



Enzimérzékeny aminosav alapú hidrogélek szintézise és vizsgálata

TDK dolgozat

Szilágyi Barnabás Áron

Vegyészmérnök Msc

Témavezető:

Dr. Szilágyi András

BME Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék, Lágyszervek
Kutatócsoport

Konzulensek:

Dr. Magyar Anna

ELTE Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék, ELTE-MTA Peptidkémiai
Kutatócsoport

Némethy Árpád

BME Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék, Lágyszervek
Kutatócsoport



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyészmérnöki és Biomérnöki kar

2011

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek TDK-dolgozatom elkészítésében.

Köszönöm Dr. Szilágyi Andrásnak elkötelezett témavezetői munkáját, dolgozatom elkészítéséhez nyújtott szakmai tanácsait, útmutatását.

Köszönettel tartozom konzulenseimnek, Dr. Magyar Annának és Némethy Árpádnak, hogy mindvégig nagy odafigyeléssel és lelkiismeretesen irányították kutatómunkámat.

Köszönetet mondok Babos Fruzsínának és Gali Irénnek az analitikai vizsgálatok elvégzéséhez nyújtott segítségükért, hasznos tanácsaikért.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Szabó Ildikónak és Dr. Bősze Szilviának a citotoxicitás vizsgálatok során nyújtott segítségükért.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy mindenben támogattak.

A munka szakmai tartalma kapcsolódik a "Minőségorientált, összehangolt oktatási és K+F+I stratégia, valamint működési modell kidolgozása a Műegyetemen" c. projekt szakmai célkitűzéseinek megvalósításához. A projekt megvalósítását az Új Széchenyi Terv TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002 programja támogatja.

A dolgozat elkészülését támogatta az NKTH – A*STAR (Szingapúr) - Kétoldalú TÉT Pályázat (BIOSPONA).

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	1
Rövidítésjegyzék.....	2
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1 Polimer gélek, mint a szabályozott hatóanyag-leadás eszközei	5
2.2 Aminosav alapú polimer gélek	7
2.3 A tripszin.....	9
2.4 Oldatfázisú peptidszintézis.....	10
2.5 Korábbi kísérletek enzimérzékeny polimer gélek előállítására.....	13
3. Célkitűzések	17
4. Kísérleti rész	18
4.1 Felhasznált anyagok	18
4.2 A tetrapeptid szintézise.....	18
4.2.1. Tervezett stratégia.....	18
4.2.2. Általános megjegyzések.....	19
4.2.3. A szintézis lépéseinek általános leiratai	20
4.3. A poliszukcinimid szintézise.....	22
4.4. PASP-FKFK gél preparációjának menete.....	22
4.5. Az <i>in vitro</i> citotoxicitás és citosztázis vizsgálatok	23
4.5. A PASP-FKFK gél tripszines bontásvizsgálata.....	24
5. Eredmények	26
5.1 H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe 2HCl szintézise.....	26
5.2 PASP-FKFK gél szintézise	30
5.3 Citotoxicitás és citosztázis vizsgálatok eredményei	33
5.4 PASP-FKFK gél tripszines emésztésvizsgálata.....	34
6. Összefoglalás.....	38
Irodalomjegyzék.....	39

Rövidítésjegyzék

Az aminosavak és aminosav-védőcsoportok jelölésére a peptidkémiaiban megszokott három-, illetve egybetűs rövidítéseket használok, a IUPAC-IUB ajánlása szerint [1].

Név	Hárombetűs rövidítés	Egybetűs rövidítés
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Aszparagin	Asn	N
Aszparaginsav	Asp	D
Cisztein	Cys	C
Fenil-alanin	Phe	F
Glicin	Gly	G
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsav	Glu	E
Hisztidin	His	H
Izoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Szerin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Tirozin	Tyr	Y
Triptofán	Trp	W
Valin	Val	V

A munkám során használt vegyületek és funkciós csoportok rövidítései:

Boc	tercier-butyl-oxi-karbonil
DAB	diaminobután
DBA	dibutilamin
DMF	N,N'-dimetil-formamid
DMSO	dimetilszulfoxid
EtOAc	etil-acetát

iBCC	klórhangyasav-izobutil-észter
MeOH	metanol
NMM	N-metil-morfolin
PASP	poliaszparaginsav
PSI	poliszukcinimid
tBu	tercier-butil
TFA	trifluor-ecetsav

Egyéb rövidítések:

Op	olvadáspont
MS	tömegspektrometria
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
VRK	vékonyréteg-kromatográfia

1. Bevezetés

Az értékes terápiás szerek felhasználásának hatékonysága jelentősen növelhető az ún. „szabályozott és célzott hatóanyag-leadású” készítmények alkalmazásával, a készítményekben a hatóanyagok pontos hely és idő szerinti célba juttatása, a szervezetben megtalálható környezeti paraméterek megváltozásával indukálható. Humánbiológiai alkalmazás esetén ezen készítmények rezponzív tulajdonságai - a legfontosabb paraméterek a pH, a hőmérséklet, illetve a szervezetben található enzimek - mellett azonban elengedhetetlen, hogy biokompatibilisek és biológiailag lebonthatók legyenek. Ezen követelmények miatt tűnik ígéretesnek az aminosavakból felépülő polimer gélek szintézise és alkalmazása, mint hatóanyag-hordozó, -leadó rendszerek.

Kutatómunkám célja egy olyan kizárólag aminosavakból felépülő hidrogél előállítása, amely enzimspecifikus hasítási hellyel rendelkező tetrapeptideket tartalmaz keresztkötőként. A tetrapeptid helyes megválasztásával elérhető, hogy a keresztkötések adott enzim hatására hasadjanak, mellyel szabályozható a hatóanyag kiszabadulásának helye a szervezetben.

Munkám során tripszinspecifikus hasítási hellyel rendelkező keresztkötő molekulákat állítottam elő oldatfázisú peptidszintézissel. Preparációs eljárást dolgoztam ki szintetikus poliszukcinimid (PSI) utólagos térhálósítására a szintetizált keresztkötő molekulák felhasználásával. Optimalizáltam a gélesedés kimenetelét befolyásoló legfontosabb paramétereket (keresztkötő-, illetve polimerkoncentráció, hőmérséklet, katalizátorok). Poliaszparaginsav géleket a PSI gélek lúgos hidrolízisével állítottam elő. Citotoxicitás-vizsgálatokat végeztünk annak bizonyítására, hogy a készített gél humánbiológiai felhasználásra alkalmas lehet, illetve bomlástermékei sem toxikusak. *In vitro* előkísérletek történtek a gél tripszin bonthatóságának vizsgálatára.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Polimer gélek, mint a szabályozott hatóanyag-leadás eszközei

A hagyományos gyógyszerformák esetén, a szervezetbe juttatott hatóanyagnak csak egy kis része hasznosul, így viszonylag nagy dózis szükséges a megfelelő hatás eléréséhez. A biohasznosulás alacsony szintje a gyártás szempontjából gazdaságtalan, valamint a felhasználás során nem kívánt mellékhatásokkal is járhat. Ezért kulcsfontosságú olyan új gyógyszerformák fejlesztése, melyek a hatóanyagot képesek célzottan a hatás helyére eljuttatni. Ezzel javíthatunk a gyógyszeres kezelés minőségén, ipari szempontból pedig a gyártás tehető gazdaságosabbá [2].

A szabályozott hatóanyag-leadás tárgykörébe tartozik a hatóanyag kioldódáskinetikájának módosítása, a hatóanyag célbajuttatása és a visszacsatolásos kioldódás.

A módosított kioldódás három alaptípusa a késleltetett, a szakaszos és az elnyújtott kioldódás [3]. Késleltetett kioldódás esetén a hatóanyag meghatározott késleltetési idő után szabadul fel, ezzel lehetővé tehetjük, hogy a kioldódás a szervezetben a megfelelő helyen induljon meg. A szakaszos hatóanyag-leadású készítmények pontosan meghatározott ismétlődő időszakokban, lökésszerűen szabadítanak fel meghatározott mennyiségű hatóanyagot a készítményből. A nyújtott hatóanyag-leadású készítményeknél a hatóanyag-leadás lassúbb, mint az azonos módon alkalmazott, hagyományos hatóanyag-leadású készítményeké. Így a felszívódás elhúzódik, a hatástartam nő és a mellékhatások veszélye csökkenthető [4].

A hatóanyag célbajuttatása (*drug targeting*) azt jelenti, hogy a hatóanyagot a megfelelő sejtekhez, illetve szervhez szállítjuk, és a hatóanyag kioldódása csak a célterület elérésekor kezdődik meg. Ennek megvalósításához szükséges, hogy a célsejteket és az egyéb sejteket egy jellemző tulajdonság alapján megkülönböztessük. Ez alapján kifejleszthetünk a célsejtekre nagymértékben szelektív hordozót [5].

A visszacsatolásos kioldódás (*feedback release*) elvén működő hordozókból csak akkor oldódik ki a hatóanyag, ha arra szükség van. A kioldódás egy olyan molekula jelenléte esetén indul meg, mely indikálja a hatóanyag szükségességét [6, 7].

A polimer hidrogéleket széles körben változtatható előnyös tulajdonságai, környezeti hatásokra való érzékenysége alkalmassá teszik arra, hogy a szabályozott hatóanyag-leadás eszközeként szolgáljanak, akár implantátumként akár orálisan adagolható formában.

Polimer géleknek nevezzük azokat a rendszereket, ahol a gél szerkezetét polimer molekulák építik fel, ezek egy stabil vázszerkezetet alakítanak ki, amely a gélnek alaktartósságot és deformálhatóságot biztosít. A polimer gélek az összefüggő vázhoz képes igen nagy, akár több ezerszeres mennyiségű, a váztól térbelileg nem elkülönült folyadékot tartalmaznak, ezért a gélek egyes fizikai kémiai tulajdonságai (pl.: diffúzió, gőznyomás) az oldatokéhoz hasonlóak. A jelentős mennyiségű folyadék megakadályozza a laza térhálós szerkezet összeomlását, ez utóbbi pedig útját állja a folyadék spontán „kifolyásának”. Azokat a géleket, melyekben a folyadék szerepét víz tölti be, hidrogéleknek nevezzük [8].

Attól függően, hogy a polimer láncokat milyen erősségű és élettartalmú kötések tartják össze, beszélhetünk fizikai és kémiai gélekről. Kémiai polimer gélek esetén a láncokat elsőrendű kémiai kötés, kovalens kötés tartja össze. Az elemi egységekből álló „végtelen molekulatömegű” térháló igen stabil, a kémiai polimer gél szerkezete csak kémiai úton bontható meg [8]. Dolgozatomban kizárólag kémiai polimer gélekkel foglalkozom.

A polimer gélek fontos jellemzője, hogy a környezeti paraméterek változtatására jól definiált választ adnak. Ez a válasz elsősorban a gél térfogatának megváltozásában nyilvánul meg. A térfogatváltozás lehet folytonos vagy ugrásszerű. Az ugrásszerű duzzadást, illetve térfogatcsökkenést gélkollapszusnak nevezzük. A térfogatváltozás számos környezeti hatás következtében létrejöhet, például pH, hőmérséklet, elektromos tér, ionerősség változása, fény vagy ezen hatások kombinációja. A térfogatváltozás során nemcsak a gél térfogata, hanem az ettől függő összes tulajdonsága is megváltozik. Jelentős mértékben módosulhatnak az optikai, mechanikai és transzport tulajdonságok. Ezen különleges tulajdonságai miatt a polimer géleknek számos gyógyszerészeti, mezőgazdasági, és környezetvédelmi alkalmazása ismert [2, 5]

Ha egy polimert hatóanyaggal együtt térhálósítunk, a térhálósítás megfelelő mértékének megválasztásával elérhető, hogy a hálóláncok közötti átlagos távolság kisebb legyen, mint a hatóanyag molekula. Ekkor a hatóanyag nem tud a gélből diffúzióval távozni. Ha a gél egy külső paraméter megváltoztatásával duzzadásra készítettük, megnövekszik a hálóláncok közötti átlagos távolság, így megszűnik az akadály a hatóanyag kioldódásával szemben. Példaként említhető a glükózérzékeny gélekkel szabályozott inzulinadagolás. Felhasználás során az inzulint egy olyan polimer gél mátrixba zárják, melynek polimerláncai hidroxilcsoportokat tartalmaznak, ezekkel borátionok kötések hoznak létre, így kialakítva a térhálósított gél. Mivel a borátionok a glükóz hidroxilcsoportjaival erősebb kötést képesek létrehozni, megnövekedett

glükózkoncentráció esetén a keresztkötések száma lecsökken, így a gél megduzzad, az inzulin kioldódása pedig megindul [9].

A gyógyszerhordozó rendszerek alkalmazásának fontos feltétele, hogy felhasználásuk során ne terheljék a szervezetet, valamint ne váltsanak ki immunreakciót, tehát biokompatibilisek legyenek. A hidrogélek számos egyedi tulajdonsággal rendelkeznek, melyek kedvezőek a biokompatibilitás szempontjából. Alacsony a határfelületi feszültségük az őket körülvevő biológiai folyadékokkal, illetve szövetekkel szemben, ez minimalizálja a proteinadszorpciót és a sejtadhéziót. Ehhez járul hozzá a felületükön lévő polimerláncok nagy mobilitása is. A szervezet tehát nem kezeli a hidrogéleket idegen testként, nem próbálja meg elszigetelni, kilöki azokat. A legtöbb hidrogél felülete nagy víztartalma miatt szuperhidrofil felületként viselkedik, ami a biokompatibilitás egyik fontos feltétele. Ezenfelül képesek szimulálni a természetes biológiai gélek, sejtek, illetve szövetek egyes hidrodinamikai és fizikai-kémiai tulajdonságait. A hidrogélek puha, rugalmas felülete csökkenti a súrlódást az őket körülvevő szövetekkel szemben, így az irritáció lecsökken. Ezen feltételek elsősorban implantátumok esetén lényegesek [5].

Hatóanyag-hordozó-rendszerek esetén fontos szempont lehet a biológiai lebonthatóság. Különösen implantátumok alkalmazása esetén kívánatos, hogy miután a hatóanyag távozott a gélből, és a hordozóra többé nincs szükség, akkor azt ne kelljen sebészeti úton eltávolítani, hanem a szervezet maga bontsa le. Ilyenkor alapvető feltétel, hogy nem keletkezhetnek toxikus bomlástermékek.

