

——— Országos Tudományos Diákköri Dolgozat ———

Készítette: László István

MSc, II. évfolyam

Dopaminnal módosított poli(szukcinimid) előállítása és
enzimatis degradációjának vizsgálata

Témavezető: Dr. Zrínyi Miklós

Egyetemi tanár, akadémikus

Konzulens: Juriga Dávid

PhD hallgató

SE, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———

——— Természettudományi Kar ——

—— Budapest, 2014/15 ——

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Polimer molekulák a gyógyászatban	4
2.1.1. Gyógyszerhordozó rendszerek alapjai: Biokompatibilis és biodegradábilis polimerek	4
2.2. Polimer alapú gyógyszerhordozó rendszerek	5
2.2.1. Fizikai kötésen alapuló gyógyszerhordozók	6
2.2.2. Kémiai kötésen alapuló gyógyszerhordozók.....	7
2.3. Poli(aminosav)ak előállítása és csoportosítása.....	8
2.4. Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) története	9
2.5. A poli(szukcinimid) reaktivitása	9
2.6. Dopamin	11
2.6.1. Dopamin átalakulása a szervezetben.....	11
2.7. Parkinson kór gyógyszeres kezelésének hátrányai	13
2.8. HPLC használata a gyógyszer, illetve a bioanalitikában.....	14
3. Célkritizálás.....	15
4. Kísérleti rész	16
4.1. Felhasznált anyagok	16
4.2. Poli(szukcinimid) (PSI) előállítása	16
4.3. PSI molekulatömegének meghatározása	17
4.4. Dopaminnal funkcionizált poli(szukcinimid) (PSI-DOPA) előállítása	18
4.5. Mágneses magrezonancia vizsgálatok (NMR)	19
4.6. Fizikai paraméterek meghatározása.....	20
4.6.1. LADME leírása	20
4.6.2. Oldhatóság vizsgálat (abszorpció)	21

4.6.3.	Lipofilitás (disztribúció).....	21
4.7.	Dopamin felszabadulásának vizsgálata fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometriás technikával (RP-HPLC-MS)	23
4.7.1.	Enzimatis reakció vizsgálata	23
4.7.2.	A mérés során alkalmazott enzimek:	24
4.7.3.	Kvantitatív analízis RP-HPLC-MS-ben	25
4.7.4.	Kalibráló egyenes.....	26
4.8.	Dopamin degradációja	27
5.	EREDMÉNYEK	29
5.1.	Poli(szukcinimid) molekulatömegének meghatározása	29
5.2.	NMR mérések eredményei	30
5.3.	A dopamin degradációs vizsgálata:	34
5.4.	Fizikai kémiai paraméterek meghatározása.....	35
5.4.1.	Oldhatósági adatok	35
5.4.2.	Lipofilitási adatok	36
5.5.	Dopamin felszabadulásának vizsgálata különböző PSI-DOPA konjugátumokról....	36
5.5.1.	PSI-DOPA GF=1 konjugátum esetén a dopamin felszabadulásának kinetikája	38
5.5.2.	PSI-DOPA GF=2 konjugátum esetén a dopamin felszabadulásának kinetikája	39
5.5.3.	PSI-DOPA GF=4 konjugátum esetén a dopamin felszabadulásának kinetikája	40
5.5.4.	Mérések összefoglalása	41
6.	Összefoglalás	42
7.	Köszönetnyilvánítás	42
8.	Hivatkozások.....	45

1. Bevezetés

Napjaink egyik jelentős kutatási témája a biokompatibilis és/vagy biodegradábilis polimerek felhasználhatósága az orvosi biológia és a gyógyszerészet területén. Ezek közül kiemelhető különböző szabályozott hatóanyag hordozó rendszerek kiépítése, melyek segítségével csökkenthető az alkalmazott dózis és növelhető a terápia hatékonysága [1; 2]. Gyógyszerhordozó rendszerek kiépítéséhez a legalkalmasabb vegyületek a biopolimerek lehetnek. [3] Ezek egyik nagy csoportja a poli(aminosavak).

A poli(aminosav)-ak előnye más polimerekkel szemben, hogy a szervezetben nagyszámban megtalálható aminosavakból épülnek fel, így lebomlásukkor nem keletkezik immunválaszt kiváltó, káros anyag. Mivel a szervezetben nagyszámú enzim specifikusan bontja ezen vegyületeket, így a polimer kémiai szerkezetének módosításával megtervezhető ezen molekulákra épülő hatóanyag hordozó rendszerek lebomlása. Így egyenesen a célszervbe juttathatjuk a gyógyszermolekulákat, melynek következtében alacsonyabb dózist alkalmazhatunk, ami lecsökkenti vagy megszünteti a mellékhatások kialakulását [3-5].

A Semmelweis Egyetem Nanokémiai Laboratóriumában régóta folynak a poli(aszparaginsav)-val (PASP) és anhidridjével, a poli(szukcinimid)-el (PSI) kapcsolatos gyógyszerészeti kutatások [6, 7, 8]. TDK hallgatóként kutatási munkám célja volt poli(szukcinimid) alapú hatóanyag-hordozó rendszer kiépítése és ezen anyagok degradációjának vizsgálata enzimek jelenlétében.

A dopamin a szervezet számára fontos vegyület, mert neurotranszmitterként az agyban kontrollálja az információ áramlását. Az agy dopamin koncentrációjának csökkenése hanyatlást idézhet elő a neurokognitív funkciókban (Parkinson-kór). Mivel a dopamin nem képes átjutni a vér-agy gáton, ezért terápiás szerként nem alkalmazható. Munkámban olyan poli(szukcinimid) alapú gyógyszerhordozót szintetizáltam és vizsgáltam, amely a dopamin perifériás rendszerben való lebomlását gátolhatja és a vér-agy gáton való átjutását segítheti elő.

TDK dolgozatomban összefoglaltam a poli(szukcinimid) - dopamin (PSI-DOPA) gyógyszer konjugátum előállítását. Az így előállított konjugátumok kémiai szerkezetének (NMR) és fizikai-kémiai paramétereinek (oldhatóság, logP) meghatározását. Emellett megvizsgáltam a dopamin bomlását, illetve a dopamin felszabadulásának kinetikáját a konjugátumról (különböző enzimek hatására) RP-HPLC- MS segítségével.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Polimer molekulák a gyógyászatban

A polimerek olyan nagy molekulatömegű anyagok, amelyek kovalens kötással összekapcsolt, ismétlődő szerkezeti egységekből (úgynevezett monomerekből) épülnek fel.

Előfordulásuk illetve előállításuk szerint meg lehet különböztetni természetben előforduló (cellulóz, fehérje); természetes alapanyag(ok)ból mesterségesen előállított (viszkóz, politejsav); és mesterséges alapanyagokból mesterséges úton előállított makromolekulákat (polietilén, polisztirol). [3; 4]

A mesterségesen előállított polimerek gyógyászati és életminőséget javító alkalmazásai a gyógyászati segédeszközökön, protéziseken, implantátumokon, szabályozott gyógyszerleadást biztosító gyógyszerhordozókon át, akár az úgynevezett génterápiában alkalmazott DNS-, RNS- és fehérje hordozókig terjedhetnek. [1-3]

Orvosbiológiai felhasználásuk esetén az egyik legfontosabb tulajdonság hogy ezen anyagok biokompatibilisek, vagyis ne váltsanak ki immunreakciót és biodegradábilisek legyenek, tehát a szervezetben építőelemeikre bomoljanak le. Gyógyszerhordozók felépítésénél a biodegradábilis és annak időbeli lefutásának ismerete kiemelten fontos, hiszen így megtervezhetjük a hatóanyag szervezetben történő felszabadulását.[1-5, 6]

2.1.1. Gyógyszerhordozó rendszerek alapjai: Biokompatibilis és biodegradábilis polimerek

Az utóbbi időkben a gyógyszerkutatásban egyre nagyobb figyelem irányul olyan gyógyszerhordozó rendszerek kifejlesztésére, amelyekkel szabályozott hatóanyagleadás érhető el. Ezek alapját legtöbb esetben biokompatibilis és/vagy biodegradábilis polimerek képezik. Ilyen molekulák alkalmazásával növelhető a hatóanyagok hasznosulása a szervezetben, így olyan molekulák is alkalmazhatóak lehetnek terápiás célokra amelyek egyszerű formulázási eljárásokkal nem [3].

A biopolimerek felfedezése és kutatása közel egy időre tehető a polimer kémia kezdeteivel. A természetes makromolekulák közül 3 csoportot különböztethetünk meg: a

poli(szacharid)-ok (glikokonjugátumok [9]), a nukleinsavak illetve a poli(aminosav)-ak (poli(lizin) [10] vagy poli(aszparaginsav) [7] alapú gyógyszerkonjugátum). A természetes polimerek felfedezése lehetővé tette, hogy a kémia fejlődésével ezeket az anyagokat mesterségesen is elő tudjuk állítani, illetve új, biológiailag aktív makromolekulákat készíthessünk, melyeknek a tulajdonságai széles keretek között változtathatóak. A poli(aminosav)-ak a szervezetben aminosavakra bomlanak, amelyeknek fontos szerepük van a biológiai rendszerek vázának felépítésében és a létfenntartó biokémiai folyamatokban [11]. Éppen ezért a poli(aminosavak) lebomlásáért a szervezetben több enzim is felelős. Megfelelő kémiai módosításokkal adott enzimcsoport célozható meg, így a hatóanyag a célszervben szabadulhat fel.

2.2. Polimer alapú gyógyszerhordozó rendszerek

A gyógyszeres terápiákban régóta megoldandó probléma, hogy a kezelés úgy legyen hatásos, hogy közben a legkevesebb mellékhatással járjon. Ezt úgy érhetjük el, ha a hatóanyag molekulánkat egy gyógyszerhordozó rendszer segítségével a terápiás célponthoz juttatjuk, ahol az felszabadulva kifejti a hatását [12-14].

Az orvosi alkalmazásokban fontos szerepe van a szabályozott gyógyszeradagolásnak, ahol a gyógyszer-molekulák és a hordozók közötti kötés teszi lehetővé a gyógyszer-adagolás optimalizálását a diagnózis és a páciens egyedi tulajdonságainak figyelembevételével. A hagyományos formulázási eljárásokkal készült készítményeknek számos hátrányuk van. Előfordulhat, hogy a hatóanyag nehezen szívódik fel, nem jut el megfelelő mennyiség a célszervbe. A szabályozott gyógyszerhordozó rendszerek (Controlled Drug-Delivery-System) az adagolás lokalizálásával, a hatóanyag-felszabadulás kinetikájának optimalizálásával általában kisebb gyógyszer-mennyiség mellett hatékonyabb gyógyítást tesznek lehetővé. Ezáltal csökkenhet a mellékhatások és a túladagolás kockázata is. [7,8, 12-15]

A gyógyszerkutatás egyik modern tendenciája a polimer gyógyszerhordozók felhasználása a különböző kismolekulájú hatóanyagok szervezetbe való bejuttatására. Makromolekulákhoz való kapcsolásuk által megnő a hatóanyagok felezési ideje, kémiai stabilitásuk. Javulhat szelektivitásuk, csökkenhet a citotoxicitásuk és enyhébb immunválaszt eredményezhetnek. A legfontosabb követelmény az ilyen készítményekkel szemben, hogy biodegradábilisak és biokompatibilisek legyenek. Hordozórendszerek alapját képezhetik polipeptidek, illetve politejsavak, melyek alkotórészei (aminosavak, tejsav) lebomlásuk után

távoznak a szervezetből vagy újra felhasználódnak. [14, 15]

A polimer alapú gyógyszerhordozókat két nagy csoportba lehet osztani:

- Fizikai kötés a gyógyszerhatóanyag és a hordozó között: kisebb egységek, molekulák spontán asszociációja útján keletkező vegyületek, melyek többnyire rendelkeznek egy hatóanyag-szállításra alkalmas üreggel (pl. liposzóma).
- Kémiai kötés a gyógyszerhatóanyag és a hordozó között: mikro- és nanorészecskék, mikrogélek, dendrimerek (szabályos, elágazó szerkezetű, gömbszerű polimer molekulák) és a polimer-hatóanyag konjugátumok.

2.2.1. Fizikai kötésen alapuló gyógyszerhordozók

Fizikai kölcsönhatáson alapuló gyógyszerhordozók esetében a gyógyszermolekula és a hordozó között csak gyenge (másodrendű) kötések vannak. Erre legismertebb példák a mikrokapszulák és a mikrorészecskék, melynek osztályozását 1. ábra mutatja be. A mikrokapszulák 0,5-2000 μm átmérőjű szabályos alakzatok, amelyek egy vagy több polimerből felépülő, áteresztő bevonattal ellátott rendszerek. [13;15]



1. ábra: Mikrokapszulák és mikrorészecskék típusai[13]

A mikrokapszula és mikrorészecske között különbséget kell tenni. A mikrokapszula egymástól jól elkülöníthető falból és belső magból épül fel, szemben a mikrorészecskével,

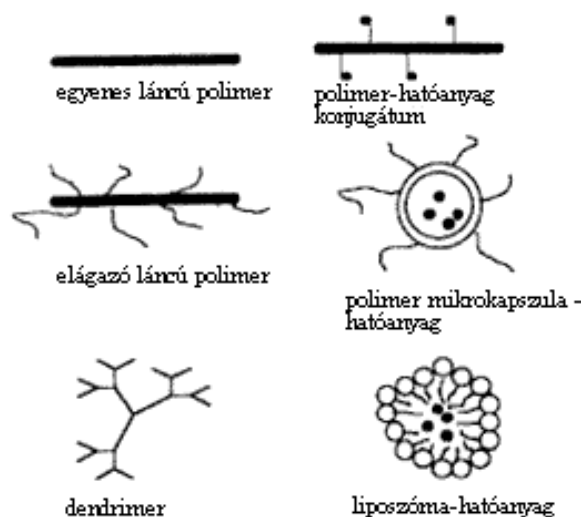
ahol nincsenek ilyen egyértelmű határok. A mikrorészecskék szerkezete az előállítási módszerrel befolyásolható, és így porózus vagy nem porózus struktúra kialakítására egyaránt van lehetőség [13,15].

A mikrokapszulázás szilárd, folyadék és gáz halmazállapotú anyagok bezárására is alkalmas eljárás, de biológiai minták egyaránt felhasználhatóak. Az előállítási mód segítségével a kívánt hatóanyag-leadó profilú készítmény készíthető. Mikrokapszulák alkalmazásával lehetőség van a hatóanyag vérben történő akumulálódás elkerülésére, ezen felül a betegek igényeihez rugalmasan idomuló készítmény kifejlesztésére. [16]

2.2.2. Kémiai kötésen alapuló gyógyszerhordozók

A polimer gyógyszerhordozók közé tartoznak a polimer mikro- és nanorészecskék, mikrogélek, dendrimerek (szabályos, elágazó szerkezetű, gömbszerű polimer molekulák) és a polimer-hatóanyag konjugátumok is.

