

**VILNIAUS UNIVERSITETAS  
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS**

**ALMA BOČKUVIENĖ**

**POLIALKILENIMINŲ, JŲ DARINIŲ IR POLIAMIDOAMINŲ  
SINTEZĖ, TYRIMAS IR PRITAIKYMAS GENŲ PERNAŠAI**

**Daktaro disertacija  
Fiziniai mokslai, chemija (03P)**

**Vilnius, 2016**

Disertacija rengta 2011 – 2015 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas – doc. dr. Aušvydas Vareikis (Vilniaus universitetas,  
fiziniai mokslai, chemija – 03P).

## TURINYS

SANTRUMPOS.....	6
ĮVADAS .....	9
1 LITERATŪROS APŽVALGA .....	14
1.1 DNR ir siRNR pernašos ypatybės.....	14
1.2 Katijoniniai polimerai – DNR ir siRNR pernašos reagentai .....	20
1.2.1 DNR bei siRNR pernašai naudojami polietileniminai ir jų dariniai .....	24
1.2.2 Bioskalūs katijoniniai polimerai DNR ir siRNR pernašai .....	34
1.3 Polimerizaciniai polialkileniminai ir jų modifikavimas PEG .....	42
1.4 Polialkileniminų sintezė polikondensacijos būdu .....	49
1.4.1 Polikondensacijos reakcijos ypatybės ir jos mechanizmas .....	49
1.4.2 Reakcijos sąlygų įtaka polikondensacijai.....	55
1.4.3 Dihalogenalkanų ir diaminoalkanų polikondensacija .....	61
1.5 Bioskalių katijoninių polimerų sintezė.....	69
1.6 Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	76
2 DARBO METODIKOS.....	78
2.1 Naudotos medžiagos ir reagentai .....	78
2.1.1 Oligomerai.....	78
2.1.2 Organinės medžiagos .....	78
2.1.3 Neorganinės medžiagos.....	80
2.1.4 Tirpikliai .....	80
2.1.5 Tirpalai .....	82
2.1.6 Naudotos eukariotinių ląstelių linijos ir auginimo terpės .....	83
2.1.7 Plazmidės .....	83
2.1.8 Eukariotinių ląstelių auginimo terpė ir jos komponentai .....	83
2.2 Polimerų sintezės ir gryninimo metodikos.....	83
2.2.1 Polialkileniminų sintezė .....	83
2.2.1.1 Poli(etileniminheksametilenimino) sintezė.....	83
2.2.1.2 Poli(2-hidroksipropilenimino) sintezė .....	84
2.2.2 Polialkileniminų darinių gavimui reikalingų junginių sintezė....	84
2.2.2.1 Cistamino sintezė .....	84

2.2.2.2 MPEGI sintezė .....	85
2.2.3 Polialikileniminų darinių sintezė.....	85
2.2.3.1 Cistamino grandžių turinčių poli(hidroksipropileniminų) sintezė.....	85
2.2.3.2 Metoksi-poli(etilenglikolio) grandinių turinčių poli(2- hidroksipropileniminų) sintezė.....	86
2.2.4 Hidroksi- ir oksigrupes turinčių poliamidoaminų sintezė.....	87
2.2.5 Polialkileniminų, jų darinių ir poliamidoaminų gryninimas ir liofilizavimas.....	87
2.3 Analizių metodikos.....	88
2.3.1 MPEGI analizė .....	88
2.3.1.1 Bendrojo jodo kiekio MPEG jodide nustatymas.....	88
2.3.1.2 Joninio (priemaišinio) jodo kiekio MPEGI nustatymas.....	88
2.3.1.3 Kovalentiškai prijungto jodo kiekio MPEG jodide nustatymas .....	89
2.3.1.4 MPEG hidroksigrupių pakeitimo jodu laipsnio nustatymas argentometrinio titravimo būdu.....	89
2.3.1.5 MPEG hidroksigrupių pakeitimo jodu laipsnio nustatymas iš <sup>1</sup> H BMR spektroskopinės analizės duomenų .....	90
2.3.2 Sieros kiekio PHPI-SS polimeruose nustatymas redukcijos- titravimo būdu.....	90
2.3.3 Išeių nustatymas .....	92
2.3.4 Molekulinių sietų chromatografija.....	92
2.3.5 Dalelių dydžio nustatymas dinaminės šviesos sklaidos metodu..	93
2.3.6 Lydymosi ir stiklėjimo temperatūrų nustatymas.....	94
2.3.7 Spektroskopinė analizė.....	94
2.3.8 Potenciometrinis titravimas ir disociacijos konstantų nustatymas .....	95
2.3.9 Reakcijos baigties laipsnio nustatymas .....	96
2.3.10 Elementinė mikroanalizė.....	97
2.3.11 Kalorimetrinio polikondensacijos kinetikos tyrimo metodika...	97
2.4 Polialkileniminų ir poliamidoaminų sudėties ir šakotumo nustatymas...	98
2.4.1 MPEG grandinių skaičiaus vienoje statistinėje PHPI-MPEG makromolekulėje apskaičiavimas .....	98
2.4.2 PHPS-SS polimerų sudėties apskaičiavimas pagal sieros kiekį...	99

2.4.3 PHPI-SS sudėties apskaičiavimas iš $^1\text{H}$ ir $^{13}\text{C}$ BMR spektroskopijos duomenų.....	100
2.4.5 Šakotumo nustatymas.....	101
2.5 Polimerų taikymas DNR/siRNR transfekcijai ir RNR grynimui .....	102
2.5.1 DNR/siRNR–polimero kompleksų sudarymas transfekcijai .....	102
2.5.2 DNR/siRNR–polimero dalelių dydžio matavimas.....	102
2.5.3 In vitro transfekcija ir jos efektyvumo nustatymas .....	103
2.5.4 DNR atpalaidavimo iš kompleksų tyrimas elektroforezės metodu .....	104
2.5.5 DNR atpalaidavimo iš kompleksų tyrimas gel-filtracijos metodu .....	104
2.5.6 Dviguba DNR transfekcija ir RNR išskyrimas .....	104
3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	106
3.1 Polialkileniminų sintezė ir tyrimas.....	106
3.1.1 Poli(etileniminheksametilenimino) sintezė ir savybės.....	106
3.1.2 Poli(2-hidroksipropilenimino) sintezė ir savybės .....	119
3.2 Modifikuotų polialkileniminų sintezė ir tyrimas.....	131
3.2.1 Disulfidinių ryšių pagrindinėje grandinėje turinčio poli(2-hidroksipropilenimino) sintezė ir savybės .....	132
3.2.2 Metoksi-poli(etilenglikolio) grandinėmis modifikuoto poli(2-hidroksipropilenimino) sintezė ir tyrimas.....	138
3.2.2.2 Metoksi-poli(etilenglikolio) grandinėmis modifikuoto poli(2-hidroksipropilenimino) savybių tyrimas .....	148
3.3 Poliamidoaminų sintezė ir savybių tyrimas .....	153
3.4 Polialkilenimino darinių ir poliamidoaminų taikymas DNR ir siRNR transfekcijai.....	162
3.4. Modifikuotų polialkileniminų taikymas DNR ir siRNR transfekcijai .....	162
3.4.2 Poliamidoaminų taikymas DNR transfekcijai.....	171
IŠVADOS .....	174
PUBLIKUOTŲ DARBŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	176
CURRICULUM VITAE.....	178
LITERATŪRA .....	179

## SANTRUMPOS

### Pagrindinių medžiagų santrumpos

APA	– aminogrupių turintys poli(met)akrilatai
AZEP	– 1-(2-aminoetil)-piperazinas
BDA	– 1,4-butandiaminas
ChI	– chitozanas
CBA	– <i>N,N'</i> -cistaminobisakrilamidas
CT	– cistaminas
DBP	– 1,3-dibrom-2-propanolis
DAP	– 1,3-diamino-2-propanolis
DBE	– 1,2-dibrometanas
DETA	– 2,2-diaminodietilaminas
DMAC	– <i>N,N</i> -dimetilacetamidas
DMEM	– Dubelko modifikuota auginimo terpė
DMF	– <i>N,N</i> -dimetilformamidas
DNR	– deoksiribonukleorūgštis
DTT	– ditioneitolis
EDA	– etilendiaminas
EDEI	– etilenditioetilenimino grandys
EDODA	– 2,2'-(etilendioksi)dietilaminas
EGFP	– sustiprinto veikimo plazmidė
EDTA	– etildiamintetraetano rūgštis
FBS	– inaktyvuotas jaučio albumino serumas
FACS	– FBS ir PBS mišinys
GFP	– plazmidė
HDA	– 1,6-heksametilendiaminas
HPI	– 2-hidroksipropilenimino grandys
IPOH	– 2-propanolis
LPEI	– linijinis polietileniminas

LPEI-MPEG	– linijinis polietileniminas turintis metoksi-poli(etilenglikolio) grandžių
MBA	– $N,N'$ - metilenbisakrilamidas
MeOH	– metanolis
MPEG	– metoksi-poli(etilenglikolis)
MPEGI	– metoksi-poli(etilenglikolio) jodidas
nt	– nukleotidas
OE	– oksietileno grandys
PC	– propilenkarbonatas
PAMAM	– poliamidoaminai
PAMAMH	– poliamidoaminai turintys hidroksigrupių
PAMAMO	– poliamidoaminai turintys oksigrupių
PBS	– fosfatinis buferis
PDMAEMA	– poli(2- $N,N$ -dimetilaminoetilmetakrilatas)
PDEAEMA	– poli(2- $N,N$ -dietilaminoetilmetakrilatas)
PEI	– polietileniminai
PEIHI	– poli(etileniminheksametileniminas)
PHPI	– poli(2-hidroksipropileniminas)
PHPI-SS	– poli(2-hidroksipropileniminas) turintis cistamino grandžių
PHPI-MPEG	– poli(2-hidroksipropileniminas) turintis metoksi-poli(etilenglikolio) grandžių
PEG	– polietilenglikolis
PEI-PEG	– polietilenimino ir polietilenglikolio kopolimeras
PLL	– poli(L-lizinas)
RNR	– ribonukleorūgštis
RPMI	– beserumė terpė
siRNR	– ( <i>small interfering RNA</i> ) – nekoduojanti RNR
ŠPEI	– šakotas polietileniminas

## Sąvokų ir metodų santrumpos

DLS	–	dinaminė šviesos sklaida
DSK	–	diferencinė skenuojamoji kalorimetrija
EMA	–	elementinė mikroanalizė
FT-IR	–	Furje infraraudonoji spektroskopija
<i>In vitro</i>	–	bandymas, atliekamas už organizmo ribų su gyvomis jo ląstelėmis
<i>In vivo</i>	–	bandymas, atliekamas gyvame organizme
MMP	–	molekulinių masių pasiskirstymo kreivės
$M_n$	–	skaitinė molekulinė masė
MSC	–	molekulinių sietų chromatografija
$M_w$	–	masinė molekulinė masė
N/P	–	azoto ir fosforo atomų santykis poliplekse
PK	–	polikondensacija
RT	–	redukcijos-titravimo metodas
RT-PCR	–	genų ekspresijos lygmenys
$S_N1$	–	bimolekulinė nukleofilinio pakeitimo reakcija
$S_N2$	–	monomolekulinė nukleofilinio pakeitimo reakcija
$X_{Br-}$	–	bromo anijonų kiekis
$X_{OH}$	–	MPEG hidroksigrupių pakeitimo jodu laipsnis
XPS	–	rentgeno fotoelektroninė spektroskopija
VFI	–	vidutinis fluorescencijos efektyvumas
$\eta$	–	išeiga



## ĮVADAS

Genų terapija tai sąlyginai nauja sritis, kurioje vis plačiau pritaikomi natūralūs ir sintetiniai polimerai. Tai perspektyvus XXI-ojo amžiaus metodas gydyti genetines ligas, vėžį ar AIDS. Klinikinėje praktikoje genetinei informacijai į ląstelę įterpti naudojami virusiniai ir nevirusiniai vektoriai. Virusiniai vektoriai dažnai sukelia uždegimus, todėl vis daugiau kreipiamas dėmesys į nevirusinius cheminius vektorius – natūralius ar sintetinius katijoninius polimerus. Daugelis mokslininkų nustatė, kad kai kurie katijoniniai polimerai genetinę informaciją gali įterpti itin efektyviai.

Tarp pasaulyje naudojamų katijoninių polimerinių vektorių geromis transfekuojančiomis savybėmis pasižymi alkilinti amino(alkil)metakrilatai, chitozanas ir jo dariniai, polilizinas, poliamidoaminai bei polietileniminai ir jų dariniai. Tarp jų polietileniminai ir poliamidoaminai yra vieni iš efektyviausių. Poliamidoaminai ir polietileniminai ląstelėms yra šiek tiek toksiški. Polietileniminas sunkiai suyra ląstelės viduje, yra linkęs agreguotis. Todėl šiems junginiams, nors jie ir labai efektyviai transfekuoja, ieškoma alternatyvų – polimerų, kurie būtų mažiau toksiški ir ląstelėse lengviau suirtų.

Idealus polimerinis vektorius turi atitikti tam tikrus reikalavimus: tinkama polimero molekulinė masė, makromolekulių krūvio tankis, polimero biosuderinamumas bei bioskalumas. Dalis šių reikalavimų betarpiškai susiję, pavyzdžiui, krūvio tankis su biosuderinamumu ar biosuderinamumas su bioskalumu. Bioskalumas priklauso nuo to, ar polimerinio vektoriaus pagrindinėje grandinėje yra bioskalių (biosuardomų) ryšių, tokių kaip esterinis, amidinis, peptidinis ar disulfidinis. Didinant vektoriaus hidrofiliškumą, jo biosuderinamumas dažnai padidėja, todėl genų pernašos vektoriai, turintys hidrofiliinių hidroksi - ar oksigrupių yra itin perspektyvūs.

Publikacijų apie genus pernešančias medžiagas bei jų panaudojimą transfekcijai yra be galo daug, ir kiekvienais metais jų prieaugis vis nemažėja. Tą lemia visa eilė neišspręstų problemų, su kuriomis susiduria šiose srityse dirbantys mokslininkai: siekiama kurti visiškai naujus ir žymiai efektyvesnius

vektorius, įvaldyti jau žinomų ar naujų polimerinių vektorių sintezės būdus, optimizuoti vektoriaus sandarą taip, kad jis būtų ne tik efektyvus transfekcijoje, bet ir mažiau toksiškas, labiau savitas vienai ar kitai ląstelių rūšiai, labiau tiktų norimų genų ar genų slopiklių pernašai. Tad idealaus vektoriaus sintezė vis dar lieka dideliu iššūkiu polimerų chemijos moksle.

## **DARBO AKTUALUMAS**

Pastaraisiais metais genų terapijoje daugybė katijoninių polimerų: polietileniminas, poli(L-lizinas), poliamidoesteriai, polidisulfidoaminas, poli(2-dimetilaminoetilmetakrilatas) bei šakoti ir linijiniai poliamidoaminai intensyviai tyrinėjami DNR ir siRNR pernašai. Šių cheminių vektorių trūkumas – mažas transfekcijos efektyvumas, didelis toksiškumas, todėl skiriamos didelės pastangos polimeriniams vektoriams tobulinti.

Transfekcijos efektyvumą ir toksiškumą lemia ne tik katijoninio polimero molekulinė masė, struktūra ir katijoninės savybės, bet ir sudaromo polimero-DNR/siRNR komplekso savybės pernašos metu. Transfekcijos efektyvumui padidinti reikalinga optimali polimero molekulinė masė bei tinkama struktūra. Manoma, kad tinkamiausios linijinės, šakotos ir dendritinės polimerų makromolekulės, kurių molekulinė masė – 5-25 kDa. Polimere turi būti tinkamas katijoninių grupių kiekis, kad galėtų sudaryti polimero-DNR/siRNR kompleksą, kuris efektyviai būtų pernešamas ląstelėje bei nesukeltų toksiškumo. Tačiau šių grupių turi būti ne pernelyg daug, nes stipriomis katijoninėmis savybėmis pasižyminčios medžiagos labai pažeidžia ar net visai suardo ląstelių sienes, o taikomos *in vivo* stipriai sąveikauja su neigiamą krūvį turinčiais kraujo plazmos albuminiais ir raudonaisiais kūneliais, taip sukeldamos ūmų viso organizmo toksinį šoką.

Polimerinių vektorių tobulinimas – vienas iš svarbiausių uždavinių, siekiant kuo efektyviau juos pritaikyti genų pernašai. Parenkant tinkamas pradines medžiagas, sintezės sąlygas bei metodus, siekiama gauti norimų parametrų katijoninį polimerą, skirtą genų pernašai.

## DARBO NAUJUMAS IR REIKŠMĖ

Keičiant sintezės sąlygas, pirmą kartą polikondensacijos būdu susintetinti didelės molekulinės masės poli(etileniminheksametileniminai) ir poli(2-hidroksipropileniminai), turintys pirminių, antrinių ir tretinių aminogrupių. Atrinktos optimalios šių polialkileniminų sintezės sąlygos bei įvertintos produktų savybės.

Pirmą kartą išsamiai ištirta diaminoalkanų ir dibromalkanų polikondensacija, naudojant izoterminę reakcijų kalorimetrą.

Pirmą kartą polikondensacijos būdu susintetinti modifikuoti poli(2-hidroksipropileniminai) su šoninėmis metoksi-poli(etilenglikolio) grandinėmis, o taip pat ir su disulfidiniais ryšiais pagrindinėje grandinėje.

Pirmą kartą susintetinti hidrofiliniai poliamidoaminai iš hidroksi- ir oksigrupių turinčių diaminų ir  $N,N'$ -metilenbisakrilamido. Atrinktos optimalios tokių poliamidoaminų sintezės sąlygos, gaunant transfekcijai tinkamos molekulinės masės ir savybių polimerus.

Nustatyta naujai susintetintų polimerų geba transfekuoti DNR/siRNR bei šių polimerų toksiškumas ir bioskalumas.

## **Darbo tikslas**

Susintetinti naujus polialkileniminų ir poliamidoaminų darinius – DNR ar siRNR pernašai tinkamus katijoninius polimerus, kurie būtų mažai toksiški ląstelėms ir bioskalūs ląstelių citoplazmoje.

Šiam tikslui pasiekti buvo išsikelti uždaviniai:

1. Susintetinti poli(etileniminheksametileniminą), poli(2-hidroksipropileniminą) ir jo darinius turinčius disulfidinių ryšių ir metoksi-poli(etilenglikolio) grandinių.
2. Susintetinti oksid- ir hidroksigrupių turinčius poliamidoaminus.
3. Nustatyti polikondensacijos ir poliadicijos reakcijos sąlygų įtaką sintetinamų polialkileniminų, jų darinių ir poliamidoaminų išeigai, molekuliniam rodikliams, šakotumui bei katijoninėms savybėms.
4. Nustatyti polikondensacijos reakcijos greitį, reakcijos baigties laipsnį įvairiuose poliniuose protoniniuose ir aprotoniniuose tirpikliuose.
5. Įvertinti naujai susintetintų katijoninių polimerų tinkamumą DNR/siRNR transfekcijai, pakartotinei transfekcijai, o taip pat ir toksiškumą ląstelėms.
6. Nustatyti disulfidinių ryšių turinčių poli(2-hidroksipropileniminų) ir hidroksigrupių turinčių poliamidoaminų bioskalumą.

## Ginamieji teiginiai

- Poliniai aprotoniniai tirpikliai yra tinkamiausi 1,2-dibrometano ir 1,6-heksametilendiamino bei 1,3-dibrom-2-propanolio ir 1,3-diamino-2-propanolio polikondensacijai vykdyti.
- Polikondensacijos būdu gautų polialkileniminų šakotumo laipsnis priklauso nuo diamino monomero baziškumo, atstumo tarp aminogrupių ir reakcijos tirpiklio savybių.
- Pagrindinėje grandinėje disulfidinių ryšių turintys poli(2-hidroksipropileniminai) gaunami vykdant 1,3-dibrom-2-propanolio polikondensaciją su cistaminu, arba su cistamino ir 1,3-diamino-2-propanolio mišiniu.
- Pagrindinėje grandinėje disulfidinių ryšių turintys poli(2-hidroksipropileniminai) yra bioskalūs. Jie mažiau toksiški ląstelėms nei poli(2-hidroksipropileniminas) ir gali būti panaudoti pakartotinei transfekcijai.
- Metoksi-poli(etilenglikolio) grandinių turintys poli(2-hidroksipropileniminai) gaunami vykdant 1,3-dibrom-2-propanolio, 1,3-diamino-2-propanolio ir metoksi-poli(etilenglikolio) jodidų polikondensaciją. Tokie didelės molekulinės masės dariniai tinkami siRNR transfekcijai.
- Iš 1,3-diamino-2-propanolio ir  $N,N'$ -metilenbisakrilamido gauti poliamidoaminai yra bioskalūs.

# 1 LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 DNR ir siRNR pernašos ypatybės

Pirmas sėkmingas genų inžinerijos eksperimentas buvo atliktas P. Berg laboratorijoje (JAV) ir apie tai paskelbta 1972 m. Nuo to laiko genų inžinerija tapo reikšmingu praktiniu instrumentu, keičiant įvairių organizmų (ląstelių, augalų, gyvūnų) genomus pagal žemės ūkio, maisto pramonės, medicinos, farmacijos ar kitų veiklos sričių poreikius [1]. Šiuolaikiniame pasaulyje bene svarbiausias perversmas įvyko XX amžiaus pradžioje, kai medicinoje buvo pradėta taikyti genų terapija. Genų terapija – ligų gydymas, pagrįstas ląstelių genetinės informacijos keitimu. Dažniausiai ši informacija keičiama įterpiant į savitą ląstelę svetimą genetinę informaciją saugojančią medžiagą – deoksiribonukleorūgštį (DNR) [2]. Pagrindinis genų terapijos tikslas – išgydyti genetinius sutrikimus [3], neurodegeneracines ligas [4] ar vėžinius susirgimus [5]. Pernašos sėkmė priklauso nuo genų pernašos technologijos, todėl labai svarbu parinkti tinkamas ir geromis savybėmis pasižyminčias genų pernašos sistemas. Šios sistemos vadinamos *transfekcijos agentais*, *genų transfektoriais*, *genų pernašos vektoriais* arba *genų nešikliais*. Yra du principiniai genų terapijos būdai – *in vitro* (kai genai įterpiami už gyvo organizmo ribų, ląstelių kultūroje) ir *in vivo* (kai genai įterpiami į gyvo organizmo ląsteles) [2]. Pastaruoju metu *in vivo* metodai genų terapijoje yra aktualiausi.

Genų transfekcijai naudojami genų pernašos vektoriai skirstomi į virusinius ir nevirusinius. Virusiniai vektoriai genų pernašos metu patekę į ląsteles priverčia jas „dirbti“ savo naudai. Kad virusas būtų tinkamas genų terapijai, iš jo būtina pašalinti viruso replikaciją sąlygojančius komponentus ir įterpti norimus rekombinantinius genus. Taip gaunami „genetiniai vaistai“. Jie dažniausiai kuriami iš retrovirusų (jų genomus sudarytas iš ribonukleorūgščių (RNR)) ir adenovirusų (jų genomus sudarytas iš deoksiribonukleorūgščių). Retrovirusai geba įsiskverbti į genomą skirtingose DNR/RNR vietose bei skatina antikūnų gamybą organizme. Retrovirusiniai vaistai turi privalumų, nes

jie ne tik skatina antikūnų gamybą organizme, bet geba infekuoti tik besidalijančias ląsteles. Tokiu būdu šį virusą galima priversti įterpti „genus savižudžius“, kurie iniciuos tik besidalijančių „sergančių“ ląstelių mirtį. Adenovirusai daugiausiai naudojami nesidalijančių ląstelių (raumenų ar nervų) terapijoje, tačiau jie greitai pašalinami iš infekuotų ląstelių, ir tai yra pagrindinis adenovirusų taikymo genų terapijoje trūkumas. Nepaisant to, kad virusiniai vektoriai pasižymi itin dideliu transfekcijos efektyvumu, jie turi visą eilę trūkumų: gamyba sudėtinga ir brangi, pasižymi dideliu imunogeniškumu, virusų matmenys nedideli, todėl į juos galima patalpinti tik nedidelį genetinės informacijos kiekį [6, 7]. Dėl šių priežasčių nuolat ieškoma naujų alternatyvų virusiniams genų pernašos vektoriams. Viena iš tokių alternatyvų – nevirusiniai vektoriai.

Nevirusiniai vektoriai – tai katijoniniai lipidai ir katijoniniai polimerai, gerai kompleksuojantys DNR [8]. Katijoninius lipidus sudaro trys pagrindinės dalys: katijoninė hidrofilinė „galva“, hidrofobinė „uodega“ ir juos jungiantis intarpas. Katijoniniai lipidai lengvai gaunami, sintetinami ar modifikuojami, bet jie tik dalinai tirpūs vandenyje, tinka tik nedaugeliui ląstelių bei sudaro labai didelius kompleksus su DNR. Be to, šie kompleksai (vadinami lipopleksais) pasižymi gana dideliu toksiškumu [9].

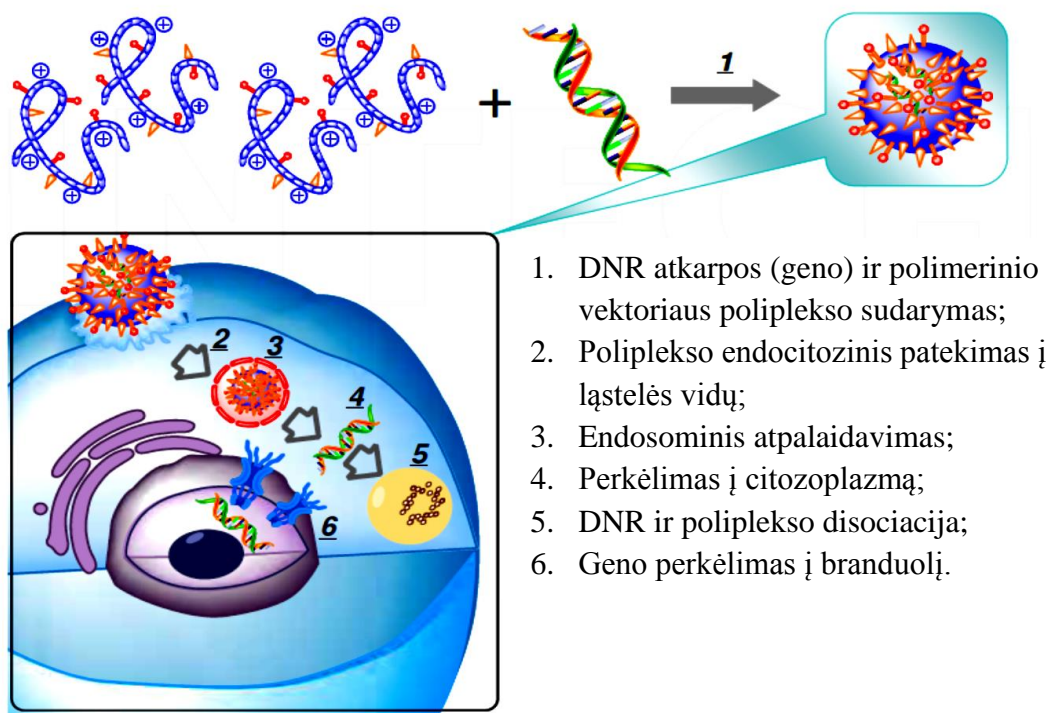
Katijoniniai polimerai pranašesni už lipidus, nes savo struktūroje neturi ilgų hidrofobinių grandinių, todėl pilnai ištirpsta vandenyje, o su DNR sudaro nedidelių matmenų kompleksus (jie vadinami poliopleksais) [10]. Katijoniniai polimerai sudaro didžiąją dalį genų pernašos sistemų, todėl šiai polimerų klasei literatūros apžvalgoje bus skirtas ypatingas dėmesys.

Norint sėkmingai atlikti genų pernašą, katijoniniai polimerai turi atitikti tam tikrus reikalavimus bei pasižymėti tinkamomis savybėmis:

- Turėti tinkamą molekulinę masę. Priklausomai nuo ląstelės savitumo, polimerinių vektorių molekulinė masė gali būti įvairi – nuo 5 kDa iki 150 kDa;
- Turėti tinkamą makromolekulių architektūrą (linijinę, šakotą ar dendrimerinę);

- Pasižymėti atitinkamu hidrofiliškumu/lipofiliškumu;
- Turėti pakankamą kiekį katijoninių grupių. Šios grupės turi gebėti gerai jonizuotis ląstelės citoplazmoje;
- Nepasižymėti imunogeniškumu bei toksiškumu ląstelėms ar organizmui;
- Gebėti biodegraduoti;
- Būti saviti ląstelėms [11-14].

Šiuos reikalavimus atitinkantys katijoniniai polimerai su DNR sudaro stabilius iki kelių šimtų nanometrų dydžio polipleksus, kurie tiesiogiai sąveikauja su ląstelėmis ir įveikia visą genų pernašos kelią. Visas genų pernašos mechanizmas susideda iš 6 etapų (1.1 pav.), ir kiekviename iš jų yra tam tikros kliūtys, kurias reikia įveikti, kad prasidėtų pernešamo geno transkripcija (genetinės informacijos nuskaitymas) ir translacija (savito baltymo sintezė). Todėl labai svarbu suprasti genų pernašos etapus, norint parinkti gerą katijoninį polimerą-vektorių.



1. DNR atkarpos (geno) ir polimerinio vektoriaus polipleksu sudarymas;
2. Polipleksu endocitozinis patekimas į ląstelės vidų;
3. Endosominis atpalaidavimas;
4. Perkėlimas į citoplazmą;
5. DNR ir polipleksu disociacija;
6. Geno perkėlimas į branduolį.

1.1 pav. Genų pernašos schema ir etapai [15].



Pirmasis genų pernašos etapas prasideda, kai katijoninis polimeras su genu kondensuojasi į kompaktišką nanodalelę (20-200 nm). Nanodalelių dydį lemia tiek paties polimero molekulinė masė bei architektūra, tiek ir polikatijono aminogrupių santykis su DNR fosfatinėmis grupėmis (N/P). Susidaręs polipleksas turi įveikti ląstelės membraną endocitozės būdu. Kadangi ląstelės membraną sudaro neigiamai įkrauti proteoglikanai (glikoproteinų šeimos baltymai, kuriuose prie baltymų prijungti glikozaminoglikanai), tai teigiamą krūvį turintis polipleksas sąveikauja su jais, taip membrana įsigaubia ir palaipsniui užsidaro, o susidariusi endosoma lieka citoplazmoje. Polipleksas į ląstelę patenka apgaubtas ląstelės plazmine membrana: tokia pūslelė vadinama endosoma.

Endosominis atpalaidavimas (polipleksų išlaisvinimas iš endosomų) vyksta endosomoms susiliejam su daug hidrolizinių fermentų turinčiomis lizosomomis (organelėmis, kuriose skaidomi organiniai junginiai). Protonams iš rūgštinės lizosomų aplinkos migravus į endosomą, ji dėl padidėjusio osmosinio slėgio suyra (įvyksta endosomų osmolizė). Toks polimero protonizavimosi endosomose reiškinys yra vadinamas „protonų kempinės“ efektu. Endosomoms suirus, tų pačių hidrolizinių fermentų pagalba polipleksas suardomas ir genas išlaisvinamas. Išlaisvintas genas migruoja į branduolį, kuriame vyksta genetinės informacijos nuskaitymas (transkripcija) ir savito baltymo sintezė (transliacija), vykstanti citoplazmoje. Genų pernašos rezultatai lemia jau minėtos polimerinio vektoriaus savybės. Genų pernaša įvertinama transfekcijos efektyvumu (tai – dalis ląstelių, kuriose vyksta transfekuoto geno transliacija) bei toksiškumu (tai – dalis ląstelių, kurios po transfekcijos neišgyvena) [15-17].

Pastaruoju metu vienas iš veiksmingiausių instrumentų genų terapijoje – specifinių (mažųjų) ribonukleorūgščių (RNR) pritaikymas genų pernašai. RNR svetimoms genetinės informacijos ląstelei nesuteikia, bet reguliuoja pačios ląstelės veiklą. Toks reguliavimas dažniausiai reikalingas norint nuslopinti nepageidaujamų genų transliaciją [18]. Kodėl RNR genų veiklos reguliavime yra tokios svarbios? Tai paaiškėja detaliau paanalizavus ląstelėje vykstančius

transkripcijos ir translacijos procesus. Kiekvienos ląstelės branduolyje nuo DNR matricos vyksta RNR sintezė – *transkripcija*. Gaunama RNR molekulė, kurios seka identiška vienos iš DNR grandinių fragmentui. DNR grandinė, kurios seka tiesiogiai atsikartoja RNR molekulėje, vadinama koduojančia (prasmine). Kita DNR grandinė yra komplementari RNR – vadinama matricine, nekoduojančia (priešprasmė) ir naudojama kaip matrica RNR sintezei. RNR pavidalu užkoduota genetinė informacija iš branduolio patenka į citoplazmą, kur vyksta baltymų sintezė (*transliacija*) į tai ląstelei būdingą aminorūgščių seką baltymų molekulėse. Išskiriami keli pagrindiniai RNR tipai: baltymus koduojanti – informacinė RNR (iRNR), kurios funkcija yra matricos baltymų biosintezė ribosomose; baltymų nekoduojanti – ribosominė RNR (rRNR), kuri atsakinga už struktūrinius ir funkcinius ribosomų komponentus; transportinė RNR (tRNR) – baltymų biosintezės tarpininkai bei labai svarbios mažosios RNR, dalyvaujančios genų raiškos valdyme – mažos branduolio snRNR (angl. *small nuclear RNR*), siRNR (angl. *small interfering RNR*), rasiRNR (angl. *repeat associated small interfering RNR*), ncRNR (angl. *non-coding RNR*)) [18]. Taigi, kaip matyti, kad RNR yra svarbios genetinės informacijos perdavime.

Pirmieji savitų (mažųjų) RNR panaudojimo genų raiškos valdyme darbai buvo pradėti dar prieš 25 metus, tyrinėjant transgeninius (modifikuotus organizmus į kuriuos perkeltas svetimasis genas) augalus. Tada buvo pastebėtas netikėtas reiškinys, pasireiškęs tuo, kad į augalą įvestas svetimasis genas nuslopina savo homologą augalo genome. Šis reiškinys buvo pavadintas genų ko-supresija arba priešprasmė (angl. *antisens*) RNR technologija [19]. 1990 metais mokslininkai A. Fire ir C. Mello, dirbdami su kirmėlėmis *Caenorhabditis elegans*, naudojo šią technologiją, bandant nuslopinti *par1* geno raišką. Vykdamas eksperimentą buvo tikimasi, kad priešprasmė RNR turėtų susirišti su (iRNR) ir slopinti translaciją, tačiau eksperimente geno slopinimo tikrąją priežastimi buvo transkripcijos metu susidariusios dvigrandės RNR (dsRNR) atsiradimas. Būtent dėl dsRNR atsiradimo buvo nuslopintas jai komplementarus genas. Toks reiškinys buvo pavadintas *RNR interferencija*

(RNRi). RNR interferencija yra labai savita ir slopina tik tą geną, kuriam dsRNR yra pilnai komplementari. Genų raiškos slopinimas dvigrande RNR yra labai efektyvus, nes slopinimas vyksta dažniausiai po-transkripciniame lygyje ir susijęs su specifinės iRNR suirimu [20].

*In vitro* tyrimuose [21], naudojant 500 nukleotidų (nt) dydžio dvigrandę RNR, ji fragmentuojama į 21-23 nt dydžio fragmentus. Šie RNR fragmentai buvo pavadinti siRNR (angl. *short interfering* arba *silencing RNA*). RNR fragmentavimą atlieka III ribonukleazių šeimos fermentai, sudarantys fosfodiesterinį ryšį tarp vieno nukleozido ribozės 3' fosfato grupės ir kito nukleozido ribozės 5' hidroksigrupės. Tokios nukleazės buvo pavadintos *Dicer*. Tolesni tyrinėjimai parodė [22], kad siRNR įeina į baltyminio komplekso sudėtį, kuris ir suardo komplementarią iRNR. Baltyminis kompleksas, kuriame aptinkama siRNR, buvo išgrynintas ir pavadintas RISC (angl. *RNA induced silencing complex*). Buvo sukurtas RISC veikimo ir RNR slopinimo (iRNR) modelis: dsRNR, patekusią į ląstelę eksperimentiškai arba susintetintą ląstelėje, atpažįsta *Dicer* nukleazės ir skaldo į 21-23 nt dvigrandžius fragmentus (t. y., į siRNR); susiformavusi maža dvigrandė siRNR per tarpinius kompleksus (RLC – *RNR loading complex*) įjunginama į RISC kompleksus; susiformavę RISC kompleksai siRNR pagalba ieško taikinio – komplementarios iRNR, o, suradę ją, – suskaldo. Taip siRNR slopina geno-taikinio raišką (angl. *knockdown*) ir baltymo sintezę.

siRNR ir DNR transfekcijos mechanizmai turi daug panašumų [23], nes abi nukleorūgštys yra dvigubos spiralės formos, kurių sudėtyje yra neigiamą krūvį turinčių fosfodiesterinių ryšių. Dėl šio krūvio DNR/siRNR geba elektrostatiškai sąveikauti su katijoniniais polimerais, todėl siRNR transfekcijai galima naudoti DNR pernašai tinkamus vektorius. Tačiau DNR ir siRNR skiriasi molekuline masė: pirmu atveju – ~1600 kDa, o antru – ~3-13 kDa. Ne visi polimerai, kurie tinka DNR transfekcijai, yra tinkami ir siRNR. Daugelis autorių pabrėžia [24-26], kad labiausiai siRNR transfekcijai tinka nedidelės molekulinės masės ir specialiai tam tikslui modifikuoti polietileniminai. Modifikuojama, įvedant polietilenglikolio fragmentus, disulfidines ar amidines

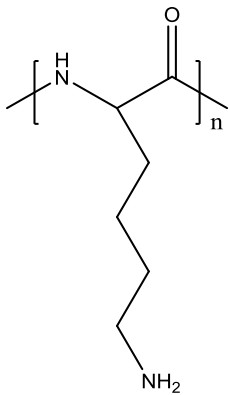
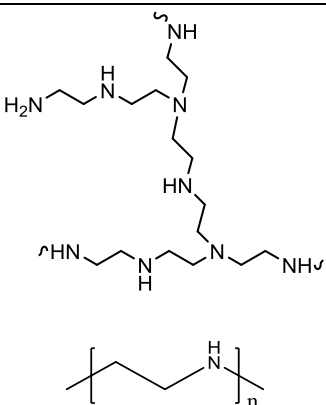
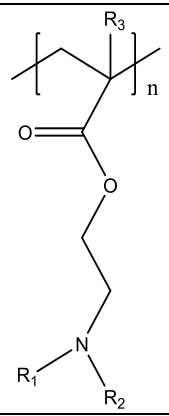
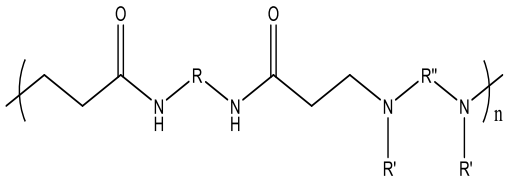
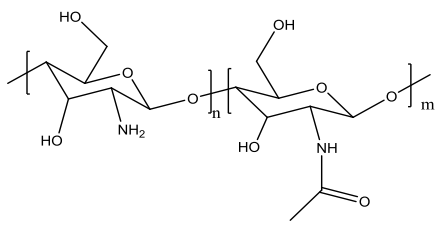
grupės. Be to, šiek tiek skiriasi DNR ir siRNR transfekcijos mechanizmai [27-29]: DNR transfekcijos galutinis tikslas – branduolys, o siRNR – citoplazma. Didžiausia problema, su kuria susiduriama transfekuojant siRNR, – tai, kad citoplazmoje siRNR labai lengvai ir greitai suskaldo nukleazės. Todėl polimerinis vektorius turi užtikrinti ne tik saugią siRNR pernašą, bet ir efektyviai ją apsaugoti citoplazmoje. Jeigu ląstelėje nėra taikinio, siRNR lieka visiškai inertiška ir nepasižymi jokiais šalutiniais, nespecifiniais efektais organizmui ar ląstelei. O tai yra neabejotinas pranašumas, lyginant genų terapiją su įprastinėmis farmakologinėmis priemonėmis.

Akivaizdu, kad genetinių ligų gydymas reikalauja naujų priemonių, nes tradiciniai būdai neduoda reikiamų rezultatų. Pasiekimai, atskleidę įvairiausių ligų molekulinis-genetinius mechanizmus ir jų korekcijos būdus, bei intensyvūs transfekcijos agentų ir transfekcijos mechanizmų tyrimai, leidžia tikėtis, kad genų terapija bus svarbi XXI-ojo amžiaus medicinos dalis, padėsianti įveikti pastaruoju metu sunkiai gydomas ar net visai neišgydomas genetinio pobūdžio ligas.

## **1.2 Katijoniniai polimerai – DNR ir siRNR pernašos reagentai**

Katijoniniai polimerai genų pernašai pradėti taikyti 1950 metais ir iki šiol užima svarbią vietą nevirusinių vektorių klasėje. Jie lengvai gaunami ir modifikuojami, o tai leidžia plačiose ribose keisti jų transfekcijos efektyvumą, toksiškumą bei savitumą atitinkamoms ląstelėms. Galima įvardinti kelias klases pagrindinių polimerinių vektorių, kurie pastaruoju metu bene plačiausiai naudojami įvairioms ląstelėms transfekuoti *in vivo* ir *in vitro*. Tai – poli-L-lizinas (PLL) ir jo dariniai [28, 30], linijiniai ir šakoti poliamidoaminai (PAMAM) [31, 32], linijiniai ir šakoti polietileniminai (LPEI ir ŠPEI) bei jų dariniai [33-35], dietilaminoetildekstranas ir jo dariniai [36, 37], chitozanas (ChI) ir jo dariniai [38-40], aminogrupių turintys poli(met)akrilatai (APA) [41-44] (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Genų pernašai naudojami katijoniai polimerai [28-44]

Polimeras	Struktūra	Modifikavimui naudojama
PLL		PEG, PAMAM, APA, -SS-
PEI		PEG, -SS-, ciklodekstrinai, peptidai, lipidai
APA		Ciklodekstrinai, PEG, polikaprolaktonai, peptidai, sintetiniai įvairūs APA kopolimerai
PAMAM		PEG, peptidai, folio rūgštis, manozė, argininas, cholesterolis
ChI		PLL, PEG, PEI, sperminas, spermidinas, įvairios aminorūgštys

Daugiausiai DNR/siRNR pernašai tyrinėjamos vektorių klasės – LPEI, ŠPEI ir jų dariniai bei PAMAM, todėl šie polimerai bus išsamiau aptarti atskiruose šio skyriaus poskyriuose. O šiame poskyryje bus nagrinėjama įvairių katijoninių polimerų tinkamumas transfekcijai bei aptartos jų modifikavimo galimybės, norint pasiekti geresnių pernašos rezultatų.

Poli-L-lizinas (PLL) – vienas iš pirmųjų katijoninių polimerų, pradėtų taikyti genų pernašai. Buvo nustatyta, kad PLL gali sudaryti stabilius polipleksus bei efektyviai pernešti DNR, jei jo molekulinė masė didesnė nei 3 kDa [28]. Norint išvengti nepageidaujamos polipleksų (polimero-DNR kompleksų) agregacijos, 3-4 kDa PLL modifikuojami imidazolu ar polietilenglikoliu (PEG) [29]. Tokie modifikatai sudaro mažesnius nei 100 nm stabilius kompleksus. Polipleksų stabilumas padidėja jei naudojami PLL kopolimerai su PAMAM, PEG, APA, dietilaminoetildekstranu bei kai į PLL struktūrą įvedami disulfidiniai ryšiai (-SS-) [29]. PLL taip pat buvo tiriamas ir siRNR pernašai, bet tinkamo efekto nebuvo gauta, nes su siRNR susidarė nestabilus kompleksas ir buvo pasiektas tik labai nedidelis genų raiškos slopinimas [28, 29].

Iš visų poli(met)akrilatų, PDMAEMA ir PDEAEMA tiriami bene dažniausiai [44]. Šie polimerai genų transfekcijoje vertinami dėl juose esančių tretinių aminogrupių, nes jų pagalba sudaryti polipleksai yra stabilūs fiziologinėje terpėje [41]. Taip pat buvo nustatyta, jog APA sudaro mažesnes polipleksų daleles, kai jų molekulinė masė >112 kDa [41]. Tačiau šiuo atveju padidėja polipleksų toksiškumas [41, 42].

Pavyzdžiui, dirbant su PDMAEMA geriausi transfekcijos rezultatai gauti, kai jo molekulinė masė 60 kDa, o, ją padidinus, susidaro ir nedideli, ir toksiškesni polipleksai. Į PDMAEMA sudėtį įvedus priridino ar imidazolo junginių bei karboksigrupių, polimero transfekcinės savybės dažnai pagerėja.

Gana geromis transfekcinėmis savybėmis pasižymi ir APA kopolimerai su PEG, metilmetakrilatu, *N*-vinilpirolidonu, trietilenglikolmetakrilatu, polikaprolaktonu [43]. Modifikuoti PDMAEMA bei PDEAEMA tirti ir siRNR

pernašoje – daugeliu atveju buvo gaunamas 50-80 % siekiantis genų slopinimo rezultatas [43].

Iš gamtinių polimerinių vektorių bene plačiausiai naudojamas chitozanas (ChI). Daugelis mokslininkų grupių labai išsamiai tyrinėjo įvairios molekulinės masės ir struktūros ChI įtaką *in vitro* ir *in vivo* DNR pernašai. Buvo nustatyta, kad, kai ChI molekulinė masė yra nuo 213 iki 17 kDa, polipleksų dydis sumažėja nuo 180 iki 100 nm, transfekcijos efektyvumas padidinamas, o toksiškumas sumažinamas [38, 39]. ChI modifikavus įvairiomis aminorugštimis, PEG, PLL ir PEI, gaunami ne tik transfekcijai tinkamų savybių polipleksai, bet ir saviti įvairioms ląstelių rūšims polipleksai [38]. Chitozaną kompleksuojant su siRNR, dažniausiai susidaro ne mažesni kaip 200 nm kompleksai [39]. Atlikus *in vivo* tyrimus, buvo pastebėta, kad chitozano/siRNR kompleksai pelių plaučių epitelio ląstelėse transfekuoja prastai (pasiektas tik 44 % geno slopinimo lygis) ir neišvengta uždegiminio atsako [39]. Jį bandyta panaikinti naudojant polietileniminu modifikuotas chitozano nanodaleles [40]. Šios nanodalelės taikytos tiek *in vivo*, tiek *in vitro* ir buvo nustatyta, kad polipleksai tampa stabilūs, mažai toksiški bei genų slopinimas siekia 90 % [40].

Genų transfekcijai plačiai naudojami ir kai kurie natūralūs nedidelės molekulinės masės poliaminai, tokie kaip putrescinas, sperminas, spermidinas ar agmatinas [45, 46]. Kadangi organizmuose šių poliaminų susidaro labai nedaug, transfekcijos eksperimentams jie gaunami sintetiniu būdu. Šie poliaminai pasižymi mažesniu toksiškumu, mažesniu imunogeniškumu bei didesniu transfekcijos efektyvumu, nei virusiniai vektoriai. Tačiau, lyginant su kitais katijoniniais polimerais, jie sudaro daug didesnius polipleksus. Tad šie poliaminai paprastai konjuguojami su dekstranais, ChI, cholesteroliu ir kt. junginiais [47].

Tarpusavyje lyginant įvairių katijoninių polimerų sandaros įtaką *in vitro* toksiškumui, juos galima išdėstyti tokia tvarka: LPEI(ŠPEI) = PLL > ChI > PAMAM > PDMAEMA [29, 41, 43]. Buvo pastebėta, kad polikatijonų sudėtyje kartu esant pirminių, antrinių ir tretinių aminogrupių (PEI, PAMAM),

polimerai mažiau toksiški ląstelėms, nei esant mažesniai aminogrupių tipų rinkiniui (PLL, PDMAEMA) [36, 41]. Šakotos struktūros katijoniniai polimerai su DNR sudaro stabilesnius polipleksus, nei linijinės struktūros polimerai [41]. Poliplekse didinant polimero kiekį, jų toksiškumas ląstelėms didėja, o transfekcijos efektyvumas mažėja [41]. Todėl genų transfekcijai itin svarbu parinkti tinkamą N/P santykį poliplekse.

### 1.2.1 DNR bei siRNR pernašai naudojami polietileniminai ir jų dariniai

Polietileniminai (PEI) – bene sėkmingiausiai genų pernašai taikomi polimerai. Pirmą kartą genų pernašai ŠPEI buvo pritaikytas 1995 metais [29, 48]. Iki šių dienų tiek ŠPEI, tiek LPEI efektyviai taikomi bei tyrinėjami įvairioms ląstelėms transfekuoti *in vivo* ir *in vitro*, ir, dėl didelio transfekcijos efektyvumo, jie yra tapę „auksiniais“ genų pernašos standartais. ŠPEI ir LPEI panaudojimą genų pernašai skatina ir tai, kad polimerai nesunkiai sintetunami, lengvai reguliuojama molekulinė masė ir PEI gali būti modifikuojami pačiais įvairiausiais junginiais [33-35].

Šakotas polietileniminas (ŠPEI) gali būti gaunamas labai įvairių molekulių masių – nuo 0,8 iki 1000 kDa bei įvairaus šakotumo laipsnio [29, 33-35]. Tačiau didelės molekulinės masės ŠPEI (didesnės kaip 60-1000 kDa) gaunamas susiuvant mažesnės molekulinės masės polimero fragmentus epichlorhidrinu, dihalogenidais, diepoksidais ir kt. [34]. ŠPEI esančios pirminės, antrinės ir tretinės aminogrupės padeda įveikti bent jau du transfekcijos barjerus: pirminės aminogrupės labai efektyviai dalyvauja sudarant kompleksą su DNR/siRNR, o antrinės ir tretinės aminogrupės, lengvai besiprotonizuodamosi ir sukurdamos teigiamą makromolekulių krūvį, padeda įveikti ląstelės membraną [49]. Atlikus įvairių ląstelių linijų transfekcijos tyrimus *in vitro* [50], buvo nustatyta, jog, esant tinkamam N/P santykiui, optimali genų pernašai ŠPEI molekulinė masė yra 5-25 kDa. ŠPEI, kurių molekulinė masė didesnė kaip 25 kDa, pasižymi pernelyg stipria elektrostatische sąveika su DNR, todėl sudaro didelių matmenų polipleksus bei agregatus [50].



Dideli polipleksai ir agregatai sunkiau patenka į ląsteles, o, būdami ląstelėse, sunkiau disocijuoja, dėl to yra toksiškesni [49, 50]. Mažiau toksiški yra ŠPEI, kai jų molekulinė masė maža, bet tokie ŠPEI nesudaro patvaraus komplekso [49, 50]. Tai blogina DNR/siRNR transfekciją ir nepadaeda DNR/siRNR apsaugoti nuo nukleazų.

T. Kramer ir kt. [51], ištyrė eilę įvairios molekulinės masės ŠPEI (0,8, 2, 5, 6, 21, 25 ir 600 kDa) ir šakotumo laipsnio (antrinių aminogrupių – nuo 65 iki 75 %) įtaką *in vitro* transfekcijai *NIH/3T3* (šveicariškų pelių embrionų jungiamojo audinio ląstelės) ir *COS7* (afrikietišku žaliųjų beždžionių inkstų dengiamojo audinio ląstelės) ląstelėms ir nustatė, jog *NIH/3T3* ląstelių pernašai optimaliausia ŠPEI masinė molekulinė masė yra 21 ir 25 kDa, o *COS7* ląstelių linijai buvo tinkami ne tik 21 ir 25 kDa, bet ir 5 bei 6 kDa ŠPEI. Tuo tarpu, > 2 kDa bei < 25 kDa ŠPEI sudarė didelius agregatus bei nestabilius kompleksus su DNR. Tokios molekulių masių tendencijos siejamos su ląstelių savitumu, nes skiriasi jungiamojo ir dengiamojo audinio ląstelių porų dydis; jo porų dydis svyruoja nuo 8 iki 21 μm, todėl manyta, jog pernašai tinkami įvairesnės molekulinės masės ŠPEI [51].

Tuo tarpu, tiriant *bEnd5* (pelių smegenų kraujagyslių epitelinio audinio ląstelės) ląstelių liniją, geriausi rezultatai buvo gauti, kuomet ŠPEI buvo nedidelės molekulinės masės (2,7 kDa) ir šakotumo. Naudojant tokį ŠPEI buvo, pasiektas didelis transfekcijos efektyvumas bei mažas toksiškumas, kai N/P = 12, o polipleksų dydis siekė 100-200 nm [52]. Buvo iškelta hipotezė, jog nedidelis epitelinio audinio porų dydis (0,12-0,16 μ) lėmė minėto ŠPEI tinkamumą genų pernašai [52, 53]. Priešingi eksperimentiniai rezultatai buvo gauti, kai įvairios molekulinės masės ŠPEI buvo taikomas *EA.hy 926* (žmogaus vainikinės arterijos epitelinio audinio ląstelės) linijai *in vitro*: transfekcijos efektyvumas didėjo, didinant ŠPEI molekulinę masę nuo 1,8 iki 70 kDa [54], o optimalus N/P santykis buvo tarp 5 ir 13,5. Šiai ląstelių linijai tinkamiausi buvo didelės molekulinės masės (10 ir 70 kDa) ŠPEI, nes arterijos epitelinio audinio porų dydis siekia ~76 μm [55].

Tiriant 2,5 ir 25 kDa ŠPEI transfekciją *in vitro* į *MCF7* (krūties liaukinio epitelinio audinio karcinomos ląstelės), *HeLa*, *Me180* (gimdos kaklelio epitelinio audinio karcinomos ląstelės) [56], *SKOV* (kiaušidžių vėžio epitelinio audinio karcinomos ląstelės), *SW-1 3* (antinksčių vėžio epitelinio audinio karcinomos ląstelės), *PC-3* (prostatos vėžio epitelinio audinio karcinomos ląstelės) [57] vėžines ląsteles, didžiausiu transfekciniu efektyvumu bei mažiausiu toksiškumu pasižymėjo 25 kDa polimeras, nes, esant optimaliam N/P [57] santykiui 10, jis sudarė mažiausius polipleksus (55-150 nm.) Autoriai pabrėžia, jog, jei ŠPEI molekulinė masė mažesnė už 5 kDa, jis su DNR sudaro nestabilius kompleksus, o tai lemia didelį jų toksiškumą bei prastą transfekcijos efektyvumą. Taip pat šiuose tyrimuose buvo atkreiptas dėmesys, jog transfekcijos su 25 kDa ŠPEI efektyvumas priklauso nuo vėžinių ląstelių savitumo.

T. Kisell grupė [58] išsamiai ištyrinėjo 48 kDa bei 5,4 kDa ŠPEI pernašą į šias ląsteles: *L929* (pelių jungiamojo audinio vėžinės ląstelės), *NIH-3T3*, *293* (žmogaus embrioninės inkstų ląstelės), *COS7*, *HeLa*, *CHO-K1* (kinietiško žiurkėno kiaušidžių epitelio ląstelės), *Jurkata* (žmogaus leukemijos ląstelės). Buvo nustatyta, jog, esant optimaliam N/P santykiui (6,7), kai ŠPEI molekulinė masė yra 48 kDa, jis sudaro 156 nm dydžio polipleksus, bet pasiekiamas nedidelis transfekcijos efektyvumas bei didelis toksiškumas. Tuo tarpu, kai ŠPEI molekulinė masė siekia tik 5,4 kDa, sudaromas 422 nm dydžio polipleksas, bet pasiekiamas daug didesnis transfekcijos efektyvumas. Tokius rezultatus, iš vienos pusės, lemia ląstelių savitumas, bet autoriai nurodo, kad transfekcijos rezultatas priklauso ir nuo poliplekso dydžio. Nors su 5,4 kDa ŠPEI ir sudaromas didesnis polipleksas, tačiau jis efektyviau pernešamas per ląstelės membraną ir nesukelia membranos pažeidimų. Panašūs tyrimai buvo atlikti su *L929* ir *ECV304* (žmogaus šlapimo pūslės epitelio vėžinės ląstelės) ląstelėmis [59], naudojant 11,9 bei 1616 kDa ŠPEI. Atlikus tyrimus buvo pastebėta, kad *ECV304* ląstelėms mažiau toksiškas yra mažesnės molekulinės masės ŠPEI, o didesnės molekulinės masės polimeras buvo toksiškas tik esant didesnėms jo koncentracijoms. *L929* ląstelių linijai toksiškumas padidėjo tik

esant ilgesnėms inkubavimo trukmėms bei didelėms polimero koncentracijoms. Šiuose tyrimuose buvo nustatyta kad, esant optimaliam N/P santykiui ir molekulinei masei 1616 kDa, ŠPEI sudarė 2-6  $\mu\text{m}$  dydžio polipleksus, o 11,9 kDa ŠPEI – 10-50 nm, todėl 11,9 kDa ŠPEI pasižymėjo mažesniu toksiškumu. Atlikus tyrimus su šioms ląstelių linijomis naudojant 800 bei 50 kDa ŠPEI [48, 51], buvo pastebėta, kad, esant optimaliam N/P santykiui (nuo 10 iki 18), transfekcijos į *NIH-3T3* ir *HeLa* ląsteles efektyvumas siekia 90 %. Tačiau kiti tyrimai į *16HBE* (žmogaus bronchų epitelio ląstelės) [60] parodė, jog 25 kDa ŠPEI daug efektyvesnis nei 50 kDa polimeras, esant optimaliam N/P santykiui 5. Šios publikacijos autoriai pastebi, kad tokias tendencijas lemia ląstelių savitumas, pasirinktas N/P santykis bei sudaromo poliplekso dydis.

Jei ŠPEI panaudojamas transfekcijai *in vivo* [61, 62], dalis aukščiau aptartų dėsningumų skiriasi. Transfekuojant į žiurkių smegenis ar kepenis, 25 kDa ŠPEI buvo žymiai efektyvesnis už 800 kDa polimerą. Nedidelės molekulinės masės ŠPEI (<2 kDa) buvo mažai toksiškas, tačiau nesudarė stabilaus poliplekso ir pasižymėjo prastomis transfekcinėmis savybėmis [54, 63]. Tyrinėjant transfekciją su ŠPEI 800 *in vivo* (žiurkių jauniklių smegenyse, viščiukų embrionų neuronuose), buvo pastebėta, kad tik esant optimaliam N/P santykiui (1,5) pasiekiamas geras transfekcijos efektyvumas. Jis tokiu atveju transfekuoja žymiai geriau nei PLL bei rinkoje naudojamas *Transfectamin* [51]. Transfekciją tyrinėjant su įvairios molekulinės masės ŠPEI (25, 50 ir 800 kDa) *in vivo* (suaugusių žiurkių smegenyse) eksperimentuose geriau veikė mažesnių molekulių masių polimeras [64, 65]. Geriausiomis transfekcinėmis savybėmis bei nedideliu toksiškumu pasižymėjo 25 kDa ŠPEI, kuris net ir po trijų mėnesių nesukėlė uždegimo neuronų audiniuose, o tai leidžia gydyti įvairius neurologinius susirgimus.

Tarpusavyje lyginant 22-25 kDa ŠPEI ir LPEI, šis dažniausiai, pasižymi geresnėmis transfekcinėmis bei mažiau toksinėmis savybėmis, nei tokios pat molekulinės masės ŠPEI. Tai stebima tiek *in vitro*, tiek ir *in vivo* tyrimuose. Tyrinėjant *in vitro* pelių vėžines ląsteles *B16F10*, *MC-38*, *C-26* [66] bei

žmonių vėžines ląstelės *SKOV*, *SW-13*, *Me180*, *PC-3* PEI22 [57], transfekcija efektyviausiai vyko, kai LPEI-DNR N/P santykis siekė nuo 20 iki 1,5 bei tuomet, kai susidarė mažesni (50-100 nm) polipleksai, nei su ŠPEI. Buvo tirta kelių molekulinų masių LPEI (3,6, 7,3 bei 22 kDa) įtaka *HepG2* (žmogaus kepenų vėžinės epitelio karcinomos ląstelės) ląstelių transfekcijai [67] ir nustatyta, kad didžiausias transfekcijos efektyvumas pasiekiamas naudojant 22 kDa LPEI, o mažos molekulinės masės polimeras sudarė nestabilius bei didelius agregatus. M. Breuning ir kt. [68] ištyrė dvylika įvairios molekulinės masės (nuo 9,5 iki 100 kDa) LPEI su *CHO-K1* bei *HeLa* ląstelių linijomis, ir nustatė, kad didžiausias transfekcijos efektyvumas (~44 %) pasiekiamas naudojant 5,6 kDa LPEI, kai N/P santykis 18. Šiuose tyrimuose buvo pastebėta, kad polipleksas su 9,5 kDa LPEI įstringa organelėse ir tampa nestabilus. Šiame tyrime autoriai taip pat pastebėjo kitas reikšmingas tendencijas: didinant LPEI molekulinę masę bei N/P santykį, transfekcijos efektyvumas didėja iki tam tikro taško, o ląstelių gyvybingumas šiame intervale drastiškai sumažėja, jei naudojamas didelis polimero kiekis, nes tada ląstelėse sulėtėja biocheminių procesų eiga. Transfekcijos-toksiškumo rezultatui taip pat įtakos turėjo ir tirtų vėžinių audinių porų dydis, nes jų porų dydis svyravo nuo 0,1 iki 7,8  $\mu\text{m}$  [69]. Apibendrinant genų transfekcijos *in vivo* tyrimus, tenka pažymėti, kad geriausi rezultatai buvo pasiekti naudojant 22 kDa LPEI, kai jis naudotas kvėpavimo takų ligoms gydyti, nes šios ląstelės pasižymi dideliu paviršiaus plotu ir didžiausiomis poromis [64, 65, 69].

Polietileniminų klasės polimerai taip pat buvo pradėti taikyti ir siRNR (19-25 nt) pernašai. Eksperimentiškai *in vitro* buvo tiriami įvairių molekulinų masių ŠPEI bei LPEI su keliomis vėžinių ląstelių linijomis (*SKOV*, *SW-13*, *ME-180*, *PC-3*) [70]. 800 ir 25 kDa ŠPEI pasižymėjo labai prastomis transfekcinėmis savybėmis ir dideliu toksiškumu, o 1,2-1,4 ir 0,6-0,8 kDa ŠPEI net ir visai netransfekavo. Tačiau 22 kDa LPEI *in vivo* eksperimentuose pasižymėjo mažu toksiškumu ir nedideliu uždegiminiu atsaku pelių jauniklių plaučiuose ir smegenyse [70]. Atlikus siRNR transfekciją į *Hep-2* ląsteles, ląstelių dalis, kuriose buvo nuslopintas genas, siekė 80 % [71].

Eksperimentiniai tyrimai patvirtino, kad, esant didesnėms koncentracijoms, tiek šakotas, tiek ir linijinis PEI *in vivo* pernašoje šiek tiek toksiški, sukelia uždegimus ir sunkiai pasišalina iš ląstelių, todėl būtina šiuos polimerus modifikuoti [57, 67, 68]. Modifikuojama įvedant funkcinių grupių, leidžiančių biologiškai suskaldyti PEI į mažesnės molekulinės masės darinius arba tokių funkcinių grupių, kurios padidina PEI biologinį suderinamumą [29, 34].

Hidroksigrupių turintys polialkileniminai (pHP) pasirodė labai tinkami transfekcijai į vėžines *Cos-7*, *HeLa*, *HepG2*, *WEHI164*, *HEK293* ir *pan.* ląsteles. Į jas buvo transfekuojuama efektyviau, nei su linijiniu 22-25 kDa PEI („*ExGen500*“), katijoniniais lipidais („*Lipofectamin*“ ar „*Fugene*“) ar su daugeliu kitų pastaruoju metu rinkoje parduodamų transfekcijos agentų [72, 73]. pHP dėl juose esančių hidroksigrupių yra ne tik labiau hidrofiliniai nei LPEI, bet ir sudaro nedidelio dydžio (~100 nm) ir stabilus laike polipleksus, o tai lemia sėkmingą transfekciją. *In vivo* taikyme pHP labiausiai tiko plaučių audiniams, nes nesukėlė uždegiminio atsako ir pasižymėjo dideliu transfekciniu efektyvumu [73].

