

PhD értekezés tézisei

Gyenes Tamás

Aminosav alapú gélek szintézise és duzzadási tulajdonságaik vizsgálata

Témavezető: Dr. Zrínyi Miklós

Konzulens: Dr. Torma Viktória

Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék, BME, Budapest

2007

Bevezetés

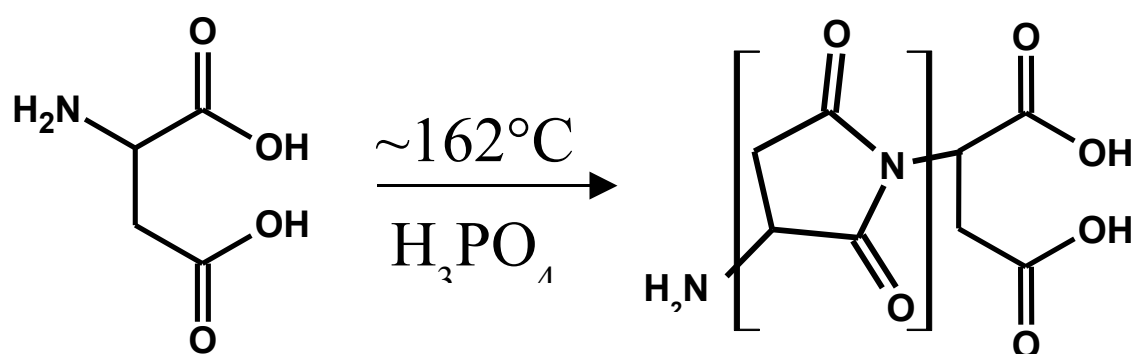
Az aminosavak és a belőlük felépülő fehérjék a Földön ismert élőszervezetek nélkülözhetetlen alkatrészei. Fontos szerepük van a biológiai rendszerek vázának felépítésében és a létfenntartó biokémiai folyamatokban. A legnagyobb szervezettségű kémiai anyagok közé tartozó fehérjék szerkezetüktől, felépítésüktől függően a legkülönbözőbb feladatok ellátására képesek. Ezen anyagok sokszínűségét a természet kémiaiilag mindössze húsz molekula, a fehérjeépítő aminosavak variációjával éri el. Aminosavak felhasználásával szintetikus úton is számos, különböző összetételű és ebből következően különböző tulajdonságokkal rendelkező anyag állítható elő.

Az első eljárásokat aminosavakból felépített molekulák szintézisére a XX. század elején dolgozták ki. Azóta egy külön tudományág, a peptidkémia kutatói foglalkoznak ezen, különböző alkalmazásokban felhasználható rendszerek előállításával. Viszonylag nagy számú (akár néhány száz) aminosav összekapcsolására alkalmas módszereket is ismerünk. Olyan rendszerek létrehozására azonban, amelyek több millió aminosav kémiai összekapcsolásával jönnek létre, csekély számú próbálkozás történt. Ennek is csak kis hányadát alkotják azok az eljárások, amelyek kizárólag a fehérjeépítő aminosavakból kiindulva, és nem természetes poliaminosavak (például fibroin, albumin, zselatin) összekapcsolásával hoznak létre makromolekulákat. Ennek

oka elsősorban az, hogy a molekulák összekapcsolása bonyolult eljárásokat és nagy költségeket igénylő feladat.

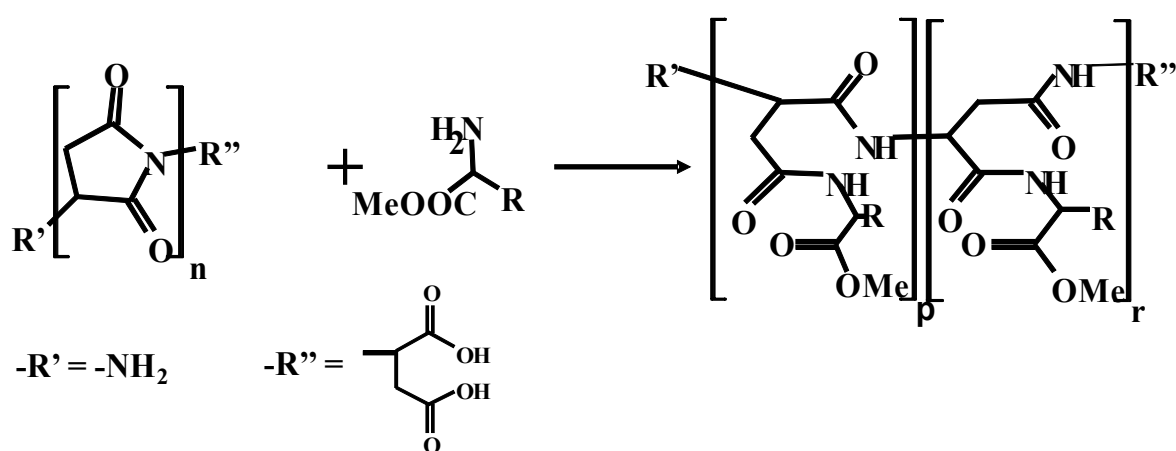
Kutatócsoportunk célul tűzte ki makroszkopikus méretű, poliaminosavakból felépülő gélek előállítását. Abból indultunk ki, hogy a fehérjékhez hasonlóan, a molekulák variálásával különféle területeken alkalmazható rendszereket hozhatunk létre. Kutatásunk elsődleges célja olyan, optikailag tiszta, monolit poliaminosav gélek előállítása, amelyek duzzadásfokuk jelentős megváltozásával érzékenyen reagálnak különféle hatásokra, például a környezet pH-jának, hőmérsékletének, ionkoncentrációjának, redoxpotenciáljának változására.

