

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ POLYME BỊ PHÂN HUỖ SINH HỌC TRÊN CƠ SỞ L-AXIT GLUTAMIC

PHẦN 1. NGHIÊN CỨU SỰ PHÂN HUỖ SINH HỌC CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT MẪU TRÊN CƠ SỞ CỦA L-AXIT GLUTAMIC VÀ DẪN XUẤT

PHẠM HỮU LÝ, ĐỖ THỊ BÍCH THANH, LÊ ĐỨC GIANG

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Người ta biết rằng, về nguyên tắc, để một polyme bị các vi sinh vật phân huỷ, trước tiên chúng phải bị các enzym phân huỷ. Điều này nảy sinh một ý tưởng gắn một số liên kết dễ bị phân huỷ enzym vào trong mạch của polyme tổng hợp không bị phân huỷ sinh học nhưng có các tính năng cơ lí tốt. Nếu ý tưởng khoa học đó là hiện thực, người ta có thể tổng hợp được rất nhiều loại polyme bị phân huỷ sinh học mới.

Trong các công trình trước, chúng tôi đã nghiên cứu thiết kế chế tạo một số loại polyme bị phân huỷ sinh học mới chứa các mắt xích bị phân huỷ sinh học là L-axit glutamic [1, 2]. Sở dĩ chọn L-axit glutamic làm một mắt xích bị phân huỷ sinh học để ghép vào mạch polyme vì thứ nhất, L-axit glutamic rất sẵn và rẻ, thứ hai, vì các polypeptid nói chung và L-axit glutamic đã được thử nghiệm và chứng minh là các chất protein chuẩn có rất nhiều chức năng sinh hoá quan trọng và có rất nhiều ứng dụng quan trọng trong nhiều lĩnh vực. Các nghiên cứu liên quan đến các loại poly- α - axit amin đã chứng minh khả năng các liên kết amit $-CO-NH-$ bị enzym phân huỷ [3 - 5]. Đến nay, một số loại polyme tổng hợp như polyethylen glycol (PEG), copolyme polystyren-anhydrid maleic anhydrid, copolymer *N*-(2hydroxypropyl)-methacrylamit, and poly(L-axit glutamic) (PG) đã được ứng dụng rộng rãi trong lâm sàng.

Trong số các loại α -axit amin, người ta rất quan tâm nghiên cứu sử dụng L-axit glutamic và các dẫn xuất [6 - 17] để tổng hợp các loại polyme và copolyme bị phân huỷ sinh học.

Để hiểu được một cách sâu sắc sự phân huỷ sinh học, khả năng phân huỷ sinh học của các loại polyme và copolyme trên cơ sở L-axit glutamic và các dẫn xuất, trước tiên chúng tôi tổng hợp và nghiên cứu sự phân huỷ enzym của một số hợp chất mẫu tổng hợp từ L-axit glutamic và các dẫn xuất.

II. PHÂN THỰC NGHIỆM

1. Hoá chất

- γ -benzyl L-glutamat (Aldrich)

$C_6H_5CH_2OCOCH_2CH_2CH(NH_2)-COOH$, Phân tử lượng: 237,26;

Đ.n.c: 181-182°C; $[\alpha]_D^{20}$: +27,7° (c=2,5, 1N HCl).

- Các dung môi và hoá chất khác: metanol (CH_3OH), clorua tionyl ($SOCl_2$), etanol, ete etylic, sulfat maghê, hexametylen diisocyanat, toluen, n-hexan; etylenglycol...

- Các loại enzym sau được mua từ Sigma Chemical Co.: urease, pepsin, α -chymotrypsin, elastase;

- Papain (Boehringer-New York), axit protease (Miles Lab, USA).

2. Tổng hợp

a. Tổng hợp hợp chất mẫu L,L-dieste diurea (1) (sơ đồ 1)

- Tổng hợp γ -benzyl-L-glutamat metyl este hydrochlorua.