A többkomponensű polimer terapeutikumoknak a szerkezet alapján való csoportosítását mutatja a 2. ábra:



2. ábra: Többkomponensű polimer terapeutikumok szerkezete [10]

A lebomló polimer alapanyagú hordozók segítségével szabályozott hatóanyag-felszabadulás érhető el, ami az adagolás gyakoriságát és a hatásos dózist egyaránt csökkenti. Ha ismerjük a hordozó polimer fizikai, kémiai tulajdonságait, megtervezhető a lebomlása a

szervezetben, ezáltal megvalósítható a hatóanyag felszabadulásának optimális sebessége. [14,17]

2.3. Poli(aminosav)ak előállítása és csoportosítása

Emil Fischer fedezte fel a 19. század végén, hogy a fehérjéket aminosavak építik fel amelyek peptid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Ettől a pillanattól kezdve folynak kutatások fehérjék illetve poli(aminosav)-ak mesterséges úton történő előállítására. Kiderült, hogy az amidkötés létrehozása két aminosav molekula között különleges körülményeket igényel. Az első polipeptidek nem rendelkeztek nagy molekulatömeggel valamint a szintézisek minden aminosavra másképpen működtek. Az így előállított polimerek nagy része toxikus volt, ezért orvosi felhasználásra sem voltak alkalmasak. [18] A 70-s évektől kezdve az új eljárások megjelenésével (folyadék-folyadék fázisú, szilárd-folyadék fázisú szintézis, védő és aktiváló csoportok alkalmazása) egyre nagyobb molekulatömegű és diverzitású peptideket voltak képesek előállítani. Ennek következtében felhasználásuk is egyre nagyobb teret nyert el a gyógyászatban [6, 18, 19].

Hatóanyag szállító rendszerek alapjául szolgálhatnak, így megoldva a gyógyszermolekula kontrollált kioldódását. [6, 18-20]

A poliaminosavakat többféleképpen csoportosíthatjuk. Az őket összekötő kötések, illetve felépítő aminosav molekulák alapján 3 csoportot különböztetünk meg [20]:

- *Hagyományos poli(aminosav)-ak:* A polimert csak egy- vagy többféle aminosav építi fel amelyek peptid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz.
- *Pszudopoli(aminosav)-ak:* A polimert szintén csak egy- vagy többféle aminosav építi fel, amelyek nem peptid kötéssel (észter, éter stb.) kapcsolódnak egymáshoz.
- *Poli(aminosav) kopolimerek:* A polimert nem csak aminosavak, hanem más monomerrel összekapcsolva alkotnak polimert. [6, 20]

2.4. Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) története

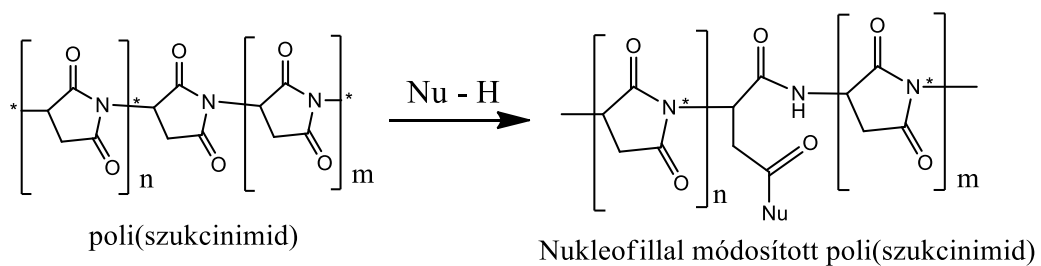
Az aminosavak közül először az aszparaginsavat fedezték fel, valamint a poli(aminosav)ak között is ő lett az első, mivel az aszparaginsav molekula összekapcsolása termikus úton is megoldható. Schaalnak már 1871-ben sikerült megvalósítania 2 monomer összekötését [21], majd 1897-ben Schiff előállította a kristályos tetra-aszparaginsavat és az amorf okta-aszparaginsavat [22]. 1951-ben Frankel és Berger már nagyobb molekulatömegű poli(aszparaginsav) előállítására volt képes N-karboxianhidrides (NCA) módszerrel [23]. Termikus úton előállított poli(aszparaginsav) szintézisét Kovács József, Könyves Imre és Pusztai Árpád valósították meg 1953-ban. A polimerizáció 180 °C-on ment végbe oldószer nélkül és közel 8 kDa-s molekulatömegű poli(aszparaginsav) keletkezett [24].

Az 1950-es évek végén Harada dolgozott ki különböző eljárásokat poli(aszparaginsav) előállítására [25-26]. A termikus polimerizációs eljárás mellett kopolimerizálással (maleinsavamin és maleinsav) kis polimerizációfokkal, később pedig monoammónium-fumársav és almasav elegyéből poli(aszparaginsav)at szintetizált [27].

Igazán nagy molekulatömegű polimerek előállítására csak a 90-es években került sor. Tomida és munkatársai dolgoztak ki többféle eljárást nagy molekulatömegű poli(aszparaginsav) előállítására. Nagy mennyiségű foszforsavban oldva sikerült magas polimerizációfokot elérni [28], de a termékből a foszforsav nehezen volt eltávolítható.

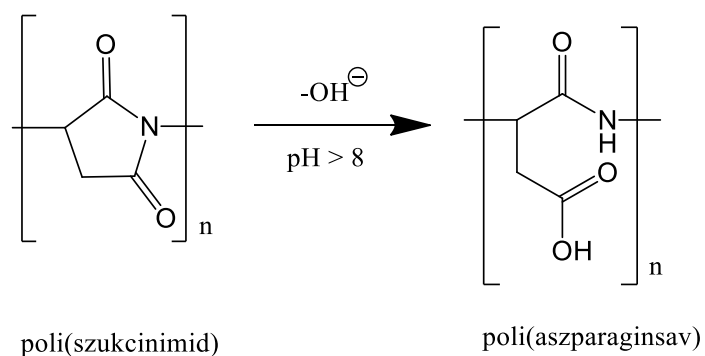
2.5. A poli(szukcinimid) reaktivitása

A PSI könnyen reakcióba vihető nukleofil reagensekkel. Ezt a tulajdonságát az öt felépítő, aktivált imidkötéseket tartalmazó szukcinimid egységeknek köszönheti. Hidroxil csoporttal lúgos közegben gyűrűfelnyílási reakció megy végbe és poli(aszparaginsav) keletkezik. N tartalmú nukleofilok esetén reakciópartnerek lehetnek az aminosavak, diaminok és hidrazinok. A folyamat általános egyenlete a 3. ábrán látható [6, 29-33]:



3. ábra: PSI reakció N-nukleofil reagenssel

A lúgos hidrolízis során a szukcinimid gyűrűből aszparaginsav lesz, így a poli(szukcinimid)-ből poli(aszparaginsav) keletkezik (4.ábra).

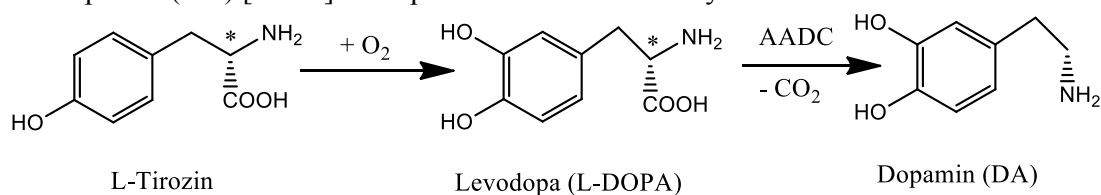


4. ábra: PSI reakciója OH ionnal reagenssel

Primer aminocsoportot tartalmazó hatóanyagokkal módosítva a PSI-t az előzőekben említett polimer-hatóanyag konjugátumot állíthatunk elő. Ilyen molekula például a dopamin.

2.6. Dopamin

A dopamin a katekolamin-családba tartozik, és prekursora két neurotransmitternek, az epinefrinnek (adrenalin), valamint a norepinefrinnek (noradrenalin). Emellett saját receptor családdal rendelkezik mind a periférián mind a központi idegrendszerben, így önmaga is neurotransmitter. Mivel a dopamin nem képes átjutni a vér-agy gáton, így a mellékvese és a hipotalamusz is termeli. A kiindulási vegyülete az L-Tirozin, amiből Levodopa (L-DOPA) lesz és végül a Dopamin (DA) [33-35]. A dopamin előállításának folyamat az 5. ábrán látható.



AADC: aromás amino-sav dekarboxiláz enzimet

5. ábra: Dopamin keletkezése a szervezetben

Az agy elülső lebenyében a dopamin kontrollálja az információáramlást. Ebben a régióban a dopamin rendellenesség hanyatlást idézhet elő olyan neurokognitív funkciókban, mint emlékezés, figyelem, valamint problémamegoldó képesség. Ezt alátámasztja az is, hogy a skizofréniát, a Tourette szindrómát és a tikk-et a magas dopamin szint (kezelése pl.: Haloperidollal), a Parkinson-kórt pedig ugyanezen neurotransmitter hiánya és a Nigrostriális pálya degenerációja okozza. [34]

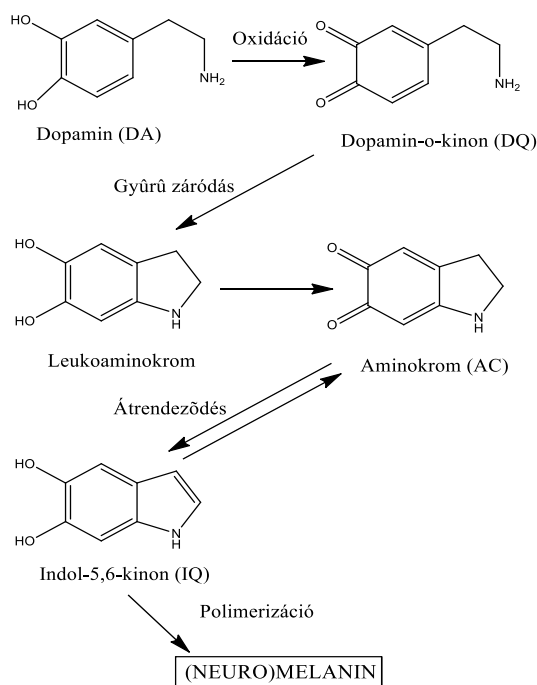
A Parkinson-kórnál a dopamint termelő idegsejtek mintegy 70-80 százaléka károsodik vagy elveszik. Mindez az agy substantia nigra részében zajlik, ahol dopamin hiányában az idegsejtek működése nem megfelelő, és ez okozza a betegség tipikus tüneteit (kéz- és lábremegés). A dopaminnak a szervezetben sok lebomlási útvonala van (lásd 2.6.1. fejezet). A káros metabolitok az agyban neurotoxikusak lehetnek, így elősegítve annak károsodását és a Parkinson-kór kialakulását [36].

2.6.1. Dopamin átalakulása a szervezetben

A test fiziológiai pH-ján a dopaminból toxikus metabolitok keletkezhetnek, melyek a szervezetre ártalmasak lehetnek. Ezen vegyületek nagy része neurotoxikus, emellett fehérje

denaturációt illetve a dopamin receptorok degenerálódását okozhatják. [34]

A dopamin biztonságos átalakulásának részletes lépései a 6. ábrán láthatóak (neuroprotektív út).



6. ábra: Dopamin oxidatív degradációjának folyamata

A dopamin hidroxil-csoportján lévő H atomok fontos szerepet játszanak az oxidáció során, mivel a fiziológiás pH-n disszociálnak. Ez a folyamat elősegíti a Dopamin / Dopamin- o-kinon átalakulást. A Dopamin-o-kinon fiziológiás pH-n nem, csak a pH<2 tartományban stabil. Emiatt Leukoaminokrómmá alakul úgy, hogy a szabad aminos-csoportja segítségével intramolekuláris gyűrűzáródás megy végbe. További oxidáció hatására Aminokrómmá alakul. A szervezetben a Dopaminból Aminokrómmá alakulást a flavonoid, illetve a tirozináz enzimek és a fémionok (mangán, réz vagy vas) segíthetik elő. Az Aminokrómm a melanin prekursora. A melaninná alakulás függ attól, hogy az aminokrómm milyen mértékben alakul át indol-5,6-kinonná, melyet egy polimerizációs folyamat követ. Ez a polimer egy fekete színű csapadék, melyek a bőrben, hajban, a retina pigmentált részén és az agyban (neuromelanin) található meg. Amennyiben a neuromelanin feldúsul a központi idegrendszerben/agyban, akkor az idegi pályák degenerációját okozza [33-35].

Az aminokróóm összekapcsolódhat enzimekkel és/vagy fehérjékkel (DJ-1 fehérje), ezáltal inaktiválhatja, illetve új, a szervezetre ártalmas képességekkel ruházhatja fel azokat. Emellett a citoskeletonban aggregátum képződésre is hajlamos (aktin; α és β -tubulin). Ezen úton neurotoxikus aggregátumok jöhetnek létre. [33; 37, 38]

2.7. Parkinson kór gyógyszeres kezelésének hátrányai

Noha a Parkinson-kór kezelésével kapcsolatban folyamatos előrelépésről lehet beszámolni, még se a megelőzése se a gyógyítása nem lehetséges. A tünetek azonban meglehetősen jól kontrollálhatóak és a betegség előrehaladása lassítható. [36]

A dopamin gyógyszerként is használható, mely a szimpatikus idegrendszerre fejt ki hatását, emelve a pulzust és a vérnyomást. Mivel a dopamin (szerkezetéből adódóan) nem képes átmenni a vérereken és a vér-agy gáton, így gyógyszerként való használata nem befolyásolja közvetlenül a központi idegrendszert. Ahhoz, hogy a Parkinson-kórban szenvedő betegeknek a dopamin-szintjét lényegesen megnöveljük az agyban, nagy dopamin mennyiséget kellene alkalmazni (naponta többször is), mivel a bevett dopamin mennyiségének 85%-a kiürül a szervezetből 24 óra alatt (enzimatis leomlás vagy diffúzió révén). Manapság a gyógyszeres kezelést a dopamin szintetikus perkurzorával, az „elő”-dopaminnal (*L-Dopa*, más néven levodopa) oldják meg, mivel ez képes átmenni a vér-agy gáton és a központi idegrendszerben dekarboxiláz enzimek hatására ezután dopaminná alakulni [39].

