobic entities

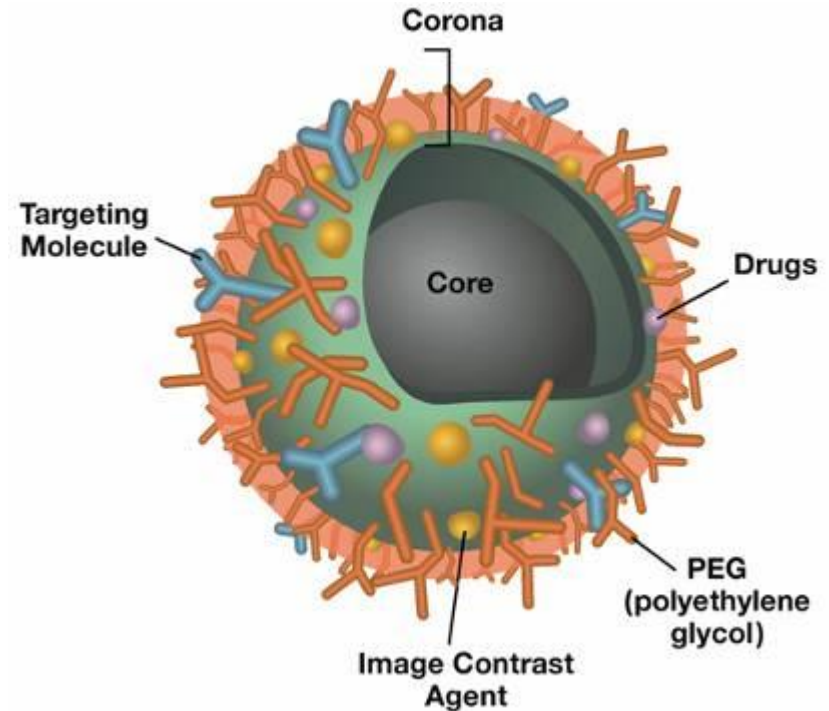
Multifunctional Systems

- Targeting groups
- Image Contrast Agents
- Coatings
- Pegylated

- Active and passive targeting

- ✓ Solubility

- ✓ Reduced toxicity



Nanospheres fabrication

- ▶ Emulsion polymerization: 50–700 nm
- ▶ Distillation precipitation polymerization: 0.1–100 μm
- ▶ Suspension polymerization : 50 – 500 μm
- ▶ Dispersion polymerization: 500 nm – 10 μm .
- ▶ SOL-GEL

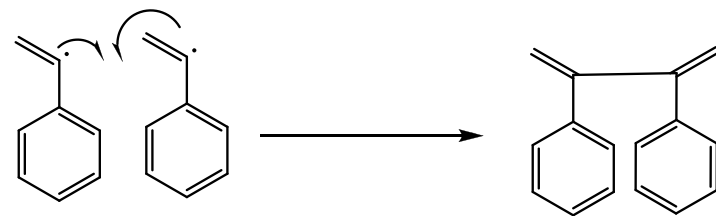
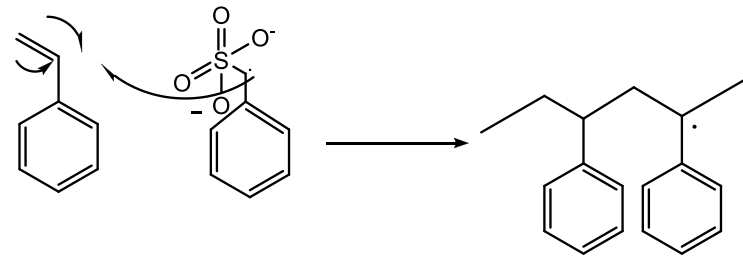
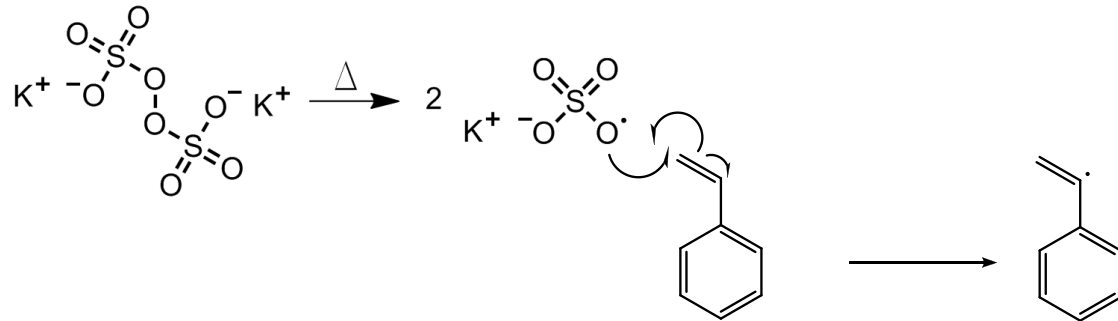
Emulsion Polymerization

In emulsion polymerization there are some key “ingredients”:

- ▶ The monomer must be insoluble in water and polymerizable by free radicals
- ▶ Water-soluble initiator
- ▶ Water
- ▶ Surfactant

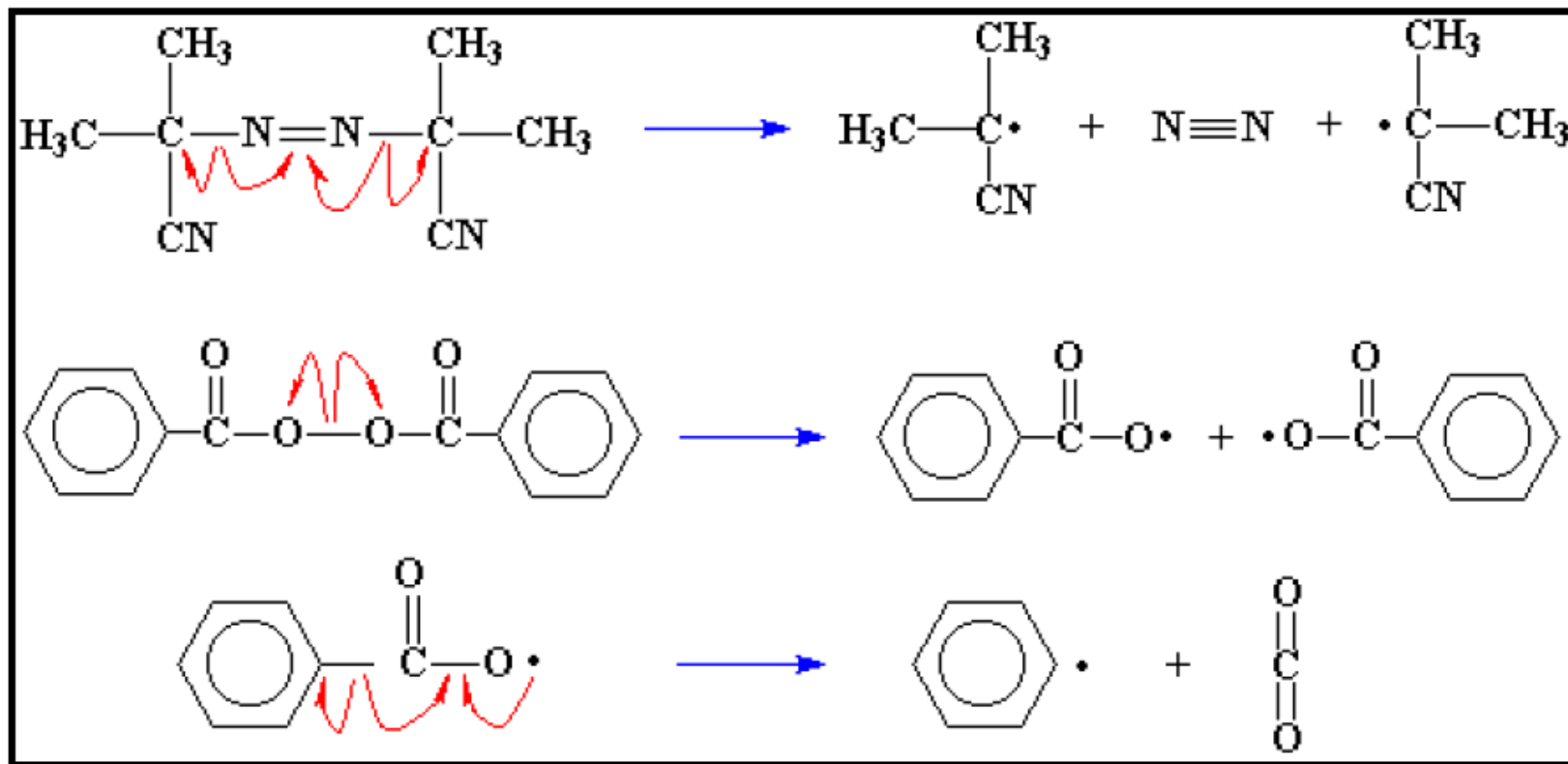
Example of polymerization

▶ Emulsion polymerization — radical polymerization

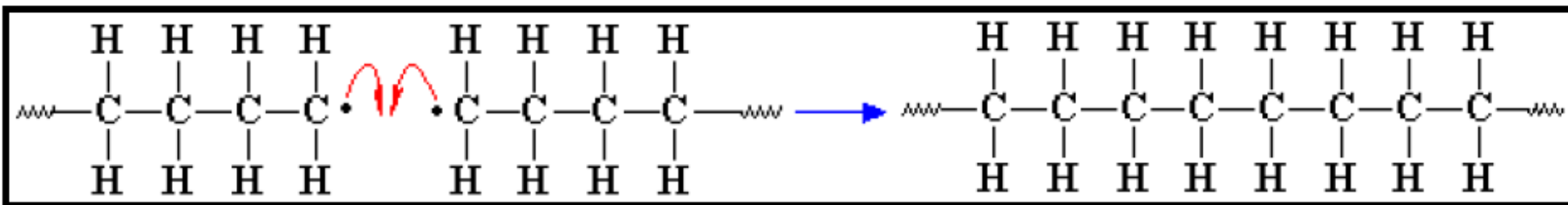
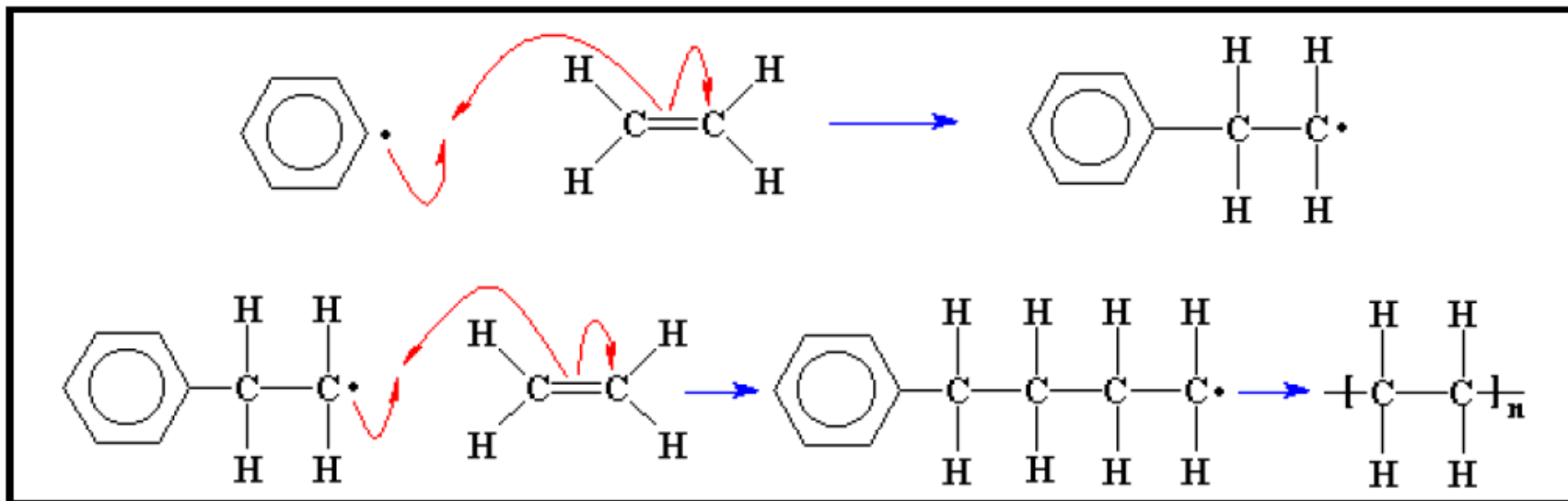


- ✓ Έναρξη
- ✓ Πρόοδο
- ✓ τερματισμό

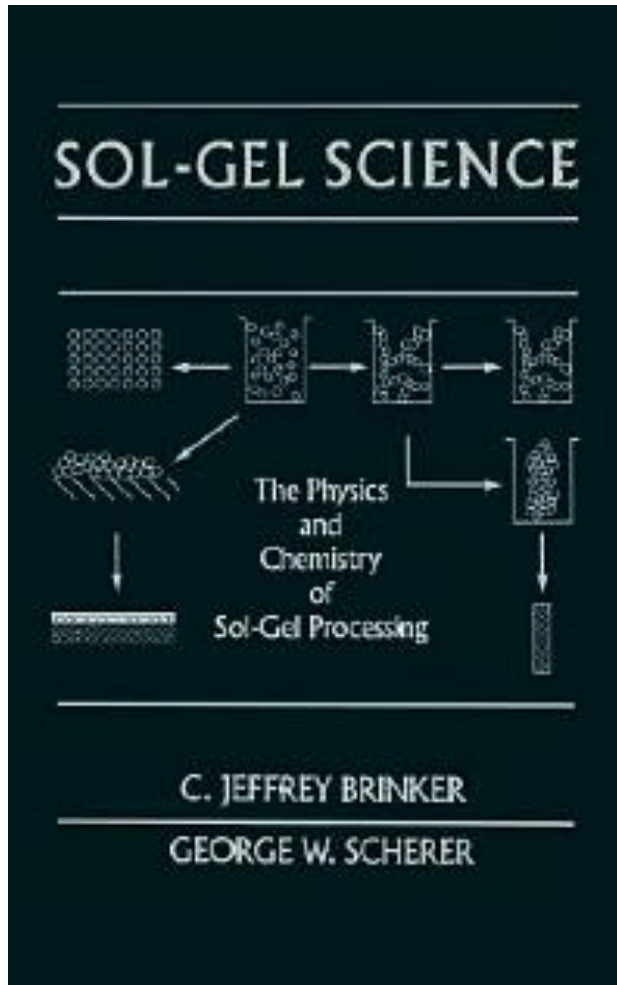
Mechanism...initiation



Mechanism...progression & termination



SOL-GEL



Διαδικασία λύματος-πηκτής (sol-gel)

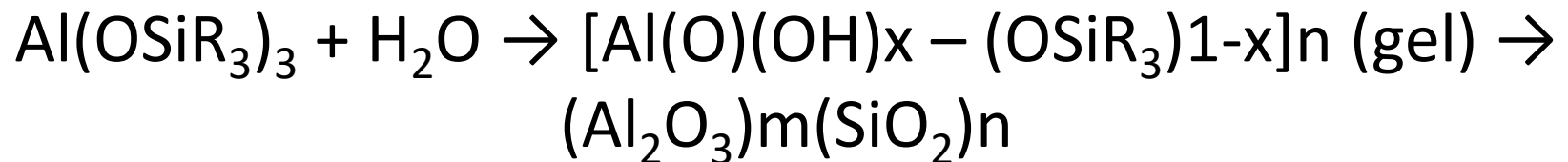
- ▶ Πρόδρομες ενώσεις: είναι οι ενώσεις μετάλλων με αλκοξειδίο τύπου $M(OR)_x$, (όπου $R = CH_3, C_2H_5, CF_3$, κ.λπ.).
- ▶ Η φύση του μετάλλου και των συναφών ομάδων R μπορεί να επηρεάσουν τη ταχύτητα σχηματισμού και τις ιδιότητες του τελικού υλικού οξειδίων.
- ▶ Οι συνθέσεις κολλοειδούς-πηκτώματος τυπικά διεξάγονται παρουσία πολικών διαλυτών όπως αλκοόλη ή νερό, οι οποίοι διευκολύνουν τις δύο κύριες αντιδράσεις της **υδρόλυσης** και της **συμπύκνωσης**.



Μεταλλικά Αλκοξειδία

- ▶ Μεταλλικά αλκοξειδία είναι ενώσεις του $\text{Si}(\text{OR})_4$, όπως τετραμεθοξυσιλάνιο (TMOS) και τετρααιθοξυσιλάνιο (TEOS).
- ▶ Al, Ti, και B sol-gel και συχνά αναμιγνύονται με TEOS.

π.χ. πυριτικά άλατα αργιλίου μπορούν να παράγονται μέσω της υδρόλυσης/συμπύκνωσης πυριτοοξειδίων, που προχωρούν μέσω ενός ενδιάμεσου πλέγματος Al–O–Al γνωστού ως αλουμοξάνες.



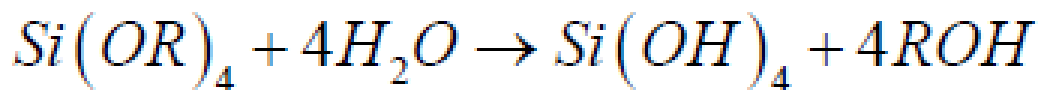
Αντιδράσεις

Υδρόλυση

Τα μεταλλικά αλκοξειδία χρησιμοποιούνται συχνά ως εκκινητές επειδή αντιδρούν εύκολα με το νερό και η αντίδραση η οποία πραγματοποιείται ονομάζεται **υδρόλυση**. Πιο συγκεκριμένα υδρόλυση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα μόριο μίας ουσίας αφού αντιδράσει με ένα μόριο νερού χωρίζεται σε δύο μέρη. Το ένα από τα δύο μέρη συνδέεται με το ιόν υδροξυλίου (OH-) ενώ το άλλο συνδέεται με το πρωτόνιο (H+) όπως δείχνει και η παρακάτω αντίδραση

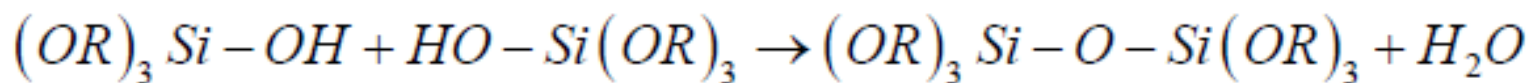


Το **R** αντιπροσωπεύει ένα **αλκύλιο** και η ομάδα **-OR** αντιπροσωπεύει την ομάδα των **αλκοξειδίων** ενώ το **ROH** μία **αλκοόλη**. Η υδρόλυση μπορεί να είναι πλήρης ή μερική ανάλογα με την ποσότητα του νερού και του καταλύτη οι οποίοι συμμετέχουν. Η **πλήρης υδρόλυση** χαρακτηρίζεται

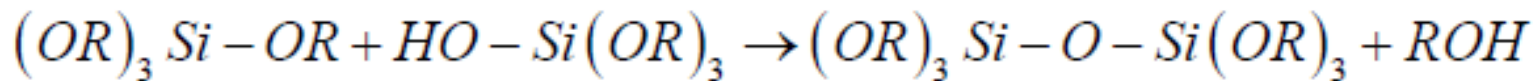


Συμπύκνωση

Η συμπύκνωση είναι η αντίδραση κατά την οποία έχουμε **συνένωση δύο μορίων** τα οποία έχουν προηγουμένως υδρολυθεί. Οι αντιδράσεις που περιγράφουν τη συμπύκνωση ακολουθούν



Συμπύκνωση H_2O



Συμπύκνωση Αλκοόλης



Δημιουργία γέλης

- ▶ Οι αντιδράσεις υδρόλυσης και συμπύκνωσης οι οποίες αναφέρθηκαν προηγουμένως έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη συσσωματωμάτων (clusters).
- ▶ Η αύξηση του μεγέθους των συσσωματωμάτων οδηγεί στη δημιουργία ενός εκτεταμένου συσσωματώματος το οποίο εμείς αποκαλείται γέλη (gel).
- ▶ Στο στάδιο σχηματισμού της γέλης πολλά συσσωματώματα βρίσκονται ακόμα “μπερδεμένα” στη φάση του λύματος αλλά κανένα δεν συνδέεται με το εκτεταμένο συσσωμάτωμα.
- ▶ Με την πάροδο του χρόνου τα συσσωματώματα που βρίσκονται στη φάση του λύματος αρχίζουν σιγά – σιγά να συνενώνονται με το δίκτυο με αποτέλεσμα την αύξηση της ακαμψία της γέλης.
- ▶ Ο σχηματισμός της γέλης πραγματοποιείται όταν σχηματίζεται ο τελευταίος δεσμός μεταξύ δύο μεγάλων συσσωματωμάτων με άμεσο αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός τεράστιου μορίου.

Δραστικότητα αλκοξειδίων



μεγαλύτερα και πιο ηλεκτροθετικά μέταλλα σε πυρηνόφιλη προσβολή από το νερό η υδρόλυση των περισσότερων αλκοξειδίων των μετάλλων είναι πολύ ταχεία, και οδηγεί στην ανεξέλεγκτη καθίζηση.

Παράγοντες ρύθμισης ταχύτητα υδρόλυσης

- ▶ Η αναλογία $\text{H}_2\text{O}/\text{M(OR)}$
- ▶ Η φύση του μεταλλικού αλκοξειδίου (π.χ. η OR ομάδα πόσο υποκατεστημένη είναι ή τον αριθμό των συμπλεγμένων μετάλλων)

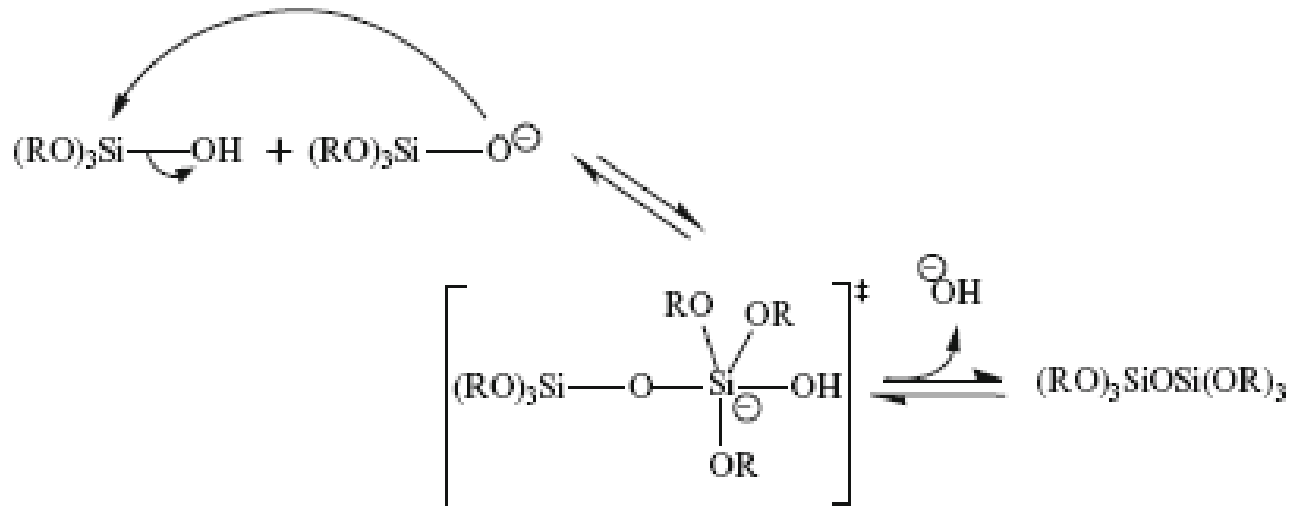
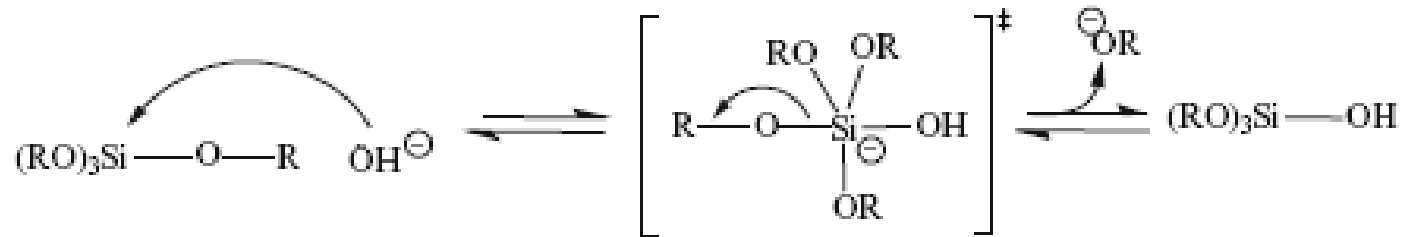


Παράγοντες που επηρεάζουν τις αντιδράσεις Sol-gel

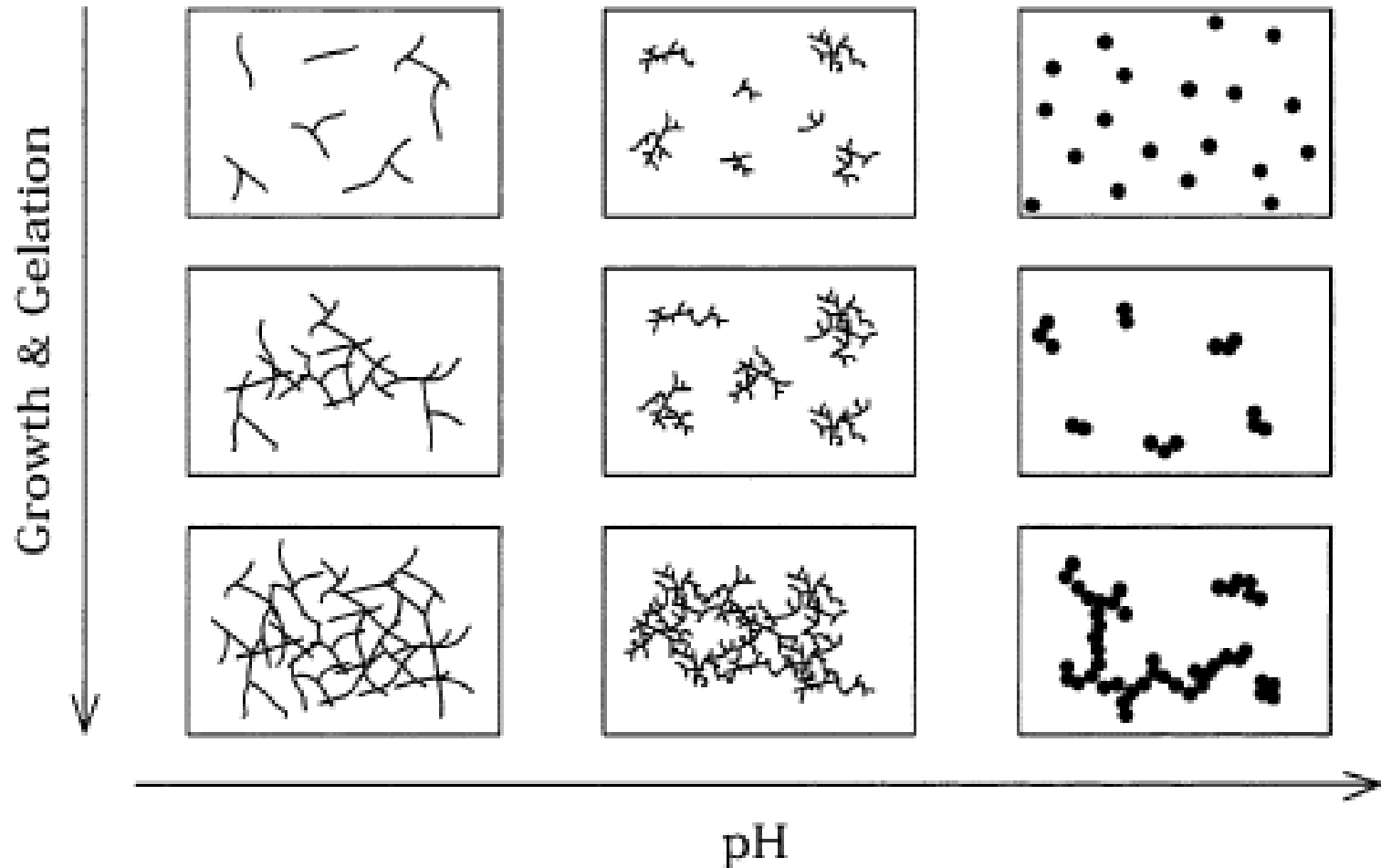
- ▶ Καταλύτες οξέα (π.χ., HCl, HF) ή βάσεις (π.χ., KOH, αμίνες, NH₃) τις φυσικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος.
- ▶ οι αντιδράσεις συμπύκνωσης αρχίζουν ενώ οι υδρολυτικές διεργασίες βρίσκονται σε εξέλιξη.
- ▶ μεταβάλλοντας το pH, και την αναλογία [H₂O/ M(OR)_n], και τον καταλύτη μπορούμε να αναγκάσουμε την ολοκλήρωση της υδρόλυσης πριν από τη συμπύκνωση.