Làm lạnh 48,9 ml (~1,21 mol) methanol đến 0°C. Vừa khuấy và nhỏ từ từ 8,70 ml (0,21 mol) chlorua tionyl. Tiếp tục khuấy thêm 1 giờ ở nhiệt độ 0°C rồi sau đó cho thêm (28,7 g, ~0,121 mol) γ -benzyl -L-glutamat. Hỗn hợp phản ứng được đun hồi lưu 6 giờ và được làm lạnh. Chưng cất chân không để loại dung môi. Sản phẩm thô rắn được kết tinh và tái kết tinh trong hỗn hợp cồn-ete thu được 20,4 g (~71%) γ -benzyl -L-glutamat metyl este hydrochlorua là tinh thể màu vàng sáng.

Phân tích nguyên tố: $C_{13}H_{17}O_4N$; *Lí thuyết*: C, 62,15; H, 6,77; O, 25,50; N, 5,58.

Thực nghiệm: C, 62,04; H, 6,71; O, 25,42; N, 5,53.

1H -NMR (D_2O): δ 2,13 ppm (m, 2H, β -CH₂); 2,47 ppm (m, 2H, γ -CH₂); 4,24 ppm (m, 1H, α -CH); 5,08 ppm (m, CH của nhóm benzyl); 7,36 ppm (s, CH trong nhân benzen của nhóm benzyl); 1,18 ppm (m, -OCH₃); 5,71 ppm (m, -NH₂)

- Tổng hợp hợp chất mẫu L,L-dieste diurea, dimethyldi γ -benzy-L-glutamatehexamethylenediurea, từ γ -benzyl-L-glutamat(1)

γ -benzyl -L-glutamat metyl este hydrochlorua (tổng hợp ở phần trên) (7 g, ~0,0244 mol) được trung hoà bằng dung dịch nước của natri bicac-bonat. γ -benzyl -L-glutamat metyl este thô được chiết bằng ete và phần chiết ete được làm khô bằng $MgSO_4$. Cát loại ete trong chân không thu được (6,8 g, 0,0270 mol) γ -benzyl -L-glutamat metyl este. Este này được hoà tan trong 50 ml toluen khô và được đưa vào bình cầu 3 cổ trang bị sinh hàn hồi lưu, ống làm khô, phễu nhỏ giọt, đường dẫn khí trơ (N_2). Hexametylen diisocyanat (98%), 2,10 g, 0,0125 mol hoà tan trong 10 ml toluen và nhỏ giọt vào hỗn hợp phản ứng trên ở nhiệt độ 60°C, sau đó tiếp tục nhỏ giọt hexametylen diisocyanat trong vòng 10 phút. Hỗn hợp phản ứng càng ngày càng đặc như sáp và được giữ ở nhiệt độ khoảng 60°C trong vòng 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh, lọc hút và rửa nhiều lần với n-hexan. Sản phẩm thô thu được (7,4 g, ~81%) màu trắng ngà được làm khô qua đêm trong chân không ở 45 – 50°C. Tái kết tinh trong hỗn hợp toluen-etyl axetat sẽ thu được 7 g (~77%) hợp chất mẫu L,L-dieste diurea tinh thể màu trắng.

Phân tích nguyên tố: $C_{34}H_{46}O_{10}N_4$; *Lí thuyết*: C, 60,90; H, 6,87; O, 23,88; N, 8,36.

Thực nghiệm: C, 60,81; H, 6,80; O, 23,82; N, 8,27.

