

## ZÁRÓJELENTÉS

Az OTKA által támogatott, **PD76401** azonosító számú **"Poliaminosav gél alapú hatóanyag-leadó rendszerek fejlesztése"** című kutatás szakmai záróbeszámolója

Napjaink gyógyszer-technológiai kutatásainak célkeresztjében állnak a szabályozott hatóanyag-leadó rendszerek. Ezek a készítmények képesek a hatóanyagot a szervezetben a kívánt helyen, időben, valamint tervezett kioldódási kinetikával leadni. A hatóanyag felszabadulását a szervezetben megtalálható környezeti paraméterek (pl.: pH, hőmérséklet, redox potenciál, illetve enzimkoncentráció) megváltozása indukálja. Ezen rendszerek segítségével növelhető a hatóanyagok biohasznosulása és csökkenthetők a káros mellékhatások.

A multireszponzív – azaz többféle külső környezeti hatásra érzékeny – polimerek és polimer gélek szerepe felértékelődött a fejlesztésekben. Elsősorban a környezet hőmérsékletére és/vagy pH-jára jelentős térfogatváltozással válaszoló polimer gélek fejlesztése került előtérbe, de a többi környezeti paraméterre való érzékenység kiaknázásában is jelentős a potenciál. A rezszponzív tulajdonságok mellett elengedhetetlen, hogy a polimer gélek biokompatibilisek és biológiailag lebonthatók legyenek. Ezen követelmények miatt tűnik ígéretesnek az aminosavakból felépülő polimer gélek szintézise és alkalmazása.

### 1. A környezet redox potenciáljára érzékeny polimer gélek

Kutatócsoportunk az előállított gélek alappolimeréül a poliszukcinimidet (PSI) választotta, mely az aszparaginsav, egy fehérjeépítő aminosav, termikus polikondenzációjával állítottunk elő. A kutatómunka ezen részfeladata során olyan géleket tanulmányoztunk, amelyek a bennük kialakított diszulfid hidak révén érzékenyek bizonyultak redukáló-/ oxidálószeres jelenlétére, ezáltal a környezet redox potenciáljával szabályozható a lebontásuk, térfogatuk. A PSI nukleofil módosításával és térhálósításával, majd ezt követő hidrolízisével kémiai keresztkötött poliaszparaginsav (PASP) géleket kaptunk. A gélek pH-érzékenységét a PASP alapváz biztosította. Két különböző rendszert vizsgáltunk: cisztaminnal térhálósított poliaszparaginsav gél (PASP-SS), valamint cisztaminnal és diamino-butánnal keresztkötött gél (PASP-SS-DAB). Gyakorlati szempontból a redox reakció reverzibilitásának megvalósítása volt kitűzött feladataink legfontosabbika.

#### 1.1. *Reverzibilis szol-gél átmenet*

A kutatómunka során módszert dolgoztunk ki cisztaminnal keresztkötött PASP alapú gélek szintézisére. A PSI ciszteaminnal történő módosításával tiol oldallánccal módosított poliszukcinimidet (PSI-SH) állítottunk elő, melynek hidrolízisével tiol módosítású poliaszparaginsavat (PASP-SH) kaptunk. Mindkét polimer diszulfidhidak létrehozásán keresztül térhálósítható a levegő oxigénjének, illetve egyéb kémiai oxidálószeres hatására. A térhálós polimerek jó oldószerükben duzzadtak, így szerves közegű PSI valamint vizes közegű PASP géleket tudtunk előállítani, melyek redukálószer hozzáadásakor feloldódtak. A kapott polimeroldatok oxidálószer alkalmazásával újra gélesíthetőek. A kétféle polimer közül a későbbi biológiai alkalmazásokat szem előtt tartva a poliaszparaginsav alapút vizsgálatuk részletesen.

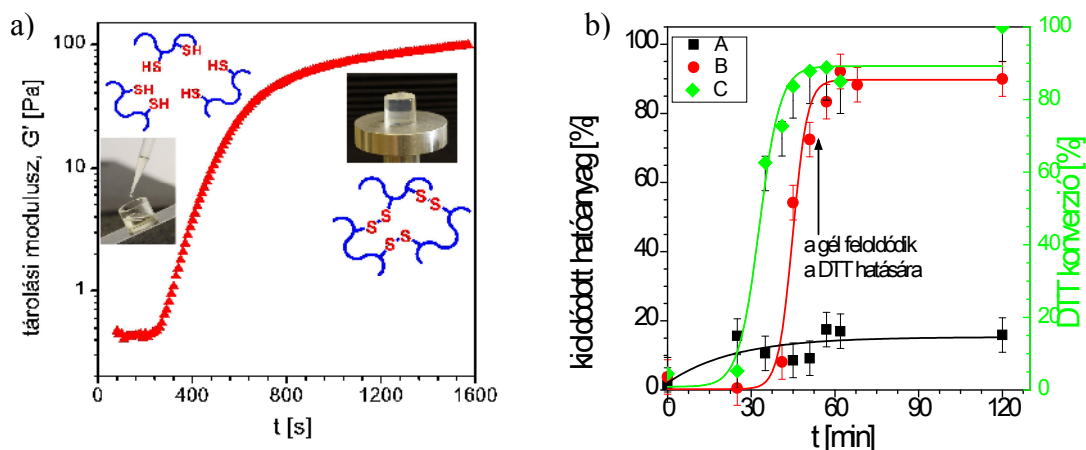
A redukált állapotban lévő, tiol csoportokat tartalmazó poliaszparaginsavat (PASP-SH) széleskörűen jellemeztük független analitikai módszerekkel. Ellman-módszerrel történő analízissel és NMR vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az oxidációra érzékeny tiol