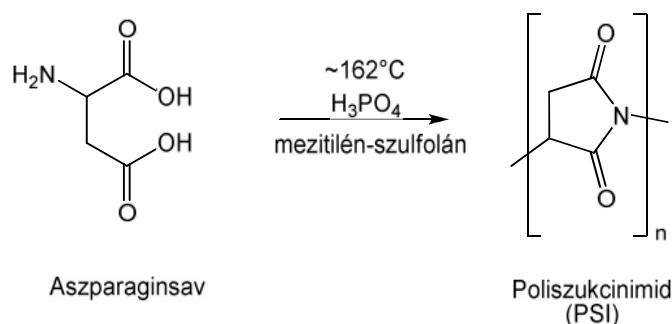
Ha polimer gélek esetében beszélünk biológiai lebonthatóságról, elengedhetetlen különválasztani a polimerláncok, illetve a keresztkötők lebonthatóságát. A polimer láncok degradációja során kisebb molekulák képződnek, melyeket a kiválasztó szervrendszer képes feldolgozni. Ebben az esetben a biodegradáció többféle mechanizmussal mehet végbe, úgymint hidrolitikus, oxidatív és enzimátikus bomlás. A keresztkötések megszűnése bekövetkezhet a keresztkötő molekulák degradációjával, mely végbemehet enzimek hatására. A keresztkötések számának csökkenésével a gél megduzzad, majd idővel polimer láncokká bomlik le [5].

2.2 Aminosav alapú polimer gélek

Szabályozott hatóanyag-leadás céljára létrehozható egy olyan orális alkalmazásra szánt polimer hidrogél, melynek keresztkötői egy bizonyos enzim hatására degradálódnak, ennek következtében a gél megduzzad, így a gél mátrixba zárt hatóanyag képes diffúzióval távozni.

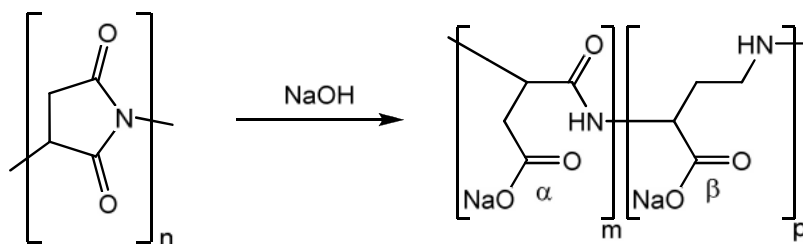
Mivel az enzimek a szervezetben speciális helyeken fordulnak elő, megfelelő keresztkötő molekula alkalmazásával a hatóanyag-leadás helye kontrollálhatóvá válik. A felépítő alapanyagok gondos megválasztásával elérhetjük, hogy a létrehozott biokompatibilis polimer gél az enzimes bontást követően toxikus melléktermékek keletkezése nélkül bomoljon le, majd távozzon a szervezetből.

Az általam tervezett polimer gél alapjául a poliszukcinimidet (PSI) választottam. A PSI előállítása az aszparaginsav termikus polikondenzációjával történik mezitilén-szulfolán elegyben H_3PO_4 katalízis mellett (1. ábra) [10].



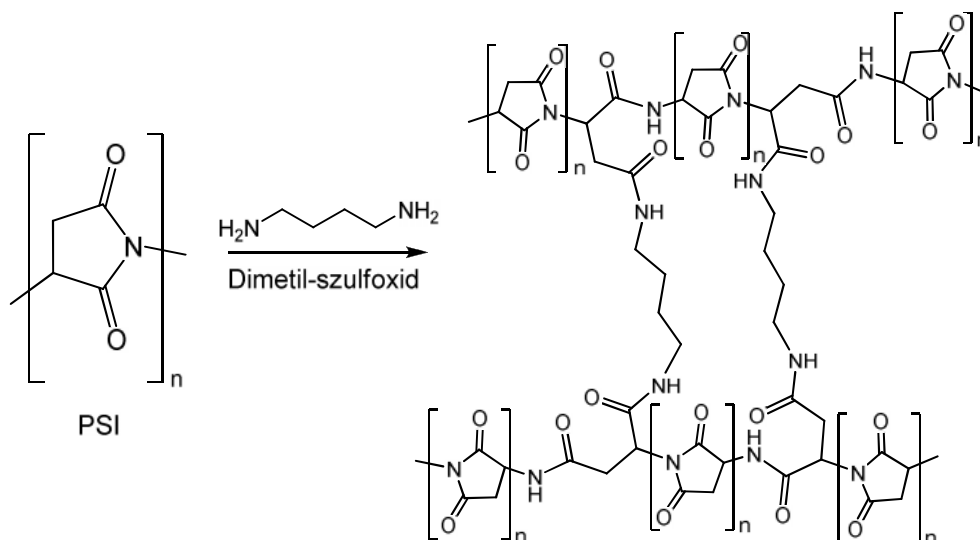
1. ábra: Poliszukcinimid előállítása aszparaginsavból termikus polimerizációval.

A létrehozott polimerben a szukcinimid gyűrű nukleofil támadásra érzékeny, ez lehetővé teszi azt, hogy a polimerláncot módosítva tulajdonságait megváltoztassuk. Hidroxidionnal, mint nukleofil reagenssel reagáltatva pedig a PSI poliaszparaginsavvá (PASP) hidrolizálható (2. ábra) [11], mely egy biokompatibilis polimer [12].



2. ábra: Poliszukcinimid hidrolízise NaOH-dal poliaszparaginsavvá

Az szukcinimid gyűrűk lehetővé teszik azt is, hogy kémiaiag térhálósított gél állíthassunk elő a poliszukcinimid, vagy akár a módosított poliszukcinimid láncból. Ehhez olyan molekulákra van szükségünk, melyek legalább két nukleofil funkció csoportot tartalmaznak. Ilyenek a természetes diaminok (például diaminobután), melyek azonban nagyobb mennyiségben toxikusak [13]. A PSI diaminobutánnal (DAB) történő térhálósítása a 3. ábrán látható [14].



3. ábra: Poliszukcinimid térhálósítása diaminobutánnal (PSI-DAB gél)

Keresztkötőként célszerű a szervezetben megtalálható fehérjealkotó aminosavakból felépülő di-, oligo-, illetve polipeptideket felhasználni. Az így képzett gél lúgos hidrolízisével egy olyan PASP gél kapunk, mely kizárólag az emberi szervezetben is megtalálható aminosavakból épül fel, így várhatóan nem lesz toxikus. Ha a keresztkötő peptid aminosav-szekvenciáját megfelelően választjuk meg, elérhető, hogy a keresztkötéseket egy kiválasztott fehérjebontó enzim hasítsa, és ennek hatására meginduljon a hatóanyag kioldódása. Mivel a gasztrointesztinális csatorna egyes szakaszaihoz specifikus enzimek tartoznak, optimalizálható a hatóanyag kiszabadulásának helye a szervezetben. Jelen dolgozatban tripszin specifikus hasítási helyeket tartalmazó tetrapeptid szintézisét és keresztkötőként való felhasználását mutatom be.

2.3 A tripszin

Azokat az enzimeket, melyek a peptidkötések hasítása révén a szervezetben a fehérjék aminosavakra történő lebontását végzik proteázoknak, illetve peptidázoknak nevezzük. A proteázok a hidroláz enzimek családjába tartoznak. A különböző proteázok a fehérjelánc különböző helyein hasítanak. Aktív centrumuk típusa alapján beszélhetünk szerin-, treonin-, aszpartil-, glutaminsav-, és metalloproteázokról, működésük pH-optimuma alapján pedig savas, semleges és bázikus proteázokról. Néhányuk a fehérjelánc terminális aminosavait hasítja le, míg mások a láncon belüli peptidkötéseket hidrolizálják. Előbbieket exopeptidázoknak, utóbbiakat endopeptidázoknak nevezzük [15].

A tripszin a szerin proteázok családjába tartozó endopeptidáz, inaktív zimogén formája, a tripszinogén a hasnyálmirigyben termelődik. A tripszinogén a patkóbélbe jutva az ott termelődő enterokináz enzim hatására alakul tripszinné [16].

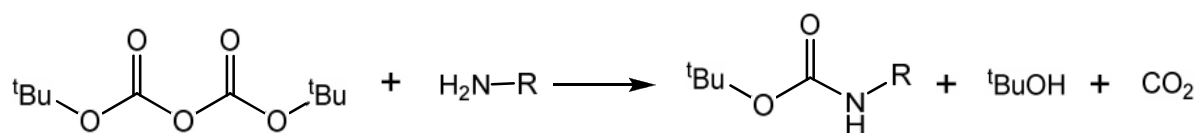
A tripszin kedvelt hasítási helye az Arg és a Lys C-terminálisa, kivétel, ha ezeket Pro követi. Ez alól kivétel, hogy -Trp-Lys-Pro- és -Met-Arg-Pro- esetén a lizin illetve az argigin után történik hasítás. Nincs azonban hasítás a Lys után a -Cys-Lys-Arg-, a -Cys-Lys-Tyr-, és a -Cys-Lys-His-szekvencia esetén. További kivétel, hogy a -Cys-Arg*-His-, -Arg-Arg*-His-, -Arg-Arg*-Arg-szekvenciák esetén az általam csillaggal jelölt arginin utáni kötés nem hasad. A tripszin pH optimuma pH=7-től pH=9-ig terjed [15].

2.4 Oldatfázisú peptidszintézis

Peptidek előállítására két fő szintézismódszer ismeretes: az oldatfázisú, illetve a szilárd fázisú peptidszintézis. Utóbbi 1963-as felfedezése óta az oldatfázisú szintézisnél jóval széleskörűbben alkalmazott módszerré vált. Kisebb tagszámú peptidek nagyobb mennyiségű előállítására azonban az oldatfázisú technika alkalmazása előnyösebb.

Az oldatfázisú szintézis lényege, hogy egy N-terminálison védett és C-terminálison aktivált aminosavszármazékot és egy C-terminálison védett aminosavszármazékot reagáltatunk. Az oldalláncon amino- illetve karboxil-csoportot tartalmazó aminosavak esetén (pl.: Lys, Asp, Glu) gondot kell fordítani az oldallánc védőcsoporttal való ellátására, különben nem kívánt termékek is keletkeznek.

A funkciós csoportok védelmére a peptidszintézis kezdeti bő fél évszázada során sok eljárás született, melyek közül az általam használtakról írok bővebben. Két aminosav (ill. peptid) összekapcsolásához szükségünk van az N-terminális aminosav α -aminocsoportjának védőcsoporttal való ellátására. Erre a célra a legelterjedtebben használt a tercier-butoxi-karbonil (Boc-), és a benzil-oxi-karbonil (Z-) csoport. A Boc védőcsoportot pl. Boc-anhidrid segítségével vihetjük be (4. ábra):

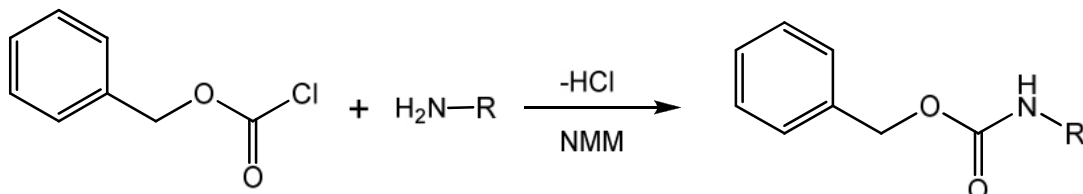


4. ábra: Boc-csoport bevitele Boc-anhidriddel

A módszer nagy hátránya az, hogy az anyag fele elvész, ennek ellenére mégis jobban használható, mintha Boc-N₃, mely robbanékony, illetve a Boc-Cl, mely bomlik. A Boc-csoport

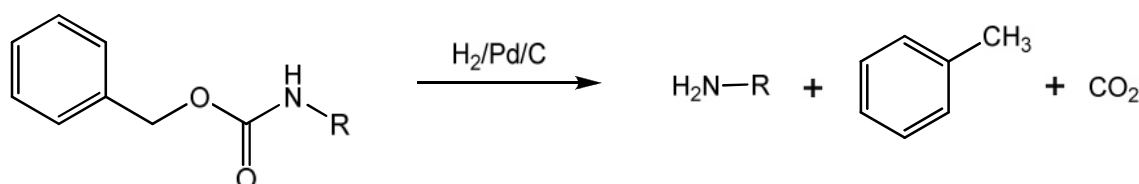
savlabilis, trifluoecetsavval (TFA) vagy sósavas dioxánnal távolítható el, a reakció során izobutén és CO₂ fejlődik.

A Z-csoportot klórhangyasav-benzilészter segítségével építhetjük be (5. ábra). A reakciót savmegkötő jelenlétében hajtjuk végre (pl.: N-metil-morfolin)



5. ábra: Z-csoport bevitele

A Z-csoport katalitikus hidrogénezéssel távolítható el (6. ábra). Az eltávolítás történhet még HBr-os ecetsavas hidrolízissel (a várt termék mellett benzil-bromid és CO₂ keletkezik).



6. ábra: Z-csoport elvtávolítása

A C-terminális aminosav karboxil-csoportjának védelmét megoldhatjuk észteresítéssel, a leggyakrabban alkalmazott észterek a metil-, benzil-, illetve tercier-butil-észterek. Aminosav-metilésztert például diazometánnal állíthatunk elő. Az észtercsoportot általában lúgos hidrolízissel távolítjuk el.

A több funkciós csoportot tartalmazó aminosavak esetében az oldalláncok védelmére is szükség van. Az Asp, Glu illetve Lys esetében az oldallánc funkciós csoportja ugyanazokkal a védőcsoportokkal védhető, mint a főlánc esetében. A hidroxil-funkció védhető benzil-, terc-butil-, illetve tritil-éterként, a Cys tiol-csoportját ugyancsak tritil-csoporttal védhetjük. A His imidazol-gyűrűje tritil-, 4-metil-tritil (Mmt) és 4-metoxi-tritil (Mtt) csoporttal védhető. Az Arg esetén a guanidino-csoport védelmét 4-toluolszulfonil (Tos), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzolszulfonil (Mtr), vagy -NO₂ csoporttal láthatjuk el.