1H -NMR (C_6D_6): δ 2,13 ppm (m, 2H, β -CH₂); 2,47 ppm (m, 2H, γ -CH₂); 4,24 ppm (m, 1H, α -CH); 5,08 ppm (m, CH của nhóm benzyl); 7,36 ppm (s, CH trong nhân benzen của nhóm benzyl); 1,18 ppm (m, -OCH₃); 8,10 ppm, -NHCO-

b. Tổng hợp poly(L,L-- γ -benzyl-L-glutamat/etylenglycol/1,6-diisocyanatohexan) (3) (sơ đồ 2)

- Tổng hợp L,L- γ -benzyl-L-glutamat etylenglycol dieste p-toluensulfonat(2)

Cho 52,85 g (0,223 mol) γ -benzyl-L-glutamat và 47,3 g (0,232 mol) p-toluensulfonat, 6,1 ml (0,11 mol) etylenglycol và 300 ml benzen vào bình 3 cổ trang bị sinh hàn hồi lưu, ống làm khô và máy khuấy từ. Hỗn hợp huyền phù được đun hồi lưu trong 34 giờ. Cát loại dung môi trong chân không thu được 107 g hỗn hợp chất sau phản ứng. Kết tinh trong nước cho 50,4 g (~48%) hợp chất mẫu L,L- γ -benzyl-L-glutamat etylenglycol dieste p-toluensulfonat sạch.

Phân tích nguyên tố: $C_{40}H_{50}O_{14}N_2S_2$; *Li thuyết*: C, 56,74; H, 5,91; O, 26,48; N, 3,31; S, 7,57. *Thực nghiệm*: C, 56,65; H, 5,80; O, 26,32; N, 3,42; S, 7,66.

1H -NMR (D_2O): 82,13 ppm (m, 2H, β -CH₂); 2,47 ppm (m, 2H, γ -CH₂); 4,24 ppm (m, 1H, α -CH); 5,08 ppm (m, CH của nhóm benzyl); 7,36 ppm (s, CH trong nhân benzen của nhóm benzyl); 2,75 ppm (m, -CH₂); 5,71 ppm (m, -NH₂).

• *Tổng hợp poly(L,L-- γ -benzyl-L-glutamat/etylenglycol/1,6-diisocyanatohexan) (3).*

Dung dịch 15 ml nước cất của 9,64 g (~0,0114 mol) L,L- γ -benzyl-L-glutamat etylenglycol dieste p-toluensulfonat (tổng hợp phần trên) được trung hoà bằng 1,92 g (~0,0228 mol) bicarbonat natri. L,L- γ -benzyl-L-glutamat etylenglycol dieste được chiết bằng chlorofooc, 7 lần, mỗi lần 25 ml. Dung dịch chiết chlorofooc được làm khô bằng magnê sulfat khan. Lọc và loại dung môi trong chân không thu được L,L- γ -benzyl-L-glutamat etylenglycol dieste dạng dầu, 5,2 g (~0,0103 mol). Hoà tan lượng dầu này trong 70 ml toluen khô và đưa vào bình 3 cổ trang bị phễu nhỏ giọt, đường dẫn khí nitơ, ống làm khô chứa CaSO₄. Nhỏ giọt 20 ml dung dịch toluen của 1,8 g (~0,0105 mol) 98% 1,6-diisocyanatohexan vào trong vòng 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khoảng 20 phút thấy xuất hiện tủa trắng. Khuấy trong vòng 12 giờ. Lọc và rửa nhiều lần bằng n-hexan. Tiếp theo sản phẩm được rửa nhiều lần với hỗn hợp nước-metanol 50/50 (tỉ lệ thể tích). Sau cùng, sản phẩm được rửa bằng metanol và sấy khô trong chân không.

Phân tích nguyên tố: $C_{40}H_{50}O_{14}N_2$ (đơn vị mất xích); *Li thuyết*: C, 56,74; H, 5,91; O, 26,48; N, 3,31; S, 7,57. *Thực nghiệm*: C, 56,65; H, 5,80; O, 26,32; N, 3,42.

1H -NMR ($C_6D_5CD_3$): 82,13 ppm (m, 2H, β -CH₂); 2,47 ppm (m, 2H, γ -CH₂); 4,24 ppm (m, 1H, α -CH); 5,08 ppm (m, CH của nhóm benzyl); 7,36 ppm (s, CH trong nhân benzen của nhóm benzyl); 2,75 ppm (m, -CH₂); 8,10 ppm (-NHCO).