ŠPEI gebėjimas protonizuotis plačiame pH intervale lemia sėkmingą kompleksų susidarymą, jų perėjimą per ląstelės membraną bei polipleksų atpalaidavimą iš endosomų dėl jų osmosinio brinkimo („protonų kempinės“ efekto). Buvo nustatyta, kad citoplazmoje (pH ~7,3) tik apie 20 % ŠPEI aminograpių yra protonizuotos. Tačiau lizosomų aplinkoje, kai pH nukrenta iki ~4,5-5, protonizuotų aminograpių padaugėja iki 50 %. Dėl protonų migracijos į endosomas, jos osmosiškai išbrinksta, dėl to suyra ir atpalaiduoja polipleksą. Panašūs dėsningumai buvo nustatyti ir naudojant 22 kDa LPEI, kurio  $pK_a$  7,9. Didėjant ŠPEI molekulinei masei, jo aminograpių  $pK_a$  (nustatyta potenciometriškai) vertės mažėja (mažėja aminograpių baziškumas): 2 kDa – 9; 25 kDa – 8,5; 750 kDa – 8,3 [56, 74]. Tokia priklausomybė aiškinama tuo, jog didesnės molekulinės masės polimerai labiau šakoti, todėl juose antrinių ir ypač tretinių aminograpių jonizacija yra apsunkinta [56, 75]. Taip pat buvo nustatyta, kad vektorių/polipleksų

transfekcijos efektyvumas bei toksiškumas nepriklauso nuo ląstelėje esančių organelių pH [75, 76].

Kaip matyti iš aukščiau pateiktos apžvalgos, ŠPEI ir LPEI transfekcijos efektyvumas bei toksiškumas DNR/siRNR pernašoje priklauso nuo polimerų molekulinę charakteristikų, o taip pat ir nuo N/P santykio bei transfekuojamų ląstelių tipo ir jų savitumo.

PEI atitinka daugelį reikalavimų reikalingų DNR pernašai, bet siRNR pernašai PEI dažniausiai turi būti modifikuojami, mažos molekulinės masės PEI susiuvant biologinėje terpėje lengvai suyrančiomis grupėmis. Tokiu būdu *in vivo* ir *in vitro* sąlygomis PEI suyra į smulkesnius fragmentus, kuriuos ląstelė pašalina ir uždegimas nesukeliamas bei pasiekama efektyvi transfekcija. Tokie PEI yra ypač aktualūs *in vivo* transfekcijai. Įvairios molekulinės masės PEI taip pat gali būti modifikuojami hidrofobiniais arba hidrofiliniais nedidelės molekulinės masės junginiais, tokiais kaip dekstranas [77], albuminas [78], įvairios aminorūgštys [79], sacharidai [80], polikaprolaktonas [81], chitozanas [82], PEG [83] ir pan. Tokiu modifikavimu padidinamas PEI biosuderinamumas ir sumažinamas citotoksiškumas, todėl transfekcijos rezultatai pagerėja.

Plačiau bus aptarta ši galimybė, kadangi tai žymiai paprastesnis būdas, nei bioskalaus PEI sintezė. Biosuderinami PEI dažniausiai „konstruojami“ iš PEI ir PEG. PEG yra pigus, biosuderinamas, netoksiškas ir labai gerai vandenyje tirpus polimeras, kurio molekulinė masė siekia nuo kelių šimtų Da iki 100 kDa [84]. Įdomu ir svarbu tai, kad dėl sintezės ypatybių yra įmanoma susintetinti nedidelės molekulinės masės PEG, turinčius labai mažus polidispersiškumo rodiklius (1,1 ir dar mažiau) [85]. Būtent tokie PEG, prieš tai juos aktyvavus, dažniausiai ir naudojami įvairių polimerų, taip pat ir PEI, modifikavimui.

Nors PEI-PEG vektorių transfekcines savybes lemia PEI fragmentas, tačiau PEG fragmentas turi didelę įtaką su transfekcija susijusiems antriniam reiškiniams (biosuderinamumui, kompleksų dydžiui, jų stabilumui, ląstelių savitumui, transfekuojamos medžiagos apsaugojimui nuo nukleazių ir pan.).

Šie efektai priklauso nuo PEG grandinių molekulinės masės ir grandinių skaičiaus modifikuotame polimere [86-88].

Pastaruoju metu visame pasaulyje mokslininkai, tyrinėję PEI-PEG darinius DNR pernašai į įvairias ląsteles *in vitro* (*1250LU*, *Hella*, *NIH/3T3*, *CHO-K1*), pastebėjo keletą aplinkybių, lemiančių polipleksų stabilumą, transfekcijos efektyvumą ir toksiškumą. U. Lungwitz ir bendraautoriai [88] ištyrė nedidelės molekulinės masės LPEI-MPEG kopolimerų kompleksus su DNR *in vitro* (*HeLa* bei *CHO-K1* ląstelių linijoms). Pasirinkta LPEI molekulinė masė 2,6 ir 4,6 kDa, o MPEG molekulinės masės – 5, 10 ir 20 kDa. 10 kDa modifikuojantis agentas buvo šakotos struktūros ir turėjo dvi 5 kDa  $\alpha$ -amino- $\omega$ -metoksi-poli(etilenglikolio) grandis. Atlikus išsamius tyrimus [88], buvo apibendrinta, kad nemodifikuotas LPEI su DNR sudarė 1500-2500 nm dydžio kompleksus, o kopolimerų kompleksai buvo nedideli – tik 150-420 nm. Kopolimerai, kuriuose buvo trys/keturios 5 kDa MPEG grandys, prijungtos prie 2,6 kDa LPEI, bei analogiški kopolimerai su 20 kDa MPEG grandimis, prijungtomis prie 4,6 kDa LPEI, sudarė ~150 nm dydžio kompleksus, nebuvo toksiški ląstelėms bei pasižymėjo didesniu transfekcijos efektyvumu lyginant su nemodifikuotais tos pačios molekulinės masės LPEI. Prijungus aukščiau minėto modifikuojančio agento dvi grandis (10 kDa + 10 kDa), transfekcijos efektyvumas drastiškai sumažėjo, o toksiškumas padidėjo. Tai akivaizdžiai rodo MPEG grandinių kiekio ir molekulinės masės įtaką transfekcijos rezultatams. Autoriai taip pat pastebi [88], kad, prijungus kelias nedidelės molekulinės masės arba vieną didelės molekulinės masės MPEG grandis, bei parinkus tinkamą N/P santykį, kompleksai išlieka stabilūs ir yra labiausiai tinkami šioms ląstelių linijoms. Tokias tendencijas autoriai sieja su MPEG savybėmis.

T. Kissel su bendraautoriais [89] tyrinėjo ŠPEI-PEG kopolimerus, besiskiriančius MPEG skiepu molekulinė mase ir tankiu, transfekcijai *in vitro* į pelių alveolių ląsteles (*LA4*). Naudojant 25 kDa ŠPEI ir įvairios molekulinės masės MPEG (550, 2000, 5000 ir 20000 Da) buvo susintetinti kopolimerai, turintys nuo 1 iki 30 skiepu ((MPEG550)<sub>30</sub>, (MPEG2000)<sub>10</sub>, (MPEG5000)<sub>4</sub> ir

(MPEG20000)<sub>1</sub>). Buvo nustatyta, jog kopolimerai su didelės molekulinės masės MPEG skiepais yra labiausiai toksiški ląstelėms. Mažiausiu toksiškumu pasižymėjo kopolimeras turintis daug (30) 550 molekulinės masės MPEG skiepų. Tokius stebimus efektus autoriai aiškina sumažėjusiu PEI pirminių aminogrupių kiekiu ir baziškumu, kai skiepų prijungiama daug. Būtent sumažėjęs baziškumas lėmė tai, jog polipleksai lengviau perėjo ląstelės membraną, o tai nulėmė mažesnę toksiškumą ir didesnę transfekcijos efektyvumą.

Labai panašių kopolimerų tyrimus su DNR atliko A. Malek ir bendraautoriai [90], tik jie genų pernašą atliko į melanomos *1205LU* ląsteles. Tyrimams buvo naudoti 5 ir 25 kDa ŠPEI kopolimerai su įvairios molekulinės masės MPEG (550, 2000, 5000, 20000 ir 30000 Da) turintys nuo 4 iki 30 MPEG grandžių. Visi tirti kopolimerai pasižymėjo dideliu transfekcijos efektyvumu, išskyrus 5 kDa ŠPEI-(MPEG550)<sub>30</sub>, kuris sudarė labai nestabilių kompleksą su DNR. *1205LU* ląstelėms transfekuoti labiausiai tinkami buvo 5 kDa ŠPEI-(MPEG550)<sub>4</sub> ir 25 kDa ŠPEI-(MPEG550)<sub>15</sub> kopolimerai, nes buvo mažai toksiški, sudarė stabilius kompleksus ir efektyviai transfekavo. Autoriai iškėlė hipotezę, jog prie šakoto PEI prijungus daug MPEG grandžių ((MPEG550)<sub>30</sub>), beveik nebelieka laisvų teigiamą krūvį turinčių aminogrupių, kurios turėtų kompleksuotis su DNR, todėl sudarytas kompleksas tampa nestabilus. siRNR pernašos atveju buvo pastebėtos panašios tendencijos, tik 25 kDa ŠPEI kopolimerai buvo efektyvesni (jų genus slopinantis efektas siekė net 60-70 %). Tokias tendencijas turbūt lemia DNR ir siRNR molekulinė masė skirtumai.

X. Zhang su bendraautoriais [91] tyrinėjo genų pernašą į *HeLa* ląsteles naudodami 25 kDa ŠPEI kopolimerus su MPEG (2000 ir 5000 Da) skiepais. MPEG skiepų skaičius šiuose kopolimeruose buvo 2, 3 ir 10 (MPEG2000) bei 1 ir 2 (MPEG5000). Buvo nustatyta, kad pernašos efektyvumą ir toksiškumą ląstelėms labiausiai lemia PEG skiepų skaičius kopolimere. Esant dideliame MPEG skiepų skaičiui, polipleksų dalelių dydis mažas. Taip pat polipleksų dydis priklausė ir nuo MPEG molekulinės masės – kopolimerai su mažesnės



molekulinės masės (2000) MPEG skiepais sudarė didesnes daleles. Šis efektas aiškinamas tuo, kad kopolimerai su mažesnės molekulinės masės MPEG skiepais sudarė netvarkingos formos kompleksus. Visais atvejais transfekcijos efektyvumas didėjo ir toksiškumas mažėjo, kai MPEG skiepų skaičius kopolimeruose buvo mažinamas.

25 kDa ŠPEI kopolimerai su 550-20000 MPEG skiepais buvo panaudoti ir transfekcijai į *3T3* bei *NIH3T3* (jungiamojo audinio) ląstelių linijas [92]. Šiame tyrime nustatyta, kad polipleksų toksiškumas nepriklausė nuo MPEG molekulinės masės, tačiau priklausė nuo MPEG skiepų kiekio: jį padidinus nuo 1 iki 6, toksiškumas sumažėjo. Mažiausio dydžio polipleksai (51 nm) gauti su kopolimeru, turinčiu vieną MPEG 20 kDa skiepą. Kitais atvejais polipleksų dydis buvo apie 100 nm. Šiai ląstelių linijai mažiausiu toksiškumu bei didžiausiu transfekcijos efektyvumu, pasižymėjo kopolimeras su 35 MPEG550 skiepais. Tokias tendencijas lemia DNR-kopolimerų kompleksų ypatybės. Ištyrus DNR-kopolimerų kompleksus su atominės jėgos mikroskopu buvo nustatyta [92], kad kopolimerai su 35 MPEG550 grandimis sudaro netvarkingus, beformius ir purius kompleksus, o tai lemia platesnę katijoninių grupių pasiskirstymą makromolekulėje.

S. Wang su bendraautorais [93] tyrinėjo PEI-PEG kopolimerų tinkamumą DNR pernašai į centrinės nervų sistemos *NT2* ląstelių linijas. Tyrimams panaudoti 25 kDa ŠPEI-(MPEG2000) kopolimerai, kuriuose MPEG skiepų kiekis buvo 1-15. Buvo nustatyta [93], kad kopolimerai su 1-5 MPEG skiepais sudaro nedidelius >200 nm kompleksus ir buvo efektyviausi didelio transfekcijos efektyvumo ir mažo toksiškumo prasmėmis. Tą lėmė ŠPEI-MPEG kopolimerų struktūra bei ląstelių savitumas.

L. Mao panašius kopolimerus tyrinėjo [94] siRNR pernašai ir nustatė, kad didžiausius kompleksus (300-400 nm) sudarė 25 kDa ŠPEI-(MPEG550)<sub>30</sub>, o 25 kDa ŠPEI-(MPEG5000)<sub>4</sub> ir 25 kDa ŠPEI-(MPEG2000)<sub>10</sub> – tik apie 110 nm. Šie kopolimerai pasižymėjo didžiausiu transfekcijos efektyvumu bei mažiausiu toksiškumu. Šiuo tyrimu nustatyta, kad geno slopinimo efektyvumas priklauso nuo MPEG skiepų molekulinės masės kopolimeruose ir ją didinant – didėjo.

Genas buvo nuslopintas apie 70 % ląstelių. Autoriai pastebi, jog PEG efektyviai apsaugo siRNR nuo nukleazių, o tai prailgina siRNR funkcionavimo laiką citoplazmoje.

Apibendrinant šiame skyriuje pateiktą medžiagą, galima padaryti kelias svarbias išvadas. Visų pirma, daugelis mokslininkų nustatė, kad PEI šakotumas turi įtakos transfeicinėms savybėms, nes linijiniai PEI dažniausiai yra aktyvesni už tokios pat molekulinės masės šakotus PEI. Antra, eksperimentiškai nustatyta, jog transfeicijai optimali ŠPEI/LPEI molekulinė masė yra apie 5-25 kDa. Trečia, norint pagerinti PEI transfeicines bei sumažinti toksines savybes, PEI gali būti modifikuojamas. Ketvirta, kadangi transfeicijos rezultatas priklauso nuo ląstelių savitumo bei nuo pernešamo objekto savybių, negalima tarpusavyje tiesiogiai lyginti LPEI/ŠPEI bei įvairius šių PEI PEI kopolimerus; polimerų tarpusavio lyginimas tik tuomet įgauna prasmę, jei jie yra naudojami vienam ir tam pačiam transfeikuojamam objektui ir į tas pačias ląstelių linijas.

### **1.2.2 Bioskalūs katijoniniai polimerai DNR ir siRNR pernašai**

Nepaisant to, jog daugelis katijoninių polimerų sėkmingai naudojami genų pernašai, vis dar nuolat ieškoma efektyvesnių ir mažiau toksiškų transfeicijos agentų, kurie būtų efektyvūs ne tik *in vitro*, bet ir *in vivo* transfeicijos sąlygomis. Šia kryptimi daugiausia tikimasi pasiekti naudojant bioskalius genų pernašos vektorius. Bioskalūs genų pernašos vektoriai leidžia išspręsti kelias svarbias problemas, su kuriomis paprastai susiduriama naudojant nebioskalius vektorius [95-97]:

- pagerinti vektoriaus ir transfeikuojamos medžiagos (DNR/siRNR) sąveiką dėl vektoriuje esančių bioskalių grupių;
- pasiekti, kad transfeikuojama medžiaga iš poliplekso išsilaisvintų lengvai ir per trumpą laiką;
- sumažinti vektoriaus toksiškumą dėl jo gebos greitai suirti citoplazmoje.

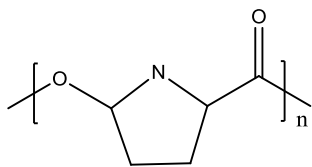
Įgyvendinus šiuos tikslus, tikėtina, kad vektorių efektyvumas transfekcijoje žymiai padidėtų, bei atsirastų galimybė juos plačiau taikyti *in vivo* būdu.

Daugelis mokslininkų bioskalius polimerinius vektorius apibrėžia kaip polimerus, kurie ląstelės viduje, jos fermentų pagalba, suyra į netoksiškus ir biosuderinamus mažos molekulinės masės fragmentus. Bioskalūs polimeriniai vektoriai skirstomi į gamtinius, dirbtinius ir sintetinius. Gamtiniai polimeriniai vektoriai tai – baltymai (protaminai, histonai) ir polisacharidai (chitozanas, dekstranas), tačiau pagrindinė šių vektorių taikymo problema – mažas jų aktyvumas transfekcijoje. Šie sintetiniai bioskalūs vektoriai, tokie kaip: katijoninių grupių turintys poliesteriai (poli(4-hidroksi-L-prolino esteris) (PHPES), poli( $\beta$ -amino esteriai) (PBAES)), poliamidoaminai (PAMAM) ir jų dariniai (cistamino grandžių turintys poliamidoaminai (CPAMAM)), polifosfoeteriai bei bioskalūs polietileniminai (cistamino grandžių turintys polietileniminai (CPEI)) ar polietilenimino-polietilenglikolio kopolimerai (PEI-PEG) (1.1 schema) yra žymiai pranašesni. Vienas iš pagrindinių reikalavimų bioskaliams vektoriams – jų geba citoplazmoje greitai skilti ir pasišalinti iš ląstelės nesukeliant neigiamo imuninio atsako. Būtent šiais aspektais daugelis mokslininkų ir lygina tarpusavyje bioskalius polimerinius vektorius [96, 98].

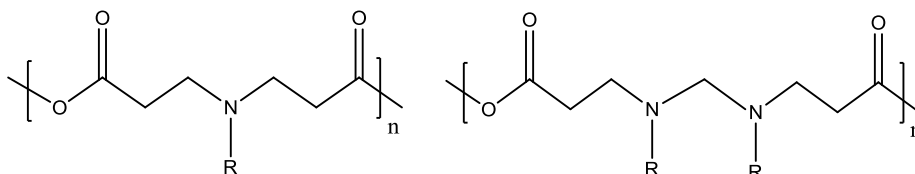
Katijoniniai poliesteriai – itin potenciali bioskalių genų transfekcijos agentų klasė, nes su DNR sudaro patvarų kompleksą, o ląstelėje suyra per trumpą laiką. Todėl buvo susintetinta ir iširta daugiau nei 2000 įvairių katijoninių poliesterių genų pernašai. Tarp jų efektyviausiais laikomi poli(4-hidroksi-L-prolino esteris), poli( $\gamma$ -4-aminobutil-1-glikolio rūgštis) bei poli( $\beta$ -aminoesteriai). Jie ne tik greitai suyra, bet ir pasižymi savitumu atskiroms ląstelių linijoms.

Pavyzdžiui, transfekuojant į *IL-10*, *COS7* bei *3T3* ląstelių linijas buvo nustatyta, kad poli( $\beta$ -aminoesteriai) suyra per 100 min iki oligomerinių junginių, todėl nėra toksiški, su DNR sudaro nedidelius 100 nm kompleksus, o transfekcijos efektyvumas net 5 kartus didesnis už PEI, PLL ar kitų

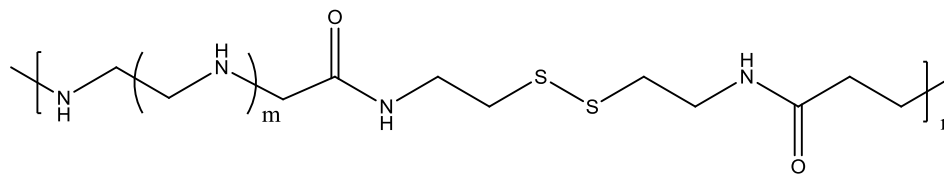
nebiodegruojančių polimerinių vektorių efektyvumą. Katijoniniai poliesteriai yra veiksmingi ir siRNR pernašai, nes pasiekiamas itin didelis (80-90 %) genų slopinimas [99-101].



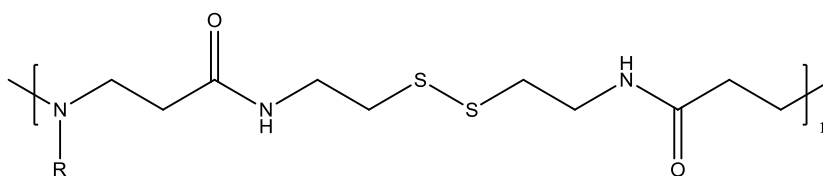
PHPES



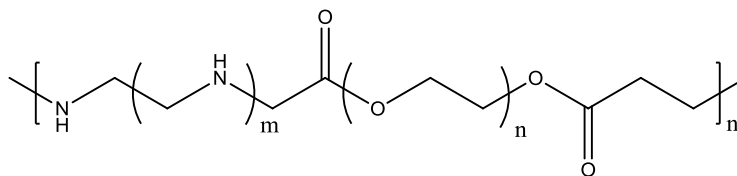
PBAES



CPEI



CPAMAM



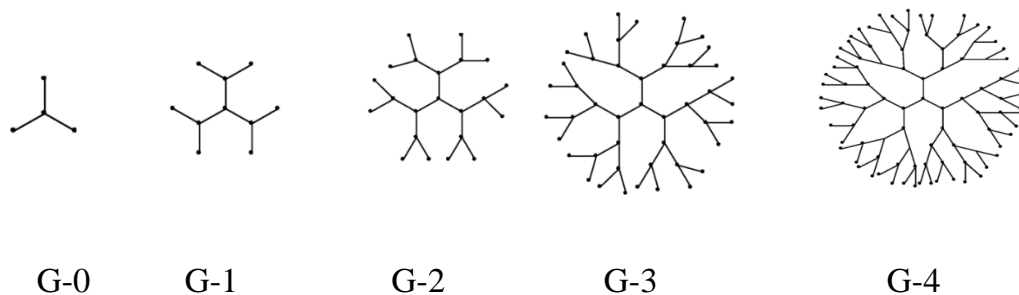
PEI-PEG

1.1 schema. Bioskalūs polimeriniai vektoriai.

Poliamidoaminai (PAMAM) – amidinių ryšių turintys polimeriniai bioskalūs vektoriai, kurių gausa yra labai didelė. Poliadicijos būdu iš bisakrilamidų ir įvairių aminų sintetinami PAMAM gali turėti ne tik įvairių aminogrupių ir jas supančių fragmentų, bet ir įvairią makromolekulių architektūrą (linijinę, šakotą, dendritinę). Pagrindinės PAMAM savybės dėl kurių jie tinka genų pernašai – labai geras tirpumas vandenyje, bioskalumas, galimybė keisti makromolekulių konformaciją priklausomai nuo pH [102]. PAMAM struktūra parenkama atsižvelgiant į transfekuojamų ląstelių savitumą. Mokslininkai [100-104] tyrinėjo PAMAM struktūros įtaką transfekcinėms savybėms. Buvo pasirinkti pagrindinėje grandinėje turintys skirtingą kiekį aminogrupių, ciklinių junginių (piperazino žiedų) ar karboksigrupių PAMAM. Jų tarpe didžiausiu transfekcijos efektyvumu bei mažiausiu toksiškumu pasižymėjo PAMAM su vienu azoto heterociklu. Šie PAMAM sudarė mažus 50-100 nm dydžio kompleksus, o polimeras hidrolizavosi per 48 valandas. Įvedus į pagrindinę grandinę karboksigrupių, PAMAM su DNR sudarė daug didesnius kompleksus (200 nm), bet šiuo atveju hidrolizė įvyko daug greičiau – per 24 valandas. Iš aukštesnės eilės diaminių gauti PAMAM transfekuoja prasčiau ir yra mažiau aktyvūs bei labiau toksiški [105, 106].

Dendritiniai PAMAM – polimerai, iš kurių makromolekulių centrinio atomo atsišakoja keletas grandinių (1.2 pav.). DNR pernašoje buvo tyrinėjami dendrimerai [107-110], turintys skirtingą kiekį atšakų makromolekulėje. Dendrimerai, turintys 12, 48, 384 ir 1536 atšakas sudarė nedidelio dydžio polipleksus (150 nm), Tačiau geriausiomis transfekcinėmis savybėmis pasižymėjo PAMAM su 384 ir 1536 atšakomis. Autoriai tokias tendencijas sieja su PAMAM struktūrinėmis savybėmis bei katijoninių grupių kiekiu. siRNR pernašoje minėtų dendrimerų aktyvumas siekia 35-45 %.

Lyginant su linijiniais, šakoti ir dendrimeriniai PAMAM sudaro kompaktiškesnes ir patvaresnes PAMAM-DNR struktūras, jų toksiškumas šiek tiek mažesnis, o transfekcijos efektyvumas – didesnis.



1.2 pav. PAMAM dendrimerų šakotumas priklausomai nuo šakų priauginimo laipsnio (G).

Tokias tendencijas lemia struktūriniai ypatumai, nes šakoti ir dendrimeriniai PAMAM pasižymi didesniu katijoninių grupių kiekiu – tai lemia stipresnę PAMAM-DNR sąveiką bei tinkamo dydžio polipleksų susidarymą [107, 108]. Kai PAMAM šakotumas didėja, polipleksų dydis pakinta nežymiai, tačiau ženkliai išauga toksiškumas. Autoriai pastebi, kad, net esant optimaliam N/P santykiui, ypač šakoti dendrimerai nepilnai suriša DNR, todėl likusios laisvos PAMAM aminogrupės pernašos metu ardo ląstelės membraną ir taip mažina jų gyvybingumą. Tai buvo nustatyta vykdant DNR transfekciją į *CHO-K1*, *COS7*, *CV-1*, *HeLa*, *Hek293* ląsteles. Lyginant tarpusavyje PAMAM, PEI, PLL ar kitus polimerinius vektorius, PAMAM yra pranašesni [102, 103, 107, 110].

Norint suteikti nebioskalam polimeriniam vektoriui bioskalumą, o bioskalam – jį padidinti, iki šiol transfekcijai efektyviai taikytus PEI, PAMAM, PDMAEMA ir kitus polimerus bandoma modifikuoti. Dažniausiai tai atliekama į polimero sandarą įvedant disulfidinių (-SS-) ryšių. Disulfidinių ryšių turintys DNR/siRNR pernašos vektoriai yra labai perspektyvūs dėl to, jog [111-115]:

- disulfidiniai ryšiai apsaugo DNR/siRNR kompleksą nuo oksiduojančios ekstraląstelinio skysčio terpės;
- padeda kompleksuoti DNR;

- efektyviai atpalaiduoja genetinę medžiagą redukcinėmis savybėmis pasižyminčioje citoplazmoje.

Citoplazmoje pagrindinis redukuojantis agentas yra glutationas. Jis ląstelėje atsakingas už baltymų bei polinukleotidų sintezę, aminorūgščių transportavimą, fermentų aktyvumo palaikymą, toksinių medžiagų nukenksminimą bei kitas vykstančias chemines reakcijas. Būtent glutationas ir suskaido polimerinius vektorius, kurie pagrindinėje grandinėje turi -SS- ryšių [111-115].

Daugelis mokslininkų grupių modifikavo ŠPEI, į jo pagrindinę grandinę įvesdami disulfidinių ryšių. Dažniausiai -SS- ryšiais sujungiami keli mažos molekulinės masės (0,8-2 kDa) ŠPEI fragmentai, tam naudojant ditiobis(sukcimidilpropionatą) (DSP), dimetil-3,3'-ditiobis-propionimidatą (DTBP), bis(2-metakriloiloksietil)disulfidą, cistamino bisakrilamidą (CBA) arba tiolinant metiltiiranu [116-122]. Naudojant ŠPEI-SS, transfekcijai buvo tiriamos kelios ląstelių linijos: *HeLa*, *293T*, *MDA-MB-231*, *C2C12*, *COS7*, *CHO*. ŠPEI (800 Da) sujungiant su DSP ir DTBP [116-119] buvo nustatyta, jog genų pernašos į *CHO* ląsteles efektyvumas priklauso nuo sujungimui naudoto reagento tipo. Esant vienodam N/P santykiui, didesniu transfekcijos efektyvumu pasižymėjo ŠPEI, sujungtas per DTBP, nes, prisijungdamas DTBP, suformuoja amidino ryšį, kuris pagerina transfekcines savybes.

Kai ŠPEI-SS tiolinamas metiltiiranu [120], reakcija vykdoma dvistadijiniu būdu. Iš pradžių 800 Da ŠPEI tiolinamas su metiltiiranu, o susidariusios tiolinės grupės antrosios stadijos metu oksiduojamos dimetilsulfoksidu iki disulfidinių, tuo pačiu padidėjant vektoriaus molekulinėi masei. *In vivo* būdu buvo tyrinėta, kaip tokio ŠPEI-SS transfekcijos efektyvumas ir toksiškumas priklauso nuo įvestų SS ryšių kiekio. Gauti ŠPEI-SS, kuriuose vidutinis SS ryšių kiekis vienoje molekulėje svyruoja nuo 2,6 iki 9,4. Tyrimai parodė, kad, esant labai mažam arba labai dideliame -SS- ryšių kiekiui, ŠPEI-SS-DNR sudaro labai didelius kompleksus (300-600 nm). Tinkamiausi genų pernašai yra ŠPEI-SS, kai disulfidinių ryšių yra nuo 3,5 iki 6,5, nes šiuo atveju susidarė tik 100 nm dydžio kompleksai, kurie *in vitro*

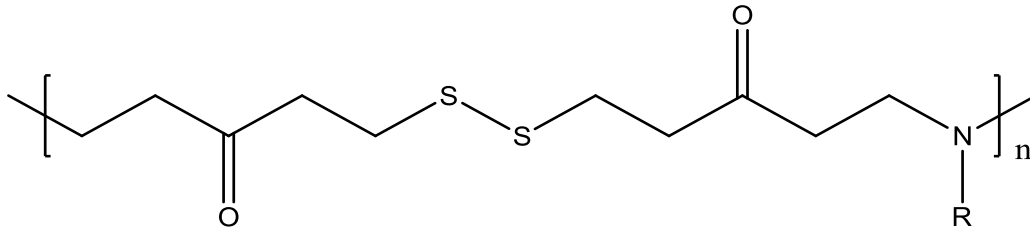
sąlygomis greitai suiro veikiami 1,4-ditiotreitoliu (DTT), pasižymėjo nedideliu toksiškumu ir dideliu transfekcijos efektyvumu. Jų transfekcijos efektyvumas buvo didesnis už 25 kDa ŠPEI efektyvumą. ŠPEI, kurių molekulinė masė 1,8 ir 25 kDa, taip pat buvo tiolinti su metiltiiranu ir oksiduoti dimetilsulfoksidu [121, 122]. Gautų polimerų makromolekulėse buvo nuo 3,5 iki 4,5 -SS- ryšių, tačiau jie pasižymėjo panašiomis transfekcinėmis savybėmis, kaip ir nemodifikuotas 25 kDa ŠPEI.

Kita bioskalių -SS- ryšių turinčių polimerinių vektorių grupė – tai PAMAM-SS polimerai, kurie sintetinami poliadicijos būdu iš CBA bei įvairių diaminų. PAMAM-SS bioskalūs polimeriniai vektoriai taikomi DNR bei siRNR pernašai į daugelį ląstelių linijų (*COS7*, *HeLa*, *293T*, *NIH3T3*, *C2C12*) [123, 124]. Nedidelės molekulinės masės (3-9 kDa) PAMAM-SS su įvairaus ilgio šoniniais pakaitais (4-amino-1-butanolio (ABOL), 5-amino-1-pentanolio (APOL), *N,N'*-dimetil-1,3-etilendiamino (DMEA), 2-(2-aminoetoksi)etanolio, 3-metoksipropilamino (AEEOL), 3-morfolinpropilamino (MOPA) bei histamino (HIS)) su DNR sudaro labai stabilus ir patvarius kompleksus (100-200 nm), kurie redukciniėje aplinkoje suyra per 1-4 valandas. Nustatyta, kad šoninių pakaitų tipas turi įtakos transfekcijos efektyvumui bei toksiškumui *COS7* ląstelių linijai, nes didžiausiu transfekcijos efektyvumu pasižymėjo PAMAM-SS su APOL ir ABOL pakaitais. Visų šiame darbe tirtų šoninių pakaitų įtaką PAMAM transfekcijai galima išdėstyti tokia tvarka: APOL=ABOL > MOPA > AEEOL > DMEA [118,122].

Kiti autoriai [125] susintetino nedidelės molekulinės masės (3-10<sup>6</sup>kDa) PAMAM-SS su aminų (etilamino (EA)), diaminų (1,2-etandiamino (EDA), 1,4-butandiamino, 1,6-heksametilendiamino (HDA)) bei poliaminų (dietilentriamino (DETA), trietilentetramino, tetraetilenpentamino (TETEP)) šoniniais pakaitais (1.2 schema). Šie PAMAM-SS su DNR sudarė labai patvarius ir kompatiškus 100 nm dydžio kompleksus, o, veikiant DTT, -SS-ryšiai suiro per kelias valandas. *COS7* ląstelėms didžiausiu transfekcijos efektyvumu pasižymėjo PAMAM-SS su trumpiausiu – EDA šoniniu pakaitu. O *293T*, *HeLa* ir *NIH3T3* ląstelėms geriausiai transfekavo PAMAM-SS su



ilgiausiais šoniniais pakaitais (trietilentriamino ir HDA) [126,127]. Lyginant su ŠPEI, visi šiame darbe susintetinti ir ištirti PAMAM-SS pasižymėjo dideliu transfekcijos efektyvumu bei labai mažu toksiškumu.



R = EDA, BDA, HDA, EA, DETA, TETA, TETEP

1.2 schema. PAMAM-SS su įvairaus tipo ir ilgio šoniniais pakaitais.

PAMAM-SS su įvairiais šoniniais pakaitais buvo tiriami ir siRNR pernašai į *HI229* ląsteles. Šiuo atveju susidarė stabilūs vidutinio dydžio (200 nm) kompleksai, o mažiausiu toksiškumu ir didžiausiu efektyvumu pasižymėjo PAMAM-SS su EDA šoniniais pakaitais, geną nuslopinę 70 % ląstelių [128-130].

Analizuojant literatūrinius duomenis apie katijoninių polimerinių vektorių sintezę ir panaudojimą galima pastebėti bene tris labai svarbias aplinkybes. Pirmiausia, labai daug pastangų dedama tam, kad būtų sukurti saugūs ir efektyvūs polimeriniai vektoriai *in vivo* pernašai (sisteminiam taikymui). Antra, naujų polimerinių vektorių sukūrimas, ištyrimas ir panaudojimas genų pernašai yra ilgas ir sunkus darbas, nes reikia suprasti daugybę veiksnių, siejančių ląstelių savitumą bei polimerinių vektorių savybes. Trečia, bet kokie pokyčiai polimero struktūroje, molekulinėje masėje, krūvio dydyje ar tipe gali stipriai keisti vieno arba net kelių iš karto, genų pernašos etapų sąlygas ir tuo pačiu nulemti galutinį transfekcijos rezultatą. Ketvirta, tenka konstatuoti jog, vykdant naujų polimerinių vektorių paiešką, o taip pat ir

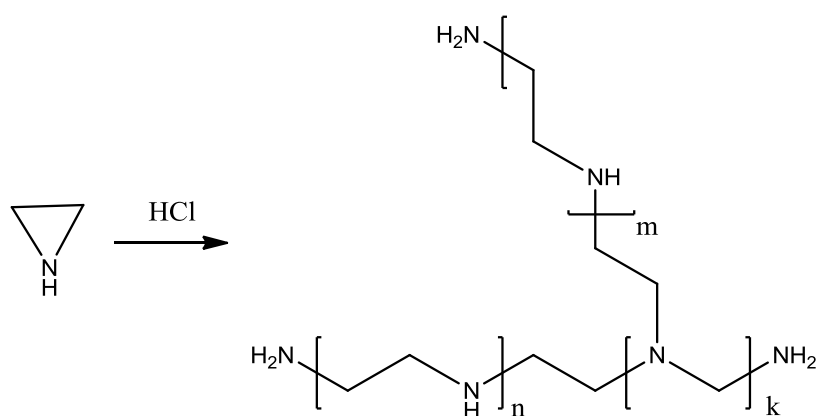
bandant patobulinti jau gerai žinomus, vis dar naudojami empiriniai klaidų ir bandymų metodai, kadangi detalus pernašos į ląsteles mechanizmas vis dar nėra iki galo ištirtas.

### 1.3 Polimerizaciniai polialkileniminai ir jų modifikavimas PEG

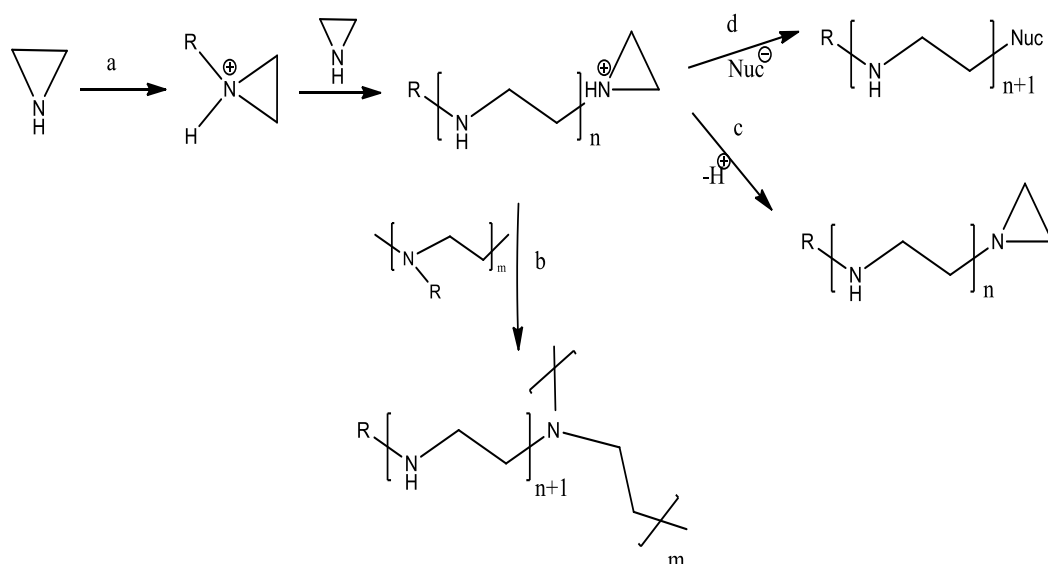
Polialkileniminai – polimerai, kurių pagrindinę grandinę sudaro alifatiniais fragmentais sujungtos iminogrupės. Jie gali būti gaunami polikondensacijos ar katijoninės ciklų polimerizacijos būdais. Šiuo būdu sintetinami polialkileniminai su etil- ir *i*-propil- fragmentais pagrindinėje grandinėje. Tai – ŠPEI bei poli(izopolipropileniminas). LPEI, o taip pat ir polipropileniminas [131, 132] gaunami dviejų stadijų būdu, iš pradžių vykdant atitinkamų ciklinių monomerų (2-oksazolinų ar 5,6-dihidro-1,3-oksazinių) katijoninę polimerizaciją, o po to atliekant susidariusių polimerinių tretinių amidų šarminę hidrolizę. Iš visų čia išvardintų polimerų bene plačiausiai taikomas ŠPEI, tačiau visi jie intensyviai tiriami kaip vaistų ir genų pernašos agentai.

Pirmą kartą šakotas polietileniminas (ŠPEI) patentuotas 1940 m. ir buvo gautas katijoniniu ciklų polimerizacijos būdu (angl. *ring-opening polymerization*) iš aziridino [133]. Vandeniškuose arba alkoholiniuose tirpaluose buvo polimerizuojama aukštose temperatūrose, o be tirpiklio – žemose [134] (1.3 schema).

Katijoninę aziridino polimerizaciją (1.4 schema) labai plačiai aprašė A. Zomlefer [135]. ŠPEI susidarymas prasideda nuo iniciavimo stadijos (1.4 schema a), vykdant aziridino protonizavimą Lewis rūgštimi (dažniausiai HCl). Augimo stadijos metu (b) susidaro linijiniai polimerizacijos dariniai, turintys aktyvų aziridinio joną grandinės gale. Jei šį joną atakuoja jau susidariusio PEI antrinės aminogrupės, susidaro tretinių aminogrupių turintis ŠPEI. Grandinė gali nutrūkti dviem būdais: deprotonuojant aktyvų centrą (c) arba jam sureaguojant su nukleofilu (d).



1.3 schema. ŠPEI ir jo sintezės principinė schema.



1.4 schema. Aziridino katijoninės polimerizacijos mechanizmas.

Katijoniniu būdu gautame ŠPEI teorinis pirminių, antrinių ir tretinių aminogrupių santykis turėtų būti artimas 25:50:25. Eksperimentiniai tyrimai parodė [136], kad ŠPEI šakotumo laipsnis šiek tiek priklauso nuo polimerizacijos būdo bei monomero konversijos. Tačiau bet koku atveju pirminių ir tretinių aminogrupių kiekiai polimere turėtų būti lygūs, kadangi

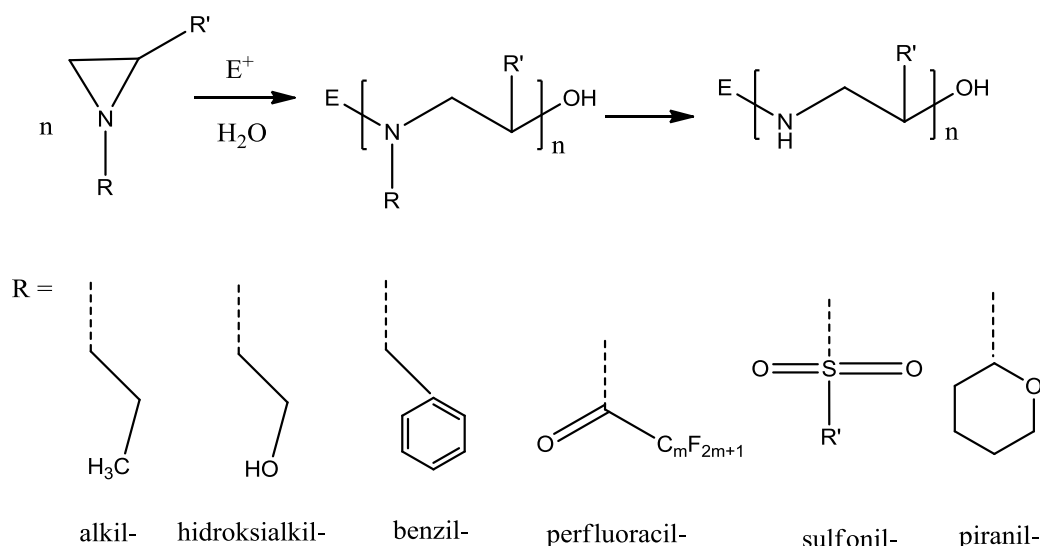
kiekviena nuo tretinės grupės prasidedanti atšaka užsibaigia viena pirmine aminogrupe.

Gana detaliaus ŠPEI šakotumo tyrimus atliko A. von Harpe su bendraautoriais. Jie  $^{13}\text{C}$  BMR pagalba ištyrė eilę komercinių bei pačių autorių sintetintų ŠPEI ir nustatė, kad komerciniuose ŠPEI (jų molekulinės masės svyravo gana plačiose 1,2-1000 kDa ribose) antrinių ir tretinių aminogrupių santykis yra artimas 1. T. y., ištirti komerciniai ŠPEI buvo itin šakoti polimerai. Tačiau pačių autorių susintetinti ŠPEI (jų molekulinės masės svyravo 9-24 kDa ribose) buvo mažiau šakoti, nes juose antrinių aminogrupių kiekis buvo maždaug du kartus didesnis už tretinių. Kiti mokslininkai [137] taip pat yra nustatę, jog didesnės molekulinės masės ŠPEI yra labiau šakoti.

Katijoniniu būdu polimerizuojant aziridiną paprastai susidaro gana nedidelės molekulinės masės (~2-50 kDa) ŠPEI [134]. Didelės molekulinės masės ŠPEI gaunamas aziridino polimerizaciją inicijuojant bifunkciniais alkilinančiais agentais [137,138]. Pageidaujamos molekulinės masės ir klampos ŠPEI taip pat gali būti gaunamas ir dihalogenalkanais, epichlorhidrinu, diizocianatais ir kt. veikiant jau susintetintą nedidelės molekulinės masės polimerą.

Aziridiną polimerizuojant vandenyje [139] ar vandeniniame amoniako tirpale [140], galima gauti linijinį PEI, tačiau jo molekulinė masė nėra didelė, o polimerizacijos greitis tokiose terpėse yra itin mažas, todėl toks LPEI sintezės būdas nerado platesnio taikymo. Polimerizuojant 2-metilaziridinus [141] įvairiuose tirpikliuose (acetonitrilas, dimetilformamidas, 1,2-dichlormetanas) ir katalizatoriumi naudojant boro trifluordieterį, geriausiai reakcija vyko acetonitrile. Gauti linijiniai PEI (LPEI) buvo tirpūs dimetilsulfoksido bei chloroforme.

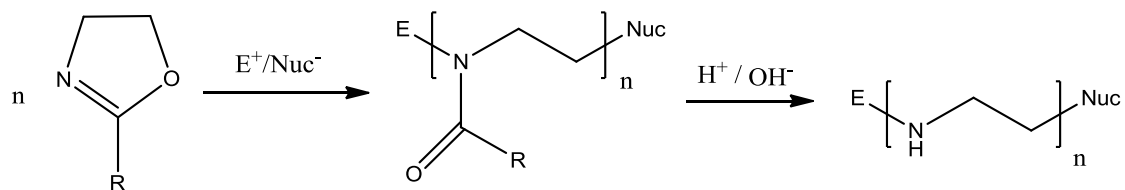
*N*-alkilintą LPEI galima gauti ir polimerizuojant *N*-pakeistus aziridinus [142, 143]. Pavyzdžiui, naudojant aziridino darinius su alkil- [143], benzil- [144], perfluoracil- [145], sulfonil- [146] ir piranil- [147] pakaitais, buvo sėkmingai susintetinti linijiniai PEI (1.5 schema).



1.5 schema. Polietileniminų sintezė iš *N*-pakeistų aziridino darinių.

Nors aziridine *N*-pakaitai reakcijos sąlygomis dažniausiai yra inertiški, tačiau kai kurie jų polimerizacijos eigoje linkę redukuotis (perfluoracil-) ar atskilti (piranil- ar sulfonil-), dėl ko susidaro ne tik pašaliniai reakcijos produktai, bet ir šakotas polimeras [142, 144, 147].

LPEI gaunamas iš 1,3-oksazolino-2-fenil-, heptil- ir kt. darinių, juos polimerizuojant katijoniniu būdu. R. Tomalia ir kt. [148] pirmieji 1966 metais aprašė 2-pakeistų 1,3-oksazolinų katijoninę polimerizaciją. Būtent 2-padėtyje pakeisti 1,3-oksazolino dariniai naudojami LPEI sintezei, nes nepakeistas 1,3-oksazolinas dėl savo paties baziškumo polimerizacijos eigoje linkęs hidrolizuotis [147, 149, 150]. Labai išsamiai linijinio LPEI sintezę išnagrinėjo T. Saegusa su bendradarbiais [151]. 2-pakeistų 1,3-oksazolinų katijoninės polimerizacijos būdu iš pradžių susintetinami linijinio polietilenimino acilinti dariniai. Juos hidrolizuojant rūgštinėje arba šarminėje terpėje, gaunamas linijinis polietileniminas [67, 151-154] (1.6 schema). Taip susintėtų LPEI molekulinė masė yra apie 5-22 kDa. Ją, priklausomai nuo katijoninės polimerizacijos sąlygų (monomero/iniciatoriaus santykis, likutinė drėgmė ir kt.), pavyksta gana nesunkiai reguliuoti.



1.6 schema. LPEI sintezė iš 2-pakeisto 1,3-oksazolino katijoninės polimerizacijos būdu.

Antroji LPEI sintezės stadija (hidrolizės) yra gana komplikauta, nes acilinti LPEI dariniai hidrolizuojami sunkiai [153]. Hidrolizės eiga taip pat priklauso nuo to, ar acilgrupė yra alifatinė ar aromatinė. Acetilinti, propionilinti ir benzoilinti LPEI dariniai dažniausiai hidrolizuojami labai rūgštinėje terpėje (konc. HCl), aukštos temperatūroje (100 °C) ir ilgą laiką [155-157]. Todėl minėtų ir panašių junginių hidrolizei ieškoma kitų alternatyvų. L. Wang ir kiti mokslininkai LPEI amidines grupes bandė hidrolizuoti fermentų pagalba [158]. L. Tauhardt mokslininkų grupė pirmoji pabandė rūgštinę hidrolizę vykdyti, esant mikrobangų poveikiui, bet reakcijos sąlygos nebuvo optimizuotos, nes nepavyko hidrolizės atlikti per trumpą laiką [159].

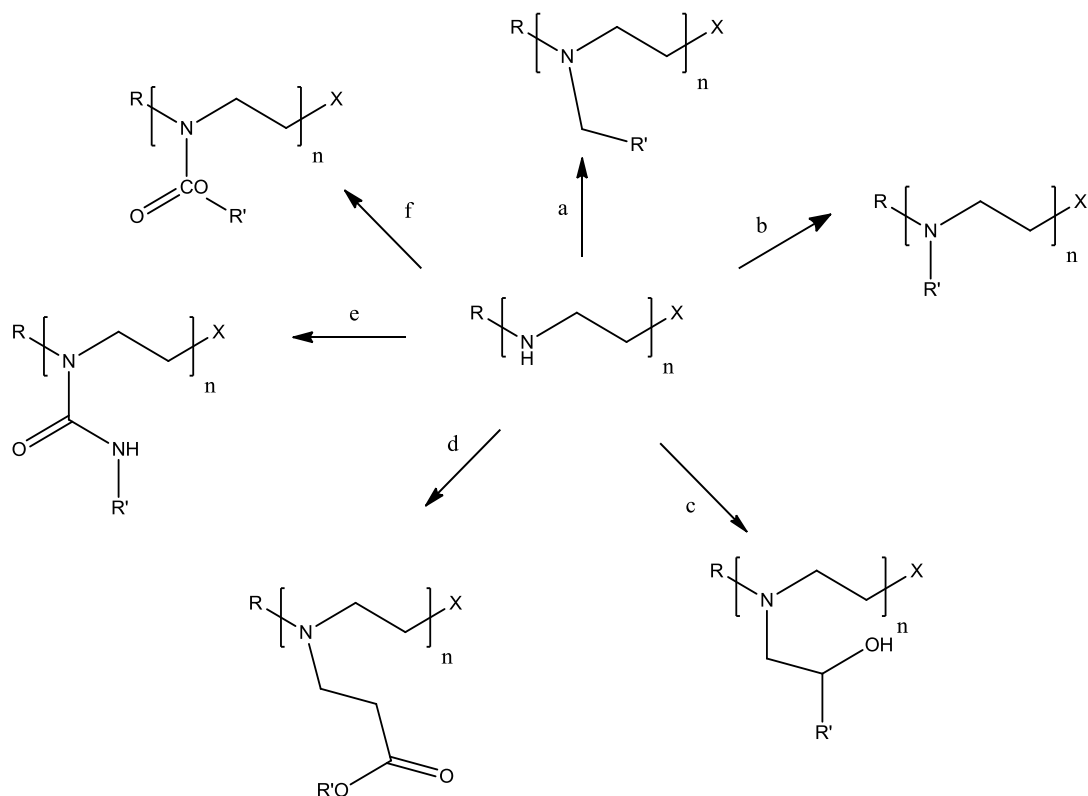
Panašiu būdu polimerizuojant 2-pakeistus 5,6-dihidro-1,3-oksazinus ir gautus produktus hidrolizuojant, galima susintetinti ir linijinį polipropileniminą (PPI). T. Saegusa PPI susintetino 1970 metais, polimerizuojant 2-pakeistus 5,6-dihidro-1,3-oksazinus nitrobenzene, inicijuojant metiltozilatų ir jodmetanu [160]. Kiti mokslininkai tokio tipo PPI susintetino naudojant iniciatoriumi perchloro rūgštį, polimerizaciją vykdant metanolyje [161].

Pastaruoju metu labai daug dėmesio skiriama polietilenglikoliais modifikuotiems PEI, nes PEG yra netoksiškas, neimunogeniškas ir biosuderinamas polimeras. PEI-PEG modifikatai pasižymi dideliu hidrofiliškumu ir gerai tirpsta fiziologiniuose skysčiuose [84, 162, 163]. PEG atšakos PEI-PEG polipleksų išorėje sukuria hidrofilinį sluoksnį, kuris ekranuoja PEI grandinių krūvio tankį, padidina polipleksų tirpumą bei juos steriškai stabilizuoja (sumažina polinkį agreguotis). Visa tai sumažina

polipleksų toksiškumą ląstelėms ir didina transfekcijos efektyvumą. Tačiau PEG grandys modifikuotuose PEI sukelia ir nepageidautinų efektų – susilpnina DNR bei siRNR kompleksavimą ir patekimą į ląsteles. Šio nepageidaujamo efekto mastas priklauso nuo PEG kiekio modifikuotame polimere, PEG molekulinės masės bei prijungimo tipo [164-166].

ŠPEI ir LPEI polietilenglikoliais modifikuojamas per pirmines/antrines aminogrupes naudojant įvairius PEG darinius. 1.7 schemoje pateikti galimi ŠPEI ir LPEI pirminių bei antrinių aminogrupių modifikavimo būdai: reakcija su aldehidais ir vėliau sekantis susidariusių Šifo bazių redukcinis alkilimas – (a) [167, 168], alkilhalogenidų nukleofilinio pakeitimo reakcijos – (b) [169], reakcijos su epoksidais (c) – [167], akrilatų adicijos reakcija – (d) [170, 171], prijungiant izocianatus – (e) [92] bei acilinant karboksirūgštimis ar jų dariniais – (f) [164, 172]. Tokie PEG aktyvavimo būdai leido efektyviai prijungti PEG prie PEI, tuo pačiu išspręsti daugelį fizikocheminių bei biologinių problemų, kylančių genų pernašos metu.

A. Malek ir kitos mokslininkų grupės [90, 173, 174] išsamiai tyrinėjo ir sintetino ŠPEI-MPEG (5 ir 25 kDa), kai įvairios molekulinės masės MPEG prijungiami per diizocianatus (heksametilendiizocianatą (HMDI) ar izoforondiizociantą (IPDI)). Tam buvo naudojami 0,55, 0,75, 2, 5, 20 ir 30 kDa MPEG. Atlikę eilę sintezių autoriai pastebėjo, kad labai svarbu parinkti tinkamą hidroksi- ir izociantogrupių santykį, nes, priešingu atveju, likus izociantogrupių pertekliui, galimos PEI susiuvimo reakcijos, kas lemtų prastą MPEG grandinių turinčių junginių tirpumą. Buvo nustatyta, kad prijungimas per IPDI vyksta geriau nei per HMDI. IPDI pasižymi nedideliu toksiškumu, geresniu tirpumu bei stabilumu reakcijos terpėje. Įvairios molekulinės masės izocianatogrupėmis modifikuoti MPEG jungiami prie ŠPEI ir buvo pastebėta, kad galima prijungti nuo 4 iki 35 MPEG atšakų, kai naudojami nedidelės molekulinės masės MPEG (0,55, 2 ir 5 kDa). O kai MPEG molekulinė masė didesnė (20 ir 30 kDa), prijungiama nuo 1 iki 3 grandžių. Autoriai, pastebi, kad modifikuojant su didelės molekulinės masės MPEG, reikalinga ilgesnė reakcijos trukmė bei švelnesnės reakcijos sąlygos.



1.7 schema. ŠPEI ir/arba LPEI aminogrupių modifikavimas.

Daugelis autorių [88, 175, 176] LPEI ir ŠPEI modifikavimui naudoja komercinius MPEG/PEG darinius: sukcinimidil- $\alpha$ -metilbutanoatą, sukcinimidilkarboksimetilatą,  $\alpha$ -amino- $\omega$ -karboksirūgštis ir kitus darinius. Jie lengvai prisijungia prie PEI pirminių ar antrinių aminogrupių.

Taip pat MPEG/PEG gali būti prijungiamas, vykdant polimerizacijos ar poliadicijos reakcijas, gaunant diblokinius ar triblokinius PEI-PEG kopolimerus [177, 178]. Vykdant LPEI poliadicijos reakcijas su MPEG/PEG akrilatais ir diakrilatais (PEG molekulinė masė 258, 575 ir 700 Da), buvo prijungiama po 1 PEG grandį [179]. Vykdant aziridino katijoninę polimerizaciją, MPEG aminos (5, 10 ir 20 kDa) gali būti naudojamas kaip augančią grandinę nutraukiantis agentas. Taip katijoninės polimerizacijos būdu gaunami MPEG atšakų turintys ŠPEI ir LPEI [178]. Efektyviausiai grandinės nutraukimo reakcija vyko su MPEG aminu, kurio molekulinė masė 5 kDa, tuo tarpu su 10 ir 20 kDa MPEG amino prijungimas vyksta apsunkintai ir reakcijos



mišinyje lieka nesureagavusio MPEG amino. Naudojant 3,4 kDa molekulinės masės PEG-bis(tozilata) kaip katijoninės polimerizacijos iniciatorių, polimerizacijos eigoje gaunamas triblokis PEI-PEG-PEI kopolimeras.

Apibendrinant ŠPEI ir LPEI bei jų darinių sintezę ir panaudojimą genų transfekcijai, galime pastebėti, kad tokie junginiai yra vieni iš efektyviausių transfekcijos vektorių šiai dienai. Visa eilė šių polimerų buvo komercializuoti ir žinomi tokiais prekybiniais vardais: *brPEI*, *PEtOx*, *Polyethyleneimine MAX* (ŠPEI tipo) ir *ExGen500*, *jetPEI*, *lPEI* (LPEI tipo). Šių vektorių molekulinė masė svyruoja nuo 0,4 iki 500 kDa, o polidispersiškumo rodiklis nuo 1,1 iki 4. Vykdam katijoninę aziridino polimerizaciją susiduriama su kai kuriomis problemomis: sunku išvengti šalutinių reakcijų, kontroliuoti PEI šakotumą bei molekulinę masę. Be to, moksliniuose straipsniuose trūksta informacijos apie sintezės sąlygų įtaką polialkileniminų šakotumui bei molekulinei masei. ŠPEI ir LPEI galima modifikuoti MPEG grandimis labai įvairiais būdais.

## **1.4 Polialkileniminų sintezė polikondensacijos būdu**

### **1.4.1 Polikondensacijos reakcijos ypatybės ir jos mechanizmas**

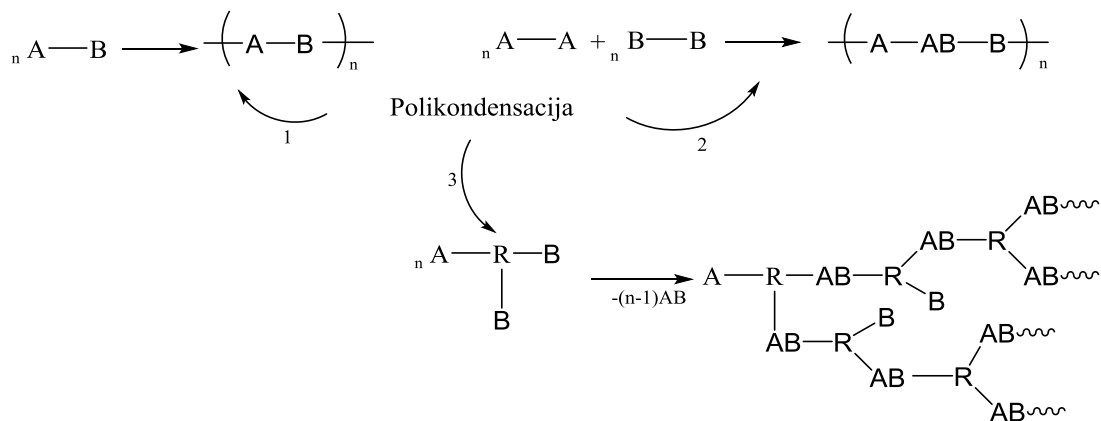
Polikondensacijos (PK) terminą 1929 metais įvedė W.H Carothers [180]. Polikondensacija (PK) – tai polimerų sintezės būdas, kai į makromolekules jungiasi monomerai bei įvairaus polimerizacijos laipsnio jų dariniai, ir tuo pat metu susidaro mažamolekuliai reakcijos produktai. PK metu monomerai į grandinę jungiasi palaipsniui, nedalyvaujant iniciatoriui ir polimerizacijos metu vyksta tik vieno tipo reakcija. Monomerai gali jungtis prie įvairaus polimerizacijos laipsnio darinių, bei šie dariniai gali jungtis tarpusavyje. Tai reiškia, kad monomerai išsieikvoja labai greitai, bet polimerizacijos laipsnis didėja palaipsniui, todėl didelės molekulinės masės polikondensatai susidaro tik esant dideliame reakcijos baigties laipsniui.

Priklausomai nuo monomerų bei reakcijos eigos, galime išskirti tokius PK tipus:

- Difunkcinių ir daugiafunkcinių monomerų polikondensacija [181];
- Homo- ir hetero- bei kopolikondensacija [181];
- Pusiausviroji ir nepusiausviroji polikondensacija [182, 183];
- Kinetiškai ir termodinamiškai kontroliuojama polikondensacija [184, 185].

PK reakcijose gali dalyvauti įvairaus funkcionalumo monomerai. 1.8 schemeje 1 ir 2 reakcijų pavyzdžiu pavaizduota difunkcinių, o 3 – daugiafunkcinių monomerų PK. Jei tarpusavyje reaguoja tik vieno monomero funkcinės grupės, tokie procesai vadinami homopolikondensacija (1.8 schema, 1 būdas). Homopolikondensacijoje dalyvaujantys monomerai simboliškai vadinami AB tipo monomerais, o jų polikondensacija dar ir AB-polikondensacija. Jei reakcijoje dalyvauja du skirtingos cheminės sudėties monomerai, kai vienas iš jų turi vieno tipo, o kitas – kito tipo tarpusavyje sureaguojančias funkcinės grupes, tai procesai vadinami heteropolikondensacija (1.8 schema, 2 būdas), o tokie monomerai simboliškai vadinami AA ir BB tipo monomerais. Todėl kartais tokia polikondensacija vadinama AA/BB-polikondensacija. Žinomi ir kopolikondensacijos atvejai, kai reakcijoje dalyvauja trys arba daugiau skirtingos cheminės sudėties monomerai. Kai bent vienas PK reakcijoje dalyvaujantis monomeras turi daugiau kaip dvi funkcinės grupes, tokia reakcija vadinama daugiafunkcinių monomerų PK (3 reakcija 1.8 schemeje) [181].

Pusiausviroji PK apibūdinama kaip lėtai vykstanti reakcija, kai sistemos būseną kiekvienu momentu nežymiai skiriasi nuo pusiausvirošios. Pusiausvirošios PK atveju tiesioginės (kondensacijos) ir grįžtamosios (susidariusio ryšio skilimo) reakcijų greičiai skiriasi nedaug. Be to, šiuo atveju polimero susidarymo greitis dar gali priklausyti ir nuo šalutinių reakcijų greičio.



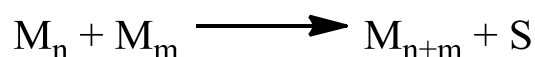
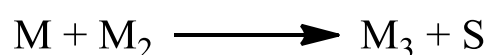
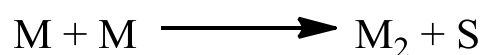
1.8 schema. Difunkcinių ir daigiafunkcinių monomerų PK.

Nepusiausvirošios polikondensacijos atveju tiesioginės reakcijos greitis yra žymiai didesnis už grįžtamųjų ir šalutinių reakcijų greitį arba grįžtamoji reakcija nevyksta visai. Toks atvejis įmanomas tuomet, kai susidaręs mažamolekulis junginys neskaldo kondensacijos metu susidariusio ryšio (pavyzdžiui, sintetinant tiokolus, susidaręs NaCl neskaldo -S-S- ryšių pagrindinėje grandinėje). Bendru sutarimu PK laikoma pusiausvirąja, jei jos reakcijos pusiausvyros konstanta mažesnė už 1000, ir nepusiausvirąja, jei ji didesnė [182, 183].

H.R. Kircherdolf mokslinė grupė išskyrė dar du PK tipus – kinetiškai (KKP) ir termodinamiškai (TKP) kontroliuojamą polikondensacijas [184, 185]. Esant KKP, grįžtamosios reakcijos nevyksta, todėl tarp įvairios architektūros polikondensatų (linijinių ir įvairaus dydžio ciklinių molekulių) jokios tarpusavio persigrupavimo reakcijos (peresterinimas, peramidinimas ir pan.) taip pat nevyks. Todėl reakcijos produkto sudėtis nebūtinai bus optimali termodinaminiu (t. y., patvarumo ar stabilumo) požiūriu ir joje vyraus ta makromolekulių forma, kuri pagal atitinkamas reakcijų greičio konstantas susidarys greičiau. TKP atveju dėl joje intensyviai vykstančių grįžtamojo pobūdžio reakcijų, reakcijos produktuose vyraus termodinamiškai patvariausia molekulių forma. Tačiau H.R Kircherdolfo teorijos paradoksas yra tame, kad, jei pasiekiamas 100 %-inis PK reakcijos baigties laipsnis, ir KKP ir TKP

atvejais reakcijos produktą turėtų sudaryti vien tik ciklinės molekulės. Tą rodo ir teoriniai skaičiavimai ir eilė praktiškai atliktų tyrimų. Apibendrinant KKP ir TKP teoriją, galima teigti, jog ji konceptualiai sujungia pusiausvrios ir nepusiausvrios polikondensacijos dėsningumus su ciklizacijos dėsningumais polikondensacijoje.

Daugelyje literatūros šaltinių PK mechanizmas apibūdinamas kaip monomerų jungimasis susidarant dimerams, kurie, savo ruožtu jungdamiesi su monomerais ar dimerais, sudaro aukštesnio polimerizacijos laipsnio darinius. Kiekvieno prisijungimo pasekoje atskyla mažamolekulis junginys, o susidariusios aukštesnio polimerizacijos laipsnio molekulės išlieka aktyvios, ir toliau jungiasi į ilgesnę makromolekulę [186, 187, 188]. Toks polikondensacijos mechanizmas pavaizduotas bendra 1.9 schema.