A védőcsoportok tervezésekor ügyelni kell arra, hogy a szintézis során azok szelektíven eltávolíthatóak legyenek. Az oldatfázisú peptidszintézisben két fő szintézisstratégia ismeretes, a lépésenkénti illetve a fragmenskondenzációs szintézis [17].

Lépésenkénti szintézis: $A+B \rightarrow AB$

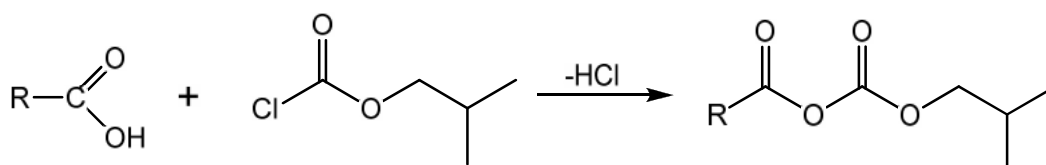
$AB+C \rightarrow ABC$

$ABC+D \rightarrow ABCD$

Fragmentskondenzációs: $A+B \rightarrow AB$; $C+D \rightarrow CD$

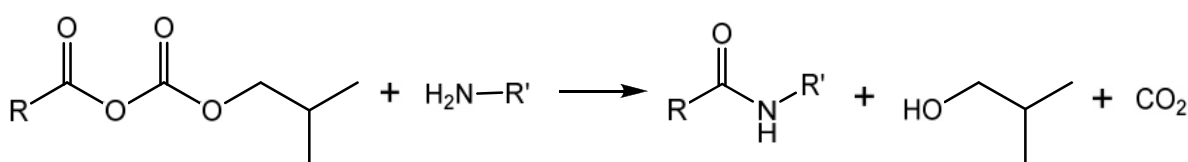
$AB+CD \rightarrow ABCD$

A megfelelően védett aminosavak kapcsolására is több módszert dolgoztak ki: savklorid, illetve azidképzés, aktív észteres (*p*-nitrofenil-észter, pentaklórfenil-észter, pentafluorfenil-észter, szukcinimid-észter), Leuchs-anhidrides, szimmetrikus- és vegyes-anhidrides, karbodiimides kapcsolás. A módszerek közös jellemzője, hogy az acilező aminosav karbonil szénatomjának δ -pozitív jellegét növelik. Munkám során az oldatfázisú kapcsolásokat vegyes anhidrides módszerrel végeztem. Vegyes anhidrides módszer esetén izobutoxi-karbonil-kloriddal (ⁱBCC) képzünk vegyes anhidridet (7. ábra):



7. ábra: Vegyes anhidrid képzése

Ezután a vegyes anhidridet reagáltatjuk a szabad aminocsoportú, karboxil-csoportján védett aminosavval (8. ábra) [18]:



8. ábra: Vegyes anhidrides kapcsolás

A kapcsolási reakció követése oldatfázisú reakciók esetén vékonyréteg-kromatográfiával történik. Az előhívásnál alkalmazott módszerek:

Ninhidrin teszt – e módszer a szabad amino-terminálissal rendelkező (kivétel prolin) peptidszármazékok kimutatására alkalmas. A ninhidrin a szabad aminocsoportot tartalmazó vegyületekkel reakcióba lép, az előhívás során képződő termék lilás, vagy sárga színnel jelenik meg. Prolinhoz történő kapcsolás esetén az ninhidrin-teszt nem alkalmazható, ehelyett az izatin tesztet használjuk.

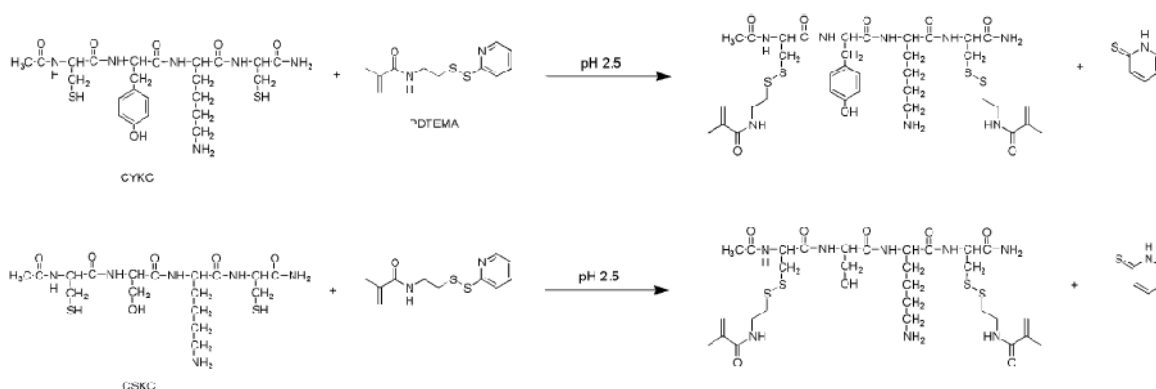
Tolidin teszt – a módszer lényege, hogy a vékonyréteg-lapot klórfürdőbe helyezzük, és a kialakuló N-klór-vegyületek az előhívás során oxidálják a tolidint, az így keletkező oxidált vegyületek jelennek meg sötétzöld, fekete színnel.

2.5 Korábbi kísérletek enzimérzékeny polimer gélek előállítására

A szakirodalomban számos enzimérzékeny polimer géllel foglalkozó cikk lelhető fel [19, 20], dolgozatomban ezek közül sorra veszem a legfontosabbakat.

Kopecek és kutatócsoportja N-(2-hidroxipropil)metakrilamidot térhálósítottak különböző oligopeptid szekvenciát tartalmazó keresztkötővel. Vizsgálták a keresztkötők kimotripszinnel, illetve más enzimekkel való bonthatóságát. Az enzimés vizsgálatok alapján megállapítható volt, hogy a keresztkötő hosszának növekedtével a degradáció foka is nő a sztérikus inhibíció csökkenése miatt. Számít emellett a keresztkötésben résztvevő aminosavak minősége is, hiszen az enzimek számára csak bizonyos peptidek szolgálnak megfelelő szubsztrátként [21, 22, 23].

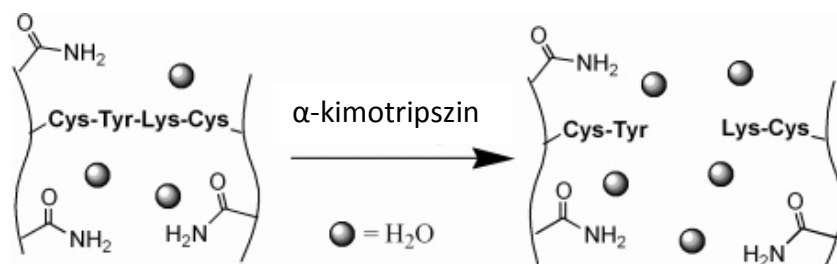
Plunkett és kutatócsoportja szabályozott hatóanyagleadás céljára állítottak elő kimotripszin érzékeny tetrapeptid szekvenciával térhálósított poliakrilamid hidrogélt. Két peptidszekvenciát választottak: Ac-Cys-Tyr-Lys-Cys-NH₂, ezt a kimotripszin a Tyr és a Lys között képes hasítani, az Ac-Cys-Ser-Lys-Cys-NH₂ szekvenciával pedig kimotripszinre nem érzékeny kontrollmintát készítettek. Első lépésként a peptidek Cys oldalláncait egy metakrilamid csoportot tartalmazó diszulfid típusú vegyülettel, az N-[2-(2-piridilditio)]etil-metakrilamiddal (PDTEMA) módosították (9. ábra).



9. ábra: Keresztkötő molekulák létrehozása tetrapeptidek PDTEMA-val való módosításával

A reakció után tisztítás nélkül akrilamid monomert és fotoiniciátor rendszert adtak hozzá, majd polimerizálták. A kimotripszinnel végzett enzimés vizsgálat a várt eredményt hozta, a Cys-Tyr-Lys-Cys térhálósító tetrapeptideket tartalmazó gélek degradálódtak (10. ábra), míg a

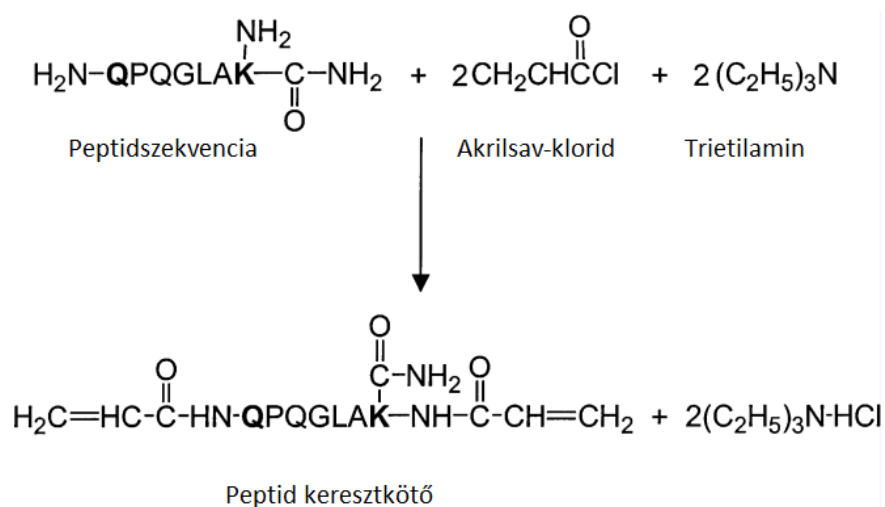
kontrollgél változatlan maradt [24]. A rendszer nagy hátránya, hogy az alkalmazott polimer rendkívül toxikus akrilamid egységekből épül fel.



10. ábra: Kimotripszin érzékeny hidrogél keresztkötőinek bomlása

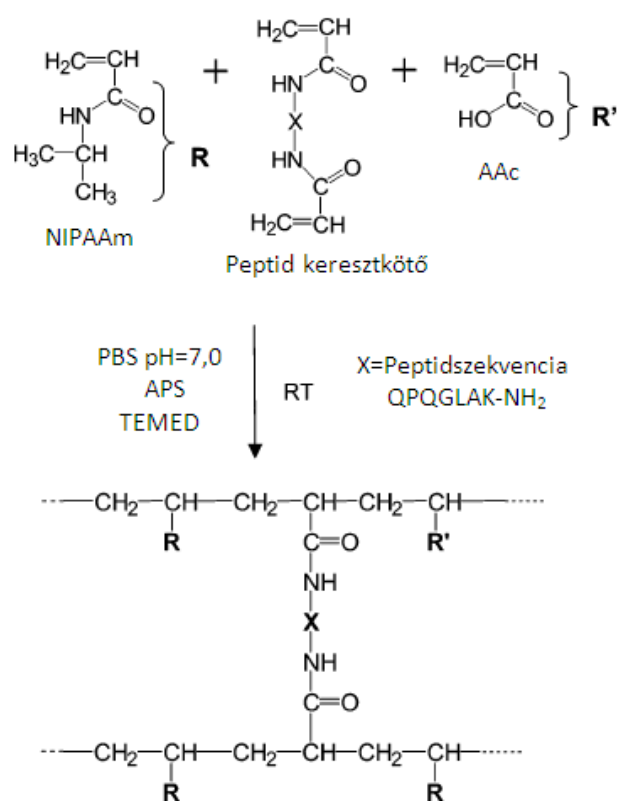
A Kim és társai által előállított hidrogél keresztkötői metalloproteáz enzim érzékenyek, a gélt mesterséges sejtközötti állományként tervezik alkalmazni. A gél alapja N-izopropil-akrilamid (NIPAAm) és akrilsav (AAc) kopolimer, melyet Gln-Pro-Gln-Gly-Leu-Ala-Lys-NH₂ aminosav-szekvenciával térhálósítottak.

A peptidhez trietilamin jelenlétében akrilsav-kloridot adtak, így kialakítva a keresztkötő molekulát (11. ábra):



11. ábra: Keresztkötő molekula létrehozása peptid és akrilsav-klorid reakciójával

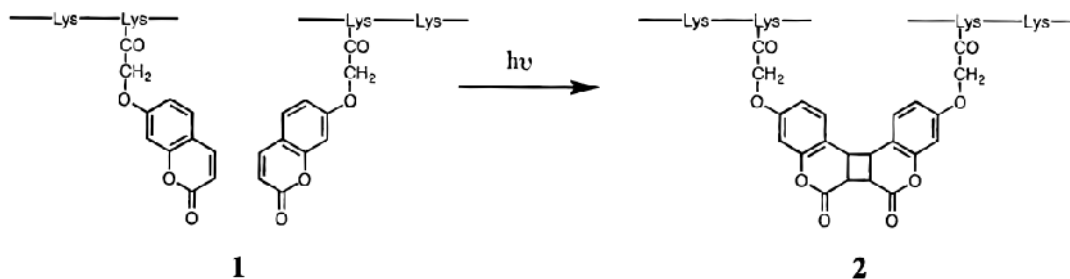
Tisztítás után a keresztkötőt NIPAAm-dal és AAc-val polimerizálták foszfát pufferben (12. ábra). Kontrollminta is készült, itt a keresztkötő nem enzimérzékeny N-N'-metilénbisz(akrilamid) volt.