3. Thử nghiệm phân huỷ enzym

Cho khoảng 100 – 200 mg mẫu thử phân huỷ enzym vào lọ thuỷ tinh. Mỗi mẫu chuẩn bị 2 hoặc 3 lọ và 2 mẫu đối chứng. Dung dịch đặc của mỗi enzym là khoảng (1 mg/ml) và được bảo quản trong điều kiện pH và nhiệt độ thích hợp. Cứ sau ngày thứ hai hoặc thứ ba dung dịch enzym mới được chuẩn bị. Để bắt đầu một chuỗi phân huỷ, 10 ml từ dung dịch đệm 0,2 M của pH mà trong đó enzym có hoạt tính cao nhất, được nhỏ vào trong mỗi lọ đựng mẫu. Dung dịch đệm được bổ sung một lượng nhỏ “tác nhân vi khuẩn” là natri azid hoặc toluen. Đối với mẫu đối chứng (không có mẫu thử phân huỷ), thì cũng lần lượt thao tác bổ sung như vậy và được hàng ngày bổ sung thêm 1 ml dung dịch đặc của mỗi enzym thử nghiệm. Các mẫu đối chứng này được sử dụng cho các phép thử phân tích ninhydrin xác định các nhóm amin cuối. Các lọ mẫu không chứa dung dịch enzym là các mẫu đối chứng thứ hai để xác định khối lượng mẫu bị thủy phân xúc tác a xít hoặc kiềm chỉ do dung dịch đệm gây ra. Tất cả các lọ được đặt trên máy lắc (30 vòng/ phút) ở nhiệt độ phòng từ 6 - 15 ngày. Trong giai đoạn này, cứ sau 24 giờ, bổ sung thêm 1ml dung dịch enzym đặc vào lọ chứa mẫu thử phân huỷ enzym và vào lọ mẫu đối chứng. Trong ngày thử nghiệm cuối cùng, tất cả các lọ chứa mẫu thử phân huỷ enzym đều được lọc, làm khô và cân. Nước lọc được phân tích ninhydrin hoặc phân tích phổ. Mẫu rắn còn lại được rửa với khối lượng nước như nhau (50 ml), sấy chân không ở 60°C trong vòng 48 giờ. Nước rửa cũng được giữ để phân tích.

Cần phải nhấn mạnh rằng ban đầu tất cả các mẫu không ướt bởi dung dịch đệm mà nổi lên trên mặt nước. Trong quá trình thử nghiệm, các mẫu thấm dung dịch enzym, bị phân huỷ enzym và dần dần chìm xuống đáy lọ, hoặc bị huyền phù hóa trong môi trường đệm, trong khi đó các mẫu đối chứng thì vẫn nổi trên mặt nước.

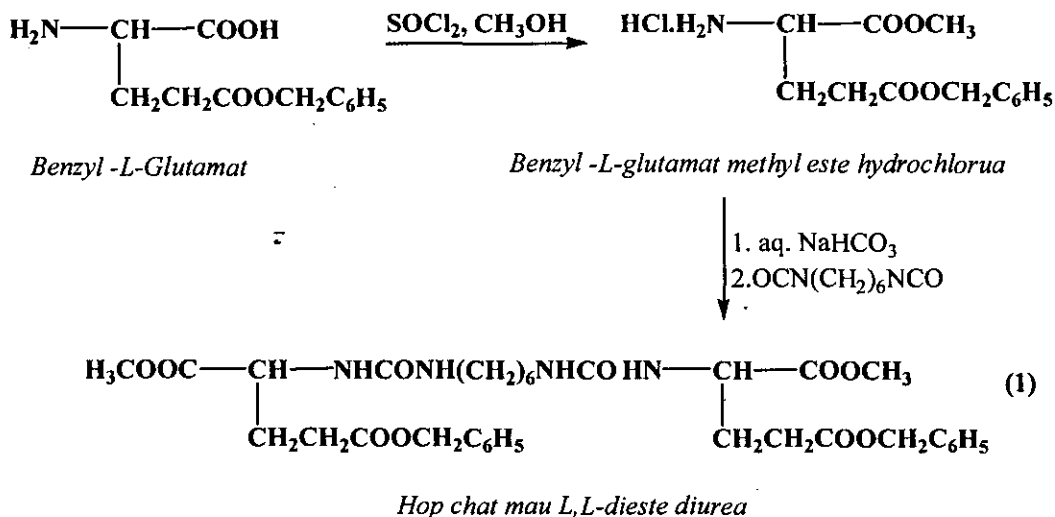
4. Các kĩ thuật phân tích xác định mức độ phân huỷ