Parkinson-kór esetében ezért megoldást jelenthet a gyógyszerhordozó rendszerek alkalmazása. Ha a dopamin fizikailag vagy kémiaiilag csapdázva van egy hordozó rendszerre (esetemben poli(aminosav)-ra), akkor az megvédheti a lebomlástól, stabilizálhatja. A nagy molekulatömegű polimerrel együtt nem képes átmenni a vér-agy gáton a dopamin, de a szervezetben lévő enzimek hatására kis fragmensek válhatnak le a konjugátumról. A kis fragmensek képesek lehetnek átmenni a vér-agy gáton, majd az agyban leszakadva elérhetjük, hogy folyamatos dopamin felszabadulás alakulhasson ki, így egy állandó dopamin szintet tartsunk fenn.

Irodalomban már előállítottak néhány dopamin tartalmú gyógyszer konjugátomot, ahol a hordozó zsírsav [40], illetve poli(etilén-glikol) (PEG) volt [41].

2.8. HPLC használata a gyógyszer, illetve a bioanalitikában

A korszerű gyógyszerkönyveknek, a legfontosabb módszerei a különféle kromatográfias technikák. Az alig 30-35 éves múltra visszatekintő nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia (HPLC-DAD) mára a gyógyszeranalitika egyik legfontosabb módszerévé vált. Általában ezt alkalmazzák gyógyszeralapanyagok és készítmények hatóanyagtartalmának meghatározására, illetve gyógyszer stabilitási vizsgálatoknál. Emellett rokonszerkezetű szerves vegyületek elválasztására, szennyezések kimutatására és meghatározására is. [42, 43]

A HPLC-MS a mai nagyműszeres analitika egyre szélesebb körben elterjedt kapcsolt technikája. Nagyfokú szelektivitást, univerzalitást (a tömegmérés (MS) univerzális detektálást) tesz lehetővé. Alkalmas szerkezeti információk szolgáltatására és nagy érzékenysége miatt a nagyon kis mennyiségű minta komplex mátrixokban történő meghatározásában az első számú módszerre lépett elő az utóbbi évtizedben. Ezt a technikát azért szeretik a gyógyszerészek, mert a polárostól az apolárosig, a kis és nagy molekulatömegű vegyületek egyidejűleg elválaszthatóak és mérhetőek. Emellett sokféle ionizátor (EI, CI, ESI, Maldi) és detektor (MS, MS-MS, UV/VIS) áll rendelkezésre, ezért a céljainknak megfelelően építhetjük meg készülékünket. [42, 44]

3. Célkitűzés

Kutatásom célja volt nagy molekulatömegű poli(szukcinimid) (PSI) előállítása savkatalizált termikus polikondenzációval L-aszparaginsavból. Az így előállított polimer molekulatömegének meghatározása vibrációs viszkoziméter használatával. Feladatomból volt a tisztított polimert módosítani dopaminnal és így különböző összetételű gyógyszer konjugátumokat szintetizálni (PSI-DOPA).

Továbbá munkám volt a különböző dopamin tartalmú gyógyszer konjugátumokat szerkezetkutató módszerrel (^1H NMR) megvizsgálni, és ellenőrizni, hogy a módosított polimer összetétele megegyezik-e az elméletivel. A konjugátumok fizikai-kémiai paramétereinek (oldhatóság és lipofilitás) meghatározása, egyszerű elválasztó tölcéses eljárással [45].

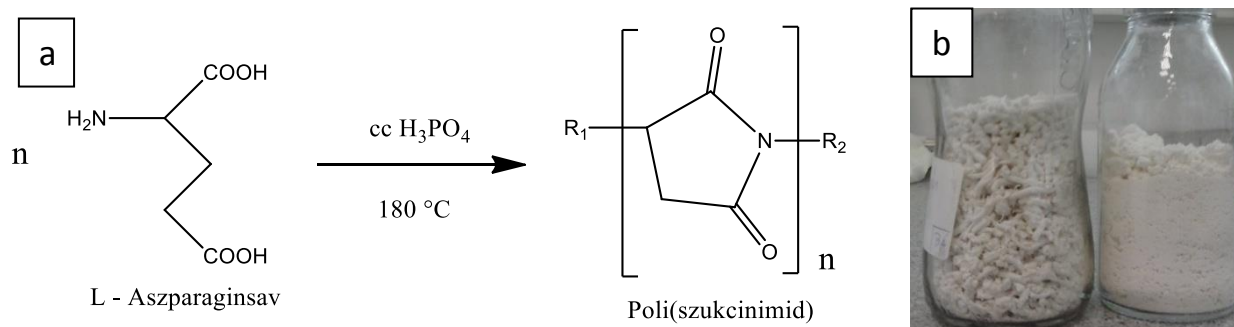
A konjugátumok illetve szabad dopamin degradációs vizsgálataihoz kifejleszteni, illetve optimalizálni egy HPLC-MS mérési eljárást,. Ezzel a módszerrel megvizsgálni a gyógyszer konjugátumokról történő dopamin felszabadulásának kinetikáját különböző enzimek (Bromelain enzimescsoport, α -Kimotripszin) jelenléte mellett.

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált anyagok

L-aszparaginsav (Sigma Aldrich; 98%); o-foszforsav (Sigma Aldrich; 99%); foszforsav oldat (VWR; 86%); Dopamin-hidroklorid (Sigma Aldrich; 99,9%); Dibutilamin (DBA) (Sigma Aldrich; 99,5%); Dimetilszulfoxid (DMSO) (VWR; 99,9%); Dimetilformamid (DMF) (VWR; 99,5%); Litium-klorid ((Sigma Aldrich; 99%); Nátrium-hidroxid (VWR; 99%); Oktanol (VWR; purum); Bórax (Hungerpharma Kft; purum); Ecetsav (Sigma Aldrich; Kromasolv); Acetonitril (Sigma Aldrich; Kromasolv); Bromelain enzimes csoport (ananász szárból) (Sigma Aldrich; 4-7 units/mg); α -Kimotripszin enzim (Sigma Aldrich; 40 units/mg)

4.2. Poli(szukcinimid) (PSI) előállítása



7. ábra: a: A PSI előállítási egyenlete; b: A végtermék

A poli(szukcinimid)-et L-aszparaginsavból állítottam elő sav katalizált termikus polikondenzációval. A reakció során monomerenként 2 víz molekula lép ki. Azonos tömegű L-aszparaginsavat és szilárd foszforsavat mértem be egy csiszolatos gömblombikba. A reakció elegyet ezután fokozatosan 180 °C-ra melegítettem, miközben a nyomást 5-10 mbar-ra csökkentettem. A reakcióhőmérséklet elérése után további 7 órán át kevertettem a reakcióelegyet. A terméket dimetilformamidban (DMF) feloldottam, majd desztillált vízben kicsaptam. Ezután desztillált vízzel semleges pH-ig mostam, majd szárító szekrényben 50 °C-on szárítottam. A 7.b ábrán látható az így előállított polimer szárítás után.

4.3. PSI molekulatömegének meghatározása

6 különböző koncentrációjú (5 – 50 mg/dm³) PSI oldatot készítettem el 0,1M LiCl/DMF-ben oldva. Az oldatok viszkozitását SV-10 vibrációs viszkoziméter (8. Ábra) segítségével mértem meg.



8. ábra: SV-10 vibrációs viszkoziméter

A mérési eredményekből meghatároztam az oldatok relatív viszkozitását (η_{rel}) az alábbi egyenlet segítségével:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}$$

ahol η a polimer oldat viszkozitása, η_0 pedig a 0,1M LiCl/DMF oldat viszkozitása. A relatív viszkozitásból számolható a fajlagos vagy más néven specifikus viszkozitás:

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$$

ahol η_{sp} jelöli a polimer oldat fajlagos viszkozitását. A fajlagos viszkozitás és a koncentráció hányadosa adja az oldat redukált viszkozitását (η_{red}):

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$$

ahol c a polimer koncentrációját jelöli. A Huggins-egyenletből következik, hogy a redukált viszkozitást a koncentráció függvényében ábrázolva, $c=0$ pontban kapjuk meg a határviszkozitást $[\eta]$ (jellemző viszkozitást):

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right)$$

A Kuhn-Mark-Houwink egyenlet segítségével a határviszkozitásból meghatározható a polimer számátlag szerinti molekulatömege:

$$[\eta] = K * M^a$$

ahol M a számátlag szerinti molekulatömeg, K és a pedig kézikönyvekben megadott állandók.

Az irodalomban ismertek a Kuhn-Mark-Houwink egyenletben használatos K és a paraméterek [46]:

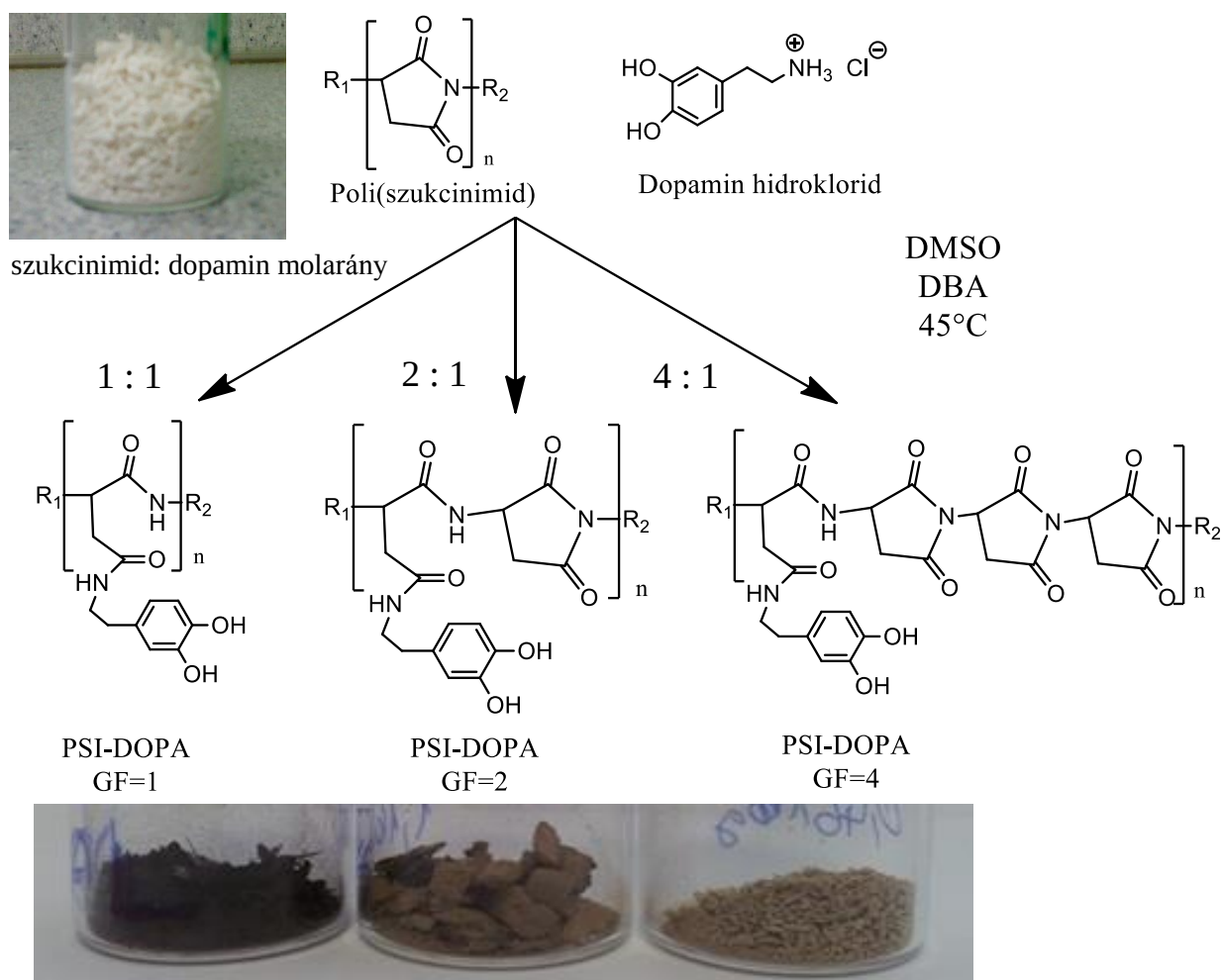
$$K=1,32*10^{-2} \quad a=0,76$$

4.4. Dopaminnal funkcionizált poli(szukcinimid) (PSI-DOPA) előállítása

A szukcinimid N vagy O tartalmú nukleofilekkel reakcióba vihető gyűrű felnyílás közben, ahogy ez a 2.5. pontban szerepelt. A dopamin a primer-amin csoportján keresztül képes nukleofil addíciós reakcióba lépni a szukcinimid gyűrűvel. A gyűrűfelnyílás során savamid kötés alakul ki a dopamin és a polimer között.

A módosításhoz a PSI-re nézve 20 tömeg%-s dimetilszulfidos (DMSO) oldatot készítettem. Egy másik főzőpohárba kimértem a dopamin-hidrokloridot, feloldottam DMSO-ban és dibutilamint (DBA) adtam hozzá, hogy a dopaminon lévő hidrokloridot megkösse. A főzőpoharak tartalmát összekevertem és 45 °C-os olajfürdőbe helyeztem 5 napra.

Módosítás során 1, 2 illetve 4-es graftolási fokú polimereket állítottam elő, ahol a graftolási fok (továbbiakban GF) azt mutatja, hogy statisztikailag minden X.-edik szukcinimid gyűrű lett módosítva dopaminnal. Az így előállított konjugátumok szerkezete a 9. ábrán láthatóak.



9. ábra: A PSI-DOPA minták előállítási egyenletei és a végtermékek

GF=2-es és 4-es polimert desztillált vízzel csaptam ki majd a csapadékot üvegszűrőn leszűrtem és 3 napra 50 °C-os szárítószekrénybe raktam. GF=1 esetén a módosított polimer vízbe öntés hatására nem csapódik ki rendesen, így szűrésre alkalmatlan. Ehelyett 14 kDa-os membránba töltöttem, hogy a DMSO-s fázist lecseréljem vizes fázisra. Az így kapott vizes oldatot szárazra pároltam.

4.5. Mágneses magrezonancia vizsgálatok (NMR)

Az NMR spektroszkópia (mágneses magrezonancia spektroszkópia) napjaink legelterjedtebben alkalmazott kémiai szerkezetkezelési vizsgálati módszere, mert szerkezeti információt nyújthat szilárd és oldatfázisú mintákról is. Az NMR spektroszkópia az egyes molekulákat felépítő atomok magjának és a rádiófrekvenciás tartományba eső

elektromágneses hullámoknak a kölcsönhatását vizsgálja

Az atommagok az őket felépítő nukleonok mozgásából következően saját spin impulzus momentummal illetve magspinnel rendelkeznek. NMR spektroszkópia szempontjából azok az atommagok aktívak, amelyek a bennük lévő nukleonok kvantumszámainak összegzése után nullától különböző magspinnel rendelkeznek. Ezek az atomok (^1H , ^{13}C , ^{15}N , stb.) külső mágneses tér hatására polarizálódnak [47]. Az egydimenziós ^1H spektrumok alapján megállapíthatjuk, hogy a molekulában található különböző hidrogén atomok milyen kémiai környezetben fordulnak elő a molekulán belül.