csoportok aránya szabályozható a preparáció során alkalmazott polimer koncentrációval valamint a módosító molekulák és a PSI arányával. Az Ellman tioltartalom meghatározási módszert kiterjesztettük polimer gélek tiol tartalmának meghatározására is.

Raman spektroszkópia segítségével igazoltuk, hogy a redukált állapotban jelenlévő tiol csoportok oxidáció hatására diszulfidhidakká alakulnak, így alakítva ki a kémiai térhálót. A mérési paraméterek optimalizálásával sikerült a tiol csoportokra szelektív Raman csúcsot mennyiségi analízisre használni. Az így kapott polimer összetétel jó korrelációban volt a klasszikus analitikai módszerekkel mért eredményekkel, azokat független kalibrációként felhasználva az általunk kifejlesztett módszer lehetővé teszi, hogy mintaelőkészítés nélkül és nem invazív módon Raman spektroszkópiával határozzuk meg az oldalláncok mennyiségét. Egyúttal a módszer alkalmas a tiol-diszulfid átalakulás követésére és mennyiségi jellemzésére is.

Az előállított redox érzékeny rendszerek várhatóan injektálható polimer oldatokként alkalmazhatók. A gélesedés folyamatát reológiai mérésekkel követtük (1.a ábra), és megállapítottuk, hogy a gélesedési időt az oldat polimer koncentrációja és az oxidálószer mennyisége határozza meg. A reológiai és Raman spektroszkópiás mérések igazolták a folyamat reverzibilitását.

Az oxidált állapotban lévő, diszulfidhidas polimer géleket duzzadásfok és pásztázó elektronmikroszkópiás mérésekkel jellemeztük. Megállapítottuk, hogy a duzzadásfok a poliaszparaginsav pKa értékeinek környezetében nagymértékű növekedést mutat, illetve a térháló erősen lúgos közegben feloldódik. A gélek pórusszerkezete szintén pH-függést mutatott, és a savas közegben megfigyelt kompakt szerkezet a pH növekedésével erősen pórusossá alakul, mely előnyösen alkalmazható pH-érzékeny, gasztrointesztinális készítmény fejlesztésére.



**1. ábra:** a) Oxidáció hatására a folyékony polimer oldat (PASP-SH) alaktartó géllé alakul (PASP-SS); b) redukálószer (DTT) hatására oldódik ki a modell hatóanyag a PASP-SS gélből, eközben a gél feloldódik, A: a hatóanyag csak kismértékben oldódik ki DTT nélkül; B: a hatóanyag ugrásszerű kioldódása DTT hatására, C: a DTT konverziója az idő függvényében

A tioltartalmú poliaszparaginsav alkalmasnak bizonyult 0,5-1,0 mm rétegvastagságú polimerfilmek öntésére, melyekből mechanikailag stabil géllapok alakíthatóak ki oxidáció hatására. Az oxidáció során in situ hatóanyag-bevitel valósítható meg. Az in vitro hatóanyag-kioldódási kísérletek alapján az előállított polimer gélek a környezet redoxpotenciáljára érzékeny, célzott hatóanyag-leadást tesznek lehetővé (1.b ábra). Az eredmények alapján – a tervezett polimer a tiolcsoportok miatt várható adhezív sajátságokat figyelembe véve – a polimer a szervezetben kialakuló redox hatások által szabályozott hatóanyag-leadó implantátumok alapját képezheti.