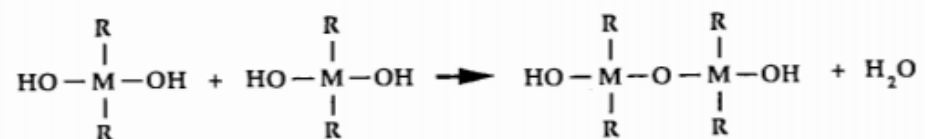
Αλκαλική(καταλυόμενη) υδρόλυση και συμπύκνωση ενός πρόδρομου πυριτο-αλκοξειδίου.



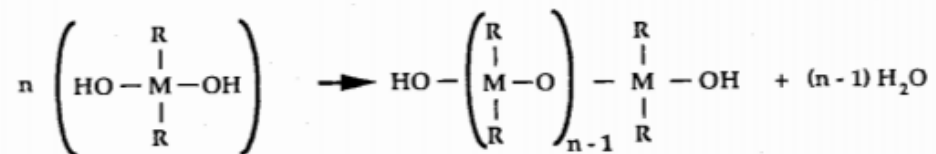
Σχέση της μορφολογίας συναρτήσει του pH κατά τη διαδικασία sol-gel



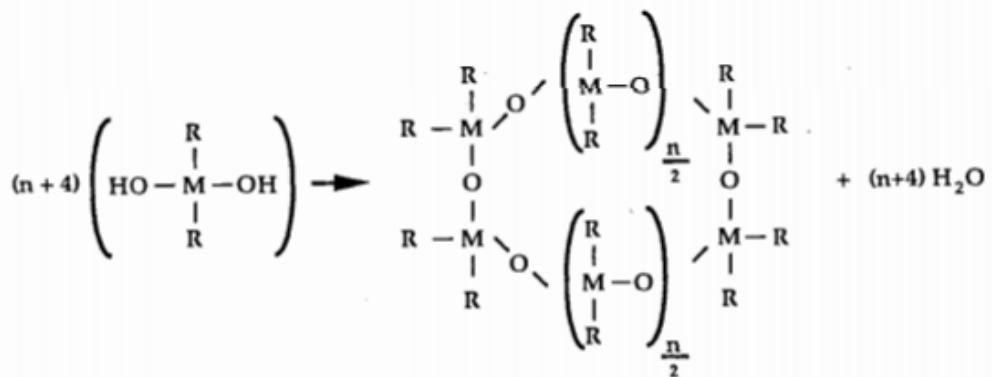
Dimer



Chain

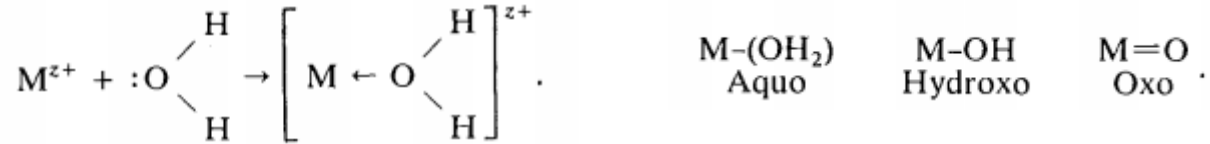


Ring

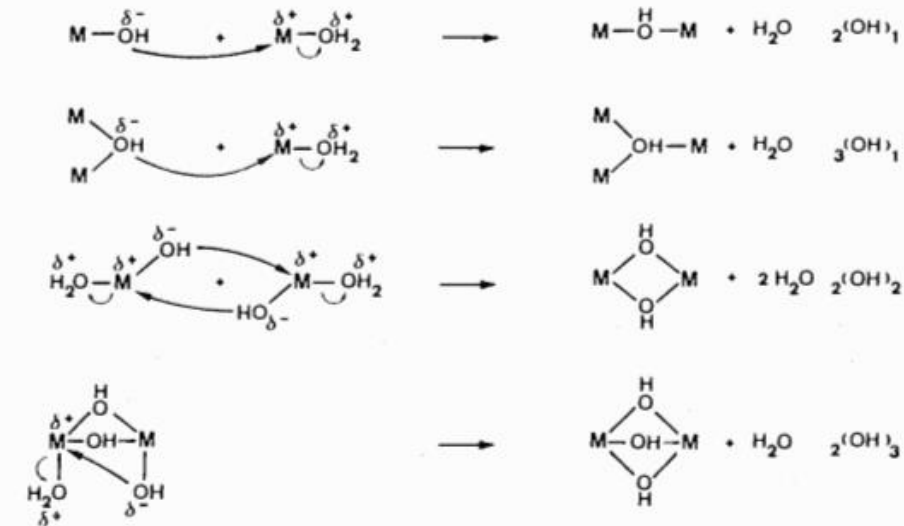


Transition metals in *sol-gel*

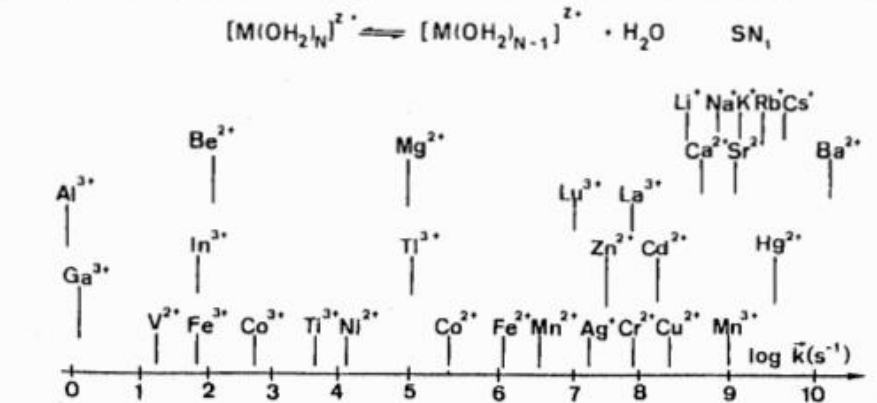
► 1st step: Metal salts hydrolysed



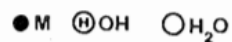
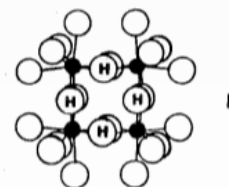
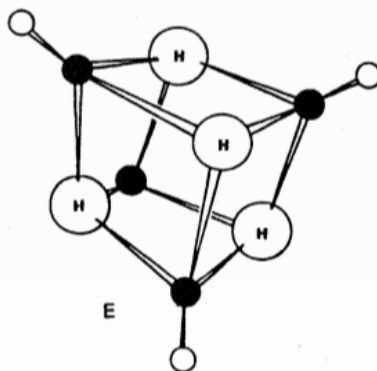
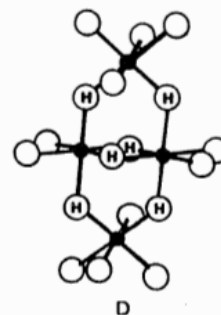
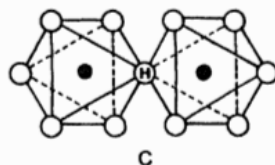
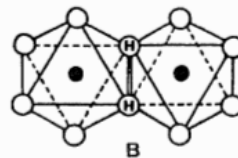
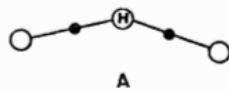
Olation: τον σχηματισμό συμπλεγμάτων πολυνυρηνικού συντονισμού μέσω ομάδων υδροξυλίου ως γεφυρών μεταξύ μετάλλων και πραγματοποιείται μεταξύ 2 μεταλικών κέντρων. Η αντίδραση πραγματοποιείται με έναν μηχανισμό S_N όπου η OH ομάδα είναι το πυρηνόφιλο και το νερό η αποχωρούσα ομάδα.



Olation mechanisms. From Livage *et al.* [8]. $x(OH)_y$ terminology defined in text.



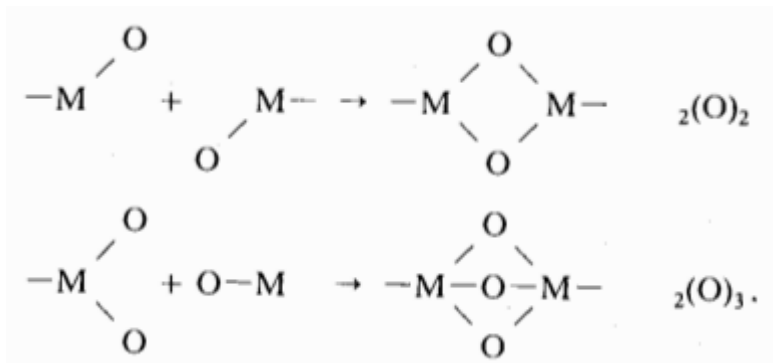
Lability of some aquo-ions ranked according to the dissociative rate constant. From Livage *et al.* [8], based on the data of Eigen [19] and Kruger [20].



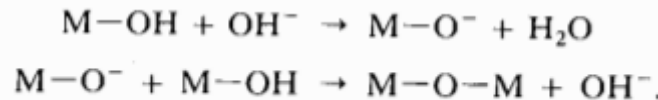
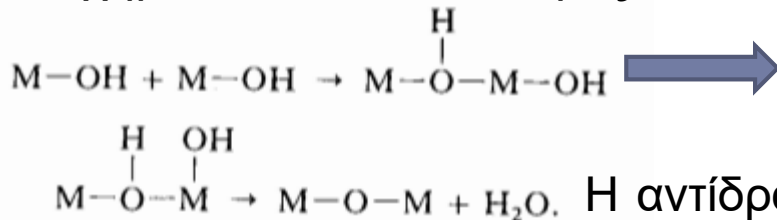
Transition metal polycations [8]:

(a) $[M_2(OH)(OH_2)_4]^{3+}$, $M = Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}$ [10]; (b) $[M_2(OH)_2(OH_2)_4]^{(2c-2)+}$, $M = VO^{2+}, Cr^{3+}, Fe^{3+}, Ti^{3+}, Cu^{2+}$ [10]; (c) $[Cr_2(OH)(OH_2)_{10}]^{3+}$ [23]; (d) $[M_4(OH)_6(OH_2)_{12}]^{6+}$, $M = Cr^{3+}, Co^{3+}$ [24]; (e) $[M_4(OH)_4(OH_2)_4]^{4+}$, $M = Co^{2+}, Ni^{2+}$ [22]; (f) $[M_4(OH)_8(OH_2)_{16}]^{8+}$, $M = Zr^{4+}, Hf^{4+}$, [25,26].

2. Oxolation: Είναι η αντίδραση συμπύκνωσης στην οποία μία όξο γέφυρα σχηματίζεται μεταξύ δύο μεταλικών κέντρων. Όταν το μέταλλο δεν είναι πλήρως υποκατεστημένο τότε η αντίδραση πραγματοποιείται σύμφωνα με το μηχανισμό A_N

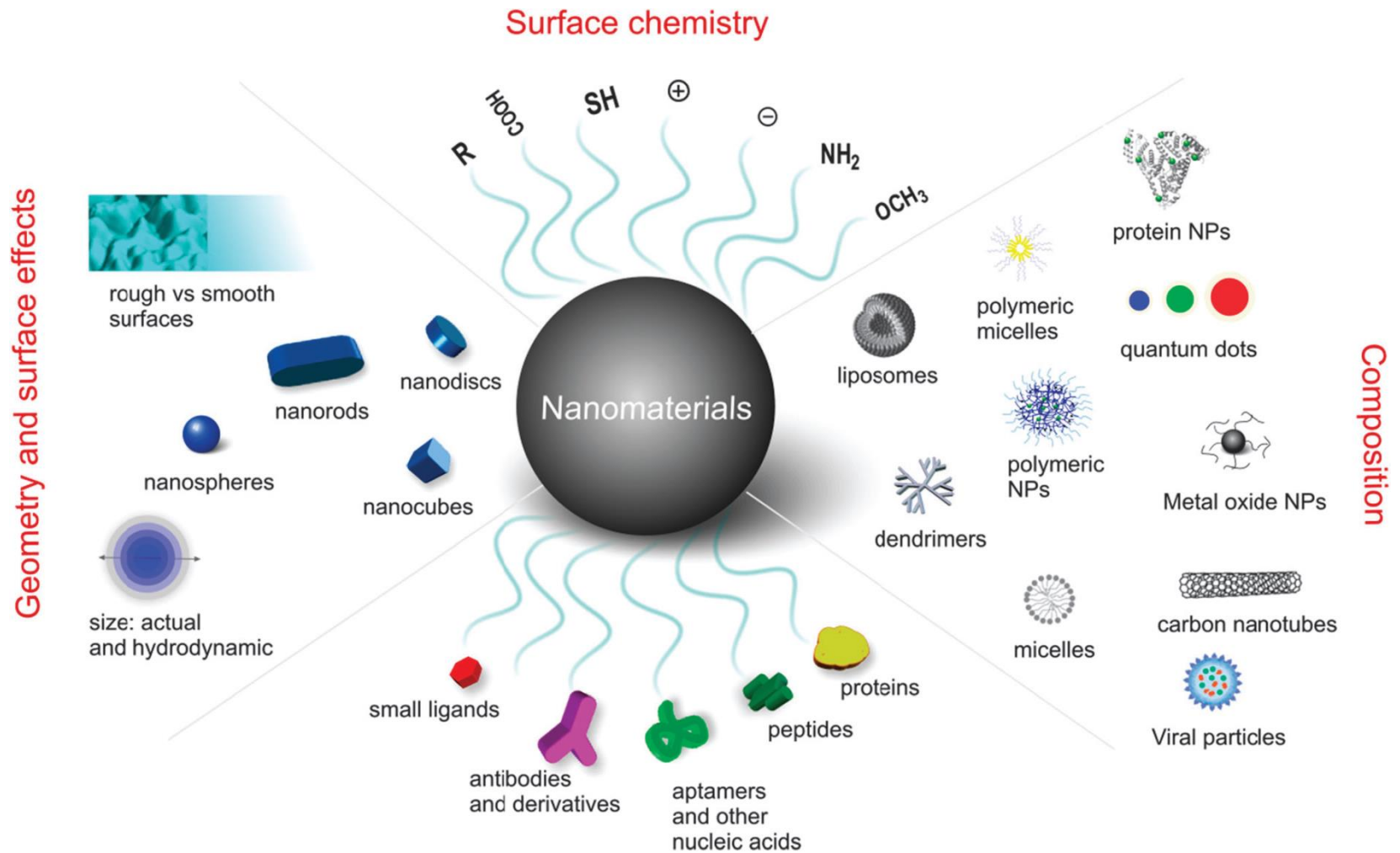


Όταν το μέταλλο είναι πλήρως συναρμοσμένο τότε η αντίδραση πραγματοποιείται σύμφωνα με το μηχανισμό 2 σταδίων μεταξύ των όξουδρόξο πρόδρομων ενώσεων περιλαμβάνοντας μία αντίδραση πυρηνόφιλη προσθήκης ακολουθούμενη από αποβολή ενός μορίου νερού ώστε να σχηματιστεί M-O-M δεσμός.



Η αντίδραση καταλύεται σε αλκαλικό περιβάλλον στο οποίο αποπρωτονιώνεται ο υδρόξο υποκαταστάτης δημιουργώντας ένα ισχυρότερο πυρηνόφιλο

Parameters for consideration



ABRAXANE® for Injectable Suspension (paclitaxel protein-bound particles for injectable suspension)



Genexol-PM: A biodegradable poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) copolymer micellar nanoparticle-entrapped formulation of paclitaxel

Feridex: FDA approved MRI contrast agent which is Iron oxide



Doxil (Doxorubicin HCl Liposome Injection)



FOR ADULT USE 45 mg for 6-month administration

← PEEL HERE ←

LOT LOT

Includes:
• One prefilled dual-chamber syringe containing needle with Lupron Depot™ safety device
• One plunger
• Two alcohol swabs

AREA FOR PHARMACY LABEL

Do not remove from clamshell until ready to use.
Usual Dose: After mixing, immediately administer entire contents of syringe by intramuscular injection every six months under physician's supervision. See Package insert for full prescribing information. See Instructions for how to mix and administer.
Only Activate Safety Device Post-Injection.
Store at 25°C (77°F); excursions permitted to 15-30°C (59-86°F)
Manufactured for:
Abbott Laboratories
North Chicago, IL 60064
by: Tokuda Pharmaceutical Company Limited
Osaka, Japan 540-8645
Product of Japan

NDC 0074-3473-03
Single Dose Administration Kit with prefilled dual-chamber syringe.
Lupron Depot®
(Leuprolide Acetate for Depot Suspension)
45 mg for 6-month administration
FOR INTRAMUSCULAR INJECTION

04-A736-R2 3 00743 47303 2

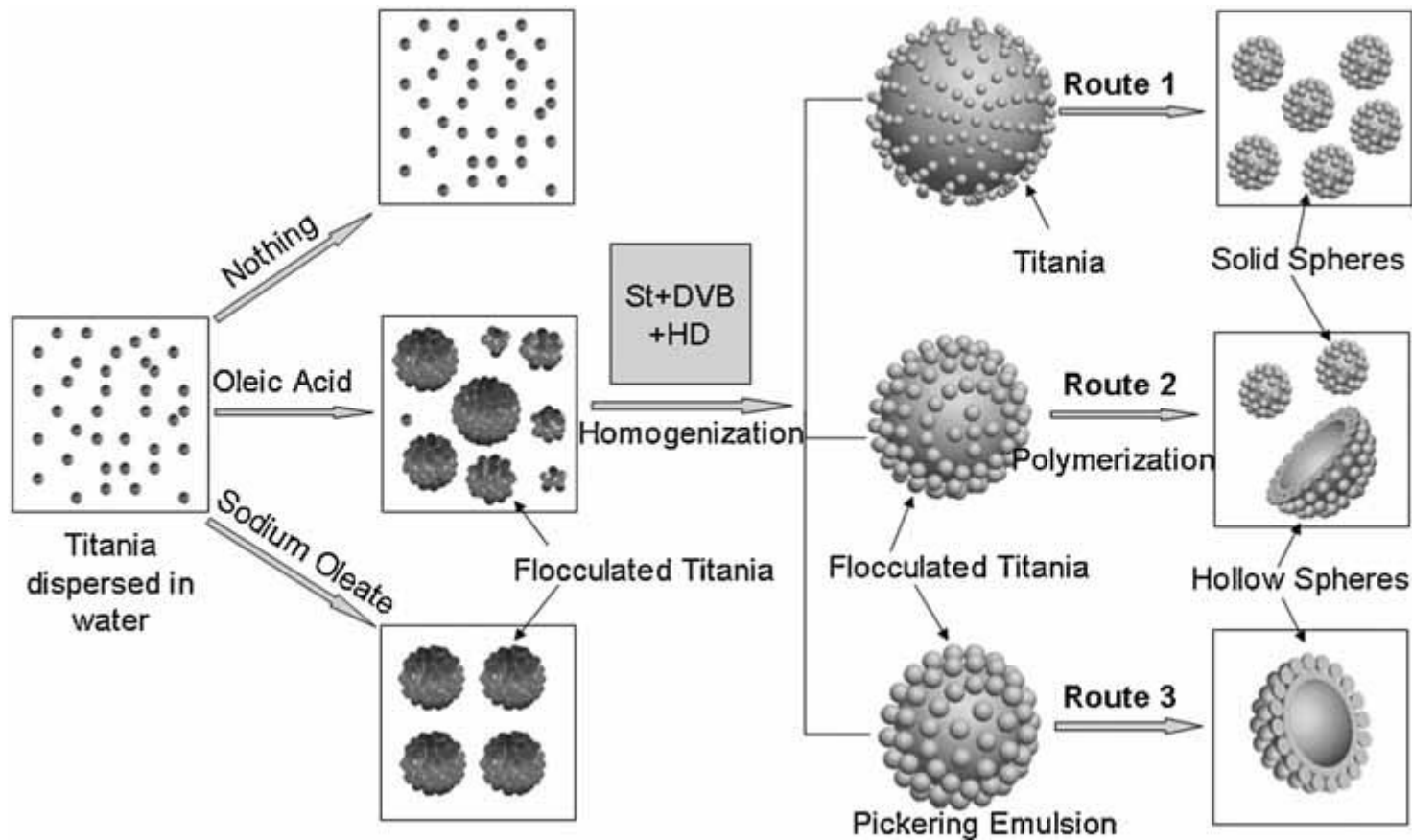
DAEFL R only

Leupron Depot: Leuprolide in

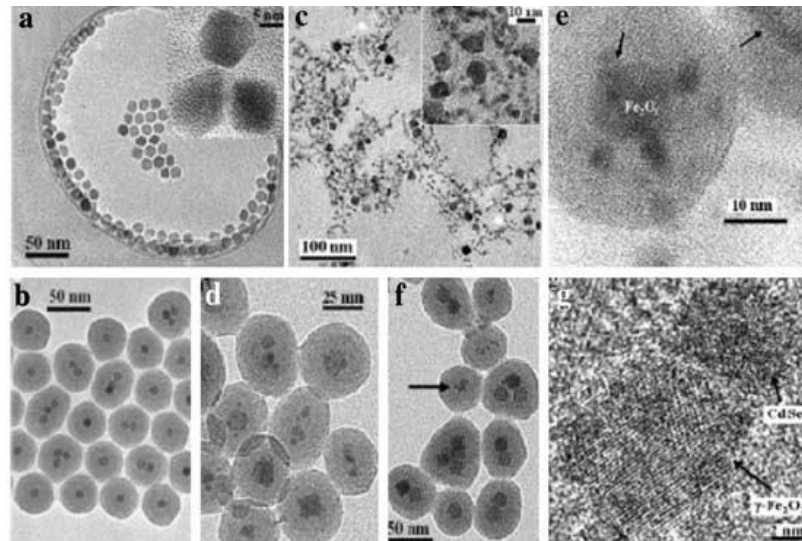
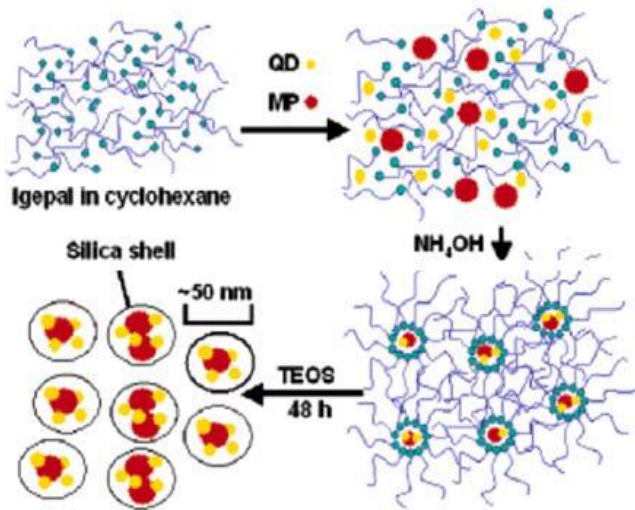
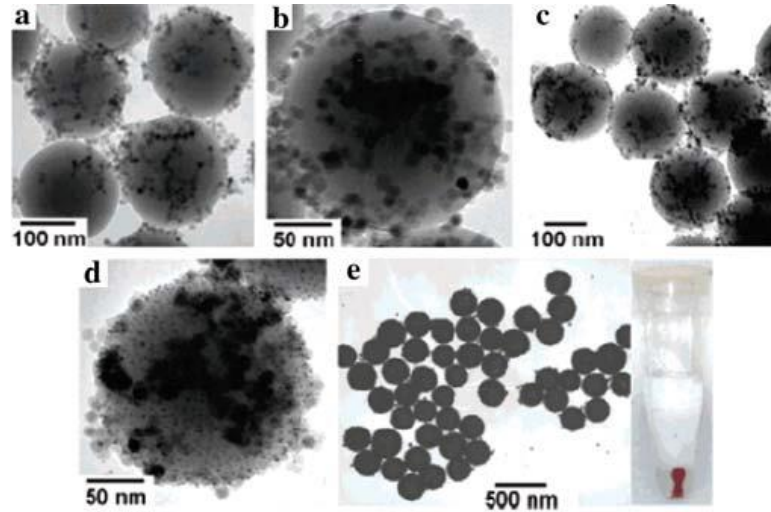
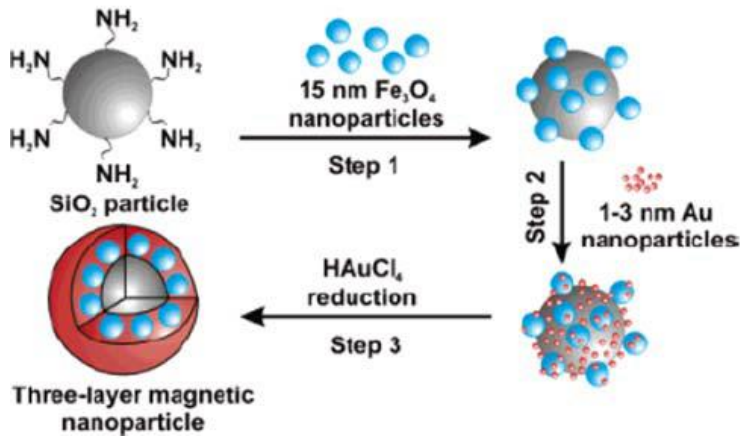
PULGA microspheres

Efthimiadou Eleni, NK, UGA, Georgia

Synthesis of inorganic NPs for other applications



Synthesis and morphology of NPs SEM & TEM characterization



Liposomes

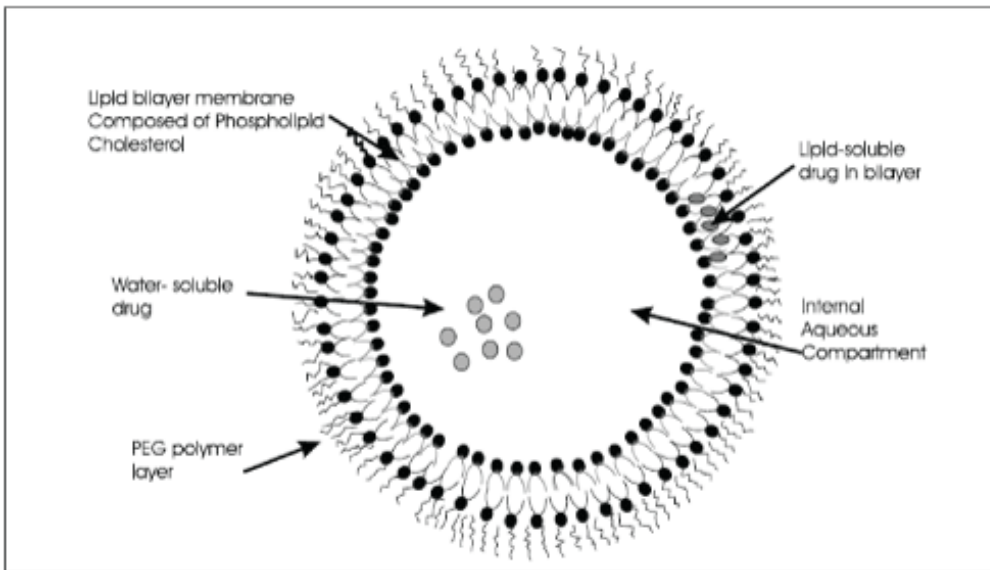


Fig. 1: Unilamellar stealth liposome

A. Conventional liposome

Hydrophobic drug
Genetic material
(e.g., DNA, RNA or siRNA)
Hydrophilic drug
Phospholipid
(e.g., anionic, cationic or neutral)

B. PEGylated liposome

Polyethylene glycol (PEG)

