



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

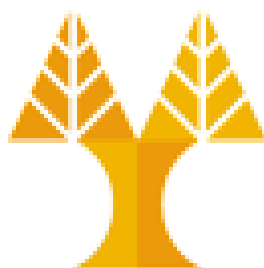
**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΥΔΡΟΦΙΛΩΝ,  
ΚΑΤΙΟΝΤΙΚΩΝ ΒΙΟΪΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΜΙΚΡΟΥ ΠΑΡΕΜΒΑΤΙΚΟΥ RNA**

**Κυριακή Σ. Παφίτη**

**Ερευνητικός Σύμβουλος: Καθηγητής Κώστας Σ. Πατρίκιος**

Μάιος 2011



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΥΔΡΟΦΙΛΩΝ,  
ΚΑΤΙΟΝΤΙΚΩΝ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΜΙΚΡΟΥ ΠΑΡΕΜΒΑΤΙΚΟΥ RNA**

**Κυριακή Σ. Παφίτη**

**Εξεταστική Επιτροπή:**

**Δρ. Αναστάσιος Ι. Τασιόπουλος**, Επίκουρος Καθηγητής (Πανεπιστήμιο Κύπρου, Εσωτερικό Μέλος, Πρόεδρος)

**Δρ. Επαμεινώνδας Λεοντίδης**, Καθηγητής (Πανεπιστήμιο Κύπρου, Εσωτερικό Μέλος)

**Δρ. Κώστας Σ. Πατρίκιος**, Καθηγητής (Πανεπιστήμιο Κύπρου, Εσωτερικό Μέλος, Ερευνητικός Σύμβουλος)

**Δρ. Ερμής Ιατρού**, Αναπληρωτής Καθηγητής (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εξωτερικό Μέλος)

**Δρ. Δημήτρης Γ. Χατζηνικολάου**, Επίκουρος Καθηγητής (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εξωτερικό Μέλος)

*Αφιερωμένο στους γονείς μου Σάββα και Ελένη  
και στην αδελφή μου Μαρία,*

**ΔΗΛΩΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή διεξήχθη από την υποφαινόμενη στο Ερευνητικό Εργαστήριο Επιστήμης Πολυμερών στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κώστα Σ. Πατρίκιου και στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής, Λειτουργίας και Θεραπείας στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου υπό την επίβλεψη του Δρ. Λεωνίδα Α. Φυλακτού.

Οι μετρήσεις Σκέδασης Νετρονίων υπό Μικρή Γωνία (SANS) έγιναν από τον συνεργάτη μας Δρ. Lionel Porcar στο National Institute of Standards and Technology (NIST) στην Αμερική. Η ανάλυση των δεδομένων SANS έγινε από τη Δρ. Έλενα Λοΐζου στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου.

Ημερομηνία.....

Υπογραφή.....

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Μετά το πέρας της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνέβαλαν στην διεκπεραίωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ερευνητικό μου σύμβουλο Καθηγητή Κώστα Σ. Πατρίκιο για τη βοήθεια και την καθοδήγησή του κατά τη διεκπεραίωση της Διδακτορικής μου Διατριβής, καθώς και τον συνεπιβλέποντα Δρ. Λεωνίδα Α. Φυλακτού για όλη τη βοήθεια και καθοδήγησή του όσον αφορά τα πειράματα στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας (ΕΝΙΣΧ/ΠΙΕΝΕΚ/0308/48) για τη χρηματοδότηση μεγάλου μέρους της παρούσας εργασίας.

Θερμά θα ήθελα να ευχαριστώ την Ερευνητικής Ομάδας Επιστήμης Πολυμερών (Πανεπιστήμιο Κύπρου) και συγκεκριμένα τους Θεώνη Γεωργίου, Δημήτρη Καφούρη, Ναταλία Χατζηαντωνίου, Χριστίνα Εφέ, Έλενα Κεπόλα και Ευγενία Παπακωσταντίνου για όλη τη βοήθεια και συμπαράστασή τους. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μαρία Ρίκκου και την Έλενα Κασσή με τις οποίες συνεργάστηκα το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της διεκπεραίωσης της Διδακτορικής μου Διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ομάδα Μοριακής Γενετικής, Λειτουργίας και Θεραπείας (Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου) και συγκεκριμένα τους Νικόλα Μαστρογιανόπουλο, Αντώνη Αντωνίου και Άντρη Κουτσουλίδου για όλη τη βοήθεια και συμπαράστασή τους.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Lionel Porcar και Δρ. Paul Butler για τη διεξαγωγή των πειραμάτων SANS στο NIST, καθώς, και τη Δρ. Έλενα Λοΐζου για την ανάλυση των δεδομένων από τα πειράματα SANS.

Πάνω από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Σάββα και Ελένη και την αδελφή μου Μαρία για όλη τη βοήθεια, υποστήριξη, υπομονή και κατανόηση που επέδειξαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της Διδακτορικής μου Διατριβής.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες μου Έλενα, Άντρη, Λουΐζα και Γεωργία για όλη τη συμπαράστασή τους.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>		
<b>1.1</b>	<b>Στόχος και Καινοτομία</b>	1
<b>1.2</b>	<b>Βιβλιογραφική Ανασκόπηση</b>	2
<b>1.2.1</b>	<b>Ανακάλυψη και Γενικά Χαρακτηριστικά του siRNA</b>	2
1.2.1.1	Μηχανισμός Δράσης του siRNA	2
1.2.1.2	Εφαρμογές του siRNA	4
<b>1.2.2</b>	<b>Μεταφορά siRNA</b>	5
1.2.2.1	Μηχανισμός Μεταφοράς - Φαινόμενο Σφουγγαριού	8
1.2.2.2	<i>Κύριοι Μεταφορείς siRNA, in vitro και in vivo</i>	9
<b>1.2.4</b>	<b>Πολυμερικά Συστήματα</b>	31
1.2.4.1	Αστεροειδή Πολυμερή	31
1.2.4.2	Πλέγματα Πολυμερών	37
1.2.4.2.1	Φθοριωμένα Αμφιφιλικά Πλέγματα	37
1.2.4.2.2	Αμφολυτικά Πλέγματα	39
<b>1.3</b>	<b>Θεωρητικό Υπόβαθρο</b>	41
1.3.1	Επιμόλυνση	41
1.4.1	Μέθοδοι Πολυμερισμού	41
1.4.1.1	Πολυμερισμός Μεταφοράς Ομάδας	42
1.4.1.2	Πολυμερισμός Μεταφοράς Αλυσίδας με Αντιστρεπτή Προσθήκη-Απόσπαση	44
1.4.2	Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών	48
1.4.2.1	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Πηκτής	48
1.4.2.2	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	49
1.4.2.3	Στατική Σκέδαση Φωτός	50
1.4.2.4	Δυναμική Σκέδαση Φωτός	51
1.4.2.5	Νεφελομετρία	52
1.4.2.6	Σκέδαση Νετρονίων υπό Μικρή Γωνία	53
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>		
<b>2.1</b>	<b>Χημικά Αντιδραστήρια</b>	55
<b>2.2</b>	<b>Καθαρισμός Μονομερών και Διαλυτών Πολυμερισμών</b>	57
<b>2.3</b>	<b>Σύνθεση Μονομερούς THPMA, Μορίου Μεταφοράς Αλυσίδας και Διασταυρωτών</b>	58

2.3.1	Σύνθεση Μονομερούς THPMA	58
2.3.2	Σύνθεση Μορίου Μεταφοράς Αλυσίδας 1,4-BTBTPB	58
2.3.3	Σύνθεση και Απομόνωση των Υδρόφιλων Κατιοντικών Διασταυρωτών ΒΜΕΡ και ΒΜΕΜΑ και του Υδρόφοβου Διασταυρωτή ΒΜΜΔ	59
<b>2.4</b>	<b>Σύνθεση Πολυμερών</b>	<b>60</b>
2.4.1	Σύνθεση Γραμμικών Ομοπολυμερών του DMAEMA με GTP	60
2.4.2	Σύνθεση Αστεροειδών Ομοπολυμερών του DMAEMA Βασισμένων στους Διασταυρωτές ΒΜΕΡ, ΒΜΕΜΑ, ΒΜΜΔ και EGDMA με GTP	61
2.4.3	Σύνθεση με Πολυμερισμό RAFT Ημιφθοριωμένων Αμφιφιλικών Πλεγμάτων των DMAEMA-TFEMA Διασυνδεδεμένων στα Άκρα και Αμφολυτικών Πλεγμάτων των DMAEMA-ΜΑΑ Διασυνδεδεμένων στα Άκρα	62
2.4.4	Υδρόλυση Μονάδων THPMA των Αμφολυτικών Πλεγμάτων	64
<b>2.5</b>	<b>Χαρακτηρισμός Γραμμικών και Αστεροειδών Ομοπολυμερών</b>	<b>65</b>
2.5.1	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Πηκτής (GPC)	65
2.5.2	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου ( <sup>1</sup> H-NMR)	65
2.5.3	Στατική Σκέδαση Φωτός (SLS)	65
2.5.4	Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	66
2.5.5	Νεφελομετρία	66
2.5.6	Τιτλοδότηση Υδρογονοϊόντων	66
<b>2.6</b>	<b>Χαρακτηρισμός Πολυμερικών Πλεγμάτων</b>	<b>67</b>
2. 6.1	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Πηκτής (GPC)	67
2. 6.2	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου ( <sup>1</sup> H-NMR)	67
2. 6.3	Ποσοστό Μη-ενσωματωθείσας στα Πλέγματα Μάζας (Extractables)	67
2. 6.4	Βαθμοί Διόγκωσης (ΒΔ) των Πολυμερικών Πλεγμάτων	68
	2.6.4.1 ΒΔ σε Οργανικούς Διαλύτες	68
	2.6.4.2 ΒΔ σε Νερό Συναρτήσει του pH	68
2.6.5	Σκέδαση Νετρονίων υπό Μικρή Γωνία (SANS)	68
<b>2.7</b>	<b>Μεταφορά siRNA με Χρήση Αστεροειδών και Γραμμικών Ομοπολυμερών</b>	<b>69</b>
2.7.1	Ετοιμασία Συμπλόκων Αστεροειδών και Γραμμικών Ομοπολυμερών-siRNA	69
2.7.2	Ετοιμασία Κυττάρων Μυοβλαστών που Εκφράζουν την Πρωτεΐνη EGFP	70
2.7.3	Επιμόλυνση	70
2.7.4	Μέτρηση της Συγκέντρωσης της EGFP και της Τοξικότητας των Πολυμερών	72
<b>2.8</b>	<b>Προσρόφηση RNA στα Πολυμερικά Πλέγματα</b>	<b>73</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>		
<b>3.1</b>	<b>Σύνθεση και Χαρακτηρισμός Νέων Διασταυρωτών</b>	<b>77</b>
3.1.1	Σύνθεση Υδρόφιλου και Κατιοντικού Διασταυρωτή ΒΜΕΡ	77

3.1.2	Σύνθεση Υδρόφιλου και Κατιοντικού Διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ	78
3.1.3	Σύνθεση Υδρόφοβου και Υδρολύμενου Διασταυρωτή ΒΜΜΔ	78
<b>3.2</b>	<b>Σύνθεση Γραμμικών Ομοπολυμερών του DMAEMA</b>	<b>79</b>
3.2.1	Μοριακά Βάρη και Σύσταση	80
3.2.2	Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Μέσα	81
3.2.2.1	Θερμοκρασίες Νεφέλωσης	81
3.2.2.2	Φαινόμενα p <i>K</i> και pH καταβύθισης	82
3.2.3	Εφαρμογή στη Μεταφορά siRNA σε Κύτταρα Θηλαστικών	82
<b>3.3</b>	<b>Σύνθεση Αστεροειδών Ομοπολυμερών</b>	<b>85</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Αστεροειδή Ομοπολυμερή του DMAEMA Βασισμένα στο Διασταυρωτή ΒΜΕΡ</b>	<b>85</b>
3.3.1.1	Μοριακά Βάρη και Σύσταση	86
3.3.1.2	Απόλυτα Μοριακά Βάρη και Αριθμός Βραχιόνων	88
3.3.1.3	Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Μέσα	89
3.3.1.3.1	Υδροδυναμικές Διάμετροι	89
3.3.1.3.2	Θερμοκρασίες Νεφέλωσης	90
3.3.1.3.3	Φαινόμενα p <i>K</i> και pH καταβύθισης	91
3.3.1.4	Εφαρμογή στη Μεταφορά siRNA σε Κύτταρα Θηλαστικών	92
<b>3.3.2</b>	<b>Αστεροειδή Ομοπολυμερή του DMAEMA Βασισμένα στο Διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ</b>	<b>96</b>
3.3.2.1	Μοριακά Βάρη και Σύσταση	96
3.3.2.2	Απόλυτα Μοριακά Βάρη και Αριθμός Βραχιόνων	97
3.3.2.3	Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Μέσα	98
3.3.2.3.1	Υδροδυναμικές Διάμετροι	98
3.3.2.3.2	Θερμοκρασίες Νεφέλωσης	99
3.3.2.3.4	Φαινόμενα p <i>K</i> και pH καταβύθισης	100
3.3.2.4	Εφαρμογή στη Μεταφορά siRNA σε Κύτταρα Θηλαστικών	100
<b>3.3.2</b>	<b>Αστεροειδή Ομοπολυμερή του DMAEMA Βασισμένα στο Διασταυρωτή ΒΜΜΔ</b>	<b>104</b>
3.3.2.1	Μοριακά Βάρη και Σύσταση	105
3.3.2.2	Απόλυτα Μοριακά Βάρη και Αριθμός Βραχιόνων	106
3.3.2.3	Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Μέσα	107
3.3.2.3.1	Υδροδυναμικές Διάμετροι	108
3.3.2.4	Εφαρμογή στη Μεταφορά siRNA σε Κύτταρα Θηλαστικών	108
<b>3.3.3</b>	<b>Αστεροειδή Ομοπολυμερή του DMAEMA Βασισμένα στο Διασταυρωτή EGDMA</b>	<b>110</b>



3.3.3.1	Μοριακά Βάρη και Σύσταση	111
3.3.3.2	Απόλυτα Μοριακά Βάρη και Αριθμός Βραχιόνων	112
3.3.3.3	Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Μέσα	113
3.3.3.3.1	Υδροδυναμικές Διάμετροι	113
3.3.3.3.2	Θερμοκρασίες Νεφέλωσης	114
3.3.3.3.3	Φαινόμενα $pK$ και $pH$ καταβύθισης	115
3.3.3.4	Εφαρμογή στη Μεταφορά siRNA σε Κύτταρα Θηλαστικών	116
<b>3.4</b>	<b>Σύγκριση Αστεροειδών Ομοπολυμερών ως Μεταφορείς siRNA</b>	120
<b>3.5</b>	<b>Σύνθεση Πολυμερικών Πλεγμάτων</b>	125
3.5.1	Σύνθεση Μορίου Μεταφοράς Αλυσίδας 1,4-BTBTPB	125
3.5.2	Σύνθεση Μονομερούς THPMA	126
3.5.3	Προσδιορισμός της Βέλτιστης Αναλογίας Διασταύρωσης	126
<b>3.5.4</b>	<b>Ημιφθοριωμένα Αμφιφιλικά Πλέγματα DMAEMA-TFEMA</b>	128
3.5.4.1	Μοριακά Βάρη, Κατανομές Μοριακών Βαρών και Συστάσεις των Γραμμικών Προπομπών	129
3.5.4.2	Μοριακά Βάρη και Συστάσεις της Μη-Ενσωματωθείσας Πολυμερικής Μάζας	133
3.5.4.3	Βαθμοί Διόγκωσης	134
3.5.4.4	Φαινόμενα $pK$	138
3.5.4.5	Δομή Πλεγμάτων (SANS)	139
3.5.4.6	Προσρόφηση RNA στα Πλέγματα	141
<b>3.6.5</b>	<b>Αμφολυτικά Πλέγματα DMAEMA-MAA</b>	146
3.6.5.1	Μοριακά Βάρη, Κατανομές Μοριακών Βαρών και Συστάσεις των Γραμμικών Προπομπών	147
3.6.5.2	Μοριακά Βάρη και Συστάσεις της Μη-Ενσωματωθείσας Πολυμερικής Μάζας	151
3.6.5.3	Βαθμοί Διόγκωσης	153
3.6.5.4	Ισοηλεκτρικά Σημεία, $pI$	157
3.6.5.5	Δομή Πλεγμάτων (SANS)	158
3.6.5.6	Προσρόφηση RNA στα Πλέγματα	160
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ</b>		
4.1	Συμπεράσματα	164
4.2	Μελλοντική Εργασία	168
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>		169
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</b>		

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή παρουσιάζεται η ανάπτυξη κατιοντικών πολυμερικών συστημάτων για χρήση στην τεχνολογία του siRNA. Το πρώτο μέρος της Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάζει τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό και την αξιολόγηση κατιοντικών γραμμικών και αστεροειδών ομοπολυμερών για μεταφορά siRNA σε κύτταρα θηλαστικών, ενώ το δεύτερο μέρος περιλαμβάνει τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό και την αξιολόγηση αμφιφιλικών και αμφολυτικών πολυμερικών πλεγμάτων σαν συστήματα προσρόφησης RNA. Συνολικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μίας σειράς κατιοντικών γραμμικών ομοπολυμερών, τεσσάρων σειρών υδρόφιλων κατιοντικών αστεροειδών ομοπολυμερών βασισμένων σε νέους διασταυρωτές καθώς και δύο σειρών πολυμερικών πλεγμάτων διασυνδεδεμένων στα άκρα, μίας σειράς αμφολυτικών και μίας σειράς ημιφθοριωμένων αμφιφιλικών.

Η σύνθεση των γραμμικών και αστεροειδών ομοπολυμερών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ελεγχόμενου πολυμερισμού μεταφοράς ομάδας (GTP), ενώ η σύνθεση των πολυμερικών πλεγμάτων με τον πολυμερισμό ριζών μεταφοράς αλυσίδας με αντιστρεπτή προσθήκη-απόσπαση (RAFT). Για τη σύνθεση των αστεροειδών συντέθηκαν δύο νέοι υδρόφιλοι, θετικά ιονιζόμενοι διασταυρωτές η 1,4-δισ(μεθακρυλοϋλοξυαιθυλο)πιπεραζίνη (BMEP) και η δισ(μεθακρυλοϋλοξυαιθυλο)μεθυλαμίνη (BMEMA) και ένας νέος υδρόφοβος υδρολυόμενος διασταυρωτής το 5,5-δισ(μεθακρυλοϋλοξυμεθυλο)-1,3-διοξάνιο (BMMD). Για σκοπούς σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε και ο εμπορικά διαθέσιμος διμεθακρυλικός διεστέρας της αιθυλενογλυκόλης (EGDMA). Σαν μονομερές χρησιμοποιήθηκε ο υδρόφιλος και θετικά ιονιζόμενος μεθακρυλικός 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας (DMAEMA). Για τη σύνθεση των πολυμερικών πλεγμάτων, σαν μονομερή χρησιμοποιήθηκαν το DMAEMA και ο μεθακρυλικός 2,2,2-(τριφθορο)αιθυλεστέρας (TFEMA) για τα ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά, και το DMAEMA και ο μεθακρυλικός 2-τετραϋδροπυρανυλεστέρας (THPMA) για τα αμφολυτικά πλέγματα. Σαν μόριο μεταφοράς αλυσίδας (CTA) χρησιμοποιήθηκε το 1,4-δισ[2-(θειοβενζοϋλοθειο)προπ-2-υλο]βενζόλιο, ενώ σαν μέσο διασταύρωσης το EGDMA.

Τα γραμμικά και τα αστεροειδή ομοπολυμερή με τις πρόδρομες γραμμικές αλυσίδες τους χαρακτηρίστηκαν ως προς τα μοριακά βάρη (MB) και τους δείκτες πολυδιασποράς (ΔΠ) με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (GPC). Τα απόλυτα MB και ο αριθμός βραχιόνων των αστεροειδών ομοπολυμερών προσδιορίστηκαν με στατική σκέδαση φωτός (SLS) όπου παρατηρήθηκε ελάττωση του αριθμού βραχιόνων με αύξηση του ΒΠ τους. Τα

υδατικά διαλύματα των αστεροειδών ομοπολυμερών χαρακτηρίστηκαν ως προς τις υδροδυναμικές τους διαμέτρους με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) όπου έδωσαν αστεροειδή και συσσωματώματα αστεροειδών ομοπολυμερών. Τέλος, οι θερμοκρασίες νεφέλωσης και οι τιμές  $pK$  των αστεροειδών και γραμμικών ομοπολυμερών προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια νεφελομετρίας και τιτλοδότησης υδρογονοϊόντων, αντίστοιχα. Με αύξηση του ΒΠ, οι θερμοκρασίες νεφέλωσης των αστεροειδών ομοπολυμερών αυξάνονταν ενώ των γραμμικών ομοπολυμερών ελατώνονταν. Οι τιμές του  $pK$  όλων των ομοπολυμερών αυξάνονταν ελαφρά με αύξηση του ΒΠ.

Οι πρόδρομες αλυσίδες των πολυμερικών πλεγμάτων χαρακτηρίστηκαν ως προς τα ΜΒ και τη σύστασή τους με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  όπου και επιβεβαιώθηκε η σύνθεσή τους. Έπειτα, προσδιορίστηκε το ποσοστό της μη-ενσωματωθείσας πολυμερικής μάζας των πλεγμάτων το οποίο σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μικρό, επιβεβαιώνοντας έτσι την επιτυχή ενσωμάτωση των γραμμικών αλυσίδων στα πλέγματα. Τα πλέγματα μελετήθηκαν, επίσης, ως προς τους ΒΔ τους σε τετραϋδροφουράνιο, καθαρό νερό και νερό με διάφορα pH (διάφορους βαθμούς ιονισμού). Παρατηρήθηκε ότι όλα τα αμφιφιλικά πλέγματα διογκώνονταν κάτω από pH 7 λόγω της φόρτισης των αμινομάδων του DMAEMA, ενώ οι τιμές  $pK$  (pH για 50% ιονισμό) βρέθηκαν να ελαττώνονται ελαφρώς με την αύξηση της περιεκτικότητας του πλέγματος σε TFEMA. Τα αμφολυτικά πλέγματα παρουσίαζαν ένα χαρακτηριστικό ελάχιστο του ΒΔ σε ενδιάμεσες τιμές pH λόγω της παρουσίας ισοηλεκτρικού σημείου,  $pI$ . Στη συνέχεια, τα πλέγματα χαρακτηρίστηκαν με σκέδαση νετρονίων υπό μικρή γωνία (SANS) όπου για τα αμφιφιλικά πλέγματα με μεγάλο ποσοστό TFEMA παρατηρήθηκε νανοφασικός διαχωρισμός, ενώ, για τα αμφολυτικά πλέγματα, σε καμία περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε τέτοιο φαινόμενο. Περαιτέρω, όλα τα πλέγματα που συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν RNA σε βασικό, όξινο και ουδέτερο περιβάλλον. Από αυτά τα πειράματα παρατηρήθηκε ότι η προσρόφηση του RNA στα πλέγματα καθοριζόταν από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο αρνητικά φορτισμένο RNA και στο θετικά φορτισμένο DMAEMA.

Τέλος, όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να μεταφέρουν siRNA σε κύτταρα μυοβλαστών τα οποία εξέφραζαν σταθερά το γονίδιο της πρωτεΐνης αυξημένου πράσινου φθορισμού (EGFP). Κατά την επιμόλυνση μεταβαλλόταν η ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς στο σύμπλοκο πολυμερούς-siRNA ενώ διατηρείτο σταθερή η ποσότητα του siRNA. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων υπολογίστηκαν τρεις ποσότητες: η καταστολή της έκφρασης της EGFP, η

κυτταροτοξικότητα και η συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης. Για όλα τα αστεροειδή παρατηρήθηκε ότι τόσο η καταστολή της έκφρασης της *EGFP* όσο και η κυτταροτοξικότητα αυξάνονταν με αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς, ενώ η συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης παρουσίαζε διάφορες τάσεις (αύξηση, ελάττωση ή και μέγιστο). Μεταξύ όλων των αστεροειδών πολυμερών, τα αστεροειδή του ΒΜΕΜΑ βρέθηκαν τα περισσότερο αποτελεσματικά και τα λιγότερο τοξικά, ενώ ήταν συγκρίσιμα με το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο Lipofectamine.

Κυριακή Σ. Παφίτη

## **ABSTRACT**

This Ph. D. Thesis presents the development of cationic polymer systems for use in siRNA technology. The first part of the Thesis focuses on the synthesis, characterization and evaluation of cationic linear and star homopolymers for siRNA transfection, while the second part concerns the synthesis and characterization of amphiphilic and ampholytic polymer conetworks which adsorb RNA. In total, one series of cationic linear homopolymers and three series of novel cationic star homopolymers, based on novel cross-linkers as well as one series of end-linked ampholytic polymer conetworks and one series of end-linked semifluorinated amphiphilic polymer conetworks were developed.

The synthesis of the linear and star homopolymers was accomplished using the controlled polymerization technique group transfer polymerization (GTP), while the synthesis of the amphiphilic and ampholytic polymer conetworks was carried out by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. For the star homopolymer synthesis, the novel hydrophilic and positively ionizable cross-linkers 1,4-bis(methacryloyloxyethyl)piperazine (BMEP) and bis(methacryloyloxyethyl)methylamine (BMEMA), as well as the hydrophobic degradable cross-linker BMMD have been synthesized. For comparison, the commercially available cross-linker ethylene glycol dimethacrylate was used. The hydrophilic positively ionizable 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) was employed as the monomer. For the semifluorinated amphiphilic polymer conetworks, DMAEMA and 2,2,2-(trifluoro)ethyl methacrylate (TFEMA) were used as monomers, while for the ampholytic polymer conetworks, DMAEMA and 2-tetrahydropyranyl methacrylate (THPMA) were employed as monomers. The chain transfer agent (CTA) used was 1,4-bis[2-(thiobenzoylthio)prop-2-yl]benzene (1,4-BTBTPB), while EGDMA served as cross-linker.

The resulting linear and star homopolymers and their linear precursors were characterized in terms of their molecular weights (MWs) and polydispersity indices using gel permeation chromatography (GPC). The absolute MWs and the number of arms of all the star homopolymers were evaluated using static light scattering (SLS). The numbers of arms were found to decrease as the arm degree of polymerization (DP) increased. Aqueous solutions of all the star homopolymers were also characterized in terms of their hydrodynamic diameters using dynamic light scattering (DLS), indicating the formation of star polymer aggregates in addition to single star homopolymers. Furthermore, all the linear and star homopolymers were characterized in terms of their cloud points and

effective  $pK_s$  using turbidimetry and hydrogen ion titration, respectively. In particular, the cloud points of the star homopolymers were found to increase with the arm DP, while the cloud points of the linear homopolymers were found to decrease with the arm DP. The effective  $pK_s$  of all the homopolymers were found to slightly increase with the arm DP.

All the conetwork precursors were characterized in terms of their MWs and compositions by GPC and  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. Subsequently, the conetworks were characterized in terms of their extractables which were found to be low, indicating the successful incorporation of the linear precursors to the conetworks. All the conetworks were also characterized for their degrees of swelling (DS) in THF, pure water and in water as a function of the pH. The semifluorinated amphiphilic polymer conetworks began to swell below pH 7 because of the presence of the units of DMAEMA, while their effective  $pK$  values slightly decreased with increasing TFEMA content. The DSs of all the ampholytic conetworks presented a characteristic minimum at intermediate pH values due to the presence of the isoelectric point,  $pI$ , while they increased at acidic and basic pHs. Subsequently, the structure of all the conetworks was studied using small-angle neutron scattering (SANS). The SANS profiles of the amphiphilic polymer conetworks presented peaks, indicating phase separation on nanoscale, while that of the ampholytic polymer conetworks did not present any peaks due to the lack of nanophase separation. In addition, all the conetworks were characterized for their ability to adsorb RNA in neutral, acidic and basic environment. In these experiments it was observed that the RNA adsorption was governed by the electrostatic forces between the negatively charged RNA and the positively charged DMAEMA units.

Finally, all star homopolymers were evaluated for their ability to deliver siRNA to the C2C12 mouse myoblast cell line, expressing the reporter enhanced green fluorescent protein (EGFP). For all star homopolymers, the star polymer loading was varied at a constant siRNA loading. From the experimental results three indicators were calculated: the *EGFP suppression*, the *cell toxicity* and the *siRNA-specific EGFP suppression*. For all the star homopolymers it was observed that both the *EGFP suppression* and the *cell toxicity* increased with star polymer loading. The *siRNA-specific EGFP suppression*, calculated by removing the effect of cell toxicity on EGFP suppression, presented different trends including increase, decrease or maximum. Between all the star homopolymers synthesized in the present work, those based on the BMEMA cross-linker were found to be the most effective and less toxic, while their transfection efficiency was comparable to that of the commercially available transfection reagent Lipofectamine.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου [nuclear magnetic resonance spectroscopy]
<b>2VP</b>	2-βινυλική πυριδίνη [2-vinyl pyridine]
<b>4T1</b>	Καρκινικά κύτταρα μαστού από ποντικό
<b>A549</b>	Καρκινικά κύτταρα πνεύμονα
<b>AA</b>	Ακρυλικό οξύ [acrylic acid]
<b>AC</b>	Οξικός ανυδρίτης [acetic anhydride]
<b>Akt1</b>	Πρωτεϊνική κινάση B
<b>B</b>	Βουταδιένιο [butadiene]
<b>B16F1</b>	Κύτταρα μελανώματος
<b>BA</b>	Ακρυλικός βουτυλεστέρας [butyl acrylate]
<b>BMEMA</b>	Δισ(μεθακρυλοϋλοξυαιθυλο)μεθυλαμίνη [bis(methacryloyloxyethyl) methylamine]
<b>BMEP</b>	1,4-δισ(μεθακρυλοϋλοξυαιθυλο) πιπεραζίνη [1,4-bis(methacryloyloxyethyl) piperazine]
<b>BMMD</b>	5,5-Δισ(μεθακρυλοϋλοξυμεθυλο)-1,3-διοξάνιο [5,5-bis(methacryloyloxy methyl)-1,3-dioxane]
<b>b-PEI</b>	Διακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη [ <i>branched</i> -polyethylenimine]
<b>BzMA</b>	Μεθακρυλικός βενζυλεστέρας [benzyl methacrylate]
<b>CBA</b>	Δισακρυλαμδική κυσταμίνη [cystamine bisacrylamide]
<b>CHD</b>	1,3-κυκλοεξαδιένιο [1,3-cyclohexadiene]
<b>CL</b>	Καπρολακτόνη [caprolactone]
<b>co</b>	Τυχαίο
<b>CT26</b>	Κύτταρα αδenoκαρκινώματος
<b>CTA</b>	Μόριο μεταφοράς αλυσίδας [chain transfer agent]
<b>D</b>	Μεθακρυλικός 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας [2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]
<b>DCC</b>	<i>N,N</i> -δικυκλοεξανυλοκαρβαμίδιο [ <i>N,N</i> -dicyclohexylcarbodiimide]
<b>DEA</b>	Μεθακρυλικός <i>N,N</i> -(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας [ <i>N,N</i> -(diethylamino)ethyl methacrylate]
<b>DEAPA</b>	3-διεθυλαμινο-1-προπυλαμίνη [3-(diethylamino)propylamine]
<b>DHP</b>	2,3-διϋδρο-2-πυράνιο [2,3-dihydro-2 <i>H</i> -pyrane]

<b>DLS</b>	Δυναμική σκέδαση φωτός [dynamic light scattering]
<b>DMAEMA</b>	Μεθακρυλικός (2-διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας [2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]
<b>DMEM</b>	Μέσο ανάπτυξης κυττάρων [Dulbecco's modified eagle's medium]
<b>DMEM-no P/S</b>	Μέσο ανάπτυξης κυττάρων χωρίς αντιβιοτικό [Dulbecco's modified eagle's medium-no penicillin / streptomycin]
<b>DMMAn</b>	Διμεθυλμαλεϊνικός ανυδρίτης [dimethylmaleic anhydrite]
<b>D-PBS</b>	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού [dulbecco's phosphate buffered saline]
<b>DPE</b>	1,1-διφαινυλοαιθυλένιο [1,1-diphenyl ethylene]
<b>DPPH</b>	2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλη [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate]
<b>DVB</b>	Διβυνιλικό βενζόλιο [divinyl benzene]
<b>EA</b>	Ακρυλικός αιθυλεστέρας [ethyl acrylate]
<b>EGDMA</b>	Διμεθακρυλικός διεστέρας της αιθυλενογλυκόλης [ethylene glycol dimethacrylate]
<b>EGFP</b>	Πρωτεΐνη πράσινου αυξημένου φθορισμού [enhanced green fluorescence protein]
<b>EM</b>	Μεθακρυλικός αιθυλεστέρας [ethyl methacrylate]
<b>extractables</b>	Μη ενσωματωθείσα πολυμερική μάζα
<b>F</b>	Φαινυλαλανίνη [phenylalanine]
<b>F<sub>8</sub>H<sub>2</sub>-MA</b>	Μεθακρυλικός 2-οκτυλοφθοροαιθυλεστέρας [2-(perfluorooctyl)ethyl methacrylate]
<b>FBS</b>	Ορός βοοειδούς [fetal bovine serum]
<b>G</b>	Βαθμιδωτά
<b>GAPDH</b>	Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης [glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase]
<b>GPC</b>	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους [gel permeation chromatography]
<b>grad</b>	Βαθμιδωτά
<b>GTP</b>	Πολυμερισμός μεταφοράς ομάδας [group transfer polymerization]
<b>H</b>	Ιστιδίνη [histidine]
<b>H1299</b>	Καρκινικά κύτταρα πνεύμονα
<b>HAc</b>	Ακρυλικός εξυλεστέρας [hexyl acrylate]
<b>Hb<sub>s</sub>Ag</b>	Πρωτεΐνη του ιού της Ηπατίτιδας Β
<b>HEGMA</b>	Μεθακρυλικός εστέρας του μεθυλαιθέρα της εξαιθυλενογλυκόλης



	[hexa(ethylene glycol) methyl ether methacrylate]
<b>HEK239</b>	Ανθρώπινα εμβρυακά κύτταρα νεφρού
<b>HeLA</b>	Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα
<b>HER-2</b>	Πρωτοογκογόνο στον επιδερμικό αναπτυξιακό παράγοντα
<b>HPMA</b>	<i>N</i> -2-(υδροξυπροπυλο)μεθακρυλαμίδιο [ <i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methacrylamide]
<b>HR5-CL11</b>	Παράγωγα καρκινικών κυττάρων HeLA
<b>HT1080</b>	Ανθρώπινα κύτταρα ινοβλαστώματος
<b>HuH7</b>	Ανθρώπινα κύτταρα υπατοκαρκινώματος
<b>IP</b>	Ισοπρένιο [isoprene]
<b>K</b>	Λυσίνη [lysine]
<b>LA</b>	Ακρυλικός δωδεκυλεστέρας [lauryl acrylate]
<b><i>l</i>-PEI</b>	Γραμμική πολυαιθυλενιμίνη [ <i>linear</i> -polyethylenimine]
<b>LRP</b>	Ζωντανός πολυμερισμός ριζών [living radical polymerization]
<b>Luc</b>	Λουσιφεράση [Luciferase]
<b>MA</b>	Ακρυλικός μεθυλεστέρας [methyl acrylate]
<b>MAA</b>	Μεθακρυλικό οξύ [methacrylic acid]
<b>MAPEG</b>	Πολυ(μεθακρυλική $\alpha$ -μεθοξυ αιθυλενογλυκόλη) [ethyleneglycol- $\alpha$ -methoxy, $\omega$ -methacrylate]
<b>MDA-MB-435</b>	Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού
<b>Mel</b>	Μελλιτίνη [melittin]
<b>MSD</b>	Πολυπληθυσμιακής κατανομής μεγεθών [multimodal size distribution]
<b>MTS</b>	1-Μεθοξυ-1-(τριμεθυλοσιλοξυ)-2-μεθυλοπροπένιο [1-methoxy-1-trimethylsiloxy-2-methyl propene]
<b><i>n</i>BMA</b>	Μεθακρυλικός $\kappa$ -βουτυλεστέρας [ <i>n</i> -butyl methacrylate]
<b><i>n</i>BuA</b>	Ακρυλικός $\kappa$ -βουτυλεστέρας [ <i>n</i> -butyl acrylate]
<b>Neuro2A</b>	Ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος
<b>NHS</b>	<i>N</i> -υδροξυ σουλφοσουξιναμίδιο [ <i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimide]
<b>NIH/3T<sub>3</sub></b>	Κύτταρα ινοβλαστών
<b>NVP</b>	<i>N</i> -(βινυλική πυρρολιδίνη) [ <i>N</i> -(vinyl pyrrolidine)]
<b>PAA</b>	Προπυλακρυλικό οξύ [propylacrylic acid]
<b>PAMAM</b>	Πολυ(αμιδοαμίνη) [poly(amidoamine)]
<b>PC3</b>	Καρκινικά κύτταρα προστάτη
<b>PCL</b>	Πολυ( $\epsilon$ -καπρολακτόνη) [poly( $\epsilon$ -cabrolactone)]

<b>PCL/PRF/F</b>	Ανθρώπινα κύτταρα συκωτιού
<b>PEG</b>	Πολυαιθυλενογλυκόλη [poly(ethylene glycol)]
<b>PEGMA</b>	Μεθακρυλικός εστέρας του μεθλαιθέρα της πεντααιθυλενογλυκόλης [penta(ethylene glycol) methyl ether methacrylate]
<b>PEI</b>	Πολυαιθυλενιμίνη [polyethylenimine, PEI]
<b>PEO</b>	Πολυαιθυλενοξείδιο [poly(ethylene oxide)]
<b>P-gI</b>	<i>P</i> -γλυκοπρωτεΐνη [ <i>P</i> -glycoprotein]
<b>PLGA</b>	Συμπολυμερές βασισμένο σε λακτικό και γλυκολιτικό οξύ [poly(D,L-lactide-co-glycolide)]
<b>PLK1</b>	Ογκογενής κινάση I [Polo-like kinase 1]
<b>Poly(DHF)</b>	Πολύ(2,7-(9,9-διεξυλοφλουορένιο)) poly(2,7-(9,9-dihexylfluorene))
<b>PPEEA</b>	Πολυ(2-αμινοαιθυλο αιθυλενοφωσφορικό) [poly(2-aminoethyl ethylene phosphate)]
<b>PPS</b>	Πολυ(προπυλενοσουλφίδιο) [poly(propylene sulfide)]
<b>PPS</b>	Φαινόξυ προπυλενοσουλφίδιο [phenoxy propylene sulfide]
<b>PROP</b>	Προπιονικό οξύ [propionic acid]
<b>PTN</b>	Αναπτυξιακός πλειοτροφικός παράγοντας [pleiotrophin growth factor]
<b>PVA</b>	Πολυ(βινυλική αλκοόλη) [Poly(vinyl alcohol)]
<b>RAFT</b>	Πολυμερισμός αντιστρεπτής προσθήκης-απόσπασης με μεταφορά αλυσίδας [reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization]
<b>RNAαση</b>	Ριβονουκλεάση
<b>ROP</b>	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου [ring opening polymerization]
<b>SANS</b>	Σκέδαση νετρονίων υπό μικρή γωνία [small angle neutron scattering]
<b>siRNA</b>	Μικρό παρεμβατικό RNA [small interfering RNA]
<b>SLS</b>	Στατική σκέδαση φωτός [static light scattering]
<b>St</b>	Στυρένιο [styrene]
<b>SUC</b>	Ηλεκτρικό οξύ [succinic acid]
<b>TBABB</b>	Διβενζοϊκό τετραβουτυλαμμώνιο [tertabutylammonium bibenzoate]
<b>tBuMA</b>	Μεθακρυλικός <i>τριτο</i> -βουτυλεστέρας [ <i>t</i> -butyl methacrylate]
<b>TETA</b>	Τριαιθυλενοτετραμίνη [triethylenetetramine]
<b>TFEMA</b>	Μεθακρυλικός 2,2,2-(τριφθορο)αιθυλεστέρας [2,2,2-(trifluoro)ethyl methacrylate]
<b>THF</b>	Τετραϋδροφουράνιο [tetrahydrofuran]

<b>THPMA</b>	Μεθακρυλικός 2-τετραϋδροπυραυλεστέρας [2-tetrahydropyranyl methacrylate]
<b>TP</b>	Μεθακρυλικός 2-τετραϋδροπυραυλεστέρας [2-tetrahydropyranyl methacrylate]
<b>U87</b>	Κύτταρα γλυοβλαστώματος
<b>VEGF</b>	Αγγειακός ενδοθηλιακός αναπτυξιακός παράγοντας [vascular endothelial growth factor]
<b>VEGF-R2</b>	Υποδοχέας-2 της πρωτεΐνης VEGF [VEGF-receptor 2]
<b>W</b>	Τρυπτοφάνη [tryptofan]
<b>Y</b>	Τυροσίνη [tyrosine]
<b>AIBN</b>	2,2'-αζωδισ(ισοβουτυλονιτρίλιο) [2,2'-azobis(isobutylnitrile)]
<b><math>\beta</math>-gal</b>	$\beta$ -γαλακτοζιτάση [ $\beta$ -galactozitase]
<b>BΔ</b>	Βαθμός διόγκωσης
<b>BI</b>	Βαθμός ιονισμού
<b>BΠ</b>	Βαθμός πολυμερισμού
<b>ΔΠ</b>	Δείκτης πολυδιασποράς
<b>E</b>	Διμεθακρυλικός διεστέρας της αιθυλενογλυκόλης [ethylene glycol dimethacrylate]
<b>ΙΣ</b>	Ισηλεκτρικό σημείο
<b>MB</b>	Μοριακό βάρος

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ**

- Πίνακας 1.1:** Πολυαιθυλενιμίμες που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι σήμερα για μεταφορά siRNA σε διάφορες κυτταροσειρές.
- Πίνακας 1.2:** Χιτοσάνες που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι σήμερα για μεταφορά siRNA σε διάφορες κυτταροσειρές.
- Πίνακας 1.3:** Διάφορα άλλα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά siRNA σε διάφορες κυτταροσειρές.
- Πίνακας 1.4:** Διασπώμενα κατιοντικά πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για μεταφορά siRNA σε διάφορες κυτταροσειρές.
- Πίνακας 1.5:** Μονομερή, μέθοδος πολυμερισμού, τρόπος σύνθεσης και μέθοδοι χαρακτηρισμού των αστεροειδών πολυμερών που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία μέχρι και σήμερα.
- Πίνακας 3.1:** Μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και βαθμοί πολυμερισμού όλων των γραμμικών ομοπολυμερών όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .
- Πίνακας 3.2:** Θερμοκρασίες νεφέλωσης όλων των γραμμικών ομοπολυμερών, όπως προσδιορίστηκαν με νεφελομετρία.
- Πίνακας 3.3:** Τιμές  $pK$  όλων των γραμμικών ομοπολυμερών, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τιτλοδότηση υδρογονοϊόντων.
- Πίνακας 3.4:** Μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και βαθμοί πολυμερισμού βραχιόνων όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMEP, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .
- Πίνακας 3.5:** Απόλυτα μοριακά βάρη και αριθμός βραχιόνων όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMEP, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-SLS.
- Πίνακας 3.6:** Υδροδυναμικές διαμέτροι σε καθαρό και όξινο νερό και μέγιστες θεωρητικές υδροδυναμικές διαμέτροι όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMEP, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με DLS.
- Πίνακας 3.7:** Θερμοκρασίες νεφέλωσης σε καθαρό νερό και σε υδατικό διάλυμα με  $pH$  8 όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMEP, όπως αυτές

- προσδιορίστηκαν με νεφελομετρία.
- Πίνακας 3.8:** Φαινόμενες τιμές  $pK$  και  $pH$  καταβύθισης όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή ΒΜΕΡ, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις υδρογονοϊόντων.
- Πίνακας 3.9:** Μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και ΒΠ βραχιόνων για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή ΒΜΕΡ, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία  $^1H$ -NMR.
- Πίνακας 3.10:** Απόλυτα μοριακά βάρη και αριθμός βραχιόνων όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του ΒΜΕΜΑ, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με SLS.
- Πίνακας 3.11:** Υδροδυναμικές διαμέτροι σε καθαρό και όξινο νερό, καθώς και οι μέγιστες θεωρητικές υδροδυναμικές διαμέτροι όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με DLS.
- Πίνακας 3.12:** Θερμοκρασίες νεφέλωσης σε καθαρό νερό και υδατικό διάλυμα σε  $pH$  8 όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με νεφελομετρία.
- Πίνακας 3.13:** Τιμές  $pK$  και  $pH$  καταβύθισης όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ, όπως προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις υδρογονοϊόντων.
- Πίνακας 3.14:** Μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και ΒΠ βραχιόνων για τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή ΒΜΜΔ, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία  $^1H$ -NMR.
- Πίνακας 3.15:** Απόλυτα μοριακά βάρη και αριθμός βραχιόνων των αστεροειδών ομοπολυμερών του ΒΜΜΔ, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με SLS.
- Πίνακας 3.16:** Υδροδυναμικές διαμέτροι σε όξινο νερό και μέγιστες θεωρητικές υδροδυναμικές διαμέτροι όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή ΒΜΜΔ, όπως προσδιορίστηκαν με DLS.
- Πίνακας 3.17:** Μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και ΒΠ βραχιόνων για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή ΕΓΔΜΑ, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία  $^1H$ -NMR.
- Πίνακας 3.18:** Απόλυτα μοριακά βάρη και αριθμός βραχιόνων για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή ΕΓΔΜΑ, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με

GPC-SLS.

- Πίνακας 3.19:** Υδροδυναμικές διαμέτροι σε καθαρό και όξινο νερό, καθώς και οι μέγιστες θεωρητικές υδροδυναμικές διαμέτροι όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή EGDMA, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με DLS.
- Πίνακας 3.20:** Θερμοκρασίες νεφέλωσης σε καθαρό νερό και υδατικό διάλυμα σε pH 8 όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή EGDMA, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με νεφελομετρία.
- Πίνακας 3.21:** Φαινόμενες τιμές  $pK$  και pH καταβύθισης όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή EGDMA, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις υδρογονοϊόντων.
- Πίνακας 3.22:** Μετατροπές μονομερούς, μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και χρόνος πήξης των πλεγμάτων του ομοπολυμερούς του DMAEMA για διάφορες γραμμομοριακές αναλογίες EGDMA : CTA.
- Πίνακας 3.23:** Μετατροπές μονομερών και διασταυρωτή, μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και συστάσεις όλων των γραμμικών προπομπών των πολυμερικών πλεγμάτων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .
- Πίνακας 3.24:** Ποσοστό, σύσταση και μοριακά βάρη της μη ενσωματωθείσας πολυμερικής μάζας (extractables) των πολυμερικών πλεγμάτων, όπως προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC και  $^1\text{H-NMR}$ .
- Πίνακας 3.25:** Βαθμοί διόγκωσης σε THF όλων των πολυμερικών πλεγμάτων.
- Πίνακας 3.26:** Βαθμοί διόγκωσης σε THF, σε καθαρό και όξινο νερό, καθώς και φαινόμενα  $pK$  των επαναλαμβανόμενων ομάδων του DMAEMA όλων των πολυμερικών πλεγμάτων.
- Πίνακας 3.27:** Τιμές για τα  $q_{\text{μέγιστο}}$  και αποστάσεις μεταξύ των κέντρων σκέδασης σε  $\text{D}_2\text{O}$  όπως αυτά προσδιορίστηκαν με το SANS, καθώς και βαθμοί διόγκωσης σε καθαρό νερό ( $\text{H}_2\text{O}$ ) όλων των πολυμερικών πλεγμάτων.
- Πίνακας 3.28:** Τιμές για το ποσοστό προσρόφησης, το ποσοστό προσρόφησης διά την ξηρή και την υγρή μάζα του πλέγματος, καθώς και τη μεταβολή της συγκέντρωσης διά την ξηρή μάζα του πλέγματος, όπως αυτές υπολογίστηκαν από την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων της προσρόφησης RNA από

όλα τα ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα.

- Πίνακας 3.29:** Μετατροπές μονομερών και διασταυρωτή, μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και συστάσεις όλων των γραμμικών προπομπών των πολυμερικών πλεγμάτων, όπως προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  και GPC.
- Πίνακας 3.30:** Ποσοστό, συστάσεις και μοριακά βάρη των extractables όλων των πολυμερικών πλεγμάτων, όπως προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .
- Πίνακας 3.31:** Βαθμοί διόγκωσης σε THF πριν από την υδρόλυση, σε όξινο νερό μετά από υδρόλυση (σε όξινο pH και ισοηλεκτρικό σημείο) και ισοηλεκτρικά σημεία (pI) όλων των πολυμερικών πλεγμάτων.
- Πίνακας 3.32:** Πειραματικές (από τους βαθμούς διόγκωσης) και μέγιστες θεωρητικές αποστάσεις μεταξύ των πυρήνων του EGDMA, καθώς και βαθμοί διόγκωσης σε  $\text{H}_2\text{O}$  (pH~3.5) των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων.
- Πίνακας 3.33:** Τιμές για το ποσοστό προσρόφησης, το ποσοστό προσρόφησης διά την ξηρή και την υγρή μάζα του πλέγματος, καθώς και τη μεταβολή της συγκέντρωσης ως προς την ξηρή μάζα του πλέγματος, όπως αυτές υπολογίστηκαν από την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων της προσρόφησης RNA από όλα τα αμφολυτικά πλέγματα και τα δύο πλέγματα των ομοπολυμερών.

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΑ**

- Σχήμα 1.1:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του siRNA μέσα στο κυτταρόπλασμα.
- Σχήμα 1.2:** Πιθανή ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PKR) με την ενεργοποίηση γονιδίων υπευθύνων για την έκφραση της ιντερφερόνης.
- Σχήμα 1.3:** Μη-ϊικοί μεταφορείς siRNA.
- Σχήμα 1.4:** Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου του σφουγγαριού (sponge effect).
- Σχήμα 1.5:** Χημικές δομές (α) γραμμικής και (β) διακλαδισμένης PEI.
- Σχήμα 1.6:** Χημικές δομές των αμινοξέων λυσίνης και ιστιδίνης.
- Σχήμα 1.7:** Χημική δομή χιτοσάνης.
- Σχήμα 1.8:** Σχηματική αναπαράσταση δενδριμερών PAMAM 2<sup>ης</sup> γενιάς με πυρήνα τριαιθανολαμίνης και δώδεκα πρωτοταγείς αμινομάδες στην περιφέρεια.
- Σχήμα 1.9:** Χημική δομή κατιοντικών αστεροειδών συμπολυμερών.
- Σχήμα 1.0:** Σχηματική απεικόνιση αστεροειδούς πολυμερούς.
- Σχήμα 1.1:** Σχηματική απεικόνιση διάφορων τύπων αστεροειδών πολυμερών.
- Σχήμα 1.2:** Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων σύνθεσης αστεροειδών πολυμερών “core-first” και “arm-first”.
- Σχήμα 1.3:** Χημικές δομές των ακρυλικών και των μεθακρυλικών μονομερών.
- Σχήμα 1.4:** Μηχανισμός του GTP.
- Σχήμα 1.5:** Χημική δομή του μορίου μεταφοράς αλυσίδας του πολυμερισμού RAFT.
- Σχήμα 1.6:** Στάδια πολυμερισμού RAFT.
- Σχήμα 1.7:** Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού μορίων με τη μέθοδο GPC.
- Σχήμα 3.1:** Ονόματα και χημικές δομές των μονομερών, των διασταυρωτών, των εκκινήτων, του καταλύτη και των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των πολυμερικών συστημάτων.
- Σχήμα 3.2:** Χημική αντίδραση της σύνθεσης του υδρόφιλου διασταυρωτή BMEP.
- Σχήμα 3.3:** Φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR του διασταυρωτή BMEP.



- Σχήμα 3.4:** Χημική αντίδραση της σύνθεσης του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ.
- Σχήμα 3.5:** Φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ.
- Σχήμα 3.6:** Χημική αντίδραση της σύνθεσης του διασταυρωτή ΒΜΜΔ.
- Σχήμα 3.7:** Φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  του διασταυρωτή ΒΜΜΔ.
- Σχήμα 3.8:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των γραμμικών ομοπολυμερών. Με μπλε ανοιχτό φαίνονται οι αλυσίδες του DMAEMA.
- Σχήμα 3.9:** Χρωματογραφήματα GPC-RI των γραμμικών ομοπολυμερών.
- Σχήμα 3.10:** Εξάρτηση της καταστολής της *EGFP*, της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης και της τοξικότητας από την ποσότητα του πολυμερούς υπό σταθερή ποσότητα siRNA για όλα τα γραμμικά ομοπολυμερή.
- Σχήμα 3.11:** Εξάρτηση (α) της καταστολής της έκφρασης της *EGFP* (β) της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης και (γ) της τοξικότητας από το βαθμό πολυμερισμού των γραμμικών ομοπολυμερών με 30 μg γραμμικού ομοπολυμερούς και 0.665 μg siRNA.
- Σχήμα 3.12:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star.
- Σχήμα 3.13:** Χρωματογραφήματα GPC-RI των αστεροειδών ομοπολυμερών DMAEMA-BMEP.
- Σχήμα 3.14:** Χρωματογραφήματα GPC-SLS όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών DMAEMA-BMEP.
- Σχήμα 3.15:** Εξάρτηση της καταστολής της έκφρασης της *EGFP*, της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης και της τοξικότητας από την ποσότητα του πολυμερούς υπό σταθερή ποσότητα siRNA για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή ΒΜΕΡ.
- Σχήμα 3.16:** Εξάρτηση (α) της καταστολής της έκφρασης της *EGFP* (β) της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης και (γ) της τοξικότητας από το βαθμό πολυμερισμού του βραχίονα των αστεροειδών ομοπολυμερών του ΒΜΕΡ για τα 30 μg αστεροειδούς ομοπολυμερούς και 0.665 μg siRNA.
- Σχήμα 3.17:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star.

- Σχήμα 3.18:** Χρωματογραφήματα GPC-RI των αστεροειδών ομοπολυμερών και των γραμμικών προπομπών τους για τη σειρά αστεροειδών με διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ.
- Σχήμα 3.19:** Χρωματογραφήματα GPC-SLS όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ.
- Σχήμα 3.20:** Εξάρτηση της καταστολής της έκφρασης της *EGFP*, της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης και της τοξικότητας από την ποσότητα του πολυμερούς υπό σταθερή ποσότητα siRNA για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ.
- Σχήμα 3.21:** Εξάρτηση (α) της καταστολής της έκφρασης της *EGFP* (β) της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης και (γ) της τοξικότητας από το βαθμό πολυμερισμού του βραχίονα των αστεροειδών ομοπολυμερών του ΒΜΕΜΑ για τα 30 μg αστεροειδούς ομοπολυμερούς και 0.665 μg siRNA.
- Σχήμα 3.22:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star.
- Σχήμα 3.23:** Χρωματογραφήματα GPC-RI των αστεροειδών ομοπολυμερών και των γραμμικών προπομπών τους για τη σειρά του ΒΜΜD.
- Σχήμα 3.24:** Χρωματογραφήματα GPC-SLS των αστεροειδών ομοπολυμερών του DMAEMA με διασταυρωτή ΒΜΜD.
- Σχήμα 3.25:** Πολυμερισμοί και υδρόλυση του διασταυρωτή ΒΜΜD.
- Σχήμα 3.26:** Εξάρτηση της καταστολής της έκφρασης της *EGFP*, της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης και της τοξικότητας από την ποσότητα του πολυμερούς υπό σταθερή ποσότητα siRNA για το αστεροειδές ομοπολυμερές DMAEMA<sub>10</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star.
- Σχήμα 3.27:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star.
- Σχήμα 3.28:** Χρωματογραφήματα GPC-RI των αστεροειδών ομοπολυμερών και των γραμμικών προπομπών τους για τη σειρά του ΕΓDΜΑ.
- Σχήμα 3.29:** Χρωματογραφήματα GPC-SLS όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του ΕΓDΜΑ.

- Σχήμα 3.30:** Εξάρτηση της καταστολής της έκφρασης της *EGFP*, της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης και της τοξικότητας από την ποσότητα του πολυμερούς υπό σταθερή ποσότητα siRNA για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή EGDMA.
- Σχήμα 3.31:** Εξάρτηση (α) της καταστολής της έκφρασης της *EGFP* (β) της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης και (γ) της τοξικότητας από το βαθμό πολυμερισμού του βραχίονα των αστεροειδών ομοπολυμερών του EGDMA για τα 30 μg αστεροειδούς ομοπολυμερούς και 0.665 μg siRNA.
- Σχήμα 3.32:** Βέλτιστη συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης για κάθε ΒΠ βραχίονα για όλες τις σειρές αστεροειδών ομοπολυμερών που συντέθηκαν.
- Σχήμα 3.33:** Τιμές τοξικότητας για τις τιμές της βέλτιστης συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης για κάθε ΒΠ βραχίονα για όλες τις σειρές αστεροειδών ομοπολυμερών που συντέθηκαν.
- Σχήμα 3.34:** Χημικές αντιδράσεις σύνθεσης του CTA 1,4-BTBTPB.
- Σχήμα 3.35:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του CTA 1,4-BTBTPB σε  $\text{CDCl}_3$ .
- Σχήμα 3.36:** Αντίδραση σύνθεσης του μονομερούς THPMA.
- Σχήμα 3.37:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του THPMA σε  $\text{CDCl}_3$ .
- Σχήμα 3.38:** Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας σύνθεσης του πολυμερικού πλέγματος EGDMA<sub>3-grad</sub>-TFEMA<sub>25-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>25-grad</sub>-EGDMA<sub>3</sub>.
- Σχήμα 3.39:** Χρωματογραφήματα GPC όλων των γραμμικών προπομπών (ομοπολυμερών και τριαδρομερών συμπολυμερών) των πολυμερικών πλεγμάτων.
- Σχήμα 3.40:** Φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  (α) του ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>50</sub> και (β) του τριαδρομερούς συμπολυμερούς TFEMA<sub>25-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>25</sub>.
- Σχήμα 3.41:** Βαθμοί διόγκωσης και βαθμοί ιονισμού συναρτήσεως του pH για όλα τα αμφιφιλικά πολυμερικά πλέγματα.
- Σχήμα 3.42:** Βαθμοί διόγκωσης των πολυμερικών πλεγμάτων σε THF, σε καθαρό νερό και νερό χαμηλού pH σε σχέση (α) την σύσταση του αμφιφιλικού πλέγματος και (β) την αρχιτεκτονική του αμφιφιλικού πλέγματος.

- Σχήμα 3.43:** Προφίλ SANS όλων των πλεγμάτων σε D<sub>2</sub>O. (α) Επίδραση της σύστασης του πολυμερικού πλέγματος. (β) Επίδραση της αρχιτεκτονικής του πολυμερικού πλέγματος.
- Σχήμα 3.44:** Καμπύλη βαθμονόμησης RNA: απορρόφηση διαλυμάτων RNA στα 258.5 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης.
- Σχήμα 3.45:** Συγκέντρωση RNA προς την ξηρή μάζα πλέγματος συναρτήσει του χρόνου για όλα τα ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα: (α) σε ουδέτερο και (β) σε όξινο pH.
- Σχήμα 3.46:** Ποσοστό προσρόφησης RNA συναρτήσει (α) της σύστασης και (β) της αρχιτεκτονικής των ημιφθοριωμένων αμφιφιλικών πλεγμάτων.
- Σχήμα 3.47:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του πολυμερικού πλέγματος βασισμένου στο ABA τριαδρομερές συμπολυμερές THPMA<sub>25</sub>-grad-DMAEMA<sub>50</sub>-grad-THPMA<sub>25</sub>.
- Σχήμα 3.48:** Χρωματογραφήματα GPC των ομοπολυμερών και τριαδρομερών συμπολυμερών των γραμμικών προπομπών των πολυμερικών πλεγμάτων.
- Σχήμα 3.49:** Φάσματα <sup>1</sup>H-NMR (α) του γραμμικού ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>50</sub> και (β) του τριαδρομερούς συμπολυμερούς THPMA<sub>25</sub>-grad-DMAEMA<sub>50</sub>-grad-THPMA<sub>25</sub>.
- Σχήμα 3.50:** Βαθμοί διόγκωσης συναρτήσει του pH όλων των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων και των πλεγμάτων των ομοπολυμερών.
- Σχήμα 3.51:** Βαθμοί διόγκωσης των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων στο χαμηλό, ψηλό και ισοηλεκτρικό pH. (α) Επίδραση της σύστασης του πολυαμφολυτικού πλέγματος. (β) Επίδραση της δομής του πολυαμφολυτικού πλέγματος.
- Σχήμα 3.52:** Προφίλ SANS όλων των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων σε D<sub>2</sub>O σε pH=3.0. (α) Επίδραση της σύστασης του πολυαμφολυτικού πλέγματος. (β) Επίδραση της αρχιτεκτονικής του πολυαμφολυτικού πλέγματος.
- Σχήμα 3.53:** Συγκέντρωση RNA προς την ξηρή μάζα πλέγματος συναρτήσει του χρόνου για όλα τα αμφολυτικά πλέγματα: (α) σε ουδέτερο και (β) σε όξινο pH.
- Σχήμα 3.54:** Ποσοστό προσρόφησης RNA συναρτήσει (α) της σύστασης και (β) της αρχιτεκτονικής των αμφολυτικών πλεγμάτων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Στόχος και Καινοτομία

Στόχος της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής είναι η ανάπτυξη μοντέρνων βιοϋλικών με βάση καλώς-ορισμένα κατιοντικά πολυμερή. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η αξιολόγηση μίας σειράς συνθετικών γραμμικών ομοπολυμερών και τεσσάρων σειρών αστεροειδών ομοπολυμερών βασισμένων σε νέους διασταυρωτές ως συστήματα μεταφοράς siRNA σε κύτταρα θηλαστικών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας προσρόφησης RNA από δύο σειρές πολυμερικών πλεγμάτων διασυνδεδεμένων στα άκρα.

Η πρωτοτυπία της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έγκειται στη χρήση αστεροειδών πολυμερών ως συνθετικά οχήματα μεταφοράς siRNA σε κύτταρα θηλαστικών (*in vitro*). Τα αστεροειδή πολυμερή, αν και παρουσιάζουν κάποιες ομοιότητες με τη δομή των δενδριμερών πολυμερών τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για μεταφορά γονιδίων, στο παρελθόν, η δομή των αστεροειδών πολυμερών δεν έχει ακόμα διερευνηθεί επαρκώς. Η ερευνητική μας Ομάδα έχει στο παρελθόν χρησιμοποιήσει αστεροειδή πολυμερή για μεταφορά DNA με πολύ καλά αποτελέσματα. Σε εκείνα τα πειράματα επιμόλυνσης παρατηρήθηκε ότι τα αστεροειδή πολυμερή δεν ήταν αρκετά διαλυτά σε υδατικά μέσα. Έτσι, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν νέοι υδρόφιλοι διασταυρωτές για αύξηση της υδροφιλικότητας των αστεροειδών πολυμερών. Οι διασταυρωτές αυτοί αποτελούν στοιχείο καινοτομίας. Τα μόρια αυτά, πέραν από τον υδρόφιλο χαρακτήρα που προσδίδουν στα αστεροειδή πολυμερή, ενισχύουν περαιτέρω το θετικό συνολικό φορτίο τους, αφού φέρουν άτομα αζώτου τα οποία μπορούν να φορτιστούν θετικά σε κατάλληλες συνθήκες.

Εκτός από τους δύο νέους υδρόφιλους και θετικά ιονιζόμενους διασταυρωτές, συντέθηκε και ένας υδρόφοβος υδρολύομενος διασταυρωτής ο οποίος αποτελεί ένα πρόσθετο στοιχείο καινοτομίας. Ο διασταυρωτής αυτός μπορεί να υδρολύεται στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας έτσι στην ευκολότερη απελευθέρωση του siRNA.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή έχουν συντεθεί και δύο σειρές κατιοντικών πολυμερικών πλεγμάτων διασυνδεδεμένων στα άκρα. Συγκεκριμένα, συντέθηκε μία σειρά ημιφθοριωμένων αμφιφιλικών πολυμερικών πλεγμάτων και μία σειρά αμφολυτικών πολυμερικών πλεγμάτων. Η σύνθεση των πλεγμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε σε μία προσπάθεια διερεύνησης και άλλων κατιοντικών συστημάτων για μεταφορά siRNA. Ως

πρώτο βήμα, τα συστήματα αυτά αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν RNA σε διάφορα pH. Στοιχείο καινοτομίας για τις δύο αυτές σειρές πολυμερικών πλεγμάτων αποτελεί η καλώς-ορισμένη δομή τους, η οποία δημιουργήθηκε με τη χρήση μίας ελεγχόμενης μεθόδου πολυμερισμού. Να σημειωθεί ότι στη βιβλιογραφία αν και δίνονται αρκετά παραδείγματα τόσο ημιφθοριωμένων όσο και αμφολυτικών πλεγμάτων, ελάχιστες είναι οι περιπτώσεις στις οποίες υπάρχει επαρκής έλεγχος της δομής.

## 1.2 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

### 1.2.1 Ανακάλυψη και Γενικά Χαρακτηριστικά του siRNA

Η επιτυχημένη μεταφορά γενετικού υλικού σε κύτταρα και οργανισμούς αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της λειτουργίας γονιδίων (γενετική έκφραση) και το σχεδιασμό θεραπευτικών στρατηγικών για πολλές ασθένειες (γενετική θεραπεία). Η μεταφορά μικρού παρεμβατικού RNA (small interfering RNA, siRNA) αποτελεί μία πολύ υποσχόμενη προσέγγιση τόσο στη μελέτη της γενετικής έκφρασης όσο και στη γενετική θεραπεία.<sup>[1,2]</sup>

Η παρεμβολή RNA (RNA interference, RNAi) είναι ένα φαινόμενο που προκαλεί τη μεταγραφική σίγηση ενός γονιδίου μετά από ενδογενή παραγωγή ή από εισαγωγή στο κύτταρο ενός μικρομοριακού siRNA με αλληλουχία συμπληρωματική με αυτή του γονιδίου. Το φαινόμενο της σίγησης ενός γονιδίου (μηχανισμός δράσης του siRNA) ανακαλύφθηκε το 1998 από τους Fire και Mello<sup>[3]</sup> στο νηματοειδή σκώληκα (*Caenorhabditis elegans*), και επιβραβεύτηκε το 2006 με την απονομή του Βραβείου Nobel Ιατρικής. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί ένα φυσικό, αρχέγονο αμυντικό μηχανισμό με τον οποίο τα φυτά και τα κατώτερα σπονδυλωτά καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων όταν απαντώνται στο κύτταρο δίκλινα μόρια RNA της ίδιας αλληλουχίας. Ο μηχανισμός αυτός απαντάται σε όλα τα μέλη του ζωϊκού βασιλείου. Στα κύτταρα των θηλαστικών αυτός έχει αντικατασταθεί από άλλους πιο εξελιγμένους αμυντικούς μηχανισμούς.

#### 1.2.1.1 Μηχανισμός Δράσης του siRNA

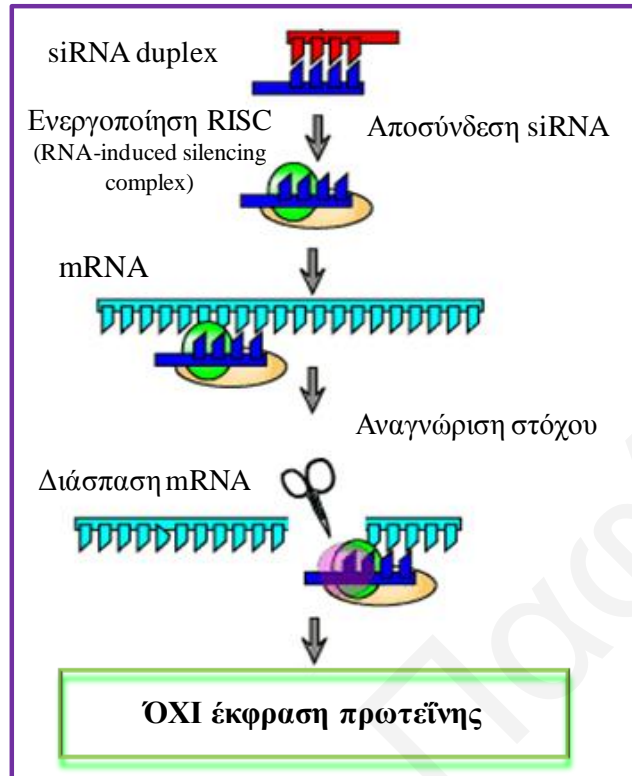
Το siRNA αποτελείται από μικρά κομμάτια δίκλωνου RNA ~19-25 νουκλεοτιδίων με 2-3 νουκλεοτίδια προεξέχοντα στα 3' άκρα.

Η γονιδιακή σίγηση μέσω της οδού του RNAi ενεργοποιείται από την ύπαρξη ενός δίκλωνου μορίου RNA. Σημαίνοντα ρυθμιστικό ρόλο στην οδό της RNAi έχει το

πρωτεϊνικό σύμπλοκο σίγησης που επάγεται από τα μόρια RNA (RNA-induced silencing complex, RISC). Το RISC αποτελείται από ειδικές πρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια Argonaute. Το έναυσμα για τη συναρμολόγηση του RISC δίνεται από τα μικρά δίκλιωνα μόρια RNA (19-30 νουκλεοτιδίων) που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Αυτά αλληλεπιδρούν με ένα από τα καταλυτικά συστατικά του RISC οδηγώντας στη διάσπαση των δίκλωνων μορίων του siRNA.<sup>[4,5]</sup>

Αναλυτικότερα, ο μηχανισμός του RNAi φαίνεται στο Σχήμα 1.1. Αρχικά στο μηχανισμό του RNAi συμμετέχει το ένζυμο Dicer το οποίο καταλύει τη διάσπαση μεγάλων δίκλωνων RNA (dsRNA) σε μικρά κομμάτια μήκους 19-30 ζευγών βάσεων τα οποία αποτελούν τα τμήματα του siRNA. Το ένζυμο Dicer ανήκει στην οικογένεια των RNAασών III οι οποίες είναι ριβονουκλεάσες εξειδικευμένες στην κατάλυση dsRNAs. Στη συνέχεια, το siRNA αλληλεπιδρά με το RISC οδηγώντας έτσι στη διάσπαση της δίκλωνης αλληλουχίας του siRNA. Ένας από τους κλώνους του siRNA, ο πρότυπος ή αντι-νοηματικός (template ή anti-sense) κλώνος, παραμένει προσδεδωμένος στο σύμπλοκο του RISC. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο του RNA-RISC εντοπίζει τη συμπληρωματική αλληλουχία του mRNA, η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και υβριδίζεται σε αυτή προάγοντας τη διάσπασή της και αποτρέποντας έτσι τη μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνη.<sup>[2]</sup> Συγκεκριμένα, η διάσπαση της αλληλουχίας του mRNA καταλύεται από ένα συστατικό του RISC, την πρωτεΐνη Argonaute-2 (Ago-2), η οποία διασπά την αλληλουχία του mRNA σε μία καθορισμένη θέση ενώ, ακολουθεί η πλήρης αποικοδόμηση του mRNA από τη δράση των κυτταρικών RNAασών (ριβονουκλεάσες).<sup>[4,5]</sup>

Να σημειωθεί ότι στα θηλαστικά κύτταρα η επαγωγή του μηχανισμού της RNAi πυροδοτείται και από ενδογενή αντίγραφα micro-RNA (miRNA) που καταλύονται από την πολυμεράση II με μήκος 21-23 ζεύγη βάσεων. Τα μόρια αυτά κατευθύνουν την αποικοδόμηση της συμπληρωματικής αλληλουχίας mRNA, αναστέλλοντας έτσι την παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, πρόδρομα miRNA προσδένονται στο κυτταρόπλασμα διάμεσου του Dicer και AGO2-RISC σύμπλοκου, αναγνωρίζοντας τις περιοχές στόχου στο mRNA αναστέλλοντας έτσι την παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης.



**Σχήμα 1.1:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του siRNA μέσα στο κυτταρόπλασμα.

### 1.2.1.2 Εφαρμογές του siRNA

Η τεχνολογία του siRNA σε κύτταρα και οργανισμούς μπορεί να εφαρμοστεί για τη μελέτη της έκφρασης και λειτουργίας ενός γονιδίου και της πρωτεΐνης που εκφράζει, αλλά και για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, γενετικών ή επίκτητων.

Η χρήση της τεχνολογίας του siRNA χρησιμοποιείται τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες μίας ή περισσότερων πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, με χρήση του siRNA καθίσταται δυνατή η διερεύνηση του ρόλου των πρωτεϊνών σε πολυσύνθετα κυτταρικά φαινόμενα. Τέτοια φαινόμενα είναι η μελέτη πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος. Εξέχοντα ρόλο για αυτή τη λειτουργία της μεταγωγής σήματος κατέχουν οι κινάσες. Ένα παράδειγμα αναφέρεται από τους Gzarderna και συνεργάτες<sup>[6]</sup> οι οποίοι, χρησιμοποιώντας το siRNA, μείωσαν την έκφραση της υπομονάδας 110β της P1-3-κινάσης, μειώνοντας έτσι σε σημαντικό βαθμό την ικανότητα διήθησης των καρκινικών κυττάρων. Μελετήθηκαν, επίσης, πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Σε μία μελέτη οι Stucke και συνεργάτες<sup>[7]</sup> μελέτησαν και απέδειξαν ότι η δράση μίας συγκεκριμένης κινάσης είναι απαραίτητη για το σχηματισμό της ατράκτου, ενώ απέδειξαν ταυτόχρονα ότι η κινάση αυτή δεν παίζει ρόλο στο διπλασιασμό του



κεντροσωματίου. Οι Mattson και Camandola<sup>[8]</sup> μελέτησαν την παραγωγή πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στον κυτταρικό θάνατο μέσω της μελέτης του αποπτωτικού γονιδίου p53. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν πρωτεΐνες οι οποίες συμβάλλουν στην κυτταρική ανάπτυξη και κινητικότητα.<sup>[9]</sup> Τέλος, πολλοί ερευνητές ασχολήθηκαν με τη μελέτη των πρωτεϊνών που παράγονται από την εισβολή ιών στα κύτταρα, όπως των ιών του HIV-1.<sup>[10]</sup>

Η ανακάλυψη το 2001<sup>[11]</sup> και το 2002<sup>[12]</sup> ότι το siRNA δρά στα κύτταρα των θηλαστικών αποτέλεσε την απαρχή για τη χρήση του για θεραπευτικούς σκοπούς.<sup>[13,14]</sup> Συγκεκριμένα, η χρήση της τεχνολογίας του siRNA εντοπίζεται σε ασθένειες στις οποίες η σίγηση ενός ή περισσοτέρων γονιδίων θα μπορούσε να επιβραδύνει ή να σταματήσει την πρόοδο της ασθένειας. Τέτοιες περιπτώσεις νοσημάτων αφορούν μεταλλάξεις στο γονιδίωμα οι οποίες προκαλούν τροποποίηση της λειτουργίας μίας πρωτεΐνης ή ακόμα και περιπτώσεις κακοηθειών που οφείλονται στην υπερέκφραση πρωτο-ογκογονιδίων. Μερικά παραδείγματα είναι ο καρκίνος,<sup>[15]</sup> οι καρδιαγγειακές νόσοι,<sup>[16]</sup> η νόσος του Parkinson,<sup>[17]</sup> η νόσος του Alzheimer,<sup>[18]</sup> η μυική δυστροφία<sup>[21]</sup> καθώς και οι λοιμώδεις νόσοι όπως η γρίπη,<sup>[19]</sup> το AIDS<sup>[20]</sup> και η ηπατίτιδα.<sup>[22]</sup>

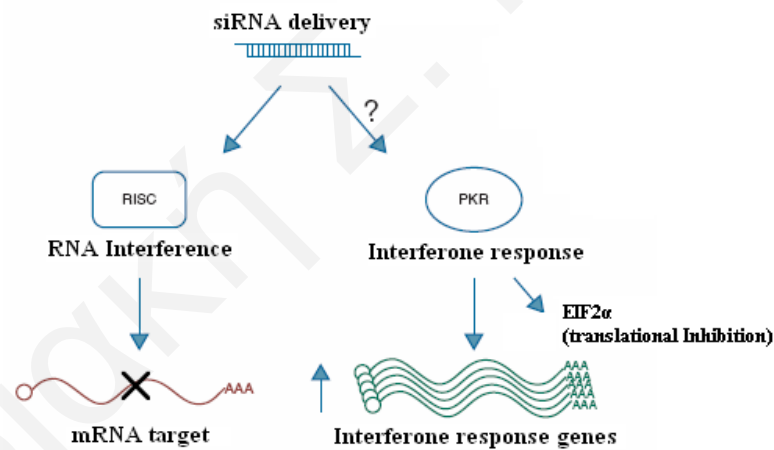
Στις μέρες μας βρίσκονται σε εξέλιξη διάφορες κλινικές μελέτες<sup>[23]</sup> με χρήση siRNA από πολλές εταιρίες οι οποίες αφορούν την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. Η πρώτη κλινική μελέτη αφορά την αντιμετώπιση του γεροντικού εκφυλισμού της ωχράς κυλίδας του ματιού (age-related macular degeneration, AMD)<sup>[24]</sup> η οποία στις μέρες μας επηρεάζει 1.6 εκατομμύρια ανθρώπους μόνο στις ΗΠΑ. Σήμερα οι μελέτες για αυτή την ασθένεια βρίσκονται στην τρίτη φάση. Άλλες κλινικές μελέτες αφορούν την αντιμετώπιση της μόλυνσης από τον αναπνευστικό συγκυτταρικό ιό (respiratory syncytial virus, RSV) καθώς και τον ιό της ηπατίτιδας Β, όπου βρίσκονται στο δεύτερο και πρώτο στάδιο, αντίστοιχα. Τέλος, στην πρώτη φάση βρίσκονται και κλινικές μελέτες που αφορούν την αντιμετώπιση στερεών όγκων (solid tumors).

### 1.2.2 Μεταφορά siRNA

Η επιτυχής μεταφορά του siRNA σε κύτταρα και οργανισμούς αποτελεί το σημαντικότερο βήμα για την εφαρμογή της τεχνολογίας του siRNA. Η απευθείας εισαγωγή του siRNA παρουσιάζει διάφορα προβλήματα όπως είναι η χαμηλή διαπερατότητά του, αφού τόσο το ίδιο όσο και η κυτταρική μεμβράνη είναι αρνητικά φορτισμένα με αποτέλεσμα να απωθούνται, ενώ ταυτόχρονα το siRNA παρουσιάζει

μικρή σταθερότητα απέναντι σε διάφορα υδρολυτικά ένζυμα (π.χ. RNAάσες) τα οποία φυσιολογικά υπάρχουν στο αίμα.<sup>[25]</sup>

Περαιτέρω, η εισαγωγή του siRNA *in vivo* προκαλεί επίσης πρόκληση ανοσοποιητικής απόκρισης από τον οργανισμό. Το ανοσοποιητικό σύστημα στηρίζεται από μία σειρά από μόρια υποδοχέων, τα οποία αναγνωρίζουν κάποια συμπληρωματικά παθογόνα μόρια, προκαλώντας διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις για αντιμετώπιση των μορίων αυτών. Όταν τμήματα του siRNA εισέρχονται στο κύτταρο, αυτά ενεργοποιούν μία σειρά από μόρια υποδοχέων συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεϊνικής κινάσης PKR. Η ενεργοποίηση της PKR έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας σειράς (cascade) βημάτων τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση κάποιων γονιδίων για παραγωγή της πρωτεΐνης της ιντερφερόνης. Η PKR ενεργοποιεί επίσης το μεταφραστικό παράγοντα eIF2 $\alpha$ , ο οποίος αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών. Όταν το σύστημα της ιντερφερόνης είναι αποτελεσματικά ενεργοποιημένο, το κύτταρο καταστέλλει όλες τις λειτουργίες του, με αποτέλεσμα να οδηγείται στην απόπτωση και τελικά στο θάνατο (Σχήμα 1.2).



**Σχήμα 1.2:** Πιθανή ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PKR) με την ενεργοποίηση γονιδίων υπευθύνων για την έκφραση της ιντερφερόνης.

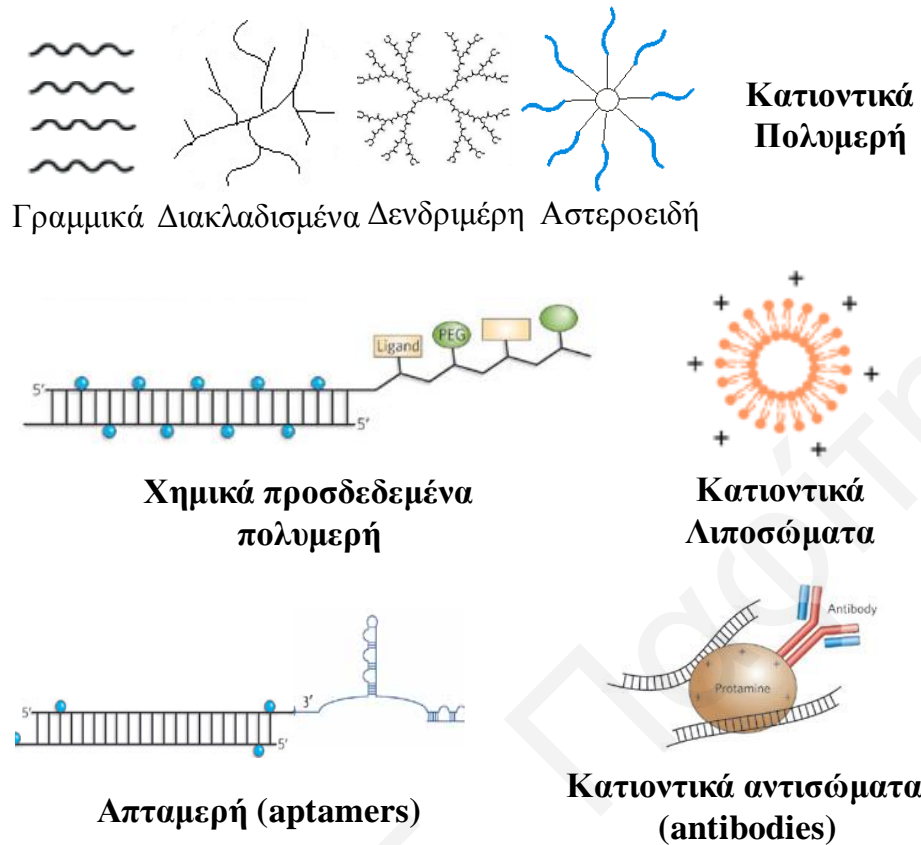
Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερη ποσότητα siRNA ενισχύει περισσότερο την ενεργοποίηση της ιντερφερόνης.<sup>[13]</sup>

Η λανθασμένη αναγνώριση του στόχου αποτελεί επίσης ένα σημαντικό πρόβλημα. Τα νουκλεϊνικά οξέα έχουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία η οποία έχει μία εξειδικευμένη συμπληρωματική αλυσίδα. Μία βάση ή μία μικρή αλληλουχία βάσεων, όταν δεν ενωθεί με την κατάλληλη συμπληρωματική αλυσίδα, δεν οδηγεί σε ολοκληρωτικό υβριδισμό των βάσεων, καταστρέφοντας έτσι τη δράση του siRNA.<sup>[13]</sup>

Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της απευθείας μεταφοράς του siRNA, οι επιστήμονες χρησιμοποίησαν ιϊκούς και μη ιϊκούς μεταφορείς. Στους ιϊκούς μεταφορείς συμπεριλαμβάνονται οι ρετροϊοί (retroviruses), οι αδενοϊοί (adenoviruses) και οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί (adeno-associated viruses, AAV). Οι ρετροϊοί ενσωματώνουν ιϊκό γονιδίωμα στο οποίο έχει μεταφερθεί συγκεκριμένος κώδικας αντιγόνου μέσα στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή και αντιγράφονται μέσα σε αυτό. Παρόλο που οι ρετροϊοί παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες, η μεταφορά του γονιδιώματός τους στο κύτταρο-ξενιστή μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του τελευταίου με πιθανότητα καρκινογένεσης. Οι αδενοϊοί χρησιμοποιούνται κυρίως για γονιδιακή θεραπεία ενάντια σε καρκινικά κύτταρα (όγκους). Η γενετική πληροφορία που φέρει ο αδενοϊός διαδίδεται έξω από τον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή με αποτέλεσμα η γενετική πληροφορία να μη διατηρείται σταθερή, ενώ υπάρχει και ο κίνδυνος να χαθεί μέσα από τις επαναλαμβανόμενες διαιρέσεις του κυττάρου. Οι αδενοϊοί προκαλούν επίσης ανοσοποιητική απόκριση από τον οργανισμό. Τέλος, οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί αν και δεν είναι παθογόνοι ιοί και ούτε αλλοιώνουν το γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή, προκαλούν απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος ενώ παρουσιάζουν ταυτόχρονα μικρή χωρητικότητα μεταφοράς.<sup>[26]</sup>

Στους μη-ιϊκούς μεταφορείς συγκαταλέγονται τα κατιοντικά πολυμερή, τα πολυμερή (κατιοντικά και μη) με χημικά προσδεδεμένο το siRNA, τα κατιοντικά λιπίδια και λιποσώματα, τα απταμερή και τα κατιοντικά αντισώματα (Σχήμα 1.3).<sup>[27]</sup> Όσον αφορά τα κατιοντικά πολυμερή, έχουν χρησιμοποιηθεί (*in vitro* και *in vivo*) πολυμερή με διάφορες αρχιτεκτονικές δομές όπως γραμμικά, διακλαδισμένα και δενδριμερή, ενώ σε μία περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν αστεροειδή πολυμερή.