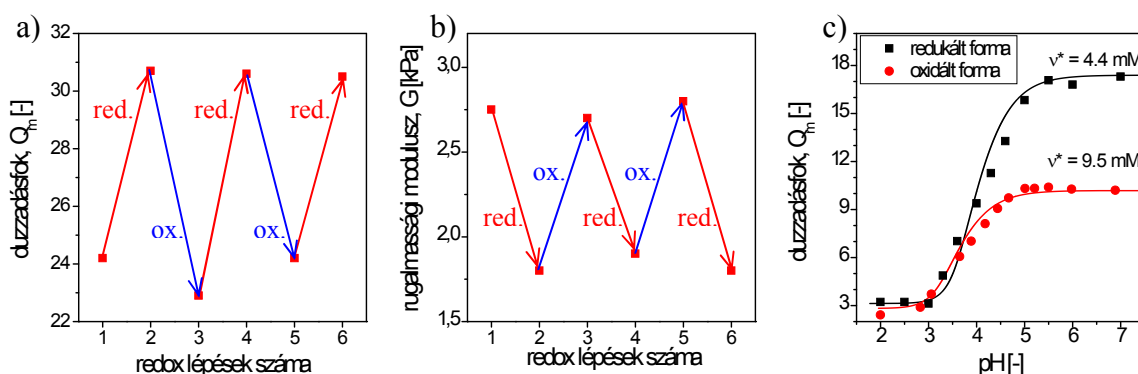
(Gyarmati B, Vajna B, Némethy Á, László K, Szilágyi A: *Redox- and ph-responsive cysteamine-modified poly(aspartic acid) showing a reversible sol–gel transition*, *Macromol Biosci* 13: (5), pp. 633-640, 2013

Gyarmati B, Némethy Á, Szilágyi A: *Reversible disulphide formation in polymer networks: a versatile functional group from synthesis to applications*, *Eur Polym J* 49: (6), pp. 1268-1286, 2013)

### 1.2. A környezet redox potenciáljának változására reverzibilis duzzadásfok változással reagáló gél

A redox érzékeny keresztkötő molekula mellett a redukálószereknek ellenálló keresztkötő molekulákat (diamino-bután, DAB) is tartalmazó PASP-SS-DAB géleket is szintetizáltunk. Az inert keresztkötőt is tartalmazó gélek esetén a redox érzékenységet a gélek duzzadásfokának és mechanikai tulajdonságaiknak változásával jellemeztük. A géleket redukáló, majd oxidáló közegbe helyeztük. A duzzadásfok nagymértékben növekedett redukált állapotban, míg eredeti állapotára csökkent oxidáció hatására, amely bizonyította a tiol-diszulfid átalakulást (2.a ábra); a folyamat szignifikánsnak és megfordíthatónak bizonyult. A rugalmassági modulusz mérésével a redox reakció szintén követhető volt (2.b ábra).

Továbbfejlesztettük a tanszéken kidolgozott elméleti leírást a polielektrolit gélek duzzadására. A Brannon-Peppas – Peppas által megadott modellt kiterjesztettük gyakorlatilag a teljes pH skálára és nagy ionerősségekre is. Az elmélet segítségével meghatároztuk PASP-SS-DAB gélek jellemző termodinamikai paramétereinek értékét mind a redukció előtt, mind utána (2.c ábra). Az Ellman tioltartalom meghatározási és Raman mikroszkópiás módszerrel igazoltuk, hogy a cisztaminnal és diamino-butánnal keresztkötött gélek reverzibilis duzzadása tiol-diszulfid cserereakción alapszik.



**2. ábra:** A PASP-SS-DAB gél a) redukció hatására duzzad, oxidáció hatására szinerizál (összehúzódik); b) rugalmassági modulusza redukció hatására csökken, oxidáció hatására nő. A folyamat megfordítható. c) A gélek duzzadásfoka pH érzékeny és jelentősen függ a gél redox állapotától

A gélben oldott anyagok transzportja reverzibilisen változik redukáló-/ oxidálószer hatására. In vitro hatóanyag-leadási kísérleteket igazoltuk, hogy redukáló közegben a redox hatásra nem érzékeny hatóanyag kioldódási sebessége jelentősen felgyorsult az oxidált állapothoz képest. A permanens keresztkötőt is tartalmazó diszulfidhidas gél tehát alkalmas jelölt redox hatással szabályozott, glutation-mediált célzott hatóanyag-hordozó készítményeket fejlesztésére.

(Gyarmati B, Némethy Á, Szilágyi A: *Redox sensitive poly(aspartic acid) based hydrogels with a reversible swelling-shrinking response*, készülő kézirat;

Gyarmati B, Némethy A, Vajna B, Szilágyi A: *Redox-responsive poly(amino acid) hydrogels*, 9<sup>th</sup> International Gel Symposium – Gelsympo 2012, Tsukuba, Japan, 2012)

### 1.3. Poliaszparaginsav alapú gélek valódi térhálósítási fokának meghatározása

A térhálós polimer gél legfontosabb jellemzőit, így a duzzadási tulajdonságait és rugalmasságát alapvetően meghatározza a szintézis során létrejövő kémiai kötések száma,

így ennek ismerete elengedhetetlen. A leggyakrabban alkalmazott modellek nem teremtenek lehetőséget a fizikai és kémiai kölcsönhatások megkülönböztetésére, és a belőlük számított eredmények a modellparaméterek bizonytalansága miatt csak becslésre alkalmasak.