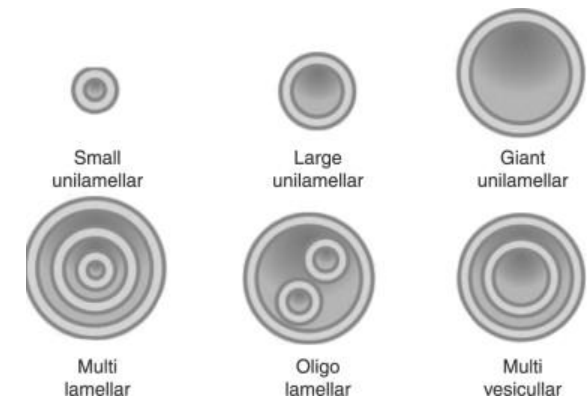
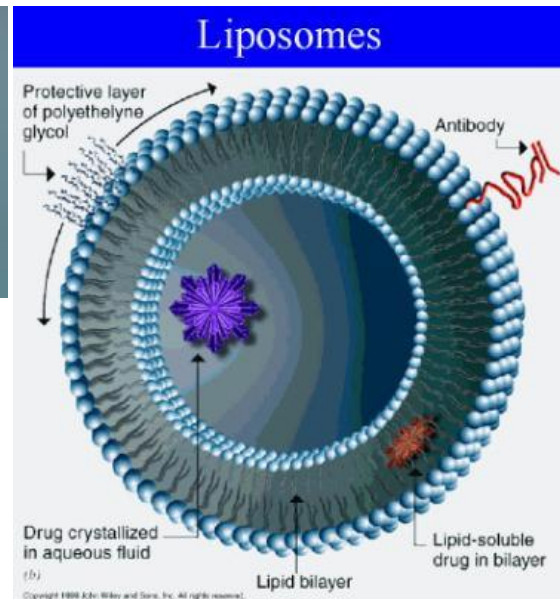
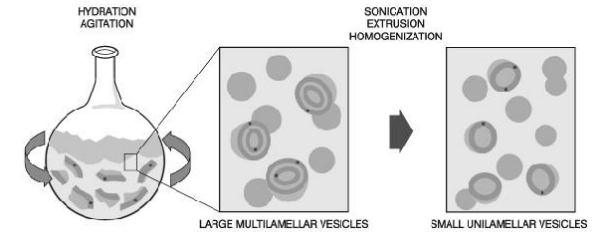
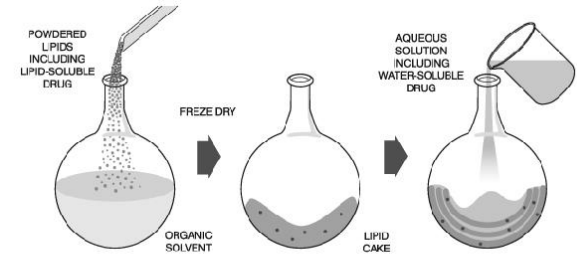
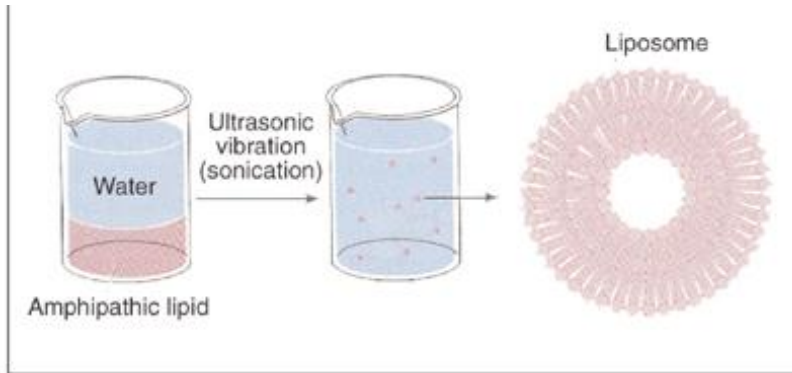
Imaging agent
(e.g., Gd-DOTA-DSPE for MRI)
Targeting ligands
(e.g., antibody)

D. Multifunctional liposome (e.g., theranostic liposome)

C. Ligand targeted liposome

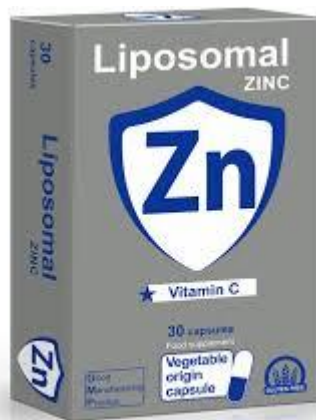
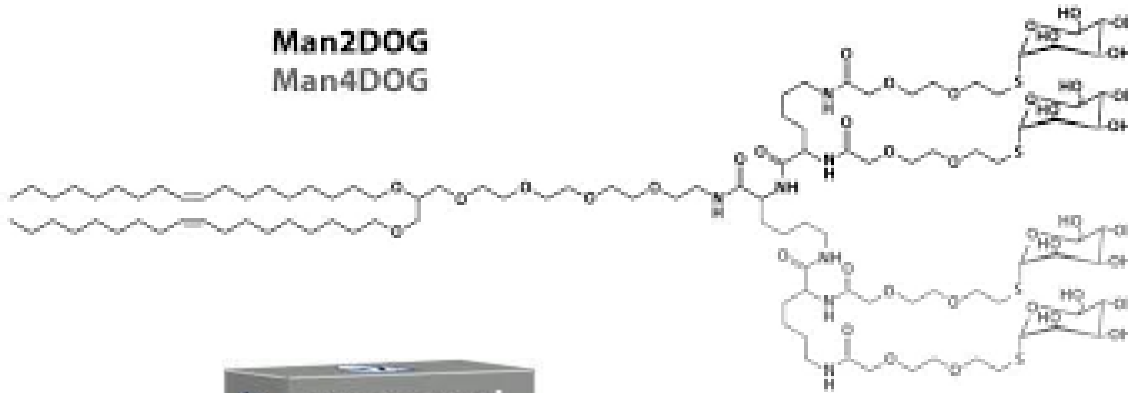
Aptamer
Antibody
Protein
Peptide
Small molecule
Carbohydrate

Liposomes synthesis for BBB



Analogues

Man2DOG
Man4DOG



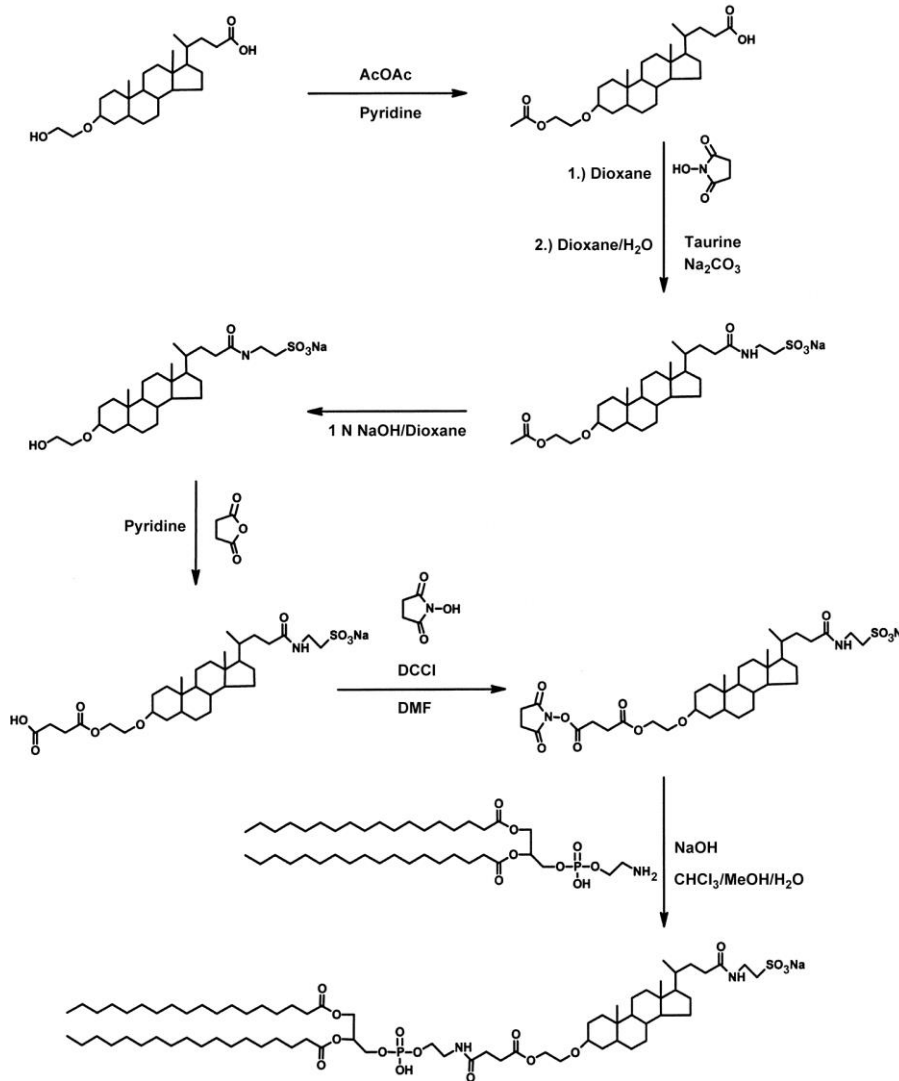
Food supplement

ASCOLIP[®]

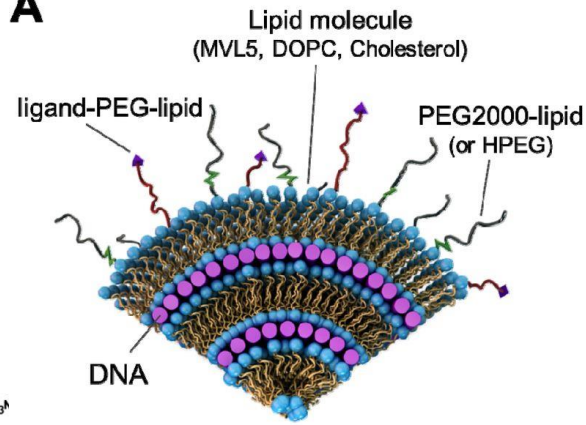
Liposomal Vitamin C
1000 mg



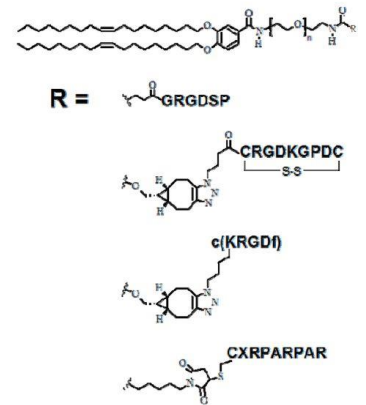
Lipids functionalization



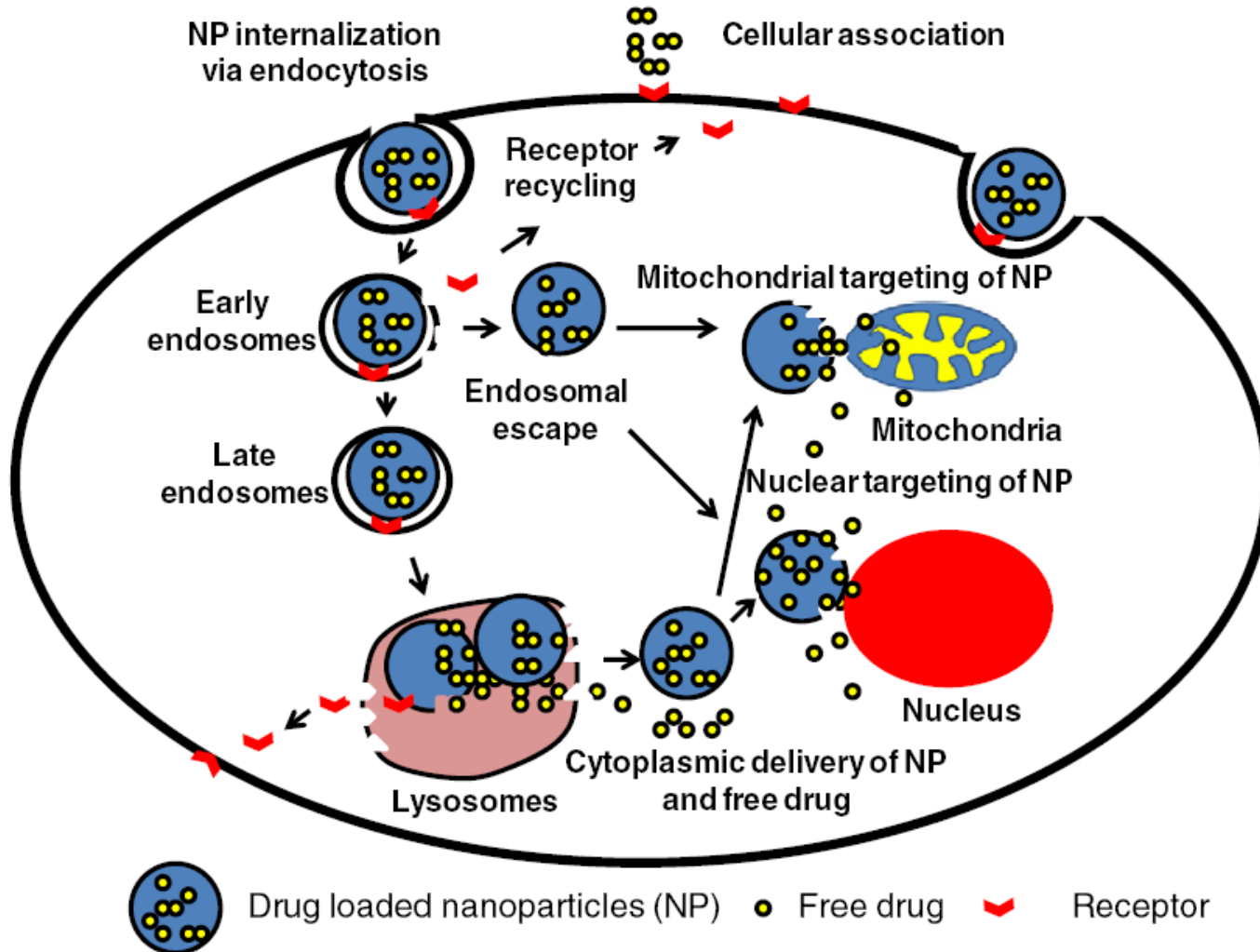
A



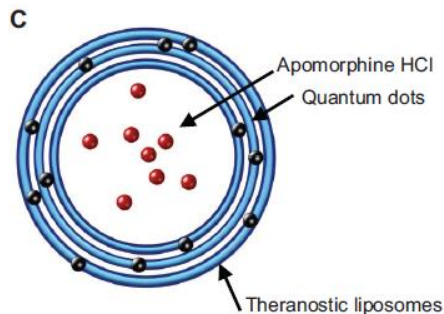
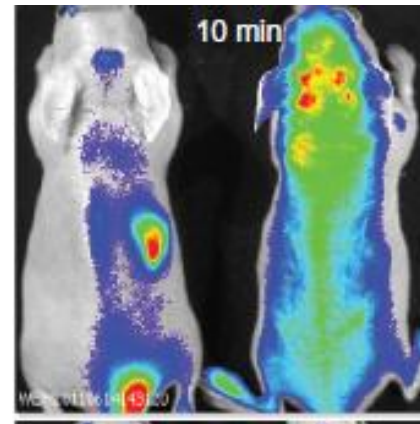
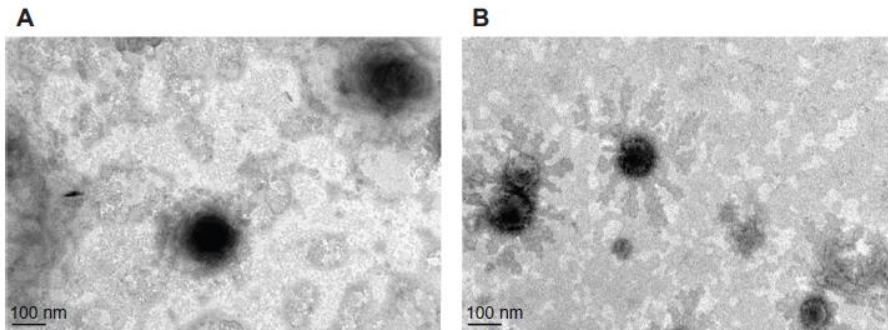
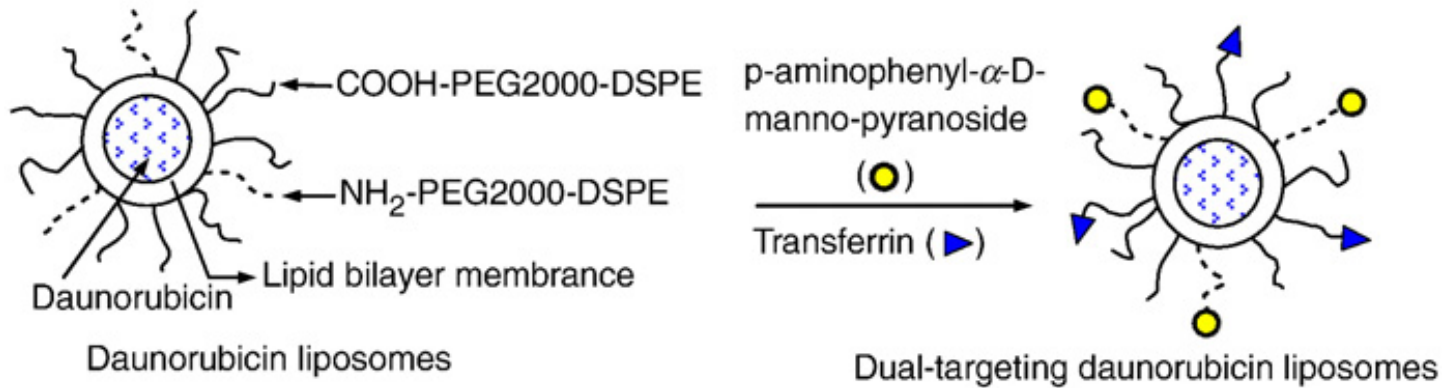
B



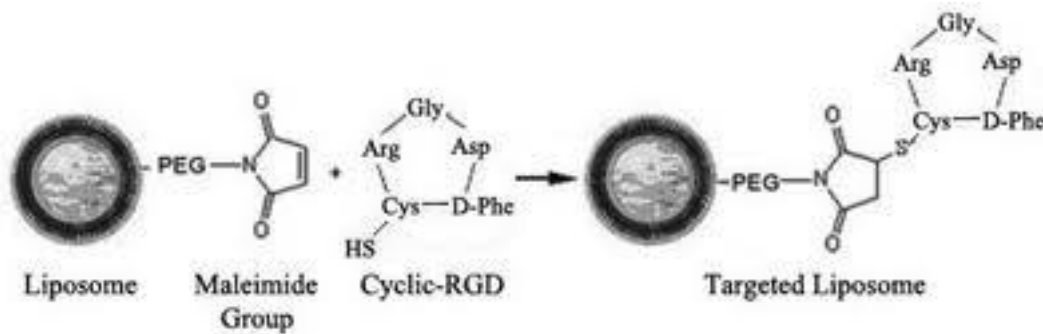
Internalization in vitro



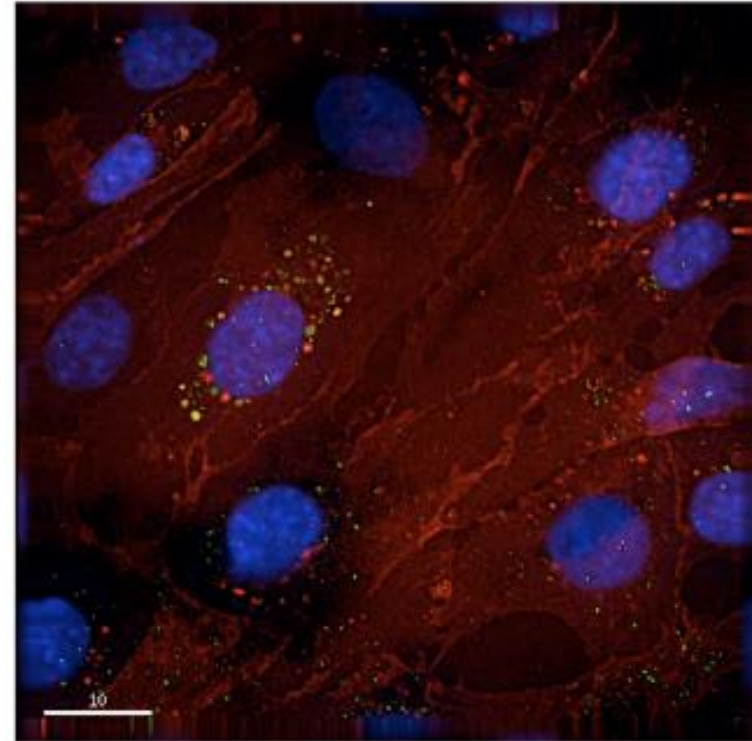
Application of Liposomes to BBB



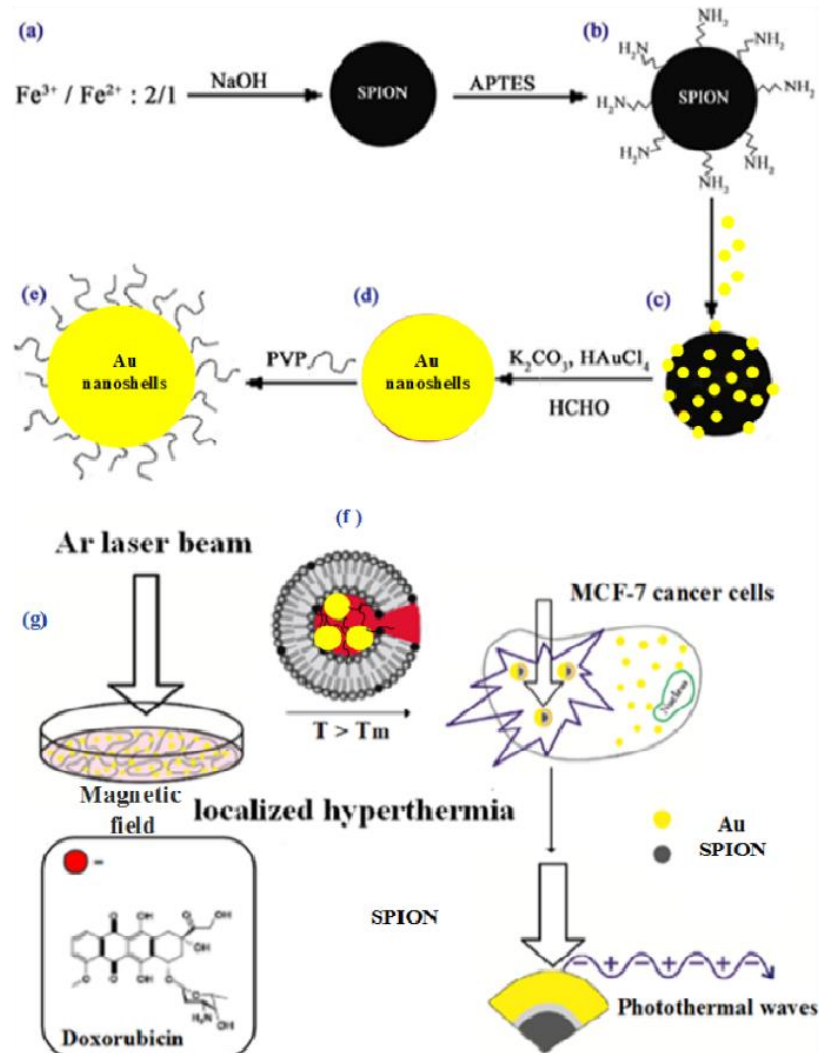
Targeted Liposomes for BBB



It shows human brain endothelial cells (which make up the BBB) treated with liposomes functionalized peptide attached to a PEG-lipid and labeled with red fluorescence



Iron oxide NPs



In my Work.....

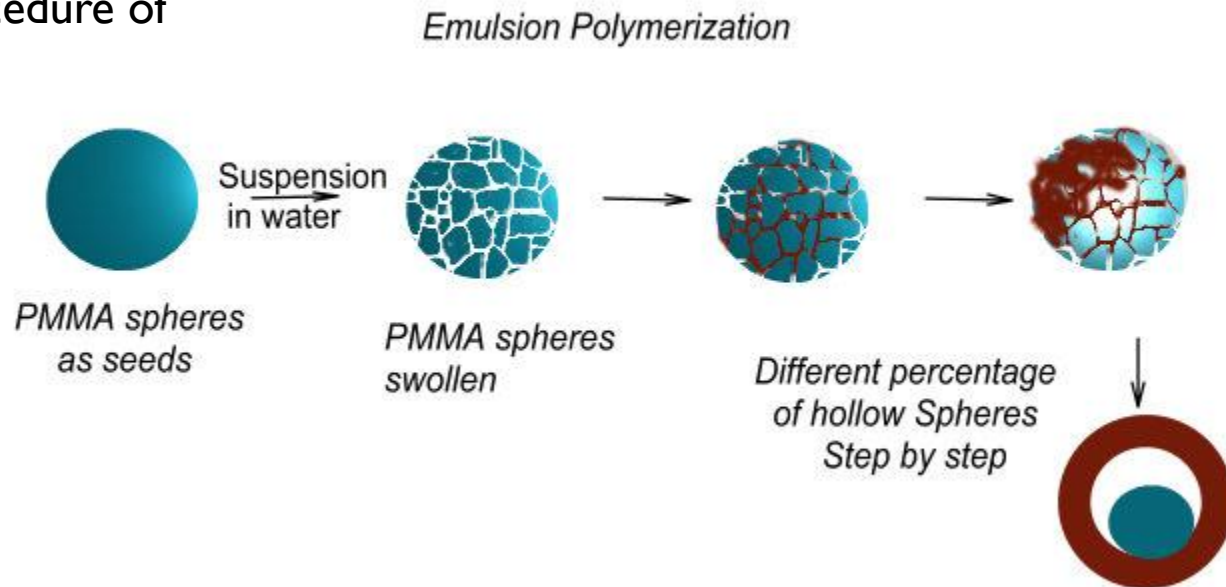
Synthesis :

- ✓ Micro/nanospheres with pH Sensitivity
- ✓ pH & Thermo Sensitivity
- ✓ Yolk type micro/nanospheres
- ✓ Layer by layer spheres
- ✓ Micelles
- ✓ Magnetic nanoparticles
- ✓ Modified the surface of micro/nanospheres