12. ábra: Metalloproteáz enzim érzékeny gél képzésének reakciója

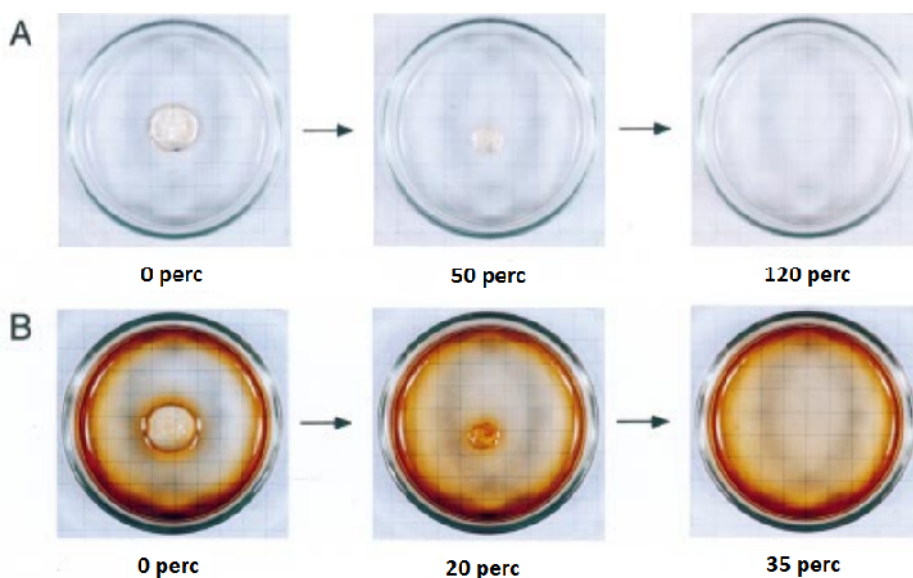
A degradációt kollagenáz enzimmel (mátrix metalloproteináz 13 - MMP13) vizsgálták, az enzim a várt módon a Gly és a Leu között hasított, a degradáció függött az enzimkoncentrációtól, illetve a keresztkötések sűrűségétől [25].

Yamamoto és csoportja lizin és ϵ -kumariloxiacetil-lizin [Lys(Cou)] kopolimerjét állították elő N-karboxianhidrides módszerrel. Az így szintetizált poli[Lys-co-Lys(Cou)] (13 ábra-1) vizes oldatához 5-10 mol% Lys(Cou)-t adtak, majd fénnel megvilágították. A fény hatására a lizin oldalláncon lévő kumarin egységek cisz fej-fej ciklokumarin dimereket alakítottak, így térhálósítva a polimerláncokat (13 ábra-2). Az oldatokat 6-24 órán át megvilágítva optikailag tiszta hidrogélekhez jutottak.



13. ábra: poli[Lys-co-Lys(Cou)] keresztkötése fény hatására

Ezután a készített gélek enzim általi bonthatóságát vizsgálták. Az 14. ábra „A” részén látható képsorozaton egy gélkorongot tripszin desztillált vizes oldatába helyeztek 25°C-on. A gél a tripszin hatására két óra alatt teljesen feloldódott. Az *Aspergillus XXIII* proteáz enzimnek ehhez mindössze 35 percre volt szüksége (14. ábra „B”)[26]. Az előző két példával ellentétben az enzim itt a polimerláncokat, nem pedig a keresztkötéseket bontotta.



14. ábra: poli[Lys-co-Lys(Cou)] gél biodegradációja tripszin (A), illetve *Aspergillus XXIII* proteáz (B) által

3. Célkitűzések

Kutatómunkám célja, egy olyan szabályozott hatóanyag-leadásra alkalmazható polimer gél előállítása, mely aminosav építőelemeinek köszönhetően biokompatibilis, valamint olyan tetrapeptidet tartalmaz keresztkötőként, mely miatt a polimer gél enzimatikusan lebonthatóvá válik.

A szintetizálandó gél alapvázául a poliszukcinimidet választottam, mely a belőle lúgos hidrolízissel előállítható PASP biokompatibilitása miatt kutatócsoportunk kiemelten alkalmazott polimere.

A polimer térhálósítását olyan tetrapeptiddel terveztem megvalósítani, mely két végén szabad aminos csoportot tartalmaz így szukcinimid gyűrűkkel képes nukleofil reakcióba lépni, valamint tripszin által specifikusan hasítható peptidkötést tartalmaz. Ez alapján a H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe szekvenciát választottam, melyet szabad N-terminálisa, illetve a C-terminálison lévő lizin szabad ϵ -aminocsoportja alkalmassá tesz arra, hogy keresztkötő molekulaként használjam fel. A szintetizálandó peptid a második és harmadik tagja között tartalmaz tripszin által hasítható kötést. A térhálósítási reakció során esetlegesen fellépő mellékreakciók elkerülése érdekében a C-terminális karboxilcsoporton, illetve a láncközi lizinen védőcsoportot alkalmaztam. A peptidek nagy mennyiségben tervezett felhasználása miatt az oldatfázisú peptidszintézis módszere mellett döntöttem. A szintézist az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoporttal együttműködve végeztem.

Végző céloom egy reprodukálható preparációs eljárás kidolgozása volt poliszukcinimid (PSI) tetrapeptiddel végzett utólagos térhálósítására. Ennek alapjául a korábban általam készített PSI gélek szolgáltak, melyeket diaminobutánnal, lizinnel, illetve dipeptiddel térhálósítottam. Poliaszparaginsav (PASP) gél a PSI-peptid gél lúgos hidrolízisével terveztem előállítani.

Az optimális tulajdonságokkal rendelkező gélek megvalósításához szükségesnek tartottam a gélesedést befolyásoló paraméterek széleskörű vizsgálatát, úgymint a polimer-, és a peptidkoncentráció, a katalizátorok mennyisége, illetve a hőmérséklet.

Humánbiológiai felhasználhatóság bizonyítására célul tűztem ki a kész gélek citotoxicitását, illetve citosztatikus hatásának vizsgálatát, valamint előkísérletet terveztem a gél enzimes bonthatóságának bizonyítására.

4. Kísérleti rész

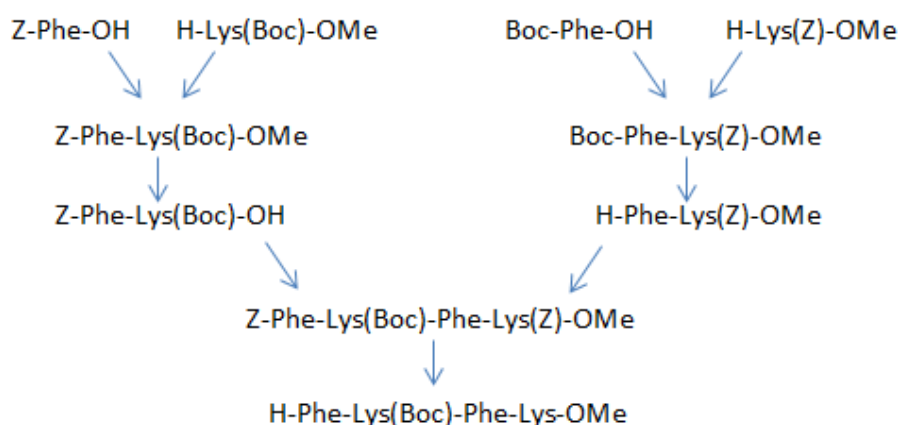
4.1 Felhasznált anyagok

A peptidszintézisekhez felhasznált kiindulási anyagokat az Iris és a Sigma-Aldrich cégektől, az oldószereket a Reanal és a Molar cégektől kereskedelmi forgalomban szereztük be. A gél-szintézis során felhasznált aszparaginsavat, mezitilént, szulfolánt, dimetil-szulfoxidot (DMSO), a 85%-os H_3PO_4 -et, illetve a dibutilamint (DBA) a Merck, a tripszint a Sigma-Aldrich cégtől szereztük be.

4.2 A tetrapeptid szintézise

4.2.1. Tervezett stratégia

A H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe szekvenciájú tetrapeptid szintézisét oldatfázisú technikával kívántam végrehajtani, úgy, hogy először két dipeptidet állítok elő az szekvencia első és második, illetve a harmadik és negyedik tagjából. A kapott, mindkét oldalon, adott esetben oldalláncon is védett két dipeptidről a védőcsoportokat eltávolítom. Az első és második tagból álló dipeptid esetén a C-terminálist teszem szabaddá, míg a szekvencia harmadik és negyedik tagját tartalmazó dipeptid esetében az N-terminálist. A két dipeptid ezzel összekapcsolhatóvá válik kialakítva ezzel a végső szekvenciát. Végezetül az N-terminális aminosav védelme és a C-terminálison található Lys ϵ – aminocsoportjának védelme távolítandó el. E két szabad aminocsoport alkalmassá teszi a peptidet arra, hogy a szukcinimid gyűrűvel nukleofil reakcióba lépjen. A fent vázolt stratégia kiegészítve a használni kívánt, egymás mellől szelektíven eltávolítható védőcsoportokkal az 15. ábrán látható:



15. ábra: A tetrapeptid szintézis terve

4.2.2. Általános megjegyzések

4.2.2.1. Vékonyréteg-kromatográfia

Az oldatfázisú reakciók nyomon követése MERCK-féle (Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60, Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254) lapokon végzett vékonyréteg-kromatográfiás futtatással történt. Az előállított anyagok retenciós faktorai az alsó indexben feltüntetett eluensre vonatkoznak. Az alkalmazott futtatóelegyek a következők voltak:

1. EtOAc : hexán = 1 : 1
2. EtOAc : hexán = 2 : 1
3. EtOAc
4. EtOAc : Pyr : AcOH : H₂O = 480 : 20 : 6 : 11
5. EtOAc : Pyr : AcOH : H₂O = 240 : 20 : 6 : 11
6. EtOAc : Pyr : AcOH : H₂O = 120 : 20 : 6 : 11
7. BuOH : AcOH : H₂O = 4 : 1 : 1
8. MeOH : H₂O : AcN = 5 : 5 : 3

A kromatogramok előhívásnál alkalmazott előhívási módszerek a következők voltak:

Ninhidrin teszt: 3 %-os etanolos ninhidrin oldat, az előhívandó kromatogramot ebbe az oldatba mártjuk, majd 3 percre 100 °C-os szárítószekrénybe helyezzük.

Tolidin teszt: 8,3 g kálium-jodidot tartalmazó 100 ml 2,5 %-os ecetsav-oldathoz hozzáadunk 100 ml 2 %-os etanolos tolidin-oldatot. A kromatogramot pár percre klórfürdőbe helyezzük, majd szellőztetés után a tolidin reagens oldatába mártva hívjuk elő.

4.2.2.2. Tisztaság ellenőrzése

A peptidek tisztaságának ellenőrzésére analitikai RP-HPLC-t használtam (KNAUER készülék, Phenomenex Jupiter, C18, 250 x 4mm, 5µm szilika, 300 Å oszlop). Az elválasztáshoz lineáris gradiens elúciót alkalmaztam (5% B – 95 % B, 50 perc).

Az oszlop ekvilibrálásához és az elúcióhoz alkalmazott elegyek a következők:

A eluens: 0,1% TFA /víz (V/V)

B eluens: 0,1% TFA /acetonitril-víz (80:20 V/V)

Az A eluensben oldott 0,5-1,0 mg/ml töménységű mintákból az oszlopra 20 µl mennyiségeket injektáltam. Az elválasztásokat szobahőmérsékleten végeztem, a folyási sebesség 1 ml/perc volt. A detektálás abszorbancia mérésével ($\lambda=220\text{nm}$) történt.

4.2.2.3. Olvadáspont meghatározás

Az olvadáspontok meghatározása Tottoli-féle olvadáspontmérővel történt, abban az esetben, mikor az anyagot sikerült kristályosítani.

4.2.2.4. Elemanalízis

Az egyes vegyületek elemanalízise VARIO EL III automata elemanalizátoron történt.

4.2.2.5. Tömegspektrometriás mérés

A mérések Bruker Esquire 3000+ típusú ioncsapdás tömegspektrométer készüléken történtek. A mintákat 0,1 % ecetsavat tartalmazó acetonitril/víz 1:1 (V/V) oldószerkeletben oldottuk. A mintákat 10 µl/perc áramlási sebességgel injektáltuk. A minták ionizációja elektropray forrással történt. A spektrumokat 4,0 kV túlfeszültséggel és 40,0 V orifice feszültséggel vettük fel. A készüléket pozitív módban használtuk 50-3000 m/z tartományban, 13,000 m/z/sec mintavételi sebességgel.

4.2.3. A szintézis lépéseinek általános leíratai

4.2.3.1. A vegyes anhidrides kapcsolás

Vegyes anhidrid készítéséhez 10 mmol N-terminálison védett aminosavat DMF-ben oldottam (kb. 10ml DMF minden gramm aminosavhoz), 11 mmol ⁱBCC-t és 11 mmol NMM-t adtam hozzá -20°C-on (aceton-szárazjeges hűtés). Az elegyet 15 percig kevertettem. Az NMM-ra az aminosav és az ⁱBCC reakciója során keletkező HCl megkötése miatt volt szükség. Közben 11 mmol aminosavészter-hidrokloridot oldottam DMF-ben, az oldathoz 11 mmol NMM-t adtam, mely az aminosavat felszabadítja sójából. A két oldatot ezután összeöntöttem, majd ellenőriztem a pH-t. Ha pH 7 alatt volt, NMM további adagolásával pH=7-re állítottam. A reakcióelegyet ezután 2 órán át kevertettem -5-0°C-on. A kapcsolás végbemenetelét VRK-val ellenőriztem. Az elegyet éjszakára hűtőszekrényben állni hagytam. Másnap a kivált NMM·HCl-t kiszűrtem, a DMF-et pedig vákuumban bepároltam. A maradék olajat EtOAc és H₂O 3:1 (10 mmol-hoz kb 60ml EtOAc : 20ml H₂O) arányú elegyében felvettem, elválasztottam, majd vízzel még kétszer kiráztam. A kirázást megismételtem háromszor hideg 1N HCl-, háromszor 10%-os NaHCO₃- és háromszor 10%-os NaCl oldattal. A kirázás eredményét VRK-val ellenőriztem. Ezután az EtOAc-os fázist min. 1 órára szárítószerre (MgSO₄) tettem. A szárítószerrel kiszűrtem, az oldatot bepároltam, a kapott anyagot kristályosítottam.

Megjegyzés: a szintézisek leírásánál, mivel nem mindig 10 mmol-ból indultam ki, feltüntettem a kiindulási aminosavak mennyiségeit, a reakciókhoz természetesen arányos mennyiségű NMM-t, ⁱBCC-t és oldószereket használtam, de ezeket külön nem tüntettem fel.

A kiindulási aminosavak nem feltétlenül hidroklorid-só formájában fordulnak elő, Boc-csoport TFA-s eltávolítása után az aminosav TFA-sója jön létre, melynek kapcsolása a HCl-sóval analóg módon történik.

4.2.3.2. Boc-védőcsoport eltávolítása

Fülke alatt az anyaghoz grammonként 10 ml trifluorecetsavat adtam. A reakcióelegyet 2 órán át kevertettem, a reakciót VRK-val követtem. A reakció végbemenetele után a TFA-t bepároltam, az anyagot kristályosítottam.