Kutatómunkánk során diaminokkal utólagosan térhálósított poliaszparaginsav hidrogélek kémiai térhálópon-t-sűrűségének meghatározására dolgoztunk ki módszert. Meghatároztuk a gélesedés alatt a polimerrel nem reagáló, illetve csak egyik aminocsoportjával kapcsolódó térhálósító molekulák számát. Ehhez a primer aminocsoportokkal szelektíven reagáló 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsavat (TNBS) használtuk. A gélesedés során nem reagáló térhálósító molekulák mennyiségét a gélből kimosva direkt módon mértük. A térhálóhoz kapcsolódó, de nem keresztkötő molekulák mennyiségét visszaméréssel határoztuk meg. A mellékreakció kiküszöbölésének érdekében a reakcióközeg lecserélésével továbbfejlesztettük a mérési módszert, mely alkalmassá teszi a TNBS t lassabb, akár heterogén fázisú mérések esetén is.

(Gyarmati B, Hegyesi N, Szilágyi A: *A 2,4,6-trinitrobenzene-sulfonic acid based assay for quantification pendant amines in aspartic acid based polymer gels*, készülő kézirat;

Gyarmati B, Hegyesi N, Faludi G, Némethy Á, Szilágyi A: *Quantitative analysis of amine groups in 1,4-diaminobutane cross-linked polysuccinimide gels*, AMSALS2012 - International Symposium on Advanced Macromolecular Systems Across the Length Scales, Siófok, 2012)

## 2. Hőmérséklet- és pH érzékeny polimer gélek

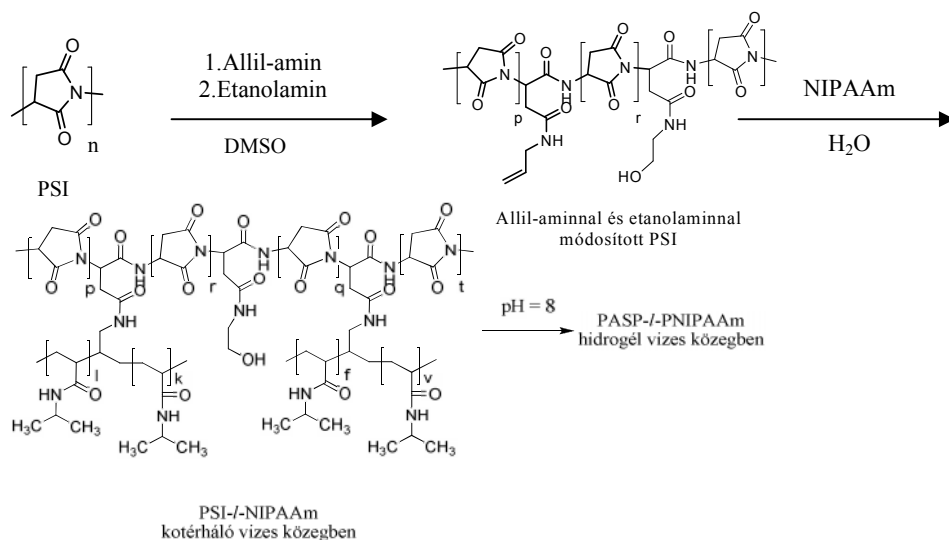
Humánbiológiai alkalmazásokban a multireszponzív polimer gél mátrixokra komoly igény mutatkozik. Célunk volt, hogy létrehozzunk egy, a környezeti pH- és hőmérséklet változására érzékenyen reagáló polimer gél-t. Ezt két eltérő tulajdonságú polimer egy rendszerbe történő kombinálásával kívántuk elérni. Ehhez a testhőmérséklet közeli fázisátalakulással rendelkező hőmérsékletérzékeny polimert, a poli(*N*-izopropil-akrilamidot) (PNIPAAm), illetve a pH-érzékeny poliszukcinimidet (PSI) választottuk, melynek elhidrolizált formája a poliaszparaginsav (PASP) polielektrolitként pH- és ionerősség érzékeny. A kétféle polimer tulajdonságai két módon kombinálhatók: úgynevezett egymásba hatoló térhálók (IPN) vagy kotérhálók létrehozásával.