- *Phương pháp trọng lượng*: Sau khi lọc và rửa với 50 ml nước, sấy chân không ở 60°C trong vòng 48 giờ. Cân để xác định lượng mẫu trước và sau khi đã bị enzym phân huỷ.
- *Phương pháp phân tích ninhydrin*: Phương pháp phân tích này có thể phân tích các nhóm amin bậc một cuối với nồng độ trong khoảng micromol. Phương pháp này không chỉ được ứng dụng với các axit amin mà còn ứng dụng được đối với tất cả các hợp chất amin bậc một. Trong phương pháp này, đồ thị chuẩn được sử dụng với chất chuẩn là γ -benzyl-L-glutamat bằng phương pháp so màu với bước sóng khoảng 520 - 540 nm.
- *Phương pháp UV-vis*: Sự phân huỷ với enzym chymotrypsin của hợp chất mẫu poly (ester urea) tạo thành sản phẩm chứa nhóm benzyl có khả năng hấp thụ ở vùng tử ngoại. Sử dụng 2 bước sóng, 290 và 258 nm. Chất chuẩn dùng là γ -benzyl-L-glutamat. Enzim chymotrypsin hấp thụ ở 290 nm, còn γ -benzyl-L-glutamat thì không. Cả enzym và γ -benzyl-L-glutamat đều hấp thụ ở 258 nm.
- *Phương pháp VPO* (máy Knauer-K7000): Xác định Mn của mẫu polyme.
- *Phương pháp 1H-NMR*: Xác định trên máy NMR-Brucker-500MH.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất mẫu dieste diurea (1) trên cơ sở của γ -benzyl-L-glutamat đã được tổng hợp theo Sơ đồ 1.

Khoảng 150 mg của hợp chất trên được thử nghiệm phân huỷ enzym với các dung dịch enzym khác nhau (0,1 mg/ml) ở nhiệt độ phòng trong thời gian 15 ngày. Mức độ thủy phân enzym được xác định theo 2 cách: Theo cách thứ nhất thì sự mất trọng lượng của mẫu thử nghiệm được so sánh với mẫu đối chứng (chỉ có dung dịch đệm, không có enzym). Theo cách thứ hai thì dung dịch phân huỷ enzym của các mẫu thử nghiệm được phân tích các nhóm amin bậc nhất bằng phương pháp ninhydrin. Nếu hàm lượng các nhóm amin tăng thì có nghĩa là sự phân huỷ đã xảy ra ở liên kết urea. Ngược lại, nếu không xác định được các nhóm amin thì sự phân huỷ chỉ có thể xảy ra ở các liên kết este. Các kết quả nghiên cứu sự phân huỷ enzym của các hợp chất mẫu được tập hợp trong bảng 1.