Τα κατιοντικά πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για μεταφορά του siRNA θα παρουσιαστούν εκτενώς στις επόμενες παραγράφους, ενώ θα γίνει ταυτόχρονα και αναφορά στα άλλα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν.

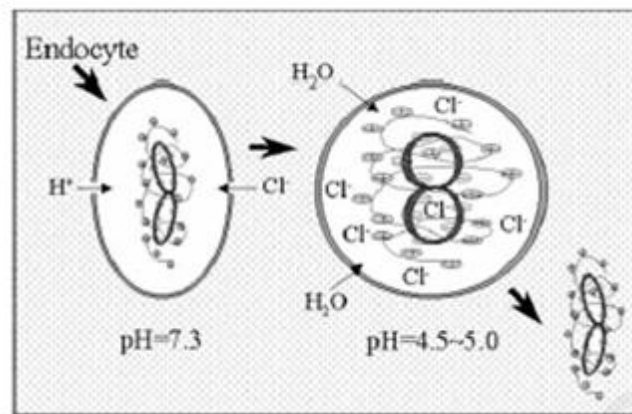


Σχήμα 1.3: Μη-ϊικοί μεταφορείς siRNA.

### 1.2.2.1 Μηχανισμός Μεταφοράς - Φαινόμενο Σφουγγαριού

Σωματίδια όπως το σύμπλοκο του siRNA με το πολυμερές εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκύττωση. Η ενδοκύττωση είναι μία διαδικασία κατά την οποία η κυτταρική μεμβράνη αναδιπλώνεται σχηματίζοντας μία κοιλότητα (ενδόσωμα) μέσα στην οποία εγκολπώνεται το σύμπλοκο. Κατά τη μεταφορά του συμπλόκου siRNA / πολυμερούς στο κύτταρο, λόγω του θετικού φορτίου που φέρει το πολυμερές, παρατηρείται το φαινόμενο του σφουγγαριού (sponge effect) το οποίο, αν και δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως, χρησιμοποιείται συχνά για να εξηγήσει την απελευθέρωση του siRNA από το κατιοντικό πολυμερές. Μέσα στο ενδόσωμα, το οποίο έχει όξινο pH (~5.5), το πολυμερές που είναι ασθενής πολυηλεκτρολύτης φορτίζεται θετικά. Η ηλεκτροστατική αυτή φόρτιση του πολυμερούς προκαλεί ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των αλυσίδων του πολυμερούς. Για αντιστάθμιση των θετικών φορτίων του πολυμερούς, ιόντα  $Cl^-$  εισχωρούν μέσα στο ενδόσωμα, οδηγώντας σε αύξηση της ωσμωτικής πίεσης του ενδοσώματος, και προκαλώντας έτσι την απορρόφηση μορίων νερού. Ο συνδυασμός της διόγκωσης του συμπλόκου και της αύξησης της ωσμωτικής πίεσης του ενδοσώματος οδηγεί σε

αποσταθεροποίηση του ενδοσώματος και τελική απελευθέρωση του συμπλόκου στο κυτταρόπλασμα.<sup>[28, 29]</sup>



**Σχήμα 1.4:** Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου του σφουγγαριού (sponge effect).<sup>[29]</sup>

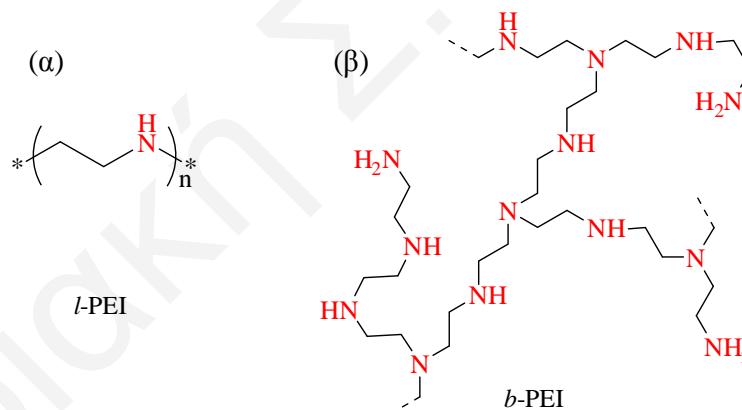
### 1.2.2.2 Κύριοι Μεταφορείς siRNA, *in vitro* και *in vivo*

Η συμπλοκοποίηση των κατιοντικών πολυμερών με το αρνητικά φορτισμένο siRNA έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ουδέτερων ή ελαφρώς θετικά φορτισμένων συμπλόκων τα οποία μπορούν εύκολα να διαπεράσουν την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη. Τα σύμπλοκα αυτά ονομάζονται polyplexes. Το θετικό φορτίο των πολυμερών προέρχεται από θετικά ιονιζόμενες ομάδες (κυρίως αμινικές) οι οποίες βρίσκονται στην κύρια ή στις πλευρικές αλυσίδες των πολυμερών. Η ένταση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και η πυκνότητα του θετικού φορτίου αποτελούν δύο σημαντικούς παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν τη δέσμευση και την απελευθέρωση του siRNA από το σύμπλοκο. Πρωτοταγείς, δευτεροταγείς ή τριτοταγείς αμίνες προτιμώνται έναντι των μόνιμα φορτισμένων (quaternary) αμιμών λόγω της σχετικής ευελιξίας τους στη δέσμευση και απελευθέρωση του siRNA σε διάφορα pH.<sup>[25]</sup>

Η πολυαιθυλενιμίνη (polyethylenimine, PEI) αποτελεί το πιο γνωστό κατιοντικό πολυμερές για μεταφορά siRNA. Λόγω της παρουσίας αμινικών ομάδων, η PEI δεσμεύεται ισχυρά στο siRNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, εξουδετερώνοντας το αρνητικό φορτίο του siRNA και προστατεύοντάς το, ταυτόχρονα, από ενζυμική αποικοδόμηση στο κυτταρόπλασμα. Αν και στη βιβλιογραφία η PEI έχει ½1μία αξιοσημείωτη ικανότητα στη μεταφορά DNA,<sup>[31]</sup> στην περίπτωση του siRNA παρουσιάζει αρκετούς περιορισμούς.<sup>[31]</sup> Το μικρό μήκος του siRNA αλλά και οι ασθενέστερες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του με την PEI μπορούν να οδηγήσουν σε διάσπαση των συμπλόκων PEI / siRNA, μετά την επαφή τους με τα ανιόντα της

κυτταρικής μεμβράνης,<sup>[32,33]</sup> οδηγώντας σε αναποτελεσματική επιμόλυνση. Σημαντικό πρόβλημα αποτελεί, επίσης, η μεγάλη τοξικότητα της PEI, η οποία οφείλεται στη μεγάλη πυκνότητα θετικού φορτίου που παρουσιάζει, γεγονός που οδηγεί στην ανάπτυξη ισχυρών αλληλεπιδράσεων με την κυτταρική μεμβράνη.

Παρόλα αυτά, η PEI έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη μεταφορά siRNA σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες στη γραμμική (*l*-PEI) αλλά και στη διακλαδισμένη (*b*-PEI) της μορφή (Σχήμα 1.5). Συγκεκριμένα, η *l*-PEI έχει συμπλοκοποιηθεί με το siRNA και χρησιμοποιηθεί επιτυχώς, σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες, ενάντια στην έκφραση του καρκινικού παράγοντα HER-2,<sup>[34]</sup> του αναπτυξιακού πλειοτροφινικού παράγοντα (pleiotrophin growth factor, PTN) του γλοιοβλαστώματος<sup>[35]</sup> και του ιού της γρίπης (Influenza A virus).<sup>[19(a)]</sup> Στην τελευταία περίπτωση, η αποτελεσματικότητα μεταφοράς του siRNA μελετήθηκε πριν και μετά τη μόλυνση από τον ιό της γρίπης όπου και παρατηρήθηκε εξίσου αποτελεσματική καταστολή του ιού. Για την αντιμετώπιση του ιού της γρίπης, η *l*-PEI έχει επίσης χρησιμοποιηθεί, *in vivo*, στην πλήρως αποακετυλιωμένη της μορφή (πλήρης απομάκρυνση των *N*-προπιονυλομάδων).<sup>[19(β)]</sup>



**Σχήμα 1.5:** Χημικές δομές (α) γραμμικής και (β) διακλαδισμένης PEI.

Στη βιβλιογραφία η PEI έχει συνδυαστεί με το υδρόφιλο πολυμερές της πολυαιθυλενογλυκόλης (poly(ethylene glycol), PEG). Η εισαγωγή τμημάτων PEG στην PEI αποδείχτηκε ότι αυξάνει τη βιοσυμβατότητά της με τρόπο που εξαρτάται τόσο από τον αριθμό των τμημάτων της PEG όσο και από τη δομή τους.<sup>[37]</sup> Επίσης, λόγω της έντονης εφυδάτωσής της σε υδατικό διάλυμα, η PEG όταν εισαχθεί στην PEI αυξάνει την αποτελεσματικότητα αντίστασης του συμπλόκου απέναντι στις RNAάσες οι οποίες υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα.<sup>[38]</sup> Μάλιστα η αντίσταση απέναντι στις RNAάσες

παρατηρήθηκε ότι αυξανόταν με αύξηση του μήκους της PEG,<sup>[38]</sup> ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι αυξανόταν και η αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης.<sup>[38,39]</sup>

Περαιτέρω, για εξειδίκευση των αλληλεπιδράσεων των συμπλόκων επιμόλυνσης με τα κύτταρα και τους ιστούς, η PEI συνδυάστηκε με διάφορους υποκατάστατες όπως είναι ο φολικός υποκαταστάτης (F), το υαλουρονικό οξύ ( HA) και διάφορα πεπτίδια. Για παράδειγμα, η ομάδα του Park<sup>[40,41]</sup> αναφέρει σε δύο μελέτες της τη χρήση του κατιοντικού συμπολυμερούς PEI-PEG-F για τη μεταφορά siRNA σε καρκινικά κύτταρα. Ο F υποκαταστάτης χρησιμοποιείται λόγω της εξειδίκευσης που παρουσιάζει αφού στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων υπάρχουν F υποκαταστάτες. Και στις δύο μελέτες παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά στην αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης σε σχέση με τη μη-τροποποιημένη PEI. Περαιτέρω, οι Jiang και συνεργάτες<sup>[42]</sup> τροποποίησαν την PEI με HA (PEI-HA, 24.2% PEI) και παρατήρησαν αύξηση της αποτελεσματικότητας καταστολής του αγγειακού ενδοθηλιακού αναπτυξιακού παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF) σε καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τη μη-τροποποιημένη PEI, ενώ, ταυτόχρονα, σε *in vivo* μελέτες παρατήρησαν ότι τα ίδια σύμπλοκα οδηγούσαν σε σημαντική ελάττωση του μεγέθους όγκων. Στις *in vivo* μελέτες παρατηρήθηκε, επίσης, ότι τα σύμπλοκα PEI-HA / siRNA συσσωρεύονταν σε ιστούς με υποδοχείς HA όπως είναι το συκώτι, ο νεφρός και οι όγκοι, λόγω της αλληλεπίδρασης των ομάδων του HA με τους υποδοχείς HA στην επιφάνεια των κυττάρων. Μία άλλη τροποποίηση της PEI παρουσιάστηκε από τους Schiffelers και συνεργάτες<sup>[43]</sup> και αφορά την εισαγωγή ενός τριπεπτιδίου αποτελούμενου από αργινίνη-γλυκίνη-ασπαραγίνη (Arg-Gly-Asp, RGD). Το τριπεπτίδιο RGD χρησιμοποιείται σαν υποκαταστάτης λόγω της εξειδικευμένης ικανότητάς του να στοχεύει πρωτεΐνες σε καρκινικά κύτταρα.<sup>[44]</sup>

Πέρα από τις τροποποιήσεις της PEI με ομάδες PEG και διάφορους υποκατάστατες, οι Creusat και Zuber<sup>[45]</sup> τροποποίησαν *b*-PEI με τα αμινοξέα λευκίνη (leucine, L), φαινυλαλανίνη (phenylalanine, F), τρυπτοφάνη (tryptofan, W) και τυροσίνη (tyrosine, Y) μέσω αντίδρασης των προστατευμένων μορφών των αμινοξέων με τις αμινικές ομάδες της PEI. Σε *in vitro* συνθήκες παρατηρήθηκε ότι η PEI-Y οδηγούσε στη μεγαλύτερη καταστολή της έκφρασης της λουσιφεράσης (Luciferase, Luc) και η PEI-L στη χαμηλότερη (σχεδόν μηδαμινή) καταστολή. Επίσης, οι Meyer και συνεργάτες<sup>[46]</sup> εισήγαγαν σε PEI το πεπτίδιο μελλιτίνη (melittin, Mel), του οποίου οι αμινικές ομάδες ήταν τροποποιημένες με διμεθυλομηλονικό ανυδρίτη (dimethylmaleic anhydride, DMMAn) με στόχο την ελαχιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων των φορτισμένων ομάδων

του πεπτιδίου με την κυτταρική μεμβράνη (ελάττωση τοξικότητας). Σε πειράματα επιμόλυνσης *in vitro* παρατήρησαν σημαντική αποτελεσματικότητα μεταφοράς siRNA σε κύτταρα νευροβλαστών.

Σε μία άλλη προσπάθεια, οι Zintchenko και συνεργάτες<sup>[47]</sup> εισήγαγαν σε *b*-PEI ακρυλικό αιθυλεστέρα (ethyl acrylate, EA), προπιονικό οξύ (propionic acid, PROP), ηλεκτρικό οξύ (succinic acid, SUC) καθώς και οξικό ανυδρίτη (acetic anhydride, AC) οπότε παρατήρησαν αύξηση της αποτελεσματικότητας της επιμόλυνσης και μείωση της τοξικότητας (σε σχέση με μη-τροποποιημένη PEI) σε *in vitro* πειράματα με καρκινικά κύτταρα. Περαιτέρω, σε μία άλλη μελέτη η ίδια ομάδα<sup>[48]</sup> εισήγαγε σε χαμηλού μοριακού βάρους (MB) PEI, μέσω προσθήκης Michael, EA, ακρυλικό *n*-βουτυλεστέρα (*n*-butyl acrylate, BuA), ακρυλικό εξυλεστέρα (hexyl acrylate, HexA) και ακρυλικό δωδεκυλεστέρα (lauryl acrylate, Lau). Σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε ότι προσθήκη δέκα ομάδων HexA σε κάθε αλυσίδα PEI ήταν η πιο αποτελεσματική τροποποίηση για μεταφορά siRNA. Επιπλέον, η *b*-PEI έχει τροποποιηθεί με διάφορες υδρόφοβες αλκυλοκαρβοξυλικές αλυσίδες<sup>[36]</sup> και μελετήθηκε ως προς την αποτελεσματικότητα μεταφοράς siRNA σε κύτταρα νευροβλαστώματος.

Περαιτέρω, οι Chen και συνεργάτες<sup>[49]</sup> τροποποίησαν *b*-PEI με το υδρόφοβο πολυ(L-γλουταμινικό γ-βενζυλεστέρα) (poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate, PBLG) όπου και παρατήρησαν τόσο ελάττωση της τοξικότητας όσο και αύξηση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης σε σχέση με τη μη-τροποποιημένη PEI. Το τελευταίο αποδόθηκε στις αλληλεπιδράσεις του υδρόφοβου PBLG με τις περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας έτσι στην αποσταθεροποίησή της, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της ενσωμάτωσης του συμπλόκου.

Σε μία πολύ ενδιαφέρουσα εργασία, οι Park και συνεργάτες<sup>[50]</sup> αφού διασταύρωσαν χαμηλού MB *l*-PEI με δισακρυλαμινική κυσταμίνη (cystamine bisacrylamide, CBA), εισήγαγαν ομάδες HA. Από τα πειράματα επιμόλυνσης παρατήρησαν ασήμαντη τοξικότητα και σχετικά καλή αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης (γύρω στο 50%) σε *in vitro* συνθήκες, ενώ σε *in vivo* συνθήκες παρατήρησαν δραματική μείωση του μεγέθους καρκινικών όγκων. Σε μία άλλη εργασία, οι Swami και συνεργάτες<sup>[51]</sup> διασταύρωσαν *b*-PEI με τη χρήση ενός δισηποξειδίου (1,4-butanediol diglycidyl ether) και μετέφεραν επιτυχώς siRNA *in vitro*.

Σε μία τελείως διαφορετική προσέγγιση, οι Song και συνεργάτες<sup>[52]</sup> συνδύασαν *b*-PEI με σωματίδια Au (*b*-PEI-capped Au) και παρατήρησαν αξιοσημείωτη καταστολή της έκφρασης εξωγενούς EGFP αλλά και γονιδίων της ενδογενούς ογκογενούς κινάσης I



---

(Polo-like kinase 1, PLK1) σε καρκινικά κύτταρα. Να σημειωθεί εδώ ότι στη βιβλιογραφία παρουσιάζεται επίσης η χημική πρόσδεση του siRNA με σωματίδια Au μέσω ομάδων θείου<sup>[53]</sup> και με τροποποιημένα σωματίδια Au με PEG μέσω αποικοδομήσιμων δισουλφιδικών δεσμών με πολύ καλά αποτελέσματα.<sup>[54]</sup>

Όλα τα πολυμερή βασισμένα σε PEI που αναφέρθηκαν προηγουμένως για μεταφορά siRNA δίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.1 που ακολουθεί.

Κυριακή Σ. Παφίτη

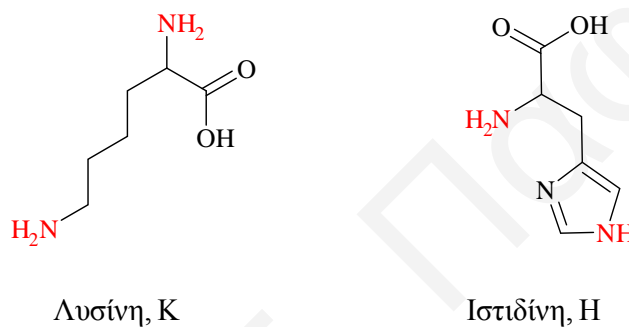
**Πίνακας 1.1:** Πολυαιθυλενιμίνες που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι σήμερα για μεταφορά siRNA σε διάφορες κυτταροσειρές.

A/A	Πρώτο πολυμερές <sup>1</sup>	Δεύτερο πολυμερές συστατικό <sup>1</sup>	Αρχιτεκτονική πολυμερούς <sup>1</sup>	Είδος κυττάρων <sup>1</sup>	Στόχος (γονίδιο ή πρωτεΐνη) <sup>1</sup>	Αριθμός αναφοράς
1	<i>l</i> -PEI (χαμηλού MB)	-----	γραμμικό ομοπολυμερές	----- ( <i>in vivo</i> )	ιός γρίπης (influenza A)	19(α)
2	<i>l</i> -PEI (χαμηλού MB)	-----	γραμμικό ομοπολυμερές	SCOV-3	HER-2 ( <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> )	34
3	<i>l</i> -PEI	-----	γραμμικό ομοπολυμερές	U87	PTN ( <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> )	35
4	Πλήρως αποακετυλιωμένη <i>l</i> -PEI (125 kDa)	-----	γραμμικό ομοπολυμερές	A549	<i>in vitro</i> : EGFP, Luc  <i>in vivo</i> : ιός γρίπης (influenza A)	19(β)
5	<i>b</i> -PEI (22 kDa, 800 Da)	-----	διακλαδισμένο ομοπολυμερές	HR5-C11	Luc	31(α)
6	<i>b</i> -PEI (25 kDa)	monomethyl ether-PEG	διακλαδισμένο συμπολυμερές PEI-g-PEG	NIH/3T3	$\beta$ -gal	38, 39
7	<i>b</i> -PEI (25 kDa)	monomethyl ether-PEG	διακλαδισμένο συμπολυμερές PEI-g-PEG	1205Lu	Luc	39
8	PEI	<i>b</i> -PEI (25 kDa)	Εισαγωγή νανοσωματιδίων Au PEI-capped Au	MDA-MB-435	PLK1	52
9	<i>b</i> -PEI (25 kDa)	PEG, F	διαδρομερές συμπολυμερές με F: PEI-PEG-F	KB	EGFP	40,41

A/A	Πρώτο πολυμερές <sup>1</sup>	Δεύτερο πολυμερές / συστατικό <sup>1</sup>	Αρχιτεκτονική πολυμερούς <sup>1</sup>	Είδος κυττάρων <sup>1</sup>	Στόχος (γονίδιο ή πρωτεΐνη) <sup>1</sup>	Αριθμός αναφοράς
10	<i>b</i> -PEI	PEG, RGD	διαδρομερές συμπολυμερές με RGD: PEI-PEG-RGD	HUVECs, N2A murine neuroblastoma, SVR-bag 4	VEGF-R2 ( <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> )	43
11	<i>b</i> -PEI (25kDa)	HA	τροποποιημένη PEI	B16F1	<i>in vitro</i> : Luc, VEGF <i>in vivo</i> : ποντίκια με όγκους (C57BL/6)	42
12	<i>b</i> -PEI (25 kDa)	PEG, πεπτίδιο DMMA <sub>n</sub> -Mel	τροποποιημένο συμπολυμερές: PEI-PEG-DMMA-Mel	Neuro2A	EGFPLuc	46
13	<i>b</i> -PEI (25 kDa)	PROP, SUC, AC, EA	τροποποιημένη PEI	B16F1, Neuro2A	Luc	47
14	<i>b</i> -PEI (800 Da)	EA, BuA, HexA, Lau	τροποποιημένη PEI	Neuro2A, HUH7, H1299	EGFPLuc	48
15	<i>b</i> -PEI (25 kDa)	PBGL	διακλαδισμένο συμπολυμερές	CT26, 4T1, HeLa	Luc	49
16	<i>b</i> -PEI (25 kDa)	αμινοξέα: L, F, W, Y	τροποποιημένη PEI	A549	Luc	45
17	<i>b</i> -PEI (25 kDa)	διασταυρωτής: 1,4-butanediol diglycidyl ether	διασταυρωμένη PEI	HEK239, A549, HeLa, COS-1	EGFP	51

<sup>1</sup>Όλες οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στον Πίνακα δίνονται στις “Συντομογραφίες” στις αρχικές σελίδες της Διδακτορικής Διατριβής.

Για τη μεταφορά του siRNA έχουν χρησιμοποιηθεί, επίσης, πολυμερή βασισμένα στα αμινοξέα λυσίνη (lysine, K) και ιστοιδίνη (histidine, H) τα οποία φέρουν αμινομάδες οι οποίες μπορούν εύκολα να πρωτονιωθούν (Σχήμα 1.6). Η ομάδα του Mixson<sup>[55]</sup> χρησιμοποίησε διακλαδισμένα πολυμερή H - K για καταστολή του γονιδίου της  $\beta$ -γαλακτοζιτάσης ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -gal) σε καρκινικά κύτταρα, και παρατήρησε ότι η καταστολή εξαρτάτο από το βαθμό διακλάδωσης. Σε μία άλλη προσπάθεια, η ίδια ομάδα<sup>[56]</sup> χρησιμοποίησε και πάλι διακλαδισμένα πολυμερή H - K επιτυγχάνοντας καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της κινάσης Raf-1 σε καρκινικά κύτταρα, ενώ σε *in vivo* συνθήκες παρατήρησε σημαντική μείωση του μεγέθους όγκων.

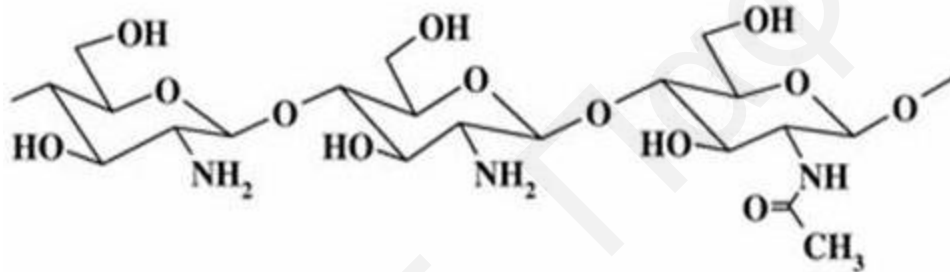


**Σχήμα 1.6:** Χημικές δομές των αμινοξέων λυσίνη και ιστοιδίνη.

Άλλα παραδείγματα κατιοντικών πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά siRNA είναι η χιτοσάνη. Η χιτοσάνη είναι ένας φυσικός, βιοσυμβατός και βιοαποικοδομήσιμος κατιοντικός πολυσακχαρίτης (Σχήμα 1.7) ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη μεταφορά γενετικών υλικών και ειδικά DNA.<sup>[57]</sup> Τα τελευταία χρόνια, η χιτοσάνη άρχισε να χρησιμοποιείται και για τη μεταφορά siRNA<sup>[58]</sup> (Πίνακας 1.2). Πρώτοι οι Katas και Alpan<sup>[59]</sup> ανέπτυξαν νανοσωματίδια χιτοσάνης και τα συμπλοκοποίησαν με siRNA. Τα νανοσωματίδια παρασκευάστηκαν με αντίδραση χλωριούχων αλάτων χιτοσάνης με πολυαιθυλενοξείδιο (poly(ethylene oxide), PEO) ή πολυπροπυλενοξείδιο (poly(propylene oxide), PPO) στην παρουσία τριφωσφορικού νατρίου ως μέσου διασταύρωσης (ionic gelation). Τα σωματίδια αυτά σε *in vitro* πειράματα μετέφεραν αποτελεσματικά siRNA σε κύτταρα. Επίσης, οι Molhotra και συνεργάτες<sup>[60]</sup> διασταύρωσαν άλατα χιτοσάνης στην παρουσία τριφωσφορικού νατρίου και μετέφεραν επιτυχώς siRNA σε κύτταρα νευροβλαστώματος. Οι Rojanarata και συνεργάτες<sup>[61]</sup> σε μία άλλη μελέτη διασταύρωσαν άλατα χιτοσάνης με πυροφωσφορική θειαμίνη και μετέφεραν επιτυχώς siRNA σε καρκινικά κύτταρα όπου παρατηρήθηκε αύξηση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης με αύξηση της αναλογίας N / P και με ελάττωση του MB της χιτοσάνης. Οι Howard και συνεργάτες<sup>[62]</sup> χρησιμοποιώντας

χιτοσάνη μετέφεραν επιτυχώς siRNA *in vitro* (σε καρκινικά κύτταρα και σε μακροφάγους) και *in vivo* (ενάντια στην πρωτεΐνη (BCR/ABL-1)). Η ίδια ομάδα σε μία πιο πρόσφατη μελέτη<sup>[63]</sup> της παρουσίασε μία καινοτόμα θεραπεία της αρθρίτιδας με τη χρήση νανοσωματιδίων χιτοσάνης, ενώ σε κάποια άλλη μελέτη<sup>[64]</sup> οι ίδιοι παρατήρησαν ότι η αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης ήταν μεγαλύτερη για πιο μεγάλα σωματίδια (μεγαλύτερο MB) και για σωματίδια με μεγαλύτερο βαθμό αποακετυλίωσης (περισσότερα θετικά φορτία). Παρόμοια αποτελέσματα εξήχθηκαν και από τους Ji και λοιπούς.<sup>[65]</sup>

Όλα τα πολυμερή βασισμένα σε χιτοσάνη που χρησιμοποιήθηκαν για μεταφορά siRNA καταγράφονται συνοπτικά στον Πίνακα 1.2 που ακολουθεί.



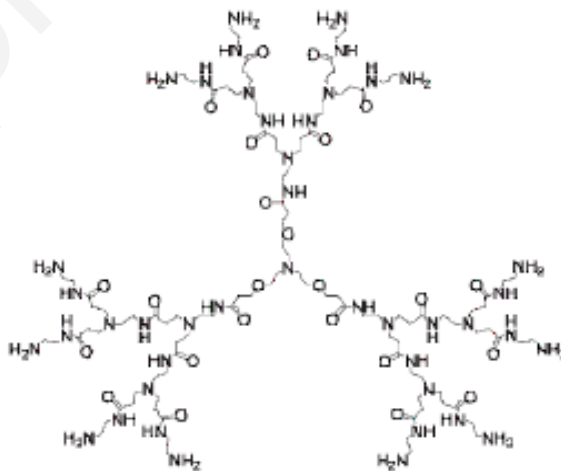
Σχήμα 1.7: Χημική δομή χιτοσάνης.

Πίνακας 1.2: Χιτοσάνες που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι σήμερα για μεταφορά siRNA σε διάφορες κυτταροσειρές.

A/A	Πρώτο πολυμερές <sup>1</sup>	Δεύτερο πολυμερές συστατικό <sup>1</sup>	Αρχιτεκτονική πολυμερούς <sup>1</sup>	Μέθοδος πολυμερισμού ή αντίδραση <sup>1</sup>	Είδος κυττάρων <sup>1</sup>	Στόχος (γονίδιο ή πρωτεΐνη) <sup>1</sup>	Αριθμός αναφοράς
1	χιτοσάνη	PEO ή PPO	διασταυρωμένο συμπολυμερές	διασταύρωση με τριφωσφορικό νάτριο	CHO K1, HEK 293		59
2	χιτοσάνη	-----	διασταυρωμένο ομοπολυμερές	διασταύρωση με τριφωσφορικό νάτριο	neuro-blastoma		60
3	χιτοσάνη	-----	διασταυρωμένο ομοπολυμερές	διασταύρωση με πυροφωσφορική θειαμίνη	Hep-G2	EGFP	61
4	χιτοσάνη	-----	γραμμικό ομοπολυμερές	εμπορικά διαθέσιμο	NIH 3T3, H1299, murine peritoneal macrophages [in vivo: transgenic EGFP ποντίκια]	<i>in vitro</i> : EGFP  <i>in vivo</i> : BCR/ABL-1	62
5	χιτοσάνη	-----	γραμμικό ομοπολυμερές	εμπορικά διαθέσιμο	Peritoneal macrophages [in vivo: DBA/1 ποντίκια με αρθρίτιδα]	TNF- $\alpha$	63
6	χιτοσάνη	-----	γραμμικό ομοπολυμερές	εμπορικά διαθέσιμο	H1299	EGFP	64
7	χιτοσάνη	-----	γραμμικό ομοπολυμερές	εμπορικά διαθέσιμο	ανθρώπινα κύτταρα εντέρου	Έκφραση γονιδίου FHL2	65

<sup>1</sup>Όλες οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στον Πίνακα δίνονται στις “Συντομογραφίες” στις αρχικές σελίδες της Διδακτορικής Διατριβής.

Μία άλλη ομάδα πολυμερών που έχει μελετηθεί εκτενώς για μεταφορά siRNA είναι τα δενδριμερή πολυμερή. Έχουν μελετηθεί διάφορες κατηγορίες δενδριμερών πολυμερών όπως καρβοσιλανικά (carbosilane) δενδριμερή,<sup>[66-68]</sup> πολυ(προπυλενιμινικά) δενδριμερή,<sup>[69]</sup> δενδριμερή με λυσίνη,<sup>[70]</sup> τριαζινοδενδριμερή<sup>[71]</sup> καθώς και πολυ(αμιδοαμινο)δενδριμερή (poly(amidoamine), PAMAM).<sup>[72-78]</sup> Τα δενδριμερή PAMAM (Σχήμα 1.8) έχουν μελετηθεί περισσότερο και αποτελούν τα πιο υποσχόμενα δενδριμερή για μεταφορά siRNA. Συγκεκριμένα, οι Zhou και συνεργάτες απέδειξαν ισχυρή ικανότητα δέσμευσης των μορίων RNA από τα δενδριμερή PAMAM.<sup>[79,80]</sup> Περαιτέρω, διάφορες ομάδες μελέτησαν την επίδραση διαφόρων διαμορφώσεων των περιφερειακών ομάδων των δενδριμερών PAMAM (με πυρήνες αιθυλενοδιαμίνης) στην αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ότι εισαγωγή πεπτιδίου σε δενδριμερή PAMAM 5<sup>ης</sup> γενιάς αυξάνει την κυτταρική δέσμευσή τους,<sup>[73]</sup> ενώ κετυλίωση των αμινικών ομάδων (ελάττωση του αριθμού των πρωτοταγών αμινών) οδηγεί σε αύξηση της βιοσυμβατότητας των δενδριμερών και σε γρηγορότερη απελευθέρωση του siRNA στο κυτταρόπλασμα.<sup>[74]</sup> Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι κετυλίωση των αμινικών ομάδων σε συνδυασμό με μόνιμη φόρτιση (quaternization) των τριτοταγών αμινομάδων οδηγεί σε ελάττωση της τοξικότητας και ενίσχυση της κυτταρικής δέσμευσης.<sup>[75,76]</sup> Πέρα από τις τροποποιήσεις στις περιφερειακές ομάδες, οι Peng και συνεργάτες τροποποίησαν τον πυρήνα των PAMAM (σε πυρήνα τριαιθανολαμίνης) και απέδειξαν εξίσου αποτελεσματική μεταφορά siRNA, με τρόπο που εξαρτάτο από τη συγκέντρωση και τον αριθμό της γενιάς των δενδριμερών.<sup>[77,78]</sup>



**Σχήμα 1.8:** Σχηματική αναπαράσταση δενδριμερών PAMAM 2<sup>ης</sup> γενιάς με πυρήνα τριαιθανολαμίνης και δώδεκα πρωτοταγείς αμινομάδες στην περιφέρεια.

Στη βιβλιογραφία η μεταφορά του siRNA έχει πραγματοποιηθεί, επίσης, με τη χρήση διαδρομερών συμπολυμερών αποτελούμενων από ένα τουλάχιστο θετικά φορτιζόμενο τμήμα βασισμένο σε μονομερή με τριτοταγείς αμινομάδες όπως είναι το *N*-[3-(διμεθυλαμινο)προπυλο μεθακρυλαμίδιο (*N*-[3-(dimethylamino) propyl] methacrylamide, DMAPMA)<sup>[81]</sup> και η 3-διαιθυλαμινο-1-προπυλαμίνη (3-(diethylamino)propylamine, DEAPA)<sup>[82]</sup> καθώς και σε μόνιμα φορτισμένα (quaternized) άτομα αζώτου.<sup>[83]</sup>

Επιπλέον, για μεταφορά γενετικών υλικών και, κυρίως, για μεταφορά DNA<sup>[84]</sup> έχει χρησιμοποιηθεί και ο μεθακρυλικός (2-διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας (2-(dimethylamino)ethyl methacrylate, DMAEMA) ο οποίος επίσης φέρει τριτοταγείς αμινομάδες. Για τη μεταφορά του siRNA, το DMAEMA έχει χρησιμοποιηθεί σαν ομοπολυμερές<sup>[85]</sup> αλλά και σαν συμπολυμερές με το υδρόφιλο τμήμα πολυ(μεθακρυλική α-μεθοξυ-πολυαιθυλενογλυκόλη) (polyethyleneglycol)-α-methoxy, ω-methacrylate, MAPEG),<sup>[85]</sup> καθώς και το τυχαίο τριπολυμερές αποτελούμενο από DMAEMA, προπυλακρυλικό οξύ (propylacrylic acid, PAA) και μεθακρυλικό *n*-βουτυλεστέρα (*n*-butyl methacrylate, BuMA), DMAEMA-*co*-PAA-*co*-BuMA.<sup>[86,87]</sup> Στην τελευταία περίπτωση, παρατηρήθηκε μάλιστα ότι το συμπολυμερές με το μεγαλύτερο ποσοστό στο υδρόφοβο BuMA παρουσίαζε τη μεγαλύτερη καταστολή της έκφρασης της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH).

Επιπλέον, στη βιβλιογραφία παρουσιάζεται και το συμπολυμερές PEG-*b*-πολυ(3-(3-αμινοπροπυλ)αμινο) προπυλασπαρταμίδιο) (PEG-*b*-poly(-3-(3-aminopropyl)amino)propylaspartamide), PEG-*b*-DPT)<sup>[88]</sup> το οποίο φέρει πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμινικές ομάδες στις πλευρικές αλυσίδες του DPT. Το συμπολυμερές αυτό συγκρινόμενο με παρόμοια μόρια τα οποία έφεραν μία αμινομάδα στην πλευρική αλυσίδα, παρουσίαζε πολύ μεγαλύτερη καταστολή του γονιδίου της *Luc*, *in vitro*. Περαιτέρω, από τους Segura και Hubbell<sup>[89]</sup> παρουσιάζεται η σύνθεση αμφιφιλικών ABΓ τριαδρομερών τριπολυμερών βασισμένων σε PEG, σε πολυ(προπυλενοσουλφίδιο) (poly(propylene sulfide), PPS) και σε ένα θετικά φορτισμένο πεπτίδιο με κύριο συστατικό τη λυσίνη.

Όλα τα πιο πάνω πολυμερή δίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 1.3 που ακολουθεί.



**Πίνακας 1.3:** Διάφορα άλλα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά siRNA σε διάφορες κυτταροσειρές.

A/A	Μονομερή συστατικά <sup>1</sup>	Αρχιτεκτονική πολυμερούς <sup>1</sup>	Μέθοδος πολυμερισμού ή αντίδραση <sup>1</sup>	Κατιοντικό συστατικό <sup>1</sup>	Είδος κυττάρων <sup>1</sup>	Στόχος (γονίδιο ή πρωτεΐνη) <sup>1</sup>	Αριθμός αναφοράς
1	DMAEMA και HPMA	διαδρομερές συμπολυμερές: DMAEMA- <i>b</i> -HPMA	RAFT	DMAEMA	----- (μόνο συμπλοκοποίηση)	-----	81
2	DEAPA και PVA	τροποποιημένη PVA	Αντίδραση DEAPA με PVA στην παρουσία καρβονυλοϊμιδαζόλιο	DEAPA	SKOV	Luc	82
3	MDS και CES	τυχαίο συμπολυμερές: MDS- <i>co</i> -CES	πολυμερισμός συμπύκνωσης (PMDS) αντίδραση quaternization	CES	HepG2, HeLa, MDA-MB-231	Bcl-2	83
4	DMAEMA και MAPEG	ομοπολυμερές DMAEMA διαδρομερές συμπολυμερές: DMAEMA- <i>b</i> -MAPEG	ATRP	DMAEMA	PC-3	VEGF	85
5	DMAEMA, PAA, BMA	διαδρομερές τριπολυμερές: DMAEMA- <i>b</i> -(DMAEMA- <i>co</i> -PAA- <i>co</i> -BuMA)	RAFT	DMAEMA	HeLa	GAPDH	86, 87

A/A	Μονομερή / συστατικά <sup>1</sup>	Αρχιτεκτονική πολυμερούς <sup>1</sup>	Μέθοδος πολυμερισμού ή αντίδραση <sup>1</sup>	Κατιοντικό συστατικό <sup>1</sup>	Είδος κυττάρων <sup>1</sup>	Στόχος (γονίδιο ή πρωτεΐνη) <sup>1</sup>	Αριθμός αναφοράς <sup>1</sup>
6	PEG και DPT	διαδρομερές συμπολυμερές: PEG- <i>b</i> -DPT	αμινόλυση του PEG-poly( <i>b</i> -benzyl-L-aspartate) με διπροτυλενοτριαμίνη	DPT	HuH-7	Luc	88
7	PEG, PPS και πεπτίδιο (κυρίως με K)	τριαδρομέρες συμπολυμερές: PEG- <i>b</i> -PSS-πεπτίδιο	ανιοντικός πολυμερισμός: PEG- <i>b</i> -PSS	πεπτίδιο (κυρίως από K)	HeLa	GAPDH	89

<sup>1</sup>Όλες οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στον Πίνακα δίνονται στις “Συντομογραφίες” στις αρχικές σελίδες της Διδακτορικής Διατριβής.

Για τη μεταφορά του siRNA έχουν χρησιμοποιηθεί, ταυτόχρονα, αποικοδομήσιμα πολυμερή (Πίνακας 1.4). Τα αποικοδομήσιμα πολυμερή<sup>[90]</sup> φέρουν δεσμούς (κυρίως εστερικούς ή δισουλφιδικούς) οι οποίοι διασπώνται στο όξινο pH του ενδοσώματος, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολυμερών με μικρότερα MB, τα οποία είναι λιγότερο τοξικά, ενώ, ταυτόχρονα, μπορούν να εκκριθούν ευκολότερα από τον οργανισμό.

Στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται διάφοροι τύποι διασπώμενων πολυκατιοντικών πολυμερών όπως είναι οι πολυ(β-αμινο-εστέρες)<sup>[91]</sup> και πολυ(αμινοεστερικές γλυκουρεθάνες) (poly(amino ester glycol urethane)).<sup>[92]</sup> Επίσης, αναφέρονται συμπολυμερή τριαιθυλενοτετραμίνης (triethylenetetramine, TETA) με CBA (μέσω αντίδρασης τύπου Michael)<sup>[93]</sup> καθώς και συμπολυμερή σπερμίνης (SP) με CBA (μέσω αντίδρασης Michael),<sup>[94]</sup> των οποίων το αποικοδομήσιμο τμήμα είναι δισουλφιδικός δεσμός. Στην τελευταία περίπτωση μάλιστα πραγματοποιήθηκαν και *in vivo* μελέτες ενάντια στην ογκοπρωτεΐνη Akt1, στις οποίες παρατηρήθηκε σημαντική μείωσή της.

Ταυτόχρονα, παρουσιάζονται βιοαποικοδομήσιμα συμπολυμερή βασισμένα σε λακτικό και γλυκολικό οξύ (poly(D,L-lactide-co-glycolide), PLGA).<sup>[95-97]</sup> Συγκεκριμένα, οι Wang και συνεργάτες<sup>[96]</sup> αναφέρουν την ανάπτυξη συμπολυμερών PLGA-PEI, PLGA-χιτοσάνης, μεθόξυ-PEG-PLGA (mPEG-PLGA) και mPEG-PLG-PEI, όπου από τα πειράματα επιμόλυνσης σε κύτταρα μολυσμένα από τον ιό της ηπατίτιδας B παρατηρήθηκε ότι τα σύμπλοκα με το mPEG-PLG-PEI ήταν τα περισσότερο αποτελεσματικά.

Στη βιβλιογραφία παρουσιάζεται, επίσης, η σύνθεση τριαδρομέρων τριπολυμερών βασισμένων σε mPEG, πολυ(ε-καπρολακτόνη) (poly(ε-caprolactone), PCL) και πολυ(2-αμινοαιθυλο αιθυλενοφωσφορικό) (poly(2-aminoethyl ethylene phosphate), PPEEA).<sup>[98]</sup> Σε μία πολύ ενδιαφέρουσα εργασία οι Zhu και συνεργάτες<sup>[100]</sup> αναφέρουν τη σύνθεση τριαδρομερών συμπολυμερών αποτελούμενων από DMAEMA (κατιοντικό) και PCL (υδρολύμενο), επιτυγχάνοντας έτσι σημαντική καταστολή του γονιδίου της πρωτεΐνης αυξημένου πράσινου φθορισμού (enhanced green fluorescence protein, EGFP) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα.

Περαιτέρω, οι Xiong και συνεργάτες<sup>[99]</sup> παρουσιάζουν τη σύνθεση διαδρομερών συμπολυμερών βασισμένων σε PEG και πολυεστέρες με κατιοντικές ομάδες στις πλευρικές αλυσίδες τους. Τέτοιες ομάδες είναι η τετρααιθυλενοπενταμίνη (tetraethylenepentamine, TP), η *N,N*-διμεθυλοδιπροπυλενοτριαμίνη (*N,N*-dimethyldipropylenetriamine, DP) και η SP. Όλα τα διασπώμενα πολυμερή παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 1.4 που ακολουθεί.

**Πίνακας 1.4:** Διασπώμενα κατιοντικά πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για μεταφορά siRNA σε διάφορες κυτταροσειρές.

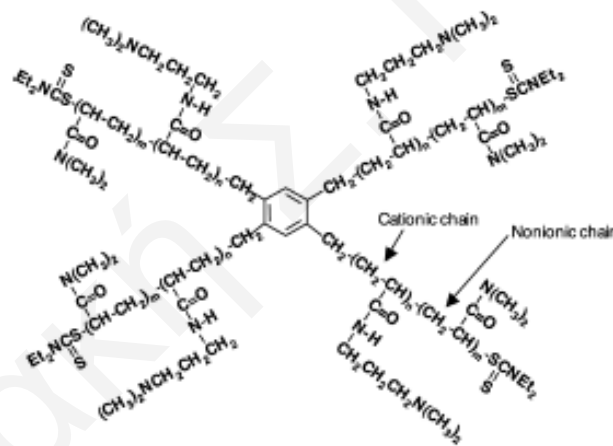
A/A	Μονομερή / πολυμερή <sup>1</sup>	Αρχιτεκτονική πολυμερούς <sup>1</sup>	Μέθοδος πολυμερισμού ή αντίδραση <sup>1</sup>	Υδρολύσιμο συστατικό <sup>1</sup>	Κατιοντικό συστατικό <sup>1</sup>	Είδος κυττάρων <sup>1</sup>	Στόχος (γονίδιο ή πρωτεΐνη) <sup>1</sup>	Αριθμός αναφοράς
1	TETA και BCA	γραμμικό συμπολυμερές	προσθήκη τύπου Michael	CBA (δισουλφιδικός δεσμός)	TETA	PC-3	EGFP	93
2	SP και BCA	γραμμικό συμπολυμερές	προσθήκη τύπου Michael	CBA (δισουλφιδικός δεσμός)	SP	A549	<i>in vitro</i> : EGFP <i>in vivo</i> : Akt1	94
3	δισ(ακρυλική) 1,4-βουτανολόλη ή δισ(ακρυλική) 1,6-εξανολόλη μαζί με 4,4-τριμεθυλενοδιπυριδίνη	πολυ(β-αμινοεστέρες)	προσθήκη Michael	εστερικός δεσμός	4,4-τριμεθυλενοδιπυριδίνη	Ηπατοκύτταρα	Luc	91
4	PEGamino-diol και 1,4-διϊσοκυανοτοβουτάνιο (1,4-diisocyanatobutane)	πολύ(ουραιθάνες)	αντίδραση PEG-amino-diol με 1,4-διϊσοκυανοτοβουτάνιο στην παρουσία καταλύτη	αμιδικός δεσμός	PEGamino-diol	HT-1080	Luc	92
5	PLGA	τυχαίο συμπολυμερές: PLGA	εμπορικά διαθέσιμο	PLGA	δεν υπάρχει	----- (μόνο συμπλοκοποίηση)	-----	97

A/A	Μονομερή / συστατικά <sup>1</sup>	Αρχιτεκτονική πολυμερούς <sup>1</sup>	Μέθοδος πολυμερισμού ή αντίδραση <sup>1</sup>	Υδρολύσιμο συστατικό <sup>1</sup>	Κατιοντικό συστατικό <sup>1</sup>	Είδος κυττάρων <sup>1</sup>	Στόχος (γονίδιο ή πρωτεΐνη) <sup>1</sup>	Αριθμός αναφοράς
6	PLGA, PEI, mPEG και χιτοσάνη	συμπολυμερή: PGLA-PEI PGLA-χιτοσάνη mPEG-PLGA mPEG-PLA-PEI	τεχνική εξάτμισης διαλύτη (PGLA-χιτοσάνη)  μέθοδος ναοκαταβύθισης: (PGLA-PEI, mPEG-PLGA, mPEG-PLA-PEI)	PLGA	PEI, χιτοσάνη	PCL/PRF/5	HBsAg	96
7	PLGA	τυχαίο συμπολυμερές	εμπορικά διαθέσιμο	PLGA	δεν υπάρχει	-----	<i>in vivo</i> : ενάντια στον ιό papiloma	95
8	mPEG, PCL και PPEEA	τριαδρομερές συμπολυμερές: mPEG- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PPEEA	αντίδραση macro-εκκινητή mPEG-PCL στην παρουσία καταλύτη Sn	PPEEA (στην παρουσία ενζύμων στο κυτταρόπλασμα)	PPEEA	HEK293	EGFP	98
9	PEO, SP, CL, DP και TP	διαδρομερή συμπολυμερή: PEO- <i>b</i> -P(CL- <i>g</i> -SP) PEO- <i>b</i> -P(CL- <i>g</i> -TP) PEO- <i>b</i> -P(CL- <i>g</i> -DP)	PEO- <i>b</i> -PCL: πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου  προσθήκη αμινών: παρουσία NHS/DCC	αμιδικός δεσμός	CL, DP, TP	MDA435/LCC6	<i>P</i> -gp	99
10	DMAEMA και PCL	τριαδρομερή συμπολυμερή: DMAEMA- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -DMAEMA	RAFT DMAEMA στην παρουσία macro-PCL CTA	PCL	DMAEMA	MDA-MB-435 PC3	EGFP VGFP	Park et al

<sup>1</sup>Όλες οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στον Πίνακα δίνονται στις “Συντομογραφίες” στις αρχικές σελίδες της Διδακτορικής Διατριβής.

Πολυμερή βασισμένα σε κυκλοδεξτρίνη αποτελούν μία άλλη πολύ σημαντική κατηγορία συστημάτων μεταφοράς siRNA. Συγκεκριμένα, ο Davis και η ομάδα του<sup>[101]</sup> αναφέρει τη σύνθεση κατιοντικών νανοσωματιδίων βασισμένων σε ολιγοκυκλοδεξτρίνες, οι οποίες φέρουν υποδοχείς τρανσερίνης και είναι στερεοχημικά σταθεροποιημένες με PEG σαν συστήματα μεταφοράς siRNA σε κλινικές μελέτες.

Τέλος, όσον αφορά τη μεταφορά siRNA με πολυμερή τα οποία δεσμεύονται στο siRNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, στη βιβλιογραφία παρουσιάζεται σε μία μόνο περίπτωση η χρήση αστεροειδών πολυμερών. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται η σύνθεση υδρόφιλων κατιοντικών αστεροειδών συμπολυμερών με τέσσερις βραχίονες βασισμένα στα μονομερή 3-(*N,N*-διμεθυλαμινο)προπυλακρυλαμίδιο (υδρόφιλο κατιοντικό) και *N,N*-διμεθυλακρυλαμίδιο (υδρόφιλο μη-ιονιζόμενο) μέσω “ζωντανού” φωτοπολυμερισμού ριζών με τη χρήση του 1,2,4,5-τετρακισ(*N,N*-διαιθυλοδιθειοκαρβαμυλομεθυλο)βενζολίου σαν iniferter (σαν εκκινήτη που αναπτύχθηκαν οι βραχίονες σε αυτόν) (Σχήμα 1.9).<sup>[102]</sup>



Σχήμα 1.9: Χημική δομή κατιοντικών αστεροειδών συμπολυμερών.

Πρόσφατα έχουν δημοσιευτεί διάφορες μελέτες που αφορούσαν την απευθείας δέσμευση του siRNA<sup>[103]</sup> με πολυμερή,<sup>[104-110]</sup> χοληστερόλη,<sup>[111]</sup> πεπτίδια,<sup>[112]</sup> πρωτεΐνες<sup>[113]</sup> και απταμερή.<sup>[114-115]</sup> Η απευθείας συμπλοκοποίηση του siRNA έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση τόσο του χρόνου ημιζωής του όσο και της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης. Η δέσμευση του siRNA γίνεται στο 3' ή 5' άκρο του νοηματικού κλώνου ή στο 3' άκρο του αντι-νοηματικού κλώνου κυρίως μέσω δισουλφιδικών δεσμών, θέσεις οι οποίες δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα του siRNA. Ένα πολυμερές το οποίο έχει δεσμευτεί απευθείας (μέσω δισουλφιδικών δεσμών) στο siRNA είναι η PEG (PEG-siRNA).<sup>[104-106]</sup> Περαιτέρω, τα μόρια PEG-siRNA συνδυάστηκαν με πεπτίδια όπως η μελλιλίνη<sup>[107,108]</sup> ή

κατιοντικά πολυμερή βασισμένα σε SP.<sup>[109]</sup> Επίσης, οι York και συνεργάτες<sup>[110]</sup> σύνδεσαν siRNA με το κατιοντικό πολυμερές N-(2-υδροξυπροπυλ)μεθακρυλαμίδιο-*b*-N-(3-αμινοπροπυλ)μεθακρυλαμίδιο).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το siRNA μπορεί να μεταφερθεί και με απταμερή (απταμερή-siRNA).<sup>[114-115]</sup> Τα απταμερή είναι μικρά συνθετικά μόρια νουκλεϊνικών οξέων τα οποία δεσμεύονται σε συγκεκριμένους στόχους παρουσιάζοντας έτσι μεγάλη εξειδίκευση. Ταυτόχρονα, το siRNA μεταφέρθηκε και με κατιοντικά αντισώματα<sup>[116]</sup> τα οποία είτε βρίσκονταν συνδεδεμένα με το siRNA είτε συμπλοκοποιούνταν με το αυτό μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Τα κατιοντικά αντισώματα παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα στο κυτταρικό περιβάλλον και μεγάλη εκλεκτικότητα σε πρωτεΐνες-στόχους της κυτταρικής μεμβράνης.

Η πιο υποσχόμενη ομάδα οχημάτων η οποία έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη μεταφορά siRNA *in vitro* και *in vivo* είναι τα λιπίδια.<sup>[117]</sup> Συγκεκριμένα, τα λιπίδια αποδείχτηκε ότι είναι καλύτεροι μεταφορείς για το siRNA σε σύγκριση με το DNA, διαφορά η οποία δεν έχει εξηγηθεί μηχανιστικά. Η εύνοια αυτή προς το siRNA αποδόθηκε στις ασθενέστερες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των λιπιδίων με το siRNA οι οποίες οδηγούν σε γρηγορότερη διάσπαση του συμπλόκου και απελευθέρωση του siRNA στο κυτταρόπλασμα. Αναλυτικά, τα λιπίδια αποτελούνται από δύο μέρη, δύο μεγάλες υδρόφοβες ανθρακικές αλυσίδες και μία υδρόφιλη κεφαλή. Για τη μεταφορά του siRNA *in vitro* και *in vivo* έχει χρησιμοποιηθεί μία πληθώρα λιπιδίων με διάφορα μεγέθη, δομές, συστάσεις και αναλογίες ανάμεσα στα δύο μέρη.<sup>[118]</sup>

Μια εναλλακτική προσέγγιση για τη σύνθεση λιπιδίων δόθηκε από τους Akinc και συνεργάτες<sup>[119]</sup> οι οποίοι παρουσίασαν τη σύνθεση μίας πληθώρας μορίων (~1200) βασισμένων σε λιπίδια, τα οποία ονόμασαν λιπιδοειδή (lipidoids). Τα λιπιδοειδή συντέθηκαν με αντίδραση (conjugation reaction) ακρυλικών αλκυλεστέρων ή ακρυλικών ακρυλαμιδίων με πρωτοταγείς ή δευτεροταγείς αμίνες. Τα μόρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για τη μεταφορά siRNA *in vitro* και *in vivo* σε ποντίκια και πηθήκους. Περαιτέρω, λιπιδοειδή χρησιμοποιήθηκαν και από τους Cho και συνεργάτες<sup>[120]</sup> με στόχο την αναστολή της απόπτωσης ενδοθηλιακών κυττάρων.

Η επιτυχημένη μεταφορά του siRNA από τα λιπίδια είχε ως αποτέλεσμα την εμπορικοποίηση αρκετών από αυτών. Σήμερα, στην αγορά διατίθενται αρκετά αντιδραστήρια βασισμένα σε λιπίδια τα οποία χρησιμοποιούνται σε *in vitro* πειράματα, όπως είναι το Lipofectamine RNAiMAX, (το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα

Εργασία για σκοπούς σύγκρισης), το jet-ENDO, το siPORT NeoFX, το DharmaFECT, το X-tremeGENE, το TriFECTin και το DOTAP.<sup>[121]</sup>

Μία άλλη “συγγενική” ομάδα των λιπιδίων που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για τη μεταφορά siRNA είναι τα κατιοντικά και ουδέτερα λιποσώματα. Τα λιποσώματα είναι μικρά σφαιρικά κυστίδια που σχηματίζονται από μόρια που περιέχουν δύο υδρόφοβες αλυσίδες και μία υδρόφιλη κεφαλή (συνήθως πρόκειται για φωσφολιπίδια). Τα μόρια αυτά κατανέμονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να σχηματίζουν μία υδρόφοβη περιφέρεια (λιπιδική διπλοστοιβάδα) η οποία στο εσωτερικό της περιέχει μία υδρόφιλη κοιλότητα στην οποία βρίσκεται το siRNA κατά τη διάρκεια της επιμόλυνσης.<sup>[122]</sup> Στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται πολλές μελέτες που αφορούν τη χρήση λιποσωμάτων τα οποία έχουν μελετηθεί και *in vivo* ενάντια σε καρκινικούς όγκους,<sup>[123,124]</sup> αλλά και στην κίρρωση του ήπατος.<sup>[125]</sup>

Τέλος, να αναφερθεί εδώ ότι μερικές φορές το siRNA πριν από τη μεταφορά του στα κύτταρα (με ιικούς και μη μεταφορείς) υφίσταται κάποιες χημικές τροποποιήσεις με στόχο την ενίσχυση της σταθερότητάς του στο αίμα, την καθυστέρηση της αποικοδόμησής του μέσα στον οργανισμό αλλά και την αποτροπή πιθανής ανοσοποιητικής απόκρισης. Τέτοιες χημικές τροποποιήσεις μπορεί να είναι η προσθήκη φωσφοροθειικών ή βορανοφωσφορικών ομάδων στην εσωτερική αλυσίδα των νουκλεοτιδίων,<sup>[126]</sup> καθώς, επίσης, και η ενσωμάτωση ομάδων φθορίου στη βάση της πυριμιδίνης.<sup>[126]</sup>

Συνοπτικά, από την πιο πάνω βιβλιογραφική ανασκόπηση φαίνεται ότι μέχρι σήμερα έχει πραγματοποιηθεί η χρήση διαφόρων συστημάτων μεταφοράς siRNA τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης αυτών των συστημάτων μεταφοράς παρατηρήθηκε ότι εξαρτάτο από διάφορους παράγοντες.

Καταρχήν, η πυκνότητα του θετικού φορτίου αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα συμπλοκοποίησης και τη μεταφορά siRNA στα κύτταρα. Από τις πιο πάνω βιβλιογραφικές αναφορές, παρατηρήθηκε ότι η χρήση πιο σφαιρικών συστημάτων όπως της *b*-PEI,<sup>[47]</sup> των διακλαδισμένων αμινοξέων,<sup>[55,56]</sup> καθώς και των δενδριμερών πολυμερών,<sup>[73-78]</sup> τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη πυκνότητα θετικού φορτίου, οδηγούσε σε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα γραμμικά συστήματα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η πλήρως αποακετυλιωμένη PEI<sup>[19(β),64]</sup> (αύξηση θετικού φορτίου) αυξάνει την αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης σε σχέση με τη μη-τροποποιημένη PEI.



Η εισαγωγή κάποιων υποκαταστατών όπως είναι ο F,<sup>[40,41]</sup> το HA<sup>[42]</sup> αλλά και διάφορα πεπτίδια<sup>[43,44,46,107,108]</sup> τα οποία παρουσίαζαν ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένες περιοχές των κυττάρων-στόχων, σε PEI ή άλλα πολυμερή είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης.

Επιπλέον, η εισαγωγή υδρόφοβων μορίων όπως το EA,<sup>[47,48]</sup> το BuA,<sup>[48]</sup> το HexA,<sup>[48]</sup> το Lau<sup>[48]</sup> και το PBGL<sup>[49,96]</sup> σε PEI παρατηρήθηκε ότι οδηγούσε σε αύξηση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης. Επίσης, φάνηκε ότι η εισαγωγή υδρόφοβων τμημάτων σε διαδρομερή συμπολυμερή<sup>[86,87]</sup> και μάλιστα η αύξηση του μήκους τους, οδηγούσε σε καλύτερα αποτελέσματα μεταφοράς.

Χωρίς αμφιβολία η τιμή  $pK$  αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των κατιοντικών συστημάτων μεταφοράς αφού καθορίζει τόσο τη συμπλοκοποίηση όσο και την απελευθέρωση του siRNA. Η PEI λόγω της μεγάλης απόκρισής της στο pH αποτελεί το πιο διαδεδομένο κατιοντικό πολυμερές.

Η τοξικότητα αποτελεί, επιπλέον, έναν πολύ σημαντικό δείκτη για την καταλληλότητα χρήσης ενός συστήματος μεταφοράς. Η χρήση διακλαδισμένων συστημάτων έναντι γραμμικών,<sup>[73-78]</sup> η ελάττωση του θετικού φορτίου<sup>[32,33]</sup> αλλά και η εισαγωγή διαφόρων υδρόφιλων ή υδρόφοβων τμημάτων όπως PEG,<sup>[37,38,104-106]</sup> κυκλοδεξτρίνης,<sup>[101]</sup> PBLG<sup>[49]</sup> και διάφορων αλειφατικών εστέρων,<sup>[47]</sup> παρατηρήθηκε ότι οδηγεί σε δραματική μείωση της τοξικότητας κατά την επιμόλυνση αποδεικνύοντας έτσι ότι η μέγιστη αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης σε συνδυασμό με την ελάχιστη ή καθόλου τοξικότητα ενός εν δυνάμει οχήματος μεταφοράς αποτελούν τις βέλτιστες συνθήκες επιμόλυνσης.

Δύο άλλες παράμετροι οι οποίες είναι πολύ σημαντικές κατά τη μεταφορά γενετικού υλικού είναι το MB και η ποσότητα του πολυμερικού συστήματος που χρησιμοποιείται στο σύμπλοκο. Αν και αυτές οι παράμετροι δεν έχουν μελετηθεί συστηματικά κατά τη μεταφορά siRNA, σε κάποιες μελέτες παρατηρείται καθαρά ότι τόσο η αύξηση του MB<sup>[31(a),47,64]</sup> όσο και η αύξηση της ποσότητας του πολυμερικού συστήματος<sup>[64]</sup> οδηγούν σε αύξηση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης. Ταυτόχρονα, όμως, στις περισσότερες περιπτώσεις οδηγούν και σε αύξηση της τοξικότητας.

Πέρα από τις πιο πάνω παρατηρήσεις, είναι δύσκολο να συγκριθούν περαιτέρω τα διάφορα συστήματα μεταφοράς λόγω της στόχευσης διαφορετικών γονιδίων αλλά και της χρήσης διαφορετικών κυτταροσειρών. Παρόλα αυτά, είναι εμφανές ότι η αρχιτεκτονική, η εκλεκτικότητα, το  $pK$ , το MB και η ποσότητα του συστήματος μεταφοράς που

---

χρησιμοποιείται κατά την επιμόλυνση αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης.

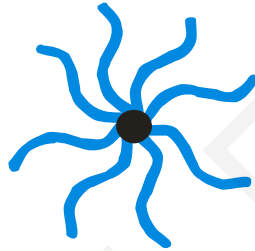
Κυριακή Σ. Παφίτη

### 1.2.3 Πολυμερικά Συστήματα

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή εξετάζεται η χρήση διαφόρων πολυμερικών συστημάτων για τη μεταφορά siRNA, συμπεριλαμβανομένων αστεροειδών πολυμερών, αμφιφιλικών και αμφολυτικών πολυμερικών πλεγμάτων. Τα συστήματα αυτά παρουσιάζονται στις αντίστοιχες παραγράφους που ακολουθούν.

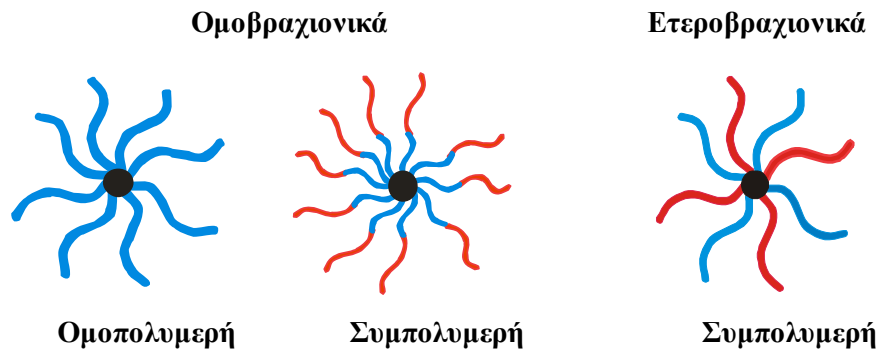
#### 1.2.3.1 Αστεροειδή Πολυμερή

Τα αστεροειδή πολυμερή είναι πολυμερή σε σχήμα αστεριού. Αποτελούνται από πολυμερικές αλυσίδες, τους βραχίονες, οι οποίες είναι διασυνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω μορίων τα οποία ονομάζονται διασταυρωτές (Σχήμα 1.10).



**Σχήμα 1.10:** Σχηματική απεικόνιση αστεροειδούς πολυμερούς. Με μαύρο φαίνεται ο πυρήνας του αστεροειδούς και με ανοικτό μπλε οι βραχίονες.

Τα αστεροειδή πολυμερή μπορούν να χωριστούν σε ομοβραχιονικά και ετεροβραχιονικά ανάλογα με το είδος των βραχιόνων τους. Τα ομοβραχιονικά αστεροειδή αποτελούνται από ένα είδος βραχιόνων, ενώ τα ετεροβραχιονικά αποτελούνται από δύο ή περισσότερα είδη βραχιόνων. Περαιτέρω, τα ομοβραχιονικά αστεροειδή πολυμερή μπορούν να χωριστούν ανάλογα με τη σύσταση των βραχιόνων τους. Συγκεκριμένα, εάν οι βραχίονές τους αποτελούνται από ένα είδος μονομερούς τότε ονομάζονται ομοπολυμερή αστεροειδή, ενώ εάν οι βραχίονές τους αποτελούνται από δύο είδη μονομερών τότε λέγονται συμπολυμερή (Σχήμα 1.11). Ανάλογα με τη διαδοχή των μονομερών στις αλυσίδες τους (τμηματική, εναλλασσόμενη ή τυχαία), τα αστεροειδή πολυμερή αναφέρονται ως αδρομερή, εναλλασσόμενα ή τυχαία αστεροειδή συμπολυμερή.

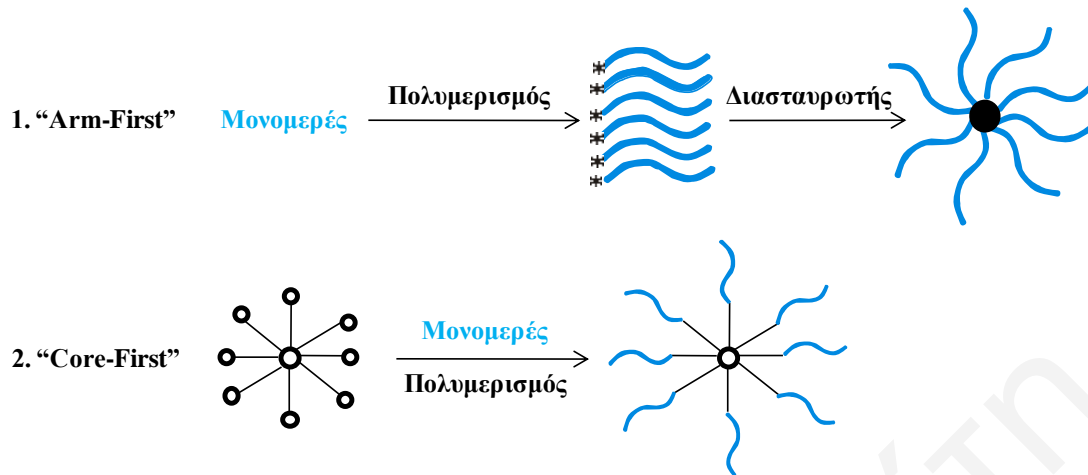


**Σχήμα 1.11:** Σχηματική απεικόνιση διάφορων τύπων αστεροειδών πολυμερών. Με μαύρο φαίνεται ο πυρήνας του αστεροειδούς και με μπλε οι βραχίονες.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφοροι τρόποι σύνθεσης αστεροειδών πολυμερών. Οι δύο σημαντικότεροι τρόποι σύνθεσης των αστεροειδών πολυμερών, οι οποίοι φαίνονται και αναπαρίστανται στο Σχήμα 1.12, είναι η μέθοδος “arm-first” και η μέθοδος “core-first”.

Στη μέθοδο “arm-first” παρασκευάζονται πρώτα οι βραχίονες του αστεροειδούς πολυμερούς οι οποίοι στη συνέχεια συνδέονται με τη χρήση ενός διδραστικού συνδετικού μορίου, διασταυρωτής. Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η σύνθεση αστεροειδών πολυμερών με ελεγχόμενο βαθμό πολυμερισμού (BΠ) βραχιόνων, ενώ μειονέκτημα αποτελεί η μη ελεγχόμενη κατανομή του αριθμού των βραχιόνων γύρω από τους πυρήνες.

Στη μέθοδο “core-first”, η σύνθεση των αστεροειδών πολυμερών πραγματοποιείται στην παρουσία ενός πολυδραστικού εκκινητή ο οποίος θα αποτελέσει τον πυρήνα του αστεροειδούς. Στην παρουσία του πολυδραστικού εκκινητή, οι αλυσίδες που θα αποτελέσουν τους βραχίονες του αστεροειδούς πολυμερούς αρχίζουν να πολυμερίζονται από τον πυρήνα προς τα έξω. Έτσι, με τη μέθοδο αυτή λαμβάνονται αστεροειδή πολυμερή με καθορισμένο αριθμό βραχιόνων και ίσο με τη δραστηριότητα του εκκινητή, αλλά όχι καθορισμένο BΠ βραχιόνων αφού όλα τα κέντρα εκκίνησης δεν έχουν την ίδια ενεργότητα.



**Σχήμα 1.12:** Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων σύνθεσης αστεροειδών πολυμερών "core-first" και "arm-first".

Στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται πολλά παραδείγματα σύνθεσης αστεροειδών πολυμερών και με τις δύο μεθόδους. Αυτά τα παραδείγματα δίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 1.5 που ακολουθεί. Στον Πίνακα συγκεκριμένα δίνονται τα μονομερή, η αρχιτεκτονική, η μέθοδος πολυμερισμού, η μέθοδος σύνθεσης και οι τρόποι χαρακτηρισμού των αστεροειδών πολυμερών.

Από όλα τα αστεροειδή πολυμερή που συντέθηκαν, μόνο σε μία περίπτωση<sup>[136]</sup> συζητείται η βιοεφαρμογή τους. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται η χρήση του για την απελευθέρωση του φαρμάκου προγεστερόνης.

Στην παρούσα Εργασία πραγματοποιείται η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η εφαρμογή αστεροειδών ομοπολυμερών σαν συστήματα μεταφοράς siRNA σε κύτταρα θηλαστικών.

**Πίνακας 1.5:** Μονομερή, μέθοδος πολυμερισμού, τρόπος σύνθεσης και μέθοδοι χαρακτηρισμού των αστεροειδών πολυμερών που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία.

A/A	Μονομερές A <sup>1</sup>	Μονομερές B <sup>1</sup> (εάν υπάρχει)	Αρχιτεκτονική αστεροειδούς πολυμερούς <sup>1</sup>	Μέθοδος πολυμερισμού <sup>1</sup>	Μέθοδος σύνθεσης <sup>1</sup>	Βιβλιογραφική αναφορά
1	MMA	-----	ομοπολυμερές	RAFT	“core-first”	127
2	MMA	-----	ομοπολυμερή	LRP	“arm-first”	128
3	MMA	CL	ετεροβραχιονικό	ATRP: μονομερές A ROP: μονομερές B	“core-first”	129
4	St B MMA	B, MMA	ομοπολυμερή PSt, PB, PMMA ομοβραχιονικά τριαδρομέρη P(St- <i>b</i> -B- <i>b</i> -MMA)	Ανιοντικός	“core-first”	130
5	B	-----	ομοπολυμερή	Ανιοντικός	“arm-first”	131
6	CHD	St	ομοπολυμερές CDH ομοβραχιονικά διαδρομερή	Ανιοντικός	“arm-first”	132
7	IP	-----	ομοπολυμερή	Ανιοντικός	“arm-first”	133
8	<i>n</i> BuA MMA	St BA	ετεροβραχιονικά συμπολυμερή	ATRP	“core-first”, “arm-first”	134
9	St MA <i>n</i> BuA	-----	ομοπολυμερές ομοπολυμερές ομοπολυμερές	ATRP	“core-first”	135

A/A	Μονομερές A <sup>1</sup>	Μονομερές B <sup>1</sup> (εάν υπάρχει)	Αρχιτεκτονική αστεροειδούς πολυμερούς <sup>1</sup>	Μέθοδος πολυμερισμού <sup>1</sup>	Μέθοδος σύνθεσης <sup>1</sup>	Βιβλιογραφική αναφορά
10	<i>t</i> BuMA, EM	PEGMA	διαδρομερή τριπολυμερή: P(EM- <i>co-t</i> -BuMA)- <i>b</i> - P(PEGMA)	ATRP	“core-first”	136
11	<i>t</i> BuA	-----	ομοπολυμερή	ATRP	“core-first”	137
12	St MA	-----	ομοπολυμερές ομοπολυμερές	ATRP	“core-first”	138
13	St	2PV	ετεροβραχιονικά συμπολυμερή διαδρομερή συμπολυμερή	Ανιοντικός	“arm-first”	139
14	St	EMA, <i>t</i> BA, 2PV	ετεροβραχιονικά συμπολυμερή	Ανιοντικός	“arm-first”	140
15	St	-----	ομοπολυμερή	Ανιοντικός	“arm-first”	141
16	St	DVB	ομοπολυμερή St ομοβραχιονικά διαδρομερή	RAFT	“arm-first”	142
17	St	CL	ετεροβραχιονικά συμπολυμερή	ATRP, ROP	“core-first”	143
18	St	AA	διαδρομερή συμπολυμερή	RAFT	“core-first”	144
19	St	F <sub>8</sub> H <sub>2</sub> -MA	ετεροβραχιονικά συμπολυμερή	Ανιοντικός	“arm-first”	145
20	DPE	St	ομοπολυμερή, ετεροβραχιονικά	Ανιοντικός	“arm-first”	146

A/A	Μονομερές A <sup>1</sup>	Μονομερές B (εάν υπάρχει) <sup>1</sup>	Αρχιτεκτονική αστεροειδούς πολυμερούς <sup>1</sup>	Μέθοδος Πολυμερισμού <sup>1</sup>	Μέθοδος σύνθεσης <sup>1</sup>	Βιβλιογραφική αναφορά
21	BzMA	HEGMA	ομοβραχιονικά διαδρομερή ετεροβραχιονικά	GTP	“arm-first”	147
22	DEA	-----	ομοπολυμερή	ATRP	“core-first”	148
23	DMAEMA	HEGMA, MMA	ομοβραχιονικά τριαδρομέρη και τυχαία	GTP	“arm-first”	149
24	CL	<i>t</i> BuA, MMA	ετεροβραχιονικά	ROP: μονομερές A ATRP: μονομερές B	“core-first”	150
25	CL	St	ετεροβραχιονικά συμπολυμερή	ATRP	“core-first”, “arm-first”	151
26	PPS	-----	Ομοπολυμερή	Ανιοντικός	“core-first”	152
27	poly(DHF) μακροεκκινητής	2VP	ομοβραχιονικά συμπολυμερή	Ανιοντικός	“arm-first”	153
28	NVP	-----	ομοπολυμερή	ATRP	“core-first”	154

<sup>1</sup>Όλες οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στον Πίνακα δίνονται στις “Συντομογραφίες” στις αρχικές σελίδες της Διδακτορικής Διατριβής.



### 1.2.3.2 Πλέγματα Πολυμερών

Πολυμερικά πλέγματα είναι διασταυρωμένα τρισδιάστατα πολυμερή τα οποία παρουσιάζουν συνδέσεις μεταξύ των αλυσίδων τους. Ανάλογα με το εάν οι αλυσίδες του πολυμερούς διασταυρωθούν σε συγκεκριμένες ή τυχαίες θέσεις, λαμβάνονται τα πρότυπα ή τα τυχαία διασταυρωμένα πλέγματα, αντίστοιχα.

Τα πολυμερικά πλέγματα είναι υλικά τα οποία είναι αδιάλυτα σε όλους τους διαλύτες, ενώ διογκώνονται σε αυτούς ανάλογα με την πολικότητά τους. Η διόγκωση των πλεγμάτων οφείλεται σε διάφορες ευνοϊκά φαινόμενα όπως η ελεύθερη ενέργεια ανάμιξης διαλύτη και πολυμερούς και οι ηλεκτροστατικές απωστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων του πλέγματος. Η έκταση της διόγκωσης ενός πλέγματος σε κάποιο διαλύτη εξαρτάται από το βαθμό διασταύρωσής του, τη σύσταση του διαλύτη, τη θερμοκρασία, το pH και την παρουσία ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας.<sup>[155]</sup>

Τα πλέγματα ανάλογα με τη σύστασή τους διακρίνονται σε υδρόφιλα, υδρόφοβα και αμφιφιλικά. Τα υδρόφιλα πλέγματα, τα οποία είναι συμβατά με το νερό και διάφορους άλλους υδρόφιλους διαλύτες, ονομάζονται και υδροπλέγματα. Στα υδροπλέγματα ανήκουν και τα πολυαμφολυτικά πλέγματα τα οποία αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες θετικά και αρνητικά φορτισμένες ομάδες.

Τα πολυμερικά πλέγματα χρησιμοποιούνται σε διάφορους τομείς της καθημερινότητας, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι βιοφαρμακευτικές εφαρμογές τους. Συγκεκριμένα, τα πολυμερικά πλέγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ελεγχόμενη απόδοση φαρμάκων, για κατασκευή τεχνητών χόνδρων και τενόντων, ως υλικά επικάλυψης για πληγές, ως τεχνητές μεμβράνες και όργανα αλλά και ως λιπαντικά σε επιστρώσεις επιφανειών π.χ. γάντια και σωλήνες αποξήρανσης.

Το ενδιαφέρον σε αυτήν την Εργασία είναι η χρησιμοποίηση πλεγμάτων για προσρόφηση RNA, το οποίο θα αποδοθεί αργότερα.

#### 1.2.3.2.1 Φθοριωμένα Αμφιφιλικά Πλέγματα

Τα αμφιφιλικά πλέγματα εκπροσωπούν μία καινούργια κατηγορία πολυμερικών υλικών τα οποία αποτελούνται από χημικά διασταυρωμένες υδρόφιλες και υδρόφοβες μονάδες.<sup>[157-159]</sup> Από την εισαγωγή τους στη βιβλιογραφία στα τέλη του 1980,<sup>[160-162]</sup> τα αμφιφιλικά πλέγματα έχουν αποτελέσει το αντικείμενο μελέτης από πάρα πολλούς ερευνητές. Η δομή των αμφιφιλικών πλεγμάτων είναι μοναδική αφού συνδυάζει τα χαρακτηριστικά των υδροπλεγμάτων και των τασιενεργών. Έτσι, τα υλικά αυτά μπορούν να διογκωθούν σε

νερό αλλά και σε οργανικούς διαλύτες. Περαιτέρω, όταν οι δύο τύποι των μονάδων τοποθετηθούν σε αρκετά μεγάλα τμήματα, τα αμφιφιλικά πλέγματα παρουσιάζουν νανοφασικό διαχωρισμό σε συγκεκριμένους διαλύτες, όπως ακριβώς τα τασιενεργά και τα τμηματικά συμπολυμερή. Τα αμφιφιλικά πλέγματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε μία πληθώρα εφαρμογών, κυρίως σαν μήτρες για τη μεταφορά φαρμάκων,<sup>[163]</sup> καλούπια για σχεδιασμό ιστών,<sup>[164, 165]</sup> μεμβράνες για τεχνητό πάγκρεας,<sup>[166]</sup> μαλακοί φακοί επαφής,<sup>[167]</sup> ημιδιαπερατές μεμβράνες,<sup>[168]</sup> υποστρώματα για ανάπτυξη νανοκρυστάλλων Pt,<sup>[169]</sup> καθώς και ως υλικά για υποστήριξη οργανικής<sup>[170]</sup> ή ενζυματικής<sup>[171]</sup> κατάλυσης.

Πρόσφατες μελέτες σε αμφιφιλικά πλέγματα παρουσίασαν τη σύνθεση αμφιφιλικών υλικών με ελεγχόμενη δομή, και, συγκεκριμένα, με καλώς-ορισμένη τη δομή του ενός από τα δύο τμήματα, είτε του υδρόφοβου<sup>[172]</sup> είτε του υδρόφιλου.<sup>[173]</sup> Σε μία προσπάθεια για σύνθεση καλώς-ορισμένων αμφιφιλικών πλεγμάτων, η ερευνητική μας Ομάδα τα τελευταία δέκα χρόνια έχει συνθέσει αμφιφιλικά ABA τριαδρομερή συμπολυμερή τα οποία διασταυρώθηκαν *in situ* προς σχηματισμό αμφιφιλικών πλεγμάτων.<sup>[174]</sup> Οι περισσότερες από τις συνθέσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του πολυμερισμού GTP, ενώ κάποιες πιο πρόσφατες προσπάθειες περιελάμβαναν τη χρήση των μεθόδων πολυμερισμού RAFT και ATRP. Στις μελέτες αυτές διάφορα υδρόφιλα μονομερή είχαν εισαχθεί συμπεριλαμβανομένων ουδέτερων,<sup>[175-177]</sup> θετικά ιονιζόμενων<sup>[176-192]</sup> και αρνητικά ιονιζόμενων,<sup>[193-195]</sup> ενώ ως υδρόφοβα μονομερή είχαν χρησιμοποιηθεί αλειφατικά<sup>[175-180, 182-195]</sup> και αρωματικά.<sup>[175,181,182]</sup>

Μία άλλη σημαντική κατηγορία υδρόφοβων μονομερών είναι τα ημιφθοριωμένα μονομερή τα οποία προσδίδουν πολλές ιδιότητες στα πολυμερή τους. Τέτοιες ιδιότητες αποτελούν η υψηλή θερμική και χημική σταθερότητα, η βιοσυμβατότητα, η χαμηλή επιφανειακή ενέργεια και η χαμηλή αναφλεξιμότητα. Αμφιφιλικά πλέγματα με υδρόφοβα φθοριωμένα τμήματα έχουν πρόσφατα παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, παρουσιάστηκε η σύνθεση φθοριωμένων και ημιφθοριωμένων πλεγμάτων έπειτα από διασταύρωση PEG ή πολυ(διμεθυλοσιλοξανίου) (poly(dimethylsiloxane), PDMS) με υπερδιακλαδισμένους φθοροβενζυλαιθέρες.<sup>[196,197-199,200,201]</sup> Περαιτέρω, οι Bruns και Tiller<sup>[202]</sup> συνέθεσαν φθοριωμένα πλέγματα βασισμένα σε πολυ(ακρυλικό υπερφθοροδεκυλεστέρα) και πολυ(ακρυλικού 2-υδροξυ(αιθυλεστέρα)). Αμφιφιλικά πλέγματα πολυ(ουραιθανών)<sup>[203-205]</sup> βασισμένα σε φθοροαιθέρες παρουσιάστηκαν επίσης στη βιβλιογραφία, ενώ ο Bongiovanni και συνεργάτες<sup>[206]</sup> παρουσίασαν πλέγματα

βασισμένα σε ABA τριαδρομερή συμπολυμερή στα οποία είτε το A είτε το B ήταν φθοριωμένα.