1.9 schema. Polikondensacijos mechanizmas: M – monomeras; 2, 3, n ir m – polimerizacijos laipsniai; S – mažamolekulis reakcijos produktas.

J.P. Flory ir A.W. Carothers atlikę daugybę eksperimentinių ir teorinių darbų, išvedė keletą labai svarbių lygčių bei apibrėžė terminus, naudojamus PK reakcijoms kiekybiškai apibūdinti. Tai reakcijos baigties laipsnis (U) ir polimerizacijos laipsnis ( $\overline{DP}$ ) [189-193].

Reakcijos baigties laipsnis pagal Carothers išreiškiamas 1.1 formule:

$$U = \frac{N - N_0}{N_0} \quad (1.1),$$

kurioje  $N_0$  – tai monomerų molekulių skaičius prieš reakciją, o  $N$  – praėjus tikram reakcijos laikui. Tuomet galima teigti, jog  $N_0 - N$  molekulių sudarė polimerinę grandinę.

1.1 lygtį pertvarkius į 1.2 lygtį, iš jos galima apskaičiuoti  $N$  – nesureagavusių molekulių skaičių bet kuriuo reakcijos laiku momentu:

$$N = N_0(1 - U) \quad (1.2),$$

Polimerizacijos laipsnis ( $\overline{DP}$ ) yra išreiškiamas 1.3 formule:

$$\overline{DP} = \frac{1}{1 - U} \quad (1.3).$$

Polikondensacijos reakcijas galime priskirti nukleofilinio pakeitimo reakcijoms ( $S_N1$  ir  $S_N2$ ) [187, 193]. Daugelis polikondensacijos reakcijų vyksta pagal  $S_N2$  reakcijos mechanizmą, t. y. pagal bimolekulinio nukleofilinio pakeitimo mechanizmą ir kinetiką. Tokios polikondensacijos reakcijos vyksta tarpusavyje reaguojant  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOCl}$ ,  $-\text{NCO}$ ,  $-\text{COCl}$ ,  $-\text{Cl}$  ir panašioms grupėms. Taip gaunami poliesteriai, poliamidai, poliimidai, polikarbonatai, polibenzimidazolai, polisulfidai, polisulfonai ir kt. [187, 193]. Nukleofilas – anijonas ar dalelė, turinti grupę su padidintu elektronų tankiu, atakuoja dalinai teigiamą krūvį turintį anglies atomą tuo pačiu metu, kai šį atomą palieka nueinanti grupė. Lengviausiai nueinančios grupės, kurių neigiamas krūvis labiausiai stabilizuotas (delokalizsuotas) yra silpnesnės bazės. Bimolekulinio nukleofilinio pakeitimo reakcijų greitis priklauso nuo abiejų

reaguojančių medžiagų koncentracijos ir didėja didėjant nukleofilo koncentracijai bei reaktiškumui. Neigiamą krūvį turintis nukleofilas visada reaktingesnis nei jo konjuguotoji rūgštis. Lyginant nukleofilus tarpusavyje, nukleofiliškumas sutampa su junginio bazingumu:  $\text{RO}^- > \text{HO}^- > \text{RCOO}^- > \text{ROH} > \text{H}_2\text{O} > \text{NH}_3$ .

Sintetinant polikondensacinius polilakileniminius, reakcijoje dalyvauja alkilhalogenidas su aminu, todėl tokios reakcijos mechanizmas ir greitis priklausys nuo to, kaip ir lengvai pasišalins nueinanti grupė (halogeno anijonas), nuo aminogrupės nukleofiliškumo bei tirpiklio.

Vykstant  $\text{S}_{\text{N}}2$  reakcijoms halogenidas sunkiau atplėšiamas, kai prijungtas prie tretinio anglies atomo, nes nukleofilui sunkiau „prieiti“ prie steriškai „apkrauto“ anglies atomo ir sudaryti naują ryšį.  $\text{S}_{\text{N}}1$  reakcijose stebimas atvirkštinis efektas – lengviausiai atplėšiamas halogenidas nuo tretinio anglies atomo, nes reakcija vyksta per dvi stadijas, susidarant stabiliam karbokatijonui. Todėl reakcijos greitis  $\text{S}_{\text{N}}2$  reakcijose padidėja, kai pakaitų kiekis alkilhalogenide sumažėja, o  $\text{S}_{\text{N}}1$  reakcijose stebimas atvirkštinis procesas. Abiem atvejais greičiausiai reakcijoje dalyvaujantys bei lengviausiai nueintys halogenai halogeniduose išsidėsto tokia tvarka:  $\text{R-I} > \text{R-Br} > \text{R-Cl} > > > \text{R-F}$  [194-197].

Kadangi aminai yra daug stipresni nukleofilai nei vanduo ar alkoholiai, visa eilė  $\text{S}_{\text{N}}2$  reakcijų gali vykti vandenyje ir alkoholiuose. Aminų nukleofiliškumas didėja, mažėjant pakaitų kiekiui prie azoto. Vykstant reakcijai tarp amoniako ir alkilhalogenido, susidaro pirminio amino druska. Tačiau jei reakcijos mišinyje yra nesureagavusio amoniako, gali vykti rūgštinė/bazinė reakcija, kurioje amoniakas reaguoja kaip bazė, prijungdamas protoną iš susidariusio amonio jono, susidarant pirminio amino bazei. Tokiai alkilnimo-deprotonizavimo reakcijai vykstant toliau, reakcijos mišinyje susidaro ne tik pirminis aminas, bet ir antrinis bei tretinis aminai, jų druskos, bei ketvirtinio amonio druska [198-200].

Nuo tirpiklio poliškumo priklauso nueinančios grupės nukleofiliškumas. Buvo nustatyta, kad vandenyje ir alkoholiuose alkilhalogenidų nueinančios

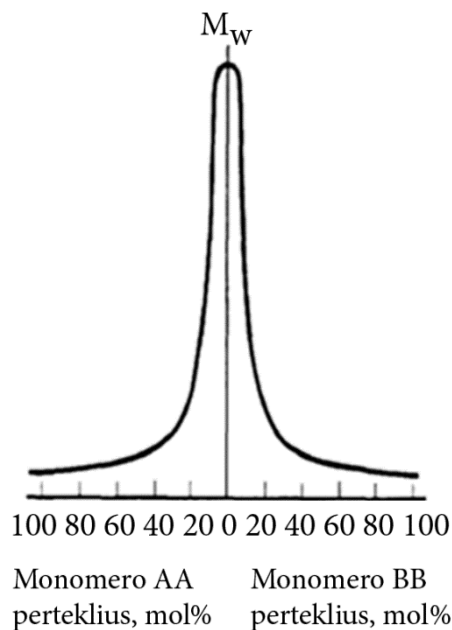
grupės išsidėsto tokia pat tvarka kaip ir dalyvaujant halogenidams  $S_N2$  reakcijose, o kituose tirpikliuose išsidėstymas priešingas. Tirpikliai, solvatuodami halogenidus/aminus, pagreitina arba sulėtina  $S_N2$  reakcijų eigą. Išsamiau tirpiklių įtaka polikondensacijos reakcijoms aptarta 1.4.2 skyriuje.

Nepaisant to, kad polikondensacija buvo pradėta intensyviai tirti dar 1929 metais, iki šių dienų ji vis dar labai domina viso pasaulio mokslininkus. W.H. Carothers ir J.P. Flory tyrinėjo polikondensaciją tiek teoriškai, tiek praktiškai. Šių mokslininkų išvestais dėsniniais sėkmingai naudojami ir šiomis dienomis. Iš pažiūros polikondensacijos reakcijos atrodo labai paprastos ir nesudėtingos, bet vykdant eksperimentus susiduriama su nemažai iššūkių.

#### **1.4.2 Reakcijos sąlygų įtaka polikondensacijai**

PK reakcijų metu keičiant monomerų funkcionalumą bei reakcijos sąlygas, gaunami įvairios struktūros bei savybių polimerai. Didelės molekulinės masės produktai susidaro tik pasiekus didelį reakcijos baigties laipsnį (0,99 ir daugiau). Vykstant reakcijai gali susidaryti šalutiniai produktai: cikliniai junginiai ar skilimo produktai. Deja, ne visada pavyksta reakcijas įvykdyti idealiomis sąlygomis ir gauti reikalingų savybių produktus [186, 187].

Literatūroje labai plačiai aprašoma monomerų funkcionalumo bei jų funkcinių grupių stochiometrijos įtaka produkto struktūrai ir savybėms. Kaip jau buvo minėta 1.4.1 skyriuje, PK gali dalyvauti difunkciniai ir daugiafunkciniai monomerai. Naudojant AB tipo monomerus, reakcijos mišinyje visuomet bus idealus balansas tarp tarpusavyje reaguojančių grupių A ir B. AA+BB bei daugiafunkcinių monomerų atveju, funkcinių grupių stochiometriškumas gali būti nesunkiai reguliuojamas, keičiant monomerų molinį santykį tarp monomerų. Nuo šio santykio priklausys gaunamos molekulinės masės maksimalus dydis, o daugiafunkcinių monomerų atveju – ir makromolekulių architektūra. AA+BB monomerų atveju polimerų molekulinės masės priklausomybę nuo monomerų pertekliaus mol% iliustruoja 1.3 paveikslas [186].



1.3 pav. Molekulinės masės priklausomybė nuo monomerų pertekliaus reakcijos mišinyje, mol%.

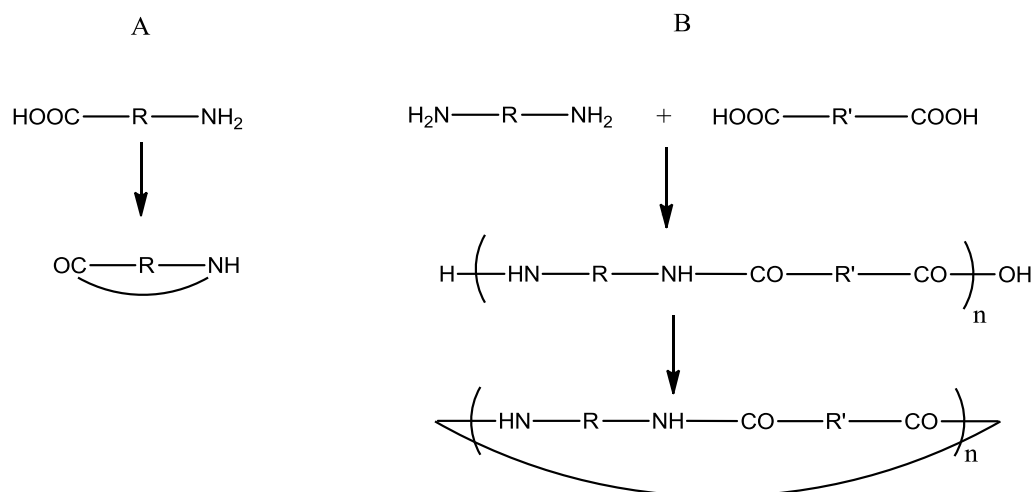
PK naudojant AB ar AA+BB tipo monomerus, teoriškai turėtų susidaryti tik linijiniai polimerai. Tačiau eksperimentiškai buvo nustatyta, jog kartais, be linijinio polimero, dar susidaro ir ciklinių nedidelės molekulinės masės darinių. Didžiausia tikimybė gauti ciklinius junginius, kai AB, AA ar BB yra linijinės molekulės, sudarytos iš ne daugiau kaip penkių anglies atomų. Reaguojant amino-, hidoksi- ir karboksigrupių turintiems monomerams (1.10°schema) taip gaunami laktamai, laktonai, cikliniai oligoesteriai [186].

Tokio tipo PK reakcijų metu ciklizacijos reakcija konkuruoja su linijinio polimero susidarymo reakcija. Viena iš priežasčių, kodėl susidaro ciklai, – tai mažas atstumas tarp funkcinių grupių, leidžiantis joms sąveikauti tarpusavyje. Todėl ypač palankiai ciklizuojasi AB tipo monomerai, turintys po 4-5 anglies atomus.

Šiam atstumui didėjant, tikimybė, kad AB monomero funkcinės grupės susidurs erdvėje, labai sumažėja. Tai galioja ir dimerams bei aukštesnio polimerizacijos laipsnio dariniams, gautiems iš AA ir BB monomerų, ir visa tai vadinama kinetine ciklų susidarymo tikimybe. Tačiau ciklizaciją lemia ne tik



tikimybiniai, bet ir termodinaminiai dėsniai. Tai buvo nustatyta atlikus kelis ciklų patvarumo, priklausomai nuo jų narių skaičiaus, tyrimo eksperimentus [187].

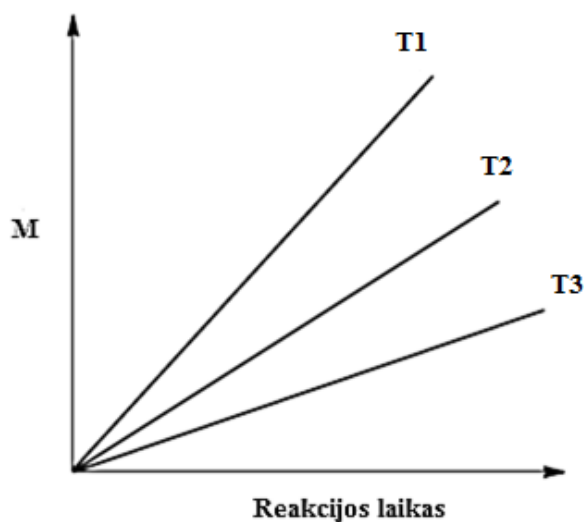


1.10 schema. Difunkcinių monomerų ciklizacija.

Tarpusavyje lyginant tą patį anglies atomų skaičių turinčius n-alkanus su cikloalkanais, nustatyta, jog cikloalkanų termodinaminis stabilumas priklauso nuo įtempio tarp anglies atomų cirklose, kuris savo ruožtu priklauso nuo ciklo dydžio. Įtempiai labai dideli 3-4 narių cirklose, drastiškai sumažėja 5, 6 ir 7 narių cirklose ir vėl padidėja 8-13 narių cirklose, bet galiausiai visiškai išnyksta labai dideliuose cirklose. Monomero struktūra taip pat turi įtakos ciklų susidarymui [187, 188]. Pavyzdžiui, ftalio rūgštis labiau linkusi sudaryti ciklinius darinius, nei tereftalio rūgštis. Jei PK yra pusiausvyroje, be ciklizacijos reakcijų, dar galimos kitos pašalinės reakcijos, tokios kaip grandžių tarpusavio persigrupavimo reakcijos ir nutrūkimas. Grandys tarpusavyje persigrupuoja, jeigu galinės grupės sąveikauja su viduje makromolekulės esančiu heteroryšiu ir jį suardo. Manoma, jog toks persigrupavimas mažai tikėtinas, jei tarpusavyje sąveikauja dvi polikondensacijos eigoje jau susidariusios intramolekulinės funkcinės grupės. Pavyzdžiui, sintetinant poliesterius, sąveikos tarp esterinių grupių yra mažai

tikėtinos. Nutrūkimo reakcijos apima visas reakcijas, dėl kurių polikondensato galinės funkcinės grupės tampa neaktyvios tolimesnėje polikondensacijos reakcijoje. Taip nutinka, kai galinės funkcinės grupės sureaguoja su monofunkciniais dariniais [186, 191].

PK reakcijos eiga priklauso nuo įvairių veiksnių: monomerų struktūros bei koncentracijos, tirpiklio, temperatūros, trukmės [189]. Ilginant reakciją ar ją vykdant aukštesnėje temperatūroje, paprastai gaunami disesnės molekulinės masės produktai (1.4 pav.). Todėl, norint gauti nedidelės molekulinės masės produktus, tam tikru laiko momentu PK reakciją reikia sustabdyti (pavyzdžiui, šaldant). Jei reakcija nutraukiama pasiekus nedidelį reakcijos baigties laipsnį, polimere dar lieka daug nesureagavusių funkcinų grupių, kurios, nors ir nedideliu greičiu, bet gali reaguoti toliau arba trukdyti praktiniam polimero taikymui.



1.4 pav. Molekulinės masės priklausomybė nuo reakcijos trukmės ir temperatūros, kai  $T1 > T2 > T3$ .

Kitas svarbus veiksnys – AA ir BB tipo monomerų grynumas, kuris lemia jų funkcinų grupių balansą/disbalansą [186]. Be to, reakcijos eigoje galimi vieno ar kito monomero nuostoliai, jeigu monomeras lakus, o reakcijos temperatūra – didelė.

Kai kurie autoriai pabrėžia [186, 187], kad, kai monomerų koncentracija reakcijos mišinyje didelė, labiau tikėtinas linijinio polimero susidarymas. Ciklizacijos reakcijos labiau tikėtinos praskiestuose tirpaluose, nes ciklizacija yra monomolekulinė (t. y. vidumolekulinė) reakcija, o linijinės grandinės susidarymas – bimolekulinė.

Polikondensacijai labai didelės įtakos turi tirpiklis [201]. Jis gali tirpinti ar išsodinti polimerą, didinti ar mažinti reakcijos greitį arba savitai veikti reakciją. Poliniai tirpikliai padidina polimerizacijos greitį tuo atveju, jei susidariusi makromolekulė yra poliškesnė už pradines reaguojančias medžiagas. O trukdo, jei ši kombinacija yra priešinga. Reakcijos eigai taip pat gali trukdyti savitos tirpiklio sąveikos su monomerų funkcinėmis grupėmis, jei dėl jų sumažėja funkcinių grupių reaktingumas.

$S_N2$  tipo reakcijose didelį vaidmenį atlieka tirpikliai ir jų poveikis labiausiai priklauso nuo tirpiklio poliškumo bei protoniškumo. Tirpiklio poliškumą parodo jo dipolio momentas, tačiau praktikoje patogiau vadovautis jų dielektrinės konstantos dydžiu. Jei tirpiklio dielektrinė konstanta ( $\epsilon$ ) didesnė už 15, jis laikomas poliniu. Polinis tirpiklis vadinamas protoniniu, jei jis pasižymi protonų donoringomis savybėmis. Kitaip sakant, turi judrių vandenilio atomą. Tipiniai protoniniai tirpikliai turi O-H ar N-H grupių, tarp kurių lengvai susidaro vandeniliniai ryšiai. Protoniniai tirpikliai gerai solvatoja nukleofilus, todėl nukleofilai  $S_N2$  reakcijose tampa mažiau aktyvūs. Polinių protoninių tirpiklių pavyzdžiai pateikti 1.2 lentelėje [202-205].

Poliniai aprotoniniai tirpikliai pasižymi poliškumu, tačiau neturi judraus vandenilio atomo. Jie laikomi gerais tirpikliais  $S_N2$  reakcijoms, nes, būdami protonų akceptoriais, su neutraliais nukleofilais sudaro vandenilinį ryšį ir taip padidina nukleofilų nukleofiliškumą. Be to, jie nesolvatoja anijoninių nukleofilų, bet gerai solvatoja tarpinius reakcijos kompleksus. Dėl šios aplinkybės jie daro ypač palankią įtaką  $S_N2$  reakcijų eigai. O poliniai protoniniai tirpikliai gali nukleofiliškai sąveikauti su elektrofilais ir elektrofiliskai – su nukleofilais. Todėl tokiuose tirpikliuose  $S_N2$  reakcijų eiga pasunkėja. Šie tirpikliai labiau tinkami  $S_N1$  reakcijoms, nes skatina elektrofilo

disociaciją ir gerai solvuoja susidariusius anijonus ir katijonus. Polinių aprotoninių tirpiklių pavyzdžiai pateikti 1.2 lentelėje [202, 206].

1.2 lentelė. Polinių protoninių ir aprotoninių tirpiklių dielektrinių konstantų ( $\epsilon$ ) ir dipolio momentų ( $\mu$ ) reikšmės [202]

Aprotoniniai	$\epsilon$	$\mu$	Protoniniai	$\epsilon$	$\mu$
Dimetilsulfoksidas	47	3,9	Vanduo	78	1,8
<i>N,N</i> -dimetilformamidas	37	3,9	Metanolis	33	1,7
Acetonitrilas	38	3,9	Etanolis	25	1,7
Acetonas	21	2,9	Metano rūgštis	59	1,4
Propilenkarbonatas	65	4,9	Etilenglikolis	37,7	2,3
<i>N,N</i> -dimetilacetamidas	38	3,7	2-propanolis	18,3	1,7

Buvo nustatyta, kad reakcijos greičio konstantos didėja, didėjant tirpiklio aprotoniškumui, t. y., kuo tirpiklis labiau aprotoninis, tuo greičio konstantos didesnės [200, 203, 204].

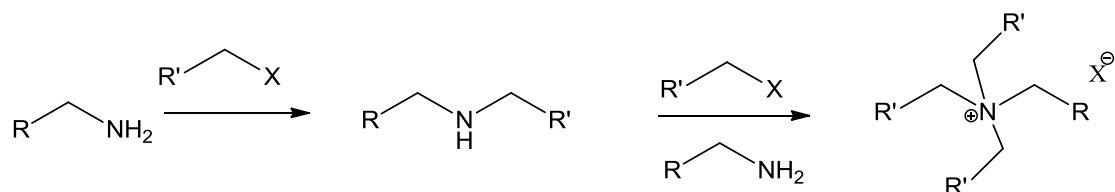
Apibendrinant pateiktą medžiagą galima teigti, jog polikondensacijos eigai, sintetinamų polikondensatų molekulių architektūrai bei molekulinei masei labai didelę įtaką daro monomerų mišinio sudėtis, monomerų koncentracija, reaguojančių grupių tarpusavio santykis, reakcijos temperatūra, trukmė bei terpė (tirpiklis).

### 1.4.3 Dihalogenalkanų ir diaminoalkanų polikondensacija

Alifatinių aminų reakcijos su alifatiniais halogenidais buvo pradėtos tyrinėti dar 1862 metais, kai A.W. Hoffman iš jodmetano ir amoniako susintetino dimetilaminą [207]. Toks alkilavimo būdas poliaminų sintezei buvo pritaikytas tik 1936 metais, kai N.M. Moonkin [208] užpatentavo alifatinių poliaminų sintezės iš 1,2-dichloretano ar 1,2-dichlorpropano ir amoniako būdą. Šių monomerų tarpusavio reakcijos buvo vykdomos aukštoje temperatūroje (120-300 °C), esant slėgiui, tirpikliu naudojant vandenį, MeOH, etanolį bei jų mišinius. Naudojant 1,2-dichloretaną buvo pastebėta, kad susidarančių produktų molekulinė masė priklausė nuo monomerų molinio santykio ir didėjo, kai amoniako dalis reakcijos mišinyje buvo didinama. Jei vandens buvo imama 18 kartų pagal masę daugiau nei amoniako, reakcija truko tik 1 val., o ši vandens kiekį sumažinus 4 kartus, reakcija nesibaigė net ir po 3 val. Gauti reakcijos produktai – tai įvairių poliaminų (etilendiamino, dietilentriamino, trietilentriamino ir didesnės molekulinės masės poliaminų) mišinys. Reakcijai naudojant 1,2-dichlorpropaną, gaunamas tripropilentetraminas ir kiti įvairūs poliaminai, kurie frakcionuojami distiliavimo būdu. Buvo pastebėta, kad, vykdant reakcijas H<sub>2</sub>O/MeOH mišiniuose, kai metanolio yra 5-10 %, reakcija pagreitėja, o sumažinus reakcijos temperatūrą – sulėtėja. Naudojant reakcijoms tik alkoholius (be vandens), gaunami mažesnės molekulinės masės poliaminai. Gauti alifatiniai poliaminai buvo naudojami įvairių organinių medžiagų, tame tarpe ir emulsiklių, sintezėms. Šie emulsikliai buvo gaminami susintetintus alifatinis poliaminus veikiant oleino ar stearino rūgštimis, o taip ir naftilen- bei sulfograpių turinčiomis sočiosiomis rūgštimis. Susintetinti emulsikliai buvo panaudoti gumos ir latekso gamyboje. Labai panašių junginių sintezę 1956 metais patentavo S.D. Dilevski [209] ir bendraautoriai. Tačiau šiuo atveju vietoje amoniako buvo naudojamas amoniako ir dietilentriamino mišinys. Patento autoriai nurodo, kad poliaminų išeigos buvo didesnės nei prieš tai publikuotuose patentuose.

1974 metais J.P. Petrovich [210] užpatentavo dervų iš dihaloalkanų ir polialkilenpoliaminų sintezę. Pirmos sintezės stadijos metu susidarę nedidelės molekulinės masės linijiniai ar šakoti polikondesacijos produktai vėliau vandenyje buvo susiuvami epichlorhidrinu, taip gaunant dervas, tinkamas naudoti popieriaus pramonėje kaip celiuliozės drėgmės reguliklius. Šiame patente pirmos stadijos produktai, pavadinti aduktais (skirtingų molekulių junginys, kuriame atomų jungimosi tvarka lieka nepakitusi), buvo gaunami kondensuojant 1,2-dichloretaną, 1,2-dibrometaną, 1,2-dijodetaną, 1,3-dichlor-2-metilpropaną, 1,3-dichlor-2-butilpropaną ar 1,3-dibrom-2-hidroksipropaną su heksametilendiaminu, 1,8-oktametilendiaminu, 1,10-dekametilendiaminu bei bisheksametilediaminu. Reakcijos buvo vykdomos 25-90 °C temperatūroje vandenyje, alkoholiuose ar jų mišiniuose, naudojant 0,5 ar 0,95 diaminoalkano ekvivalentą vienam dihalogenido ekvivalentui. Aduktų molekulinė masė buvo nustatyta jų klamos matavimo būdu ir buvo pastebėta, kad didesnės molekulinės masės junginiai gaunami tuomet, kai reakcija vykdoma vandenyje su 0,95 ekvivalento diaminoalkano vienam dihalogenido ekvivalentui. Labai įdomu, kad reakcijose su 1,2-dichloretanu buvo gaunami cikliniai piperazino eilės aduktai.

Panašias ciklizacijos tendencijas pastebėjo ir kiti mokslininkai, tyrę 1,2-etilendiamino (EDA) reakciją su 1,2-dichloretanu ar 2,2-dichlordietileteriu [211]. Jie nustatė, jog reakcijos produktuose yra ciklinių junginių – piperazino ir 2-etilaminomorfolino. Šio junginio egzistavimas rodo, kad, įvykus pradinei etilendiamino ir 2,2-dichlordietileterio reakcijai ir susidarius protonizuotai antrinei aminogrupei, ji gali būti dar nesureagavusių aminų deprotonuojama ir toliau alkilinama papildomai. Todėl reakcijos produktuose atsiranda tretinių bei ketvirtinių aminogrupių turinčių junginių. T. y., vyksta tokios pat reakcijos, kurias buvo nustatęs A.W. Hoffmann [207]. Paprasčiausiu atveju, kai reakcijoje dalyvauja pirminis monoaminas su pirminiu monoalkilhalogenidu, reakcijos produktą sudaro antrinių, tretinių ir ketvirtinių aminų mišinys (1.11 schema):



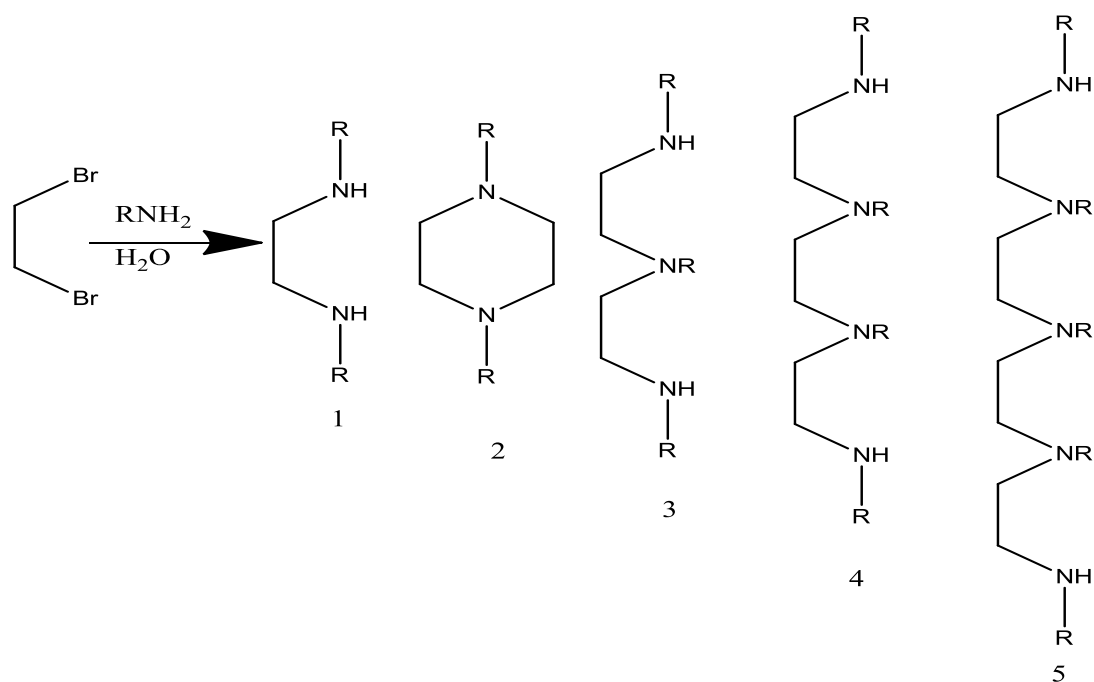
1.11 schema. P. Hofmann alikilinimo reakcija [207].

Iš tokių reakcijos produktų atskirų aminų išskyrimas yra pakankamai sudėtingas, todėl organinių junginių sintezėje ši reakcija nebuvo labai populiaru ir plačiai taikoma.

DMF tirpale kambario temperatūroje polikondensuojant 1,2-etilendiaminą su *p*-dichlormetilbenzenu (DMB) [212] (1 EDA ekvivalentui buvo imti 0,8, 1,1, 1,25 ir 1,5 DMB ekvivalentai), gauti susiūti reakcijos produktai. Didinant DMB kiekį reakcijos mišinyje, reakcijos produktų išeigos didėjo. Susintetintus netirpius produktus straipsnio autoriai siūlo naudoti kaip jonitus vandens valymui, nes jie gerai suriša sunkiųjų metalų jonus.

Labai panašios polikondensacijos reakcijos buvo vykdomos ir kituose eksperimentiniuose darbuose. Tik čia buvo naudoti monoaminai ( $RNH_2$ ,  $R = Me, Et, i-Pr, t-but, Ph$ ) ir 1,2-dibrometanas *N*-pakeistų di- ir polietilenaminų sintezei [213]. Reakcijos vykdytos kambario temperatūroje, vandenyje, 28 dienas bei naudojant penkis amino ekvivalentus vienam 1,2-dibrometano ekvivalentui. Šių reakcijų produktus sudarė įvairių poliaminų mišinys (1.12<sup>o</sup> schema), kurio kiekybinė ir kokybinė sudėtis buvo nustatyta BMR ir dujų chromatografijos metodais. Buvo ištirta, kad visais atvejais 1 produkto susidaro daugiausiai (1.3 lentelė) bei pastebėta, kad, didėjant pirminio amino pakaitui, 1 produkto išeiga didėja. Tai, matyt, lemia pakaitų dydis. Kitų produktų (2-5) išeigos daug mažesnės, o pakaitų dydis jų išeigai įtakos neturėjo.

Kadangi šių reakcijų eigoje susidarydavo poliaminų druskos, apsunkinančios reakcijos mišinio maišymą, tai kai kurioms reakcijoms vandens kiekis buvo padidinamas. Reakcijos su *t*-butilaminu buvo vykdomos ne tik vandenyje bet ir heksane, tačiau didesnė nei 70 % išeiga nebuvo pasiekta.



1.3 lentelė. *N*-pakeistų di- ir polietilenaminų išeigos

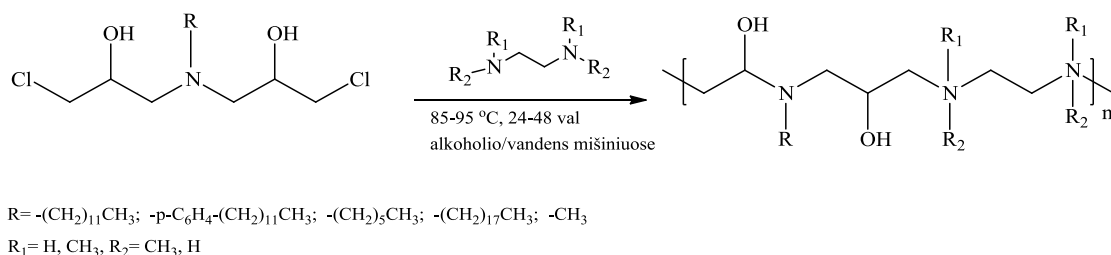
R	1	2	3	4	5
	Produkto išeiga, %				
Me	10	9	2	1	-
Et	28	3	6	2	-
<i>i</i> -Pr	49	7	14	1	0,1
<i>t</i> -Bu	70	9	2	-	-
Ph	70	10	10	-	-

Buvo tiriamos di(2-chloretil)eterio ir etilediamino ar etanolamino tarpusavio reakcijos acetonitrile. Nustatyta, jog šiuo atveju reakcijos produktus sudaro labai įvairūs junginiai, o šių junginių tipas priklauso nuo naudoto amino ir reakcijos sąlygų. Pavyzdžiui, naudojant EDA ir esant jo pertekliui, susidaro ciklinis junginys 4-(2-aminoetil)morfolinas. Linijiniai junginiai gauti esant ekvimoliniam šių reagentų santykiui. Tokia reakcijų eiga buvo paaiškinama entropiniu faktoriumi, kai reakcijos vykdomos aukštesnėse temperatūrose. Kiti



labai panašūs junginiai, *N*-arilpiperazinai, buvo susintetinti iš anilino ir 2,2'-dichlordietilamino hidroklorido dietilenglikolio monometileteryje, esant bazei bei naudojant aukštą temperatūrą [211]. Kai kurie iš šių sintetinių *N*-arilpiperazinų yra svarbūs struktūriniai elementai biologiškai aktyviuose junginiuose (ligandai serotonino receptoriuose). Tokie susintetinti junginiai naudojami kaip vaistai gydyti centrinės nervų sistemos ligas [214].

Q. Li su bendraautoriais susintetino naują junginių klasę DNR transfekcijai – lipopolihidroksialkilenaminus [215]. Šie junginiai savo struktūra panašūs į katijoninius lipidus bei polikatijonus ir buvo gauti iš įvairių bis(2-hidroksi-3-chlorpropil)alkilaminų (BCIPA) bei įvairių diaminoalkanų. Reakcijos buvo vykdomos metanolyje, butanolyje bei jų mišiniuose su vandeniu (1.13 schema).



### 1.13 schema. Lipopolihidroksialkilenaminų sintezė.

Buvo nustatyta, kad jei reakcija metanolio/vandens mišinyje vykdoma 72 val., 40 °C temperatūroje, iš BCIPA ir EDA susidaro nedidelės molekulinės masės (600-750 Da) produktai. Metanolį pakeitus butanoliu, pakėlus reakcijos temperatūrą iki 95 °C, o reakcijos trukmę pailginus iki 48 val., gauti lipopolihidroksialkilenaminai, kurių vidutinė masinė molekulinė masė 2 kDa, polidispersiškumo rodiklis 1,3-1,6. Reakcijoms su *N,N,N',N'*-tetrametildiaminu (TEMED) ir *N,N'*-dimetiletildiaminu (DMED) tinkamiausias buvo MeOH/H<sub>2</sub>O mišinys. Apibendrinus eksperimentinius rezultatus, buvo pastebėta priklausomybė tarp R pakaito dydžio BCIPA ir

lipopolihidroksialkilenamino molekulinės masės. Pavyzdžiui, kai naudotas EDA su BCIPA, kuriame yra dodecil-, 4-dodecilfenil-, heksil- ir oktadecilpakaitai, mažėjant pakaito dydžiui, vidutinė masinė molekulinė masė didėjo. Atvirkštinė priklausomybė pastebėta EDA pakeitus į TEMED. Labai panašios struktūros junginius iš BCIPA, kuriame  $R = -(CH_2)_2OH$ , ir TEMED, DMED, 1,2-diaminopropano (DAP) bei *N,N*-bis(2-hidroksietil)etilendiamino (BHEEDA) susintetino kita mokslininkų grupė [215, 216]. Buvo sintetinama be tirpiklio, 105 °C temperatūroje, 5-120 min. Tik tuo atveju kai buvo naudoti mažiau reaktingi diaminoalkanai, tokie kaip TEMED, DMED ar BHEEDA, reakcijos laikas buvo prailgintas iki 14 val. Visų susintetintų junginių MSC parodė, jog jų molekulių masių pasiskirstymo kreivės bimodalinės. Pavyzdžiui, jeigu reakcijoms buvo naudojamas EDA, tai gautame produkte bimodalinėje kreivėje pirmas maksimumas atitiko 3,9-5,4 kDa, o antras – 7,2-13 kDa vidutines masines molekulinės masės [215, 216]. Todėl, toliau buvo atliekamas polimerų gryninimas ultrafiltracijos būdu, išskiriant 5 frakcijas, kurios toliau tyrinėtos transfekcijoje, nustatant jų efektyvumą ir toksiškumą [216].

Panašaus tipo reakcijos vykdytos iš įvairių dihalogenalkanų ir ditretinių diaminų polikondensacijos būdu, gaunant jonenus (polimerines ketvirtines amonio druskas). Alifatinių jonenu pavadinimai sudaromi remiantis metileno grandžių skaičiumi diamino ir dihalogenido monomeruose. Pavyzdžiui, jeigu jonenas gaunamas iš 1,6-dibromheksano ir *N,N,N',N'*-tetrametilenheksametilendiamino, tai tokia polimerinė ketvirtinė amonio druska vadinama 6,6-jonenu. Daugelis autorių pažymi tai [217-221], jog jonenu struktūra bei molekulių masių parametrai priklauso nuo tirpiklio, reakcijos temperatūros, trukmės ir monomerų koncentracijos. Jonenai pasižymi antimikrobinėmis savybėmis bei naudojami kaip genų pernašos agentai [217].

A. Rembaum ir kt. [217] iš *N,N,N',N'*-tetrametilenheksametilendiamino, *N,N,N',N'*-tetrametilendimetilendiamino bei 1,5-dibrompentano, 1,3-dibrompropano, 1,10-dibromdekano, 1,1-dibrometano ar 1,2-dibrometano susintetino visą eilę alifatinių jonenu. Sintezės vykdytos dimetilsulfoksido, DMF, MeOH,

H<sub>2</sub>O bei jų mišiniuose nuo kelių parų iki kelių savaičių kambario temperatūroje. Buvo išsamiai ištirta šių reakcijų kinetika ir nustatyti gautų jonų ribiniai klamos skaičiai. Tiriant kinetiką, buvo pastebėta, kad, esant mažoms koncentracijoms, reakcijos greitis priklausė nuo tirpiklio, tačiau nepriklausė nuo metilengrupių skaičiaus monomere. Taip pat buvo nustatyta, jog dichloridai reaguoja daug lėčiau nei dibromidai, o apibendrinus kinetinius duomenis konstatuota, kad alifatinių ditretinių aminų polikondensacija su dihalogenidais vyksta pagal bimolekulinio nukleofilinio pakeitimo (S<sub>N</sub>2) reakcijas. Didžiausias klamos skaičius gautas sintetinant jonus DMF-H<sub>2</sub>O mišiniuose iš (N,N,N',N'-tetrametilenheksametilendiamino bei N,N,N',N'-tetrametilendimetilendiamino). Sintetinant jonus buvo neišvengta ir ciklizacijos reakcijų. Jos vyko N,N,N',N'-tetrametilendimetilendiamino monomerų polikondensacijos metu. Ciklinių junginių susidarymą skatino kai kurie tirpikliai – tie, kuriuose jonas mažai tirpo (pvz., acetonitrilas). Cikliniai junginiai identifikuoti naudojant <sup>1</sup>H ir <sup>13</sup>C BMR spektroskopinius tyrimo metodus.

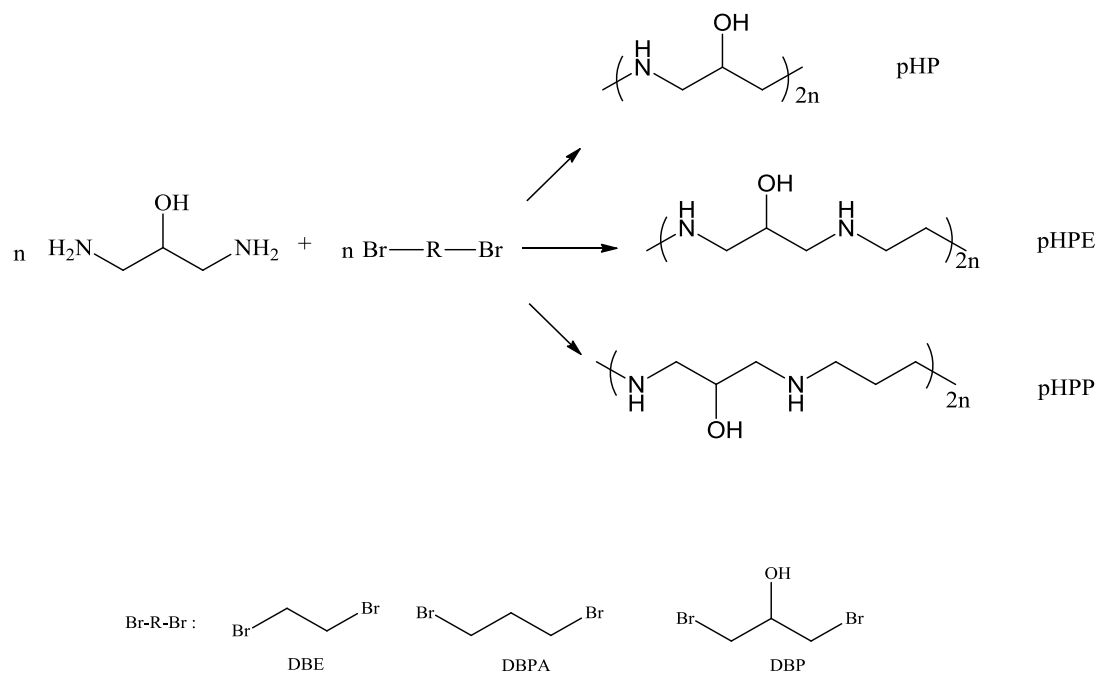
Cikliniai jonai taip pat buvo susintetinti ir iš 1,4-diazo[2,2,2]bicikloktano, jį kondensuojant su įvairiais dihalogenidais [218]. Buvo nustatyta, kad polikondensacijos reakcijos greitis didėja, didėjant tirpiklių dielektrinei konstantai bei reakcijos temperatūrai. Didžiausios išeigos gautos sintezę atliekant dimetilsulfoksido tirpale, o didžiausia produktų klampa – kai ilgėja metileno grandinė dibromido monomere [218].

Jei ditretiniai aminai polikondensuojami su dichloridais, turinčiais indukcinį efektą pasižyminčių funkcinių grupių ((1,3-dichlor-propan-2-onu ar bis(2-chloretil)eteriu), polikondensacijos reakcijos vyksta pagal pirmojo laipsnio reakcijas, nes susidaro stabilus karbokatijonas [219-221].

Kai kurie mokslininkai vykdė įdomias reakcijas dealkilinant jonus iki poli(tretinio amino). Iš pradžių buvo susintetinti įvairūs jonai: 6,6-, 6,5-, 6,4-, 6,3-, 4,6-, 4,5-, 4,4- ir 4,3. Po to ketvirtinės aminogrupės buvo dealkilintos etanolaminu arba ličio propantiolatu. Dealkilinimo laipsnis nustatytas naudojant BMR spektroskopiją ir geriausiu atveju siekė net 98,4 %

(nuo susidariusių tretinių aminogrupių kiekio). Dealkilinimas vyko lėčiau ir sunkiau, jei jonuose esančios metileno grandinės neilgos (4,6-, 4,5-, 4,4- ir 4,3-jononai). Kiti jononai dealkilinasi pakankamai gerai, o geriau tais atvejais, kai buvo dealkilinamos bromidų, bet ne chloridų druskos. Šis dėsniumas buvo aiškinamas tuo, kad etanolaminas bromido jonus solvatavo geriau, nei chlorido jonus [222].

Hidroksigrupių turintys LPEI analogai taip pat gali būti sintetinami polikondensuojant hidroksigrupių turinčius diaminoalkanus su įvairiais dibromalkanais, taip pat, turinčiais hidroksigrupių. 2015 metais užpatentuota visa klasė tokių junginių, o trys iš jų buvo išsamiai ištirti genų pernašoje. Polikondensacija vykdyta tarp 1,3-diamino-2-propanolio ir 3 skirtingų dibromidų: 1,2-dibrometano (DBE), 1,3-dibromopropano (DBPA), 1,3-dibrom-2-propanolio (DBP) (1.14 schema). Polikondensacijos reakcija buvo vykdoma MeOH 48 val. 50 °C temperatūroje, naudojant ekvimolinį monomerų mišinį [72, 73].



1.14 schema. Hidroksigrupių turinčių polialkileniminų sintezės schema.

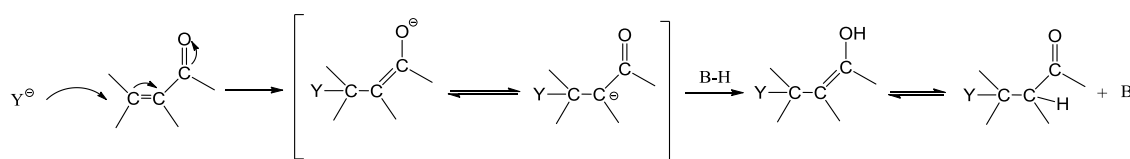
Gautų polialkileniminų, turinčių hidroksigrupes, išėigos svyruoja nuo 21 iki 32 %. Polimerų sandara nustatyta FT-IR, <sup>1</sup>H BMR bei XPS spektroskopijos metodais, o molekulinų masių parametrai – MSC. Analizės rezultatai parodė, jog buvo gauti linijiniai, gerai vandenyje tirpstantys katijoniniai polimerai. Jų masinės molekulinės masės svyravo nuo 8 iki 20 kDa, o polidispersiškumas – nuo 1,67 iki 2,98. Taip pat buvo pastebėta, jog molekulinės masės dydžiui šiek tiek įtakos turėjo dibromalkanų struktūra [72, 73].

Apibendrinant šiame skyriuje išdėstytą medžiagą, galima teigti, jog dihalogenalkanų ir diaminoalkanų polikondensacija yra labai mažai tyrinėta. Manoma, jog tokia situacija susidarė dėl to, kad šių medžiagų tarpusavio reakcijos metu susidariusios iminogrupės gali būti alkilinamos papildomai – iki tretinių ar net ketvirtinių aminogruočių. Dėl to reakcijos produktai gali turėti ne tik neregulias sandaros grandis (dervų tipo), bet net ir įgauti tinklinę struktūrą. Visa tai kartu labai trukdo ne tik polialkileniminų sintezei, bet ir jų gryninimui, analizei bei praktiniam pritaikymui. Nepaisant to, jog šiuo būdu jau buvo susintetinta ir ištirta eilė labai įdomių polimerų, tarp jų ir radusių plataus praktinio taikymo perspektyvų. Be to, parenkant įvairius monomerus, polikondensacijos būdu galima gauti labai įvairios cheminės sudėties polialkilenimus, o katijoninės ciklo polimerizacijos būdu įmanoma gauti tik polietilenimino darinius. Todėl, išmokus valdyti dihalogenalkanų ir diaminoalkanų polikondensacijos reakciją, toks įvairios sandaros polialkilenų sintezės būdas turėtų tapti labai perspektyvus.

### **1.5 Bioskalių katijoninių polimerų sintezė**

1887 metais A. Michael aprašė labai įdomią reakciją, kuri vėliau įgavo jos atradėjo vardą. Michaelio reakcija (Michaelio prisijungimu) vadinamas baze aktyvuotų metilen- ar metingrupių, esančių šalia elektronoakceptorinių pakaitų, prijungimas prie elektronoakceptorine grupe aktyvuoto nesotaus junginio [223]. Klasikinis Michaelio reakcijos variantas – tai karboniljunginių prisijungimas prie  $\alpha,\beta$ -nesotaus karboniljunginio. Šią reakciją, kaip ir kitas

Michaelio tipo reakcijas, katalizuoja baziniai katalizatoriai (pavyzdžiui, natrio etilatas, piperidinas ir pan.) ir ji susideda iš trijų stadijų (1.15 schema). Pirmiausia karboniljunginio metilen- ar metingrupę atakuoja bazinis katalizatorius. Iš šios grupės atplėšus protoną, susidaro taip vadinamas enoliato jonas (anijonas). Šis jonas atakuoja  $\beta$  anglies atomą  $\alpha,\beta$ -nesočiame karboniljunginyje, susidarant naujam ryšiui ir neigiamam krūviui migruojant į nesotaus junginio karbonilgrupę (susidarant tarpiniam enoliato jonui). Paskutinės stadijos metu protonizuotas bazinis katalizatorius atakuoja tarpinį enoliato joną, susidarant galutiniam prijungimo produktui ir regeneruojantis baziniam katalizatoriui [105, 106, 224]. Sintezės prasme Michaelio reakcija patogi, nes vyksta švelniose sąlygose, gaunamos didelės reakcijos produktų išeigos [105].

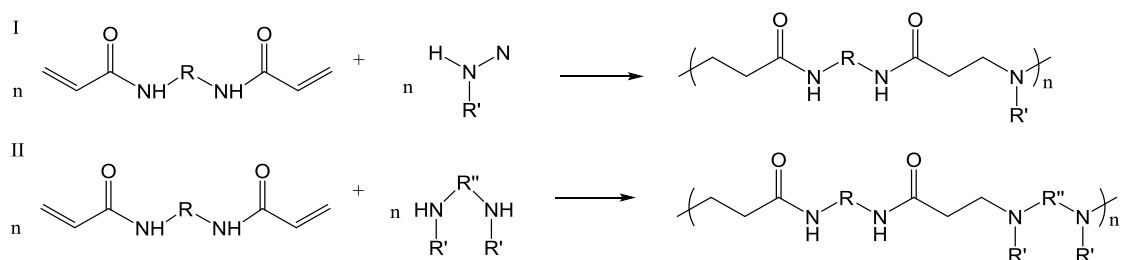


1.15 schema. Michaelio reakcijos mechanizmas.

Kadangi pirminiai ir antriniai aminai yra baziniai junginiai, jie pasižymi enoliato jono savybėmis (yra nukleofilai) ir todėl gali dalyvauti Michaelio prisijungime. Įdomu tai, kad tokiose aminų reakcijose papildomos bazės (katalizatoriaus) nereikia. Toks prisijungimas buvo pavadintas aza-Michaelio prisijungimu (angl. *aza-Michael addition reaction*) [223].

Jei Michaelio reakcijoje dalyvauja difunkciniai reagentai, reakcijos eigoje susidarys polimeras. Naudojant aminus ir diakrilatus, tokios sintezės pirmą kartą buvo atliktos 1956 metais ir pavadintos Michaelio pakopinėmis arba Michaelio poliadicijos reakcijomis (angl. *Stepwise Michael-type polyaddition* arba *step-growth Michael addition polymerization*), o jų eigoje susidarantys polimerai – poliamidoaminais (PAMAM) [223]. 1.16 schemeje pateikta

PAMAM sintezė iš pirminio amino (I) arba antrinio diamino (II) ir bisakrilamido.



1.16 schema. Poliamidoaminų susidarymo reakcijų pavyzdžiai.

Kadangi antriniai aminai yra nukleofiliškesni už pirminius, jie šiose reakcijose aktyvesni. Tačiau galutinis reakcijos rezultatas priklausys ne tik nuo azoto atomo pakeitimo laipsnio amine, bet ir nuo sterinių faktorių. PAMAM sintezė Michaelio būdu turi visą eilę privalumų: polimerizacija vyksta žemose temperatūrose, gali būti naudojami įvairūs tirpikliai, egzistuojantis labai platus monomerų (ypač aminų) pasirinkimas leidžia sintetinti labai įvairios sudėties ir struktūros PAMAM, reakcijos eigą lengva kontroliuoti [105].

Labai plačiai PAMAM sintezę tyrinėjo P. Ferruti su kolegomis [225, 226]. Jie ištyrė reakcijos sąlygų (temperatūra, tirpikliai, monomerai) įtaką PAMAM susidarymo greičiui, struktūrai bei PAMAM molekuliniam parametrams (masei, dispersiškumui). Naudojant įvairius diaminus buvo nustatyta, kad reakcijos greitis didėja tokia tvarka: *N,N'*-diizopropiletildiaminas < *N,N'*-dimetiletildiaminas < 2-metilpiperazinas (AZEP) < piperazinas. Tai siejama su amino struktūra ir aminogrupės geba protonizuotis. P. Ferruti taip pat nustatė, kad aminų reakingumą, o tuo pačiu ir sintezės greitį, galima padidinti naudojant žemės šarminių metalų druskas (tokias kaip CaCl<sub>2</sub>) [105, 226].

Tirpiklių įtaka PAMAM susidarymo greičiui buvo iširta 2-metilpiperazino ar 2,5-dimetilpiperazino reakcijoje su 1,4-bisakriloilpiperazinu. Naudojant vandenį, MeOH, etilenglikolį, DMF bei

formamidą buvo nustatyta, jog protoniniuose tirpikliuose sintezės vyko pagal pseudo antrojo laipsnio reakcijos lygtį, tuo tarpu aprotoniniuose tirpikliuose – pagal trečiojo laipsnio reakcijos lygtį. Esant fiksuotai reakcijos temperatūrai bei fiksuotoms monomerų koncentracijoms, buvo nustatyta, kad reakcija vandenyje vyko greičiau nei MeOH, nes vandens dielektrinė skvarba didesnė nei MeOH. Šių reakcijų kinetika tirta UV spektroskopijos pagalba, nustatant dvigubųjų ryšių kitimą reakcijos eigoje. Autoriai pastebėjo akivaizdų kinetinių konstantų kitimą įvairiuose protoniniuose tirpikliuose – didėjant tirpiklio dipolio momentui, kinetinės konstantos mažėjo [225].

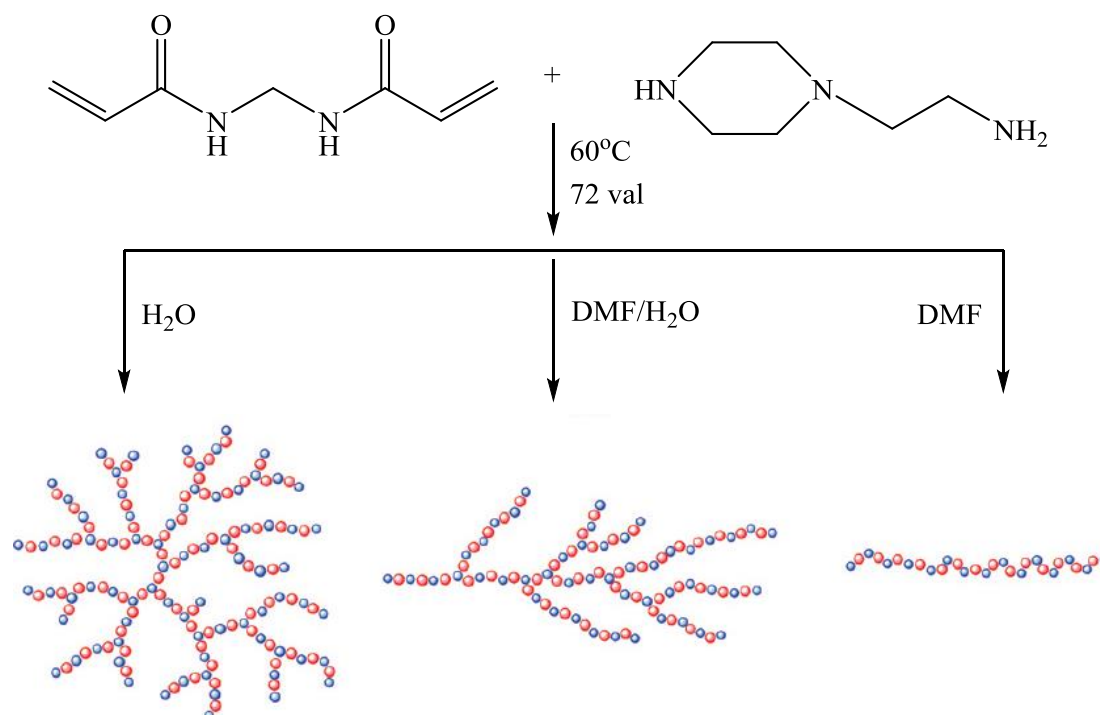
Buvo iširta DMF, vandens bei jų mišinių įtaka iš 1-(2-aminoetil)-piperazino (AEPZ) ir *N,N'*-metilenbisakrilamido (MBA) ar *N,N'*-cistaminobisakrilamido (CBA) sintetinamų PAMAM šakotumui (jis kiekybiškai nustatytas  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR spektroskopijos metodais) [125, 227]. Naudojant ekvivalentinius monomerų kiekius, minėtuose tirpikliuose gauti linijiniai, šakoti ir labai šakoti PAMAM (1.17 schema).

Atlikus reakcijas su MBA ir AEPZ buvo nustatyta, kad, mažėjant vandens kiekiui reakcijos mišinyje, gaunami mažiausio šakotumo PAMAM. Kai tirpiklis tik vanduo, šakotumo laipsnis siekia – 0,44. Sumažinus vandens kiekį iki 60 %, šakotumo laipsnis sumažėja iki 0,21, o sumažinus iki 10 % – 0,06 (šakotumo laipsnis apskaičiuojamas pagal antrinių ir tretinių aminogrupių santykį). MSC įvertinus PAMAM masines molekulinės masės bei dispersiškumo laipsnį, nebuvo pastebėta jokių šiuos rodiklius siejančių tendencijų su PAMAM šakotumu. Šių PAMAM masinės molekulinės masės svyravo nuo 8,0 iki 9,3 kDa, o polidispersiškumo rodiklis – nuo 1,25 iki 1,82 [227].

Atlikus reakcijas su CBA ir AEPZ, DMF gautas linijinis PAMAM. DMF- $\text{H}_2\text{O}$  mišiniuose ( $\text{H}_2\text{O}$  66 %) PAMAM šakotumo laipsnis jau siekė 0,42, masinė molekulinė masė svyravo tarp 6,4-8,5 kDa, o polidispersiškumo rodiklis tarp 1,59-1,82. Kaip matyti iš pateiktų duomenų, naudojant *N,N'*-cistaminobisakrilamidą, gaunami didesnio šakotumo laipsnio bei mažesnės molekulinės masės PAMAM [227, 125]. Tai, matyt, lėmė *N,N'*-



cistaminobisakrilamido struktūra, t.y., ilgesnė šio monomero molekulė ir didesnis jo hidrofobiškumas.



1.17 schema. Tirpiklių įtaka PAMAM šakotumui.

PAMAM šakotumą galima reguliuoti ne tik keičiant tirpiklį, bet ir monomerų santykį bei reakcijos trukmę [228]. Tuo buvo įsitikinta PAMAM sintetinant iš MBA ir AEPZ MeOH/H<sub>2</sub>O mišinyje. Šiame eksperimente vienam ekvivalentui AZEP buvo naudoti 1,5 ar 2 ekvivalentai MBA, o reakcijos truko nuo 6 iki 132 val. Be šakotumo, dar buvo įvertinta reakcijos sąlygų įtaka monomerų konversijai, PAMAM masinei molekulinei masei bei polidispersiškumo rodikliui. Vykdamt reakcijas su 2 ekvivalentais MBA, per 132 val. jo sureagavo apie 90 %, o produktų masinė molekulinė masė siekė 27,2 kDa. Šiuo atveju polidispersiškumo rodiklis buvo 2 kartus didesnis, nei reakciją vykdant 6 val. MBA kiekį sumažinus iki 1,5 ekvivalento, gauti netirpūs tinkliniai PAMAM, kurių tolimesnė analizė jau buvo neįmanoma. <sup>13</sup>C BMR įrodyta, jog jau po 0,17 val. susidaro šakotos struktūros PAMAM, ir šakotumas toliau nepaliaujamai didėja [228]. Vadinasi, reguliuojant reakcijos trukmę taip pat įmanoma gauti įvairaus šakotumo PAMAM.

Kita mokslininkų grupė [229] ištyrė įvairių bisakrilamidų (*N,N'*-metilenbisakrilamido (MBA), *N,N'*-heksametenbisakrilamido (HMBA), 1,4-bis(akriloil)piperazino (BAP) ir *N,N'*-cistaminobisakrilamido (CBA)) santykio su AZEP įtaką PAMAM šakotumui, reakciją vykdant MeOH 144 val. Ištyrus PAMAM produktus <sup>13</sup>C BMR spektroskopijos metodu buvo nustatyta, kad, naudojant 2 ekvivalentus bisakrilamidų (MBA, HMBA, BAP, CBA), gaunami linijinės struktūros PAMAM. Padidinus ekvivalentų santykį iki 2,5, gaunami tiek linijinės, tiek šakotos struktūros polimerai. O kai bisakrilamidų ekvivalentų kiekis padidinamas dvigubai (iki 5), susidaro šakoti PAMAM. Nustatyta, jog linijinio PAMAM masinė molekulinė masė yra 11,8 kDa, o polidispersiškumas 1,23. Tuo tarpu šakotiems PAMAM šie rodikliai apytiksliai siekia 15 kDa ir 2,7-4,2.

Įvairūs bisakrilamidai MBA, HMBA, *N,N'*-1,8-oktametenbisakrilamidas, *p*-ksilenbisakrilamidas (KBA), BAP, CBA taip pat tirti reakcijose su *N,N'*-dimetilcistaminu [230]. Tačiau šiuo atveju buvo naudoti ekvimoliniai reagentų mišiniai, o reakcijos vykdytos MeOH/H<sub>2</sub>O (90/10) mišiniuose 6-10 dienų. Didžiausia išeiga (54 %) pasiekta, naudojant HMBA, o PAMAM masinė molekulinė masė didėjo, didėjant anglies atomų skaičiui bisakrilamido molekulėje. Todėl didžiausia masinė molekulinė masė gauta naudojant KBA (79,7 kDa), tačiau šiuo atveju PAMAM išeiga buvo mažiausia (30 %).

Keletas mokslininkų grupių pabandė gauti PAMAM, reakcijoms naudodami diaminus, kurių viena iš aminogrupių apsaugota *tert*-butiloksikarbonilgrupėmis (buvo apsaugoti EDA, 1,4-butandiaminas ir HDA). Įvykdžius šių aminų reakciją su MBA ir pašalinus apsaugą, buvo gauti PAMAM, turintys šonines pirmines aminogrupes [231]. Šie PAMAM buvo sintetinami 140 °C temperatūroje be tirpiklio, naudojant ekvivalentinius monomerų kiekius. Visi susintetinti PAMAM buvo didelės masinės molekulinės masės (12-18 kDa), o dispersiškumas siekė 1,5-2,8. Buvo pastebėta molekulinės masės ir polidispersiškumo didėjimo tendencija, kuomet didėja anglies atomų skaičius apsaugotame diamine. Tačiau žemesnėje

temperatūroje (120 °C) vykdančias 1,6-bis(akrilamido)heksano reakcijas su tais pačiais apsaugotais diaminais, [232], taip pat gauti panašios eilės molekulių masių produktai (10-20 kDa). Sintezėms naudojant apsaugotą EDA, buvo gauti didžiausios molekulinės masės PAMAM, tačiau jų ir polidispersiškumas buvo didžiausias.

Panašios reakcijos MeOH terpėje 240 val. buvo vykdytos tarp CBA ir neapsaugotų diaminų: dietilentetramino (DETA), trietilentetramino, tetraetilenpentamino [233]. Poliamine didėjant aminogrupių kiekiui, PAMAM vidutinė masinė molekulinė masė bei išėiga didėjo, o polidispersiškumas – mažėjo. Didžiausia masinė molekulinė masė, išėiga bei mažiausias polidispersiškumas gautas naudojant tetraetilenpentaminą.

Apibendrinant 1.5 skyriuje pateiktą medžiagą galima apibrėžti optimalias PAMAM sintezės iš bisakrilamidų ir pirminių bei antrinių diaminų sąlygas: reakcijos terpė – poliniai protoniniai tirpikliai, neaukšta temperatūra, ilga reakcijos trukmė (nuo kelių valandų iki keliolikos parų). Taip sintetinamų PAMAM vidutinė masinė molekulinė masė – 10,0-70,0 kDa, o polidispersiškumo rodiklis artimas 2. PAMAM šakotumas reguliuojamas keičiant tirpiklio ar tirpiklių mišinio protoniškumą bei monomerų molinį santykį. PAMAM tirpumas priklauso nuo jų sandaros. Geriausiai linijinių PAMAM tirpikliais laikomi vanduo, chloroformas, pirminiai alkoholiai, dimetilsulfoksidas bei kiti poliniai tirpikliai.