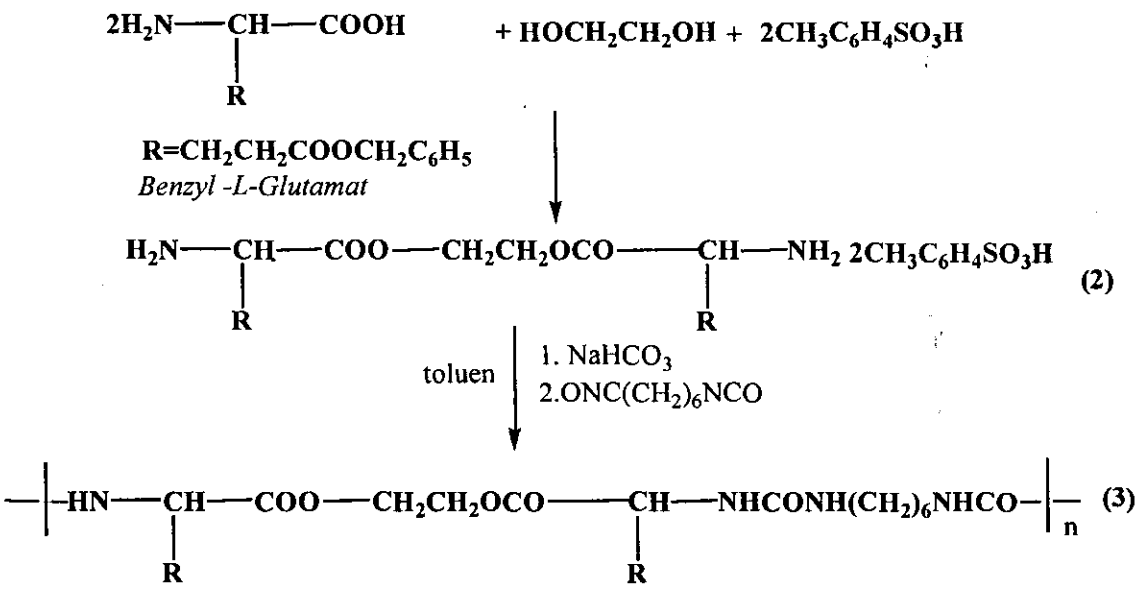
Sơ đồ 1. Tổng hợp hợp chất mẫu dieste diurea (1)

Các kết quả trong bảng 1 cho thấy, từ 6 enzym sử dụng, chymotrypsin là một loại enzym hiệu quả nhất để phân huỷ hợp chất mẫu dieste diurea (1). Metanol đã được phát hiện trong hỗn hợp phân huỷ enzym bằng phương pháp sắc kí khí. Không phát hiện thấy bất kì hợp chất chứa liên kết este nào trong hỗn hợp phân huỷ enzym. Cũng không phát hiện thấy sự tăng của giá trị nhóm chức amin. Điều này chứng tỏ sự thủy phân liên kết este tạo thành hợp chất diaxit là nguyên nhân chính gây ra sự suy giảm khối lượng của mẫu thử nghiệm phân huỷ enzym. Điều này cũng phù hợp với những kết quả nghiên cứu về sự phân huỷ chymotrypsin của mối liên kết acyl trong mạch nhánh thơm [18].

Bảng 1. Sự phân huỷ enzym của hợp chất mẫu dieste diurea (1)^a

Loại enzym	Dung dịch đệm, pH	Hợp chất mẫu dieste-diurea	
		%mất trọng lượng	% tăng NH ₂
Chymotrypsin	imidazole, 7,8	84,7	^c
Papain	Phosphat, 6,5	1,2	4,5
Elastase	Tris ^b , 8,8	12,1	3,7
Axit protease	glycine HCl, 3,1	-	-
	Phthalat HCl, 3,1	1,5	-
Pepsin	HCl, 2,2	^c	-
Urease	Phosphat, 7,0	^d	1,8

^aGiá trị trung bình của 3 lần đo; ^bTris = tris(hydroxymethyl)aminomethan; ^c Không đáng kể; ^dKhối lượng rất nhỏ chất rắn còn lại sau khi li tâm.



Sơ đồ 2. Tổng hợp hợp chất trung gian L,L-γ-benzyl-L-glutamat etylenglycol dieste p-toluensulfonat(2) và poly(L,L-γ-benzyl-L-glutamat/etylenglycol/1,6-diisocyanatohexan)(3)

Từ các kết quả trong bảng 1 ta cũng thấy rằng, enzym elastase cũng có khả năng phân huỷ liên kết este của hợp chất mẫu dieste diurea (1), tuy mức độ có thấp hơn nhiều so với enzym chymotrypsin. Ba loại enzym khác là axit protease, pepsin và urease là không có khả năng phân huỷ hợp chất mẫu dieste diurea (1) trong khoảng nồng độ sử dụng.