Όπως φαίνεται πιο πάνω, στη βιβλιογραφία δεν παρουσιάζονται αρκετά τμηματικά αμφιφιλικά πλέγματα με φθοριωμένα τμήματα. Έτσι, επιμέρους στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση καλώς-ορισμένων ημιφθοριωμένων αμφιφιλικών πλεγμάτων βασισμένων σε ABA τριαδρομερή συμπολυμερή και η διερεύνηση της προσρόφησης σε αυτά RNA.

#### **1.2.3.2.2 Αμφολυτικά Πλέγματα**

Μία άλλη σημαντική κατηγορία πολυμερικών πλεγμάτων είναι τα αμφολυτικά πλέγματα τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των υδροπλεγμάτων. Τα αμφολυτικά πλέγματα είναι διασταυρωμένα πολυμερή που φέρουν θετικά και αρνητικά φορτισμένα τμήματα.<sup>[207-211]</sup>

Όταν τα τμήματα αυτά είναι βασισμένα σε ασθενή οξέα ή ασθενείς βάσεις, τα πολυαμφολυτικά πλέγματα έχουν ισχυρή απόκριση στο pH. Χαρακτηριστικά παρουσιάζουν μεγάλους βαθμούς διόγκωσης (BΔ) (μεγάλη επιμήκυνση των αλυσίδων) σε ακραίες τιμές pH και ελάχιστη ή καθόλου διόγκωση σε ενδιάμεσες τιμές pH και γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο, pI, όπου το συνολικό φορτίο του πλέγματος είναι μηδέν. Αυτά τα υλικά βρίσκουν πολλές εφαρμογές στην ιατρική<sup>[212-214]</sup> και κυρίως στην απελευθέρωση φαρμάκων<sup>[215]</sup> και στην προσρόφηση DNA,<sup>[216,217]</sup> ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και στην προσρόφηση και απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων.<sup>[218]</sup>

Στη βιβλιογραφία παρουσιάζεται ένας μεγάλος αριθμός παραδειγμάτων σύνθεσης τυχαίων πολυαμφολυτικών πλεγμάτων<sup>[213-239]</sup> βασισμένων σε διάφορα θετικά ιονιζόμενα και αρνητικά ιονιζόμενα μονομερή. Σε όλες τις περιπτώσεις η σύνθεση είναι τυχαία με χρήση πολυμερισμού ελευθέρων ριζών, οδηγώντας έτσι σε περιορισμένο ή καθόλου έλεγχο στη δομή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι αλυσίδες ανάμεσα στα κέντρα διασταύρωσης (οι ελαστικές αλυσίδες) παρουσιάζουν ευρεία κατανομή MB σαν αποτέλεσμα του ταυτόχρονου συμπολυμερισμού των μονομερών και του διασταυρωτή.

Ο έλεγχος στο μήκος και στη σύσταση των αλυσίδων των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση “ζωντανών” μεθόδων πολυμερισμού. Σήμερα, οι μόνες αναφορές που παρουσιάζουν τη σύνθεση καλώς-ορισμένων πολυαμφολυτικών πλεγμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του GTP. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν πολυαμφολυτικά πλέγματα βασισμένα σε διασταυρωμένα ABA τριαδρομερή συμπολυμερή,<sup>[240]</sup> και αστεροειδή συμπολυμερή.<sup>[216]</sup>

---

Επιμέρους, στόχος της παρούσας Εργασίας αποτελεί η σύνθεση καλώς-ορσιμένων πολυαμφολυτικών πλεγμάτων διασυνδεδεμένων στα άκρα με τη χρήση του πολυμερισμού RAFT, και η μελέτη της φόρτισής τους με RNA.

Κυριακή Σ. Παφίτη

### 1.3 Θεωρητικό Υπόβαθρο

#### 1.3.1 Επιμόλυνση

Επιμόλυνση είναι η διαδικασία μεταφοράς ξένων μορίων σε κύτταρα είτε για σκοπούς μελέτης (λειτουργία γονιδίων και έκφραση πρωτεϊνών) είτε για θεραπευτικούς σκοπούς (γενετική θεραπεία). Τέτοια μόρια μπορεί να είναι γενετικό υλικό (όπως DNA, RNA, πλασμιδιακό DNA και siRNA) αλλά και πρωτεΐνες (όπως αντισώματα).

Η επιμόλυνση του κυττάρου με siRNA (και γενικά με γενετικό υλικό) μπορεί να πραγματοποιηθεί με απευθείας μεταφορά “γυμνού” siRNA, με συμπλοκοποίηση μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων αλλά και με χημική πρόσδεση του siRNA σε διάφορα συστήματα όπως κατιοντικά πολυμερή, λιπίδια, λιποσώματα, κατιοντικά αντισώματα, πρωτεΐνες και απταμερή. Επίσης, η επιμόλυνση με siRNA μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ιών όπως ρετροϊών, αδενοϊών, καθώς και αδενο-σχετιζόμενων ιών.

Ταυτόχρονα, για τη μεταφορά γενετικών υλικών έχει χρησιμοποιηθεί και η μέθοδος “gene gun” (κυρίως για το DNA) κατά την οποία χρησιμοποιούνται νανοσωματίδια χρυσού (Au). Παράλληλα, η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε υδροδυναμικά και με ηλεκτροπόρωση. Κατά την ηλεκτροπόρωση στα κύτταρα εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και έτσι δημιουργούνται οπές στις κυτταρικές μεμβράνες από τις οποίες εισέρχεται το γενετικό υλικό.

Στην παρούσα Εργασία η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατιοντικών συστημάτων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συμπλοκοποίηση του siRNA με τα κατιοντικά πολυμερή μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, και τα σχηματισθέντα σύμπλοκα μεταφέρθηκαν στη συνέχεια στα κύτταρα βάσει συγκεκριμένου πρωτοκόλλου.

#### 1.4.1 Μέθοδοι Πολυμερισμού

Οι μέθοδοι πολυμερισμού διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τους “ζωντανούς” και τους “μη-ζωντανούς” πολυμερισμούς. Τα τελευταία χρόνια γίνονται πολλές έρευνες για ανάπτυξη νέων “ζωντανών” μεθόδων πολυμερισμού. Στις “ζωντανές” μεθόδους πολυμερισμού, όλα τα μόρια του εκκινητή ενεργοποιούνται νωρίς και ταυτόχρονα, ενώ όλα τα κέντρα του πολυμερισμού παραμένουν ενεργά και διαθέσιμα για προσθήκη ακόμα και όταν καταναλωθεί όλη η ποσότητα του μονομερούς. Στους “ζωντανούς” πολυμερισμούς το MB των πολυμερών μπορεί να καθοριστεί από προηγουμένως μέσω του λόγου μονομερούς προς εκκινητή, παρέχοντας έτσι έλεγχο κατά τον πολυμερισμό.

Στην κατηγορία των “ζωντανών” μεθόδων πολυμερισμού ανήκουν ο ανιοντικός πολυμερισμός, το GTP, το RAFT και το ATRP, ενώ στους “μη-ζωντανούς” πολυμερισμούς συγκαταλέγονται ο πολυμερισμός ελευθέρων ριζών και ο κατιοντικός πολυμερισμός. Στους “μη-ζωντανούς” πολυμερισμούς τα άκρα των πολυμερών δεν διατηρούνται ενεργά, ενώ οι κατανομές των MB είναι πλατιές λόγω του τερματισμού των αλυσίδων, με αποτέλεσμα τη λήψη πολυμερικών αλυσίδων με ποικίλους βαθμούς πολυμερισμού (απώλεια ελέγχου).

Στην παρούσα Εργασία για τη σύνθεση των πολυμερικών συστημάτων χρησιμοποιήθηκαν οι “ζωντανοί” πολυμερισμοί GTP και RAFT οι οποίοι παρουσιάζονται στη συνέχεια.

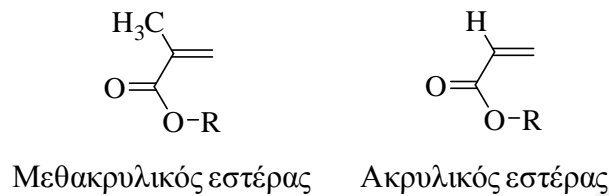
#### ***1.4.1.1 Πολυμερισμός Μεταφοράς Ομάδας [Group Transfer Polymerization, GTP]<sup>[421-245]</sup>***

Ο πολυμερισμός μεταφοράς ομάδας (GTP) ανακαλύφθηκε από τον Owen W. Webster στα εργαστήρια της Dupont στις ΗΠΑ στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Η ανακάλυψη του GTP αποτέλεσε μία σημαντική εξέλιξη στο χώρο των ανιοντικών πολυμερισμών. Το GTP, καταρχήν, διατηρεί το σημαντικό πλεονέκτημα του ανιοντικού πολυμερισμού κατά το οποίο τα άκρα του πολυμερούς παραμένουν ενεργά ακόμα και μετά την πλήρη κατανάλωση του μονομερούς, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα για περαιτέρω πολυμερισμό. Πρόκειται για μία βασική μέθοδο ελεγχόμενου πολυμερισμού ακρυλικών μονομερών η οποία διεξάγεται ακόμα και σε θερμοκρασία δωματίου και απαιτεί πυριτικές κετενικές ακετάλες ή άλλες ενώσεις του πυριτίου σαν εκκινητές και πυρηνόφιλα αντιδραστήρια ως καταλύτες (όπως ιόντα φθοριδίου, διφθοριδίου, κυανιδίου, αζιδίου, οξυανιόντα και οξέα Lewis). Δίνει “ζωντανά” πολυμερή με στενή κατανομή MB, όπου ο βαθμός πολυμερισμού ελέγχεται από την αναλογία μονομερούς προς εκκινητή.

Η μέθοδος πολυμερισμού GTP παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως είναι ποσοτική απόδοση του πολυμερισμού, στενή κατανομή μοριακών βαρών, σχετικά μεγάλη ταχύτητα αντίδρασης πολυμερισμού, ενώ οι πολυμερισμοί GTP μπορούν επίσης να διεξαχθούν και σε θερμοκρασία δωματίου. Περαιτέρω, το GTP δίνει τη δυνατότητα παρασκευής πολυμερών με διάφορες αρχιτεκτονικές όπως είναι αδρομερή συμπολυμερή, αστεροειδή πολυμερή, διακλαδισμένα πολυμερή αλλά και πλέγματα πολυμερών.

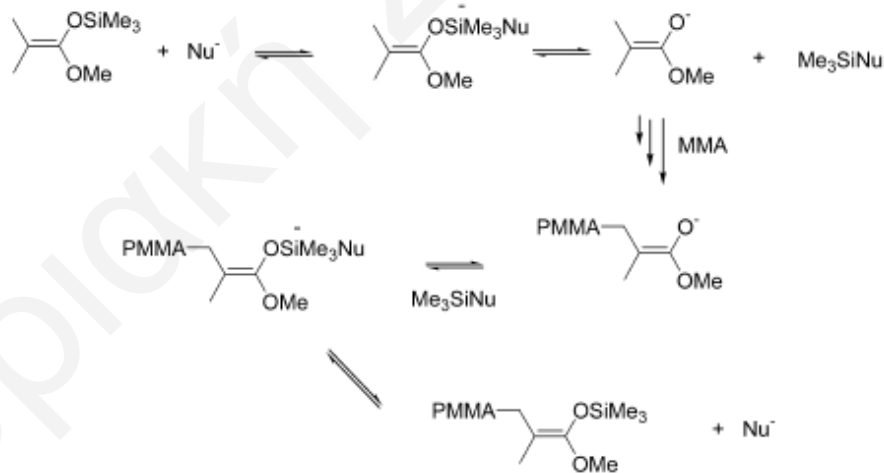
Μειονέκτημα του GTP αποτελεί το σχετικά μικρό μέγεθος των πολυμερών που μπορούν να παρασκευαστούν, με ένα άνω όριο MB για γραμμικά πολυμερή γύρω στις 50000 g mol<sup>-1</sup> που αντιστοιχεί σε ΒΠ ≤500. Επίσης, μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι ο GTP

μπορεί να εφαρμοστεί για τον πολυμερισμό μόνο συγκεκριμένων τύπων μονομερών, των μεθακρυλικών και των ακρυλικών (Σχήμα 1.13). Τέλος, η μεγάλη ευαισθησία του GTP στην υγρασία και στις όξινες ακαθαρσίες (όπου απενεργοποιούν τα ενεργά κέντρα του) αποτελεί επίσης ένα επιπρόσθετο μειονέκτημα, το οποίο όμως υπάρχει και στο “ζωντανό” ανιοντικό πολυμερισμό.



**Σχήμα 1.13:** Χημικές δομές των ακρυλικών και των μεθακρυλικών μονομερών.

Ο μηχανισμός του GTP αποτέλεσε για πολλά χρόνια θέμα διαμάχης ανάμεσα στους επιστήμονες. Τελικά, υιοθετήθηκε ο διασπαστικός μηχανισμός (dissociative) ο οποίος φαίνεται στο Σχήμα 1.14.



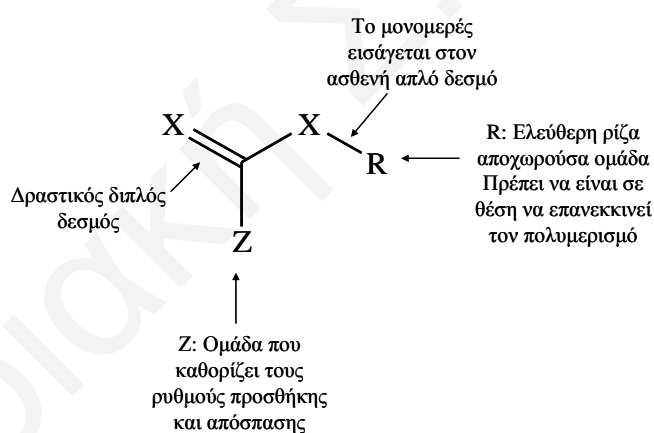
**Σχήμα 1.14:** Μηχανισμός του GTP.

Αρχικά, ο πυρηνόφιλος καταλύτης συμπλοκοποιείται με την πυριτική κετηνική ακετάλη και μέσω ενός διασπαστικού βήματος δημιουργείται το ενεργό ενολικό ανιόν το οποίο προστίθεται στα μονομερή. Στη συνέχεια, το ενολικό ανιόν ενώνεται με την ομάδα  $\text{Me}_3\text{SiNu}$  και έτσι ξαναδημιουργείται η τερματική πυριτική κετηνική ακετάλη.

### 1.4.1.2 Πολυμερισμός Μεταφοράς Αλυσίδας με Αντιστρεπτή Προσθήκη-Απόσπαση [Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer, RAFT, Polymerization]<sup>[246]</sup>

Ο πολυμερισμός RAFT ανακαλύφθηκε από τους Rizzardo και συνεργάτες στην Αυστραλία το 1998 και ανήκει στους ελεγχόμενους πολυμερισμούς ριζών. Πρόκειται για μια μέθοδο πολυμερισμού η οποία μπορεί να πολυμερίσει ένα ευρύ φάσμα μονομερών, συμπεριλαμβανομένων και μονομερών με λειτουργικές ομάδες όπως -OH, -COOH, -CONR<sub>2</sub>, -NR<sub>2</sub> και -SO<sub>3</sub>Na χωρίς να είναι απαραίτητη η διαδικασία προστασίας και αποπροστασίας των ομάδων αυτών, ενώ μπορεί να ληφθεί μία μεγάλη ποικιλία αρχιτεκτονικών δομών συμπεριλαμβανομένων αδρομερών συμπολυμερών, αστεροειδών και άλλων περίπλοκων αρχιτεκτονικών.

Στον πολυμερισμό RAFT είναι απαραίτητη η παρουσία διθειο-ενώσεων οι οποίες δρουν με πολύ αποτελεσματικό τρόπο σαν μόρια μεταφοράς αλυσίδας (CTA) με αντιστρεπτή προσθήκη-απόσπαση. Τα πιο γνωστά CTA είναι ενώσεις θειοκαρβονυλοθείου της μορφής Z-C(=S)S-R (Σχήμα 1.15) στις οποίες η ομάδα Z καθορίζει τους ρυθμούς προσθήκης και απόσπασης.



**Σχήμα 1.15:** Χημική δομή του μορίου μεταφοράς αλυσίδας του πολυμερισμού RAFT.

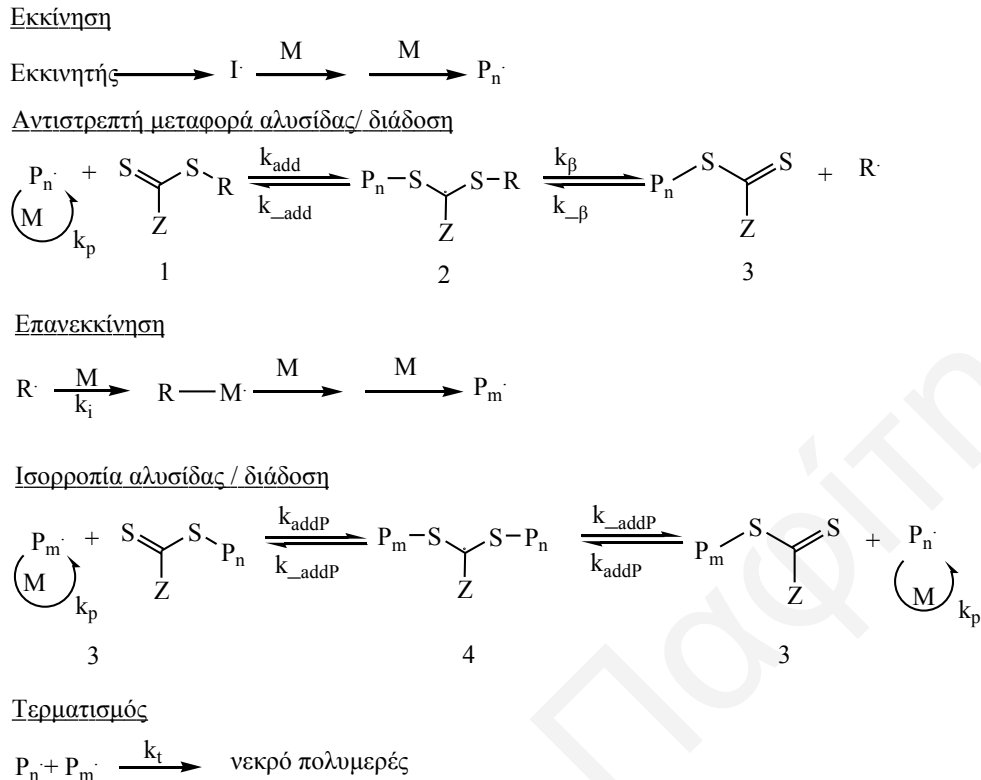
Για να είναι αποτελεσματικά τα CTA πρέπει να τηρούνται κάποιες προϋποθέσεις όπως:

1. Οι ρυθμοί προσθήκης και απόσπασης πρέπει να είναι παρόμοιοι με το ρυθμό διάδοσης του πολυμερισμού, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η γρήγορη κατανάλωση του αρχικού CTA και η γρήγορη ισορροπία ανάμεσα στις ενεργές και ανενεργές ενώσεις. Για να ευνοείται η προσθήκη ρίζας πρέπει η ομάδα Z να ενεργοποιεί το δεσμό C=S.



2. Για να εξασφαλίζεται η πρόοδος του πολυμερισμού μέχρι τον επιθυμητό βαθμό, πρέπει η αποχωρούσα ομάδα  $R^\bullet$  να είναι καλή αποχωρούσα ομάδα σαν ρίζα και να έχει την ικανότητα να επανενεργοποιεί τον πολυμερισμό ( $R = CH_2Ph, C(CH_3)_2Ph, C(CH_3)_2CN$ ). Σε περίπτωση που δεν συμβαίνει αυτό, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος καθυστέρησης του μηχανισμού και εμφάνισης ανεπιθύμητων αντιδράσεων μέσω ριζών, όπως, για παράδειγμα, πρόωρος τερματισμός.

Ο μηχανισμός του πολυμερισμού RAFT παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.16. Όπως φαίνεται στο Σχήμα, η έναρξη και ο τερματισμός του πολυμερισμού πραγματοποιούνται όπως στο συμβατικό πολυμερισμό ελευθέρων ριζών. Το πρώτο στάδιο του πολυμερισμού περιλαμβάνει διάσπαση του εκκινητή σε ρίζες. Οι ρίζες αυτές ( $P_n^\bullet$ ) εκκινούν τον πολυμερισμό με αντίδρασή τους με το μονομερές. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται προσθήκη της ρίζας διάδοσης ( $P_n^\bullet$ ) στη θειοκαρβονυλοθειϊκή ένωση (1), ακολουθούμενη από τη διάσπαση της ενδιάμεσης ρίζας που οδηγεί στο σχηματισμό μίας πολυμερικής θειοθειϊκής ένωσης (3) και μίας νέας ρίζας ( $R^\bullet$ ). Η αντίδραση της νέας ρίζας ( $R^\bullet$ ) με ένα μόριο μονομερούς δημιουργεί μία νέα ρίζα διάδοσης ( $P_m^\bullet$ ). Η γρήγορη ισορροπία μεταξύ των ενεργών ριζών διάδοσης ( $P_n^\bullet$  και  $P_m^\bullet$ ) και του αδρανούς θειοκαρβονυλοθειϊκού πολυμερούς (3) έχει ως αποτέλεσμα την ίση πιθανότητα για όλες τις αλυσίδες να αυξηθούν και να παραχθούν πολυμερή με χαμηλή πολυδιασπορά. Ο πυρήνας της πορείας RAFT είναι η κύρια ισορροπία η οποία παρουσιάζεται στην αντίδραση ισορροπία αλυσίδας / διάδοση με τις κινητικές σταθερές  $k_{addP}$  και  $k_{-addP}$  να ελέγχουν τη θέση ισορροπίας. Στο στάδιο της προσθήκης, η κινητική σταθερά  $k_{addP}$  ελέγχει τη διαμοριακή αντίδραση μεταξύ των ελεύθερων πολυμερικών ριζών και του πολυμερικού αντιδραστήριου RAFT η οποία οδηγεί στο σχηματισμό μακρο-RAFT ρίζας (4), ενώ η κινητική σταθερά  $k_{-addP}$  μπορεί να ερμηνευτεί σαν το αντίστροφο του μέσου χρόνου ζωής της ενδιάμεσης μακρο-RAFT ρίζας (4). Στο τελευταίο στάδιο γίνεται διαμοριακός τερματισμός του πολυμερισμού ελευθέρων ριζών, οδηγώντας στο σχηματισμό ανενεργών πολυμερών. Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, οι περισσότερες αλυσίδες διατηρούν τη θειοκαρβονυλοθειϊκή τελική ομάδα και μπορούν να απομονωθούν ως σταθερά υλικά.



**Σχήμα 1.16:** Στάδια πολυμερισμού RAFT.

Ο πολυμερισμός RAFT επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, αφού αύξησή της οδηγεί σε μεγαλύτερη αύξηση της κινητικής σταθεράς διάσπασης σε σχέση με την αύξηση που παρουσιάζουν οι υπόλοιπες κινητικές σταθερές, γεγονός που οφείλεται στη μεγαλύτερη ενέργεια ενεργοποίησης. Αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού πολυμερισμού, χωρίς να επηρεάζεται ο δείκτης πολυδιασποράς (ΔΠ). Η κινητική σταθερά μεταφοράς του CTA αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, διασφαλίζοντας έτσι γρήγορο ρυθμό ανταλλαγής ανάμεσα στην αδρανή και την ενεργή αλυσίδα.

Για καλό έλεγχο των MB και του ΔΠ, ο λόγος CTA : εκκινητή είναι σημαντικός για δεδομένο ζεύγος μονομερούς και CTA. Όταν ο πιο πάνω λόγος είναι μεγάλος διατηρούνται τα χαρακτηριστικά του “ζωντανού” πολυμερισμού διότι σύμφωνα με το μηχανισμό RAFT η μείωση της συγκέντρωσης του εκκινητή αναμένεται να ευνοεί περισσότερο τις αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει μόνο ένα είδος ριζών παρά τις αντιδράσεις τερματισμού.

---

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στον πολυμερισμό με τη μέθοδο RAFT είναι οι ίδιοι με αυτούς που χρησιμοποιούνται στο συμβατικό πολυμερισμό ελευθέρων ριζών και συνήθως είναι αζω- και περοξυ-ενώσεις.

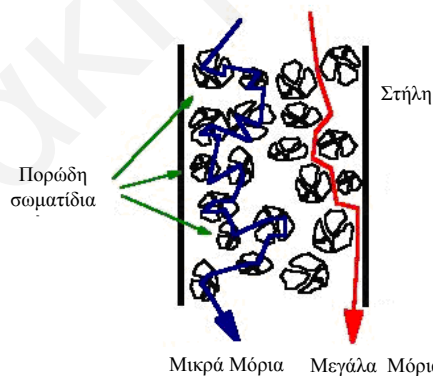
Συνοπτικά, η μέθοδος RAFT παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους πολυμερισμούς. Είναι μία ελεγχόμενη μέθοδος πολυμερισμού με την οποία μπορούν να παραχθούν πολυμερή με επιθυμητό  $M_n$ , με στενή κατανομή  $M_w$ , ενώ παρουσιάζει λιγότερους περιορισμούς όσον αφορά τα είδη των μονομερών και τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται ο πολυμερισμός.

## 1.4.2 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών

### 1.4.2.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους [Gel Permeation Chromatography, GPC]

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (gel permeation chromatography, GPC) είναι μία μέθοδος διαχωρισμού που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και το χαρακτηρισμό του μεγέθους βιοπολυμερών και συνθετικών πολυμερών. Μία από τις κυριότερες χρήσεις της είναι ο προσδιορισμός των σχετικών ΜΒ και των ΔΠ των πολυμερών.

Ο μηχανισμός διαχωρισμού της μεθόδου βασίζεται στη μοριακή διήθηση όπου τα μόρια διαχωρίζονται με βάση τον υδροδυναμικό τους όγκο. Συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη διέλευση του δείγματος μέσα από πορώδες υλικό το οποίο μπορεί να είναι μικρά σωματίδια πυριτίας ή πολυμερών, διαμέτρου 5 ως 10  $\mu\text{m}$ , μέσα στους πόρους των οποίων είναι εγκλωβισμένος ο διαλύτης. Καθώς το δείγμα διέρχεται από τη στήλη, τα μεγάλα σε μέγεθος μόρια δεν μπορούν να εισέλθουν στους μικρούς πόρους (δεν υφίστανται καμία κατακράτηση) με αποτέλεσμα να εξέρχονται από τη στήλη σε μικρούς χρόνους κατακράτησης. Τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια διαπερνούν τους πόρους και εκλούνται σε μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης (Σχήμα 1.17). Απαραίτητη προϋπόθεση για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός είναι να μην υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της προς ανάλυση ουσίας και της στατικής φάσης.



**Σχήμα 1.17:** Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού μορίων με τη μέθοδο GPC.

Η μέθοδος GPC δεν είναι απόλυτη αλλά σχετική μέθοδος προσδιορισμού μεγέθους και έτσι χρειάζεται βαθμονόμηση. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται από μία σειρά προτύπων δειγμάτων γνωστού ΜΒ. Ο χρόνος κατακράτησης των προτύπων δειγμάτων, ο οποίος καθορίζεται με βάση τον όγκο κατακράτησης, χρησιμοποιείται για να γίνει η καμπύλη βαθμονόμησης.

Από την ανάλυση του χρωματογραφήματος GPC λαμβάνονται τιμές για τα  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$ , και  $M_w / M_n$ . Το  $M_p$  είναι το MB που αντιστοιχεί στο μέγιστο της κορυφής που λαμβάνεται από το χρωματογράφημα. Το  $M_n$  είναι το μέσου-αριθμού MB το οποίο εκφράζει το μέσο MB με κριτήριο το σχετικό πλήθος των πολυμερών. Το  $M_w$  είναι το μέσου-βάρους MB το οποίο εκφράζει το μέσο MB με κριτήριο το σχετικό βάρος των πολυμερών. Τέλος, ο λόγος  $M_w / M_n$  ορίζει το ΔΠ και παίρνει τιμές από 1 μέχρι άπειρο. Αν ο λόγος αυτός ισούται με 1, τότε η κατανομή των MB είναι τέλεια, δηλαδή όλα τα μόρια έχουν ακριβώς το ίδιο MB. Όσο το  $M_w / M_n$  μεγαλώνει, τόσο διευρύνονται και οι κατανομές. Να σημειωθεί ότι το θεωρητικό MB του πολυμερούς που λαμβάνεται από ένα “ζωντανό” πολυμερισμό μπορεί να υπολογιστεί σαν το γινόμενο του MB του μονομερούς επί το θεωρητικό ΒΠ συν το MB του κομματιού του εκκινήτη το οποίο ενσωματώνεται πάνω στο πολυμερές. Το θεωρητικό αυτό MB συγκρίνεται στη συνέχεια με το  $M_n$  που υπολογίζεται από τη χρωματογραφία GPC.

#### ***1.4.2.2 Φασματοσκοπία Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού Πρωτονίου [Proton Nuclear Magnetic Resonance, Spectroscopy $^1\text{H-NMR}$ ]***

Η φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού πρωτονίου (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy,  $^1\text{H-NMR}$ ) είναι τεχνική με την οποία μπορεί να χαρτογραφηθεί η δομή ενός μορίου. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στις διεγέρσεις των πυρήνων, οι οποίες προκαλούνται από την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, ενός μορίου όταν αυτό τοποθετηθεί σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο.

Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων ενός μορίου προσανατολίζονται, στην απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τρόπο τυχαίο. Όταν όμως το δείγμα τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, οι πυρήνες αυτοί αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ένας περιστρεφόμενος πυρήνας μπορεί να αποκτήσει τέτοιο προσανατολισμό ώστε το δικό του μικρό μαγνητικό πεδίο να διαταχθεί είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Ο παράλληλος προσανατολισμός του spin είναι χαμηλότερης ενέργειας και έτσι ευνοείται έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού. Όταν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας αλλάζει φορά προς την κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, λέγεται ότι οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία.

Οι πυρήνες που μπορούν να μελετηθούν με NMR είναι οι πυρήνες που παρουσιάζουν μη μηδενικό σπιν, δηλαδή όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων ή περιττό αριθμό νετρονίων.

Η ακριβής συχνότητα που απαιτείται για το συντονισμό εξαρτάται από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και από το είδος του πυρήνα. Βασικά, η συχνότητα μετάπτωσης είναι ανάλογη προς την ένταση του μαγνητικού πεδίου, όπως φαίνεται από την εξίσωση  $\omega_o = \gamma \cdot B_o$ . Η συχνότητα  $\omega_o$  καλείται συχνότητα Larmor, ενώ η σταθερά  $\gamma$  ονομάζεται γυρομαγνητικός λόγος.

Η θέση συντονισμού ενός πυρήνα εκφράζεται σε σχέση με μία πρότυπη ουσία που προστίθεται στο δείγμα. Συνήθως ως πρότυπη ουσία λαμβάνεται το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Η χημική μετατόπιση εκφράζει τη διαφορά στη συχνότητα συντονισμού μεταξύ των πρωτονίων του δείγματος και των πρωτονίων του TMS. Η χημική μετατόπιση εκφράζεται συνήθως στην κλίμακα  $\delta$  με βάση τη σχέση:  $\delta = (\nu_\delta - \nu_\alpha) / \nu_o$ , όπου  $\nu_\delta$  είναι η συχνότητα συντονισμού του εξεταζόμενου πρωτονίου (σε Hz),  $\nu_\alpha$  η συχνότητα συντονισμού των πρωτονίων της ουσίας αναφοράς, δηλαδή του TMS, και  $\nu_o$  είναι η συχνότητα λειτουργίας του φασματομέτρου. Η παράμετρος  $\delta$ , χημική μετατόπιση, είναι αριθμός χωρίς διαστάσεις και εκφράζεται σε ppm. Η χημική μετατόπιση εξαρτάται από το ηλεκτρονιακό περιβάλλον του πυρήνα. Οι περισσότερο θωρακισμένοι πυρήνες εμφανίζονται σε υψηλό μαγνητικό πεδίο (δεξιά), ενώ οι λιγότερο θωρακισμένοι πυρήνες εμφανίζονται σε χαμηλό πεδίο (αριστερά).

Τα φάσματα NMR μπορούν να ληφθούν σε διαλύματα με διαλύτες που δεν περιέχουν πρωτόνια (π.χ.  $CCl_4$ ) ή δευτεριωμένους διαλύτες (π.χ.  $CDCl_3$ ) όπου έχει προστεθεί μικρή ποσότητα TMS. Πρωτόνια που έχουν το ίδιο περιβάλλον, που έχουν δηλαδή τον ίδιο βαθμό θωράκισης, είναι συνήθως μαγνητικά ισότιμα παρουσιάζοντας την ίδια τιμή  $\delta$ . Το εμβαδόν της κάθε κορυφής στο φάσμα  $^1H$ -NMR υπολογίζεται με τη βοήθεια ολοκληρωτή και είναι ανάλογο του αριθμού των πρωτονίων.

#### **1.4.2.3 Στατική Σκέδαση Φωτός [Static Light Scattering, SLS]**

Η στατική σκέδαση φωτός (static light scattering, SLS) είναι μία απόλυτη μέθοδος χαρακτηρισμού μεγέθους σωματιδίων. Στη SLS μετράται η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε διαφορετικές γωνίες και συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια, με τη χρήση της θεωρίας Debye (για τη σκέδαση από μακρομόρια), υπολογίζεται το MB από την

αποτείνουσα, και εάν η ποιότητα των δεδομένων το επιτρέπει, υπολογίζεται η γυροσκοπική ακτίνα και ο δεύτερος δυναμικός συντελεστής από την κλίση του διαγράμματος Zimm. Η βάση για το διάγραμμα Zimm είναι η εξίσωση 1.1:

$$\text{Εξίσωση 1.1: } \frac{Hc}{\Delta R(\theta, c)} = \left( \frac{1}{M_w} + 2A_2c \right) \left( 1 + \frac{1}{3} q^2 R_g^2 \right)$$

όπου  $\theta$  η γωνία σκέδασης,  $\Delta R$  ο παράγοντας Rayleigh,  $M_w$  το μέσου-βάρους MB,  $c$  η συγκέντρωση του πολυμερούς,  $q = (4\pi n_o/\lambda_o) \sin(\theta/2)$  και  $R_g$  η γυροσκοπική ακτίνα. Η οπτική σταθερά  $H$  δίνεται από την εξίσωση 1.2:

$$\text{Εξίσωση 1.2: } H = 4\pi^2 n_o^2 (dn/dc)^2 / (N_{AV} \lambda_o^4)$$

όπου  $n_o$  ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη,  $dn/dc$  ο ειδικός δείκτης διάθλασης του διαλύματος,  $N_{AV}$  ο αριθμός Avogadro,  $\lambda_o$  το μήκος κύματος του λέιζερ στον αέρα.

Οι εντάσεις της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μετρούνται για διάφορες γωνίες, τόσο για κάθε μία από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του δείγματος (πολυμερούς) όσο και για τον καθαρό διαλύτη. Αφαιρώντας τη σκέδαση του καθαρού διαλύτη από αυτή του πολυμερούς λαμβάνεται η ένταση που οφείλεται στο πολυμερές.

Αν το αριστερό μέλος της εξίσωσης σχεδιαστεί ως προς  $\sin(\theta/2) + K_p \cdot c$  για τις τιμές  $\Delta R(\theta, c)$  για όλες τις γωνίες  $\theta$  και για τις συγκεντρώσεις  $c$ , όπου  $K_p$  είναι μία αυθαίρετη σταθερά του γραφήματος, προκύπτει το διάγραμμα Zimm που αποτελείται από δύο ομάδες παραλλήλων ευθειών. Η μία ομάδα ευθειών συνιστά τις μετρήσεις των γωνιών για κάθε συγκέντρωση ( $c$ =σταθερό) και η άλλη τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων για κάθε γωνία ( $\theta$ =σταθερό). Στο ίδιο διάγραμμα φέρονται οι ευθείες που αντιστοιχούν σε γωνία  $\theta=0^\circ$  και συγκέντρωση  $c=0$  ως ακολούθως: προεκτείνοντας τις ευθείες των γωνιών ( $c$ =σταθερό) στη γωνία μηδέν για κάθε συγκέντρωση, τότε προκύπτει μία ευθεία γραμμή,  $\theta=0^\circ$ . Η κλίση αυτής της ευθείας δίνει το  $A_2$ . Προεκτείνοντας τις ευθείες των συγκεντρώσεων ( $\theta$ =σταθερό) στη συγκέντρωση μηδέν για κάθε γωνία, τότε προκύπτει το  $R_g$ . Η τιμή στο κοινό σημείο τομής των δύο ευθειών ( $\theta=0^\circ$  και  $c=0$ ) στον άξονα  $y$  του διαγράμματος Zimm δίνει το αντίστροφο του μέσου-βάρους MB του πολυμερούς.

#### 1.4.2.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός [Dynamic Light Scattering, DLS]

Η δυναμική σκέδαση φωτός (dynamic light scattering, DLS) είναι μία απόλυτη μέθοδος προσδιορισμού της κατανομής του μεγέθους μικρών σωματιδίων σε διάλυμα. Στη DLS μετράται η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (υπό μία συγκεκριμένη γωνία) σε

σχέση με το χρόνο. Υπολογίζεται η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης (διακύμανση από μία μέση τιμή της έντασης συναρτήσει του χρόνου) από την οποία στη συνέχεια υπολογίζονται οι συντελεστές διάχυσης και οι αντίστοιχες διαμέτροι. Συγκεκριμένα, η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης δίνεται από την εξίσωση 1.3:

$$\text{Εξίσωση 1.3: } C(t) = A e^{-2\Gamma t} + B$$

όπου το  $A$  είναι μία σταθερά που καθορίζεται από το σχεδιασμό του οργάνου, το  $B$  είναι η γραμμή αναφοράς (baseline) και το  $\Gamma$  είναι ο συντελεστής αυτοσυσχέτισης.

Με βάση τα δεδομένα υπολογίζεται ο συντελεστής  $\Gamma$  που στη συνέχεια με τη χρήση της εξίσωσης 1.4:

$$\text{Εξίσωση 1.4: } \Gamma = D q^2 [\text{rad sec}^{-1}]$$

υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης  $D$ . Η τιμή του  $q$  υπολογίζεται από την εξίσωση 1.5, η οποία ισχύει μόνο για σφαιρικά σωματίδια:

$$\text{Εξίσωση 1.5: } q = (2\pi n/\lambda_o) \sin\theta/2$$

όπου  $\lambda_o$  είναι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας του λέιζερ,  $\theta$  η γωνία σκέδασης και  $n$  ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη. Ακολουθώντας, γνωρίζοντας το  $D$  και με βάση την εξίσωση 1.6 υπολογίζεται η φαινόμενη υδροδυναμική διάμετρος  $d$  του μορίου:

$$\text{Εξίσωση 1.6: } d = k_B T / (3\pi\eta D) [\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}]$$

όπου το  $k_B$  είναι η σταθερά Boltzmann, το  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία σε Κ και το  $\eta$  το δυναμικό ιξώδες του διαλύτη.

Σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου DLS σε σχέση με άλλες μεθόδους είναι πέρα από το γεγονός ότι είναι απόλυτη μέθοδος και δεν χρειάζεται βαθμονόμηση, απαιτεί μικρό όγκο δείγματος, είναι γρήγορη καθώς και μη καταστρεπτική για το δείγμα.

Το σημαντικότερο μειονέκτημα της μεθόδου DLS είναι η ευαισθησία της στη σκόνη, για αυτό και τα δείγματα διηθούνται πριν χρησιμοποιηθούν.

#### 1.4.2.5 Νεφελομετρία

Στη νεφελομετρία μετράται η θερμοκρασία στην οποία ο διαλύτης παύει να είναι καλός για το δείγμα, δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία δημιουργούνται συσσωματώματα τα οποία προκαλούν αυξημένη σκέδαση φωτός την οποία και ανιχνεύει το φασματοφωτόμετρο. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται ταυτόχρονη



μέτρηση της θερμοκρασίας και της σκέδασης μίας ουσίας σε διάλυμα στο ορατό φάσμα φωτός.

#### **1.4.2.6 Σκέδαση Νετρονίων υπό Μικρή Γωνία [Small-Angle Neutron Scattering, SANS]<sup>[247]</sup>**

Η τεχνική SANS αποτελεί μία ισχυρή τεχνική για τον προσδιορισμό του σχήματος και του μεγέθους σωματιδίων των οποίων το μέγεθος είναι μεταξύ 1 και 300 nm. Η τεχνική αυτή απαιτεί την παρουσία μίας πηγής νετρονίων η οποία μπορεί να προέρχεται από πυρηνικούς αντιδραστήρες ή επιταχυντές από πυρηνικές αντιδράσεις. Κατά την παραγωγή τους, τα νετρόνια έχουν πολύ υψηλή ενέργεια για να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα σκέδασης και για αυτό πρέπει να επιβραδυνθούν (με επιβραδυντές νετρονίων) μέχρις ότου η κινητική τους ενέργεια να αντιστοιχεί με αυτή σε θερμοκρασία δωματίου (θερμά νετρόνια) ή μικρότερη (ψυχρά νετρόνια). Τα νετρόνια χαρακτηρίζονται από μήκος κύματος de Broglie

$$\lambda = \frac{h}{(m_n v)} \approx 1 - 10 \text{ \AA}, \text{ όπου } m_n \text{ η μάζα του νετρονίου και } v \text{ η ταχύτητά του. Το μήκος de}$$

Broglie είναι συγκρίσιμο με τυπικές ατομικές διαστάσεις και έτσι η σκέδαση νετρονίων αναλύεται με τη θεωρία σκέδασης Debye-Gans από μεγάλα σωματίδια. Τα νετρόνια είναι αρκετά βαριά σωματίδια και, αντίθετα από τις ακτίνες X, δεν σκεδάζονται από τα ηλεκτρόνια. Τα νετρόνια έχουν μαγνητική ροπή, αλλά έχουν μηδενική ηλεκτρική διπολική ροπή και μηδενικό ηλεκτρικό φορτίο, για αυτό έχουν αμελητέα αλληλεπίδραση με τα ηλεκτρόνια. Τα νετρόνια σκεδάζονται μόνο από τους πυρήνες των ατόμων, με τους οποίους η αλληλεπίδραση είναι πολύ ισχυρή, αλλά και εξαιρετικά μικρής εμβέλειας ( $10^{-15}$  m).

Η τεχνική SANS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό της δομής πολυμερικών πλεγμάτων. Το διογκωμένο πολυμερικό πλέγμα μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα σχεδόν ρευστό δυαδικό μίγμα πολυμερούς στο οποίο παρουσιάζονται κάποιες διακυμάνσεις συγκέντρωσης λόγω θερμικής κίνησης. Επίσης, μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα μαλακό στερεό που εμφανίζει ένα φάσμα στατικών διακυμάνσεων της συγκέντρωσης, λόγω των τοπικών διακυμάνσεων της δομής του πλέγματος, για παράδειγμα, κάποια εναλλαγή σκληρότερων περιοχών με μικρότερο βαθμό διόγκωσης με μαλακότερες περιοχές με μεγαλύτερο βαθμό διόγκωσης. Αυτές οι διακυμάνσεις μπορούν επίσης να οφείλονται και στη διαδικασία διασταύρωσης του πλέγματος που συνοδεύεται από μία ανακατανομή των διαφόρων τμημάτων του πολυμερούς.

Οι μελέτες της δομής των πολυμερικών πλεγμάτων με χρήση τεχνικών σκέδασης απαιτούν τη χρήση κατάλληλων δομικών μοντέλων. Ξεκινώντας από ένα διάλυμα πολυμερούς, μπορούμε να πούμε ότι η ακτινοβολία σκεδάζεται από τις αυθόρμητες θερμοδυναμικές διακυμάνσεις της συγκέντρωσης γύρω από την κατάσταση ισορροπίας που περιγράφονται από το μέσο κλάσμα όγκου του πολυμερούς,  $\phi$ , και τον αντίστοιχο συντελεστή ωσμωτικής συμπίεσης.

Στη σκέδαση νετρονίων από πολυμερικά πλέγματα σημαντικό ρόλο παίζει ο συντελεστής ελαστικότητας ( $G$ ) που προκύπτει από το γεγονός ότι οι αλυσίδες του πολυμερικού πλέγματος διασυνδέονται με διασταυρώσεις. Η παρουσία αυτού του συντελεστή ελαστικότητας τροποποιεί την απόκριση του συστήματος. Έτσι, οι δυναμικές διακυμάνσεις συγκέντρωσης που σκεδάζουν την ακτινοβολία από διογκωμένα πλέγματα δεν ελέγχονται πλέον μόνο από το συντελεστή ωσμωτικής πίεσης του διαλύματος ενός πολυμερούς, αλλά και από ένα διαμήκη συντελεστή ώσμωσης ( $M_{os}$ ) που προέρχεται από τις μοριακές κινήσεις.

Διακυμάνσεις στη συγκέντρωση επίσης προκαλούνται και από τις ελαστικές δυνάμεις μέσα στα πλέγματα. Τέτοιες στατικές διακυμάνσεις της συγκέντρωσης, που προκαλούνται και από τις ελαστικές παρεμποδίσεις που υπάρχουν στο πλέγμα λόγω των χημικών διασταυρώσεων, έχουν μεγαλύτερη εμβέλεια από τις οσμωτικές διακυμάνσεις και έτσι προκαλούν μια έντονη σκέδαση στην περιοχή μικρών  $q$  του φάσματος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Υλικά

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Εργασία για τη σύνθεση και τον καθαρισμό των τριών νέων διασταυρωτών 1,4-δισ(μεθακρυλοϋλοξυαιθυλο) πιπεραζίνη (1,4-bis(methacryloyloxyethyl) piperazine, BMEP), δισ(μεθακρυλοϋλοξυαιθυλο) μεθυλαμίνη (bis(methacryloyloxyethyl)methylamine, BMEMA) και 5,5-δισ(μεθακρυλοϋλοξυμεθυλο)-1,3-διοξάνιο (5,5-bis(methacryloyloxymethyl)-1,3-dioxane, BMMD), του μονομερούς μεθακρυλικού τετραϋδροπυρανυλεστέρα (2-tetrahydropyranyl methacrylate, THPMA) και του CTA 1,4-δισ[2-(θειοβενζοϋλθιο)προπ-2-ϋλ]βενζόλιο (1,4-bis[2-(thiobenzoylthio)prop-2-yl]benzene, 1,4-BTBTPB) ήταν: η 1,4-δισ(υδροξυαιθυλο)πιπεραζίνη (99%), η *N*-μεθυλοδιαιθανολαμίνη (>99%), 5,5-δισ(υδροξυμεθυλο)-1,3-διοξάνιο (90%), το μεθακρυλοχλωρίδιο (96%), η τριαιθυλαμίνη (>99%), το μεθακρυλικό οξύ (methacrylic acid, MAA, 99%), το 2,3-διϋδρο-2-πυράνιο (2,3-dihydro-2H-pyrane, DHP, 97%), το βρωμοβενζόλιο (>99%), το μαγνήσιο (Mg, 98%), ο διθειάνθρακας (>99.5%), το *π*-τολουοσουλφονικό οξύ (με 1 μόριο H<sub>2</sub>O, 98%), το 1,4-διϋσοπροπενυλοβενζόλιο (97%), η βασική αλουμίνα και η σίλικα (60 Å, 70-230 mesh). Όλα αυτά τα αντιδραστήρια, με εξαίρεση το βρωμοβενζόλιο (>99.5%) και το 1,4-διϋσοπροπενυλοβενζόλιο (97%), αγοράστηκαν από την Aldrich Γερμανίας. Το βρωμοβενζόλιο αγοράστηκε από τη Fluka Γερμανίας, ενώ, το 1,4-διϋσοπροπενυλοβενζόλιο από την TCI Europe Βελγίου.

Για τις πιο πάνω συνθέσεις χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, οι διαλύτες χλωροφόρμιο (>99%), τετραϋδροφουράνιο (tetrahydrofuran, THF, 99.8%), τετραχλωράνθρακας (99.9%), διαιθυλαιθέρας (>99.7%) και εξάνιο (>96%) οι οποίοι αγοράστηκαν από την Aldrich Γερμανίας.

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό όλων των σειρών των αστεροειδών πολυμερών και των πολυμερικών πλεγμάτων, με όλες τις μεθόδους πολυμερισμού, ήταν: τα υδρόφιλα μονομερή το DMAEMA (99%) και THPMA (προστατευμένη μορφή του MAA), το υδρόφοβο ημιφθοριωμένο μονομερές μεθακρυλικός 2,2,2-τριφθοροαιθυλεστέρας (2,2,2-(trifluoro)ethyl methacrylate, TFEMA, 99%), οι νέοι υδρόφιλοι διασταυρωτές BMEP και BMEMA, ο νέος υδρόφοβος διασταυρωτής BMMD, καθώς, και, ο διμεθακρυλικός διεστέρας της αιθυλενογλυκόλης (ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA, 98%). Χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, σαν

ξηραντικό το υδρίδιο του ασβεστίου (calcium hydride,  $\text{CaH}_2$ , 90-95%) και σαν παρεμποδιστής του πολυμερισμού ελευθέρων ριζών η ένυδρη 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλη (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate, DPPH, 95%). Όλα τα αντιδραστήρια αυτά αγοράστηκαν από την Aldrich Γερμανίας.

Για τη μέθοδο GTP, σαν εκκινήτης χρησιμοποιήθηκε το 1-μεθοξυ-1-τριμεθυλοσιλοξυ-2-μεθυλο προπένιο (1-methoxy-1-trimethylsiloxy-2-methyl propene, MTS, 95%) το οποίο αγοράστηκε από την Aldrich Γερμανίας, ενώ σαν διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το THF το οποίο αγοράστηκε από τη Scharlau Ισπανίας. Το THF χρησιμοποιήθηκε, επίσης, και σαν κινητή φάση στη χρωματογραφία GPC. Για τη ξήρανση του THF χρησιμοποιήθηκαν μεταλλικό νάτριο και κάλιο τα οποία και τα προμήθευσε η Fluka Γερμανίας. Σαν καταλύτης του GTP χρησιμοποιήθηκε το διβενζοϊκό τετραβουτυλαμμώνιο (tertabutylammonium bibenzoate, TBABB) το οποίο παρασκευάστηκε με βάση τη μέθοδο των Dicker και συνεργατών<sup>[243]</sup> μέσα από την αντίδραση του υδροξειδίου του τετραβουτυλαμμωνίου (40% σε νερό) και του βενζοϊκού οξέος (>99.5%) σε νερό.

Για τη μέθοδο RAFT, χρησιμοποιήθηκαν το 2,2'-αζωδισ(ισοβουτυλονιτρίλιο) (2,2'-azobis(isobutylnitrile), AIBN, 95%) ως πηγή ριζών και το 1,4-διοξάνιο (99%) σαν διαλύτης. Τα αντιδραστήρια αυτά αγοράστηκαν από τη Merck και την Aldrich Γερμανίας, αντίστοιχα.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ), το οποίο λήφθηκε από τη Merck Γερμανίας, ως διαλύτης για τη φασματοσκοπία NMR.

Για τα πειράματα επιμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε, καταρχήν, το EGFP siRNA με συμπληρωματική αλληλουχία ως προς το γονίδιο EGFP το οποίο αγοράστηκε από την Ambion Ηνωμένου Βασιλείου. Για την καλλιέργεια των κυττάρων, τη διαδικασία επιμόλυνσης και την εξαγωγή των πρωτεϊνών από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού με φυσιολογική συγκέντρωση άλατος (Dulbecco's phosphate buffered saline, D-PBS) χωρίς χλωριούχο ασβέστιο και χλωριούχο μαγνήσιο, μέσου ανάπτυξης κυττάρων Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), ρυθμιστικό διάλυμα επιμόλυνσης OPTIMEM (μειωμένης περιεκτικότητας σε ορρούς), ορρός βοοειδούς (fetal bovine serum, FBS), γλουταμίνη, πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, τρυψίνη (25% (1X) με EDTA 4Na) και αντιβιοτικό γενετισίνη (geneticin) τα οποία αγοράστηκαν από την Gibco Ηνωμένου Βασιλείου. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκαν β-μερκαπτοαιθανόλη (99%) η οποία λήφθηκε από την Merck Γερμανίας, γλυκερόλη (99.5%) η οποία αγοράστηκε από την BDH Αγγλίας, υδροχλωρικό

τρис(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο (TRIS-HCl, για μοριακή βιολογία) το οποίο λήφθηκε από την Aldrich Γερμανίας, tween20 (ultrapure) το οποίο αγοράστηκε από την USB Corporation ΗΠΑ και πλήρες αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ απαλλαγμένο από αναστολέα πρωτεΐνάσης (complete EDTA-free protease inhibitor) το οποίο λήφθηκε από τη Roche Γερμανίας. Για σκοπούς σύγκρισης, ως μέσο επιμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Lipofectamine RNAiMAX (για επιμόλυνση με siRNA) το οποίο λήφθηκε από την Invitrogen Ηνωμένου Βασιλείου.

Τέλος, για τα πειράματα προσρόφησης γενετικού υλικού RNA σε όλα τα πλέγματα που συντέθηκαν χρησιμοποιήθηκαν RNA από μαγιά (RNA torula yeast) το οποίο αγοράστηκε από την Aldrich Γερμανίας, καθώς, και (TRIS, 99.9%) και ρυθμιστικό διάλυμα με pH 10 τα οποία λήφθηκαν από την Aldrich Γερμανίας και τη Scharlau Ισπανίας, αντίστοιχα.

### **Καθαρισμός Χημικών**

#### **2.2 Καθαρισμός Μονομερών, Διασταυρωτή EGDMA και Διαλυτών Πολυμερισμού**

Τα μονομερή DMAEMA και TFEMA και ο διασταυρωτής EGDMA, για την απομάκρυνση διαφόρων όξινων, δραστικών προσμίξεων και παρεμποδιστών, περάστηκαν δύο φορές μέσα από γυάλινες στήλες οι οποίες περιείχαν βασική αλουμίνα. Τόσο στα μονομερή όσο και στο διασταυρωτή προστέθηκε μικρή ποσότητα DPPH για αποτροπή πιθανού θερμικού πολυμερισμού τους, ενώ προστέθηκε, επίσης, και μικρή ποσότητα ξηραντικού CaH<sub>2</sub> για απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας. Τα αντιδραστήρια αυτά, λίγο πριν τη χρήση τους, αποστάχτηκαν, υπό δυναμικό κενό, για επίτευξη πλήρους καθαρότητας.

Η ίδια διαδικασία ξήρανσης, στην παρουσία CaH<sub>2</sub>, ακολουθήθηκε και για το διαλύτη του πολυμερισμού RAFT 1,4-διοξάνιο.

Το THF, το οποίο αποτελεί το διαλύτη για τους πολυμερισμούς GTP, αποστάχτηκε, ακριβώς πριν από τη χρήση του, για μία περίπου ώρα μέσα σε ειδική αποστακτική στήλη η οποία περιείχε ευτηκτικό κράμα νατρίου / καλίου για εξουδετέρωση κάθε ίχνους υγρασίας. Η απόσταξη επαναλήφθηκε δύο φορές για επίτευξη μεγαλύτερης καθαρότητας του διαλύτη.

## 2.3 Σύνθεση Μονομερούς THPMA, Μορίου Μεταφοράς Αλυσίδας και Διασταυρωτών

### 2.3.1 Σύνθεση Μονομερούς THPMA

Η σύνθεση του μονομερούς THPMA βασίστηκε στη βιβλιογραφική αναφορά που δημοσιεύτηκε από τον Hertler το 1991<sup>[259]</sup> με τη διαφορά ότι, αντί της διασταυρωμένης πολυ(υδροχλωρικής 4-βινυλοπυριδίνης) χρησιμοποιήθηκε το θειικό οξύ. Η τελευταία μέθοδος ακολουθήθηκε και στην εργασία της Demosthenous και συνεργατών.<sup>[240]</sup>

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του THPMA ήταν η εξής: σε σφαιρική φιάλη των 100 mL τοποθετήθηκαν 15.0 mL MAA (15.3 g, 177.9 mmol), 31.8 mL DHP (29.9 g, 355.8 mmol) μαζί με λίγη ποσότητα DPPH ως παρεμποδιστή ελευθέρων ριζών, για προστασία των THPMA και MAA από ανεπιθύμητο θερμικό πολυμερισμό. Η αντίδραση τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 60 °C και αφέθηκε, υπό συνεχή ανάδευση, για 48 h. Στη συνέχεια, το προϊόν της αντίδρασης, αφού αραιώθηκε με προξηραμένο διχλωρομεθάνιο, περάστηκε από στήλη βασικής αλουμίνας για απομάκρυνση του οξέος που δεν αντέδρασε. Η ποσότητα του DHP η οποία δεν είχε αντιδράσει απομακρύνθηκε με τη βοήθεια απόσταξης. Το μονομερές λήφθηκε με απόδοση 90% (27.1 g). Η δομή του THPMA επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR.

### 2.3.2 Σύνθεση Μορίου Μεταφοράς Αλυσίδας 1,4-BTBTPB

Το CTA 1,4-BTBTPB παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία,<sup>[260]</sup> μέσω αντίδρασης 2 g διθειοβενζοϊκού οξέος (13.0 mmol) με 0.98 g 1,4-διϊσοπροπενυλοβενζολίου (6.20 mmol) στην παρουσία καταλυτικής ποσότητας (0.1 g) π-τολουολοσουλφονικού οξέος (0.5 mmol) και 8 mL τετραχλωράνθακα ως διαλύτη. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 80 °C για 18 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, απομακρύνθηκε το π-τολουολοσουλφονικό οξύ με τη βοήθεια εκχύλισης με κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου (160 mL), ακολουθούμενης από εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (2×40mL). Ακολούθως, η οργανική φάση ξηράθηκε με θειικό μαγνήσιο, διηθήθηκε και εξατμίστηκε ο διαλύτης με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα. Για την απομάκρυνση διαφόρων ακαθαρσιών (παραπροϊόντων) από την αντίδραση, το 1,4-BTBTPB ανακρυσταλώθηκε με μίγμα διαλυτών εξανίου : διαιθυλαιθέρα σε αναλογία 2 : 1. Η ταυτοποίηση του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR.

Η σύνθεση του διθειοβενζοϊκού οξέος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα τους Jayalakshmi και συνεργάτες.<sup>[261]</sup> Συγκεκριμένα, σε μία τρίλαιμη σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 1.1 g Mg (45.0 mmol) τα οποία διασπάρθηκαν σε 127.0 mL ξηρού THF. Έπειτα, με τη βοήθεια ενός

γυάλινου χωνιού, προστέθηκαν, κατά σταγόνα, 4.8 mL βρωμοβενζολίου (7.1 g, 45.0 mmol). Η αντίδραση θερμάνθηκε στους 35 °C μέχρι πλήρους κατανάλωσης και εξαφάνισης του στερεού Mg. Στη συνέχεια, η αντίδραση τοποθετήθηκε σε πάγο και, αφού η θερμοκρασία κατέβηκε στους -5 °C, προστέθηκαν, στάγδην, 2.7 mL διθειάνθρακα (3.5 g, 45.0 mmol) ως διάλυμα σε 37.0 mL ξηρού THF. Η αντίδραση αφέθηκε για 1 h στους -5 °C. Έπειτα, αφού απομακρύνθηκε ο διαλύτης με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα, προστέθηκαν 60.0 mL διαιθυλαιθέρα και 60.0 mL παγωμένου HCl οξέος 10% κ. μ. Η οργανική φάση, αφού απομονώθηκε με τη βοήθεια διαχωριστικής χοάνης, εκχυλίστηκε, περαιτέρω, με παγωμένο διάλυμα NaOH 10% κ. μ. Οι αλκαλικές φάσεις συλλέχθηκαν και ξεπλύθηκαν τρεις φορές με διαιθυλαιθέρα, οξινίστηκαν με HCl και ξεπλύθηκαν ξανά με διαιθυλαιθέρα. Τέλος, η οργανική φάση εκχυλίστηκε τρεις φορές με αποσταγμένο νερό. Αφού απομακρύνθηκε ο διαλύτης, το διθειοβενζοϊκό οξύ χρησιμοποιήθηκε, αμέσως, στο επόμενο στάδιο. Η δομή του προϊόντος επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR.

### **2.3.3 Σύνθεση και Απομόνωση των Υδρόφιλων Κατιοντικών Διασταυρωτών BMEP και BMEMA και του Υδρόφοβου Διασταυρωτή BMMD**

Στην παρούσα Εργασία συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δύο νέοι υδρόφιλοι και θετικά ιονιζόμενοι διασταυρωτές, οι BMEMA και BMEP, καθώς, και ένας υδρόφοβος (μη κατιοντικός) και υδρολυόμενος διασταυρωτής, ο BMMD.

Η σύνθεση όλων των διασταυρωτών πραγματοποιήθηκε με αντίδραση εστεροποίησης των αντίστοιχων διολών, της 1,4-δισ(υδροξυαιθυλο)πιπεραζίνης, της *N*-μεθυλοδιαιθανολαμίνης και του 5,5-δισ(υδροξυμεθυλο)-1,3-διοξάνιο, με μικρή περίσσεια μεθακρυλοχλωριδίου στην παρουσία βάσης τριαιθυλαμίνης. Σαν διαλύτης χρησιμοποιήθηκε προξηραμένο χλωροφόρμιο, ενώ οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του BMEP, σε σφαιρική φιάλη των 500 mL τοποθετήθηκαν 8 g 1,4-δισ(υδροξυαιθυλο)πιπεραζίνης (46.0 mmol) μαζί με 80 mL προξηραμένου χλωροφορμίου. Αφού η αλκοόλη διαλύθηκε πλήρως, προστέθηκαν 39.9 mL τριαιθυλαμίνης (37.2 g, 368 mmol), και έπειτα προστέθηκαν, στάγδην, 9.4 mL μεθακρυλοχλωριδίου (10.2 g, 97.1 mmol). Η αντίδραση, η οποία ήταν έντονα εξώθερμη, αφέθηκε να αναδεύεται για 1 h περίπου. Στην περίπτωση του BMEMA, 8 g *N*-μεθυλοδιαιθανολαμίνης (67.2 mmol) αντέδρασαν με 13.6 mL μεθακρυλοχλωριδίου (14.7 g, 141.1 mmol) στην παρουσία 58.3 mL τριαιθυλαμίνης (54.4g, 537.6 mmol) και 80 mL προξηραμένου χλωροφορμίου. Τέλος, στην περίπτωση του DMMD, 8 g 5,5-δισ(υδροξυμεθυλο)-1,3-διοξάνιο (54.0 mmol) αντέδρασαν με 11.5 mL

μεθακρυλοχλωρίδιου (12.4 g, 118.8 mmol) στην παρουσία 46.9 mL τριαιθυλαμίνης (43.7 g, 432 mmol) και 80 mL προξηραμένου χλωροφορμίου. Ο καθαρισμός των αντιδράσεων περιελάμβανε διήθηση για απομάκρυνση του άλατος της υδροχλωρικής τριαιθυλαμίνης που παράχθηκε, διέλευση μέσα από στήλη βασικής αλουμίνας ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) για απομάκρυνση της περίσσειας του οξέος (MAA) και εξάτμιση της περίσσειας της τριαιθυλαμίνης και του διαλύτη με περιστροφικό εξάτμιστήρα. Οι διασταυρωτές BMEP, BMEMA και BMMD λήφθηκαν με αποδόσεις 64, 59 και 60%, αντίστοιχα. Οι δομές των διασταυρωτών επιβεβαιώθηκαν με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ -NMR.

## 2.4 Σύνθεση Πολυμερών

Στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μίας σειράς γραμμικών ομοπολυμερών, τεσσάρων σειρών αστεροειδών πολυμερών και δύο σειρών πολυμερικών πλεγμάτων διασυνδεδεμένων στα άκρα. Για τη σύνθεση των γραμμικών και αστεροειδών ομοπολυμερών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος πολυμερισμού GTP, ενώ για τη σύνθεση των πολυμερικών πλεγμάτων η μέθοδος RAFT.

Για όλους τους πολυμερισμούς, όλα τα γυαλικά πλύθηκαν, διαδοχικά, σε λουτρό βάσης και λουτρό οξέος, ξεπλύθηκαν προσεκτικά με νερό και ακετόνη και ξηράθηκαν για ένα βράδυ σε φούρνο στους  $120\text{ }^\circ\text{C}$  έτσι ώστε να επιτευχθεί μεγάλη καθαρότητα και απαλλαγή από κάθε ίχνος υγρασίας.

### 2.4.1 Σύνθεση Γραμμικών Ομοπολυμερών του DMAEMA με GTP

Η σύνθεση της σειράς των γραμμικών ομοπολυμερών του DMAEMA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου GTP. Η σύνθεση αυτή πραγματοποιήθηκε σε ένα στάδιο με διαδοχική προσθήκη του εκκινητή MTS και του μονομερούς DMAEMA σε διάλυμα καταλύτη TBABB σε THF.

Οι πολυμερισμοί έλαβαν χώρα σε σφαιρικές φιάλες κλειστές με λαστιχένιο πόμα. Αρχικά, προστέθηκε μικρή ποσότητα καταλύτη TBABB και η φιάλη πωματίστηκε. Μετά εφαρμόστηκε ηλεκτρονικό θερμόμετρο στο εξωτερικό της φιάλης για ακριβή καταγραφή της θερμοκρασίας, ενώ διαβιβάστηκε ξηρό και καθαρό αέριο άζωτο για εκτοπισμό του ατμοσφαιρικού αέρα. Στη συνέχεια, προστέθηκε φρεσκοαπεσταγμένος διαλύτης THF και εκκινητής MTS με τη χρήση γυάλινων συριγγών. Τέλος, με αργό ρυθμό, σταγόνα-σταγόνα, προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα μονομερούς.



Πιο κάτω περιγράφεται, ενδεικτικά, η σύνθεση του γραμμικού ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>. Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL προστέθηκαν περίπου 0.01 g TBABB. Στη συνέχεια, με μία γυάλινη σύριγγα προστέθηκαν 16.2 mL THF και μετά 0.3 mL MTS (0.26 g, 1.5 mmol). Ακολούθως, προστέθηκαν, με αργό ρυθμό, 5.1 mL DMAEMA (4.7 g, 30.0 mmol), όπου και παρατηρήθηκε αύξηση της θερμοκρασίας από τους 23.7 στους 41.9 °C, και λήφθηκε, παράλληλα, δείγμα (0.4 mL) για ανάλυση με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR. Ο πολυμερισμός των γραμμικών ομοπολυμερών τερματίστηκε με 1 mL μεθανόλης και τα πολυμερή καταβυθίστηκαν σε εξάνιο και αφέθηκαν για τρεις μέρες σε φούρνο κενού σε θερμοκρασία δωματίου για να ξηρανθούν.

#### **2.4.2 Σύνθεση Αστεροειδών Ομοπολυμερών του DMAEMA Βασισμένων στους Διασταυρωτές BMEP, BMEMA, BMMD και EGDMA με GTP**

Στην παρούσα Εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τεσσάρων σειρών αστεροειδών πολυμερών: τριών βασισμένων στους τρεις νέους διασταυρωτές BMEP, BMEMA και BMMD και μίας βασισμένης στον εμπορικά διαθέσιμο διασταυρωτή EGDMA. Η σύνθεση των αστεροειδών πολυμερών πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, στη φιάλη πολυμερισμού έγινε διαδοχική προσθήκη του εκκινητή MTS και του μονομερούς DMAEMA σε διάλυμα καταλύτη TBABB σε THF όπου και σχηματίστηκαν γραμμικά ομοπολυμερή με ενεργό το ένα άκρο τους. Στη συνέχεια, κατά το δεύτερο στάδιο, έγινε η προσθήκη του αντίστοιχου διασταυρωτή (BMEP, BMEMA, BMMD ή EGDMA) ο οποίος οδήγησε στη διασύνδεση των αλυσίδων στο ένα άκρο και στο σχηματισμό των αστεροειδών ομοπολυμερών. Η γραμμομοριακή αναλογία διασταυρωτή : εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε ήταν, σε όλες τις περιπτώσεις ίση με 4 : 1.

Οι πολυμερισμοί έλαβαν χώρα σε σφαιρικές φιάλες κλειστές με λαστιχένιο πώμα. Αρχικά, προστέθηκε μικρή ποσότητα καταλύτη TBABB και η φιάλη πωματίστηκε. Μετά εφαρμόστηκε ηλεκτρονικό θερμόμετρο στο εξωτερικό της φιάλης για ακριβή καταγραφή της θερμοκρασίας, και έπειτα διαβιβάστηκε καθαρό αέριο άζωτο για εκτοπισμό του ατμοσφαιρικού αέρα. Στη συνέχεια, προστέθηκε φρεσκοαπεσταγμένος διαλύτης THF και εκκινητής MTS με τη χρήση γυάλινων συριγγών. Ακολούθως, προστέθηκε με αργό ρυθμό, σταγόνα-σταγόνα, η απαραίτητη ποσότητα του μονομερούς και, τέλος, με γρήγορο ρυθμό, προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα του διασταυρωτή.

Πιο κάτω περιγράφεται, ενδεικτικά, η σύνθεση του αστεροειδούς πολυμερούς της σειράς του BMEMA, DMAEMA<sub>20</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star. Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL προστέθηκαν

περίπου 0.01 g TBABB (0.0212 mmol). Στη συνέχεια, με μία γυάλινη σύριγγα προστέθηκαν 20.7 mL THF και μετά 0.3 mL MTS (0.26 g, 1.5 mmol). Ακολούθως, προστέθηκαν με αργό ρυθμό 5.1 mL DMAEMA (4.7 g, 30.0 mmol), που οδήγησε σε αύξηση της θερμοκρασίας από τους 22 στους 39 °C, και λήφθηκε δείγμα (0.2 mL) για ανάλυση με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR. Τέλος, προστέθηκαν, με γρήγορο ρυθμό, 1.5 mL BMEMA (1.5 g, 6 mmol), που προκάλεσαν αύξηση της θερμοκρασίας από τους 36 τους 38 °C. Επίσης, λήφθηκε δείγμα (0.2 mL) για ανάλυση με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR. Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, παρασκευάστηκαν όλα τα αστεροειδή πολυμερή από όλες τις σειρές. Ο πολυμερισμός των αστεροειδών πολυμερών τερματίστηκε με 1 mL μεθανόλη και τα αστεροειδή πολυμερή καταβυθίστηκαν σε εξάνιο και αφέθηκαν για τρεις μέρες σε φούρνο κενού σε θερμοκρασία δωματίου για να ξηρανθούν.

#### ***2.4.3 Σύνθεση με Πολυμερισμό RAFT Ημιφθοριωμένων Αμφιφιλικών Πλεγμάτων των DMAEMA-TFEMA Διασυνδεδεμένων στα Άκρα και Αμφολυτικών Πλεγμάτων των DMAEMA-MAA Διασυνδεδεμένων στα Άκρα***

Συντέθηκαν δύο σειρές πολυμερικών πλεγμάτων διασυνδεδεμένων στα άκρα με τη μέθοδο πολυμερισμού RAFT. Η πρώτη σειρά αφορούσε ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα βασισμένα στα μονομερή DMAEMA και TFEMA, ενώ η δεύτερη σειρά αφορούσε, και πάλι, αμφιφιλικά πλέγματα των μονομερών DMAEMA και THPMA, τα οποία με υδρόλυση των μονάδων του THPMA έδωσαν αμφολυτικά πλέγματα των DMAEMA και MAA.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, και για τις δύο σειρές πολυμερικών πλεγμάτων, περιελάμβανε διαδοχική προσθήκη των μονομερών και του διασταυρωτή στην ίδια φιάλη πολυμερισμού. Συγκεκριμένα, και στις δύο περιπτώσεις, μεταβλήθηκε συστηματικά η σύσταση και η αρχιτεκτονική των πλεγμάτων.

Για τους πολυμερισμούς χρησιμοποιήθηκαν το 1,4-BTBTPB σαν CTA, το AIBN σαν εκκινήτης ελευθέρων ριζών και το 1,4-διοξάνιο σαν διαλύτης. Σαν μονομερή χρησιμοποιήθηκαν τα DMAEMA και TFEMA για τη σύνθεση των αμφιφιλικών πλεγμάτων και τα DMAEMA και THPMA (προστατευμένη μορφή του MAA) για τη σύνθεση των αμφολυτικών πλεγμάτων. Η γραμμομοριακή αναλογία διασταυρωτή (EGDMA) : CTA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 6 : 1 η οποία προσδιορίστηκε προηγουμένως σαν η βέλτιστη αναλογία διασύνδεσης στα άκρα. Για κάθε σειρά πλεγμάτων συντέθηκαν

οκτώ πλέγματα. Συγκεκριμένα, για τη σειρά των αμφοφιλικών πλεγμάτων συντέθηκαν δύο πλέγματα βασισμένα στα ομοπολυμερή DMAEMA<sub>100</sub> και TFEMA<sub>50</sub>, τρία πλέγματα βασισμένα στα ABA τριαδρομερή συμπολυμερή TFEMA<sub>12.5-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>12.5</sub>, TFEMA<sub>25-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>25</sub> και TFEMA<sub>37.5-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>37.5</sub>, ένα πλέγμα βασισμένο στο BAB τριαδρομέρες συμπολύμερες DMAEMA<sub>25-grad</sub>-TFEMA<sub>50-grad</sub>-DMAEMA<sub>25</sub>, ένα πλέγμα βασισμένο στο τυχαίο συμπολυμερές TFEMA<sub>25-co</sub>-DMAEMA<sub>50-co</sub>-TFEMA<sub>25</sub>, καθώς, και, ένα τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα. Η σύνθεση όλων των διασυνδεδεμένων στα άκρα πολυμερικών πλεγμάτων πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές προσθήκες των μονομερών (με την κατάλληλη σειρά) και του διασταυρωτή, ενώ τα τυχαία πλέγματα συντέθηκαν με ταυτόχρονο πολυμερισμό μονομερών και διασταυρωτή.

Συντέθηκαν, επίσης, και τα αντίστοιχα αμφολυτικά πλέγματα. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν τα εξής πλέγματα: δύο πλέγματα βασισμένα στα ομοπολυμερή DMAEMA<sub>100</sub> και THPMA<sub>50</sub>, τρία πλέγματα βασισμένα στα ABA τριαδρομερή συμπολυμερή THPMA<sub>12.5-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-THPMA<sub>12.5</sub>, THPMA<sub>25-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-THPMA<sub>25</sub> και THPMA<sub>37.5-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-THPMA<sub>37.5</sub>, ένα πλέγμα βασισμένο στο BAB τριαδρομέρες συμπολύμερες DMAEMA<sub>25-grad</sub>-THPMA<sub>50-grad</sub>-DMAEMA<sub>25</sub>, ένα πλέγμα βασισμένο στο τυχαίο συμπολυμερές THPMA<sub>25-co</sub>-DMAEMA<sub>50-co</sub>-THPMA<sub>25</sub>, και, τέλος, ένα τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα.

Να αναφερθεί εδώ ότι κατά τη σύνθεση του αμφολυτικού πλέγματος του DMAEMA<sub>25-grad</sub>-THPMA<sub>50-g</sub>-DMAEMA<sub>25</sub> και του πλέγματος του ομοπολυμερούς του THPMA<sub>50</sub>, στα οποία το THPMA προστίθεται πρώτο κατά τον πολυμερισμό, παρατηρήθηκε μερική υδρόλυση του THPMA. Για να αποτραπεί η υδρόλυση προτίθεται τριαιθυλαμίνη. Έτσι, και στις δύο αυτές περιπτώσεις, προστέθηκε ο μισός όγκος από τον υπολογισθέντα όγκο του διαλύτη, ενώ ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώθηκε με τριαιθυλαμίνη.

Πιο κάτω περιγράφεται, ενδεικτικά, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του πλέγματος EGDMA<sub>3-grad</sub>-TFEMA<sub>25-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>25-grad</sub>-EGDMA<sub>3</sub>. Σε προξηραμένη φιάλη Schlenk των 10 mL, μεταφέρθηκαν 3 mL DMAEMA (2.8 g, 17.8 mmol), 0.17 g 1,4-BTBTPB (0.365 mmol), 35.9 mg AIBN (0.22 mmol) και 2.9 mL 1,4-διοξάνιο. Μετά από τη διάλυση των αντιδραστηρίων και την ομογενοποίηση του διαλύματος, πραγματοποιήθηκαν τρεις κύκλοι παγώματος-απαέρωσης-τήξης (freeze-evacuate-thaw cycles), κατά τους οποίους το διάλυμα ψύχεται (και στερεοποιείται) υπό κενό με τη βοήθεια υγρού αζώτου, και, στη συνέχεια, αφήνεται να

επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και να γίνει υγρό ξανά. Μετά την ολοκλήρωση της απαέρωσης, το μείγμα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο όπου θερμαίνεται, υπό συνεχή ανάδευση, στους 70 °C και αφέθηκε να αντιδράσει για 12 h μέχρι που η μετατροπή του DMAEMA έφτασε το 96.7%. Αφού λήφθηκε δείγμα για χαρακτηρισμό του γραμμικού προπομπού με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  και χρωματογραφία GPC, προστέθηκαν 2.2 mL (2.99 g, 17.8 mmol) TFEMA. Ο πολυμερισμός αυτός αφέθηκε για άλλες 12 h όπου και η μετατροπή του TFEMA έφτασε το 83.4%. Αφού και πάλι λήφθηκε δείγμα για χαρακτηρισμό του γραμμικού τριαδρομερούς προπομπού με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  και χρωματογραφία GPC, προστέθηκαν 0.41 mL διασταυρωτή EGDMA (0.43 g, 2.19 mmol). Ο σχηματισμός του πλέγματος παρατηρήθηκε μετά από 8.4 h. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τη σύνθεση όλων των άλλων πολυμερικών πλεγμάτων.

Κατά τη σύνθεση όλων των αμφολυτικών πλεγμάτων, στο σημείο όπου γινόταν η προσθήκη του δεύτερου μονομερούς THPMA, το διάλυμα του πολυμερισμού ήταν ιδιαίτερα ιξώδες. Έτσι, για να μπορεί το δεύτερο μονομερές να διαλυθεί και να ομογενοποιηθεί στο μείγμα του πολυμερισμού, προστίθεντο, μαζί με το μονομερές THPMA, και 1 mL διαλύτη 1,4-διοξανίου.

#### **2.4.4 Υδρόλυση Μονάδων THPMA των Αμφολυτικών Πλεγμάτων**

Όλα τα αμφιφιλικά πλέγματα τα οποία ήταν βασισμένα στα μονομερή DMAEMA και THPMA, αμέσως μετά από τη σύνθεση και την εξαγωγή της μη-ενσωματωθείσας πολυμερικής μάζας (extractables) τους, υδρολύθηκαν στην παρουσία HCl. Αναλυτικότερα, κάθε πλέγμα μεταφέρθηκε σε δοχεία του 1 L τα οποία περιείχαν περίπου 400 mL καθαρού νερού και τον κατάλληλο όγκο HCl (10 M). Η ποσότητα του HCl που προστέθηκε υπολογίστηκε σαν τρεις φορές το άθροισμα του αριθμού των γραμμομορίων του THPMA συν του DMAEMA (το DMAEMA δεν υδρολύεται αλλά δεσμεύει HCl για να ιονιστεί). Τα πλέγματα αφέθηκαν για υδρόλυση για μία εβδομάδα, ενώ για τις επόμενες δύο εβδομάδες ξεπλένονταν καθημερινά με απεσταγμένο νερό για απομάκρυνση της περίσσειας του HCl αλλά και του διϋδροπυρανίου που παράγεται. Πριν από την κάθε αλλαγή του νερού, το pH του υπερκείμενου διαλύματος μετρητών. Το pH του υπερκείμενου διαλύματος των πλεγμάτων αμέσως μετά την υδρόλυση ήταν γύρω στο 1.5, ενώ μετά από έκπλυση για δύο βδομάδες ανήλθε στην τιμή 3.5-4.0.

## 2.5 Χαρακτηρισμός Αστεροειδών και Γραμμικών Ομοπολυμερών

### 2.5.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Πηκτής (*Gel Permeation Chromatography, GPC*)

Δείγματα των γραμμικών προπομπών των αστεροειδών ομοπολυμερών, των ιδίων των αστεροειδών ομοπολυμερών, καθώς και δείγματα των γραμμικών ομοπολυμερών χαρακτηρίστηκαν ως προς τα MB και τους ΔΠ τους με χρωματογραφία GPC. Για τη χρωματογραφία GPC χρησιμοποιήθηκε σύστημα της Polymer Laboratories εξοπλισμένο με μία στήλη PL-Mixed “D”. Ο φέρον διαλύτης ήταν το THF με ροή  $1 \text{ mL min}^{-1}$  η οποία επιτυγχανόταν με μία αντλία HPLC της Waters μοντέλο 515, ενώ ο δείκτης διάθλασης μετράτο με χρήση ανιχνευτή δείκτη διάθλασης μοντέλου ERC-7515A. Η βαθμονόμηση των MB βασίστηκε σε οκτώ πρότυπα γραμμικά πολυμερή PMMA (850, 2810, 4900, 11550, 30530, 60150, 138500 και  $342900 \text{ g mol}^{-1}$ ). Για το χαρακτηρισμό παρασκευάστηκαν διαλύματα πολυμερών σε THF και διηθήθηκαν με μικρόφιλτρα με μέγεθος πόρων  $0.45 \mu\text{m}$  πριν από τη μελέτη τους.

### 2.5.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου (*Nuclear Magnetic Resonance, $^1\text{H-NMR}$* )

Οι γραμμικοί προπομποί των αστεροειδών ομοπολυμερών, τα ίδια τα αστεροειδή ομοπολυμερή, καθώς και δείγματα των γραμμικών ομοπολυμερών χαρακτηρίστηκαν ως προς τη σύστασή τους με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  σε  $\text{CDCl}_3$ . Τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  λήφθηκαν με τη χρήση φασματομέτρου NMR μοντέλου Avance της Bruker 300 MHz για επιβεβαίωση της δομής και εύρεση της σύστασής τους.

### 2.5.3 Στατική Σκέδαση Φωτός (*Static Light Scattering, SLS*)

Με τη βοήθεια της SLS έγινε προσδιορισμός των απόλυτων μέσου-βάρους MB ( $M_w$ ) των αστεροειδών ομοπολυμερών που συντέθηκαν. Για τις μετρήσεις της SLS, χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο BI-MwA της Brookhaven, εξοπλισμένο με laser ισχύος 30mW το οποίο εκπέμπει στα 673 nm. Για κάθε διάλυμα μετρήθηκε η σκέδαση του φωτός σε 7 διαφορετικές γωνίες 35, 50, 75, 90, 105, 130 και  $145^\circ$ . Το φασματοφωτόμετρο BI-MwA ήταν συνδεδεμένο με μία στήλη PL-Mixed “D” της Polymer Laboratories και ο φέρον διαλύτης ήταν το THF (ροή  $1 \text{ mL / min}$ ) ο οποίος παρείχετο από μία ισοκρατική αντλία επίσης της Polymer Laboratories μοντέλο PL-LC1120. Ο δείκτης διάθλασης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης μοντέλο RL-RI800 της Polymer Laboratories. Πριν από τις μετρήσεις σκέδασης, τα δείγματα των πολυμερών

διαλυθήκαν σε THF και διηθήθηκαν διαμέσου μικροφίλτρων σύριγγας των οποίων οι πόροι είχαν μέγεθος 0.45  $\mu\text{m}$ . Η ποσότητα  $dn/dC$  των πολυμερικών διαλυμάτων σε THF προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ένα διαθλασίμετρο ABBE.

#### **2.5.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)**

Διαλύματα 1% κ. 3μ των αστεροειδών ομοπολυμερών σε καθαρό νερό και σε όξινο διάλυμα άλατος (0.07 M HCl, 1M NaCl) μελετήθηκαν με DLS για να προσδιοριστούν οι υδροδυναμικές διαμέτροι των πολυμερών. Για τις μετρήσεις, χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο δυναμικής σκέδασης φωτός μοντέλου 90Plus της Brookhaven εξοπλισμένο με ερυθρό laser 30 mW το οποίο εκπέμπει στα 673 nm. Για κάθε δείγμα αστεροειδούς πολυμερούς έγιναν μετρήσεις για 10 λεπτά (5 γύροι επαναλήψεις 2 min). Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση ανάλυσης πολυπληθυσμιακής κατανομής μεγεθών (multimodal size distribution, MSD) με ελάχιστα τετράγωνα και με απαγόρευση αρνητικών τιμών των διαμέτρων (NNCLS). Πριν από τις μετρήσεις σκέδασης φωτός, τα διαλύματα των αστεροειδών πολυμερών διηθήθηκαν διαμέσου μικροφίλτρων σύριγγας PTFE με μέγεθος μικροπόρων 0.45  $\mu\text{m}$  για να απομακρυνθούν τα σωματίδια σκόνης που μπορεί να υπήρχαν στα διαλύματα, ενώ αφέθηκαν σε ηρεμία για μία περίπου ώρα πριν από τη μέτρησή τους ούτως ώστε να διαφύγουν τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.