Synthesis of microspheres

✓ Microspheres using emulsion polymerization

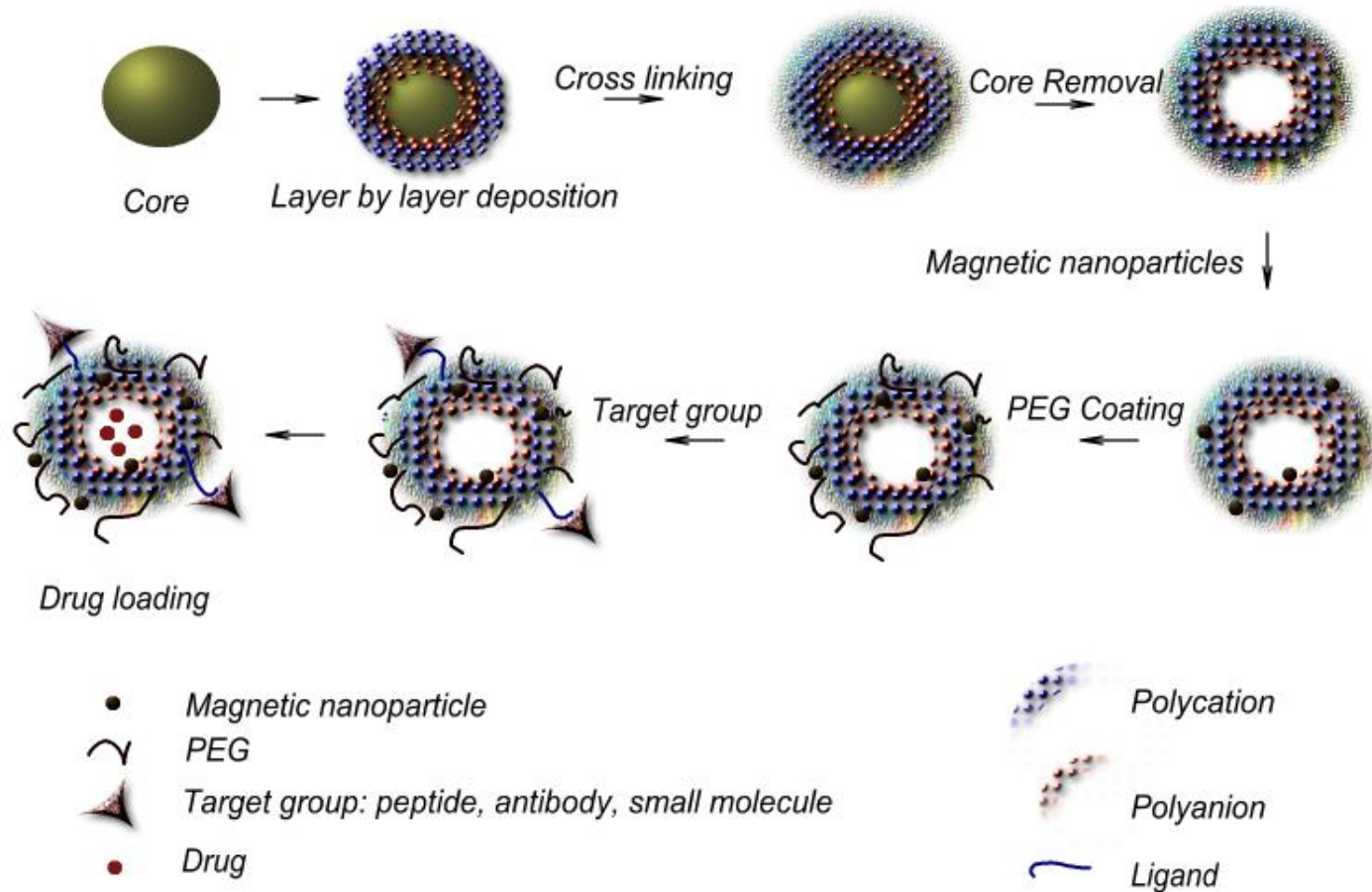
Swelling procedure of seeds



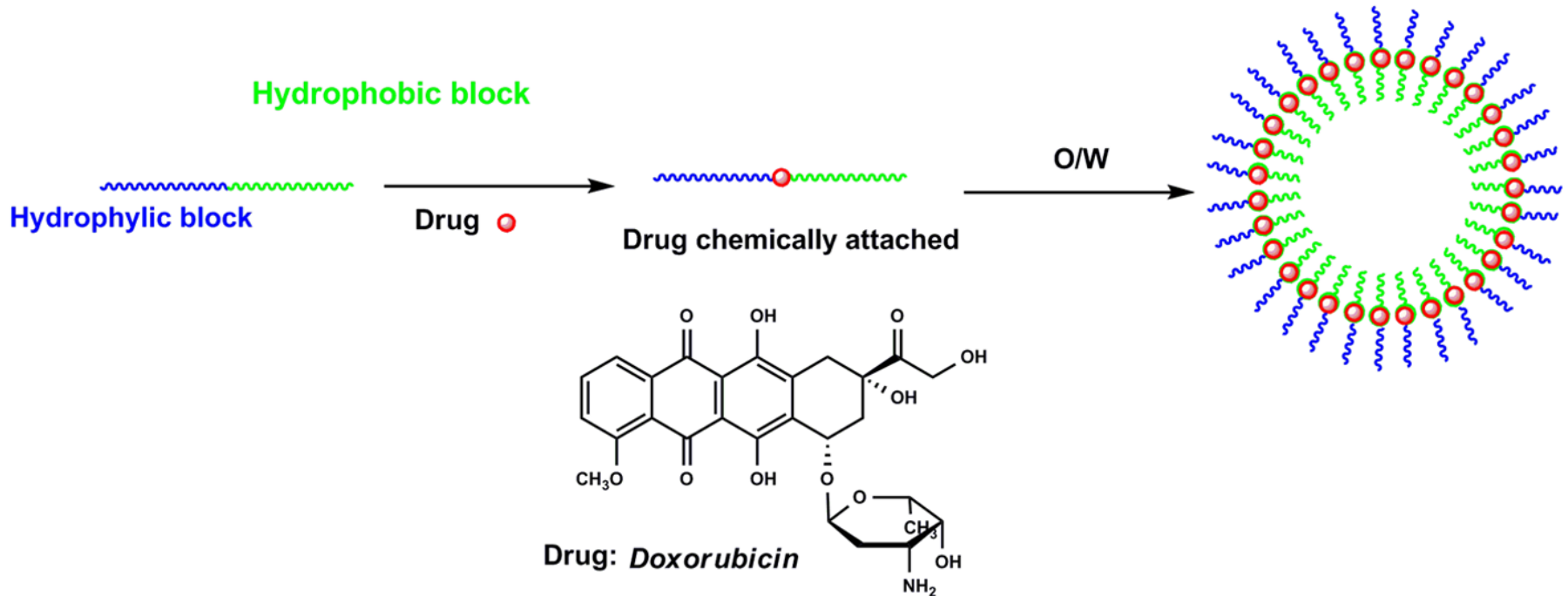
Schematic presentation of fabrication of hollow microspheres

- ✓ One step core shell spheres fabrication
- ✓ Create a large void
- ✓ The use of surfactant is avoided
- ✓ The cavity can be enlarged after solvent etching

Microspheres using Layer by layer technique



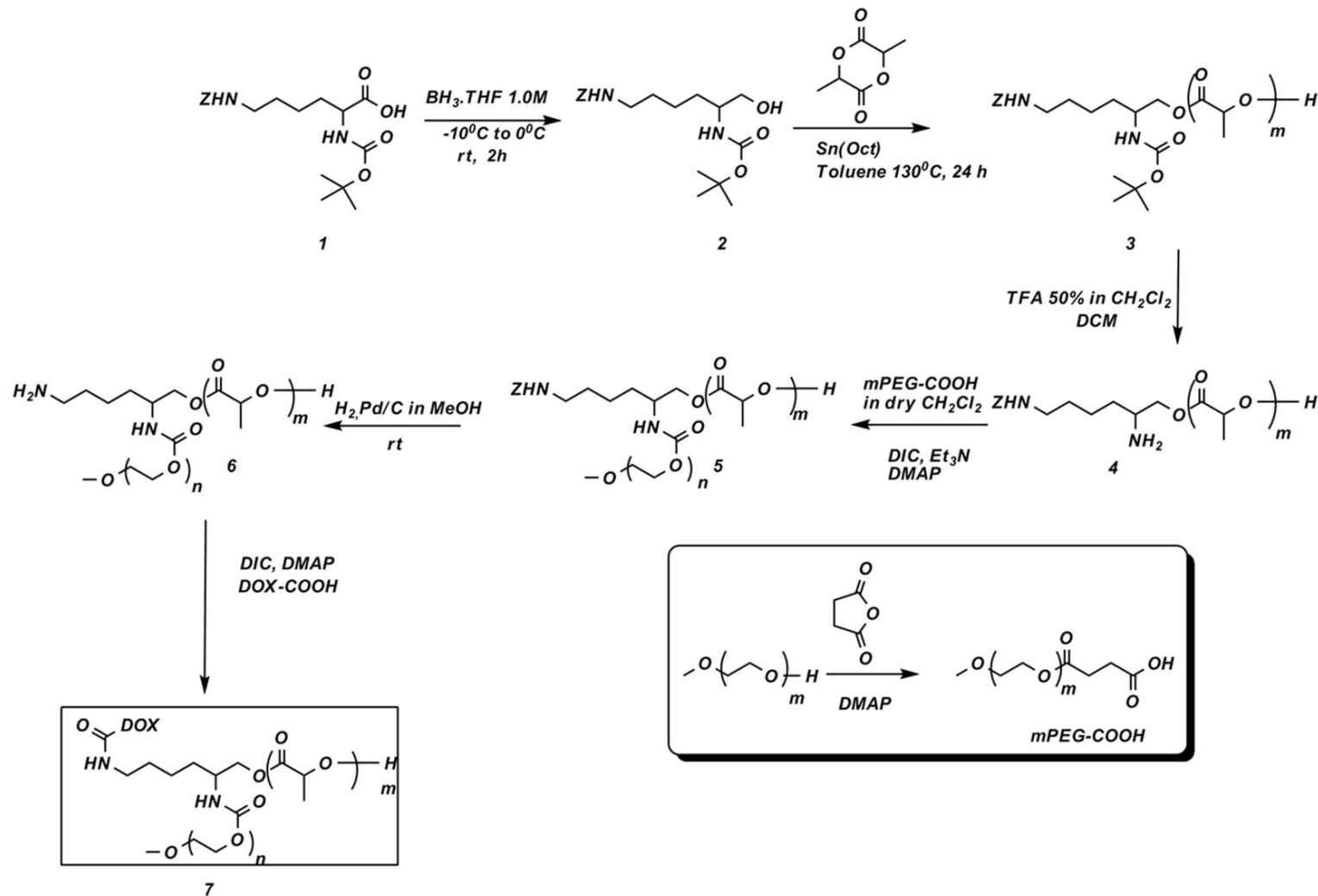
Micelles



Advantages

- Small size
- Chemical modification
- Characterization with NMR

Micelles



Characterization of nanocontainers

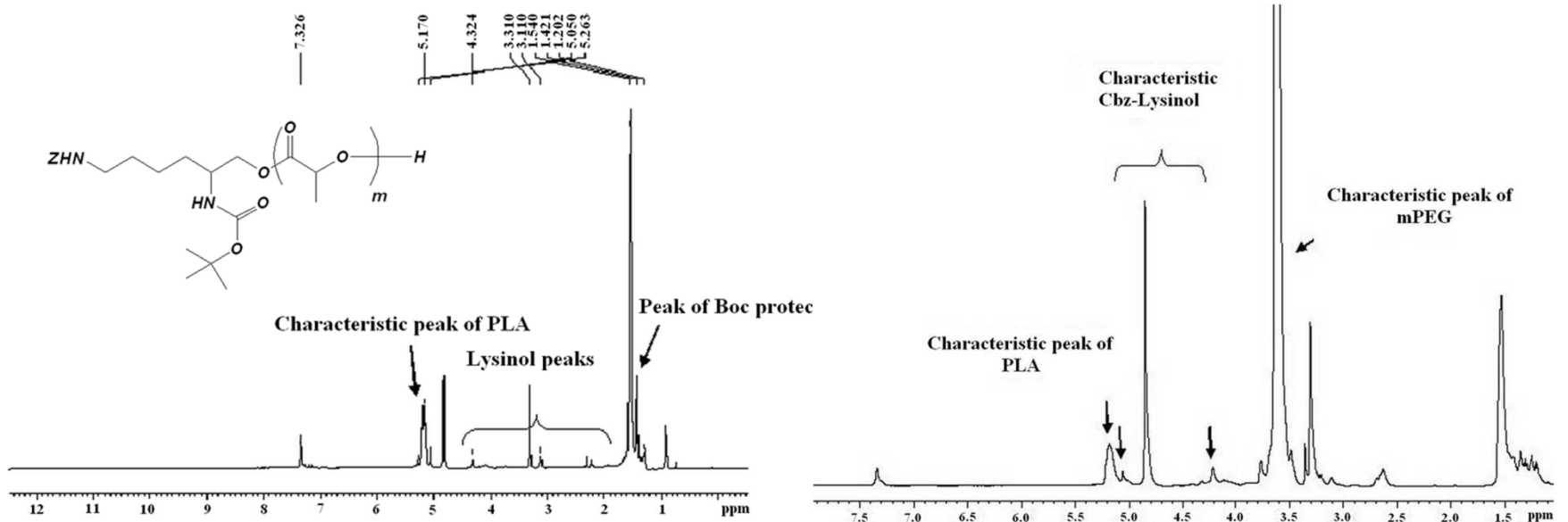
▶ Structural Characterization

- ❑ FT-IR
- ❑ RAMAN
- ❑ NMR
- ❑ UV

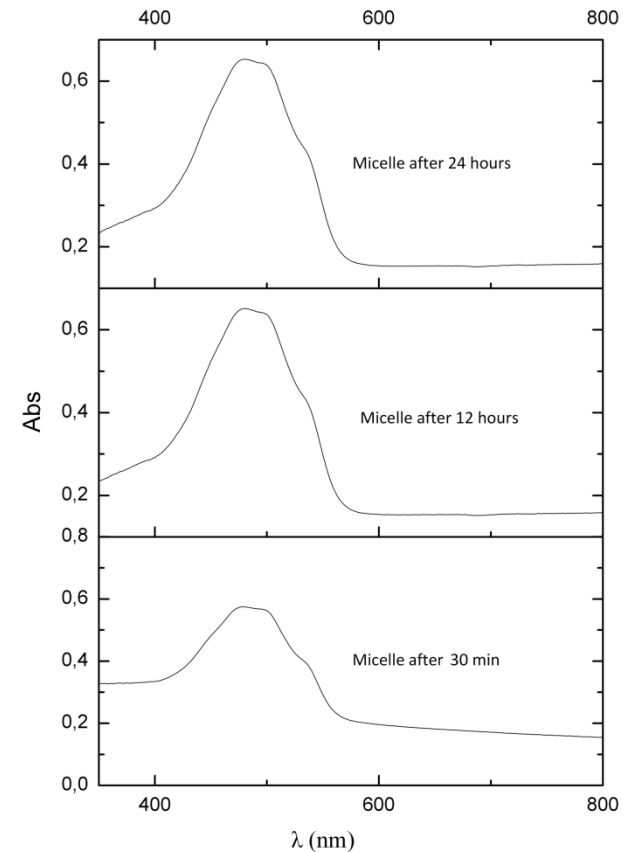
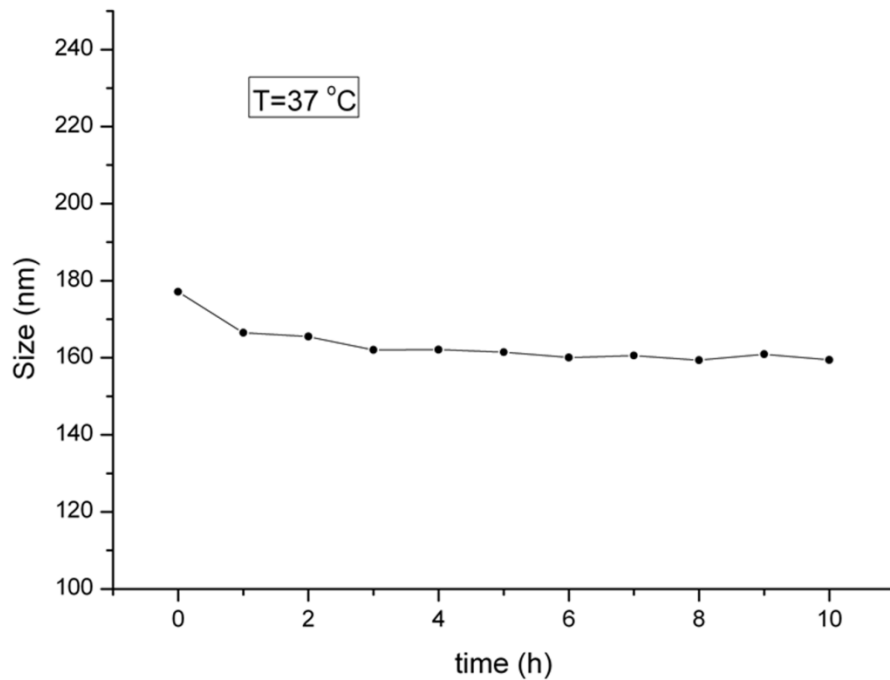
▶ Morphological characterization

- ❑ SEM (Scanning Electron Microscopy)
- ❑ TEM (Transmission Electron Microscopy)
- ❑ AFM
- ❑ DLS

NMR characterization



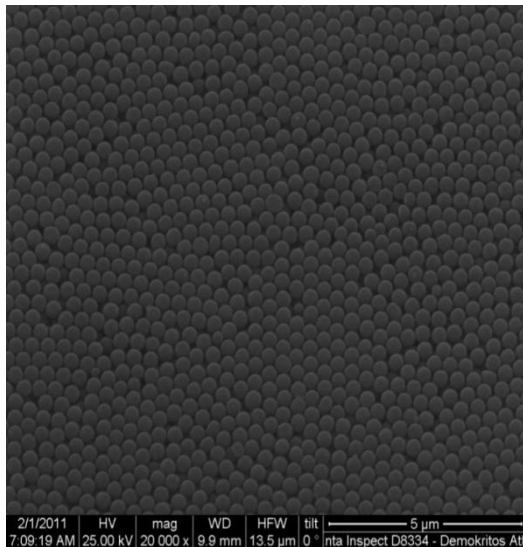
DLS & UV spectra showing the stability of micelles



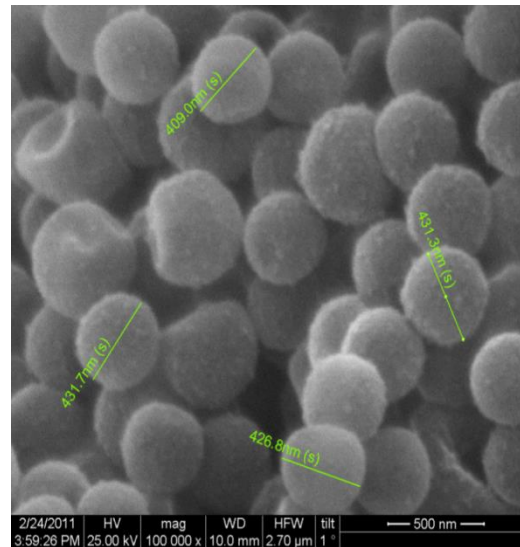
Particle size of micelles after being incubated in PBS containing 10% FBS at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for various periods of time. Absorption spectra of Dox-micelle aqueous solution 30 min after preparation, 12 and 24 h storage in dark.

SEM images

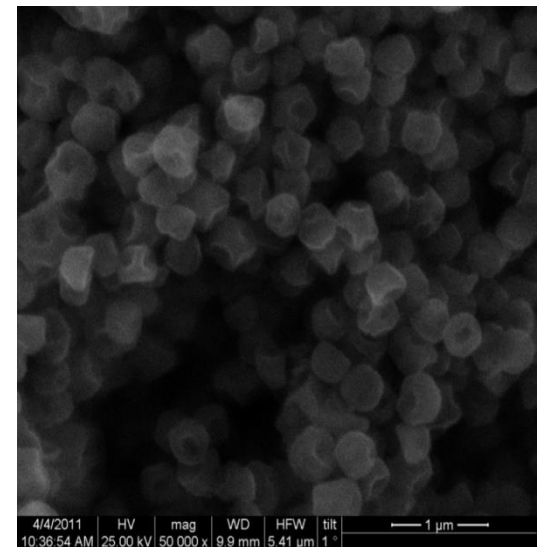
▶ SEM



a



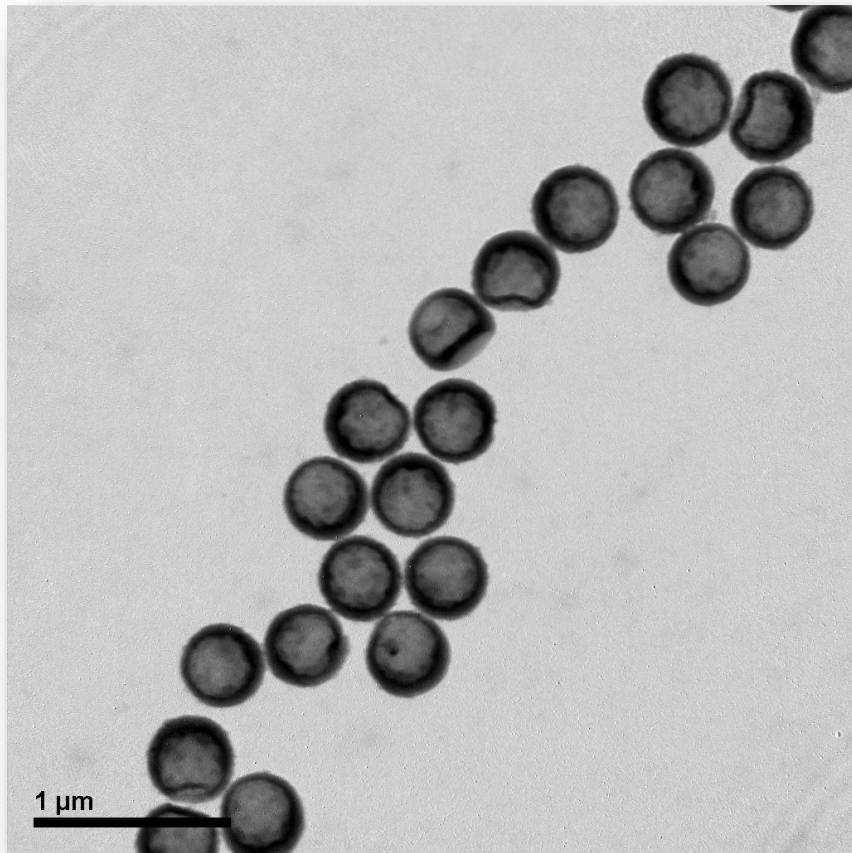
b



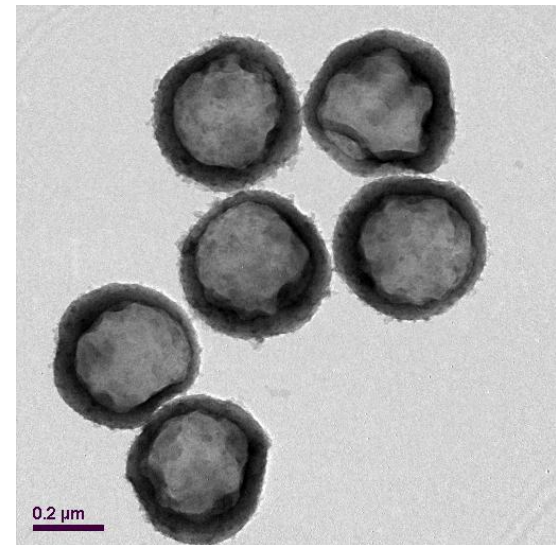
c

SEM images of different stages in seed polymerization, a) Seeds of PMMA, b) Strawberry-like surface in which a small cavity was formed, c) Hollow spheres after 10 min CHCl_3 treatment with full template removal

TEM images



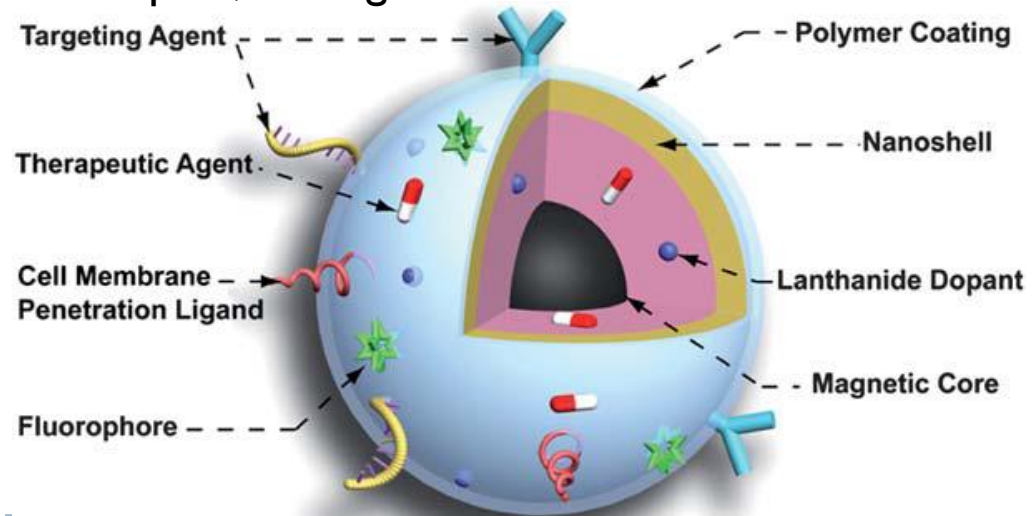
TEM image of hollow spheres.



Functionalization

Functionalization of microspheres

- ❑ Magnetic nanoparticle functionalization Fe_3O_4 (Magnetic functionalization)
- ❑ Peg functionalization (Polymer coating)
- ❑ FITC functionalization (Fluorophore)
- ❑ Folic Acid functionalization (Targeting Agents), VGFR/EGFR (Growth Factors)
- ❑ Gd nanoparticles or DOTA Gd (Lanthanide dopant, As diagnostic system)
- ❑ Peptide (For specific targeting)
- ❑ Ligands (Cell membrane penetration ligand)
- ❑ Drugs



Functionalization reactions

- ▶ Nucleophilic Addition

- ▶ Carbodiimide chemistry

- Esters (Acid sensitive)
- Amides (Peptidase sensitive)

- ▶ Other functionalizations

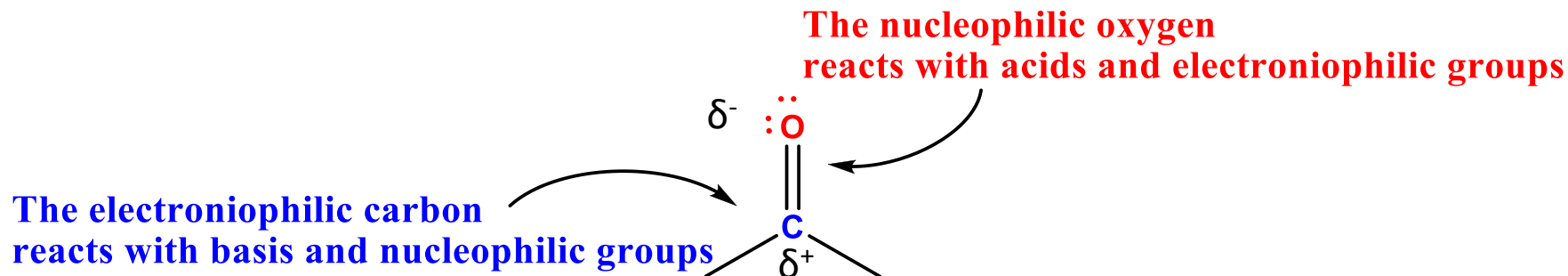
- Acid sensitive

- ▶ More.....

More.....

More.....reactions

Nucleophilic Addition



What is electrophilic ????

Electrophilic : positive, electron poor, cation, e^- receiver.

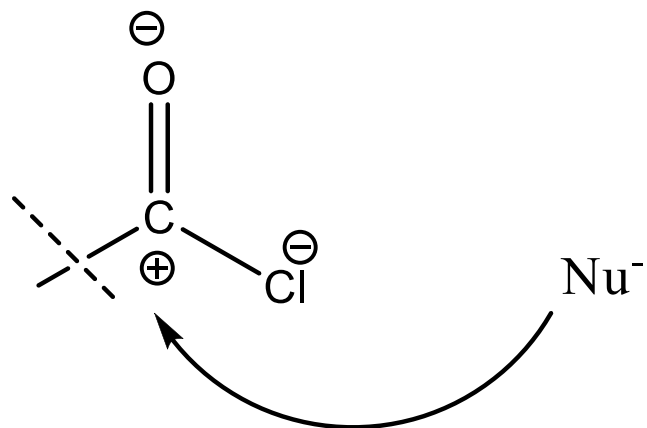
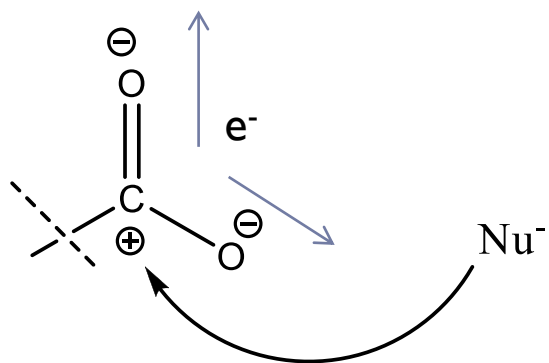
Ηλεκτρονιόφιλο = «Θετικό», ηλεκτρονιακά «φτωχό», «κατιον-οειδές», δέκτης- e^-

What is Nucleophilic ????

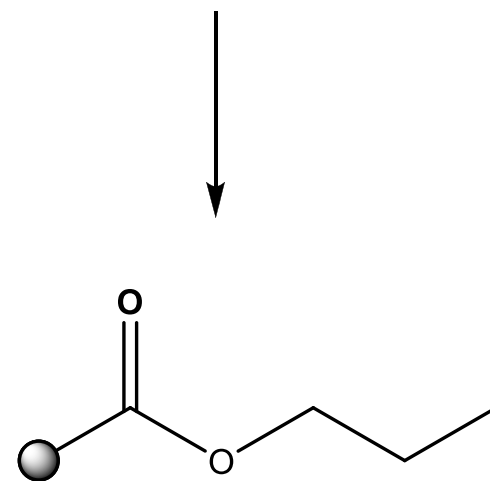
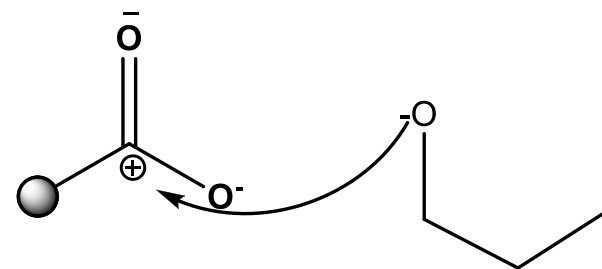
Nucleophilic: negative, electron rich, anion, e^- donor.