Từ các kết quả nghiên cứu sự phân huỷ enzym của hợp chất mẫu dieste diurea (1), chúng tôi đã tiếp tục tổng hợp và nghiên cứu sự phân huỷ enzym của poly(este urea) có trọng lượng phân tử trung bình thấp (3) trên cơ sở của γ -benzyl-L-glutamat (sơ đồ 2).

Vì các kết quả nghiên cứu phần trên đã cho thấy enzym chymotrypsin là một loại enzym hiệu quả nhất để phân huỷ hợp chất mẫu dieste diurea (1), nên chúng tôi chỉ sử dụng chymotrypsin để phân huỷ poly(L,L- γ -benzyl-L-glutamat/etylen glycol/1,6-diisocyanatohe-xan)(3)- một loại polyme có cấu trúc tương tự hợp chất mẫu dieste diurea (1) và có trọng lượng phân tử trung bình thấp (~2.800, xác định bằng phương pháp VPO). Mẫu poly(L,L- γ -benzyl-L-glutamat/etylen glycol/1,6-diisocyanatohe-xan) (3) đã được phơi với dung dịch enzym chymotrypsin ở pH 7,8 (bảng 2). Sau 15 ngày phơi, mẫu phân huỷ enzym mất khoảng 22,6% trọng lượng ban đầu. Các kết quả phân tích UV-vis hàm lượng hợp chất bị phân huỷ chứa mảnh γ -benzyl-L- a xít glutamic (~21,7%) cũng khẳng định thêm sự phân huỷ này. Chỉ có khoảng 0,4% sự tăng hàm lượng nhóm amin được xác định bằng phương pháp phân tích ninhydrin. Các kết quả nghiên cứu này chứng tỏ rằng các loại polyme tổng hợp chứa các mắt xích là một loại α -axit amin (trong trường hợp này là γ -benzyl-L-axit glutamic) hoàn toàn có thể bị phân huỷ enzym và sự phân huỷ enzym xảy ra chủ yếu ở liên kết este trong mạch đại phân tử của polyme tổng hợp.

Bảng 2. Sự phân huỷ bằng enzym chymotrypsin của hợp chất mẫu dieste diurea (1) và poly (L,L- γ -benzyl-L-glutamat/etylen glycol/1,6-diisocyanatohe-xan) (3)

Hợp chất	Mn	Số liên kết este	Thời gian phân huỷ	% mất trọng lượng
Monome (1)	670	4	15	84,7 $\pm$ 0,2%
Polyme (3)	4680	28	15	22,6 $\pm$ 0,1%

IV. KẾT LUẬN

- Đã tổng hợp được một loại hợp chất mẫu dieste diurea là dimethyldi γ -benzy-L-glutamatehexamethylenediurea chứa 4 liên kết este và một loại oligome có trọng lượng phân tử trung bình 4680 chứa khoảng 28 liên kết este;

- Đã thử nghiệm phân huỷ enzym của 2 hợp chất trên với 6 loại enzym. Các kết quả nghiên cứu cho thấy trong 6 loại enzym sử dụng, dung dịch α -chymotrypsin ở pH = 7,8 là một loại enzym có khả năng phân huỷ mạnh nhất đối với 2 hợp chất thử nghiệm. Sau 15 ngày phơi mẫu với dung dịch enzym 0,1 mg/ml ở nhiệt độ phòng, hợp chất mẫu dieste diurea là dimethyldi γ -benzy-L-glutamatehexamethylenediurea chứa 4 liên kết este mất tới 84,7% trọng lượng; còn hợp chất oligome có trọng lượng phân tử trung bình 4680 chứa khoảng 28 liên kết este trong đại phân tử chỉ mất khoảng 22,6% trọng lượng. Sự phân huỷ enzym xảy ra chủ yếu ở mỗi liên kết este trong mạch đại phân tử của polyme tổng hợp.