4.2.3.3. Észtercsoport lúgos hidrolízise

10 mmol észterszármazékból dioxán:víz 1:1 arányú elegyével 10%-os oldatot készítettem. Az oldathoz 10 mmol 2N NaOH-ot adtam, és szobahőmérsékleten 2 órán át kevertettem. A reakciót VRK-val követtem. A reakció végeztével az elegy pH-ját 7-re állítottam 1N hideg HCl oldattal. A dioxánt bepároltam, a visszamaradt vizes fázisra EtOAc-ot rétegeztem. A vizes fázis pH-ját 1N HCl oldattal 3-ra állítottam, így a Na-sóból szabad savat képeztem. A vizes fázis háromszor kiráztam EtOAc-tal, végül az egyesített szerves fázist 10%-os NaCl oldattal. Az oldatot MgSO_4 -on szárítottam. A szárítás után az anyagot szűrtem, bepároltam, majd kristályosítottam.

4.2.3.4. Z-csoport elvtávolítása katalitikus hidrogénezéssel

Mivel a reakció során CO_2 gáz fejlődik, a hidrogénezést átbuborékolatós rendszerben végeztem. Első lépésként kiűztem a levegőt a készülékből. Ehhez a hidrogénező kacsába kb. 15 ml MeOH-t öntöttem, majd rázatás közben az átáramló hidrogénnel alaposan átöblítettem a rendszert (a feltétbe zárófolyadékot öntöttem). Ezután a 10%-os palládium-csontszén katalizátort metanolban felfuszpendáltam (kb. a hidrogénezendő anyag tömegének 10%-át). A katalizátor ezután a feltéten keresztül bejuttattam a kacsába, a feltétet egy kevés oldószerrel átöblítettem, majd kb. 15 percig hidrogéneztem átmenő hidrogénáramban rázatás közben. A fenti módon előkészített katalizátort tartalmazó rendszerbe a feltéten keresztül bejuttattam a hidrogénezendő anyag kb. 20%-os metanolos oldatát, majd a rázatást újból megindítottam. A reakció ideje alatt a feltétben zárófolyadék volt. A reakciót a kimenő gáz Ba(OH)_2 -ba való buborékolatásával, illetve VRK-val követtem. A reakció lejátszódása után a katalizátort redős szűrőn kiszűrtem, a kapott oldathoz piridin-hidrokloridot adtam. Végezetül az elegyet bepároltam, majd éterrel eldörzsöltem.

4.3. A poliszukcinimid szintézise

A poliszukcinimidet az aszparaginsav (25 g) termikus polikondenzációjával állítottam elő, mezitilén (65 ml) és szulfolán (19 ml) elegyében, foszforsav katalizátor (4 g) mellett, nitrogén atmoszférában, 163°C-on. Hét óra folyamatos kevertetés után a reakcióelegyhez metanolt öntöttem, majd a polimert desztillált vízzel mostam, levegőn szárítottam.

4.4. PASP-FKFK¹ gél preparációjának menete

A készítendő gél alappolimere a poliszukcinimid, melyet a H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe tetrapeptiddel térhálósítunk. A térhálópontok létrehozásához az szükséges, hogy a peptid két végén szabad amincsoportok legyenek, melyek a szukcinimid gyűrűkkel nukleofil addíciós reakcióba lépnek.

A 250 mg-os preparatív tömegű, 8-as elméleti térhálósági fokú², és 1,5 mmol/g polimerkoncentrációjú³ gélhez szükséges bemérendő mennyiségeket az 1. táblázat tartalmazza:

1. táblázat: PSI-FKFK gél preparációjához szükséges bemérések

	PSI	H-Phe-Lys(Boc)- Phe-Lys-OMe x2HCl	DMSO	0,4 mmol/g-os 85%-os H ₃ PO ₄	DBA	Preparatív tömeg
m (mg)	36,4	35,4	128,9	25,0	24,2	250
n (mmol)	0,375	0,047	-	0,010	0,188	-

Egy 2 ml-es üvegbe analitikai mérlegen bemértem a szilárd PSI-t, illetve a szilárd tetrapeptidet, majd pipettával bemértem a szükséges mennyiségű DMSO-t. Az üveget ezután ultrahangos kádba helyeztem, és ott tartottam, míg a szilárd anyag teljesen fel nem oldódott. Az így elkészült nagy viszkozitású oldathoz 85%-os H₃PO₄ DMSO-s oldatát adtam (0,4 mmol/g), kevertem, majd néhány percre visszatettem az ultrahangos kádba. Végül az oldathoz pipettával hozzáadtam a DBA-t, ezután 60°C-on gélesítettem a rendszert.

A gélesítés végeztével eltávolítottam a gélét az üvegből, majd pH=8 imidazol pufferbe helyezve a PSI alapú gélét PASP alapú polimer gélként hidrolizáltam. A puffert a gélen többször cseréltem, így a gélből kimosódott a DMSO, illetve az összes el nem reagált komponens. A

¹ H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe tetrapeptiddel térhálósított poliaszparaginsav gél.

² Térhálósági fok (Ψ): a polimer és a kereszkötő molaránya:

$$\Psi = n_{\text{polimer}} / n_{\text{térhálósító}}$$

³ A 1,5 mmol/g jelentése: 1,5 mmol szukcinimid ismétlődő egység 1 g polimer oldatban.

következő lépés a keresztkötő molekulán található Boc-védőcsoport eltávolítása volt. Ehhez a gél pH=3 citromsavas pufferben áztattam 3 napig, naponta cserélve a pufferoldatot. Az elkészült PASP-FKFK gél a további vizsgálatok miatt pH=7,5 foszfát pufferben tároltam. A pufferek ionerőssége minden esetben $I=0,15$ M volt.

4.5 Az *in vitro* citotoxicitás és citosztázis vizsgálatok

A vegyületek *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatásának meghatározása a sejtek életképességének vizsgálatával, a tetrazólium (MTT) módszer (1-4) alkalmazásával történt. A 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) sárga színű tetrazólium só, melyet az élő sejtek a mitokondriális dehidrogenáz enzim segítségével formazán származékká alakítanak át. Mivel ezt az átalakítást csak az élő sejtek képesek elvégezni, ezért a módszer alkalmas különféle vegyületek citotoxikus és citosztatikus hatásának mérésére [27, 28, 29, 30].

A vizsgálatokat az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoportban – együttműködés keretében – végezték el. Meghatározták a PASP-FKFK gél, az azt felépítő polimer és a keresztkötő peptid *in vitro* citotoxicitását, illetve citosztatikus hatását humán HepG2 hepatoma és HT-29 vastagbél sejtenyészeten [31, 32, 33]. A meghatározásokat megelőzően a HepG2 hepatoma sejtkultúrát [31, 32, (ATCC HB-8065)] és a HT29 vastagbél tumorsejteket [33, (ATCC HTB-38)] a 150 ml-es szövettenyésztő flaskában tenyésztették RPMI-1640 teljes médiumban, 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában. A teljes médium 10% FCS-t, L-glutamint (2 mM) és gentamicint (160 µg/ml) tartalmazott. A citotoxicitási és citosztatikus hatás vizsgálatokhoz a sejteket 96 lyukú letapadó szövettenyésztő lemezre osztották 100 µl RPMI-1640 teljes médiumban (5×10^3 sejt/lyuk). Következő nap a negatív kontrollként használt sejtekre 150 µl szérumentes médiumot, míg a kezelt sejtekre 50 µl szérumentes médiumot és 100 µl szérumentes médiumban oldott különböző koncentrációjú hatóanyagok kerültek. A PSI, illetve a PASP esetében a kezelési koncentrációk a következők voltak: 5; 1; 0,2 és 0,04 térfogat%. A polimerek citotoxikus hatásának meghatározásakor 3, illetve 24 órán keresztül inkubálták a sejtek és kezelőoldatok kimosását követően (135-135 µl szérumentes médium; kétszer,) került az MTT-oldat (2 mg/mL koncentrációban) a sejtekre. Az MTT-oldattal való 4 órás inkubálás után oldották ki a lila kristályokat 100 µl DMSO-ban.

A minták optikai denzitását $\gamma=540$ nm és 620 nm-en Elisa Reader (Labsystems, Finnország) segítségével mérték. A két hullámhosszon mért abszorbancia értékek különbségét átlagolni kell (A).

A citotoxicitást, illetve a citosztatikus hatás százalékát a következő képlet alapján határozták meg: ahol A a 4 párhuzamos lyukban mért abszorbancia átlaga.

Citotoxicitás (%) / Citosztázis (%) = $(1 - A_{\text{kezelt}} / A_{\text{kontroll}}) \times 100$, ahol A_{kezelt} a kezelt sejtek, míg A_{kontroll} a negatív kontroll sejtek esetében mért abszorbanciát jelenti.

A citotoxicitás és a citosztázis mértékét (%) a koncentráció függvényében ábrázolhatjuk és a kapott görbék segítségével meghatározható az egyes vegyületekre vonatkozó IC_{50} értékeket (Microcal Origin 7.5). Az IC_{50} értékek azt a koncentrációértéket jelentik, amely a sejtek 50%-ának pusztulását okozzák.

Az polimerek citosztatikus hatásának meghatározása annyiban különbözik a citotoxikus hatás vizsgálatától, hogy a kezelőoldatok eltávolítását követően (24 órás kezelési idő után) teljes médiumban való további 72 órás továbbtenyésztést követően kerül sor az MTT-tesztre. A peptidek *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatásának vizsgálata 1000-20 μM koncentrációtartományban történt. A mérések a polimerekkel megegyezően 24 órás inkubálási idővel folytak a polimerek esetében ismertetett módon. A peptidek esetében a citosztatikus hatás meghatározásakor a továbbtenyésztési idő 48 óra volt.

A PASP-FKFK gél öt napos áztatása után kapott felülúszó citosztatikus hatását vizsgáltattuk meg. A sejteken a felülúszóból vett mintával (100 μl) való inkubálás 24 órán át tartott. A sejtek továbbtenyésztése az MTT-tesztet megelőzően szintén további 48 órán át tartott.

4.5. A PASP-FKFK gél tripszines bontásvizsgálata

Munkám során kvalitatív előkísérletet végeztem a PASP-FKFK (H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe tetrapeptiddel térhálósított poliaszparaginsav) gél tripszines degradációjának bizonyítására. Az általam szintetizált gél – azaz kémiai térhálót – olyan keresztkötő molekulák tartják össze, mely specifikusan tripszin által hasítható kötések tartalmazzák. Feltételezésünk szerint, ha a gél tripszint tartalmazó PBS közegbe kerül, a keresztkötések megszűnnek, és idővel a térhálópontok megszűnésével a gél feloldódik.

Az enzimbontásos kísérletek során vizsgáltam egy enzimspecifikus hasítási hellyel rendelkező tetrapeptiddel térhálósított PASP polimer gél (PASP-FKFK), valamint két hasítási helyet nem tartalmazó kontrollgél. A kontrollgél 20-as térhálóssági fokú PASP-DAB, illetve H-Phe-Lys-OMe dipeptiddel térhálósított 6-os térhálóssági fokú PASP-FK gélek voltak. A vizsgált gélek egy-egy darabját előzőleg pH=7,5-ös foszfát pufferben áztattam, majd 2 mg/ml-es tripszin

törzsoldatot készítettem, melynek oldószere szintén $\text{pH}=7,5$ foszfát puffer volt, figyelembe véve ezzel a tripszin működésének pH optimumát.

Ezt követően a gélekre 2-2 ml tripszin oldatot pipettáztam, majd óránként fényképet készítettem, hogy dokumentáljam a szabad szemmel is megfigyelhető degradációt.

5. Eredmények

5.1 H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe·2HCl szintézise

A szintézis során a 15. ábrán már bemutatott stratégiát követtem. Először létrehoztam az N-terminális dipeptidet, majd lúgos hidrolízissel eltávolítottam a metilészter csoportot. A beméréseket és kitermeléseket a 2. és a 3. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: Z-Phe-Lys(Boc)-OMe előállítása

	Kiindulási anyagok		Termék (Z-Phe-Lys(Boc)-OMe)		Kitermelés
	Z-Phe-OH	HCl·H-Lys(Boc)-OMe	Várt	Kapott	
M	299,3 g/mol	296,8 g/mol	541,6 g/mol		-
n	10,0 mmol	11,0 mmol	10,0 mmol	7,4 mmol	73,7%
m	3,0 g	3,3 g	5,4 g	4,0 g	

$R_{f1}=0,40$ $R_{f2}=0,55$

Op.:117-119°C (MeOH-ból éterrel kristályosítva, a továbbiakban:

MeOH/éter)

3. táblázat: A metilészter védőcsoport eltávolítása a Z-Phe-Lys(Boc)-OMe dipeptidről

	Kiindulási anyag	Termék (Z-Phe-Lys(Boc)-OH)		Kitermelés
	Z-Phe-Lys(Boc)-OMe	Várt	Kapott	
M	541,6 g/mol	527,6 g/mol		-
n	7,4 mmol	7,4 mmol	6,1 mmol	83,4%
m	4,0 g	3,9 g	3,2 g	

$R_{f4}=0,55$ $R_{f5}=0,7$

Op.:101-105°C (MeOH/éter)

Ezután C-terminális dipeptidet (H-Phe-Lys(Boc)-OMe·TFA) szintetizáltam, majd eltávolítottam az Boc-védőcsoportot az N-terminális aminosavról. A reakciók eredményét a 4. és 5. táblázatban tüntetem fel:

4. táblázat: Boc-Phe-Lys(Z)-OMe előállítása

	Kiindulási anyagok		Termék (Boc-Phe-Lys(Z)-OMe)		Kitermelés
	Boc-Phe-OH	HCl·H-Lys(Z)-OMe	Várt	Kapott	
M	265,3 g/mol	330,8 g/mol	541,6 g/mol		-
n	10,0 mmol	11,0 mmol	10,0 mmol	5,7 mmol	57,5%
m	2,7 g	3,6 g	5,4 g	3,1 g	

$R_{f1}=0,40$ $R_{f2}=0,55$

Op.:94-97°C (MeOH/éter)