## 1.6 Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Genų transfekcijai naudojama daugybė katijoninių polimerų: šakotas ir linijinis polietileniminas, poli(L–lizinas), poliamidoesteris, šakoti ir linijiniai poliamidoaminai, poli-(2-dimetilaminoetilmetakrilatas). Šių cheminių vektorių trūkumas – mažas transfekcijos efektyvumas, todėl nuolat tobulinami transfekcijos agentų parametrai (molekulinė masė, struktūra, katijoninių grupių kiekis). Genų inžinerijai skirti transfekcijos agentai sintetinami naudojant įvairiausias sintezės bei modifikavimo būdus. Vieni iš labiausiai naudojamų transfekcijos agentų yra šakotas ir linijinis polietileniminai. Šakotas polietileniminas ar kai kurie jo dariniai gaunami katijoniniu būdu polimerizuojant aziridiną arba *N*-pakeistus aziridinus. Tačiau šiuo būdu sunku išvengti šalutinių reakcijų, kontroliuoti PEI šakotumą bei molekulinę masę. Linijinis polietileniminas gaunamas katijoniniu būdu polimerizuojant 2-pakeistus oksazolinus. Toks sintezės būdas taip pat nėra tinkamas, nes sunku reguliuoti polimero molekulinę masę, pasiekti didelį linijinio polietilenimino amidų hidrolizės laipsnį. Todėl, iškyla akivaizdus poreikis rasti naujus ir paprastesnius būdus, kuriais galima būtų lengvai susintetinti polietileniminą ar jam analogiškus polimerus bei sintezės metu reguliuoti ne tik polimero molekulinę masę, bet ir šakotumą.

Iš literatūros apžvalgos, matyti, kad kai kurie polietileniminai gali būti gaunami paprastu polikondensacijos būdu iš dihalogenalkanų ir diaminoalkanų. Tokios reakcijos iki šiol buvo labai mažai tirtos, o to priežastis – sintezės metu vykstantis papildomas iminogrupių alkilinimas, susidarant šakotiems ar net tinkliniams junginiams. Išmokus sintezės metu valdyti dažnai nepageidaujamas papildomo alkilinimo reakcijas, o taip pat susidarančių polimerų molekulinę masę bei polidispersiškumą, toks poliiminų sintezės būdas taptų labai patraukliu, nes atsivertų plačios galimybės sintetinti įvairios sudėties poliiminas, kurie galėtų rasti platų praktinį pritaikymą, tarp jų – ir kaip genus ar vaistus pernešančios medžiagos.

Transfekcijos tyrimuose gana plačiai panaudojami ir modifikuoti ŠPEI bei LPEI. Nors egzistuoja labai įvairūs šių polimerų modifikavimo būdai, visus juos galima suskirstyti į dvi pagrindines grupes: a) polilakilenimino pirminės/antrinės aminogrupės modifikuojamos tiesiogiai; b) prie aminogrupių prijungiami tarpiniai pakaitai, o tik tuomet prie šių pakaitų prijungiamos pageidaujamos funkcinės grupės. Nors tokie modifikavimo būdai nesudėtingi, bet ne visuomet pavyksta reikiamas funkcinės grupės įvesti tiesiogiai, o, jei modifikuojama per tarpinius pakaitus, sintezės procesas tampa ilgas (daugiastadijnis, atsiranda būtinybė gryninti tarpinius reakcijų produktus). Todėl nuolat ieškoma paprastesnių ir efektyvesnių ŠPEI ar LPEI modifikavimo būdų.

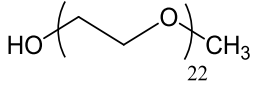
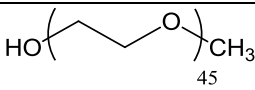
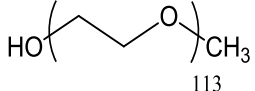
Sintetinant poliamidoaminus Michaelio reakcijos būdu iš bisakrilamidų ir pirminių bei antrinių diaminų, gaunami įvairios struktūros poliamidoaminai (linijiniai, šakoti, dendrimeriniai). Parenkant tinkamas sąlygas Michaelio reakcijai (reakcijos terpė, trukmė, temperatūra), galima gauti įvairios molekulinės masės, dispersiškumo bei struktūros poliamidoaminus. Iš literatūros apžvalgos, matyti, kad nors sintetinamų PAMAM įvairovė labai didelė, vis dar nebuvo susintetinti ir ištirti PAMAM su hidroksi- ir oksigrupėmis pagrindinėje grandinėje. Manoma, kad ir tokio tipo PAMAM galėtų rasti savo pritaikymo nišą genų transfekcijoje, tačiau visų pirma reikia išmokti sintetinti tokias medžiagas bei įvaldyti jų molekulinę masę, šakotumą ir kitų jų svarbių rodiklių valdymo būdus.

Nors genų pernašai naudojamų polimerų įvairovė labai didelė, efektyvus, optimalaus ir plataus taikymo spektro polimerinio vektoriaus sintezė vis dar lieka dideliu iššūkiu polimerų chemijos moksle.

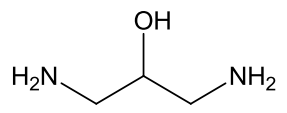
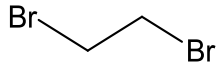
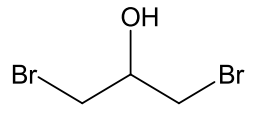
## 2 DARBO METODIKOS

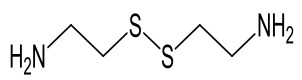
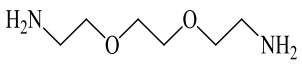
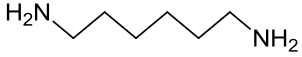
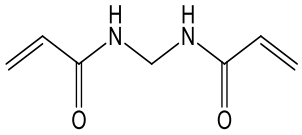
### 2.1 Naudotos medžiagos ir reagentai

#### 2.1.1 Oligomerai

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Metoksi-polietilenglikolis MPEG 1000, <i>Sigma Aldrich</i>	$M_r$ 1000 g/mol; $T_{lyd}$ 39 °C	
Metoksi-polietilenglikolis MPEG 2000, <i>Sigma Aldrich</i>	$M_r$ 2000 g/mol; $T_{lyd}$ 60 °C	
Metoksi-polietilenglikolis MPEG 5000, <i>Sigma Aldrich</i>	$M_r$ 5000 g/mol; $T_{lyd}$ 67 °C	

#### 2.1.2 Organinės medžiagos

Pavadinimas	Savybės	Formulė
1,3-diamino-2-propanolis, DAP, <i>Sigma Aldrich</i>	$M_r$ 90,12 g/mol; $T_{lyd}$ . 41-43 °C; 95 %; pKa1 7,93; pKa2 9,69	
1,2-dibrometanas, DBE, <i>Fluka</i>	$M_r$ 187,86 g/mol; $\rho$ 2,179 g/ml; $T_{vir}$ . 132 °C; 98 %	
1,3-dibrom-2-propanolis, DBP, <i>Sigma Aldrich</i>	$M_r$ 217,89 g/mol; $\rho$ 2,136 g/ml; $T_{vir}$ . 219 °C; 98 %	

2,2-ditiobis(etilamino dihidrochloridas), CTDH, <i>Sigma Aldrich</i>	$M_r$ 225,20 g/mol; $T_{lyd.}$ 217-220 °C $\geq 99,9$ %;	 2HCl
2,2'-(etilendioksi)dietilaminas, EDODA, <i>Sigma Aldrich</i>	$M_r$ 154,17 g/mol; $\rho$ 1,015 g/ml; $T_{lyd.}$ 105-109 °C; 98 %	
1,6-heksametilendiaminas, HDA, <i>Fluka</i>	$M_r$ 116,21 g/mol; $\rho$ 0,84 g/ml, $T_{vir.}$ 204,6 C; $T_{lyd.}$ 39 °C; 98 %; pKa1 10,93; pKa2 10,63	
Jodmetanas, <i>Merk</i>	$M_r$ 141,94; $\rho$ 2,280 g/ml; $T_{vir.}$ 42 °C, 98 %	CH <sub>3</sub> I
<i>N,N'</i> -metilenbisakrilamidas MBA, <i>Sigma Aldrich</i>	$M_r$ 154,17 g/mol; $\rho$ 2,136 g/ml; $T_{lyd.}$ >300 °C; 99 %	
Trifenilfosfitas, TFF, <i>Sigma Aldrich</i>	$M_r$ 310,28 g/mol; $\rho$ 1,184 g/ml; $T_{vir.}$ 360 °C; 97 %	P(OC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub>

### 2.1.3 Neorganinės medžiagos

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Azoto rūgštis, <i>Reachem</i>	$M_r$ 63,0 g/mol; koncentruota (68 %)	HNO <sub>3</sub>
Druskos rūgštis, <i>Reachem</i>	$M_r$ 36,46 g/mol	HCl
Kalio hidroksidas, <i>Reachem</i>	$M_r$ 56,0 g/mol	KOH
Natrio borhidridas, <i>Reachem</i>	$M_r$ 37,83 g/mol	NaBH <sub>4</sub>
Natrio chloridas, <i>Reachem</i>	$M_r$ 58,5 g/mol	NaCl
Natrio hidroksidas, <i>Sigma Aldrich</i>	$M_r$ 40,0 g/mol	NaOH
Natrio karbonatas (bevandenis), <i>Reachem</i>	$M_r$ 105,98 g/mol; $\rho$ 2,54 g/ml	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Natrio sulfatas (bevandenis), <i>Reachem</i>	$M_r$ 142,04 g/mol; $\rho$ 2,664 g/ml	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Sidabro nitratas, <i>Reachem</i>	$M_r$ 169,87 g/mol	AgNO <sub>3</sub>

### 2.1.4 Tirpikliai

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Acetonitrilas, AcN, <i>Readel-de Haën</i>	$M_r$ 41,05 g/mol; $\rho$ 0,786 g/ml; $T_{vir.}$ 81,3 °C; $\geq 99,9$ %	CH <sub>3</sub> CN



Clorbenzenas, ClB, <i>Aldrich</i>	$M_r$ 112,56 mol; $\rho$ 1,11 g/ml; $T_{vir.}$ 131 °C; 99,8 %	$C_6H_5Cl$
Dejonizuotas vanduo	$M_r$ 18,015 g/mol; $\rho$ 1 g/ml; $T_{vir.}$ 99,98 °C; savitasis laidumas $1 \mu S \cdot cm^{-1}$	$H_2O$
Deuteruotas chloroformas, <i>Aldrich</i>	$M_r$ 120,38 g/mol; $\rho$ 1,50 g/ml; $T_{vir.}$ 61 °C; $\geq 99,9$ %	$CDCl_3$
Deuteruotas vanduo, <i>Aldrich</i>	$M_r$ 20,02 g/mol; $\rho$ 1,33 g/ml; $T_{vir.}$ 101,4 °C; $\geq 99,9$ %	$D_2O$
Deuteruotas natrio šarmas <i>Aldrich</i>	$M_r$ 41,0 g/mol; $\geq 99$ %	NaOD
Dichlormetanas, <i>Eurochemicals</i>	$M_r$ 84,93 g/mol; $\rho$ 1,33 g/ml; $T_{vir.}$ 39,6 °C; $\geq 99,9$ %	$CH_2Cl_2$
Etoksietanas, dietileteris, <i>Lach-ner</i>	$M_r$ 72,12 g/mol; $\rho$ 0,7134 g/ml; $T_{vir.}$ 34,6 °C; $\geq 99,9$ %	$C_4H_{10}O$
Etan-1,2-diolis, etilenglikolis, EG, <i>Eurochemicals</i>	$M_r$ 62,07 g/mol; $\rho$ 1,1132 g/ml; $T_{vir.}$ 197,3 °C; 99 %	$C_2H_6O_2$
Metilbenzenas, toluenas, <i>Eurochemicals</i>	$M_r$ 92,14 g/mol; $\rho$ 0,87 g/ml; $T_{vir.}$ 111 °C; 98 %	$C_6H_5CH_3$

Metanolis, MeOH, <i>Eurochemicals</i>	M <sub>r</sub> 32,04 g/mol; ρ 0,7918 g/ml; T <sub>vir.</sub> 64,7 °C; 99,8 %	CH <sub>3</sub> OH
<i>N,N</i> -dimetilacetamidas, DMAC, <i>Sigma-Aldrich</i>	M <sub>r</sub> 87,12 g/mol; ρ 0,937 g/ml; T <sub>vir.</sub> 165 °C; 99 %	CH <sub>3</sub> CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<i>N,N</i> -dimetilformamidas, DMF, <i>Eurochemicals</i>	M <sub>r</sub> 73,09 g/mol; ρ 0,948 g/ml; T <sub>vir.</sub> 152 – 154 °C; 99,8 %	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO
Propilenkarbonatas, PC, <i>Sigma Aldrich</i>	M <sub>r</sub> 102,09 g/mol; ρ 1,205 g/ml; T <sub>vir.</sub> 242 °C; 99 %	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
Propan-2-olis, izopropanolis, IPOH, <i>Reachem</i>	M <sub>r</sub> 60,10 g/mol; ρ 0,7810 g/ml; T <sub>vir.</sub> 82 °C; 99,7 %	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O

### 2.1.5 Tirpalai

Acetatatinis buferis (pH 4): 0,25 M CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa.

Boratinis buferis (pH 8,3): 0,1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH, 0,2mM EDTA.

Agarozė (1 %): 0,1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH (pH 8,3); 0,2 mM EDTA, 1 % agarozė.

Tripsinas-EDTA: tripsinas-EDTA standartinis tirpalas (10 ml).

Fosfatinis buferis (PBS; pH 7,2-7,4): NaCl 274 mM (16,12 g); KCl 5,4 mM (0,402 g); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,6 mM (1,22 g); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,94 mM (0,408 g); H<sub>2</sub>O 1000 ml.

### **2.1.6 Naudotos eukariotinių ląstelių linijos ir auginimo terpės**

*HeLa* (angl. *Human Negroid cervix epitheloid carcinoma, Henrietta Lacks*) – tęstinai kultivuojama adhezinių ląstelių linija, išvesta iš 31 metų amžiaus negroidės gimdos epitelinės karcinomos ląstelių. *ATCC (LGS Standards, UK)*.

*HEK293* (angl. *Human embryonic kidney cells*) – embrioninės kepenų ląstelės, išvestos iš vieno, greičiausiai sveiko, legaliai abortuoto vaisiaus. Ląstelės auginamos DMEM terpėje su 2 mM L-glutamino, 2 mM gentamicino ir 10 % PBS (*Thermo Fisher Scientific, Lafayette, US*).

### **2.1.7 Plazmidės**

GFP – žaliai fluorescuojantį baltymą koduojanti plazmidinė DNR, *Ambion (Life Technologies)*. EGFP – sustiprinto veikimo žaliai fluorescuojančio baltymo koduojanti plazmidinė DNR, *GenScript USA Inc*.

### **2.1.8 Eukariotinių ląstelių auginimo terpė ir jos komponentai**

DMEM augimo terpės sudėtis: DMEM (450 ml); FBS inaktyvuotas (50 ml); L-gliutamino/gentamicino tirpalas (50 ml);  $\beta$ -merkaptoetanolis (1,7  $\mu$ l).

L-gliutamino/gentamicino tirpalas: L-gliutaminas (1,5 g), gentamicino sulfatas (250 mg); vanduo (50 ml).

## **2.2 Polimerų sintezės ir gryninimo metodikos**

### **2.2.1 Polialkileniminų sintezė**

#### **2.2.1.1 Poli(etileniminheksametilenimino) sintezė**

Poli(etileniminheksametilenimino) (PEIHI) sintezei naudoti ekvimoliniai monomerų kiekiai. Į 25 ml talpos kolbutę dedama 0,0166 mol (1,91 g) 1,6-heksametilendiamino, 0,0166 mol (3,1 g) 1,2-dibrometano ir pripilama tiek DMAC, DMF, PC, MeOH, IPOH, H<sub>2</sub>O, kad monomerų koncentracija būtų

50 %. Reakcijos vykdomos 50 °C temperatūroje 7 paras, reakcijos mišinį pastoviai maišant magnetine maišykle.

### 2.2.1.2 Poli(2-hidroksipropilenimino) sintezė

Poli(2-hidroksipropilenimino) (PHPI) sintezei naudoti ekvimoliniai monomerų kiekiai. Į 25 ml talpos kolbutę dedama 0,0166 mol (1,49 g) DAP ir pripilama tiek DMAC, DMF, MeOH, IPOH ar H<sub>2</sub>O, kad galutinė visų monomerų koncentracija būtų 40 %. Kolbutė su tirpalu pašildoma iki 60 °C ir, tirpalą pastoviai maišant, į jį sulašinama 0,0166 mol (3,62 g) DBP. Tuomet reakcijos mišinio temperatūra greitai pakeliama iki 80 °C ir šioje temperatūroje sintezė vykdoma 7 paras. Tik metanolyje reakcija vykdoma 60 °C temperatūroje.

## 2.2.2 Polialikileniminų darinių gavimui reikalingų junginių sintezė

### 2.2.2.1 Cistamino sintezė

Stiklinėlėje pasveriami 0,039 mol (8,7 g) cistamino dihidrochlorido, ištirpinama 30 ml H<sub>2</sub>O ir ledo vonelėje atšaldoma iki 0-5 °C. Paruošiamas 10 M NaOH tirpalas, kuris taip pat atvėsina iki 0-5 °C. 15 ml atšaldyto NaOH tirpalo per 1 val. sulašinama į pastoviai šaldomą ir maišomą cistamino dihidrochlorido tirpalą. Iš reakcijos mišinio cistaminas ekstrahuojamas dichlormetanu (100 ml, porcijomis po 10 ml). Dichlormetano ekstraktai sujungiami, džiovinami pridėjus bevandenio Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o po to rotaciniu garintuvu sukcentruojami iki klampios, gelsvo sirupo pavidalo masės, kuri dar kartą papildomai išdžiovinama pridėjus bevandenio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Gauta 4,3 g cistamino (išeiga 73,1 %). Cistaminas laikomas šaldytuve -20 °C temperatūroje. <sup>1</sup>H BMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,30 (4H, -NH<sub>2</sub>); 2,58 (4H, -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 2,80 (4H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C BMR (CDCl<sub>3</sub>): 39,56 (2C, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 41,29 (2CH, -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>).

### **2.2.2.2 MPEGI sintezė**

MPEGI sintetinti pagal [234] metodiką iš MPEG, kurių molekulinė masė 1000, 2000 arba 5000. Į 250 ml apvaliadugnę kolbą su šlifiniu kamščiu dedama 10 mmol MPEG ir įpilama 20 mmol trifenilfosfito bei 20 mmol jodmetano. Kolba sandariai užkemšama, statoma į alyvos vonią ir, reakcijos mišinį pastoviai maišant, jo temperatūra palaipsniui pakeliama iki 60 °C. Šioje temperatūroje reakcijos mišinys išlaikomas tol, kol ištirpsta visas MPEG. Tuomet maždaug per 2 valandas reakcijos mišinio temperatūra palaipsniui pakeliama iki 120 °C ir šioje temperatūroje reakcija vykdoma parą laiko.

Baigus sintezę, reakcijos mišinys atvėsinaamas ir MPEGI išekstrahuojamas dviem dejonizuoto vandens porcijomis po 25 ml. Ekstrahavimo metu sekama, kad į vandens fazę nepatektų su vandeniu nesimaišanti fazė (kad fazės geriau atsiskirtų, galima mišinį galima centrifuguoti). Tada vandeniniai ekstraktai sujungiami ir neutralizuojami su 0,5 M NaOH tirpalu iki pH 7 (pagal lakmuso popierėlį). Gautas tirpalas rototiniame-vakuuminiame garintuve sukcentruojamas iki sirupo konsistencijos ir išdžiovinamas ventiliuojamoje krosnelėje 40 °C temperatūroje. Gaunama kieta balta ar šviesiai gelsva vaško pavidalo medžiaga. Jodintų MPEG išeigos: 81,3 % (MPEGI1000), 95,7 % (MPEGI2000), 98,4 % (MPEGI5000).

### **2.2.3 Polialikileniminų darinių sintezė**

#### **2.2.3.1 Cistamino grandžių turinčių poli(hidroksipropileniminų) sintezė**

Cistamino grandžių turintys poli(hidroksipropileniminai) (PHPI-SS) sintetinti DMAC, kai bendra monomerų (DAP, DBP ir CT) koncentracija 40 %. PHPI-SS sintezei naudojami ekvivalentiniai kiekiai CT (ar CT kartu su DAP) ir DBP (po 0,0166 mol). CT ar CT ir DAP ištirpinami DMAC, tuomet sulašinamas DBP ir, nepertraukiamai maišant, reakcija vykdoma 7 paras 80 °C temperatūroje.

### 2.2.3.2 Metoksi-poli(etilenglikolio) grandinių turinčių poli(2-hidroksipropileniminų) sintezė

Metoksi-poli(etilenglikolio) grandinių turintys poli(2-hidroksipropileniminai) (PHPI-MPEG) buvo sintetinti 2 būdais. Pirmuoju (**A**) būdu į kolbutę dedama 0,001 mol MPEGI, 0,01 mol (0,9012 g) DAP ir toks DMAC kiekis, kad galutinė DAP, DBP ir MPEGI koncentracija būtų 40 %. Kolbutė užkemšama ir maišomas reakcijos mišinys 2 valandas išlaikomas 60 °C temperatūroje. Tuomet kolbutė atvėsinama ir į ją supilama 0,0095 mol (2,0699 g) DBP. Kolbutę užkemšus, reakcija 80 °C temperatūroje tęsiama 166 val. Sintetinant antruoju (**B**) būdu, į kolbutę dedama 0,01 mol (0,9012 g) DAP, 0,0095 mol (2,0699 g) DBP ir toks DMAC kiekis, kad galutinė DAP, DBP ir MPEGI koncentracija būtų 40 %. Kolbutę sandariai užkimšus, maišomas reakcijos mišinys 80 °C temperatūroje išlaikomas 144 val. Tuomet reakcijos mišinys trumpam atvėsinamas, suberiama 0,001 mol MPEGI ir reakcija 80 °C temperatūroje tęsiama dar 24 val.

Kadangi susintetintuose MPEGI -OH grupių pakeitimo jodu laipsniai nevisada siekia 100 % (t. y., ne visas MPEG yra jodinamas ir išlieka reakcijos produktuose), tai sintezei reikalingas jodinto produkto kiekis (m, g) apskaičiuojamas pagal (2.1) formulę:

$$m = \frac{\text{mol} \cdot 100 \cdot 126,9}{I_k} \quad (2.1),$$

čia:

Mol – sintezei numatytas gryno MPEGI kiekis, mol;

$I_k$  – kovalentinį ryšį sudariusio jodo kiekis susintetintame MPEG jodide, % (2.3.1.3 metodika);

126,9 – jodo santykinė atominė masė.

#### 2.2.4 Hidroksi- ir oksigrupes turinčių poliamidoaminų sintezė

Hidroksi- (PAMAMH) ir oksigrupes turinčių poliamidoaminų sintezės vykdytos 25 ml apvaliadugnėse kolbutėse. Naudoti ekvimoliniai monomerų kiekiai: 0,012 mol (1,850 g) MBA bei 0,012 mol (1,082 g) DAP ar 0,012 mol (3,629 g) EDODA. Monomerai ištirpinami H<sub>2</sub>O arba MeOH/H<sub>2</sub>O mišiniuose (tūriniai santykiai 50:50 ir 90:10). Bendra monomerų koncentracija reakcijos mišiniuose sudarė 20 %. Reakcijos vykdytos 7 paras 25 °C temperatūroje, reakcijos mišinį pastoviai maišant magnetine maišykle.

#### 2.2.5 Polialkileniminų, jų darinių ir poliamidoaminų gryninimas ir liofilizavimas

Reakcijas užbaigus, reakcijos mišiniai ištirpinami vandeniniame 0,15 M NaCl tirpale ir gryninami ultrafiltruojant per 10 kDa molekulinę masių perskyrimo ribos membraną. Iš pradžių tirpalai plaunami su 0,15 M vandeniniu NaCl tirpalu (kol ištekantio filtrato optinis tankis 220 nm šviesoje sumažėja iki 0,2), o NaCl pašalinamas plaunant dejonizuotu vandeniu (kol ištekantio filtrato elektrinis laidumas sumažėja iki 100 μS). Sulaikytieji ultrafiltravimo tirpalai sukonzentruojami vakuuminio-rotaciniu garintuvu iki sirupo pavidalo konsistencijos.

Į liofilizatoriaus *Alpha 2-4 LSC* indelius pilama 10-20 ml gryninto ir sukonzentruoto polimero tirpalo. Užšalimo stadijoje nustatoma -40 °C temperatūra, kurioje bandiniai išlaikomi 12 valandų. Polimero tirpalo pagrindinio džiovavimo metu atidaromas dujų balasto vožtuvas vakuuiniame siurblyje ir lentynos temperatūra pakeliama dešimčia laipsnių. Produkto temperatūrai pasiekus lentynos temperatūrą, temperatūra vėl pakeliama dešimčia laipsnių. Tai kartojama tol, kol produkto temperatūra pasiekia 0 °C. Tuomet uždaromas dujų balasto vožtuvas ir baigiamojo džiovavimo metu lentynos temperatūrą keliant kas 10 laipsnių pasiekama, kad produkto temperatūra taptų 15-20 °C.

## 2.3 Analizių metodikos

### 2.3.1 MPEGI analizė

#### 2.3.1.1 Bendrojo jodo kiekio MPEG jodide nustatymas

Į dvi Erlenmejerio kolbutes dedami 0,0001 g tikslumu pasverti ~1 g dydžio MPEGI bandiniai ir užpilami 0,5 M vandeniniu KOH tirpalu (20 ml). Prijungus grįžtamąjį aušintuvą, kolbutės statomos į smėlio vonelę, kurioje šildoma tiek, kad tirpalai silpnai virtų. Joje kolbutės išlaikomos 3-4 valandas. Baigus hidrolizę, kolbutės atvėsinaimos ir, pastoviai tirpalus maišant, į juos lašinama koncentruota HNO<sub>3</sub>, kol pasiekama neutrali (pagal lakmuso popierėlį) terpė. Taip paruošti bandiniai konduktometriškai titruojami 0,1 M AgNO<sub>3</sub> vandeniniu tirpalu. Bendras procentinis jodo kiekis bandinyje (I<sub>b</sub>, %) apskaičiuojamas pagal (2.2) formulę:

$$I_b = \frac{100 \cdot C \cdot V \cdot 126,9}{m \cdot 1000} \quad (2.2),$$

čia:

C – AgNO<sub>3</sub> tirpalo koncentracija, mol/l;

V – bandiniui titruoti sunaudoto AgNO<sub>3</sub> tirpalo tūris, ml;

M – bandinio masė, g;

126,9 – jodo santykinė atominė masė.

#### 2.3.1.2 Joninio (priemaišinio) jodo kiekio MPEGI nustatymas

Į dvi Erlenmejerio kolbutes dedami 0,0001 g tikslumu pasverti ~1 g dydžio MPEGI bandiniai ir užpilami 20 ml dejonizuoto vandens. Bandiniams ištirpus, patikrinama ir, jei reikia, pakoreguojama tirpalų pH, kad būtų apie 7. Tuomet, tirpalus pastoviai maišant, konduktometriškai titruojama 0,1 M



AgNO<sub>3</sub> vandeniniu tirpalu. Joninio jodo kiekis (I<sub>j</sub>, %) bandinyje apskaičiuojamas pagal (2.2) formulę.

### 2.3.1.3 Kovalentiškai prijungto jodo kiekio MPEG jodide nustatymas

Kovalentiškai prijungto jodo kiekis MPEGI (I<sub>k</sub>, %) apskaičiuojamas pagal (2.3) formulę:

$$I_k = I_b - I_j \quad (2.3),$$

čia:

I<sub>b</sub> – analiziškai (2.3.1.1) nustatytas bendrasis jodo kiekis bandinyje, %;

I<sub>j</sub> – analiziškai (2.3.1.2) nustatytas joninio jodo kiekis bandinyje, %.

### 2.3.1.4 MPEG hidroksigrupių pakeitimo jodu laipsnio nustatymas argentometrinio titravimo būdu

Nustačius kovalentiniškai prijungto jodo kiekį MPEGI (2.3.1.3), randamas -OH grupių pakeitimo jodu laipsnis (X<sub>OH</sub>), kuris rodo, kiek vidutiniškai -OH grupių yra pakeistos jodu vienoje MPEG molekulėje. Esant nepilnam jodinimui, 0 ≤ X<sub>OH</sub> ≤ 1, o esant pilnam, X<sub>OH</sub> = 1. X<sub>OH</sub> randamas pagal (2.4) formulę:

$$X_{OH} = \frac{MM \cdot I_k}{100 \cdot 126,9 - 109,9 \cdot I_k} \quad (2.4),$$

čia:

MM – MPEG molekulinė masė, g/mol;

I<sub>k</sub> – kovalentinį ryšį sudariusio jodo kiekis MPEGI, %;

109,9 – jodo santykinės atominės ir -OH grupės molekulinės masių skirtumas;

126,9 – jodo santykinė atominė masė.

### 2.3.1.5 MPEG hidroksigrupių pakeitimo jodu laipsnio nustatymas iš $^1\text{H}$ BMR spektroskopinės analizės duomenų

$X_{\text{OH}}$  taip pat galima apskaičiuoti suintegravus atitinkamų protonų signalus MPEGI  $^1\text{H}$  BMR spektre ( $\text{CDCl}_3$ ). Lyginami  $-\text{CH}_2\text{-I}$  (3,20-2,25 m.d) ir  $\text{CH}_3\text{-O-}$  (3,3 m.d) protonų signalų integralai ir  $X_{\text{OH}}$  randamas pagal (2.5) formulę. Galima lyginti ir  $-\text{CH}_2\text{-I}$  su  $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-}$  (3,4-3,5 m.d) signalų integralus. Tokiu atveju turėtų būti skaičiuojama pagal (2.6) formulę, bet apskaičiavimo tikslumas gausis mažesnis, nes  $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-}$  protonų signalų integralas yra labai didelis, o  $-\text{CH}_2\text{-I}$  – labai mažas.

$$X_{\text{OH}} = \frac{A \cdot 3}{B \cdot 2} \quad (2.5), \quad X_{\text{OH}} = \frac{H \cdot A}{2 \cdot (A + C)} \quad (2.6),$$

čia:

- A –  $-\text{CH}_2\text{-I}$  protonų signalų integralas (3,20-2,25 m.d);
- B –  $\text{CH}_3\text{-O-}$  protonų signalų integralas (3,3 m.d);
- C –  $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-}$  protonų signalų integralas (3,4-3,5 m.d);
- H – protonų skaičius MPEG oksietileno grupėse: 88 (MPEG 1000); 180 (MPEG 2000); 452 (MPEG 5000).

### 2.3.2 Sieros kiekio PHPI-SS polimeruose nustatymas redukcijos-titravimo būdu

Tiksliai pasvertas tiriamas polimero bandinys, kuriame galėtų būti apie 0,001 mol disulfidinių ryšių, dedamas į 100-150 ml talpos stiklinėlę su aukštomis sienelėmis. Į stiklinėlę įleidžiamas teflonuotas magnetukas. Bandinys ištirpinamas ~15-20 ml dejonizuoto  $\text{H}_2\text{O}$  ir pašarminamas 6 M NaOH tirpalu iki pH ~8-9 (pagal lakmuso popierėlį). Stiklinėlė statoma ant magnetinės maišyklės ir, reakcijos mišinį intensyviai maišant, į jį nedidelėmis porcijomis palaipsniui suberiama 0,3-0,5 g (~0,008 mol)  $\text{NaBH}_4$ . Beriant

NaBH<sub>4</sub> stengiamasi, kad mišinys pernelyg neputotų ir nebūtų išnešamas ant stiklinėlės sienelių. Kiekviena sekanti NaBH<sub>4</sub> porcija suberiama tik pilnai pasibaigus putojimui nuo prieš tai subertos porcijos. Jei putos išnešamos ant stiklinėlės sienelių, prieš beriant sekančią NaBH<sub>4</sub> porciją jos apiplaunamos nedideliu kiekiu dejonizuoto H<sub>2</sub>O. Subėrus visą NaBH<sub>4</sub>, reakcijos mišinys stiklinėlėje dar maišomas 30 min. Po to, nenutraukiant maišymo, į stiklinėlę nedidelėmis porcijomis supilama ~10 ml 3 M HNO<sub>3</sub>. Putojimui nurimus, lakmuso popierėliu patikrinama mišinio pH ir su HNO<sub>3</sub> jis pakoreguojamas iki ~1. Jei virš tirpalo stiklinėlės sienelės aplipusios drumzlėmissienelės apiplaunamos dejonizuotu H<sub>2</sub>O ir į mišinį supilama ~10 ml 6 M NaOH tirpalo. Jei mišinio pH nesiekia ~9-10 (tikrinama lakmuso popierėliu), į mišinį dar įpilama NaOH. Po to į stiklinėlę supilama 10 ml koncentruoto amoniako vandeninio tirpalo ir reakcijos mišinys titruojamas potenciometriškai, naudojant standartizuotą 0,1 M AgNO<sub>3</sub> tirpalą. Potenciometriniam titravimui naudojami sidabro/sidabro chloridinis elektrodai. Potencialo šuolis stebimas maždaug tarp -325 ir -175 mV. Nustačius ekvivalentinį tašką, sieros kiekis bandinyje (S, %) apskaičiuojamas pagal 2.7 formulę:

$$S \% = \frac{V \cdot C \cdot 32,066 \cdot 100}{g \cdot 1000} \quad (2.7),$$

čia:

- V – titravimui sunaudoto AgNO<sub>3</sub> tūris, ml;
- C – AgNO<sub>3</sub> tirpalo koncentracija, mol/l;
- 32,066 – sieros santykinė atominė masė;
- G – tyrimui paimtos medžiagos masė, g.

Neredukuoto bandinio titravimas atliekamas tam, kad būtų įsitikinta, jog neredukuotame bandinyje nėra merkaptograpių. Analizė atliekama aprašytu

būdu, tik prieš tai nenaudojama redukcija. Bandinys ištirpinamas, pašarminama NaOH, pridedama amoniako tirpalo ir titruojama 0,1 M AgNO<sub>3</sub> tirpalu.

### 2.3.3 Išeigų nustatymas

CT ir MPEGI išeigos (%) nustatomos pasveriant išdžiovintus reakcijos produktus, ir apskaičiuojamas praktinės ir teorinės masių santykis (%).

Gravimetrijos būdu nustatomos ir ultrafiltruotų polimerų išeigos. Tuo tikslu ant 0,0001 g tikslumu pasverto laikrodžio stiklelio supilama 2 ml ultrafiltruoto polimero tirpalo. Džiovinama ventiliuojamoje krosnelėje 40 °C temperatūroje 24 valandas. Po džiovinimo laikrodžio stiklelis su polimeru pasveriamas 0,0001 g tikslumu. Iš masių skirtumo randama sauso polimero masė, esanti 2 ml ultrafiltruoto tirpalo. Žinant ultrafiltruoto polimero tirpalo visą tūrį, polimero išeiga (%) apskaičiuojama pagal 2.8 formulę:

$$\eta = \frac{V \cdot m}{2 \cdot m_0} \cdot 100 \quad (2.8),$$

čia:

- V – ultrafiltruoto polimero tirpalo tūris, ml;
- M – sauso polimero masė ant laikrodžio stikliuko, g;
- m<sub>0</sub> – bendra monomerų masė, naudota sintezei, g.

### 2.3.4 Molekulinių sietų chromatografija

Analizė atlikta naudojant *Viscotek GPC max* chromatografą, sujungtą su universalia A6000M kolonėle. Ji užpildyta poli(hidroksimetakrilatu), turinčiu 15 Å dydžio akutes (molekulinių masių darbinė zona – 3·10<sup>2</sup> - 2·10<sup>7</sup> Da). Naudota trijų jutiklių sistema: šviesos lūžio rodiklio, lazerio šviesos (670 nm) sklaidos 90° kampu ir santykinio slėgio. Mėginių koncentracija 5 mg/ml. Naudota mobili fazė – 250 mM acetatinis buferis (pH 4), mobilios fazės

judėjimo greitis – 0,5 ml/min. Chromatografuojama 35 °C temperatūroje, chromatogramas užrašant ir apdorojant *OmniSEC* programa.

MSC analizei reikalingos polimerų dn/dc vertės acetatiniame buferyje 35 °C temperatūroje nustatytos su *Waters 410* lūžio rodiklio diferenciniu refraktometru. Detektoriaus palyginamoji ir analizinė celės praplaunamos 250 mM acetatiniu buferiu ir, naudojant „AutoZero“ funkciją, „nununamos“ signalo vertės. Naudojamos 0,2-5 mg/ml polimerų koncentracijos, pradedant matuoti nuo mažiausios. Į analizinę celę suleidus 2-3 ml tirpalo palaukiama, kol nusistovi signalo vertė, ji užrašoma ir leidžiamas sekantis mėginys. Atlikus tyrimus, iš gautų duomenų brėžiama išmatuotų verčių (mV) tiesinė priklausomybė nuo polimero koncentracijos ir apskaičiuojamas jos polinkio kampo tangentas ( $\text{tg}(\alpha_p)$ ). Analogiškai atliekamas prietaiso kalibravimas su žinomo lūžio rodiklio KCl vandeniniais tirpalais. Tik šiuo atveju palyginamoji celė užpildoma vandeniu ir apskaičiuojamas išmatuotų verčių tiesinės priklausomybės nuo KCl tirpalo lūžio rodiklio polinkio kampo tangentas ( $\text{tg}(\alpha_k)$ ). Polimerų dn/dc vertė apskaičiuojama:

$$\frac{dn}{dc} = \frac{\text{tg}(\alpha_p)}{\text{tg}(\alpha_k)} \quad (2.9),$$

Gautos tokios polimerų dn/dc vertės: PHPI – 0,1858; PHPI-MPEG1000 – 0,1697; PHPI-MPEG2000 – 0,1442; PHPI-MPEG5000 – 0,1482, PAMAM – 0,1945. PHPI-SS polimerams naudota PHPI būdinga dn/dc vertė (0,1858).

### **2.3.5 Dalelių dydžio nustatymas dinaminės šviesos sklaidos metodu**

Polimerų makromolekulių raizginėlių dydis tirpaluose nustatomas su *Malvern Nano-ZS* analizatoriumi, naudojant polimerų tirpalus (5 mg/ml) acetatiniame buferyje ar 150 mM NaCl. Dalelių dydžių matavimo diapazonas 0,1-10000 nm, matuojama 173° kampu, lazeriniu 632,8 nm bangos ilgio šviesos šaltiniu. Iš gautų autokoreliacijos kreivių apskaičiuojamas tirpale

esančių dalelių difuzijos koeficientas, o iš jo – dalelių užimamo tūrio pasiskirstymas pagal jų hidrodinaminio skersmens dydį.

### 2.3.6 Lydymosi ir stiklėjimo temperatūrų nustatymas

Polimerų lydymosi temperatūros ( $T_{\text{lyd}}$ ) buvo nustatytos naudojant diferencinį skenuojamąjį kalorimetrą *DSC 8000 (Perkin Elmer)*. Analizė atlikta inertinėje azoto dujų atmosferoje (azoto tekėjimo greitis – 40 ml/min). Bandinys (apie 4,5 mg) dedamas į aliuminio lėkštelę su keliomis skylutėmis dangtelyje ir kaitinamas keliant temperatūrą iki 130 °C (10 °C/min greičiu), tada atšaldomas iki 20 °C (30 °C/min greičiu) ir pakartotinai vėl kaitinamas iki 180 °C (10 °C/min). Lydymosi ir stiklėjimo temperatūrų vertės buvo nustatytos iš pakartotinio kaitinimo kreivės.  $T_s$  randama ekstrapoliuojant termogramos tiesines dalis prieš endoterminį laiptelį ir nuleidžiant statmenį į temperatūrų skalę iš taško, kuriame laiptelio aukštis lygus pusei atstumo tarp ekstrapoliacijos tiesių.

### 2.3.7 Spektroskopinė analizė

FTIR spektrai užrašyti *PERKIN-ELMER* spektrometru “*Frontier*“ 3700-550  $\text{cm}^{-1}$  intervale, esant 4  $\text{cm}^{-1}$  skiriamajai gebai.

BMR spektrai užrašyti *Brucker 400 Ascend<sup>TM</sup>* branduolių magnetinio rezonanso spektrometru (400 MHz), 29,7 °C temperatūroje, signalų atskaitos tašku naudojant tirpiklių (DOH ir  $\text{CHCl}_3$ ) signalus. Signalų cheminiai poslinkiai pateikti  $\delta$  skalėje milijoninėmis dalimis (m.d). Polialikileniminai (~0,1 g) buvo tirpinami  $\text{D}_2\text{O}$ , o MPEGI bei CT (~0,05 g) tirpinami deuteruotame chloroforme ( $\text{CDCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  BMR spektrai kaupti 4-6 kartus, o  $^{13}\text{C}$  – nuo 200 iki 6000 kartų (priklausomai nuo medžiagos koncentracijos). Kad pagerėtų spektrų kokybė, PHPI tirpalai  $\text{D}_2\text{O}$  buvo pašarminami pridėjus 40 % NaOD iki pH 12-13.

Kiekybinė  $^{13}\text{C}$  BMR analizė atlikta su šarminių (PHPI) ir nešarminių (PEIHI, PHPI-SS, PHPI-MPEG bei PAMAM) tirpalų spektrais. Kad būtų

išvengta NOE (*Nuclear Overhauser*) efektų, kiekybiniam matavimams naudotas [136] šaltinyje pateiktas metodas, paremtas *Inverse Gated Decoupling* principu. Tai atlikta naudojant *zgig30* pulsų seką.

Raman spektrai užrašyti *PERKIN ELMER RamanStation 400F* spektrometru 2200-1000  $\text{cm}^{-1}$  intervale. Lazerio galingumas 100 W, kaupimo laikas 60 s.

XPS spektrai užrašyti naudojant *VG Scientific* spektrometrą *ESCALAB MK II*, esant Mg  $K_{\alpha}$  ( $h\nu=1253,6 \text{ eV}$ ) spinduliuotei. Krūvio korekcija atlikta pagal C 1s surišimo energijos juostą atitinkančią 284,6 eV.

### 2.3.8 Potenciometrinis titravimas ir disociacijos konstantų nustatymas

Potenciometriniam titravimui naudotas *METLER TOLEDO MP220* pH-metras ir stiklo elektrodas *HANNA HI 1230*. Titravimui naudoti liofilizuoti polimerai, mėginių koncentracija – 0,01 g /ml 0,15 M NaCl tirpale. Tirpalas titruojamas mikrobiurete 21 °C temperatūroje, naudojant 0,1 M HCl ir NaOH tirpalus, pH vertes pasižymint 0,02 tikslumu kas 0,1 ml suvartoto titranto.

Iš potenciometrinio titravimo kreivės nustatyti ekvivalentiniai taškai ir apskaičiuotas polielektrolito jonizacijos laipsnis ( $\alpha$ ) kiekviename potenciometrinės kreivės taške. Priimta, kad rūgštiniame ekvivalentiniame taške visų aminogrupių jonizacijos laipsnis lygus nuliui, o šarminiame – vienetui. Iš titravimo duomenų brėžta tirpalo pH priklausomybė nuo  $\lg[\alpha/(1-\alpha)]$  ir duomenys aprašyti tiesės lygtimi ( $y=n \cdot x+b$ ). Laisvasis tiesės lygties narys b (taškas, kuriame tiesė kerta ordinačių ašį) lygus iminogrupių rūgštinei disociacijos konstantai ( $\text{pK}_a$ ), o tiesės polinkio kampo tangentas – tai Henderson ir Hasselbalch lygties koeficientas n [235]. Iš potenciometrinio titravimo duomenų ( $\text{pK}_a$ ) apskaičiuojama buferinė talpa, kuri parodo pH intervalą, kuriame protonizuojasi amino grupės. Buferinė talpa – tai stiprios rūgšties arba šarmo kiekis, kurio reikia, kad 1 litro buferinio tirpalo pH pasikeistų vienetu ir randama iš lygties  $\text{pH}=\text{pK}_a\pm 1$  [236].

### 2.3.9 Reakcijos baigties laipsnio nustatymas

Reakcijos baigties laipsnis nustatomas pagal  $\text{Br}^-$  kiekį polialkileniminų sintezės reakcijos produktuose. Reakcijos produktai praplaunami dietileteriu ir išdžiovinami vakuuminėje krosnelėje  $40\text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje. Išdžiovinti polimerai tirpinami vandenyje (0,2 g/40 ml) ir titruojami 0,1 M  $\text{AgNO}_3$  tirpalu, kuris lašinamas po 0,5 ml. Titravimo metu *METLER TOLEDO Conductivity meter FE30/FG3* konduktometru matuojamas titruojamo tirpalo elektros laidumas. Ekvivalentinis taškas nustatomas pagal kreivės lūžio vietą titravimo kreivėje. Bromo anijonų kiekis  $X_{\text{Br}^-}$  (%) reakcijos mišinyje apskaičiuojamas pagal 2.10 formulę:

$$X_{\text{Br}^-} = \frac{V_{\text{ekv}} \cdot C \cdot 79,904 \cdot 100}{m \cdot 1000} \quad (2.10),$$

čia:

$V_{\text{ek}}$  – iki ekvivalentinio taško sunaudoto titranto tūris, ml;

$C$  –  $\text{AgNO}_3$  koncentracija, mol/l;

79,904 – Br santykinė atominė masė;

$M$  – bandinio masė, g.

Reakcijos baigties laipsnis (mol%) apskaičiuojamas pagal 2.11 formulę:

$$U = \frac{X_{\text{Br}^- \text{praktinis}}}{X_{\text{Br}^- \text{teorinis}}} \cdot 100 \quad (2.11),$$

čia:

$X_{\text{Br}^- \text{praktinis}}$  – bromo anijonų kiekis, apskaičiuotas iš titravimo duomenų;

$X_{\text{Br}^- \text{teorinis}}$  – teorinis bromo anijonų kiekis (51,88 % PHPI atveju ir 52,56 % PEIHI atveju).



### 2.3.10 Elementinė mikroanalizė

PHPI-SS polimerų elementinė mikroanalizė (N, H, C, S) atlikta naudojant *Thermo Scientific™ FLASH 2000 CHNS/O Analyzer*. N, H, C nustatymo paklaida siekia iki 0,4 %, o S – iki 1 %.

### 2.3.11 Kalorimetrinio polikondensacijos kinetikos tyrimo metodika

Polikondensacijos kinetika tirta *Omnical Inc. SuperCRC* izoterminiu kalorimetru 10 ml tūrio užsukamuose indeliuose. Tyrimui naudoti tokie patys monomerų santykiai, tirpikliai, koncentracijos ir temperatūros, kaip ir polialkileniminius sintetinant didesniuose tūriuose, tik reakcijos trukmė buvo iki 24 val. HDA ir DBE polikondensacijos atveju reakcija buvo tiriama ir 25 °C temperatūroje.

Kalorimetriniai duomenys (šilumos srauto priklausomybė nuo reakcijos trukmės) buvo registruojami ir kaupiami naudojant *WinCRC* programą, kurioje prieš matavimus nustatoma reakcijos temperatūra, maišymo greitis ( $720 \text{ min}^{-1}$ ), temperatūros kėlimo greitis ( $0,1 \text{ }^\circ\text{C/min}$ ). Vienas indelis užpildomas tirpikliu, kitas – tirpikliu, kuriame ištirpintas diaminas. Indeliai įleidžiami į matavimo celę ir, nusistovėjus bazinei linijai, sulašinamas dihalogenidas. Tai laikoma reakcijos pradžia. Gautos šilumos srauto priklausomybės tiesiogiai atspindi polikondensacijos reakcijos greitį.

Po reakcijos pagal 2.3.9 metodiką nustatomas  $\text{Br}^-$  kiekis reakcijos produktuose ir apskaičiuojamas reakcijos baigties laipsnis (U). Konversijos priklausomybė nuo reakcijos trukmės ( $q=f(\tau)$ ) gaunama šilumos srauto (mW) priklausomybę konvertuojant į energijos (J) priklausomybę ir ją skaitiškai (Simpsono būdu) integruojant. Tuomet integralinės kreivės pirmojo taško ordinatė sutapatinama su 0, o paskutiniojo – su U.

## 2.4 Poliakileniminų ir poliamidoaminų sudėties ir šakotumo nustatymas

### 2.4.1 MPEG grandinių skaičiaus vienoje statistinėje PHPI-MPEG

#### makromolekulėje apskaičiavimas

MPEG grandinių skaičius vienoje statistinėje PHPI-MPEG makromolekulėje ( $k$ ) apskaičiuojamas pagal 2.12 formulę:

$$\begin{cases} M_n = k \cdot M_{\text{MPEG}} + m \cdot 73 \\ \text{OE} = \left( k \cdot \frac{M_{\text{MPEG}}}{44} \right) / \left( k \cdot \frac{M_{\text{MPEG}}}{44} + m \right) \cdot 100 \end{cases} \quad (2.12),$$

čia:

- $m$  – 2-hidroksipropilenimino grandžių skaičius statistinėje PHPI-MPEG makromolekulėje;
- $k$  – MPEG grandinių skaičius vienoje statistinėje PHPI-MPEG makromolekulėje;
- OE – Iš  $^1\text{H}$  BMR duomenų apskaičiuotas oksietileno grandžių kiekis PHPI-MPEG, mol% (žr. 2.14 formulę);
- $M_{\text{MPEG}}$  – MPEG grandinės molekulinė masė, g/mol;
- $M_n$  – iš MSC duomenų apskaičiuota PHPI-MPEG skaitinė molekulinė masė, Da;
- 73 – 2-hidroksipropilenimino grandies molekulinė masė, g/mol;
- 44 – oksietileno grandies molekulinė masė, g/mol.

Iš  $^1\text{H}$  BMR duomenų pagal 2.13 formulę apskaičiuojamas 2-hidroksipropilenimino (PHI) ir oksietileno grandžių (OE) molinis santykis, o pagal 2.14 formulę – oksietileno grandžių kiekis PHPI-MPEG:

$$Y = \frac{A \cdot 4}{B \cdot 1} \quad (2.13), \quad \text{OE} = \frac{1}{1 + Y} \cdot 100 \quad (2.14),$$

čia:

- Y – 2-hidroksipropilenimino ir oksietileno grandžių molinis santykis;
- A –  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NH}-$  protonų signalų integralas (4,1-4,3 m.d);
- B –  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$  protonų signalų integralas (3,4-3,5 m.d);
- OE – oksietileno grandžių (OE) kiekis PHPI-MPEG, mol%.

#### 2.4.2 PHPS-SS polimerų sudėties apskaičiavimas pagal sieros kiekį

Redukcijos-titravimo (2.3.2 metodika) ar elementinės analizės būdu (2.3.10 metodika) nustatius sieros kiekį PHPI-SS polimeruose, apskaičiuojami juose esantys etilenditioetilenimino (EDEI) ir 2-hidroksipropilenimino (HPI) grandžių kiekiai (%) pagal 2.15 formules:

$$a = \frac{S \cdot 216,165}{2 \cdot 32,066}; \quad b = 100 - a \quad (2.15),$$

čia:

- a – EDEI grandžių kiekis, %;
- b – HPI grandžių kiekis, %;
- 216,165 – protonizuotos EDEI grandies molekulinė masė, g/mol;
- 2 – sieros atomų skaičius EDEI grandyje;
- 32,066 – sieros santykinė atominė masė.

Apskaičiuojami EDEI ir HPI grandžių kiekiai (mol%) pagal 2.16 formulę:

$$A = \frac{\frac{a}{216,165}}{\frac{a}{216,165} + \frac{b}{154,006}} \cdot 100; \quad B = 100 - A \quad (2.16),$$

čia:

- A – EDEI grandžių kiekis, mol%;
- B – HPI grandžių kiekis, mol%;
- 216,165 – protonizuotos EDEI grandies molekulinė masė, g/mol;
- 154,006 – protonizuotos HPI grandies molekulinė masė g/mol.

HPI ir EDEI grandžių molinis santykis PHPI-SS polimeruose apskaičiuojamas kaip B/A.

### 2.4.3 PHPI-SS sudėties apskaičiavimas iš $^1\text{H}$ ir $^{13}\text{C}$ BMR spektroskopijos duomenų

Pagal reakcijos mišinio sudėtį apskaičiuotas teorinis CT ir HPI grandžių kiekis polimere (pavyzdžiui, kai CT:DBP:DAP=0,5:1:0,5, tai reiškia, jog polimero pasikartojančią sandaros grandį turi sudaryti 1 CT ir 3 HPI grandys). Praktiniai grandžių kiekiai iš  $^1\text{H}$  BMR spektrų randami lyginant HPI ir EDEI grandžių protonų signalų integralus, esančius tarp 4,4-3,7 m.d ( $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-NH-}$ ) ir 3,7-2,1 m.d ( $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$ ).  $^{13}\text{C}$  BMR spektruose lyginami anglies signalų integralai esantys tarp 65,7 m.d bei 32 ir 33,5 m.d. Vienai EDEI grandžiai tenkantis HPI grandžių kiekis apskaičiuojamas pagal 2.17 ir 2.18 formules:

$$X_{\text{HPI}} = \frac{8 \cdot S_1}{S_2 - 4 \cdot S_1} \quad (2.17), \quad X_{\text{HPI}} = \frac{Q_1}{2 \cdot Q_2} \quad (2.18),$$

čia:

- $S_1$  –  $\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-NH-}$  signalų integralas (4,4-3,7 m.d);
- $S_2$  –  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$  signalų integralas (3,7-2,1 m.d).

Q<sub>1</sub> –  $-\underline{\text{CH}}_2-\underline{\text{CH}}(\text{OH})-\underline{\text{CH}}_2-\text{NH}-$  signalų integralas  
(65,7 m.d);

Q<sub>2</sub> –  $-\underline{\text{CH}}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{S}-\text{S}-\underline{\text{CH}}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{NH}-$  signalų integralas  
(32 ir 35,5 m.d).

#### 2.4.5 Šakotumo nustatymas

Polialkileniminų, jų darinių ir poliamidoaminų šakotumo laipsnis apskaičiuotas remiantis [136] šaltinyje pateiktu principu.

PEIHI jis skaičiuojamas iš anglies, esančios šalia pirminių, antrinių ir tretinių aminogrupių, signalų integralų (A): 39,2 m.d (A<sub>1</sub>), 43,5 m.d (A<sub>2</sub>), 44,5 m.d (A<sub>3</sub>), 48,3 m.d (A<sub>4</sub>), 49,2 m.d (A<sub>5</sub>), 50,5 m.d (A<sub>6</sub>), 52-54 m.d (A<sub>7</sub>), 56,8 m.d (A<sub>8</sub>). Pirminių, antrinių ir tretinių aminogrupių kiekiai (N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, mol%) apskaičiuojami pagal 2.19 ir 2.20 formules:

$$(A_7+A_8) + \frac{(A_4+A_5+A_6)}{2} + \frac{(A_1+A_2+A_3)}{3} = Z \quad (2.19),$$

$$N_1 = \frac{A_7+A_8}{Z} \cdot 100; \quad N_2 = \frac{A_4+A_5+A_6}{2 \cdot Z} \cdot 100; \quad (2.20),$$

$$N_3 = \frac{A_1+A_2+A_3}{3 \cdot Z} \cdot 100;$$

PHPI, PHPI-SS, PHPI-MPEG bei PAMAM šakotumo laipsnis skaičiuojamas iš anglies, esančios šalia pirminių, antrinių ir tretinių aminogrupių, signalų integralų (A): 38-44 m.d (A<sub>1</sub>), 46-52 m.d (A<sub>2</sub>), ir 53-59 m.d (A<sub>3</sub>). Pirminių, antrinių ir tretinių aminogrupių kiekiai (N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, mol%) apskaičiuojami pagal 2.21 formules:

$$A_1 + \frac{A_3}{2} + \frac{A_2}{3} = Z; \quad (2.21).$$

$$N_1 = \frac{A_1}{Z} \cdot 100; \quad N_2 = \frac{A_2}{2 \cdot Z} \cdot 100; \quad N_3 = \frac{A_3}{3 \cdot Z} \cdot 100$$

Visais atvejais šakotumo laipsnis apskaičiuojamas kaip  $N_2/N_3$ .

## 2.5 Polimerų taikymas DNR/siRNR transfekcijai ir RNR gryninimui

Genų transfekcijos tyrimai buvo atlikti „Thermo Fisher Scientific Baltics“ Vilniaus padalinyje, Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centro Ląstelių biologijos laboratorijoje. Eksperimentus atliko Lolita Žaliauskienė ir Kristina Slavuckytė. Buvo įvertintas transfekcijos efektyvumas, kuris parodo gyvų ląstelių procentą, kuriose vyksta GFP geno raiška; vidutinis fluorescencijos intensyvumas parodo GFP baltymo raiškos efektyvumą, t. y. kaip ryškiai fluorescuoja ląstelės; toksiškumas parodo žuvusių ląstelių procentą.

### 2.5.1 DNR/siRNR–polimero kompleksų sudarymas transfekcijai

Kompleksai buvo sudaromi beseruminėje RPMI terpėje. Naudojama 0,5-1  $\mu\text{g}$  DNR/siRNR. Į reakcijos mišinį pilamas polimerų tirpalų kiekis apskaičiuojamas pagal nustatytą polimero tirpalo koncentraciją. Bendras reakcijos tūris – 100  $\mu\text{l}$ . Mišinys gerai išmaišomas ir inkubuojamas kambario temperatūroje 15 min.

### 2.5.2 DNR/siRNR–polimero dalelių dydžio matavimas

DNR-polimero kompleksai sudaromi 100  $\mu\text{l}$  0,15 M NaCl tirpale arba RPMI/SF terpėje. Sudarant kompleksus, dedama 1  $\mu\text{g}$  žiedinių DNR ir 7,5-150  $\mu\text{mol}$  tiriamų polimerų (PHPI-MPEG, PHPI-SS). siRNR-polimero

kompleksas sudaromas iš eGFP siRNR ir praskiedžiamas pridėjus 50 µl beseruminės terpės. Galutinė siRNR koncentracija – 25 nM, o PHPI-MPEG koncentracijos nuo 2 iki 140 µM.

Kompleksų stabilumui įvertinti dalelių dydžiai matuojami iš karto (tik sumaišius sudedamąsias dalis), po 20 min ir po 60 min. Dalelės matuojamos dinaminės šviesos sklaidos prietaisu *Malvern Zetasizer NanoS*. Eksperimentų duomenys analizuojami *Malvern DTS v 5.10* programa.

### **2.5.3 *In vitro* transfekcija ir jos efektyvumo nustatymas**

DNR transfekcijai naudojamos ląstelės vieną dieną prieš transfekciją persėjamos į 24 šulinėlių plokšteles. Ląstelių tankis –  $6 \cdot 10^4$  ląstelių šulinėlyje / 1 ml DMEM terpės. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje 5 % CO<sub>2</sub> aplinkoje, kol padengia apie 70-80 % plokštelės paviršiaus.

siRNR transfekcijai naudojamos ląstelės vieną dieną prieš transfekciją persėjamos į 48 šulinėlių plokšteles. Ląstelių tankis –  $2 \cdot 10^4$  ląstelių šulinėlyje / 250 µl RPMI terpės su 10 % FBS. GFP ekspresija indukuojama doksiciklinu (galutinė koncentracija ląstelėse 1 µg/ml). Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje 5 % CO<sub>2</sub> aplinkoje.

Paruošti siRNR/DNR-polimero kompleksai (2.5.1 metodika) sulašinami į šulinėlį ant ląstelių. Po transfekcijos praėjus 48 val., ląstelės ruošiamos srautinei citometrijai. Nuo adhezinių ląstelių nusiurbiamą terpę, užpilama 100 µl tripsino ir 1-2 min inkubuojama kambario temperatūroje. Tripsinas neutralizuojamas su 100 µl FACS buferio, ląstelės nuplaunamos nuo plokštelės paviršiaus. Paruošiama 96 šulinėlių plokštelė, į šulinėlius įpilama 100 µl 2 kartus praskiesto fiksavimo buferio. Ląstelių suspensija (100 µl) perkeliama į šulinėlį su fiksavimo buferiu ir intensyviai pipetuojuant sumaišoma. Ląstelės analizuojamos *Guava EasyCyte Plus* aparatu, rezultatai apdorojami naudojantis *Guava CytoSoft* programa.

#### **2.5.4 DNR atpalaidavimo iš kompleksų tyrimas elektroforezės metodu**

DNR atpalaidavimas iš sudarytų kompleksų tikrinamas DNR poslinkio agaroziniame gelyje metodu. Į vandenį įdedama 1 µg DNR ir įvairus kiekis biodegraduojančio polimero, priklausomai nuo tiriamo polimero pradinės koncentracijos. Bendras mišinio tūris – 15 µl. Mišinys pirmiausia 15 minučių inkubuojamas, kad susidarytų kompleksai. Po to į mišinį pridedami skirtingi kiekiai (DTT) (0; 50; 100; 250; 500; 1000 nmol). Vėl inkubuojama 15 min. Mėginiai dažomi su *6X DNA Loading Dye* dažu ir į 1 % agarozinį gelį suleidžiamas visas tirpalo tūris. Atliekama elektroforezė.

#### **2.5.5 DNR atpalaidavimo iš kompleksų tyrimas gel-filtracijos metodu**

Gel-filtracija atlikta naudojant *Amersham Biosciences Acta Purifier* skysčių chromatografijos sistemą. Naudojama *Superdex 75 10/300 GL* chromatografinė kolonėlė, skirta 3-70 kDa masės medžiagoms atskirti. Kolonėlės tūris – 24,5 ml.

Prie HPLC sistemos prijungta gel-filtracinė kolonėlė praplaunama trimis tūriais vandens, kol pilnai išlyginama bazinė linija ir nekinta elektrinis laidumas. Mobili fazė – 0,2 M NaCl tirpalas, jos judėjimo greitis – 0,5 ml/min. 0,5 ml mėginio perfiltruojama per 0,22 µm filtrą ir įleidžiama į kolonėlę. Detektuojama su 220 nm šviesa. Po elucijos kolonėlė kiekvieną kartą praplaunama vandeniu.

#### **2.5.6 Dviguba DNR transfekcija ir RNR išskyrimas**

Dieną prieš transfekciją ląstelės užsėjamos 6 šulinėlių plokštelėje, tuo pačiu tankiu kaip ir 2.5.3 metodikoje, po 4 ml terpės šulinėlyje. Transfekcijos dieną ląstelių tankis turi būti apie 80 %. Pirmą transfekcijos dieną transfekuojami trys šulinėliai iš šešių. Vienai transfekcijai naudojami 4 µg plazmidžių ir eksperimentiškai nustatytas optimalus polimero kiekis. Kompleksai sudaromi beseruminėje RPMI terpėje, bendras reakcijos tūris –



400 µl. Sekančią dieną po transfekcijos terpė nusiurbama ir užpilama nauja terpė. Vieną kartą transfektuotos ląstelės transfekuojamos pakartotinai, naudojant tokius pačius (naujai paruoštus) transfekcijos mišinius. Analogiškai transfekuojamos ląstelės kituose trijuose šulinėliuose, kur dar transfekcija nebuvo atlikta. Paliekamas ir kontrolinis šulinėlis.

Praėjus parai po antros transfekcijos, ląstelės nutripsinizuojamos, centrifuguojamos ir suspenduojamos FACS buferyje. Dalis suskaičiuotų ląstelių naudojama RNR gryninimui, o dalis – transfekcijos efektyvumo nustatymui su *Guava EasyCyte Plus* aparatu. Duomenys apdorojami *CytoSoft 5,3* programa.

RNR gryninimas atliekamas pagal *GeneJet™ RNA Purification Kit, Mammalian Cultured Cells Total RNA Purification Kit* protokolą. 10 µl mėginio dažoma *2X RNA Loading Dye* dažu. Rezultatai analizuojami 1 % agarozės gelyje.

### 3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

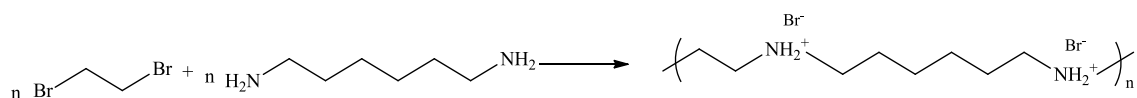
#### 3.1 Polialkileniminų sintezė ir tyrimas

Kadangi kai kurie polikondensaciniu būdu gauti polialkileniminai pasižymėjo labai puikiomis transfekcinėmis savybėmis [72, 73], ir polikondensacinis polialkileniminų sintezės būdas vis dar mažai ištirtas, šio mokslinio darbo rėmuose buvo bandoma detaliau ištirti dihalogenalkanų polikondensaciją su diaminoalkanais, o tuo pačiu ir susintetinti įvairesnės sudėties bei savybių polialkileniminius bei nustatyti jų gebą transfekuoti DNR/siRNR.