Az NMR spektrumok felvételéhez DMSO- d_6 -ban feloldottam 30mg PSI, illetve a különböző graftolási fokú PSI-DOPA mintákat, majd az oldatot kétcsatornás Jastec 400MHz-es spektrométerben helyeztem el. A készülékhez egyszerre két mag manipulálására alkalmas inverz szélessávú mérőfej, pulzusforma generátor, és pulzus térgradiens meghajtó (PFG) csatlakozott. A kvantitatív ^1H -NMR spektrumokat 16 s relaxációs idővel, 3 s mintagyűjtési idővel, és legkevesebb 32 akkumulációs idővel rögzítettem.

4.6. Fizikai paraméterek meghatározása

A szerkezet-hatás összefüggések felismerése óta a gyógyszerkémikusok számára az újonnan szintetizált vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzése mindig is hasznos információval szolgált, hogy megjósolják a gyógyszerkészítmények várható biológiai hatását, illetve a szervezeten belüli mozgását. A fenti célra leggyakrabban használt fizikai-kémiai paraméterek az *oldhatóság*, az *ionizáció*, a *lipofilitás* és a *permeabilitás*. [45]

4.6.1. LADME leírása

Az orvostudomány elképzelhetetlen farmakonok, vagyis az élő szervezet működését már kis koncentrációban is számottevően befolyásoló molekulák alkalmazása nélkül. A farmakon szélesebb értelemben minden bioaktív ágens, szűkebb értelemben terápiásan alkalmazott hatóanyag. A farmakonok tulajdonságait, hatásmechanizmusát, használatuk általános szempontjait a farmakológia (gyógyszertan) írja le. Ez két fő részre bontható: az élő

szervezetnek a farmakonra kifejtett hatásával foglalkozó farmakokinetikára, és a farmakonnak az élő szervezetre kifejtett hatását tárgyaló farmakodinámiára (gyógyszerhatástan). [48,49]

A farmakokinetikát didaktikai megfontolásból kvalitatív és kvantitatív részre oszthatjuk. A kvalitatív farmakokinetika az élő szervezet azon működéseivel foglalkozik, amelyek meghatározzák a szervezetbe került farmakon sorsát. A farmakont érintő főbb eseményeket általában az ún. ADME felosztás keretében oktatják, amely az adott szer útját a felszívódástól (abszorpció) a megoszláson (disztribúció) és a metabolizmuson át a kiválasztásig (exkréció) követi. Ha a szer sorsát a gyógyszerformából való felszabadulástól (liberáció) vizsgáljuk, a LADME rövidítést használjuk. [48, 49]

4.6.2. Oldhatóság vizsgálat (abszorpció)

A gyógyszervegyületek kémiaiailag különböző szerkezetűek, így viselkedésükben, valamint fizikai-kémiai paramétereikben (oldhatóság) is különböznek egymástól. Az oldhatóság tehát az anyag szerkezetéből eredő molekuláris tulajdonság, mely anyagi minőségére jellemző érték. [45, 50]

A szervezet működéséhez szükséges biológiai, kémiai és biokémiai folyamatok vizes közegben mennek végbe. Ezért biohasznosíthatóság szempontjából a gyógyszerjelölt vegyületek legfontosabb tulajdonsága vízben való oldhatóságuk. A gyógyszerkutatás különböző fázisaiban az oldhatóság meghatározási módszerek különbözőek. A korai fázisban elegendők a tájékoztató adatok, később azonban nagy pontosságú eredményekre van szükség. Munkám során az általános rázótolcséres oldhatósági vizsgálatot végeztem el. [50, 51]

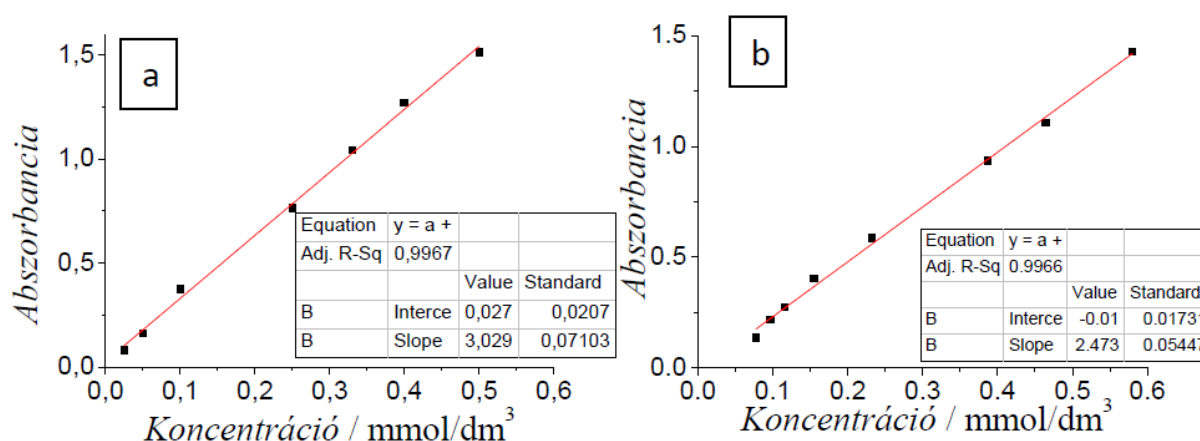
Az oldhatóság a gyógyszerkönyvben is benne van, mint minőségi kritérium. Az Európai (Ph. Eur.) és a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII.) szinte minden kémiai alapanyagnál vizsgálhatja az oldódást.

4.6.3. Lipofilitás (disztribúció)

A lipofilitás a legrégebben használt fizikai-kémiai paraméter a gyógyszerkutatásban. A lipofilitás megmutatja egy gyógyszermolekula affinitását az apoláris környezethez (kettős foszfolipid réteghez). Emiatt meghatározza a gyógyszermolekula szervezetbeli eloszlását,

mind a farmakokinetikai mind a farmakodinámiás fázisban. Jellemzésére a lgP (megoszlási hányados tízes alapú logaritmusa) adat szolgál. [48 ,52 ,53]

Kalibráló sorozatot készítettem ultratiszta vízben (MQ), illetve oktanolban oldott dopaminra. Spektrofotométer segítségével meghatároztam ezeknek az oldatoknak az abszorbanciáját 280 nm-en, ahol a dopaminnak elnyelési maximuma van. Az alábbi kalibrációt használtam a mérések kiértékeléséhez (10. ábra).



10. ábra: Dopamin kalibráló egyenese (a: MQ; b: oktanol)

A dopamin kalibráló egyenesének egyenlete:

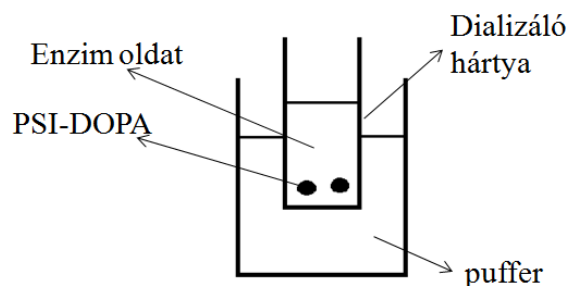
- MQ-ban: $y = 3,0292 \cdot x + 0,0274$
- Oktanolban: $y = 2,4735 \cdot x - 0,0145$

A mérések során 0,1 g módosított polimert mértem be 1 l cm³ ultratiszta vízbe, hogy így biztosítsam az anyagfelesleget az oldatban. 24 óra elteltével 0,2 µm-es szűrőn szűrtem át, majd spektrofotométer segítségével megmértem az oldat abszorbanciáját az előbb említett hullámhosszon. Mérőhenger segítségével meghatároztam a szűrt oldat térfogatát, majd beletöltöttem egy elválasztó tölcserbe. A vizes fázis térfogatának megfelelő mennyiségű oktanolra öntöttem hozzá és jó alaposan összeráztam. 24 órát vártam a mérés előtt, hogy biztosítsam az egyensúly beállását a 2 fázis között. Megmértem a vizes, illetve az oktanolos fázis elnyelését. A spektrofotométeres vizsgálatok után a rázó-tölcserre újra összeráztam. Újabb 24 óra eltelté után ismét megmértem a fázisok abszorbanciáját. Így megkaptam a 24, illetve 48 óra eltelté utáni megoszlást a fázisok között.

4.7. Dopamin felszabadulásának vizsgálata fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometriás technikával (RP-HPLC-MS)

4.7.1. Enzimatikus reakció vizsgálata

A vizsgálatokhoz a 11. ábrán látható elrendezésű rendszert használtam. Bemértem a 1 g PSI-DOPA és az enzimoldatot (18 mg enzim + 6 cm³ foszfát (PBS) puffer) a membránba. A mérésekhez 3,5 kDa-os membránt alkalmaztam, mert a nagy molekulatömegű vegyületeket bent tartja (módosított polimer, enzim), míg a kis molekulatömegű vegyületeket (dopamin) átengedi, így csak a tiszta dopamin, illetve a kisebb polimer fragmensek jutnak át rajta. A külső térben az enzimoldat alapjául szolgáló PBS puffer oldat található (60 cm³). A méréseket 37°C-n (testhőmérséklet modellezése), 0,1M-s pH=7,5 PBS-ben végeztem.



11. ábra: Az enzimes degradációs mérések során használt berendezés modellje

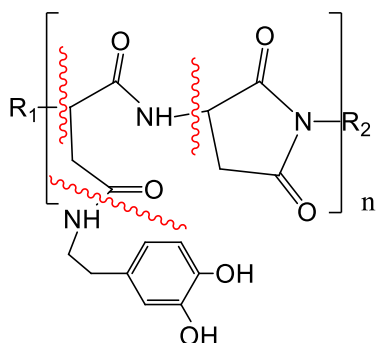
A 0. időpillanatban kezdtem a mintavételt a külső térből és 20 percenként vettem 10 µl mintát. Perisztaltikus pumpa segítségével kevertettem a rendszert, hogy mindenhol homogén legyen a külső tér.

A külső térből vett mintát 3000-szeresére hígítottam (1% ecetsavas) ultratiszta vízzel (MQ).

4.7.2. A mérés során alkalmazott enzimek:

Bromelain enzimcsoport:

A bromelain egy főleg proteázokból álló keverék enzimcsoport, melynek az átlagos molekulatömege 45 kDa.

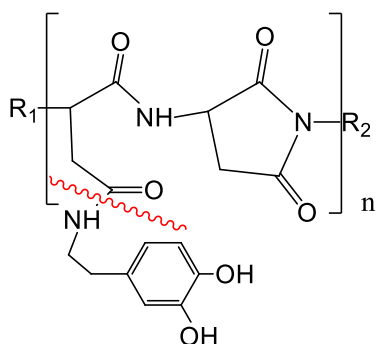


A bromelain proteázai a cisztein proteázok csoportjába tartoznak, azaz szabad szulfhidril-csoport található az enzimek aktív centrumában. Ez az enzimcsoport az Aszparagin-Aszparagin kötést, illetve az Aszparagin-Dopamin kötést is hasíthatja [47,54].

12.ábra: Bromelain hasítási helye

α -Kimotripszin enzim:

Az α -Kimotripszin a szerin proteázok csoportjába tartozik. Kedvezményezetten olyan helyeken bontja a peptid vagy észter kötést, ahol aromás aminosav (fenilalanin (Phe), triptofán (TRP) tirozin (Tyr)) van jelen. Molekulatömege 26 kDa.

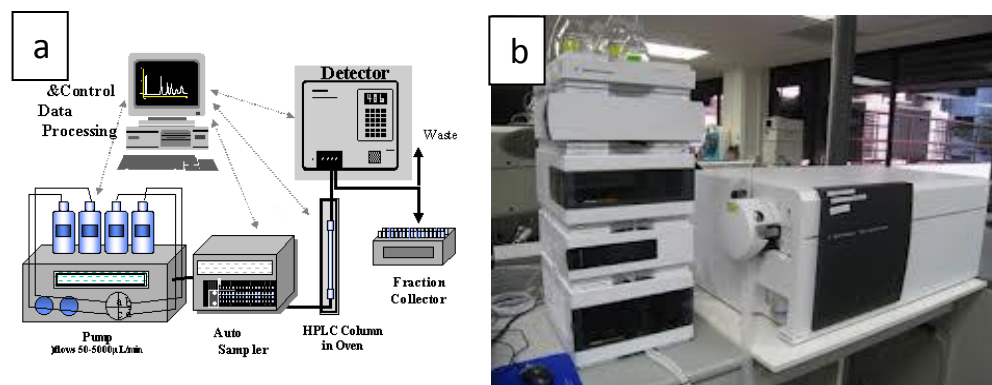


Az α -Kimotripszin bontó hatását főleg a Dopamin-Aszparaginsav kötés mentén fejt ki, mivel a dopaminnak hasonló szerkezete van mint a tirozinnak. [55]

13.ábra: α -Kimotripszin hasítási helye

4.7.3. Kvantitatív analízis RP-HPLC-MS-ben

A mérést Agilent HPLC – QQQ műszeren végeztem.[47,48]



14. ábra: a: HPLC-MS elvi felépítése, b: Agilent HPLC-MSQ műszer

HPLC beállításai:

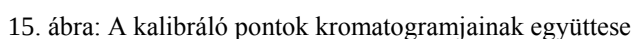
- Ascentis Express (XDB-C₁₈) oszlop, 150mm * 3mm * 2,7µm
- áramlási sebesség: 0,3 ml / perc
- eluens összetétel: (1% ecetsavas) MQ :acetonitril
- Gradiens elúció:
 - 0 → 2 percig 1% acetonitril
 - 2 → 6 percig 90% acetonitril
 - 6 → 10 percig 1% acetonitril
- teljes mérési idő: 18 perc

MS paraméterek:

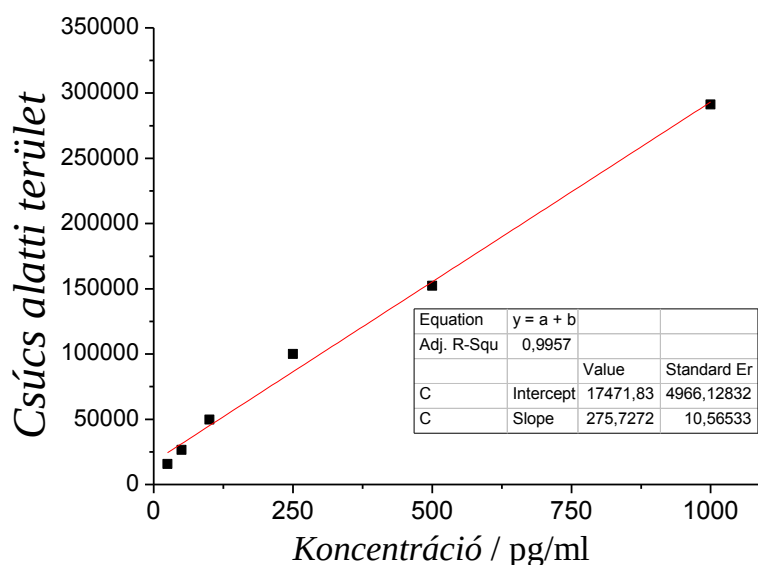
- electrospray ionforrás, pozitív ionizációs mód
- tömegtartomány: m/z 50-500 Da
- scan time: 800 msec
- fragmentor feszültség: 135 V
- ütközési energia (collision energy): 5 eV
- kapilláris feszültség: 1950 V
- ionforrás hőmérséklet 300 °C
- szárítógáz sebessége: 5 l / perc
- nebulizer gáz: 11 l / perc

A minta, miközben keresztülhalad a kolonnán, az álló fázissal való specifikus kémiai vagy fizikai kölcsönhatások, illetve a nagy molekulatömegbeli különbség révén szeparálódnak egymáshoz képest. Az oszlopon lévő visszatartás mértéke a vizsgálandó anyag és az állófázis tulajdonságaitól valamint a mozgó fázis összetételétől függ.