Lời cảm ơn. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Chương trình Nghiên cứu cơ bản Nhà nước về Khoa học Tự nhiên đã giúp đỡ thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Pham Huu Ly and Do Bich Thanh - Investigation on some biopolymers containing biodegradable α -amino acid fragments, Part 1: Synthesis and characterisation of novel γ -benzyl-L-glutamate-based dicarboxylic acids, *Advances in Natural Sciences* **6** (3) (2005) 215-220.
2. Ngo Duc Huyen and Pham Huu Ly - Investigation on some biopolymers containing biodegradable α -amino acid fragments, Part 2: Synthesis of new biodegradable block copolymers from γ -benzyl-L-glutamate-based dicarboxylic acids and polyethyleneglycol, *Advances in Natural Sciences* **6** (3) (2005) 221-226.
3. K. E. Gonsalves, P. M. Mungara - Synthesis and properties of degradable polyamides and related polymers, *Trends Polym. Sci.* **14** (1996) 25-31.
4. K. Iokei, M. Oka, T. Hayashi, Y. Miyachi - Enzymatic hydrolysis of random copolypeptide consisting of N- hydroxyethyl-L-glutamine and L-alanine, L-leucine or L-valine, *Eur. Polym. J.* **35** (1999) 945-51.
5. Y. Hiyachi, K. Jokei, M. Oka, T. Hayashi - Enzymatic hydrolysis of random copolypeptides consisting of N-hydroxypropyl-L-asparagine and L-alanine, *Eur. Polym. J.* **35** (1999) 395-401.
6. Y. Park, J. Liang, Z. Yang, V. C. Yang - Controlled release of clot-dissolving tissue-type plasminogen activator from a poly(L-glutamic acid) semi-interpenetrating polymer network hydrogel, *Control Release* **75** (1-2) (2001) 37-44.
7. W. Tansey, S. Ke, X. Y. Cao, J. P. Marites - Sidney W., and atun L. Synthesis and characterization of branched poly(L-glutamic acid) as a biodegradable drug carrier, *J. Controlled Release* **94** (1) (2004) 39-51.
8. P. Dubruel, L. Dekie, B. Atristiaens, B. Vanloo, M. Rosseneu, J. Van De Kerckhove, M. Mannisto, A. Urtti, E. Schacht - Poly-L-glutamic acid derivatives as multifunctional vectors for gene delivery, Part B. Biological evaluation. *Biomacromolecules* **4** (5) (2003) 1177-1183.
9. P. Iolanda, C. Armando, M. G. Clara, A. Concepciun, and C. AgustOn - Interactions of quinine with polyacrylic and poly-L-glutamic acids in aqueous solutions, *Eur. Polyffi. J.* **40** (4) (2004) 819-828.
10. L. Dekie, V. Toncheva, P. Dubruel, E. H. Schacht, L. Barren, L. W. Seymour - Poly-L-glutamic acid derivatives as vectors for gene therapy, *J. Control Release* **165** (12) (2000) 187-202.
11. M. Kitamura and T. Nakamura - Inclusion of amino acids and the effect on growth kinetics of L-glutamic acid, *Powder Technology* **121** (1) (2001) 39-45.
12. W. S. Jack, Bh. Raffia, T. John, R. B. Kent, H. Eveline, K. Peter, and V. de Peter - Water-soluble poly-(L-glutamic acid)-Gly-camptothecin conjugates enhance camptothecin stability and efficacy in vivo, *J. Controlled Release* **74** (1-3) (2001) 243-247.
13. M. Tomaz - Poly-L-glutamic acid and poly-L-lysine: model substances for studying secondary structures of proteins, *Biochemistry and Molecular Biology Education* **28** (5) (2000) 244-247.
14. H. Uyama, T. Fukuoka, I. Komatsu, T. Watanabe, S. Kobayashi - Protease-catalyzed regioselective polymerization and copolymerization of glutamic acid diethyl este,