#### **2.5.5 Νεφελομετρία**

Διαλύματα (1% κ. μ.) αστεροειδών και γραμμικών ομοπολυμερών μελετήθηκαν ως προς τις θερμοκρασίες νεφέλωσής τους σε καθαρό νερό. Τα διαλύματα των αστεροειδών ομοπολυμερών μελετήθηκαν, επίσης, ως προς τις θερμοκρασίες νεφέλωσής τους και σε υδατικό διάλυμα σε pH 8. Για τις μετρήσεις νεφελομετρίας, χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης UV/vis μοντέλο Lambda 10 της Perkin-Elmer. Το δείγμα του πολυμερούς τοποθετήθηκε σε κυψελίδα χαλαζία μαζί με μαγνητικό αναδευτήρα ο οποίος τέθηκε σε κίνηση. Η οπτική πυκνότητα στα 500 nm και η θερμοκρασία καταγράφονταν ταυτόχρονα με χρήση λογισμικού πακέτου TempLab μαζί με το UVWinLab. Σαν θερμοκρασία νεφέλωσης λήφθηκε η τιμή στην οποία παρουσιάστηκε η πρώτη απότομη αύξηση στην οπτική πυκνότητα.

#### **2.5.6 Τιτλοδότηση Υδρογονοϊόντων**

Υδατικά διαλύματα (1% κ. μ.) όλων των αστεροειδών και γραμμικών ομοπολυμερών χαρακτηρίστηκαν ως προς τις φαινόμενες τιμές  $pK_a$  των μονάδων του DMAEMA.

Αναλυτικότερα, 70 mg από κάθε πολυμερές τιτλοδοτήθηκαν μεταξύ pH 2 και 12, υπό συνεχή ανάδευση, χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα NaOH 0.5 M. Το pH του διαλύματος μετράτο με τη χρήση φορητού πεχαμέτρου μοντέλου PS30 της Corning. Τα φαινόμενα  $pK_a$  υπολογίστηκαν ως το pH σε 50% ιονισμό.

## 2.6 Χαρακτηρισμός Πολυμερικών Πλεγμάτων

### 2. 6.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Πηκτής (GPC)

Οι γραμμικοί προπομοί των πολυμερικών πλεγμάτων, καθώς και τα extractables τους χαρακτηρίστηκαν ως προς τα MB και τους ΔΠ τους με χρωματογραφία GPC. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή των αστεροειδών και γραμμικών ομοπολυμερών.

### 2.6.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου ( $^1\text{H-NMR}$ )

Οι γραμμικοί προπομοί των πολυμερικών πλεγμάτων, καθώς και τα extractables τους χαρακτηρίστηκαν ως προς τη δομή και τις συστάσεις τους με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ . Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή των αστεροειδών και γραμμικών ομοπολυμερών.

### 2. 6.3 Ποσοστό Μη-ενσωματωθείσας στα Πλέγματα Μάζας (Extractables)

Αμέσως μετά τη σύνθεση των πλεγμάτων, λήφθηκε ένα μικρό κομμάτι από κάθε πλέγμα το οποίο αφέθηκε να ισορροπήσει για 24 h σε  $\text{CDCl}_3$ . Το προκύπτον εκχύλισμα χαρακτηρίστηκε ως προς τη σύστασή του με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ . Αυτό το εκχύλισμα ονομάστηκε “early” extractables. Στη συνέχεια, το υπόλοιπο πλέγμα τοποθετήθηκε για εξισορρόπηση για δύο εβδομάδες σε THF. Το προκύπτον εκχύλισμα συμπυκνώθηκε με εξάτμιση του διαλύτη, ξηράθηκε σε φούρνο κενού για 24 h, και ζυγίστηκε. Το ποσοστό των extractables στο πλέγμα υπολογίστηκε ως ο λόγος της αποξηραμένης μάζας δια τη θεωρητική μάζα του πλέγματος. Η τελευταία υπολογίστηκε ως το άθροισμα των μαζών των μονομερών, του διασταυρωτή και του CTA που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη σύνθεση. Τα extractables χαρακτηρίστηκαν, επίσης, ως προς τα MB τους και τη σύστασή τους με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ , αντίστοιχα.

### **2. 6.4 Βαθμοί Διόγκωσης (ΒΔ) των Πολυμερικών Πλεγμάτων**

Όλα τα πλέγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς τους βαθμούς διόγκωσής (ΒΔ) τους σε THF και σε νερό. Περαιτέρω, όλα τα πλέγματα, λόγω της παρουσίας των θετικά φορτιζόμενων ομάδων του DMAEMA, οι ΒΔ τους προσδιορίστηκαν σε νερό σε διάφορα pH.

#### **2.6.4.1 ΒΔ σε Οργανικούς Διαλύτες**

Όλα τα ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα και όλα τα αμφολυτικά πλέγματα πριν την υδρόλυσή τους χαρακτηρίστηκαν ως προς τους ΒΔ τους σε THF. Από όλα τα πολυμερικά πλέγματα, τα οποία βρίσκονταν σε ισορροπία σε THF, λήφθηκαν μικρά κομμάτια τα οποία τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα φιαλίδια. Τα κομμάτια των πλεγμάτων ζυγίστηκαν προσδιορίζοντας έτσι τη διογκωμένη σε THF μάζα τους. Έπειτα, τα κομμάτια των πλεγμάτων ξηράνθηκαν σε φούρνο κενού (θερμοκρασία δωματίου) για 72 h, και ζυγίστηκαν και προσδιορίστηκαν έτσι οι ξηρές μάζες των πλεγμάτων. Οι ΒΔ προσδιορίστηκαν από το λόγο της διογκωμένης μάζας διά την ξηρή μάζα του πλέγματος.

#### **2.6.4.2 ΒΔ σε Νερό Συναρτήσει του pH**

Όλα τα αμφιφιλικά και αμφολυτικά πολυμερικά πλέγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς τους ΒΔ τους σε καθαρό νερό και σε νερό σε διάφορα pH μεταξύ 1.5 και 12. Ο χαρακτηρισμός των ΒΔ σε διάφορα pH επιτεύχθηκε με προσθήκη σε ξηρά, προζυγισμένα δείγματα πλεγμάτων απιονισμένο νερό (5 mL) και κατάλληλη ποσότητα διαλύματος 0.5 M HCl ή 0.5 M NaOH (για να επιτευχθεί ο αντίστοιχος βαθμός ιονισμού, BI). Τα πλέγματα αφέθηκαν σε ισορροπία για άλλες δύο εβδομάδες και μετρήθηκε το pH του υπερκείμενου διαλύματος και η διογκωμένη μάζα τους. Όλες οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές και υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και τα σφάλματά τους. Οι τιμές των  $pK$  των πλεγμάτων προσδιορίστηκαν από την καμπύλη του BI συναρτήσει του pH του υπερκείμενου διαλύματος ως το pH όπου ο BI ήταν ίσος με 50%. Στην περίπτωση των αμφολυτικών πλεγμάτων, το ισοηλεκτρικό σημείο (ΙΣ) λήφθηκε σαν το pH στο οποίο το πλέγμα παρουσίαζε το χαμηλότερο ΒΔ.

### **2.6.5 Σκέδαση Νετρονίων Υπό Μικρή Γωνία (Small-Angle Neutron Scattering, SANS)**

Όλα τα πλέγματα που συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν (σε αφόρτιστη κατάσταση) ως προς το νανοφασικό διαχωρισμό και τις αποστάσεις ανάμεσα στα κέντρα διασταύρωσής τους με τη χρήση SANS σε D<sub>2</sub>O. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το φασματόμετρο 30 m NG7 στο Ερευνητικό Κέντρο Νετρονίων του National Institute of Standards and



Technology (NIST) στο Gaithersburg στην Αμερική. Το μήκος κύματος  $\lambda$  της δέσμης νετρονίων ήταν ίσο με  $6 \text{ \AA}$ , και η απόσταση δείγματος-ανιχνευτή ήταν 1, 4.5 και  $13.5 \text{ m}$ , καλύπτοντας το εύρος τιμών για το διάνυσμα σκέδασης  $q$  από  $0.034$  μέχρι και  $5.6 \text{ nm}^{-1}$ . Τα πλέγματα τοποθετήθηκαν σε κυψελίδες χαλαζία με εσωτερικό μήκος δέσμης ακτινοβολίας  $1 \text{ mm}$ . Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας καταγραφόταν σε διδιάστατο ανιχνευτή όπου, στη συνέχεια, διορθώθηκε ως προς το κέντρο της δέσμης και τις τιμές της έντασης διέλευσης της ακτινοβολίας και μετατράπηκε, έτσι, σε απόλυτες τιμές. Κατά τη διαδικασία αυτή αφαιρείτο ο ηλεκτρονικός θόρυβος και η σκέδαση από την άδεια κυψελίδα. Η απόσταση μεταξύ των κέντρων σκέδασης προσδιορίστηκε από τη θέση του μέγιστου της κορυφής συσχέτισης  $q_{\text{max}}$ , σαν  $2\pi / q_{\text{max}}$ .

## 2.7 Μεταφορά siRNA με Χρήση Αστεροειδών και Γραμμικών Ομοπολυμερών

Όλα τα αστεροειδή και γραμμικά ομοπολυμερή μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να μεταφέρουν siRNA σε κύτταρα θηλαστικών. Τα πειράματα αυτά έγιναν στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής στο εργαστήριο του Δρ. Λεωνίδα Α. Φυλακτού.

### 2.7.1 Ετοιμασία Συμπλόκων Αστεροειδών και Γραμμικών Ομοπολυμερών – siRNA

Καταρχήν, παρασκευάστηκαν διαλύματα πολυμερών (γραμμικών και αστεροειδών) συγκέντρωσης  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  με τη διάλυση  $30 \text{ mg}$  γραμμικού ή αστεροειδούς πολυμερούς σε  $10 \text{ mL}$  καθαρού, απιονισμένου νερού.

Η συμπλοκοποίηση του πολυμερούς (γραμμικού ή αστεροειδούς) με το siRNA πραγματοποιήθηκε βάσει συγκεκριμένου πρωτοκόλλου. Συγκεκριμένα, σε δύο ξεχωριστούς μικρούς σωλήνες παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα: ένα διάλυμα siRNA και ένα διάλυμα πολυμερούς σε ρυθμιστικό διάλυμα OPTIMEM. Το διάλυμα του siRNA παρασκευάστηκε με ανάμειξη  $1 \mu\text{L}$  siRNA συγκέντρωσης  $50 \mu\text{M}$  με  $99 \mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος επιμόλυνσης OPTIMEM. Το διάλυμα του πολυμερούς παρασκευάστηκε με ανάμειξη του κατάλληλου όγκου πολυμερούς, ο οποίος λήφθηκε από το διάλυμα συγκεντρώσεως  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ , και συμπλήρωση μέχρι τα  $100 \mu\text{L}$  με OPTIMEM. Η ποσότητα των πολυμερών που προστέθηκε κυμαινόταν από  $5$  μέχρι και  $33.3 \mu\text{L}$ , ποσότητες που αντιστοιχούσαν σε  $15$  με  $100 \mu\text{g}$  πολυμερούς. Στη συνέχεια, τα δύο διαλύματα αναμείχθηκαν και αφέθηκαν στο σκοτάδι για  $25 \text{ min}$  σχηματίζοντας έτσι το διάλυμα επιμόλυνσης. Για έλεγχο της αποτελεσματικότητας των πολυμερών χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο LipofectamineRNAiMAX. Η παρασκευή του

συμπλόκου του LipofectamineRNAiMAX / siRNA πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και για τα πολυμερή. Συγκεκριμένα, η συμπλοκοποίηση πραγματοποιήθηκε με ανάμειξη διαλύματος LipofectamineRNAiMAX (5  $\mu\text{L}$  LipofectamineRNAiMAX και 95  $\mu\text{L}$  OPTIMEM) και διαλύματος siRNA (1  $\mu\text{L}$  (66.5  $\mu\text{g}$ ) και 99  $\mu\text{L}$  OPTIMEM).

### ***2.7.2 Ετοιμασία Κυττάρων Μυοβλαστών που Εκφράζουν την Πρωτεΐνη EGFP***

Στην παρούσα Διδακτορική Εργασία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μυοβλαστών C2C12 (ποντικών) τα οποία εξέφραζαν σταθερά το γονίδιο της EGFP. Για την ετοιμασία των κυττάρων αυτών ακολουθήθηκε η πιο κάτω διαδικασία: κύτταρα μυοβλαστών C2C12 τοποθετήθηκαν σε δισκία των 6 φρεατίων (wells) τα οποία περιείχαν 2 mL complete DMEM (DMEM στο οποίο προστέθηκε 10% κ. ο. FBS, 2% κ. ο. γλουταμίνη και 1% κ. ο. πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη). Αφού τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν μέχρι 90% αλληλεπικάλυψη, αυτά επιμολύνθηκαν με 10  $\mu\text{g}$  NIT EGFP πλασμιδιακό DNA (0.04  $\mu\text{g}$   $\mu\text{L}^{-1}$  σε OPTIMEM) με χρήση 10  $\mu\text{L}$  Lipofectamine2000 (40 ng  $\text{L}^{-1}$  σε OPTIMEM). Μετά από 6 h, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με D-PBS και προστέθηκε φρέσκο complete DMEM. Έπειτα, στα κύτταρα προστέθηκαν 100  $\mu\text{L}$  τρυψίνη και έτσι τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια των φρεατίων, ενώ, με προσθήκη 2 mL complete DMEM η τρυψίνη απενεργοποιήθηκε και τα κύτταρα διασπάρθηκαν στο διάλυμα. Στη συνέχεια, από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν όγκοι 20, 30 και 50  $\mu\text{L}$  και μεταφέρθηκαν σε φρεάτια διαμέτρου 100 mm τα οποία περιείχαν φρέσκο complete DMEM. Μη-επιμολυσμένα κύτταρα μεταφέρθηκαν, επίσης, σε φρεάτια των 100 mm. Μετά από 24 h, το complete DMEM αντικαταστάθηκε με complete DMEM το οποίο περιείχε γενετισίνη (με τελική συγκέντρωση 400  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$ ). Τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν για 6-10 μέρες και οι κλώνοι που εξέφραζαν την EGFP συλλέχθηκαν κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού. Στη συνέχεια, με χρήση ειδικών απορροφητικών δισκίων τα οποία εμποτίστηκαν με θρυψίνη, λήφθηκαν τα κύτταρα που εξέφραζαν την EGFP και τοποθετήθηκαν σε complete DMEM για να μεγαλώσουν.

Για τη διαδικασία αυτή όσο και για την επιμόλυνση, που παρουσιάζεται παρακάτω, χρησιμοποιήθηκαν επωαστικός κλίβανος Jouan Quality System 150 9001 και απαγωγός Advanced Bio Safety.

### 2.7.3 Επιμόλυνση

24 h πριν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων επιμόλυνσης, 100 000 κύτταρα μυοβλαστών ποντικού τα οποία εξέφραζαν το γονίδιο της EGFP, τοποθετήθηκαν σε δισκία των 12-φρεατίων και αφέθηκαν, κάτω από κανονικές συνθήκες (θερμοκρασία 37 °C, ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>), με ~2 mL complete DMEM να μεγαλώσουν μέχρι η αλληλοεπικάλυψη τους να είναι 40-60% (confluency).

Την μέρα της επιμόλυνσης, προστέθηκαν στα κύτταρα (αφού ξεπλύθηκαν με D-PBS) 0.8 mL complete DMEM στο οποίο δεν είχε προστεθεί πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (DMEM-no PS). Στη συνέχεια, στα κύτταρα προστέθηκε, στάγδην, το διάλυμα του συμπλόκου siRNA / πολυμερούς (200 μL) και αυτά αφέθηκαν για επώαση στους 37 °C για 6 h. Έπειτα, το μέσο ανάπτυξης των κυττάρων (DMEM-no PS) αντικαταστάθηκε με 2 mL φρέσκου DMEM-no PS και τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν για 24 h. Μετά, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με D-PBS, για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα, και αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια των φρεατίων με τη χρήση θρυψίνης (100 μL για κάθε φρεάτιο). Στη συνέχεια, εξήχθηκαν όλες οι πρωτεΐνες από τα κύτταρα.

Να σημειωθεί ότι για κάθε πείραμα επιμόλυνσης (για κάθε δισκίο με 12 φρεάτια) αφήνετο ένα μη-επιμολυσμένο δείγμα κυττάρων (φρεάτιο) ως δείγμα ελέγχου (control), ενώ ένα δείγμα κυττάρων (φρεάτιο) επιμολυνόταν με το αντιδραστήριο Lipofectamine για σκοπούς σύγκρισης. Τα πειράματα επιμόλυνσης για κάθε δείγμα επαναλαμβάνονταν τρεις φορές και λαμβανόταν ο μέσος όρος και υπολογιζόταν το σφάλμα με τη βοήθεια στατιστικής ανάλυσης.

Η εξαγωγή των πρωτεϊνών από τα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με τον εξής τρόπο: αφού σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 100 μL θρυψίνη. Τα κύτταρα αφέθηκαν για 2 min στον επωαστικό κλίβανο. Έπειτα, αφού σε κάθε φρεάτιο προστέθηκε 1 mL complete DMEM, τα κύτταρα αναδεύτηκαν καλά και μαζεύτηκαν σε σωλήνες των 15 mL όπου και ακολούθησε έντονη ανάδευση με χρήση φυγόκεντρου (1300 rpm) για 5 min. Αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό από τα κύτταρα, προστέθηκαν 1.5 mL D-PBS και τοποθετήθηκαν για ακόμα 5 min σε έντονη ανάδευση στη φυγόκεντρο (1300 rpm) για 5 min. Τέλος, αφού αφαιρέθηκε το D-PBS, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν 200 μL Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 10% κ. ο. γλυκερόλη, 1% κ. ο. tween, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.04% κ. ο. αναστολέα πρωτεΐνάσης) και αφού αναδεύτηκαν καλά, τοποθετήθηκαν σε μικρούς σωλήνες των 1.5 mL.

Οι πρωτεΐνες εξήχθηκαν, με τον ίδιο τρόπο, τόσο από τα επιμολυσμένα με πολυμερή δείγματα κυττάρων όσο και από το μη-επιμολυσμένο δείγμα κυττάρων, αλλά και από το δείγμα κυττάρων το οποίο επιμολύνθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο Lipofectamine.

#### **2.7.4 Μέτρηση της έντασης του φθορισμού της EGFP και της Τοξικότητας των Πολυμερών**

Μετά την εξαγωγή των συνολικών πρωτεϊνών από τα κύτταρα, μετρήθηκε η ένταση του φθορισμού της EGFP με τη χρήση μικρού-φθορισμομέτρου μοντέλου PBS-380 με μήκος κύματος απορρόφησης στα 509 nm (συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας,  $\epsilon = 61000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) και μήκος κύματος εκπομπής στα 488 nm. Η συγκέντρωση της EGFP μετρήθηκε, επίσης, και για το μη-επιμολυσμένο δείγμα όπου και υπολογίστηκε η καταστολή της EGFP (ή *EGFP suppression*) ως ένα μείον το λόγο της συγκέντρωσης της EGFP στο επιμολυσμένο δείγμα προς τη συγκέντρωση της EGFP στο μη-επιμολυσμένο δείγμα (εξίσωση 1).

$$\% \text{ Καταστολή της EGFP} = \left( 1 - \frac{\text{τιμή EGFP σε επιμολυσμένο δείγμα}}{\text{τιμή EGFP σε μη - επιμολυσμένο δείγμα}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Τόσο για τα επιμολυσμένα δείγματα όσο και για το μη-επιμολυσμένο δείγμα μετρήθηκε και η *τοξικότητα*. Μετά από την επιμόλυνση και αφού στα κύτταρα προστέθηκε η τρυψίνη και το complete DMEM, λήφθηκε δείγμα 10  $\mu\text{L}$  κυττάρων το οποίο αναμείχθηκε με 10  $\mu\text{L}$  Trypan Blue. Το Trypan Blue είναι μία χρωστική ουσία η οποία διεισδύει μόνο στις διακεκομμένες μεμβράνες των νεκρών κυττάρων βάφοντάς τα έτσι μπλε. Το δείγμα αυτό τοποθετήθηκε στη συνέχεια σε ειδικό κυτταρομετρητή (Bio-Rad iMark<sup>TM</sup>) όπου μετρήθηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων. Η *τοξικότητα* (ή *toxicity*) υπολογίστηκε από τον τύπο της εξίσωσης 2, ως ένα μείον το λόγο του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στο επιμολυσμένο δείγμα προς τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων στο μη-επιμολυσμένο δείγμα.

$$\% \text{ Τοξικότητα} = \left( 1 - \frac{\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων στο επιμολυσμένο δείγμα}}{\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων στο μη - επιμολυσμένο δείγμα}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Στην παρούσα Εργασία εισήχθηκε και υπολογίστηκε μία καινούργια παράμετρος, η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* (ή *siRNA-specific EGFP suppression*). Η τελευταία αφορά την καταστολή της EGFP που οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στο siRNA. Η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* υπολογίστηκε από το γινόμενο της *βιωσιμότητας* ( $=1 - \text{τοξικότητα}$ ) επί την *καταστολή της EGFP*, όπως φαίνεται στην εξίσωση 3.

$$\begin{aligned} & \% \text{ Συνολική Αποτελεσματικότητα Επιμόλυνσης} \\ & = (\text{Καταστολή της EGFP} \times (1 - \text{Τοξικότητα})) \times 100 \end{aligned} \quad (3)$$

## 2.8 Προσρόφηση RNA στα Πολυμερικά Πλέγματα

Όλα τα αμφολυτικά και αμφιφιλικά πλέγματα καθώς και τα ομοπολυμερή πλέγματα EGDMA<sub>3</sub>-grad-DMAEMA<sub>100</sub>-grad-EGDMA<sub>3</sub> και EGDMA<sub>3</sub>-grad-MAA<sub>50</sub>-grad-EGDMA<sub>3</sub> μελετήθηκαν ως προς το ρυθμό και την ποσότητα προσρόφησης του γενετικού υλικού RNA.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρική βαθμονόμηση του RNA σε σχέση με τη συγκέντρωσή του. Προς το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε ένα διάλυμα RNA σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 10 συγκέντρωσης 0.031 g mL<sup>-1</sup>. Στη συνέχεια, το μητρικό αυτό διάλυμα αραιώθηκε και παρασκευάστηκαν από αυτό διαλύματα χαμηλότερων συγκεντρώσεων σε RNA ως εξής: 1.0\*10<sup>-7</sup>, 5.0\*10<sup>-7</sup>, 9.0\*10<sup>-7</sup>, 1.0\*10<sup>-6</sup>, 5.0\*10<sup>-6</sup>, 9.0\*10<sup>-6</sup>, 1.0\*10<sup>-5</sup>, 1.0\*10<sup>-5</sup>, 5.0\*10<sup>-5</sup>, 9.0\*10<sup>-5</sup> και 1.0\*10<sup>-4</sup> g mL<sup>-1</sup>. Για τη συγκέντρωση διαλύματος 5.0\*10<sup>-5</sup> λήφθηκε το φάσμα UV-vis για εύρος μήκους κύματος λ από 200 μέχρι 800 nm όπου και προσδιορίστηκε το λ για τη μέγιστη απορρόφηση. Το λ βρέθηκε ίσο με 258.5 nm. Έτσι, για τις άλλες συγκεντρώσεις λήφθηκαν οι απορροφήσεις τους σε αυτό το λ (258.5 nm) και ζωγραφίστηκε στη συνέχεια η καμπύλη βαθμονόμησης της απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση. Για τις μετρήσεις της απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV-vis μοντέλου UV-1601 της Shimadzu.

Για τα πειράματα προσρόφησης, από κάθε πλέγμα λήφθηκαν τρία κομμάτια (300 mg κάθε ένα), ξηράθηκαν σε φούρνο κενού για 4 μέρες, και μεταφέρθηκαν σε καθαρό νερό όπου αφέθηκαν να ισορροπήσουν για δύο εβδομάδες. Έπειτα, τα πλέγματα μελετήθηκαν ως προς το ρυθμό και το ποσοστό προσρόφησης του RNA σε όξινο, ουδέτερο και βασικό pH (pH 4, 7 και 9). Για τα πειράματα προσρόφησης επιλέχθηκε RNA με συγκέντρωση 3.0\*10<sup>-5</sup> g mL<sup>-1</sup> το οποίο έδινε απορρόφηση γύρω στο 0.6 στα 258.5 nm. Για να ρυθμιστεί

---

το pH του διαλύματος RNA στο 7 και 4 προστέθηκε κατάλληλος όγκος HCl 2 M. Στα pH αυτά το DMAEMA βρισκόταν σε μερική και πλήρως φορτισμένη κατάσταση, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα να ασκούνται ελκτικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των μονάδων του DMAEMA και του RNA. Για την παρακολούθηση του ρυθμού προσρόφησης του RNA στα πλέγματα προστέθηκαν, αρχικά, 5 mL διαλύματος RNA. Στη συνέχεια, λαμβάνονταν κάθε 5 min μετρήσεις της απορρόφησης του RNA στο UV στα 258.5 nm για 2 με 3 ώρες.

Κυριακή Σ. Παφίτη

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή αναπτύχθηκαν βιοϋλικά με βάση καλώς-ορισμένα κατιοντικά πολυμερή. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η αξιολόγηση μίας σειράς συνθετικών γραμμικών ομοπολυμερών και τεσσάρων σειρών αστεροειδών ομοπολυμερών ως συστήματα μεταφοράς siRNA σε κύτταρα θηλαστικών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας προσρόφησης RNA από δύο σειρές πολυμερικών πλεγμάτων διασυνδεδεμένων στα άκρα.

Τα γραμμικά και αστεροειδή ομοπολυμερή συντέθηκαν με τη μέθοδο πολυμερισμού GTP,<sup>[241-245]</sup> ενώ τα πολυμερικά πλέγματα με τη μέθοδο RAFT.<sup>[246]</sup>

Για όλες τις συνθέσεις τα μονομερή που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα DMAEMA, THPMA και TFEMA. Το DMAEMA είναι ένα υδρόφιλο και θετικά ιονιζόμενο σε χαμηλά pH μονομερές το οποίο μπορεί, λόγω του θετικού φορτίου του, να συμπλοκοποιηθεί με το αρνητικά φορτισμένο siRNA. Το THPMA είναι ένα υδρόφοβο, μη-ιοντικό μονομερές το οποίο όταν υδρολυθεί δίνει το MAA, ένα υδρόφιλο και αρνητικά ιονιζόμενο σε σχετικά υψηλά pH μονομερές. Το TFEMA είναι ένα ημιφθοριωμένο, υδρόφοβο και μη-ιοντικό μονομερές το οποίο παρουσιάζει τις ξεχωριστές ιδιότητες των ατόμων φθορίου που περιέχει.

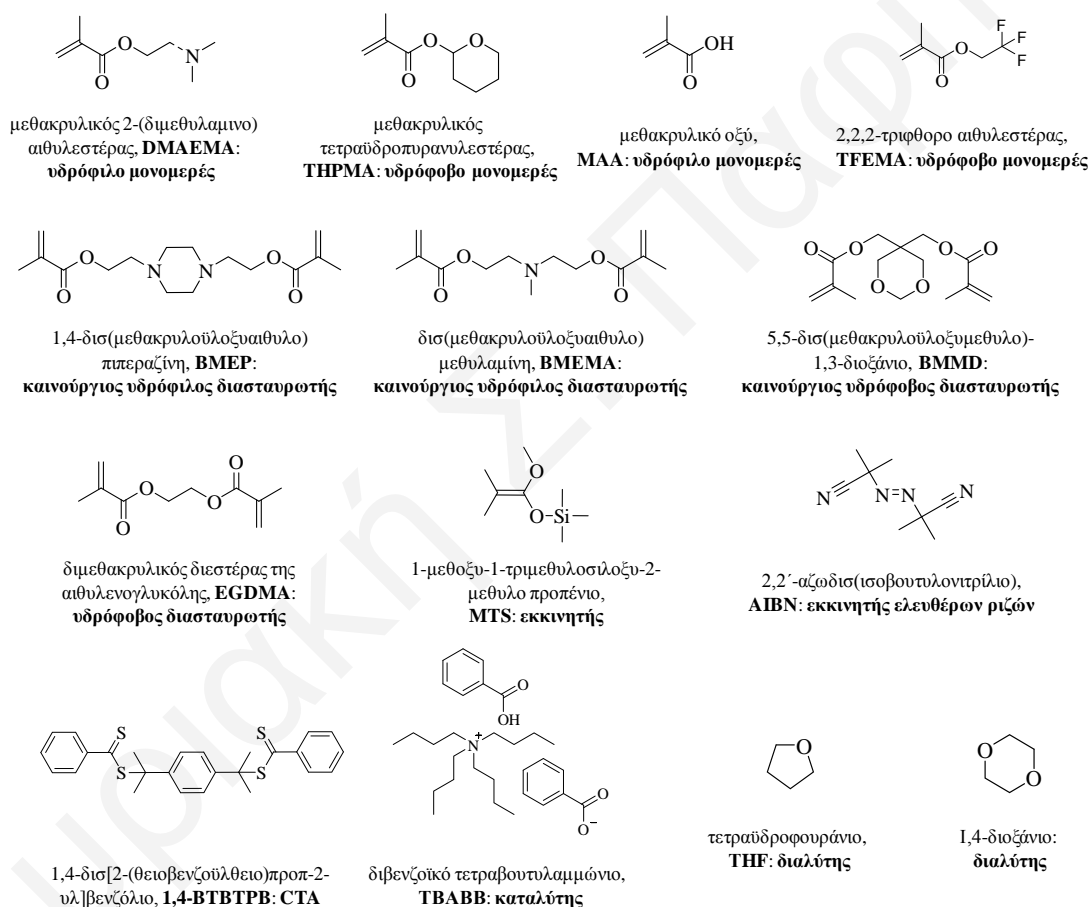
Για τη σύνθεση των γραμμικών και αστεροειδών ομοπολυμερών χρησιμοποιήθηκαν ο μονοδραστικός εκκινητής MTS και ο καταλύτης TBABB, ενώ για τη σύνθεση των πολυμερικών πλεγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ο εκκινητής ελευθέρων ριζών AIBN και το CTA 1,4-BTBTPB.

Σαν διαλύτης για τους πολυμερισμούς με GTP χρησιμοποιήθηκε το THF, ενώ για τους πολυμερισμούς με RAFT το 1,4-διοξάνιο.

Ως διασταυρωτές για τη σύνθεση των αστεροειδών ομοπολυμερών χρησιμοποιήθηκαν οι νέοι, υδρόφιλοι, θετικά ιονιζόμενοι και μη-υδρολυόμενοι BMEP και BMEMA, καθώς και ο νέος, υδρόφοβος και υδρολυόμενος διασταυρωτής BMMD, ενώ για σκοπούς σύγκρισης, χρησιμοποιήθηκε και ο εμπορικά διαθέσιμος υδρόφοβος διασταυρωτής EGDMA. Ο τελευταίος χρησιμοποιήθηκε, επίσης, ως συνδετικό μέσο στην περίπτωση των πολυμερικών πλεγμάτων.

Τα ονόματα και οι χημικές δομές όλων των μονομερών, των διασταυρωτών, των εκκινητών, του καταλύτη και των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση όλων των πολυμερικών συστημάτων δίνονται στο Σχήμα 3.1.

Στα κεφάλαια που ακολουθούν συζητούνται, αναλυτικά, τα αποτελέσματα από τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό και την αξιολόγηση της κάθε σειράς γραμμικών και αστεροειδών ομοπολυμερών και πολυμερικών πλεγμάτων. Επιπρόσθετα, σε ένα κεφάλαιο συζητούνται εκτενώς και συγκρίνονται μεταξύ τους όλα τα αποτελέσματα από τα πειράματα επιμόλυνσης.



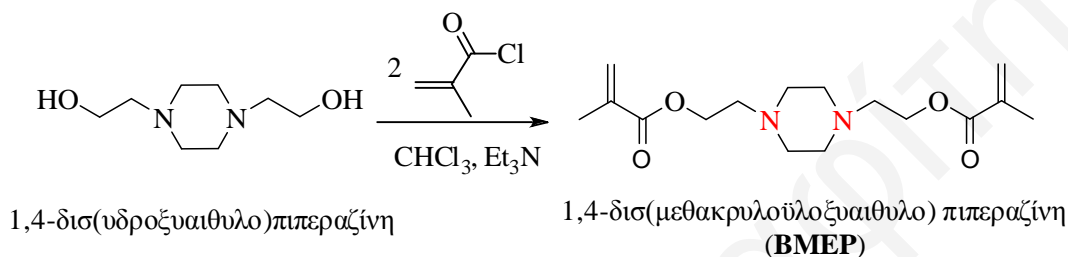
**Σχήμα 3.1:** Ονόματα και χημικές δομές των μονομερών, των διασταυρωτών, των εκκινητών, του καταλύτη και των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των πολυμερικών συστημάτων.



### 3.1 Σύνθεση και Χαρακτηρισμός Νέων Διασταυρωτών

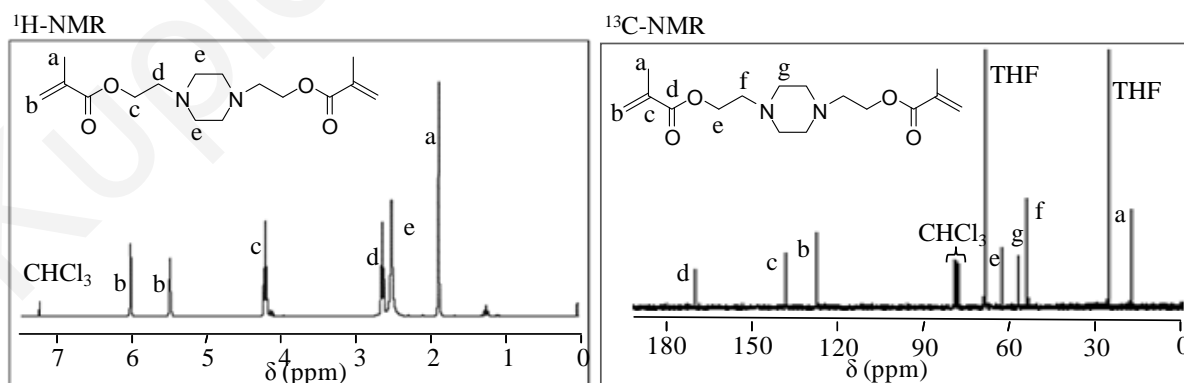
#### 3.1.1 Σύνθεση Υδρόφιλου και Κατιοντικού Διασταυρωτή BMEP

Η σύνθεση του νέου, υδρόφιλου, θετικά ιονιζόμενου και μη υδρολύμενου διασταυρωτή BMEP πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης εστεροποίησης της 1,4-δισ(υδροξυαιθυλο)πιπεραζίνης με περίσσεια μεθακρυλοχλωριδίου στην παρουσία βάσης τριαιθυλαμίνης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.2. Η αντίδραση ήταν άμεση και εξώθερμη.



**Σχήμα 3.2:** Χημική αντίδραση της σύνθεσης του υδρόφιλου διασταυρωτή BMEP.

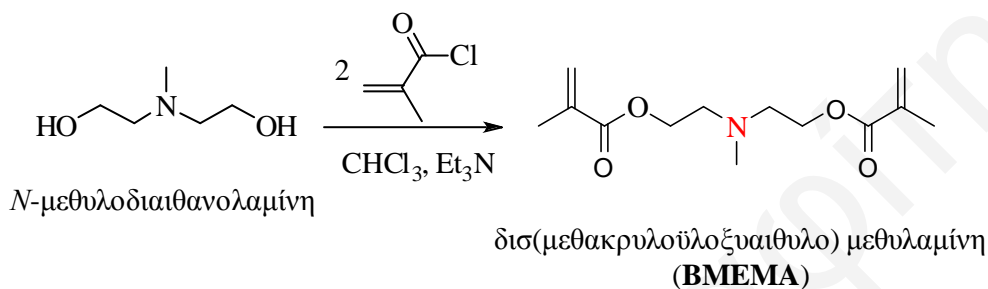
Αφού ο διασταυρωτής BMEP καθαρίστηκε, η δομή του επιβεβαιώθηκε με χρήση φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ -NMR. Τα φάσματα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ -NMR του BMEP φαίνονται στο Σχήμα 3.3. Ο διασταυρωτής λήφθηκε σε απόδοση 64%. Για να επιτευχθεί μεγαλύτερη καθαρότητα, ο διασταυρωτής επιχειρήθηκε να αποσταχθεί. Δυστυχώς, όμως, δεν ήταν επιτυχής η απόσταξη του αφού κατά τη θέρμανσή του πολυμεριζόταν (παρόλο που είχε προστεθεί μικρή ποσότητα DPPH) και έπηξε, με αποτέλεσμα να καταστραφεί και να πρέπει να ξανασυντεθεί.



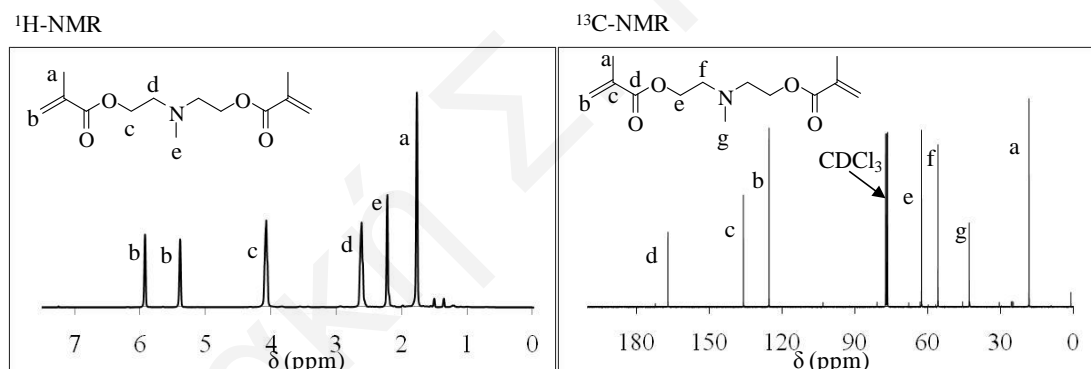
**Σχήμα 3.3:** Φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR (αριστερά) και  $^{13}\text{C}$ -NMR (δεξιά) του διασταυρωτή BMEP.

### 3.1.2 Σύνθεση Υδρόφιλου και Κατιοντικού Διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ

Η σύνθεση του νέου, υδρόφιλου, θετικά ιονιζόμενου και μη υδρολυόμενου διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης εστεροποίησης της *N*-μεθυλοδιαιθανολαμίνης με το μεθακρυλοχλωρίδιο στην παρουσία βάσης τριαιθυλαμίνης (Σχήμα 3.4). Το μόριο λήφθηκε σε απόδοση 59% και ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ -NMR (Σχήμα 3.5). Το μόριο αυτό, για μεγαλύτερη καθαρότητα, αποστάχθηκε υπό κενό στους 110 °C.



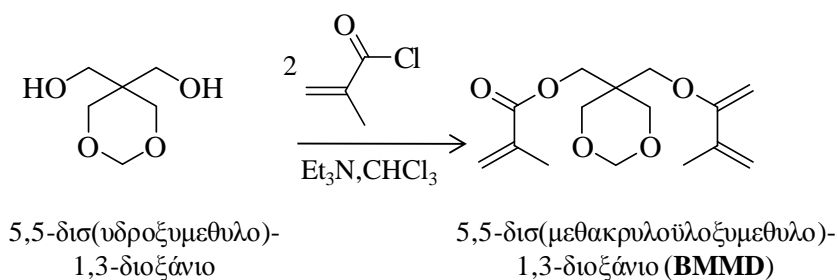
Σχήμα 3.4: Χημική αντίδραση της σύνθεσης του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ.



Σχήμα 3.5: Φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  (αριστερά) και  $^{13}\text{C-NMR}$  (δεξιά) του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ.

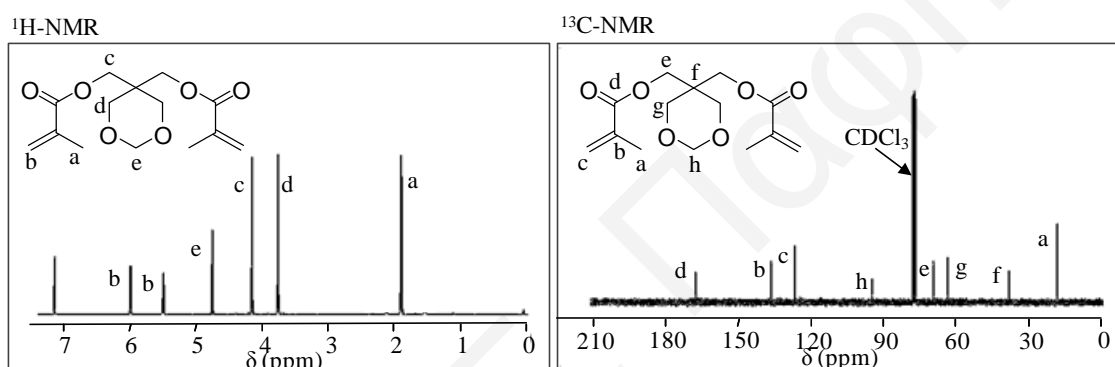
### 3.1.3 Σύνθεση Υδρόφοβου και Υδρολυόμενου Διασταυρωτή ΒΜΜΔ

Στην παρούσα Εργασία πραγματοποιήθηκε, επίσης, η σύνθεση και ενός υδρολυόμενου διασταυρωτή του ΒΜΜΔ. Η σύνθεση του τελευταίου πραγματοποιήθηκε, επίσης, μέσω αντίδρασης εστεροποίησης της αντίστοιχης αλκοόλης (5,5-δισ(υδροξυμεθυλο)-1,3-διοξάνιο) με το μεθακρυλοχλωρίδιο στην παρουσία βάσης τριαιθυλαμίνης (Σχήμα 3.6). Ο ΒΜΜΔ έπειτα από τον καθαρισμό του λήφθηκε σε απόδοση 65%.



**Σχήμα 3.6:** Χημική αντίδραση της σύνθεσης του διασταυρωτή BMMD.

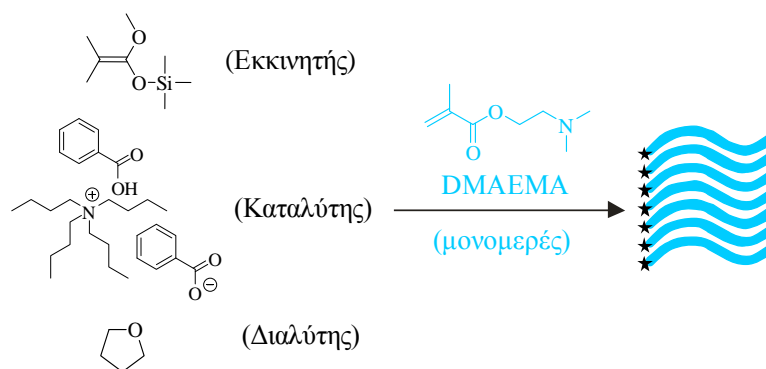
Η δομή του BMMD επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ -NMR. Τα σχετικά φάσματα δίνονται στο Σχήμα 3.7 που ακολουθεί.



**Σχήμα 3.7:** Φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR (αριστερά) και  $^{13}\text{C}$ -NMR (δεξιά) του διασταυρωτή BMMD.

### 3.2 Σύνθεση Γραμμικών Ομοπολυμερών του DMAEMA

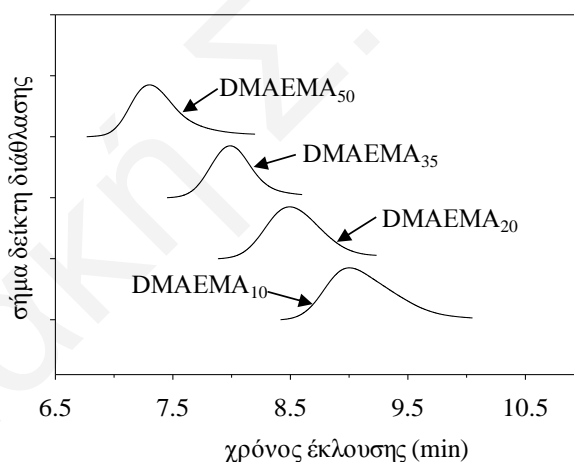
Στην παρούσα Εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μίας σειράς υδρόφιλων και κατιοντικών γραμμικών ομοπολυμερών με διάφορους ΒΠ βασισμένων στο υδρόφιλο και θετικά ιονιζόμενο μονομερές του DMAEMA. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν γραμμικά ομοπολυμερή με ΒΠ 10, 20, 35 και 50. Η σύνθεσή τους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο GTP. Στο Σχήμα 3.8 φαίνεται σχηματικά η σύνθεση των γραμμικών ομοπολυμερών. Στο Σχήμα με ανοικτό μπλε χρώμα χρωματίζονται οι μονάδες του DMAEMA, ενώ οι αστερίσκοι στα άκρα των αλυσίδων υποδηλώνουν τα ενεργά άκρα τους. Όπως φαίνεται στο Σχήμα, η σύνθεση των γραμμικών ομοπολυμερών πραγματοποιήθηκε σε ένα στάδιο μέσω του πολυμερισμού του DMAEMA στην παρουσία του μονοδραστικού εκκινητή MTS.



**Σχήμα 3.8:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των γραμμικών ομοπολυμερών. Με μπλε ανοιχτό φαίνονται οι αλυσίδες του DMAEMA. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τα ενεργά άκρα των αλυσίδων.

### 3.2.1 Μοριακά Βάρη και Σύσταση

Η σύνθεση των γραμμικών ομοπολυμερών επιβεβαιώθηκε με χρωματογραφία GPC-RI. Τα χρωματογραφήματα GPC-RI φαίνονται στο Σχήμα 3.9, ενώ τα  $M_p$  και  $M_n$ , οι ΔΠ και οι ΒΠ όπως προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI δίνονται στον Πίνακα 3.1. Στον Πίνακα δίνονται, επίσης, οι ΒΠ όπως αυτοί προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$ .



**Σχήμα 3.9:** Χρωματογραφήματα GPC-RI των γραμμικών ομοπολυμερών.

**Πίνακας 3.1:** Μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και βαθμοί πολυμερισμού όλων των γραμμικών ομοπολυμερών όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .

Α/Α	Θεωρητική δομή γραμμικών ομοπολυμερών	Θεωρητικό MB	Αποτελέσματα GPC-RI				Αποτελέσματα $^1\text{H-NMR}$
			$M_p$	$M_n$	ΔΠ	ΒΠ του D	ΒΠ του D
1	DMAEMA <sub>10</sub>	1670	1800	1240	1.30	7	13.6
2	DMAEMA <sub>20</sub>	3240	4280	3610	1.17	22	37.5
3	DMAEMA <sub>35</sub>	5600	10500	9320	1.11	59	69
4	DMAEMA <sub>50</sub>	7960	34100	26200	1.19	166	150

Στο Σχήμα 3.9 παρατηρείται στα χρωματογραφήματα GPC-RI των γραμμικών ομοπολυμερών ότι καθώς αυξανόταν ο ΒΠ τους, οι κορυφές μετατοπίζονταν σε μικρότερους χρόνους έκλουσης, επιβεβαιώνοντας έτσι την αύξηση του MB των πολυμερών. Από τον Πίνακα 3.1 παρατηρείται ότι τα MB των δύο μικρότερων γραμμικών ομοπολυμερών ήταν κοντά στα θεωρητικά αναμενόμενα, ενώ αυτά των άλλων δύο ήταν αρκετά μεγαλύτερα. Αυτό αποδόθηκε σε μερική απενεργοποίηση του εκκινητή κατά τον πολυμερισμό. Οι ΔΠ, όπως αυτοί προσδιορίστηκαν με GPC-RI, ήταν χαμηλοί, αποδεικνύοντας τον έλεγχο της αντίδρασης πολυμερισμού. Οι ΒΠ των γραμμικών ομοπολυμερών που προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του GPC-RI βρίσκονταν σε καλή συμφωνία με τους αντίστοιχους που προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .

### 3.2.2 Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Μέσα

Μετά τη σύνθεση τους, όλα τα γραμμικά ομοπολυμερή χαρακτηρίστηκαν ως προς τις θερμοκρασίες νεφέλωσής τους σε καθαρό νερό και τις φαινόμενες τιμές  $pK$  των μονάδων του DMAEMA με τη βοήθεια νεφελομετρίας και τιτλοδότησης υδρογονοϊόντων, αντίστοιχα.

#### 3.2.2.1 Θερμοκρασίες Νεφέλωσης

Οι θερμοκρασίες νεφέλωσης των γραμμικών ομοπολυμερών βρέθηκαν να ελαττώνονται από τους 41.9 στους 31.7 °C με αύξηση του MB τους (Πίνακας 3.2). Αυτό αποδόθηκε στην ελάττωση της διαλυτότητας των γραμμικών ομοπολυμερών με αύξηση του μεγέθους τους. Η τάση αυτή των θερμοκρασιών νεφέλωσης βρίσκεται σε συμφωνία με την εργασία του Weaver και συνεργατών<sup>[248]</sup> οι οποίοι παρατήρησαν παρόμοια εξάρτηση των θερμοκρασιών νεφέλωσης από το MB για μία σειρά γραμμικών ομοπολυμερών βασισμένων στο μεθακρυλικό 2-(υδροξυ)αιθυλεστέρα (που παρασκευάστηκαν με τη χρήση ενός υδρόφιλου εκκινητή) με ΒΠ μεταξύ 20 και 45 σε υδατικό διάλυμα με pH 6.5.

**Πίνακας 3.2:** Θερμοκρασίες νεφέλωσης όλων των γραμμικών ομοπολυμερών, όπως προσδιορίστηκαν με νεφελομετρία.

A/A	Θεωρητική δομή γραμμικών ομοπολυμερών	Θερμοκρασία νεφέλωσης (°C)
1	DMAEMA <sub>10</sub>	41.9
2	DMAEMA <sub>20</sub>	38.7
3	DMAEMA <sub>35</sub>	35.2
4	DMAEMA <sub>50</sub>	31.7

### 3.2.2.2 Φαινόμενα pK και pH καταβύθισης

Για όλα τα γραμμικά ομοπολυμερή προσδιορίστηκαν οι φαινόμενες τιμές pK των μονάδων του DMAEMA οι οποίες δίνονται στον Πίνακα 3.3. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν να διακυμαίνονται γύρω από το 7.4 κατά 0.1 μονάδες.

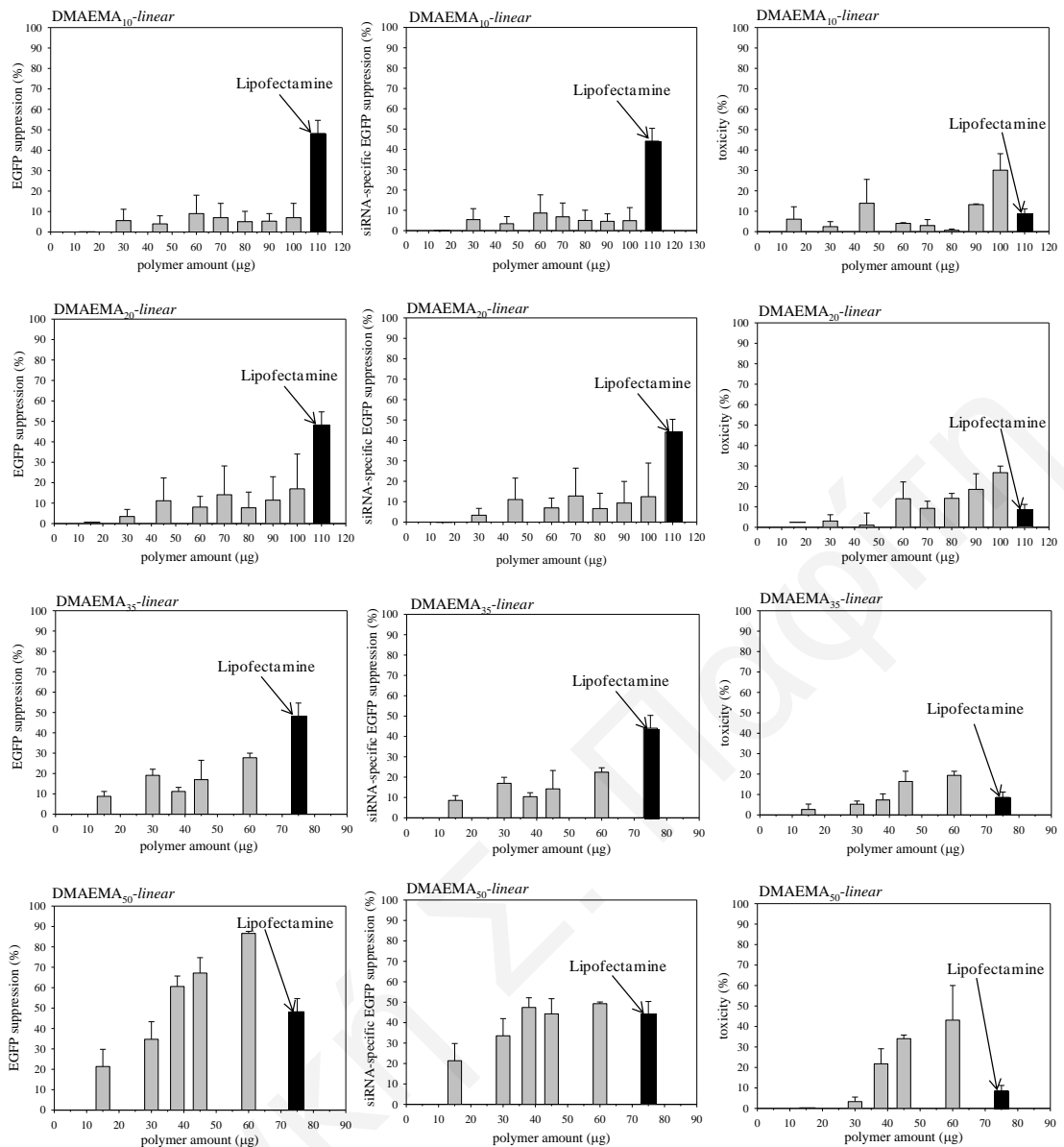
**Πίνακας 3.3:** Τιμές pK όλων των γραμμικών ομοπολυμερών, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τιτλοδότηση υδρογονοίωντων.

A/A	Θεωρητική δομή γραμμικών Ομοπολυμερών	pK
1	DMAEMA <sub>10</sub>	7.3
2	DMAEMA <sub>20</sub>	7.4
3	DMAEMA <sub>35</sub>	7.4
4	DMAEMA <sub>50</sub>	7.5

### 3.2.3 Εφαρμογή στη Μεταφορά siRNA σε Κύτταρα Θηλαστικών

Μετά από το χαρακτηρισμό τους σε οργανικά και υδατικά μέσα, όλα τα γραμμικά ομοπολυμερή χαρακτηρίστηκαν ως προς την ικανότητά τους να μεταφέρουν siRNA σε κύτταρα μυοβλαστών (C2C12, από ποντίκια) και να καταστέλλουν την έκφραση ενδογενούς EGFP. Η αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης βασίστηκε σε τρεις δείκτες: την καταστολή της έκφρασης της EGFP (ή *EGFP suppression*), την τοξικότητα (ή *toxicity*) και τη συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης (ή *siRNA-specific EGFP suppression*). Η συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης, όπως αναφέρεται και στο Πειραματικό Μέρος, αντανακλά την καταστολή της έκφρασης της EGFP που οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στην παρουσία του siRNA αφού έχει αφαιρεθεί η επίδραση της τοξικότητας. Αυτοί οι τρεις δείκτες μελετήθηκαν ως προς την ποσότητα του πολυμερούς (polymer amount) υπό σταθερή ποσότητα siRNA (0.665 μg, 50 pmol). Για σκοπούς σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο επιμόλυνσης Lipofectamine.

Στο Σχήμα 3.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα επιμόλυνσης. Συγκεκριμένα, τα γραφήματα παριστάνουν τους δείκτες της καταστολής της έκφρασης της EGFP, της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης, και της τοξικότητας σε συνάρτηση με την ποσότητα του πολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε κατά την επιμόλυνση. Η ποσότητα των ομοπολυμερών μεταβαλλόταν από 15 σε 100 μg για τα γραμμικά ομοπολυμερή DMAEMA<sub>10</sub> και DMAEMA<sub>20</sub>, και από 15 σε 60 μg για τα γραμμικά ομοπολυμερή DMAEMA<sub>35</sub> και DMAEMA<sub>50</sub>.

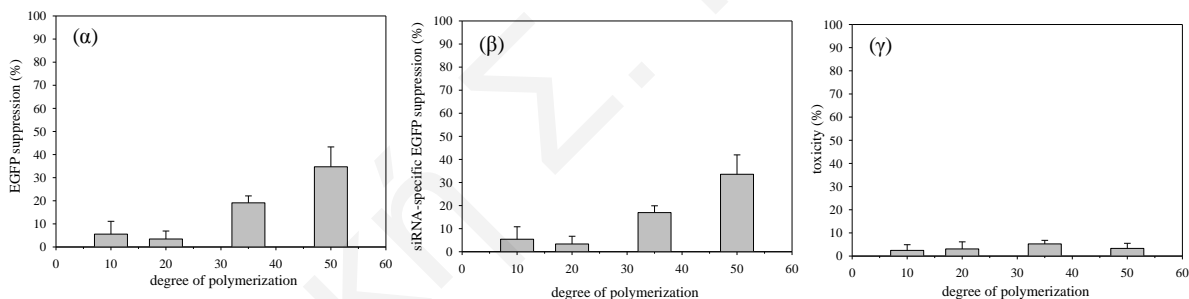


**Σχήμα 3.10:** Εξάρτηση της καταστολής της *EGFP* (ή *EGFP suppression*), της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και της τοξικότητας (ή *toxicity*) από την ποσότητα του πολυμερούς (*polymer amount*) υπό σταθερή ποσότητα *siRNA* (0.665 μg, 50 pmol) για όλα τα γραμμικά ομοπολυμερή.

Για τα γραμμικά ομοπολυμερή DMAEMA<sub>10</sub> και DMAEMA<sub>20</sub> παρατηρήθηκε ότι η καταστολή της έκφρασης της *EGFP* (Σχήμα 3.10, αριστερή στήλη γραφημάτων) και η συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης (Σχήμα 3.10, μεσαία στήλη γραφημάτων) ήταν τελείως ανεξάρτητα από την ποσότητα του ομοπολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε. Για το γραμμικό ομοπολυμερές DMAEMA<sub>35</sub> παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της καταστολής της έκφρασης της *EGFP* και της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης με αύξηση της ποσότητας του ομοπολυμερούς. Τέλος, για το γραμμικό ομοπολυμερές DMAEMA<sub>50</sub> φάνηκε ότι τόσο η καταστολή της έκφρασης της *EGFP* όσο και η τοξικότητα αυξάνονταν καθαρά με την αύξηση της ποσότητας του ομοπολυμερούς, ενώ η συνολική

αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης παρουσίαζε μικρή αύξηση. Μάλιστα, η τελευταία για ποσότητες μεταξύ 45 και 60  $\mu\text{g}$  ήταν συγκρίσιμη με τις αντίστοιχες τιμές του εμπορικά διαθέσιμου αντιδραστηρίου Lipofectamine. Όσον αφορά την τοξικότητα των τριών πρώτων γραμμικών ομοπολυμερών, αν και παρουσίαζε μικρή αυξητική τάση, διατηρείτο σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Επιπλέον, οι τρεις δείκτες μελετήθηκαν και ως προς το ΒΠ των γραμμικών ομοπολυμερών. Για κάθε πολυμερές λήφθηκαν οι τιμές για κάθε δείκτη στα 30  $\mu\text{g}$  πολυμερούς και αναπαραστάθηκαν σε σχέση με το ΒΠ (Σχήμα 3.11). Έτσι, το Σχήμα 3.11 παρουσιάζει την καταστολή της έκφρασης της *EGFP*, τη συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης και την τοξικότητα σε σχέση με το ΒΠ (degree of polymerization) των ομοπολυμερών. Είναι γνωστό ότι η αύξηση του ΒΠ των ομοπολυμερών αντιστοιχεί στην αύξηση του ΜΒ τους (Πίνακας 3.1). Έτσι, στο Σχήμα 3.11 παρουσιάζεται η εξάρτηση των τριών αυτών δεικτών από το ΜΒ. Από τις γραφικές παραστάσεις φαίνεται ότι η καταστολή της έκφρασης της *EGFP* και η συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης αυξάνονταν με αύξηση του ΒΠ, ενώ η τοξικότητα των ομοπολυμερών ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα.



**Σχήμα 3.11:** Εξάρτηση (α) της καταστολής της έκφρασης της *EGFP* (ή *EGFP suppression*) (β) της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και (γ) της τοξικότητας (ή *toxicity*) από το βαθμό πολυμερισμού (ή degree of polymerization) των γραμμικών ομοπολυμερών με 30  $\mu\text{g}$  γραμμικού ομοπολυμερούς και 0.665  $\mu\text{g}$  (50 pmol) siRNA.



### 3.3 Σύνθεση Αστεροειδών Ομοπολυμερών

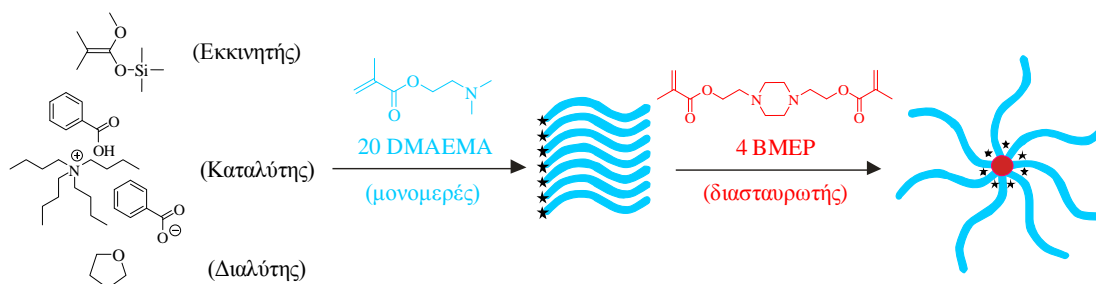
Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τεσσάρων σειρών αστεροειδών ομοπολυμερών, τριών σειρών βασισμένων στους τρεις νέους διασταυρωτές BMEP, BMEMA και BMMD, και μίας βασισμένης στον εμπορικά διαθέσιμο EGDMA.

Οι δύο νέοι υδρόφιλοι διασταυρωτές BMEP και BMEMA έφεραν δύο και ένα τριτοταγή άτομα αζώτου, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα να φορτίζονται θετικά κάτω από όξινες συνθήκες. Η σύνθεση αστεροειδών ομοπολυμερών βασισμένων σε αυτούς τους υδρόφιλους διασταυρωτές είχε ως αποτέλεσμα, πέρα από την αύξηση του υδρόφιλου χαρακτήρα των αστεροειδών πολυμερών, και την ενίσχυση του θετικού φορτίου τους. Η σύνθεση αυτών των διασταυρωτών αποφασίστηκε έπειτα από την παρατήρηση προβλημάτων διαλυτότητας σε υδατικά μέσα αστεροειδών πολυμερών του EGDMA τα οποία συντέθηκαν προηγουμένως από την Ομάδα μας και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μεταφοράς DNA.

Πέρα, όμως, από τα προβλήματα διαλυτότητας που παρατηρήθηκαν σε προηγούμενες μελέτες, παρατηρήθηκε, επίσης, τόσο σε προηγούμενες μελέτες όσο και στην παρούσα Εργασία, μεγάλη τοξικότητα των αστεροειδών πολυμερών. Έτσι, γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι μεγάλου MB πολυμερή οδηγούν σε αυξημένη τοξικότητα, επιχειρήσαμε, παράλληλα, τη σύνθεση ενός υδρολυόμενου διασταυρωτή του BMMD. Μετά την υδρόλυση τους, τα αστεροειδή πολυμερή του BMMD γίνονταν υδρόφιλα, ενώ ελαττωνόταν και το MB τους, συμβάλλοντας έτσι στην ευκολότερη αποβολή τους από τα κύτταρα.

#### 3.3.1 Αστεροειδή Ομοπολυμερή του DMAEMA Βασισμένα στο Διασταυρωτή BMEP

Η πρώτη σειρά υδρόφιλων και κατιοντικών αστεροειδών ομοπολυμερών που συντέθηκε στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή ήταν βασισμένη στον νέο, υδρόφιλο και θετικά ιονιζόμενο διασταυρωτή BMEP. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τεσσάρων αστεροειδών ομοπολυμερών με ΒΠ βραχιόνων ίσους με 15, 20, 35 και 50. Η σύνθεση των αστεροειδών ομοπολυμερών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου GTP. Για όλους τους πολυμερισμούς χρησιμοποιήθηκε το DMAEMA ως μονομερές, το MTS ως εκκινητής, το TBABB ως καταλύτης και το THF ως διαλύτης. Στο Σχήμα 3.12 φαίνεται σχηματικά η σύνθεση του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star. Στο Σχήμα οι μονάδες του DMAEMA χρωματίζονται με μπλε, ενώ ο πυρήνας του BMEP δίνεται με σκούρο κόκκινο. Οι αστερίσκοι στα άκρα των γραμμικών προπομπών και στον πυρήνα συμβολίζουν τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.



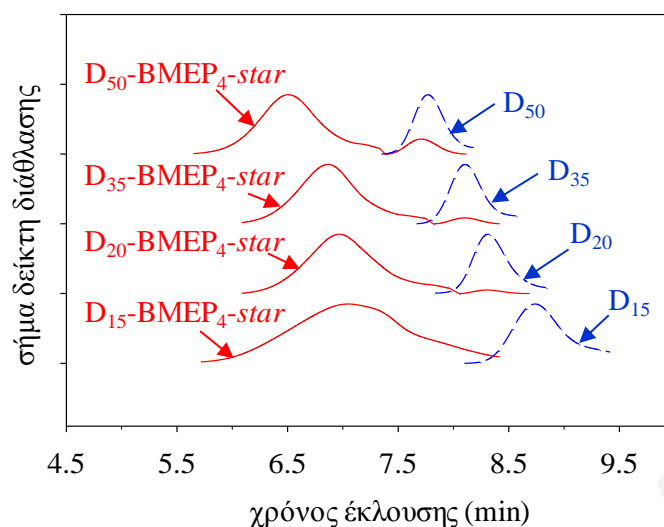
**Σχήμα 3.12:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star. Με ανοικτό μπλε χρωματίζονται οι μονάδες του DMAEMA, ενώ ο πυρήνας του BMEP παρουσιάζεται με κόκκινο.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.12, η σύνθεση των αστεροειδών ομοπολυμερών πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των γραμμικών προπομπών (βραχίονες αστεροειδούς ομοπολυμερούς) μέσα από τον πολυμερισμό του μονομερούς DMAEMA στην παρουσία του μονοδραστικού εκκινητή MTS. Στη συνέχεια, κατά το δεύτερο στάδιο, στην ίδια φιάλη πολυμερισμού οι βραχίονες διασυνδέθηκαν στο ένα άκρο τους μέσα από τον πολυμερισμό του BMEP ο οποίος οδήγησε στο σχηματισμό “arm-first” αστεροειδών ομοπολυμερών. Η γραμμομοριακή αναλογία διασταυρωτή προς εκκινητή, για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή, ήταν ίση με 4 : 1.

### 3.3.1.1 Μοριακά Βάρη και Σύσταση

Η επιτυχία σύνθεσης των αστεροειδών ομοπολυμερών επιβεβαιώθηκε με GPC-RI. Τα χρωματογραφήματα των γραμμικών προπομπών των αστεροειδών ομοπολυμερών και των ίδιων των αστεροειδών ομοπολυμερών φαίνονται στο Σχήμα 3.13, ενώ τα MB, οι ΔΠ και ΒΠ των αστεροειδών ομοπολυμερών αλλά και των βραχιόνων τους, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με GPC-RI, δίνονται στον Πίνακα 3.4. Στον ίδιο Πίνακα δίνονται, επίσης, οι ΒΠ των βραχιόνων όπως αυτοί προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR.

Στο Σχήμα 3.13 φαίνεται ότι τα χρωματογραφήματα GPC-RI των αστεροειδών ομοπολυμερών μετακινούνται σε μικρότερους χρόνους έκλουσης σε σύγκριση με αυτά των γραμμικών προπομπών τους (βραχιόνων) αποδεικνύοντας έτσι την αύξηση του MB τους και τον επιτυχή σχηματισμό τους. Στα χρωματογραφήματα των αστεροειδών ομοπολυμερών με ΒΠ βραχίονα 20, 35 και 50 φαίνεται μικρό ποσοστό γραμμικού ομοπολυμερούς το οποίο δεν ενσωματώθηκε στο αστεροειδές ομοπολυμερές. Αυτό αποδόθηκε στο αυξημένο ιξώδες του διαλύματος, στη μειωμένη κινητικότητα των αλυσίδων, καθώς και στην πιθανή απενεργοποίηση των ενεργών κέντρων του πολυμερισμού.



**Σχήμα 3.13.** Χρωματογραφήματα GPC-RI των αστεροειδών ομοπολυμερών DMAEMA-BMEP.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.4, τα MB των γραμμικών προπομπών των αστεροειδών ομοπολυμερών είναι μεγαλύτερα από τα θεωρητικά αναμενόμενα, γεγονός που οφείλεται σε μερική απενεργοποίηση του εκκινήτη. Οι ΔΠ των αστεροειδών ομοπολυμερών είναι χαμηλοί, με εξαίρεση το DMAEMA<sub>15</sub>-BMEP<sub>4-star</sub> το οποίο έχει ΔΠ 2.24. Αυτό οφείλεται στην περαιτέρω διασύνδεση των αστεροειδών ομοπολυμερών (star-star coupling), κατάσταση η οποία ευνοείται από το μικρό μήκος του βραχίονά τους. Οι ΒΠ των βραχιόνων, όπως αυτοί προσδιορίστηκαν με χρήση GPC-RI και φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H-NMR, βρίσκονται σε σχετικά καλή συμφωνία μεταξύ τους.

**Πίνακας 3.4:** Μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και βαθμοί πολυμερισμού βραχιόνων όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMEP, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR.

A/A	Θεωρητική δομή πολυμερών <sup>1</sup>	Θεωρητικό MB	Αποτελέσματα GPC-RI				Αποτελέσματα <sup>1</sup> H-NMR
			M <sub>p</sub>	M <sub>n</sub>	ΔΠ	ΒΠ D	ΒΠ D
1	D <sub>15</sub>	2460	3420	2200	1.38	13	20
	D <sub>15</sub> -BP <sub>4-star</sub>	-----	63800	38000	2.24		24
2	D <sub>25</sub>	4030	7050	6100	1.10	38	30
	D <sub>25</sub> -BP <sub>4-star</sub>	-----	73700	55200	1.41		37
			7260	6860	1.03		
3	D <sub>35</sub>	5600	10300	9320	1.06	59	54
	D <sub>35</sub> -BP <sub>4-star</sub>	-----	87700	71700	1.31		35
			10300	9900	1.03		
4	D <sub>50</sub>	7960	18400	17100	1.04	108	54
	D <sub>50</sub> -BP <sub>4-star</sub>	-----	166000	135000	1.30		84
			22600	19400	1.04		

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BP: BMEP.

### 3.3.1.2 Απόλυτα Μοριακά Βάρη και Αριθμός Βραχιόνων

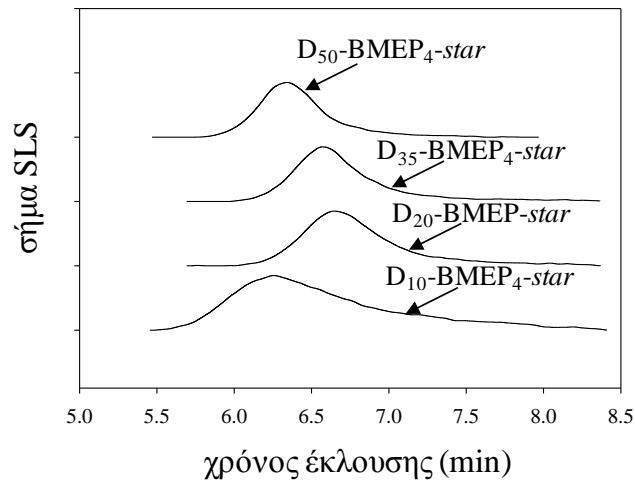
Όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του BMEP χαρακτηρίστηκαν ως προς τα απόλυτα MB,  $M_w$ , και τον αριθμό βραχιόνων τους με χρήση GPC-SLS. Στο Σχήμα 3.14 δίνονται τα χρωματογραφήματα GPC-SLS όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών, ενώ στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται τα απόλυτα  $M_w$  και ο αριθμός βραχιόνων τους. Ο αριθμός βραχιόνων των αστεροειδών ομοπολυμερών υπολογίστηκε αφαιρώντας αρχικά από την τιμή του απόλυτου  $M_w$  το MB που αντιστοιχούσε στον πυρήνα του BMEP, και διαιρώντας, στη συνέχεια, τη ληφθείσα τιμή με το  $M_n$  του βραχίονα η οποία λήφθηκε με GPC-RI. Από τον Πίνακα φαίνεται ότι το  $M_w$  των αστεροειδών με ΒΠ βραχίονα 20, 35 και 50 αυξάνεται μονοτονικά με αύξηση του ΒΠ βραχίονα. Το μικρότερο αστεροειδές ομοπολυμερές παρουσιάζει μεγαλύτερο MB λόγω της περαιτέρω διασύνδεσης των αλυσίδων του, ενώ φέρει, επίσης, και το μεγαλύτερο αριθμό βραχιόνων (=28.5). Τα άλλα τρία αστεροειδή ομοπολυμερή με ΒΠ βραχίονα 20, 35 και 50 έχουν αριθμούς βραχιόνων περίπου ίσους με 9.5. Το DMAEMA<sub>15</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star παρουσίασε το μεγαλύτερο αριθμό βραχιόνων αφού, λόγω του μικρού μήκους του βραχίονα του, δεν παρουσιάζονταν ιδιαίτερες στερεοχημικές παρεμποδίσεις με αποτέλεσμα την ενσωμάτωση μεγαλύτερου αριθμού βραχιόνων.

**Πίνακας 3.5:** Απόλυτα μοριακά βάρη και αριθμός βραχιόνων όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMEP, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-SLS.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδών ομοπολυμερών <sup>1</sup>	$M_w$ αστεροειδών	$M_w^{\text{πυρήνα}}$ <sup>2</sup>	$M_w^{\text{αστρ.}}$ - $M_w^{\text{πυρήνα}}$	$M_n$ βραχίονα με GPC-RI	Αριθμός βραχιόνων
1	D <sub>15</sub> -BP <sub>4</sub> -star	95200	32400	62800	2200	28.5
2	D <sub>25</sub> -BP <sub>4</sub> -star	83500	20000	63500	6100	10.4
3	D <sub>35</sub> -BP <sub>4</sub> -star	103000	18500	84500	9320	9.1
4	D <sub>50</sub> -BP <sub>4</sub> -star	188000	26300	161700	17100	9.5

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BP: BMEP.

<sup>2</sup> $M_w \times [(BΠ_{\text{εορ. BMEP}} \times MB_{\text{BMEP}}) / (BΠ_{\text{εορ. DMAEMA}} \times MB_{\text{DMAEMA}} + BΠ_{\text{εορ. BMEP}} \times MB_{\text{BMEP}})]$



**Σχήμα 3.14:** Χρωματογραφήματα GPC-SLS όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών DMAEMA-BMEP.

### 3.3.1.3 Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Μέσα

Όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του BMEP χαρακτηρίστηκαν σε 1% κ.μ. υδατικά διαλύματα ως προς τις υδροδυναμικές διαμέτρους (σε καθαρό και όξινο νερό), τις θερμοκρασίες νεφέλωσης (σε καθαρό νερό και υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με pH 8), τα φαινόμενα pK και τα pH καταβύθισης. Τα αποτελέσματα συζητούνται στις επόμενες αντίστοιχες παραγράφους.

#### 3.3.1.3.1 Υδροδυναμικές Διάμετροι

Τα αστεροειδή ομοπολυμερή DMAEMA-BMEP χαρακτηρίστηκαν σε καθαρό (pH~9.0-9.5) και όξινο νερό (pH~3) ως προς τις υδροδυναμικές διαμέτρους τους με τη βοήθεια DLS. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 3.6. Στον ίδιο Πίνακα δίνονται, επίσης, οι μέγιστες θεωρητικές υδροδυναμικές διαμέτροι. Συγκεκριμένα, η μέγιστη υδροδυναμική διάμετρος ενός αστεροειδούς ομοπολυμερούς ισοδυναμεί με το διπλάσιο του τοπογραφικού μήκους (contour length) της αλυσίδας ενός βραχίονα. Το τελευταίο υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη συνεισφορά μίας μονάδας μονομερούς στο τοπογραφικό μήκος που είναι ίσο με 0.254 nm επί το συνολικό αριθμό επαναλαμβανόμενων μονάδων σε κάθε βραχίονα.<sup>[249]</sup> Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μονάδων υπολογίστηκε σαν το άθροισμα των βινυλικών μονάδων του βραχίονα (ισοδυναμούν με το ΒΠ του) συν το διπλάσιο του αριθμού των μορίων του διασταυρωτή (αφού κάθε μόριο διασταυρωτή περιέχει δύο βινυλικές ομάδες).

Στα ιστογράμματα DLS, όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή παρουσίαζαν δύο ή περισσότερες κορυφές. Οι μικρότερες υδροδυναμικές διαμέτροι (<10 nm) αποδόθηκαν

στην παρουσία γραμμικού ομοπολυμερούς το οποίο δεν προχώρησε σε σχηματισμό αστεροειδούς πολυμερούς. Οι τιμές που ήταν κοντά στις θεωρητικά αναμενόμενες αποδόθηκαν στα αστεροειδή ομοπολυμερή, ενώ οι μεγάλες τιμές αποδόθηκαν σε συσσωματώματα αστεροειδών ομοπολυμερών. Στον Πίνακα αυτό, με έντονα μαύρα γράμματα παρουσιάζονται οι πιο πολυπληθείς κατανομές. Σε καθαρό νερό παρατηρήθηκε ότι μόνο για το DMAEMA<sub>50</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star η πιο πολυπληθής κορυφή οφειλόταν σε αστεροειδή ομοπολυμερή. Σε όξινο νερό η πιο πολυπληθής κορυφή για όλα τα αστεροειδή, εκτός από το DMAEMA<sub>15</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star, αποδόθηκε στα ίδια τα αστεροειδή ομοπολυμερή. Μάλιστα, σε όλες τις περιπτώσεις, οι υδροδυναμικές διάμετροι ήταν μικρότερες από τις αναμενόμενες (βασισμένες τόσο στους θεωρητικούς όσο και στους πειραματικούς ΒΠ) αφού οι τελευταίες αφορούσαν πλήρως εκτεταμένους βραχίονες. Για το DMAEMA<sub>15</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star τόσο σε καθαρό όσο και σε όξινο νερό οι πιο πολυπληθείς κορυφές αντιστοιχούσαν σε συσσωματώματα αστεροειδών ομοπολυμερών, όπως εξηγήθηκε προηγουμένως.

**Πίνακας 3.6:** Υδροδυναμικές διάμετροι σε καθαρό και όξινο νερό και μέγιστες θεωρητικές υδροδυναμικές διάμετροι όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMEP, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με DLS.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδών ομοπολυμερών <sup>1</sup>	Υδροδυναμικές διάμετροι (nm)			
		Καθαρό νερό	1 M NaCl 0.07 M HCl (pH ~ 3)	Μέγιστη θεωρητική	Μέγιστη θεωρητική βασισμένη στους ΒΠ από GPC-RI
1	D <sub>15</sub> -BP <sub>4</sub> -star	1.3, <b>31.6</b> , 316.2, 3162.3	13.5, <b>38.2</b>	11.7	7.6
2	D <sub>25</sub> -BP <sub>4</sub> -star	11.2, 72.5, <b>323.0</b>	<b>15.1</b> , 41.8, 46.9	16.8	15.2
3	D <sub>35</sub> -BP <sub>4</sub> -star	11.0, 70.8, <b>488.1</b>	<b>18.8</b> , 71.4, 93.2	21.8	34.0
4	D <sub>50</sub> -BP <sub>4</sub> -star	4.7, <b>13.7</b> , 48.1, 491.6	<b>26.0</b> , 173.0, 430.5, 526.0	29.5	88.4

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BP: BMEP.

### 3.3.1.3.2 Θερμοκρασίες Νεφέλωσης

Όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή χαρακτηρίστηκαν ως προς τις θερμοκρασίες νεφέλωσής τους σε καθαρό νερό (pH διάλυσης αστεροειδών ομοπολυμερών pH~9.0-9.5) και σε υδατικό διάλυμα με pH 8. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 3.7. Παρατηρήθηκε ότι οι θερμοκρασίες νεφέλωσης των αστεροειδών ομοπολυμερών στο pH διάλυσής τους αυξάνονταν από 18 μέχρι και 27 °C όσο αυξανόταν ο ΒΠ του βραχίονα τους. Αυτές οι θερμοκρασίες συμφωνούν με αυτές σε προηγούμενες μελέτες βασισμένες σε αστεροειδή ομοπολυμερή.<sup>[250(a)]</sup> Σε pH 8, οι θερμοκρασίες νεφέλωσης αυξάνονταν από 48 μέχρι και 58 °C όσο αυξανόταν ο ΒΠ του βραχίονα. Στο pH διάλυσης, οι θερμοκρασίες νεφέλωσης των αστεροειδών ομοπολυμερών ήταν σχετικά χαμηλές, γεγονός που αποδόθηκε στο ότι οι

μονάδες του μονομερούς DMAEMA γίνονται υδρόφοβες για θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 35 °C. Οι θερμοκρασίες νεφέλωσης των αστεροειδών ομοπολυμερών σε υδατικό διάλυμα με pH 8 ήταν κατά περίπου 30 °C υψηλότερες από τις αντίστοιχες σε καθαρό νερό, γεγονός που αποδόθηκε στο μερικό ιονισμό των μονάδων του DMAEMA και του BMEP (στο pH αυτό) σε σχέση με την αφόρτιστη κατάσταση σε καθαρό νερό. Παρατηρήθηκε, τόσο στο καθαρό νερό όσο και στο υδατικό διάλυμα, ότι καθώς αυξανόταν το μήκος του βραχίονα των αστεροειδών αυξανόταν και οι θερμοκρασίες νεφέλωσης τους, γεγονός που αποδόθηκε στην αύξηση της στερεοχημικής σταθεροποίησης των αστεροειδών ομοπολυμερών από τους μακρύτερους βραχίονες.

**Πίνακας 3.7:** Θερμοκρασίες νεφέλωσης σε καθαρό νερό και σε υδατικό διάλυμα με pH 8 όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMEP, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με νεφελομετρία.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδών ομοπολυμερών <sup>1</sup>	Θερμοκρασίες νεφέλωσης (°C)	
		Καθαρό νερό (pH~9.0-9.5)	Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS (50 mM) με pH 8
1	D <sub>15</sub> -BP <sub>4</sub> -star	18.3	48.8
2	D <sub>25</sub> -BP <sub>4</sub> -star	24.0	53.9
3	D <sub>35</sub> -BP <sub>4</sub> -star	25.0	56.0
4	D <sub>50</sub> -BP <sub>4</sub> -star	27.1	57.8

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BP: BMEP.