5. táblázat: A Boc-csoport eltávolítása a Boc-Phe-Lys(Z)-OMe dipeptidről

	Kiindulási anyag	Termék (TFA·H-Phe-Lys(Z)-OMe)		Kitermelés
	Boc-Phe-Lys(Z)-OMe	Várt	Kapott	
M	541,6 g/mol	555,6 g/mol		-
n	5,7 mmol	5,7 mmol	5,6 mmol	98,2%
m	3,1 g	3,2 g	3,1 g	

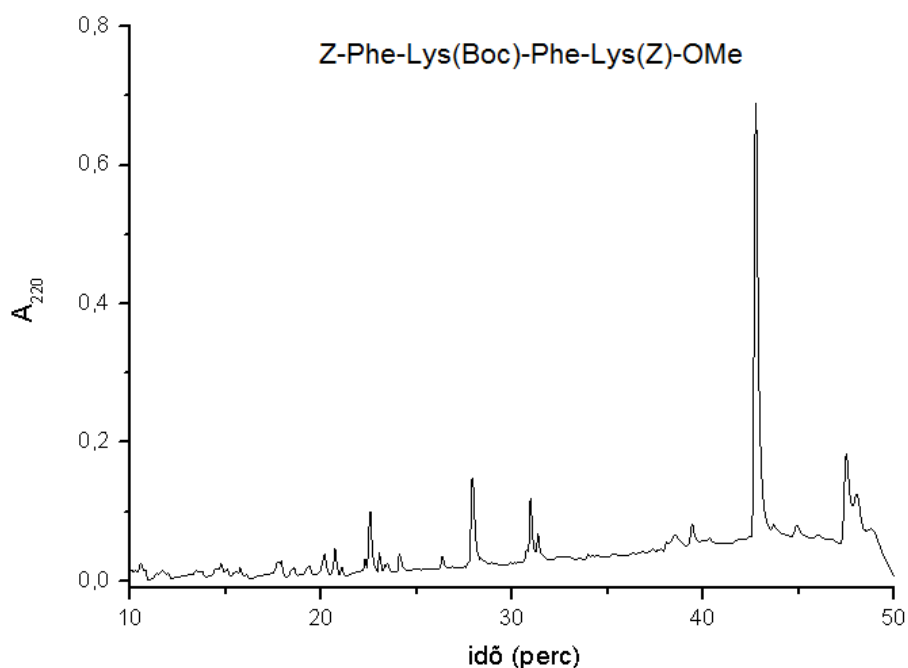
$R_{f7}=0,70$ $R_{f8}=0,45$ Az anyagot nem kristályosítottam.

A kapott dipeptideket vegyes anhidrides kapcsolással tetrapeptiddé kapcsoltam (6. táblázat).

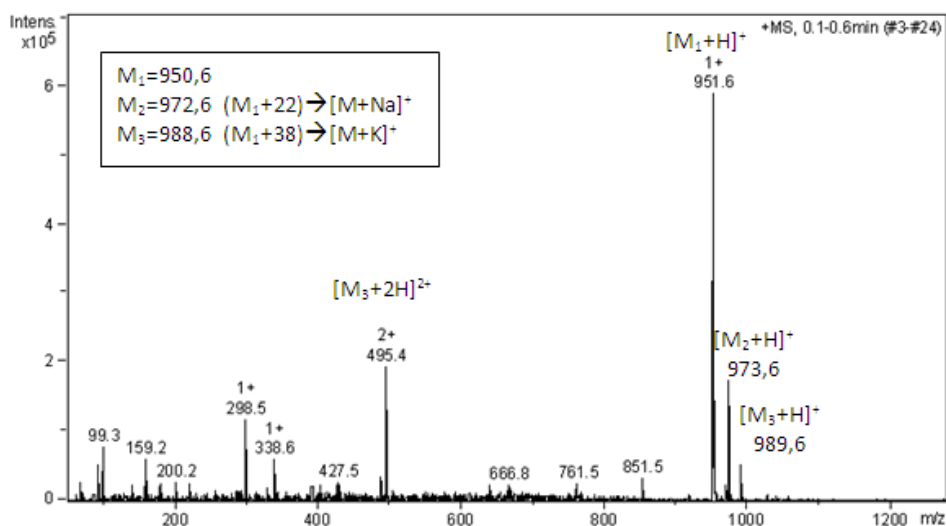
6. táblázat: Z-Phe-Lys(Boc)-OH és H-Phe-Lys(Z)-OMe dipeptidek kapcsolása:

	Kiindulási anyagok		Termék (Z-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys(Z)-OMe)		Kitermelés
	Z-Phe-Lys(Boc)-OH	TFA·H-Phe-Lys(Z)-OMe	Várt	Kapott	
M	527,6 g/mol	555,6 g/mol	951,1 g/mol		-
n	5,3 mmol	5,6 mmol	5,3 mmol	3,5 mmol	66,3%
m	2,8 g	3,1 g	5,0 g	3,3 g	

$R_{f2}=0,70$ $R_{f3}=0,55$ Op.:147-149°C (MeOH/éter)



16. ábra: Az előállított Z-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys(Z)-OMe HPLC kromatogramja



17. ábra: Az előállított Z-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys(Z)-OMe tömegspektruma

Az elkészített termék azonosításához először egy HPLC kromatogramot vettünk fel (5% B – 95 % B, 50 perc). A termék retenciós ideje (16. ábra) 43 perc, kis mennyiségben tartalmazott szennyeződések, de ezek mennyisége nem jelentős és a további szintézisek során jelenlétük nem zavaró. A főcsúcs tömegspektruma a 17. ábrán látható. A 951,6 m/z csúcs protonált molekulaion, mely a várt molekulatömegű. A 973,6 m/z és a 989,6 m/z tömegszámoknál a tetrapeptid egyik hidrogénje Na-ra, illetve K-ra cserélődött le. Jellemző csúcs még a 495,4 m/z-nél látható molekulaion, mely a kétszeresen ionizálódott tetrapeptid.

A szintézis utolsó lépéseként katalitikus hidrogénezéssel eltávolítottam a két Z-csoportot (7. táblázat).

7. táblázat: A katalitikus hidrogénezés adatai:

	Kiindulási anyag	Termék (2HCl·H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe)		Kitermelés
	Z-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys(Z)-OMe	Várt	Kapott	
M	951,1 g/mol	775,8 g/mol		-
n	2,6 mmol	2,6 mmol	2,1 mmol	80,4%
m	2,1 g	2,0 g	1,6 g	

A végtermék adatai:

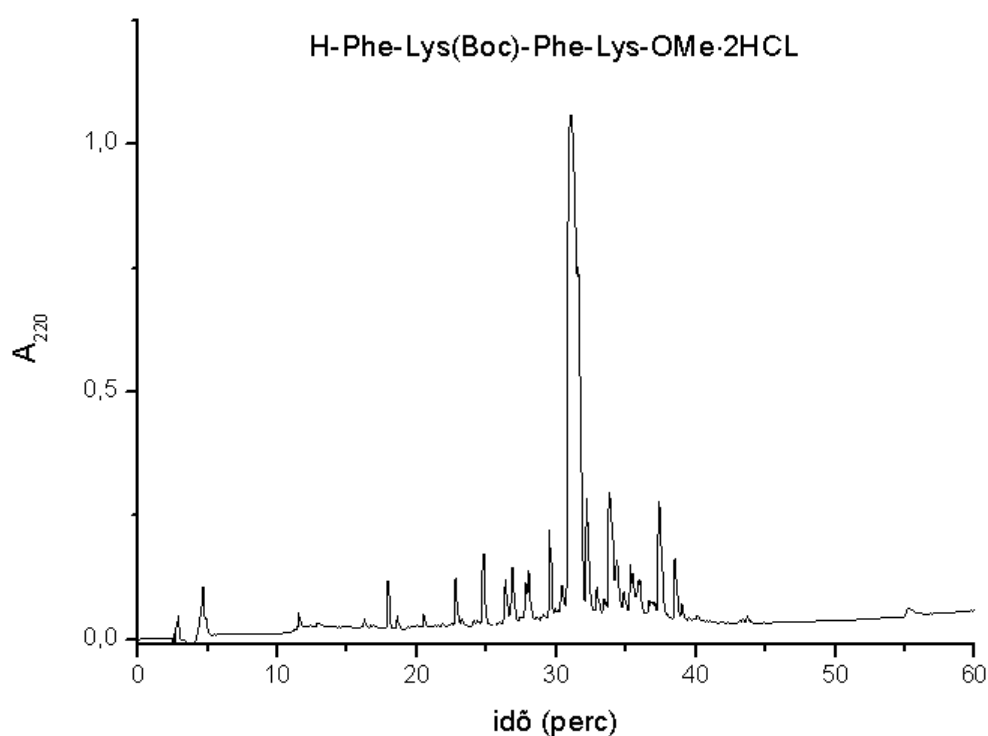
Kitermelés (a kiindulási anyagmennyiségre számolva): 21,0%

$R_f=0,45$ $R_f=0,70$

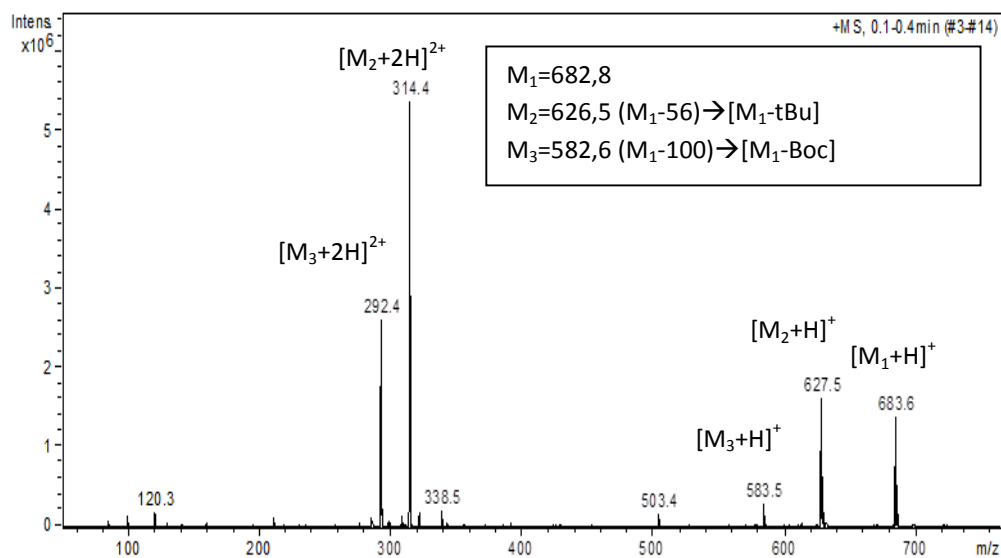
Op.: N.A. (éteres eldörzsölés)

Elemanalízis: Várt: C: 57,22 % N: 11,14 % H: 7,57 %

 Kapott: C: 58,10 % N: 10,81 % H: 7,25 %



18. ábra: Az előállított H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe HPLC kromatogramja



19. ábra: Az előállított H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe tömegspektruma

A katalitikus hidrogénezés után újra ellenőriztük a terméket. A HPLC kromatogramon jól látható a termék intenzív csúcsa (retenciós idő 32 perc, 5% B – 95 % B, 50 perc, 18. ábra). A kapott H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe tartalmaz szennyeződések, de a felhasználás szempontjából ez elhanyagolható, hiszen a kész gélből a szennyeződések kimoshatók. A főcsúcs tömegspektruma a 19. ábrán látható. A 683,6 m/z csúcs a protonált molekulaion, mely megfelel

a várt molekulatömegnek. Az MS mérés körülményei között a Boc csoport képes két lépésben lehasadni, ezért 627,5 m/z-nél és 314,4 m/z-nél megjelenik a molekula egyszeresen, illetve kétszeresen protonált tBu-csoportot nem tartalmazó formája. 583,5 m/z-nél és 292,4 m/z-nél pedig a molekula egyszeresen, illetve kétszeresen protonált Boc-csoportot nem tartalmazó formája. A fentiek alapján megállapítható, hogy az anyag alkalmas a további felhasználásra.

5.2 PASP-FKFK gél szintézise

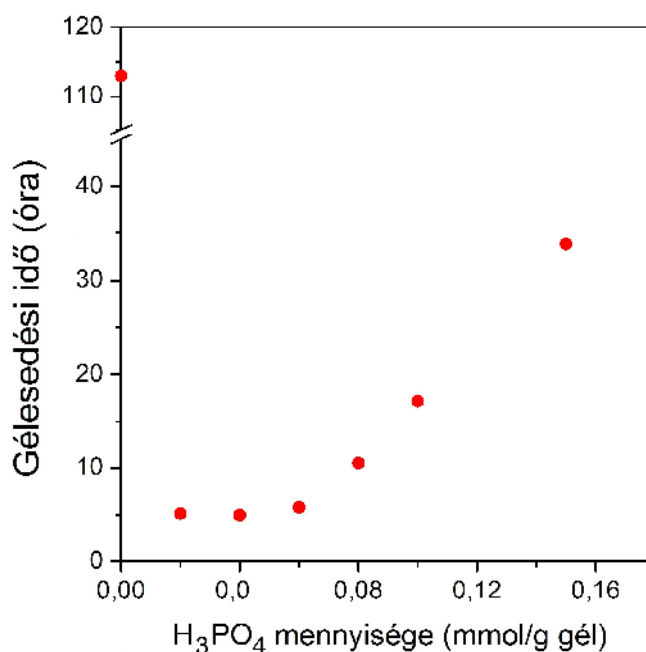
A gélszintézis optimalizálása során figyelembe kellett venni azt a tényt, hogy a keresztkötőként alkalmazandó tetrapeptid mennyisége korlátozott, újabb sarzs előállítása pedig rendkívül idő- és munkaigényes. Ezért az optimalizálási lépések egy részét nem a H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMex2HCl tetrapeptiddel, hanem hasonló szerkezetű modellvegyületekkel, egy kereskedelmi forgalomban kapható aminosavszármazékkal: lizin-etilészterrel (H-Lys-OEt2HCl), illetve az általam kifejezetten erre a célra a szintetizált dipeptiddel: H-Phe-Lys-OMex2HCl-dal végeztem.