Šiame darbe pirmiausia buvo ieškoma tokių reakcijos sąlygų, kad susidarytų didelės molekulinės masės (didesnės už 10 kDa) ir geresnių išėigų polialkileniminai. Monomerų tarpusavio reakcijos kinetika tirta nustatant  $\text{Br}^-$  kiekį reakcijos mišiniuose bei kalorimetriškai. Išgryninti polimerai buvo analizuojami nustatant jų molekulinę masę, hidrodinaminius skersmenis, šakotumą, aminograpių jonizacijos konstantas bei buferinę talpą; visi šie parametrai ypač svarbūs polimeriniams katijoniniams vektoriams, nes leidžia preliminariai nuspėti vektoriaus gebą transfekuoti DNR/siRNR.

##### 3.1.1 Poli(etileniminheksametilenimino) sintezė ir savybės

Diaminų polikondensacijos su dihalogenalkanais sąlygų optimizavimui buvo pasirinkti 1,6-heksametilendiamino (HDA) ir 1,2-dibrometano (DBE) monomerai, nes jie yra itin pigūs, lyginant su kitais šiame darbe naudotais monomerais. Šių monomerų polikondensacija (3.1 schema) tirta, keičiant įvairias reakcijos sąlygas: tirpiklį (metanolis (MeOH), 2-propanolis (IPOH), etilenglikolis, vanduo, *N,N*-dimetilacetamidas (DMAC), *N,N*-dimetilformamidas (DMF), propilenarbonatas (PC), acetonitrilas, chlorbenzenas), temperatūrą (25-50 °C), bendrą monomerų koncentraciją (15-70 %), reakcijos trukmę (1-372 val.).



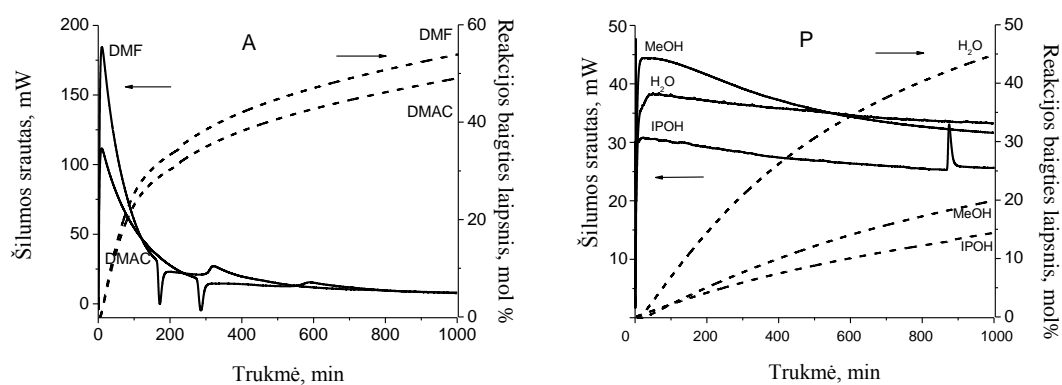
### 3.1 schema. 1,6-heksametilendiamino ir 1,2-dibrometano polikondensacija.

Naudojant 60 ir 70 % bendrą monomerų koncentraciją 50 °C temperatūroje reakcijos mišiniai beveik visuose tirpikliuose per kelias reakcijos valandas tapdavo heterogeniniai ir labai tiršti ir jų maišymas magnetine maišykle tapdavo neįmanomas. Tik reakciją vykdant H<sub>2</sub>O, etilenglikolyje, DMAC ir DMF, reakcijos mišiniai likdavo homogeniniai. Akivaizdu, kad tokią tirpiklių įtaką lėmė jų poliškumas. Taip pat buvo nustatyta, jog nei monomerų supylimo į reakcijos mišinį tvarka, nei maišymo greitis esminių pokyčių reakcijos mišinio homogeniškumui/heterogeniškumui bei ultrafiltruoto PEIHI išėigai ir molekulinei masei neturėjo. Atsižvelgus į tai, vėliau monomerai buvo supilami visi iš karto (2.2.1.1 metodika), o jų koncentracija reakcijos mišiniuose sumažinta iki 50 %. Tokios koncentracijos tirpaluose net ir heterogeninių reakcijos mišinių maišymas jokių problemų nekėlė.

Siekiant išsiaiškinti 1,6-heksametilendiamino ir 1,2-dibrometano reakcijų eigą, jos buvo tirtos kalorimetriškai (2.3.11 metodika). Izoterminių kalorimetrinių tyrimų metu buvo nustatomos išsiskyrusio šilumos srauto (mW) priklausomybės nuo reakcijos trukmės. Jos proporcingos reakcijos greičiui. Izoterminiai kalorimetriniai HDA ir DBE polikondensacijos tyrimai atlikti 25 ir 50 °C temperatūrose DMF, DMAC, H<sub>2</sub>O, IPOH ir MeOH tirpikliuose.

Kaip matyti iš šilumos srauto priklausomybių nuo reakcijos trukmės (3.1 ir 3.2 pav.), PEIHI susidarymo reakcija yra egzoterminė. Be to, reakcijos pradžioje generuojamas didelis šilumos srautas. Vėliau jis palaipsniui mažėja, nes reakcijos terpėje mažėja reaguojančių funkcinių grupių koncentracija. Labai įdomu, kad šilumos srauto priklausomybės turi autokataliziniams procesams būdingą vaizdą: reakcijos greitis pradiniu momentu stipriai padidėja, o po to sulėtėja. Tačiau galima įtarti, kad šis pagreitis nėra

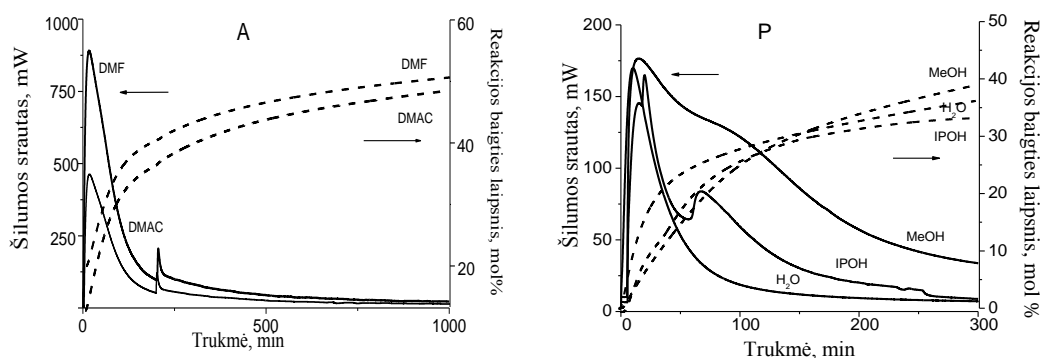
susijęs su autokataliziniais procesais, kadangi pagreitėjimas prasideda iš karto po DBE supylimo, o jau po minutės prasideda stiprus lėtėjimas. Šilumos srauto kreivių maksimumai atsiranda, dėl šilumos srauto termoporų inertiškumo. Todėl, kylančiosios kreivių dalys labiau atspindi ne realų reakcijos šiluminį efektą, o daugiau reakcijos indo ir termoporų įšilimo greitį. Dažniausiai maksimumai stebimi praėjus ~1-2 min nuo paskutinio iš monomerų supylimo, ir tai visiškai atitinka prietaiso celės laiko konstantą (1,5-1,7 min). Tačiau reikia pastebėti, kad, praėjus ~5-10 min nuo reakcijos pradžios, pradiniu reakcijos momentu pasireiškę maksimumai jau neturėtų daryti įtakos diferencialinėms bei integralinėms kreivėms, nes vėluojanti šiluma tuo metu jau būna pasiekusi termoporas.



3.1 pav. Šilumos srauto ir reakcijos baigties laipsnio 25 °C temperatūroje priklausomybės nuo HDA ir DBE polikondensacijos trukmės poliniuose aprotoniniuose (A) ir protoniniuose (P) tirpikliuose.

Tarpusavyje lyginant šilumos srauto priklausomybes, gautas 25 ir 50 °C, galima pastebėti, jog, nepriklausomai nuo reakcijos temperatūros, poliniuose aprotoniniuose tirpikliuose reakcijos vyko žymiai sparčiau nei protoniniuose. Tą patvirtina ir reakcijos baigties laipsnio kitimo kreivės (integralinės šilumos srauto priklausomybės) bei eksperimento metu pasiektų reakcijos baigties laipsnių galutiniai dydžiai. Toks rezultatas yra tikėtinas, nes poliniai

protoniniai tirpikliai su aminogrupėmis gali sudaryti vandenilinį ryšį, mažinantį aminogrupių nukleofiliškumą. Tokie tirpikliai taip pat gerai solvuoja anijonus, nukleofilų katijonus ir pačius nukleofilus, o tai trukdo  $S_N2$  reakcijai [195]. Nors poliniai aprotoniniai tirpikliai su aminogrupėmis taip pat gali sudaryti vandenilinį ryšį, bet, priešingai nei protoniniai tirpikliai, jie šį ryšį susidaro kaip protonų akceptoriai, dėl to aminogrupių nukleofiliškumas turėtų padidėti. Be to, aprotoniniai poliniai tirpikliai gerai solvuoja tarpinius reakcijos kompleksus. Abi aplinkybės sudaro ypač palankią įtaką  $S_N2$  reakcijų eigai, ką galima matyti iš 3.1 ir 3.2 paveikslų.



3.2 pav. Šilumos srauto ir reakcijos baigties laipsnio 50 °C priklausomybės nuo HDA ir DBE polikondensacijos trukmės poliniuose aprotoniniuose (A) ir protoniniuose (P) tirpikliuose.

Kalorimetrinis tyrimas parodė, kad, jei reakcija vykdoma IPOH, DMAC ar DMF, reakcijos eigoje stebimi nedideli šuoliški šilumos srauto pokyčiai. Manoma, kad jie atsiranda tuomet, kai reakcijos terpėje pradeda susidaryti mažai tirpios reakcijos produktų dalelės.

Tokiu atveju pasikeičia reakcijos mišinio komponentų solvatavimo laipsnis, sulėtėja šilumos perdava dėl staiga padidėjusios reakcijos mišinio klampos, ir išsiskiria reakcijos produktų kristalizacijos šiluma. Todėl antrinių šiluminių efektų kryptį (endoterminis-egzoterminis) ir laipsnį turėtų nulemti

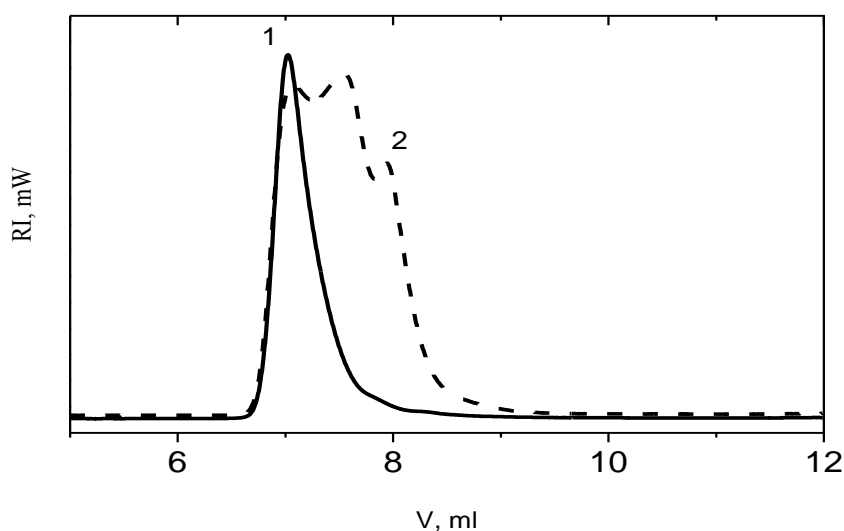
aukščiau minėtų reiškinių šiluminių efektų suma. Tokias prielaidas paremia tai, jog  $H_2O$ , kuriame polimeras tirpsta gerai, antrinių šiluminių efektų nebuvo stebima. Jų nebuvo ir MeOH. Nors jis polimerą tirpina blogiau nei vanduo, bet žymiai geriau nei IPOH, DMAC ar DMF, todėl sintetinant MeOH antriniais šiluminiais efektais nepasireiškė. Tarpusavyje lyginant šilumos srauto ir reakcijos baigties laipsnio priklausomybes galima surasti reakcijos baigties laipsnį, kuomet šie efektai prasideda. Pavyzdžiui, IPOH jie prasideda pasiekus ~12 mol% (25 °C) ir ~20 mol% (50 °C), o aprotoniniuose tirpikliuose – ~40 mol% (25 °C) ir ~50 mol% (50 °C) baigties laipsnius. Tai paremia aukščiau suformuluotą hipotezę, nes aukštesnėje temperatūroje daugelis medžiagų tirpsta geriau, todėl joje polimeras turėtų išsėsti pasiekus didesnį reakcijos baigties laipsnį, nei žemesnėje. Įdomu tai, jog antriniais šiluminiais efektais aprotoniniuose tirpikliuose prasideda sureagavus apytiksliai pusei visų funkcinių grupių, o tai atitinka dimerų susidarymo stadiją.

Iš 3.1 ir 3.2 paveikslų galima padaryti dar vieną labai svarbią išvadą – beveik nepriklausomai nuo tirpiklio cheminės sudėties ir reakcijos temperatūros, HDA ir DBE tarpusavio reakcija yra greita tik pačiu pradiniu reakcijos momentu. Vėliau, maždaug po 200 minučių ji stipriai sulėtėja (šilumos srauto kreivės tampa beveik horizontalios). Manoma, kad tai susiję su reakcijos mišinio heterogeniškumu. Tuomet polimerizacija vyksta jau kietoje netirpių reakcijos produktų fazėje, į kurią monomerai, dimerai ar oligomerai difunduoja labai lėtai. Tokiu būdu, norint gauti didelę polikondensatų molekulinę masę ir išeigą, šias reakcijas reikia vykdyti itin ilgai. Tačiau šis samprotavimas ir išvada netinka vandens terpei, nes joje reakcijos produktai gerai tirpūs. Todėl reakcijos sulėtėjimą vandenyje sąlygoja ne reakcijos mišinio heterogeniškumas, o dar nesureagavusių pirminių aminogrupių protonizavimo reiškiniai: vykstant polikondensacijai ir pastoviai reakcijos mišinyje mažėjant pirminių aminogrupių kiekiui, vis didesnę jų dalį protonizuoja vandens molekulės. Protonizuotos pirminės aminogrupės ( $-NH_3^+OH$ ) netenka nukleofiliškumo ir nustoja reagavusios su DBE. Taigi, pasiekus tam tikrą (bet

mažesni už 100 mol%) reakcijos baigties laipsni, polikondensacija vandenyje turėtų visiškai sustoti.

Kadangi kalorimetriniai tyrimai parodė, jog PEIHI reikia sintetinti ilgą laiką (kad būtų pasiekta didelė išeiga ir molekulinė masė), tolimesniuose eksperimentuose HDA ir DBE reakcijos trukmė buvo prailginta iki 168 val. Taip pat į tolimesnius tyrimus įtrauktas dar vienas aprotoninis polinis tirpiklis – propilenkarbonatas (PC). Tačiau PC reakcija buvo vykdoma tik 48 val., nes vėliau tokie reakcijos mišiniai labai suklampėdavo ir jų maišymas sustodavo.

Po 168 val. reakcijos, ištyrus PEIHI reakcijos mišinius molekulių sietų chromatografija (MSC), buvo pastebėtas eliucijos kreivių multimodališkumas (3.3 pav.). Tai rodo, jog reakcijos eigoje susidaro ir iki pat sintezės pabaigos išlieka kelios PEIHI frakcijos, turinčios skirtingas vidutines molekulinės mases. PEIHI ultrafiltravus per 10 kDa molekulių masių perskyrimo ribos membraną, eliucijos kreivės įgauna monomodalinį pobūdį.



3.3 pav. Ultrafiltruoto (1) ir reakcijos mišinyje esančio (2) PEIHI eliucijos kreivės. Sintezė vykdyta 50 % MeOH tirpale 50 °C temperatūroje 168 val. RI – diferencinio lūžio rodiklio jutiklio atsakas.

Atsižvelgiant į tai, kad po ultrafiltravimo PEIHI tapo labiau vienalytis, visi tolimesni MSC, DLS, potenciometrinio titravimo bei spektroskopiniai tyrimai buvo atliekami tik su grynintais PEIHI. Iš 3.1 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad grynintų PEIHI išėigos labai nedidelės ir neviršija net 10 %. Tai reiškia, kad, net ir po 168 val. trukusios reakcijos didesnę reakcijos mišinio dalį sudarė mažamolekuliai produktai.

3.1 lentelė. Ultrafiltruotų PEIHI rodikliai

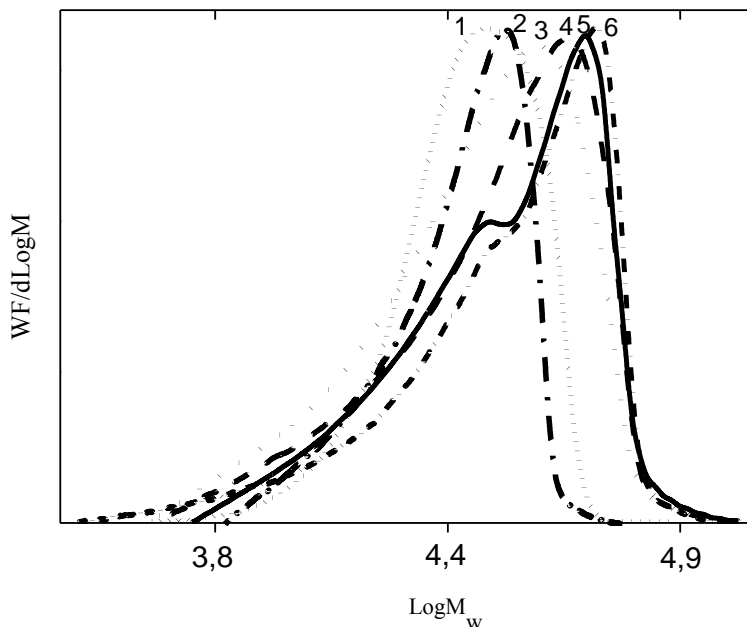
Tirpiklis	t, val	$\eta$ , % <sup>a</sup>	$M_w$ , kDa <sup>b</sup>	$M_w/M_n$ <sup>b</sup>
MeOH	168	5,4	22,1	2,43
IPOH		0,2	21,1	3,28
H <sub>2</sub> O		2,8	68,6	4,10
DMF	168	8,6	70,5	4,09
DMAC	168	7,3	81,4	5,22
PC	48	0,9	29,8	5,14

<sup>a</sup> nustatyta gravimetriškai, <sup>b</sup> nustatyta MSC

Aprotoniniuose tirpikliuose, išskyrus PC, gaunamos didesnės išėigos ir molekulinės masės nei bet kuriame iš protoninių tirpiklių. Tai rodo, jog aprotoniniuose tirpikliuose reakcija vyko sparčiau. Šie duomenys pilnai atitinka kalorimetrinių tyrimų metu nustatytus dėsningumus ir patvirtina, jog HDA ir DBE polikondensacijai aprotoniniai tirpikliai tinka labiau. Aprotoniniuose tirpikliuose gautų ir ultrafiltruotų PEIHI polidispersiškumo rodikliai yra šiek tiek didesni nei gautų protoniniuose tirpikliuose. Be to, dispersiškumas didesnis už 2, kuris maksimaliai įmanomas polikondensacijoje [186]. Tą patvirtina ir molekulių masių pasiskirstymo (MMP) kreivės (3.4 pav.). Šis rezultatas logiškas dėl dviejų priežasčių. Visų pirma, vykstant heterofazinei polimerizacijai gali susidaryti labai įvairaus polimerizacijos laipsnio dariniai [182, 183]. Antra, ultrafiltruojant pašalinamos tik tos frakcijos, kurių molekulinė masė mažesnė už membranos perskyrimo ribą



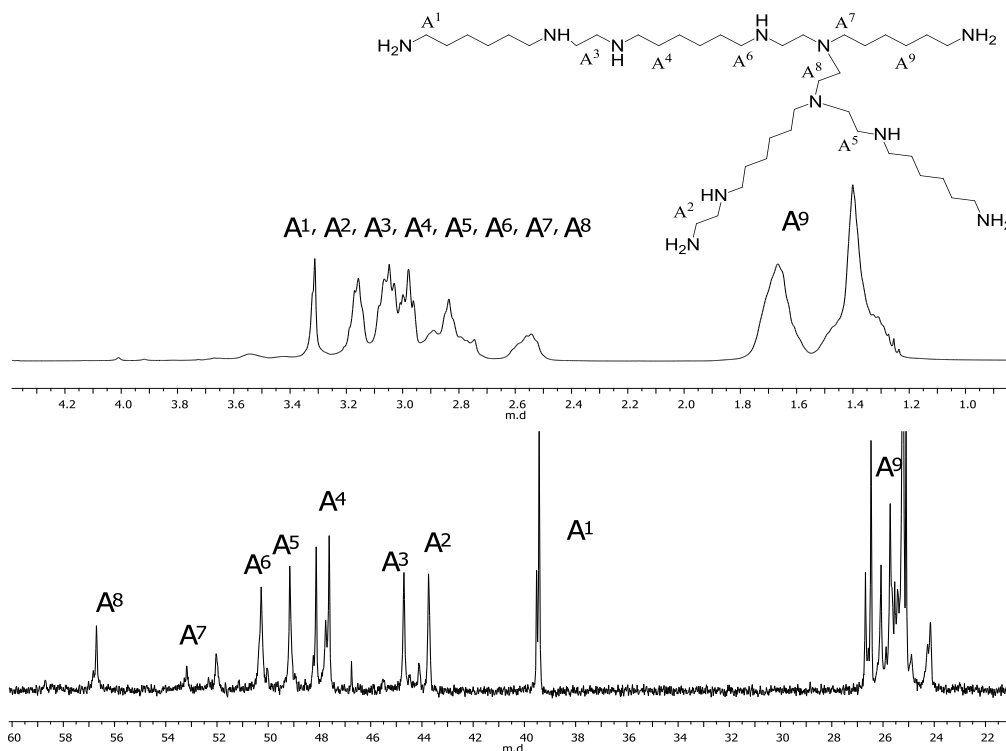
(10 kDa). Todėl ultrafiltravimo metu polimero dispersiškumas dalinai sumažėja tik mažų molekulių masių zonoje.



3.4 pav. Ultrafiltruotų PEIHI MMP kreivės. Sintetinta: 1 – PC, 2 – IPOH, 3 – MeOH, 4 – DMAC, 5 – DMF, 6 – H<sub>2</sub>O (kiti polimerų rodikliai 3.1 lentelėje).

Atlikus <sup>1</sup>H ir <sup>13</sup>C BMR spektroskopinį tyrimą buvo nustatyta grynintų PEIHI sudėtis bei kai kurie jų makromolekulių struktūros aspektai. Kadangi visų PEIHI cheminė sudėtis yra ta pati, nagrinėtas tik PEIHI, sintetinto DMAC, spektras (3.5 pav.). <sup>1</sup>H BMR spektre esantys signalai ties 1,2-1,8 m.d priskirti metilengrupių protonams HMDA grandyse (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). Signalai, esantys ties 2,5-3,4 m.d, gali būti priskirti etilendiamino grandžių metileno grupių, esančių šalia įvairiai protonizuotų aminogrupių, protonams (-<sup>+</sup>NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-<sup>+</sup>NH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub><sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-). Žymiai informatyvesni yra <sup>13</sup>C spektrai (3.5 pav. apačioje). Juose 24-27 m.d signalai priskirti iminoheksametenimino grandžių metilengrupių angliai (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). Signalas ties 40 m.d priskirtas angliai, esančiai prie pirminės aminogrupės (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 43-47 m.d signalai priskirti metilengrupių,

esančių prie įvairiai protonizuotų antrinių aminogrupių, angliai (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- ir -NH<sub>2</sub><sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-). Signalas ties 48-52 m.d gali būti priskirtas angliai prie tretinio amino (...-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-...)<sub>2</sub>).



3.5 pav. PEIHI, susintetinto DMAC, <sup>1</sup>H (viršuje) ir <sup>13</sup>C BMR (apačioje) spektrai D<sub>2</sub>O.

Visų tipų anglis, matomas <sup>13</sup>C BMR spektre, galima suskirstyti į kelias grupes, iš kurių tarpusavio santykio galima apskaičiuoti PEIHI polimerų šakotumo laipsnį (antrinių ir tretinių aminogrupių santykis) (2.4.5 metodika). Iš 3.2 lentelės matyti, kad poliniuose aprotoniniuose tirpikliuose susidaro labiau šakoti PEIHI. Yra žinoma, kad poliniai aprotoniniai tirpikliai neprotonizuoja amino grupių, o su jomis sudaro akceptorinius H-ryšius, tad juose susidaro palankios sąlygos protonizuotų iminogrupių deprotonizavimui ir papildomam alkilinimui. Papildomo alkilinimo (tuo pačiu ir šakotumo) laipsniui turi įtakos tirpiklio savybės: kuo didesnė tirpiklio pK<sub>a</sub> t. y., kuo tirpiklis labiau

baziškesnis, tuo šakotesnis PEIHI susidaro. Šias tendencijas patvirtina tirpiklių  $pK_a$  reikšmės: DMF – 37; DMAC – 30; H<sub>2</sub>O – 15,7; MeOH – 15,5 [237, 238].

3.2 lentelė. PEIHI aminogrupių kiekiai (mol%) ir šakotumo laipsnis

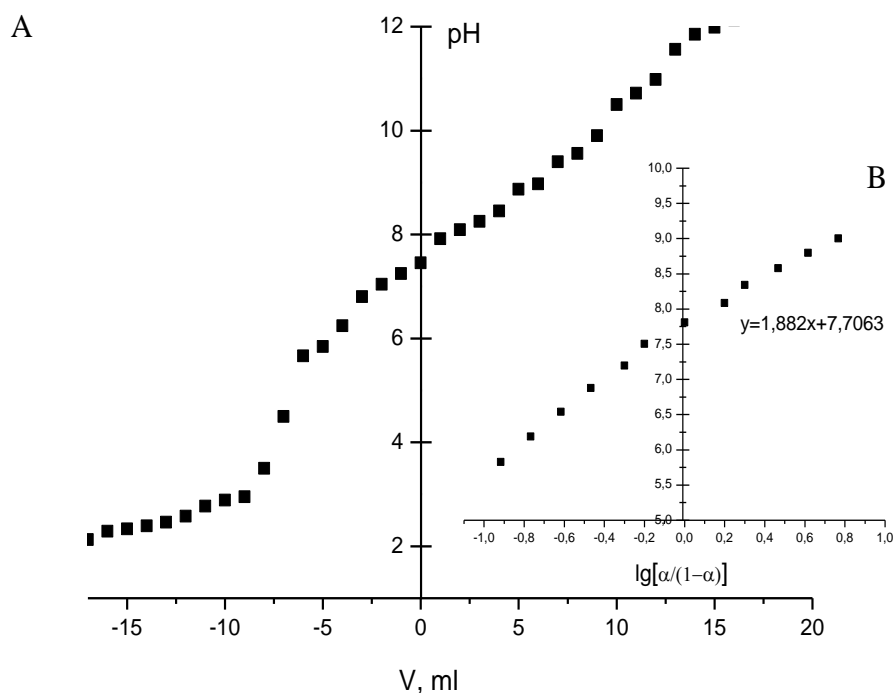
Tirpiklis	Pirminės (N <sub>1</sub> ),	Antrinės (N <sub>2</sub> )	Tretinės (N <sub>3</sub> )	N <sub>2</sub> /N <sub>3</sub>
MeOH	24,6	66,5	8,9	7,4
H <sub>2</sub> O	28,7	62,7	8,6	7,3
DMF	27,3	61,9	10,8	5,7
DMAC	30,2	60,1	9,7	6,1

PEIHI FT-IR spektrai papildo informaciją apie polimerų sandarą. Absorbcijos juosta ties 3390 cm<sup>-1</sup> būdinga valentiniams N-H virpesiams. Alkilgrupių buvimą rodo asimetriniai ir simetriniai virpesiai ties 2936-2825 cm<sup>-1</sup>. NH<sub>2</sub><sup>+</sup> grupėms būdinga sugerties juosta ties 1724 cm<sup>-1</sup>. N-H deformaciniams virpesiams būdinga 1609-1624 cm<sup>-1</sup> sugerties juosta, 1460-1464 cm<sup>-1</sup> juosta būdinga CH<sub>2</sub> deformaciniams virpesiams, o ties ~728-731 cm<sup>-1</sup> – N-H deformaciniams-vėduokliniams, esantiems už plokštumos, virpesiams. C-N būdinga valentinių virpesių sugerties juosta yra ties ~1040-1055 cm<sup>-1</sup>.

Šie rezultatai gerai koreliuoja su literatūroje pateikiamais giminingų polimerų (PEI ar PPI) BMR ir FT-IR spektrais [136, 239].

Potenciometrinio titravimo ir dinaminės šviesos sklaidos (DLS) metodais buvo tiriamos polielektrolitinės PEIHI savybės. Norint tinkamai pritaikyti polimerus genų pernašai, būtina įvertinti jų baziškumą, protonizacijos laipsnį bei tai, kaip kinta polimerų krūvis/dydis esant skirtingiems pH. Remiantis potenciometrinio titravimo duomenimis (3.6 pav.), apdorotais Henderson ir Hasselbalch lygtimi (pagal 2.3.8 metodiką), buvo apskaičiuotos PEIHI rūgštinės disociacijos konstantos (3.3 lentelė). Matyti, jog jos svyruoja nuo 7,8 iki 8,1, ir šios vertės yra artimos literatūroje pateiktoms PEI  $pK_a$  vertėms [56]. Tiesės polinkio kampo tangentas (n) Henderson ir Hasselbalch koordinatėse

svyruoja tarp 1,82-2,25. Jis priklauso nuo polimero struktūros ir, polielektrolitų atveju, paprastai būna didesnis už 1. Šių duomenų visuma patvirtina, jog PEIHI yra katijoniniai polielektrolitai.



3.6 pav. PEIHI, sintetinto DMAC, potenciometrinio titravimo kreivė (A) ir titravimo duomenys Henderson ir Hasselbalch lygties koordinatėse (B).

Remiantis nustatytais jonizacijos konstantomis buvo apskaičiuotas PEIHI protonizacijos laipsnis ( $\beta$ ), kuris būtų būdingas polimerui citoplazmoje (pH 7,3).

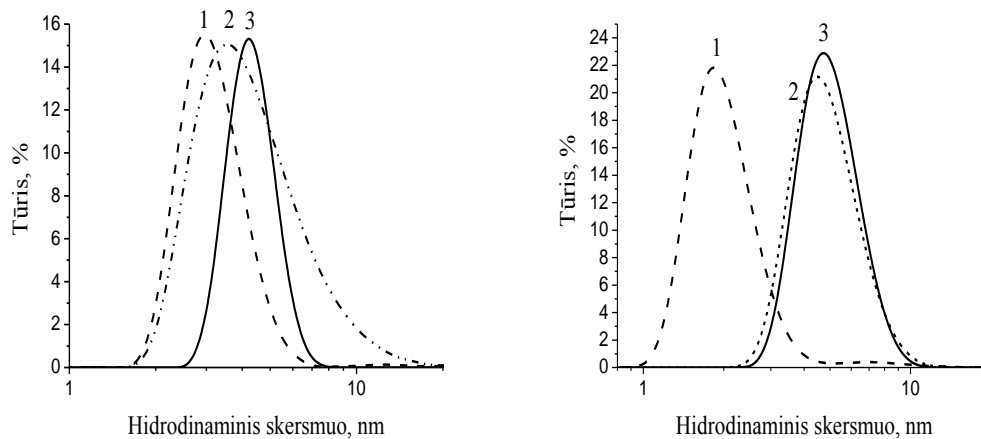
3.3 lentelė. PEIHI jonizacijos parametrai

Tirpiklis	$pK_a$	n	$\beta$	Buferinė talpa
MeOH	7,9	2,15	74,1	6,9-8,9
H <sub>2</sub> O	8,1	2,22	75,8	7,1-9,1
DMF	7,8	2,05	59,2	6,8-8,8
DMAC	7,7	1,82	52,6	6,7-8,7

Galima pastebėti, jog poliniuose protoniniuose tirpikliuose susintetinti PEIHI citoplazmoje turėtų būti labiau jonizuoti. Tačiau, matyt, lemia šiek tiek mažesnis šių polimerų šakotumas, todėl juose pirminių ir antrinių aminogrupių suma yra šiek tiek didesnė (3.2 lentelė), nei kituose polimeruose. Būtent pirminės ir antrinės aminogrupės turėtų jonizuotis lengviau už tretines, nes jos yra labiau steriškai blokuojamos nuo sąveikos su protonais. Literatūroje pateikiama [240-242], kad sėkmingai transfekcijai naudojamų polietileniminų jonizacijos laipsnis citoplazmoje turėtų siekti nuo 10 iki 68 %, tad susintetinti PEIHI pagal šį rodiklį galėtų būti gerais transfekcijos vektoriais.

Buferinės talpos vertės visų PEIHI gan artimos ir svyruoja nuo 6,7 iki 9,1 (3.3 lentelė). Kadangi citoplazmos pH patenka į visų polimerų buferinės talpos zonas, visi susintetinti PEIHI galėtų būti naudojami kaip transfekcijos vektoriai. Pavyzdžiui, yra žinoma [240-241], kad sėkmingai transfekcijai naudojamų polietileniminų buferinė talpa svyruoja pH 6-9 srityje. Taigi, pagal jonizacines savybes PHPI gali visiškai atitikti genų transfektoriams keliamus reikalavimus.

DLS matavimai (3.7 pav.), parodė, kad gryname vandenyje PEIHI elgiasi kaip tipinis katijoninis polielektrolitas. Esant žemoms pH vertėms, polimero gniužulas didesnis, o aukštomis – mažesnis. Tačiau matomas ir netipinis PEIHI elgesys, jei vanduo pakeičiamas vandeniniu 0,15 M NaCl tirpalu. Jame jonizuotų (pH 2) ar dalinai jonizuotų (pH 7,1) gniužulų matmenys dėl ekranavimo reiškinio turėtų sumažėti, bet jie šiek tiek padidėja. Gali būti, kad taip nutinka dėl dalinės  $\text{Na}^+$  jonų sąveikos su polimero priešjonais, susidarant joniniams difuzinio pobūdžio „trejetukams“:  $\sim\text{N}^+\cdot\text{Br}^-\cdot\text{Na}^+$ . Taip pat 0,15 M NaCl tirpale sumažėja visiškai nejonizuoto (pH 10) PEIHI gniužulų matmenys. Galimai tai susiję su polimero išsūdymo efektu – tai gerai žinomas reiškinys, kuomet mažamolekuliai elektrolitai sumažina krūvio neturinčių polimerų tirpumą [242, 243]. Iš esmės, išsūdymo efektas siejamas su sustiprėjusiomis hidrofobinėmis sąveikomis.



3.7 pav. MeOH susintetinto PEIHI dalelių dydžio pasiskirstymas. Vandenyje (kairėje) ir 0,15 M NaCl tirpale (dešinėje), kai pH: 1 – 10, 2 – 7,1, 3 – 2.

Apibendrinant PEIHI sintezės ir tyrimų rezultatus galima padaryti tokias esmines išvadas: 1) buvo surastos optimaliausios PEIHI sintezės sąlygos: polinių aprotoninių tirpiklių terpė, kurioje monomerų koncentracija ne didesnė kaip 50 %, 50 °C temperatūra ir ilga (ne mažiau kaip savaitė) reakcijos trukmė; 2) HDA ir DBE polikondensacijos metu susidaro įvairaus polimerizacijos laipsnio dariniai. Geriausiuose tirpikliuose (DMF ir DMAC) gauta išėiga siekė tik apie 7-9 %, o masinė molekulinė masė nuo 70 iki 81 kDa; 3) BMR ir FT-IR metodais įrodyta PEIHI sandara.  $^{13}\text{C}$  BMR spektroskopijos būdu nustatyta, kad PEIHI yra šakotas polimeras. Poliniuose protoniniuose tirpikliuose susintetintų PEIHI tretinių ir antrinių aminogrupių santykis (polimero šakotumo laipsnis) siekia ~7, o poliniuose aprotoniniuose – ~6; 4) PEIHI pasižymi katijoninėmis savybėmis ir tirpaluose elgiasi kaip tipiškas polielektrolitas.

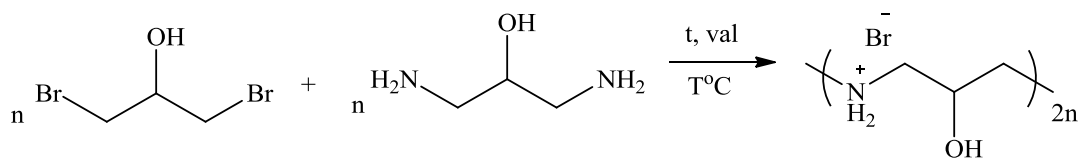
Genų pernašai PEIHI nebuvo plačiau tyrinėti, kadangi preliminarūs tyrimai parodė daug mažesnę šio polimero efektyvumą lyginant su komerciniu PEI *ExGen 500*. Tarpusavyje lyginant šiuos polimerus galima pastebėti, jog *ExGen 500* turi daugiau aminogrupių (elementinėje sudėtyje turi net 32,5 % azoto) nei PEIHI (tik 19,7 % azoto). Tai matyt ir lėmė šių polimerų efektyvumo skirtumus transfekcijoje.

### 3.1.2 Poli(2-hidroksipropilenimino) sintezė ir savybės

Poli(2-hidroksipropileniminas) (PHPI) buvo susintetintas iš 1,3-diamino-2-propanolio (DAP) ir 1,3-dibrom-2-propanolio (DBP) ir kaip labai efektyvus genų pernašos agentas patentuotas *TurboFect* pavadinimu [72]. Tačiau tiek PHPI sintezė, tiek jo molekuliniai parametrai buvo mažai tyrinėti [72, 73]. Todėl šiame darbe buvo siekiama nustatyti PHPI susidarymo kinetiką, išsamiai ištirti sintezės sąlygų įtaką PHPI išeigai ir molekuliniams parametrams, detalai išanalizuoti gaunamų polimerų sandarą. Parenkant sintezės sąlygas DAP ir DBP polikondensacijai buvo išbandyti įvairūs tirpikliai, reakcijos temperatūra, monomerų koncentracija.

PHPI sintezė (3.2 schema) vykdyta poliniuose protoniniuose ir aprotoniniuose tirpikliuose: IPOH, MeOH, DMF, DMAC. Bendra monomerų koncentracija keista nuo 40 iki 60 %, o temperatūra – nuo 60 iki 80 °C. Visos reakcijos buvo vykdomos 168 valandas.

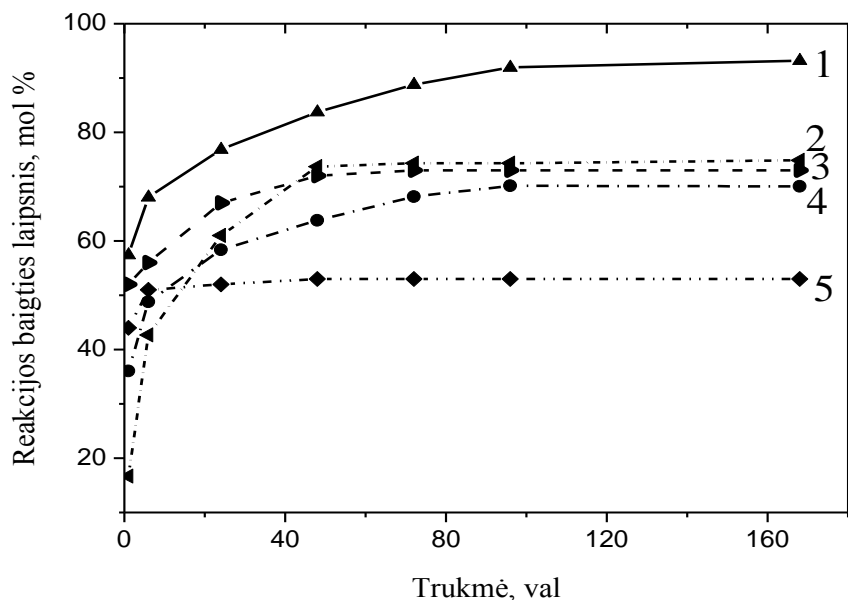
Preliminarūs tyrimai parodė, kad žemesnėje nei 60 °C temperatūroje bei esant 40-60 % monomerų koncentracijai grynintų produktų išeigos buvo mažesnės nei 10 %, todėl galima teigti, kad susidarydavo daug mažos molekulinės masės produktų. Geros išeigos ir didelė molekulinė masė buvo gaunama reakciją vykdant 60 °C ir aukštesnėse temperatūrose. Todėl sintezės MeOH, turinčiame žemą virimo temperatūrą, buvo vykdomos 60 °C temperatūroje, o kituose tirpikliuose – 80 °C temperatūroje. Visais atvejais buvo naudojama 40 % bendra monomerų koncentracija.



3.2 schema. 1,3-dibrom-2-propanolio ir 1,3-diamino-2-propanolio polikondensacijos reakcija.

DAP ir DBP polikondensacijos kinetika buvo ištirta potenciometriškai (2.3.8) ir kalorimetriškai (2.3.11). Pirmasis būdas taikytas esant ilgai reakcijos trukmei, o antrasis – pradiniu reakcijos periodu.

Kaip matyti iš 3.8 paveikslo, daugelyje tirpiklių reakcijos eiga labai panaši: reakcija labai sparti kelių pradinių valandų bėgyje, o vėliau, po 2-3 parų reakcijos baigties laipsnis nusistovi ir jau beveik nebekinta. Ypač greitai reakcijos baigties laipsnis nustoją kitę reakciją vykdant IPOH. Po 168 val. šiame tirpiklyje buvo pasiektas mažiausias reakcijos baigties laipsnis, o DMAC – didžiausias.

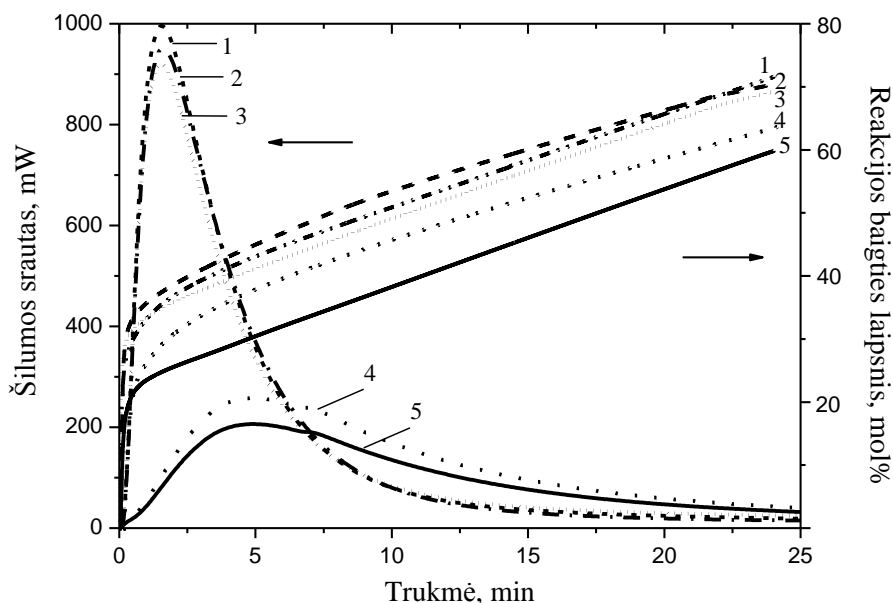


3.8 pav. DAP ir DBP polikondensacijos reakcijos baigties laipsnio (mol%) priklausomybė nuo reakcijos trukmės ir naudojamo tirpiklio: 1 – DMF, 2 – DMAC, 3 – H<sub>2</sub>O, 4 – MeOH, 5 – IPOH.

Kalorimetrinis tyrimas parodė (3.9 pav.), kad DAP ir DBP polikondensacija labai sparti pirmųjų kelių minučių bėgyje ir stipriai sulėtėja jau po 20-25 min. Remiantis šilumos srauto kitimu reakcijos metu, visus ištirtus tirpiklius galima suskirstyti į dvi grupes. Pirmajai galima būtų priskirti DMF, DMAC ir H<sub>2</sub>O, antrajai – MeOH ir IPOH. Pirmojoje tirpiklių grupėje



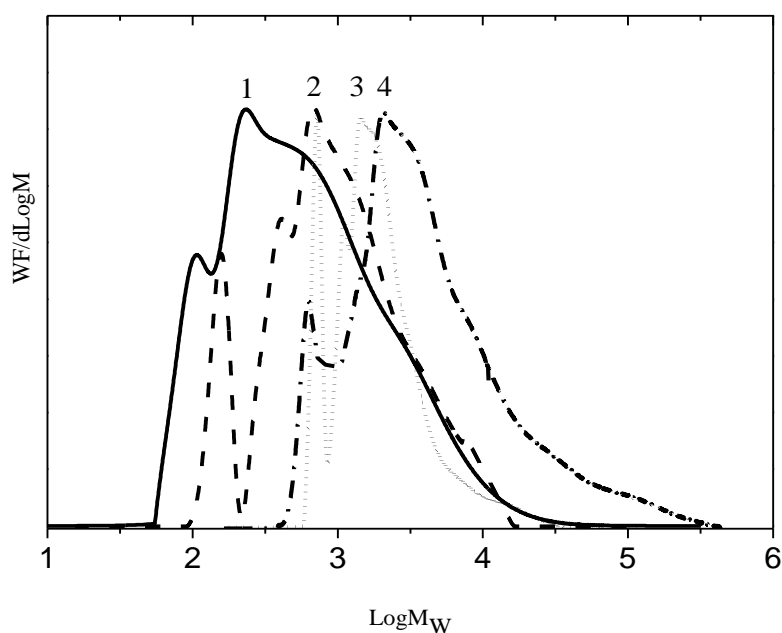
šilumos srautas reakcijos pradžioje yra žymiai intensyvesnis nei antrojoje. Panašų dėsningumą MeOH teko konstatuoti ir HDA-DBE polikondensacijos atveju (3.1.1 skyrius), tik ten H<sub>2</sub>O buvo priskiriamas antrajai tirpiklių grupei. Taigi, dar kartą pasitvirtino, jog poliniai aprotoniniai tirpikliai bei šiuo atveju ir vanduo yra vieni geresnių diaminoalkanų ir dibromalkanų polikondensacijai.



3.9 pav. DAP ir DBP polikondensacijos reakcijos baigties laipsnio ir šilumos srauto (reakcijos greičio) priklausomybės nuo reakcijos trukmės ir naudojamo tirpiklio: 1 – DMF, 2 – DMAC, 3 – H<sub>2</sub>O, 4 – MeOH, 5 – IPOH.

Negrynintų reakcijos produktų molekulinė masė pasiskirstymo kreivės yra multimodalinės ir plačios (3.10 pav.). Tai rodo, jog mišinys sudaro kelias skirtingas frakcijas, turinčios tiek labai mažą, tiek ir pakankamai didelę molekulinę masę. Reakcijos eigoje vidutinė masinė molekulinė masė pasistumia į didesnių verčių pusę, tačiau MMP kreivių forma beveik nekinta. Įdomu tai, jog atskirose reakcijos mišinio zonose makromolekulių augimas vyko nepriklausomai nuo jų augimo kitose zonose. Tai gali būti siejama su reakcijos mišinio heterofaziškumu ir manoma, jog dėl monomerų difuzijos greičių skirtumo sparčiausias augimas vyko smulkesnėse suspensijos dalelėse ir stambesniųjų dalelių paviršiuje, o stambesniųjų viduje – lėčiausiai.

Atsižvelgiant į tai, kad reakcijos produktus sudaro kelių skirtingų molekulinė masių frakcijos ir, kad molekulinė masių pasiskirstymas yra labai platus, visi tolimesni tyrimai buvo atliekami tik ultrafiltravimo būdu išgrynintų PHPI. Ultrafiltravimo sąlygos nurodytos 2.2.5. metodikoje.



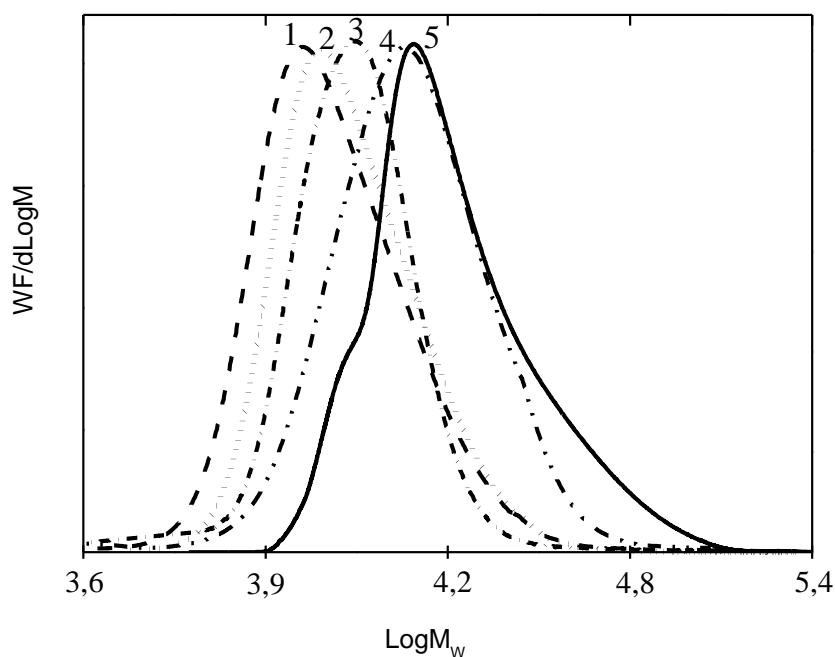
3.10 pav. DMAC sintetinamų PHPI MMP kreivės po: 1 – 1 val., 2 – 24 val., 3 – 48 val., 4 – 168 val.

3.4 lentelė. Ultrafiltruotų PHPI rodikliai

Tirpiklis	$\eta$ , % <sup>a</sup>	$M_w$ , kDa <sup>b</sup>	$M_w/M_n$ <sup>b</sup>	$\alpha$ <sup>c</sup>	$T_s$ <sup>d</sup>
MeOH	14,2	12,7	2,04	0,50	-21,8
IPOH	5,7	9,70	2,71	0,52	-20,9
H <sub>2</sub> O	17,4	8,06	1,94	0,50	-26,0
DMF	15,7	16,4	4,72	0,44	35,7
DMAC	19,5	17,6	4,84	0,43	32,0

<sup>a</sup> nustatyta gravimetriškai, <sup>b</sup> nustatyta MSC, <sup>c</sup> Mark-Houwink lygties vertė nustatyta MSC, <sup>d</sup> nustatyta DSC

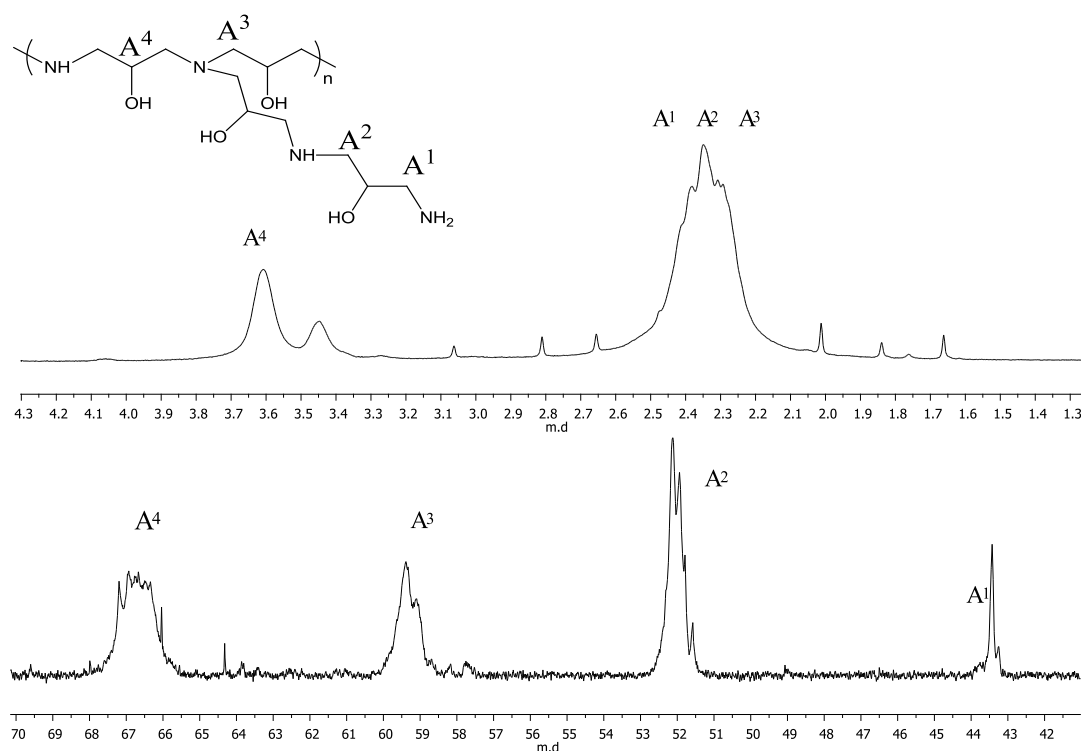
Išgrynintų PHPI išeiga siekia 6-20 %, o vidutinė masinė molekulinė masė 8-17 kDa (3.4 lentelė). PHPI, susintetintų MeOH, IPOH ir vandenyje, polidispersiškumas siekia apie 2-3, o poliniuose aprotoniniuose tirpikliuose jis šiek tiek didesnis (apie 5). Polidispersiškumas didesnis dėl to, jog šių polimerų molekulinė masė yra didesnė (juose yra frakcijų, kurių molekulinė masė siekia 100 kDa ir daugiau (žr. 3.11 pav.)).



3.11 pav. Ultrafiltruotų PHPI MMP kreivės. Sintetinta: 1 – IPOH, 2 – H<sub>2</sub>O, 3 – MeOH, 4 – DMF, 5 – DMAC.

Buvo atlikti spektroskopiniai susintetintų PHPI tyrimai. Atliekant PHPI BMR spektroskopinius tyrimus pastebėta, kad signalų cheminiai poslinkiai ir išplitimas PHPI atveju labai priklauso nuo pH. Tai nenuostabu, nes tai – katijoninis polimeras. Ypač platūs signalai gaunami esant daliai PHPI aminogrupių protonizacijai. Polimero tirpalus stipriai parūgštinant, išplitimas sumažėja. Dar geresnės kokybės spektrai gaunami stipriai pašarminus (aminogrupes visiškai deprotonizavus). Šiuo atveju signalai ne tik susiaurėja, bet ir pasislenka į silpnescio lauko pusę. Tokios tendencijos buvo pastebėtos ir atliekant polietilenimino tyrimus [244]. Deprotonizuoto PHPI <sup>1</sup>H BMR spektre

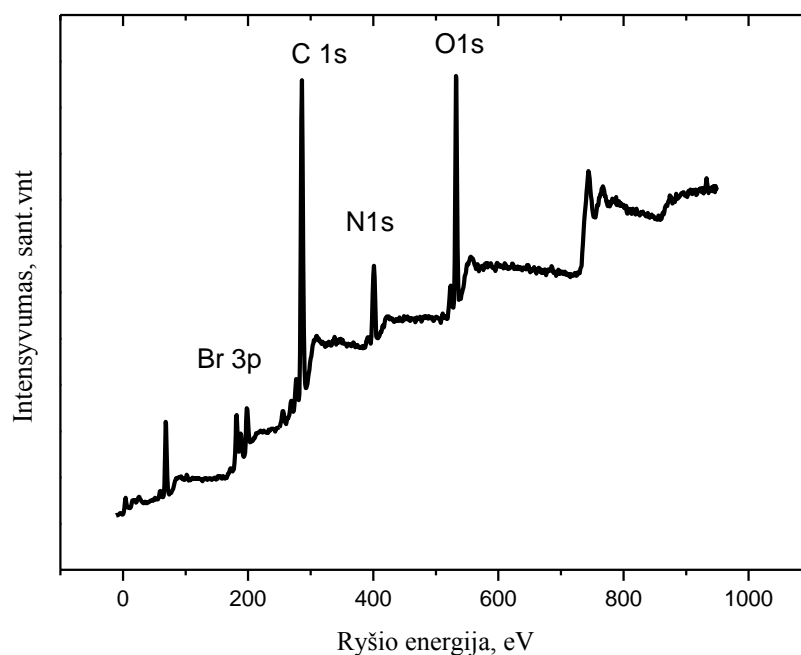
(3.12 pav.) signalas ties 2,36 m.d priskirtas  $-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}(\text{OH})-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$  protonams. Du signalai ties 3,45 m.d ir 3,62 m.d priskirti  $-\text{C}\underline{\text{H}}_2-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{OH})-\text{C}\underline{\text{H}}_2-$  protonams. Metingrupių protonų signalų suskilimas į du signalus buvo pastebimas tik stipriai šarminėje terpėje. Kai kurie autoriai pastebi [245], jog tai galėtų būti susiję su DAP grandies konformaciniu izomerizmu, nes monomeras turi kelias gana stabilias konformacijas, besiskiriančias hidroksigrupės padėtimi aminogrupių atžvilgiu.



3.12 pav. DMAC susintetinto ir deprotonizuoto PHPI BMR spektrai  $\text{D}_2\text{O}$ : protonų (viršuje), anglies (apačioje).

$^{13}\text{C}$  BMR spektruose (3.12 pav.) signalas ties 43,28 m.d priskirtas angliai, esančiai šalia pirminių aminogrupių ( $\text{H}_2\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ). 52,80 m.d signalas priskirtas angliai, esančiai prie antrinių aminogrupių ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{C}\underline{\text{H}}_2-$ ). Signalas ties 59,10 m.d priskirtas angliai, esančiai prie tretinių aminogrupių ( $\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{C}\underline{\text{H}}_2-)_3$ ). Signalai ties 64,20-63,80 m.d priskirti metingrupių angliai ( $-\text{C}\underline{\text{H}}_2-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{OH})-\text{C}\underline{\text{H}}_2-$ ).

Papildomos informacijos apie PHPI sandarą suteikė rentgeno fotoelektronų spektroskopijos (XPS) tyrimai. Jie patvirtino, jog polimeruose yra Br, C, N ir O (buvo fiksuojamos atitinkamos surišimo energijos juostos ties 68, 181, 285, 400 ir 532 eV). XPS spektras taip pat patvirtino, jog polimeruose lieka grandinių, turinčių kovalentiškai prijungto bromo, kurio surišimo energijos juosta atitinka 181 eV bei bromido anijonų, kurio surišimo energijos juosta – 68 eV.



3.13 pav. DMAC susintetinto PHPI XPS spektras.

Iš  $^{13}\text{C}$  BMR spektrų prie atitinkamų aminogrupių (metodika 2.4.5) buvo apskaičiuoti PHPI šakotumo laipsniai. Šakotumo laipsnis parodo, kiek PHPI pasikartojančių grandžių yra tarp dviejų atšakų. Nustatyti duomenys pateikti 3.5 lentelėje. Iš jų matyti, kad šakotumo laipsnis priklauso nuo polikondensacijos reakcijai naudojamo tirpiklio. Didžiausias laipsnis gautas reakciją vykdant poliniuose aprotoniniuose tirpikliuose (DMF ir DMAC). Tokie PHPI kiekvienoje ar kas antroje pasikartojančioje grandyje turi po

atšaką. Vykiant sintezę MeOH ir IPOH, gauti mažiau šakoti produktai. Juose atsišakojimai atsiranda maždaug tik kas trečioje grandyje.

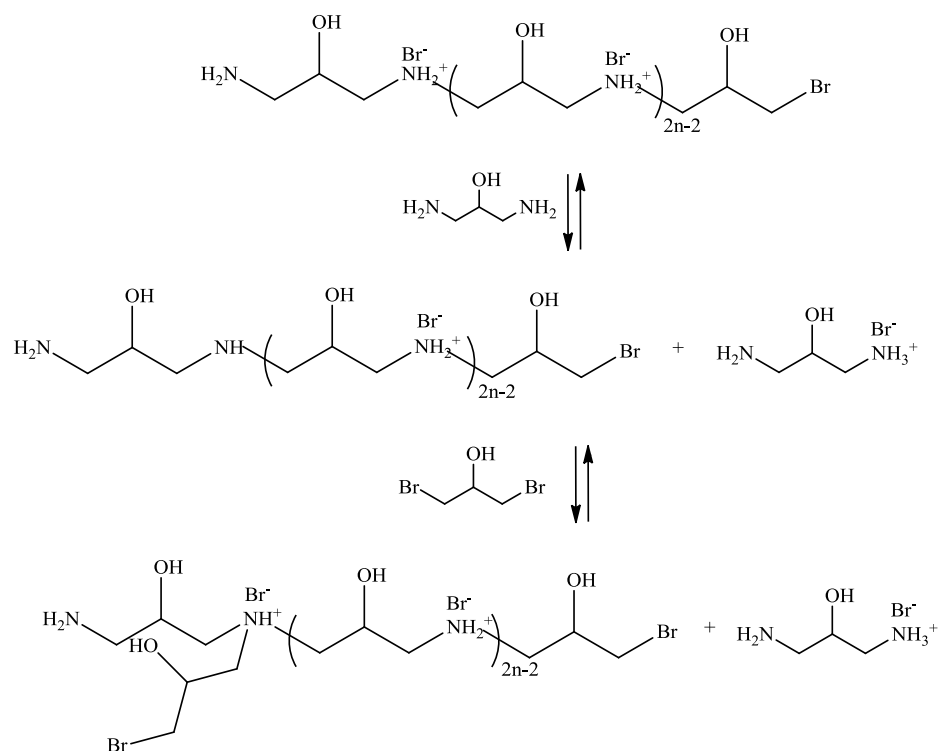
3.5 lentelė. PHPI aminogrupių kiekis (mol%) ir šakotumas ( $N_2/N_3$ )

Tirpiklis	Pirminės, $N_1$	Antrinės, $N_2$	Tretinės, $N_3$	$N_2/N_3$
MeOH	23,7	57,6	18,7	3,08
IPOH	22,5	55,1	22,4	2,45
H <sub>2</sub> O	24,8	54,9	19,3	2,84
DMF	29,1	39,7	31,2	1,27
DMAC	16,9	52,8	30,3	1,74

Tarpusavyje lyginant PEIHI (3.1.1 skyrius) su PHPI, galime pastebėti, jog tirpiklių įtaka šių polimerų šakotumo laipsniui yra panaši – poliniuose aprotoniniuose tirpikliuose susidaro labiau šakoti polimerai. Tačiau PHPI visumoje yra labiau šakoti polimerai už PEIHI. Šią tendenciją, matyt, nulėmė atstumas tarp aminogrupių diamino monomere. Manoma, kad kuo jis mažesnis, tuo lengviau protonams migruoti tarp šalia viena kitos esančių aminogrupių. Be to, esant mažam atstumui, susidaro palankios sąlygos ir intramolekulinių ciklinių darinių susidarymui. Tačiau net ir itin šakoti PHPI buvo gerai tirpūs vandenyje, todėl tarpmolekuliniai skersiniai ryšiai nesusidarė, o šakojimasis vyko tik dėl makromolekulių viduje vykstančio persitvarkymo.

PHPI sintezės metu šakojimasis galimas tuo atveju, jei susidariusios protonizuotos antrinės aminogrupės deprotonuojamos dar nesureagavusiomis pirminėmis aminogrupėmis, esančiomis DAP monomere ar galinėse oligomero/polimero grupėse (3.3 schema). Iš aukščiau pateiktų rezultatų akivaizdu, kad tirpiklis, kuriame sintetinama, turi įtakos PHPI šakojimuisi. Manoma, kad jis gali pakeisti aminogrupių nukleofiliškumą. Poliniuose protoniniuose tirpikliuose dalis aminogrupių yra protonizuotos, todėl jos netekusios savo nukleofiliškumo ir gebėjimo deprotonuoti protonizuotas antrines aminogrupes. Aprotoniniuose poliniuose tirpikliuose, kurie yra

protonų iš nukleofilų akceptoriai, aminogrupių nukleofiliškumas (baziškumas) padidėja, kartu padidėjant šių grupių deprotonizuojančiai gebai.