A kalibrációhoz készítettem egy mintasorozatot, ahol a koncentráció tartomány 25 - 1000 pg/ml közötti lineáris tartományt fedte le.



26



16. ábra: Kalibráló egyenes

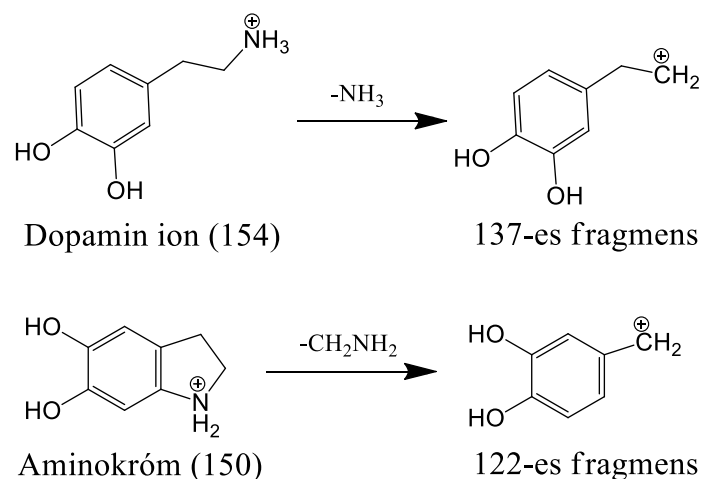
A dopamin kalibráló egyenes egyenlete: $y = 1741,83 * x + 275,73$

A 16. ábrán látható kalibráló egyenes R értéke 0,995 felett van, illetve a csúcsok elúciós ideje is 2% hibahatáron belül vannak ($3,080 \pm 0,062$ perc), így elmondható hogy a kalibrációs egyenes használható a kiértékelésekhez a további méréseknél.

4.8. Dopamin degradációja

A dopamin a RP-HPLC-MS-ben töltött idő alatt is degradálódik a 2.6.1-es pontban leírtak szerint. Emiatt a pontos dopamin koncentrációk meghatározásához meg kellett vizsgálnom a degradációs folyamatokat pH=7 (foszfát puffer) és 9-es (borát puffer) körülményeken. A degradációs méréseket ugyanolyan mérési körülmények között végeztem, mint az enzimes vizsgálatokat.

A mérések során a dopamin, illetve az Aminokróm molekulaionját, illetve a főkomponenseit detektáltam. A dopamin esetében egy ammónia (NH_3) kilépés során keletkező m/z 137-es fragmenst, míg az aminokróm esetében metilamin ($-\text{CH}_2\text{-NH}_2$) hasad ki a molekulából, így m/z 122 Da-nak felel meg. A vegyületeknek a szerkezete a 17. ábrán látható. [56, 57]



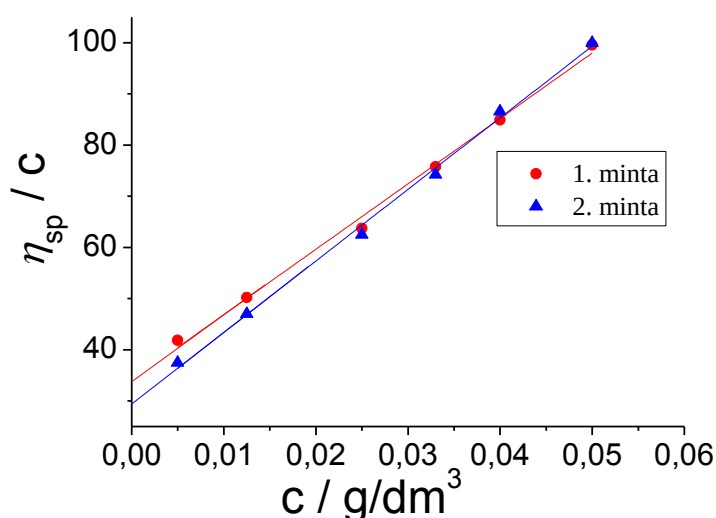
17. ábra: Dopamin és Aminokróm fragmentációja

Semleges közegű foszfát puffer oldatból (pH=7,0) elkészítettem egy 600 pg/ml koncentrációjú oldatot egy mintatartó üvegbe. 20 percenként injektáltam belőle az oszlopra és vizsgáltam az előbb említett m/z jelnél lévő csúcsokat. Lúgos közegű borát pufferben (pH=9,3) megismételtem ezt a vizsgálatot, de itt már 950 pg/ml koncentrációjú oldatot készítettem. A mérések során csak semleges közeghez közeli pH-n (7,5) vizsgáltam a mintát, így a korrigáláshoz azt a mérési eredményeket használtam fel.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Poli(szukcinimid) molekulatömegének meghatározása

A 4.3. fejezetben leírtak alapján, a 18. ábrán látható egyenesek tengelymetszetéből meghatároztam az általam használt két PSI minta átlagos molekulatömegét, amelyeket a 1. táblázatban foglaltam össze:



18. ábra: A PSI minták specifikus viszkozitásának változása a koncentráció függvényében

A 18. ábrán látható grafikonról leolvashatjuk a polimerekhez tartozó határviszkozitás értékeket. Ezt behelyettesítve a Kuhn-Mark-Houwink egyenletbe megkaphatjuk a polimerek átlagos molekulatömegét. Az így kapott eredményeket az 1. táblázatban összegzem.

1. táblázat: A PSI oldatok egyenesének kiértékelése:

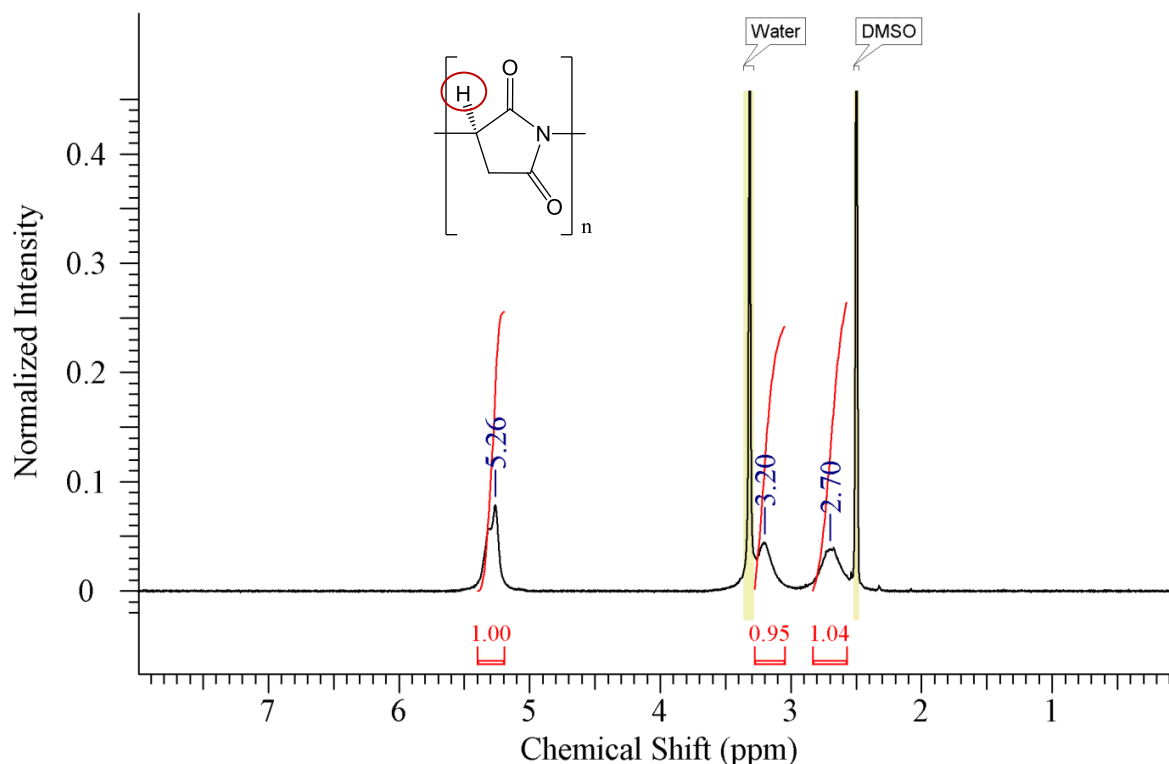
	<i>Határviszkozitás érték / N/m</i>	<i>Átlagos molekulatömeg / kDa</i>
1. minta	34,08 ± 1,33	30,86 ± 1,58
2. minta	29,37 ± 1,21	25,37 ± 1,51

Az eredmények alapján látható, hogy az általam használt poli(szukcinimid) átlagos molekulatömege 25 kDa felett volt.

5.2. NMR mérések eredményei

PSI spektruma:

A PSI pontos szerkezetének igazolása céljából ^1H -NMR felvételt készítettem.

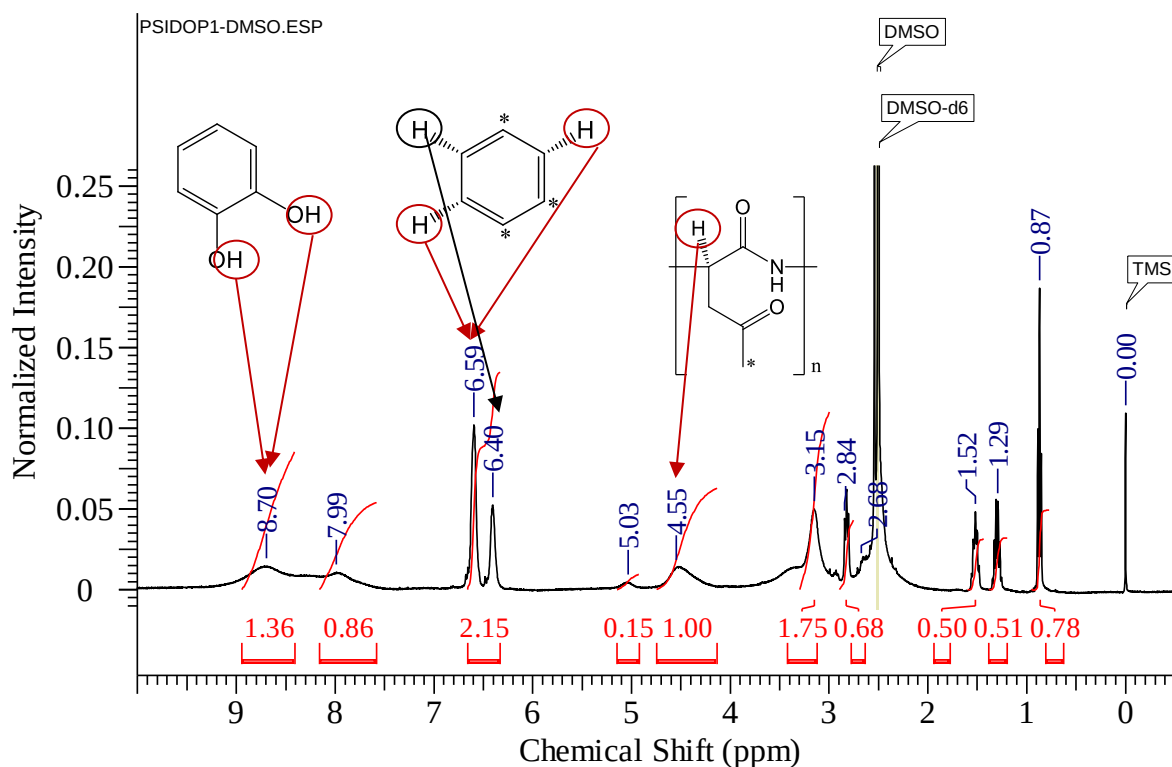


19. ábra: A PSI NMR spektruma

A PSI ^1H -NMR spektrumában 3 csúcsot lehet megfigyelni (19. ábra). A metilén csoporton lévő két proton jele két külön helyen jelenik meg 2,5 ppm-nél és 3,2 ppm-nél, a metin csoportban lévő szén kiralitása miatt. Az 5 ppm-nél jelentkező csúcs a szukcinimid gyűrű monomerek kapcsolódási pontjánál lévő metin csoporton lévő H atom jele. Emellett szennyezőként megjelenik a víz, illetve a deuterált DMSO oldószer is a minta spektrumában. 6ppm-nél nagyobb tartományban nem ad jelet a polimer. Ebből arra lehet következtetni, hogy a polimer nem tartalmaz sem amid, sem karboxil-csoportból származó protont, vagyis nincs benne felnyílt gyűrű. Az NMR spektrum nagymértékben hasonlít a PSI irodalomban megtalálható spektrumára [58].