### 2.1. Hőmérséklet- és pH érzékeny kotérhálós gélek

A kotérhálók kialakításánál az egyik vázalkotó polimerre építjük fel a másik polimert. Elsőként a PSI-t állítottuk elő polikondenzációs reakcióval. A PNIPAAm kiépítése a PSI vázon a PSI láncmódosításával volt megvalósítható, ennek során allil-amint addicionáltattunk a vázra. A lelógó kettős kötések már lehetővé tették, hogy gyökös polimerizációval a NIPAAm-ot a PSI-hez kapcsoljuk. A gélesítést DMSO-s közegben hajtottuk végre, a reakció eredményeként jó mechanikai tulajdonságokkal rendelkező géleket kaptunk. Vizsgáltuk, hogy a láncmódosítás mértéke hogyan befolyásolja a gélesedést, illetve a létrejött polimer gélek tulajdonságait. Tanulmányoztuk a polimer szerkezetnek a gél fizikai-kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatását. Megállapítottuk, hogy a hőmérsékletérzékenység csak abban az esetben jellemzi a rendszert, ha a gél-t alkotó vázban a PNIPAAm/ PSI arány 1-nél nagyobb. Az alapvázat alkotó PSI-*l*-PNIPAAm térháló érzékenyen reagált a környezeti pH megváltozására is. A láncalkotó szukcinimid gyűrűk pH > 6,5-nél felnyíltak és a vázalkotó PSI poliaszparaginsavvá alakult át.

A kotérhálók szintézisét vizes közegben is megvalósítottuk (3. ábra), mert a NIPAAm polimerizációja vizes fázisban jobb minőségű hidrogéleket eredményez, mint nemvizes közegben. A vízben nem oldódó PSI vízoldhatóságát a főlánc etanol-aminnal történő kémiai módosításával lehetett megoldani. Allil-amin oldalcsoportok beépítésével pedig biztosítottuk, hogy a PSI részt vegyen a NIPAAm gyökös mechanizmusú polimerizációjában, kialakítva

ezzel a multireszponzív PSI-*l*-PNIPAAm hidrogélt. Az ezt követő lúgos hidrolízis során kaptuk meg a PASP-*l*-PNIPAAm hidrogélt.



3. ábra: PASP-*l*-PNIPAAm hidrogélek szintézise vizes közegben

A szintézist követően a kotérhálós szerkezetű hidrogélek egyensúlyi duzzadásfokának változását vizsgáltuk különböző környezeti paraméterek mellett. Tanulmányoztuk a kiválasztott gél duzzadásfokának változását az alkalmazott duzzasztószer ionerősségének függvényében. Megállapítottuk, hogy az ionerősség növekedésével a gélek duzzadásfoka csökken. Mikrokolorimetriás (DSC) mérésekkel bizonyítottuk, hogy a PNIPAAm-ra jellemző fázisátalakulási hőmérséklet az ionerősség növelésével szintén csökken.

DSC, valamint duzzadásfok méréssel vizsgáltuk a gélek hőmérsékletérzékenységét különböző állapotokban (PSI-*l*-PNIPAAm, PASP-*l*-PNIPAAm). Megállapítottuk, hogy a PNIPAAm fázisátalakulási hőmérsékletét befolyásolja a másik vázalkotó polimer állapota, valamint az alkalmazott duzzasztószer és annak ionerőssége. A mérési eredmények igazolták, hogy a hidrogélek valóban érzékenyeken reagálnak a nemcsak a környezeti pH, de a hőmérséklet megváltozására is, azaz multireszponzív tulajdonságot mutatnak.

A PASP-*l*-PNIPAAm hidrogélekből történő hatóanyag-kioldódás vizsgálatokat diklofenák-nátrium nem szteroid típusú gyulladáscsökkentővel végeztük. Az általunk kifejlesztett PASP-*l*-PNIPAAm multireszponzív hatóanyag-hordozó rendszer a gyomorsav pH-ján magában tartja a diklofenák-nátriumot, kialakítva ezzel egy védelmi funkciót a gyomorban. A pH-t a vékonybélben található értékre emelve a PASP-*l*-PNIPAAm hidrogélek kismértékben megduzzadnak, valamint a diklofenák-nátrium oldhatósága is megnő, ez a hatóanyag felgyorsuló leadását idézi elő. A PASP-*l*-PNIPAAm hidrogélek alkalmazásával a hatóanyag-leadás tehát gyakorlatilag nem megy végbe a gyomorban és lelassul a vékonybélben. Az azonos módon alkalmazott, hagyományos hatóanyag-leadó rendszerekhez képest így növelhető a hatástartam és csökkenthető a mellékhatások veszélye. Az *in vitro* citotoxicitás vizsgálatok eredményei nem zárták ki a gél jövőbeni humánbiológiai felhasználásának lehetőségét.