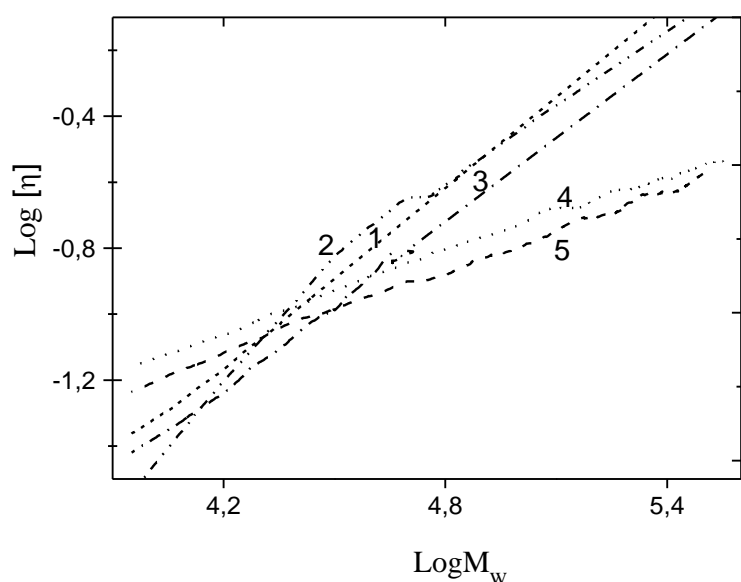


### 3.3 schema. PHPI šakojimosi mechanizmas.

BMR metodu nustatyti PHPI šakotumo duomenys buvo patvirtinti ir naudojant MSC. MSC, turinti klamos ir šviesos sklaidos jutiklį sistemą, leidžia įvertinti polimero šakotumą pagal logaritminės klamos priklausomybės nuo polimero logaritminės molekulinės masės polinkio kampą. Linijinių polimerų atveju šis kampas (tai Mark-Houwink konstanta) siekia 0,5, o šakotų polimerų atveju jis paprastai būna mažesnis. Iš 3.14 pav. matyti, kad alkoholiuose ir vandenyje sintetinto PHPI atvejais polinkio kampas yra 0,5, o aprotoniniuose tirpikliuose – 0,43-0,44. Tai patvirtina, kad DMAC ir DMF gaunami labiau šakotos struktūros polimerai.

Yra žinoma [246], kad polimerų stiklėjimo temperatūra priklauso nuo polimero šakotumo, molekulinės masės (jei ji nedidelė), poliškumo, pagrindinės grandinės stereoizomerijos, cheminės sudėties. Stiklėjimo

temperatūra parodo temperatūrą, kai polimeras iš stikliškosios būsenos tampa elastingas, arba atvirkščiai. Šakotumui didėjant, ji paprastai didėja. Todėl susintetinti PHPI buvo tiriami ir DSK metodu. 3.4 lentelėje pateiktos  $T_s$  vertės rodo, jog protoniniuose tirpikliuose susintetintų PHPI stiklėjimo temperatūra yra žema (palyginimui galima paminėti, jog 25 kDa ŠPEI  $T_s$  -53 °C). Visiškai kitokios  $T_s$  yra aprotoniniuose tirpikliuose susintetintų PHPI. Manoma, kad toks didelis  $T_s$  skirtumas atsiranda būtent dėl šių polimerų šakotumo skirtumų, nes polimerų cheminė sudėtis yra ta pati, o molekulinės masės skiriasi nežymiai.



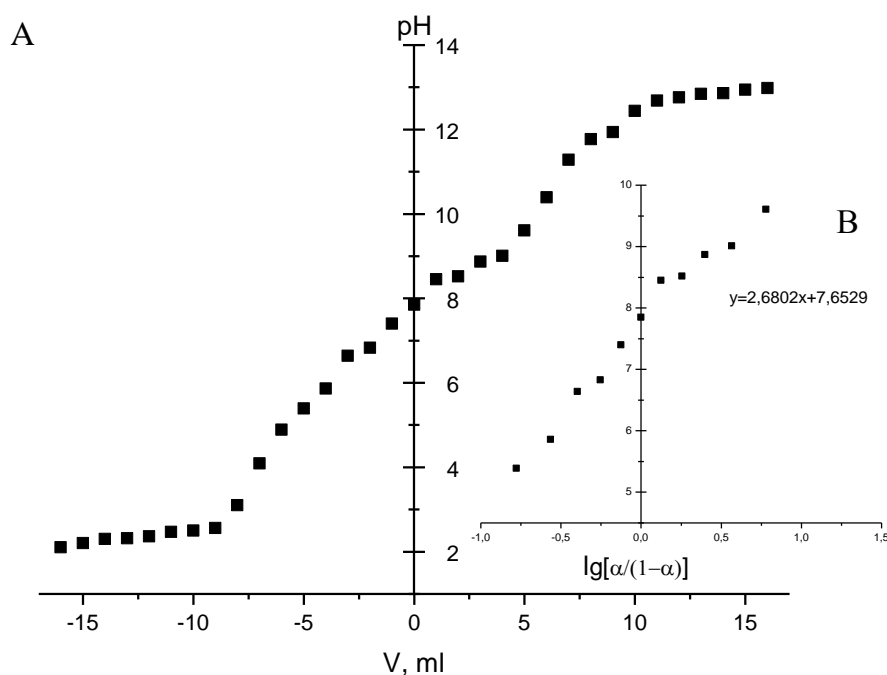
3.14 pav. PHPI logaritminės klamos priklausomybė nuo logaritminės molekulinės masės. Sintetinta: 1 – IPOH, 2 – H<sub>2</sub>O, 3 – MeOH, 4 – DMF, 5 – DMAC.

Siekiant įvertinti PHPI katijonines savybes, buvo atliktas potenciometrinis titravimas. Potenciometrinėje kreivėje (3.15 pav.) stebimi du šuoliai: pirmasis – ties pH 5, o antrasis – ties pH 11. Titruojant į rūgštinę pusę, ties pH 5 protonizuojamos buvusios neprotonizuotos aminogrupės, o, titruojant į šarminę, ties pH 11 deprotonizuojamos buvusios protonizuotos grupės. Todėl ekvivalentinis taškas ties pH 5 atitinka visišką visų tipų



aminogrupių protonizaciją, o ekvivalentinis taškas ties pH 11 – visišką visų tipų aminogrupių deprotonizaciją.

Kreivės dalis tarp šių šuolių buvo panaudota PHPI menamų jonizacijos konstantų ( $pK_a$ ) nustatymui Henderson ir Hasselbalch būdu. Skirtinguose tirpikliuose sintetintų PHPI jos labai panašios ir svyruoja tarp 7,2-7,8. Palyginimui galima paminėti, jog, titruojant ŠPEI [76] taip pat stebimi du ekvivalentiniai šuoliai – ties 9-7 ir 6-7 pH. Nemažai darbų yra skirta ir ŠPEI jonizacijos konstantų nustatymui. Jos kartais nustatomos atskiriems ŠPEI aminogrupių tipams [56, 74, 75]. Pavyzdžiui, pirminių aminogrupių  $pK_a$  yra 9,4. Antrinių aminogrupių  $pK_a$  priklauso nuo jų padėties grandinėje. Jei jos yra tretinių aminogrupių apsuptyje,  $pK_a$  siekia 8,6. Jei antrinė aminogrupė yra tarp pirminės ir antrinės, jų  $pK_a$  siekia 6,8.

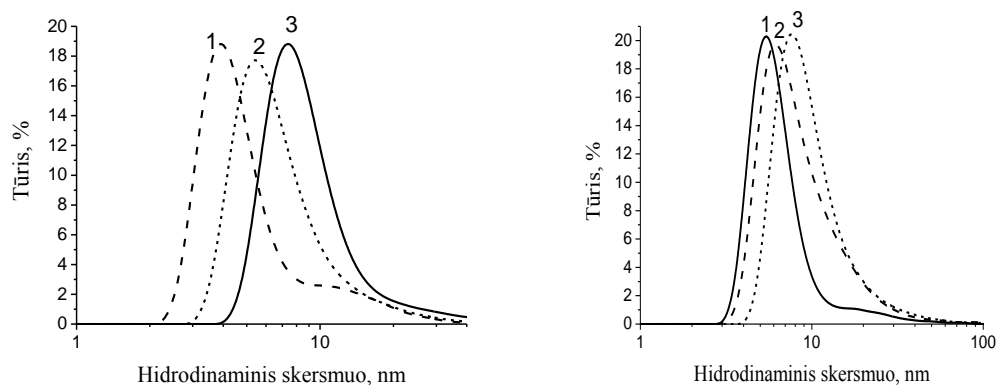


3.15 pav. DMAC susintetinto PHPI, potenciometrinio titravimo kreivė (A) ir titravimo duomenys Henderson ir Hasselbalch lygties koordinatėse (B).

Gauti rezultatai rodo, jog galėjo būti gauti šakoti PHPI, nes PHPI ir ŠPEI pasikartojančios grandys yra panašios. Henderson ir Hasselbalch lygties narys

n visų polimerų atveju taip pat mažai skyrėsi ir svyravo nuo 2,1 iki 2,6. Tokios n vertės rodo polielektrolitams būdingą PHPI elgesį.

Atlikus DLS matavimus vandenyje (3.16 pav.) pastebėta, jog kaip ir kitų polietileniminų atveju dalelių dydis priklauso nuo pH (polimero išsivyniojimo/susisukimo laipsnio) [243]. Tačiau įdomu tai, kad 0,15 M NaCl vandeniniame tirpale nejonizuoto polimero (pH 10) dalelių dydis yra šiek tiek didesnis nei tokios pat pH vertės vandenyje. O, esant kitoms pH vertėms, PHPI dalelių dydis beveik nepriklauso nuo to, ar polimeras tirpinamas H<sub>2</sub>O, ar vandeniniame 0,15 M NaCl tirpale. Tai rodo, jog PHPI makromolekulių gniužulų dydis mažai priklauso nuo joninės jėgos ir pH pokyčių. Šiuo aspektu PEIHI elgiasi kiek kitaip (žr. 3.7°pav.).



3.16 pav. DMAC susintetinto PHPI dalelių dydžio pasiskirstymas. Vandenyje (kairėje) ir 0,15 M NaCl (dešinėje) tirpale, kai pH: 1 – 10; 2 – 7; 3 – 2.

Apibendrinant šiame skyriuje pateiktą medžiagą, galima paminėti kelis svarbiausius atliktų tyrimų rezultatus. 1,3-diamino-2-propanolio ir 1,3-dibrom-2-propanolio polikondensacija poliniuose protoniniuose ir aprotoniniuose tirpikliuose vyksta lėtai. Didžiausias polikondensacijos reakcijos greitis bei reakcijos baigties laipsnis pasiekiamas poliniuose aprotoniniuose tirpikliuose DMAC ir DMF. Po 7 paras trukusios reakcijos ultrafiltruotų PHPI išeiga siekia ~6-20 %, o masinė molekulinė masė ~5-18 kDa. Visuose tirtuose tirpikliuose

(H<sub>2</sub>O, MeOH, IPOH, DMF, DMAC) susidaro šakoti PHPI, o šakotumo laipsnis priklauso nuo tirpiklio gebos padidinti ar sumažinti aminogrupių nukleofiliškumą. Nepaisant vykusių šakojimosi reakcijų, susidarė netinkliniai ir vandenyje gerai tirpūs PHPI. Nuo PHPI šakotumo priklauso šių polimerų stiklėjimo temperatūra ir kreivių polinkis Mark-Houwink koordinatėse. Visi susintetinti PHPI yra katijoniniai polielektrolitai, turintys gebančių jonizuotis pirminių, antrinių ir tretinių aminogrupių. Šių grupių menamoji rūgštinė jonizacijos konstanta mažai priklauso nuo PHPI sintezės būdo ir siekia 7,2-7,8.

### 3.2 Modifikuotų polialkileniminų sintezė ir tyrimas

Kadangi PHPI, skirtingai nei ŠPEI ar LPEI, sintetinamas polikondensacijos būdu, atsiranda įdomi perspektyva PHPI modifikuoti jau pačios sintezės metu, parenkant modifikavimui tinkamus mono- ar daugiafunkcinius amino- ar alkilhalogenido tipo monomeras. Tai ir pabandyta atlikti šiame darbe, modifikuojančiais monomerais pasirenkant metoksi-poli(etilenglikolių) jodidus ir cistaminą. Tokie MPEG grandines ir disulfidinius ryšius turintys PHPI dar nebuvo nei sintetinti, nei tirtas jų transfekcinis/toksinis aktyvumas ląstelėms.

Minėti modifikuojantys junginiai pasirinkti neatsitiktinai, nes PHPI (patentuotas *Turbofect* pavadinimu [72]), nors ir labai efektyvus transfekcijoje bet yra tinkamas tik genų [73] ar baltymų [247] transfekcijai, bet to, yra šiek tiek toksiškas ląstelėms [73]. Į PHPI struktūrą įvedant polietilenglikolio grandis, buvo tikimasi padidinti vektoriaus biosuderinamumą, sumažinti toksiškumą [84, 162, 163] bei labiau jį pritaikyti siRNR [94] transfekcijai. O, modifikuojant cistaminu, buvo siekta suteikti PHPI gebą degraduoti ląstelių viduje [111-115]. Dėl bioskaidumo PHPI toksiškumas taip pat turėtų sumažėti, bei atsirastų galimybės transfekcijos vektorių taikyti ir pakartotinei transfekcijai (kotransfekcijai), kuri būtina rekombinantinių baltymų sintezės procesuose [248]. Bioskalus vektorius ląstelės viduje nesuriša RNR, o tai yra

būtina sąlyga sėkmingai kotransfekcijai bei tuo pačiu ir netransfekuotų ląstelių pašalinimui iš ląstelių pasėlio [248].

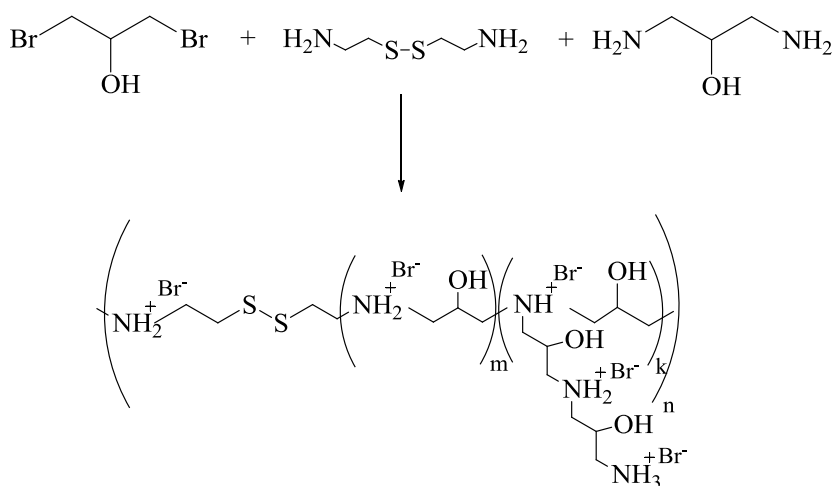
### **3.2.1 Disulfidinių ryšių pagrindinėje grandinėje turinčio poli(2-hidroksipropilenimino) sintezė ir savybės**

Disulfidinių ryšių pagrindinėje turinčio PHPI (PHPI-SS) sintezei panaudotas disulfidinių ryšių turintis monomeras – cistaminas (CT). Nepaisant to, jog neprotonizuotas cistaminas yra šiek tiek nestabilus junginys [249], jis naudojamas gamtinių [250] ar sintetinių [251] nedidelės molekulinės masės junginių modifikavimui. Todėl šiame darbe buvo nuspręsta išbandyti CT ar jo mišinio su DAP polikondensaciją su DBP. Mūsų turimomis žiniomis, mokslinėje literatūroje iki šiol dar nėra aprašyta, kad cistaminas būtų panaudotas polikondensaciniams polialkileniminams gauti.

Siekiant parinkti optimalias sąlygas disulfidinių ryšių turinčių PHPI sintezei, buvo atlikta eilė bandomųjų sintezių, keičiant tirpiklius (PC, IPOH, MeOH, DMAC ir DMF) bei bendrą monomerų koncentraciją (40-60 ir 100 %). Bandomosios sintezės parodė, jog polimerai susidaro, vadinasi, sintezių sąlygomis CT yra pakankamai stabilus ir gali būti naudojamas polialkileniminų, turinčių disulfidinių ryšių, sintezei.

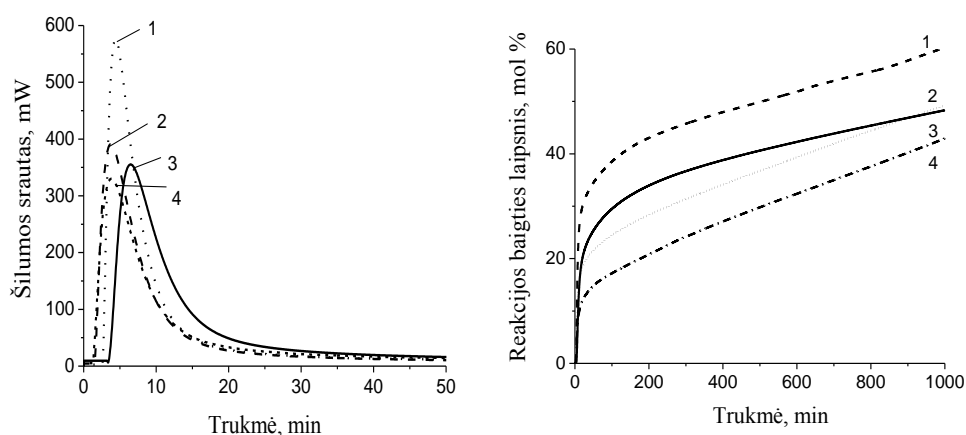
Bandomųjų sintezių metu didžiausia PHPI-SS išeiga ir molekulinė masė gauta tuomet, kai tirpikliu naudotas DMAC, esant 40 % bendrai monomerų koncentracijai, ir kai polikondensacija vykdyta 80 °C temperatūroje. Būtent tokios sintezių sąlygos naudotos visų šiame skyriuje aprašytų PHPI-SS polimerų sintezei. Visi šie PHPI-SS buvo sintetinami keičiant santykį tarp CT ir DAP, bet tuo pačiu išlaikant ekvimolinį santykį tarp visų aminogrupės turinčių monomerų ir DBP (3.4 schema).

Po sintezės visi polimerai buvo gryninti ultrafiltravimo būdu (2.2.5 metodika) ir visi tyrimai atlikti tik su ultrafiltruotais polimerų bandiniais.



3.4 schema. 1,3-dibrom-2-propanolio, cistamino ir 1,3-diamino-2-propanolio polikondensacija.

Siekiant išsiaiškinti cistamino įtaką polikondensacijos kinetikai, reakcijos buvo tiriamos skysčių izoterminės kalorimetrijos metodu. Kaip matyti iš 3.18 paveiksle esančių kreivių, didžiausi reakcijos greičiai ir didžiausi reakcijos baigties laipsniai pasiekiami tuomet, kai DBP:CT:DAP molinis santykis pradiniam reakcijos mišinyje lygus 1:0,25:0,75. Didinat CT dalį mišinyje, reakcija lėtėja ir pasiekiami mažesni reakcijos baigties laipsniai. Ir tik DAP visiškai pakeitus cistaminu (CT:DAP – 1:1), greitis vėl šiek tiek padidėja (pagreitėjimas šiuo atveju matomai susijęs su reakcijai palankia labai reguliaria monomerų grandžių išsidėstymo tvarka polimere). Todėl iš čia aprašytų rezultatų, o taip pat ir lyginant 3.17 ir 3.9 paveikslų duomenis seka, kad *N,N*-dimetilacetamide DBP su CT kondensuojasi lėčiau nei su DAP. Manoma, jog tokią tendenciją nulemia mažesnis CT baziškumas už DAP. Kadangi nepavyko rasti literatūrinių duomenų apie CT baziškumą, jis buvo teoriškai apskaičiuotas naudojantis ACDLabs programa ir gauta, jog  $pK_b1$  galėtų būti artima 5,03, nes žinoma, jog DAP ši konstanta siekia 4,31 [252]. Todėl šie skaičiai galėtų patvirtinti prielaidą apie priežastis, kodėl CT yra mažiau aktyvus už DAP  $S_N2$  reakcijoje.



3.17 pav. Šilumos srauto (kairėje) ir reakcijos baigties laipsnio (dešinėje) priklausomybė nuo reakcijos trukmės ir (CT:DAP:DBP molinio santykio reakcijos mišinyje: 1 – 0,25, 2 – 0,5, 3 – 1 ir 4 – 0,7.

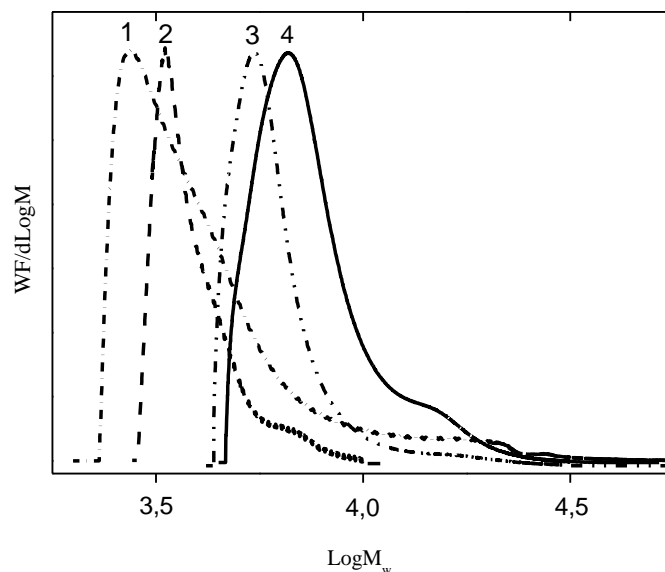
3.6 lentelėje pateiktos PHPI-SS išeigos (1,4-7,1 %) po 168 val. sintezės, rodo, jog per tą pačią reakcijos trukmę PHPI-SS polimerų susidaro mažiau, nei disulfidinių ryšių neturinčių PHPI. Skiriasi ir šio tipo polimerų molekuliniai parametrai (PHPI-SS polimerai pasižymi mažesnėmis skaitinėmis bei masinėmis molekulinėmis masėmis). Tiek išeigos, tiek ir molekulinė masių skirtumai, gali būti paaiškinami mažesniu CT reakingumu už DAP.

3.6 lentelė. PHPI-SS ir PHPI rodikliai

Polimeras	Molinis santykis			$\eta$ , % <sup>a</sup>	$M_w$ , kDa <sup>b</sup>	$M_w/M_n$ <sup>b</sup>	$N_2/N_3$ <sup>c</sup>
	DBP	CT	DAP				
PHPI-SS1	1	1	-	4,5	4,2	1,98	1,76
PHPI-SS2	1	0,7	0,3	1,4	3,9	1,52	1,65
PHPI-SS3	1	0,5	0,5	4,8	7,9	1,56	2,01
PHPI-SS4	1	0,25	0,75	7,1	6,9	1,43	1,94
PHPI <sup>d</sup>	1	-	1	19,5	17,6	4,84	1,74

<sup>a</sup>nustatyta gravimetriškai; <sup>b</sup>MSC; <sup>c</sup>BMR

PHPI-SS MMP kreivės (3.18 pav.) yra multimodalinės ir panašių formų. Jos, taip pat kaip ir PHPI polimerų kreivės (žr. 3.11 pav.), rodo, jog abiejų tipų polimerai yra nevienalyčiai. PHPI-SS nevienalytiškumo priežastys, kaip ir PHPI polimerų atveju (3.1.2 skyrius), matomai susijusios su heterogeninėmis sintezių sąlygomis.

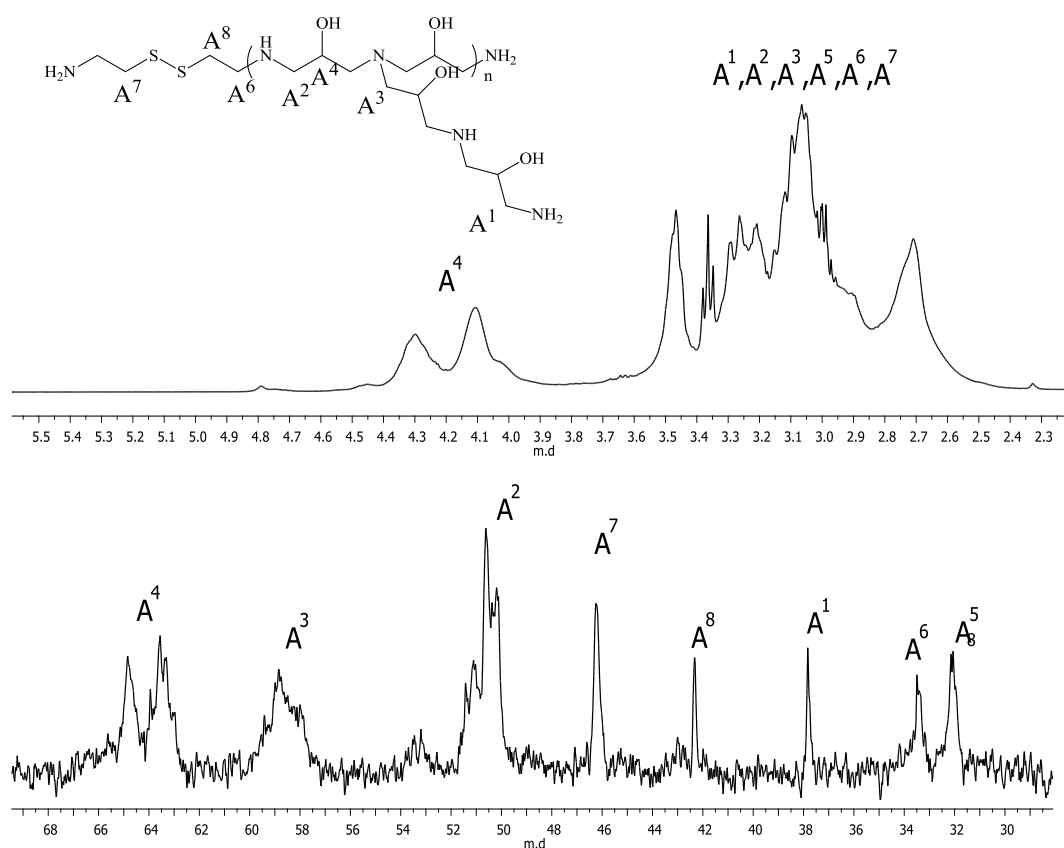


3.18 pav. Molekulinių masių pasiskirstymo kreivės: PHPI-SS1 – 1, PHPI-SS2 – 2, PHPI-SS3 – 4, PHPI-SS4 – 3.

Cistamino grandžių turinčių polimerų sandara įvertinta  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR spektroskopijos metodais. 3.19 paveiksle pateiktas PHPI-SS3 polimero  $^1\text{H}$  BMR spektras  $\text{D}_2\text{O}$ . Jame be signalų būdingų PHPI fragmentams (3.1.2 skyrius), matomi signalai ties 2,71-3,47 m.d. Jie priskirti  $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{S}-\text{S}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-$  protonams.  $^{13}\text{C}$  BMR spektruose taip pat matomi signalai būdingi cistamino fragmentams: signalas ties 32,1 m.d priskirtas angliai, esančiai prie disulfidinių ryšių tiek makromolekulių grandinėje, tiek ir galuose ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{S}-\text{S}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-$  ir  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{S}-\text{S}-\underline{\text{CH}}_2-$ ); signalas ties 33,5 m.d priskirtas angliai, esančiai prie disulfidinio ryšio, kuris yra šalia tretinių aminogrupių ( $>\text{N}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{S}-\text{S}-$ ); signalas ties 38,8 m.d priskirtas angliai, esančiai  $\text{NH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-$  grupėse; signalas ties 46,3 m.d priskirtas angliai, esančiai  $-\text{CH}_2-$

S-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>- grupėse, o ties 53,8 m.d – priskirtas angliai, esančiai šalia tretinių aminogrupių (>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-).

Integruojant ir tarpusavyje lyginant <sup>13</sup>C BMR spektrų integralus buvo apskaičiuotas PHPI-SS šakotumo laipsnis kaip antrinių ir tretinių aminogrupių kiekio santykis (3.6 lentelė). Jis parodė, jog maždaug kas trečia aminogrupė PHPI-SS polimeruose turi atšaką, ir kad PHPI-SS šakotumas mažai priklauso nuo CT kiekio reakcijos mišinyje.



3.19 pav. PHPI-SS3 <sup>1</sup>H BMR (viršuje) ir <sup>13</sup>C BMR (apačioje) spektrai.

Kadangi buvo norima gauti bioskalius PHPI-SS polimerus, buvo būtina įsitikinti, kad polimeruose yra disulfidinių ryšių. Taip pat buvo svarbu nustatyti tikslų jų kiekį, kad būtų galima nuspėti polimerų bioskalumo gebą. Be to, žinant disulfidinių ryšių (sieros) kiekį, būtų įmanoma tiksliau apibūdinti ir susintetintų PHPI-SS polimerų sudėtį. Dėl šių priežasčių PHPI-SS polimerai buvo analizuojami trimis skirtingais metodais: naudojant BMR spektroskopiją,



nustatant sieros kiekį redukcijos-titravimo (RT) būdu, o taip pat ir atliekant elementinę mikroanalizę (EMA).

RT ir EMA leido tiesiogiai įrodyti, kad polimeruose yra sieros, ir kad jos kiekiai PHPI-SS polimeruose artimi teoriniams kiekiams, apskaičiuotiems pagal monomerų santykį pradiniam reakcijos mišinyje (3.7 lentelė). Atlikus neredukuotų bandinių titravimą nustatyta, jog tiolgrupių polimerai neturi, todėl galima teigti, kad visa juose nustatyta siera yra disulfidinių ryšių pavidale.

BMR, EMA ir RT duomenis perskaičiavus į HPI ir EDEI santykį (3.8 lentelė) akivaizdžiai matyti, jog susintetintų PHPI-SS polimerų sudėtis yra artima sudėčiai, kuri turėjo susidaryti pagal pradinio reakcijos mišinio monomerų stochiometriją. Tai įrodo, jog CT dalyvavo polikondensacijos reakcijoje su DAP ir DBP ir kad susidarė disulfidinių ryšių turintys polimerai, o šių ryšių kiekis proporcingas CT kiekiui reakcijos mišinyje.

Tarpusavyje lyginant įvairių analizių duomenis (3.8 lentelė) galima pastebėti, jog visumoje mažiausiu rezultatų (teorinių ir eksperimentinių) sutapimu pasižymėjo <sup>13</sup>C BMR analizė. Tai visiškai tikėtina, turint mintyje mažą <sup>13</sup>C izotopo koncentraciją medžiagose. Išskyrus PHPI-SS1 polimero analizės rezultatus, kiti metodai rodė pakankamai tokių rezultatų sutapimą. Šio polimero analizės paklaidos matomai susijusios su labai dideliu sieros kiekiu polimere.

3.7 lentelė. Teorinis ir eksperimentiškai nustatytas sieros kiekis (%) PHPI-SS polimeruose

Polimeras	Teorinis	Eksperimentiškai nustatytas	
		EMA	RT
PHPI-SS1	17,3	20,9	18,4
PHPI-SS2	12,7	13,6	11,6
PHPI-SS3	9,4	9,4	10,3
PHPI-SS4	4,9	5,4	5,3

3.8 lentelė. Teorinis ir eksperimentiškai nustatytas HPI/EDEI grandžių molinis santykis PHPI-SS polimeruose remiantis BMR, EMA ir RT analizių duomenimis

Polimeras	Teorinis	Eksperimentiškai nustatytas			
		<sup>1</sup> H BMR	<sup>13</sup> C BMR	EMA	RT
PHPI-SS1	1	0,9	1,1	0,5	0,8
PHPI-SS2	1,8	1,9	2,2	1,7	2,1
PHPI-SS3	3	2,9	3,2	2,9	2,6
PHPI-SS4	7	6,4	7,4	6,6	6,3

Apibendrinant PHPI-SS polimerų sintezę ir savybes, galima išskirti šiuos svarbiausius rezultatus: 1) disulfidinių ryšių pagrindinėje grandinėje turinčius polialkileniminius galima susintetinti polikondensuojant cistaminą su alkilendibromidais; 2) 1,3-dibrom-2-propanolis su cistaminu reaguoja lėčiau, nei su 1,3-diamino-2-propanoliu; 3) iš cistamino, 1,3-dibrom-2-propanolio ir 1,3-diamino-2-propanolio gaunami disulfidinių ryšių turintys polimerai, o šių ryšių kiekis proporcingas cistamino ir kitų monomerų moliniam santykiui pradiniam reakcijos mišinyje; 4) PHPI-SS polimeruose nėra tioliograpių, o tai įrodo jų stabilumą laike; 5) atliktų tyrimų visuma rodo, jog PHPI-SS polimerai yra potencialiai bioskalūs, tad gali būti tiriami kaip bioskalūs genų transfektoriai.

### 3.2.2 Metoksi-poli(etilenglikolio) grandinėmis modifikuoto poli(2-hidroksipropilenimino) sintezė ir tyrimas

Yra žinoma, jog PHPI ląstelėms yra šiek tiek toksiški [73]. Bandant sumažinti PHPI toksiškumą, padidinti biosuderinamumą ir PHPI labiau pritaikyti siRNR transfekcijai, PHPI buvo modifikuotas metoksi-poli(etilenglikolio) grandinėmis.

Poli(2-hidroksipropileniminas) su metoksi-poli(etilenglikolių) (MPEG) grandinėmis makromolekulių galuose (PHPI-MPEG) buvo sintetinamas iš

DAP, DBP bei 1000, 2000 ir 5000 Da MPEG jodidų (MPEGI). Šiame darbe buvo siekiama nustatyti, kokią įtaką MPEG atšakų skaičiui makromolekulėse, polimerų molekulinei masei, išėigai ir jų tinkamumui transfekcijai turi MPEGI molekulinė masė bei jų įdėjimo į reakcijos mišinį momentas.

Reakcijai reikalingi MPEGI buvo susintetinti pagal adaptuotą Rydon metodiką [234]. Svarbiausieji MPEGI rodikliai (išėiga, bendrasis, priemaišinis-joninis, ir kovalentinis jodo kiekiai) pateikti 3.9 lentelėje. Iš šių, o taip pat ir iš  $^1\text{H}$  BMR analizės duomenų buvo apskaičiuotas MPEG -OH grupių pakeitimo jodu laipsnis ( $X_{\text{OH}}$ ). Tai itin svarbi charakteristika, nes ne MPEG, o tik MPEG jodidai gali prisijungti prie DAP aminogrupių. Iš 3.9 lentelėje patektų duomenų matyti, jog  $X_{\text{OH}}$  yra artimas teoriniam, kuris turi būti lygus 1 (jei visos hidroksigrupės pakeičiamos jodu). Jei  $X_{\text{OH}}$  artimas vienetui, susidaro geros prielaidos ne tik PHPI-MPEG sintezei, bet ir mažesniai polimero užteršimui kondensacijos reakcijoje nedalyvaujančiu MPEG.

3.9 lentelė. MPEG jodidų rodikliai

MPEG	$\eta$ , %	$I_b$ , % <sup>a</sup>	$I_j$ , % <sup>b</sup>	$I_k$ , % <sup>c</sup>	$X_{\text{OH}}$ <sup>d</sup>	$X_{\text{OH}}$ <sup>d</sup> (BMR)
MPEGI1000	81,3	10,8	1,1	9,7	0,8	0,9
MPEGI2000	95,7	8,5	1,3	7,2	1,2	0,9
MPEGI5000	98,4	2,7	0,3	2,4	0,9	1,0

<sup>a</sup>Bendrojo jodo kiekis MPEG jodide; <sup>b</sup>Joninio jodo kiekis MPEG jodide; <sup>c</sup>Kovalentinio jodo kiekis MPEG jodide; <sup>d</sup>MPEG hidroksigrupių pakeitimo jodu laipsnis

Sėkmingą MPEG jodinimą patvirtino ne tik argentometriniu titravimo rezultatai, bet ir  $^1\text{H}$  BMR spektrai (juose matomas  $-\text{CH}_2\text{-I}$  grupei būdingas tripletas ties 3,15-3,20 m.d), o taip pat ir Raman bei FT-IR spektrai.

Raman spektruose matomos  $-\text{CH}_2\text{-I}$  grupei būdingos sugerties juostos su smailėmis ties 709 ir 618  $\text{cm}^{-1}$ . Sugerties juostos ties 1594, 1028 ir 1007  $\text{cm}^{-1}$  rodo, jog jodintuose dariniuose yra nedidelis kiekis natrio fenoliato (susidarant

MPEGI, išsiskiria fenolis, kuris, prieš atliekant MPEGI ekstrakciją, neutralizuojamas su NaOH). FT-IR spektruose taip pat matomos  $\text{-CH}_2\text{-I}$  grupei būdingos sugerties juostos ties 758 ir 692  $\text{cm}^{-1}$ .

Parentant geriausias sąlygas PHPI-MPEG sintezei, buvo nuspręsta visais atvejais naudoti DMAC tirpiklį, 80 °C reakcijos temperatūrą ir 168 val. reakcijos trukmę, kadangi būtent tokiose sąlygose susidarydavo pakankamai gerų parametrų PHPI. Prisilaikant šių bazinių sąlygų buvo keičiami kiti reakcijų parametrai, siekiant nustatyti jų įtaką PHPI-MPEG molekulinei masei, išeigai ir oksietileno (OE) grandžių kiekiui polimere. Šiuo tikslu buvo išbandyti įvairių molekulinų masių MPEGI (1000, 2000 ir 5000 Da), kelios bendros visų monomerų koncentracijos (40 ir 60 %), o taip pat buvo varijuojamas MPEGI kiekis reakcijos mišinyje (0,0005, 0,001 ar 0,002 mol, kai DAP ir DBP kiekiai buvo pastovūs ir atitinkamai sudarė 0,01 ir 0,0095 mol). Be to, MPEGI į reakcijos mišinį buvo dedamas reakcijos pradžioje (iš pradžių 2 valandas vykdoma DAP ir MPEGI kondensacija, ir tik tuomet dedamas DBP), arba reakcijos pabaigoje (iš pradžių 144 valandas polikondensuojami DAP su DBP, ir tik tuomet dedamas MPEGI). Kai kuriais atvejais DAP ir DBP reakcijos eigoje buvo dozuojami papildomai. Visi preliminarių tyrimų rezultatai trumpai bus aptarti.

Naudojant 60 % bendrą visų monomerų koncentraciją ir 1 mmol MPEGI į reakcijos mišinį dedant reakcijos pabaigoje, OE grandžių prijungiama nuo 2 iki 3 mol%. Ultrafiltruotų PHPI-MPEG išeiga siekė 4-7 %, masinė molekulinė masė – 70-144 kDa, o polidispersiškumas – net 9,9. Tai, kad didelės molekulinės masės produkto susidarė nedaug, galėjo lemti labai klampi reakcijos terpė, trukdžiusi monomerų migracijai. OE grandžių kiekis padidinamas, kai MPEGI dedamas reakcijos pradžioje. Šiuo atveju OE kiekis polimeruose padidėjo iki 75 mol%, bet išeiga, masinė molekulinė masė bei polidispersiškumas beveik nepakito (atitinkamai 1-6 %, 9 ir 100-150 kDa). Taigi, toks sintezės būdas dėl pernelyg mažų išeigų nepasitvirtino ir toliau nebuvo naudojamas.

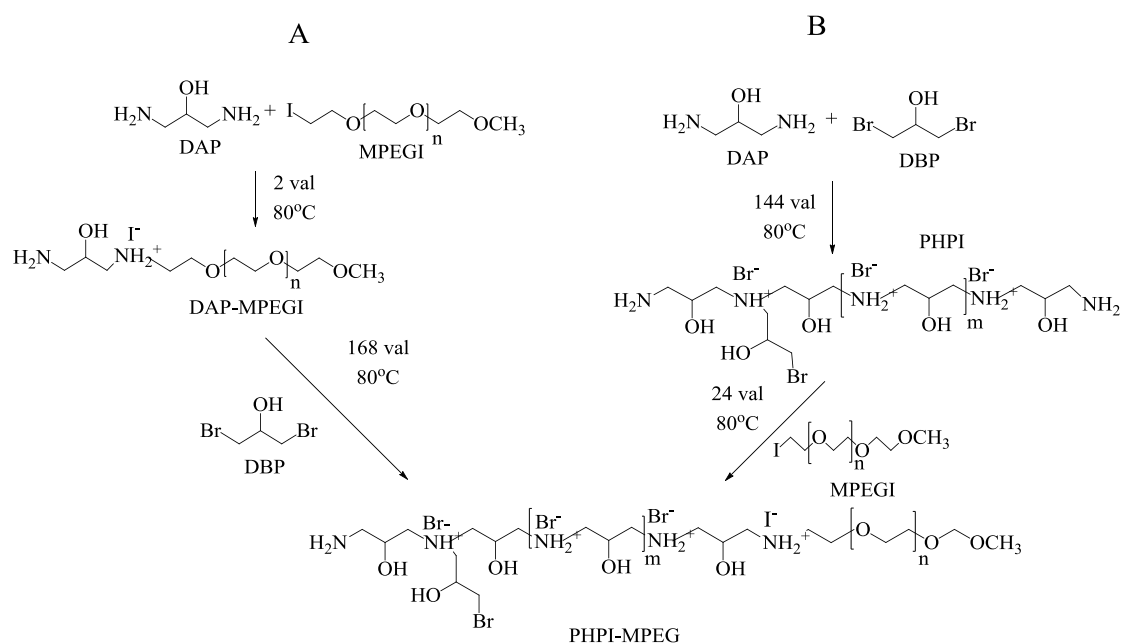
Buvo atliktos bandomosios sintezės į reakcijos mišinį pridedant papildomai DAP ir DBP. Iš pradžių reakcija buvo vykdoma su 0,01 mol DAP, 0,0095 mol DBP ir 0,001 mol MPEGI. Tuomet, praėjus 168 val., į reakcijos mišinį papildomai įdedama 0,01 mol DAP ir 0,0095 mol DBP. Tada reakcijos pratęsimas dar 168 val. Šiuo atveju OE grandžių kiekis polimeruose svyravo 50-60 mol% ribose, molekulinė masė beveik nepakito, o ultrafiltruotų polimerų išeiga išlieko nedidelė (6 %). Taigi, papildomas monomerų dozavimas nepasiteisino, nes polimerų rodikliai pakito nedaug, o reakcijos trukmė jau pernelyg ilga.

Buvo nustatyta jog, sintezei naudojant 40 % monomerų koncentraciją ir 0,0005, 0,001 ar 0,002 mol MPEGI dedant reakcijos pradžioje, kai kurie rezultatai priklausė nuo MPEGI kiekio. Sintezei naudojant 0,0005 mol ir 0,002 mol MPEGI, ultrafiltruotų polimerų išeigos siekė vos 3-15 %, buvo prijungiama nuo 18 iki 76 mol% OE grandžių, masinė molekulinė masė siekė 90 kDa, o polidispersiškumas – 8. Kuomet buvo naudojama 0,001 mol MPEGI, OE grandžių kiekis polimeruose pakito nedaug (lyginant su 0,0005 ar 0,002 mol MPEGI), polimerų masinės molekulinės masės ir polidispersiškumas šiek tiek sumažėjo, o išeiga padidėjo beveik dvigubai. Būtent dėl didelės išeigos ir pakankamai geros molekulinės masės šios sąlygos pasirodė tinkamos ir buvo naudojamos PHPI-MPEG sintezei. Toliau šios sąlygos sutrumpintai bus žymimos „A“ raide (3.5 schema).

Naudojant tą pačią bendrą monomerų koncentraciją (40 %) ir siekiant įvesti mažesnę OE grandžių kiekį, 0,001 mol MPEGI į reakcijos mišinį buvo dedami praėjus 144 valandoms nuo reakcijos pradžios (tuo metu DAP ir DBP polikondensacijos baigties laipsnis pasiekia ~75 mol%). Taip pavyko ženkliai sumažinti OE grandžių kiekį polimeruose, gauti didelę polimerų molekulinę masę ir ultrafiltruotų polimerų išeigą. Toliau šios sąlygos bus žymimos „B“ raide (3.5 schema).

Taigi buvo atrinktos sąlygos dviejų labai skirtingų tipų PHPI-MPEG sintezėms: turinčių vidutinę molekulinę masę, daug OE grandžių ir didelę išeigą (A polimerai), ir turinčių didelę molekulinę masę, mažai OE grandžių ir

vidutinę išeią (B polimerai). Šių polimerų sintezių svarbiausieji rezultatai pateikti 3.10 lentelėje ir 3.20 paveiksle.



3.5 schema. 1,3-dibrom-2-propanolio, 1,3-diamino-2-propanolio ir MPEGI polikondensacija.

Lentelėje visų pirma matoma tendencija, kad ultrafiltruotų PHPI-MPEG išeišos labai priklauso nuo reakcijoje dalyvavusio MPEGI molekulinės masės: jai didėjant, išeišos stipriai mažėja. Ir akivaizdu, jog šis dėsniumas tik labai nedaug priklauso nuo į polimerą įvestų oksietileno grandžių (OE) skaičiaus (visumoje A atveju OE buvo įvesta daug, o B atveju – labai mažai, bet susintetintų su tuo pačiu MPEGI A ir B polimerų išeišos skiriasi nedaug). Todėl manoma, jog MPEGI molekulinės masės įtaka išeišai visų pirma pasireiškia per MPEGI įtaką reakcijos mišinio klampai: kuo didesnė MPEGI molekulinė masė, tuo reakcijos mišinys buvo klampesnis, tuo lėčiau monomerai reagavo ir susidarė mažiau polimero.

Kaip matyti iš šios lentelės, PHPI-MPEG molekulinės masės, OE grandžių kiekis bei MPEG grandinių skaičius vienoje statistinėje

makromolekulėje (k) visumoje labiau priklauso nuo pasirinkto sintezės būdo, nei nuo MPEGI molekulinės masės.

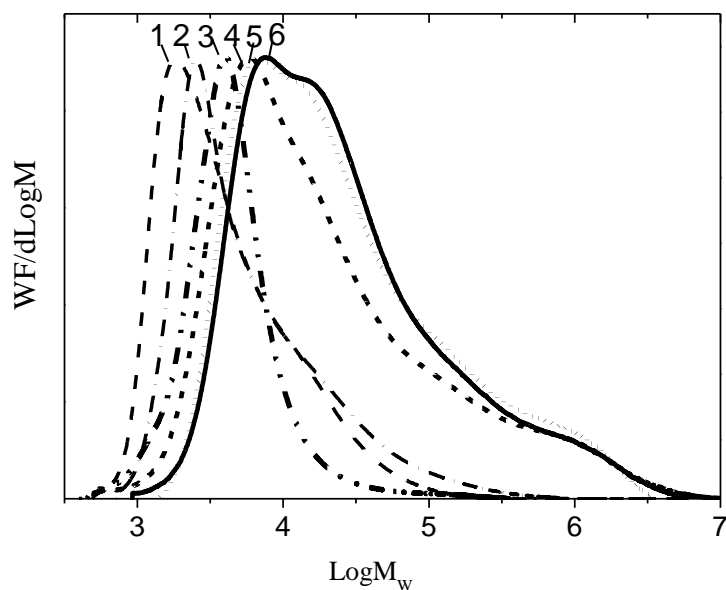
3.10 lentelė. MPEG grandinėmis modifikuotų PHPI darinių rodikliai

Sintezė	Nr.	MPEGI	$\eta$ , %	OE, mol %	k	$M_w$ , kDa	$M_w/M_n$	$N_2/N_3$
A	1	1000	28,1	59	1,25	7,7	2,84	2,5
	2	2000	23,2	67	1,06	15,6	4,03	2,4
	3	5000	5,97	72	1,20	52,6	5,29	2,3
B	4	1000	20,9	3,3	0,22	138	11,7	2,7
	5	2000	17,1	2,4	0,09	145	12,1	2,8
	6	5000	6,04	9,3	0,15	162	13,6	2,6

OE-oksietileno grandžių kiekis; k- MPEG grandinių skaičius vienoje statistinėje MPEG'ilito PHPI makromolekulėje;  $\alpha$  - Mark-Houwink lygties rodiklio vertė;  $N_2/N_3$  – šakotumo laipsnis iš BMR spektrų.

Nuo sintezės būdo taip pat priklauso molekulinė masė pasiskirstymo kreivių forma (3.20 pav.). Sintetinant A būdu, kreivių forma labiau monomodalinė, o B būdu – labiau bimodalinė. Be to, B polimerai labiau polidispersiški už A polimerus, nes juose yra itin didelės molekulinės masės (1000 kDa ir daugiau) frakcijų (3.20 pav.).

Taigi, iš 3.10 lentelės ir 3.20 paveikslėlio seka, kad visa eilė PHPI-MPEG polimerų rodiklių (molekulinė masė, polidispersiškumas, MPEG grandinių skaičius makromolekulėse ir išeiga) labai priklauso nuo polimero sintezės būdo. Jei MPEGI dedamas reakcijos pradžioje (A būdas), MPEG į makromolekules pradeda jungtis nuo pat reakcijos pradžios.



3.20 pav. PHPI-MPEG MMP kreivės (kreives žymintys skaičiai atitinka polimerų žymėjimą 3.10 lentelėje).

Kadangi pradiniam reakcijos mišinyje yra didelė aminogrupių koncentracija, galima tikėtis, kad beveik visas reakcijoje naudotas MPEGI dalyvaus polimero susidaryme. Ir priešingai, jei MPEGI dedamas reakcijos pabaigoje, aminogrupių koncentracija reakcijos mišinyje jau yra stipriai sumažėjusi. Todėl MPEGI reakcija su šiomis grupėmis bus lėta ir per baigtinį reakcijos laiką spės sureaguoti tik dalis MPEGI. Būtent todėl A tipo polimeruose beveik kiekviena jų makromolekulė turi šiek tiek daugiau nei po vieną MPEG grandinę, o B polimeruose tokią grandinę turi tik kas 5-11 makromolekulė. Atsižvelgiant į tai, galima teigti, jog susidarant A polimerams, MPEGI dalyvavo kaip augančią grandinę nutraukiantis agentas, ir šiuos polimerus galima traktuoti kaip diblokinius, sudarytus iš PHPI ir MPEG bloką (PHPI-MPEG). O, susidarant B polimerams, MPEGI modifikavo jau susintetintą PHPI karkasą, todėl šiuos polimerus galima traktuoti kaip silpnai ir statistiškai MPEG grandinėmis modifikuotą PHPI.



Kiek sunkiau paaiškinti, kodėl nuo sintezės būdo itin stipriai priklauso PHPI-MPEG molekulinė masė. Sintetinant A polimerus, antrosios stadijos metu visą laiką reakcijos mišinyje buvo augančią grandinę nutraukiančio monofunkcinio DAP-MPEG adukto ar monofunkcinio MPEGI, jei jis nespėjo sureaguoti pirmosios stadijos metu (žr. 3.5 schemą). Todėl, nors ir buvo balansas tarp tarpusavyje reaguojančių funkcinių grupių, vidutinis reakcijos mišinio funkcionalumas sudarė tik 1,95. Nesudėtingi teoriniai skaičiavimai rodo, jog, esant tokiam funkcionalumui bei sureagavus visoms funkcinėms grupėms, turėtų susidaryti linijinės makromolekulės iš 39-ų 2-hidroksipropilenimino grandžių, o prie abiejų linijinės makromolekulės galų būtų prijungta po vieną MPEG grandinę. Tuomet  $M_n$ , priklausomai nuo MPEGI molekulinės masės, galėtų siekti 8-16 kDa. 3.10 lentelėje pateikti duomenys rodo, jog eksperimentinės  $M_n$  buvo šiek tiek mažesnės. Bet to ir reikėtų tikėtis, jei reakcijos metu sureagavo tik dalis funkcinių grupių (jei nebuvo pasiektas ribinis 100 mol% reakcijos baigties laipsnis). Todėl manoma, jog šiuo atveju praktiškai gauti rezultatai pakankamai gerai atitinka teorines prielaidas.

Atlikus analogiškus skaičiavimus B polimerams, turėtume gauti tokį patį rezultatą, nes, po MPEGI pridėjimo turėtų susidaryti toks pats reakcijos mišinio funkcionalumas, ir toks pats balansas tarp reaguojančių funkcinių grupių, kaip ir A atveju. Tačiau 3.10 lentelėje pateikti rezultatai rodo priešingai. Todėl manoma, jog sintetinant B būdu didelės molekulinės masės produktai susidarė jau pirmosios stadijos metu, ir jie susidarė dėl heterogeninių reakcijos sąlygų bei nepusiausvirošios polikondensacijos pobūdžio. Reakcijai vykstant heterogeniškai, dėl joje dalyvaujančių dalelių difuzijos greičių skirtumų, gali susidaryti lokalsios zonos, kuriose savaime susiformuoja tarpusavyje reaguojančių funkcinių grupių balansas ir atsiranda galimybė susidaryti didelės molekulinės masės produktui. O nepusiausvirošios polikondensacijos atveju toks balansas net ir apskritai nėra būtinas [191]. Nors A polimerai irgi susidarė nepusiausviroju būdu, tačiau šiuo atveju MPEGI buvo dedamas į reakcijos mišinį pačioje reakcijos pradžioje, o tai padidino

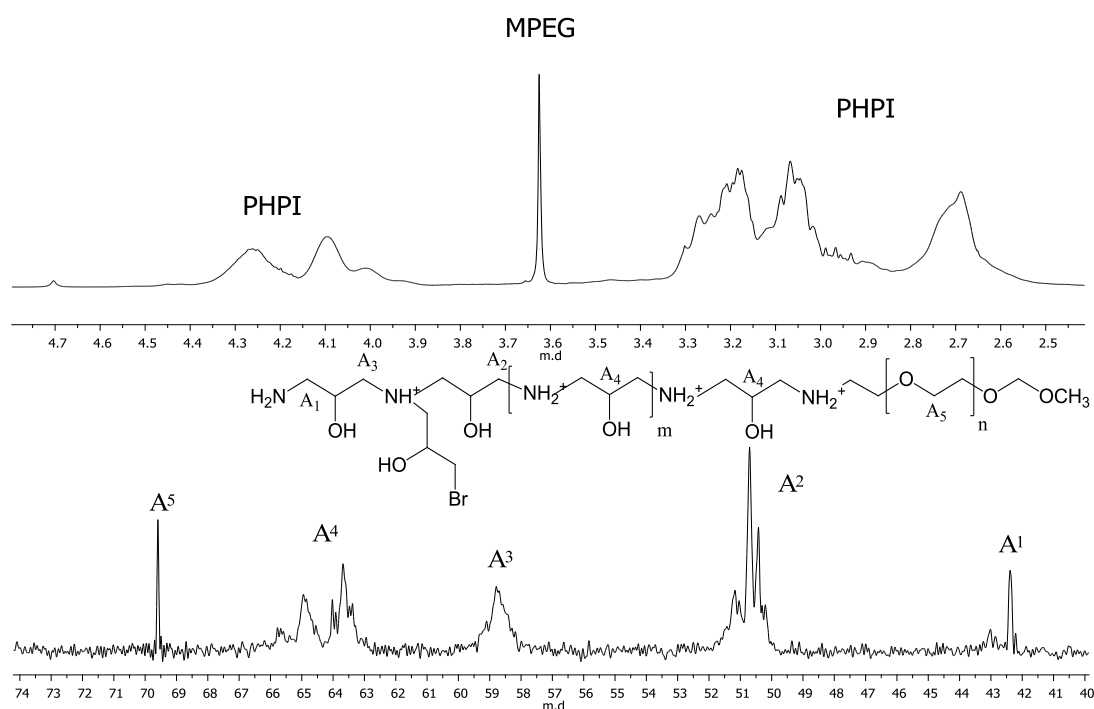
besusidarantių reakcijos produktų tirpumą (arba suderinamumą su tirpikliu) ir tuo pačiu laisvesnę reaguojančių dalelių migraciją. Todėl A atveju susidarė polimerai, kurių polimerizacijos laipsnį didžiaja dalimi nulėmė reaguojančių monomerų funkcionalumas ir tarpusavio stochiometrija, o B atveju – sąlygos, kurios susidarė dėl heterogeninio pirmosios stadijos pobūdžio .

Grįžtant prie polimerų B, dar galima pastebėti, kad jie MPEG grandimis buvo modifikuoti ne tik esant mažai aminogrupių koncentracijai reakcijos mišinyje (žr. aukščiau), bet ir labiau heterogeninėmis sąlygomis nei A. Dėl to galima manyti, jog MPEGI prie B polimerų jungėsi tarpfaziniame tirpalas-kieta polimero dalelė paviršiuje, ir tai gali būti papildomas veiksnys, taip pat lėmęs mažą MPEG grandinių skaičių B polimeruose.

PHPI-MPEG sandara buvo įvertinta iš  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR spektrų (3.21 pav.). Visuose tirtuose šių polimerų  $^1\text{H}$  BMR spektruose, be PHPI būdingų signalų (3.1.2 skyrelis), stebimi MPEG grandinėms būdingi signalai: metilengrupių, esančių oksietileno grandyse (3,63 m.d), ir metilgrupių, esančių metoksigrupėse (3,30 m.d), protonų signalai.  $^{13}\text{C}$  BMR spektruose MPEG grandinių buvimą rodo signalas ties 69,5 m.d ( $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$ ) (3.22 pav.). Visi kiti spektruose stebimi signalai priklauso PHPI fragmentų anglims (žr. 3.1.2 skyrių).

Iš  $^{13}\text{C}$  BMR spektro pagal 2.4.5 metodiką buvo apskaičiuotas PHPI-MPEG šakotumo laipsnis. Kaip matyti 3.10 lentelėje pateiktų duomenų, A ir B polimerų šakotumas mažesnis už PHPI, sintetinto DMAC, šakotumą (žr. 3.2.1 skyrių). Tai gali būti susiję su reakcijos mišinio vidutinio funkcionalumo skirtumais (sintetinant PHPI jis buvo lygus 2, o MPEG-PHPI – 1,95), ir su makromonomero (MPEGI) dalyvavimu reakcijoje.

MSC analizė patvirtino, jog šie polimerai šakoti, nes Mark-Houwink lygties rodiklio  $\alpha$  vertės svyravo nuo 0,29 iki 0,38. Šakotiems polimerams tai būdingos vertės [253].



3.21 pav. 5 polimero (3.10 lentelė)  $^1\text{H}$  BMR (viršuje) ir  $^{13}\text{C}$  BMR (apačioje) spektrai  $\text{D}_2\text{O}$ .

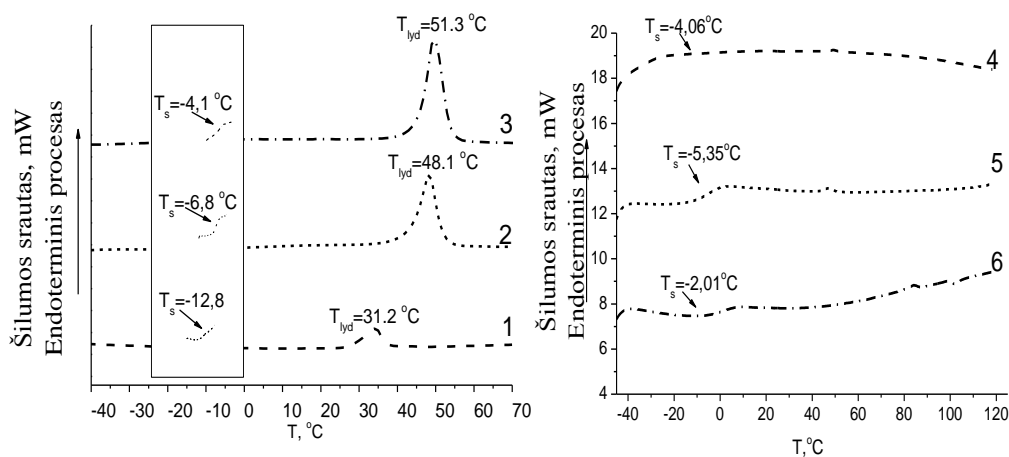
Polimerų cheminė sudėtis iš dalies buvo patvirtinta FT-IR ir XPS spektroskopijos metodais. PHPI-MPEG FT-IR spektruose yra būdingos sugerties juostos tiek PHPI (žr. 3.2.1), tiek ir MPEG grandims. Joms būdingos 1100, 1470 ir  $962\text{ cm}^{-1}$  sugerties juostos, priskiriamos virpesiams, vykstantiems eterinėse grupėse oksietileno grandyse, metoksigrupėse ir metilengrupėse. Nustatyta, jog PHPI-MPEG neturi MPEG jodidui būdingos - $\text{CH}_2\text{-I}$  grupės sugerties juostos ties  $800\text{ cm}^{-1}$ . Iš to galima daryti išvadą, jog neprisijungęs MPEGI buvo sėkmingai pašalintas polimerų gryninimo metu (ekstrahuojant ir ultrafiltruojant). O XPS spektroskopijos tyrimai atskleidė, kad ultrafiltruotuose polimeruose nedidelė jų makromolekulių dalis užsibaigia DBP grandimi (spektruose stebimas Br 3p signalas ties 180 eV, būdingas kovalentiškai prijungtam bromui).

### 3.2.2.2 Metoksi-poli(etilenglikolio) grandinėmis modifikuoto poli(2-hidroksipropilenimino) savybių tyrimas

Siekiant nustatyti ar MPEG grandys prijungiamos prie PHPI, taip pat buvo atlikti ir diferencinės skenuojančios kalorimetrijos (DSK) tyrimai. PHPI termogramoje nebuvo pastebėta jokių lydymuisi-kristalizacijai būdingų smailių, tačiau PHPI-MPEG polimerams jos buvo stebimos (3.22 pav.). Lyginant PHPI-MPEG lydymosi temperatūras su atitinkamų MPEG temperatūromis (MPEG1000 ji yra apie 20 °C; MPEG2000 – apie 12 °C; MPEG5000 – apie 9 °C), PHPI-MPEG jos mažesnės. Tai rodo, jog PHPI-MPEG polimeruose MPEG grandys gali būti plastifikuotos arba PHPI grandimis, arba nedideliu vandens kiekiu, kurį paprastai sugeria labai hidrofiliinės PHPI grandys. Šis teiginys labiausiai tikėtinas.

DSK analizė parodė, kad polimerų lydymosi temperatūros priklauso ne tik nuo prijungto MPEG molekulinės masės, bet ir nuo jo grandinių skaičiaus polimere. Iš 3.22 pav. pateiktų duomenų akivaizdu, kad, didėjant OE grandžių kiekiui polimere, didėja ir jo lydymosi temperatūra.

PHPI-MPEG stiklėjimo temperatūros taip pat priklauso OE grandžių kiekiui ir, jam didėjant, mažėja (3.22 pav.). Be to, jos visumoje buvo daug mažesnės už DMAC susintetinto PHPI stiklėjimo temperatūrą (PHPI atveju ji siekė 32 °C). Todėl manoma, MPEG grandinės PHPI-MPEG polimeruose gali plastifikuoti PHPI grandines. PHPI-MPEG, kuriuose oksietileno grandžių kiekis siekia 59-72 mol%, stiklėjimo temperatūros kito nuo -12,8 °C iki -4,1 °C (1-3 kreivės). Kai oksietileno grandžių yra ne daugiau kaip 10 %, stiklėjimo temperatūros svyruoja nuo -2,01 °C iki -4,06 °C (4-6 kreivės). Todėl akivaizdu, kad stiklėjimo temperatūros sumažėjimą lemia oksietileno grandžių ir hidroksigrupių (PHPI grandinėse) netvarkingas išsidėstymas makromolekulės grandinėse bei šakota struktūra.

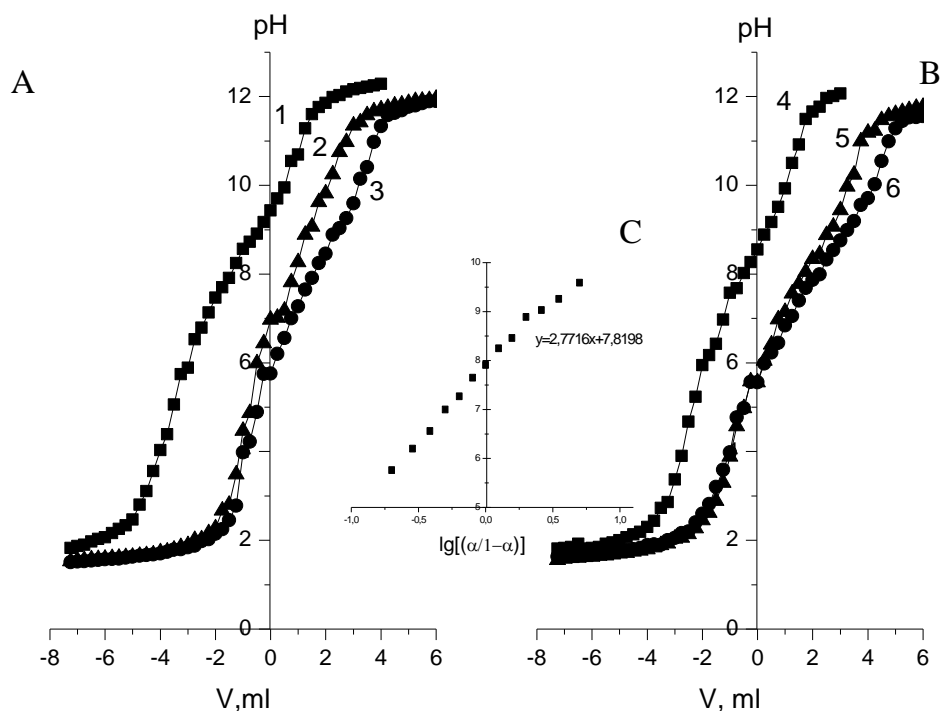


3.22 pav. PHPI-MPEG DSK termogramos. Kreives žymintys skaičiai atitinka polimerų žymėjimą 3.10 lentelėje.

Norint įsitikinti, ar MPEG atšakos turi įtakos PHPI grandinių aminogrupių jonizacijai, buvo atliktas PHPI-MPEG polimerų potenciometrinis titravimas.