### 3.3.1.3.3 Φαινόμενα pK και pH Καταβύθισης

Τα φαινόμενα pK όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών υπολογίστηκαν ως το pH που αντιστοιχεί όταν το 50% των μονάδων του DMAEMA συν του BMEP είναι ιονισμένες. Οι τιμές pK, καθώς και τα pH καταβύθισης των αστεροειδών ομοπολυμερών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8. Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές pK των αστεροειδών ομοπολυμερών αυξάνονται από 7.0 μέχρι και 7.4, καθώς αυξανόταν το μήκος του βραχίονα. Το τελευταίο συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες.<sup>[250(a)]</sup> Τα pH καταβύθισης επίσης αυξάνονται με το μήκος του βραχίονα από 8.5 μέχρι και 9.7, κάτι που μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της στερεοχημικής σταθεροποίησης των αστεροειδών ομοπολυμερών.

**Πίνακας 3.8:** Φαινόμενες τιμές pK και pH καταβύθισης όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMEP, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις υδρογονοϊόντων.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδών ομοπολυμερών <sup>1</sup>	pK	pH καταβύθισης
1	D <sub>15</sub> -BP <sub>4</sub> -star	7.0	8.5
2	D <sub>25</sub> -BP <sub>4</sub> -star	7.1	8.7
3	D <sub>35</sub> -BP <sub>4</sub> -star	7.3	9.0
4	D <sub>50</sub> -BP <sub>4</sub> -star	7.4	9.7

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BP: BMEP.

### 3.3.1.4 Εφαρμογή στη Μεταφορά siRNA σε Κύτταρα Θηλαστικών

Όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του BMEP αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να μεταφέρουν siRNA σε κύτταρα μυοβλαστών (C2C12) και να καταστέλλουν την έκφραση ενδογενούς EGFP. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης βασίστηκε σε τρεις δείκτες: την *καταστολή της έκφρασης της EGFP* (ή *EGFP suppression*), τη *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και την *τοξικότητα* (ή *toxicity*). Αυτοί οι τρεις δείκτες μελετήθηκαν ως προς την ποσότητα του πολυμερούς (polymer amount) υπό σταθερή ποσότητα siRNA (0.665 μg, 50 pmol). Για σκοπούς σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο επιμόλυνσης Lipofectamine.

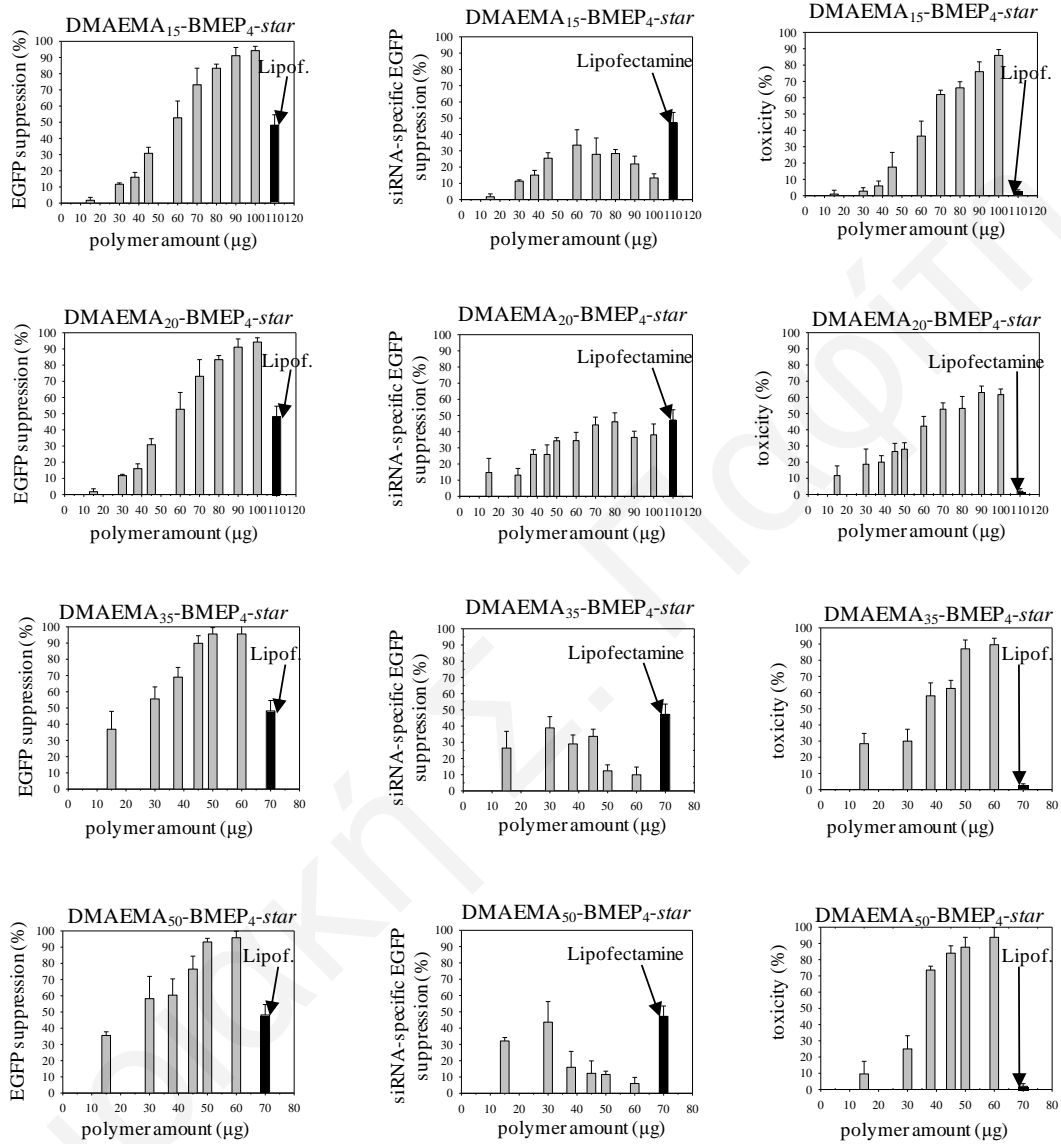
Στο Σχήμα 3.15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα επιμόλυνσης. Συγκεκριμένα, οι γραφικές παριστάνουν τους δείκτες της *καταστολής της έκφρασης της EGFP*, της *συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης* και της *τοξικότητας* σε σχέση με την ποσότητα του πολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε. Συγκεκριμένα, η ποσότητα των αστεροειδών ομοπολυμερών μεταβαλλόταν από 15 σε 100 μg για τα DMAEMA<sub>15</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star και DMAEMA<sub>20</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star, και από 15 σε 60 μg για τα DMAEMA<sub>35</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star και DMAEMA<sub>50</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star. Για τα τελευταία αστεροειδή ομοπολυμερή χρησιμοποιήθηκαν μικρότερες ποσότητες πολυμερούς λόγω της αυξημένης τοξικότητάς τους σε μεγαλύτερες ποσότητες.

Από τα γραφήματα στο Σχήμα 3.15 φαίνεται ότι η *καταστολή της έκφρασης της EGFP* (Σχήμα 3.15, αριστερή στήλη γραφημάτων) και η *τοξικότητα* (Σχήμα 3.15, δεξιά στήλη γραφημάτων) αυξανόταν μονοτονικά με αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς ομοπολυμερούς. Η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* (Σχήμα 3.15, μεσαία στήλη γραφημάτων), στην οποία συνυπολογίζεται η επίδραση της τοξικότητας των αστεροειδών ομοπολυμερών, παρουσίαζε, σε όλες τις περιπτώσεις, μέγιστη τιμή σε σχέση με τη ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς λόγω της μεγάλης αύξησης της τοξικότητας μαζί με την ποσότητα του πολυμερούς. Σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή για το μέγιστο ήταν συγκρίσιμη, στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος, με την αντίστοιχη του εμπορικά διαθέσιμου αντιδραστηρίου Lipofectamine (Σχήμα 3.15).

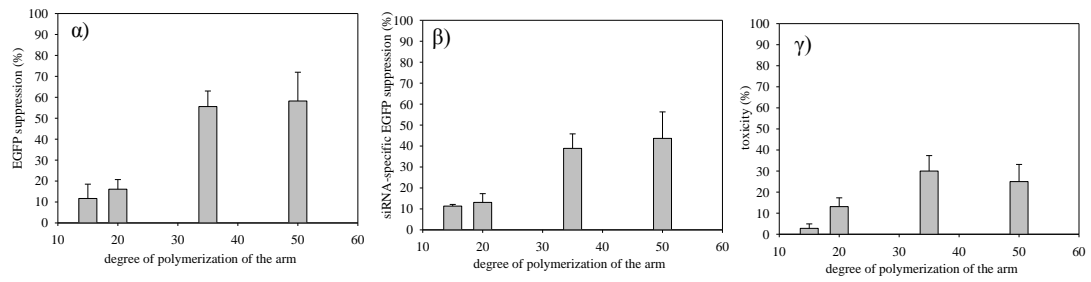
Στο Σχήμα 3.16 παρουσιάζεται η εξάρτηση της *καταστολής της έκφρασης της EGFP*, της *συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης* και της *τοξικότητας* για τα 30 μg αστεροειδούς ομοπολυμερούς (μαζί με 0.665 μg siRNA) από το ΒΠ του βραχίονα για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή. Παρατηρήθηκε ότι και οι τρεις αυτοί δείκτες αυξάνονταν με την αύξηση του ΒΠ του βραχίονα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το απόλυτο MB για τα



αστεροειδή ομοπολυμερή με ΒΠ βραχίονα 20, 35 και 50 αυξανόταν μονοτονικά με αύξηση του ΒΠ του βραχίονα, ο άξονας των  $x$  των γραφημάτων αυτών αντιστοιχεί στην αύξηση του συνολικού ΜΒ. Έτσι, οι τρεις αυτοί δείκτες αυξάνονταν με αύξηση του ΜΒ του αστεροειδούς ομοπολυμερούς.



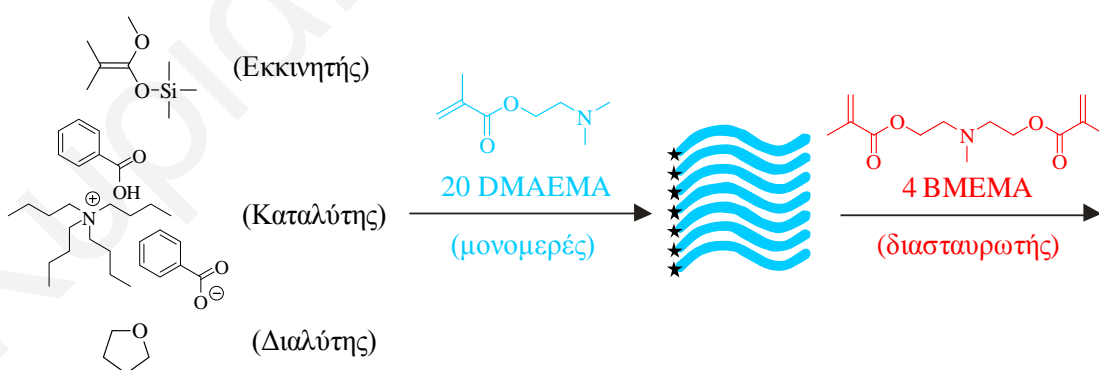
**Σχήμα 3.15:** Εξάρτηση της καταστολής της έκφρασης της EGFP (ή EGFP suppression), της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης (ή siRNA-specific EGFP suppression) και της τοξικότητας (ή toxicity) από την ποσότητα του πολυμερούς (polymer amount) υπό σταθερή ποσότητα siRNA (0.665 μg, 50 pmol) για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή BMEP.



**Σχήμα 3.16:** Εξάρτηση (α) της καταστολής της έκφρασης της EGFP (ή *EGFP suppression*) (β) της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και (γ) της τοξικότητας (ή *toxicity*) από το βαθμό πολυμερισμού του βραχίονα (ή *degree of polymerization of the arm*) των αστεροειδών ομοπολυμερών του BMEP για τα 30 μg αστεροειδούς ομοπολυμερούς και 0.665 μg (50 pmol) siRNA.

### 3.3.2 Αστεροειδή Ομοπολυμερή του DMAEMA Βασισμένα στο Διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ

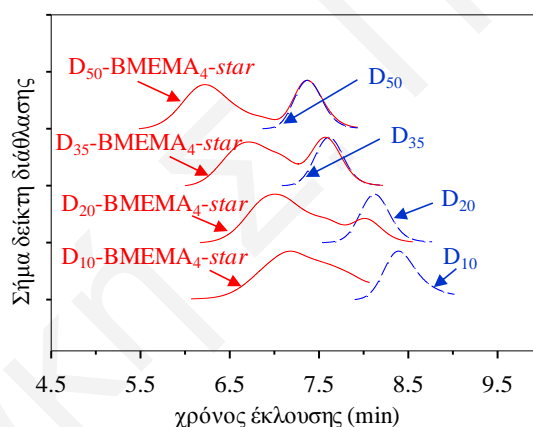
Η δεύτερη σειρά υδρόφιλων, κατιοντικών, αστεροειδών ομοπολυμερών του DMAEMA που συντέθηκε στην παρούσα Διατριβή ήταν βασισμένη στον νέο, υδρόφιλο και θετικά ιονιζόμενο διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν, με τη χρήση της μεθόδου πολυμερισμού GTP, τέσσερα αστεροειδή ομοπολυμερή βασισμένα στο υδρόφιλο και θετικά ιονιζόμενο μονομερές του DMAEMA με ΒΠ βραχιόνων 10, 20, 35, και 50. Για όλους τους πολυμερισμούς χρησιμοποιήθηκαν το TBABB σαν καταλύτης, το MTS σαν εκκινητής και το THF σαν διαλύτης. Το Σχήμα 3.17 παρουσιάζει την συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star. Στο Σχήμα, με μπλε ανοιχτό αναπαριστάνονται οι μονάδες του DMAEMA, ενώ με βαθύ κόκκινο παρουσιάζεται ο πυρήνας του ΒΜΕΜΑ. Οι αστερίσκοι στα άκρα των αλυσίδων των γραμμικών προπομπών και του πυρήνα δηλώνουν τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού. Αναλυτικότερα, η σύνθεση των αστεροειδών ομοπολυμερών πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια (Σχήμα 3.17). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των γραμμικών προπομπών (βραχίονες αστεροειδών ομοπολυμερών) από τον πολυμερισμό του μονομερούς DMAEMA στην παρουσία του μονοδραστικού εκκινητή MTS, ενώ, κατά το δεύτερο στάδιο, στην ίδια φιάλη πολυμερισμού, οι βραχίονες διασυνδέθηκαν στο ένα άκρο μέσα από τον πολυμερισμό του ΒΜΕΜΑ ο οποίος οδήγησε στο σχηματισμό “arm-first” αστεροειδών ομοπολυμερών. Η γραμμομοριακή αναλογία διασταυρωτή ως προς εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή ήταν ίση με 4 : 1.



**Σχήμα 3.17:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-BMEP<sub>4</sub>-star.

### 3.3.2.1 Μοριακά Βάρη και Σύσταση

Η επιτυχής σύνθεση των αστεροειδών ομοπολυμερών επιβεβαιώθηκε με τη χρήση GPC-RI. Τα χρωματογραφήματα GPC-RI όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.18. Τα χρωματογραφήματα των αστεροειδών ομοπολυμερών, όπως φαίνονται στο Σχήμα, μετατοπίστηκαν σε μικρότερους χρόνους έκλυσης σε σύγκριση με αυτά των γραμμικών προπομπών τους, καταδεικνύοντας, έτσι τη διασύνδεση των γραμμικών προπομπών μέσω των μορίων του διασταυρωτή προς το σχηματισμό μεγαλύτερων πολυμερικών μορίων. Με εξαίρεση το αστεροειδές DMAEMA<sub>10</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star, όλα τα χρωματογραφήματα GPC-RI παρουσίαζαν δύο κορυφές, μία οφειλόμενη στο αστεροειδές ομοπολυμερές και μία άλλη στο μικρό ποσοστό του μη-ενσωματωθέντος γραμμικού ομοπολυμερούς. Μη πλήρης ενσωμάτωση των γραμμικών ομοπολυμερών στα αστεροειδή αποδόθηκε στο αυξημένο ιξώδες του διαλύματος, στη μειωμένη κινητικότητα των αλυσίδων και στην πιθανή απενεργοποίηση των ενεργών κέντρων του πολυμερισμού.



**Σχήμα 3.18:** Χρωματογραφήματα GPC-RI των αστεροειδών ομοπολυμερών και των γραμμικών προπομπών τους για τη σειρά αστεροειδών με διασταυρωτή BMEMA.

Οι τιμές των  $M_n$ ,  $M_p$  και  $\Delta\Pi$  των αστεροειδών ομοπολυμερών και των γραμμικών προπομπών τους, καθώς επίσης και οι ΒΠ των βραχιόνων τους όπως υπολογίστηκαν με GPC-RI και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.9. Παρατηρήθηκε ότι τα MB των γραμμικών προπομπών ήταν, σε όλες τις περιπτώσεις, μεγαλύτερα από τα θεωρητικά αναμενόμενα, γεγονός που αποδόθηκε σε μερική απενεργοποίηση του εκκινητή. Οι  $\Delta\Pi$  των αστεροειδών πολυμερών ήταν σχετικά χαμηλοί, με εξαίρεση το μικρότερο αστεροειδές ομοπολυμερές το οποίο λόγω της εκτενούς διασύνδεσης των πυρήνων του παρουσίαζε υψηλότερους  $\Delta\Pi$ . Τέλος, οι ΒΠ των βραχιόνων που προσδιορίστηκαν με GPC-RI και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR βρίσκονταν σε σχετικά καλή συμφωνία μεταξύ τους.

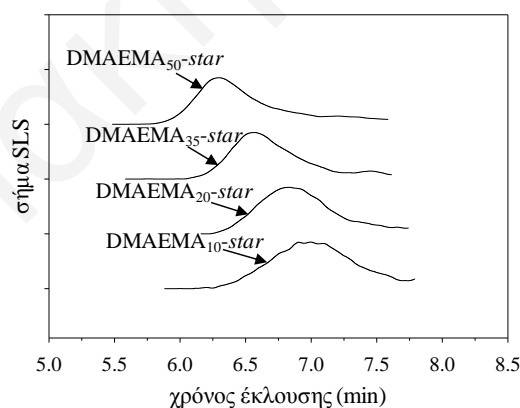
**Πίνακας 3.9:** Μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και ΒΠ βραχιόνων για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .

Α/Α	Θεωρητική δομή πολυμερών <sup>1</sup>	Θεωρ. ΜΒ	Αποτελέσματα GPC-RI				Αποτελέσματα $^1\text{H-NMR}$
			$M_p$	$M_n$	$\Delta\Pi$	ΒΠ D	ΒΠ D
1	D <sub>10</sub>	1670	2820	1770	1.35	11	19
	D <sub>10</sub> -BM <sub>4</sub> -star	-----	26100	15200	1.69	-----	17
2	D <sub>20</sub>	3240	4710	4090	1.14	25	37.5
	D <sub>20</sub> -BM <sub>4</sub> -star	-----	34100	23800	1.47	-----	30
			4880	4270	1.04		
3	D <sub>35</sub>	5600	12800	10900	1.14	69	75
	D <sub>35</sub> -BM <sub>4</sub> -star	-----	72100	57400	1.29	-----	75
			13500	11600	1.06		
4	D <sub>50</sub>	7960	16300	13200	1.18	83	-----
	D <sub>50</sub> -BM <sub>4</sub> -star	-----	157000	112000	1.41	-----	-----
			17100	12700	1.07		

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BM: ΒΜΕΜΑ.

### 3.3.2.2 Απόλυτα Μοριακά Βάρη και Αριθμός Βραχιόνων

Όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή χαρακτηρίστηκαν ως προς τα απόλυτα  $M_w$  σε THF με χρήση GPC-SLS. Τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.19. Στο Σχήμα αυτό φαίνονται μόνο τα χρωματογραφήματα των αστεροειδών ομοπολυμερών και όχι του μη ενσωματωμένου γραμμικού προπομπού λόγω της ασθενέστερης σκέδασης των τελευταίων (αρκετά μικρότερα μόρια) σε σύγκριση με τα αστεροειδή ομοπολυμερή. Τα απόλυτα  $M_w$  και ο αριθμός των βραχιόνων δίνονται στον Πίνακα 3.10.



**Σχήμα 3.19:** Χρωματογραφήματα GPC-SLS όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ.

Οι τιμές των απόλυτων  $M_w$  βρέθηκαν να αυξάνονται μονοτονικά με αύξηση του ΒΠ του βραχίονα από 51 000 μέχρι και 269 000  $\text{g mol}^{-1}$ , ενώ ο αριθμός των βραχιόνων βρέθηκε να κυμαίνεται από 7 μέχρι και 19.

**Πίνακας 3.10:** Απόλυτα μοριακά βάρη και αριθμός βραχιόνων όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του ΒΜΕΜΑ, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με SLS.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδών <sup>1</sup>	$M_w$ αστεροειδών με SLS	Κλάσμα μάζας πυρήνα <sup>2</sup>	$M_w$ πυρήνα	$M_w^{\text{αστερ.}} - M_w^{\text{πυρήνα}}$	$M_n$ βραχίονα με GPC-RI	Αριθμός βραχιόνων
1	D <sub>10</sub> -BM <sub>4</sub> -star	51300	0.34	17400	33900	1770	19.2
2	D <sub>20</sub> -BM <sub>4</sub> -star	60600	0.20	12100	48500	4090	11.9
3	D <sub>35</sub> -BM <sub>4</sub> -star	87700	0.13	11400	76300	10900	7.0
4	D <sub>50</sub> -BM <sub>4</sub> -star	269000	0.09	24200	244800	13200	18.5

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BM: ΒΜΕΜΑ.

<sup>2</sup> $(\text{BΠ}_{\text{θεορ.ΒΜΕΜΑ}} \times \text{MB}_{\text{ΒΜΕΜΑ}}) / (\text{BΠ}_{\text{θεορ.ΒΜΕΜΑ}} \times \text{MB}_{\text{ΒΜΕΜΑ}} + \text{BΠ}_{\text{θεορ.ΒΜΕΜΑ}} \times \text{MB}_{\text{DMAEMA}})$

### 3.3.2.3 Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Μέσα

Όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του ΒΜΕΜΑ χαρακτηρίστηκαν σε 1% κ.μ. υδατικά διαλύματα ως προς τις υδροδυναμικές τους διαμέτρους (σε καθαρό και όξινο νερό), τις θερμοκρασίες νεφέλωσης (σε καθαρό νερό και υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με pH 8), τα φαινόμενα pK και τα pH καταβύθισης. Τα αποτελέσματα συζητούνται στις επόμενες αντίστοιχες παραγράφους.

#### 3.3.2.3.1 Υδροδυναμικές Διάμετροι

Οι πειραματικά προσδιορισθείσες υδροδυναμικές διαμέτροι των αστεροειδών ομοπολυμερών τόσο σε καθαρό νερό (pH ~ 9.4) όσο και σε υδατικό διάλυμα το οποίο περιείχε 0.07 M HCl και 1 M NaCl σε pH 3 δίνονται στον Πίνακα 3.11. Στον ίδιο Πίνακα δίνονται, επίσης, οι μέγιστες θεωρητικές υδροδυναμικές διαμέτροι οι οποίες υπολογίστηκαν θεωρώντας ότι οι βραχίονες βρίσκονται σε πλήρως εκτεταμένη μορφή. Από τις κατανομές DLS (Πίνακας 3.11) παρατηρήθηκε ότι όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή παρουσίαζαν 2 - 4 κορυφές, με τη μικρότερου μεγέθους κορυφή να αντιστοιχεί στους μη-ενσωματωμένους γραμμικούς προπομπούς, και τις άλλες σε αστεροειδή ομοπολυμερή και συσσωματώματα αστεροειδών ομοπολυμερών. Στον Πίνακα 3.11 με μαύρα έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι κορυφές με το μεγαλύτερο πληθυσμό. Σε καθαρό νερό φάνηκε ότι η πιο πολυπληθής υδροδυναμική διάμετρος των DMAEMA<sub>10</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star και DMAEMA<sub>20</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star αντιστοιχούσε σε συσσωματώματα αστεροειδών ομοπολυμερών, ενώ αυτή των άλλων δύο αστεροειδών, DMAEMA<sub>35</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star και DMAEMA<sub>50</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star, αντιστοιχούσε στα ίδια τα αστεροειδή ομοπολυμερή. Στο όξινο (pH 3) υδατικό διάλυμα το οποίο περιείχε 1 M άλατος NaCl, σε όλες τις περιπτώσεις, οι πιο πολυπληθείς κατανομές αντιστοιχούσαν σε αστεροειδή ομοπολυμερή. Με εξαίρεση το DMAEMA<sub>10</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star, οι πειραματικές υδροδυναμικές διαμέτροι που αντιστοιχούσαν στα αστεροειδή ομοπολυμερή ήταν

μικρότερες από τις θεωρητικά αναμενόμενες αφού οι τελευταίες υπολογίστηκαν θεωρώντας τους βραχίονες των αστεροειδών πλήρως εκτεταμένους. Η μεγαλύτερη από τη θεωρητικά αναμενόμενη υδροδυναμική διάμετρος του DMAEMA<sub>10</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star στο όξινο υδατικό διάλυμα αποδόθηκε σε περαιτέρω ομοιοπολικές διασυνδέσεις των αστεροειδών μεταξύ τους κατά τη διάρκεια της σύνθεσης οι οποίες ευνοούνταν από το μικρό μήκος των βραχιόνων (μικρότερες στερεοχημικές παρεμποδίσεις).

**Πίνακας 3.11:** Υδροδυναμικές διαμέτροι σε καθαρό και όξινο νερό, καθώς και οι μέγιστες θεωρητικές υδροδυναμικές διαμέτροι όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMEMA, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με DLS.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδών ομοπολυμερών <sup>1</sup>	Υδροδυναμικές διαμέτροι (nm)			Μέγιστη θεωρητική βασισμένη στους ΒΠ με GPC
		Καθαρό νερό (pH=9.4)	0.07 M HCl 1 M NaCl (pH=3)	Μέγιστη θεωρητική	
1	D <sub>10</sub> -BM <sub>4</sub> -star	9.0, <b>32.1</b> , 141.0, 944.0	<b>12.8</b> , 278.0	9.1	9.7
2	D <sub>20</sub> -BM <sub>4</sub> -star	133.8, <b>479.7</b>	<b>14.7</b> , 378.5, 453.4	14.2	16.8
3	D <sub>35</sub> -BM <sub>4</sub> -star	8.2, <b>21.1</b>	<b>21.5</b> , 346.0	21.8	39.1
4	D <sub>50</sub> -BM <sub>4</sub> -star	11.2, <b>26.5</b>	<b>5.5</b> , <b>26.2</b> , 108.8	29.5	46.2

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BM: BMEMA.

### 3.3.2.3.2 Θερμοκρασίες Νεφέλωσης

Οι θερμοκρασίες νεφέλωσης των αστεροειδών ομοπολυμερών σε καθαρό νερό (pH διάλυσης των αστεροειδών 8.5-9.5) και σε υδατικό διάλυμα με pH 8 δίνονται στον Πίνακα 3.12. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι, για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή, οι θερμοκρασίες νεφέλωσης αυξάνονταν μονοτονικά με την αύξηση του ΒΠ του βραχίονα λόγω της καλύτερης στερεοχημικής σταθεροποίησης των αστεροειδών ομοπολυμερών από τους μεγαλύτερους βραχίονες.<sup>[251]</sup> Συγκεκριμένα, σε καθαρό νερό οι θερμοκρασίες νεφέλωσης αυξάνονταν από τους 23.1 μέχρι τους 29.3 °C καθώς ο ΒΠ των βραχιόνων αυξανόταν από 10 σε 50, όπως αναμενόταν για πολυμερή βασισμένα στο μονομερές του DMAEMA,<sup>[250(a)]</sup> ενώ σε υδατικό διάλυμα με pH 8 αυξάνονταν από τους 43.5 στους 56.0 °C με αύξηση του ΒΠ του βραχίονα. Στο υδατικό διάλυμα με pH 8 (ρυθμιστικό διάλυμα TRIS 50 mM), οι θερμοκρασίες νεφέλωσης ήταν κατά σχεδόν 30 °C μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες σε καθαρό νερό, γεγονός που οφειλόταν στο μερικό ιονισμό των μονάδων του DMAEMA και του BMEMA στο pH αυτό, σε αντίθεση με την αφόρτιστη κατάσταση σε καθαρό νερό.

**Πίνακας 3.12:** Θερμοκρασίες νεφέλωσης σε καθαρό νερό και υδατικό διάλυμα σε pH 8 όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με νεφελομετρία.

Α/Α	Θεωρητική δομή αστεροειδών ομοπολυμερών <sup>1</sup>	Θερμοκρασίες νεφέλωσης (°C)	
		pH διάλυσης	Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS (50 mM), pH 8
1	D <sub>10</sub> -BM <sub>4</sub> -star	23.1	43.5
2	D <sub>20</sub> -BM <sub>4</sub> -star	23.5	50.0
3	D <sub>35</sub> -BM <sub>4</sub> -star	27.5	55.5
4	D <sub>50</sub> -BM <sub>4</sub> -star	29.3	56.0

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BM: ΒΜΕΜΑ.

#### 3.3.2.3.4 Φαινόμενα pK και pH καταβύθισης

Τα φαινόμενα pK όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του ΒΜΕΜΑ υπολογίστηκαν ως το pH που αντιστοιχεί όταν το 50% των μονάδων του DMAEMA συν του ΒΜΕΜΑ είναι ιονισμένες. Οι τιμές pK των αστεροειδών ομοπολυμερών, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.13, παρατηρήθηκε ότι αυξάνονταν από 6.9 σε 7.3 με αύξηση του ΒΠ του βραχίονα. Αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες σε γραμμικά<sup>[252]</sup> και αστεροειδή<sup>[250(a)]</sup> ομοπολυμερή του DMAEMA.

Κατά τις τιτλοδοτήσεις καταγράφηκε το pH στο οποίο τα αστεροειδή ομοπολυμερή καταβυθίζονταν (Πίνακας 3.13). Από τον Πίνακα φαίνεται ότι τα pH καταβύθισης αυξάνονταν ελαφρώς με αύξηση του ΒΠ του βραχίονα, λόγω και πάλι της αύξησης της στερεοχημικής σταθεροποίησης από τους μακρύτερους βραχίονες.<sup>[251]</sup>

**Πίνακας 3.13:** Τιμές pK και pH καταβύθισης όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή ΒΜΕΜΑ, όπως προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις υδρογονοϊόντων.

Α/Α	Θεωρητική δομή αστεροειδών ομοπολυμερών <sup>1</sup>	pK	pH καταβύθισης
1	D <sub>10</sub> -BM <sub>4</sub> -star	6.9	9.2
2	D <sub>20</sub> -BM <sub>4</sub> -star	7.1	9.4
3	D <sub>35</sub> -BM <sub>4</sub> -star	7.3	9.8
4	D <sub>50</sub> -BM <sub>4</sub> -star	7.3	9.4

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BM: ΒΜΕΜΑ.

#### 3.3.2.4 Εφαρμογή στη Μεταφορά siRNA σε Κύτταρα Θηλαστικών

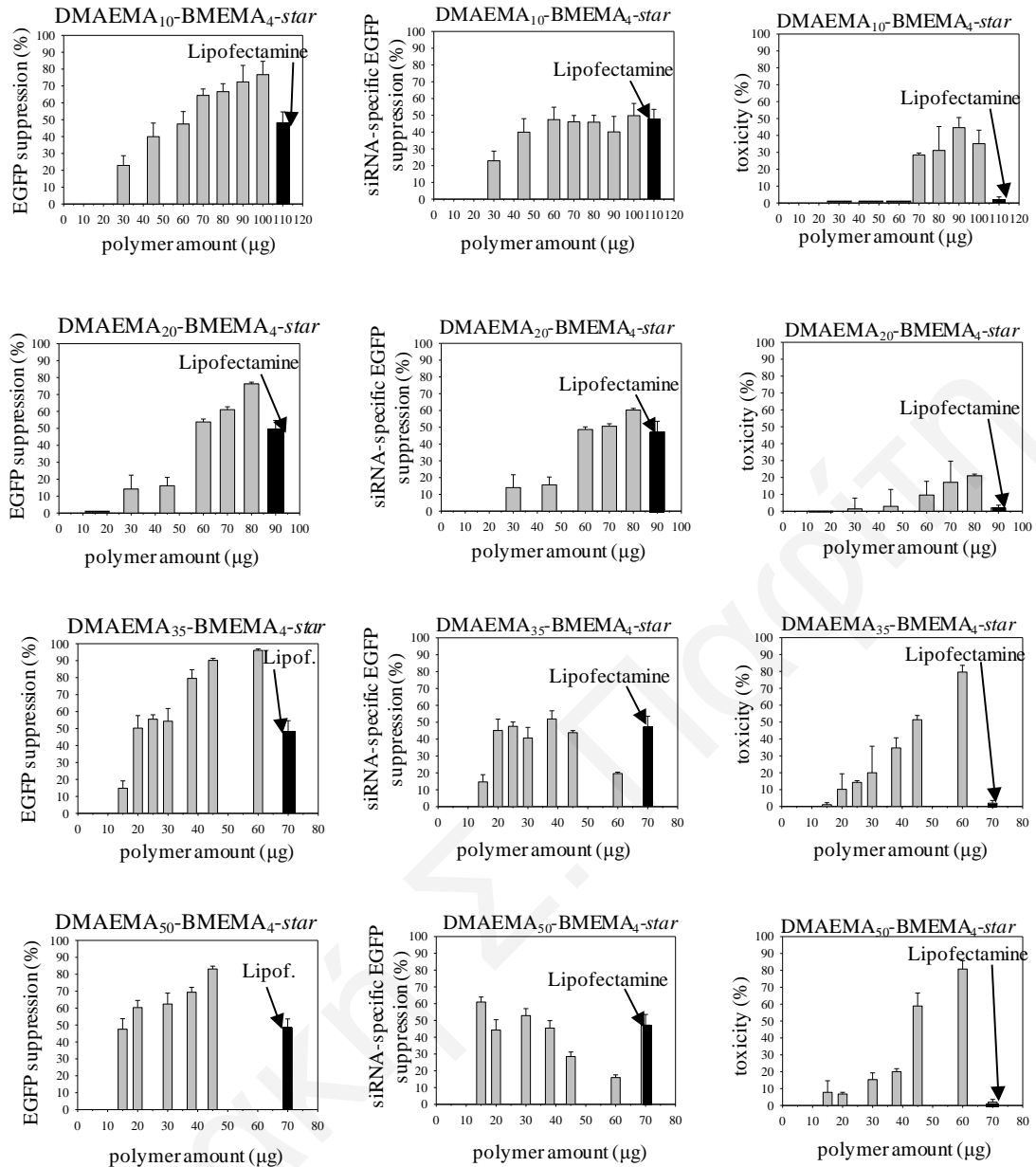
Μετά από το χαρακτηρισμό τους σε οργανικά και υδατικά μέσα, όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του ΒΜΕΜΑ αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να μεταφέρουν siRNA σε κύτταρα μυοβλαστών (C2C12) τα οποία εξέφραζαν σταθερά το γονίδιο της πρωτεΐνης EGFP. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης βασίστηκε σε τρεις δείκτες: την καταστολή της έκφρασης της EGFP (ή EGFP suppression), τη συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης (ή siRNA-specific EGFP suppression) και την τοξικότητα



(ή *toxicity*). Αυτοί οι τρεις δείκτες μελετήθηκαν ως προς την ποσότητα του πολυμερούς (polymer amount) υπό σταθερή ποσότητα siRNA (1  $\mu$ L, 0.665  $\mu$ g). Για σκοπούς σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο επιμόλυνσης Lipofectamine.

Στο Σχήμα 3.20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα επιμόλυνσης. Συγκεκριμένα, οι γραφικές παριστάνουν τους δείκτες της *καταστολής της έκφρασης της EGFP*, της *συνολικής καταστολής της EGFP* και της *τοξικότητας* σε συνάρτηση με την ποσότητα του πολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε κατά την επιμόλυνση. Συγκεκριμένα, η ποσότητα των αστεροειδών ομοπολυμερών μεταβαλλόταν από 30 σε 100  $\mu$ g για το αστεροειδές DMAEMA<sub>10</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star και από 15 σε 80  $\mu$ g για το αστεροειδές DMAEMA<sub>20</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star. Για τα DMAEMA<sub>35</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star και DMAEMA<sub>50</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star, η ποσότητα του πολυμερούς μεταβαλλόταν μόνο μεταξύ 15 και 60  $\mu$ g λόγω της αυξημένης τοξικότητας των αστεροειδών αυτών πολυμερών σε μεγαλύτερες ποσότητες.

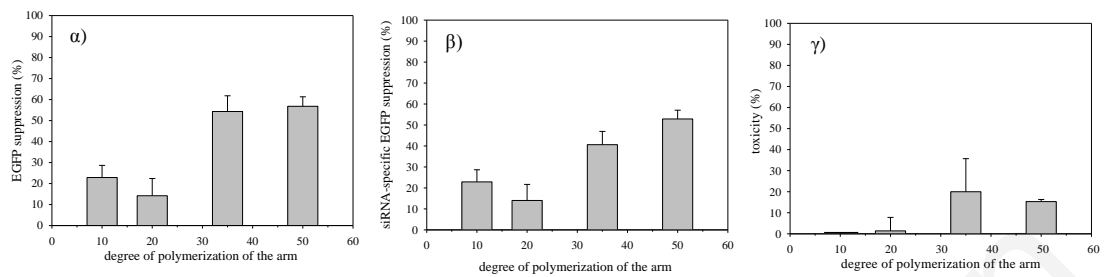
Για όλα τα αστεροειδή πολυμερή παρατηρήθηκε ότι η *καταστολή της έκφρασης της EGFP* (Σχήμα 3.20, αριστερή στήλη γραφημάτων) και η *τοξικότητα* (Σχήμα 3.20, δεξιά στήλη γραφημάτων) αυξάνονταν με αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς ομοπολυμερούς. Η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* (Σχήμα 3.20, μεσαία στήλη γραφημάτων), στην οποία συνυπολογίστηκε η επίδραση της τοξικότητας των αστεροειδών ομοπολυμερών, παρουσίαζε, με αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς ομοπολυμερούς, μικρή αύξηση για τα αστεροειδή ομοπολυμερή με ΒΠ βραχίονα 10 και 20, ενώ για το DMAEMA<sub>35</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star παρουσίαζε μία εμφανή αύξηση. Για το αστεροειδές DMAEMA<sub>50</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star, η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* ελαττωνόταν με αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς λόγω της μεγάλης τοξικότητάς του. Από αυτά τα πειράματα επιμόλυνσης παρατηρήθηκε, επίσης, ότι η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών, ήταν συγκρίσιμη με αυτή του εμπορικά διαθέσιμου αντιδραστηρίου Lipofectamine (Σχήμα 3.20).



**Σχήμα 3.20:** Εξάρτηση της καταστολής της έκφρασης της *EGFP* (ή *EGFP suppression*), της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και της τοξικότητας (ή *toxicity*) από την ποσότητα του πολυμερούς (*polymer amount*) υπό σταθερή ποσότητα *siRNA* (0.665 μg, 50 pmol) για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή *BMEMA*.

Επίσης, μελετήθηκε η εξάρτηση από το ΒΠ του βραχίονα. Το Σχήμα 3.21 παρουσιάζει την εξάρτηση της καταστολής της έκφρασης της *EGFP*, της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης, και της τοξικότητας για τα 30 μg αστεροειδούς ομοπολυμερούς (μαζί με 0.665 μg *siRNA*) από το ΒΠ του βραχίονα για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του *BMEMA*. Παρατηρήθηκε ότι και οι τρεις αυτοί δείκτες αυξάνονταν ελαφριά με την αύξηση του ΒΠ του βραχίονα. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το απόλυτο *MB* των αστεροειδών ομοπολυμερών αυξανόταν μονοτονικά με αύξηση του ΒΠ του βραχίονα, ο

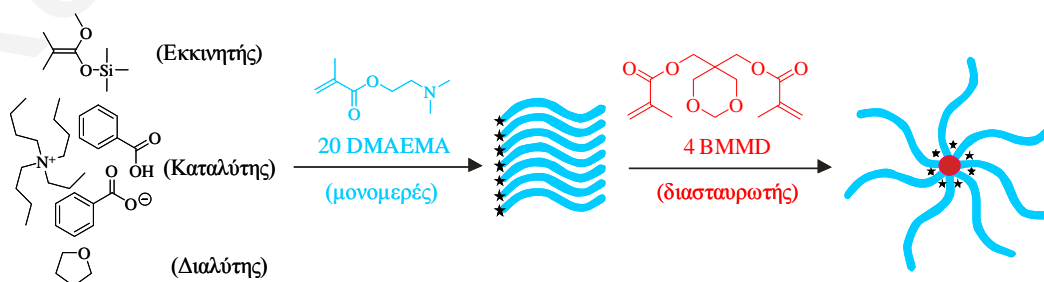
άξονας των  $x$  των γραφημάτων αυτών αντιστοιχεί στην αύξηση του MB. Έτσι, τα γραφήματα στο Σχήμα 3.21 παρουσιάζουν, ταυτόχρονα, και τη μικρή εξάρτηση αυτών των τριών δεικτών από το MB.



**Σχήμα 3.21:** Εξάρτηση (α) της καταστολής της έκφρασης της EGFP (ή *EGFP suppression*) (β) της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και (γ) της τοξικότητας (ή *toxicity*) από το βαθμό πολυμερισμού του βραχίονα (ή *degree of polymerization of the arm*) των αστεροειδών ομοπολυμερών του BMEMA για τα 30  $\mu\text{g}$  αστεροειδούς ομοπολυμερούς και 0.665  $\mu\text{g}$  (50 pmol) siRNA.

### 3.3.3 Αστεροειδή Ομοπολυμερή του DMAEMA Βασισμένα στο Διασταυρωτή BMMD

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή επιτεύχθηκε η σύνθεση δύο αστεροειδών ομοπολυμερών βασισμένων στον υδρόφοβο και υδρολύσιμο διασταυρωτή BMMD με ΒΠ βραχιόνων 10 και 20. Η σύνθεσή τους πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου πολυμερισμού GTP. Για τους πολυμερισμούς, σαν μονομερές χρησιμοποιήθηκε το υδρόφιλο και θετικά ιονιζόμενο DMAEMA, σαν εκκινητής το MTS, σαν καταλύτης το TBABB και σαν διαλυτής το THF. Το Σχήμα 3.22 παρουσιάζει τη συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star. Στο Σχήμα, με μπλε ανοιχτό αναπαριστούνται οι μονάδες του DMAEMA, ενώ με βαθύ κόκκινο υποδεικνύεται ο πυρήνας του BMMD. Οι αστερίσκοι στα άκρα των αλυσίδων των γραμμικών προπομπών και του πυρήνα δηλώνουν τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού. Αναλυτικότερα, η σύνθεση των αστεροειδών ομοπολυμερών πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια (Σχήμα 3.22). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των γραμμικών προπομπών (βραχίονες αστεροειδών πολυμερών) από τον πολυμερισμό του μονομερούς DMAEMA στην παρουσία του μονοδραστικού εκκινητή MTS, ενώ, κατά το δεύτερο στάδιο, στην ίδια φιάλη πολυμερισμού, οι βραχίονες διασυνδέθηκαν στο ένα άκρο μέσα από τον πολυμερισμό του BMMD ο οποίος οδήγησε στο σχηματισμό “arm-first” αστεροειδών ομοπολυμερών. Η γραμμομοριακή αναλογία διασταυρωτή προς εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε ήταν ίση με 4 : 1. Να σημειωθεί εδώ ότι έγινε προσπάθεια για σύνθεση και μεγαλύτερων αστεροειδών ομοπολυμερών με ΒΠ βραχίονα 35 και 50. Δυστυχώς, όμως, δεν ήταν εφικτή η σύνθεσή τους αφού σε καμία περίπτωση δεν σχηματίστηκε αστεροειδές πολυμερές. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό αυξήσαμε τη συνολική συγκέντρωση των στερεών κατά τον πολυμερισμό αλλά και πάλι δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός αστεροειδών πολυμερών γεγονός που πιθανόν να οφειλόταν στις στερεοχημικές παρεμποδίσεις από το δακτύλιο του μορίου του διασταυρωτή BMMD.

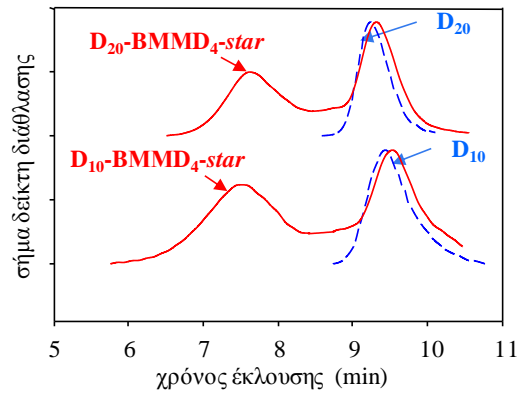


**Σχήμα 3.22:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star. Οι μονάδες του DMAEMA φαίνονται με ανοιχτό μπλε χρώμα, ενώ, με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται ο πυρήνας του BMMD. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.

### 3.3.3.1 Μοριακά Βάρη και Σύσταση

Ο επιτυχής σχηματισμός των δύο αστεροειδών ομοπολυμερών επιβεβαιώθηκε με τα χρωματογραφήματα GPC-RI τα οποία φαίνονται στο Σχήμα 3.23. Από ό,τι φαίνεται στο Σχήμα, τα χρωματογραφήματα των αστεροειδών ομοπολυμερών μετατοπίζονταν σε μικρότερους χρόνους έκλουσης σε σύγκριση με αυτά των γραμμικών προπομπών τους, δείχνοντας έτσι την αύξηση του MB τους και, κατ' επέκταση, το σχηματισμό τους. Και στις δύο περιπτώσεις, στα χρωματογραφήματα φαίνονταν δύο κορυφές, μία οφειλόμενη στο αστεροειδές ομοπολυμερές και η άλλη στο μη ενσωματωμένο γραμμικό ομοπολυμερές. Μάλιστα, το ποσοστό του μη ενσωματωμένου γραμμικού ομοπολυμερούς ήταν αρκετά μεγάλο γεγονός που απέδειξε τη δυσκολία ενσωμάτωσης των γραμμικών προπομπών στο αστεροειδές ομοπολυμερές πιθανώς λόγω των στερεοχημικών παρεμποδίσεων από το δακτύλιο του διασταυρωτή. Περαιτέρω, η μη πλήρης ενσωμάτωση των γραμμικών ομοπολυμερών στα αστεροειδή αποδόθηκε και στο αυξημένο ιξώδες του διαλύματος, στη χαμηλή κινητικότητα των αλυσίδων και στην πιθανή απενεργοποίηση των ενεργών κέντρων του πολυμερισμού.

Στον Πίνακα 3.14 δίνονται τα  $M_p$  και  $M_n$ , οι ΔΠ και οι ΒΠ των βραχιόνων των αστεροειδών ομοπολυμερών και των γραμμικών προπομπών τους όπως αυτά προσδιορίστηκαν με GPC-RI. Δίνονται, επίσης, οι ΒΠ όπως αυτοί προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ . Παρατηρήθηκε ότι τα MB των γραμμικών προπομπών των αστεροειδών ομοπολυμερών ήταν λίγο μεγαλύτερα από τα θεωρητικά αναμενόμενα, γεγονός που οφειλόταν στη μερική απενεργοποίηση του εκκινητή. Παρατηρείται, επίσης, ότι το MB του μικρότερου αστεροειδούς, του DMAEMA<sub>10</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star, ήταν μεγαλύτερο από του δεύτερου αστεροειδούς γεγονός που οφειλόταν στην περαιτέρω διασύνδεση των αστεροειδών ομοπολυμερών μεταξύ τους. Οι ΔΠ των αστεροειδών ομοπολυμερών ήταν αρκετά μεγάλοι, ενώ, τέλος, οι ΒΠ των βραχιόνων των αστεροειδών που προσδιορίστηκαν με τις δύο μεθόδους (χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ ) συμφωνούσαν αρκετά καλά μεταξύ τους.



**Σχήμα 3.23:** Χρωματογραφήματα GPC-RI των αστεροειδών ομοπολυμερών και των γραμμικών προπομπών τους για τη σειρά του BMMD.

**Πίνακας 3.14:** Μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και ΒΠ βραχιόνων για τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή BMMD, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδούς ομοπολυμερούς <sup>1</sup>	Αποτελέσματα GPC-RI				Αποτελέσματα $^1\text{H-NMR}$
		$M_p$	$M_n$	$\Delta\Pi$	ΒΠ D	ΒΠ D
1	D <sub>10</sub>	4360	2940	1.36	18	12.5
	D <sub>10</sub> -BD <sub>4</sub> -star	93300	77000	1.73	-----	15
2	D <sub>20</sub>	4200	4500	1.02	28	25
	D <sub>20</sub> -BD <sub>4</sub> -star	77600	40700	1.73	-----	25
		5250	4790	1.32		

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BD: BMMD.

### 3.3.3.2 Απόλυτα Μοριακά Βάρη και Αριθμός Βραχιόνων

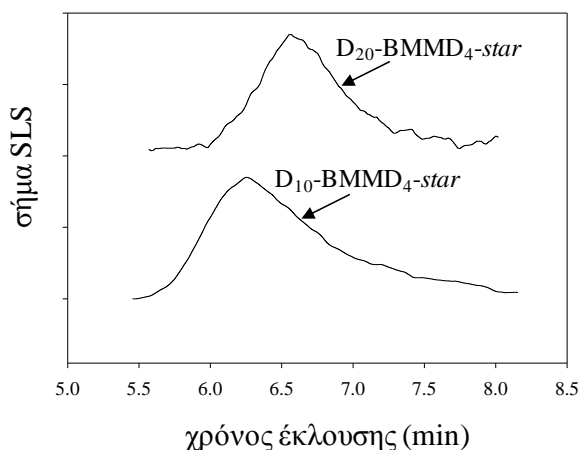
Τα απόλυτα  $M_w$  των αστεροειδών ομοπολυμερών του BMMD προσδιορίστηκαν με χρήση SLS σε THF. Τα χρωματογραφήματα GPC-SLS δίνονται στο Σχήμα 3.24, ενώ οι σχετικοί υπολογισμοί δίνονται στον Πίνακα 3.15. Το απόλυτο  $M_w$  του μικρότερου αστεροειδούς DMAEMA<sub>10</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star ήταν μεγαλύτερο από αυτό του DMAEMA<sub>20</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star, όπως αναμενόταν (από τα αποτελέσματα GPC-RI). Ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών ομοπολυμερών βρέθηκε ίσος με 50 και 28, για ΒΠ βραχίονα 10 και 20, αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.15:** Απόλυτα μοριακά βάρη και αριθμός βραχιόνων των αστεροειδών ομοπολυμερών του BMMD, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με SLS.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδών <sup>1</sup>	$M_w$ αστεροειδών με SLS	Κλάσμα μάζας πυρήνα <sup>2</sup>	$M_w^{\text{πυρήνα}}$	$M_w^{\text{αστερ.}} - M_w^{\text{πυρήνα}}$	$M_n$ βραχίονα με GPC-RI	Αριθμός βραχιόνων
1	D <sub>10</sub> -BD <sub>4</sub> -star	256000	0.42	108000	148000	2940	50.3
2	D <sub>20</sub> -BD <sub>4</sub> -star	176000	0.27	47500	128500	4500	28.6

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BD: BMMD.

<sup>2</sup> $(\text{BΠ}_{\text{θεωρ. BMMD}} \times \text{MB}_{\text{BMMD}}) / (\text{BΠ}_{\text{θεωρ. DMAEMA}} \times \text{MB}_{\text{DMAEMA}} + \text{BΠ}_{\text{θεωρ. BMMD}} \times \text{MB}_{\text{BMMD}})$



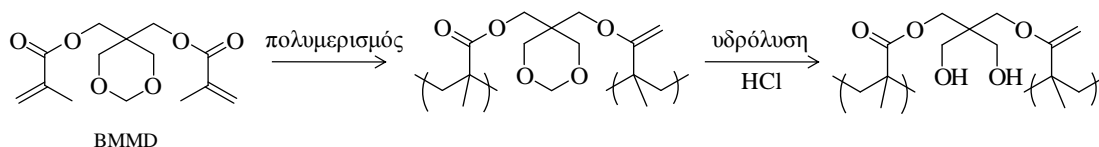
**Σχήμα 3.24:** Χρωματογραφήματα GPC-SLS των αστεροειδών ομοπολυμερών του DMAEMA με διασταυρωτή BMMD.

### 3.3.3.3 Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Μέσα

Ο χαρακτηρισμός σε υδατικά μέσα των δύο αστεροειδών ομοπολυμερών του DMAEMA που είναι διασταυρωμένα με BMMD (υδροδυναμικές διαμέτροι σε καθαρό νερό και βασικό υδατικό διάλυμα, θερμοκρασίες νεφέλωσης και φαινόμενα  $pK$ ) δεν ήταν δυνατός αφού τα αστεροειδή αυτά ήταν αδιάλυτα σε ουδέτερο νερό και βασικό υδατικό διάλυμα ( $pH \sim 8$ ). Το τελευταίο αποδόθηκε τόσο στην περαιτέρω διασύνδεση των αστεροειδών ομοπολυμερών (λόγω του μικρού μήκους των βραχιόνων τους) όσο και στο σχετικά μικρό υδρόφιλο χαρακτήρα τους αφού περιείχαν μεγάλο ποσοστό του υδρόφοβου διασταυρωτή BMMD.

Για αύξηση της υδροφιλικότητας των αστεροειδών ομοπολυμερών επιχειρήθηκε υδρόλυση του πυρήνα του BMMD των αστεροειδών ομοπολυμερών στην παρουσία μικρής ποσότητας υδροχλωρικού οξέος. Υδρόλυση του διασταυρωτή BMMD οδηγούσε στη διάνοιξη του δακτυλίου του και στο σχηματισμό δύο υδροξυλομάδων (Σχήμα 3.25). Η παρουσία των τελευταίων οδηγούσε στην αύξηση του υδρόφιλου χαρακτήρα των αστεροειδών ομοπολυμερών. Παρατηρήθηκε, έτσι, ότι το αστεροειδές ομοπολυμερές DMAEMA<sub>10</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star ήταν πλήρως διαλυτό σε όξινο νερό, ενώ, το DMAEMA<sub>20</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star ήταν λιγότερο διαλυτό (λίγο θολό). Η μη-διαλυτότητα του τελευταίου παρά την υδρόλυση των ομάδων του BMMD αποδόθηκε στην περαιτέρω διασύνδεση μεταξύ των αστεροειδών ομοπολυμερών.

Επειδή τα αστεροειδή πολυμερή διαλύονταν μόνο σε χαμηλό  $pH$ , προσδιορίστηκαν οι υδροδυναμικές διαμέτροί τους σε όξινο νερό. Τα αποτελέσματα συζητούνται στην παράγραφο που ακολουθεί.



**Σχήμα 3.25:** Πολυμερισμοί και υδρόλυση του διασταυρωτή BMMD.

### 3.3.3.3.1 Υδροδυναμικές Διάμετροι

Οι υδροδυναμικές διαμέτροι των αστεροειδών ομοπολυμερών, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, προσδιορίστηκαν μόνο σε όξινο νερό το οποίο περιείχε 0.07 M HCl και 1 M NaCl. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 3.16. Στον Πίνακα με έντονα μαύρα γράμματα δίνονται οι πιο πολυπληθείς κορυφές. Το αστεροειδές DMAEMA<sub>10</sub>-BMMD<sub>4</sub>-*star* παρουσίαζε δύο κορυφές στα φάσματα DLS με τη μικρότερη να αντιστοιχεί σε αστεροειδή ομοπολυμερή και την άλλη σε συσσωματώματα (ολιγομερή) αστεροειδών ομοπολυμερών, ενώ το DMAEMA<sub>20</sub>-BMMD<sub>4</sub>-*star* παρουσίαζε μία. Και στις δύο περιπτώσεις η πιο πολυπληθής κορυφή, η οποία ήταν μικρότερη από τη μέγιστη θεωρητικά αναμενόμενη, αντιστοιχούσε σε αστεροειδή ομοπολυμερή.

**Πίνακας 3.16:** Υδροδυναμικές διαμέτροι σε όξινο νερό και μέγιστες θεωρητικές υδροδυναμικές διαμέτροι όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή BMMD, όπως προσδιορίστηκαν με DLS.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδούς ομοπολυμερούς <sup>1</sup>	Υδροδυναμικές διαμέτροι (nm)			
		Καθαρό νερό	0.07 M HCl, 1 M NaCl (pH ~ 3)	Μέγιστη θεωρητική	Μέγιστη θεωρητική βασισμένη στους ΒΠ με GPC
1	D <sub>10</sub> -BD <sub>4</sub> - <i>star</i>	δεν διαλυόταν	<b>8.8</b> , 22.1	9.1	13.2
2	D <sub>20</sub> -BD <sub>4</sub> - <i>star</i>	δεν διαλυόταν	<b>13.4</b> <sup>2</sup>	14.2	18.3

<sup>1</sup>D: DMAEMA και BD: BMMD.

<sup>2</sup>Το δείγμα αυτό ήταν λίγο θολό.

### 3.3.3.4 Εφαρμογή στη Μεταφορά siRNA σε Κύτταρα Θηλαστικών

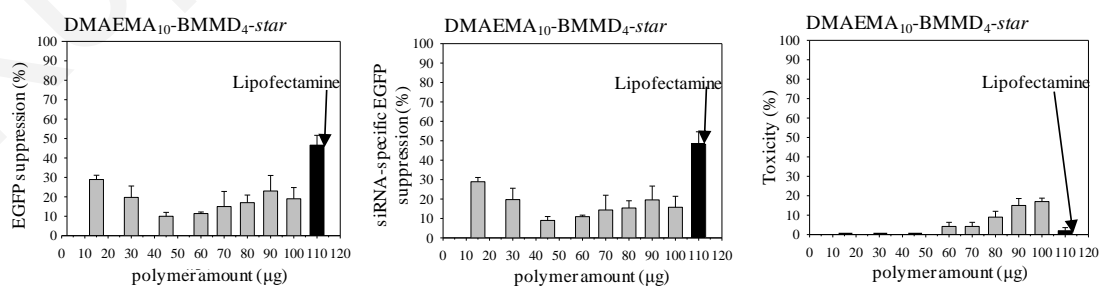
Από τα δύο αστεροειδή ομοπολυμερή του BMMD μόνο το μικρότερο αστεροειδές, DMAEMA<sub>10</sub>-BMMD<sub>4</sub>-*star*, αξιολογήθηκε ως σύστημα μεταφοράς siRNA σε κύτταρα μυοβλαστών (C2C12) αφού ήταν το μόνο που μετά την υδρόλυσή του (με προσθήκη μικρής ποσότητας υδροχλωρικού οξέους) διαλυόταν πλήρως σε όξινο νερό. Το αστεροειδές ομοπολυμερές DMAEMA<sub>20</sub>-BMMD<sub>4</sub>-*star* λόγω της μικρής διαλυτότητάς του (και μετά την υδρόλυσή του) δεν αξιολογήθηκε σε πειράματα επιμόλυνσης.



Η αξιολόγηση της ικανότητας του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>10</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star να μεταφέρει siRNA σε κύτταρα θηλαστικών και να καταστέλλει την έκφραση ενδογενούς EGFP βασίστηκε σε τρεις δείκτες: την *καταστολή της έκφρασης της EGFP* (ή *EGFP suppression*), τη *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και την *τοξικότητα* (ή *toxicity*). Στα πειράματα επιμόλυνσης μεταβαλλόταν συστηματικά η ποσότητα του πολυμερούς (polymer amount) με σταθερή ποσότητα siRNA (0.665 μg, 50 pmol). Για σκοπούς σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο επιμόλυνσης Lipofectamine.

Στο Σχήμα 3.26 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα επιμόλυνσης. Αναλυτικότερα, παρουσιάζονται η *καταστολή της έκφρασης της EGFP*, η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* και η *τοξικότητα* συναρτήσει της ποσότητας του αστεροειδούς ομοπολυμερούς η οποία μεταβαλλόταν από 15 μέχρι και 100 μg.

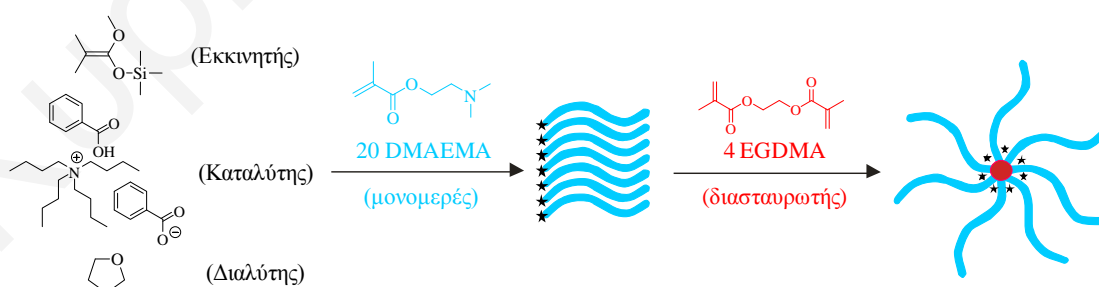
Από τα πειράματα επιμόλυνσης παρατηρήθηκε ότι η *καταστολή της έκφρασης της EGFP* (Σχήμα 3.26, αριστερό γράφημα) αυξανόταν ελαφρώς καθώς η ποσότητα του πολυμερούς αυξανόταν από 45 σε 100 μg. Οι δύο μικρότερες ποσότητες 15 και 30 μg παρουσίαζαν μεγαλύτερες τιμές *καταστολής της έκφρασης της EGFP*. Η *τοξικότητα* (Σχήμα 3.26, δεξιό γράφημα) του αστεροειδούς βρισκόταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Συγκεκριμένα, μέχρι τα 45 μg δεν παρατηρήθηκε καμία τοξικότητα, ενώ, για τις άλλες ποσότητες, αυξανόταν ελαφρώς με αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς ομοπολυμερούς φτάνοντας μέχρι 20%. Ο τελευταίος και σημαντικότερος δείκτης, η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* (Σχήμα 3.26, μεσαίο γράφημα), ο οποίος συνδύαζε την *καταστολή της έκφρασης της EGFP* και την *τοξικότητα*, παρατηρήθηκε ότι ακολουθούσε την ίδια τάση με την *καταστολή της έκφρασης της EGFP*. Αυτό αποδεικνύει τη μικρή συμβολή της *τοξικότητας* στον υπολογισμό της *συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης* αφού η πρώτη διατηρείτο σε πολύ χαμηλά επίπεδα.



**Σχήμα 3.26:** Εξάρτηση της *καταστολής της έκφρασης της EGFP* (ή *EGFP suppression*), της *συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης* (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και της *τοξικότητας* (ή *toxicity*) από την ποσότητα του πολυμερούς (polymer amount) υπό σταθερή ποσότητα siRNA (0.665 μg, 50 pmol) για το αστεροειδές ομοπολυμερές DMAEMA<sub>10</sub>-BMMD<sub>4</sub>-star.

### 3.3.3 Αστεροειδή Ομοπολυμερή του DMAEMA Βασισμένα στο Διασταυρωτή EGDMA

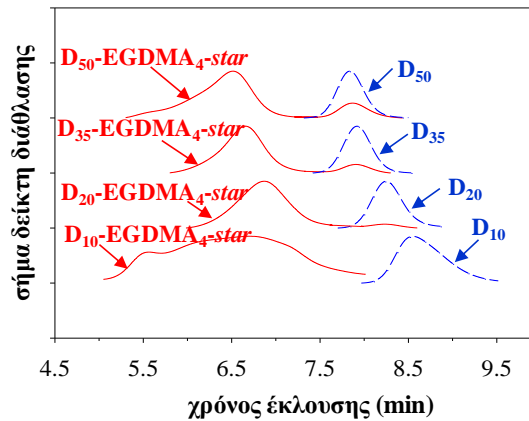
Για σκοπούς σύγκρισης, πέρα από τα αστεροειδή ομοπολυμερή που είναι βασισμένα στους καινούργιους διασταυρωτές BMEP, BMEMA και BMMD, συντέθηκε και μία σειρά αστεροειδών ομοπολυμερών βασισμένων στον υδρόφοβο και εμπορικά διαθέσιμο διασταυρωτή EGDMA. Για τη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε πάλι το υδρόφιλο και θετικά ιονιζόμενο μονομερές του DMAEMA. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν τέσσερα αστεροειδή ομοπολυμερή με ΒΠ βραχίονα 10, 20, 35 και 50 (ίδιους με αυτούς των άλλων αστεροειδών) με τη χρήση της μεθόδου GTP. Για όλους τους πολυμερισμούς χρησιμοποιήθηκαν το MTS σαν εκκινητής, το TBABB σαν καταλύτης και το THF σαν διαλύτης. Το Σχήμα 3.27 παρουσιάζει διαγραμματικά τη συνθετική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star. Στο Σχήμα με μπλε ανοιχτό αναπαριστούνται οι μονάδες του DMAEMA, ενώ ο πυρήνας του EGDMA χρωματίζεται με βαθύ κόκκινο. Οι αστερίσκοι στα άκρα των αλυσίδων των γραμμικών προπομπών και του πυρήνα δείχνουν τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού. Αναλυτικότερα, η σύνθεση των αστεροειδών ομοπολυμερών έγινε σε δύο στάδια (Σχήμα 3.27). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των γραμμικών προπομπών (βραχίονες αστεροειδών πολυμερών) από τον πολυμερισμό του μονομερούς DMAEMA στην παρουσία του μονοδραστικού εκκινητή MTS, ενώ, κατά το δεύτερο στάδιο, στην ίδια φιάλη πολυμερισμού, οι βραχίονες διασυνδέθηκαν στο ένα άκρο μέσα από τον πολυμερισμό του EGDMA ο οποίος οδήγησε στο σχηματισμό “arm-first” αστεροειδών ομοπολυμερών. Η γραμμομοριακή αναλογία διασταυρωτή προς εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε, για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή, ήταν και πάλι ίση με 4 : 1.



**Σχήμα 3.27:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του αστεροειδούς ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>20</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star. Οι μονάδες του DMAEMA χρωματίζονται με ανοικτό μπλε χρώμα, ενώ, ο πυρήνας του EGDMA φαίνεται με βαθύ κόκκινο. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.

### 3.3.3.1 Μοριακά Βάρη και Σύσταση

Ο σχηματισμός των αστεροειδών ομοπολυμερών του EGDMA επιβεβαιώθηκε με χρωματογραφία GPC-RI (Σχήμα 3.28). Όπως φαίνεται στο Σχήμα, μετά την προσθήκη του διασταυρωτή, η κατανομή των MB των αστεροειδών ομοπολυμερών μετατοπίστηκε, όπως αναμενόταν, σε μικρότερους χρόνους έκλουσης σε σχέση με την αντίστοιχη των γραμμικών ομοπολυμερών τους, αποδεικνύοντας έτσι την αύξηση των MB τους και τον επιτυχή σχηματισμό τους. Από τα χρωματογραφήματα GPC-RI παρατηρήθηκε, επίσης, ότι όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή, με εξαίρεση το μικρότερο αστεροειδές, DMAEMA<sub>10</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star, παρουσίαζαν δύο κορυφές, μία που οφειλόταν στο αστεροειδές ομοπολυμερές και μία δεύτερη που οφειλόταν στους γραμμικούς προπομπούς που δεν ενσωματώθηκαν στο αστεροειδές. Η αποτυχία ενσωμάτωσης όλων των γραμμικών προπομπών στο αστεροειδές αποδόθηκε και πάλι στο αυξημένο ιξώδες του διαλύματος, στη μικρότερη κινητικότητα των αλυσίδων και στην πιθανή απενεργοποίηση των ενεργών κέντρων των αλυσίδων. Το χρωματογράφημα GPC-RI του DMAEMA<sub>10</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star παρουσίαζε μία πολύ ευρεία κατανομή με δύο κορυφές η οποία οφειλόταν τόσο σε αστεροειδή ομοπολυμερή όσο και σε διασυνδέσεις μεταξύ αστεροειδών ομοπολυμερών (star-star coupling), αποτέλεσμα που ευνοείτο από τις ασθενείς στερεοχημικές παρεμποδίσεις ανάμεσα στα αστεροειδή λόγω του μικρού μήκους των βραχιόνων (BΠ=10). Τα  $M_n$ ,  $M_p$ , και οι ΔΠ όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών και των γραμμικών προπομπών τους δίνονται στον Πίνακα 3.17. Τα  $M_n$  των γραμμικών προπομπών ήταν κοντά στις θεωρητικές τιμές, ενώ οι ΔΠ τους ήταν αρκετά χαμηλοί. Οι ΔΠ των αστεροειδών ομοπολυμερών 2, 3 και 4 (Πίνακας 3.17) ήταν μεταξύ 1.3 και 1.5, ενώ αυτή του αστεροειδούς ομοπολυμερούς 1 ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη, 3.6. Ο Πίνακας παρουσιάζει, επίσης, τα MB των μη ενσωματωμένων γραμμικών προπομπών τα οποία, στις περισσότερες περιπτώσεις, ήταν κοντά στα MB των γραμμικών προπομπών των αστεροειδών ομοπολυμερών. Οι BΠ των βραχιόνων οι οποίοι υπολογίστηκαν τόσο από τα χρωματογραφήματα GPC-RI όσο και από τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR δίνονται στις δύο τελευταίες στήλες του Πινάκα 3.17. Σε όλες τις περιπτώσεις αυτοί οι BΠ βρίσκονταν σε σχετικά καλή συμφωνία τόσο μεταξύ τους όσο και με τις θεωρητικά αναμενόμενες τιμές.



**Σχήμα 3.28:** Χρωματογραφήματα GPC-RI των αστεροειδών ομοπολυμερών και των γραμμικών προπομπών τους για τη σειρά του EGDMA.

**Πίνακας 3.17:** Μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και ΒΠ βραχιόνων για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή EGDMA, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC-RI και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .

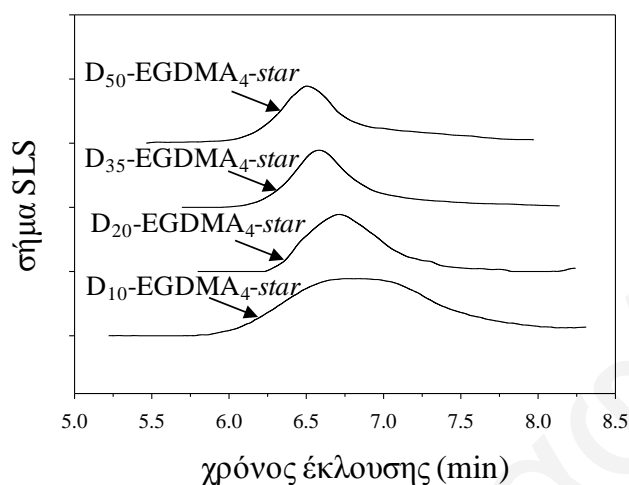
A/A	Θεωρητική δομή πολυμερών <sup>1</sup>	Θεωρητικό MB	Αποτελέσματα GPC-RI				Αποτελέσματα $^1\text{H-NMR}$
			$M_p$	$M_n$	$\Delta\text{Π}$	ΒΠ D	ΒΠ D
1	D <sub>10</sub>	1670	2090	1190	1.42	7	12
	D <sub>10</sub> -EG <sub>4</sub> -star	-----	785000	777000	3.64	-----	8
			82300	72100			
			4270	4130	1.03		
2	D <sub>20</sub>	3240	3700	3000	1.17	18	30
	D <sub>20</sub> -EG <sub>4</sub> -star	-----	40800	28700	1.53	-----	21
			3000	2790	1.04		
3	D <sub>35</sub>	5600	7200	6120	1.23	38	-----
	D <sub>35</sub> -EG <sub>4</sub> -star	-----	63900	51200	1.37	-----	38
			5500	5330	1.06		
4	D <sub>50</sub>	7960	8120	6700	1.13	42	75
	D <sub>50</sub> -EG <sub>4</sub> -star	-----	78800	67600	1.36	-----	50
			5840	4950	1.10		

<sup>1</sup>D: DMAEMA και EG: EGDMA.

### 3.3.4.2 Απόλυτα Μοριακά Βάρη και Αριθμός Βραχιόνων

Τα απόλυτα MB όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του EGDMA προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια SLS σε THF. Τα σχετικά χρωματογραφήματα παρατίθενται στο Σχήμα 3.29, ενώ ο αριθμός των βραχιόνων γύρω από κάθε πυρήνα δίνονται στον Πίνακα 3.18. Παρατηρήθηκε ότι για τα αστεροειδή ομοπολυμερή με ΒΠ βραχιόνων 20, 35 και 50, τα απόλυτα MB τους αυξάνονταν μονοτονικά με αύξηση του ΒΠ του βραχίονα. Το DMAEMA<sub>10</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star δεν ακολουθούσε αυτή την τάση αφού παρουσίαζε μεγαλύτερο MB λόγω ομοιοπολικής διασύνδεσης μεταξύ αστεροειδών πολυμερών, όπως εξηγήθηκε προηγουμένως. Αυτό το αστεροειδές ομοπολυμερές παρουσίαζε, για τον ίδιο

λόγο, και το μεγαλύτερο αριθμό βραχιόνων (=114.3). Τα άλλα τρία αστεροειδή ομοπολυμερή με ΒΠ βραχίονα 20, 35 και 50 έφεραν αρκετά λιγότερους βραχίονες οι οποίοι κυμαίνονταν από 24 μέχρι και 27.



Σχήμα 3.29: Χρωματογραφήματα GPC-SLS όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του EGDMA.

Πίνακας 3.18: Απόλυτα μοριακά βάρη και αριθμός βραχιόνων για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή EGDMA, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με GPC-SLS.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδούς ομοπολυμερούς <sup>1</sup>	$M_w$ αστεροειδούς με SLS	Κλάσμα μάζας πυρήνα <sup>2</sup>	$M_w$ πυρήνα	$M_w^{αστερ.} - M_w^{πυρήν.}$	$M_n$ βραχίονα με GPC-RI	Αριθμός βραχιόνων
1	D <sub>10</sub> -EG <sub>4</sub> -star	204000	0.34	68400	136000	1190	114.3
2	D <sub>20</sub> -EG <sub>4</sub> -star	93400	0.20	18800	74600	3000	24.9
3	D <sub>35</sub> -EG <sub>4</sub> -star	166000	0.13	20900	145000	6120	23.7
4	D <sub>50</sub> -EG <sub>4</sub> -star	201000	0.09	18400	183000	6700	27.3

<sup>1</sup>D: DMAEMA και E: EGDMA.

<sup>2</sup> $(BΠ_{θεορ. EGDMA} \times MB_{EGDMA}) / (BΠ_{θεορ. DMAEMA} \times MB_{DMAEMA} + BΠ_{θεορ. EGDMA} \times MB_{EGDMA})$

### 3.3.4.3 Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Μέσα

Όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του EGDMA χαρακτηρίστηκαν σε 1% κ.μ. υδατικά διαλύματα ως προς τις υδροδυναμικές τους διαμέτρους (σε καθαρό και όξινο νερό), τις θερμοκρασίες νεφέλωσης (σε καθαρό νερό και ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με pH 8), τα φαινόμενα pK και τα pH καταβύθισης. Τα αποτελέσματα συζητούνται στις επόμενες αντίστοιχες παραγράφους.

#### 3.3.4.3.1 Υδροδυναμικές Διάμετροι

Οι υδροδυναμικές διαμέτροι όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του EGDMA προσδιορίστηκαν σε καθαρό νερό (pH ~ 9.4) και σε υδατικό διάλυμα το οποίο περιείχε

0.07 M HCl και 1 M NaCl και είχε pH 3. Όλες οι πειραματικές υδροδυναμικές διαμέτροι όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών, καθώς και οι μέγιστες θεωρητικές διαμέτροί τους δίνονται στον Πίνακα 3.19. Από τον Πίνακα φαίνεται ότι τα αστεροειδή ομοπολυμερή παρουσίαζαν 2 με 5 κορυφές στα φάσματα DLS, με τις μικρότερες κορυφές να αποδίδονται σε μη ενσωματωμένα γραμμικά ομοπολυμερή και τις άλλες σε αστεροειδή ομοπολυμερή και συσσωματώματα αστεροειδών ομοπολυμερών. Στον Πίνακα οι πιο πολυπληθείς κορυφές φαίνονται με έντονα μαύρα γράμματα. Από ό,τι φαίνεται στον Πίνακα, η πιο πολυπληθής κορυφή για τα δύο μικρότερα αστεροειδή ομοπολυμερή (BPI 10 και 20) τόσο σε καθαρό όσο και σε όξινο νερό, αντιστοιχούσε σε συσσωματώματα αστεροειδών ομοπολυμερών. Στην περίπτωση του DMAEMA<sub>10</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star, αυτές οι υδροδυναμικές διαμέτροι αποδόθηκαν σε διασυνδέσεις ανάμεσα στα αστεροειδή ομοπολυμερή. Στην περίπτωση του DMAEMA<sub>35</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star, οι υδροδυναμικές διαμέτροι ήταν πολύ κοντά στις θεωρητικά αναμενόμενες και αυτές μπορούν να αποδοθούν στα ίδια τα αστεροειδή ομοπολυμερή αλλά και σε διασυνδέσεις αστεροειδών (πολύ μικρές). Τέλος, οι πιο πολυπληθείς υδροδυναμικές διαμέτροι του DMAEMA<sub>50</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star σε καθαρό και όξινο νερό αντιστοιχούσαν στο ίδιο το αστεροειδές ομοπολυμερές. Μάλιστα, αυτές οι διαμέτροι, και στους δύο διαλύτες, ήταν μικρότερες από τις μέγιστες θεωρητικά αναμενόμενες διαμέτρους αφού οι τελευταίες υπολογίστηκαν για πλήρως εκτεταμένους βραχίονες.

**Πίνακας 3.19:** Υδροδυναμικές διαμέτροι σε καθαρό και όξινο νερό, καθώς και οι μέγιστες θεωρητικές υδροδυναμικές διαμέτροι όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή EGDMA, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με DLS.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδούς ομοπολυμερούς <sup>1</sup>	Υδροδυναμικές διαμέτροι (nm)			
		Καθαρό νερό (pH≈9.4)	0.07 M HCl 1 M NaCl (pH=3)	Μέγιστη θεωρητική	Μέγιστη θεωρητική βασισμένη στους BPI με GPC
1	D <sub>10</sub> -EG <sub>4</sub> -star	10.0, 27.4, <b>86.6</b> , 868.2 <sup>2</sup>	19.3, <b>51.9</b> , 203.1	9.1	7.6
2	D <sub>20</sub> -EG <sub>4</sub> -star	12.0, <b>214.5</b>	7.2, <b>18.7</b> , 200.6	14.2	13.2
3	D <sub>35</sub> -EG <sub>4</sub> -star	9.5, <b>22.9</b>	12.8, <b>25.2</b> , 69.7, 75.9, 82,6	21.8	23.4
4	D <sub>50</sub> -EG <sub>4</sub> -star	7.2, <b>20.1</b>	<b>23.8</b> , 142.5	29.5	25.4

<sup>1</sup>D: DMAEMA και E: EGDMA.

<sup>2</sup>Για να ληφθεί η μέτρηση αυτή στο διάλυμα του αστεροειδούς ομοπολυμερούς προστέθηκαν λίγες σταγόνες HCl αφού ήταν αδιάλυτο σε καθαρό νερό.

### 3.3.4.3.2 Θερμοκρασίες Νεφέλωσης

Οι θερμοκρασίες νεφέλωσης όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του EGDMA σε καθαρό νερό (στο pH διάλυσης των ομοπολυμερών γύρω στο 9.4) και σε υδατικό διάλυμα

με pH 8 δίνονται στον Πίνακα 3.20. Όλες οι θερμοκρασίες νεφέλωσης σε καθαρό νερό κυμαίνονταν μεταξύ 24.2 και 27.5 °C, όπως αναμενόταν για αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA.<sup>[250(a)]</sup> Συγκεκριμένα, οι θερμοκρασίες νεφέλωσης των αστεροειδών ομοπολυμερών με ΒΠ βραχίονα 20 και 35 αυξάνονταν καθώς ο ΒΠ των βραχιόνων αυξανόταν λόγω μεγαλύτερης στερεοχημικής σταθεροποίησης των αστεροειδών ομοπολυμερών από τους μακρύτερους βραχίονες. Το αστεροειδές ομοπολυμερές DMAEMA<sub>50</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star παρουσίαζε παρόμοια θερμοκρασία νεφέλωσης με το DMAEMA<sub>35</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star, αποτέλεσμα που συμφωνούσε με προηγούμενη μελέτη από την Ερευνητική Ομάδα μας.<sup>[250(a)]</sup> Οι θερμοκρασίες νεφέλωσης στο υδατικό διάλυμα (pH 8) ήταν μεταξύ 51.0 και 56.5 °C, ακολουθώντας την ίδια τάση με αυτές σε καθαρό νερό, με τη διαφορά ότι ήταν σχεδόν 30 °C μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες σε καθαρό νερό. Οι μεγαλύτερες θερμοκρασίες νεφέλωσης στο υδατικό διάλυμα αποδόθηκαν στη μερική φόρτιση των ομάδων του DMAEMA κάτω από αυτές τις συνθήκες σε αντίθεση με την αφόρτιστη κατάσταση σε καθαρό νερό. Η θερμοκρασία νεφέλωσης του μικρότερου αστεροειδούς, του DMAEMA<sub>10</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star, δεν προσδιορίστηκε διότι το αστεροειδές αυτό ήταν αδιάλυτο τόσο στο καθαρό νερό όσο και στο υδατικό διάλυμα. Σε όξινο νερό (pH ~ 3), το αστεροειδές αυτό δεν καταβυθιζόταν σε καμία θερμοκρασία στο θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 15 και 65 °C.

**Πίνακας 3.20:** Θερμοκρασίες νεφέλωσης σε καθαρό νερό και υδατικό διάλυμα σε pH 8 όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή EGDMA, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με νεφελομετρία.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδούς ομοπολυμερούς <sup>1</sup>	Θερμοκρασίες νεφέλωσης (°C)	
		Καθαρό νερό (pH≈9.4)	Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS (50 mM) με pH=8
1	D <sub>10</sub> -EG <sub>4</sub> -star	----- <sup>2</sup>	----- <sup>2</sup>
2	D <sub>20</sub> -EG <sub>4</sub> -star	24.2	51.0
3	D <sub>35</sub> -EG <sub>4</sub> -star	27.5	56.5
4	D <sub>50</sub> -EG <sub>4</sub> -star	26.7	56.0

<sup>1</sup>D: DMAEMA και E: EGDMA.

<sup>2</sup>Το αστεροειδές ομοπολυμερές D<sub>10</sub>-EG<sub>4</sub>-star ήταν αδιάλυτο τόσο σε καθαρό νερό όσο και σε υδατικό διάλυμα με pH 8.

### 3.3.3.3 Φαινόμενα pK και pH καταβύθισης

Τα φαινόμενα pK των μονάδων του DMAEMA, τα οποία υπολογίστηκαν ως το pH για 50% ιονισμό, καθώς και τα pH καταβύθισης όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του EGDMA δίνονται στον Πίνακα 3.21. Όπως φαίνεται στον Πίνακα, οι φαινόμενες τιμές pK των αστεροειδών ομοπολυμερών αυξάνονταν από 6.7 μέχρι και 7.3, μαζί με το ΒΠ του βραχίονα. Οι τιμές αυτές ήταν σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες βασισμένες σε γραμμικά<sup>[252]</sup> και αστεροειδή<sup>[250(a)]</sup> ομοπολυμερή του DMAEMA. Η αύξηση των

φαινόμενων τιμών  $pK$  με την αύξηση του ΒΠ των βραχιόνων πιθανώς να οφείλετο στη μικρότερη υδροφοβικότητα στα αστεροειδή με τους μακρύτερους βραχίονες, αφού αυτά έχουν μικρότερο ποσοστό υδρόφοβου EGDMA. Ομοίως, τα  $pH$  καταβύθισης επίσης αυξάνονταν με το ΒΠ του βραχίονα, από 8.2 μέχρι και 10.9, λόγω και πάλι της μικρότερης υδροφοβικότητας αλλά και της μεγαλύτερης στερεοχημικής σταθεροποίησης των αστεροειδών ομοπολυμερών με μακρύτερους βραχίονες.

**Πίνακας 3.21:** Φαινόμενες τιμές  $pK$  και  $pH$  καταβύθισης όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών του διασταυρωτή EGDMA, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις υδρογονοϊόντων.