Ηλεκτρονιόφιλο = «Αρνητικό», ηλεκτρονιακά «πλούσιο», «ανιόν-οειδές», δότης- e^-

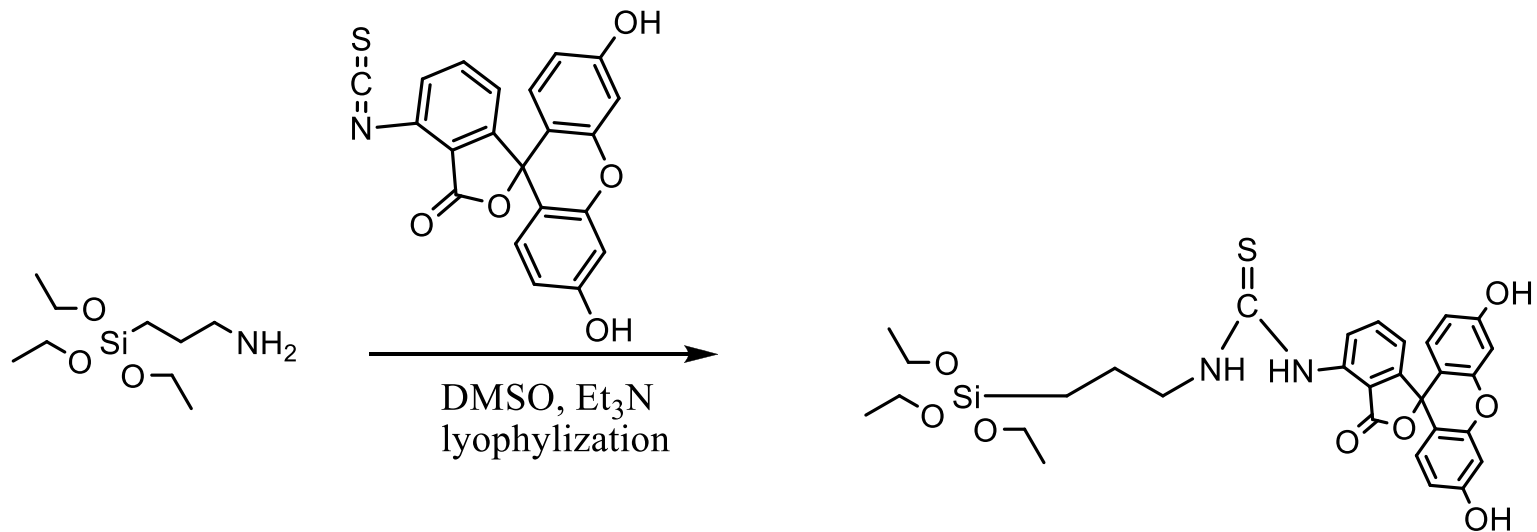
Nucleophilic addition mechanism



e.g. NH_3, OH



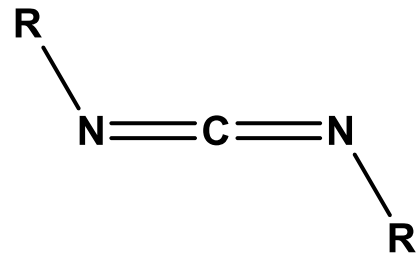
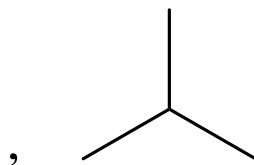
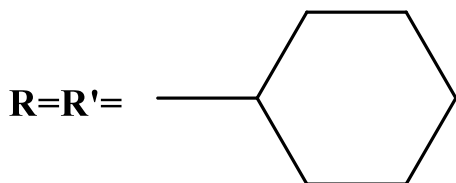
FITC functionalization



Characterization IR, NMR

Carbodiimide chemistry

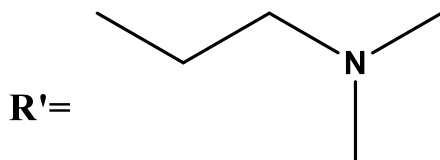
According carbodiimide chemistry



N,N'-dicyclohexylcarbodiimide **N,N'-Diisopropylcarbodiimide**

DCC

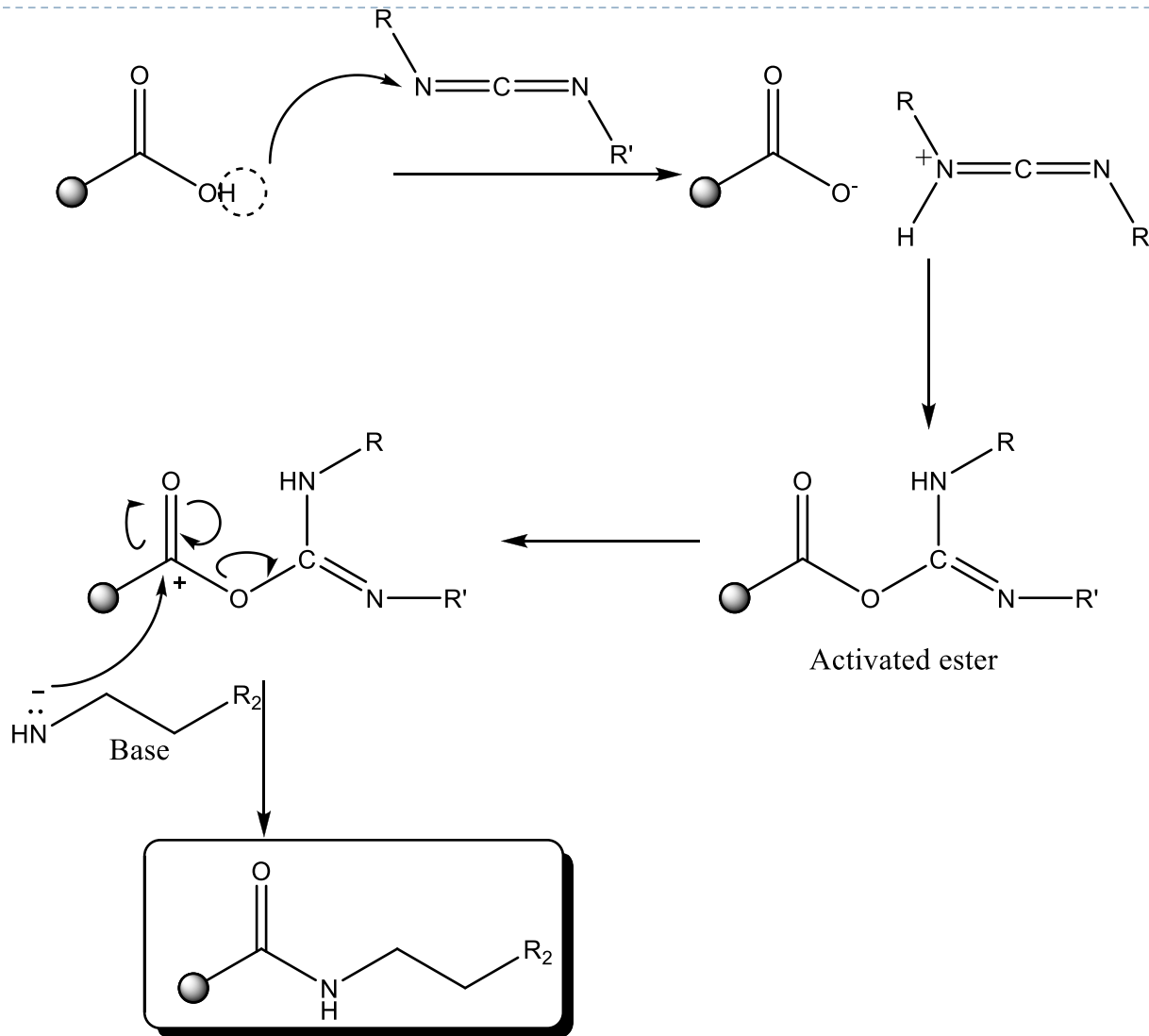
DIC



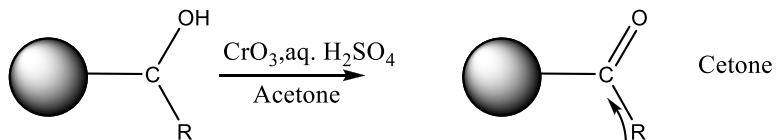
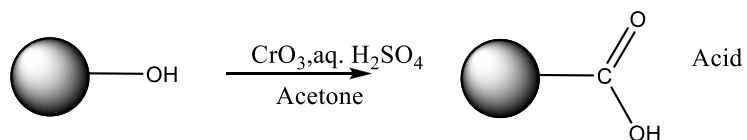
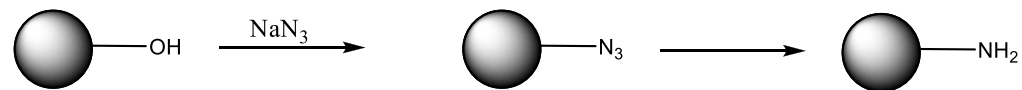
EDC

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

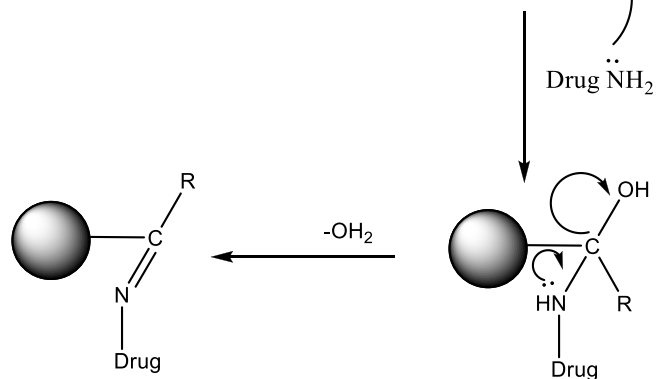
Mechanism of Nanomaterial's Functionalization



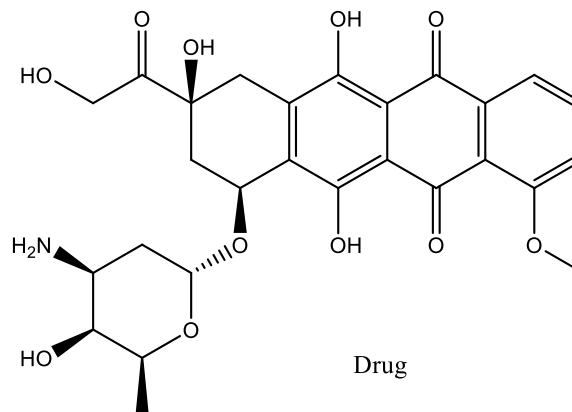
Other functionalizations



Jones Oxidation

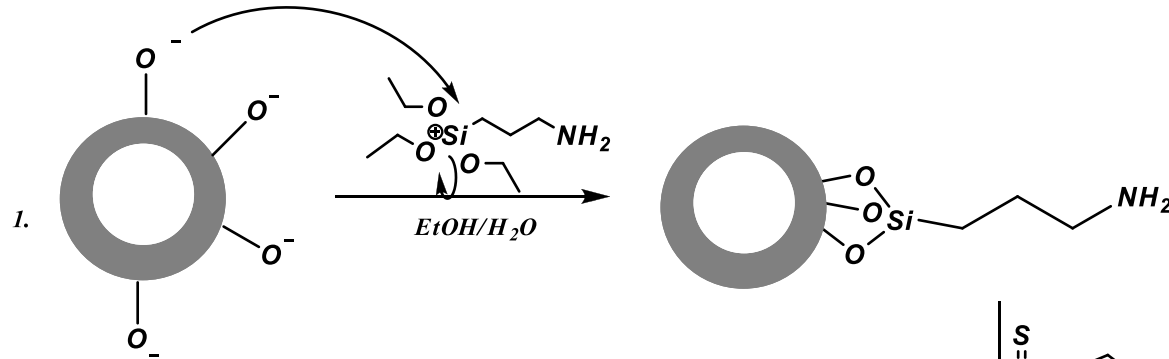


Imine or Schiff base formatio
Acidic sensitive
pH of endosomes

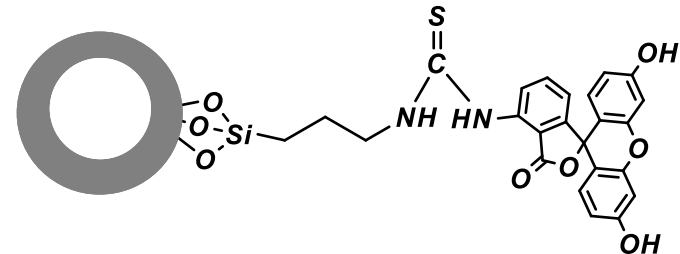
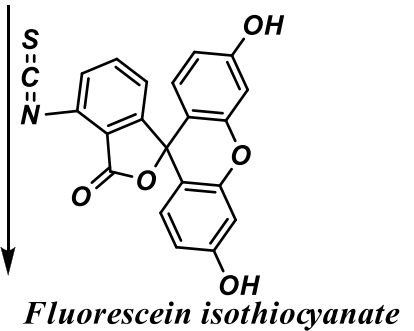


Drug

FITC functionalization



FITC modification



Sol Gel Process Synthesis

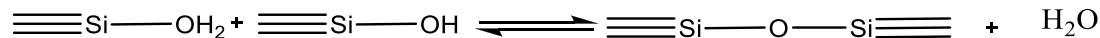
➤ Hydrolysis



➤ Alcohol Condensation



➤ Water Condensation



Functionalization

Two ways of functionalization



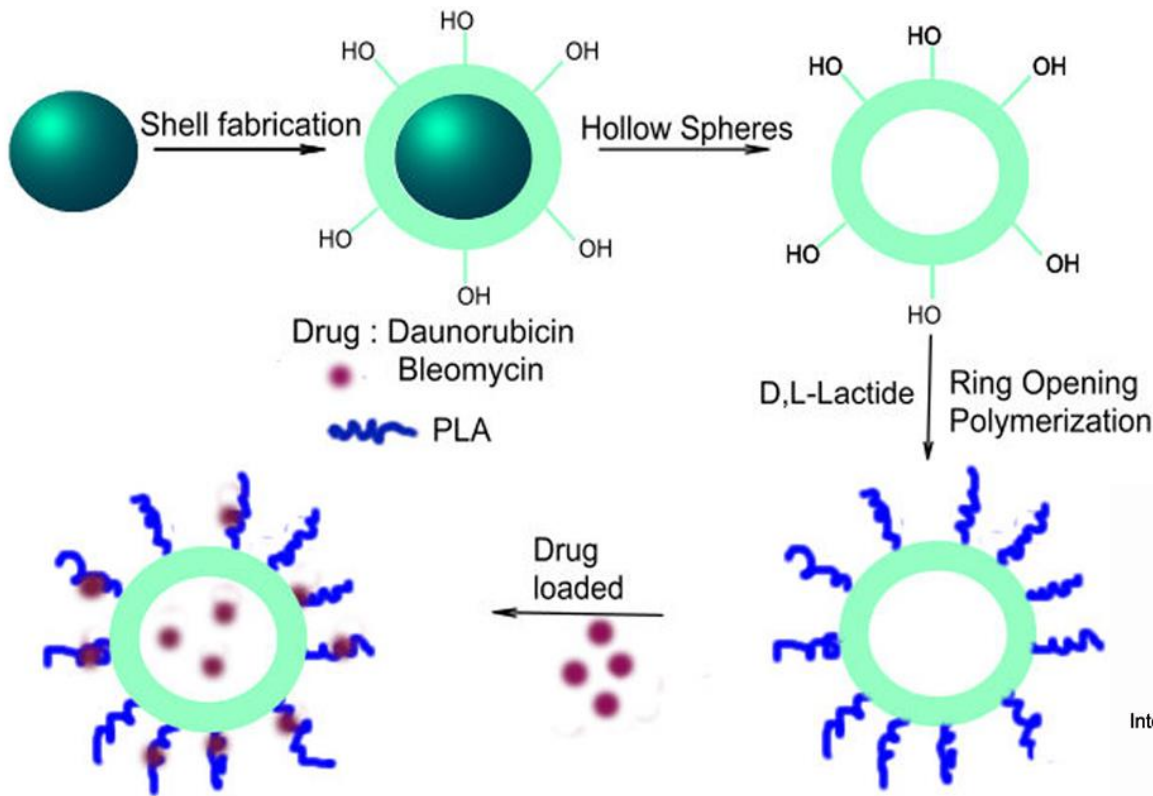
*Coating: PEG, PLA,
Polysacharides, and other...*



*addition : PEG
PLA, target moeity*



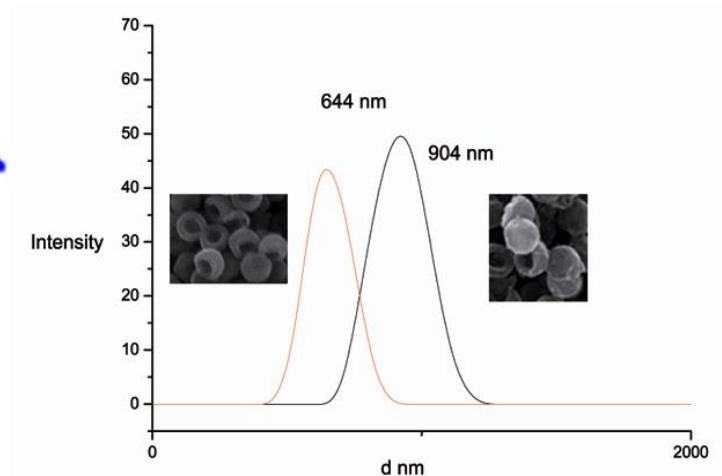
✓ Coating of Nanospheres



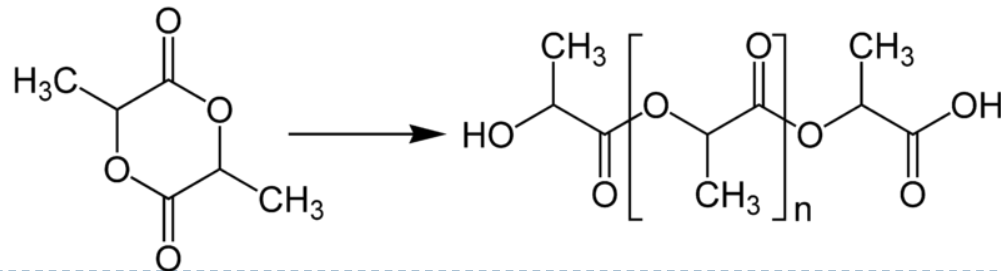
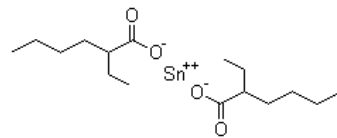
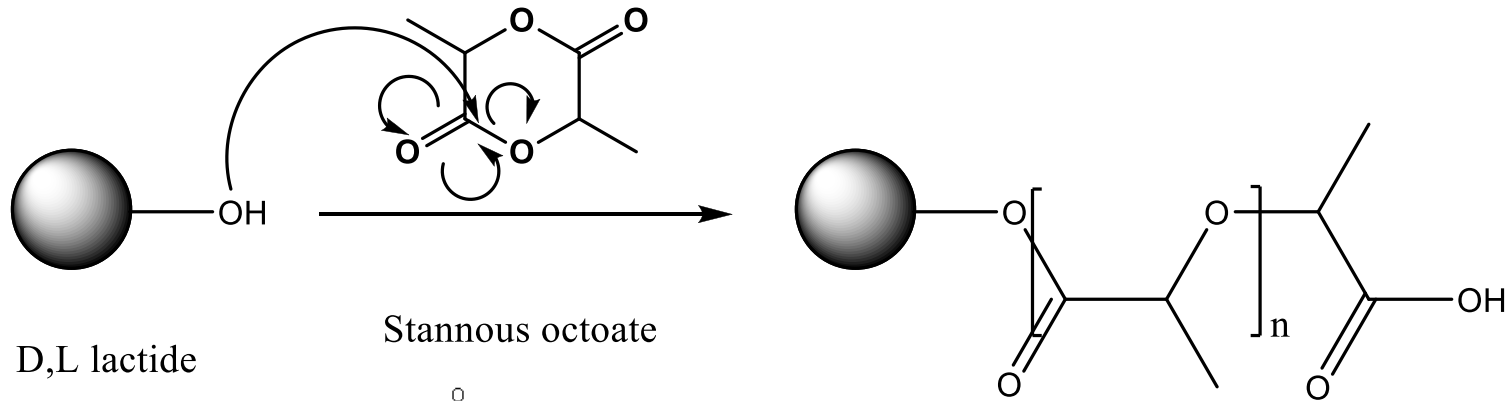
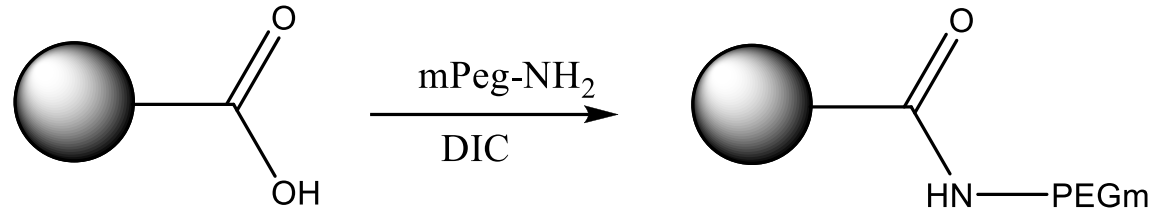
biodegradable
character

Synthesis by ROP:
(Ring Opening Polymerization)

- Increase Drug Loaded
 - Improve the drug solubility
- ↓
- Increase the bioavailability

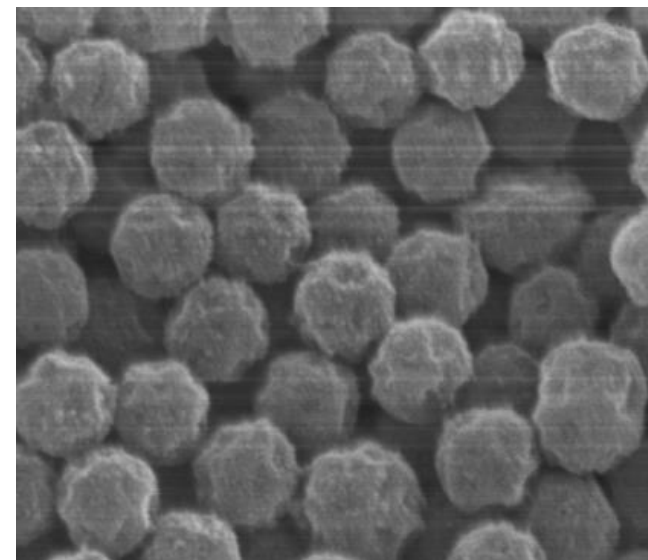
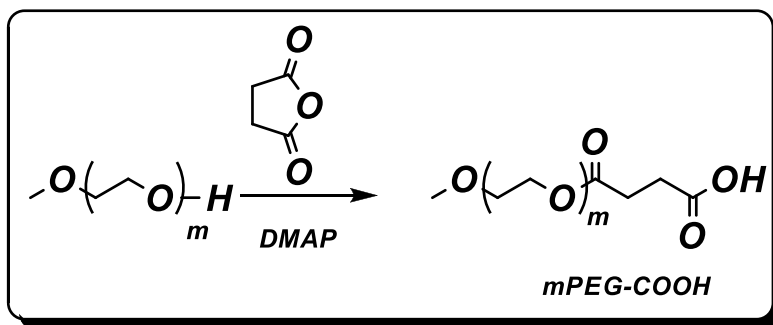
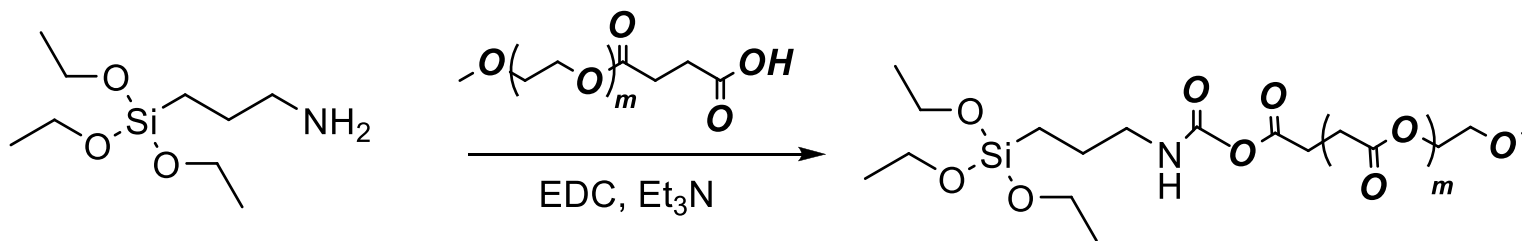


PEG and Poly(Lactic Acid) coating



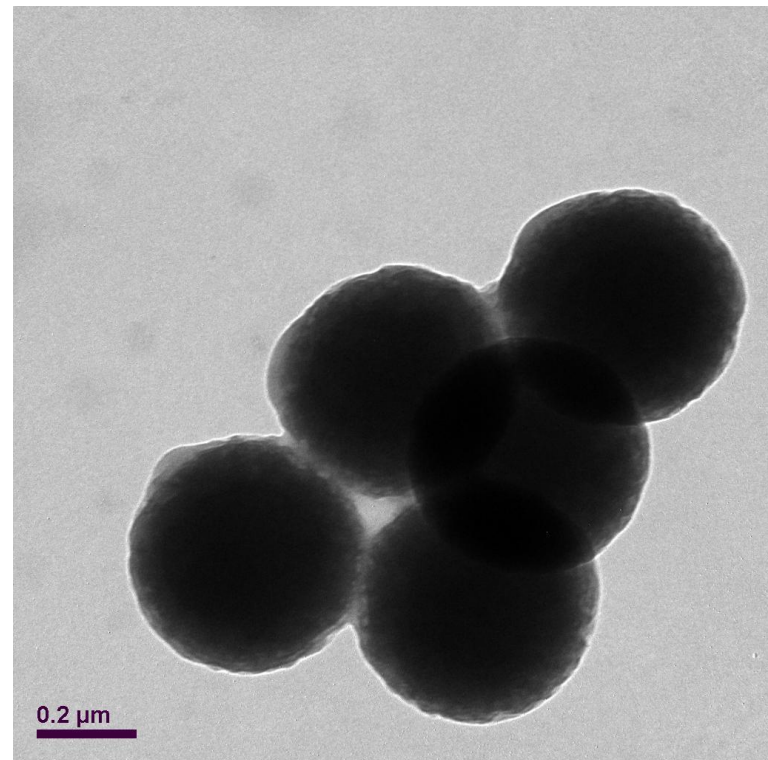
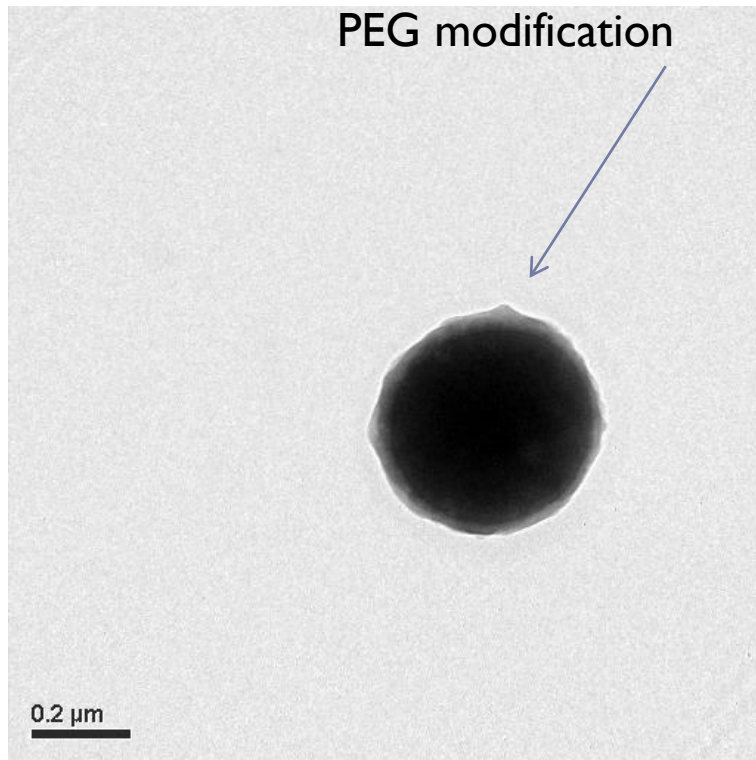
PEG coating

▶ PEG-APS:



TEM images of PEG Coated spheres

- ▶ Deposition on the surface and crosslinking with the COOH and OH groups.