PSI-DOPA GF=1:

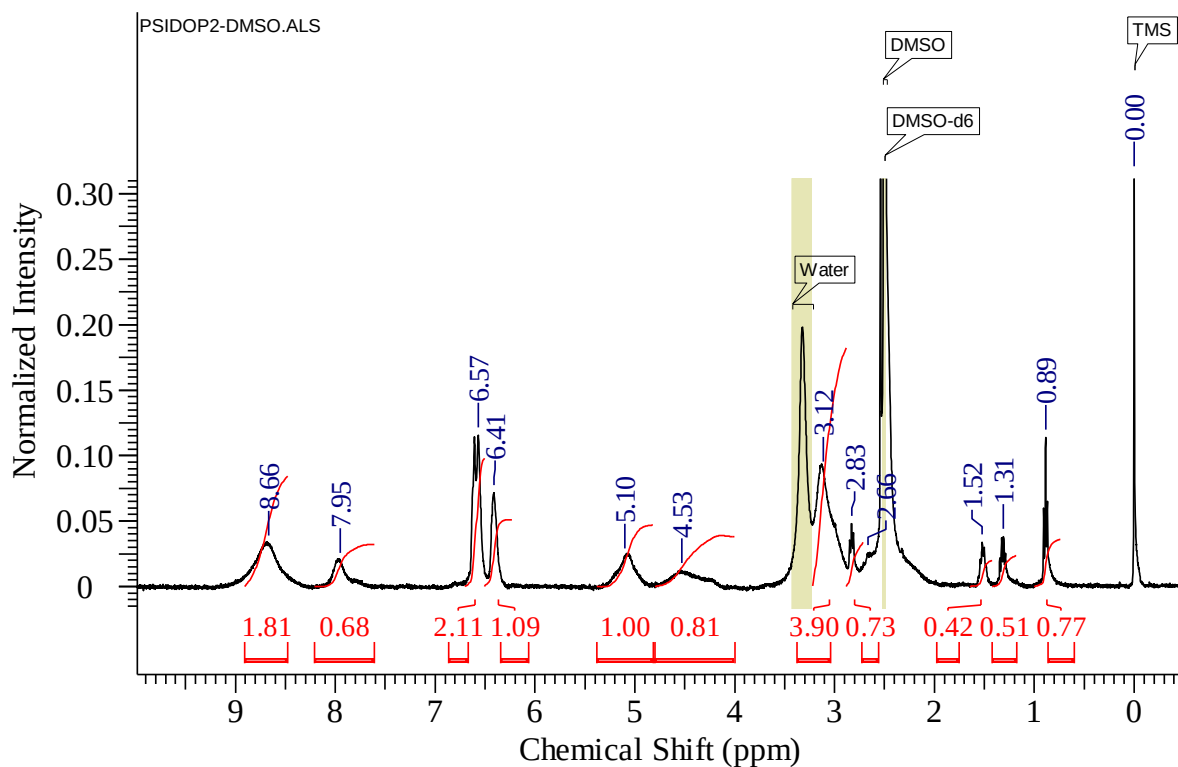
A PSI spektrumához képest megjelennek új csúcsok (20. ábra), amelyek a dopamin karakterisztikus csúcsai. Ezek a csúcsok a dopaminban lévő benzol gyűrű protonjainak (6,4 és 6,6 ppm között), illetve 8 ppm felett látható egy másik csúcs, ami a 2 hidroxil csoporton lévő protonoktól származik. Emellett 4,5 ppm-nél is megjelenik egy új csúcs, ami a felnyílt szukcinimid monomerek kapcsolódási pontjánál lévő metin csoporton lévő H atom jele. Emellett szennyezőként dibutilamin (DBA) jelenik meg a spektrumon. A DBA-hoz tartozó jelek a 0,9; az 1,3, illetve az 1,5 ppm-nél.



20. ábra: A PSI-DOPA GF=1 NMR spektruma

PSI-DOPA GF=2:

A 20. ábrához képest a 21. ábrán a dopamin, illetve a PSI csúcsainak az integrál értékének aránya változott. Mellette észrevehető, hogy a PSI-hez tartozó csúcsok sokkal intenzívebbek lettek, mint a GF=1 esetében.

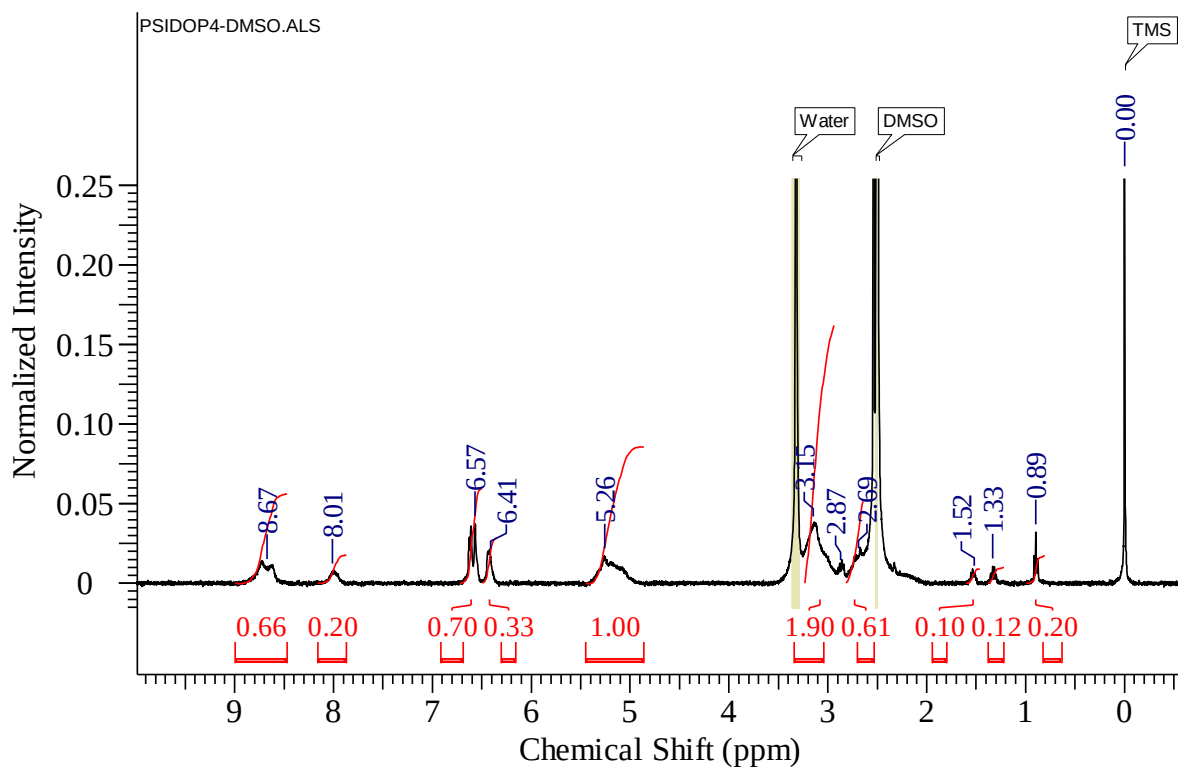


21. ábra: A PSI-DOPA GF=2 NMR spektruma

A DBA itt is megjelenik, de a csúcsainak az intenzitása csökkent.

PSI-DOPA GF=4:

A 22. ábrán is láthatóak a dopamin karakterisztikus csúcsai, de már nem olyan intenzíven, mivel ebben az esetben már csak minden 4. szukcinimid gyűrű van módosítva dopaminnal.



22. ábra: A PSI-DOPA GF=4 NMR spektruma

A következő 2. táblázatban összegeztem a mérések során tapasztaltakat az összes dopaminnal módosított szukcinimid minta esetében. Itt a dopamin mennyiségéhez viszonyítottam (6,4 és 6,6 ppm közötti csúcs) a felnyílatlan szukcinimid gyűrűk mennyiségét (5 ppm).

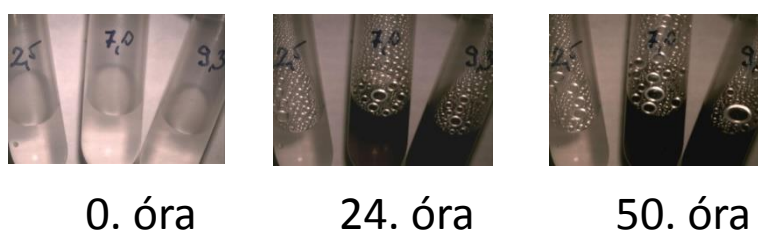
2. táblázat: NMR mérések eredményeinek összefoglalása

	PSI	GF=1	GF=2	GF=4
Dopamin (6,4+6,7 ppm)	0	1	1	1
Felnyílatlan szukcinimid gyűrű (5ppm)	1	0,10	0,94	2,91

A 2. táblázatból jól látható, hogy az elméleti graftolási fokkal közel azonos a tényleges dopamin szukcinimid arány a mintákban. Ebből az következik, hogy az elvart reakciók zajlottak le a szintézis során.

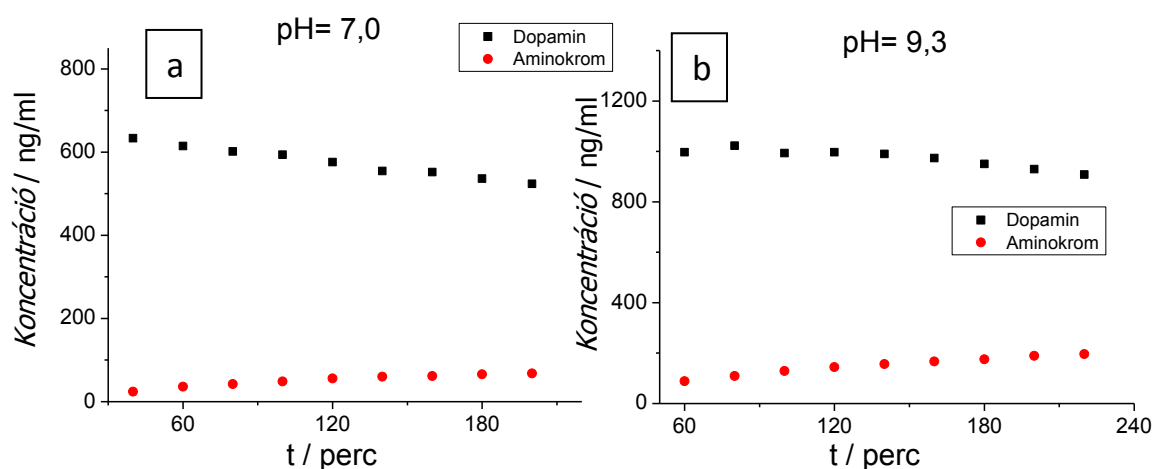
5.3. A dopamin degradációs vizsgálata:

A dopamin egy bomlékony vegyület. Már fény hatására, fiziológiás pH-n ($\text{pH} \geq 7$) megindul a degradációja, ahogy ezt leírtam a 2.6.1-es pontban. A 6. ábrán a dopamint $\text{pH}=7,0$ -ás és $\text{pH}=9,3$ -as közegben tároltam 50 óráig. Az ábrán jól látható, hogy már 24 óra eltelte után fekete csapadék keletkezett a $\text{pH}=7$ és magasabb tartományban, ami a melanin megjelenésére utal.



23. ábra: Dopamin degradációja 0; 24 és 50 óra elteltével

Az RP-HPLC-MS mérés során kapott eredményt, vagyis a dopamin bomlását és az Aminokrom keletkezését az idő függvényében ábrázoltam a 24. ábrán a $\text{pH}=7,0$ és $9,3$ pufferben. Az ábrán jól látható, hogy a dopamin koncentrációja csökken az idő függvényében.



24. ábra: Dopamin bomlása; aminokrom keletkezése az idő függvényében (a: $\text{pH}=7,0$; b: $\text{pH}=9,3$)

A következő 3. táblázatban összegeztem, hogy 3 óra elteltével, mennyi a dopamin, illetve az aminokróm koncentrációja, illetve mekkora a bomlás mértéke.

3. táblázat: 3 óra elteltével a dopamin, aminokróm arány

	C_{dopamin} (ng/ml)	C_{Aminokróm} (ng/ml)	Bomlás mértéke
pH = 7,0	553,2	67,9	12,27 %
pH = 9,3	881,3	196,6	22,31 %

A 3. táblázat adatai alapján látható, hogy a lúgos pH tartományon nagyobb mértékben (22%) bomlik a dopamin, mint a semleges közegben (12%). Ezeket a méréseket felhasználtam a későbbi mérések korrigálásához.

5.4. Fizikai kémiai paraméterek meghatározása

5.4.1. Oldhatósági adatok

Az oldhatósági adatok a következő 4. táblázatban láthatóak:

4. táblázat: 24 óra eltelte után az oldhatósági adatok

	GF=1	GF=2	GF=4
24 óra	1,279 mg/ml	0,087 mg/ml	0,419 mg/ml

A tiszta PSI vízben oldhatatlan polimer, de semleges (illetve lúgos) közegben a szukcinimid elhidrolizál és aszparaginsavvá alakul, amely már egy vízben jól oldódó vegyület. Így azok a módosított polimerek (GF=2 és 4), ahol vannak felnyílatlan szukcinimid gyűrűk, rosszul fognak oldódni. A GF=4-es esetében minden 4. szukcinimid van módosítva dopaminnal, de 24 óra elteltével nagyobb az oldhatósága, mert feltehetőleg több szukcinimid gyűrű hidrolizált el benne, mint GF=2 esetében.

5.4.2. Lipofilitási adatok

A méréseknél a hagyományos rázótolcséres módszert alkalmaztam állandó hőmérsékleten (25°C), amivel a módosított polimerek poláros-apoláris fázisok közötti megoszlását határoztam meg.