A/A	Θεωρητική δομή αστεροειδούς ομοπολυμερούς <sup>1</sup>	$pK$	$pH$ καταβύθισης
1	D <sub>10</sub> -EG <sub>4</sub> -star	6.7	8.2
2	D <sub>20</sub> -EG <sub>4</sub> -star	7.2	8.9
3	D <sub>35</sub> -EG <sub>4</sub> -star	7.3	10.2
4	D <sub>50</sub> -EG <sub>4</sub> -star	7.3	10.9

<sup>1</sup>D: DMAEMA και E: EGDMA.

### 3.3.3.4 Εφαρμογή στη Μεταφορά siRNA σε Κύτταρα Θηλαστικών

Όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του EGDMA αξιολογήθηκαν σαν οχήματα μεταφοράς siRNA σε κύτταρα μυοβλαστών (C2C12) τα οποία εξέφραζαν σταθερά το γονίδιο της πρωτεΐνης EGFP. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης βασίστηκε σε τρεις δείκτες: την καταστολή της έκφρασης της EGFP (ή *EGFP suppression*), τη συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και την τοξικότητα (ή *toxicity*). Στα πειράματα επιμόλυνσης μεταβαλλόταν συστηματικά η ποσότητα του πολυμερούς (polymer amount) υπό σταθερή ποσότητα siRNA (0.665  $\mu$ g, 50 pmol). Για σκοπούς σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο επιμόλυνσης Lipofectamine.

Το Σχήμα 3.30 παρουσιάζει τα αποτελέσματα επιμόλυνσης τα οποία εκφράζονται μέσα από την καταστολή της έκφρασης της EGFP, τη συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης και την τοξικότητα σε συνάρτηση με την ποσότητα του αστεροειδούς ομοπολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε. Συγκεκριμένα, η ποσότητα του ομοπολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε μεταβαλλόταν από τα 30 στα 100  $\mu$ g για το DMAEMA<sub>10</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star και από τα 15 στα 90  $\mu$ g για το DMAEMA<sub>20</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star. Για τα DMAEMA<sub>35</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star και DMAEMA<sub>50</sub>-EGDMA<sub>4</sub>-star χρησιμοποιήθηκε μικρότερο εύρος ποσοτήτων, μεταξύ 15 και 60  $\mu$ g, λόγω της αυξημένης τοξικότητας αυτών των αστεροειδών ομοπολυμερών.

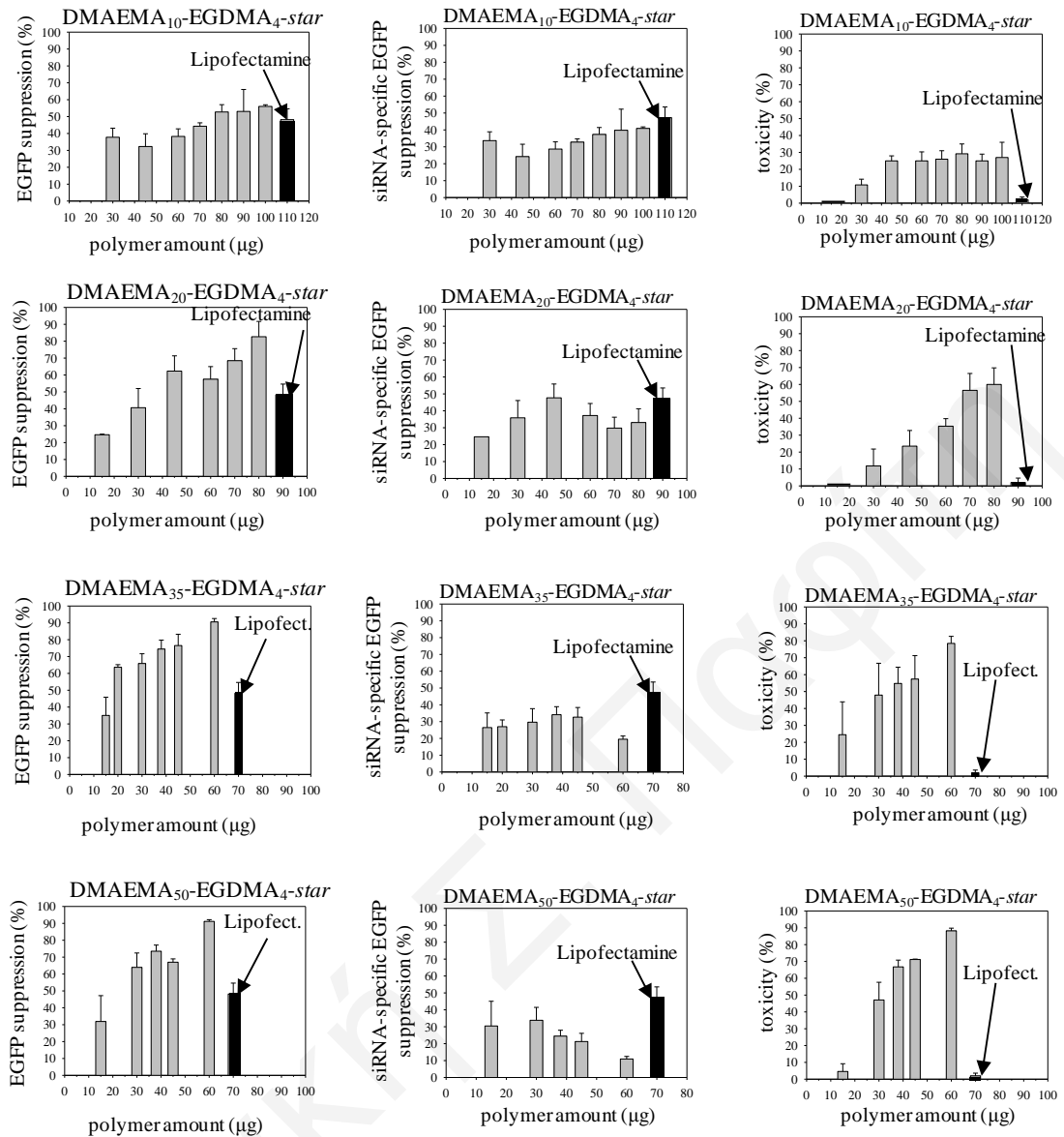
Από τα πειράματα επιμόλυνσης παρατηρήθηκε ότι η καταστολή της έκφρασης της EGFP,



για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή, αυξανόταν με αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς ομοπολυμερούς (Σχήμα 3.30, αριστερή στήλη γραφημάτων). Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη καταστολή παρατηρήθηκε για τις μεγαλύτερες ποσότητες αστεροειδούς ομοπολυμερούς.

Ο δεύτερος δείκτης που μελετήθηκε ήταν η *τοξικότητα* η οποία αυξανόταν, για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή, με αύξηση της ποσότητας του ομοπολυμερούς (Σχήμα 3.30, δεξιά στήλη γραφημάτων).

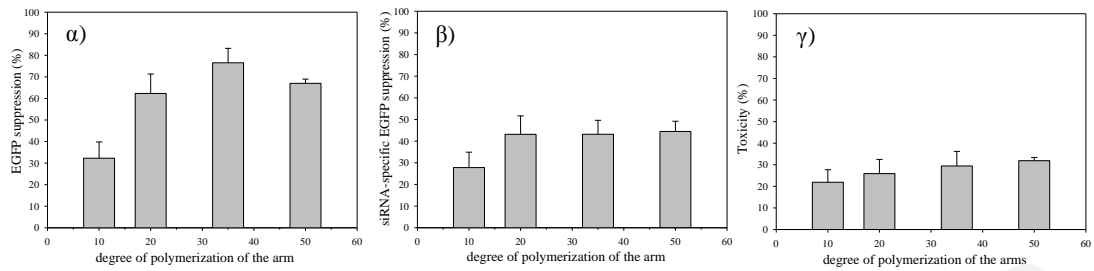
Ο τελευταίος και σημαντικότερος δείκτης που μελετήθηκε ήταν η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης*. Αυτός ο δείκτης δεν λαμβάνει υπόψη μόνο την καταστολή του σήματος της EGFP αλλά και την καταστολή των συνολικών πρωτεϊνών (στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και η EGFP) λόγω του θανάτου των κύτταρων κατά τη διάρκεια της επιμόλυνσης. Όπως εξηγήθηκε στο Πειραματικό Μέρος, αυτός ο δείκτης υπολογίστηκε από το συνδυασμό των δύο προηγούμενων δεικτών οι οποίοι βρέθηκαν να αυξάνονται με την αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς ομοπολυμερούς. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα επιμόλυνσης έδειξαν ότι η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* αυξανόταν ελαφρώς για το μικρότερο αστεροειδές ομοπολυμερές, παρουσίαζε μέγιστο για τα αστεροειδή ομοπολυμερή DMAEMA<sub>20</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star και DMAEMA<sub>35</sub>-BMEMA<sub>4</sub>-star, ενώ, για το μεγαλύτερο αστεροειδές ομοπολυμερές, ελαττωνόταν με αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς (Σχήμα 3.30, μεσαία στήλη γραφημάτων). Μάλιστα, η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* σε κάποιες ποσότητες για τα δύο μικρότερα αστεροειδή ομοπολυμερή ήταν συγκρίσιμη με αυτή του εμπορικά διαθέσιμου αντιδραστηρίου Lipofectamine, τα αποτελέσματα του οποίου, επίσης, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.30.



**Σχήμα 3.30:** Εξάρτηση της καταστολής της έκφρασης της *EGFP* (ή *EGFP suppression*), της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και της τοξικότητας (ή *toxicity*) από την ποσότητα του πολυμερούς (*polymer amount*) υπό σταθερή ποσότητα *siRNA* (0.665 µg, 50 pmol) για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του διασταυρωτή EGDMA.

Επιπρόσθετα, οι τρεις δείκτες μελετήθηκαν σε συνάρτηση με το ΒΠ του βραχίονα. Το Σχήμα 3.31 παρουσιάζει την εξάρτηση των τριών αυτών δεικτών από το ΒΠ του βραχίονα του αστεροειδούς ομοπολυμερούς (*degree of polymerization of the arm*) για μία συγκεκριμένη ποσότητα αστεροειδούς. Συγκεκριμένα, το Σχήμα παρουσιάζει την (α) καταστολή της έκφρασης της *EGFP* (β) συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνση και (γ) τοξικότητα σε σχέση με το ΒΠ του βραχίονα για ποσότητα 30 µg αστεροειδούς ομοπολυμερούς. Όπως φαίνεται στο Σχήμα με αύξηση του ΒΠ του βραχίονα, η καταστολή της έκφρασης της *EGFP* αυξανόταν καθαρά για τα τρία μικρότερα πολυμερή, ενώ η τοξικότητα και η συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης αυξάνονταν ελαφρά. Η πιο

πάνω τάση αποδεικνύει τη σημαντικότερη επίδραση της ποσότητας του πολυμερούς από ό,τι του MB στη *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης*.



**Σχήμα 3.31:** Εξάρτηση (α) της καταστολής της έκφρασης της EGFP (ή *EGFP suppression*) (β) της συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης (ή *siRNA-specific EGFP suppression*) και (γ) της τοξικότητας (ή *toxicity*) από το βαθμό πολυμερισμού του βραχίονα (ή *degree of polymerization of the arm*) των αστεροειδών ομοπολυμερών του EGDMA για τα 30 μg αστεροειδούς ομοπολυμερούς και 0.665 μg (50 pmol) siRNA.

### 3.4 Σύγκριση Αστεροειδών Ομοπολυμερών ως Μεταφορείς siRNA

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή αξιολογήθηκαν συνολικά μία σειρά γραμμικών και τέσσερις σειρές αστεροειδών ομοπολυμερών ως συστήματα μεταφοράς siRNA σε κύτταρα θηλαστικών. Μελέτη αστεροειδών πολυμερών παρουσιάζεται μόνο μία φορά στη βιβλιογραφία με πολύ υποσχόμενα αποτελέσματα.<sup>[100]</sup> Στην παρούσα Εργασία οι τρεις σειρές των αστεροειδών ομοπολυμερών ήταν βασισμένες σε τρεις νέους διασταυρωτές τους BMER, BMEMA και BMMD, ενώ η τέταρτη ήταν βασισμένη στον εμπορικά διαθέσιμο EGDMA. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης, όπως έχει αναφερθεί, βασίστηκε σε τρεις δείκτες, την καταστολή της έκφρασης της *EGFP*, τη συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης και την τοξικότητα.

Συνοπτικά, από όλα τα πειράματα επιμόλυνσης, με εξαίρεση το αστεροειδές DMAEMA<sub>10</sub>-BMMD<sub>4-star</sub> (της ομάδας του BMMD), παρατηρήθηκε ότι η καταστολή της έκφρασης της *EGFP* αυξανόταν με αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς. Μάλιστα, η μεγαλύτερη καταστολή παρατηρείτο με τη χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων πολυμερούς. Αυτή η παρατήρηση βρίσκεται σε συμφωνία με τη μελέτη του Convertine και συνεργατών<sup>[86]</sup> οι οποίοι παρατήρησαν ότι η καταστολή της έκφρασης της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης αυξανόταν με αύξηση της ποσότητας των διαδρομερών συμπολυμερών των οποίων το ένα τμήμα αποτελείτο από DMAEMA. Οι ερευνητές αυτοί απέδωσαν αυτήν την τάση στο σχηματισμό περισσότερων συμπαγών συμπλόκων με μεγαλύτερες ποσότητες πολυμερούς τα οποία μπορούσαν να ενσωματωθούν καλύτερα από το κύτταρο.

Παράλληλα, αύξηση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης παρατηρήθηκε και με τη χρήση πολυκατιοντικών συστημάτων τα οποία είχαν περισσότερο σφαιρικές δομές όπως είναι τα αστεροειδή πολυμερή. Τέτοιες μελέτες αφορούσαν υπερδιακλαδισμένα πεπτίδια τα οποία αποτελούνταν από ιστιδίνη και λυσίνη,<sup>[55]</sup> συστήματα αποτελούμενα από PEI-graft-PEG-folate<sup>[40]</sup> καθώς και δενδριμερή (PAMAM) πολυμερή.<sup>[78]</sup> Ένα άλλο παράδειγμα που παρουσιάζεται στη βιβλιογραφία αφορά τη χρήση πολυμερών της χιτοσάνης.<sup>[64]</sup> Στη μελέτη αυτή η αύξηση της καταστολής αποδόθηκε στη μεγαλύτερη σταθερότητα που έδινε στο σύστημα η ποσότητα της χιτοσάνης η οποία δεν συμμετείχε στο σχηματισμό συμπλόκων.

Όσον αφορά την τοξικότητα των αστεροειδών ομοπολυμερών, στην παρούσα Εργασία παρατηρήθηκε αύξησή της με αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς που χρησιμοποιείτο. Αυτό αποδόθηκε στην περίσσεια του ελεύθερου πολυμερούς το οποίο, λόγω του θετικού φορτίου του, δεσμευόταν ισχυρότερα στην κυτταρική μεμβράνη οδηγώντας έτσι στην

αποσταθεροποίησή της και στον τελικό θάνατο των κυττάρων. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Cai και συνεργατών<sup>[258]</sup> οι οποίοι παρατήρησαν αύξηση της τοξικότητας με αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς για μία σειρά από γραμμικά ομοπολυμερή του DMAEMA. Επίσης, σε μία άλλη μελέτη, οι Liu και συνεργάτες<sup>[64]</sup> παρατήρησαν αύξηση της τοξικότητας με αύξηση της ποσότητας της χιτοσάνης στο σύμπλοκο πολυμερούς / siRNA.

Σημαντικότερος από τους τρεις δείκτες που μελετήθηκαν είναι αυτός της *συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης*. Ο δείκτης αυτός συνδυάζει δύο δείκτες, την *αποτελεσματικότητα καταστολής* και την *τοξικότητα*, δείκτες οι οποίοι συνήθως παρουσιάζουν αντίθετη τάση με την ποσότητα του πολυμερούς. Αν και πολύ σημαντικός, αυτός ο δείκτης δεν χρησιμοποιείται συχνά στη βιβλιογραφία. Η Ομάδα μας είχε μελετήσει αυτό το δείκτη σε προηγούμενες μελέτες μεταφοράς DNA<sup>[250]</sup> τον οποίο ονόμασε “overall transfection efficiency”. Σε αυτά τα πειράματα επιμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, διάφορα αστεροειδή πολυμερή βασισμένα στο DMAEMA. Σε αντίθεση με την παρούσα Εργασία, όλα τα αστεροειδή πολυμερή που μελετήθηκαν παρουσίαζαν ένα καθαρό μέγιστο στη συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης με αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς που χρησιμοποιείται.

Στην παρούσα Εργασία παρατηρήθηκε ότι ο δείκτης της *συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης* παρουσίαζε διάφορες τάσεις, συμπεριλαμβανομένης μείωσης, αύξησης και μεγίστου με αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς. Να σημειωθεί, όμως, ότι η καλύτερη *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* που επιτυγχάνοταν από κάθε αστεροειδές ομοπολυμερές ήταν συγκρίσιμη με την τιμή του εμπορικά διαθέσιμου και δαπανηρού αντιδραστηρίου Lipofectamine, αποδεικνύοντας έτσι την *αποτελεσματικότητα* αυτών των αστεροειδών ομοπολυμερών.

Περαιτέρω, μελετώντας την επίδραση του ΒΠ του βραχίονα των αστεροειδών ομοπολυμερών παρατηρήθηκε ότι η *καταστολή της EGFP*, στις περισσότερες περιπτώσεις, αυξανόταν με αύξηση του ΒΠ. Όπως έχει αναφερθεί, η αύξηση του ΒΠ του βραχίονα αντιστοιχούσε στην αύξηση της στερεοχημικής σταθεροποίησης των αστεροειδών ομοπολυμερών, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις αντιστοιχούσε και στην αύξηση του MB των αστεροειδών ομοπολυμερών. Έτσι, η αύξηση της *καταστολής της EGFP* με το ΒΠ μπορεί να αποδοθεί στα πιο σταθερά ομοπολυμερή. Αυτή η παρατήρηση βρίσκεται σε συμφωνία με τη μελέτη του Crayson και συνεργατών<sup>[31(a)]</sup> οι οποίοι επίσης παρατήρησαν αύξηση της καταστολής ενός γονιδίου με αύξηση του MB των διακλαδώσεων της PEI. Παρόμοια παρατήρηση αναφέρθηκε και από τους Liu και συνεργάτες<sup>[64]</sup> οι οποίοι

παρατήρησαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης καθώς το MB και ο βαθμός αποακετυλίωσης (deacetylation) των χιτοσανών αυξανόταν. Αυτό το απέδωσαν στο σχηματισμό περισσότερο σταθερών και συμπαγών συμπλόκων χιτοσάνης / siRNA.

Η τοξικότητα σε όλες τις περιπτώσεις αυξανόταν με αύξηση του ΒΠ του βραχίονα. Αυτό αποδόθηκε στην αποσταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών από μεγαλύτερα σωματίδια τα οποία οδηγούσαν σε γρηγορότερους ρυθμούς θανάτου των κυττάρων. Αυτό συμφωνεί με τη μελέτη των Cai και συνεργατών<sup>[258]</sup> οι οποίοι παρατήρησαν αύξηση της τοξικότητας με αύξηση του MB (αύξηση μήκους αλυσίδας) για μία σειρά γραμμικών ομοπολυμερών βασισμένων στο DMAEMA. Μερικές άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία που χρησιμοποιούν PEI επιβεβαιώνουν τις πιο πάνω παρατηρήσεις. Συγκριμένα, ο Thomas και συνεργάτες<sup>[19(β)]</sup> παρατήρησαν αύξηση στην κυτταροτοξικότητα καθώς το MB γραμμικής και αποακετυλιωμένης (deacylated) PEI αυξανόταν. Επίσης, ο Zintchenko και συνεργάτες<sup>[47]</sup> παρατήρησαν υψηλά ποσοστά τοξικότητας διακλαδισμένης PEI και έτσι χρησιμοποίησαν κάποια τροποποιημένα παράγωγά της, όπου και παρατήρησαν ελάττωση της τοξικότητας κατά 10 φορές σε σύγκριση με την PEI (χωρίς τροποποιήσεις). Να αναφερθεί, επίσης, ότι και από την Ομάδα μας<sup>[250]</sup> σε προηγούμενα πειράματα παρατηρήθηκε αύξηση της τοξικότητας με αύξηση του MB των αστεροειδών ομοπολυμερών.

Έχοντας κατά νου ότι καθώς ο ΒΠ του βραχίονα αυξάνεται, το κλάσμα μάζας του διασταυρωτή ελαττώνεται και, έτσι, το κλάσμα μάζας των βραχιόνων (σε DMAEMA) αυξάνεται. Και αφού η σύγκριση γίνεται υπό σταθερή ποσότητα ομοπολυμερούς, αυτό σημαίνει ότι το αστεροειδές ομοπολυμερές με το μεγαλύτερο ΒΠ βραχίονα περιείχε περισσότερο DMAEMA (περισσότερο θετικό φορτίο) κατά την επιμόλυνση, το οποίο εξηγεί τόσο την *αύξηση της καταστολής της EGFP* όσο και την *τοξικότητα*.

Παρατηρήθηκε ότι με αύξηση του MB η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης* ακολουθούσε, τις περισσότερες φορές, την ίδια τάση με την *καταστολή της EGFP*, επιβεβαιώνοντας έτσι τη μεγάλη επίδραση της σταθεροποίησης και του MB των αστεροειδών ομοπολυμερών στην *αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης*.

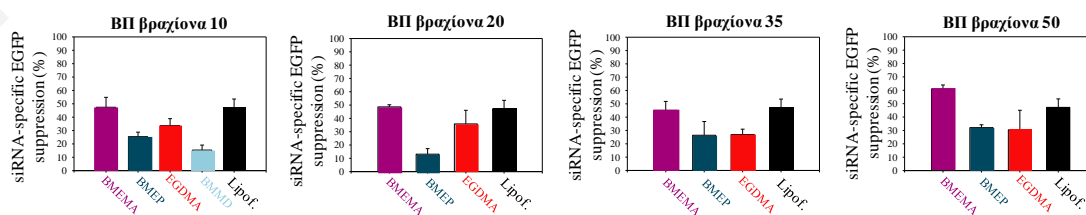
Συγκρίνοντας τα αστεροειδή πολυμερή με τα αντίστοιχα γραμμικά παρατηρήθηκε, με εξαίρεση το μεγαλύτερο γραμμικό ομοπολυμερές DMAEMA<sub>50-linear</sub>, ότι όλα τα γραμμικά ομοπολυμερή δεν παρουσίαζαν αξιόλογη καταστολή της EGFP. Για παράδειγμα, συγκρίνοντας το δεύτερο αστεροειδές ομοπολυμερές με ΒΠ βραχίονα 20 από τη σειρά του BMEMA (DMAEMA<sub>20</sub>-BMEMA<sub>4-star</sub>) με το μεγαλύτερο γραμμικό ομοπολυμερές DMAEMA<sub>50-linear</sub>, τα οποία παρουσίαζαν παρόμοια MB, παρατηρήθηκε

ότι παρά το ίδιο MB, αυτά παρουσίαζαν διαφορές στην αποτελεσματικότητα μεταφοράς siRNA και στην τοξικότητα. Στην πραγματικότητα, τα αστεροειδή ομοπολυμερή φαίνονταν να ήταν λιγότερο τοξικά από τα αντίστοιχα γραμμικά. Η χαμηλή αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης των γραμμικών ομοπολυμερών βρίσκεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Lee και συνεργατών<sup>[253]</sup> οι οποίοι χρησιμοποίησαν γραμμικά ομοπολυμερή του DMAEMA τα οποία είχαν MB 20 000 g mol<sup>-1</sup>.

Από αυτά τα πειράματα επιμόλυνσης είναι ξεκάθαρο ότι τα αστεροειδή ομοπολυμερή είναι καλύτερα αντιδραστήρια επιμόλυνσης από τα αντίστοιχα γραμμικά ομοπολυμερή. Η καλύτερη αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης των αστεροειδών ομοπολυμερών μπορεί να αποδοθεί στην αστεροειδή δομή τους η οποία συμβάλλει στο σχηματισμό περισσότερων συμπαγών συμπλόκων τα οποία είναι ικανά να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, ενώ, παράλληλα, προστατεύουν ικανοποιητικά το siRNA από την αποικοδόμησή του λόγω της παρουσίας πρωτεολυτικών ένζυμων στο κυτταρόπλασμα.

Τελειώνοντας, θα πραγματοποιηθεί μία σύγκριση της αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών. Στο Σχήμα 3.32 παρουσιάζονται οι τιμές της βέλτιστης συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης για κάθε ΒΠ βραχίονα για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή, ενώ στο Σχήμα 3.33 φαίνονται οι αντίστοιχες τοξικότητες για κάθε βέλτιστη τιμή για όλους τους ΒΠ βραχίονα για όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή. Στα σχήματα με μωβ χρώμα παρουσιάζονται τα πολυμερή του BMEMA, με μπλε του BMEP, με μαύρο ανοιχτό του BMMD και με κόκκινο του EGDMA. Με μαύρο χρώμα φαίνονται οι τιμές που αφορούν το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο Lipofectamine.

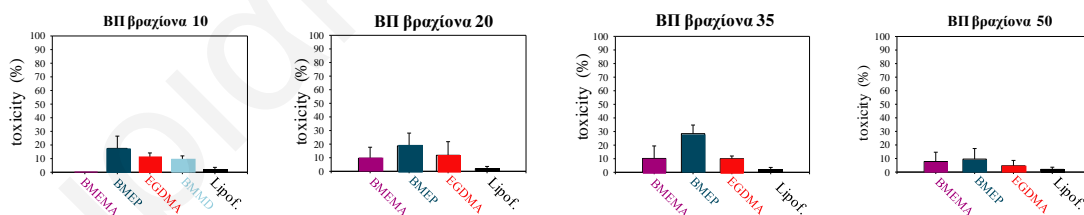
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.32 για όλους τους ΒΠ βραχίονα πιο αποτελεσματικά αστεροειδή ομοπολυμερή είναι αυτά του διασταυρωτή BMEMA. Για ΒΠ βραχίονα 10, δεύτερα πιο αποτελεσματικά αστεροειδή ομοπολυμερή είναι αυτά του EGDMA, ακολουθούν αυτά του BMEP και, τέλος, του BMMD. Για ΒΠ βραχίονα 20 παρατηρείται και πάλι η ίδια τάση, ενώ για ΒΠ βραχίονα 35 και 50 τα αστεροειδή ομοπολυμερή του BMEP είναι περίπου το ίδιο αποτελεσματικά με αυτά του EGDMA.



**Σχήμα 3.32:** Βέλτιστη συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης για κάθε ΒΠ βραχίονα για όλες τις σειρές αστεροειδών ομοπολυμερών που συντέθηκαν.

Συγκρίνοντας τις τοξικότητες των τεσσάρων σειρών αστεροειδών ομοπολυμερών (Σχήμα 3.33) παρατηρούμε ότι τα περισσότερα τοξικά αστεροειδή ομοπολυμερή είναι αυτά του BMEP, ακολουθούμενα από αυτά του EGDMA και του BMMD (στην περίπτωση του ΒΠ βραχίονα 10), ενώ τα αστεροειδή ομοπολυμερή του BMEMA είναι τα λιγότερα τοξικά. Βέβαια να αναφερθεί ότι για τις βέλτιστες ποσότητες, η τοξικότητα σε καμία περίπτωση δεν ξεπερνούσε το 20%.

Από αυτή τη σύγκριση φαίνεται ότι τα αστεροειδή ομοπολυμερή του BMEMA είναι τα καλύτερα οχήματα μεταφοράς siRNA, αποδεικνύοντας έτσι ότι ο διασταυρωτής BMEMA είναι ο καλύτερος διασταυρωτής που συντέθηκε. Μάλιστα, σε όλες τις περιπτώσεις είναι το ίδιο αποτελεσματικά ή και καλύτερα από το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο Lipofectamine. Αυτό μπορεί να αποδοθεί, καταρχήν, στο ότι σχηματίζει τα λιγότερα τοξικά πολυμερή αλλά και στο ότι φορτίζεται θετικά, σε αντίθεση με αυτόν του EGDMA και BMMD, με αποτέλεσμα να συμπλοκοποιείται πιο εύκολα με το siRNA και να σχηματίζει πιο συμπαγή σύμπλοκα βοηθώντας έτσι στην αποτελεσματικότερη επιμόλυνση. Συγκρινόμενος με τον εμπορικά διαθέσιμο EGDMA, ο υδρόφιλος χαρακτήρας του BMEMA φαίνεται να είναι μία παράμετρος η οποία συμβάλλει θετικά κατά την επιμόλυνση. Ένας επιπρόσθετος λόγος στον οποίο μπορεί να αποδοθεί η αποτελεσματικότητα αυτού του διασταυρωτή είναι η μεγάλη καθαρότητά του, αφού από τους τρεις νέους διασταυρωτές ήταν ο μόνος που μπορούσε να αποσταχθεί (και αποστάχτηκε). Οι άλλοι δύο διασταυρωτές κατά την απόσταξη τους πολυμερίζονταν και έπηζαν.



**Σχήμα 3.33:** Τιμές τοξικότητας για τις τιμές της βέλτιστης συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης για κάθε ΒΠ βραχίονα για όλες τις σειρές αστεροειδών ομοπολυμερών που συντέθηκαν.

Συμπερασματικά μπορεί να λεχθεί με βεβαιότητα ότι τα αστεροειδή ομοπολυμερή μπορούν να αποτελέσουν καινούργια, αποτελεσματικά και μη δαπανηρά αντιδραστήρια μεταφοράς siRNA σε *in vitro* συνθήκες, συμβάλλοντας έτσι στην άμβλυνση του τεράστιου προβλήματος της μεταφοράς του siRNA στα κύτταρα-στόχο.

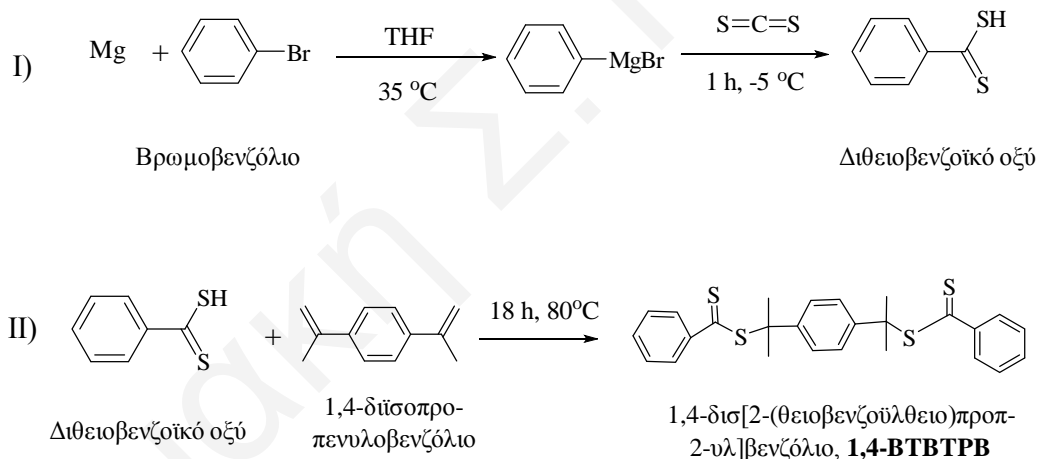


### 3.5 Σύνθεση Πολυμερικών Πλεγμάτων

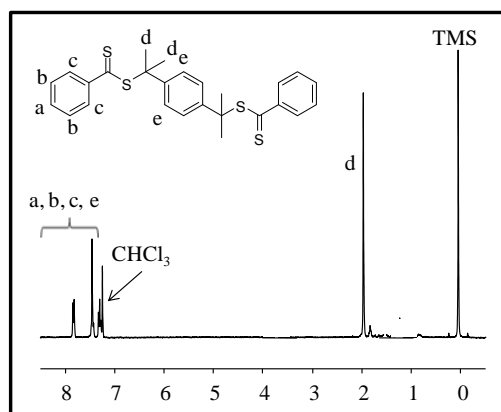
Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή συντέθηκαν επίσης και δύο σειρές πολυμερικών πλεγμάτων. Συγκεκριμένα, συντέθηκε μία σειρά αμφιφιλικών ημιφθοριωμένων πολυμερικών πλεγμάτων βασισμένων στα μονομερή DMAEMA και TFEMA, και μία σειρά αμφολυτικών πολυμερικών πλεγμάτων βασισμένων στα μονομερή DMAEMA και MAA.

#### 3.5.1 Σύνθεση Μορίου Μεταφοράς Αλυσίδας 1,4-BTBTPB

Η σύνθεση του CTA 1,4-BTBTPB πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.34. Κατά το πρώτο στάδιο, συντέθηκε και καθαρίστηκε το διθειοβενζοϊκό οξύ το οποίο λήφθηκε σε απόδοση 68.0%. Κατά το δεύτερο στάδιο, το διθειοβενζοϊκό οξύ αντέδρασε με το 1,4-διϊσοπροπενυλοβενζόλιο, δίνοντας το 1,4-BTBTPB. Το τελευταίο, μετά από τον καθαρισμό του, λήφθηκε σε απόδοση 53%, ενώ η δομή του επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ , όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.35.



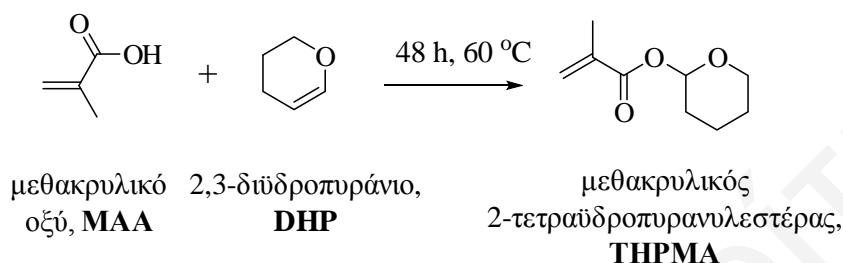
**Σχήμα 3.34:** Χημικές αντιδράσεις σύνθεσης του CTA 1,4-BTBTPB.



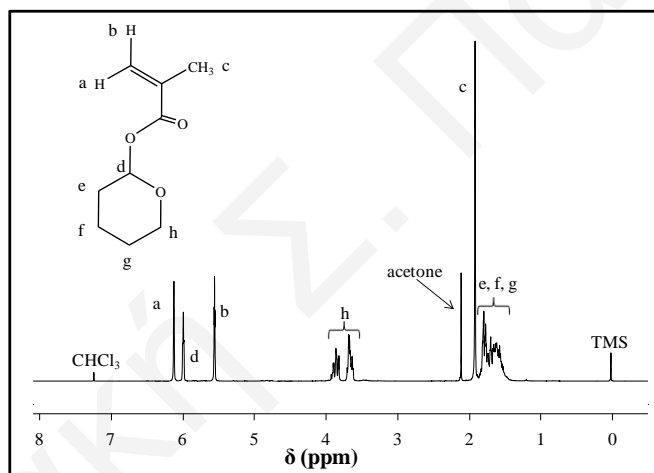
**Σχήμα 3.35:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του CTA 1,4-BTBTPB σε  $\text{CDCl}_3$ .

### 3.5.2 Σύνθεση του Μονομερούς THPMA

Το μονομερές THPMA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των αμφολυτικών πλεγμάτων, συντέθηκε σε ένα στάδιο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.36. Το THPMA λήφθηκε σε απόδοση 90%, ενώ η δομή του επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ . Στο Σχήμα 3.37 δίνεται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του THPMA σε  $\text{CDCl}_3$ .



Σχήμα 3.36: Αντίδραση σύνθεσης του μονομερούς THPMA.



Σχήμα 3.37: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του THPMA σε  $\text{CDCl}_3$ .

### 3.5.3 Προσδιορισμός της Βέλτιστης Γραμμομοριακής Αναλογίας Διασταύρωσης

Πριν από τη σύνθεση των πολυμερικών πλεγμάτων, βρέθηκε η βέλτιστη γραμμομοριακή αναλογία διασταυρωτή : CTA για τη διασύνδεση των αλυσίδων σε πλέγμα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ομοπολυμερών πλεγμάτων του  $\text{DMAEMA}_{100}$  στα οποία μεταβαλλόταν η γραμμομοριακή αναλογία  $\text{EGDMA} : \text{CTA}$  από 2 : 1 σε 8 : 1. Για τα πλέγματα αυτά, καταγραφόταν ο χρόνος που χρειαζόταν για να σχηματιστούν (να πήξουν). Στον Πίνακα 3.22 δίνονται οι μετατροπές των  $\text{DMAEMA}$  και  $\text{EGDMA}$ , τα MB, οι ΔΠ και οι ΒΠ των γραμμικών προπομπών του  $\text{DMAEMA}$ , καθώς και ο χρόνος πήξης του κάθε πλέγματος.

Παρατηρήθηκε ότι για γραμμομοριακή αναλογία 2 : 1 δεν σχηματιζόταν πλέγμα, ενώ για αναλογία 4 : 1 χρειαζόνταν περισσότερες από 8 ώρες. Για αναλογίες 6 : 1 και 8 : 1

χρειάζονταν 3.5 και 3.3 ώρες, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ταυτόχρονα ότι, με αύξηση της ποσότητας του EGDMA, αυξανόταν και το ποσοστό μετατροπής του. Έτσι, με αυτά τα δεδομένα, σαν βέλτιστη γραμμομοριακή αναλογία διασταύρωσης EGDMA : CTA λήφθηκε η 6 : 1, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση όλων των πολυμερικών πλεγμάτων.

**Πίνακας 3.22:** Μετατροπές μονομερούς, μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και χρόνος πήξης των πλεγμάτων του ομοπολυμερούς του DMAEMA για διάφορες γραμμομοριακές αναλογίες EGDMA : CTA.

Α/Α	EGDMA : CTA	% Μετατροπή DMAEMA		Μετατροπή EGDMA <sup>1</sup>	Αποτελέσματα GPC			Χρόνος πήξης (h)
		GPC	<sup>1</sup> H-NMR		$M_n$	ΔΠ	ΒΠ DMAEMA	
1	2 : 1	75.4	75.6	80.9	11700	1.6	72	όχι πλέγμα
2	4 : 1	94.3	93.9	93.0	16900	1.6	105	8-24
3	6 : 1	94.2	91.7	93.4	16000	1.5	99	3.5
4	8 : 1	81.0	83.0	97.4	15900	1.4	98	3.3

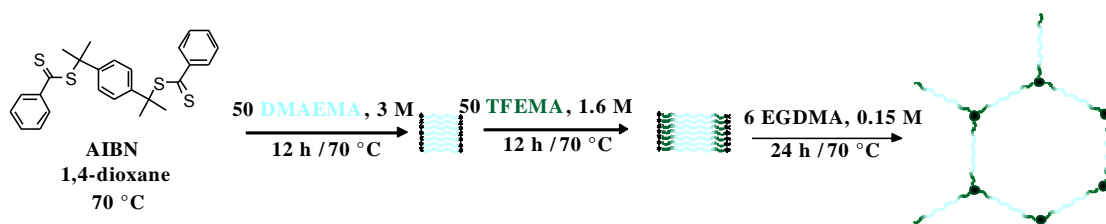
<sup>1</sup>H μετατροπή υπολογίστηκε από τα “early” extractables με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR.

### 3.5.4 Ημιφθοριωμένα Αμφιφιλικά Πλέγματα DMAEMA-TFEMA

Στην παρούσα Εργασία συντέθηκαν πέντε αμφιφιλικά ημιφθοριωμένα πολυμερικά πλέγματα διασυνδεδεμένα στα άκρα και ένα τυχαία διασταυρωμένο αμφιφιλικό πλέγμα, βασισμένα στα μονομερή DMAEMA (υδρόφιλο μονομερές) και TFEMA (υδρόφοβο-ημιφθοριωμένο μονομερές). Συντέθηκαν, επίσης, δύο ομοπολυμερή πλέγματα διασυνδεδεμένα στα άκρα βασισμένα στα μονομερή DMAEMA και TFEMA. Η σύνθεση των πολυμερικών πλεγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο RAFT. Για τους πολυμερισμούς χρησιμοποιήθηκε το 1,4-BTBTPB σαν CTA, το AIBN σαν εκκινήτης και το 1,4-διοξάνιο σαν διαλύτης. Συντέθηκαν τρία πλέγματα διασυνδεδεμένα στα άκρα βασισμένα στα ABA τριαδρομερή συμπολυμερή TFEMA<sub>12.5-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>12.5</sub>, TFEMA<sub>25-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>25</sub> και TFEMA<sub>37.5-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>37.5</sub>, ένα πλέγμα διασυνδεδεμένο στα άκρα βασισμένο στο BAB τριαδρομερές συμπολυμερές DMAEMA<sub>25-grad</sub>-TFEMA<sub>50-grad</sub>-DMAEMA<sub>25</sub>, ένα πλέγμα διασυνδεδεμένο στα άκρα βασισμένο στο τυχαίο συμπολυμερές DMAEMA<sub>50-co</sub>-TFEMA<sub>50</sub>, καθώς και ένα τυχαία διασταυρωμένο ισομοριακό πλέγμα. Συντέθηκαν, επίσης, δύο πλέγματα διασυνδεδεμένα στα άκρα βασισμένα στα ομοπολυμερή DMAEMA<sub>100</sub> και TFEMA<sub>100</sub>. Η σύνθεση όλων των αμφιφιλικών πολυμερικών πλεγμάτων πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές προσθήκες των μονομερών (με την κατάλληλη σειρά) και του διασταυρωτή, ενώ το τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα συντέθηκε με ταυτόχρονο πολυμερισμό μονομερών και διασταυρωτή. Για όλους τους πολυμερισμούς χρησιμοποιήθηκε η βέλτιστη γραμμομοριακή αναλογία διασταύρωσης EGDMA : CTA ίση με 6 : 1, όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως.

Στο Σχήμα 3.38 δίνεται διαγραμματικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του ημιφθοριωμένου αμφιφιλικού πλέγματος EGDMA<sub>3-grad</sub>-TFEMA<sub>25-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>25-grad</sub>-EGDMA<sub>3</sub>. Οι μονάδες του DMAEMA στο Σχήμα χρωματίζονται με ανοιχτό μπλε, ενώ του TFEMA παρουσιάζονται με σκούρο πράσινο χρώμα. Οι μαύροι κύκλοι παριστάνουν τους πυρήνες διασταύρωσης που αποτελούνται από EGDMA. Η σύνθεση περιελάμβανε διαδοχικές προσθήκες των μονομερών και του διασταυρωτή, χωρίς απομόνωση (με καταβύθιση) κάποιου ενδιάμεσου προϊόντος (πολυμερούς), γεγονός που βοήθησε στην καλύτερη διατήρηση των ενεργών κέντρων του πολυμερισμού (διατήρηση “ζωντανού” χαρακτήρα του πολυμερισμού). Αυτή η πειραματική διαδικασία αποφασίστηκε ύστερα από την παρατήρηση ότι έπειτα από την απομόνωση του κάθε ενδιάμεσου προϊόντος του πολυμερισμού (ομοπολυμερή και συμπολυμερή), ο επόμενος πολυμερισμός δεν ήταν ποσοτικός, ενώ για τη διασταύρωση σε

αυτές τις περιπτώσεις απαιτείτο γραμμομοριακή αναλογία EGDMA : CTA μεγαλύτερη από 6 : 1.



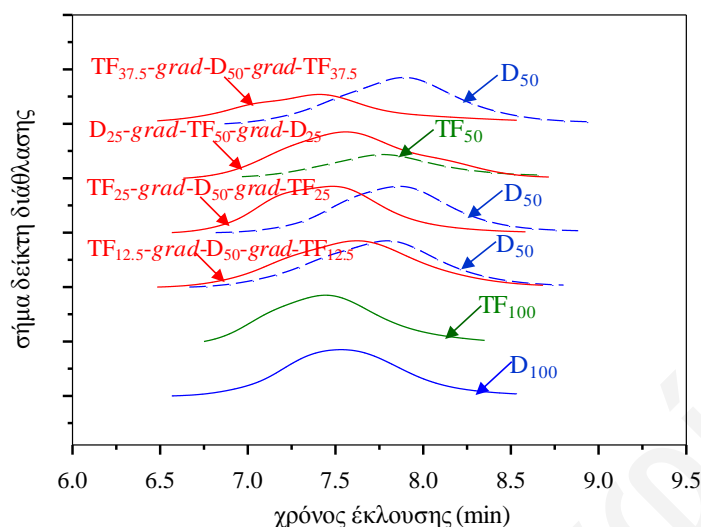
**Σχήμα 3.38:** Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας σύνθεσης του πολυμερικού πλέγματος EGDMA<sub>3</sub>-grad-TFEMA<sub>25</sub>-grad-DMAEMA<sub>50</sub>-grad-TFEMA<sub>25</sub>-grad-EGDMA<sub>3</sub>. Οι μονάδες του DMAEMA χρωματίζονται με ανοικτό μπλε, ενώ οι μονάδες του TFEMA παρουσιάζονται με σκούρο πράσινο. Οι μαύροι κύκλοι παρουσιάζουν τους πυρήνες διασταύρωσης που αποτελούνται από EGDMA.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.38, κατά το πρώτο στάδιο του πολυμερισμού λήφθηκαν γραμμικά ομοπολυμερή του DMAEMA με ενεργά και τα δύο άκρα τους (φαίνονται με αστερίσκους) λόγω της παρουσίας του διδραστικού CTA. Κατά το δεύτερο στάδιο, έγινε η προσθήκη του δεύτερου μονομερούς TFEMA, η οποία οδήγησε στην αύξηση του μήκους της αλυσίδας και στο σχηματισμό του τριαδρομερούς συμπολυμερούς TFEMA-grad-DMAEMA-grad-TFEMA το οποίο έφερε και πάλι δύο ενεργά άκρα. Τελικά, έγινε η προσθήκη του διασταυρωτή EGDMA η οποία οδήγησε στο σχηματισμό ενός τρισδιάστατου πλέγματος μέσω της διασύνδεσης των ενεργών άκρων των αλυσίδων. Να σημειωθεί ότι, κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, σε όλες τις περιπτώσεις το μείγμα του πολυμερισμού ήταν ομοιογενές.

#### 3.5.4.1 Μοριακά Βάρη, Κατανομές Μοριακών Βαρών και Συστάσεις των Γραμμικών Προπομπών

Η επιβεβαίωση της σύνθεσης των γραμμικών προπομπών των πολυμερικών πλεγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας GPC, τα χρωματογραφήματα της οποίας φαίνονται στο Σχήμα 3.39. Στον Πίνακα 3.23 δίνονται οι μετατροπές των μονομερών και του διασταυρωτή, καθώς και τα MB, οι ΔΠ και οι συστάσεις όλων των γραμμικών προπομπών των πολυμερικών πλεγμάτων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR. Στον Πίνακα δίνεται επίσης ο χρόνος σχηματισμού των πλεγμάτων. Από τα χρωματογραφήματα φαίνεται ότι τα MB των τριαδρομέρων συμπολυμερών είναι μεγαλύτερα από αυτά των αντίστοιχων γραμμικών ομοπολυμερών, όπως και ήταν αναμενόμενο. Οι τιμές  $M_n$  των ομοπολυμερών και τριαδρομερών συμπολυμερών βρέθηκαν να είναι πολύ κοντά σε αυτές που αναμενόταν βάσει του λόγου μονομερούς προς CTA. Οι ΔΠ όλων των γραμμικών προπομπών ήταν σχετικά μεγάλοι

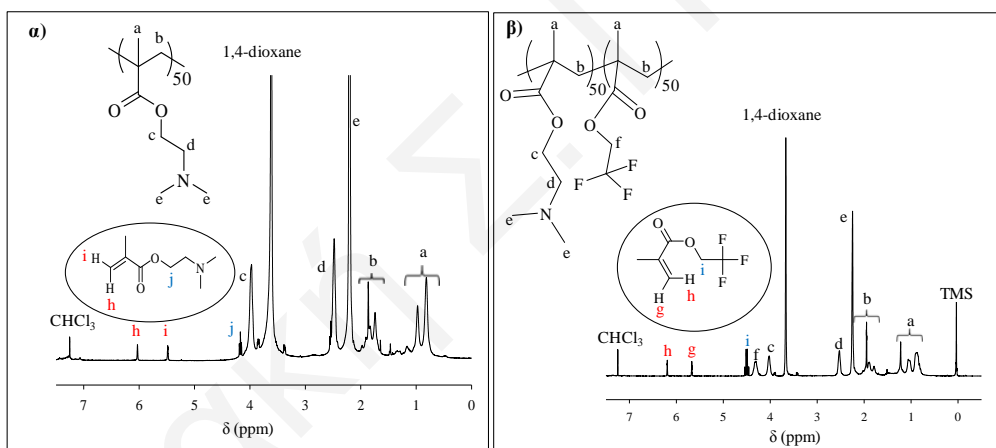
αλλά συγκρίσιμοι με αυτούς άλλων μελετών που έγιναν με χρήση του ίδιου CTA.<sup>[182]</sup>



**Σχήμα 3.39:** Χρωματογραφήματα GPC όλων των γραμμικών προπομπών (ομοπολυμερών και τριαδρομερών συμπολυμερών) των πολυμερικών πλεγμάτων. [D: DMAEMA, TF: TFEMA και E: EGDMA].

Το Σχήμα 3.40(α) παρουσιάζει το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>50</sub>, ενώ το Σχήμα 3.40(β) παραθέτει το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του τριαδρομερούς συμπολυμερούς TFEMA<sub>25-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>25</sub>. Στο φάσμα του τριαδρομερούς συμπολυμερούς παρουσιάζεται μία καινούργια κορυφή στα 4.3 ppm η οποία οφείλεται στα πρωτόνια f του τμήματος του polyTFEMA, επιβεβαιώνοντας έτσι την ενσωμάτωση μονάδων του TFEMA στα άκρα του ομοπολυμερούς του DMAEMA. Να σημειωθεί ότι στο φάσμα του συμπολυμερούς εμφανίζονται και οι δύο κορυφές των ολεφινικών πρωτονίων του TFEMA (κορυφές h και g στα 6.2 και 5.8 ppm, αντίστοιχα), οι οποίες οφείλονται στο μονομερές TFEMA που δεν πολυμερίστηκε. Σύγκριση των εμβαδών των κορυφών f και g επιτρέπει τον υπολογισμό της μετατροπής του μονομερούς TFEMA σε πολυμερές στο ομοπολυμερές και στα συμπολυμερή. Παρομοίως, η μετατροπή του μονομερούς DMAEMA σε πολυμερές (στο ομοπολυμερές και συμπολυμερή) υπολογίστηκε από τα εμβαδά των κορυφών των οξυμεθυλενικών πρωτονίων των polyDMAEMA και DMAEMA στα 3.96 και 4.1 ppm, αντίστοιχα. Οι μετατροπές των μονομερών στα γραμμικά ομοπολυμερή και συμπολυμερή δίνονται στον Πίνακα 3.23 υπό τον τίτλο “Μετατροπές”, στην αντίστοιχη σειρά (του ομοπολυμερούς ή συμπολυμερούς). Οι μετατροπές για τα ομοπολυμερή ήταν πάντα πολύ υψηλές, κυμαινόμενες από 85.7 μέχρι και 95.8% για το DMAEMA, και από 77.3 μέχρι και 99.0% για το TFEMA. Οι μετατροπές στα συμπολυμερή ήταν επίσης υψηλές, κυμαινόμενες από 58.8 μέχρι και

100.0% για το DMAEMA, και από 79.0 μέχρι και 98.5% για το TFEMA. Η χαμηλότερη τιμή για τη μετατροπή του DMAEMA (58.8%) μπορεί να αποδοθεί σε στερεοχημικές παρεμποδίσεις από τα άτομα του φθορίου, αφού σε αυτήν την περίπτωση πρώτα σχηματίστηκε το τμήμα του polyTFEMA. Να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις, οι μετατροπές του μονομερούς στο πρώτο τμήμα του συμπολυμερούς ήταν μεγαλύτερες στο συμπολυμερές σε σύγκριση με το αντίστοιχο ομοπολυμερές, αποδεικνύοντας έτσι την περαιτέρω πρόοδο του πολυμερισμού του πολυμερισμού του πρώτου μονομερούς κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού του δεύτερου μονομερούς, όπως και ήταν αναμενόμενο. Τέλος, οι συστάσεις των συμπολυμερών υπολογίστηκαν από τα εμβαδά των κορυφών των χαρακτηριστικών πρωτονίων των polyTFEMA (κορυφή f) και polyDMAEMA (κορυφή c). Οι υπολογισθείσες συστάσεις δίνονται στην τελευταία στήλη του Πίνακα 3.23 σαν τα % mol του TFEMA, όπου σε όλες τις περιπτώσεις ήταν κοντά στις θεωρητικά αναμενόμενες τιμές.



**Σχήμα 3.40:** Φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  (α) του ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>50</sub> και (β) του τριαδρομερούς συμπολυμερούς TFEMA<sub>25-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-TFEMA<sub>25</sub>.

**Πίνακας 3.23:** Μετατροπές μονομερών και διασταυρωτή, μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και συστάσεις όλων των γραμμικών προπομπών των πολυμερικών πλεγμάτων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR.

A/A	Δομή πολυμερούς <sup>1</sup>	Μετατροπές (%mol)			Χρόνος (min)	Χρόνος πήξης (min)	MB <sub>θεορ.</sub> <sup>2</sup>	Αποτελέσματα GPC		% mol TF	
		TF	D	E				M <sub>n</sub>	ΔΠ	Θεορ.	<sup>1</sup> H-NMR
<b>1</b>	D <sub>100</sub>	-----	85.7	-----	710		16000	15300	1.50	0	0
	E <sub>3-grad</sub> -D <sub>100-grad</sub> -E <sub>3</sub>	-----	91.7	81.7	1440	180	-----	-----	-----	-----	-----
<b>2</b>	TF <sub>100</sub>	99.0	-----	-----	780		17000	16900	1.45	100	100
	E <sub>3-grad</sub> -TF <sub>100-grad</sub> -E <sub>3</sub>	99.2	-----	99.8	1440	180	-----	-----	-----	-----	-----
<b>3</b>	D <sub>50</sub>	-----	94.0	-----	605		8000	9530	1.62	0	0
	TF <sub>12.5-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -TF <sub>12.5</sub>	85.0	100	-----	740		12500	12500	1.66	33.3	22.5
	E <sub>3-grad</sub> -TF <sub>12.5-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -TF <sub>12.5-grad</sub> -E <sub>3</sub>	99.3	100	98.1	1440	435	-----	-----	-----	-----	-----
<b>4</b>	D <sub>50</sub>	-----	95.8	-----	710		8000	8120	1.50	0	0
	TF <sub>25-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -TF <sub>25</sub>	79.0	100	-----	710		17000	20800	1.51	50.0	49.5
	E <sub>3-grad</sub> -TF <sub>25-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -TF <sub>25-grad</sub> -E <sub>3</sub>	99.1	100	97.5	1440	≤ 540	-----	-----	-----	-----	-----
<b>5</b>	TF <sub>50</sub>	77.3	-----	-----	729		9000	9000	1.47	100	100
	D <sub>25-grad</sub> -TF <sub>50-grad</sub> -D <sub>25</sub>	91.2	58.8	-----	696		17000	11600	1.70	50.0	55.2
	E <sub>3-grad</sub> -D <sub>25-grad</sub> -TF <sub>50-grad</sub> -D <sub>25-grad</sub> -E <sub>3</sub>	98.3	96.5	94.3	1440	≤ 540	-----	-----	-----	-----	-----
<b>6</b>	D <sub>50</sub>	-----	87.2	-----	625		8000	9630	1.59	0	0
	TF <sub>37.5-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -TF <sub>37.5</sub>	81.5	99.1	-----	695		21000	20400	1.81	60.0	58.6
	E <sub>3-grad</sub> -TF <sub>37.5-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -TF <sub>37.5-grad</sub> -E <sub>3</sub>	93.6	100	83.5	1440	≤ 540	-----	-----	-----	-----	-----
<b>7</b>	D <sub>50-co</sub> -TF <sub>50</sub>	98.5	98.0	-----	625		17000	14700	1.46	50.0	48.5
	E <sub>3-grad</sub> -(D <sub>50-co</sub> -TF <sub>50</sub> )-grad-E <sub>3</sub>	99.5	99.5	99.5	1440	≤ 425	-----	-----	-----	-----	-----
<b>8</b>	D <sub>50-co</sub> -TF <sub>50-co</sub> -E <sub>6</sub>	99.5	99.5	99.5	1440	130-610	-----	-----	-----	-----	-----

<sup>1</sup>D: DMAEMA, TF: TFEMA και E: EGDMA.<sup>2</sup>MB<sub>θεορ.</sub>=[Μονομερούς] / [CTA] × (μετατροπή μονομερούς) × MB<sub>μονομερούς</sub> + MB<sub>CTA</sub>.



Οι τελικές μετατροπές των μονομερών των DMAEMA και TFEMA στα συμπολυμερή υπολογίστηκαν από τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  των “early” extractables χρησιμοποιώντας τις ίδιες κορυφές με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για τους υπολογισμούς για τα γραμμικά συμπολυμερή, όπως αναφέρεται προηγουμένως. Τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  των “early” extractables χρησιμοποιήθηκαν επίσης για τον υπολογισμό της μετατροπής του διασταυρωτή EGDMA στα πλέγματα, ο οποίος βασίστηκε στην κορυφή των οξυμεθυλενικών πρωτονίων του (μη-πολυμερισμένου) EGDMA στα 4.40 ppm. Αυτές οι μετατροπές δίνονται επίσης στον Πίνακα 3.23. Παρατηρήθηκε ότι οι μετατροπές των τριών αυτών συστατικών στα πλέγματα ήταν υψηλές. Συγκριμένα, οι τιμές αυτές ήταν μεταξύ 96.5 και 100.0% για το DMAEMA, 93.6 και 99.5% για το TFEMA, και 81.7 και 99.8% για το EGDMA. Να σημειωθεί ότι ανάμεσα στα τρία πλέγματα των ABA τριαδρομέρων συμπολυμερών, το πλέγμα του ABA τριαδρομερούς συμπολυμερούς με το μεγαλύτερο συνολικό ΒΠ (= 125) παρουσίασε τη χαμηλότερη μετατροπή του EGDMA, ενώ το πλέγμα ABA τριαδρομερούς συμπολυμερούς με το μικρότερο συνολικό ΒΠ (= 75) παρουσίασε την υψηλότερη μετατροπή EGDMA.

#### **3.5.4.2 Μοριακά Βάρη και Συστάσεις της Μη-Ενσωματωθείσας Πολυμερικής Μάζας (extractables)**

Μετά τη σύνθεσή τους, όλα τα πολυμερικά πλέγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ποσοστό των extractables τους. Τα αποτελέσματα αυτά δίνονται στον Πίνακα 3.24 στον οποίο περιλαμβάνεται το ποσοστό των extractables και η σύστασή τους (από φάσματα  $^1\text{H-NMR}$ ). Στον Πίνακα δίνονται, επίσης, τα  $M_n$  και οι ΔΠ των extractables όπως λήφθηκαν με χρωματογραφία GPC. Το ποσοστό των extractables κυμαινόταν από 2.8 μέχρι και 21.0%, με το μεγαλύτερο ποσοστό να αντιστοιχεί στο πλέγμα με το μεγαλύτερο τμήμα polyTFEMA (με συνολικό ΒΠ=75). Οι σχετικά χαμηλές τιμές των extractables απέδειξαν την επιτυχή ενσωμάτωση των γραμμικών προπομών στα πλέγματα. Στην περίπτωση του πλέγματος EGDMA<sub>3</sub>-grad-TFEMA<sub>37.5</sub>-grad-DMAEMA<sub>50</sub>-grad-TFEMA<sub>37.5</sub>-grad-EGDMA<sub>3</sub>, το υψηλό ποσοστό των extractables (21%) αποδόθηκε στο μεγάλο μήκος του γραμμικού προπομού το οποίο δυσκόλευε την ενσωμάτωσή του στο πολυμερικό πλέγμα.

Από τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  των extractables φάνηκε ότι αποτελούνταν κυρίως από γραμμικές αλυσίδες (polyDMAEMA, polyTFEMA ή poly(DMAEMA-grad-TFEMA)), οι οποίες πιθανόν να τερματίστηκαν πριν από την προσθήκη του διασταυρωτή. Μάλιστα, η σύσταση των extractables σε polyDMAEMA ήταν μεγαλύτερη στις περιπτώσεις όπου το DMAEMA πολυμεριζόταν πρώτο. Οι τιμές  $M_n$  των κύριων κορυφών των extractables οι

οι οποίες φαίνονται στον Πίνακα 3.24, σε κάποιες περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερες και σε κάποιες άλλες μικρότερες από αυτές των γραμμικών προπομπών τους (Πίνακας 3.23). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα  $M_n$  των κύριων κορυφών των πλεγμάτων 1, 3, 4 και 6 (Πίνακας 3.24) ήταν μικρότερα από τα αντίστοιχα των γραμμικών προπομπών τους, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην πρόωρη απενεργοποίηση αυτών των αλυσίδων με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ενσωματωθούν στο πλέγμα. Αντίθετα, τα  $M_n$  των πλεγμάτων 2, 5 και 7 (Πίνακας 3.24) ήταν μεγαλύτερα από αυτά των γραμμικών προπομπών τους. Το τελευταίο μπορεί να αποδοθεί στη διασύνδεση των ελεύθερων πολυμερικών αλυσίδων κατά τη διάρκεια της εξαγωγής των extractables.

**Πίνακας 3.24:** Ποσοστό, σύσταση και μοριακά βάρη της μη-ενσωματωθείσας πολυμερικής μάζας (extractables) των πολυμερικών πλεγμάτων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .

A/A	Δομή πλέγματος <sup>1</sup>	Extract. (% κ.μ)	Σύσταση Extractables (% mol) ( $^1\text{H-NMR}$ )					Αποτελέσματα GPC	
			PD <sup>2</sup>	PTF <sup>3</sup>	D	TF	E	$M_n$	$\Delta\Pi$
1	$E_3\text{-grad-D}_{100}\text{-grad-E}_3$	10.5	99.6	---	---	---	0.4	6410	1.7
								134	1.0
2	$E_3\text{-grad-TF}_{100}\text{-grad-E}_3$	8.7	---	100	---	---	---	17600	1.7
								459	1.1
3	$E_3\text{-grad-TF}_{12.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{12.5}\text{-grad-E}_3$	5.7	69.9	18.5	---	---	11.6	11000	1.8
								197	1.1
4	$E_3\text{-grad-TF}_{25}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{25}\text{-grad-E}_3$	9.0	62.1	36.0	---	---	1.9	12700	1.7
								300	1.1
5	$E_3\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-TF}_{50}\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-E}_3$	7.6	36.8	49.7	5.8	---	7.7	19600	2.4
								260	1.0
6	$E_3\text{-grad-TF}_{37.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{37.5}\text{-grad-E}_3$	21.0	49.7	47.3	---	0.7	2.3	19300	5.4
								108	1.0
7	$E_3\text{-grad-(D}_{50}\text{-co-TF}_{50})\text{-grad-E}_3$	5.9	52.1	47.7	---	---	0.2	19900	1.5
8	$D_{50}\text{-co-TF}_{50}\text{-co-E}_6$	2.8	32.1	49.4	---	18.5	---	---	---

<sup>1</sup>D: DMAEMA, TF: TFEMA και E: EGDMA.

<sup>2</sup>PD: polyDMAEMA.

<sup>3</sup>PTF: polyTFEMA.

### 3.5.4.3 Βαθμοί Διόγκωσης

Όλα τα αμφιφιλικά πλέγματα DMAEMA-TFEMA καθώς και τα δύο ομοπολυμερή πλέγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς τους ΒΔ τους σε THF και νερό διαφόρων pH.

Οι ΒΔ των αμφιφιλικών πλεγμάτων σε THF δίνονται στον Πίνακα 3.25. Παρατηρήθηκε ότι οι ΒΔ των πολυμερικών πλεγμάτων σε THF ελαττώνονταν με αύξηση της περιεκτικότητας των πλεγμάτων σε TFEMA, γεγονός που απέδειξε τη μεγαλύτερη

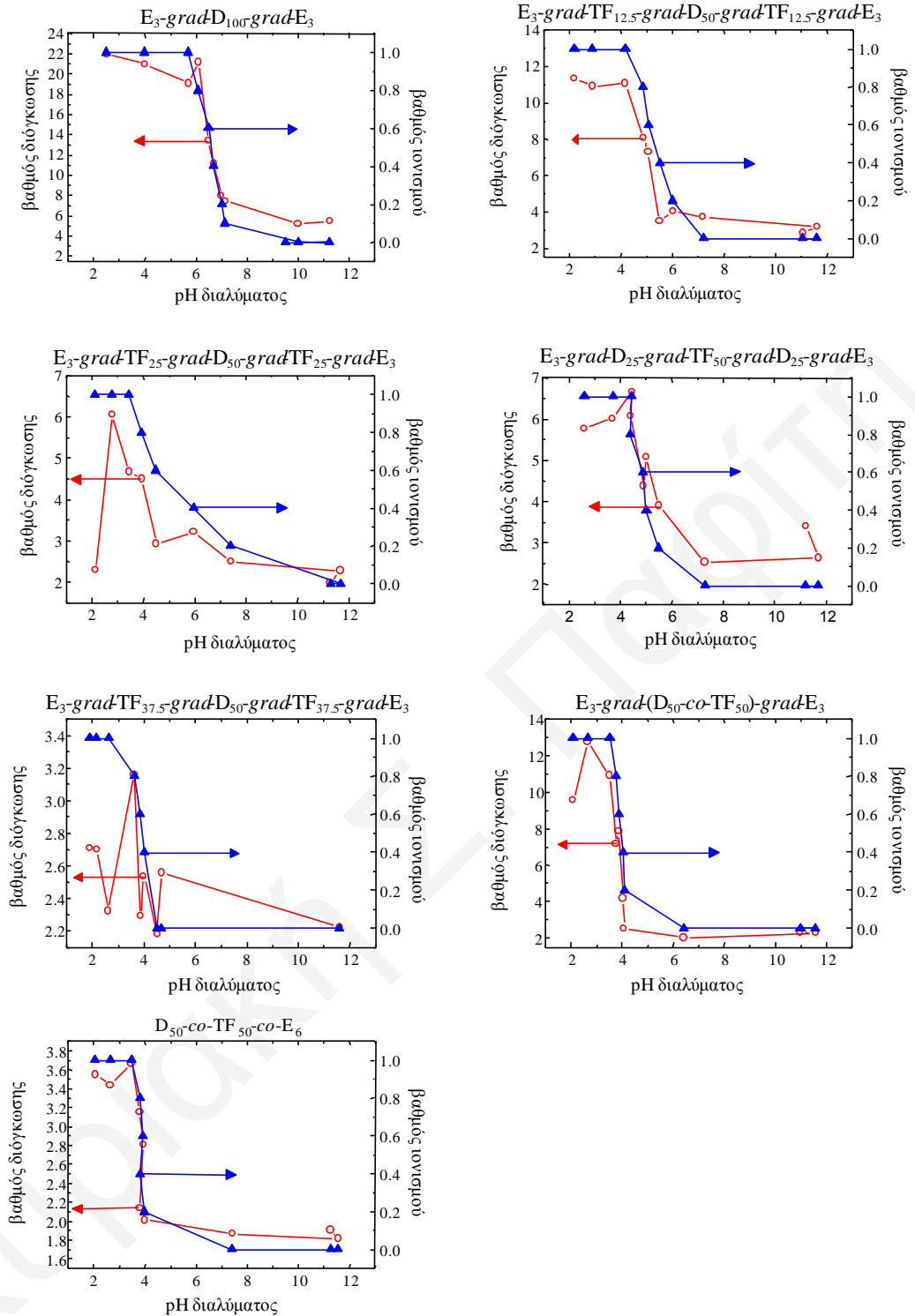
συγγένεια των ομάδων του DMAEMA για το THF σε σύγκριση με αυτές του ημιφθοριωμένου μονομερούς TFEMA. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το πλέγμα του ABA τριαδρομερούς συμπολυμερούς είχε μικρότερο ΒΔ από το πλέγμα του BAB τριαδρομερούς συμπολυμερούς, γεγονός που αποδόθηκε στη διευθέτηση των μονάδων του TFEMA, το οποίο παρουσιάζει μικρότερη συγγένεια προς το THF από ότι το DMAEMA, στο εξωτερικό τμήμα του τριαδρομερούς. Τέλος, το τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα παρουσίασε το χαμηλότερο ΒΔ από όλα τα πλέγματα, γεγονός που αποδόθηκε στην ευρεία κατανομή του μήκους των αλυσίδων μεταξύ των διασταυρώσεων. Η παρουσία μερικών μικρότερων αλυσίδων (σε σύγκριση με το μέσο μήκος των αλυσίδων) καθόριζε τη διόγκωση του πλέγματος, οδηγώντας στο μικρότερο ΒΔ.

**Πίνακας 3.25:** Βαθμοί διόγκωσης σε THF όλων των πολυμερικών πλεγμάτων.

A/A	Δομή πλέγματος <sup>1</sup>	Βαθμοί διόγκωσης σε THF
1	$E_3\text{-grad-D}_{100}\text{-grad-E}_3$	$6.3 \pm 0.2$
2	$E_3\text{-grad-TF}_{100}\text{-grad-E}_3$	$6.4 \pm 0.5$
3	$E_3\text{-grad-TF}_{12.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{12.5}\text{-grad-E}_3$	$8.9 \pm 0.5$
4	$E_3\text{-grad-TF}_{25}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{25}\text{-grad-E}_3$	$5.3 \pm 0.6$
5	$E_3\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-TF}_{50}\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-E}_3$	$11.5 \pm 0.6$
6	$E_3\text{-grad-TF}_{37.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{37.5}\text{-grad-E}_3$	$3.8 \pm 0.9$
7	$E_3\text{-grad-(D}_{50}\text{-co-TF}_{50})\text{-grad-E}_3$	$4.2 \pm 0.4$
8	$D_{50}\text{-co-TF}_{50}\text{-co-E}_6$	$2.6 \pm 0.2$

<sup>1</sup>D: DMAEMA, TF: TFEMA και E: EGDMA.

Όλα τα αμφιφιλικά πλέγματα χαρακτηρίστηκαν και ως προς τους ΒΔ τους σε νερό με διάφορα pH. Οι πειραματικά υπολογισθέντες ΒΔ σε νερό διαφόρων pH και οι ΒΙ όλων των πολυμερικών πλεγμάτων σχεδιάστηκαν συναρτήσει του pH (Σχήμα 3.41). Η θεωρητική δομή του κάθε πολυμερικού πλέγματος δίνεται πάνω από κάθε γράφημα. Για όλα τα πλέγματα φαίνεται ότι το γράφημα του ΒΔ συναρτήσει του pH ακολουθεί το αντίστοιχο γράφημα του ΒΙ συναρτήσει του pH, επιβεβαιώνοντας έτσι τη σημασία του φορτίου στη διόγκωση των πλεγμάτων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα, όλα τα αμφιφιλικά πλέγματα διογκώνονταν για pH μικρότερο του 7 λόγω της



**Σχήμα 3.41:** Βαθμοί διόγκωσης και βαθμοί ιονισμού συναρτήσει του pH για όλα τα αμφιφιλικά πολυμερικά πλέγματα DMAEMA-TFEMA.

παρουσίας των ομάδων DMAEMA, μίας τριτοταγούς αμίνης η οποία ιονίζεται σε όξινα pH ( $\text{pH} < 8$ ).<sup>[183-185]</sup> Ο ιονισμός των ομάδων του DMAEMA είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των θετικά φορτισμένων αλυσίδων του πλέγματος αλλά και τη δημιουργία ωσμωτικής πίεσης από τη συσσώρευση αντισταθμιστικών ιόντων έναντι των φορτίων.<sup>[186,187]</sup> Και οι δύο αυτοί παράγοντες ωθούν

το πλέγμα σε διόγκωση. Όπως φαίνεται στο Σχήμα, οι ΒΔ των πλεγμάτων παρουσίαζαν μέγιστες τιμές για  $pH \sim 3.0-4.5$ , ακολουθούμενες από μείωση σε χαμηλότερες τιμές  $pH$  ( $pH \sim 2$ ). Η μείωση των ΒΔ αποδόθηκε στην αύξηση της ιοντικής ισχύος η οποία προερχόταν από τη σχετικά υψηλή συγκέντρωση  $HCl$  σε αυτές τις όξινες συνθήκες.

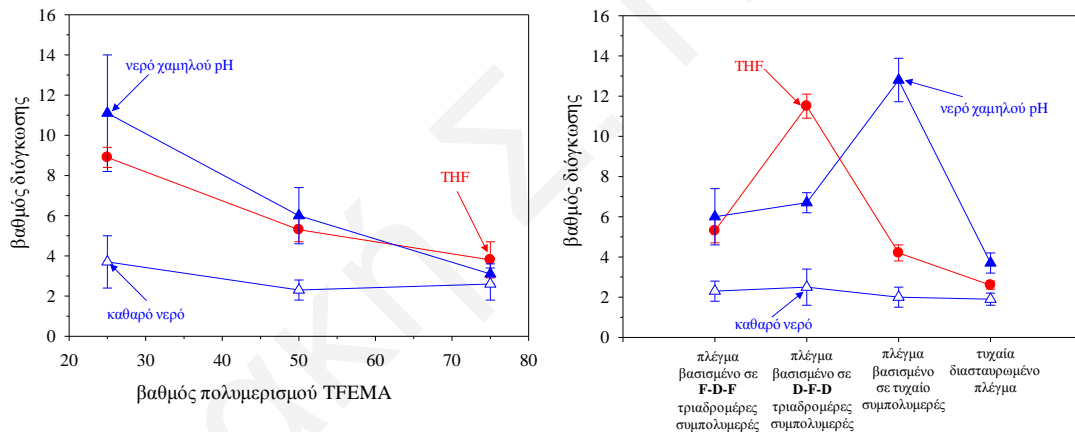
Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για το ομοπολυμερές πλέγμα του DMAEMA, το οποίο για  $pH$  μικρότερο του 7 άρχισε να διογκώνεται.

Από τα γραφήματα του Σχήματος 3.41 εξήχθησαν οι τιμές για τους ΒΔ σε καθαρό και όξινο νερό, οι οποίοι δίνονται στον Πίνακα 3.26 και παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.42 σε συνάρτηση με τη σύσταση και την αρχιτεκτονική των πολυμερικών πλεγμάτων. Στο Σχήμα 3.42 φαίνονται επίσης και οι ΒΔ των αμφιφιλικών πλεγμάτων σε THF. Συγκεκριμένα, το Σχήμα 3.42(α) παρουσιάζει την επίδραση της σύστασης, ενώ το Σχήμα 3.42(β) παρουσιάζει την επίδραση της αρχιτεκτονικής του πολυμερικού πλέγματος στους ΒΔ. Από το Σχήμα 3.42(α) παρατηρείται ότι οι ΒΔ σε καθαρό και όξινο νερό ελαττώνονταν με αύξηση της σύστασης των πλεγμάτων σε TFEMA. Συγκεκριμένα, οι ΒΔ σε νερό χαμηλού  $pH$  ελαττώνονταν από 11.1 σε 2.3 καθώς ο ΒΠ των τμημάτων TFEMA αυξανόταν από 25 σε 75. Αυτοί οι ΒΔ ήταν μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους ΒΔ σε καθαρό νερό λόγω του πλήρους ιονισμού των τμημάτων του DMAEMA σε χαμηλά  $pH$ . Από το Σχήμα 3.42(β) παρατηρείται ότι οι ΒΔ όλων των ισομοριακών αμφιφιλικών πλεγμάτων σε καθαρό νερό ήταν σταθεροί, με τιμές γύρω στο  $\sim 2$ . Σε όξινο νερό, ο ΒΔ του  $E_3\text{-grad-TF}_{25}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{25}\text{-grad-E}_3$  (ABA) πλέγματος ήταν λίγο χαμηλότερος από αυτόν του  $E_3\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-TF}_{50}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-E}_3$  (BAB) πλέγματος λόγω της ύπαρξης των υδρόφοβων μονάδων TF δίπλα από τους υδρόφοβους πυρήνες του EGDMA, οδηγώντας έτσι σε ενίσχυση της υδροφοβικότητας του πλέγματος. Το αμφιφιλικό πλέγμα του τυχαίου συμπολυμερούς ( $E_3\text{-grad-(D}_{50}\text{-co-TF}_{50})\text{-grad-E}_3$ ) σε όξινο νερό παρουσίασε μεγαλύτερο ΒΔ από τα άλλα ισομερή αμφιφιλικά πλέγματα λόγω της τυχαίας κατανομής των μονάδων του υδρόφοβου TFEMA στο συμπολυμερές, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν αρκετά μεγάλες συνεχόμενες αλληλουχίες μονάδων TFEMA που θα οδηγούσαν σε μικροφασικό διαχωρισμό, περιορισμό της έκτασης των αλυσίδων και μείωση του ΒΔ. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι το τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα ( $D_{50}\text{-co-TF}_{50}\text{-co-E}_6$ ) παρουσίασε τους χαμηλότερους ΒΔ σε όξινο νερό σε σύγκριση με τα άλλα ισομερή πλέγματα, γεγονός που αποδόθηκε στην ευρεία κατανομή του μήκους των αλυσίδων ανάμεσα στα κέντρα διασταύρωσης με κυρίαρχη την επίδραση των μικρότερων αλυσίδων.

**Πίνακας 3.26:** Βαθμοί διόγκωσης σε THF, σε καθαρό και όξινο νερό, καθώς και φαινόμενα pK των επαναλαμβανόμενων μονάδων του DMAEMA όλων των πολυμερικών πλεγμάτων.

Α/Α	Δομή πλέγματος <sup>1</sup>	Βαθμοί διόγκωσης			Τιμές pKs
		THF	Καθαρό νερό	Όξινο νερό	
1	E <sub>3</sub> -grad-D <sub>100</sub> -grad-E <sub>3</sub>	6.3 ± 0.2	5.2 ± 1.6	22.0 ± 1.6	7.0
2	E <sub>3</sub> -grad-TF <sub>100</sub> -grad-E <sub>3</sub>	6.4 ± 0.5	2.3 ± 0.3	-----	-----
3	E <sub>3</sub> -grad-TF <sub>12.5</sub> -grad-D <sub>50</sub> -grad-TF <sub>12.5</sub> -grad-E <sub>3</sub>	8.9 ± 0.5	3.7 ± 1.3	11.1 ± 2.9	5.3
4	E <sub>3</sub> -grad-TF <sub>25</sub> -grad-D <sub>50</sub> -grad-TF <sub>25</sub> -grad-E <sub>3</sub>	5.3 ± 0.6	2.3 ± 0.5	2.7 ± 1.4	5.0
5	E <sub>3</sub> -grad-D <sub>25</sub> -grad-TF <sub>50</sub> -grad-D <sub>25</sub> -grad-E <sub>3</sub>	11.5 ± 0.6	2.5 ± 0.9	6.7 ± 0.5	5.3
6	E <sub>3</sub> -grad-TF <sub>37.5</sub> -grad-D <sub>50</sub> -grad-TF <sub>37.5</sub> -grad-E <sub>3</sub>	3.8 ± 0.9	2.6 ± 0.8	2.3 ± 0.5	3.9
7	E <sub>3</sub> -grad-(D <sub>50</sub> -co-TF <sub>50</sub> )-grad-E <sub>3</sub>	4.2 ± 0.4	2.0 ± 0.5	10.9 ± 5.2	4.0
8	D <sub>50</sub> -co-TF <sub>50</sub> -co-E <sub>6</sub>	2.6 ± 0.2	1.9 ± 0.3	3.7 ± 0.5	3.9

<sup>1</sup>D: DMAEMA, TF: TFEMA και E: EGDMA.



**Σχήμα 3.42:** Βαθμοί διόγκωσης των πολυμερικών πλεγμάτων σε THF, σε καθαρό νερό και νερό χαμηλού pH σε σχέση με (α) τη σύσταση του αμφιφιλικού πλέγματος και (β) την αρχιτεκτονική του αμφιφιλικού πλέγματος.

#### 3.5.4.4 Φαινόμενα pK

Οι φαινόμενες τιμές pK για τις μονάδες του DMAEMA λήφθηκαν από τα γραφήματα του ΒΙ σε σχέση με το pH ως το pH για 50% ιονισμό. Οι φαινόμενες τιμές των pK για όλα τα αμφιφιλικά πλέγματα και το ομοπολυμερές πλέγμα του DMAEMA παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.26. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν να ελαττώνονται ελαφρώς με την αύξηση της περιεκτικότητας του πλέγματος σε TFEMA. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες από την Ομάδα μας για αμφιφιλικά πλέγματα.<sup>[190]</sup> Η αύξηση της περιεκτικότητας σε TFEMA οδηγεί σε αύξηση της υδροφοβικότητας, σε μείωση της τοπικής διηλεκτρικής σταθεράς και σε ενίσχυση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων

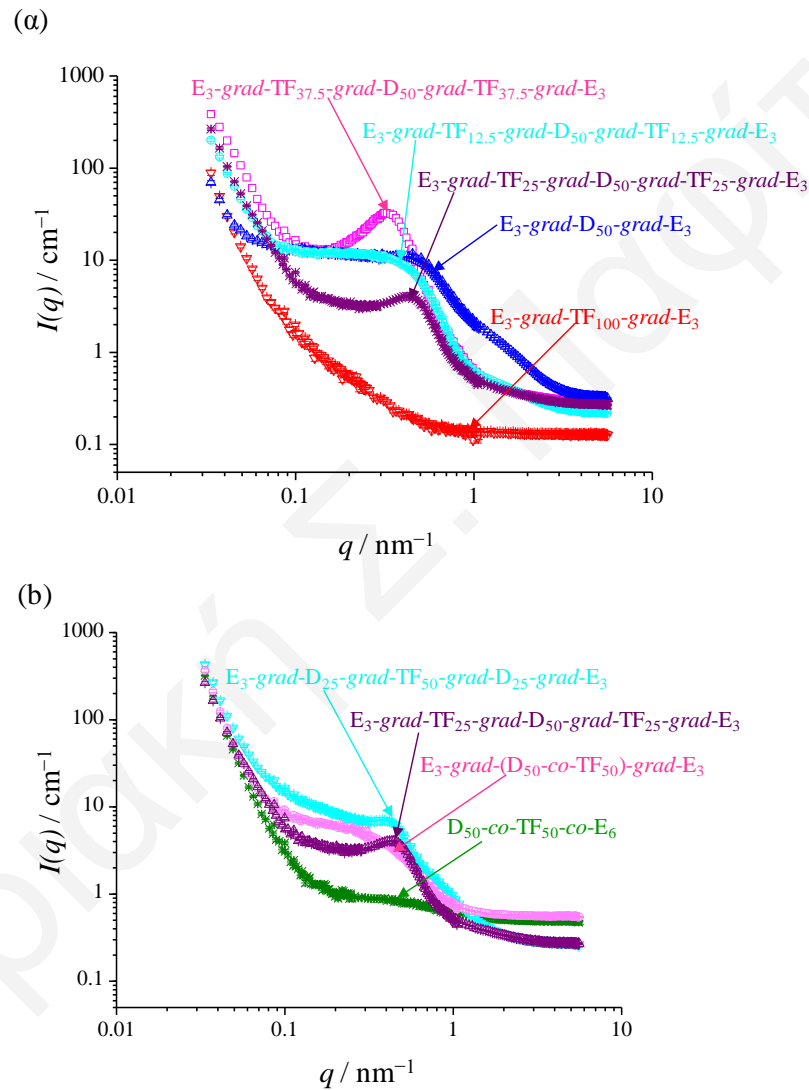
Coulomb, με αποτέλεσμα να γίνεται πιο δύσκολος ο ιονισμός του πλέγματος.<sup>[186]</sup> Αναλυτικότερα, όλες οι τιμές των  $pK$  κυμαίνονταν από 3.9 μέχρι και 5.3, τιμές οι οποίες ήταν χαμηλότερες από την αντίστοιχη τιμή για το πιο υδρόφιλο ομοπολυμερές πλέγμα του DMAEMA ( $pK \sim 7$ ). Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες από την Ομάδα μας σε αμφιφιλικά πλέγματα.<sup>[190]</sup>

#### 3.5.4.5 Δομή Πλεγμάτων (SANS)

Η δομή όλων των αμφιφιλικών πλεγμάτων, καθώς και των δύο πλεγμάτων των ομοπολυμερών, προσδιορίστηκε με χαρακτηρισμό με SANS. Στο Σχήμα 3.43 φαίνονται τα προφίλ (φάσματα) SANS όλων των ημιφθοριωμένων αμφιφιλικών πλεγμάτων σε αφόρτιστη κατάσταση σε  $D_2O$ , ενώ στον Πίνακα 3.27 δίνονται οι αποστάσεις μεταξύ των κέντρων σκέδασης οι οποίες υπολογίστηκαν από τα μέγιστα στα προφίλ SANS. Το Σχήμα 3.43(α) απεικονίζει την επίδραση της σύστασης του αμφιφιλικού πλέγματος, ενώ το Σχήμα 3.43(β) παρουσιάζει την επίδραση της αρχιτεκτονικής του αμφιφιλικού πλέγματος.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.43(α), τα προφίλ SANS των δύο πιο υδρόφοβων πολυμερικών πλεγμάτων  $E_3\text{-grad-TF}_{25}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{25}\text{-grad-E}_3$  και  $E_3\text{-grad-TF}_{37.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{37.5}\text{-grad-E}_3$  παρουσίασαν ευδιάκριτες απλές κορυφές, ενώ το προφίλ του λιγότερο υδρόφοβου πολυμερικού πλέγματος  $E_3\text{-grad-TF}_{12.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{12.5}\text{-grad-E}_3$  και αυτό του υδρόφιλου πλέγματος του ομοπολυμερούς του DMAEMA ( $E_3\text{-grad-D}_{100}\text{-grad-E}_3$ ) δεν παρουσίασαν κορυφή αλλά ώμο. Τέλος, το προφίλ SANS του πλέγματος του ομοπολυμερούς του TFEMA δεν παρουσίασε ούτε κορυφή ούτε ώμο. Η παρουσία κορυφών από τα δύο περισσότερο υδρόφοβα πλέγματα βασισμένα σε τριαδρομερή συμπολυμερή αποδόθηκε στην οργάνωση των ημιφθοριωμένων υδρόφοβων τμημάτων σε μεγαλύτερους υδρόφοβους τομείς, οδηγώντας έτσι σε νανοφασικό διαχωρισμό. Η παρουσία ώμου στην περίπτωση του πλέγματος  $E_3\text{-grad-TF}_{12.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{12.5}\text{-grad-E}_3$  μπορεί, επίσης, να αποδοθεί στο σχηματισμό υδρόφοβων συστάδων (clusters) οι οποίες όμως ήταν μικρότερες από προηγουμένως λόγω των μικρότερων υδρόφοβων τμημάτων. Η παρουσία ώμου στην περίπτωση του πλέγματος του ομοπολυμερούς του DMAEMA<sub>100</sub> μπορεί να αποδοθεί στη σκέδαση από τους υδρόφοβους πυρήνες του διασταυρωτή EGDMA. Η απουσία κορυφής στην περίπτωση του  $E_3\text{-grad-TF}_{100}\text{-grad-E}_3$  οφειλόταν στην έλλειψη αντίθεσης σκέδασης, αφού αυτό το πλέγμα δεν απορροφούσε  $D_2O$ , λόγω της μεγάλης υδροφοβικότητάς του. Για τα δύο πιο υδρόφοβα πλέγματα, παρατηρήθηκε ότι καθώς η περιεκτικότητα σε polyTFEMA αυξανόταν, οι κορυφές γίνονταν πιο έντονες ενώ μετακινούνταν σε μικρότερες τιμές του  $q$ , αποδεικνύοντας έτσι τον ισχυρότερο

νανοφασικό διαχωρισμό και τις μεγαλύτερες αποστάσεις ανάμεσα στα κέντρα σκέδασης, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, οι αποστάσεις μεταξύ των κέντρων σκέδασης υπολογιζόμενες ως  $2\pi/q_{\text{μέγιστο}}$  ήταν 13.9 και 19.0 nm (Πίνακας 3.27) για τα πλέγματα 4 και 6, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι μικρότερες από το τοπογραφικό μήκος των αντίστοιχων αλυσίδων που είναι 25 και 31 nm, όπως άλλωστε αναμενόταν με βάση την αυθόρμητη συσπείρωση των αλυσίδων αφενός, και αφετέρου με βάση την αυτοσυσσωμάτωση και το νανοφασικό διαχωρισμό τους στο νερό.