A lizin-etilészterrel térhálósított poliszukcinimid gél (PSI-LYS) szintézisének alapját a PSI-DAB gél előállításának módszere képezte [14]. A PSI-DAB gélek esetében elegendő a polimer és a keresztkötő DMSO-s törzsoldatának megfelelő arányú összemérése, majd további oldószer adagolása ahhoz, hogy a szükséges polimerkoncentrációt megkapjuk. PSI-LYS gélek készítésekor azonban már katalizátorok használata is szükséges ahhoz, hogy a térhálósítási reakció végbemenjen. A gél készítése során két vegyületet alkalmaztunk katalizátorként, a foszforsavat, illetve dibutilamint. A foszforsavas katalízis mechanizmusa ugyan még nem tisztázott, de korábban a csoportban lizin-etilészterrel végzett gélesítési kísérletek során megfigyelték, hogy a hosszú, akár két hetes reakcióidő kis mennyiségű foszforsav alkalmazásával néhány órára csökkenthető [14]. A másik katalizátor a DBA, melynek funkciója, hogy a hidroklorid sóból felszabadítsa a keresztkötőként alkalmazott lizin-etilésztert, nukleofillé téve az amincsoportokat.

Az általam készített lizin-etilészterrel, di- illetve tetrapeptiddel térhálósított PSI gélek tulajdonságait a szintézis során öt fő paraméterrel jellemezhetjük: a polimerkoncentráció (mmol/g gél), az elméleti térhálósítási fok (mmol PSI/mmol keresztkötő), a DBA arány (mmol DBA/mmol keresztkötő), a foszforsav mennyisége (mmol/g gél) illetve a preparatív tömeg (g). A munkám során alaktartó, mérhető rugalmassági modulusú (a gél 10%-os alakváltoztatást reverzibilisen legyen képes elszenvedni), a pH változást térfogatváltozással követő gél

szerettem volna előállítani, egy ilyen gél nevezek „optimálisnak”. Az optimalizálási lépések ismertetése során az előbbi paraméterek módosításával kapott eredményeket mutatom be.

Az optimalizálás első lépéseként a PSI-LYS gélszintézis során felhasznált foszforsav mennyiségét állítottam be. Ennek során 1 mmol/g gél PSI-koncentrációjú, 6-os elméleti térhálósági fokú, 2-es DBA arányú (mely a hidroklorid sóval ekvimoláris mennyiséget jelent), 3 g preparatív tömegű géleket készítettem. Az egyes gélekben alkalmazott foszforsav mennyiségét 0-0,15 mmol/g gél tartományban változtattam, majd mértem a gélesedéshez szükséges időt. A kísérlet eredménye a 20. ábrán látható.



20. ábra: Gélesedési idő a foszforsav katalizátor mennyiségének függvényében

A kapott eredmények alapján foszforsav nélkül csak nagyon lassan játszódik le a reakció, valamint a túl sok sav is látványosan lassította a reakció sebességét 0,06 mmol/g felett. A további gélek szintézise során a görbe minimumpontjához tartozó foszforsav mennyiséget (0,04 mmol/g gél) alkalmaztam.

Következő lépésként meghatároztam a DBA bázis ideális mennyiségét. A készített gélek állandó paraméterei az 8. táblázatban láthatóak.

8. táblázat: PSI-LYS gélek állandó paraméterei a DBA mennyiségének beállítása során

C _{PSI} (mmol/g gél)	PSI/H-Lys-OEt ₂ HCl	H ₃ PO ₄ (mmol/g gél)	Preparatív tömeg (g)
1	6	0,04	3

A DBA/keresztköti arány ezekben a gélekben 2, 4, 6, illetve 8 volt. A bázis mennyisége a gélesedési időt nem befolyásolta, a legjobb mechanikai tulajdonságú géleket 4, illetve magasabb bázisarányoknál értem el. Négy feletti bázisarányok alkalmazása esetén a rendszer azonban kétfázisúvá vált, a DBA nem oldódott a DMSO-ban. A továbbiakban ezért a 4-es DBA/keresztköti arányt alkalmaztam a kísérletek során.

Az optimalizálás következő lépéseit H-Phe-Lys-OMex2HCl dipeptiddel végeztem el (PSI-FK gél). Elsőként egy méretcsökkentést hajtottam végre, innentől nem 3 g, hanem mindössze 250 mg preparatív tömegű géleket készítettem. Ezzel együtt járt, hogy törzsoldatok használata helyett, a polimert illetve keresztköti szilárd formában mértem össze, csak ezután adtam hozzá a szükséges mennyiségű oldószert. A törzsoldatok ilyen kis mennyiségű bemérése nagy hibát okozott volna, különös tekintettel a nagy viszkozitású PSI oldatra. Az ideális PSI-LYS gél paramétereit alapul véve a dipeptiddel végzett térhálósítás nem eredményezett megfelelő gél. Végül az ideális összetételt a polimerkoncentráció megnövelésével értem el (9. táblázat).

9. táblázat Az ideális PSI-FK gél fő tulajdonságai

C_{PSI} (mmol/g gél)	PSI/H-Phe-Lys-OMex2HCl	DBA/H-Phe-Lys-OMex2HCl	H_3PO_4 (mmol/g gél)	Preparatív tömeg (mg)
1,5	6	4	0,04	250

Végül áttértem a H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe tetrapeptid alkalmazására. Először a PSI-FK géllel azonos paraméterekkel rendelkező gélét igyekeztem készíteni, ehhez azonban jóval több szilárd keresztköti bemérésére volt szükség, mint PSI-FK gélek esetén, tekintetbe véve a di- illetve tetrapeptid moláris tömegeinek különbségét. Ennek eredményeként egy viszkózus, nagy polimer- és keresztköti-koncentrációjú rendszer állt elő, mely az utolsó lépésben hozzáadott bázis hatására azonnal gumyszerű fizikai gélle állt össze. Ez a rendszer lúgos hidrolízis során pH=8-as pufferben feloldódott, így megállapítható volt, hogy nem alakultak ki kémiai térhálópontok. A pillanatnyi gélesedést feltehetően másodrendű kölcsönhatások (H-híd, lánchurkolódás stb.) alakították ki. Több különböző összetétel sikertelen kipróbálása után a megoldást a magasabb hőmérsékleten való gélesítés jelentette (korábban a géleket szobahőmérsékleten állítottam elő). 60°C-on a képződött gumyszerű gél megszűnt, a rendszer viszkozitása lecsökkent, a reakciósebesség ezzel szemben megnőtt, e hatások pedig elősegítették a kémiai gél kialakulását.

Az optimalizálás eredményeképpen megállapítható, hogy sikerült reprodukálható eljárást kidolgoznom PSI H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe tetrapeptiddel való térhálósítására. A PSI gél lúgos hidrolízisével és a Boc-védőcsoport eltávolításával optikailag tiszta és megfelelő mechanikai tulajdonságokkal rendelkező PASP-FKFK gélt sikerült előállítanom.

5.3 Citotoxicitás és citosztázis vizsgálatok eredményei

Az *in vitro* citotoxicitás és citosztatikus hatás meghatározások – együttműködés keretében - az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoportban készültek. A mérések eredményeként adatokat kaptunk a felhasznált PSI alappolimer, illetve a kész gélben megtalálható PASP polimer *in vitro* citotoxikus, illetve citosztatikus hatásáról. Abban az esetben tekintettünk egy anyagot citotoxikusnak, ha a sejtek több mint 50 %-a elpusztult az MTT-teszt eredménye alapján. Az eredményeket (a számszerű IC₅₀ értékek feltüntetése nélkül) az 10. táblázatban tüntetem fel:

10. táblázat: PSI és PASP citotoxicitás és citosztázis vizsgálatának eredményei

Minta meg- nevezése	Citotoxicitás				Citosztázis	
	3h		24h			
	HepG2	HT-29	HepG2	HT-29	HepG2	HT-29
PSI	nem citotoxikus	nem citotoxikus	citotoxikus	nem citotoxikus	nem citosztatikus	Proliferációt serkentő
PASP	nem citotoxikus	nem citotoxikus	nem citotoxikus	nem citotoxikus	nem citosztatikus	nem citosztatikus

Az 10. táblázat alapján megállapítottuk, hogy 3 órás kezelést követően egyik polimer sem bizonyult citotoxikusnak a vizsgált sejteken. A 24 órás kezelés hatására a PSI a HepG2 sejteken már mutatott citotoxikus hatást. A PSI és a PASP citosztatikus hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a PSI a HT-29 sejteken proliferációt (sejtosztódást) serkentő hatást mutatott, a HepG2 sejteken pedig nem tapasztaltunk citosztatikus hatást.

Az 11. táblázatban a védett, illetve a védetlen keresztkötő peptidekkel végzett vizsgálatok eredményei láthatók.

11. táblázat: Peptidek citotoxicitás és citosztázis vizsgálatának eredményei

Minta megnevezése	Citotoxicitás		Citosztázis	
	HepG2	HT-29	HepG2	HT-29
H-Phe-Lys-Phe-Lys-OMex3HCl	nem citotoxikus	nem citotoxikus	nem citosztatikus	nem citosztatikus
H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMex3HCl	nem citotoxikus	nem citotoxikus	nem citosztatikus	nem citosztatikus

A 11. táblázat alapján a peptidek egyike sem bizonyult *in vitro* citotoxikusnak, illetve citosztatikusnak a vizsgált sejteken az alkalmazott koncentrációtartományban.

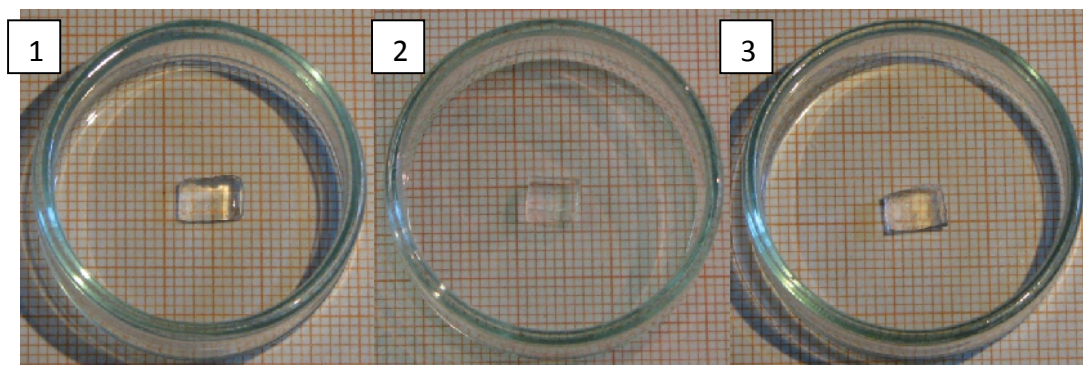
A PASP-FKFK gél ötnapos médiumos áztatásával kapott felülúszók vizsgálata során nem tapasztaltunk sem citosztatikus, sem proliferációt serkentő hatást egyik sejtvonalon sem (12. táblázat).

12. táblázat: PASP-FKFK gél citosztázis vizsgálatának eredményei

Minta megnevezése	Citosztázis	
	HepG2	HT-29
PASP-FKFK gél	nem citosztatikus	nem citosztatikus

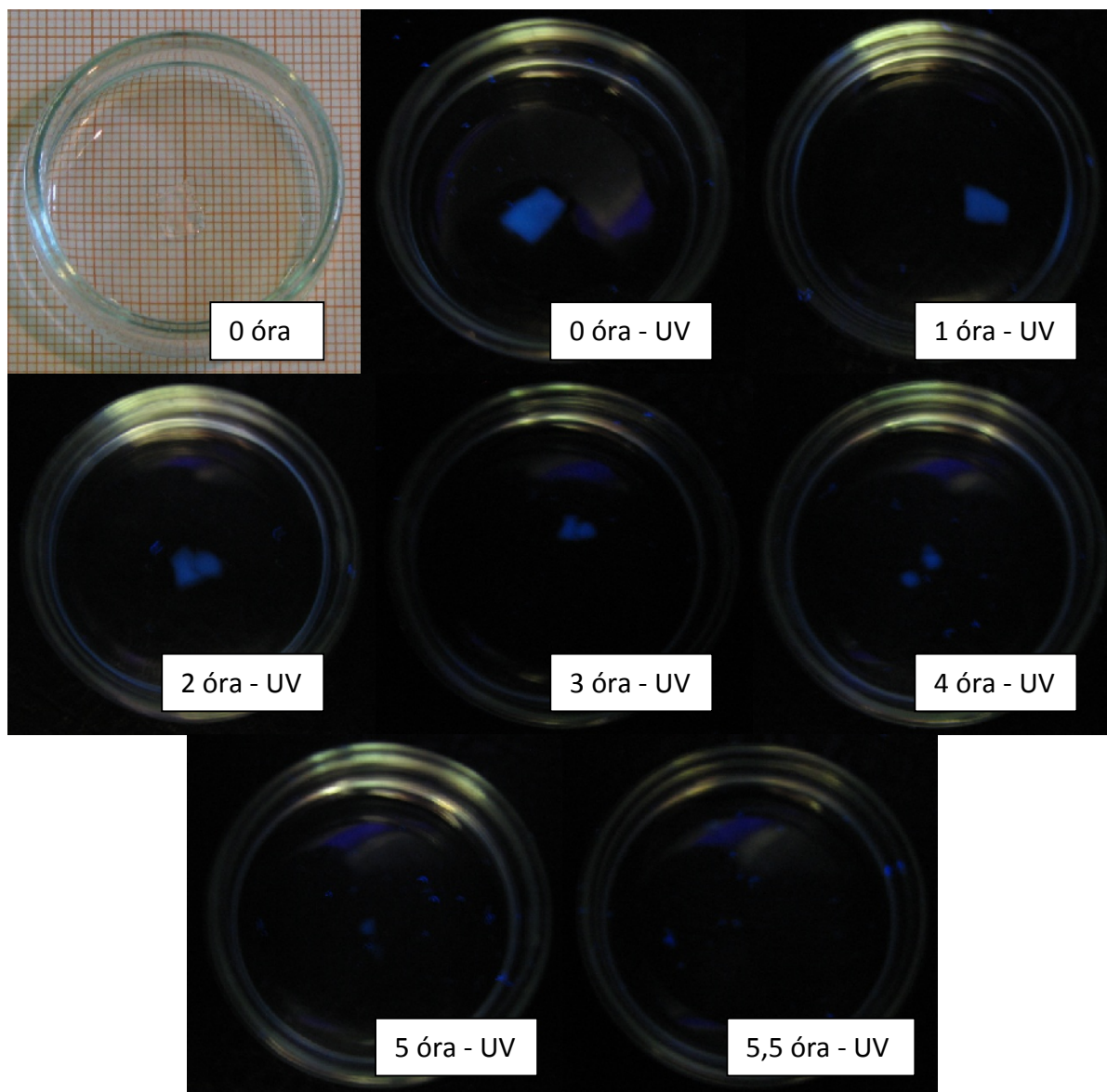
5.4 PASP-FKFK gél tripszines emésztésvizsgálata