Kaip matyti iš 3.11 lentelėje pateiktų duomenų, gana nemažas  $n$  (2,8-3,1) rodo, jog polimerų aminogrupių jonizacija labai priklauso nuo kaimyninių aminogrupių jonizavimo būsenos. Tai polielektrolitams tipinis elgesys. Visi polimerai turi labai artimas  $pK_a$  vertes. Galima pastebėti, kad A būdu gauti polimerai šiek tiek baziškesni, matomai, dėl mažesnės šių polimerų molekulinės masės. Be to, galima konstatuoti, jog PHPI-MPEG polimerų  $pK_a$  vertės labai artimos PHPI  $pK_a$  vertei (7,8), o tai įrodo, jog MPEG grandys neturi didesnės įtakos PHPI-MPEG aminogrupių baziškumui. Tą iš esmės rodo ir 3.23 paveiksle pateiktos potenciometrinio titravimo kreivės, kurios itin panašios į PHPI potenciometrinio titravimo kreives (žr. 3.15 pav.).

Katijoniniams genų transfektoriams labai svarbūs parametrai yra jų buferinė talpa bei tai, kokia dalis katijoninių grupių yra neprotonizuota citoplazmoje pH (pH 7.3). Tik esant didelei buferinei talpai, ir, jei citoplazmos pH patenka į buferinės talpos intervalą, galima tikėtis, jog ląstelėje vyks „protonų kempinės“ reiškinys ir polipleksas bus atpalaiduojamas iš endosomų.

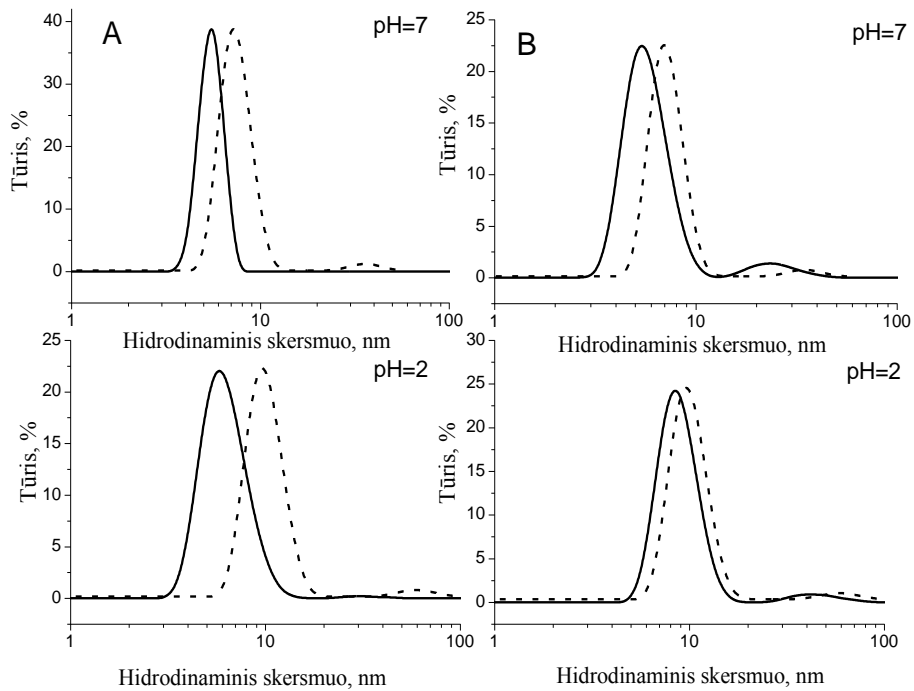


3.23 pav. MPEG grandinėmis modifikuotų PHPI darinių potenciometrinio titravimo kreivės (A ir B) ir 2-o polimero (3.11 lentelė) titravimo duomenys Hendersono ir Haselbalcho lygties koordinatėse (C). Kreivės žymintys skaičiai atitinka polimerų žymėjimą 3.10 lentelėje.

3.11 lentelė. MPEG grandinėmis modifikuotų PHPI darinių jonizacijos rodikliai

Sintezė	Polimeras	pK <sub>a</sub>	n	β	Buferinė talpa
A	1	7,8	3,1	41,2	6,8-8,8
	2	7,8	2,8	39,4	6,8-8,8
	3	7,6	2,8	43,4	6,6-8,6
B	4	7,5	3,0	45,6	6,5-8,5
	5	7,4	2,9	48,3	6,4-8,4
	6	7,5	2,8	45,6	6,5-8,5
PHPI		7,8	2,6	56,4	6,8-8,8

Buferinė talpa ir jonizacijos laipsnis esant pH 7,3 ( $\beta$ ) buvo apskaičiuojami iš PHPI-MPEG  $pK_a$ . Kaip matome iš 3.11 lentelės, polimerų buferinės talpos svyruoja tarp 6,4 ir 8,8, o protonizacijos laipsnis citoplazmoje galėtų siekti tik apie 39-48 %. Šie rodikliai rodo, jog PHPI-MPEG gali būti tinkami genų transfekcijai.



3.24 pav. PHPI (punktyrinės linijos) ir PHPI-MPEG (ištisinės linijos) dalelių dydžio pasiskirstymas esant skirtingam pH: A – polimeras 2, B – polimeras 5 (3.10 lentelė).

Dinaminės šviesos sklaidos tyrimo metodas (DLS) naudingas įvertinant polimerų dalelių dydį tirpaluose. Tai labai svarbus parametras katijoniniams polimerams, naudojamiems genų pernašai. Ištyrus PHPI-MPEG nustatyta, kad neutralioje ir rūgštinėje terpėse jie sudaro šiek tiek mažesnio dydžio daleles (žr. 3.24 pav.), nei PHPI. Toks PHPI-MPEG darinių elgesys sietinas su

vandeniniuose tirpaluose vykstančia intensyvia MPEG grandžių tarpusavio sąveika.

Ganėtinau stebina ir tai, jog rūgštinėje terpėje PHPI-MPEG gniužulai nors ir išsivynioja, bet ne tiek daug, kaip PHPI. Šis reiškinys irgi galėtų būti siejamas su MPEG grandinių sąveika, dalinai kompensuojančia jonizuotų aminogrupių tarpusavio atostūmio jėgas.

Taigi, dalis DLS duomenų rodo, jog transfekcijoje PHPI-MPEG galėtų būti šiek tiek pranašesni už PHPI, nes mažesnės jų dalelės turėtų sudaryti ir šiek tiek mažesnius kompleksus su siRNR/DNR. Kiti rodo priešingai – jei rūgštinėje lizosomų aplinkoje komplekso dalelių dydis nepadidės, jis bus sunkiau atpalaiduojamas iš endosomų („protonų kempinė“ veiks ne taip efektyviai, kaip PHPI atveju).

Apibendrinant PHPI-MPEG sintezių ir tyrimo rezultatus galima pastebėti tokius svarbiausius momentus: 1) MPEG grandinių turinčius PHPI lengvai ir paprastai galima susintetinti dalį DBP pakeičiant MPEG jodidais; 2) parenkant MPEGI dozavimo ir reakcijos mišinį laiką, galima reguliuoti MPEG grandinių skaičių PHPI-MPEG jų molekulinę masę bei polimero išeią; 3) įvedus MPEGI reakcijos pradžioje, polimerų molekulinės masės nedidelės (8-53 kDa), o prie vienos PHPI makromolekulės prisijungia nuo 1 iki 1,25 MPEG grandinių. MPEGI prijungiant reakcijos pabaigoje, susidaro didelės molekulinės masės produktai (140-160 kDa), ir tik kas 5-11 PHPI makromolekulė turi prijungtą MPEG grandinę. Tokių polimerų išeigos mažesnės, nei tuomet, kai MPEGI dedamas reakcijos pradžioje; 4) PHPI-MPEG mažiau šakoti nei PHPI, ir jų šakotumas mažai priklauso nuo MPEGI įdėjimo į reakcijos mišinį; 5) PHPI-MPEG disociacijos konstantų bei buferinės talpos rodikliai rodo, jog šie polimerai gali būti tinkami genų transfekcijai; 6) MPEG grandinės efektyviai stabilizuoja PHPI-MPEG gniužulų dydį įvairių pH verčių tirpaluose.



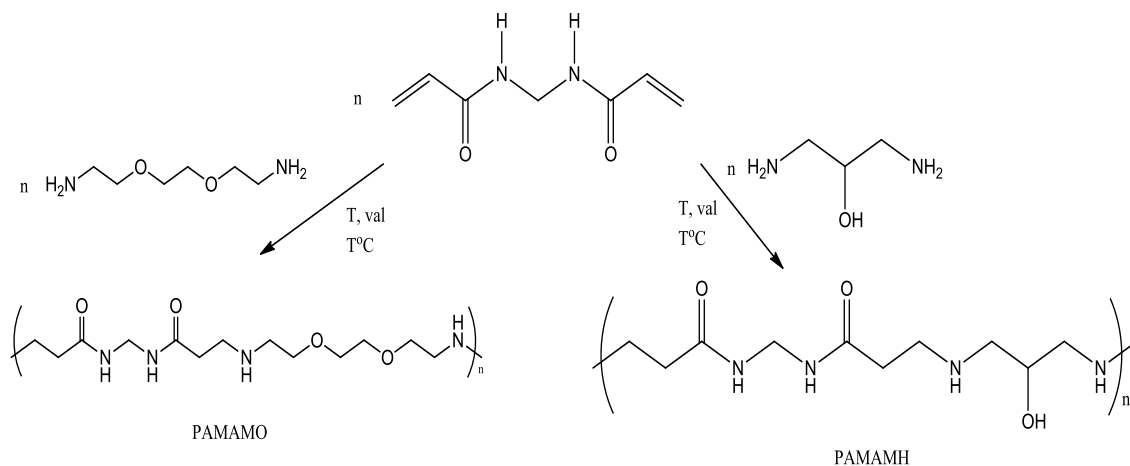
### 3.3 Poliamidoaminų sintezė ir savybių tyrimas

Kaip 1.5 skyriuje jau buvo minėta, pirmąjį kartą poliamidoaminų (PAMAM) sintezė aprašyta 1970 metais [226] ir iki šiol yra susintetinta labai įvairių PAMAM, tame tarpe tinkančių ir genų pernašai. Tačiau, renkant medžiagą literatūros apžvalgai, nebuvo aptikta, kad PAMAM sintezei būtų panaudojami tokie monomerai, kaip DAP bei 2,2'-(etilendioksi)dietilaminas (EDODA). Šie monomerai PAMAM sintezei yra įdomūs dėl savo hidrofiliškumo: DAP turi hidroksigrupę, o EDODA – eterinį deguonį. Tokiu būdu, naudodami DAP ar EDODA monomerus, buvo tikimasi susintetinti PAMAM tipo genų transfekcijos vektorius, kurie pasižymėtų ne tik bioskalumu, bet ir būtų geriau biosuderinami dėl savo hidrofiliškumo.

Oksi- (PAMAMO) ir hidroksi- (PAMAMH) grupių turintys poliamidoaminai buvo susintetinti poliadicijos būdu iš *N,N'*-metilenbisakrilamido (MBA) ir DAP ar EDODA, naudojant ekvimolinius monomerų santykius (3.6 schema). Remiantis literatūra, sintezėms buvo pasirinkta nedidelė reakcijos temperatūra (25 °C) bei ilga reakcijos trukmė (7 paros). Kitos sintezių sąlygos buvo tikslinamos: parenkami tinkamiausi tirpikliai ir monomerų koncentracija. Buvo išbandyti poliniai aprotoniniai bei protoniniai tirpikliai DMF, DMAC, H<sub>2</sub>O, MeOH, o taip pat ir MeOH mišiniai su vandeniu tūriniu santykiu 50/50 bei 90/10. Bendra monomerų koncentracija keista nuo 10 iki 30 %.

Atlikus bandomąsias PAMAM sintezes buvo nustatyta, kad, esant bendrai monomerų koncentracijai 10 %, DMAC ir DMF susidaro heterogeniniai reakcijos mišiniai, todėl tolimesniems tyrimams šių tirpiklių buvo atsisakyta.

Vykdamas reakcijas MeOH, H<sub>2</sub>O bei MeOH mišiniuose su vandeniu vyko reakcijos mišiniai buvo homogeniniai, nes šie poliniai protoniniai tirpikliai geriau tirpino monomerus ir polimerus, ir tuo buvo pranašesni už neprotoninius tirpiklius.



3.6 schema. *N,N'*-metilenbisakrilamido poliadicija su 2,2'-(etilendioksi)dietilaminu bei 1,3-diamino-2-propanoliu.

Naudojant 10 % monomerų koncentraciją paaiškėjo, kad gaunamų PAMAMH ir PAMAMO molekulinės masės nedidelės (4,5-7,8 kDa). Padidinus monomerų koncentracijas iki 25-30 %, reakcijos eigoje polimerai krito į nuosėdas, o dalis jų net susigelino. Taip susintetinti netinkliniai PAMAM buvo ultrafiltruoti ir paaiškėjo, kad jų išėigos siekė iki 20 %, o masinės molekulinės masės – 12,5-18,2 kDa. Taip pat, buvo nustatyta, jog vandenyje sintetinti poliamidoaminai buvo labai polidispersiniai (6,7-8,9). Atsižvelgiant į tai, kad susidarė heterogeniniai, daliniai tinkliniai ir labai polidispersiniai polimerai, buvo atsisakyta naudoti 25-30 % siekiančias monomerų koncentracijas. Sumažinus pradinių monomerų koncentraciją iki 20 % ir ultrafiltravus gautus polimerus nustatyta, kad jų išėigos siekia 2,5-21 %, masinės molekulinės masės nuo 8 iki 76 kDa, o polidispersiškumas 1,22-5,42.

Taigi, atlikus bandomąsias sintezes, buvo nustatytos optimalios PAMAMH ir PAMAMO sintezių sąlygos: vandens, metanolio ar metanolio ir vandens mišinių terpės, 25 °C temperatūra ir 20 % bendra monomerų koncentracija. Šios sintezių sąlygos naudotos visiems žemiau aprašytiems

PAMAM gauti. Visiems žemiau pateiktiems tyrimams naudoti ultrafiltruoti PAMAM bandiniai.

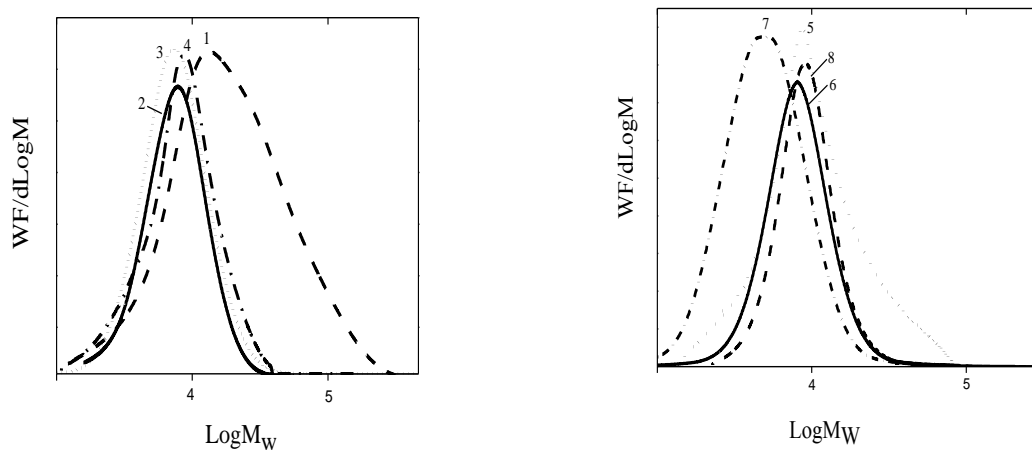
3.12 lentelė. Poliamidoaminų PAMAMH ir PAMAO išeiga ir molekuliniai rodikliai

PAMAMH				
Polimeras	Tirpiklis	$\eta$ , %	$M_w$ , kDa	$M_w/M_n$
1	H <sub>2</sub> O	12,4	76,3	4,19
2	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	21,3	23,9	1,28
3	MeOH/H <sub>2</sub> O (90/10)	11,8	25,3	1,52
4	MeOH	19,9	31,8	1,86
PAMAMO				
Polimeras	Tirpiklis	$\eta$ , %	$M_w$ , kDa	$M_w/M_n$
5	H <sub>2</sub> O	4,6	17,4	2,54
6	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	5,8	10,7	1,22
7	MeOH/H <sub>2</sub> O (90/10)	2,5	8,2	2,49
8	MeOH	3,5	12,2	1,21

PAMAMO išeiga visais atvejais buvo mažesnė nei PAMAMH. Manoma, jog tokius skirtumus lemia DAP ir EDODA monomerų baziškumo skirtumai. Teoriniai skaičiavimai, naudojant ACDLabs programą rodo, jog pirmo ir antro jonizacijos laipsnio  $pK_a$  reikšmės EDODA monomerui galėtų būti apie 0,4-0,5 vienetus mažesnė už DAP  $pK_a$  [252]. Todėl ir nukleofilinės EDODA savybės galėtų būti silpnesnės už DAP.

Analizuojant 3.12 lentelės duomenis, sunku išvelgti kokią nors aišką koreliaciją tarp diamino monomero cheminės sudėties ir PAMAM molekulinį masių, tačiau matoma labai aiški koreliacija tarp terpės cheminės sudėties ir gaunamų PAMAM molekulinį masių: ir PAMAMH ir PAMAMO atvejais didžiausia molekulinė masė gauta sintetinant vandenyje ir metanolyje, o

vandens-metanolio mišiniuose ji mažesnė (3.25 pav.). Tokį dėsningumą, matyt, lemia du skirtingi ir tarpusavyje konkuruojantys reiškiniai. Vanduo, geriau solvuoja monomerus, polimerus, bei tarpinį Michaelio reakcijos būvį – tarpinį enoliato anijoną (žr. 1.15 schemą literatūrinėje dalyje) ir taip skatina reakciją, tačiau, dalinai protonizuodamas aminus, ją stabdo. Metanolis šiuo atveju veikia priešingai. Todėl grynuose tirpikliuose susidaro didesnės molekulinės masės produktai, o jų mišiniuose, dėl pasireiškiančio dvigubo stabdymo mechanizmo – mažesnės. Visų susintetintų PAMAM polidispersiškumo rodikliai pakankamai gerai koreliuoja su polimerų molekulių masių vertėmis.



3.25 pav. PAMAM MMP kreivės (kreives žymintys skaičiai atitinka polimerų žymėjimą 3.12 lentelėje).

Spektroskopiniai tyrimai, ypač BMR ir FT-IR, yra vieni svarbiausių tyrimo metodų polimerams atpažinti bei jų sandarai nustatyti, todėl 3.26 ir 3.27 paveiksluose pateikiami susintetintų PAMAM  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR spektrai.

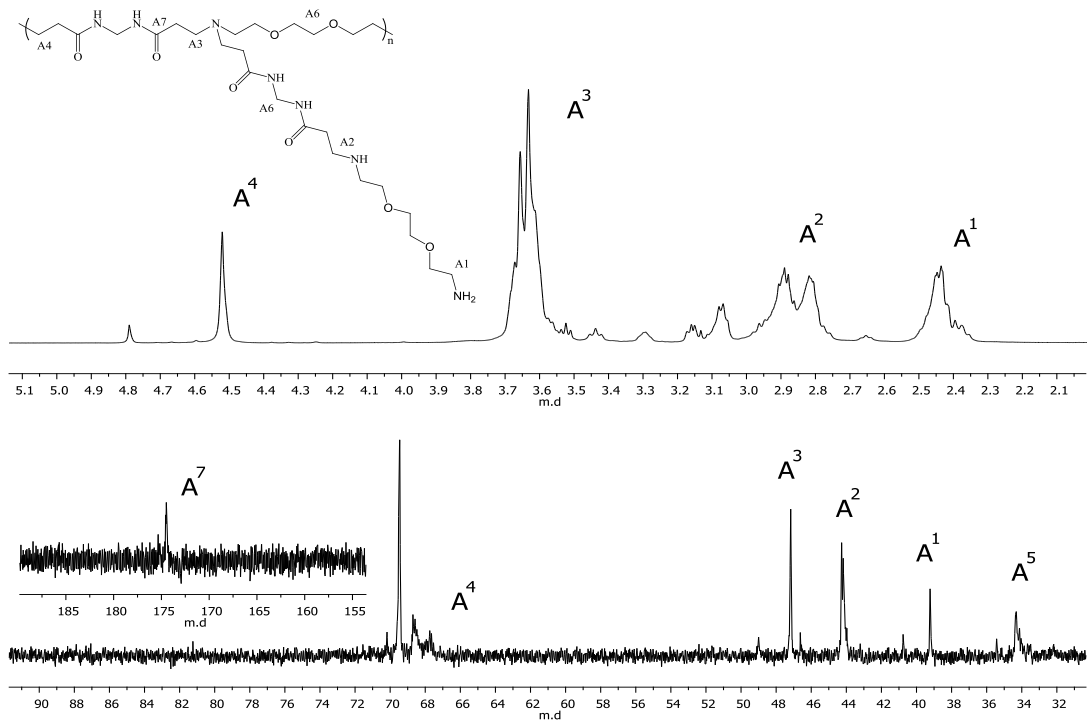
Oksi- ir hidroksigrupes turinčių PAMAM  $^1\text{H}$  BMR spektruose dauguma signalų išsidėstę panašiose poslinkių zonose: ~4,43 bei 4,46 m.d signalai priskirti  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-$  protonams; 3,75 m.d –  $>\text{CH}-\text{OH}$ ; 3,56 m.d signalai

rodo protonus, esančius šalia oksigrupės (-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-). Apie esančias amido grupes (-CH<sub>2</sub>CONH-) galima spręsti iš 2,72-2,80 m.d signalo. Platus ir stipriai suskilęs signalas ties 2,58 m.d gali būti priskirtas metilengrupių protonams, esantiems šalia įvairiai protonizuotų aminogrupių (-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>- ir -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub><sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-).

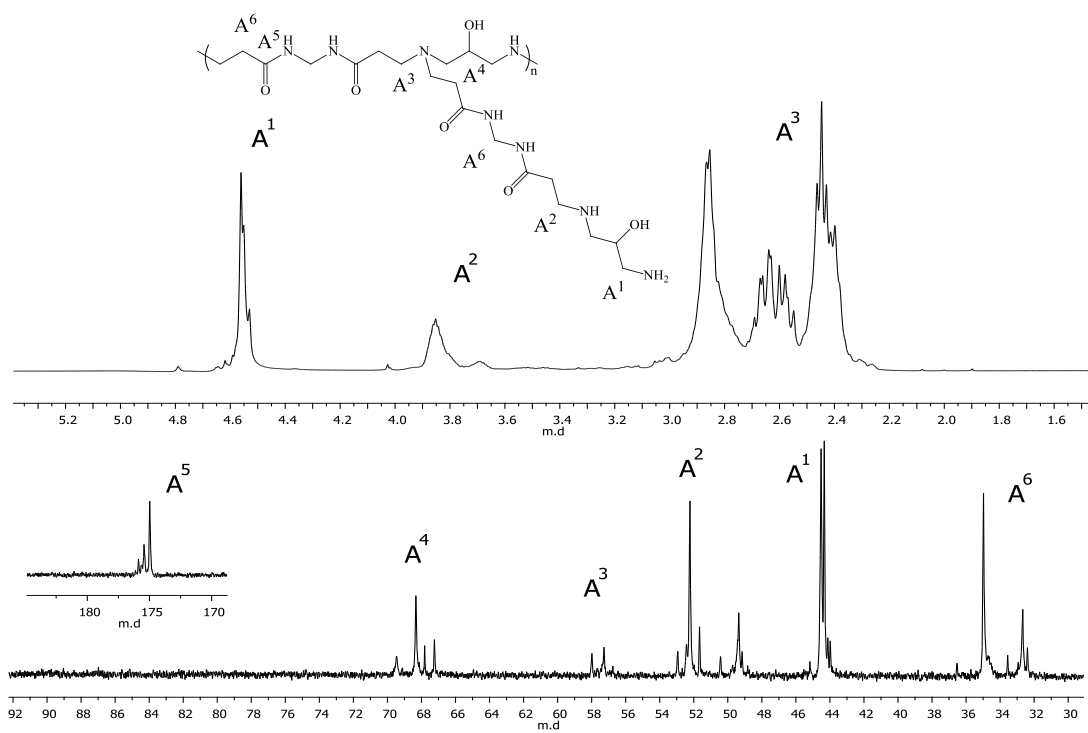
<sup>13</sup>C BMR spektruose signalai, esantys ties 173-174 m.d, rodo anglį amidiniame ryšyje (-CH<sub>2</sub>CONH-). 67,8 m.d signalas priskirtas >CH-OH angliai, o 69,5-68,6 m.d – -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- anglims. Abiejų tipų PAMAM anglies spektruose matomi signalai, būdingi anglies, esančios šalia pirminių, antrinių ir tretinių aminogrupių, atomams: 44,2-44,3 m.d – -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>-; 47,2-49,3 m.d – -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-CH<sub>2</sub>-; ~51 ir 66-52,1 m.d – >NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>-; 39,2 bei 38,2 m.d signalai rodo anglį, sujungtą su protonizuotais ir neprotonizuotais azoto atomais.

Remiantis <sup>13</sup>C BMR spektrais buvo apskaičiuotas šakotumo laipsnis. PAMAMH pirminių, antrinių ir tretinių aminogrupių vidutiniškai yra 62, 24 ir 14° mol%. Todėl šių polimerų šakotumo laipsnis (N<sub>2</sub>/N<sub>3</sub>) ~1,7 (t. y., beveik kas antra iminogrupė turi atšaką). PAMAMO šie rodikliai atitinkamai siekia 60, 32 ir 8° mol%, N<sub>2</sub>/N<sub>3</sub> ~4 (t. y., beveik kas ketvirta iminogrupė turi atšaką). Mažesnę PAMAMO šakotumą galėjo nulemti mažesnis EDODA grandyse esančių iminogrupių baziškumas (nukleofiliškumas). Dėl to jos ne taip aktyviai jungėsi prie nesotaus karboniljunginio (MBA).

Užrašius PAMAM FT-IR spektrus, pastebėta, jog serijos ribose visų polimerų spektrai labai panašūs, tačiau jie šiek tiek skiriasi, priklausomai nuo to, ar polimerai turioksi-, ar hidroksigrupes. Abiejų tipų polimerų spektruose sugerties juostos su smailėmis ties 3272 cm<sup>-1</sup> būdingos pirminių bei antrinių aminogrupių virpesiams. PAMAMH -OH virpesiams būdinga sugerties juosta ties 3284 cm<sup>-1</sup>. Alkilgrupių buvimą rodo simetriniai ir asimetriniai virpesiai ties 2822-2846 cm<sup>-1</sup>. Amidogrupei būdingi virpesiai stebimi ties 1635 bei 1644 cm<sup>-1</sup>. Antrinėse aminogrupėse vykstantys deformaciniai N-H virpesiai stebimi ties 1531 ir 1528°cm<sup>-1</sup>. 1455-1364 cm<sup>-1</sup> sugerties juosta būdinga alifatinės -CH-grupės δ virpesiams.



3.26. PAMAMO  $^1\text{H}$  BMR (viršuje) ir  $^{13}\text{C}$  BMR (apačioje) spektrai.

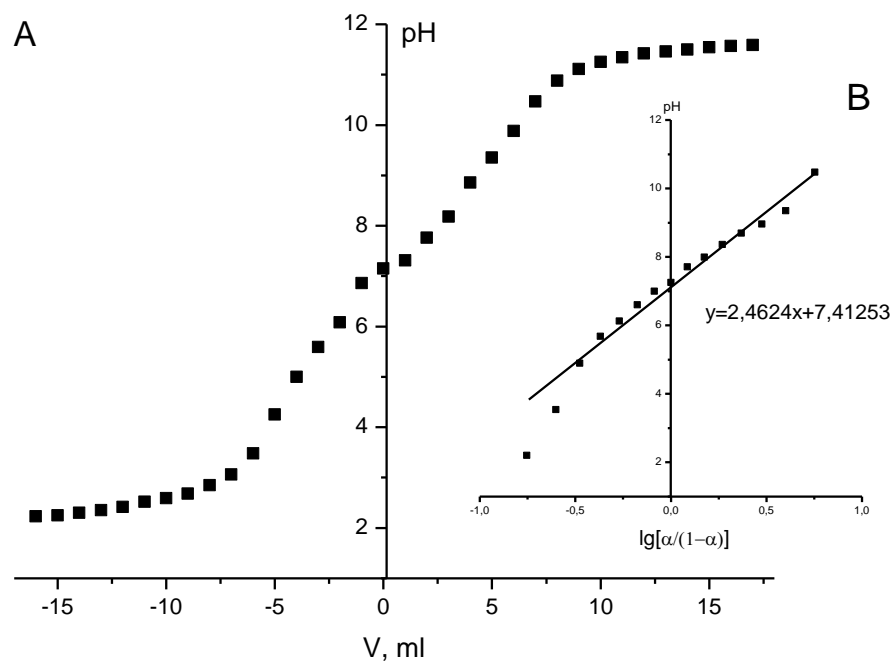


3.27. PAMAMH  $^1\text{H}$  BMR (viršuje) ir  $^{13}\text{C}$  BMR (apačioje) spektrai  $\text{D}_2\text{O}$ .

Sugerties juostos ties 1245-1190  $\text{cm}^{-1}$  bei 1193  $\text{cm}^{-1}$  rodo simetrinius bei asimetrinius  $\nu$  karbonil- bei hidroksigrupių virpesius. Sugerties juostos ties 1114 ir 1108  $\text{cm}^{-1}$  rodo  $\delta$  (CH-OH) virpesius. C-N virpesių sugertiems juosta ties 1050 ir 1105  $\text{cm}^{-1}$  įrodo, kad junginyje yra -NH/-NH<sub>2</sub> grupių. Tačiau 1108  $\text{cm}^{-1}$  srityje esančios juostos yra būdingos ir eterinio fragmento C-O-C deformaciniams virpesiams. 922 bei 910  $\text{cm}^{-1}$  virpesiai būdingi  $\delta$  (C-C). Amidinį ryšį įrodo sugerties juosta ties 1635  $\text{cm}^{-1}$ .

PAMAM DSK tyrimų rezultatai atskleidė, jog šie polimerai turi terminius perėjimus būdingus stiklėjimui. Todėl, remiantis termogramomis, buvo apskaičiuotos PAMAM stiklėjimo temperatūros. Jos hidroksigrupių turinčių polimerų yra tokios (čia polimerų numeriai atitinka 3.12 lentelėje esančius numerius): 1 – 5,22; 2 – 16,37; 3 – 10,73 ir 4 – 8,48 °C. Oksigrupių turinčių PAMAM jos žymiai mažesnės ir neigiamos: 5 – -28,48; 6 – -42,63; 7 – -25,99; 8 – -12,82; 9 – -29,27 ir 10 – -31,62 °C. Manoma, jog tokie stiklėjimo temperatūrų skirtumai tarp polimerų serijų atsiranda todėl, jog PAMAMH vandenilinius ryšius gali sudaryti ne tik iminogrupės, bet ir hidroksigrupės. O PAMAMO polimere yra eterinių ryšių, polimero grandinei suteikiančių lankstumo. Stiklėjimo temperatūrų skirtumai kiekvienos iš serijų ribose galėjo atsirasti tiek dėl molekulinės masės, tiek ir dėl makromolekulių šakotumo skirtumų [254].

Visi poliamidoaminai, pagrindinėje grupėje, turintys antrinių (ir tretinių) aminograpių, gali būti priskirti polielektrolitams. PAMAM potenciometrinio titravimo kreivėse (3.28 pav.) stebimi du ekvivalentiniai šuoliai ties pH 4 ir 10. Akivaizdu, kad, kai pH mažesnė už 4, visos PAMAM aminogrupės yra visiškai protonizuotos, o, kai didesnė už 10, yra deprotonizuotos. Kadangi visos potenciometrinio titravimo kreivės panašios, kaip pavyzdys pateiktas PAMAMH, sintetinto MeOH, potenciometrinio titravimo kreivė (3.28 pav.).



3.28 pav. MeOH susintetinto PAMAMH, potenciometrinio titravimo kreivė (A) ir titravimo duomenys Henderson ir Hasselbalch lygties koordinatėse (B).

Iš potenciometrinio titravimo duomenų buvo apskaičiuotos  $pK_a$  vertės, o taip pat PAMAM buferinė talpa bei polimerų protonizacijos laipsnis, kuris būtų ląstelių citoplazmoje (pH 7,3). Šie duomenys, pateikti 3.13 lentelėje, rodo, jog susintetinti PAMAM nėra labai stiprios bazės, ir kad jų baziškumas mažai priklauso nuo polimerizacijos sąlygų bei aminogrupės turinčio monomero tipo. Visgi, stebima tendencija, kad hidroksigrupių turintys PAMAM yra šiek tiek baziškesni už turinčius oksigrupes. Šis pastebėjimas logiškas, nes, kaip jau minėta, DAP turėtų būti baziškesnis monomeras už EDODA, tad ir iš jo aminograpių susidariusios iminogrupės taip pat galėtų būti baziškesnės. PAMAM buferinė talpa yra nuo ~6,41 iki ~8,81, tad į šią zoną patenka įvairių viduląstelinų skysčių pH vertės.



3.13 lentelė. PAMAMO ir PAMAMH jonizacijos rodikliai

PAMAMH			
Tirpiklis	Buferinė talpa	pK <sub>a</sub>	β, %
H <sub>2</sub> O	6,57-8,57	7,57	65,06
MeOH	6,62-8,62	7,62	67,63
MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	6,55-8,55	7,55	64,00
MeOH/H <sub>2</sub> O (90/10)	6,61-8,61	7,61	68,05
PAMAMO			
Tirpiklis	Buferinė talpa	pK <sub>a</sub>	β, %
H <sub>2</sub> O	6,55-8,55	7,55	64,40
MeOH	6,41-8,41	7,41	56,10
MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	6,46-8,46	7,46	59,11
MeOH/H <sub>2</sub> O (90/10)	6,50-8,50	7,50	61,31

Citoplazmoje (pH 7,3) apie 30-40 % PAMAM aminogrupių turėtų būti neprotonizuotos. Remiantis šiais rodikliais galima teigti, jog PAMAMH ir PAMAMO citoplazmoje galėtų veikti kaip efektyvios „protonų kempinės“, tad ir patys polimerai galėtų būti efektyvūs transfektoriai.

Apibendrinant PAMAM sintezės iš MBA ir DAP bei EDODA rezultatus, galima teigti, jog buvo atrinktos optimaliausios reakcijų sąlygos. Genų transfekcijai tinkamiausi polimerai buvo gauti, sintezes vykdant poliniuose protoniniuose tirpikliuose (H<sub>2</sub>O, MeOH) ar jų mišiniuose ir esant 20 % bendrai monomerų koncentracijai. Nuo sintezei panaudoto diamino cheminės sudėties priklausė PAMAM išėiga, molekulinė masė ir šakotumas, tačiau beveik nepriklausė polimerų aminogrupių disociacijos konstanta. Pagal jonizacines savybes ir molekulinę masę, visi susintetinti PAMAM galėtų būti tinkami transfektoriai genų pernašai.

### **3.4 Polialkilenimino darinių ir poliamidoaminų taikymas DNR ir siRNR transfekcijai**

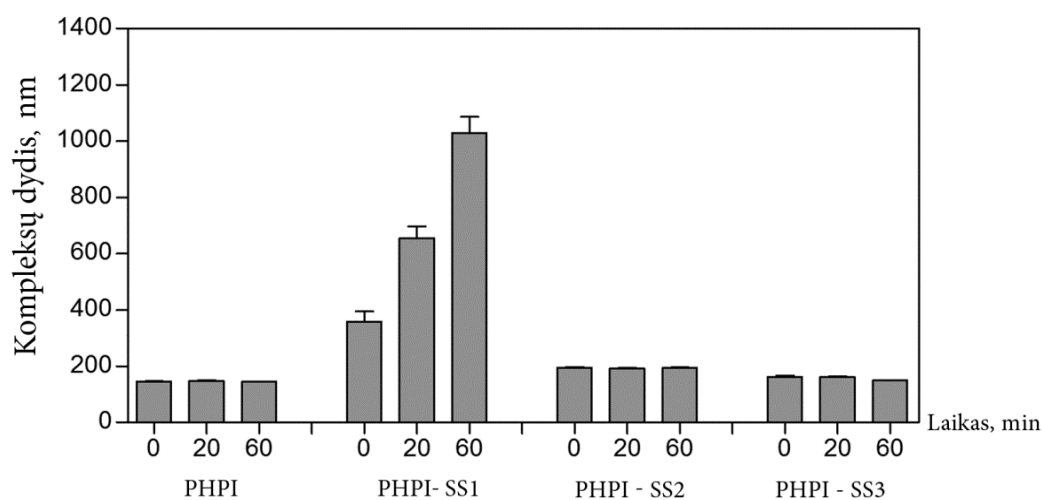
#### **3.4.1 Modifikuotų polialkileniminų taikymas DNR ir siRNR transfekcijai**

PHPI (*TurboFect*) tinkamumas genų pernašai jau buvo tirtas [73] ir *in vitro* tyrimuose nustatyta, jog jis su DNR sudaro patvarius 100-150 nm kompleksus ir geba tinkamai pernešti genus į įvairių linijų (*Cos-7*, *Hela*, *Hek293*, *B50*, *L292* ir t.t) ląstes. Daugeliu atvejų, naudojant PHPI, buvo pasiektas beveik šimtaprocentinis transfekcijos efektyvumas (GFP geno ekspresija vyko apie 90 % ląstelių), o toksiškumas siekė tik apie 10 %. Taip pat buvo atlikti *in vivo* tyrimai, kurie atskleidė, kad PHPI gyvūnų plaučiuose nesukėlė uždegiminio atsako, todėl puikiai tiko pernašai į plaučių audinius. Tačiau plaučių audiniai, dėl jų endotelio ląstelių ypatybių, beveik visuomet lengviau „priima“ polipleksus, nei kiti audiniai [73]. Į kitus organus PHPI transfekavo ne taip efektyviai bei buvo pastebėtas didesnis jo toksiškumas pakartotinės transfekcijos metu [73].

Siekiant sumažinti PHPI toksiškumą bei padidinti biosuderinamumą, šiame darbe PHPI buvo modifikuotas dviem skirtingais būdais: įvedant į PHPI pagrindinę grandinę disulfidinių ryšių, o taip pat ir MPEG grandines. Iš PHPI su disulfidiniais ryšiais buvo tikimasi, kad jis ląstelėje efektyviai suirs iki mažesnių fragmentų (oligomerų), dėl to turėtų sumažėti toksiškumas ir tuo pačiu padidėti transfekcijos efektyvumas. O, įvedus MPEG grandis, buvo tikimasi padidinti PHPI biosuderinamumą bei pritaikyti šį transfektorių siRNR pernašai. Taip pat buvo susintetinti PHPI analogai – poliamidoaminai, turintys amidinių ryšių,oksi- bei hidroksigrupių – taip buvo tikimasi gauti ir bioskalius, ir gerai biosuderinamus transfektorius. Taip pat buvo tikimasi, kad katijoniniai polimerai: PHPI-SS, PHPI-MPEG bei PAMAM su DNR/siRNR sudarys stabilius ir nedidelius kompleksus bei pasižymės tinkamu transfekcijos efektyvumu.

DLS metodu išmatavus cistamino grandžių turinčių PHPI-SS polipleksų su DNR dydį (3.29 pav.), buvo pastebėta, kad mažiausio dydžio kompleksus

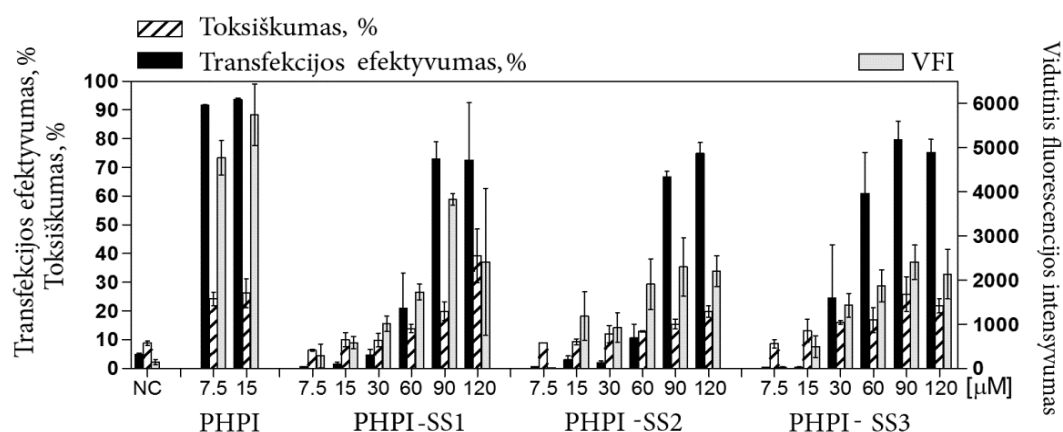
(apie 200 nm) per 60 min, sudaro PHPI-SS2 bei PHPI-SS3. PHPI-SS1 polipleksų dydis po 60 minučių išauga iki 1100-1200 nm. PHPI-SS 4 tyrimams nebuvo naudotas, nes jame cistamino grandžių yra gana mažai (žr. 3.2.1 skyrių 3.6 lentelę), tad buvo tikėtina, kad jis transfekuos panašiai kaip PHPI, bei nepasižymės geru bioskalumu. PHPI-SS1 komplekso susidarymo tendencijas galima paaiškinti tuo, kad šiuose polimeruose yra likęs nedidelis kiekis 100 kDa frakcijų (3.29 pav.), kurios trukdo tinkamo dydžio kompleksų. Didelės molekulinės masės frakcijos polimerai su DNR paprastai sudaro didelius ir nestabilius agregatus. Nestabilumas atsiranda dėl lėtos didelių makromolekulių pertvarkos komplekso susidarymo metu.



3.29 pav. PHPI-SS – DNR kompleksų dydis.

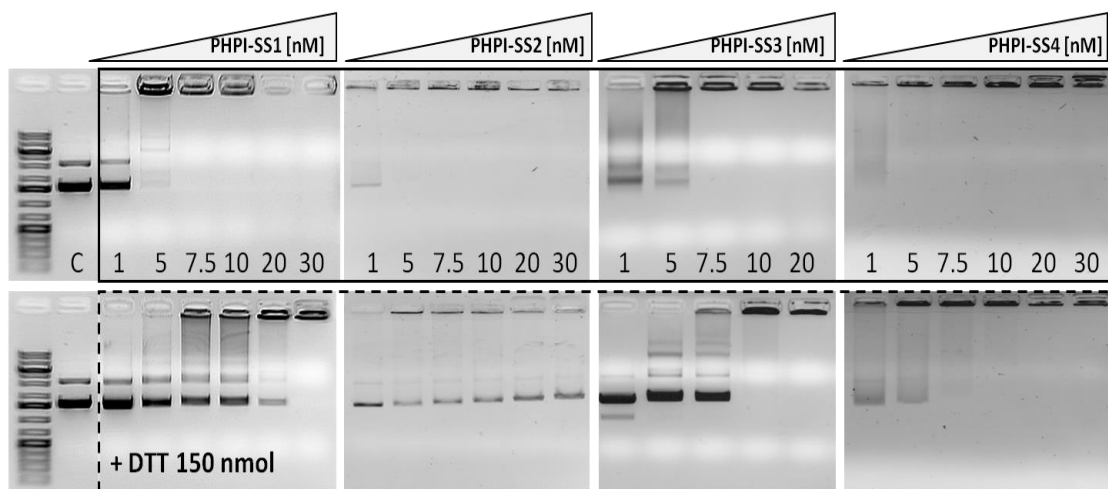
Atlikus transfekcijos, toksiškumo bei vidutinio fluorescencijos intensyvumo (VFI) tyrimus (3.30 pav.), buvo pastebėta, kad pakankamai gerai transfekavo visi PHPI-SS. PHPI-SS2 bei PHPI-SS3 polimerai pasižymėjo mažiausiu toksiškumu, ir jų toksiškumas beveik nepriklausė nuo polimerų koncentracijos. Palyginus šiuos rezultatus su nemodifikuoto PHPI rezultatais, matyti, jog PHPI-SS mažiau toksiškas net 3 kartus (jei lyginamos tos pačios polimerų koncentracijos). PHPI-SS polimerų, lyginant su nemodifikuotu PHPI, VFI pakankamai žemas. Taip pat mažesnis ir GFP baltymo raiškos

efektyvumas (t. y., ląstelės fluorescuoja mažesniu intensyvumu nei transfekavus PHPI). Šie dėsningumai susiję su tirtų polimerų katijoniškumu: PHPI, kaip labiausiai katijoninis polimeras (teoriškai jame turi būti 19,2 % azoto iminogrupių pavidalu), transfekavo itin gerai, bet yra toksiškas. O PHPI-SS1-SS3 yra mažiau katijoniški (teoriškai juose turėtų būti 13,5-16,0 % azoto iminogrupių pavidalu). Jie transfekavo blogiau, bet ląstelės išliko labiau gyvybingos.



3.30 pav. Žaliai fluorescuojančio baltymo sintezę koduojančio geno transfekcijos su PHPI-SS rezultatai.

Siekiant paaiškinti PHPI-SS polimerų transfekcijos bei toksiškumo rezultatus, buvo ištirtas biodegraduojančių polimerų gebėjimas suirti citoplazmoje ir atpalaiduoti DNR. Tuo tikslu polimerų-DNR kompleksai buvo veikiami reduktoriumi – ditioneitolu (DTT) ir atliekama elektroforezė agaroziniame gelyje (3.31 pav.). Viršutinė šio paveikslo dalis atspindi polimerų gebėjimą surišti DNR ir buvo pastebėta, kad DNR migravo įvairiai: PHPI-SS2 ir PHPI-SS4 visiškai kompleksavo DNR, o PHPI-SS1 bei PHPI-SS3 – tik esant didesnėms polimero koncentracijoms.



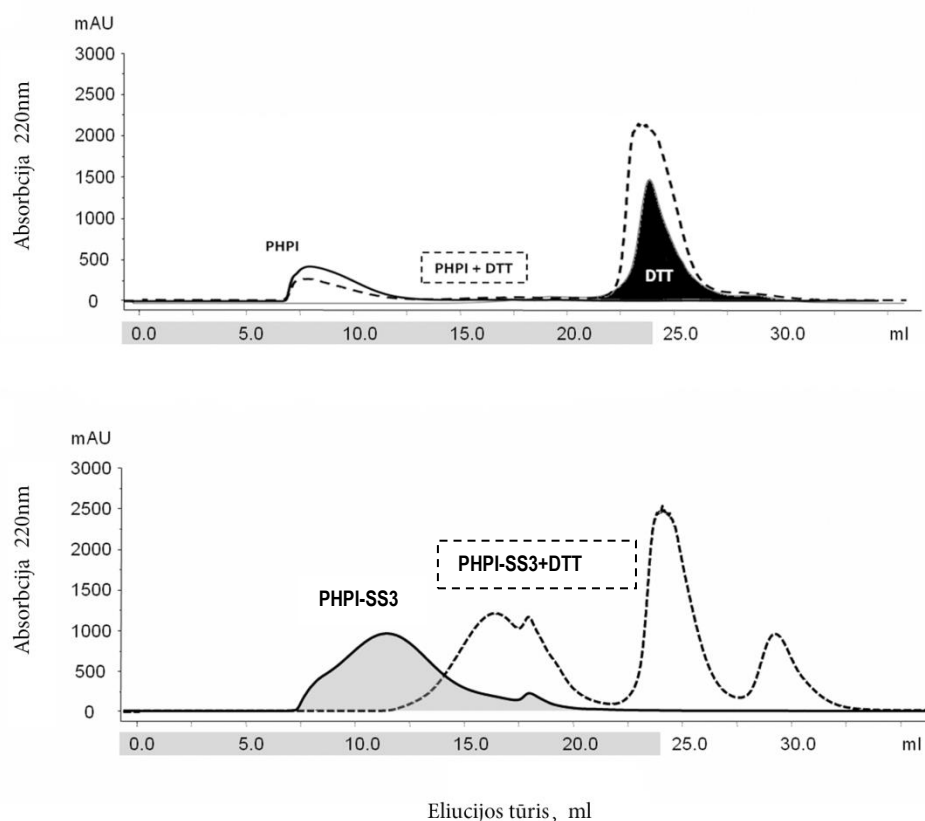
3.31 pav. DNR surišimo ir atpalaidavimo tyrimas. Viršutinė dalis – polimeras be DTT; apatinė dalis – polimeras pridėjus DTT; C – kontrolinis bandinys – 1 µg plazmidinės DNR; abscisė – polimero koncentracija (nmol).

Žemesnėje 3.31 paveikslo dalyje esantys rezultatai parodo, jog, PHPI-SS1 bei PHPI-SS3, beveik nepriklausomai nuo polimero koncentracijos, pilnai atpalaiduoja DNR, kuri migruoja agaroziniame gelyje. PHPI-SS2 tik dalinai atpalaiduoja DNR, ir tik esant mažai polimero koncentracijai. Dar blogiau DNR atpalaidavo PHPI-SS4. Tai rodo prastesnį PHPI-SS2 ir -SS4 polimerų bioskalumą, o tuo pačiu ir prastesnes transfekcines savybes.

Tyrimas agaroziniame gelyje parodė, kad vienas iš perspektyviausių polimerų genų transfekcijai yra PHPI-SS3. Todėl buvo atlikti šio polimero papildomi bioskalumo tyrimai skysčių chromatografijos metodu (3.32 pav.). PHPI bei PHPI-SS3 buvo veikiami DTT ir chromatografuojami. Gautose chromatogramose aiškiai matoma, jog DTT paveikto PHPI eliucijos laikas toks pat, kaip ir nepaveikto, tad galima teigti, jog DTT poveikyje PHPI nesuyra. DTT paveikus PHPI-SS3, rezultatas buvo priešingas, nes eliucijos laikas sutrumpėjo, o tai vienareikšmiškai įrodo šio polimero gebą suirti redukciniame aplinkoje.

Yra žinoma [255], kad transfekuotas ląsteles naudojant grįžtamai transkripcijai (transgeninės DNR padauginimui iš RNR; angl. *RT-PCR* –

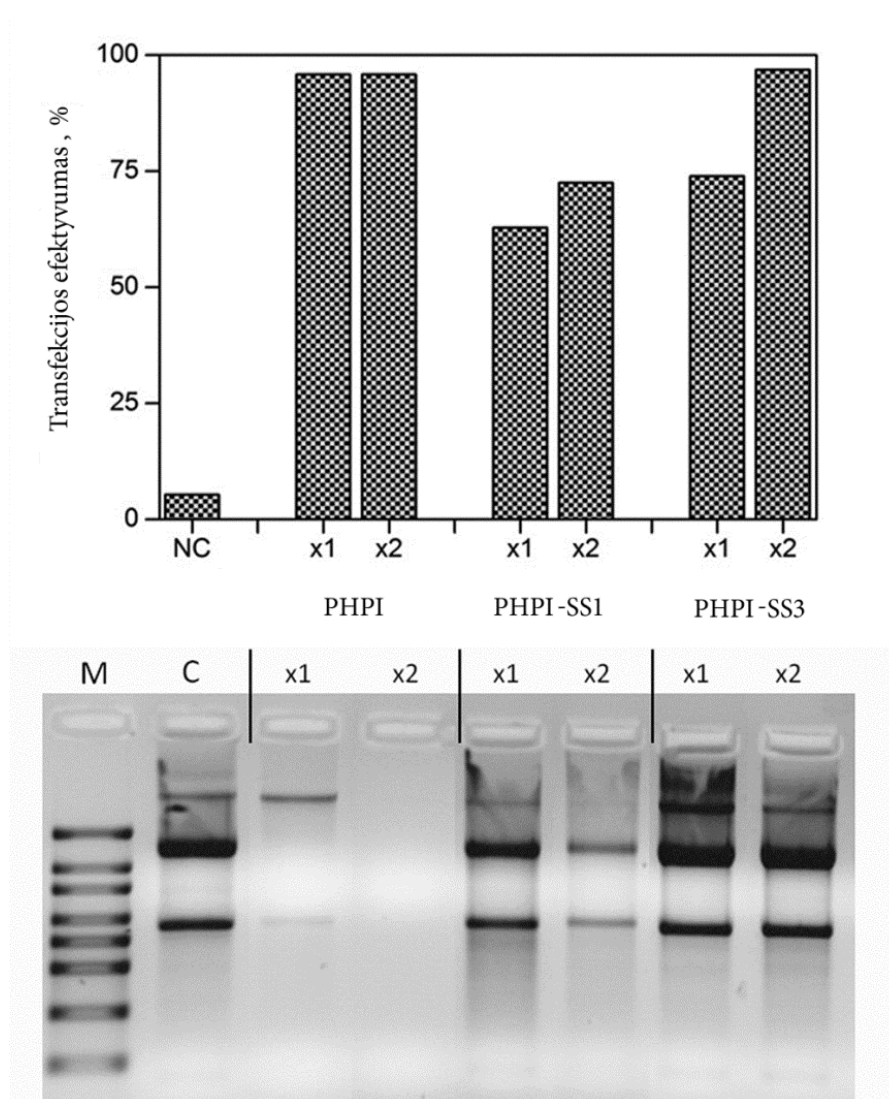
*reverse transcription polymerase chain reaction*), kai kurie transfekcijos reagentai stipriai suriša viduląstelinę RNR ir RT-PCR procesą daro neįmanomu.



3.32 pav. PHPI (viršuje) ir PHPI-SS3 (apačioje) eliucijos kreivės, kai PHPI ir PHPI-SS3 nepaveiktas DTT (ištisinė linija) ir paveiktas DTT (punktyrinė linija).

Todėl buvo tikimasi, kad ląstelėje degraduojantis PHPI-SS nesuriš RNR ir tokias ląsteles bus labiau įmanoma panaudoti RT-PCR technologijose. Po transfekcijos buvo atliktas RNR gryninimas ir įvertinti genų ekspresijos lygmenys q-PCR (angl. *quantitative polymerase chain reaction*) ir RT-PCR metodais. *Hek-293* ląstelės buvo transfekuojamos du kartus 24 val. bėgyje EGFP plazmide. Kaip matyti 3.33 paveikslo viršutinės dalies, visų mėginių transfekcijos rezultatai labai geri (60-95 %), o pakartotinės transfekcijos

efektyvumas padidėja. Žemutinė 3.33 paveikslo dalis vaizduoja RNR išsilaisvinimą (angl. *recovery*). Čia matoma, jog po pirminės transfekcijos su PHPI, RNR išsilaisvina sunkiai ir beveik neišsilaisvina po pakartotinės transfekcijos. Tai reiškia, kad į ląstelę patekęs PHPI efektyviai suriša RNR ir tokiu būdu negali būti efektyviai naudojamas pakartotinėje transfekcijai, pavyzdžiui, konstruojant rekombinantinius organizmus rekombinantinių baltymų sintezei [256].

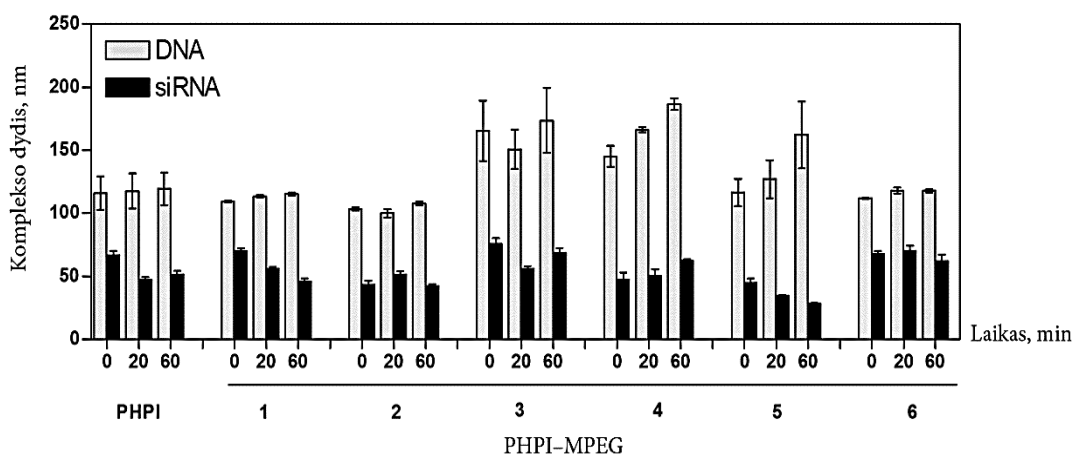


3.33 pav. RNR atpalaidavimas po transfekcijos (x1) ir pakartotinės transfekcijos (x2). NC – netransfekuotos ląstelės; C – kontrolė (RNR iš netransfekuotų ląstelių), M – *RiboRuler* plataus diapazono RNR kopėtelės.

Tačiau PHPI-SS polimerai, ir ypač PHPI-SS3, RNR nesuriša (3.33 pav. apačia), vadinasi, jie ląstelės viduje suskaidomi iki nedidelių fragmentų, nesugebančių surišti RNR, taigi, gali būti efektyviai naudojami pakartotinai transfekuojant genus.

Modifikavus PHPI MPEG grandimis buvo tikimasi, kad skirtingas kiekis MPEG grandžių bei MPEG molekulinė masė turės įtakos mažinant vektoriaus toksiškumą ir jį labiau pritaikant siRNR transfekcijai (citoplazmoje apsaugant siRNR nuo destruktivaus nukleazių poveikio).

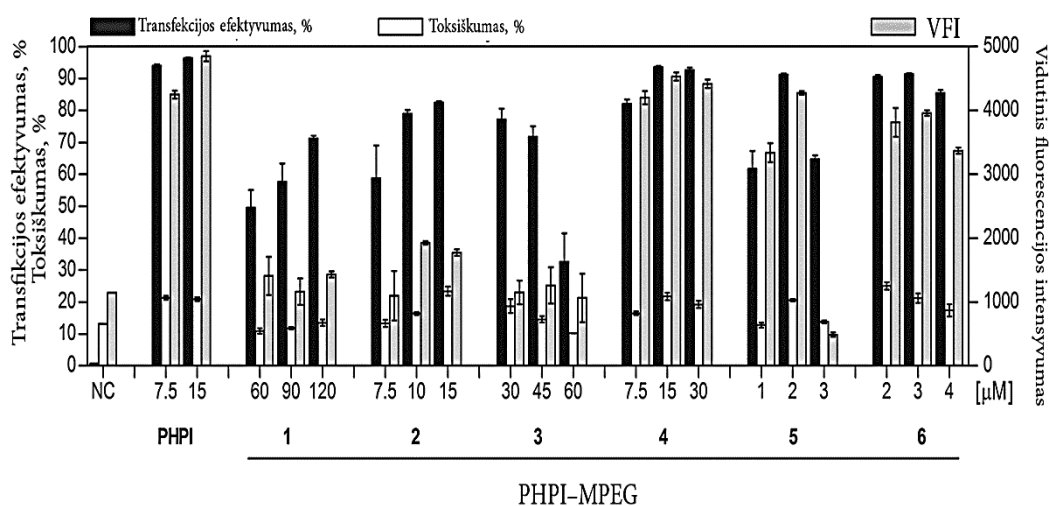
Buvo nustatyta, jog PHPI-MPEG su DNR sudaro ~125-200 nm dydžio polipleksus (3.34 pav.). Po 60 min inkubacijos stabiliausi polipleksai išlieka tuomet, kai jie buvo sudaryti iš 1 bei 3 polimerų (žr. 3.10 lentelę). Šiuose PHPI-MPEG polimeruose oksietileno grandžių buvo atitinkamai 59 ir 67 mol%. Taip pat gana stabilius kompleksus sudarė ir 6 polimeras, tačiau jame oksietileno grandžių buvo nedaug – tik 9,3 mol%. Lyginant su nemodifikuotu PHPI, 1, 3 ir 6 polimerų polipleksai nors ir yra panašaus stabilumo, bet šiek tiek mažesni. Todėl, tam tikrais atvejais MPEG grandinių įvedimas davė teigiamą efektą – buvo gaunami mažesnių dydžių polipleksai nei su PHPI.



3.34 pav. PHPI bei PHPI-MPEG kompleksų su DNR bei siRNR dydžiai (polimerų numeriai atitinka 3.10 lentelėje esančius numerius).



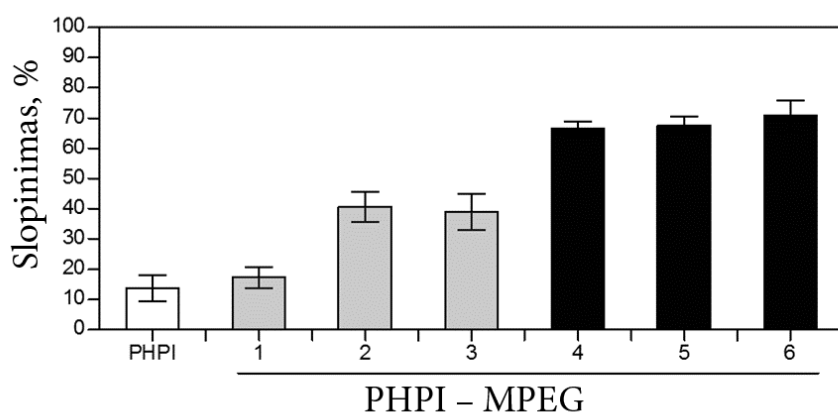
Daugelis autorių [84, 94,162,163] pabrėžia, kad iki 100 nm dydžio kompleksai yra patys efektyviausi bei tinkamiausi siRNR pernašai. Kompleksų su siRNR dydžio tyrimas atskleidė, jog visi PHPI-MPEG pradiniu momentu sudaro ~50-75 nm dydžio polipleksus. Jų stabilumas laike buvo labai įvairus: laikui bėgant, kai kuriais atvejais dalelių dydis didėjo, kitais – mažėjo. Nors visumoje pokyčiai ir nebuvo dideli, visgi stabiliausius kompleksus su siRNR sudarė 6 polimeras. Taigi, galima konstatuoti, jog tarp PHPI ir PHPI-MPEG nėra didelio skirtumo, jei lyginamas polipleksų su siRNR dydis ir jų stabilumas laike, o gauti dalelių dydžiai yra tinkami siRNR transfekcijai.



3.35 pav. Žaliai fluorescuojančio baltymo sintezę koduojančio geno transfekcijos su PHPI ir PHPI-MPEG rezultatai (polimerų numeriai atitinka 3.10 lentelėje esančius numerius).

DNR transfekcijos, toksiškumo bei VFI tyrimai atskleidė (3.35 pav.), kad su 4-6 polimerais pasiekiamas 90 % transfekcijos efektyvumas (ekspresija vyksta 90 % ląstelių), o toksiškumas išlieka 20 % lygyje. Nors šių polimerų polidispersiškumas siekia nuo 11,7 iki 13,6, bet geno ekspresija vyksta sėkmingai. Yra žinoma, kad didelis polidispersiškumas transfekcijos efektyvumui bei toksiškumui įtakos neturi [257].

Daugelis autorių tyrinėjo [84, 94, 162, 163] MPEG grandinių turinčių polimerų taikymą siRNR ir vienareikšmiškai priedavo išvados, kad skirtingoms ląstelių linijoms MPEG grandinių turinčių polimerų efektyvumas skiriasi. Taigi, jie yra saviti ląstelėms. Po siRNR transfekcijos su PHPI-MPEG, net 70 % *Hela* ląstelių genas buvo nuslopintas. Tuo tarpu po transfekcijos su nemodifikuotu PHPI, genas nustojo veikęs tik 10 % ląstelių (3.36 pav.). Didžiausias genų slopinimas pasiekiamas, kai siRNR pernašai taikomi PHPI-MPEG, kurių sudėtyje MPEG grandžių yra nuo 3,3 iki 9,3 % (t. y., kai polimerai buvo sintetinti B būdu). Stebimi skirtumai tarp A ir B tipo polimerų įtakos galutiniam rezultatui (genų slopinimui) galėtų būti paaiškunami ne MPEG grandžių kiekiu polimeruose, o šių polimerų molekulinė masė skirtumais. Kadangi B tipo polimerų molekulinė masė didesnė, galima spėti, kad jie efektyviau apsaugojo transfekuojamą siRNR nuo ją degraduojančių nukleazų poveikio citoplazmoje, tokiu būdu užtikrino didelį transfekcijos efektyvumą bei didelį geno slopinimo mastą.



3.36 pav. GFP geno slopinimo mastas po siRNR transfekcijos naudojant PHPI ir PHPI-MPEG (polimerų numeriai atitinka 3.10 lentelėje esančius numerius).

Literatūroje aprašoma labai daug siRNR transfekcijai pritaikytų vektorių, kuriuos naudojant gaunamas net 100 % siekiantis norimo geno slopinimo lygis. Tačiau *in vivo* taikyme jie vis dar nėra tinkami dėl audinių uždegimus

sukeliančio poveikio [70, 71]. Manoma, kad PHPI-MPEG šiuo požiūriu bus efektyvesni, nes MPEG grandinės ekranuoja polimero teigiamą krūvį, todėl turėtų sumažinti vektoriaus toksiškumą [86-88]. Be to, jos padidina poliplekso dalelių stabilumą [86-88]. MPEG grandinės taip pat galėtų apsaugoti polipleksus ir nuo baltųjų kraujo kūnelių atakos, o tai prailgintų poliplekso cirkuliacijos kraujyje trukmę ir tuo pačiu, leistų PHPI-MPEG taikyti *in vivo* transfekcijai.