**Σχήμα 3.43:** Προφίλ SANS όλων των πλεγμάτων σε  $D_2O$ . (α) Επίδραση της σύστασης του πολυμερικού πλέγματος. (β) Επίδραση της αρχιτεκτονικής του πολυμερικού πλέγματος.

Το Σχήμα 3.43(β) παραστάνει τα προφίλ SANS των τεσσάρων ισομοριακών, ισομερών πλεγμάτων, τα οποία έχουν την ίδια σύσταση αλλά διαφορετική δομή. Στο Σχήμα φαίνεται ότι τα προφίλ των πλεγμάτων βασισμένων στο ABA (TF-D-TF) και στο BAB (D-TF-D) τριαδρομερή συμπολυμερή παρουσίαζαν απλές κορυφές, το πλέγμα του τυχαίου



συμπολυμερούς παρουσίαζε ώμο, ενώ το τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα δεν παρουσίαζε ούτε ώμο ούτε κορυφή. Το πλέγμα του D-TF-D τριαδρομερούς συμπολυμερούς παρουσίαζε λίγο μεγαλύτερη απόσταση ανάμεσα στα κέντρα σκέδασης σε σύγκριση με το πλέγμα του TF-D-TF τριαδρομερούς συμπολυμερούς λόγω του λιγότερου αποτελεσματικού νανοφασικού διαχωρισμού στο πρώτο πλέγμα. Αυτό οφειλόταν στην τοποθέτηση των υδρόφοβων ημιφθοριωμένων τμημάτων στο κέντρο του τριαδρομερούς συμπολυμερούς, μακριά από τον πυρήνα του υδρόφοβου EGDMA. Η παρουσία ώμου στην περίπτωση του πλέγματος του τυχαίου συμπολυμερούς αποδόθηκε στη σκέδαση από τους υδρόφοβους πυρήνες του EGDMA, ενώ η απουσία οποιασδήποτε κορυφής στην περίπτωση του τυχαία διασταυρωμένου πλέγματος αποδόθηκε στην τυχαία κατανομή των υδρόφοβων ομάδων στις αλυσίδες του πλέγματος, τόσο TFEMA όσο και EGDMA, αποκλείοντας έτσι το νανοφασικό διαχωρισμό. Το τελευταίο βρίσκεται σε συμφωνία με άλλες εργασίες σε αμφιφιλικά πλέγματα (σε D<sub>2</sub>O) οι οποίες παρουσιάστηκαν από την Ομάδα μας.<sup>[189]</sup>

**Πίνακας 3.27.** Τιμές για τα  $q_{\text{μέγιστο}}$  και αποστάσεις μεταξύ των κέντρων σκέδασης σε D<sub>2</sub>O όπως αυτά προσδιορίστηκαν με το SANS, καθώς και βαθμοί διόγκωσης σε καθαρό νερό (H<sub>2</sub>O) όλων των πολυμερικών πλεγμάτων.

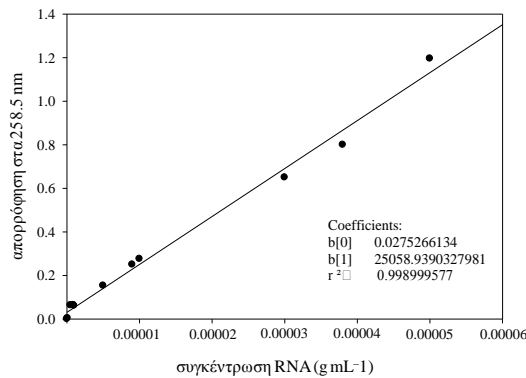
a/a	Δομή πλέγματος <sup>1</sup>	$q_{\text{μεγ.}} \text{ (nm}^{-1}\text{)}$	$d \text{ (nm)}$	$B\Delta_{\text{καθαρό νερό}}$
1	$E_3\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-E}_3$	όχι κορυφή	-----	5.2
2	$E_3\text{-grad-TF}_{100}\text{-grad-E}_3$	όχι κορυφή	-----	2.3
3	$E_3\text{-grad-TF}_{12.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{12.5}\text{-grad-E}_3$	ώμος	-----	3.7
4	$E_3\text{-grad-TF}_{25}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{25}\text{-grad-E}_3$	0.452	13.9	2.5
5	$E_3\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-TF}_{50}\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-E}_3$	0.404	15.5	2.5
6	$E_3\text{-grad-TF}_{37.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-TF}_{37.5}\text{-grad-E}_3$	0.330	19.0	2.2
7	$E_3\text{-grad-(D}_{50}\text{-co-TF}_{50})\text{-grad-E}_3$	όχι κορυφή	-----	2.0
8	$D_{50}\text{-co-TF}_{50}\text{-co-E}_6$	όχι κορυφή	-----	1.9

<sup>1</sup>D: DMAEMA, TF: TFEMA και E: EGDMA.

#### 3.5.4.6 Προσρόφιση RNA στα Πλέγματα

Όλα τα ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν RNA. Τα πειράματα προσρόφισης διεξήχθησαν σε ουδέτερο, όξινο και βασικό pH. Η απορρόφιση στα 258.5 nm του υπερκείμενου του πλέγματος διαλύματος RNA για κάθε πλέγμα λαμβανόταν περιοδικά.

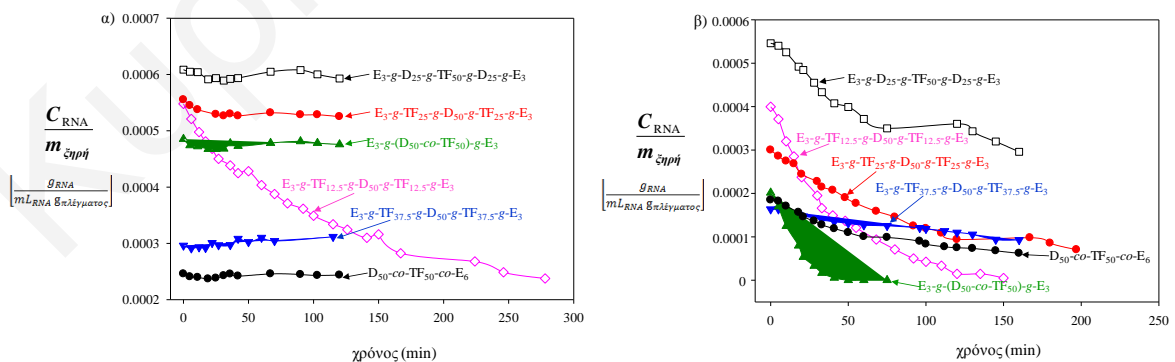
Αρχικά, έγινε βαθμονόμηση για τη συγκέντρωση υδατικών διαλυμάτων του RNA. Η καμπύλη βαθμονόμησης φαίνεται στο Σχήμα 3.44 όπου δίνονται επίσης η κλίση (b1) και η αποτέμνουσα της ευθείας με τον άξονα των ψ (b0).



**Σχήμα 3.44:** Καμπύλη βαθμονόμησης RNA: απορρόφηση διαλυμάτων RNA στα 258.5 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Δεδομένου ότι το RNA υδρολύεται πολύ εύκολα σε υδατικά διαλύματα, κατά τα πειράματα προσρόφησης μελετήθηκε η υδρόλυσή του. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα RNA (συγκέντρωσης  $3.0 \cdot 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$ ) όπου και μετρήσαν η απορρόφηση του στα 258.5 nm για 3 μέρες. Από τις μετρήσεις παρατηρήθηκε ότι η απορρόφηση του ήταν σταθερή γύρω στο 0.6, αποδεικνύοντας έτσι ότι δεν υδρολύοταν στις συνθήκες των πειραμάτων προσρόφησης.

Στο Σχήμα 3.45 δίνονται τα διαγράμματα της συγκέντρωσης του RNA προς την ξηρή μάζα του πλέγματος συναρτήσει του χρόνου σε ουδέτερο και όξινο pH για όλα τα ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα. Τα διαγράμματα σε βασικό pH δεν αναπαρίστανται αφού για κανένα πλέγμα δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε απορρόφηση (Πίνακας 3.28).



**Σχήμα 3.45:** Συγκέντρωση RNA προς την ξηρή μάζα πλέγματος συναρτήσει του χρόνου για όλα τα ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα: (α) σε ουδέτερο και (β) σε όξινο pH.

Από την επεξεργασία των δεδομένων των καμπυλών του Σχήματος 3.45 προέκυψε ο Πίνακας 3.28. Συγκεκριμένα, στον Πίνακα δίνονται το ποσοστό της προσρόφησης, το ποσοστό της προσρόφησης ως προς την ξηρή και υγρή μάζα του πλέγματος, καθώς και η μεταβολή της συγκέντρωσης ως προς την ξηρή μάζα του πλέγματος.

**Πίνακας 3.28:** Τιμές για το ποσοστό προσρόφησης, το ποσοστό προσρόφησης διά την ξηρή και την υγρή μάζα του πλέγματος, καθώς και τη μεταβολή της συγκέντρωσης διά την ξηρή μάζα του πλέγματος, όπως αυτές υπολογίστηκαν από την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων της προσρόφησης RNA από όλα τα ημιφθοριωμένα αμιφιλικά πλέγματα.

A/A	Δομή πλέγματος <sup>1</sup>	$\frac{\Delta A}{A_0}$	$\frac{\Delta A}{A_0 \times m_{\text{ξηρή πλέγμ.}}} [\text{g}_{\text{πλέγμ.}}^{-1}]$	$\frac{\Delta A}{A_0 \times m_{\text{υγρή πλέγμ.}}} [\text{g}_{\text{πλέγμ.}}^{-1}]$	$\frac{\Delta C}{m_{\text{ξηρή πλέγμ.}} \left[ \frac{g_{\text{RNA}}}{\text{mL}_{\text{RNA}} \text{ πλέγματος}} \right]}$
<b>Διάλυμα RNA ουδέτερο pH</b>					
1	E <sub>3</sub> -g-D <sub>100</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.50	7.98	1.53	2.58e <sup>-4</sup>
2	E <sub>3</sub> -g-TF <sub>12.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-TF <sub>12.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.45	7.26	1.95	3.10e <sup>-4</sup>
3	E <sub>3</sub> -g-TF <sub>25</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-TF <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.04	0.70	0.30	3.00e <sup>-5</sup>
4	E <sub>3</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-TF <sub>50</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.02	0.37	0.14	1.57e <sup>-5</sup>
5	E <sub>3</sub> -g-TF <sub>37.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-TF <sub>37.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
6	E <sub>3</sub> -g-(D <sub>50</sub> -co-TF <sub>50</sub> )-g-E <sub>3</sub>	0.02	0.22	0.11	9.54e <sup>-6</sup>
7	D <sub>50</sub> -co-TF <sub>50</sub> -co-E <sub>6</sub>	0	0	0	0
<b>Διάλυμα RNA όξινο pH</b>					
1	E <sub>3</sub> -g-D <sub>100</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.52	9.30	1.25	2.20e <sup>-5</sup>
2	E <sub>3</sub> -g-TF <sub>12.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-TF <sub>12.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.57	9.24	0.85	3.94e <sup>-4</sup>
3	E <sub>3</sub> -g-TF <sub>25</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-TF <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.44	5.37	2.35	2.29e <sup>-4</sup>
4	E <sub>3</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-TF <sub>50</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.26	5.85	1.01	2.50e <sup>-4</sup>
5	E <sub>3</sub> -g-TF <sub>37.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-TF <sub>37.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.25	1.66	0.71	7.07e <sup>-5</sup>
6	E <sub>3</sub> -g-(D <sub>50</sub> -co-TF <sub>50</sub> )-g-E <sub>3</sub>	0.56	4.59	3.37	1.96e <sup>-4</sup>
7	D <sub>50</sub> -co-TF <sub>50</sub> -co-E <sub>6</sub>	0.38	2.88	0.91	1.22e <sup>-4</sup>
<b>Διάλυμα RNA βασικό pH</b>					
1	E <sub>3</sub> -g-D <sub>100</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
2	E <sub>3</sub> -g-TF <sub>12.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-TF <sub>12.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
3	E <sub>3</sub> -g-TF <sub>25</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-TF <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
4	E <sub>3</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-TF <sub>50</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
5	E <sub>3</sub> -g-TF <sub>37.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-TF <sub>37.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
6	E <sub>3</sub> -g-(D <sub>50</sub> -co-TF <sub>50</sub> )-g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
7	D <sub>50</sub> -co-TF <sub>50</sub> -co-E <sub>6</sub>	0	0	0	0

<sup>1</sup>D: DMAEMA, TF: TFEMA και E: EGDMA.

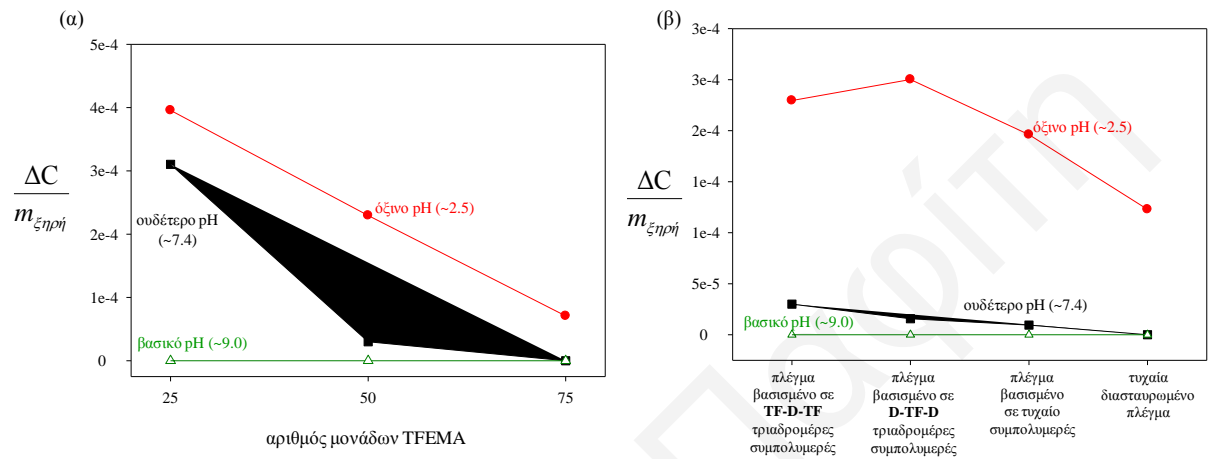
Από τον Πίνακα και τα διαγράμματα παρατηρήθηκε ότι όλα τα αμφιφιλικά πλέγματα σε όξινο pH προσροφούσαν μεγαλύτερο ποσοστό RNA. Αυτό αποδόθηκε στην πλήρη θετική φόρτιση του DMAEMA, η οποία οδηγούσε στην ανάπτυξη ηλεκτροστατικών ελκτικών αλληλεπιδράσεων Coulomb με το αρνητικά φορτισμένο RNA.

Περαιτέρω, η προσρόφηση του RNA από τα ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα μελετήθηκε σε σχέση με τη σύσταση και την αρχιτεκτονική των αμφιφιλικών πλεγμάτων. Στο Σχήμα 3.46 δίνεται η μεταβολή της συγκέντρωσης ( $\Delta C$ ) ως προς την ξηρή μάζα (η οποία αντιστοιχεί στο ποσοστό προσρόφησης ανά μονάδα μάζας) του πλέγματος συναρτήσει της περιεκτικότητας σε TFEMA (Σχήμα 3.46 (α)) και της αρχιτεκτονικής (Σχήμα 3.46 (β)).

Από το Σχήμα 3.46 (α) παρατηρήθηκε καταρχήν ότι σε βασικό pH κανένα πλέγμα δεν προσροφούσε RNA λόγω της μη φόρτισης των ομάδων του DMAEMA, σε αντίθεση με τη μερική ή πλήρη φόρτιση του DMAEMA σε ουδέτερο και όξινο pH, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε καθαρά ότι σε όξινο pH η προσρόφηση και για τα τρία πλέγματα ήταν μεγαλύτερη από ό,τι σε ουδέτερο pH, όπως αναμενόταν, λόγω της πλήρους φόρτισης των ομάδων του DMAEMA σε σύγκριση με τη μερική φόρτιση σε ουδέτερο pH. Τόσο σε όξινο όσο και σε ουδέτερο pH παρατηρήθηκε ότι η προσρόφηση ελαττωνόταν με αύξηση της περιεκτικότητας του πλέγματος σε TFEMA που ισοδυναμεί με ελάττωση της περιεκτικότητας σε DMAEMA που προκαλεί ελάττωση της ηλεκτροστατικής έλξης με το RNA.

Το Σχήμα 3.46 (β) παρουσιάζει την επίδραση της αρχιτεκτονικής στην προσρόφηση RNA. Από τα γραφήματα φαίνεται καθαρά ότι σε βασικό περιβάλλον κανένα πλέγμα δεν προσροφά και πάλι λόγω της μη φόρτισης του RNA. Σε ουδέτερο pH παρατηρήθηκε ότι η επίδραση της αρχιτεκτονικής στην προσρόφηση ήταν πολύ μικρή, αφού και τα τέσσερα ισομοριακά πλέγματα παρουσιάζουν πολύ κοντινές τιμές. Σε όξινο περιβάλλον παρατηρήθηκε ότι τα δύο καλώς-ορισμένα τριαδρομέρη πλέγματα παρουσίαζαν υψηλότερη προσρόφηση από τα άλλα δύο, λόγω της παρουσίας των μονάδων του DMAEMA σε ξεχωριστά τμήματα. Συγκρίνοντας τα δύο πλέγματα των τριαδρομέρων συμπολυμερών, παρατηρήθηκε ότι αυτό του D-TF-D, στο οποίο οι μονάδες του DMAEMA βρίσκονται στο εξωτερικό τμήμα του συμπολυμερούς, παρουσίαζε ελαφρά μεγαλύτερη προσρόφηση από αυτό του TF-D-TF συμπολυμερούς στο οποίο οι μονάδες του DMAEMA βρίσκονται στο κεντρικό τμήμα του τριαδρομερούς. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στις ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις του DMAEMA όταν αυτό βρίσκεται στο εξωτερικό τμήμα των τριαδρομερών με το RNA. Το πλέγμα του τυχαίου συμπολυμερούς

καθώς και το τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα παρουσίαζαν χαμηλότερες προσροφήσεις. Το τελευταίο αποδόθηκε στην τυχαία κατανομή των μονάδων του TFEMA και DMAEMA στο συμπολυμερές και στην ευρεία κατανομή του μήκους των αλυσίδων ανάμεσα στα κέντρα διασταύρωσης για το πλέγμα του τυχαίου συμπολυμερούς και το τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα, αντίστοιχα.

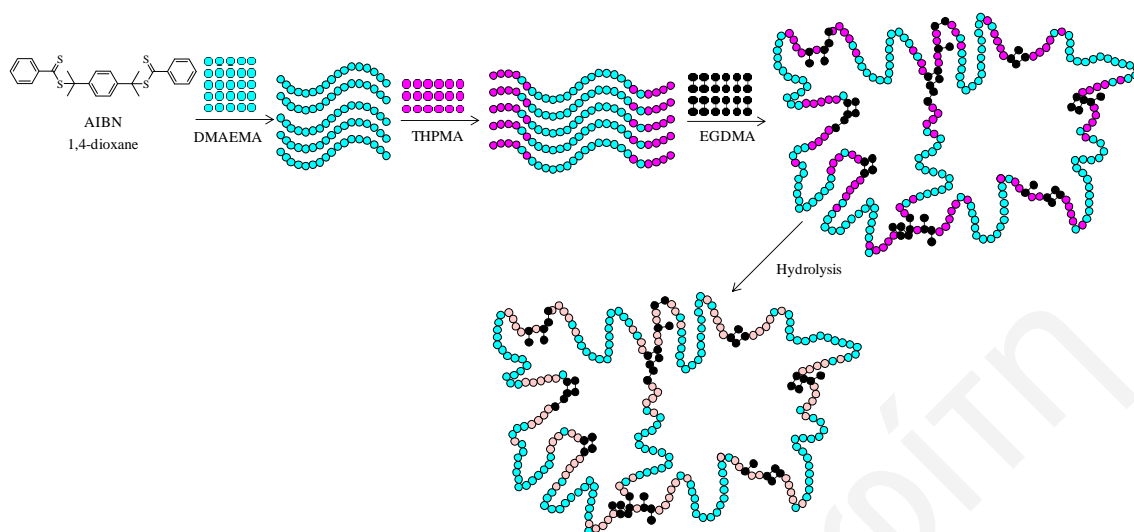


**Σχήμα 3.46:** Ποσοστό προσρόφησης RNA συναρτήσει (α) της σύστασης και (β) της αρχιτεκτονικής των ημιφθοριωμένων αμφιφιλικών πλεγμάτων.

### 3.6.5 Αμφολυτικά Πλέγματα DMAEMA-MAA

Στην παρούσα Διδακτορική διατριβή συντέθηκαν πέντε αμφολυτικά πλέγματα διασυνδεδεμένα στα άκρα, ένα τυχαία διασταυρωμένο αμφολυτικό πλέγμα, καθώς και δύο πλέγματα ομοπολυμερών, ενός πολυκατιόντος και ενός πολυανιόντος. Η σύνθεση όλων των πλεγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο πολυμερισμού RAFT. Σαν βασικό (κατιοντικό) μονομερές χρησιμοποιήθηκε το DMAEMA και σαν όξινο (ανιοντικό) μονομερές το MAA. Το τελευταίο εισήχθη στα πλέγματα μέσα από τον πολυμερισμό του THPMA το οποίο αποτελεί την προστατευμένη μορφή του. Για τη σύνθεση όλων των πλεγμάτων χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, το AIBN σαν εκκινητής, το 1,4-BTBTBPB σαν CTA και το 1,4-διοξάνιο σαν διαλύτης, ενώ το EGDMA αποτελούσε το μέσο διασταύρωσης. Συντέθηκαν τρία πλέγματα διασυνδεδεμένα στα άκρα βασισμένα στα ABA τριαδρομερή συμπολυμερή  $MAA_{12.5-grad-DMAEMA_{50-grad-MAA_{12.5}}$ ,  $MAA_{25-grad-DMAEMA_{50-grad-MAA_{25}}$  και  $MAA_{37.5-grad-DMAEMA_{50-grad-MAA_{37.5}}$ , ένα πλέγμα διασυνδεδεμένο στα άκρα βασισμένο στο BAB τριαδρομερές συμπολυμερές  $DMAEMA_{25-grad-MAA_{50-grad-DMAEMA_{25}}$ , ένα πλέγμα διασυνδεδεμένο στα άκρα βασισμένο στο τυχαίο συμπολυμερές  $DMAEMA_{50-co-MAA_{50}}$ , καθώς και ένα τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα. Συντέθηκαν, επίσης, δύο πλέγματα διασυνδεδεμένα στα άκρα βασισμένα στα ομοπολυμερή  $DMAEMA_{100}$  και  $MAA_{50}$ . Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση ενός πολυμερικού πλέγματος βασισμένου σε ABA τριαδρομερές συμπολυμερές η οποία περιελάμβανε διαδοχικές προσθήκες μονομερών και διασταυρωτή, ακολουθούμενη από όξινη υδρόλυση των μονάδων του THPMA, παρουσιάζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 3.47. Στο Σχήμα οι μονάδες του DMAEMA φαίνονται με ανοιχτό μπλε, οι μονάδες του THPMA παρουσιάζονται με μωβ, και οι μονάδες του MAA, οι οποίες λήφθηκαν έπειτα από την υδρόλυση των μονάδων του THPMA, φαίνονται με ροζ. Οι μαύροι αλτήρες που φαίνονται στο πλέγμα απεικονίζουν τις μονάδες του EGDMA. Όπως φαίνεται στο Σχήμα, αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του γραμμικού ομοπολυμερούς του DMAEMA το οποίο έφερε δύο ενεργά άκρα (λόγω της παρουσίας του διδραστικού CTA). Ακολούθησε η προσθήκη του μονομερούς του THPMA η οποία οδήγησε στην ανάπτυξη της αλυσίδας και στο σχηματισμό του τριαδρομερούς συμπολυμερούς ( $THPMA-grad-DMAEMA-grad-THPMA$ ) το οποίο έφερε και πάλι δύο ενεργά άκρα. Τέλος, έγινε η προσθήκη του διασταυρωτή EGDMA η οποία οδήγησε στη διασύνδεση των ενεργών άκρων των αλυσίδων και στο σχηματισμό του τρισδιάστατου πλέγματος. Η γραμμομοριακή αναλογία του EGDMA προς το CTA που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα αμφολυτικά πλέγματα ήταν ίση με 6 : 1. Όπως έχει αναφερθεί και στην περίπτωση των αμφιφιλικών πλεγμάτων DMAEMA-TFEMA, η διαδικασία σύνθεσης περιελάμβανε διαδοχικές προσθήκες, χωρίς

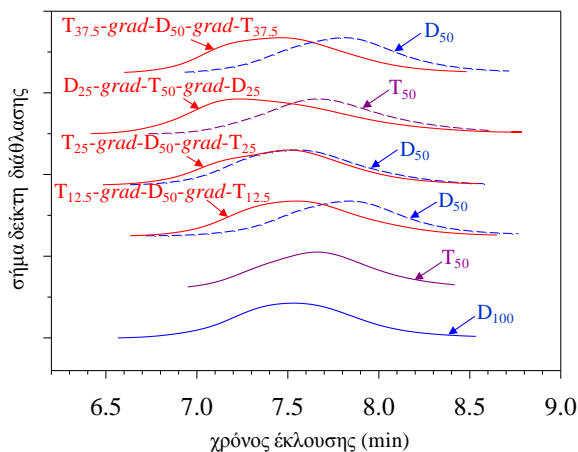
απομόνωση οποιουδήποτε ενδιάμεσου πολυμερούς, γεγονός που ενίσχυε το “ζωντανό” χαρακτήρα του πολυμερισμού.



**Σχήμα 3.47:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του πολυμερικού πλέγματος βασισμένου στο ABA τριαδρομερές συμπολυμερές THPMA<sub>25</sub>-grad-DMAEMA<sub>50</sub>-grad-THPMA<sub>25</sub>. Με ανοικτό μπλε φαίνονται οι μονάδες του DMAEMA, με μωβ οι μονάδες του THPMA, και με ανοικτό ροζ οι μονάδες του MAA. Οι μαύροι αλτήρες απεικονίζουν τις μονάδες του EGDMA.

### 3.6.5.1 Μοριακά Βάρη, Κατανομές Μοριακών Βαρών και Συστάσεις των Γραμμικών Προπομπών

Το Σχήμα 3.48 παρουσιάζει τα χρωματογραφήματα GPC των γραμμικών προπομπών των αμφολυτικών πλεγμάτων (ομοπολυμερή και τριαδρομερή συμπολυμερή), ενώ ο Πίνακας 3.29 δίνει τις μετατροπές των μονομερών και του διασταυρωτή, τα MB, τους ΔΠ και τις συστάσεις όλων των γραμμικών προπομπών των αμφολυτικών πλεγμάτων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR. Από τα χρωματογραφήματα GPC φαίνεται ότι τα MB όλων των τριαδρομερών συμπολυμερών ήταν μεγαλύτερα από αυτά των αντίστοιχων γραμμικών ομοπολυμερών τους, επιβεβαιώνοντας έτσι την επιτυχία στη σύνθεσή τους. Περαιτέρω, οι τιμές των  $M_n$  των ομοπολυμερών και των τριαδρομερών συμπολυμερών, με εξαίρεση το μεγαλύτερο τριαδρομερές συμπολυμερές THPMA<sub>37.5</sub>-grad-DMAEMA<sub>50</sub>-grad-THPMA<sub>37.5</sub>, βρέθηκαν να είναι πολύ κοντά στις θεωρητικά αναμενόμενες. Οι ΔΠ όλων των γραμμικών προπομπών ήταν σχετικά μεγάλοι ( $\geq 1.3$ ) αλλά συγκρίσιμοι με αυτούς των αμφιφιλικών πλεγμάτων DMAEMA-TFEMA στα οποία χρησιμοποιήθηκε το ίδιο CTA.

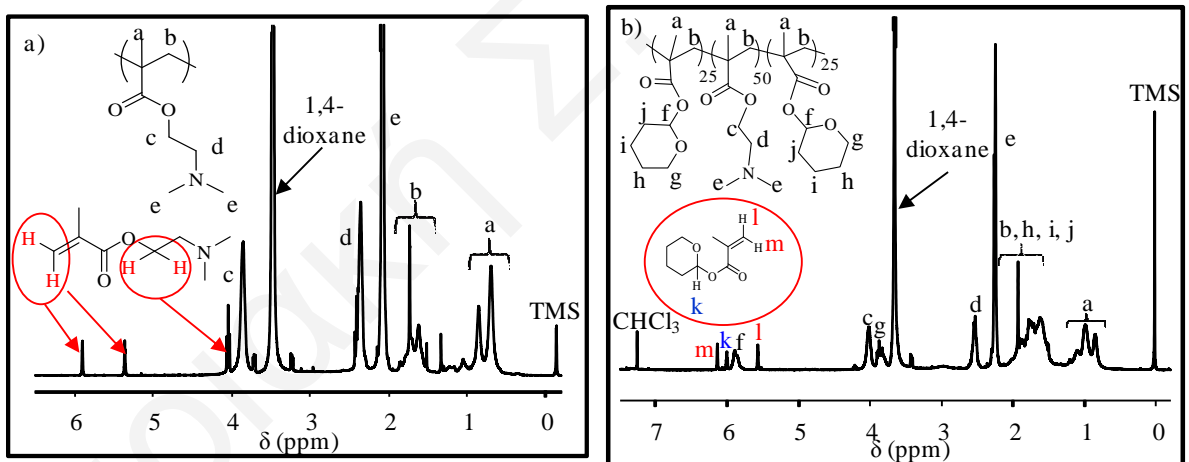


**Σχήμα 3.48:** Χρωματογραφήματα GPC των ομοπολυμερών και των τριαδρομερών συμπολυμερών, γραμμικών (και μη-υδρολύμενων) προπομπών των πολυμερικών πλεγμάτων. [D: DMAEMA και T: THPMA].

Το Σχήμα 3.49(α) παρουσιάζει το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>50</sub>, ενώ το Σχήμα 3.49(β) παραθέτει το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του τριαδρομερούς συμπολυμερούς THPMA<sub>25-grad</sub>-DMAEMA<sub>50-grad</sub>-THPMA<sub>25</sub>. Το φάσμα του τριαδρομερούς συμπολυμερούς παρουσιάζει τη χαρακτηριστική κορυφή f του μεθινικού πρωτονίου του τετραϋδροπυρανυλικού δακτυλίου στα 5.89 ppm των τμημάτων του polyTHPMA, επιβεβαιώνοντας έτσι την ενσωμάτωση μονάδων του THPMA στα άκρα του ομοπολυμερούς του DMAEMA. Να σημειωθεί ότι η κορυφή k στο ίδιο φάσμα οφείλεται στο μεθινικό πρωτόνιο του μονομερούς THPMA που δεν πολυμερίστηκε. Σύγκριση των εμβαδών των κορυφών f και k επιτρέπει τον υπολογισμό της μετατροπής του μονομερούς THPMA σε πολυμερές στο ομοπολυμερές και στα συμπολυμερή τους. Παρομοίως, η μετατροπή του μονομερούς DMAEMA σε πολυμερές (στο ομοπολυμερές και στα συμπολυμερή) υπολογίστηκε από τα εμβαδά των κορυφών των οξυμεθυλενικών πρωτονίων των polyDMAEMA και DMAEMA στα 3.96 και 4.1 ppm, αντίστοιχα. Οι μετατροπές των μονομερών στα γραμμικά ομοπολυμερή και συμπολυμερή δίνονται στον Πίνακα 3.29 υπό τον τίτλο “Μετατροπές”, στην αντίστοιχη σειρά (του ομοπολυμερούς ή του συμπολυμερούς). Οι μετατροπές για τα ομοπολυμερή ήταν πάντα πολύ υψηλές, κυμαινόμενες από 85.7 μέχρι και 96.2% για το DMAEMA, και από 98 μέχρι και 99.0% για το THPMA. Οι μετατροπές στα συμπολυμερή ήταν επίσης υψηλές, κυμαινόμενες από 66.3 μέχρι και 100.0% για το DMAEMA, και από 81.8 μέχρι και 100% για το THPMA. Η χαμηλότερη μετατροπή του DMAEMA (66.3%) αποδόθηκε στον πολυμερισμό του THPMA ως πρώτου μονομερούς σε αυτήν την περίπτωση, για να σχηματίσει το μεσαίο τμήμα του τριαδρομερούς συμπολυμερούς. Να σημειωθεί εδώ ότι κατά τη σύνθεση του



παρόντος BAB τριαδρομερούς συμπολυμερούς παρατηρείτο υδρόλυση του μονομερούς THPMA (~54%), η οποία αντιμετωπίστηκε με προσθήκη μικρής ποσότητας τριαιθυλαμίνης κατά τον πολυμερισμό. Η προσθήκη τριαιθυλαμίνης, μίας βάσης τριτοταγούς αμίνης, είχε ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του THPMA και την αποτροπή της υδρόλυσής του στη διάρκεια του πολυμερισμού του. Η τάση αυτή του THPMA να υδρολύεται όταν πολυμερίζεται πρώτο πιθανώς να ήταν και ο λόγος που παρατηρούνταν χαμηλές μετατροπές. Να σημειωθεί ότι, για όλα τα πλέγματα, οι μετατροπές του μονομερούς στο πρώτο τμήμα του συμπολυμερούς ήταν μεγαλύτερες στο συμπολυμερές σε σύγκριση με το αντίστοιχο ομοπολυμερές, αποδεικνύοντας έτσι περαιτέρω πρόοδο του πολυμερισμού του πρώτου μονομερούς κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού του δεύτερου μονομερούς, όπως και ήταν αναμενόμενο. Τέλος, οι συστάσεις των συμπολυμερών υπολογίστηκαν από τα εμβαδά των κορυφών των χαρακτηριστικών πρωτονίων των polyTHPMA (κορυφή f) και polyDMAEMA (κορυφή c). Οι υπολογισθείσες συστάσεις δίνονται στην τελευταία στήλη του Πίνακα 3.28 σαν τα % mol του THPMA. Σε όλες τις περιπτώσεις ήταν κοντά στις θεωρητικά αναμενόμενες τιμές.



**Σχήμα 3.49:** Φάσματα <sup>1</sup>H-NMR (α) του γραμμικού ομοπολυμερούς DMAEMA<sub>50</sub> και (β) του τριαδρομερούς συμπολυμερούς THPMA<sub>25</sub>-grad-DMAEMA<sub>50</sub>-grad-THPMA<sub>25</sub>.

**Πίνακας 3.29:** Μετατροπές μονομερών και διασταυρωτή, μοριακά βάρη, δείκτες πολυδιασποράς και συστάσεις όλων των γραμμικών προπομπών των πολυμερικών πλεγμάτων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR και χρωματογραφία GPC.

A/A	Δομή πολυμερούς <sup>1</sup>	Μετατροπές (mol %)			Χρόνος πήξης (min)	Χρόνος πήξης (min)	MB <sub>θεωρ.</sub> <sup>2</sup>	Αποτελέσματα GPC		% mol T	
		T	D	E				M <sub>n</sub>	ΔΠ	Θεωρ.	<sup>1</sup> H-NMR
1	D <sub>100</sub>	-----	85.7	-----	710		16000	14900	1.5	0	
	E <sub>3-grad</sub> -D <sub>100-grad</sub> -E <sub>3</sub>	-----	91.7	95.6	1440	180	-----	-----	-----	-----	-----
2	T <sub>50</sub>	99.0	-----	-----	1150		9000	12300	1.3	100	100
	E <sub>3-grad</sub> -T <sub>50-grad</sub> -E <sub>3</sub>	99.0	-----	99.1	1440	≤ 540	-----	-----	-----	-----	-----
3	D <sub>50</sub>	-----	96.2	-----	668		8000	8830	1.5	0	0
	T <sub>12.5-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -T <sub>12.5</sub>	85.3	99.3	-----	690		12500	13300	1.5	33.0	46.1
	E <sub>3-grad</sub> -T <sub>12.5-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -T <sub>12.5-grad</sub> -E <sub>3</sub>	89.2	100	86.0	1440	610	-----	-----	-----	-----	-----
4	D <sub>50</sub>	-----	87.5	-----	660		8000	9150	1.5	0	0
	T <sub>25-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -T <sub>25</sub>	83.4	96.7	-----	675		16500	16000	1.5	50.0	47.9
	E <sub>3-grad</sub> -T <sub>25-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -T <sub>25-grad</sub> -E <sub>3</sub>	95.7	99.9	88.6	1440	505	-----	-----	-----	-----	-----
5	T <sub>50</sub>	98.0	-----	-----	705		9000	9500	1.6	100	100
	D <sub>25-grad</sub> -T <sub>50-grad</sub> -D <sub>25</sub>	100	66.3	-----	750		16500	14200	1.9	50.0	60.3
	E <sub>3-grad</sub> -D <sub>25-grad</sub> -T <sub>50-grad</sub> -D <sub>25-grad</sub> -E <sub>3</sub>	99.0	98.5	100	1440	≤ 540	-----	-----	-----	-----	-----
6	D <sub>50</sub>	-----	94.5	-----	660		8000	9310	1.4	0	0
	T <sub>37.5-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -T <sub>37.5</sub>	81.8	100	-----	690		21000	16400	1.5	60.0	55.3
	E <sub>3-grad</sub> -T <sub>37.5-grad</sub> -D <sub>50-grad</sub> -T <sub>37.5-grad</sub> -E <sub>3</sub>	88.5	100	82.3	1440	625	-----	-----	-----	-----	-----
7	D <sub>50-co</sub> -T <sub>50</sub>	92.6	87.2	-----	740		16500	15300	1.4	50.0	48.5
	E <sub>3-grad</sub> -(D <sub>50-co</sub> -T <sub>50</sub> )-grad-E <sub>3</sub>	100	99.6	99.7	1440	540	-----	-----	-----	-----	-----
8	D <sub>50-co</sub> -T <sub>50-co</sub> -E <sub>6</sub>	100	100	100	1440	75	-----	-----	-----	-----	-----

<sup>1</sup>D: DMAEMA, T: THPMA και E: EGDMA.

<sup>2</sup>MB<sub>θεωρ.</sub> = [Μονομερούς] / [CTA] × (μετατροπή μονομερούς) × MB<sub>μονομερούς</sub> + MB<sub>CTA</sub>

Οι τελικές μετατροπές των μονομερών των DMAEMA και THPMA στα συμπολυμερή υπολογίστηκαν από τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  των “early” extractables χρησιμοποιώντας τις ίδιες κορυφές με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για τους υπολογισμούς για τα γραμμικά συμπολυμερή, όπως αναφέρεται προηγουμένως. Τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  των “early” extractables χρησιμοποιήθηκαν επίσης για τον υπολογισμό της μετατροπής του διασταυρωτή EGDMA στα πλέγματα, ο οποίος βασίστηκε στην κορυφή των οξυμεθυλενικών πρωτονίων του (μη-πολυμερισμένου) EGDMA στα 4.40 ppm. Αυτές οι μετατροπές δίνονται επίσης στον Πίνακα 3.28. Παρατηρήθηκε ότι οι μετατροπές των τριών αυτών συστατικών στα πλέγματα ήταν υψηλές. Συγκριμένα, οι τιμές αυτές ήταν μεταξύ 98.5 και 100.0% για το DMAEMA, 88.5 και 100% για το THPMA, και 82.3 και 100% για το EGDMA. Να σημειωθεί ότι η χαμηλότερη μετατροπή 82.3% αντιστοιχεί στο τριαδρομερές συμπολυμερές με τις μεγαλύτερες αλυσίδες (συνολικός ΒΠ 125), ενώ για τα ABA τριαδρομερή συμπολυμερή με μικρότερες αλυσίδες παρατηρήθηκαν μετατροπές 86.0 και 88.6% για συνολικούς ΒΠ 75 και 100, αντίστοιχα. Οι μετατροπές του EGDMA στα άλλα πλέγματα ήταν ίσες με 95% ή και μεγαλύτερες.

### **3.6.5.2 Μοριακά Βάρη και Συστάσεις της Μη-Ενσωματωθείσας Πολυμερικής Μάζας (extractables)**

Τα extractables όλων των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων και των δύο πλεγμάτων των ομοπολυμερών χαρακτηρίστηκαν ως προς το ποσοστό τους, τα  $M_n$  και τους ΔΠ τους. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 3.30. Το ποσοστό των extractables όλων των πλεγμάτων ήταν σχετικά χαμηλό (< 30%), αποδεικνύοντας έτσι την επιτυχή ενσωμάτωση των γραμμικών προπομπών στα πλέγματα. Το χαμηλότερο ποσοστό extractables παρουσιάστηκε από το πλέγμα του τυχαίου συμπολυμερούς και του τυχαία διασταυρωμένου πλέγματος. Αυτό αποδόθηκε στο μικρότερο αριθμό βημάτων, ένα και κανένα, μέχρι τη διασταύρωση αυτών των πλεγμάτων, σε σύγκριση με τα τρία βήματα που απαιτούνταν στην περίπτωση των πλεγμάτων των ABA και BAB τριαδρομερών συμπολυμερών.

Από τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρήθηκε ότι τα extractables αποτελούνταν κυρίως από γραμμικές αλυσίδες (polyDMAEMA, polyTHPMA ή poly(DMAEMA-*grad*-THPMA)), οι οποίες πιθανόν να απενεργοποιήθηκαν πριν από την προσθήκη του διασταυρωτή. Συγκεκριμένα, τα extractables ήταν πλουσιότερα στο πολυμερές που αποτελούσε

**Πίνακας 3.30:** Ποσοστό, συστάσεις και μοριακά βάρη των extractables όλων των πολυμερικών πλεγμάτων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR.

A/A	Δομή πλέγματος <sup>1</sup>	Extract. (% κ.μ)	Αποτελέσματα <sup>1</sup> H-NMR (mol %)					Αποτελέσματα GPC	
			% PD <sup>2</sup>	% PT <sup>3</sup>	% D	% T	% E	<i>M<sub>n</sub></i>	ΔΠ
1	E <sub>3</sub> -grad-D <sub>100</sub> -grad-E <sub>3</sub>	24.2	88.1	0	9.4	-----	2.5	19000	1.8
								240	1.1
2	E <sub>3</sub> -grad-T <sub>50</sub> -grad-E <sub>3</sub>	22.3	0	97.2	-----	0	2.8	9500	1.5
								230	1.1
3	E <sub>3</sub> -grad-T <sub>12.5</sub> -grad-D <sub>50</sub> - grad-T <sub>12.5</sub> -grad-E <sub>3</sub>	29.8	56.8	29.9	0	7.4	5.9	7400	1.6
								220	1.1
4	E <sub>3</sub> -grad-T <sub>25</sub> -grad-D <sub>50</sub> - grad-T <sub>25</sub> -grad-E <sub>3</sub>	24.3	55.9	25.0	0	9.9	9.2	8000	1.4
								200	1.1
5	E <sub>3</sub> -grad-D <sub>25</sub> -grad-T <sub>50</sub> - grad-D <sub>25</sub> -grad-E <sub>3</sub>	25.1	37.4	60.8	0	1.8	0	17400	1.3
								351	1.1
6	E <sub>3</sub> -grad-T <sub>37.5</sub> -grad-D <sub>50</sub> - grad-T <sub>37.5</sub> -grad-E <sub>3</sub>	25.0	42.8	43.4	0	9.9	3.9	10200	2.2
								230	1.1
7	E <sub>3</sub> -grad-(D <sub>50</sub> -co-T <sub>50</sub> )- grad-E <sub>3</sub>	4.4	0	0	0	0	0	210	1.1
8	D <sub>50</sub> -co-T <sub>50</sub> -co-E <sub>6</sub>	11.1	55.8	44.2	0	0	0	9560	1.1
								220	1.1

<sup>1</sup>D: DMAEMA, T: THPMA και E: EGDMA.

<sup>2</sup>PD: polyDMAEMA.

<sup>3</sup>PT: polyTHPMA.

το μεσαίο τμήμα του τριαδρομερούς συμπολυμερούς αφού το πολυμερές αυτό συμμετείχε από την αρχή του πολυμερισμού με αποτέλεσμα να υπόκειται σε μεγαλύτερη απενεργοποίηση. Τα extractables των πλεγμάτων, τις περισσότερες φορές, περιείχαν επίσης μονομερές THPMA και διασταυρωτή EGDMA, ενώ σε μία περίπτωση (EGDMA<sub>3</sub>-grad-DMAEMA<sub>100</sub>-grad-EGDMA<sub>3</sub>) περιείχαν και μονομερές DMAEMA. Τα extractables όλων των πλεγμάτων χαρακτηρίστηκαν επίσης και με χρωματογραφία GPC. Τα *M<sub>n</sub>* και οι ΔΠ των κορυφών φαίνονται στον Πίνακα 3.30. Με εξαίρεση το EGDMA<sub>3</sub>-grad-DMAEMA<sub>100</sub>-grad-EGDMA<sub>3</sub> και το EGDMA<sub>3</sub>-grad-DMAEMA<sub>25</sub>-grad-THPMA<sub>50</sub>-grad-DMAEMA<sub>25</sub>-grad-EGDMA<sub>3</sub>, για τα υπόλοιπα πλέγματα οι τιμές των *M<sub>n</sub>* της κύριας κορυφής ήταν μικρότερες από αυτές των γραμμικών προπομπών (Πίνακας 3.29) αποδεικνύοντας ότι τα extractables των πλεγμάτων αυτών ανήκουν σε αλυσίδες των οποίων τα ενεργά κέντρα απενεργοποιήθηκαν πριν το τέλος του πολυμερισμού. Σε αντίθεση, στις περιπτώσεις των πλεγμάτων EGDMA<sub>3</sub>-grad-DMAEMA<sub>100</sub>-grad-EGDMA<sub>3</sub> και EGDMA<sub>3</sub>-grad-DMAEMA<sub>25</sub>-grad-THPMA<sub>50</sub>-grad-DMAEMA<sub>25</sub>-grad-EGDMA<sub>3</sub>, οι τιμές του *M<sub>n</sub>* ήταν μεγαλύτερες από αυτές των γραμμικών προπομπών, γεγονός που μπορεί

να αποδοθεί στη διασύνδεση των ελεύθερων πολυμερικών αλυσίδων κατά τη διάρκεια της εξαγωγής των extractables.

### 3.6.5.3 Βαθμοί Διόγκωσης

Όλα τα πλέγματα χαρακτηρίστηκαν πριν από την υδρόλυσή τους ως προς τους ΒΔ τους σε THF, καθώς και μετά από την υδρόλυσή τους ως προς τους ΒΔ τους σε νερό σε διάφορα pH.

Οι ΒΔ όλων των πλεγμάτων σε THF πριν από την υδρόλυσή τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.31. Οι ΒΔ των τριών πλεγμάτων των ABA τριαδρομερών συμπολυμερών παρατηρήθηκε ότι αυξάνονταν καθώς η μετατροπή του EGDMA μειωνόταν (Πίνακας 3.29), οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό λιγότερο συμπαγών υλικών. Αυτή η αύξηση του ΒΔ ακολουθεί επίσης την αύξηση του συνολικού ΒΠ των αλυσίδων από 75 μέχρι 125 (το THF είναι μη εκλεκτικός διαλύτης για το DMAEMA και το THPMA). Από τα τέσσερα ισομερή ισομοριακά πλέγματα, το πλέγμα του τυχαίου συμπολυμερούς διασυνδεδεμένου στα άκρα και το τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα παρουσίαζαν τους χαμηλότερους ΒΔ σε THF. Το τελευταίο συμφωνεί με τον πλήρη πολυμερισμό του EGDMA σε αυτά τα δύο πλέγματα και το χαμηλότερο ποσοστό των extractables.

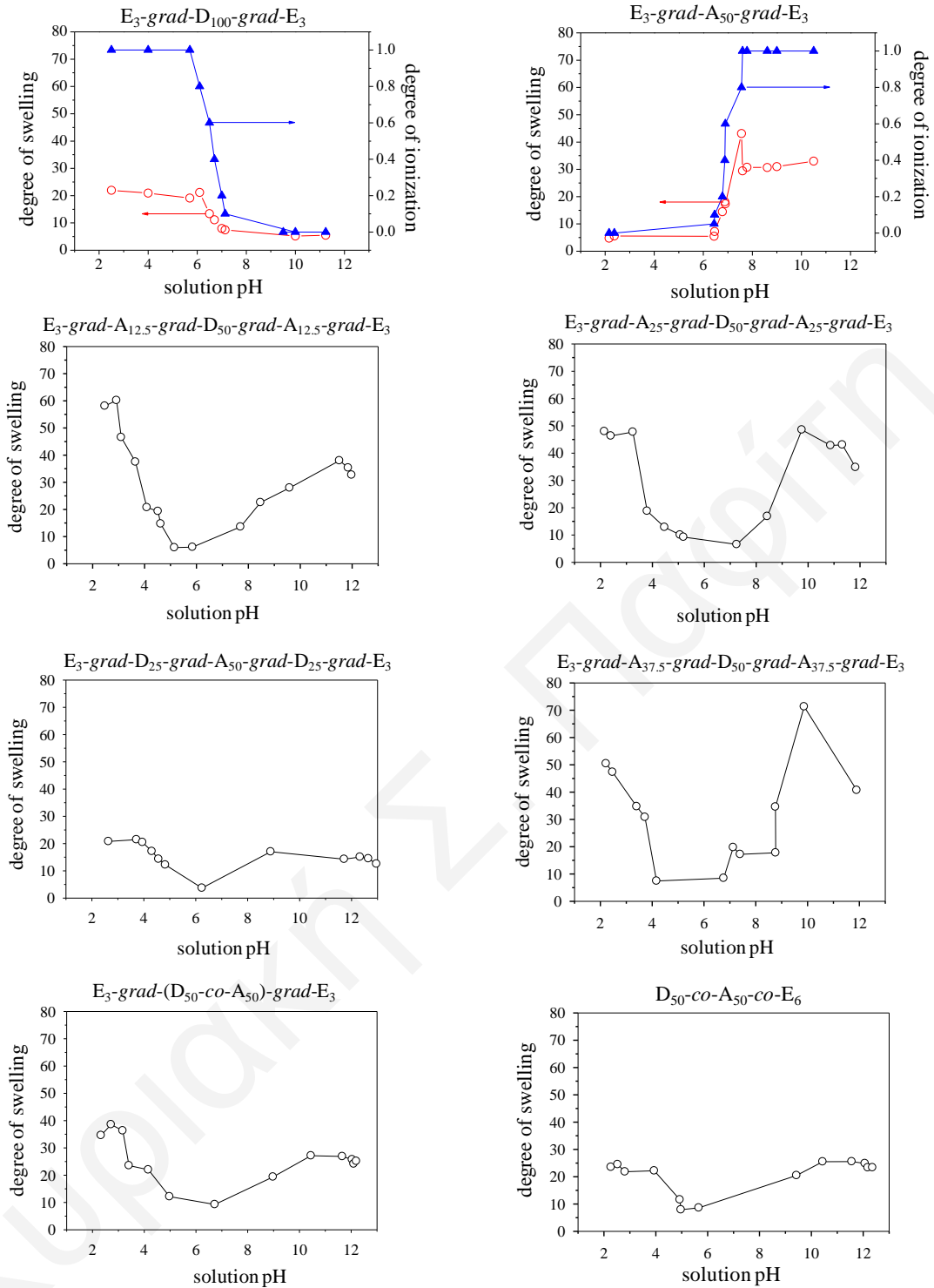
Όλα τα πλέγματα χαρακτηρίστηκαν επίσης ως προς τους ΒΔ σε νερό με διάφορα pH, μετά την όξινη υδρόλυσή τους και μετατροπή τους σε πολυαμφολυτικά πλέγματα. Οι πειραματικοί ΒΔ όλων των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων καθώς και των δύο πολυηλεκτρολυτικών πλεγμάτων των ομοπολυμερών παρουσιάζονται συναρτήσει του pH του υπερκείμενου διαλύματος στο Σχήμα 3.50. Παρατηρήθηκε ότι οι υδατικοί ΒΔ του ομοπολυμερούς πλέγματος του DMAEMA αυξάνονταν για τιμές pH μικρότερες από 7, γεγονός που οφειλόταν στον ιονισμό των ομάδων του DMAEMA σε αυτήν την περιοχή του pH. Παρομοίως, οι υδατικοί ΒΔ του πλέγματος του ομοπολυμερούς του MAA αυξάνονταν για pH μεγαλύτερα του 6 λόγω του ιονισμού των μονάδων του MAA σε υψηλότερα, αντί χαμηλότερα, pH αφού πρόκειται για ασθενές οξύ και όχι ασθενή βάση που είναι το DMAEMA. Από την άλλη, οι υδατικοί ΒΔ όλων των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων παρουσίαζαν ένα ελάχιστο ΒΔ σε ενδιάμεσες τιμές pH, ενώ αυξάνονταν σε βασικά και όξινα pH. Αυτή η συμπεριφορά είναι τυπική για πολυαμφολυτικά πλέγματα λόγω της παρουσίας του pI στο οποίο το συνολικό φορτίο του πλέγματος είναι μηδέν.<sup>[254,255]</sup> Ακριβώς στο pI αλλά και γύρω από αυτό οι συνολικές απωστικές δυνάμεις είναι μηδενικές, ενώ επικρατούν οι δυνάμεις van der Waals και οι υδρόφοβες ελκτικές αλληλεπιδράσεις, οδηγώντας έτσι στην εκτεταμένη συρρίκνωση (collapse) των

πολυαμφολυτικών αλυσίδων. Για τιμές pH μικρότερες και μεγαλύτερες από το pI, οι ΒΔ των πλεγμάτων αυξάνονταν λόγω ιονισμού των μονάδων του DMAEMA και του MAA, αντίστοιχα. Η μικρή μείωση των ΒΔ σε ακραίες υψηλές και χαμηλές τιμές pH αποδόθηκε στην αύξηση της ιοντική ισχύος, η οποία οφειλόταν στις σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις των NaOH και HCl σε αυτές τις συνθήκες. Έτσι, η συμπεριφορά των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων σε ακραίες τιμές pH είναι παρόμοια με αυτή των απλών πολυηλεκτρολυτικών πλεγμάτων<sup>[256]</sup> στα οποία ο ιονισμός των φορτιζόμενων ομάδων έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των φορτισμένων αλυσίδων του πλέγματος αλλά και δημιουργία οσμωτικής πίεσης από τη συσσώρευση αντισταθμιστικών ιόντων έναντι των φορτίων, οδηγώντας έτσι σε διόγκωση του πλέγματος.

**Πίνακας 3.31:** Βαθμοί διόγκωσης σε THF πριν από την υδρόλυση, σε όξινο νερό και στο ισοηλεκτρικό σημείο μετά από την υδρόλυση και ισοηλεκτρικά σημεία (pI) όλων των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων.

A/A	Δομή πλέγματος <sup>1</sup>	Βαθμοί Διόγκωσης			pI
		σε THF πριν από την υδρόλυση	σε H <sub>2</sub> O μετά από την υδρόλυση σε		
			pH=3.5-4.0	pI	
1	E <sub>3</sub> -grad-D <sub>100</sub> -grad-E <sub>3</sub>	21.0	24.0	-----	-----
2	E <sub>3</sub> -grad-A <sub>50</sub> -grad-E <sub>3</sub>	-----	19.6	-----	-----
3	E <sub>3</sub> -grad-A <sub>12.5</sub> -grad-D <sub>50</sub> -grad-A <sub>12.5</sub> -grad-E <sub>3</sub>	54.0	39.6	6.0	5.5
4	E <sub>3</sub> -grad-A <sub>25</sub> -grad-D <sub>50</sub> -grad-A <sub>25</sub> -grad-E <sub>3</sub>	56.4	47.7	7.9	6.1
5	E <sub>3</sub> -grad-D <sub>25</sub> -grad-A <sub>50</sub> -grad-D <sub>25</sub> -grad-E <sub>3</sub>	-----	22.7	3.7	6.3
6	E <sub>3</sub> -grad-A <sub>37.5</sub> -grad-D <sub>50</sub> -grad-A <sub>37.5</sub> -grad-E <sub>3</sub>	62.7	54.9	7.9	5.4
7	E <sub>3</sub> -grad-(D <sub>50</sub> -co-A <sub>50</sub> )-grad-E <sub>3</sub>	5.60	23.9	9.2	6.8
8	D <sub>50</sub> -co-A <sub>50</sub> -co-E <sub>6</sub>	20.5	22.0	7.9	5.3

<sup>1</sup>D: DMAEMA, A: MAA και E: EGDMA.



**Σχήμα 3.50:** Βαθμοί διόγκωσης συναρτήσει του pH όλων των πολυαμοφολυτικών πλεγμάτων DMAEMA-MAA και των πλεγμάτων των ομοπολυμερών.

Περαιτέρω, οι υδατικοί ΒΔ των πολυαμοφολυτικών πλεγμάτων σε χαμηλά pH (pH ~ 3), σε υψηλά pH (pH ~ 11) και στο pI (pH ~ 5-7) μελετήθηκαν σε σχέση με τη σύσταση και την αρχιτεκτονική του αμοφολυτικού πλέγματος. Όλοι αυτοί οι ΒΔ λήφθηκαν από το Σχήμα 3.50 και παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.51. Το Σχήμα 3.51(α) παρουσιάζει την επίδραση της

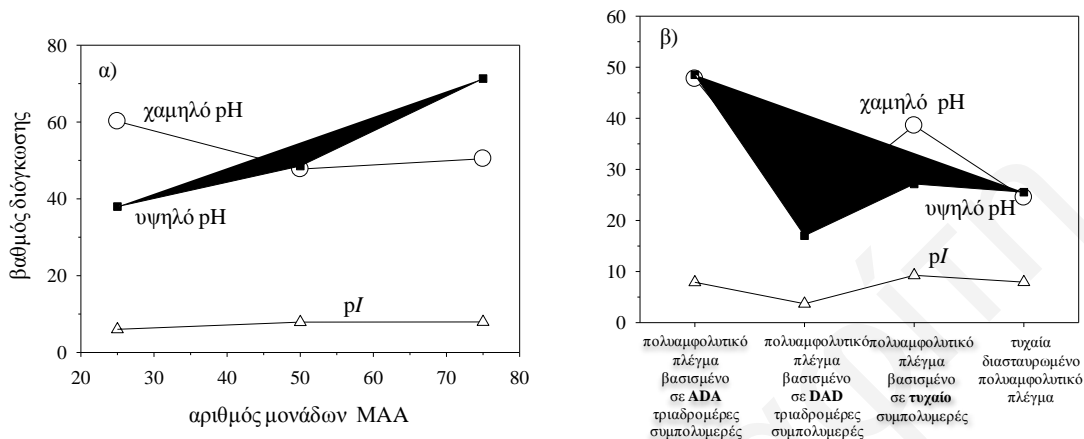
σύστασης, ενώ το Σχήμα 3.51(β) παρουσιάζει την επίδραση της αρχιτεκτονικής των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων στους ΒΔ.

Στο Σχήμα 3.51(α) φαίνεται ότι οι ΒΔ στο  $pI$  των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων ήταν σταθεροί (γύρω στο 8), αποδεικνύοντας έτσι ότι τα πλέγματα βρίσκονταν σε μία αρκετά συρρικνωμένη κατάσταση λόγω της απουσίας αντισταθμιστικών ιόντων και απωστικών αλληλεπιδράσεων. Σε όξινο pH, το βασικό πολυαμφολυτικό πλέγμα (περίσσεια μονάδων DMAEMA) παρουσίασε τον υψηλότερο ΒΔ λόγω του μεγαλύτερου αριθμού θετικά φορτισμένων μονάδων (μικρότερος αριθμός μονάδων MAA) κάτω αυτές τις συνθήκες. Παρόμοια, σε υψηλά pH, το όξινο πολυαμφολυτικό πλέγμα (περίσσεια μονάδων MAA) παρουσίασε τον υψηλότερο ΒΔ λόγω του μεγαλύτερου αριθμού καρβοξυλικών ανιόντων σε αλκαλικές συνθήκες. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι οι ΒΔ σε υψηλά pH των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων βασισμένων σε ABA τριαδρομερή συμπολυμερή αυξάνονταν μονοτονικά με αύξηση του αριθμού των μονάδων του MAA στις πολυαμφολυτικές αλυσίδες. Τέλος, οι υδατικοί ΒΔ σε χαμηλό και υψηλό pH του ισομοριακού πολυαμφολυτικού πλέγματος συνέπιπταν λόγω του ίδιου αριθμού φορτισμένων μονάδων σε κάθε αλυσίδα στις δύο ακραίες τιμές pH, οδηγώντας έτσι στις ίδιες απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις.

Το Σχήμα 3.51(β) παριστάνει την επίδραση της αρχιτεκτονικής των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων στους υδατικούς ΒΔ. Στα  $pI$ , τα τέσσερα ισομερή πολυαμφολυτικά πλέγματα βρίσκονταν σε αρκετά συρρικνωμένη κατάσταση, παρουσιάζοντας τους ίδιους ΒΔ, γύρω στο 8. Αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες<sup>[181,240]</sup> οι οποίες απέδειξαν τη μη επίδραση της αρχιτεκτονικής δομής των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων στους ΒΔ στο  $pI$ . Οι ΒΔ σε χαμηλό και υψηλό pH των ισομοριακών πολυαμφολυτικών πλεγμάτων παρατηρήθηκε ότι εξαρτώντο από την τελική μετατροπή του EGDMA (Πίνακας 3.28). Συγκεκριμένα, το πλέγμα του ABA τριαδρομερούς συμπολυμερούς παρουσίασε τους υψηλότερους ΒΔ σε χαμηλό και υψηλό pH. Αυτοί οι ΒΔ αντανάκλυσαν τη χαμηλότερη μετατροπή του EGDMA (88.6%) του πλέγματος αυτού, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός λιγότερο συμπαγούς πλέγματος. Αντίθετα, το πλέγμα του BAB τριαδρομερούς συμπολυμερούς, το οποίο παρουσίασε ποσοτική μετατροπή του EGDMA, παρουσίασε επίσης και τους χαμηλότερους ΒΔ σε χαμηλό και υψηλό pH (σχηματισμός πιο συμπαγούς πλέγματος). Τέλος, τα άλλα δύο ισομερή πολυαμφολυτικά πλέγματα, το πλέγμα του τυχαίου συμπολυμερούς διασυνδεδεμένου στα άκρα και το τυχαία διασταυρωμένο πλέγμα, είχαν ΒΔ πιο κοντά σε αυτούς του πλέγματος του BAB τριαδρομερούς συμπολυμερούς, αφού η μετατροπή του EGDMA και σε αυτά τα πλέγματα



ήταν επίσης πλήρης. Οι χαμηλότεροι ΒΔ του τυχαία διασταυρωμένου πλέγματος σε σύγκριση με αυτούς του πλέγματος του τυχαίου συμπολυμερούς διασυνδεδεμένου στα άκρα μπορούν να αποδοθούν στην ύπαρξη μεγαλύτερων και μικρότερων αλυσίδων στο πρώτο πλέγμα και στην υπέρσχυση της επίδρασης των μικρότερων αλυσίδων.



**Σχήμα 3.51:** Βαθμοί διόγκωσης των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων σε χαμηλό, υψηλό και ισοηλεκτρικό pH. (α) Επίδραση της σύστασης του πολυαμφολυτικού πλέγματος. (β) Επίδραση της αρχιτεκτονικής δομής του πολυαμφολυτικού πλέγματος.

### 3.6.5.4 Ισοηλεκτρικά Σημεία, $pI$

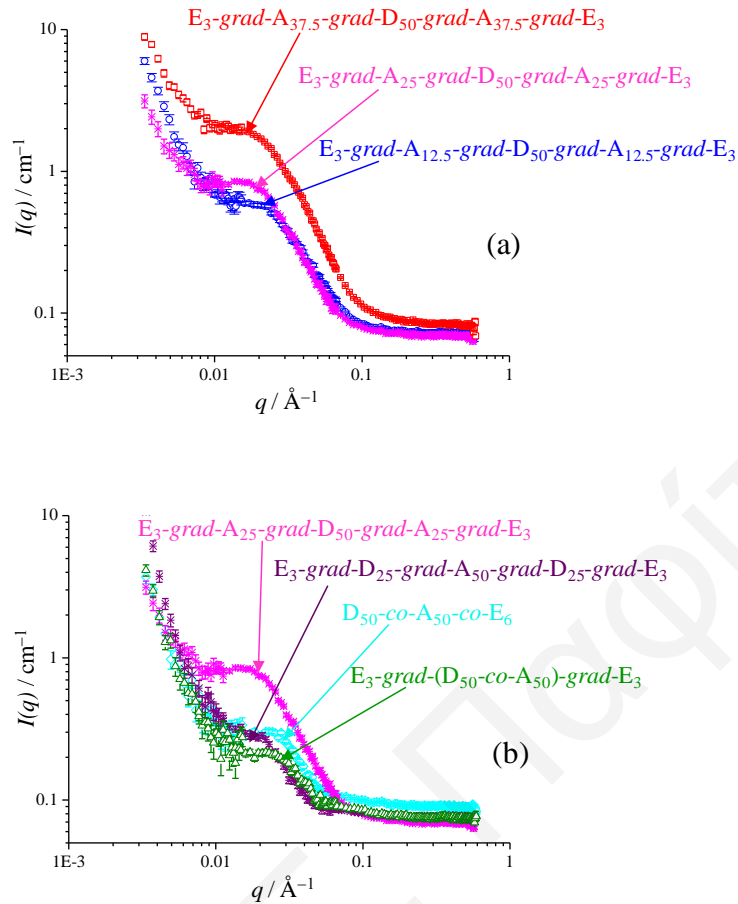
Τα  $pI$  των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων, υπολογιζόμενα από τη θέση του ελάχιστου ΒΔ, κυμαίνονταν από 5.3 μέχρι και 6.8. Τα  $pI$  των πλεγμάτων  $E_3\text{-grad-A}_{25}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-A}_{25}\text{-grad-E}_3$  και  $E_3\text{-grad-A}_{37.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-A}_{37.5}\text{-grad-E}_3$  ελαττώνονταν από 6.1 σε 5.4 με αύξηση της περιεκτικότητας σε MAA, όπως αναμενόταν. Το περισσότερο βασικό πλέγμα  $E_3\text{-grad-A}_{12.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-A}_{12.5}\text{-grad-E}_3$  είχε σχετικά χαμηλό  $pI$ , γύρω στο 5.5. Η μη αναμενόμενη αυτή συμπεριφορά μπορεί να οφείλεται στον προσεγγιστικό τρόπο υπολογισμού του  $pI$  από την καμπύλη του ΒΔ συναρτήσεως του pH του διαλύματος. Πέρα από αυτή την ασυμβατότητα, ο μέγιστος ΒΔ σε όξινο pH αυτού του πολυαμφολυτικού πλέγματος ήταν υψηλότερος από τον αντίστοιχο μέγιστο ΒΔ σε βασικά pH, αντανακλώντας έτσι την περίσσεια των μονάδων του DMAEMA σε σχέση με τις μονάδες του MAA. Να σημειωθεί ότι ακριβώς το αντίθετο, συνέβηκε για το πιο όξινο πλέγμα  $E_3\text{-grad-A}_{37.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-A}_{37.5}\text{-grad-E}_3$ , όπως και ήταν αναμενόμενο. Το πολυαμφολυτικό ισομοριακό πλέγμα  $E_3\text{-grad-A}_{25}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-A}_{25}\text{-grad-E}_3$  παρουσίασε σχεδόν τους ίδιους ΒΔ σε όξινο και αλκαλικό pH, και πάλι σε συμφωνία με τις προσδοκίες μας. Αναλυτικότερα, σε ακραίες τιμές pH η διόγκωση των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων αναμενόταν να καθορίζεται από τις πλήρως ιονισμένες μονάδες. Έτσι σε χαμηλές τιμές pH, οι μεγάλοι ΒΔ οφείλονταν στον ιονισμό των μονάδων του DMAEMA, ενώ σε υψηλές

τιμές pH οι μεγάλοι ΒΔ οφείλονταν στον ιονισμό των μονάδων του ΜΑΑ. Τα  $pI$  των τριών ισομοριακών πλεγμάτων  $E_3\text{-grad-A}_{25}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-A}_{25}\text{-grad-E}_3$ ,  $E_3\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-A}_{50}\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-E}_3$  και  $E_3\text{-grad-(A}_{50}\text{-co-D}_{50})\text{-grad-E}_3$  κυμαίνονταν από 6.1 σε 6.8. Η διακύμανση αυτή αποδόθηκε στην ευαισθησία του  $pI$  ως προς τη σύσταση του πολυαμφολύτη κοντά στην ισομοριακή σύσταση, όπως αναφέρεται και από άλλες μελέτες.<sup>[254,255,257]</sup>

### 3.6.5.5 Δομή Πλεγμάτων (SANS)

Όλα τα πολυαμφολυτικά πλέγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς τη δομή τους σε  $D_2O$  με τη χρήση SANS. Το Σχήμα 3.52 παρουσιάζει τα προφίλ SANS όλων των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων σε  $D_2O$  σε  $pH=3.0$ . Το Σχήμα 3.52(α) απεικονίζει τα προφίλ SANS πολυαμφολυτικών πλεγμάτων διαφορετικής σύστασης, ενώ το Σχήμα 3.52(β) παρουσιάζει τα προφίλ SANS πολυαμφολυτικών πλεγμάτων διαφορετικής αρχιτεκτονικής.

Τα προφίλ σκέδασης όλων των πολυαμφολυτικών πλεγμάτων δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε ευδιάκριτη κορυφή (όπως παρατηρήθηκε προηγουμένως στα ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα) αλλά μόνο ώμο σε ενδιάμεσες τιμές  $q$ , ενώ σε πολύ χαμηλές τιμές  $q$  παρουσίασαν μεγάλη αύξηση στην τιμή της σκεδαζόμενης έντασης. Η απουσία κορυφών αποδόθηκε στο ότι τα πλέγματα αποτελούνταν από επαναλαμβανόμενες μονάδες δύο υδρόφιλων μονομερών, των DMAEMA και ΜΑΑ, που δεν μπορούν να οδηγήσουν σε νανοφασικό διαχωρισμό που θα είχε αποτέλεσμα το σχηματισμό κορυφής. Ο ώμος παρουσιαζόταν στην περιοχή- $q$  μεταξύ 0.1 και 0.2  $nm^{-1}$ , αντιστοιχώντας σε μήκος συσχέτισης  $2\pi/q = 30 - 60$  nm, το οποίο βρισκόταν σε συμφωνία με την απόσταση των πυρήνων του EGDMA (γύρω στα 25 nm). Οι τελευταίες αποστάσεις υπολογίστηκαν από τους θεωρητικούς ΒΔ σε νερό σε  $pH 3.5$  και θεωρώντας ότι γύρω από κάθε πυρήνα αναφύονταν 20 αλυσίδες. Ο Πίνακας 3.32 δίνει αυτές τις υπολογισθείσες αποστάσεις μεταξύ των πυρήνων οι οποίες ήταν πολύ κοντά στις αποστάσεις μεταξύ των πυρήνων που υπολογίστηκαν για πλήρως εκτεταμένες αλυσίδες. Η αυξημένη σκέδαση που παρατηρήθηκε σε πολύ χαμηλές τιμές  $q$  πιθανότατα να οφειλόταν σε ανομοιογένεια του συστήματος η οποία μάλλον προερχόταν από τις τοπικές διαφορές της συγκέντρωσης πολυμερούς μέσα στο πλέγμα, δηλαδή την εναλλαγή περισσότερο συμπυκνωμένων περιοχών με λιγότερο πυκνές περιοχές. Έτσι, τα προφίλ SANS πιθανότατα σχετίζονται με τις αποστάσεις πυρήνα-πυρήνα των αμφολυτικών πλεγμάτων.



**Σχήμα 3.52:** Προφίλ SANS όλων των πολυαμοφολυτικών πλεγμάτων σε  $D_2O$  σε  $pH=3.0$ . (α) Επίδραση της σύστασης του πολυαμοφολυτικού πλέγματος. (β) Επίδραση της αρχιτεκτονικής του πολυαμοφολυτικού πλέγματος. [D: DMAEMA, A: MAA και E: EGDMA].

**Πίνακας 3.32:** Πειραματικές (από τους βαθμούς διόγκωσης) και μέγιστες θεωρητικές αποστάσεις μεταξύ των πυρήνων του EGDMA, καθώς και βαθμοί διόγκωσης σε  $H_2O$  ( $pH\sim 3.5$ ) των πολυαμοφολυτικών πλεγμάτων.

Α/Α	Δομή πλέγματος <sup>1</sup>	Απόσταση πυρήνων (nm)		ΒΔ σε $H_2O$ ( $pH\sim 3.5$ )
		μέγιστη θεωρητική <sup>2</sup>	από ΒΔ <sup>3</sup>	
1	$E_3\text{-grad-A}_{12.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-A}_{12.5}\text{-grad-E}_3$	19.0	23.2	39.6
2	$E_3\text{-grad-A}_{25}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-A}_{25}\text{-grad-E}_3$	25.4	25.4	47.7
3	$E_3\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-A}_{50}\text{-grad-D}_{25}\text{-grad-E}_3$	25.4	19.0	22.7
4	$E_3\text{-grad-A}_{37.5}\text{-grad-D}_{50}\text{-grad-A}_{37.5}\text{-grad-E}_3$	31.8	26.2	54.9
5	$E_3\text{-grad-(D}_{50}\text{-co-A}_{50})\text{-grad-E}_3$	25.4	12.5	6.00
6	$D_{50}\text{-co-A}_{50}\text{-co-E}_6$	-----	-----	22.0

<sup>1</sup>D: DMAEMA, A: MAA και E: EGDMA.

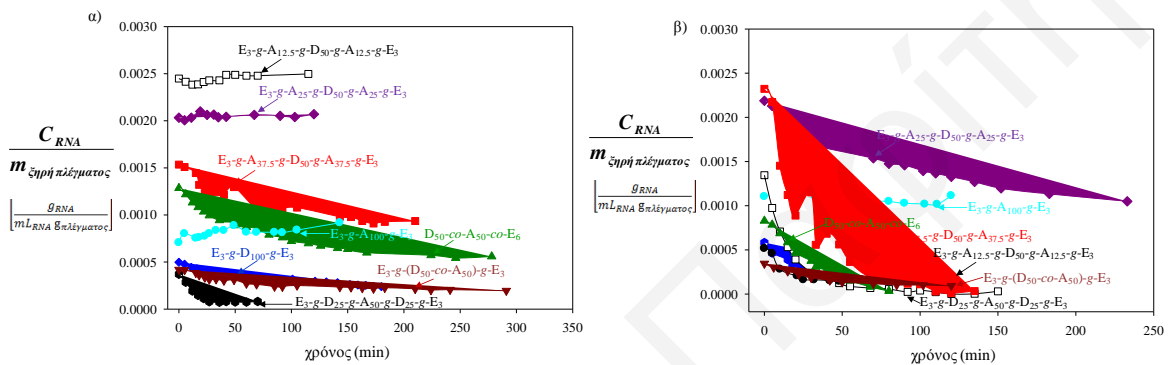
<sup>2</sup>Η απόσταση των πυρήνων EGDMA υπολογίστηκε ως το άθροισμα των ΒΠ των μονάδων του DMAEMA και του MAA σε κάθε πλέγμα πολλαπλασιασμένο με την τιμή 0.254 nm η οποία αντιστοιχεί στη συνεισφορά μίας επαναλαμβανόμενης μονάδας μονομερούς στο τοπογραφικό μήκος.

<sup>3</sup>Υπολογίστηκε με βάση τους ΒΔ και θεωρώντας ότι γύρω από κάθε πυρήνα αναφέρονται 20 αλυσίδες.

### 3.6.5.6 Προσρόφηση RNA στα Πλέγματα

Όλα τα αμφολυτικά πλέγματα και τα δύο πλέγματα των ομοπολυμερών DMAEMA και MAA αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν RNA σε ουδέτερο, όξινο και βασικό περιβάλλον.

Στο Σχήμα 3.53 δίνονται τα διαγράμματα της συγκέντρωσης του RNA προς την ξηρή μάζα του πλέγματος συναρτήσει του χρόνου σε ουδέτερο και όξινο pH για όλα τα αμφολυτικά πλέγματα. Τα διαγράμματα σε βασικό pH δεν αναπαρίστανται αφού για κανένα πλέγμα δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε απορρόφηση.



**Σχήμα 3.53:** Συγκέντρωση RNA προς την ξηρή μάζα πλέγματος συναρτήσει του χρόνου για όλα τα αμφολυτικά πλέγματα: (α) σε ουδέτερο και (β) σε όξινο pH.

Από την επεξεργασία των δεδομένων των καμπύλων του Σχήματος 3.53 των αμφολυτικών πλεγμάτων σε ουδέτερο, όξινο αλλά και βασικό περιβάλλον (δεν δίνεται διάγραμμα) προέκυψε ο Πίνακας 3.33. Συγκεκριμένα, στον Πίνακα δίνονται το ποσοστό της προσρόφησης, το ποσοστό της προσρόφησης ως προς την ξηρή και υγρή μάζα του πλέγματος, καθώς και η μεταβολή της συγκέντρωσης ως προς την ξηρή μάζα του πλέγματος.

Από τον Πίνακα και τα διαγράμματα παρατηρήθηκε ότι όλα τα πλέγματα σε όξινο pH προσροφούσαν μεγαλύτερο ποσοστό RNA. Αυτό αποδόθηκε στην πλήρη θετική φόρτιση του DMAEMA, η οποία οδηγούσε στην ανάπτυξη ηλεκτροστατικών ελκτικών αλληλεπιδράσεων Coulomb με το αρνητικά φορτισμένο RNA.

**Πίνακας 3.33:** Τιμές για το ποσοστό προσρόφησης, το ποσοστό προσρόφησης ανά την ξηρή και την υγρή μάζα του πλέγματος, καθώς και τη μεταβολή της συγκέντρωσης ως προς την ξηρή μάζα του πλέγματος, όπως αυτές υπολογίστηκαν από την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων της προσρόφησης RNA από όλα τα αμφολυτικά πλέγματα και τα δύο πλέγματα των ομοπολυμερών.

A/A	Δομή πλέγματος <sup>1</sup>	$\frac{\Delta A}{A_0}$	$\frac{\Delta A}{A_0 \times m_{\text{ξηρή πλέγμ.}}}$ [gπλέγμ. <sup>-1</sup> ]	$\frac{\Delta A}{A_0 \times m_{\text{υγρή πλέγμ.}}}$ [gπλέγμ. <sup>-1</sup> ]	$\frac{\Delta C}{m_{\text{ξηρή πλέγμ.}} \cdot g_{\text{RNA}}}$ [mL <sub>RNA</sub> gπλέγματος]
<b>Διάλυμα RNA ουδέτερο pH</b>					
1	E <sub>3</sub> -g-D <sub>100</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.50	7.98	1.53	2.59e <sup>-4</sup>
2	E <sub>3</sub> -g-A <sub>100</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
3	E <sub>3</sub> -g-A <sub>12.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-A <sub>12.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
4	E <sub>3</sub> -g-A <sub>25</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-A <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
5	E <sub>3</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-A <sub>50</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.77	8.43	0.59	2.96e <sup>-4</sup>
6	E <sub>3</sub> -g-A <sub>37.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-A <sub>37.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.29	14.65	1.04	6.29e <sup>-4</sup>
7	E <sub>3</sub> -g-(D <sub>50</sub> -co-A <sub>50</sub> )-g-E <sub>3</sub>	0.38	5.25	1.00	2.24e <sup>-4</sup>
8	D <sub>50</sub> -co-A <sub>50</sub> -co-E <sub>6</sub>	0.46	17.36	2.01	7.42 e <sup>-4</sup>
<b>Διάλυμα RNA όξινο pH</b>					
1	E <sub>3</sub> -g-D <sub>100</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.52	9.30	1.25	2.20e <sup>-5</sup>
2	E <sub>3</sub> -g-A <sub>100</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.07	2.07	0.16	8.87e <sup>-5</sup>
3	E <sub>3</sub> -g-A <sub>12.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-A <sub>12.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.07	31.69	1.22	1.35e <sup>-3</sup>
4	E <sub>3</sub> -g-A <sub>25</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-A <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.43	26.63	2.65	1.14e <sup>-3</sup>
5	E <sub>3</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-A <sub>50</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.60	8.66	0.43	3.38e <sup>-4</sup>
6	E <sub>3</sub> -g-A <sub>37.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-A <sub>37.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0.58	54.81	1.16	2.31e <sup>-3</sup>
7	E <sub>3</sub> -g-(D <sub>50</sub> -co-A <sub>50</sub> )-g-E <sub>3</sub>	0.57	5.89	0.96	2.52e <sup>-4</sup>
8	D <sub>50</sub> -co-A <sub>50</sub> -co-E <sub>6</sub>	0.61	20.44	0.87	7.96e <sup>-4</sup>
<b>Διάλυμα RNA βασικό pH</b>					
1	E <sub>3</sub> -g-D <sub>100</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
2	E <sub>3</sub> -g-A <sub>100</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
3	E <sub>3</sub> -g-A <sub>12.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-A <sub>12.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
4	E <sub>3</sub> -g-A <sub>25</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-A <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
5	E <sub>3</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-A <sub>50</sub> -g-D <sub>25</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
6	E <sub>3</sub> -g-A <sub>37.5</sub> -g-D <sub>50</sub> -g-A <sub>37.5</sub> -g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
7	E <sub>3</sub> -g-(D <sub>50</sub> -co-A <sub>50</sub> )-g-E <sub>3</sub>	0	0	0	0
8	D <sub>50</sub> -co-A <sub>50</sub> -co-E <sub>6</sub>	0	0	0	0

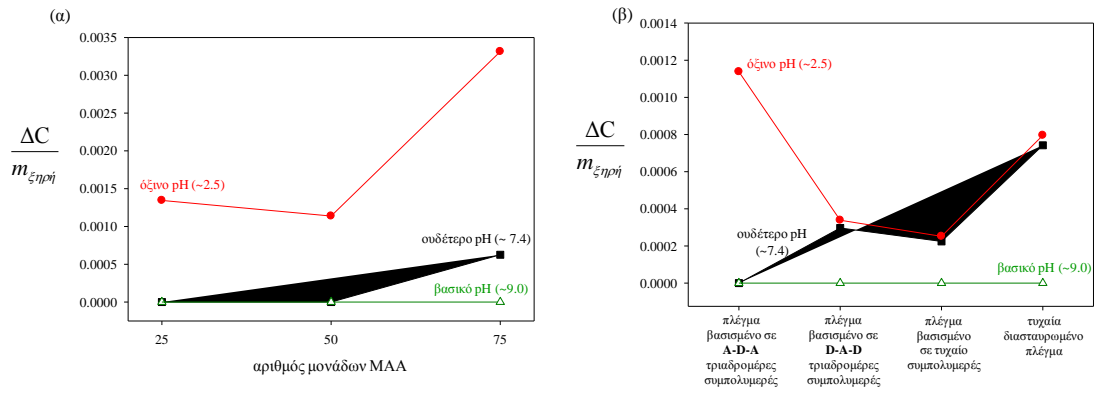
<sup>1</sup>D: DMAEMA, A: MAA και E: EGDMA.