A vizsgálatnak alávetett PASP-FKFK gél, illetve a kontrollgélként alkalmazott PASP-DAB és PASP-FK gélek a vizsgálat megkezdése előtt a 21. ábrán láthatóak:



21. ábra: 1. PASP-FKFK; 2. PASP-DAB; 3. PASP-FK gélek a tripszines emésztés megkezdése előtt

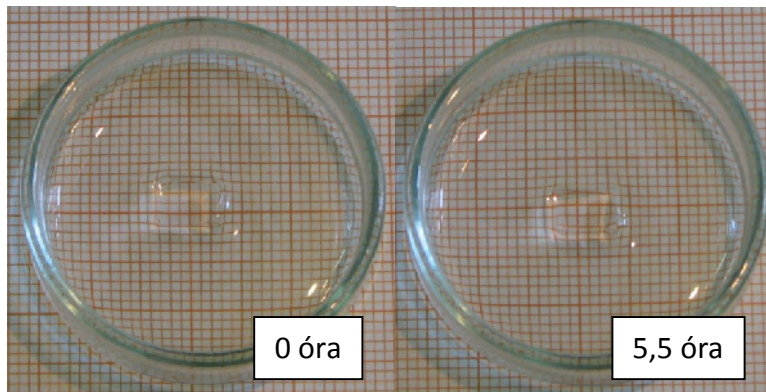
A gélek enzimátikus bontása legegyszerűbben szabad szemmel követhető. A géleket petricsészékben 2 ml 2 mg/ml-es tripszin helyeztem el 25 °C-on és adott időközönként lefotóztam azokat. Az enzim bontás eredményei a 22-24. ábrán láthatók. A 22. ábrán a PASP-FKFK-ról készített fotósorozat látható. Az oldatban lévő áttetsző PASP-FKFK gél a degradáció előrehaladtával egyre kevésbé volt látható a szokványos fényképeken, ezért UV-lámpa megvilágításával készítettem képeket, kihasználva, hogy a gél tartalmaz UV-aktív fenilcsoportokat. Ez gyengébb minőségű, de a célnak tökéletesen megfelelő fényképeket eredményezett. A proteáz enzim hatására elhidrolizált a keresztkötő tetrapeptid -Lys-Phe-peptidkötése és a gélmátrix homogén és transzparens polimeroldattá alakult át. Szabad szemmel öt és fél óra elteltével már nem volt megfigyelhető egyetlen géldarab sem az oldatban (az utolsó fotón kizárólag porszemek csillogása látható).



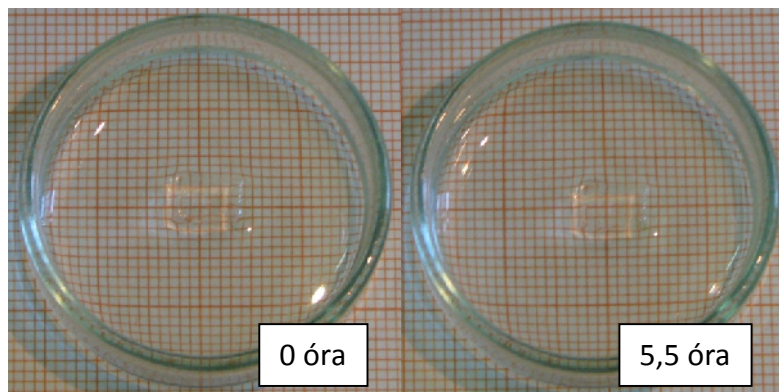
22. ábra: Tetrapeptiddel térhálósított PASP-FKFK gél biodegradációja tripszines emésztőközegben

A tripszines közeg a kontrollgéleken nem idézett elő szemmel látható degradációt. A gélek nem estek szét darabokra, még a vágási élek lekerekedése sem volt észlelhető. Mivel a kontrollgélek csak a keresztkötő minőségében különböztek a gélből – keresztkötőként egy diamint illetve egy dipeptidet tartalmaztak –, ezért két következtetést vonhatunk le az eredményekből. A tripszin nem bontotta észrevehető sebességgel a polimervázat alkotó poliaszparaginsavat a vizsgálat ideje alatt, hiszen a diaminnal térhálósított PASP-DAB gél nem degradálódott. A degradáció során a keresztkötő molekulák hasadtak fel. Az enzimes bontáshoz szükséges volt, hogy a térhálósító molekula tetrapepid legyen hiszen csak így biztosítható, hogy a Lys C-terminálisa kapcsolódjon a mellette lévő aminosavhoz, a dipeptiddel térhálósított

géleken szintén nem volt megfigyelhető degradáció hosszú időn keresztül (24. ábra). Munkám során ellenőriztem a PASP-FKFK gélek stabilitását, a géleket 2 héten keresztül tartottam az enzim bontással azonos összetételű, de enzimet nem tartalmazó oldatban, eközben a degradáció jeleit nem tapasztaltam.



23. ábra: PASP-DAB gél tripszines emésztésvizsgálata



24. ábra: PASP-FK gél tripszines emésztésvizsgálata

A keresztkötő és a PASP-FKFK gél bomlástermékek detektálásával egybekötött kvantitatív tripszines emésztésvizsgálata a jövőben fog megtörténni.

6. Összefoglalás

Kutatásom célja olyan polimer gél szintézise volt, mely biokompatibilitásának valamint enzimérzékenységének köszönhetően alkalmas lehet hatóanyag-hordozónak szabályozott hatóanyag-leadó rendszerekben. A kitűzött célt, specifikus enzim hasítási helyet tartalmazó tetrapeptidekkel térhálósított poliszukcinimid gél előállításával értem el.

A kiválasztott PSI polimer korábbi térhálósítási reakcióit figyelembe véve első lépésként egy olyan tetrapeptidet terveztem, melynek N-terminálisa szabad, C-terminálisán pedig lizin található, valamint a peptid tartalmaz specifikusan tripszin által hasítható kötést is. Ezek alapján megvalósítottam a H-Phe-Lys(Boc)-Phe-Lys-OMe tetrapeptid szintézisét oldatfázisban, mely eljárás biztosította a további gélszintézishez szükséges peptid mennyiséget.

Munkám során preparációs eljárást dolgoztam ki a PSI tetrapeptidekkel való térhálósítására. Ennek során optimalizáltam a gélesedést befolyásoló legfontosabb paramétereket, úgymint a polimer-, illetve a peptidkoncentráció, a katalizátorok mennyisége és a hőmérséklet. Eredményként megállapítható, hogy sikerrel állítottam elő olyan speciális tetrapeptiddel térhálósított polimer térhálót, mely érzékenyen reagált a környezeti pH megváltozására, valamint adott fizikai- és kémiai környezetben időben állandó fizikai-kémiai és mechanikai tulajdonságokkal rendelkezik.

Humánbiológiai hatóanyag-leadó rendszerként funkcionáló felhasználáshoz elengedhetetlen volt a gélek citotoxicitásának illetve citosztatikus hatásának vizsgálata, mely méréseket két sejtvonalon vizsgáltunk az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoporttal együttműködve. Megállapítottuk, hogy az elvégzett kísérletek alapján a létrehozott polimer gél humánbiológiai felhasználásra a kutatás jelen állása szerint alkalmas.

In vitro előkísérletet végeztem a szintetizált gél tripszines degradálhatóságának bizonyítására, melynek során a PASP-FKFK gél 5,5 óra alatt teljesen degradálódott, míg a kontrollgélek változatlanok maradtak. Ezzel bizonyítottuk a készített gél tripszin általi bonthatóságát.

Jövőbeni célom, a keresztkötő és a PASP-FKFK gél bomlástermékeinek detektálásával egybekötött kvantitatív tripszines emésztésvizsgálat, valamint a biokompatibilitás vizsgálatok folytatása a gél bomlástermékeire is kiterjesztve. Ezen felül tervezem a gélesítés megvalósítását más szekvenciájú tetrapeptidekkel.

Irodalomjegyzék

-
- [1] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides Recommendations 1983. *J. Biochem* **138**, 9-37 (1984)
- [2] Zrínyi M. (2003) A 21.század anyagai: Az intelligens anyagok , Mindentudás Egyeteme
- [3] VIII. Magyar Gyógyszerkönyv. II. kötet. Budapest: Medicina Könyvkiadó; 2004. p. 1059.
- [4] Antal I.; Klebovich I. (2008) A fájdalomterápia farmakokinetikán alapuló optimalizálása – innovatív hatóanyag-leadó rendszerek. *LAM*, **18(11)**, 783–789.
- [5] Park, K.; Shalaby, W. S. W.; Park, H. (1993) Biodegradable Hydrogels for drug delivery p. 4-6
- [6] Gyenes T.; Zrínyi M. (2001) Szabályozott hatóanyag-leadó rendszerek; Paradigmaváltás a gyógyszerészetben, *Acta Pharmaceutica Hungarica*, **71**, 405.
- [7] Kaparissides, C.; Alexandridou, S. ; Kotti, K. ; Chaitidou, S. (2006) Recent Advances in Novel Drug Delivery Systems, *Journal of nanotechnology online*, **2**, 1-11.
- [8] Szilágyi A. (2005) Hőmérsékletérzékeny polimer gélek- Az elmélettől a gyakorlati alkalmazásig; PhD disszertáció
- [9] Zrínyi M. (1999) A szintetikus izom és a szabályozott hatóanyag-leadás, Magyar Tudomány
- [10] Tomida, M.; Nakato, T.; Matsunami, S.; Kakuchi, T. (1997) Convenient synthesis of high molecular weight poly(succinimide) by acid-catalysed polycondensation of L-aspartic acid. *Polymer*, **38 (18)** 4733-4737.
- [11] Katritzky A.; Yao J.; Qi M.; Chou Y.; Sicora D. J.; Shannon D. (1998) Ring opening reactions of succinimides. *Heterocycles* **48(12)**, 2677–91.
- [12] Ramsammy L.S., Josepovitz C., Lane B.P., Kaloyanides G.J.: (1989) Polyaspartic acid protects against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **250**, 149-153
- [13] Til, H. P.; Falke, H. E.; Prinsen, M. K.; Willems. M. I. (1997) Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats, *Food and chemical toxicology*, **35**, 337-348
- [14] Gyenes T., (2007) Aminosav alapú gélek szintézise és duzzadási tulajdonságainak vizsgálata; PhD disszertáció
- [15] Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F. (2003) The Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd ed. Academic Press
- [16] Kiel, B. (1971) Trypsin. In Boyer, P.S. *The Enzymes*, Amsterdam: Elsevier. pp. 249–275.
- [17] Bajusz S. (1980) Peptidszintézis, Akadémiai kiadó p. 44-68
- [18] Bajusz S. (1980) Peptidszintézis, Akadémiai kiadó p. 82-83
- [19] Ulij, R. V.; Bibi, N.; Jayawarna, V.; Thornton, P. D.; Todd, S. J.; Mart, R. J.; Smith, A. J. Gough, J. E. (2007) Bioresponsive hydrogels, *Materials Today*, Vol 10, No. 4 40-48
- [20] Ulij, R. V. (2006) Enzyme-responsive materials: a new class of smart biomaterials, *Journal of material chemistry*, **16**, 2217–2225
- [21] Rejmanova, P.; Obereigner, B.; Kopecek, J. (1981) Polymers Containing Enzymatically Degradable Bonds 2. *Makromol. Chem.* **182**, 1899 – 1915.
- [22] Rejmanova, P.; Obereigner, B.; Kopecek, J. (1981) Polymers Containing Enzymatically Degradable Bonds 3. *Makromol. Chem.* **182**, 1917- 1928.
- [23] Ulbrich, K. ; Strohm, J. ; Kopecek, J. (1982) Polymers containing enzymatically degradable bonds. VI. Hydrophilic gels cleavable by chymotrypsine, *Biomaterials*, **3**, 150-154.

-
- [24] Plunkett, K.N.; Berkowski, K. L.; Moore J. S. (2005) Chymotrypsin Responsive Hydrogel: Application of a Disulfide Exchange Protocol for the Preparation of Methacrylamide Containing Peptides. *Biomacromolecules* **6**, 632-637
 - [25] Kim, S.; Healy, K. E. (2003) Synthesis and Characterization of Injectable Poly(N-isopropylacrylamide-co-Acrylic acid) Hydrogels with Proteolytically Degradable Cross-links. *Biomacromolecules* **4**, 1214-1223.
 - [26] Yamamoto, H.; Kitsuki, T.; Nishida, A.; Asada, K.; Ohkawa, K.; (1999) Photoresponsive Peptide and Polypeptide Systems. 13. Photoinduced Cross-Linked Gel and Biodegradation Properties of Copoly(L-lysine) Containing -7-Coumaryloxyacetyl-L-lysine Residues *Macromolecules* **32** 1055-1061
 - [27] Mosmann, (1983) T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65(1-2)** p. 55-63.
 - [28] Slater, T. F., Sawyer, B., Strauli, U. (1963) Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts, *Biochim. Biophys. Acta*, **77** p. 383-93.
 - [29] Altman, F. P. (1976) Tetrazolium salts and formazans, *Prog. Histochem. Cytochem.*, **9(3)** 1-56.
 - [30] Liu, Y. B., Peterson, D. A., Kimura, H. Schubert, D. (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem*, **69**, 581-593.
 - [31] Knowles, B., Aden, D. (1983) Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor., *USA patent*, **4,393,133**
 - [32] Knowles, B., Howe, C. C., Aden, D. P. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, **209(4455)**, p. 497-9.
 - [33] Trainer, D. L., Kline, T., McCabe, F. L., Faucette, L. F., Feild, J., Chaikin, M., Anzano, M., Rieman, D., Hoffstein, S., Li, D.J. et al. (1988) Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines, *Int. J. Cancer*, **41**, 287-296