A permeabilitás kiszámolásához a következő egyenletet alkalmaztam: $P = \frac{C_{oktanol}}{C_{víz}}$

5. táblázat: 24 és 48 óra eltelte után a lipofilitási adatok

	GF1		GF2		GF4	
	P	lgP	P	lgP	P	lgP
24 óra	0,046	-1,337	0,498	-0,303	0,197	-0,706
48 óra	0,043	-1,369	0,425	-0,372	0,195	-0,710

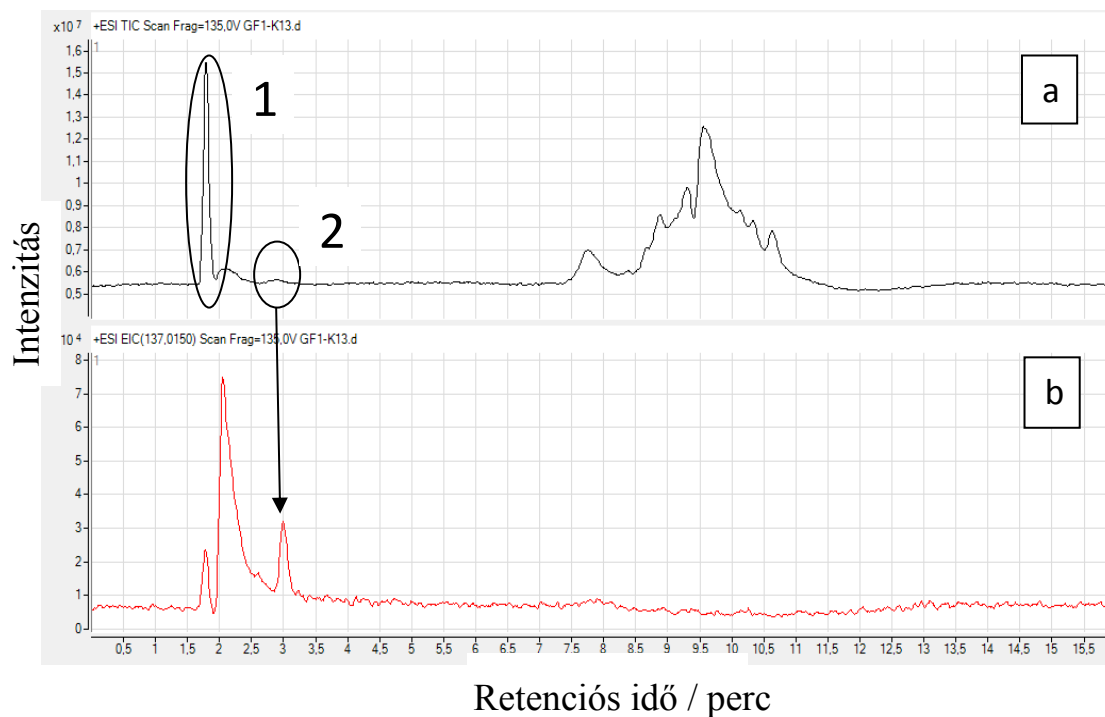
A Víz/Oktanol megoszlási értékek minden minta esetében 1 alatt voltak, amiből az következik, hogy a módosított polimerek a vizes fázisban koncentrálnak jobban. Ezek alapján a vegyületek poláros jellegűek azonban a polimeren található dopamin mennyisége befolyásolja a vegyületek két fázis közötti megoszlását.

5.5. Dopamin felszabadulásának vizsgálata különböző PSI-DOPA konjugátumokról

A mérések során 3 rendszerben vizsgáltam a dopamin felszabadulását. Csak puffert tartalmazó közegben, illetve Bromelain enzimcsoport és α -Kimotripszin enzim jelenlétében.

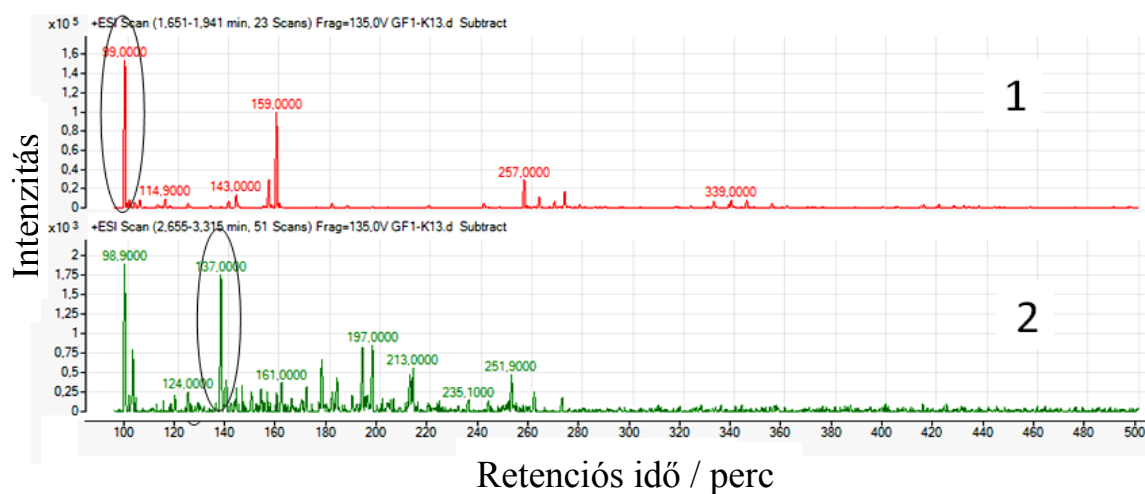
A kiértékelés folyamatát egy példán mutatom be. A 25.a. ábrán a GF=1 Bromelain enzimcsoportos mérésnél vett 13. mintához (4. óra) tartozó mérés teljes ionkromatogramja látható. A 25.b. ábrán a dopaminra jellemző m/z 137csúcs extrahált kromatogramja látható.

Az oszlopról a PSI, illetve a módosított polimer a holtidőben, a dopamin 3 percnél, míg az aminokrom 7 percnél eluálódik az oszlopról.



25. ábra: a: Bromelain enzimszoport jelenlétében a GF=1 minta total ionkromatogramja; b: Az m/z 137 (dopamin fragmens) extrahált ionkromatogramja

Holt időben eluálódó komponensek (1) MS spektruma és a dopamin ($t_R=3$ perc, (2)) MS spektruma a 26. ábrán láthatóak.



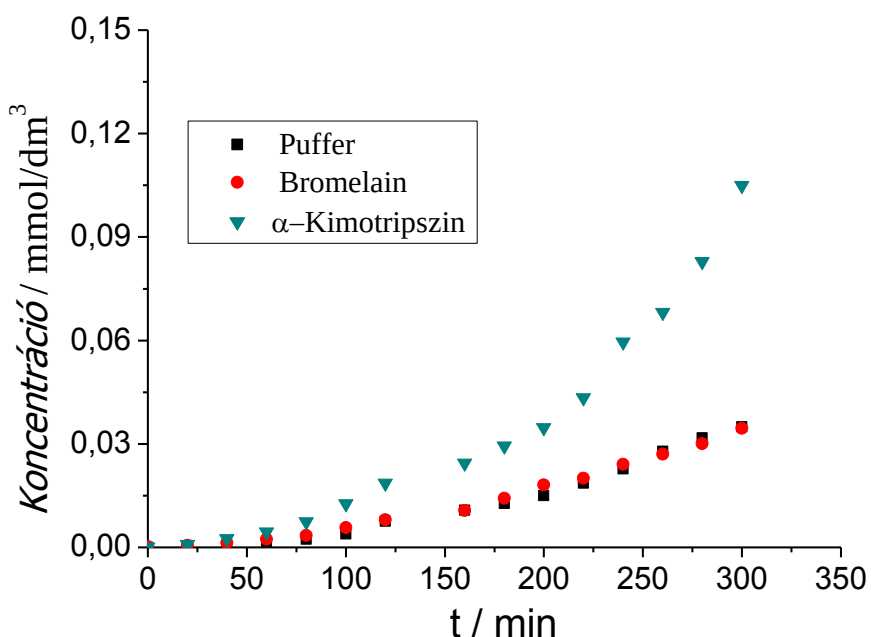
26. ábra: 1: PSI MS spektruma; 2: Dopamin MS spektruma

(1) jelölt csúcs MS spektrumában az m/z 99-hez tartozó jel a legintenzívebb, mely a szukcinimidre jellemző molekula ion jele. A (2) jelölt spektrumban megjelenik az m/z 137-hez

tartozó jel, mely a dopamin fő fragmense. [51,52]. A spektrumok alapján a molekulák jól vizsgálhatóak, mennyiségük meghatározható.

5.5.1. PSI-DOPA GF=1 konjugátum esetén a dopamin felszabadulásának kinetikája

Az enzim működéséhez elengedhetetlen, hogy azonos fázisban legyen a gyógyszer konjugátum az enzimmel. Emiatt ebben az esetben tapasztalhatjuk majd a legnagyobb dopamin felszabadulást, mivel a 3 összetételű konjugátum közül ez oldódott a legjobban vizes közegben.



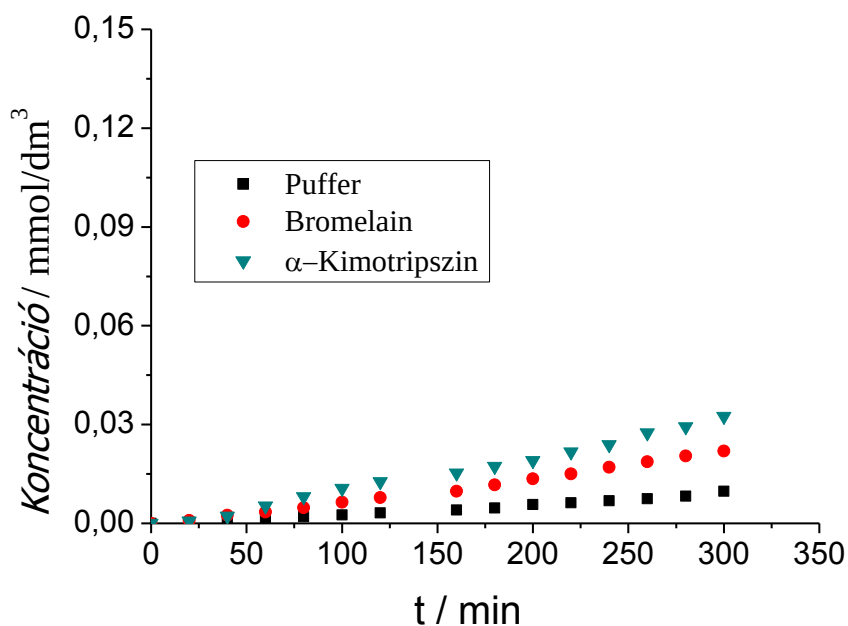
27. ábra: A felszabadult dopamin koncentrációja az idő függvényében

Az 27. ábrán jól látható, hogy az α -Kimotripszin hatására szabadult fel a legnagyobb mennyiségben a dopamin. Bromelain enzimsorozat, illetve csak puffert tartalmazó oldat jelenlétében is tapasztalható felszabadulás. A puffer hatására történő hidrolízis esetén nem a monomerek közötti kötés, hanem a szukcinimid-dopamin közötti kötés hasad fel. A Bromelain enzimsorozat hatása a puffer oldathoz képest nem tér el jelentősen, ebből arra

következtethetünk, hogy ez az enzim nem katalizálja aszparaginsav-dopamin kötés felszakadását ennél az összetételnél. Viszont a 25.b. ábrán látható extrahált kromatogrammon 2. percnél lévő csúcs alapján elmondható, hogy az aszparaginsav-aszparaginsav kötés hidrolízisét katalizálja.

A görbe kezdeti lassú emelkedése azért van, mert a funkcionizált polimer lassan oldódik vizes alapú pufferben, miközben az enzimek csak az oldott polimernél képesek elősegíteni a hasítást. Jelentős eltérés csak 80 perc után tapasztalható az α -Kimotripszines és a puffer oldatos mérés között, de utána ez a különbség exponenciálisan nő. Az α -Kimotripszin előszeretettel a szukcinimid-dopamin közötti kötést hasítja (lásd: 4.7.2. fejezet), így elősegítve csak a szabad dopamin felszabadulást a konjugátumról. Az exponenciális növekedés oka, a polimeren lévő dopamin mennyiségének csökkenésében keresendő. A dopamin leszakadása után aszparaginsav monomer egységek maradnak a polimeren, amely vízben jól oldódik. Így a dopamin leszakadásával a konjugátum egyre jobban oldódik vízben. Mivel ezzel nő a szubsztrát koncentrációja a termékek képződésének sebessége is nő.

5.5.2. PSI-DOPA GF=2 konjugátum esetén a dopamin felszabadulásának kinetikája

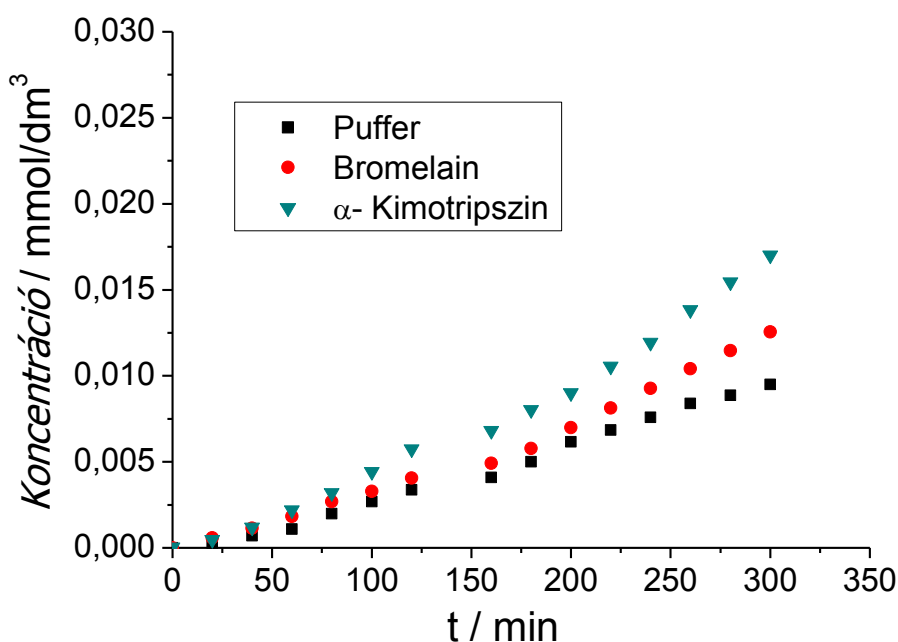


28. ábra: A felszabadult dopamin koncentrációja az idő függvényében

A 28. ábrán látható görbe lefutása eltér a GF=1 estében mutatott eredményekhez képest, de a tendencia hasonló. Ebben az esetben is az α -Kimotripszin esetében van a legintenzívebb dopamin felszabadulás. Puffer hatására itt is szabadul fel dopamin, de nem olyan jelentősen, mint a GF=1 esetében (27. ábra).

Ennek a funkcionizált polimernek a legkisebb az oldhatósága a 3 minta közül, így a mérési idő alatt ebben az esetben oldódott be a legkevesebb polimer. A görbe lassú emelkedése is erre utal. Jól látható, hogy mindkét enzim jelenlétében nagyobb volt a dopamin koncentrációja, mint puffer esetében, vagyis mindkét enzim elősegítette a dopamin felszabadulásának folyamatát.

5.5.3. PSI-DOPA GF=4 konjugátum esetén a dopamin felszabadulásának kinetikája



29. ábra: A felszabadult dopamin koncentrációja az idő függvényében

Az oldhatósága ennek a konjugátumnak jobb, mint a GF=2-nek, de sokkal kevesebb dopamint tartalmaz, így a felszabadult dopamin koncentrációk tekintetében az oldhatóságból származó előnye elveszett a GF=2-vel szemben. Az eredményekből látható, hogy a konjugátum dopamin tartalma befolyásolja a leginkább a felszabadult dopamin mennyiségét,

az oldhatósága csak másodlagos. Azonban megfigyelhető, hogy a polimer graftolási foka nem befolyásolja jelentős mértékben a leszakadás kinetikáját.

5.5.4. Mérések összefoglalása

A mérések során kapott eredmények korrigált értékeit a 6. táblázatban foglalom össze.