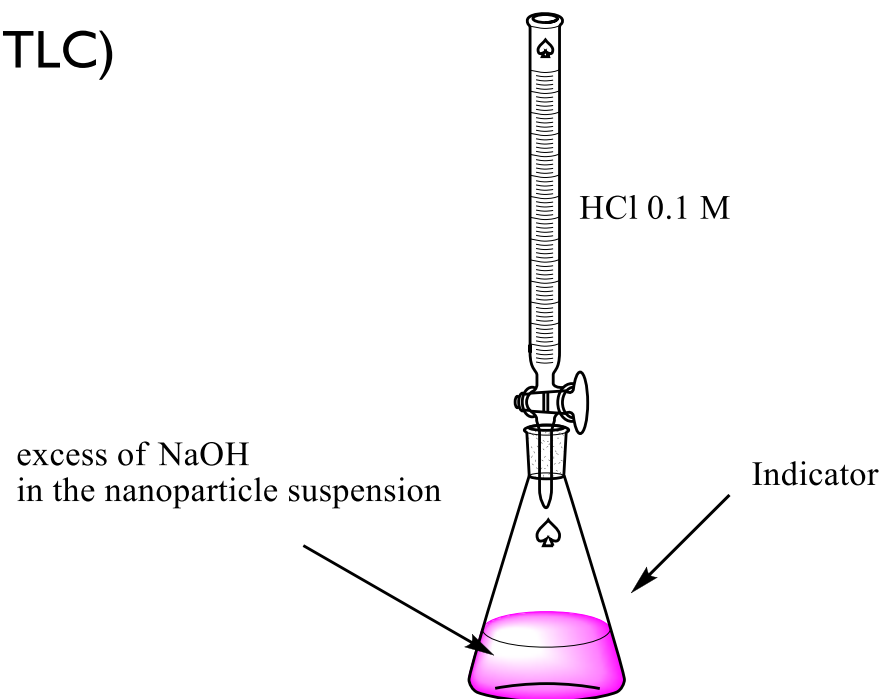
Peg Advantages

▶ **PEG Moiety Properties**

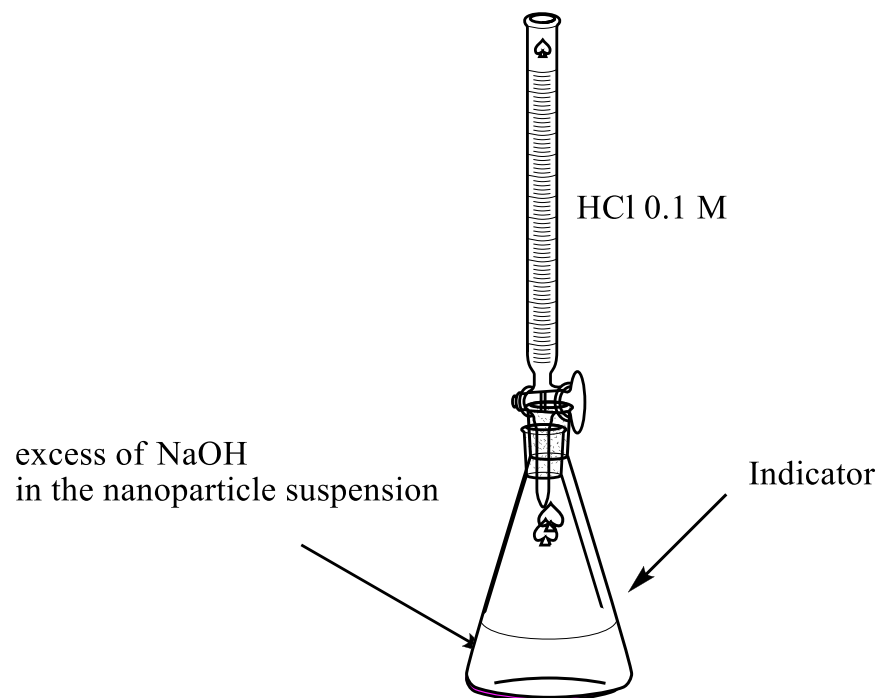
- ▶ PEG is a particularly attractive polymer for conjugation. The specific characteristics of PEG moieties relevant to pharmaceutical applications are:
 - ▶ • Water solubility
 - ▶ • High mobility in solution
 - ▶ • Lack of toxicity and immunogenicity
 - ▶ • Ready clearance from the body
 - ▶ • Altered distribution in the body

Difficulties during chemical functionalizations

- ▶ Monitor of the reaction
- ▶ Determination of $-\text{COOH}$,
 - Back-Titration with NaOH
- ▶ $-\text{NH}_2$,
 - Nynidrin test (Red color in TLC)
 - Kaizer test (Blue color)
 - Titration with picric Acid
 - Fmoc determination



Solutions (e.g. Back titration)



$$n_{\text{COOH}} = n_{\text{NaOH}} - n_{\text{HCl}}$$

Targeting

Targeting

▶ Targeting

Passive Targeting Enhanced Permeation and
(EPR effect)

Targeting of RES cancers

Size and surface chemistry

Active Targeting

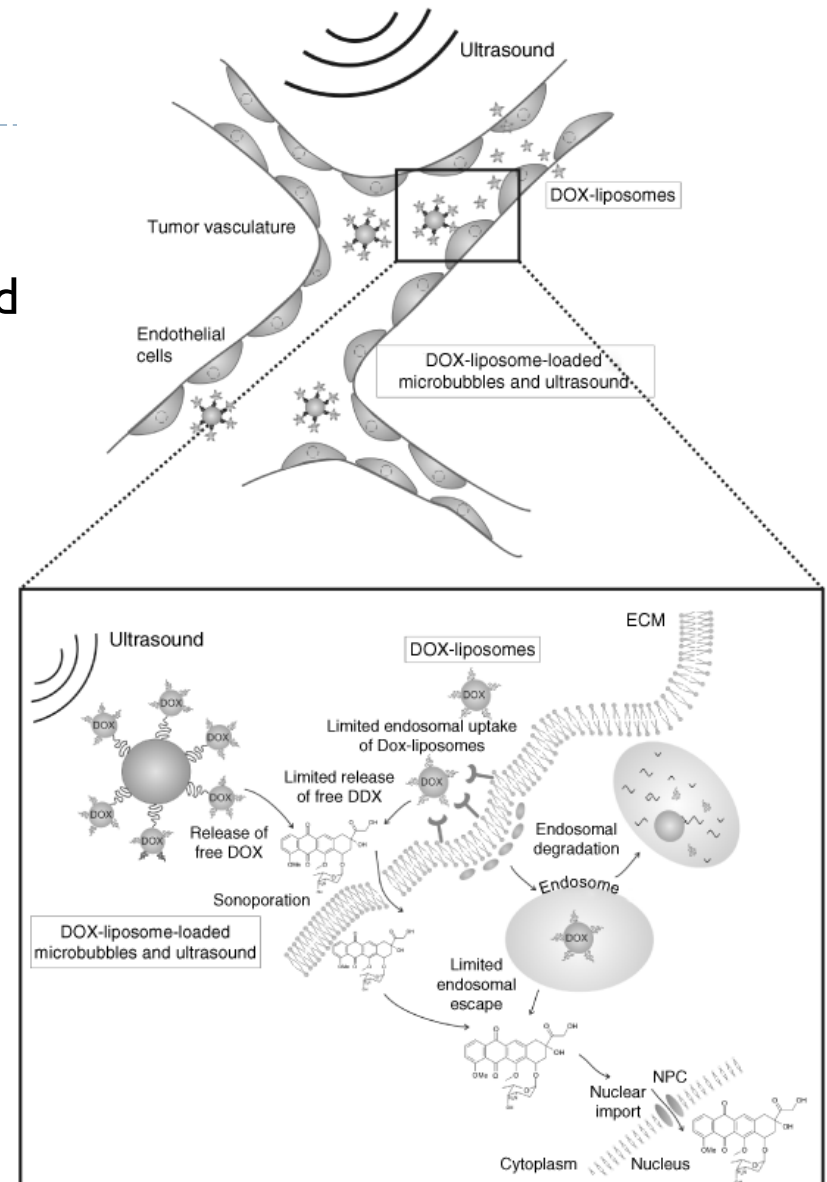
Surface chemistry allows

Functionalization/targeting molecules

Antibodies, e.g. Herceptin

Small molecules, e.g. folic acid

Cytokines, e.g. TNF- α

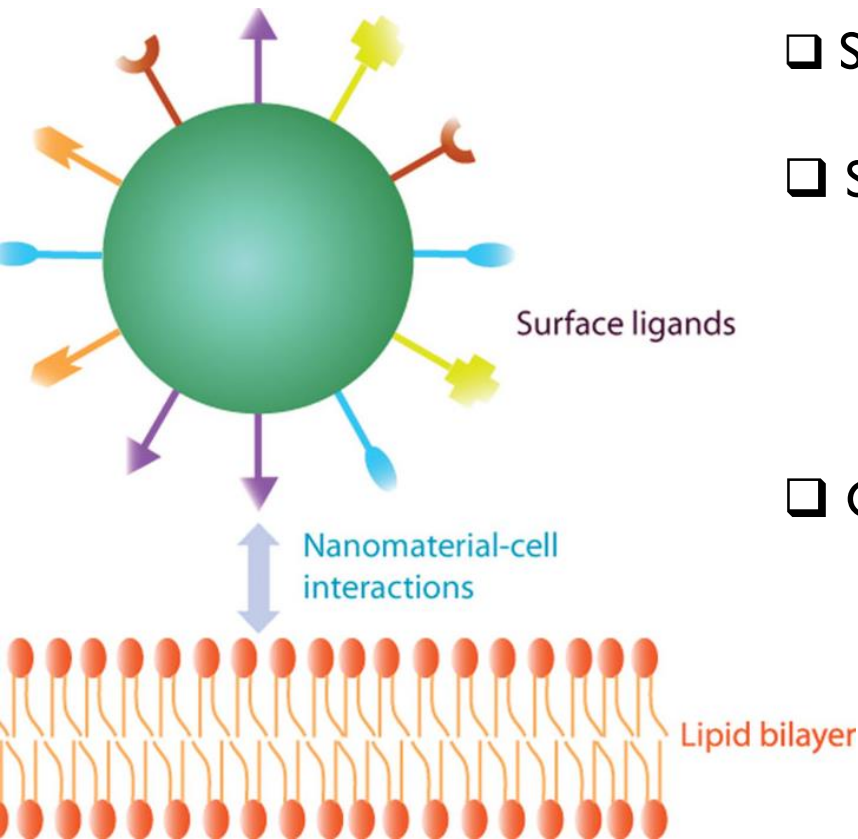


Ways of Targeting

- ▶ Nanomaterials
- ▶ Folic Acid
- ▶ Peptides



Type of nanomaterial



Shape : Spherical, tubes, membranes...

Size :

< 200 nm Passive targeting (EPR effect)

200 nm Active targeting using small molecules

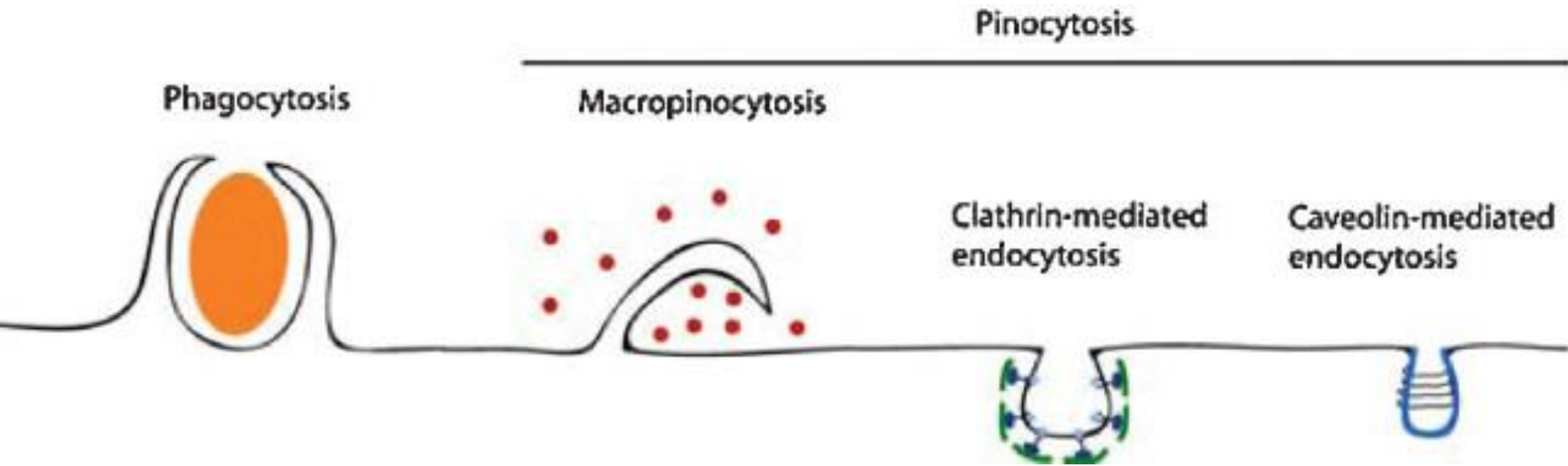
Charge :

Positive charged

Negative

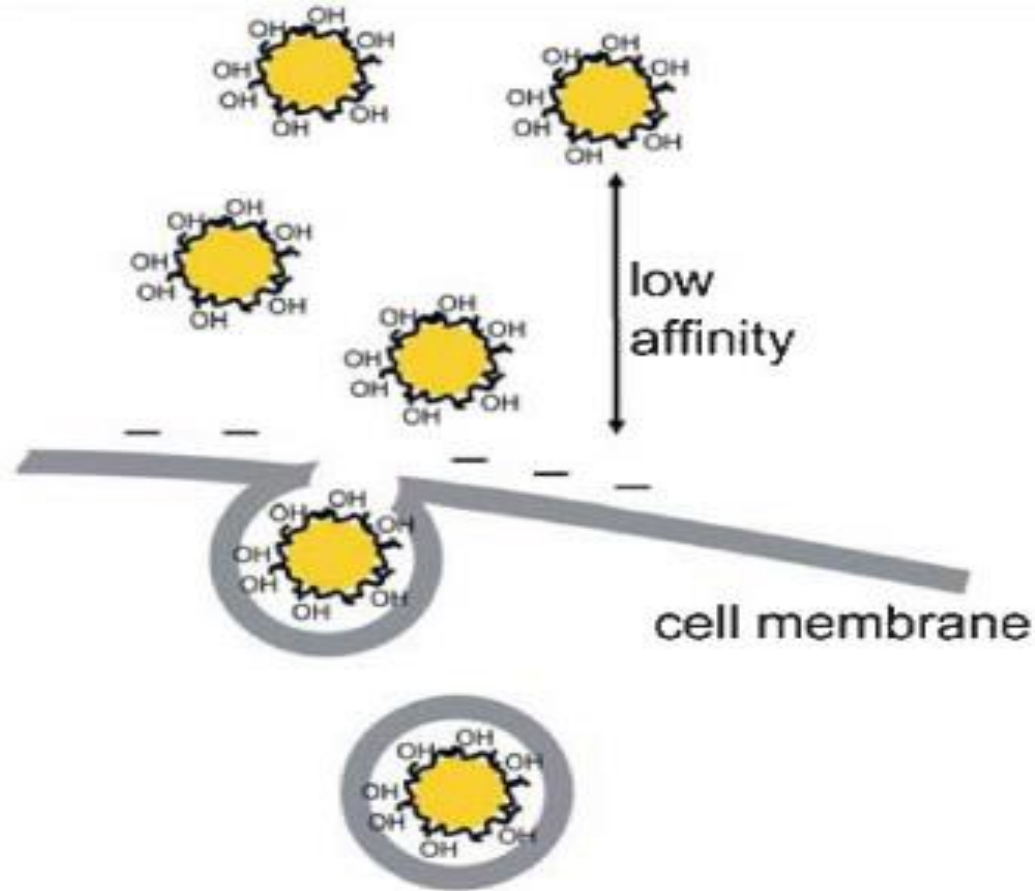
Neutral

How the type of nanomaterial affect Internalization?



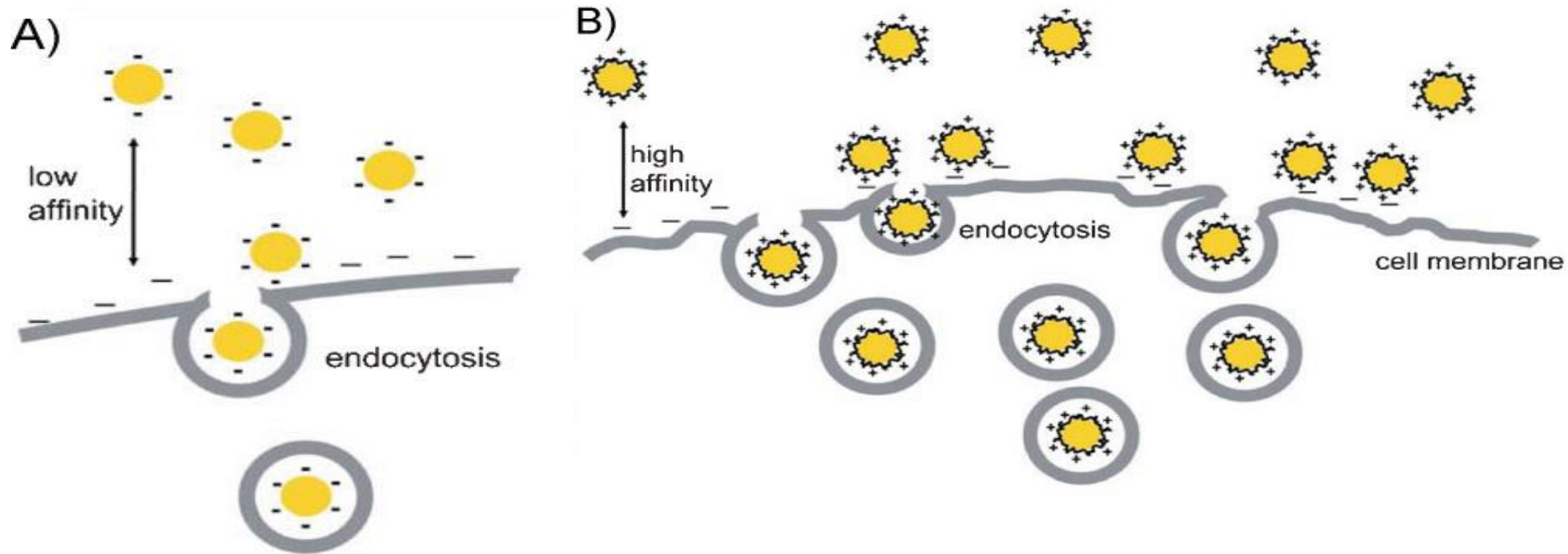
- Enclosing them in the membrane
- Endolysosomes (membrane- bound vesicles)
- Taken up into macrophage
- Clarithin

Internalization & Functional groups



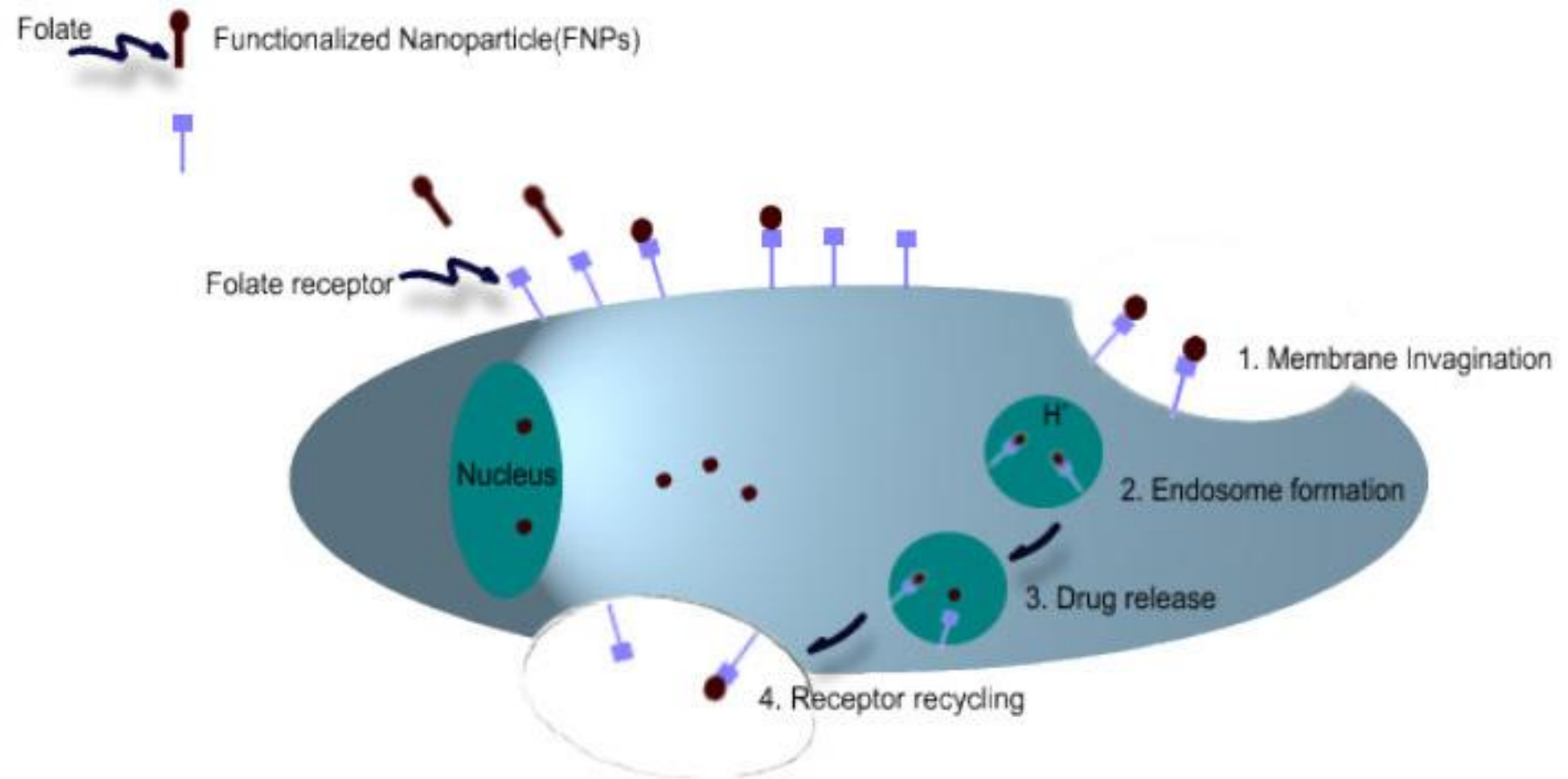
The hydroxylic groups have a lower affinity than the NH_2 groups

Internalization & Charge



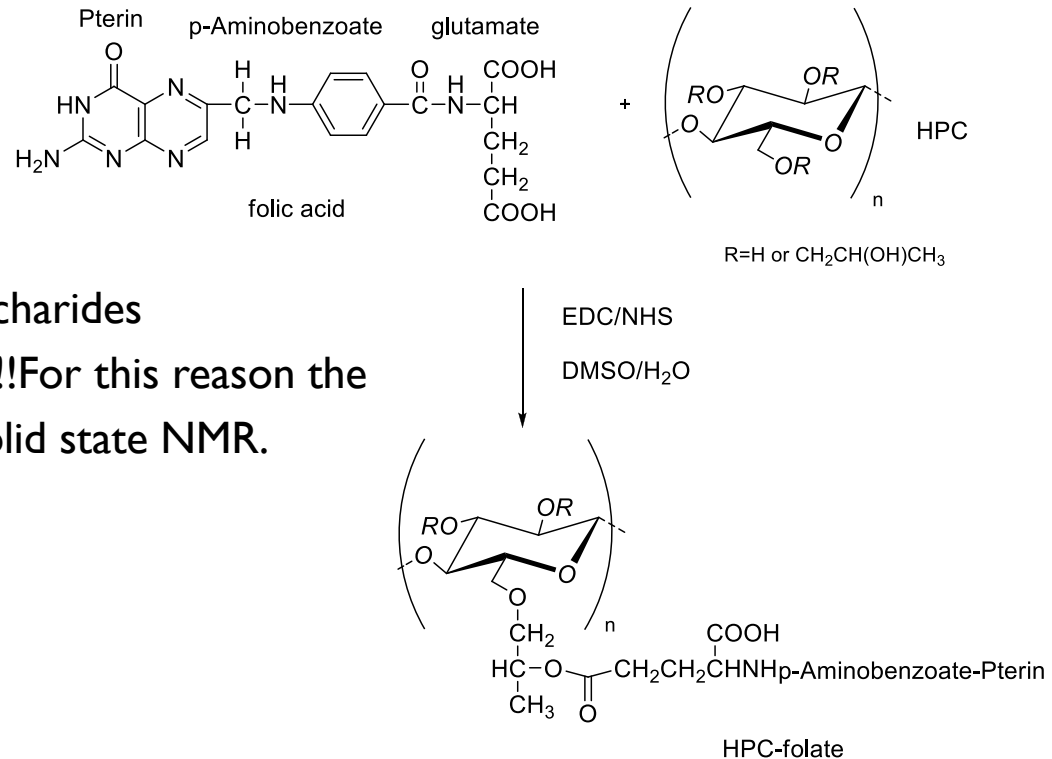
- Positive charged nanoparticles: high affinity
- Negative charged nanoparticles low affinity
- neutral

Mechanism of Folic Acid Targeting



Folic Acid modification

▶ HPC-Folic Acid modification



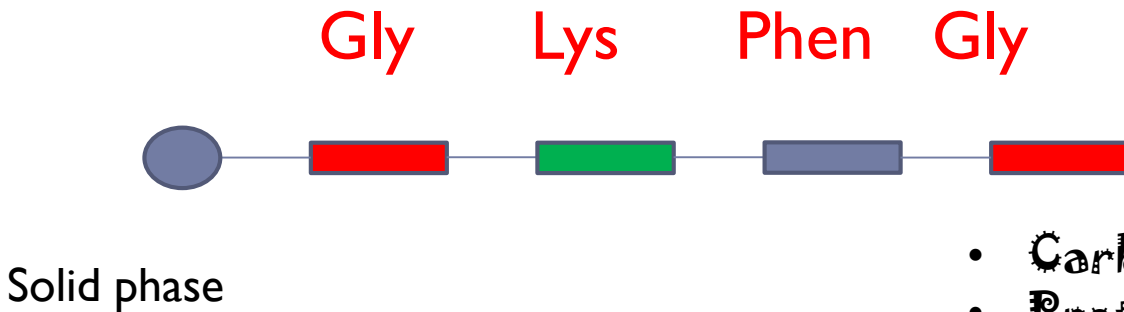
- ▶ The problem with polysaccharides
.....The solubility in high pH!!For this reason the NMR for this molecules.....Solid state NMR. IR for determination!!!

- ▶ APS-Folic Acid
- ▶ APS functionalized spheres and then reaction with Folic acid (Buffer solution + DMSO)

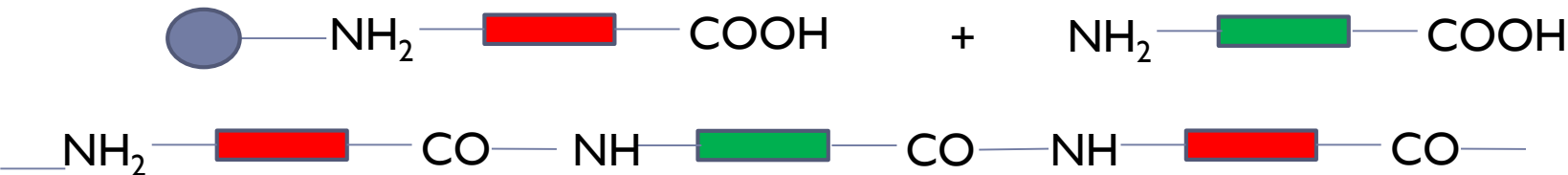
Peptide Synthesis

- ▶ Sensitive peptides either targeting groups or specific cleavage
- ▶ GFLG-Dox : Sensitive at **proteases hydrolysis????**

Gly-Phen-Lys-Gly



- Carbodiimide chemistry
- Protection/Deprotections



Synthesis.....