(Némethy Á, Solti K, Kiss L, Gyarmati B, Deli M, Csányi E, Szilágyi A: *pH- and temperature-responsive poly(aspartic acid)-l-poly(N-isopropylacrylamide) conetwork hydrogel*, Eur Polym J, in press, 2013;

Némethy Á, Solti K, Gyarmati B, Szilágyi A: *Polí(n-izopropilakrilamid)-l-poliaszparaginsav hidrogélek szintézise és tulajdonságainak vizsgálata*, XXXV. Kémiai Előadói Napok konferenciakiadvány, pp. 168-171., 2012)

## 2.2. *Hőmérséklet- és pH érzékeny egymásba hatoló térhálók (IPN)*

Egy másik módja a pH- és a hőmérsékletérzékeny tulajdonságok ötvözésére, ha a két polimert IPN rendszerként társítjuk egymással. Az egymásba hatoló térhálók (IPN-ek) előnye az egyedi polimerek által alkotott gélekénél, hogy egy sokkal jobb mechanikai tulajdonságokkal rendelkező mátrixot hozhatunk létre. A polimerekre egyedileg jellemző tulajdonságok kedvező módon ötvözhetők egy rendszeren belül.

A PSI diaminokkal, a NIPAAm pedig biszakrilamid térhálósító molekula jelenlétében térhálósítható. DMSO-s közegben, időben elválasztva hoztuk létre az IPN gél vázát alkotó két térhálósított polimert.

Megállapítottuk, hogy a térhálósítás mértékének és a polimer koncentrációnak mindkét alkotó esetén akkorának kell lenni, hogy önmagukban is jó minőségű géleket adjanak, ezen felül megfigyeltük, hogy a térhálósság mértéke nem különbözhet számottevően. Továbbá megállapítottuk, hogy a hőmérsékletérzékenység csak abban az esetben jellemzi a rendszert, ha a PNIPAAm/ PSI arány nagyobb, mint egy.

A kotérháló vizsgálatához hasonlóan kiválasztottunk egy mechanikai tulajdonságaiban, illetve pH- és hőmérsékletérzékenység szempontjából kedvező IPN gél. Vizsgáltuk a gélek duzzadásfokának pH- és hőmérsékletérzékenységét. Vizsgáltuk a PNIPAAm fázisátalakulási hőmérsékletének változását az ionerősség függvényében. DSC és duzzadásfok mérésekkel tanulmányoztuk a fázisátalakulási hőmérsékletek változását az alkalmazott duzzasztószerek függvényében.

(Némethy Á, Németh Cs, Gyarmati B, Szilágyi A: *Synthesis and swelling properties of novel pH- and temperature-responsive PASP/PNIPAAm IPN gels*, készülő kézirat;

Németh Cs, Némethy Á, Tátraaljai D, Gyarmati B, Szilágyi A: *Poly(N-isopropylacrylamide)/poly(aspartic acid) interpenetrating networks*, AMSALS2012 - International Symposium on Advanced Macromolecular Systems Across the Length Scales, 2012

## 2.3. *Fény- és pH érzékeny polimer gélek*

Az aminosav gélek oly módon is multireszponzívva tehetők, ha a pH érzékenységük mellett fény besugárzásának hatására változtatják tulajdonságaikat. Munkánk során a BME Szerves Kémia és Technológia Tanszékével együttműködve fényérzékeny molekulát (spirobenzopirán származék) állítottunk elő. Ezt az általunk előállított PASP-*l*-PNIPAAm kotérhálók PNIPAAm láncába beépítettük. A kromofor fényindukált szerkezeti átalakulásával az előállított gélek duzzadásfokát azonban nem sikerült befolyásolni.

## 3. *Kizárólag aminosavakból felépülő polimer gélek*

Az emberi szervezetben orális gyógyszerhatóanyag hordozóként felhasználható biokompatibilis és biológiailag (enzimek által) lebontható hatóanyag-leadó rendszerek fejlesztésénél előtérbe kerülnek a kizárólag aminosavakból előállított gélek.

### 3.1. *Poliaszparaginsav-*l*-zselatin kotérhálók*

A poliszukcinimid-*l*-zselatin kotérhálókat a természetes aminosavakból felépülő polimerből, a zselatinból és az általunk szintetizált poliszukcinimidből állítottuk elő. Olyan kémiai térhálós rendszert kaptunk, ahol a polimer láncokat (PSI) összekötő molekulák maguk is polimerek (zselatin). Az előállított gél egyszerre mutatta a PSI gélekre és a zselatin gélekre jellemző pH-függést, emellett a normál zselatin géleknél lényegesen jobb mechanikai tulajdonságokkal rendelkezett. Megállapítottuk, hogy a gélek egyensúlyi duzzadásfokának pH-függése hasonló a PSI-DAB géleknél tapasztaltakhoz, azonban a duzzadásfok növekedése kevésbé ugrásszerű. Ennek oka valószínűleg a zselatin savas mellékcsoportokat tartalmazó

aminosavaiban (glutaminsav, aszparaginsav) keresendő. Lúgos közegben a gélben található szukcinimid gyűrűk felnyílnak, hidrolizálnak; a létrejövő PASP láncok polielektrolitként viselkednek, ezáltal a gélek duzzadásfoka jelentősen megnő. A PASP-*l*-zselatin gélek savas közegben szinerizálnak (térfogatuk csökken). Megállapítottuk, hogy a PSI-t és zselatint különböző arányban tartalmazó gélek duzzadásfoka és rugalmassági modulusza nagymértékben függ az egyes összetevők koncentrációjától.