6. táblázat: 5 óra eltelte után a koncentrációk

	GF=1	GF=2	GF=4
Csak puffer	0,035 mmol/dm ³	0,010 mmol/dm ³	0,010 mmol/dm ³
Bromelain	0,035 mmol/dm ³	0,022 mmol/dm ³	0,013 mmol/dm ³
α -Kimotripszin	0,105 mmol/dm ³	0,032 mmol/dm ³	0,017 mmol/dm ³

Puffer hatására mindhárom esetben szabadul fel dopamin a konjugátumról, de ez a GF=1-s polimer kivételével minden esetben kevesebb, mint az enzimek jelenlétében. α -Kimotripszin jelenlétében voltak a legmagasabbak a végső dopamin koncentrációk minden esetben, ami azt bizonyítja, hogy ennek az enzimnek a jelenlétében főleg a polimer-dopamin kötés szakadt fel. Bromelain enzimcsoport esetében, amikor nem minden monomer volt funkcionálizálva, szintén eltérést láthatunk a pufferhez képest, ami annak lehet a következménye, hogy ebben az esetben a bromelain a polimerben található amid kötések is bontja.

Látható, hogy ez a gyógyszerkonjugátum alkalmas lehet egy elnyújtott, folyamatos dopamin leadásra a szervezetben, mivel a dopamin bomlásának ellenére is folyamatosan mérhető a dopamin koncentrációjának növekedése. Emellett összetételtől függően lehet szabályozni a felszabaduló dopamin koncentrációját.

6. Összefoglalás

Munkám során sikeresen állítottam elő L-aszapragsav sav katalizált termikus polikondenzációjával poli(szukcinimid)et (PSI). Az így előállított polimerek molekulatömegét viszkoziméter segítségével mértem meg és meghatároztam, hogy az általam előállított polimer átlagos molekulatömege 25 kDa-nál nagyobb. Az így előállított polimert különböző összetételben sikerült módosítani dopaminnal (PSI-DOPA GF=1; 2 és 4).

A tiszta, illetve a módosított polimert ^1H -NMR-rel vizsgáltam és megállapítottam, hogy az elvárt reakciók zajlottak le a kísérletek során, illetve igazoltam, hogy a polimerhez kötött dopamin valós és a sztöchiometria alapján számított mennyisége hibahatáron belül megegyezik.

Az így kapott módosított polimerek oldhatósági és lipofilitási értékeit meghatároztam klasszikus elválasztó tölcéses módszerrel. Az eredmények alapján megállapítható, hogy 24 és 48 óra elteltével is a vizes fázisban koncentrálnak jobban a módosított polimerek, mint az oktanolos fázisban. A GF=1 esetében volt a legnegatívabb logP érték (-1,3), így itt volt a legkevesebb oktanolban oldott konjugátum. Ez azért van, mert a konjugátum magas dopamin tartalma sokkal polárosabbá teszi azt. A legnagyobb logP értéket GF=2-nél tapasztaltam (-0,3). A mérések eredményei alapján jól látható, hogy ezek a vegyületek poláros tulajdonságokkal rendelkeznek.

Sikeresen optimalizáltam egy mérési eljárást az RP-HPLC-MS készüléken a dopamin alapú mérések vizsgálataihoz. Megállapítottam, hogy semleges és lúgos közegben 3 óra elteltével a dopamin egy jelentős része elbomlik (12-22%), illetve a közeg pH értékének növekedésével nő a degradáció mértéke.

Csak pufferes közeg, Bromelain enzimcsoport és α -Kimotripszin enzim jelenlétében vizsgáltam a dopamin felszabadulásának kinetikáját a gyógyszerkonjugátumról. Megállapítottam, hogy a graftolási fok csökkentésével növelhető az időegység alatt felszabaduló dopamin mennyisége proteáz enzimek jelenlétében. Emellett α -Kimotripszin enzim jelenlétében, mely specifikusan a dopamin-szukcinimid kötés mentén hasít, szabadult fel a legnagyobb dopamin mennyiség a konjugátumról.

Összefoglalva a munkámat, sikerült előállítanom egy olyan poli(aminosav) alapú gyógyszerkonjugátumot, amely képes elnyújtott, folyamatos dopamin leadásra, így biztosítható lehet egy állandó dopamin koncentráció a szervezetben.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Zrínyi Miklós Professzor Úrnak, hogy érdeklődésemet felkeltette a téma iránt, valamint hogy szakmai segítséget nyújtott munkám során.

Szeretném megköszönni a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet Nanokémiai kutatócsoport tagjainak a kutatómunkám során nyújtott segítségért, amely nélkül ez a dolgozat nem születethetett volna meg. Különösképp Juriga Dávidnak, hogy konzulensemként irányította munkámat.

Dr. Ludányi Krisztinának a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézet, Bioanalitikai Laboratórium vezetőjének, aki a HPLC-s mérések során segítette a munkámat tapasztalataival és hasznos tanácsaival.

8. Hivatkozások

- [1] : Tanaka T., Hocker L.O., Benedek B., *J. Chem. Phys.*, 1973, 59, 5151-5159
- [2] : Tanaka T., Fillmore D. J., *J. Chem. Phys.*, 1979, 70, 1214-1218
- [3] : Jedlovsky-Hajdú A., Varga Zs., Juriga D., Molnár K., Zrínyi M.: Biokompatibilis anyagok: Mesterséges mátrixok és nanorészecskék, *Magyar Tudomány*, 2012. 6, 39.
- [4] : Ham D., Prosaposin precursor protein: functions and medical applications, *Scripta Medica*, 2004.77, 127.
- [5] : Heckmann-Pohl DM. Et. Al., Improvement of the fungal enzyme pyranose 2-oxidase using protein engineering, *J. Biotechnology*, 2006. 124, 26.
- [6] : Juriga Dávid, Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) alapú gélek mechanikai, duzzadási és degradációs tulajdonságainak vizsgálata, MSc diplomamunka, 2013
- [7] : Zrínyi Miklós, *Magyar Tudomány* 1999.6.
- [8] : Zrínyi Miklós: A 21. század anyagai: az intelligens anyagok, Mindentudás egyeteme – 16. előadás – 2003. január 20.
- [9] : Somsák László, A szénhidrátkód, *Magyar Tudomány*, 2009.
- [10] : Hudecz Ferenc: Polimer terapeutikumok. *Magyar Tudomány*, 1998.
- [11] : Gyenes Tamás, Aminosav alapú gélek szintézise és duzzadási tulajdonságaik vizsgálata, PhD értekezés, 2007
- [12] : Dr. Máthé Csabáné, Gyógyszeradagoló rendszerek polimer alapú textilszövetekkel, Műanyag ipari szemle, 2014
- [13] : Dr. Fenyvesi Zsófia, Módosított hatóanyag-leadású diklofenák-nátrium tartalmú gyógyszerkészítmények fermulálása és vizsgálata, Doktori értekezés, 2010
- [14] : Kiss Éva, Gyógyszerhordozó nanorészecskék, *Fizikai Szemle* 413-417, 2011/12
- [15] : Mathiowitz E, Kretz MR, Brannon-Peppas L. Microencapsulation. In: Mathiowitz E (szerk.), *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. Volume 2. John Wiley and Sons Inc, New York, 1999: 493-546.
- [16] : Rácz I, Selmeczi B. A molekuláris és mikrokapszulázás művelete. In: Vincze J. (szerk.), *Gyógyszer-technológia 2 Művelettan-eljárás*. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2001: 120-127.
- [17] : Dobrádi Anita, Gyógyszerhordozó nanorészecskék előállítása és vizsgálata, TDK dolgozat, 2012
- [18] : S. W. Shalaby, Biomedical polymers: Designed-to-degrade systems, *Hanser Publisher*, New York, 1994.
- [19] : Balázs L., A kémia története I. *Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest*, 1996.
- [20] : G. Pitaressi Et. Al.: Crosslinked hyaluronan with a protein-like polymer: Novel bioresorbable films for biomedical applications, *J. Biomed. Mat. Res. Part A*, 2007. 84A, 2, 413.
- [21] : Schaal E., Über einige aus Asparaginsäure entstehende Producte. *Ann. Chem.*, 1871, 157, 24.
- [22] : Schiff H., Über Polyaspartsauren. *Ber. dtsch. Chem.*, 1897. 30, 2449-2459
- [23] : Frankel, M., Berger, A.: Synthesis of Polyaspartic Acid. *J. Org. Chem.* 1951. 16, 1513.

- [24] : Kovács J., Könyves I., Pusztai A.: Darstellung von Polyasparaginsäuren (Polyaspartsäuren) aus dem thermischen Autokondensationsprodukt der Asparaginsäure. *Experientia*, 1953, 12, 459
- [25] : Fox S.W., Harada K.: The thermal copolymerization of amino acids common to protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 3745.
- [26] : Fox S.W., Harada K.: Thermal polymerization of amino acid mixtures containing aspartic acid or a thermal precursor of aspartic acid. *US Patent 3,052,655*; 1962.
- [27] : Harada K.: Polycondensation of Thermal Precursors of Aspartic Acid. *J. Org. Chem.*, 1959, 24, 1662.
- [28] : Nakato T., Kusuno A., Kakuchi T.: Synthesis of Poly(succinimide) by Bulk Polycondensation of L-Aspartic with an Acid Catalyst. *Journal of polymer science: Part A: Polymer chemistry*, 2000, 38, 117.
- [29] : Zhu J.X., Doyle H.A., Mamula M.J., Aswad D.W.: Proteomic analysis of endogenous substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in mouse brain. *J. Biol. Chem.*, 2006, 44, 33802.
- [30] : Neri P., Antoni G., Benvenuti F., Colola F., Gazzei G.: Synthesis of alpha beta-poly((2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide), a new plasma expander. *J Med Chem.* 1973, 16, 893
- [31] : Tachibana Y., Kurisawa M., Uyama H., Kakuchi T., Kobayashi S.: Biodegradable thermoresponsive poly(amino acid)s. *Chem. Commun.*, 2003, 106.
- [32] : Tachibana Y., Kurisawa M., Uyama H., Kakuchi T., Kobayashi S.: Thermoresponsive Hydrogels Based on Biodegradable Poly(amino acid)s. *Chem. Lett.*, 2003, 32, 374
- [33] : Patricia Munoz, Et. al., Dopamine Oxidation and Autophagy, Parkinson's Disease, 2012, Article ID: 920953.
- [34] : Irmgard Paris, Et. Al., Amnochrome as a Preclinical Experimental Model to Study Degradation of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease, *Neurotoxicity Research*, 2007, VOL. 12(2). pp. 125-134
- [35] : David Gustav, Rathe Anderson: Oxidation and reactivity of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, a reactive intermediate of dopamine metabolism, Thesis and Dissertations, University of Iowa, 2011
- [36] : Dr. Csuth Ágnes, A Parkinson-kór - Tünetek és kezelés, *WEBBeteg* cikk, 2014
- [37] : E. H. Norris, B. I. Giasson, R. Hodara et al., "Reversible inhibition of α -synuclein fibrillization by dopaminochrome mediated conformational alterations," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 22, pp. 21212–21219, 2005.
- [38] : K. A. Conway, J. C. Rochet, R. M. Bieganski, and P. T. Lansbury Jr., "Kinetic stabilization of the α -synuclein protofibril by a dopamine- α -synuclein adduct," *Science*, vol. 294, no. 5545, pp. 1346–1349, 2001.
- [39] : Dobrai Erzsébet, A boldogság hormonjai - 2. rész: dopamin, *Pánikbetegségek* cikk, 2014
- [40] : Victor E. Shashoua, Appetite suppression with dopamine-fatty acid conjugates, Szabadalom, 1990
- [41] : Juan Zhang and Et Al., Synthesis of poly(ethylene glycol)-dopamine conjugates and their controlled drug-release behaviors, *Journal of Applied Polymer*, 2011

- [42] : Görög Sándor, Az analitikai kémia szerepe a 21. század gyógyszerészetében, Acta Pharmaceutica Hungarica, 2001
- [43] : Jankovics Péter, Korszerű elválasztástechnikák alkalmazása a hatósági gyógyszerellenőrző laboratóriumban felmerülő gyakorlati problémák megoldására, Doktori értekezés, 2011
- [44] : Németh Tamás, Elválasztástechnikai módszerek alkalmazásának gyakorlati kérdései gyógyszeranyagok és -készítmények minőségellenőrzésében, Doktori értekezés, 2010
- [45] : Takácsné Inóvács Krisztina, Völgyi Gergely; A fizikai-kémiai jellemzés helye és módszerei a gyógyszerkutatásban, Magyar Kémiai Folyóirat, 2005
- [46] : J. Vlasák et. al, Properties and reactivity of polysuccinimide, *J. of Pol. Sci.:Polymer Symp.*, 1979. 66, 59.
- [47] : Kiss Gergely, Az emésztést elősegítő mátrix, 2011
- [48] : Dr. Halmos Gábor, Fejezetek a modern biofarmáciából, Budapest 2011
- [49] : M. J. Neal, Rövid farmakológia, B+V Kiadó, 2000
- [50] : Baka Edit, Gyógyszerek oldhatóságának meghatározására alkalmas módszerek vizsgálata és fejlesztése, Doktori értekezés, 2010
- [51] : Dévay A., Antal I. A gyógyszeres terápia biofarmáciai alapjai. Budapest, Medicina Kiadó, 2009.
- [52] : Völgyi Gergely, Módszerek fejlesztése vízben rosszul oldódó vegyületek fizikai-kémiai paramétereinek (pKa, logP) meghatározására a gyógyszerkutatás korai fázisában, Doktori tézisek, 2007
- [53] : Huszár Mónika, Az optimális lipo- és foszfolipofilítási tartomány meghatározása különböző potenciális antitumor és NOX inhibitor sajátsággal bíró molkeulacsálád esetén, Doktori értekezés, 2010
- [54] : Gregory S. Kelly ND, Bromelain: A Literature Review and Discussion of its Therapeutic Applications, *Alternative Medicine Review*, 1996, 1(4):243-257
- [55] : Novák Lajos, Nyitrai József, Hauai László; Biomolekulák kémiája, Magyar kémikusok egyesülete, 2000
- [56] : Kevin Y. Zhu, Qiang Fu, K. Wing Leung, Zack C.F. Wong, Roy C.Y. Choi, Karl W.K. Tsim: The establishment of a sensitive method in determining different neurotransmitters simultaneously in rat brains by using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chrom.B*, 2011, 879, p737-742
- [57] : Carrera V, Sabater E, Vilanova E, Sogorb MA: A simple and rapid HPLC–MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: Application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007, 847(2), p88-94, Epub 2006
- [58] : Matsubara K. Et. Al.: ^1H and ^{13}C NMR characterization of poly(succinimide) prepared by thermal polycondensation of L-aspartic acid, *Macromolecules*, 1997, 30, 2305.