Apibendrinant modifikuotų polialkileniminų transfekcines ir toksines savybes, galima pastebėti, jog šie polimerai pagal visą eilę parametrų (didelis transfekcijos efektyvumas, bioskalumas, reikiamas polipleksų dalelių dydis ir stabilumas, mažas toksiškumas ir pan.) buvo žymiai efektyvesni už nemodifikuotą PHPI. PHPI su disulfidiniais ryšiais makromolekulėse yra tinkamas pakartotinei transfekcijai, o su MPEG grandinėmis – siRNR transfekcijai.

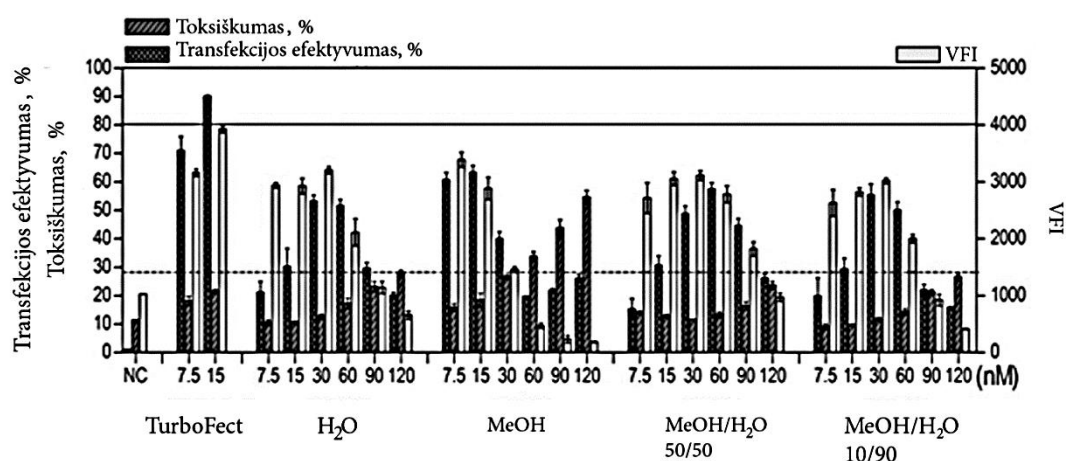
### **3.4.2 Poliamidoaminų taikymas DNR transfekcijai**

Dėl nedidelių išeigų, PAMAMO genų transfekcijos tyrimuose nebuvo taikyti. Geriausių parametrų PAMAMH tinkamumas buvo tirtas tik su DNR, įvertinant transfekcines ir toksines savybes, bei VFI. 3.37 pav. pateikti šių tyrimų rezultatai (polimerus apibūdinantys duomenys pateikti 3.12 lentelėje).

Tyrimai parodė, jog PAMAMH transfekcijos efektyvumas siekė tik apie 60 % *TurboFect* (PHPI) efektyvumo. Taip pat šie polimerai buvo toksiškesni nei *TurboFect*. Todėl, remiantis gautais rezultatais, galima vienareikšmiškai teigti, jog DNR transfekcijoje PAMAMH mažiau efektyvus už *TurboFect* (PHPI). Šis efektyvumų skirtumas matomai galėtų būti paaiškintas mažesniu PAMAMH katijoniškumu: PHPI iminogrupės yra gana arti viena kitos, o PAMAMH fragmente jas skiria  $N,N'$ -metilenbisakrilamido liekanos.

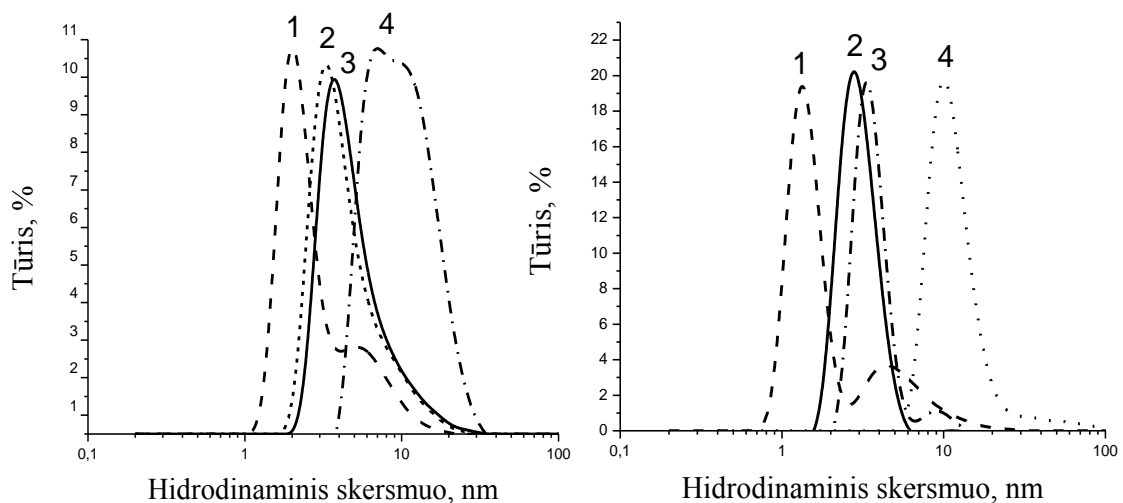
Vektoriaus bioskalumas ląstelėse ar kraujyje yra labai svarbi savybė. Svarbu, kad polimeras, patekęs į ląstelę ar organizmo skysčius, po kurio laiko suskiltų iki mažesnių molekulinės masės junginių, kurie galėtų būti įsisavinti

kaip maisto medžiagos ar pašalinti kaip apykaitos produktai. PAMAM galimybė degraduoti tirta naudojant modelinę sistemą. Buvo nustatoma, kokių greičiu dėl amidinių grupių hidrolizės kinta PAMAM dalelių dydžiai PBS buferyje. 3.38 paveiksle pateikti rezultatai rodo, kad PAMAM dalelių skersmuo PBS buferyje laikui bėgant mažėja, tai reiškia, jog susintetinti PAMAM geba hidrolizuotis.



3.37 pav. Žaliai fluorescuojančio baltymo sintezę koduojančio geno transfekcijos rezultatai su PAMAMH (polimerus apibūdinantys duomenys pateikti 3.12 lentelėje).

Kaip matyti iš 3.38 pav., per 24 valandas dalelių skersmuo sumažėja ~2 kartus, o vėliau hidrolizės greitis lėtėja ir eksperimento metu visiškai suardyti PAMAM nepavyko. Galima daryti prielaidą, jog viduląsteliniame skystyje esančios hidrolazės galėtų PAMAM skaidyti ir žymiai greičiau. Tačiau mažas šių polimerų efektyvumas transfekcijoje ir didesnis už PHPI toksiškumas rodo, jog ir viduląsteliniame skystyje vykstančios hidrolizės greitis taip pat nėra didelis. Todėl PAMAM polimerai šiuo aspektu aiškiai nusileidžia PHPI-SS polimerams.



3.38 pav. PAMAMH, susintetinto MeOH/H<sub>2</sub>O (50/50), (kairėje) ir PAMAMO, susintetinto MeOH/H<sub>2</sub>O (50/50), (dešinėje), dalelių dydžio kitimas PBS buferyje: 4 – po 0 val., 3 – po 24 val., 2 – po 72 val., 1 – po 144 val.

Apibendrinant PAMAM transfekcijos rezultatus galima teigti, jog hidroksigrupių turintys poliamidoaminai nebuvo efektyvūs GFP geno pernašoje į *HeLa* ląsteles, jie, gal būt, galėtų efektyviau veikti esant kitam ląstelės-geno deriniui. Tačiau, kad būtų atsakyta į šį klausimą, visų pirma reikėtų papildomų PAMAM bioskalumo tyrimų ląstelių citozolyje.

## IŠVADOS

1. Poliniai aprotoniniai tirpikliai yra tinkamiausia terpė 1,6-heksametilendiamino ir 1,2-dibrometano, o taip pat 1,3-diamino-2-propanolio (DAP) ir 1,3-dibrom-2-propanolio (DBP) polikondensacijai. Tokiuose tirpikliuose pasiekiamas didžiausias polikondensacijos reakcijos greitis, reakcijos baigties laipsnis, susidaro didžiausios molekulinės masės polimerai.
2. Polikondensacijos būdu sintetinant polialkileniminius ir jų darinius, o taip pat ir poliadicijos būdu sintetinant poliamidoaminus turinčiusoksi- arba hidroksigrupių, susidaro šakoti, bet tirpūs katijoniniai polimerai. Labiau šakoti polimerai susidaro polikondensaciją vykdant poliniuose aprotoniniuose tirpikliuose, naudojant baziškesnį diamino monomerą ir tais atvejais, kai monomerų reaguojančios funkcinės grupės mažiau nutolusios viena nuo kitos.
3. Ultrafiltravimo būdu gryninant polialkileniminius, jų darinius ir poliamidoaminus, iš jų pašalinamos mažamolekulės frakcijos, taip išskiriant didesnės molekulinės masės bei mažiau polidispersinius polimerus.
4. Disulfidinių grupių turintys poli(2-hidroksipropilenimino) (PHPI) dariniai (PHPI-SS) susintetinti polikondensuojant DBP su cistaminu (CT), arba su CT ir DAP mišiniu. Šiuose polimeruose disulfidinių grupių kiekis proporcingas CT molinei daliai pradiname reakcijos mišinyje. Ultrafiltruotų PHPI-SS molekulinė masė nedidelė (3,9-7,9 kDa).
5. Metoksi-poli(etilenglikolio) (MPEG) grandinių turintys PHPI dariniai (PHPI-MPEG) susintetinti vykdant DAP polikondensaciją su DBP ir MPEG jodidais, kurių molekulinė masė 1000, 2000 ir 5000 Da. Parenkant MPEG jodido dozavimo į reakcijos mišinį laiką, galima reguliuoti MPEG kiekį PHPI darinyje, tokio darinio molekulinę masę bei išeigą. MPEG jodidą dedant reakcijos pradžioje, susidaro nedidelės molekulinės masės (8-53 kDa) polimerai, turintys virš 60 mol% oksietileno grandžių ir po 1-

1,25 MPEG grandinę makromolekulėje. MPEG jodidą dedant baigiantis reakcijai, susidaro didelės molekulinės masės (140-160 kDa) polidispersiniai polimerai, turintys mažiau nei 9 mol% oksietileno grandžių ir po 0,09-0,22 MPEG grandinių makromolekulėje. PHPI-MPEG išėiga mažesnė nei 30 % ir mažai priklauso nuo MPEG molekulinės masės.

6. Disulfidinių ryšių pagrindinėje grandinėje turintys PHPI dariniai geba suirti ląstelių citozolyje, todėl jie mažiau toksiški už PHPI ir yra tinkami pakartotinei transfekcijai.
7. Didelės molekulinės masės ir mažai MPEG grandinių turintys PHPI-MPEG siRNR transfekuoja geriau už mažos molekulinės masės PHPI-MPEG darinius ar PHPI. Didelės molekulinės masės PHPI-MPEG efektyvumas siRNR transfekcijoje siekia 70 %.
8. Poliadicijos būdu iš *N,N'*-metilenbisakrilamido ir DAP bei 2,2'-(etilendioksi)diethylamino susintetinti oksid- ir hidroksigrupių turintys poliamidoaminai. Hidroksigrupių turintys poliamidoaminai yra bioskalūs, tačiau GFP geną į *HeLa* ląsteles transfekuoja ne taip efektyviai, kaip PHPI.

## PUBLIKUOTŲ DARBŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

### Moksliniai straipsniai žurnaluose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą:

1. Bočkuvienė A., Vareikis A., Makuška R. Polycondensation of hydroxyl-group containing aliphatic diamines and dibromides yielding highly branched poly(2-hydroxypropylene imines), *Chemija*, 2015, 26 (1), P.51-59.
2. Bockuviene A., Balciunaite J., Slavuckyte K., Zaliauskiene L., Vareikis A., Makuska R., Poly(ethylene glycol) modified poly(2-hydroxypropylene imine) as efficient reagent for siRNA transfection, *J. Polym. Res.*, 2016, 23 (10), P. 1-12.
3. Bockuviene A., Slavuckyte K., Vareikis A., Zigmantas S., Zaliauskiene L., Makuska R., Intracellular delivery and triggered release of DNA using biodegradable poly(2-hydroxypropylene imines) containing cystamine units, *Macromol. Biosci.*, Priimtas spaudai.

### Patentai

Pateikta paraiška JAV patentui: Zigmantas Š., Žaliauskienė L., Makuška R., Bočkuvienė A., Vareikis A., Biodegradable cationic polymers and uses thereof.

### Tarptautinių konferencijų tezės

1. Bočkuvienė, A., Vinkevičiūtė, I., Vareikis, A. Synthesis and characterization of novel poly(amidoamine). *Baltic Polymer Symposium 2013: Programme and Book of Abstracts*. 2013, Trakai, Lithuania, p. 68.
2. Bočkuvienė, A., Balčiūnaitė, J., Vareikis, A., Makuška, R., Sythesis and study of MPEG-containing poly(2-hydroxypropylene imines). *Baltic Polymer Symposium 2014: Programme and Book of Abstracts*. 2014, Laulasmaa, Estonia, p. 73.



## **Tarptautinių konferencijų medžiaga**

1. Burvytė, A., Vareikis, A., Makuška, R. Poly(alkylene imines) by polycondensation: how to get higher molecular weight?. *Programme and Proceedings of Baltic Polymer Symposium 2012*, Liepoja, Latvia, 2012, p. 117.
2. Bočkuvienė, A., Vareikis, A., Makuška, R. Synthesis of highly branched poly(2-hydroxypropylene imines). *Programme and Proceedings of Baltic Polymer Symposium 2015*, Sigulda, Latvia, 2015, p. 79.
3. Vareikis, A., Bočkuvienė, A., Makuška, R., Kinetic study of polycondensation of 1,3-diamino-2-propanol with 1,3-dibromo-2-propanol. *Programme and Proceedings of Baltic Polymer Symposium 2015*, Sigulda, Latvia, 2015, p. 80.
4. Bočkuvienė, A., Balčiūnaitė, J., Vareikis, A., Makuška, R., Synthesis and characterization of novel containing poly(propylene imine) and poly(ethylene glycol)methyl ether segments. *Programme and Proceedings of Interantional Conference of Lithuanian Chemical Society Chemistry and Chemical technology 2014*, Kaunas, Lithuania, 2014, p. 294.

## **Nacionalinės konferencijos tezės**

1. Bočkuvienė, A., Balčiūnaitė, J., Slavuckytė, K., Žaliauskienė, L., Vareikis, A., Makuška, R.. Polietilenglikoliu modifikuoti poli(2-hidroksiropileniminai) – efektyvūs reagentai siRNR pernašai. Fizinių ir technologijos mokslų tarpdalykiniai tyrimai, Vilnius, Lietuva, 2016, p. 40.

## CURRICULUM VITAE

*Vardas, pavardė:* Alma Bočkuvienė (Burvytė)

*Gimimo data ir vieta:* 1986 sausio 29 d. Palanga

### *Išsilavinimas:*

1994 – 2005 Palangos „Baltijos“ vidurinė mokykla

#### **Vidurinis išsilavinimas**

2005 – 2009 Vilniaus universitetas, Chemijos fakultetas

#### **Chemijos bakalauras**

2009 – 2011 Vilniaus universitetas, Chemijos fakultetas

#### **Chemijos magistras**

2011 – 2015 Vilniaus universitetas, Chemijos fakultetas,

Polimerų chemijos katedra

#### **Doktorantūros studijos**

*Užsienio kalbos:* anglų, rusų

*El. paštas:* burvytealma@gmail.com

### *Dalyvauta projektuose:*

2012 03 01 – 2013 08 31 LMT finansuojamamas mokslininkų grupių projektas „Biolubrikantus imituojančios anijoninės polimerinės šepetinės struktūros“. Nr. MIP-051/2012.

2012 06 20 – 2012 11 30 Projektas „Molekulinės *in vitro* diagnostikos įrankiai“. Nr.VP2-1.3.-ŪM-02-K-02-005.

2014 04 21 – 2015 04 21 Projektas „Mokinių jaunųjų tyrėjų atskleidimo ir ugdymo sistemos sukūrimas – II etapas“. Nr.VP1-3.2.-ŠMM-02-V-03-001.

## LITERATŪRA

1. Mitra S., Genetic Engineering: Principles and Practice, *McGraw-Hill Education*, India, 2015.
2. Herzog R., Zolotukhin S., A Guide to Human Gene Therapy, *World Scientific*, USA, 2010.
3. Edelstein M. L., Abedi M. R., Wixon J., Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update, *J. Gene Med.*, 2007, V. 9, 833-842.
4. Roth J. A., Cristiano R. J., Therapy for cancer: What have we done and where are we going?, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 1997, V. 88, 21-39.
5. Smith R. A., Miller T. M., Yamanaka K., Monia B. P., Condon T. P., Hung G., Lobsiger C. S., Ward C. M., McAlonis-Downes M., Wei H., Wancewicz E.V., Bennett C. F., Cleveland D. W., Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease, *J. Clin. Invest.*, 2006, V. 116, 2290-2296.
6. Robbins P. D., Ghivizzani S. C., Viral vectors for Gene Therapy, *Pharm. Ther.*, 1998, V. 80, 35-47.
7. Lundstrom K., Latest development in viral vectors for gene therapy, *Trends in Biotechnol.*, 2003, V. 21, 117-122.
8. Lv H., Zhang S., Wang B., Cui S., Yan J., Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *J. Control. Release*, 2006, V. 114, 100-109.
9. Mahato R. I., Rolland A., Tomlinson E., Cationic Lipid-Based Gene Delivery Systems: Pharmaceutical Perspectives, *Pharm. Res.*, 1997, V.14, 853-859.
10. Tros de Ilarduyaa C., Sunb Y., Duzgunes N., Gene delivery by lipoplexes and polyplexes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2010, V. 40, 159-170.
11. Eliyahu H., Barenholz Y., Domb A. J., Polymers for DNA delivery, *Molecules*, 2005, V. 10, 34-64.
12. Sezer A. D., Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems, *InTech*, Croatia, 2012.

13. Davis M. E., Non-viral gene delivery systems, *Curr. Opin Biotechnol.*, 2002, V. 13, 128-131.
14. Zhang Y., Satterlee A., Huang L., *In Vivo* gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles?, *Molecular Ther.*, 2012, V. 20, 1298-1304.
15. Lin C., Biomedicine, *InTech*, Croatia, 2012.
16. Khalil I. A., Kogure K., Akita H., Harashima H., Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery, *Pharmacol. Rev.*, 2006, V. 58, 32-45.
17. Wiethoff C. M., Middaugh C. R., Barriers to nonviral gene delivery, *J. Pharm. Sci.*, 2003, V. 92, 203-217.
18. Sužiedelienė E., Molekulinės biologijos vadovėlis, *Vilniaus universitetas*, 2014.
19. Agrawal N., Dasaradhi P. V. N., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R. K., Mukherjee S. K., RNA interference: biology, mechanism, and applications, *Microbiol. Molecular Biology Rev.*, 2003, V. 67, 657-685.
20. Howard K. A., RNA Interference from Biology to Therapeutics, *Springer*, New York Heidelberg Dordrecht London, 2013.
21. Dominska M., Dykxhoorn D. M., Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape, *J. Cell Sci.*, 2010, V. 123, 1183-1189.
22. Gary D. J., Puri N., Won Y., Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery, *J. Control. Release*, 2007, V. 121, 64-73.
23. Akhtar S., Benter I. F., Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo, *J. Clin. Invest.*, 2007, V. 117, 3623-3632.
24. Gunther M., Lipka J., Malek A., Gutsch D., Kreyling W., Aigner A., Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2011, V. 77, 438-449.
25. Aliabadi H. M., Landry B., Sun C., Tang T., Uluda H., Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: Where do we stand?, *Biomaterials*, 2012, V. 33, 2546-2569.

26. Singha K., Namgung R., Kim W. J., Polymers in small-interfering RNA delivery, *Nucleic Acid Ther.*, 2011, V. 21, 133-147.
27. Kang H. C., Huh K. M., Bae Y. H., Polymeric nucleic acid carriers: current issues and novel design approaches, *J. Control. Release*, 2012, V. 164, 256-264.
28. Toncheva V., Wolfert M. A., Dash P. R., Oupicky D., Ulbrich K., Seymour L. W., Schacht E. H., Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with polyL-lysine grafted with hydrophilic polymers, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, V. 1380, 354-368.
29. Mintzer M. A., Simanek E. E., Nonviral vectors for gene delivery, *Chem. Rev.*, 2009, V. 109, 259-302.
30. Lollo C. P., Banaszczyk M. G., Mullen P. M., Coffin C. C., Wu D., Carlo A. T., Bassett D. L., Gouveia E. K., Carlo D. J., Poly-L-Lysine-Based gene delivery systems: synthesis, purification and application, *Gene Ther. Protocols Method Mol. Med.*, 2002, V. 69, 1-13.
31. Wu J., Huang W., He Z., Dendrimers as carriers for siRNA delivery and gene silencing: A Review, *The Sci. World J.*, 2013, V. 2013, 1-13.
32. Huang R., Ke W., Liu Y., Jiang C., Pei Y., The use of lactoferrin as a ligand for targeting the polyamidoamine-based gene delivery system to the brain, *Biomaterials*, 2008, V. 29, 238-246.
33. Lungwitz U., Breunig M., Blunk T., Gopferich A., Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2005, V. 60, 247-266.
34. Kircheis R., Wightman L., Wagner E., Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, V. 3, 341-358.
35. Godbey W. T., Wu K. K., Mikos A. G., Poly(ethyleneimine) and its role in gene delivery, *J. Control. Releases*, 1999, V. 60, 149-60.
36. Fischera D., Lib Y., Ahlemeyerc B., Krieglsteinc J., Kissela T, In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis, *Biomaterials*, 2003, V. 24, 1121-1131.

37. Jiang D., Salem A. K., Optimized dextran-polyethylenimine conjugates are efficient non-viral vectors with reduced cytotoxicity when used in serum containing environments, *Int. J. Pharm.*, 2012, V 427, 71-79.
38. Sato T, Ishii T., Okahata Y., In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency, *Biomaterials*, 2001, V. 22, 2075-2080.
39. Mao S., Sun W., Kissel T., Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, V. 62, 12-27.
40. Ragelle H., Riva R., Vandermeulen G., Naeye B., Pourcelle V., Le Duff C. S., Haese C. D, Nysten B., Braeckmans K., De Smedt S.C., Jerome C., Preat V., Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: Optimizing formulation to increase stability and efficiency, *J. Control. Release*, 2014, V. 176 54-63.
41. Dubruel P., Schacht E., Vinyl polymers as non-viral gene delivery carriers: current status and prospects, *Macromol. Biosci.*, 2006, V. 6, 789-810.
42. van der Aa M. A. E. M., Huth U. S., Hafele S. Y., Schubert R., Oosting R. S., Mastrobattista E., Hennink W. E., Peschka-Suss R., Koning G. A., Krommelin D. J. A., Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells, *Pharm. Res.*, 2007, V 24, 1590-1598.
43. Schallon A., Jerome V., Walther A., Synatschke C. V., Müller A. H. E., Freitag R., Performance of three PDMAEMA-based polycation architectures as gene delivery agents in comparison to linear and branched PEI, *Reac. Func. Polym.*, 2010, V. 70, 1-10.
44. Xu F.J., Yang W.T., Polymer vectors via controlled/living radical polymerization for gene delivery, *Prog. Polym. Sci.*, 2011, V. 36, 1099-1131.
45. Saminathan M., Thomas T., Shirahata A., Pillai C. K. S., Thomas T. J., Polyamine structural effects on the induction and stabilization of liquid

- crystalline DNA: potential applications to DNA packaging, gene therapy and polyamine therapeutics, *Nucleic Acids Res.*, 2002, V. 30, 3722-3731.
46. Thomas T., Thomas T. J., Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, V. 58 244-258.
  47. Blagbrough I. S., Geall A. J., Neal A. P., Polyamines and novel polyamine conjugates interact with DNA in ways that can be exploited in non-viral gene therapy, *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, V. 31, 397-406.
  48. Boussif O., Lezoualcht F., Zanta M. A., Mergny M. D., Schermant D., Demeneix B., Behr J. P., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, V. 92, 7297-7301.
  49. Park T. G., Jeong J. H., Kim S. W., Current status of polymeric gene delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, V. 58, 467-486.
  50. Neu M., Fischer D., Kissel T., Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives, *J. Gene. Med.*, 2005, V. 7, 992-1009.
  51. Kramer M., Stumby J. A., Grimm G., Kaufmann B., Kruger U., Weber M., Haag R., Dendritic polyamines: simple access to new materials with defined treelike structures for application in nonviral gene delivery, *ChemBioChem*, 2004, V. 5, 1081-1087.
  52. Fischer D., Bhattacharya R., Osburg B., Bickel U., Inhibition of monocyte adhesion on brain-derived endothelial cells by NF-kappaB decoy/polyethylenimine complexes, *J. Gene. Med.* 2005, V. 7, 1063-1076.
  53. Brown N. A., Bron A. J., An estimate of the human lens epithelial cell size in vivo, *Exp. Eye Res.*, 1987, V. 44, 899-906.
  54. Adamson R. H. Microvascular endothelial cell shape and size in situ, *Microvasc Res.*, 1993, V. 46, 77-88.
  55. Freitas R. A., Nanomedicine, Volume I: Basic Capabilities, *Landes Bioscience*, Georgetown, TX, 1999.

56. Mady M. M., Mohammed W. A., El-Guendy N. M., Elsayed A. A., Effect Of Polymer Molecular Weight On The DNA/Pei Polyplexes Properties, *Romanian J. Biophys.*, 2011 , V. 21,151-165.
57. Werth S., Urban-Klein B., Dai L., Hobel S., Grzelinski M., Bakowsky U., Czubayko F., Aigner A., A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes, *J. Control. Release*, 2006, V. 112, 257-270.
58. Kunath K., von Harpe A., Fischer D., Petersen H., Bickelb U., Voigt K., Kissela T., Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine, *J. Control. Release*, 2003, V. 89, 113-125.
59. Fischer D., Bieber T., Li Y., Elsasser H., Kissel T., A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethyleneimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity, *Pharm. Res.*, 1999, V. 16, 1273-1279.
60. Wiseman J. W., Goddard C. A., McLelland D., Colledge W. H., Comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo, *Gene Ther.*, 2003, V. 10, 1654-1662.
61. Abdallah B., Hassan A., Benoist C., Goula D., Behr J. P., Demeneix B. A., A powerful non viral vector for in vivo gene transfer in to the adult mammalian brain: Polyethyleneimine, *Human gene ther.*, 1996, V. 7,1947-1954.
62. Boletta A., Benigni A., Lutz J., Remuzzi G., Soria M., Monaco L., Non viral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine, *Human Gene Ther.*, 1997, V. 8, 1245-1251.
63. Baker A., Saltik M., Lehrmann H., Killisch I., Mautner V., Lamm G., Christofori G., Cotten M., Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive



- and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery, *Gene Ther.*, 1997, V. 4, 773-782.
64. Horbinski C., Stachowiak M. K, Higgins D., Finnegan S. G., Polyethyleneimine-mediated transfection of cultured postmitotic neurons from rat sympathetic ganglia and adult human retina, *BMC Neuroscience*, 2001, V. 2, 1-8.
  65. Guerra-Crespo M., Charli J., Rosales-Garcia V. H, Pedraza-Alva G., Perez-Martinez L., Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons, *J. Neurosci. Methods*, 2003, V. 127, 179-192.
  66. Wightman L., Kircheis R., Rossler V., Carotta S., Ruzicka R., Kursa M., Wagner E., Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery *in vitro* and *in vivo*, *J. Gene. Med.*, 2001, V. 3, 362-372.
  67. Brissault B., Kichler A., Guis C., Leborgne C., Danos O., Cheradame H., Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection, *Bioconjugate Chem.* 2003, V. 14, 581-587.
  68. Breunig M., Lungwitz U., Liebl R., Fontanari C., Klar J., Kurtz A., Blunk T., Goepferich A., Gene delivery with low molecular weight linear polyethylenimines, *J. Gene. Med.*, 2005; V. 7, 1287-1298.
  69. Oh Y., Park T. G., siRNA delivery systems for cancer treatment, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, V. 61, 850-862.
  70. Akhtar S., Benter I., Advanced Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: Potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity, *Drug Deliv. Rev.*, 2007, V. 59, 164-182.
  71. Urban-Klein B., Werth S., Abuharbeid S., Czubayko F., Aigner A., RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA *in vivo*, *Gene Ther.*, 2005, V. 12, 461-466.
  72. Lagunavicius A., Zigmantas S., Riauba L., Zaliauskiene L., Makuska R., Vareikis A., Bernadisiute U., *US Pat. 9,102,796*, 2015.
  73. Zaliauskiene L., Bernadisiute U., Vareikis A., Makuska R., Volungeviciene I., Petuskaite A., Riauba L., Lagunavicius A., Zigmantas S., Efficient gene

- transfection using novel cationic polymers poly(hydroxyalkylene imines), *Bioconjugate Chem.*, 2010, V. 21,1602-1611.
74. Dai Z., Wu C., How does DNA complex with polyethylenimine with different chain lengths and topologies in their aqueous solution mixtures?, *Macromolecules*, 2012, V. 45, 4346-4353.
  75. Utsuno K., Uludag H., Thermodynamics of polyethylenimine-DNA binding and DNA condensation, *Biophys. J.*, 2010, V. 99, 201-207.
  76. Amin Z. R., Rahimizadeh M., Eshghi H., Dehshahri A., Ramezani M., The effect of cationic charge density change on transfection efficiency of polyethylenimine, *Iran J. Basic Med. Sci.*, 2013, V. 16, 150-156.
  77. Tiyafoonchaia W., Woiszwillob J., Middaugh C. R., Formulation and characterization of DNA–polyethylenimine–dextran sulfate nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2003, V. 19, 191-202.
  78. Rhaesea S., von Briesen H., Rubsamen-Waigmann H., Kreuter J., Langer K., Human serum albumin–polyethylenimine nanoparticles for gene delivery, *J. Control. Release*, 2003, V. 92, 199-208.
  79. Zhang Q., Luan C., Yin D., Zhang J., Liu Y., Peng Q., Xu Y., Yu X., Amino acid-modified polyethylenimines with enhanced gene delivery efficiency and biocompatibility, *Polymers*, 2015, V. 7, 2316-2331.
  80. Zhang N., Wardwell P. R., Bader R. A., Polysaccharide-based micelles for drug delivery, *Pharm.*, 2013, V. 5, 329-352.
  81. Kim M., Lin M. M., Sohn Y. J., Kim J., Kang B. S., Kim D. K., Polyethyleneimine-associated polycaprolactone—Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a gene delivery vector, *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 2015:00B:000-000.
  82. Tripathi S. K., Goyal R., Kumar P., Gupta K. C., Linear polyethylenimine-graft-chitosan copolymers as efficient DNA/siRNA delivery vectors in vitro and in vivo, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2012, V. 8, 337-345.
  83. Erbacher P., Bettinger T., Belguise P., Shaomin V., Jean-Luc Z., Jean-Paul Behr C, Remy J., Transfection and physical properties of various

- saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI), *J. Gene. Med.*, 1999, V. 1, 210-222.
84. Roberts M. J., Bentley M. D., Harris J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, V. 54, 459-476.
  85. Zhang J., Zhao Y., Su Z., Ma G., Synthesis of monomethoxy Poly(ethylene glycol) without diol poly(ethylene glycol), *J. Appl. Polym. Sci.*, 2007, V. 105, 3780-3786.
  86. Lee M., Kim S. W., Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery, *Pharm. Res.*, 2005, V. 22, 1-10.
  87. Funhoff A. M., Monge S., Teeuwena R., Koninga G. A., Schuurmans-Nieuwenbroeka N. M. E., Crommelina D. J. A., Haddleton D. M., Henninka W. E, van Nostrum C. F., PEG shielded polymeric double-layered micelles for gene delivery, *J. Control. Release*, 2005, V. 102, 711-724.
  88. Lungwitz U., Breunig M., Liebl R., Blunk T., Goepferich A., Methoxy poly(ethylene glycol) – Low molecular weight linear polyethylenimine-derived copolymers enable polyplex shielding, *Eur. Pharm. Biopharm.*, 2008, V. 69, 134-148.
  89. Petersen H., Fechner P. M., Fischer D., Kissel T., Synthesis, characterization, and biocompatibility of polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers, *Macromolecule*, 2002, V. 35, 6867-6874.
  90. Malek A., Czubayko F., Aigner A., PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-induced gene targeting efficacy, *J. Drug Targ.*, 2008, V. 16, 124-139.
  91. Zhang X., Pan S., Hu H., Wu G., Feng M., Zhang W., Luo X., Poly(ethylene glycol)-block-polyethylenimine copolymers as carriers for gene delivery: Effects of PEG molecular weight and PEGylation degree, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2008, V. 84A, 795-804.
  92. Petersen H., Fechner P. M., Martin A. L., Kunath K., Stolnik S., Roberts C. J., Fischer D., Davies M. C., Kissel T., Polyethylenimine-graft-

- Poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system, *Bioconjugate Chem.*, 2002, V. 13, 845-854.
93. Tanga G. P., Zenga J. M., Gaoa S. J., Maa Y. X., Shia L., Li Y., Toob H.-P., Wang S., Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent, *Biomaterials*, 2003, V. 24, 2351-2362.
94. Mao S., Neu M., Germershaus O., Merkel O., Sitterberg J., Bakowsky U., Kissel T., Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly(ethylene imine)- graft - poly(ethylene glycol) block copolymer/siRNA polyplexes, *Bioconjugate Chem.*, 2006, V. 17, 1209-1218.
95. Luten J., van Nostrum C. F., De Smedt S. C., Hennink W. E., Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery, *J. Control.Release*, 2008, V. 126, 97-110.
96. Kim T., Kim S. W., Bioreducible polymers for gene delivery, *Reac. Func. Polym.*, 2011, V. 71, 344-349.
97. Son S., Namgung R., Kim J., Singha K., Kim W. J., Bioreducible polymers for gene silencing and delivery, *Accoun. Chem. Res.*, 2012, V. 45, 1100-1112.
98. Klein P. M., Wagner E., Bioreducible polycations as shuttles for therapeutic nucleic acid and protein transfection, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, V. 21, 804-817.
99. Lynn D. M., Langer R., Degradable poly( $\alpha$ -amino esters): synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, V. 122, 10761-10768.
100. Tzeng S. Y., Hung B. P., Grayson W. L., Green J. J., Cystamine-terminated poly(beta-amino ester)s for siRNA delivery to human mesenchymal stem cells and enhancement of osteogenic differentiation, *Biomaterials*, 2012, V. 33, 8142-8151.

101. Wei M., Good D., Novel Gene Therapy Approches, *InTech*, Croatia, 2013.
102. Hill I. R. C., Garnett M. C., Bignotti F., Davis S. S., In vitro cytotoxicity of poly(amidoamine)s: relevance to DNA delivery, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, V. 1427, 161-174.
103. Lin C., Engbersen J. F. J., Effect of chemical functionalities in poly(amido amine)s for non-viral gene transfection, *J. Control. Release*, 2008, V. 132, 267-272.
104. Ranucci E., Ferruti P., Lattanzio E., Manfredi A., Rossi M., Mussini P. R., Chiellini F., Bartoli C., Acid-Base Properties of Poly(amidoamine)s, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.*, 2009, V. 47, 6977-6991.
105. Ferruti P., Marchisio M. A., Duncan R., Poly(amido-amine)s: Biomedical Applications, *Macromol. Rapid Commun.*, 2002, V. 23, 332-355.
106. Casolaro M., Bignotti F., Sartoreb L., Penco M., The thermodynamics of basic and amphoteric poly(amido-amine)s containing peptide nitrogens as potential binding sites for metal ions, *Part 1, Polymer*, 2001, V. 42, 903-912.
107. Tang M. X., Redemann C. T., Szoka F. C., In Vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers., *J. Bioconjugate Chem.*, 1996, V. 7, 703-714.
108. Zhang Y., Zhou C., Kwak K. J., Wang X., Yung B., Lee L. J., Wang Y., Wang P. G., Lee R., Efficient siRNA delivery using a polyamidoamine dendrimer with a modified pentaerythritol core, *J. Pharm. Res.*, 2012, V. 29, 1627-1636.
109. Arima H., Motoyama K., Higashi T., Potential use of polyamidoamine dendrimer conjugates with cyclodextrins as novel carriers for siRNA, *Pharm.*, 2012, V. 5, 61-78.
110. Perez A. P., Romero E. L., Morilla M. J., Ethylenediamine core PAMAM dendrimers/siRNA complexes as *in vitro* silencing agents, *Inter. J. Pharm.*, 2009, V. 380, 189-200.

111. Bauhuber S., Hozsa C., Breunig M., Gopferich A., Delivery of nucleic acids via disulfide-based carrier systems, *Adv. Mater.*, 2009, V. 21, 3286-3306.
112. Breunig M., Lungwitz U., Liebl R., Gopferich A., Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, V. 104, 14454-14459.
113. Read M. L., Bremner K. H., Oupicky D., Green N. K., Searle P. F., Seymour L. W., Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids, *J. Gene Med.*, 2003, V. 5, 232-245.
114. Wu G., Fang Y.-Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D., Glutathione Metabolism and Its Implications for Health, *J. Nutr.*, 2004, V. 134, 489-492.
115. Schafer F.Q., Buettner G.R., Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical. Biol. Med.*, 2001, V. 30, 1191-1212.
116. Wang J., Mao H., Leong K.W., A novel biodegradable gene carrier based on polyphosphoester. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, V. 123, 9480-9489.
117. Gosselin M. A., Guo W., Lee R. J., Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine, *Bioconj. Chem.* 2001, 12, 989-994.
118. Lin C., Zhong Z., Lok M. C., Jiang X., Hennink W. E., Feijen J., Engbersen J. F. J., Novel bio-reducible poly(amido amine)s for highly efficient gene delivery, *Bioconj. Chem.*, 2007, V. 18, 138-145.
119. Sun Y. X., Zeng X., Meng Q. F., Zhang X. Z., Cheng S. X., Zhuo R. X., The influence of RGD addition on the gene transfer characteristics of disulfide-containing polyethyleneimine/DNA complexes, *Biomaterials*, 2008, V. 29, 4356-4365.
120. Peng Q., Zhong Z., Zhuo R., Disulfide cross-linked polyethylenimines (PEI) prepared via thiolation of low molecular weight PEI as highly efficient gene vectors, *Bioconj. Chem.*, 2008, V. 19, 499-506.

121. Lee Y., Mo H. , Koo H., Park J.Y., Cho M.Y., Jin G.W., Park J.S., Visualization of the degradation of a disulfide polymer, linear poly(ethylenimine sulfide), for gene delivery, *Bioconjugate Chem.*, 2007, V. 18, 13-18.
122. Koo H., Jin G.W., Kang H., Lee Y., Nam K., Bai C. Z., Park J. S., Biodegradable branched poly(ethylenimine sulfide) for gene delivery, *Biomaterials*, 2010, V. 31, 988-997.
123. Ou M., Xu R., Kim S. H., Bull D. A., Kim S. W., A family of bioreducible poly(disulfide amine)s for gene delivery, *Biomaterials*, 2009, V. 30, 5804-5814.
124. van der A L. J., Vader P., Storm G., Schiffelers R. M., Engbersen J. F. J., Optimization of , poly(amido amine)s as vectors for siRNA delivery, *J. Control. Release*, 2011, V. 150, 177-186.
125. Zhang B., Ma X., Murdoch W., Radosz M., Shen Y., Bioreducible poly(amido amine)s with different branching degrees as gene delivery vectors, *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, V. 110, 990-998.
126. Ou M., Wang X., Xu R., Chang C., Bull D. A., Kim S. W., Novel biodegradable poly(disulfide amine)s for gene delivery with high efficiency and low cytotoxicity, *Bioconjugate Chem.*, 2008, V. 19, 626-633.
127. Zhong H., He Z., Li Z., Li G., Shen S., Li X., Studies on polyamidoamine dendrimers as efficient gene delivery vector, *J. Biomat. Applic.*, 2008, V. 22, 527-544.
128. Kukowska-Latallo J. F., Bielinska A. U., Johnson J., Spindler R., Tomalia D. A., Baker J. R., Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using starburst polyamidoamine dendrimers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, V. 93, 4897-4902.
129. Kim S. H., Ou M., Bull D. A., Kim S. W., Reductive degradation behavior of bioreducible poly(disulfide amine) for enhancing siRNA efficiency, *Macromol. Biosci.*, 2010, V. 10, 898-905.

130. van der Aa L. J., Vader P., Schiffelers R. M., Storm G., Engbersen J. F. J., Perspective on polymeric carrier systems for siRNA delivery, *Cur. Top. in Med. Chem.*, 2012, V. 12, 108-109.
131. Levy A., Polymerization of cyclic imino ethers. II. Oxazines., Litt M. *Polymer Lett.*, 1967, V. 5, 881-886.
132. Saegusa T., Ikeda H., Isomerization polymerization of 2-Oxazoline. VI. Kinetic study on the polymerization of 2-Methyl-2-oxazoline Initiated by methyl iodide, *Macromolecules*, 1973, V. 6, 808-811.
133. Ulrich H., Harz W., *US Pat. 2,182,306*, 1939.
134. C.R Dick, G.E Ham, Characterization of polyethyleneimine, *J. Macromol. Sci. A*, 1970, V. 4, 1301-1314.
135. Jones G. D., Langsjoen A., Neumann S. M. M. C., Zomlefer J., The Polymerization of ethyleneimine, *Org J. Chem.*, 1944, V. 09, 125-147.
136. von Harpe A., Petersen H., Li Y., Kissel T., Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery, *J. Controlled Release*, 2000, V. 69, 309-322.
137. Bayer O., Lehmann W., 1958, *US Pat.2849411A*.
138. Wilson B.W., 1965, *US Pat. 3203910*.
139. Wilson A.L., 1951, *US Pat. 2553696*.
140. Wilson A.L., 1986, *US Pat. 2318730*.
141. Rivas B. L., Barria B., Synthesis and characterization of poly(2-methylaziridine), *Polym. Bull.*, 1996, V. 36, 157-164.
142. Weyts K. F., Goethals E. J., New synthesis of linear polyethyleneimine, *Polym. Bull.*, 1988, V. 19, 13-19.
143. Pooley S. A., Canessa G. S., Rivas B. L., Poly[N-(2-hydroxyethyl)ethyleneimine-co-(1,2,3,6-tetrahydrophthalic anhydride)] by spontaneous copolymerization, *Macromol. Chem. Phys.*, 1998, V. 199, 2293-2299.
144. Goethals E. J., Bossaer P., Deveux R., The polymerization behaviour of 1-benzyl-2,2-dimethylaziridine, *Polym. Bull.*, 1981, V. 6, 121-126.



145. Demember J. R., Taylor L. D., A reinvestigation of the chemical reactivity of *N*-perfluoroacylaziridines, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, 1979, V. 17, 1089-1101.
146. Stewart I. C., Lee C. C., Bergman R. G., Toste F. D., Living ring-opening polymerization of *N*-Sulfonylaziridines: synthesis of high molecular weight linear polyamines, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, V 127, 17616-17617.
147. Saegusa T., Ikeda H., Fujii H., Crystalline polytehyleneimine, *Macromolecules*, 1972, V. 5, 108-108.
148. Kagiya T., Narisawa S., Maeda T., Fukui K., Ring-opening polymerization of 2-substituted 2-oxazolines, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Lett.*, 1966, V. 4, 441-445.
149. W. Seeliger, E. Aufderhaar, W. Diepers, R. Feinauer, R. Nehring, W. Thie, H. Hellmann, Recent syntheses and reactions of cyclic imidic esters, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1966, V. 5, 875-888.
150. Tomalia D. A., Sheetz D. P., Homopolymerization of 2-alkyl- and 2-aryl-2-oxazolines, *J. Polym. Sci Part A: Polym. Chem.*, 1966, V. 4, 2253-2265.
151. Saegusa T., Shiota T., Matsumoto S., Fujii H., Kinetic study of ring-opening polymerization of oxepane, *Macromolecules*, 1972, V. 5, 34-36.
152. Litt M. H., Lin C. S., Selective hydrolysis of oxazoline block copolymers, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 1992, V. 30, 779-786.
153. Lambermont-Thijs H. M. L., van der Woerd F. S., Baumgaertel A., Bonami L., Du Prez F. E., Schubert U. S., Hoogenboom R., Linear poly(ethylene imine)s by acidic hydrolysis of poly(2-oxazoline)s: kinetic screening, thermal properties, and temperature-induced solubility transition, *Macromolecules*, 2010, V. 43, 927-933.
154. Bartulin J., Rivas B. L., Rodriguez-Baeza M., Angne U., Synthese und charakterisierung von linearem poly(iminoethylen), *Die Makromol. Chem.*, 1982, V. 183, 2935-2940.
155. Saegusa T., Yamada A., Taoda H., Kobayashi S., Linear Poly(*N*-alkylethylenimine)s, *Macromolecules*, 1978, V. 11, 435-436.

156. Goubert M., Canet I, Sinibaldi M.E., A flexible route to new spirodioxanes, oxathianes, and morpholines, *Tetrahedron*, 2009, V. 65, 4182-4189.
157. Wang C. H., Fan, K. R. Hsiue G. H., Enzymatic degradation of PLLA-PEOZ-PLLA triblock copolymers, *Biomaterials*, 2005, V. 26, 2803-2811.
158. Kem K. M., Kinetics of the hydrolysis of linear poly[(acylimino)-ethylenes], *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, 1979, V. 17, 1977-1990.
159. Tauhardt L., Kempe K., Knop K., Altuntas E., Jager M., Schubert S., Fischer D., Schubert U. S., Linear polyethyleneimine: optimized synthesis and characterization – on the way to pharmagrade batches, *Macromol. Chem. Phys.*, 2011, V. 212, 1918-1924.
160. Saegusa T., Nagura Y., Kobayashi S., Isomerization polymerization of 1,3-Oxazine. I. Polymerization of unsubstituted 5,6-Dihydro-4H-1,3-oxazin giving poly(N-formyltrimethylenimine) and its alkaline hydrolysis to poly(trimethylenimine), *Macromolecules*, 1973, V. 6, 495-498.
161. Levy A., Litt M., Polymerization Of cyclic imino ethers. I. Oxazines, *Polym. Lett.*, 1967, V. 5 , 881-886.
162. Zalipsky. S., Harris J. M. Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly (ethylene glycol), ACS Symposium Series; *American Chemical Society: Washington, DC*, 1997.
163. Harris J. M, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications. New York, *Plenum press*, 1992.
164. Ogris M., Brunner S., Schuller S., Kircheis R., Wagner E., PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery, *Gene Ther*, 1999, V. 6, 595-605.
165. Mishra S., Webster P., Davis M. E., PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles, *Eur. J. Cell Biol.*, 2004, V. 83, 97-111.
166. Kursá M., Walker G. F., Roessler V., Ogris M., Roedl W., Kircheis R., Wagner E., Novel shielded transferrinpolyethylene glycol-

- polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer, *Bioconjugate Chem.*, 2003, V. 14, 222-231.
167. Veronese F. M., Pasut G., PEGylation, successful approach to drug delivery, *Drug Disc. Today*, 2005, V. 10, 1451-1458.
168. Park M., *US Pat. 20040105839 A1*, 2004.
169. Choi J. H., Choi J. S., Suh H., Park J. S., Effect of Poly(ethylene glycol) Grafting on Polyethylenimine as a gene transfer vector *in vitro*, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2001, V. 22, 46-52.
170. Zhang Z., Yang C., Duan Y., Wang Y., Liu J., Wang L., Kong D., Poly(ethylene glycol) analogs grafted with low molecular weight poly(ethylene imine) as non-viral gene vectors, *Acta Biomater.*, 2010, V. 6, 2650-2657.
171. Cho C., Design and development of degradable polyethylenimines for delivery of DNA and small interfering RNA: An updated review, *ISRN Mater. Sci.*, 2012, V. 2012, 1-24.
172. Burke R. S, Pun S. H., Extracellular barriers to *in Vivo* PEI and PEGylated PEI polyplex-mediated gene delivery to the Liver, *Bioconjugate Chem.*, 2008, V. 19, 693-704.
173. Merkel O. M., Beyerle A., Librizzi D., Pfestroff A., Behr T. M., Sproat B., Barth P. J., Kissel T., Nonviral siRNA delivery to the lung: investigation of PEG-PEI polyplexes and their *in Vivo* performance, *Molecular Pharm.*, 2009, V. 6, 1246-1260.
174. X. Zhang, S. Pan, H. Hu, G. Wu, M. Feng, W. Zhang, X. Luo, Poly(ethylene glycol)-block-polyethylenimine copolymers as carriers for gene delivery: Effects of PEG molecular weight and PEGylation degree, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* , V.84A, 2008, 795-804.
175. Fitzsimmons R. E. B., Uludag H., Specific effects of PEGylation on gene delivery efficacy of polyethylenimine: Interplay between PEG substitution and N/P ratio, *Acta Biomater.*, 2012, V. 8, 3941-3955.

176. Akiyama Y., Harada A., Nagasaki Y., Kataoka K., Synthesis of Poly(ethylene glycol)-*block*-poly(ethylenimine) possessing an acetal group at the PEG end, *Macromolecules*, 2000, V. 33, 5841-5845.
177. Zhong Z., Feijen J., Low molecular weight linear polyethylenimine-*b*-poly(ethylene glycol)-*b*-polyethylenimine triblock copolymers: synthesis, characterization, and *in Vitro* gene transfer properties, *Biomacromolecules*, 2005, V. 6, 3440-3448.
178. Park M. R., Han K. O., Han I. K., Choa M. H, Nahd J. W., Choia Y. J., Cho C. S., Degradable polyethylenimine-*alt*-poly(ethylene glycol) copolymers as novel gene carriers, *J. Control. Release*, 2005, V. 105, 367-380.
179. Petersen H., Martin A. L., Stolnik S., Roberts C. J., Davies M. C., Kissel T., The macrostopper route: A new synthesis concept leading exclusively to diblock copolymers with enhanced DNA condensation potential, *Macromolecules*, 2002, V. 35, 9854-9856.
180. Kricheldorf H., Polycondensation, History and New Results, *Springer*, Heidelberg New York Dordrecht London, 2014.
181. Žemaitaitis A., Polimerų fizika ir chemija. *Leidykla Technologija*, Kaunas, 2001.
182. Korshak V. V., Vinogradova S. V., Non-Equilibrium polycondensation (Review), *Vysokomol. Soyed. A3*: 1971, V. 2, 367-383.
183. Korshak V. V., Characteristic features of non-equilibrium polycondensation, *Russian Chemical Rev.*, 1966, V. 35, 439-447.
184. Kricheldorf H. R., Schwarz G., Cyclic polymers by kinetically controlled step-growth polymerization, *Macromol. Rapid Commun.*, 2003, V. 24, 359-381.
185. Kricheldorf H. R., What does polycondensation mean?, *Macromol. Symp.*, 2003, V. 199, 1-13.
186. Odian G., Principles of Polymerization, *John Wiley&Sons*, 2004.
187. Asua J.M., Polymer Reaction Engineering, *Blackwell Publishing Ltd*, 2007

188. Ravve A., Principles of Polymer Chemistry, *Springer science+business Media*, LLC 2012.
189. Carraher C.E., Polymer Chemistry (7th edition), *Taylor&Francis Groupe. LLC*, Boca Roton London NewYork, 2006.
190. Chanda M., Advanced Polymer Chemistry: A problem solving Guide, *MACEL, Dekker, Inc.*, New York Basel, 2000.
191. Rogers M.E., Long T.E., Synthetic Methods in step – Growth Polymers, *Wiley Interscience*, A John Wiley&Sons, Inc., publication, 2003.
192. Stille J. K., Step-Growth Polymerization, *Journal of Chemical Education*, 1981, V. 58, 862-866.
193. Bamford.C. H., Tipper C.F.H., Non-radical polymerization, in: J.H. Saunders, F. Dobinson, The Kinetics of Polycondensation Reaction, *Elsvier Scientific Publishing Company*, Amsterdam-Oxford-New York, 1976.
- 194.<https://www.google.lt/webhp?sourceid=chromeinstant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=Ch19+Amines+landscape>. Žiūrėta 2016.04.04
195. Neuman R.C. Organic Chemistry, *OrgChembyNewman*, USA, 2013
196. Uggerud E., Reactivity trends and stereospecificity in nucleophilic substitution reactions, *J. Phys. Org. Chem.*, 2006; V. 19, 461-466.
197. Simonyan G. S., Beileryan N. M, Pirumyan E. G., Roque J.-P., Boyer B., Effects of solvents and the structure of amines on the rates of reactions of a,b-Unsaturated nitriles and amides with secondary amines, *Kinetics and Catalysis*, 2001, V. 42, 474-478.
- 198.[http://pages.towson.edu/jdiscord/www/331\\_problem\\_sets/Chapter10\\_11/Reactions\\_of\\_Alkyl\\_Halides.pdf](http://pages.towson.edu/jdiscord/www/331_problem_sets/Chapter10_11/Reactions_of_Alkyl_Halides.pdf). Žiūrėta 2016.04.04
199. [http://www.ch.ic.ac.uk/widdowson/teach\\_files/nitrogen/dw1.html](http://www.ch.ic.ac.uk/widdowson/teach_files/nitrogen/dw1.html). Žiūrėta 2016.04.04
200. Smit S.H, Organic Chemistry Review: substitution and elimination reactions of alkyl halides, *Amazom Digital service*, USA, 2011.
201. Tondo D. W., Pliego J. R., Modeling protic to dipolar aprotic solvent rate acceleration and leaving group effects in SN<sub>2</sub> reactions: A theoretical

- study of the reaction of acetate ion with ethyl halides in aqueous and dimethyl sulfoxide solutions, *J. Phys. Chem. A*, 2005, V. 109, 507-511.
202. Wypych G., Handbook of solvents, *ChemTech publishing*, Toronto–NewYork, 2001.
203. Dack M. R. J., The influence of solvent on chemical reactivity, *J. Chem. Edu.*, 1974, V. 51, 231-234.
204. Maroncelli M., Macinnis J., Fleming G. R., Polar solvent dynamics and electron-transfer reactions, *Science*, 1989, V. 243, 1674-1681.
205. Ebrahimi A., Habibi M., Amirmijani A., The study of counterion effect on the reactivity of nucleophiles in some SN<sub>2</sub> reactions in gas phase and solvent media, *J. Molec. Struc.: Theochem*, 2007, V. 809, 115-124.
206. Estaway K. H., Solvent effects on the structure of SN<sub>2</sub> transition states, *Can. J. Chem.* 1978, V. 56, 2691-2699.
207. Hofmann A. W., Contributions towards the history of the monamines. No. VI. *Proceedings of the Royal Society of London*: 1862, V. 1854, 380-383.
208. Mnookin N. M., *US Patent 2,049,467*, 1936.
209. Dylewski S. W., Dulude H. G., Warren G.W., *US Patent 2,769,841*, 1956.
210. Petrovich J. P., Taylor D. L., *US Patent 3,855,158*, 1972.
211. Costero A. M., Andreu C., Monrabal E., J. Reactivity of Bis(2-chloroethyl)ether with different Amines, *Chem. Res.*, 1998, V. 378, 1448-1452.
212. Bicak N., Koza C., Atay T. J., Metal chelating resins by condensation of ethylene diamine with p-dichloromethyl benzene, *Appl. Polym. Sci.*, 1996, V. 61, 799-804.
213. Denk M. K., Krause M. J., Niyogi D. F., Gill N. K., Reaction of 1,2-dibromoethane with primary amines: formation of N,N-disubstituted ethylenediamines RNH–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–NHR and homologous polyamines RNH–[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR]<sub>n</sub>–H, *Tetrahedron*, 2003, V. 59, 7565-7570.
214. Liu K. G., Robichaud A. J., General and convenient synthesis of N-aryl piperazines, *Tetrahedron Letters*, 2005, V. 46, 7921-7922.

215. Li Q., Zhang G., Marhefka J., Kamenevab M. V., Liu D., Synthesis of lipopolyhydroxylalkyleneamines for gene delivery, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, V. 16, 2428-2432.
216. Gao X., Kuruba R., Damodaran K., Day B. W., Liu D., Li S., Polyhydroxylalkyleneamines: A class of hydrophilic cationic polymer-based gene transfer agents, *J. Control. Release*, 2009, V. 137, 38-45.
217. Rembaum A., Baumgartner W., Eisenbergt A., Aliphatic Ionenenes, *Polym. Letters*, 1968, V. 6. 159-171.
218. Salamone J. C. Snider B., Quaternary ammonium polymers from L,P-Diaza[2.2.2]Bicyclooctane, *J. Polym. Sci.: Part A-1*, 1970, V. 8, 3495-3501.
219. Bortel E., Kochanowski A., Chloro-ionenes from dichlorides and tertiary diamines *Makromol. Chem.*, 1987, V. 188, 2019-2026.
220. Littmanand E. R., Marvel C. S., Cyclic quaternary ammonium salts from halogenated aliphatic tertiary amines, *J. Am. Chem. Soc.*, 1930, V. 52, 287-294.
221. Tsutsui T., Tanaka R., Tanaka T., Dynamic mechanical properties of some novel ionene polymers, *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.*, 1975, V. 13, 2091-2102.
222. Hagi H., Ooishi O., Tanaka R. Synthesis of linear poly(tertiary amines) by selective dealkylation of poly(quaternary ammonium salt)s. *Pergamon Press*, UK, 1979.
223. Mather B. D., Viswanathan K., Miller K. M., Long T. E. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies, *Prog. Polym., Sci.* 2006, V. 31, 487-531.
224. Michael A. Uber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsaureather zu den Athern ungesattigter Sauren, *Prakt. Chem.*, 1887, V. 35, 349-356.
225. Amiji M. M., Polymeric Gene Delivery Principles and Application: Ferruti P., Franchini J. Poly(amidoamine)s for Gene Delivery, *CRC press*, Boca Raton London, New York, Washington, D.C., 2005.

226. Ferruti P., Poly(amidoamine)s: Past, Present, and perspectives, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2013, V. 51, 2319-2535.
227. Wang R., Zhou L., Zhou Y., Li G., Zhu X., Gu H., Jiang X., Li H., Wu J., He L., Guo X., Zhu B., Ya D., Synthesis and gene delivery of poly(amido amine)s with different branched architecture, *Biomacromolecules*, 2010, V. 11, 489-495.
228. Wang D., Liu Y., Hong C., Pan C., Preparation and Characterization of Novel Hyperbranched Poly(amido amine)s from Michael Addition Polymerizations of Trifunctional Amines with Diacrylamides, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.*, 2005, V. 43, 5127–5137.
229. Lin C., Zhong Z., Lok M. C., Jiang X., Hennink W. E., Feijen J., Engbersen J. F. J., Linear poly(amido amine)s with secondary and tertiary amino groups and variable amounts of disulfide linkages: Synthesis and in vitro gene transfer properties, *J. Control. Release*, 2006, V. 116, 130-137.
230. Martello F., Fenili F., Lattanziano E., Engbersen J.F.J., Ferruti P.. Hyperbranched poly(amidoamine)s containing disulfide linkages in the main chain for DNA transfection, *J. Control. Release.*, 2008, V. 132, 10-12.
231. Liu M., Chen J., Cheng Y., Xue Y., Zhuo R., Huang S., Novel poly(amidoamine)s with pendant primary amines as highly efficient gene delivery vectors, *Macromol. Biosci.*, 2010, V. 10, 384-392.
232. Lin C., Blaauboer C., Timoneda M. M., Lok M. C., van Steenbergen M., Hennink W. E., Zhong Z., Feijen J., Engbersen J. F. J., Bioreducible poly(amido amine)s with oligoamine side chains: Synthesis, characterization, and structural effects on gene delivery, *J. Control. Release*, 2008, V. 126, 166-174.
233. Piest M., Lin C., Mateos-Timoneda M.A., Lok M.C., Hennink W.E., Feijen J., Engbersen F.J., Novel poly(amido amine)s with bioreducible disulfide linkages in their diamino-units: Structure effects and in vitro gene transfer properties, *J. Control. Release*, 2008, V. 130, 38-45.



234. Bernadisiute U., Antanelis T., Vareikis A., Makuska R., Iodination of poly(ethylene glycol) by a mixture of triphenyl phosphite and iodomethane, *Chemija*, 2008. V. 19, 43–49.
235. Makuska R., Synthesis and Characterization of polymers (In Lithuania), 2006, *University Press*, Vilnius.
236. Sataki M., Sethi M. S, Hayaski Y., Iqbal S. A., BioPhysical Chemistry, *Discovery publishing House*, 1997. New Delhi.
237. Reeve W., Erikson, C. M.; Aluotto, P. F., A new method for the determination of the relative acidities of alcohols in alcoholic solutions. The nucleophilicities and competitive reactivities of alkoxides and phenoxides, *Can. J. Chem.*, 1979, V. 57, 2747-2754.
238. Ballinger, P.; Long, F.A., Acid ionization constants of alcohols. II. Acidities of some substituted methanols and related compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, V. 82, 795-798.
239. Wang F., P. Liu, T. Nie, H. Wei, Z. Cui, Characterization of a polyamine microsphere and its adsorption for protein, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, V. 14, 17-29.
240. Gibney K., Sovadinova I., Lopez A. I., Urban M., Ridgway Z., Caputo G. A., Kuroda K., Poly(ethylene imine)s as antimicrobial agents with selective activity, *Macromol Biosci.*, 2012, V. 12, 1279-1289.
241. Jeong J. H., Song S. H., Lim D. W., Lee H., Park T. G., DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline), *J. Control. Release*, 2001, V. 73, 391-399.
242. Ziebarth J. D., Wang Y., Understanding the protonation behavior of linear polyethylenimine in solutions through Monte Carlo simulations, *Biomacromolecules*, 2010, V. 11, 1- 29.
243. Koetz J., Kosmella., Polyelectrolytes and Nanoparticles, *Springer*, New York Heidelberg Dordrecht London 2007.
244. Sharma K. P., Choudhury C. K., Srivastava S., Davis H., Rajamohanam P. R., Roy S., Kumaraswamy G., Assembly of polyethyleneimine in the

- hexagonal mesophase of nonionic surfactant: effect of pH and temperature, *J. Phys. Chem.*, B 2011, V. 115, 9059-9069.
245. Cheng X. J. M., Heller J. P., Petterson K. A., Roberts J. D., 2002, Effect of pH on the rotational conformations of 1,3-diamino-2-hydroxypropane., *Magn. Reson. Chem.*, 2002, V.40, 666-671.
246. Wooley K. L., Hawker C. J., Pachan J. M., Frechet J. M., Physical properties of dendritic macromolecules: a study of glass transition temperature, *Macromolecules*, 1993, V. 26, 1514-1519.
247. Glemzaite M., Balciunaite E., Karvelis T., Gasiunas G., Grusyte M. M., Alzbutas G., Jurcyte A., Anderson E. M., Maksimova E., Smith A. J., Lubys A., Zaliauskiene L., Siksnys V., Targeted gene editing by transfection of in vitro reconstituted *Streptococcus thermophilus* Cas9 nuclease complex. *RNA biology*, 2015, V. 12, 1-4.
248. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R., Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Nature Biotechnol.*, 2004, V. 22, 1393-1398.
249. Kay G., Knott R. M., Cairns D., McCaughan B., A potential new prodrug for the treatment of cystinosis: Design, synthesis and in-vitro evaluation, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 2008, V. 18, 1716–1719.
250. Pinazo A., Diz M., Solans C., Pes M. A., Erra P., Infante M. R., Synthesis and properties of cationic surfactants containing a disulfide bond, *JAOCS*, 1993, V. 70, 37-42.
251. Hartmann L., Borner H. G., Precision polymers: Monodisperse, monomer-sequence-defined segments to target future demands of polymers in medicine, *Adv. Mater.*, 2009, V. 21, 3425-3431.
252. Robinson R. A., Stokes R. H., Electrolyte Solutions, *Butterworth & Co*, London, 1970.
253. Malmstrom E., Hult A., Hyperbranched polymers, *J. Macromol. Sci., Part C: Polym.* 1997, V. 37, 555-557.

254. Onaca O., Enea R., Hughes D. W., Meier W., Stimuli-Responsive polymersomes as nanocarriers for drug and gene delivery. *Macromol. Biosci.*, 2009, V. 9, 129-139.
255. Wright J. L., Jordan M., Wurm F. M., Transfection of partially purified plasmid DNA for high level transient protein expression in HEK293-EBNA cells, *J. Biotechnol.*, 2003, V. 102, 211-221.
256. Bulbas P., Lorence A., Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols, *Springer*, New York Heidelberg Dordrecht London 2004.
257. Godbey W. T., Mikos A. G., Size matter: molecular weight effects the efficiency of poly(ethyleneimine) as gene delivery vehicle, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, V. 45, 268-275.