(Némethy Á., Gyarmati B., Gyenes T., Pukánszky B., Szilágyi A: Preparation and characterization of poly(aspartic acid)-gelatin co-networks, 73rd Prague Meeting on Macromolecules, 2009)

### **3.2. Enzimatikusan lebomló poliaszparaginsav hidrogélek szintézise és vizsgálata**

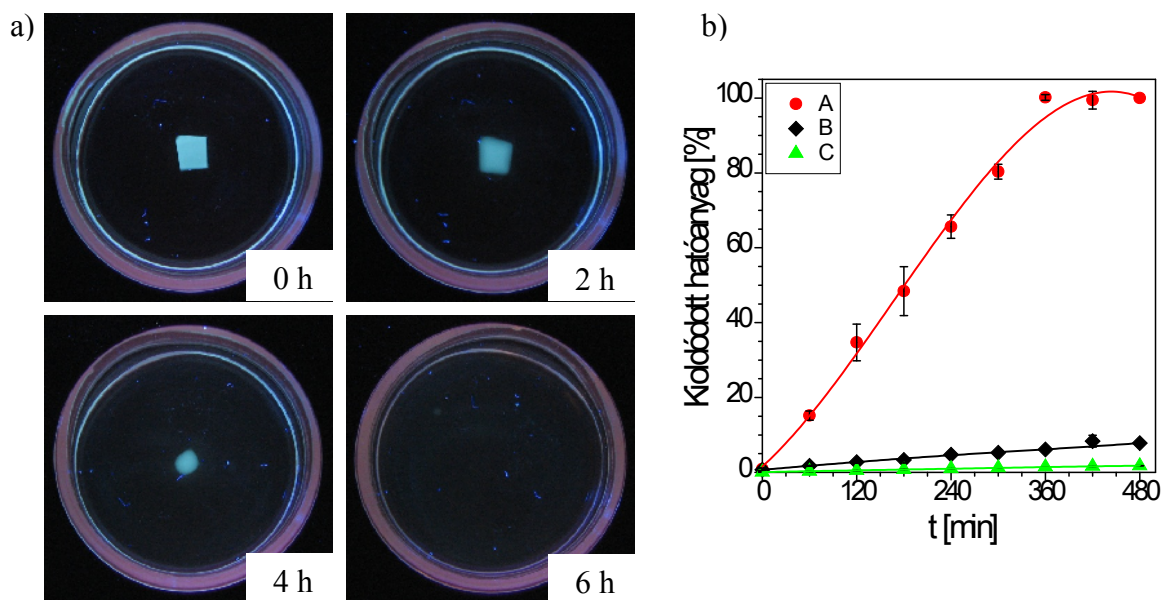
A részfeladat során célunk egy szabályozott hatóanyag-leadásra alkalmas aminosavakból felépülő polimer hidrogél előállítása volt, melyből a hatóanyag nem oldódik ki mindaddig, míg a gél keresztköteit egy bizonyos enzim nem hasítja, melynek során a gélmátrix degradálódik. Mivel a szervezetben az enzimek specifikus helyeken fordulnak elő, optimalizálható a hatóanyag kioldódásának helye, a mátrixból való kioldódás pedig elnyújtott leadást eredményezhet. A gél aminosav építőeleminek köszönhetően várhatóan nem fog a szervezetben kedvezőtlen válaszreakciót kiváltani.

Ezt a célt tripszinspecifikus keresztköte-molekulát tartalmazó poliaszparaginsav gél előállításával valósítottuk meg. Első lépésként egy olyan tetrapeptid szekvenciákat terveztünk, melyek N-terminálisa szabad, C-terminálisán pedig védetlen oldalláncú lizin található, így alkalmas a gél alapvázául szolgáló poliszukcinimid (PSI) térhálósítására, ezen felül tartalmaz specifikusan tripszin által hasítható köte. Nyolc különböző peptidszekvencia került előállításra, végül a H-Phe-Arg-Phe-Lys-OH (FRFK) szekvenciájú tetrapeptidet választottuk (a peptidszintézisek az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjával együttműködésben történtek). Preparációs eljárást dolgoztunk ki PSI tetrapeptiddel történő térhálósítására, mely gél lúgos hidrolízisével poliaszparaginsav gélt állítottunk elő (PASP-FRFK gél). Sikeresen állítottunk elő egy kizárólag aminosavakból álló, transzparens, jó mechanikai tulajdonságokkal rendelkező polimer hidrogélt.