Περαιτέρω, η προσρόφηση του RNA από τα αμφολυτικά πλέγματα μελετήθηκε σε σχέση με τη σύσταση και την αρχιτεκτονική των αμφολυτικών πλεγμάτων. Στο Σχήμα 3.54. δίνεται η μεταβολή της συγκέντρωσης ( $\Delta C$ ) ως προς την ξηρή μάζα του πλέγματος

συναρτήσει της περιεκτικότητας σε ΜΑΑ (Σχήμα 3.54 (α)) και της αρχιτεκτονικής (Σχήμα 3.54 (β)).

Από το Σχήμα 3.54 (α) παρατηρείται, καταρχήν, ότι σε βασικό pH δεν προσροφήθηκε καθόλου RNA, γεγονός που αποδόθηκε στη μη φόρτιση του DMAEMA σε αυτό το pH, σε αντίθεση με τη μερική ή πλήρη φόρτιση του DMAEMA σε ουδέτερο και όξινο pH, αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης (η οποία αντιστοιχεί στο ποσοστό της προσρόφησης) σε όξινο pH ήταν μεγαλύτερη από αυτή σε ουδέτερο νερό, όπως άλλωστε αναμενόταν, λόγω της πλήρους φόρτισης των αμινομάδων του DMAEMA, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ελκτικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με το RNA. Περαιτέρω, σε ουδέτερο και όξινο pH παρατηρήθηκε ότι η το ποσοστό του RNA που προσροφήθηκε αυξανόταν με αύξηση της περιεκτικότητας του πλέγματος σε ΜΑΑ, γεγονός που αποδόθηκε στην αύξηση του υδρόφιλου χαρακτήρα των πλεγμάτων.

Από το Σχήμα 3.54 (β), στο οποίο παριστάνεται η επίδραση της αρχιτεκτονικής στην προσρόφησης RNA, παρατηρήθηκε καταρχήν ότι και τα τέσσερα ισομοριακά πλέγματα σε βασικό pH δεν προσροφούσαν καθόλου RNA. Σε ουδέτερο pH το πλέγμα του A-D-A τριαδρομερούς πολυαμφολύτη παρουσίασε χαμηλότερη προσρόφηση από αυτήν του πλέγματος του D-A-D τριαδρομερούς πολυαμφολύτη. Αυτό αποδεικνύει ότι η διευθέτηση των μονάδων του DMAEMA στα άκρα των αλυσίδων του D-A-D τριαδρομερούς συμπολυμερούς είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ισχυρότερων ελκτικών αλληλεπιδράσεων με το RNA, σε σύγκριση με το πλέγμα του A-D-A τριαδρομερούς συμπολυμερούς στο οποίο το DMAEMA ήταν στο κεντρικό τμήμα της αλυσίδας. Αν και αυτή η συμπεριφορά των δύο αυτών καλώς-ορισμένων πλεγμάτων αναμενόταν και σε όξινο pH, προς έκπληξη παρατηρήθηκε ότι σε όξινο περιβάλλον το πλέγμα του A-D-A τριαδρομερούς πολυαμφολύτη παρουσίασε κατά πολύ μεγαλύτερη προσρόφηση από αυτήν του D-A-D τριαδρομερούς πολυαμφολύτη. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι το πλέγμα του A-D-A τριαδρομερούς πολυαμφολύτη ήταν λιγότερο συμπαγές από αυτό του D-A-D τριαδρομερούς πολυαμφολύτη (χαμηλότερη κατανάλωση EGDMA), με αποτέλεσμα την πιο εύκολη προσρόφηση RNA.



**Σχήμα 3.54** Ποσοστό προσρόφησης RNA συναρτήσει (α) της σύστασης και (β) της αρχιτεκτονικής των αμφολυτικών πλεγμάτων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

### 4.1 Συμπεράσματα

#### Σύνθεση, χαρακτηρισμός και αξιολόγηση γραμμικών και αστεροειδών ομοπολυμερών για μεταφορά siRNA

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή συντέθηκαν επιτυχώς τέσσερις σειρές αστεροειδών ομοπολυμερών, δύο βασισμένες στους καινούργιους υδρόφιλους και θετικά ιονιζόμενους διασταυρωτές BMEP και BMEMA, μίας βασισμένης στον υδρόφοβο αλλά υδρολύμενο διασταυρωτή BMMD, καθώς και μίας βασισμένης στον εμπορικά υδρόφοβο και μη υδρολύμενο διαθέσιμο διασταυρωτή EGDMA. Συντέθηκε, επίσης, επιτυχώς μία σειρά γραμμικών ομοπολυμερών.

Η επιτυχία σύνθεσης των αστεροειδών ομοπολυμερών επιβεβαιώθηκε με χρωματογραφία GPC όπου και παρατηρήθηκε μετατόπιση των χρωματογραφημάτων των γραμμικών προπομπών τους σε μικρότερους χρόνους έκλουσης και επομένως αύξηση του MB. Παρόμοια, για τα γραμμικά ομοπολυμερή παρατηρήθηκε αύξηση του MB με αύξηση του ΒΠ, επιβεβαιώνοντας την επιτυχία σύνθεσή τους.

Όλα τα γραμμικά και αστεροειδή ομοπολυμερή χαρακτηρίστηκαν σε οργανικά και υδατικά μέσα. Σε οργανικά μέσα, για τα αστεροειδή ομοπολυμερή παρατηρήθηκε αύξηση των MB, αύξηση των απόλυτων MB και μείωση του αριθμού βραχιόνων με αύξηση του ΒΠ των βραχιόνων. Περαιτέρω, η αποτελεσματικότητα διασταύρωσης των διασταυρωτών βρέθηκε να μειώνεται με τη σειρά EGDMA > BMEP > BMEMA > BMMD.

Σε υδατικά μέσα τα διαλύματα των αστεροειδών πολυμερών έδωσαν αστεροειδή πολυμερή αλλά και συσσωματώματα αστεροειδών πολυμερών, ενώ οι θερμοκρασίες νεφέλωσης, οι τιμές pK και τα pH καταβύθισής τους βρέθηκαν να αυξάνονται με αύξηση των ΒΠ των βραχιόνων.

Ταυτόχρονα, οι θερμοκρασίες νεφέλωσης των γραμμικών ομοπολυμερών σε υδατικά μέσα βρέθηκαν να ελαττώνονται με αύξηση του MB τους λόγω της ελάττωσης της διαλυτότητάς τους, ενώ οι τιμές pK τους βρέθηκαν σταθερές γύρω στο 7.4.

Όλα τα γραμμικά και αστεροειδή ομοπολυμερή μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να μεταφέρουν siRNA σε κύτταρα μυοβλαστών τα οποία εξέφραζαν σταθερά το γονίδιο της EGFP.



Από τα πειράματα επιμόλυνσης παρατηρήθηκε ότι όλα τα αστεροειδή πολυμερή και το μεγαλύτερο (BΠ 50) γραμμικό ομοπολυμερές μετέφεραν επιτυχώς siRNA σε κύτταρα μυοβλαστών. Για όλα σχεδόν τα αστεροειδή ομοπολυμερή παρατηρήθηκε αύξηση της καταστολής της *EGFP* και της *κυτταροτοξικότητας* με αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς, ενώ η *συνολική αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης (siRNA-specific EGFP suppression)* παρουσίασε διάφορες τάσεις, συμπεριλαμβανομένης αύξησης, μείωσης ή και μεγίστου. Η αύξηση του BΠ του βραχίονα βρέθηκε να οδηγεί σε μεγάλη αύξηση της καταστολής της *EGFP* και της *τοξικότητας* και σε μικρή αύξηση της *συνολικής αποτελεσματικότητας επιμόλυνσης*.

Τέλος, παρατηρήθηκε ότι τα αστεροειδή πολυμερή του BMEMA ήταν τα περισσότερο αποτελεσματικά και τα λιγότερο τοξικά πολυμερή που συντέθηκαν, ενώ αυτά του BMEP ήταν τα λιγότερο αποτελεσματικά και περισσότερο τοξικά. Μάλιστα, η αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης των αστεροειδών του BMEMA ήταν συγκρίσιμη με αυτή του εμπορικά διαθέσιμου και δαπανηρού αντιδραστηρίου Lipofectamine. Αυτό μπορεί να αποδοθεί, καταρχήν, στο ότι σχηματίζει τα λιγότερο τοξικά πολυμερή αλλά και στο ότι φορτίζεται θετικά σε σχέση με τον EGDMA, με αποτέλεσμα να συμπλοκοποιείται πιο εύκολα με το siRNA και να σχηματίζει πιο συμπαγή σύμπλοκα βοηθώντας έτσι στην αποτελεσματικότερη επιμόλυνση. Ένας επιπρόσθετος λόγος στον οποίο μπορεί να αποδοθεί η αποτελεσματικότητα αυτού του διασταυρωτή είναι η μεγάλη καθαρότητά του, αφού από τους τρεις καινούργιους διασταυρωτές αυτός ήταν ο μόνος που μπορούσε να αποσταχθεί.

#### **Σύνθεση, χαρακτηρισμός και αξιολόγηση ημιφθοριωμένων αμφιφιλικών και αμφολυτικών πολυμερικών πλεγμάτων σε πειράματα προσρόφησης RNA**

Όσον αφορά τη σύνθεση των πολυμερικών πλεγμάτων, στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή συντέθηκε μία σειρά ημιφθοριωμένων αμφιφιλικών πλεγμάτων βασισμένων στα μονομερή DMAEMA και TFEMA, καθώς, και μία σειρά αμφολυτικών πλεγμάτων βασισμένων στα μονομερή DMAEMA και MAA.

Οι πρόδρομες αλυσίδες των πολυμερικών πλεγμάτων χαρακτηρίστηκαν ως προς τα MB και τη σύστασή τους με χρωματογραφία GPC και φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  όπου και επιβεβαιώθηκε η επιτυχής σύνθεσή τους. Τα πλέγματα χαρακτηρίστηκαν, αρχικά, ως προς το ποσοστό των extractables το οποίο σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μικρό,

επιβεβαιώνοντας έτσι την επιτυχή ενσωμάτωση των γραμμικών αλυσίδων των πολυμερών στα πολυμερικά πλέγματα.

Όλα τα πλέγματα μελετήθηκαν ως προς τους ΒΔ τους σε THF, καθαρό νερό και νερό με διάφορα pH. Όσον αφορά τα αμφιφιλικά πλέγματα, οι ΒΔ τους σε καθαρό και οξινομένο νερό αλλά και σε THF παρατηρήθηκε ότι ελαττώνονταν με αύξηση της περιεκτικότητας των πλεγμάτων σε TFEMA, ενώ οι ΒΔ τους σε συνάρτηση με το pH του διαλύματος αυξάνονταν κάτω από pH 7 λόγω της φόρτισης των αμινομάδων του DMAEMA. Τέλος, οι τιμές  $pK$  βρέθηκαν να ελαττώνονται ελαφρώς με την αύξηση της περιεκτικότητας του πλέγματος σε TFEMA γεγονός που οφείλεται στην αύξηση της υδροφοβικότητας, σε μείωση της τοπικής διηλεκτρικής σταθεράς και σε ενίσχυση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων Coulomb, με αποτέλεσμα να γίνεται πιο δύσκολος ο ιονισμός του πλέγματος.

Τα αμφολυτικά πλέγματα παρουσίαζαν ένα ελάχιστο ΒΔ σε ενδιάμεσες τιμές pH, ο οποίος αυξανόταν σε βασικά και όξινα pH. Αυτή η συμπεριφορά είναι χαρακτηριστική για αμφολυτικά πλέγματα λόγω της παρουσίας  $pI$ . Ακριβώς στο  $pI$  αλλά και γύρω από αυτό οι συνολικές απωστικές δυνάμεις στο πλέγμα είναι μηδενικές, ενώ επικρατούν οι δυνάμεις van der Waals και οι υδρόφοβες ελκτικές αλληλεπιδράσεις, οδηγώντας έτσι στην εκτεταμένη συρρίκνωση των πολυαμφολυτικών αλυσίδων.

Περαιτέρω, η δομή όλων των πλεγμάτων που συντέθηκαν μελετήθηκε με τη βοήθεια SANS. Από τα φάσματα SANS παρατηρήθηκε ότι τα ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε TFEMA (BII 50 και 75) παρουσίαζαν ευδιάκριτες απλές κορυφές, γεγονός που αποδείκνυε την ύπαρξη νανοφασικού διαχωρισμού. Μάλιστα, η ένταση των κορυφών αυτών αυξανόταν ενώ, ταυτόχρονα, μετατοπίζοντας σε μικρότερες τιμές  $q$  με αύξηση της περιεκτικότητας σε polyTFEMA, υποδεικνύοντας έτσι τον ισχυρότερο νανοφασικό διαχωρισμό, καθώς και τις μεγαλύτερες αποστάσεις ανάμεσα στα κέντρα σκέδασης, αντίστοιχα. Τα αμφολυτικά πλέγματα σε καμία περίπτωση δεν παρουσίαζαν κορυφές, γεγονός που αποδόθηκε στην έλλειψη νανοφασικού διαχωρισμού αφού τόσο το DMAEMA όσο και το MAA ήταν εξίσου υδρόφιλα.

Τέλος, όλα τα αμφολυτικά και ημιφθοριωμένα αμφιφιλικά πλέγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν RNA σε ουδέτερο, όξινο και βασικό περιβάλλον. Από τα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε ότι η προσρόφηση καθοριζόταν από την ανάπτυξη ελκτικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του θετικά φορτισμένου DMAEMA

και του αρνητικά φορτισμένου RNA. Περαιτέρω, παρατηρήθηκε ότι αύξηση της περιεκτικότητας των ημιφθοριωμένων αμφιφιλικών πλεγμάτων σε TFEMA οδηγούσε σε ελάττωση της προσρόφησης RNA, λόγω ελάττωσης της περιεκτικότητας σε DMAEMA. Στην περίπτωση των αμφολυτικών πλεγμάτων παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της περιεκτικότητας σε MAA δεν ήταν σαφή η επίδραση στην προσρόφηση RNA, ίσως λόγω του αμφολυτικού χαρακτήρα του πλέγματος. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αρχιτεκτονική των αμφιφιλικών πλεγμάτων δεν επιδρούσε σχεδόν καθόλου στην προσρόφηση σε βασικό και ουδέτερο pH, ενώ σε όξινο pH το πλέγμα του D-TF-D παρουσίασε τη μεγαλύτερη απορρόφηση πιθανώς λόγω των ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων με το RNA. Τέλος, σε βασικό pH η προσρόφηση των αμφολυτικών πλεγμάτων ήταν μηδενική και ανεξάρτητη από τη δομή του πλέγματος, ενώ σε όξινο pH το πλέγμα του A-D-A τριαδρομερούς συμπολυμερούς παρουσίαζε τη μεγαλύτερη προσρόφηση, πιθανώς λόγω της λιγότερο συμπαγούς δομής αυτού του πλέγματος σε σύγκριση με τα άλλα τρία ισομοριακά πλέγματα.

## 4.2 Μελλοντική Εργασία

Από τη συστηματική μελέτη υδρόφιλων κατιοντικών αστεροειδών πολυμερών για τη μεταφορά siRNA επιβεβαιώθηκε ότι τα αστεροειδή πολυμερή αποτελούν πολύ υποσχόμενα μέσα μεταφοράς siRNA, *in vitro*. Έτσι, σαν μελλοντική εργασία προτείνεται η περαιτέρω διερεύνηση της ανάπτυξης μη-τοξικών αστεροειδών πολυμερών για μεταφορά siRNA. Προς το σκοπό αυτό προτείνεται η σύνθεση με GTP αστεροειδών ομοπολυμερών με μεγάλους και θετικά φορτιζόμενους πυρήνες (χρήση μεγαλύτερης αναλογίας EGDMA προς MTS) βασισμένων σε υδρόφιλο και μη-ιονιζόμενο μονομερές. Η παρουσία του θετικού φορτίου μόνο στον πυρήνα των αστεροειδών (όχι στους βραχίονες) θα έχει ως συνέπεια την ελάττωση των αλληλεπιδράσεων των αστεροειδών με την κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα τη μείωση της τοξικότητας. Η χρήση υδρόφιλου μονομερούς θα δώσει μεγαλύτερο υδρόφιλο χαρακτήρα στα αστεροειδή πολυμερή, οδηγώντας έτσι σε πλήρη διαλυτοποίησή τους σε υδατικά μέσα. Σαν υδρόφιλο μη-ιονικό μονομερές μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο μεθακρυλικός εστέρας της τετρααιθυλενογλυκόλης.

Από τα πειράματα προσρόφησης RNA φάνηκε ότι τα κατιοντικά αμφιφιλικά πλέγματα προσροφούν αποτελεσματικά RNA άρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μεταφορά γενετικού υλικού. Με βάση αυτό, σαν μελλοντική εργασία προτείνεται, επίσης, η σύνθεση κατιοντικών βιοαποικοδομήσιμων αμφιφιλικών πλεγμάτων βασισμένων σε υδρολύμενους διασταυρωτές όπως το BMMD. Σαν υδρόφιλο και θετικά ιονιζόμενο μονομερές μπορεί να χρησιμοποιηθεί το DMAEMA, ενώ σαν υδρόφοβο μονομερές το *n*BuMA. Τα πολυμερικά αυτά πλέγματα θα υδρολύονται στο όξινο περιβάλλοντος του ενδοσώματος (pH ~ 5), το οποίο δημιουργείται κατά την είσοδο του συμπλόκου στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την ευκολότερη απελευθέρωση του siRNA στο κυτταρόπλασμα ενώ, παράλληλα, η υδρόλυση των πλεγμάτων θα οδηγεί στο σχηματισμό γραμμικών συμπολυμερών (με μικρότερο MB) τα οποία θα αποβάλλονται ευκολότερα από το κύτταρο μέσω των διεργασιών έκκρισης.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Ryther, R. C. C.; Flynt, A. S.; Phillips III, J. A.; Patton, J. G. “siRNA therapeutics: big potential from small RNAs,” *Gene Ther.* **2005**, *12*, 5-11.
2. Bumcrot, D.; Manoharan, M.; Koteliansky, V.; Sah, D. W. Y. “RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceuticals drugs,” *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 711-719.
3. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. “Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*,” *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
4. Wang, Y.; Sheng, G.; Juranek, S.; Tuschl, T.; Patel, D. J. “Structure of the guide-stand-containing argonaute silencing complex,” *Nature* **2008**, *456*, 209-213.
5. Rand, T. A.; Ginalski, K.; Grishin, N. V.; Wang, X. “Biochemical identification of argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14385-14389.
6. Czauderna, F.; Fechtner, M.; Aygün, H.; Arnold, W.; Klippel, A.; Giese, K.; Kaufmann, J. “Functional studies on the PI(3)-kinase signalling pathway employing synthetic and expressed siRNA,” *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 670-682.
7. Stucke, V. M.; Silljé, H. H.; Arnaud, L.; Nig, E. A. “Human MP1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication,” *EMBO J.* **2002**, *21*, 1723-1732.
8. Mattson, M. P.; Camandola, S. “NF-kappa B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders,” *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 247-254.
9. Poinat, P.; De Arcangelis, A.; Sookhareea, S.; Zhu, X.; Hedgecock, E. M.; Labouesse, M.; Georges-Labouesse, E. “A conserved interaction between beta 1 integrin/PAT-3 and Nck-interacting kinase /MIG-15 that mediates commissural axon navigation in *C. elegans*,” *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 622-631.
10. Jacque, J.-M.; Triques, K.; Stevenson, M. “Modulation of HIV-1 replication by RNA interference,” *Nature* **2002**, *418*, 435-438.
11. McCaffrey, A. P.; Meuse, L.; Pham, T.-T. T.; Conklin, D. S.; Hannon, G. J.; Kay, M. A. “RNA interference in adult mice,” *Nature* **2002**, *418*, 38-39.
12. Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. “Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells” *Nature* **2001**, *411*, 494-498.

13. Kim, D. H.; Rossi, J. J. “Strategies for silencing human disease using RNA interference” *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 173-184.
14. Dykxhoorn, D. M.; Palliser, D.; Lieberman, J. “The silent treatment: siRNA as small molecule drugs,” *Gene Ther.* **2006**, *13*, 541-552.
15. (α) Ozpolat, B.; Sood, A. K.; Lopez-Berestein, G. “Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer,” *J. Intern. Med.* **2009**, *267*, 44-53. (β) Abbasi, M.; Lavasanifar, A.; Berthiaume, L. G.; Weinfeld, M.; Uludağ, H. “Cationic polymer-mediated small interfering RNA delivery for p-glycoprotein down-regulation in tumor cells,” *Cancer* **2010**, *1*, 5544-5554.
16. Quarck, R.; Holvoet, P. “Gene therapy approaches for cardiovascular diseases,” *Curr. Gene Ther.* **2004**, *4*, 207-223.
17. Zhou, H.; Falkenburger, B. H.; Schulz, J. B.; Tieu, K.; Xu, Z.; Xia, X. G. “Silencing of the *Pink1* gene expression by conditional RNAi does not induce dopaminergic neuron death in mice,” *Int. J. Biol. Sci.* **2007**, *3*, 242-250.
18. Singer, O.; Marr, R. A.; Rockenstein, E.; Crews, L.; Coufal, N. J.; Gage, F. H.; Verma, I. M.; Masliah, E. “Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model,” *Nature Neuroscience* **2005**, *8*, 1343-1349.
19. (α) Ge, Q.; Filip, L.; Bai, A.; Nguyen, T.; Eisen, H. N.; Chen, J. “Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8676-8681. (β) Thomas, M.; Lu, J. J.; Ge, Q.; Zhang, C.; Chen, J.; Klibanov, A. M. “Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5679-5684.
20. (α) Kirchhoff, F. “Silencing HIV-1 *in vivo*,” *Cell* **2008**, *134*, 566-568. (β) Qin, X. F.; An, D. S.; Chen, I. S.; Baltimore, D. “Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery small interfering RNA against CCR5,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 183-188.
21. Markert, C. D.; Ning, J.; Staley, J. T.; Heinzke, L.; Childers, C. K.; Ferreira, A. J.; Brown, M.; Stoker, A.; Okamura, C.; Childers, M. K. “TCAP knockdown by RNA interference inhibits myoblast differentiation in cultured skeletal muscle cells,” *Neuromuscular Disorders* **2008**, *18*, 413-422.
22. (α) Radhakrishnan, S. K.; Layden, T. J.; Gartel, A. L. “RNA interference as a new strategy against viral hepatitis,” *Virology* **2004**, *323*, 173-181. (β) Chen, Y.; Cheng, G.;

- Mahato, R. I. "RNAi for treating hepatitis B viral infection," *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 72-86.
23. Tiemann, K.; Rossi, J. J. "RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects," *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 142-151.
24. Chappelow, A. V.; Kaiser, P. "Neovascular age-related macular degeneration," *Drugs* **2008**, *68*, 1029-1036.
25. Baigude, H.; Rana, T. M. "Delivery of therapeutic RNAi by nanovehicles," *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2449-2454.
26. (α) Liu, Q.; Muruve, D. A. "Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors," *Gene Ther.* **2003**, *10*, 935-940. (β) Sun, J. Y.; Anand-Jawa, V.; Chatterjee, S.; Wong, K. K. "Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors," *Gene Ther.* **2003**, *10*, 964-976. (γ) Carter, B. J.; Samulski, R. J. "Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles," *Int. J. Mol. Med.* **2000**, *6*, 17-27.
27. Castanotto, D.; Rossi, J. J. "The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics," *Nature* **2009**, *457*, 426-433.
28. Pang, S. W.; Park, H. Y.; Jang, Y. S.; Kim, W. S.; Kim, J. H. "Effects of charge density and particle size of poly(styrene/(dimethylamino)ethyl methacrylate) nanoparticle for gene delivery in 293 cells," *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2002**, *26*, 213-222.
29. Funhoff, A. M.; Nostrum, C. F.; Koning, G. A.; Nieuwenbroek, N. M.; Crommelin, D. J.; Hennink, W. E. "Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH," *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 32-39.
30. Gary, D. J.; Puri, N.; Won, Y. Y. "Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinction from polymer-based DNA delivery," *J. Controlled Release* **2007**, *121*, 64-73.
31. (α) Grayson, A. C. R.; Doody, A. M.; Putnam, D. "Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery *in vitro*," *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1868-1876. (β) Grayson, A. C.; Ma, J.; Putman, D. "Kinetic and efficacy analysis of RNA interference in stably and transiently expressing cell lines," *Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 601-613.
32. Bolcato-Bellemin, A.-L.; Bonnet, M.-E.; Greusat, G.; Erbacher, P.; Behr, J.-P. "Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16050-16055.

33. Spagnou, S.; Miller, A. D.; Keller, M. “Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA,” *Biochemistry* **2004**, *43*, 13348-13356.
34. Klein, U. 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**, *12*, 461-466.
35. Grzelinski, M.; Urban-Klein, B.; Martens, T.; Lamszus, K.; Bakowsky, U.; Höbel, S.; Czubayko, F.; Aigner, A. “RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs *in vivo* exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts,” *Hum. Gene Ther.* **2006**, *17*, 751-766.
36. Oskuee, R. K.; Philipp, A.; Dehshahri, A.; Wagner, E.; Ramezani, M. “The impact of carboxyalkylation of branched polyethylenimine on effectiveness in small interfering RNA delivery,” *J. Gene Med.* **2010**, *12*, 729-738.
37. Petersen, H.; Fechner, M.; Fischer, D.; Kissel, T. “Synthesis, characterization, and biocompatibility of polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers,” *Macromolecules* **2002**, *35*, 6887-6874.
38. 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**, *17*, 1209-1221.
39. Malek, A.; Czubayko, F.; Aigner, A. “PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-mediated gene targeting efficacy,” *J. Drug Targeting* **2008**, *16*, 124-139.
40. Kim, S. H.; Jeong, J. H.; Cho, K. C.; Kim, S. W.; Park, T. G. “Target-specific gene silencing by siRNA plasmid DNA complexed with folate-modified poly(ethylenimine),” *J. Controlled Release* **2005**, *104*, 233-232.
41. Kim, S. H.; Mok, H.; Joeng, J. H.; Kim, S. W.; Park, T. G. “Comparative evaluation of target-specific GFP gene silencing efficiencies for antisense ODN, synthetic siRNA, and siRNA plasmid complexes with PEI-PEG-FOL conjugate,” *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 241-244.
42. Jiang, G.; Park, K.; Kim, J.; Kim, K. S.; Hahn, S. K. “Target specific intracellular delivery of siRNA/PEI-HA complex by receptor mediated endocytosis,” *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 727-737.



43. Schiffelers, R. M.; Ansari, A.; Xu, J.; Zhou, Q.; Tang, Q.; Storm, G.; Molema, G.; Lu, P. Y.; Scaria, P. V.; Woodle, M. C. "Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle," *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e149.
44. Wang, X-L.; Xu, R.; Wu, X.; Gillespie, D.; Jensen, R.; Lu, Z-R. "Targeted systemic delivery of a therapeutic siRNA with a multifunctional carrier controls tumor proliferation in mice," *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 738-746.
45. Creusat, C.; Zuber, G. "Self-assembling polyethylenimine derivatives mediated efficient siRNA delivery in mammalian cells," *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2787-2789.
46. Meyer, M.; Phillip, A.; Oskuee, R.; Schmidt, C.; Wagner, E. "Breathing life into polycations: functionalization with pH-responsive endosomolytic peptides and polyethylene glycol enables siRNA delivery," *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3272-3273.
47. Zintchenko, A.; Philipp, A.; Dehshahri, A.; Wagner, E. "Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity," *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1448-1455.
48. Phillip, A.; Zhao, X.; Tarcha, P.; Wagner, E.; Zintchenko, A. "Hydrophobically modified oligoethylenimines as highly efficient transfection agents for siRNA delivery," *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2055-2061.
49. Chen, J.; Tian, H.; Guo, Z.; Xia, J.; Kano, A.; Maruyama, A.; Jing, X.; Chen, X. "A highly efficient siRNA carrier of PBLG modified hyperbranched PEI," *Macromolecular Bioscience* **2009**, *9*, 1247-1253.
50. Park, K.; Lee, M.-Y.; Kim, K. S.; Hahn, S. K.; "Target specific tumor treatment by VEGF siRNA complexed with reducible polyethyleneimine-hyaluronic acid conjugate," *Biomaterial* **2010**, *31*, 5258-5265.
51. Swami, A.; Kurupati, R. K.; Pathak, A.; Singh, Y.; Kumar, P.; Gupta, K. C. "A unique and highly efficient non-viral DNA/siRNA delivery system based on PEI-bisepoxide nanoparticles," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *362*, 835-841.
52. Song, W.-J.; Du, J.-Z.; Sun, T.-M.; Zhang, P.-Z.; Wang, J. "Gold nanoparticles capped with polyethyleneimine for enhanced siRNA delivery," *Cancer Therapy* **2010**, *6*, 239-246.
53. Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Prigodich, A. E.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. "Gene Regulation with Polyvalent siRNA-Nanoparticle Conjugates" *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2072-2073.

54. Lee, J. S.; Green, J. J.; Love, K. T.; Sunshine, J.; Langer, R.; Anderson, D. G. "Gold, poly(beta-amino ester) nanoparticles for small interfering RNA delivery," *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2402-2406.
55. Leng, Q.; Scaria, P.; Zhu, J.; Ambulos, N.; Campbell, P.; Mixson, J. A. "Highly branched HK peptides are effective carriers of siRNA," *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 977-986.
56. Leng, Q.; Mixson, A. J. "Small interfering RNA targeting Raf-1 inhibits tumour growth *in vitro* and *in vivo*" *Can. Gene Ther.* **2005**, *12*, 682-690.
57. (α) Gary, D.; Puri, N.; Won, Y.-Y. "Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery," *J. Controlled Release* **2007**, *121*, 64-73. (β) Romoren, K.; Petersen, S.; Smistad, G.; Evensen, O.; Thu, B. J. "The influence of formulation variables on *in vivo* transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based complexes," *Int. J. Pharm.* **2003**, *261*, 115-127. (γ) Weecharangsan, W.; Opanasopit, P.; Ngawhirunpat, T.; Apirakaramwong, A.; Rojanarata, T.; Ruktanonchai, U.; Lee, R. J. "Evaluation of chitosan salts as non-viral gene vectors in CHO-K1 cells," *Int. J. Pharm.* **2008**, *348*, 161-1168.
58. Rudzinski, W. E.; Aminabhari, T. M. "Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA," *Int. J. Pharm.* **2010**, *399*, 1-11.
59. Katas, H.; Alpan, H. O. "Development and characterization of chitosan nanoparticles for siRNA delivery," *J. Controlled Release* **2006**, *115*, 216-225.
60. Malhotra, M.; Kulamavra, A.; Sebak, S.; Paul, A.; Bhatena, J. Mirzaei, M.; Prakash, S. "Ultrafine chitosan nanoparticles as an efficient nucleic acid delivery system targeting neuronal cells," *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35*, 719-726.
61. Rojanarata, T.; Opanasopit, P.; Techaarpornkul, S.; Ngawhirunpat, T.; Ruktanonchai, U. "Chitosan-thiamine pyrophosphate as a novel carrier for siRNA delivery," *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2807-2814.
62. Howard, K. A.; Rahbek, U. L.; Liu, X.; Damgaard, C. K.; Glud, S. Z.; Andersen, M. Ø.; Hovgaard, M. B.; Schmitz, A.; Nyengaard, J. R.; Besenbacher, F.; Kjems, J. "RNA interference *in vitro* and *in vivo* using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system," *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 476-484.
63. Howard K. A.; Paludan, S. R.; Behlke, M.; Besenbacher, F.; Deleuran, B.; Kjems, J. "Chitosan/siRNA nanoparticle-mediated TNF- $\alpha$  knockdown in peritoneal macrophages

- for anti-inflammatory treatment in murine arthritis model,” *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 162-168.
64. Liu, X.; Howard, K. A.; Dong, M.; Andersen, M. Ø.; Rahbek, U. L.; Johnsen, M. G.; Hansen, O. C.; Besenbacher, F.; Kjems, J. “The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing,” *Biomaterial* **2007**, *28*, 1280-1288.
65. Ji, A. M.; Su, D.; Che, O.; Li, W. S.; Sun, L.; Zhang, Z. Y.; Yang, B.; Xu, F. “Functional gene silencing mediated by chitosan/siRNA nanocomplexes,” *Nanotechnology* **2009**, *20*, 405-412.
66. Weber, N.; Ortega, P.; Clemente, M. I.; Shcharbin, D.; Bryszewska, M.; Mata, F. J. D. L.; Gomez, R.; Munoz-Fernandez, M. A. “Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes,” *J. Controlled Release* **2008**, *132*, 55-64.
67. Gras, R.; Almonacid, L.; Ortega, P.; Serramia, M. J.; Gomez, R.; Mata, F. J. D. L.; Lopez-Fernandez, L. A.; Munoz-Fernandez, M. A. “Changes in gene expression pattern of human primary macrophages induced by carbosilane dendrimers 2G-NN16,” *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 577-586.
68. Posadas, I.; Lopez-Hernandez, B.; Clemente, M. I.; Jimenez, J. L.; Ortega, P.; Mata, F. J. D. L.; Gomez, R.; Munoz-Fernandez, M. A.; Geva, V. “Highly efficient transfection of rat cortical neurons using carbosilane dendrimers unveils a neuroprotective role for HIF-1 alpha in early chemical hypoxia-mediated neurotoxicity,” *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 1181-1191.
69. Omid, Y.; Hollins, A. J.; Drayton, R. M.; Akhtar, S. “Polypropylenimine dendrimer-induced gene expression changes: the effect of complexation with DNA, dendrimer generation and cell type,” *J. Drug Targeting* **2005**, *13*, 431-443.
70. Inoue, Y.; Kurihara, R.; Tsuchida, A.; Hasegawa, M.; Nagashima, T.; Mori, T.; Niidome, T.; Katayama, Y.; Okitsu, O. “Efficient delivery of siRNA using dendritic poly(L-lysine) for loss-of-function analysis,” *J. Controlled Release* **2008**, *126*, 59-66.
71. Merkel, O. M.; Mintzer, M. A.; Librizzi, D.; Samsonova, O.; Dicke, T.; Sproat, B.; Garn, H.; Barth, P. J.; Simanek, E. E.; Kissel, T. “Triazine dendrimers as nonviral vectors for *in vitro* and *in vivo* RNAi: the effect of peripheral groups and core structure on biological activity,” *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 969-983.

72. Kang, H.; DeLong, R.; Fisher, M. H.; Juliano, R. L. "Tat-Conjugated PAMAM Dendrimers as Delivery Agents for Antisense and siRNA Oligonucleotides," *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 2099-2106.
73. Kang, H.; DeLong, R.; Fisher, M. H.; Juliano, R. L. "Tat-conjugated PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense and siRNA oligonucleotides," *Phar. Res.* **2005**, *22*, 2099-2106.
74. Waite, C. L.; Sparks, S. M.; Uhrich, K. E.; Roth, C. M. "Acetylation of PAMAM dendrimers for cellular delivery of siRNA," *BMC Biotechnology* **2009**, *9*, doi 10.1186/1472-6750-9-38.
75. Patil, M. L.; Zhang, M.; Betigeri, S.; Taratula, O.; He, H.; Minko, T. "Surface-modified and internally cationic polyamidoamine dendrimer for efficient siRNA delivery," *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1396-1403.
76. Patil, M. L.; Zhang, M.; Taratula, O.; Garbuzenko, O. B.; He, H.; Minko, T. "Internally cationic polyamidoamine PAMAM-OH dendrimers for siRNA delivery: effect of the degree of quaternization and cancer targeting," *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 258-266.
77. Liu, X. X.; Rocchi, P.; Qu, F. Q.; Zheng, S. Q.; Liang, Z. C.; Gleave, M.; Iovanna, J.; Peng, L. "PAMAM dendrimers mediate siRNA delivery to target Hsp27 and produce potent antiproliferative effects on prostate cancer cells," *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1302-1310.
78. Zhou, J.; Wu, J.; Hafdi, N.; Behr, J. P.; Erbacher, P.; Peng, L. "PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing," *Chem. Commun.* **2006**, *22*, 2362-2364.
79. Wu, J. Y.; Zhou, J. H.; Qu, F. Q.; Bao, P. H.; Zhang, Y.; Peng, L. "Polycationic dendrimers interact with RNA molecules: polyamine dendrimers inhibit the catalytic activity of *Candida* ribozymes," *Chem. Commun.* **2005**, 313-315.
80. Zhou, J. H.; Wu, J. Y.; Liu, X. X.; Qu, F. Q.; Xiao, M.; Zhang, Y.; Charles, L.; Zhang, C. C.; Peng, L. "Cooperative binding and self-assembling behavior of cationic low molecular-weight dendrons with RNA molecules," *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 581-585.
81. Scales, C. W.; Huang, F.; Li, N.; Vasilieva, Y. A.; Ray, J.; Convertine A. J.; McCormick, C. L. "Corona-stabilized interpolyelectrolyte complexes of siRNA with nonimmunogenic, hydrophilic/cationic block copolymers prepared by aqueous RAFT polymerization," *Macromolecules* **2006**, *39*, 6871-6881.

82. Nguyen, J.; Reul, R.; Roesler, S.; Dayyoub, E.; Schmehl, T.; Gessler, T.; Seeger, W.; Kissel, T. H. "Amine-modified poly(vinyl alcohols)s as non-viral vectors for siRNA delivery: effects of the degree of amine substitution on physicochemical properties and knockdown efficiency," *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2670-2682.
83. Beh, C. W.; Seow, W. Y.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Ong, Z. Y.; Ee, P. L. R.; Yang, Y-Y.; "Efficient delivery of Bcl-2-targeted siRNA using cationic polymer nanoparticles: downregulating mRNA expression level and sensitizing cancer cells to anticancer drugs," *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 41-48.
84. (α) Alvarez-Lorenzo, C.; Barreiro-Iglesias, R.; Concheiro, A.; Iourtchenko, L.; Alakhov, V.; Bromberg, L.; Temchenko, M.; Deshmukh, S.; Hatton, T. A. "Biophysical characterization of complexation of DNA with block copolymers of poly(2-dimethylaminoethyl) methacrylate, poly(ethylene oxide), and poly(propylene oxide)," *Langmuir* **2005**, *21*, 5142-5148. (β) Piroton, S.; Muller, C.; Pantoustier, N.; Botteman, F.; Collinet, S.; Grandfils, C.; Dandrifosse, G.; Degève, P.; Dubois, P.; Raes, M. "Enhancement of transfection efficiency through rapid and noncovalent post-PEGylation of poly(dimethylaminoethyl methacrylate)/DNA complexes," *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1471-1479. (γ) Zhu, C.; Jung, S.; Si, G.; Cheng, R.; Meng, F.; Zhu, X. "Cationic methacrylate copolymers containing primary and tertiary amino side groups: controlled synthesis via RAFT polymerization, DNA condensation, and *in vitro* gene transfection," *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 2869-2877. (δ) Schallon, A.; Jérôme, V.; Walther, A.; Synatschke, 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," *React. Funct. Polym.* **2010**, *70*, 1-10. (ε) Verbaan, F. J.; Oussoren, C.; Snel, C. J.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E.; Storm, G. "Steric stabilization of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based polyplexes mediates prolonged circulation and tumor targeting in mice," *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 64-75.
85. Kong, W.-H.; Sung, D.-K.; Shim, Y.-H.; Bae, K. H.; Dubois, P.; Park, T. G. Kim, J.-H.; Seo, S-W. "Efficient intracellular siRNA delivery strategy through rapid and simple two steps mixing involving noncovalent post-PEGylation," *J. Controlled Release* **2009**, *138*, 141-147.
86. Convertine, A. J.; Benoit, D. S. W.; Duvall, C. L.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. "Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery," *J. Controlled Release* **2009**, *133*, 221-229.

87. Convertine, A. J.; Diab, C.; Prieve, M.; Paschal, A.; Hoffman, A. S.; Johnson, P. H.; Stayton, P. S. "pH-responsive polymeric micelle carriers for siRNA drugs," *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2904-2911.
88. Itaka, K.; Kanayama, N.; Nishiyama, N.; Jang, W. D.; Yamasaki, K. N.; Kawaguchi, H.; Kataoka, K. "Supramolecular nanocarrier of siRNA from PEG-based block copolymer carrying diamine side chain with distinctive  $pK_a$  directed to enhance intracellular gene silencing," *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13612-13613.
89. Segura, T.; Hubbell, J. A. "Synthesis and *in vitro* characterization of ABC triblock copolymer for siRNA delivery," *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 736-745.
90. Jere, D.; Arote, R.; Jiang, H.-L.; Kim, Y.-K.; Cho, M.-H.; Cho, C.-S. "Bioreducible polymers for efficient gene and siRNA delivery," *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 1-4.
91. Vandebroucke, R.; Geest, B. G. D.; Bonne, S.; Viken, M.; Haecke, T. V.; Heimberg, H.; Wgner, E.; Rogiers, V.; De Smedt, S. G.; Demeester, J.; Sander, N. N. "Prolonged gene silencing in hepatoma cells and primary hepatocytes after small interfering RNA delivery with biodegradable poly( $\beta$ -amino esters)," *J. Gene Med.* **2008**, *10*, 783-794.
92. Tseng, S. J.; Tang, S. C. "Development of poly(amino ester glycol urethane)/siRNA polyplexes for gene silencing," *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1383-90.
93. Jeong, J. H.; Christensen, L. V.; Yockman, J. W.; Zhong, Z. Y.; Engbersen, J. F. J.; Kim, W. J.; Feijen, J.; Kim, S. W. "Reducible poly(amido ethylenimine) directed to enhance RNA interference," *Biomaterials* **2007**, *28*, 1912-1917.
94. Jere, D.; Kim, J. E.; Arote, R.; Jiang, H. L.; Kim, Y. K.; Choi, Y. J.; Yun, C.-H.; Cho, M.-H.; Cho, C.-S. "Akt1 silencing efficiencies in lung cancer cells by sh/si/ssiRNA transfection using a reductable polyspermine carrier," *Biomaterials* **2009**, *30*, 1635-1647.
95. Khan, A.; Benboubetra, M.; Sayyed, P. Z.; Ng, K. W.; Fox, S.; Beck, G.; Benter, I. M.; Akhtar, S. "Sustained polymeric delivery of gene silencing antisense ODNs, siRNA, DNazymes and Ribozymes: *in vitro* and *in vivo* studies," *J. Drug Targeting* **2004**, *12*, 393-404.
96. Wang, J.; Feng, S.-S.; Wang, S.; Chen, Z.-Y. "Evaluation of cationic nanoparticles of biodegradable copolymers as siRNA delivery system for hepatitis B treatment," *Int. J. Pharm.* **2010**, *400*, 194-200.
97. Cun, D.; Foged, C.; Yang, M.; Frøkjær, S.; Nielsen, H. M. "Preparation and characterization of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery," *Int. J. Pharm.* **2010**, *390*, 70-75.

98. Sun, T. M.; Du, J. Z.; Yan, L. F.; Mao, H. Q.; Wang, J. “Self-assembled biodegradable micellar nanoparticles of amphiphilic and cationic block copolymer for siRNA delivery,” *Biomaterials* **2008**, *29*, 4348-4355.
99. Xiong, X. B.; Uludag, H.; Lavasanifar, A. “Biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)-*block*-polyesters with grafted polyamines as supramolecular nanocarriers for efficient siRNA delivery,” *Biomaterials* **2009**, *30*, 242-253.
100. Zhu, S.; Jung, S.; Luo, S.; Meng, F.; Zhu, X.; Park, T. G.; Zhong, Z. “Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles based on PDMAEMA-PCL-PDMAEMA triblock copolymers,” *Biomaterials* **2010**, *31*, 2408–2416.
101. Davis, E. M. “The first delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticles: From concept to clinic,” *Mol. Pharm.* **2009**, *3*, 659-668.
102. Mori, T.; Ishikawa, A.; Nemoto, Y.; Kambe, N.; Sakamoto, M.; Nakayama, Y. “Development of a novel nonviral gene silencing that is effective both *in vitro* and *in vivo* using star-shaped block copolymer (star vector),” *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1262-1269.
103. Jeong, J. H.; Hyejung, M.; Oh, Y.-K.; Park, T. G. “siRNA conjugate delivery systems,” *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 5-14.
104. Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Itaka, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. “Lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugated through acid-labile  $\beta$ -thiopropionate linkage to construct pH sensitive polyion complex micelles achieving enhanced gene silencing in hepatoma cells,” *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1624-1625.
105. Kim, S. H.; Jeong, J. H.; Lee, S. H.; Kim, S. W.; Park, T. G. “PEG conjugated VEGF siRNA for ant-angiogenic gene therapy,” *J. Controlled Release* **2006**, *116*, 123-129.
106. Rozema, D. B.; Lewis, D. L.; Wakefield, D. H.; Wong, So C.; Klein, J. J.; Roesch, P. L.; Bertin, S.L.; Reppen, T. W.; Chu, Q.; Blokhin, A. V.; Hagstrom, J. E.; Wolff, J. A. “Dynamic polyconjugates for targeted *in vivo* delivery of siRNA to hepatocytes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12982-12987.
107. Meyer, M.; Dohmen, C.; Philipp, A.; Kiener, D.; Maiwald, G.; Scheu, C.; Ogris, M.; Wagner, E. “Synthesis and biological evaluation of bioresponsive and endosomolytic siRNA-polymer conjugate,” *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 752-762.
108. Kim, S. H.; Jeong, J. H.; Lee, S. H.; Kim, S. W.; Park, T. G. “LHRH receptor-mediated delivery of siRNA using polyelectrolyte complex micelles self-assembled

- from siRNA-PEG-LHRH conjugate and PEI,” *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2156-2162.
109. Nothisen ,M.; kotera, M.; Voirin, E.; Remy, J.-S.; Behr, J.-P. “Cationic siRNAs provide carrier-free gene silencing in animal cells,” *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17730-17731.
110. York, A. W.; Huang, F.; McCormick, C. L. “Rational design of targeted cancer therapeutics through the multiconjugation of folate and cleavable siRNA to RAFT-synthesized (HPMA-*s*-APMA) copolymers,” *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 505-514.
111. Kim, W. J.; Chang, C. W.; Lee, M.; Kim, S. W. “Efficient siRNA delivery using water soluble lipopolymer for anti-angiogenic gene therapy,” *J. Controlled Release* **2007**, *118*, 357-363.
112. Fröhlich, T.; Wagner, E. “Peptide- and polymer-based delivery of therapeutic RNA,” *Soft Mater.* **2010**, *6*, 226-234.
113. Prochiantz, A.; “Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others,” *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 400-406.
114. Hicke, B. J.; Stephens, A. “Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy,” *J. Clin. Invest.* **106**, 923-928.
115. Chu, T. C.; Twu, K. Y.; Ellington, A. D.; Levy, M. “Aptamers mediated siRNA delivery,” *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e73.
116. Iketa, Y.; Taira, K. “Ligand-targeted delivery of therapeutic siRNA,” *Pharm. Res.* **2006**, 1631-1640.
117. Zhang, S.; Zhao, B.; Jiang, H.; Wang, B.; Ma, B. “Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA,” *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 1-10.
118. Semple, S. C.; Akinc, A.; Chen, J.; Sandhu, A. P.; Mui, B. L. et al. “Rational design of cationic lipids for siRNA delivery,” *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 172-176.
119. Akinc, A.; Zumbuehl, A.; Goldberg, M.; Leshchiner, E. S.; et al. “A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics,” *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 561-569.
120. Cho, S.-W.; Goldberg, M.; son, S. M.; Xu, Q.; Yang, F.; Mei, Y.; Bogatyrev, S.; Langer, R.; Anderson, D. G. “Lipid-like nanoparticles for small interfering RNA delivery to endothelial cells,” *Advance Functional Materials* **2009**, *19*, 3112-3118.
121. Kim, W. J.; Kim, S. W. “Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles,” *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 657-666.



122. Peer, D.; Park, E. J.; Morishita, Y.; Carman, C. V.; Shimaoka, M. “Systemic leukocyte-directed siRNA delivery is revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target,” *Science* **2008**, *319*, 627-630.
123. Pirollo, K. F.; Zon, G.; Rait, A.; Zhou, Q.; Yu, W.; Hogrefe, R.; Chang, E. H. “Tumor-targeting nanoimmunoliposome complex for short interfering RNA delivery,” *Hum. Gene Ther.* **2006**, *17*, 117-124.
124. Tran, M. A.; Watts, R. J.; Robertson, P. “Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma,” *Pigment of Cell Melanoma Res.* **2009**, *22*, 388-399.
125. Sato, Y.; Murase, K.; Kato, J.; Kobune, M.; Sato, T.; Kawano, Y.; Takimoto, R.; Takada, K.; Miyanishi, K.; Matsunaga, T.; Takayama, T.; Niitsu, Y. “Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperon,” *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 431-442.
126. Friedman, T.; Felgner, P. L.; Blaese, R. M.; Ho, D. Y.; Sapolsky, R. M.; Mirsky, S.; Rennie, J. “Making gene therapy work,” *Scientific American* **1997**, *June*, 79-104.
127. Moschogianni, P.; Pispas, S.; Hadjichristidis, N. “Multifunctional ATRP initiators: synthesis of four-arm homopolymers of methyl methacrylate and graft copolymers of polystyrene and poly(*t*-butyl methacrylate),” *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2001**, *39*, 650-655.
128. Goh, T. K.; Yamashita, S.; Satoh, K.; Blencowe, A.; Kamigaito, M.; Qiao, G. G. “High efficient synthesis of low polydispersity core cross-linked star polymers by Ru-catalyzed living radical polymerization,” *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 456-461.
129. Heise, A.; Trollsas, M.; Magbitang, T.; Hedrick, J. L.; Frank, C. W.; Miller, R. D. “Star polymers with alternating arms from miktofunctional initiators using consecutive atom transfer radical polymerization and ring-opening polymerization,” *Macromolecules* **2001**, *34*, 2789-2804.
130. Matmour, R.; Lebreton, A.; Tsitsilianis, C.; Kallitsis, I.; Heroguez, V.; Gnanou, Y. “Tri- and tetracarbanionic initiators by a lithium/halide exchange reaction: application to star-polymer synthesis,” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 284-287.
131. Roovers, J.; Zhou, L.L.; Toprowski, P. M.; Vanderzwan, M.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. “Regular star polymers with 64 and 128 arms-models for polymeric micelles,” *Macromolecules* **1993**, *26*, 4324-4331.

132. Hong, K. L.; Wan, Y. N.; Mays, J. W. "1,3-cyclohexanediene polymers. 2. Near-monodisperse star and star-block polymers on poly(1,3-cyclohexanediene)," *Macromolecules* **2001**, *34*, 2482-2487.
133. Switek, K. A.; Bates, F. S.; Hillmyer, M. A. "Star polymer synthesis using hexafluoropropylene oxide as an efficient multifunctional coupling agent," *Macromolecules* **2004**, *37*, 6355-6361.
134. Gao, H. F.; Tsarevski, N. V.; Matyjaszewski, K.; "Synthesis of degradable miktoarm star copolymers via atom transfer radical polymerization," *Macromolecules* **2005**, *38*, 5995-6004.
135. Feng, X. S.; Pan, C. Y. "Synthesis and characterization of star polymers initiated by hexafunctional discotic initiator through atom transfer radical polymerization," *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2001**, *39*, 2233-2243.
136. Jones, M.-C.; Ranger, M.; Leroux, J.-C. "pH-sensitive unimolecular polymeric micelles: synthesis of a novel drug carrier," *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 774-781.
137. Plamper, F. A.; Becker, H.; Lanzendörfer, M.; Patel, M.; Wittemann, A.; Ballauff, M.; Müller, A. H. E. "Synthesis, characterization and behavior in aqueous solution of star-shaped poly(acrylic acid)," *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206*, 1813-1825.
138. Jankova, K.; Bednarek, M.; Hvilsted, S. "Star polymers by ATRP of styrene and acrylates employing multifunctional initiators," *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 3748-3759.
139. Tsitsilianis, C.; Voulgaris, D. "Poly(2-vinylpyridine)-based star-shaped polymers. Synthesis of heteroarm star (A(n)B(n)) and star block (AB)(n) copolymers," *Macromol. Chem. Phys.* **1997**, *198*, 997-1007.
140. Tsitsilianis, C.; Voulgaris, D. "Hydrodynamic dimensions of heteroarm star copolymers by size exclusion chromatography," *Polymer* **2000**, *41*, 1607-1614.
141. Lee, H. J.; Lee, K.; Choi, N. "Controlled anionic synthesis of star-shaped polystyrene by the incremental addition of divinylbenzene," *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 870-878.
142. Zheng, G. H.; Pan, C. H. "Preparation of star polymers based in polystyrene or polystyrene-*b*-*N*-isopropyl acrylamide and divinylbenzene via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization," *Polymer*, **2005**, *46*, 2802-2810.
143. Lorenzo, A. T.; Müller, A. J.; Priftis, D.; Pitsikalis, M.; Hadjichristidis, N. "Synthesis and morphological characterization of miktoarm star copolymers (PCL)<sub>2</sub>(PS)<sub>2</sub> of

- poly( $\epsilon$ -caprolactone) and polystyrene,” *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 5387-5397.
144. Whittaker, M. R.; Monteiro, M. J. “Synthesis and aggregation behavior of four-arm star amphiphilic block copolymers in water,” *Langmuir* **2006**, *22*, 9746-9752.
145. Abouelmagd, A.; Sugiyama, K.; Hirao, A. “Synthesis of well-defined miktoarm star-branched polymers consisting of perfluorinated segments by a novel methodology using soluble in-chain-benzyl bromide-functionalized AB diblock copolymers as key building blocks,” *Macromolecules* **2011**, *44*, 826-834.
146. Hirao, A.; Kawasaki, K.; Higashihara, T. “Precise synthesis of asymmetric star-shaped polymers by coupling reactions of new specially designed polymer anions with chain-end-functionalized polystyrenes with benzyl bromide moieties,” *Sci. Tech. Adv. Mater.* **2004**, *5*, 469-477.
147. Hadjiyannakou, S. C.; Triftaridou, A. I.; Patrickios, C. S. “Synthesis, characterization and evaluation of amphiphilic star copolymeric emulsifiers based on methoxy hexa(ethylene glycol) methacrylate and benzyl methacrylate,” *Polymer* **2005**, *46*, 2433-2442.
148. Schmalz, A.; Hanisch, M.; Schmalz, H.; Müller, A. H. E. “Double stimuli-responsive behaviour of linear and star-shaped poly(*N,N*-diethylaminoethyl methacrylate) in aqueous solution,” *Polymer* **2010**, *51*, 1213-1217.
149. Triftaridou, A. I.; Vamvakaki M.; Patrickios, C. S.; Stavrouli, N.; Tsitsilianis, C. “Synthesis of amphiphilic (ABC)<sub>n</sub> multiarm star triblock terpolymers,” *Macromolecules* **2005**, *38*, 1021-1024.
150. Erdogan, T.; Ozyrek, Z.; Hizal, G.; Tunca, U. “Facile synthesis of AB(2)-type miktoarm star polymers through the combination of atom transfer radical polymerization and ring-opening polymerization,” *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 2313-2320.
151. Du, J. Z.; Chen, Y. M. “Star polymer, PCL-PS heteroarm star polymer by ATRP, and core-carboxylated PS star polymer,” *Macromolecules* **2004**, *37*, 3588-3594.
152. Hirata, M.; Abe, Y.; Ochiai, B.; Endo, T. “Synthesis of well-defined and end-polymerizable star-shaped polysulfides and their application to negative photoresist,” *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 4385-4392.
153. Li, D.-H.; Lin, C.-H.; Chen, C.-Y.; Hsu, J.-C.; Chiu, Y.-C.; Chang, W.-T.; Chen, W.-C. “Poly[2,7-(9,9-dihexylfluorene)]-*block*-poly(2-vinylpyridine) rod-coil star-block

- copolymers: synthesis, micellar structures, and photophysical properties,” *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 297-304.
154. Mishra, V.; Kumar, R. “Synthesis and characterization of five-arm star polymer of *N*-vinyl pyrrolidone through ATRP based on glucose,” *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1534-1540.
155. Allcock, H.R.; Lambe, F.W. *Contemporary Polymer Chemistry*; 2<sup>nd</sup> Ed., Prentice Hall: Englewood Cliffs, **1990**.
156. Mespouille, L.; Hedrick, J. L.; Dubois, P. “Solid–solid interface adsorption of proteins and enzymes in nanophase-separated amphiphilic conetworks,” *Soft Matter* **2009**, *5*, 4878-4892.
157. Gitsov, I. “Hybrid linear dendritic macromolecules: from synthesis to applications,” *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 5295-5314.
158. Erdodi, G.; Kennedy, J. P. “Structural investigations on hybrid polymers suitable as a nanoparticle precipitation environment,” *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 1-18.
159. Patrickios, C. S.; Georgiou, T. K. “Covalent amphiphilic polymer networks,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8*, 76-85.
160. Weber, M.; Stadler, R. “Hydrophilic-hydrophobic two-component polymer networks: 1. Synthesis of reactive poly(ethylene oxide) telechelics,” *Polymer* **1988**, *29*, 1064-1070.
161. Weber, M.; Stadler, R. “Hydrophilic-hydrophobic two-component polymer networks: 2. Synthesis and characterization of poly(ethylene oxide)-*linked*-polybutadiene,” *Polymer* **1988**, *29*, 1071-1078.
162. Chen, D.; Kennedy, J. P.; Allen, A. J. J. “Amphiphilic networks. 1. Network synthesis by copolymerization of methacryloyl-capped polyisobutylene with 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate and characterization of the networks,” *J. Macromol. Sci. Chem.* **1988**, *A25*, 389-401.
163. Bromberg, L.; Temchenko, M.; Hatton, T. A. “ Synthesis and self-assembly of poly(ethylene oxide)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene oxide)-*g*-poly(acrylic acid) Gels,” *Langmuir* **2002**, *18*, 4944-4952.
164. Tanahashi, K.; Jo, S.; Mikos, A. G. “Synthesis and characterization of biodegradable cationic poly(Propylene fumarate-co-ethylene glycol) copolymer hydrogels modified with agmatine for enhanced cell adhesion,” *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1030-1037.

165. Rimmer, S.; Wilshaw, S.-P.; Pickavance, P.; Ingham, E. "Cytocompatibility of poly(1,2 propandiol methacrylate) copolymer hydrogels and conetworks with or without alkyl amine functionality," *Biomaterials* **2009**, *30*, 2468-2478.
166. Grundfest-Broniatowski, S. F.; Tellioglu, G.; Rosenthal, K. S.; Kang, J.; Erdodi, G.; Yalcin, B.; Cakmak, M.; Drazba, J.; Bennett, A.; Lu, L.; Kennedy, J. P. "A new bioartificial pancreas utilizing amphiphilic membranes for the immunoisolation of porcine islets: a pilot study in the canine," *ASAIO J.* **2009**, *55*, 400-405.
167. Nicolson, P. C.; Vogt, J. "Soft contact lens polymers: an evolution," *Biomaterials* **2001**, *22*, 3273-3283.
168. Du Prez, F. E.; Goethals, E. J.; Schué, R.; Qariouh, H.; Schué, F. "Multifunctional membranes for solvent resistant nanofiltration and pervaporation applications based on segmented polymer networks," *Polym. Int.* **1998**, *46*, 117-125.
169. Christodoulakis, K. E.; Palioura, D.; Anastasiadis, S. H.; Vamvakaki, M. "Metal nanocrystals embedded within polymeric nanostructures: Effect of polymer-metal compound interactions," *Top. Catal.* **2009**, *52*, 394-411.
170. Hensle, E. M.; Tobis, J.; Tiller, J. C.; Bannwarth, W. "Ring-closing olefin metathesis in the aqueous phase of amphiphilic conetworks consisting of fluorophilic and hydrophilic compartments," *J. Fluor. Chem.* **2008**, *129*, 968-973.
171. Savin, G.; Bruns, N.; Thomann, Y.; Tiller, J. C. "Nanophase separated amphiphilic microbeads," *Macromolecules* **2005**, *38*, 7536-7539.
172. (a) Yamamoto, K.; Ito, E.; Fukaya, S.; Takagi, H. "Phase-separated conetwork structure induced by radical copolymerization of poly(dimethylsiloxane)- $\alpha,\omega$ -diacrylate and *N,N*-Dimethylacrylamide," *Macromolecules* **2009**, *42*, 9561-9567. (b) Tobis, J.; Thomann, Y.; Tiller, J. C. "Synthesis and characterization of chiral and thermo responsive amphiphilic conetworks," *Polymer* **2010**, *51*, 35-45. (c) Subramanyam, U.; Kennedy, J. P. "PVA networks grafted with PDMS branches," *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2009**, *47*, 5272-5277.
173. (a) Lin, C.; Gitsov, I. "Synthesis and physical properties of reactive amphiphilic hydrogels based on poly(pchloromethylstyrene) and poly(ethylene glycol): Effects of composition and molecular architecture," *Macromolecules* **2010**, *43*, 3256-3267. (b) Bartels, J. W.; Billings, P. L.; Ghosh, B.; Urban, M. W.; Greenlief, C. M.; Wooley, K. L. "Amphiphilic crosslinked networks produced from the vulcanization of nanodomains within thin films of poly(*N*-vinylpyrrolidinone)-*b*-poly(isoprene)," *Langmuir* **2009**, *25*, 9535-9544.

174. Triftaridou, A. I.; Kafouris, D.; Vamvakaki, M.; Georgiou, T. K.; Krasia, T. C.; Themistou, E.; Hadjiantoniou, N.; Patrickios, C. S. “Three Different Types of Quasi-Model Networks: Synthesis by Group Transfer Polymerization and Characterization,” *Polym. Bull.* **2007**, *58*, 185-190.
175. Achilleos, M.; Legge, T. M.; Perrier, S.; Patrickios, C. S. “Poly(ethylene glycol)-based amphiphilic model conetworks: Synthesis by RAFT polymerization and characterization,” *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 7556-7565.
176. Triftaridou, A. I.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. “Cationic Amphiphilic Model Networks Based on Symmetrical ABCBA Pentablock Terpolymers: Synthesis, Characterization and Modeling,” *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1615-1623.
177. Triftaridou, A. I.; Loizou, E.; Patrickios, C. S. “Synthesis and characterization of amphiphilic cationic symmetrical ABCBA pentablock terpolymer networks: Effect of hydrophobic content,” *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 4420-4432.
178. Simmons, M. R.; Yamasaki, E. N.; Patrickios, C. S. “Cationic homopolymer model networks and star polymers: synthesis by group transfer polymerisation and characterization of the aqueous degree of swelling,” *Macromolecules* **2000**, *33*, 3176-3179.
179. Triftaridou, A. I.; Hadjiyannakou, S. C.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. “Synthesis, Characterization and Modeling of Cationic Amphiphilic Model Hydrogels: Effects of Polymer Composition and Architecture,” *Macromolecules* **2002**, *35*, 2506-2513.
180. Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. “Synthesis and Characterization of Polyelectrolytic Amphiphilic Model Networks Based on Cross-linked Stars: Effect of Star Architecture,” *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 1630-1638.
181. Achilleos D. S.; Georgiou, T. K.; Patrickios, C. S. “Amphiphilic model conetworks based on cross-linked star copolymers of benzyl methacrylate and 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate: Synthesis, characterization and DNA adsorption studies,” *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3396-3405.
182. Achilleos, M.; Krasia-Christoforou, T.; Patrickios, C. S. “Amphiphilic model conetworks based on combinations of methacrylate, acrylate and styrenic units: Synthesis by RAFT radical polymerization and characterization of the swelling behavior” *Macromolecules* **2007**, *40*, 5575-5581.
183. Krasia, T. C.; Patrickios, C. S. “pH response of model diblock and triblock copolymer networks containing polystyrene and poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-2-(dimethylamino)ethyl methacrylate),” *Macromolecules* **2006**, *39*, 2467-2473.

184. Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S.; Lindner, P.; Gradzielski, M. “Amphiphilic networks based on cross-linked star polymers: A small-angle neutron scattering study,” *Langmuir* **2007**, *23*, 10433-10437.
185. Georgiou, T. K.; Patrickios, C. S.; Groh, P. W.; Iván, B. “Amphiphilic model conetworks of polyisobutylene methacrylate and 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate prepared by the combination of quasiling carbocationic and group transfer polymerizations” *Macromolecules* **2007**, *40*, 2335-2343.
186. Hadjiantoniou, N. A.; Patrickios, “Synthesis and characterization of amphiphilic conetworks based on multiblock copolymers,” *C. S. Polymer* **2007**, *48*, 7041-7048.
187. Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. “Synthesis and characterization of the swelling and mechanical properties of amphiphilic ionizable model conetworks containing *n*-butyl methacrylate hydrophobic blocks,” *Soft Matter* **2008**, *4*, 268-276.
188. Kafouris, D.; Gradzielski, M.; Patrickios, C. S. “Amphiphilic networks based on cross-linked star polymers: A small-angle neutron scattering study,” *Macromolecules* **2009**, *42*, 2972-2980.
189. Hadjiantoniou, N. A.; Patrickios, C. S.; Thomann, Y.; Tiller, J. C. “Amphiphilic conetworks based on end-linked multiblock copolymers of different numbers of blocks and constant molecular weight and composition,” *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 942-950.
190. Rikkou, M. D.; Loizou, E.; Porcar, L.; Butler, P.; Patrickios, C. S. “Degradable amphiphilic end-linked conetworks with aqueous degradation rates determined by polymer topology,” *Macromolecules* **2009**, *42*, 9412-9421.
191. Rikkou, M. D.; Loizou, E.; Porcar, L.; Patrickios, C. S. “Structural characterization of amphiphilic polymer conetworks end-linked with the optimal amount of cross-linker,” *Eur. Polym. J.* **2010**, *46*, 441-449.
192. Rikkou, M. D.; Kolokasi, M.; Matyjaszewski, K.; Patrickios, C. S. “End-linked amphiphilic polymer conetworks: Synthesis by sequential atom transfer radical polymerization and swelling characterization,” *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 1878-1886.
193. Kali, G.; Georgiou, T. K.; Iván, B.; Patrickios, C. S.; Loizou, E.; Thomann, Y.; Tiller, J. C. “Synthesis and Characterization of Anionic Amphiphilic Model Conetworks Based on Methacrylic Acid and Methyl Methacrylate: Effects of Composition and Architecture,” *Macromolecules* **2007**, *40*, 2192-2200.

194. Kali, G.; Georgiou, T. K.; Iván, B.; Patrickios, C. S.; Loizou, E.; Thomann, Y.; Tiller, J. C. "Synthesis and Characterization of Anionic Amphiphilic Model Conetworks of 2-Butyl-1-Octyl Methacrylate and Methacrylic Acid: Effects of Polymer Composition and Architecture," *Langmuir* **2007**, *23*, 10746-10755.
195. Kali, G.; Georgiou, T. K.; Iván, B.; Patrickios, C. S. "Anionic amphiphilic end-linked conetworks by the combination of quasilinging carbocationic and group transfer polymerizations," *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2009**, *47*, 4289-4301.
196. Gudipati, C. S.; Finlay, J. A.; Callow, J. A.; Callow, M. E.; Wooley, K. L. "The anti-fouling and fouling-release performance of unique hyperbranched fluoropolymer (HBFP)-poly(ethylene glycol) (PEG) composite coatings evaluated by protein adsorption and the settlement of zoospores of the green fouling Alga *Ulva* (syn. *Enteromorpha*)," *Langmuir* **2005**, *21*, 3044-3053.
197. Gan, D.; Mueller, A.; Wooley, K. L. "Amphiphilic and hydrophobic surface patterns generated from hyperbranched fluoropolymer (HBFP)-linear polymer networks: minimally-adhesive coatings via crosslinking of hyperbranched fluoropolymers," *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 3531-3540.
198. Brown, G. O.; Bergquist, C.; Ferm, P.; Wooley, K. L. "Unusual, promoted release of guests from amphiphilic crosslinked polymer networks," *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11238-11239.
199. Xu, J.; Bohnsack, D. A.; Mackay, M. E.; Wooley, K. L. "Unusual mechanical performance of amphiphilic crosslinked polymer networks," *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 506-507.
200. Gudipati, C. S.; Greenlief, C. M.; Johnson, J. A.; Prayongpan, P.; Wooley, K. L. "Hyperbranched fluoropolymer (HBFP) and linear poly(ethylene glycol) (PEG) based amphiphilic crosslinked networks as efficient anti-fouling coatings: An insight into the surface compositions, topographies and morphologies," *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 6193-6208.
201. Powell, K. T.; Cheng, C.; Wooley, K. L.; Singh, A.; Urban, M. W. "Complex amphiphilic networks derived from diamine-terminated poly(ethylene glycol) and benzylic chloride-functionalized hyperbranched fluoropolymers," *Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 4782-4794.
202. Bruns, N.; Tiller, J. C. "Amphiphilic conetworks with a fluorophilic phase," *Macromolecules* **2006**, *39*, 4386-4394.



203. Hu, Z.; Chen, L.; Betts, E. D.; Pandya, A.; Hillmyer, M. A.; DeSimone, J. M. “Optically transparent, amphiphilic networks based on blends of perfluoropolyethers and poly(ethylene glycol),” *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14244-14252.
204. Consolati, G.; Levi, M.; Turri, S. “Positron annihilation and phase separation phenomena in polyurethane crosslinked coatings with different polyether segments,” *Polymer* **2001**, *42*, 9723-9728.
205. Turri, S.; Radice, S.; Canteri, R.; Speranza, G.; Anderle, M. “Surface study of perfluoropolyether-urethane cross-linked polymers,” *Surf. Interface Anal.* **2000**, *29*, 873-886.
206. Bongiovanni, R.; Malucelli, G.; Messori, M.; Pilati, F.; Priola, A.; Tonelli, C.; Toselli, M. “Acrylic polyester resins containing perfluoropolyethers structures: synthesis, characterization and photopolymerization,” *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *75*, 651-659.
207. Kudaibergenov, S. “Recent advances in the study of synthetic polyampholytes in solution,” *Adv. Polym. Sci.* **1999**, *144*, 115-197.
208. Lowe, A. B.; McCormick, C. L. “Synthesis and solution properties of zwitterionic polymers,” *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4177-4189.
209. Ciferri, A.; Kudaibergenov, S. “Natural and synthetic polyampholytes, 1<sup>a</sup> theory and basic structures,” *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 1953-1968.
210. Dobrynin, A. V.; Colby, R. H.; Rubinstein, M. “Polyampholytes,” *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2004**, *42*, 3513-3538.
211. Dobrynin, A. V. “Theory and stimulations of charged polymers: from solution properties to polymeric nanomaterials,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2008**, *13*, 376-388.
212. Chen, L.; Tian, Z.; Du, Y. “Synthesis and pH sensitivity of carboxymethyl chitosan-based polyampholyte hydrogels for protein carrier matrices,” *Biomaterials* **2004**, *25*, 3725-3732.
213. Casolaro, M.; Bottari, S.; Ito, Y. “Vinyl polymers based on L-histidine residues. Part 2. Swelling and electric behavior of smart poly(ampholyte) hydrogels for biomedical applications,” *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1439-1448.
214. Ogawa, Y.; Kazuyoshi, O.; Wang, B.; Kokufuta, E. “A biochemo-mechanism system consisting of polyampholyte gels coimmobilized glucose oxidase and urease,” *Langmuir* **2001**, *17*, 2670-2674.

215. Sutani, K.; Kaetsu, I.; Uchida, K.; Matsubara, Y. “Stimulus responsive drug release from polymer gel. Controlled release of ionic drug from polyampholyte gel,” *Radiat. Phys. Chem.* **2002**, *64*, 331–336.
216. Georgiou, T. K.; Patrickios, C. S. “Synthesis, characterization, and DNA adsorption studies of ampholytic model conetworks based on cross-linked star copolymers,” *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 574–582.
217. Ohsugi, A.; Furukawa, H.; Kakugo, A.; Osada, Y.; Gong, J. P. “Catch and release of DNA in coacervate-dispersed gels,” *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 1242–1246.
218. Alvarez-Lorenzo, C.; Hiratani, H.; Tanaka, K.; Stancil, K.; Grosberg, A. Yu.; Tanaka, T. “Simultaneous multiple-point adsorption of aluminum ions and charged molecules by a polyampholyte thermosensitive gel: controlling frustrations in a heteropolymer gel,” *Langmuir* **2001**, *17*, 3616–3622.
219. Karbarz, M.; Pulka, K.; Misicka, A.; Stojek, Z. “pH and temperature-sensitive *N*-isopropylacrylamide ampholytic networks incorporation *L*-lysine,” *Langmuir* **2006**, *22*, 7843–7847.
220. Ogawa, Y.; Ogawa, K.; Kokufuta, E. “Shrinking behavior of a polyampholyte gel composed of positively charged networks with immobilized polyanions,” *Langmuir* **2004**, *20*, 2546–2552.
221. Ogawa, K.; Nakayama, A.; Kokufuta, E. “Preparation and characterization of thermosensitive polyampholyte nanogels,” *Langmuir* **2003**, *19*, 3178–3184.
222. Ogawa, K.; Nakayama, A.; Kokufuta, E. “Electrophoretic behavior of ampholytic polymers and nanogels,” *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 8223–8227.
223. Kakinoki, S.; Kaetsu, I.; Nakayama, M.; Sutani, K.; Uchida, K.; Yukutake, K. “Temperature and pH responsiveness of poly-(DMAA-*co*-unsaturated carboxylic acid) hydrogels synthesized by UV-irradiation,” *Radiat. Phys. Chem.* **2003**, *67*, 685–693.
224. Nisato, G.; Munch, J. P.; Candau, S. J. “Swelling, structure, and elasticity of polyampholyte hydrogels,” *Langmuir* **1999**, *15*, 4236–4244.
225. Kudaibergenov, S. E.; Sigitov, V. B. “Swelling, shrinking, deformation, and oscillation of polyampholyte gels based on vinyl 2-aminoethyl ether and sodium acrylate,” *Langmuir* **1999**, *15*, 4230–4235.
226. Guo, B.; Elgsaete, A.; Christensen, B. E.; Stokke, B. T. “Sclerox-chitosan co-gels: Effects of charge density on swelling of gels in ionic aqueous solution and in poor

- solvents, and on the rehydration of dried gels,” *Polym. Gels Networks* **1998**, *6*, 471–492.
227. English, A. E.; Tanaka, T.; Edelman, E. R. “Polymer and solution ion shielding in polyampholytic hydrogels,” *Polymer* **1998**, *39*, 5893–5897.
228. Thanh, L. T. M.; Makhaeva, E. E.; Khokhlov, A. R. “Polyampholyte gels: swelling, collapse and interaction with ionic surfactants,” *Polym. Gels Networks* **1997**, *5*, 357–367.
229. Baker, J. P.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M. “swelling properties of acrylamide-based ampholytic hydrogels: comparison of experiment with theory,” *Polymer* **1995**, *36*, 1061-1069.
230. McCormick, C. L.; Salazar, L. C. “Ampholytic terpolymers of acrylamide with sodium 3-acrylamido-3-methylbutanoate and 2-acrylamido-2-methylpropane-trimethylammonium chloride,” *J. Appl. Polym. Sci.* **1993**, *45*, 1115-1120.
231. Yu, H.; Grainger, D. W. “thermo-sensitive swelling behavior in crosslinked *N*-isopropylacrylamide networks: cationic, anionic, and ampholytic hydrogels, ” *J. Appl. Polym. Sci.* **1993**, *49*, 1553-1563.
232. Baker, J. P.; Stephens, D. R.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M. “Swelling equilibria for acrylamide-based polyampholyte hydrogels,” *Macromolecules* **1992**, *25*, 1955–1958.
233. Annaka, M.; Tanaka, T. “Multiple phases of polymer gels,” *Nature* **1992**, *355*, 430–432.
234. Tanya, M.; Ende, A.; Peppas, N. A.; “Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly(acrylic acid) and poly(acrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. II. Diffusion and release studies,” *J. Controlled Release* **1997**, *48*, 47-56.
235. Zhao, Y.; Chen, W.; Xia, J.; Liu, W.; Yang, Y.; Xu, H.; Yang, X. “Erosion behavior of ionically crosslinked polyampholyte gels under DC electric field,” *Macromol. Chem. Phys.* **2006**, *207*, 1674-1679.
236. Valencia, J.; Piérola, I. F. “Interpretation of the polyelectrolyte and antipolyelectrolyte effects of poly(*N*-vinylimidazole-co-sodium styrenesulfonate) hydrogels,” *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2007**, *45*, 1683-1693.
237. Mohan, M. Y.; Geckeler, K. E.; “Polyampholytic hydrogels: Poly(*N*-isopropylacrylamide)-based stimuli-responsive networks with poly(ethyleneimine),” *React. Funct. Polym.* **2007**, *67*, 144-155.

238. Valencia, J.; Baselga, J.; Pierola, I. F. “Compression elastic modulus of neutral, ionic, and amphoteric hydrogels based on *N*-vinylimidazole,” *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2009**, *47*, 1078-1087.
239. Yu, C.; Yun-fei, T.; Huan-lin, T.; Hui-min, T. “Study of carboxymethyl chitosan based Polyampholyte superabsorbent polymer I optimization of synthesis conditions and pH sensitive property study of carboxymethyl chitosan-g-poly(acrylic acid-co-dimethyldiallylammonium chloride) superabsorbent polymer,” *Carbohydr. Polym.* **2010**, *81*, 365-371.
240. Demosthenous, E.; Hadjiyannakou, S. C.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. “Synthesis and characterization of polyampholytic model networks: Effects of polymer composition and architecture,” *Macromolecules* **2002**, *35*, 2252-2260.
241. Webster, O. W.; Hertler, W. R.; Sogah, D. Y.; Farnham, W. B.; RajanBabu, T. V. “Group-transfer polymerization. 1. A new concept for addition polymerization with organosilicon initiators,” *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5706–5708.
242. Sogah, D. Y.; Hertler, W. R.; Webster, O. W.; Cohen, G. M. “Group Transfer Polymerization. Polymerization of Acrylic Monomers,” *Macromolecules* **1987**, *20*, 1473–1488.
243. Dicker, I. B.; Cohen, G. M.; Farnham, W. B.; Hertler, W. R.; Laganis, E. D.; Sogah, D. Y. “Oxyanions Catalyze Group-Transfer Polymerization to Give Living Polymers,” *Macromolecules* **1990**, *23*, 4034–4041.
244. Webster, O. W. “Group transfer polymerization: A critical review of its mechanism and comparison with other methods for controlled polymerization of acrylic monomers,” *Adv. Polym. Sci.* **2004**, *167*, 1–34.
245. Lowe, A. B.; Billingham, N. C.; Armes, S. P. “Synthesis and characterization of zwitterionic block copolymers,” *Macromolecules* **1998**, *31*, 5991–5998.
246. Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. “Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: The RAFT process,” *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559-5562.
247. Higgins, J. S.; Benoit, H. C. *Polymers and Neutron Scattering*, Clarendon Press Oxford, 1996.
248. Weaver, J. V. M.; Bannister, I.; Robinson, K. L.; Bories-Azeau, X.; Armes, S. P. “Stimulus-responsive water-soluble polymers based on 2-hydroxyethyl methacrylate,” *Macromolecules* **2004**, *37*, 2395-2403.

249. Hiemenz, P. C. *Polymer Chemistry: The basic concepts*; Marcel Dekker: New York, 1984; Ch. 1 p. 62-63.
250. (α) Georgiou, T. K.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S.; Yamasaki, E. N.; Phylactou, L. A. "Nanoscopic cationic methacrylate star homopolymers: Synthesis by group transfer polymerization, characterization and evaluation as transfection reagents," *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2221-2229. (β) Georgiou, T. K.; Vamvakaki, M.; Phylactou, L. A.; Patrickios, C. S. "Synthesis, characterization, and evaluation as transfection reagents of double-hydrophilic star copolymers: Effect of star architecture," *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2990-2997. (γ) Georgiou, T. K.; Phylactou, L. A.; Patrickios, C. S. "Synthesis, characterization, and evaluation as transfection reagents of ampholytic star copolymers: Effect of star architecture," *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3505-3512.
251. Hunter, R. J. *Foundations of Colloid Science*; Oxford University 841 Press: Oxford, 1993; Vol. I, p 475.
252. Simmons, M. R.; Patrickios, C. S. "Synthesis and aqueous solution characterization of catalytically active block copolymers containing imidazole," *Macromolecules* **1998**, *31*, 9075-9077.
253. 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**, *18*, 13-18.
254. Patrickios, C. S.; Hertler, W. R.; Abbott, N. L.; Hatton, T. A. "Diblock, ABC triblock, and random methacrylic polyampholytes – synthesis by group-transfer polymerization and solution behavior," *Macromolecules* **1994**, *27*, 930-937.
255. Patrickios, C. S.; Yamasaki, E. N. " " *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 82-91.
256. Siegel, R. A.; Firestone, B. A. "Swelling of a polymer membrane for use in a glucose biosensor," *Macromolecules* **1988**, *21*, 3254-3259. (b) Shibayama, M.; Tanaka, T. "Structure characterization of tetra-PEG gel by small-angle neutron scattering," *Adv. Polym. Sci.* **1993**, *109*, 1-62. (c) Philippova, O. E.; Hourdet, D.; Audebert, R.; Khokhlov, A. R. " pH-responsive gels of hydrophobically modified poly(acrylic acid)," *Macromolecules* **1997**, *30*, 8278-8285.
257. Patrickios, C. S. "Polypeptide amino acid composition and isoelectric point. 1. A closed-form approximation," *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *175*, 256-260.

- 
258. Cai, J.; Yue, Y.; Rui, D.; Zhang, Y.; Liu, S.; Wu, C. "Effect of chain length on cytotoxicity and endocytosis of cationic polymers," *Macromolecules* **2011**, *44*, 2050-2057.
259. Hertler, W. R. U.S. Patent 5,072,029, 1991.
260. Patton, D. L.; Mullings, M.; Fulghum, T.; Advincula, R. C. "A facile synthesis route to thio-functionalized  $\alpha,\omega$ -telechelic polymers via reversible addition fragmentation chain transfer polymerization," *Macromolecules* **2005**, *38*, 8597-8602.
261. Jayalakshmi, R.; Ramadas, S. R.; Pillai, C. N. "Michael addition of dithiobenzoic acid to  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones. A new series of dithioesters," *Org. Prep. Proceed. Int.* **1981**, *13*, 71-79.