DIC, OXYMA,
DMF



Magnetic Nanoparticles : synthesis & functionalization

Synthesis

Co-precipitation of the Fe salts (FeCl_2 and FeCl_3)

Under N_2 !

Or synthesis on the nanospheres surface

Which is depended on :

Nanospheres surface functional group

-OH, -COOH, - NH_2

The conditions

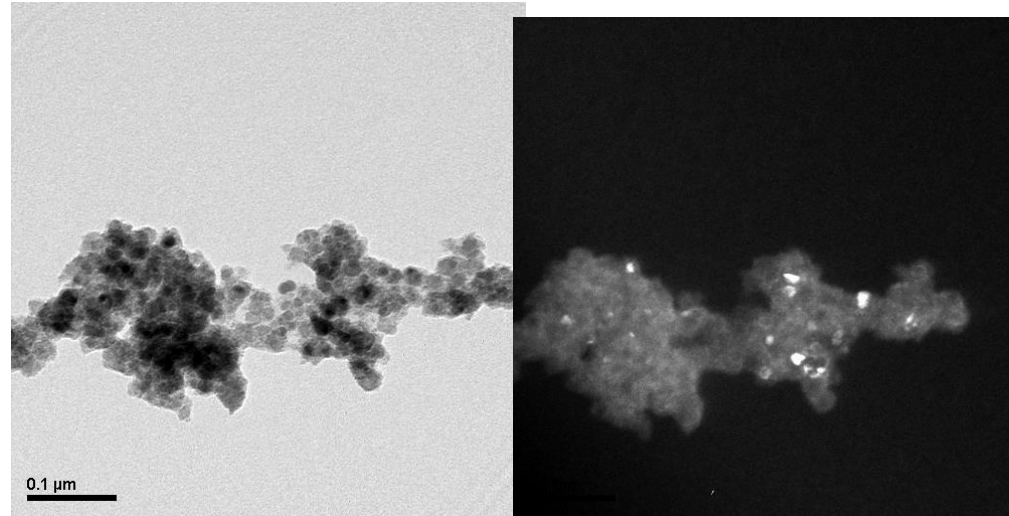
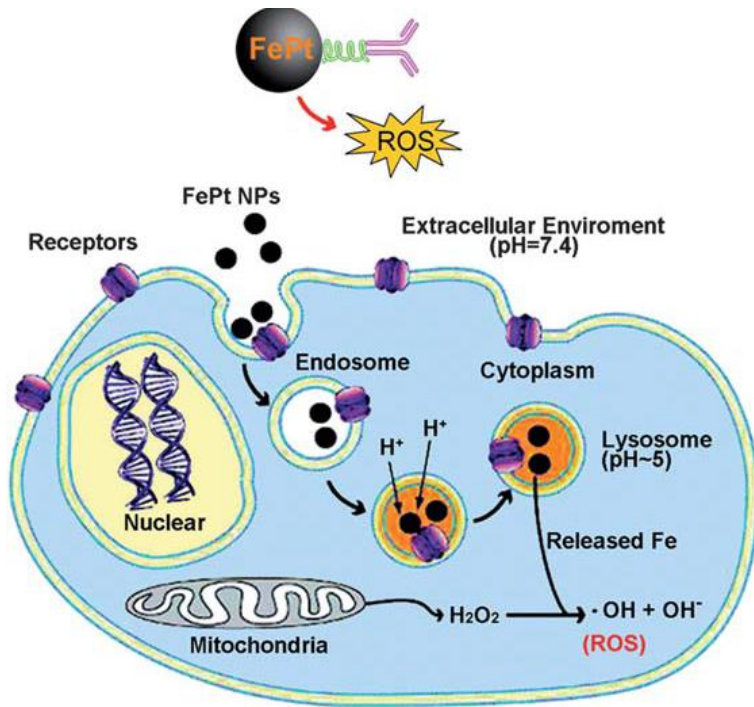
pH (10-12)

Temperature

The introducing properties

Under N_2 !

Magnetic Particles coating



Loading & Release

Encapsulation efficiency & Loading capacity

Loading capacity % = $\frac{\text{weight of the drug in microspheres}}{\text{total weight of the microspheres}} \times 100$

Encapsulation Efficiency % = $\frac{\text{weight of the drug in microspheres}}{\text{weight of the feeding drug}} \times 100$

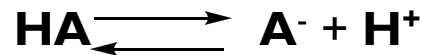


Factors affecting Loading and Release

The drug loading depends on:

- ▶ Solubility of the drug
- ▶ MW of the polymer
- ▶ Interaction between the polymer and Drug
- ▶ pKa of the Drug and pKa of the polymer
- ▶ What is pKa???

Acid Dissociation constant, K_a



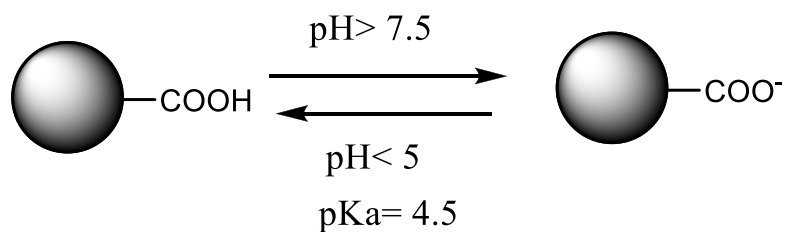
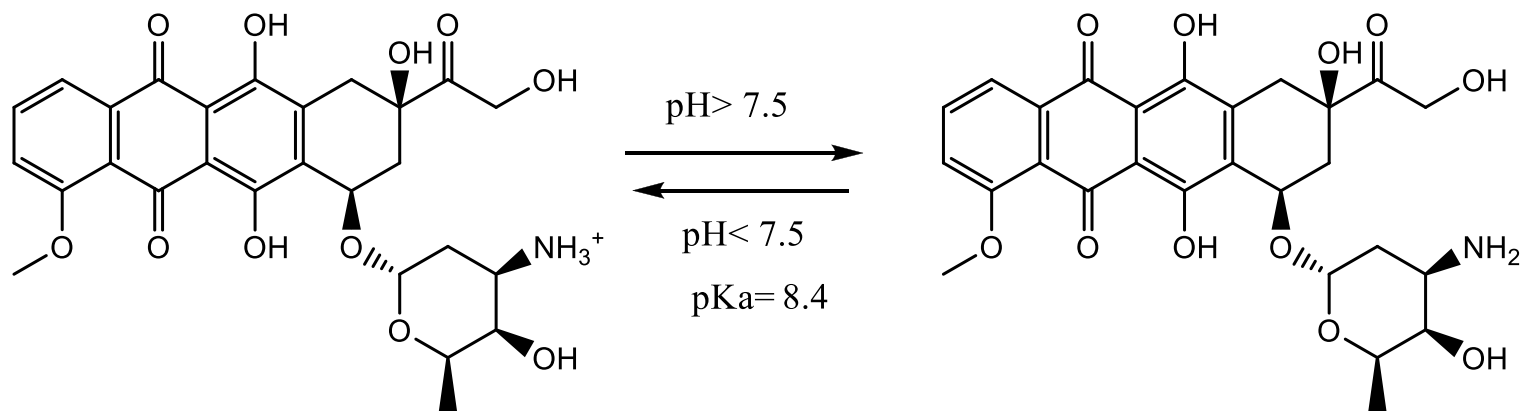
$$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{HA}]}$$

Weak Acids : -2 to 12

Strong Acids : -2

$$pK_a = -\log K_a$$

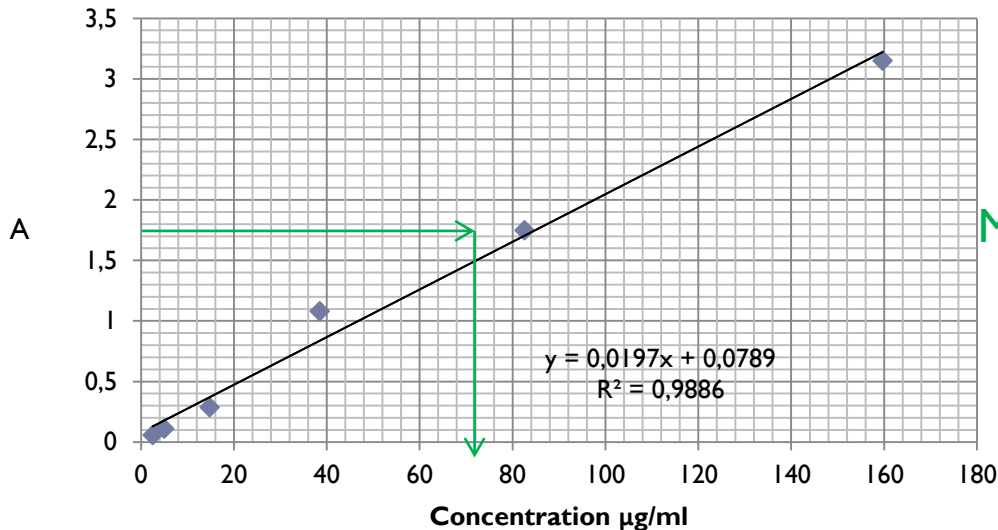
Electrostatic Interactions



Drug concentration in loading and release study

- ▶ It depends on the structure of the Drug
- ▶ UV-vis spectroscopy: Lambert-Beer : $A = \epsilon b c$
- ▶ Fluorescence spectroscopy

□ Standard curve :



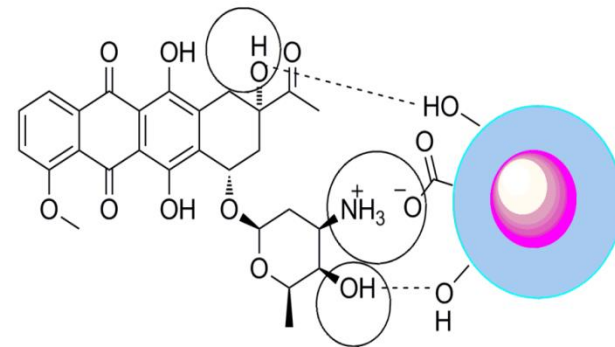
Measure absorbance of the supernatant

e.g. $A = 1.8$. $C_{un} = 80 \mu\text{g/ml}$

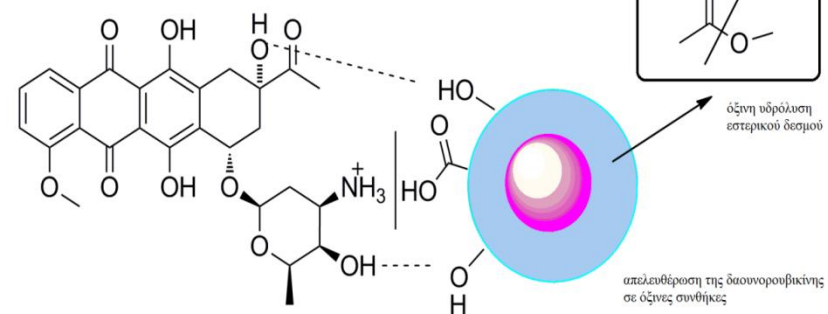
Mechanism of Drug loading & Release

Association with the polymer chain by:

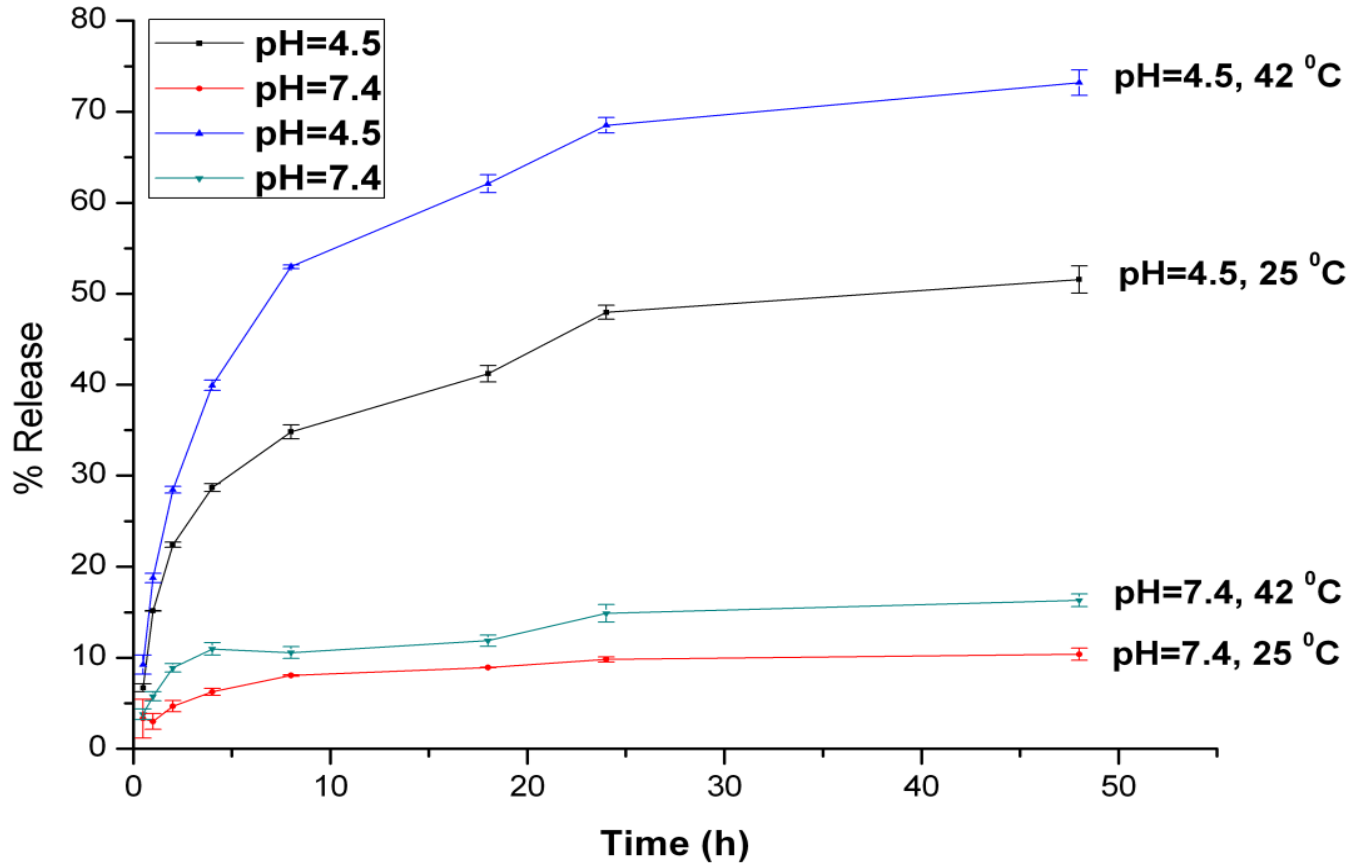
- ❑ *Hydrophobic forces*
- ❑ *Hydrogen bonds*
- ❑ *Dipole –charge interactions*
- ❑ *Absorption on the surface of nanocarriers*



διαμοριακές αλληλεπιδράσεις κατά τον εγκλωβισμό της δαουνορουβικίνης



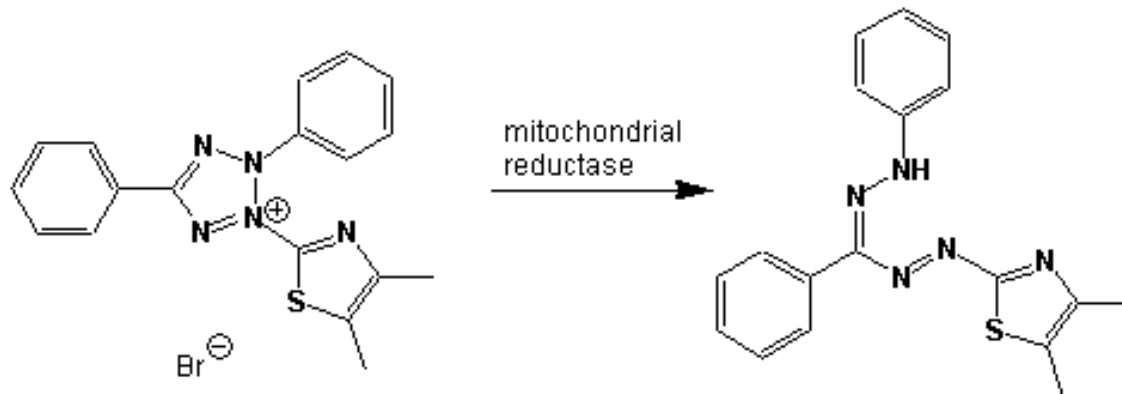
e.g. Release of pH & Thermo sensitive nanocontainers



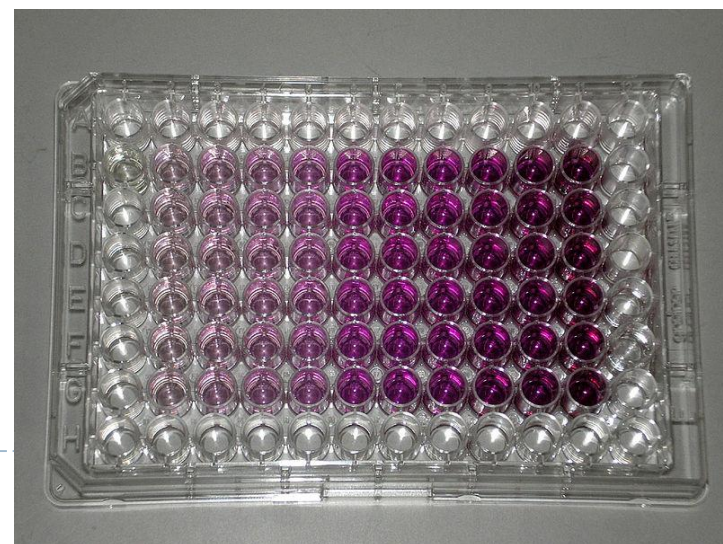
Cytotoxicity

Cytotoxicity

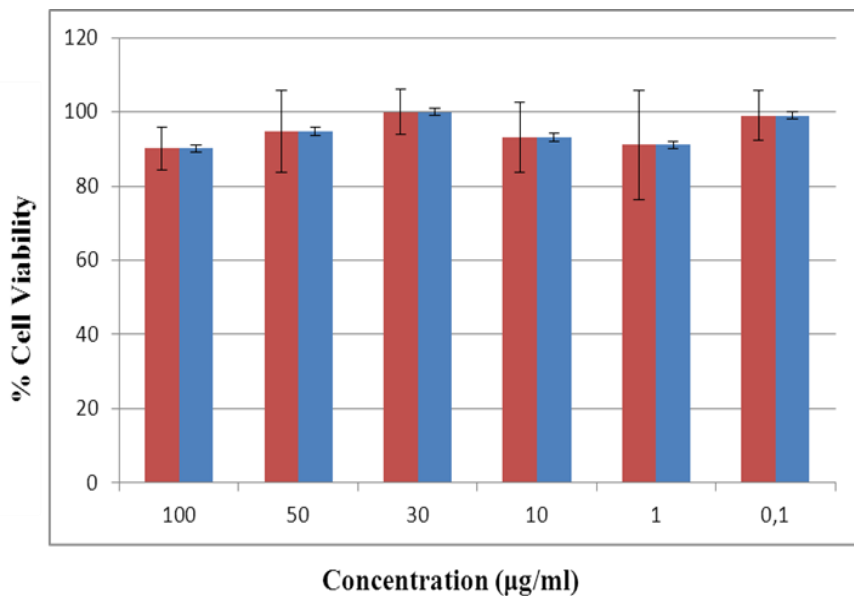
MTT assay



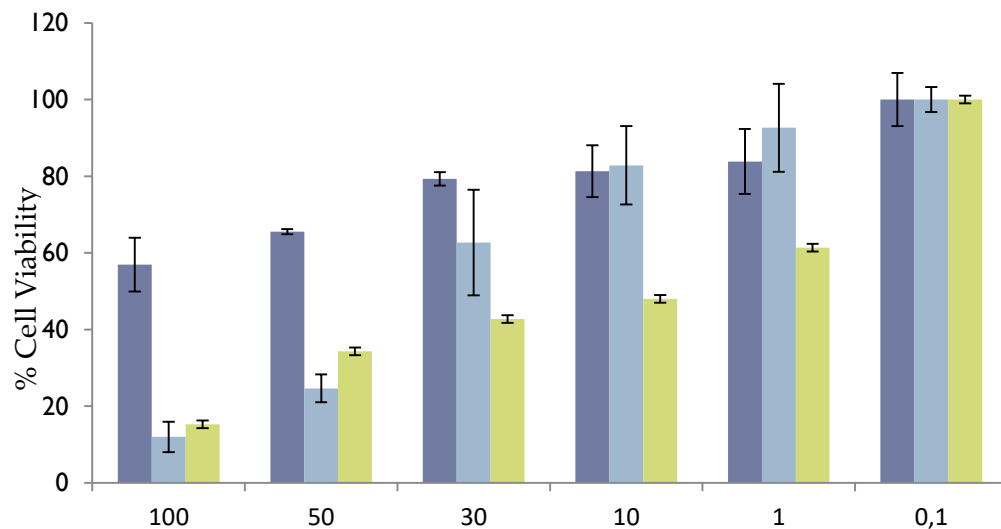
- ▶ We need Hela (cancer cells) for targeted microspheres with folic acid
- ▶ MCF7 for the microspheres evaluation
- ▶ a yellow tetrazole is reduced to purple formazan in living cells



Cytotoxicity study (MTT)

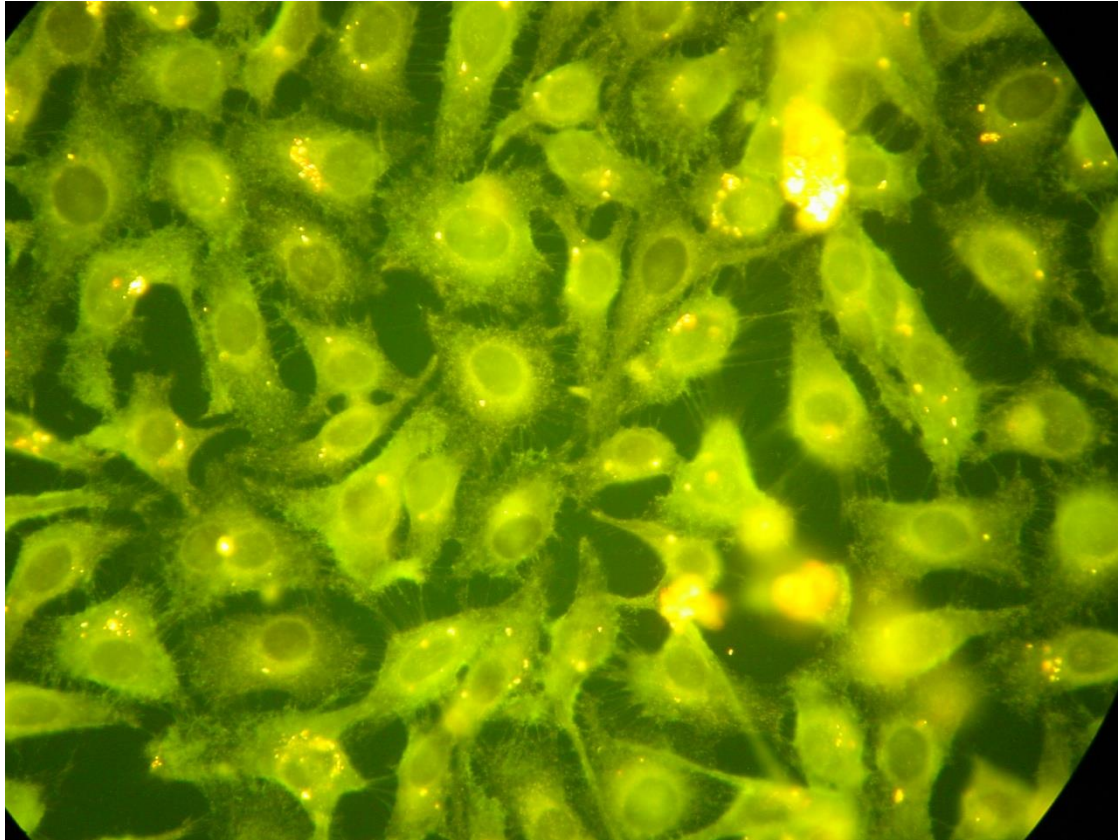


Cytotoxicity on HEK-293 cells as determined by the MTT assay. Cells were treated with NCs for 24 hours at 37 °C

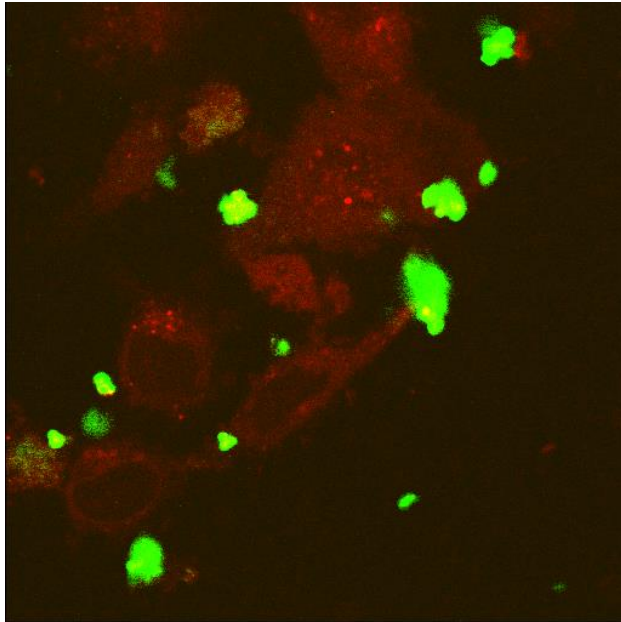


Cytotoxicity on MCF-7 cells [the drug DOX (light blue), Polymer (Blue) and DOX+Polymer (yellow)] as determined by the MTT assay. Cells were treated with NCs for 24 hours at 37 °C

Fluorescence of Hela cancer cells with Fluorescent NPs

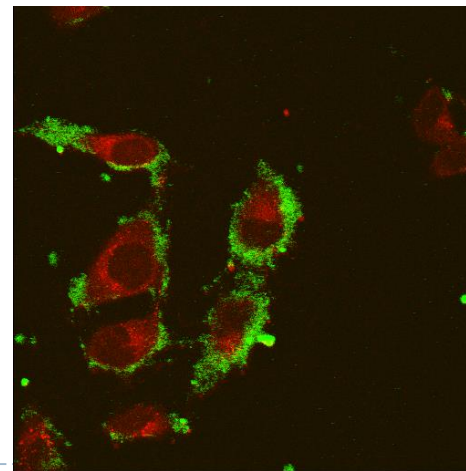
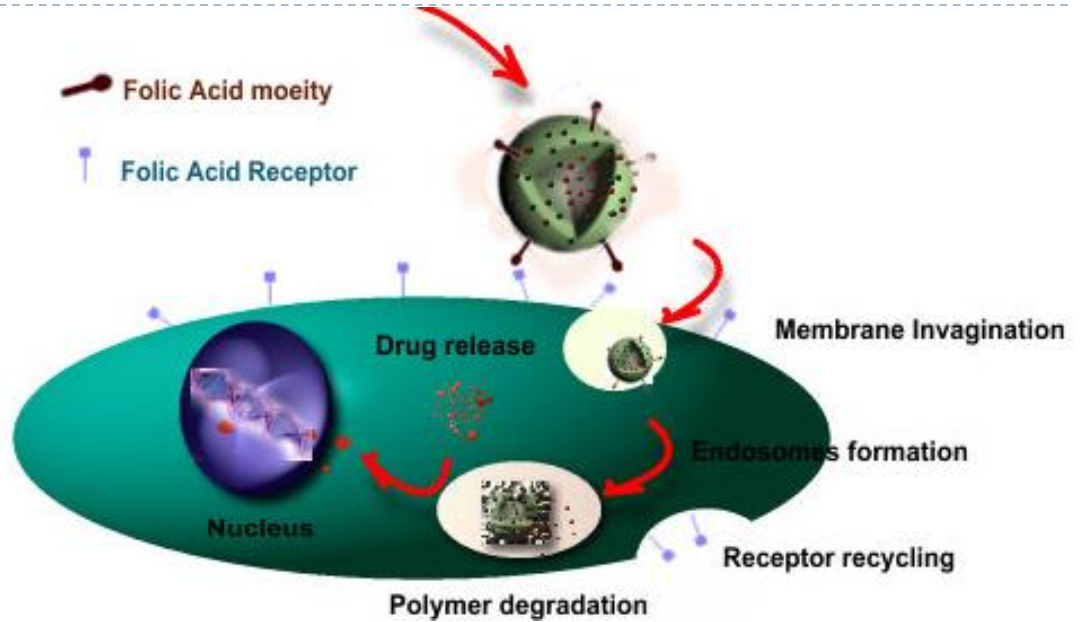