Igazoltuk az előállított gél tripszin általi bonthatóságát. A kísérlet során a PASP-FRFK gél 6 óra alatt teljesen feloldódott (4.a ábra), míg a negatív kontrollmintán nem tapasztaltunk degradációra utaló változást. Bizonyítottuk, hogy a gél enzimspecifikus keresztköteinek köszönhetően tripszinnel bontható.

A tervezett humánbiológiai felhasználás miatt elengedhetetlen volt vizsgálni a gél alapanyagainak *in vitro* citotoxicitását, illetve citosztatikus hatását. Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoporttal együttműködésben végzett mérések eredményei nem zárták ki a gél jövőbeni humánbiológiai felhasználásának lehetőségét. Kísérletet végeztünk a PASP-FRFK gél hatóanyag-leadó rendszerként való alkalmazhatóságának bizonyítására fluoreszcens modell-hatóanyaggal. A kísérlet eredményéből megállapítható volt, hogy a PASP-FRFK gél tripszines közegben elnyújtott kioldódási kinetikával adja le a hatóanyagot, míg a negatív kontrollmintákból a kioldódás minimális volt (4.b ábra). Elmondható tehát, hogy az általunk szintetizált PASP-FRFK gél a jövőben szabályozott hatóanyag-leadás céljára alkalmas lehet.

(Szilágyi B.Á., Némethy Á., Magyar A., Szilágyi A: *Enzimátikus úton lebomló poliaminosav gélek szintézise és vizsgálata*, XVII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, 2011)



**4. ábra:** a) PASP-FRFK gél emésztése tripszines közegben; b) FITC-dextrán modell hatóanyag kioldódása A: PASP-FRFK gélből tripszines közegben; B: PASP-FRFK gélből tripszin nélküli közegben, C: PASP-SS nem tripszin érzékeny gélből tripszines közegben

#### 4. Összefoglalás

A projekt fő célja szabályozott és elnyújtott hatóanyag-leadó rendszerek fejlesztése volt, melyeket aminosavakból felépülő multireszponzív polimer gélekkel valósítottunk meg. A poliaszparaginsav alapváz pH érzékenységét a keresztkötő vagy a másik polimer alkotó hőmérséklet-, redoxpotenciál- vagy enzim érzékenységével kapcsoltuk össze. Analitikai módszereket dolgoztunk ki, fejlesztettünk tovább polimer gélek tulajdonságainak jellemzésére. Hatóanyag- és egyéb modellvegyületek szabályozott kioldódását számos paraméter függvényében részletesen jellemeztük. Biológiai vizsgálatok alapján a szintetizált gélek ígéretesek, jövőbeli orvosbiológiai alkalmazásuk lehetséges elsősorban gasztrointesztinális hatóanyag-leadó rendszerként vagy implantátumként, vagy olyan esetekben, ahol az in situ gélesedés előnyös.

#### 5. A pályázat hasznossága

A pályázat lehetővé tette, hogy a BME Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszékén 2008-ban létrejött Lány Anyagok Kutatócsoport szakmai és anyagi helyzete stabilizálódjon. A kutatásban a kezdetektől résztvevő két fő PhD hallgató (Gyarmati B. és Némethy Á.) már a disszertációjuk elkészítésén dolgozik. 2012-ben a csoportnak 4 fő diplomázó hallgatója kutatott a pályázat témájában, ők a BME TDK konferenciáján munkájukkal 3 db első és 1 db harmadik helyezést nyertek el. A pályázat elősegítette együttműködések létrejöttét mind magyar (SzTE Gyógyszer technológiai Intézet, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport), mind külföldi partnerekkel (Institute of Materials Research and Engineering, Szingapúr; Institut Polytechnique de Bordeaux, Franciaország). A tématerületen végzett kutatómunka nemzetközi elismerést szerzett a csoportnak, 2012-ben sikeres nemzetközi konferencia (AMSALS 2012, „Nanostrukturált rendszerek alkalmazása a szabályozott hatóanyag-leadásban”) szervezésében vehettünk részt, melynek a pályázat vezető kutatója főszerzője és társelnöke volt.



A pályázathoz közvetlenül kapcsolhatóan 3 db közleményünk jelent meg nemzetközi folyóiratban és további 3 db kézirat készül jelenleg. Hazai és nemzetközi konferenciákon 7 db előadást és 14 db posztert mutattunk be a pályázati időszak alatt.