Cell studies for targeting to HeLa cells by confocal



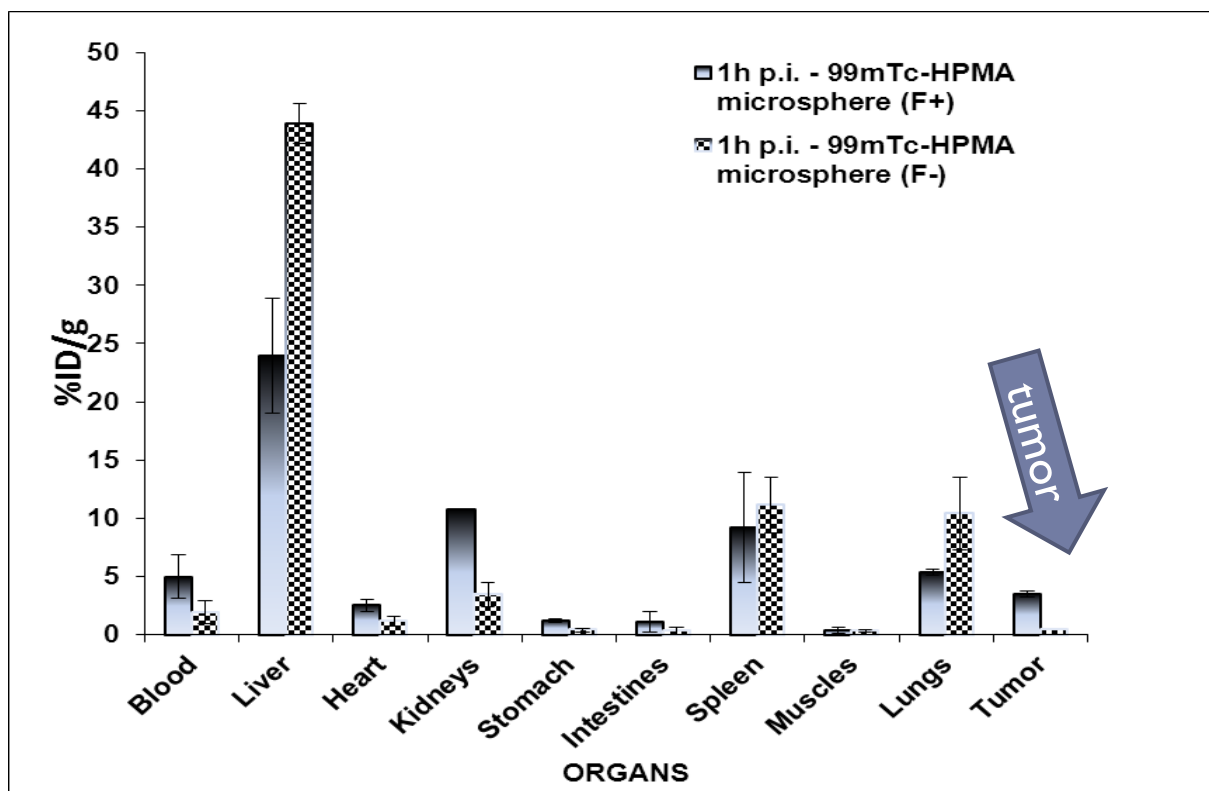
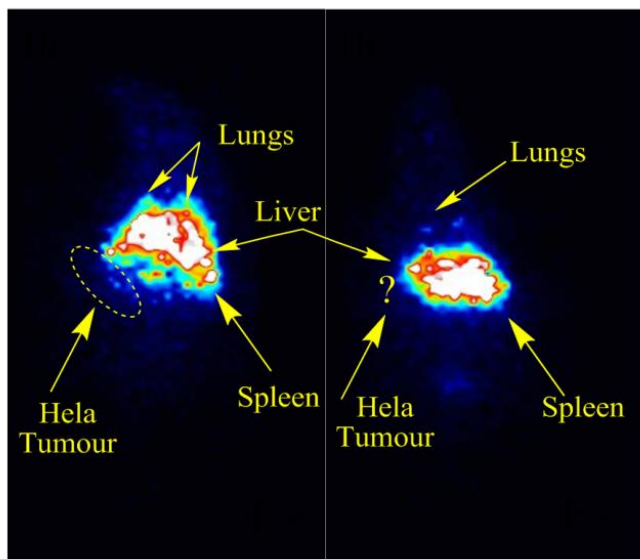
Without Folic Acid

Red : Lyso-tracker
Green: FITC-tNCs

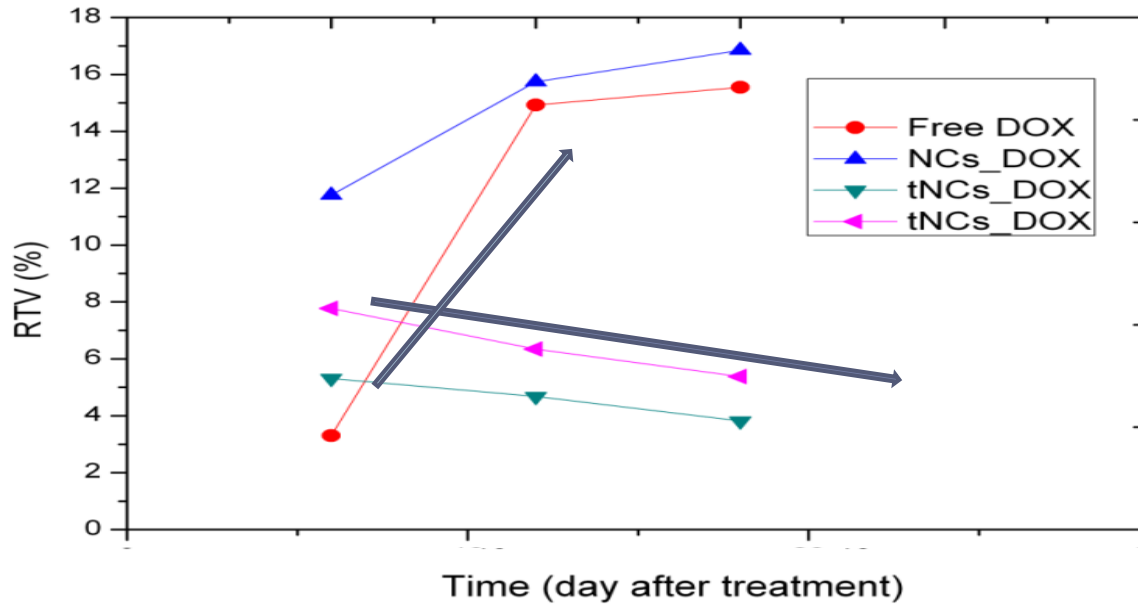


With Folic Acid

In vivo confirmation of targeting ability



Improvement of therapeutic efficacy through targeted NCs

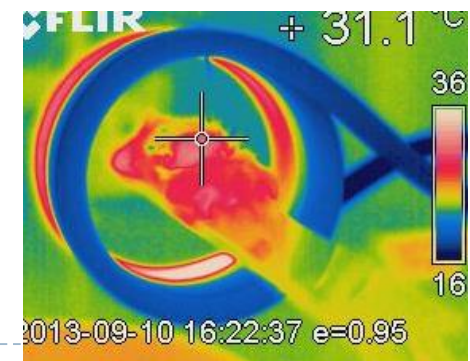


Other initial animal studies:
tNCs_DOX concentration tripled and the results are very surprising

- Toxicity is avoided
- The tumor decreases

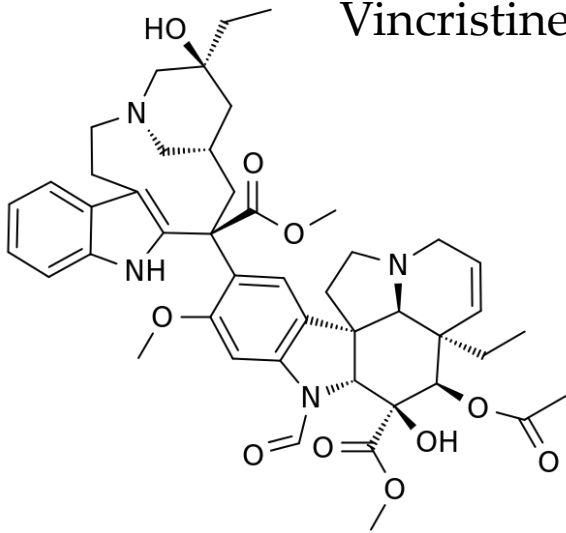
Hyperthermia as combined therapy

- SCID mice
- HeLa xenografts in one month
- I.V. Injection
- 1 hour after
- 15 min hyperthermia on tumor area



Traditional Therapies

Vincristine

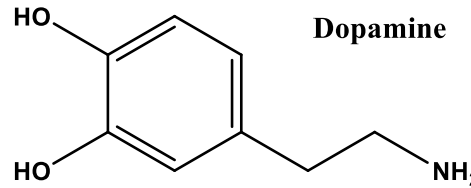


Bioavailability 30%

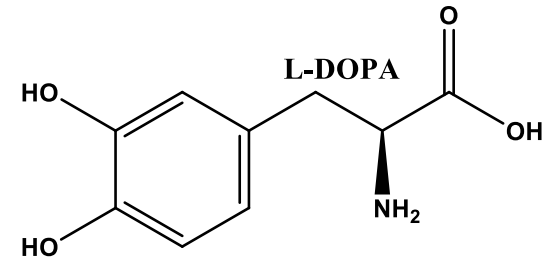
Half-life 0.75–1.5 hours

Excretion renal 70–80%

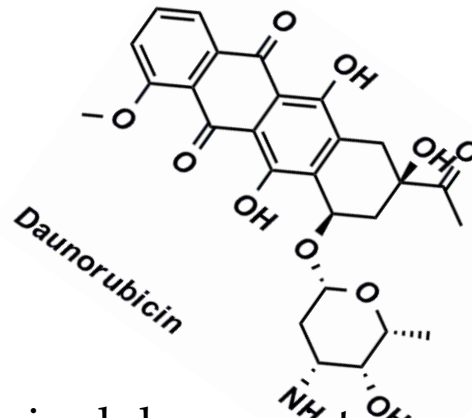
Dopamine



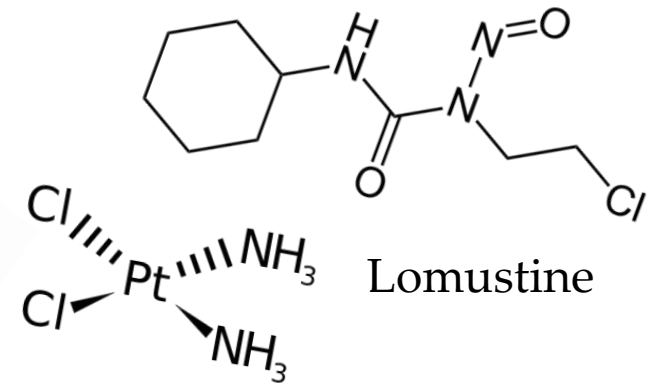
L-DOPA



L-DOPA crosses the protective BBB, whereas dopamine itself cannot



Daunorubicin



Lomustine

Cisplatin

✓ Most effective antibiotics

✓ Wide range of cancers

Side effects

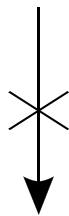
✓ Cardiotoxicity

✓ Tumors intrinsic and acquired drug resistance

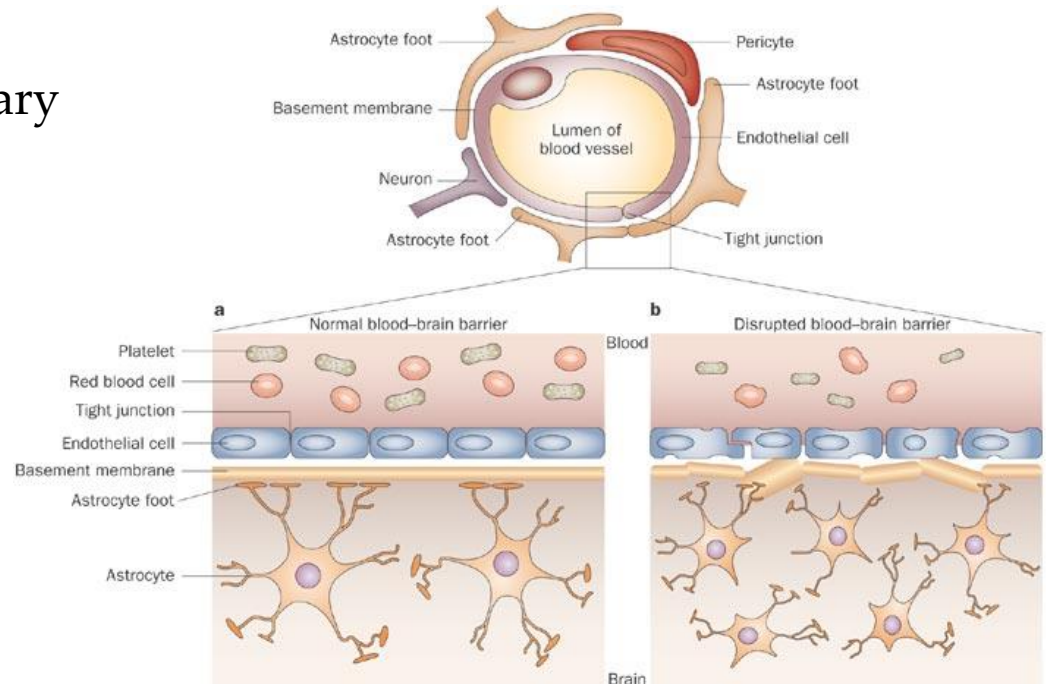
Could nanotechnology across the BBB???

The problem : impermeability of the BBB due to

- Tight junctions between capillary and endothelial cells
- Few alternate transportation pathways
- Enzymatic protection of brain
- Expresses high levels of efflux transport proteins



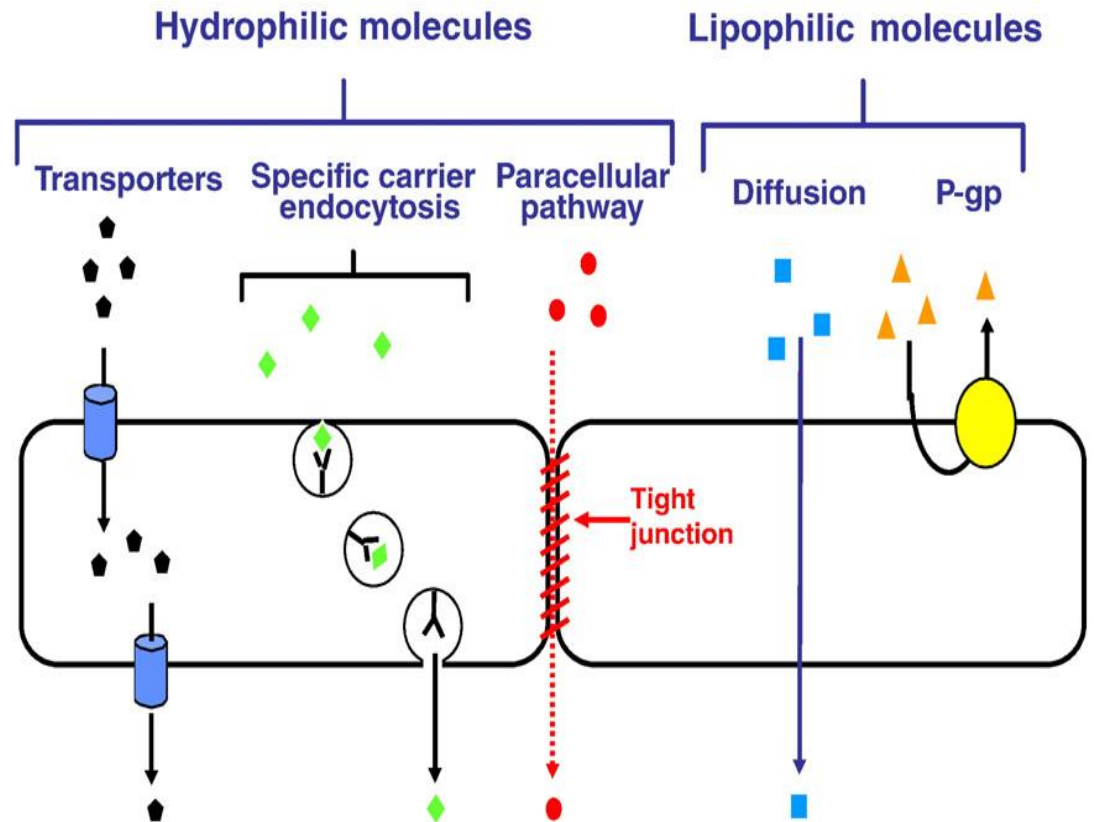
98% of small molecules and all large molecules



Ehrlich, P., 1885

What Crossing the BBB?

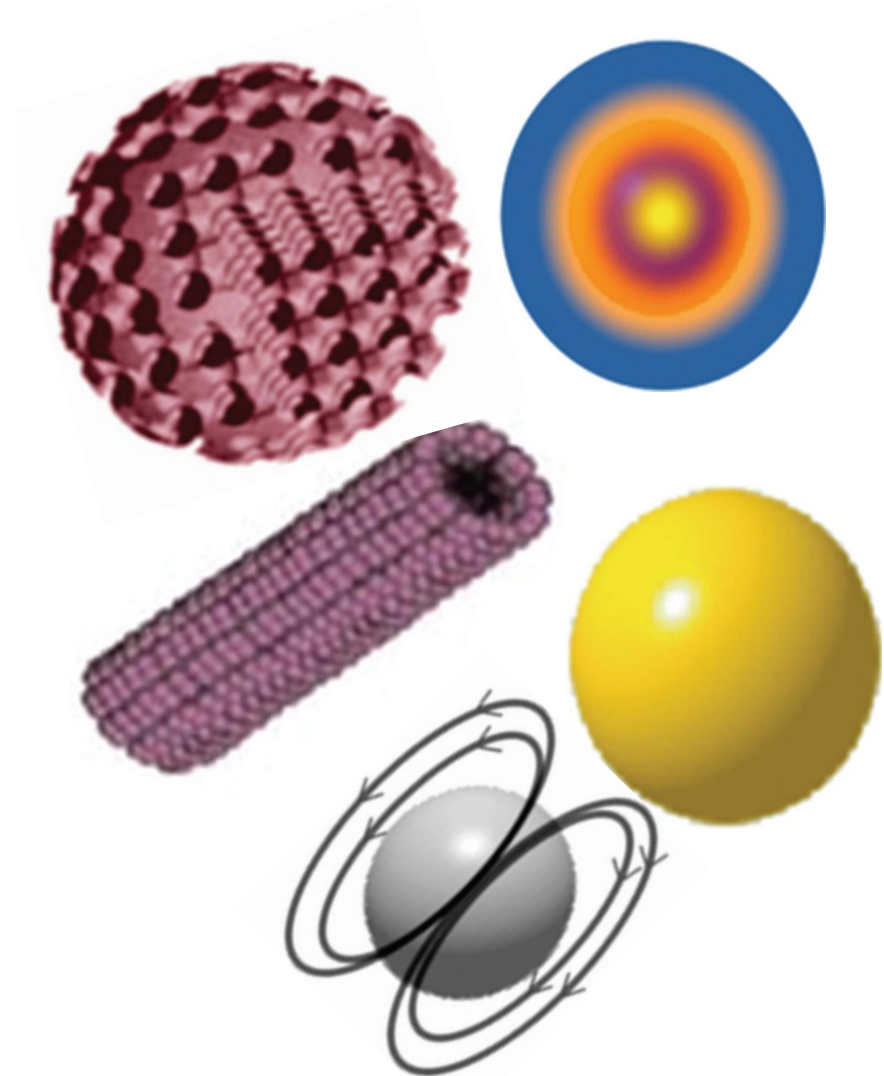
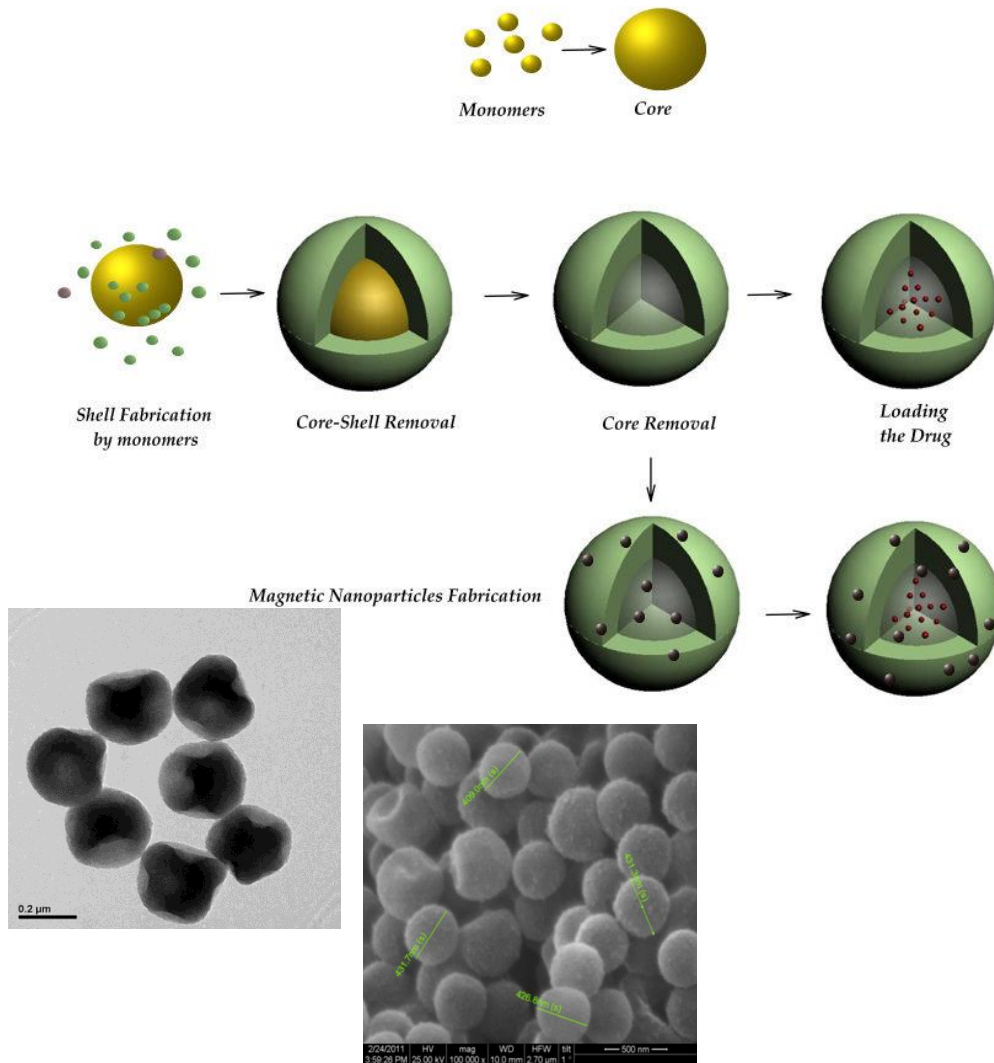
- Small hydrophilic molecules
- Larger and/or hydrophilic essential molecules
- Small lipophilic molecules (will be exposed to efflux pumps)



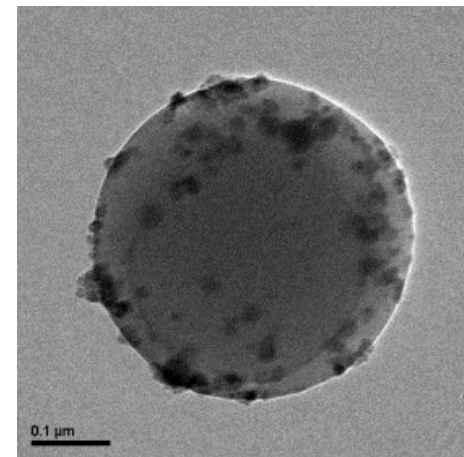
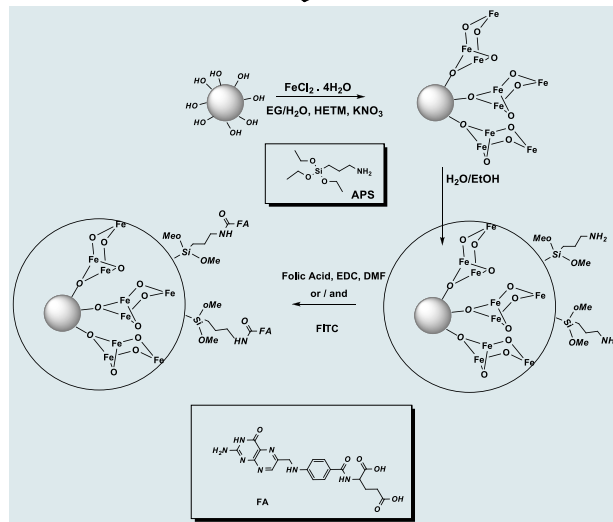
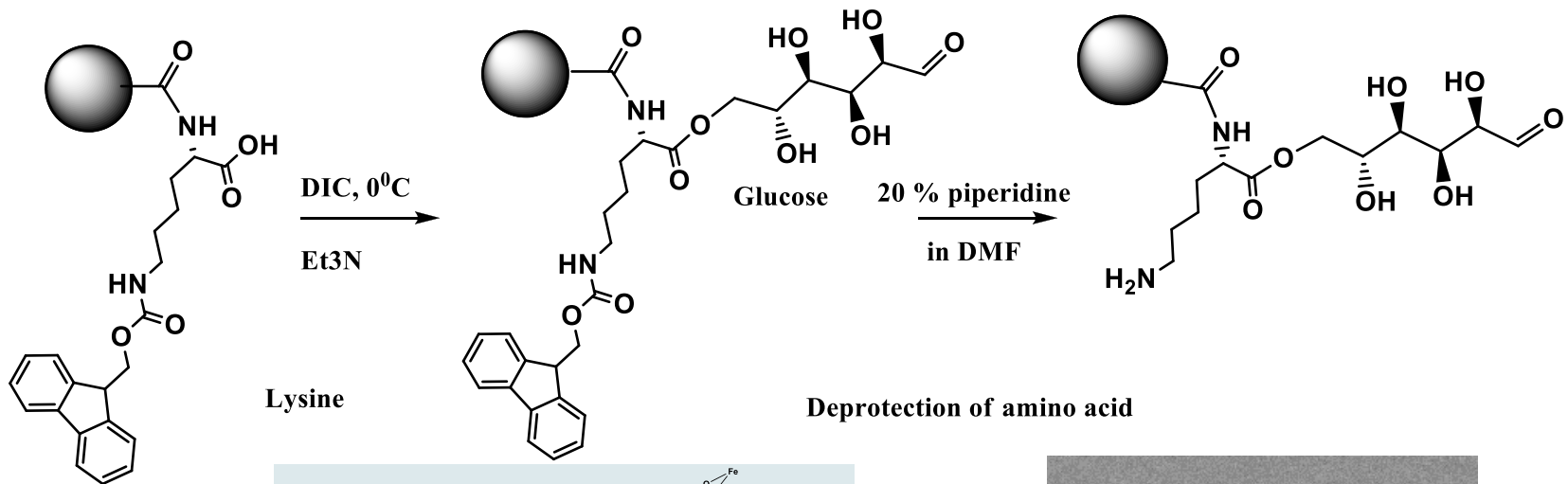
Bypass the BBB

- Invasive approaches
 - ❑ Intra-cerebro-ventricular infusion,
 - ❑ Convection-enhanced delivery
 - ❑ Polymer or microchip systems
- Pharmacological approach (e.g. alcohol, nicotine and benzodiazepine)
 - ❑ Molecular size (<500 D)
 - ❑ Lipophilicity (the more lipophilic the better the transport)
 - ❑ Charge (hydrogen bonding)
- Physiological approach
 - ❑ Transporter mediated
 - ❑ Receptor mediated (Insulin, transferrin)

Nanoparticles synthesis



Nanoparticles modification for crossing BBB



Functionalization of PNCs [= pH & Thermo & Redox targeted PNCs] through Lysine