A célok megvalósításának első lépése olyan, aminosavakból felépülő polimer szintézise, amelyből polimer gél állítható elő. A második lépés egy reakciót kidolgozása a lánc aminosavakkal történő módosítására, majd térhálósítására. Céljaim elérését az aszparagin termikus polikondenzációjával előállított polimer, a poliszukcinimid felhasználása tette lehetővé (1. ábra).



1. ábra. Poliszukcinimid előállítása aszparaginsavból

A poliszukcinimid aktív peptid kötése alkalmassá teszik a polimer láncot arra, hogy tulajdonságait különböző módosító molekulákkal megváltoztassuk, az adott felhasználási célra optimalizáljuk. A szukcinimid molekularészlet nukleofil támadásra érzékeny funkciós csoportot tartalmaz. Ha a polimert megfelelő körülmények között nukleofil reagensekkel hozzuk kontaktusba, a szukcinimid gyűrű felnyílnak, és egy módosított α és β aszparaginból mint monomeregységekből álló polimer keletkezik (2. ábra)



2. ábra. Poliszukcinimid módosítása aminosavakkal

Megfelelő méretű polimer szintézisével és a módosító, keresztkötő eljárások kifejlesztésével elérhetjük, hogy a poliszukcinimidből felépülő térhálók tulajdonságai széles tartományban változtathatóvá váljanak. Így a különféle felhasználásokra optimalizálható poliaminosav gélekhez juthatunk.

Mivel a poliaminosav alapú gélek kizárólag az emberi szervezetben megtalálható molekulákból épülnek fel, remélhetjük, hogy különböző humánbiológiai alkalmazások (implantátumok, szintetikus izmok, hatóanyag-leadó rendszerek stb.) alapját képezhetik. Távlati célunk elsősorban a gélek érzékenységén alapuló szabályozott hatóanyag-leadás megvalósítása.

Munkámmal, amelyet a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszékének Lágyműanyagok Kutatócsoportjában, Dr. Zrínyi Miklós és Dr. Torma Viktória vezetésével végeztem, egy új kutatási területnek, a szintetikus előállított poliaminosav alapú gélek kémiájának alapjait kívántam lerakni, ezzel megteremtve a lehetőségét számos fontos, főként orvosbiológiai célokat szolgáló, biokompatibilis anyag előállításának.

Kísérleti módszerek

Az aminosav alapú polimerek és gélek szintézisére irányuló kutatások mellett céлом volt az előállított anyagok szerkezetének, valamint fizikai és kémiai tulajdonságainak vizsgálata. Ehhez az ismert módszerek mellett új eljárásokat is kifejlesztettem. Az előállított polimerek szerkezetének felderítésére NMR és dinamikus fényszórás méréseket végeztem. A gélek vizsgálatára duzzadáskinetika, egy irányú összenyomás, egyensúlyi duzzadásfok méréseket, valamint gélesedési idő meghatározást és potenciometrikus titrálást alkalmaztam.

Új tudományos eredmények

1. Monolit gélek előállítására alkalmas poliaminosavat szintetizáltam aszparaginsav termikus polimerizációjával. Megállapítottam, hogy a polimer elágazási aránya függ a szintézis során alkalmazott katalizátor mennyiségétől.
2. Eljárást dolgoztam ki poliszukcinimid funkcionálizálására szerinnel, glicinnel és fenilalaninnal. A módosított és módosítatlan monomeregységek arányát NMR- vizsgálatokkal határoztam meg.
3. Aminosav alapú, monolit géleket állítottam elő poliszukcinimid térhálósításával, putrescin, spermidin, illetve spermin keresztkötő molekulák felhasználásával.
4. Eljárást dolgoztam ki poliszukcinimid térhálósítására lizinnel. Így olyan monolit gélt állítottam elő, amelynek térhálója kizárólag aminosavakból áll. Megállapítottam, hogy a gélesedés folyamata megfelelő mennyiségű foszforsav vagy ecetsav alkalmazásával felgyorsítható.
5. Eljárást dolgoztam ki poliszukcinimid térhálósítására cisztaminnal. Így olyan poliaminosav gélt hoztam létre, amelyben a poliaminosav láncok diszulfidkötéseken keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Megállapítottam, hogy a cisztamin–poliszukcinimid reakció foszforsavval és ecetsavval katalizálható.

6. Eljárást dolgoztam ki olyan poliaminosav gélek előállítására, amelyekben a redukálható cisztamin mellett nem redukálható diaminobután is részt vesz a poliszukcinimid térháló kialakításában.
7. Poliszukcinimid és zselatin felhasználásával olyan poliaminosav térhálót állítottam elő, amelyben a zselatin szabad aminocsoportjai és a szukcinimidgyűrűk hoznak létre kémiai kötést.
8. Potenciometrikus titráláson alapuló módszert fejlesztettem ki gélek kémiai hálópont-sűrűségének meghatározására. Megállapítottam, hogy a diaminobutánnal térhálósított poliszukcinimid gélekben (10/1 monomer/térhálósító arány mellett) a kémiai hálópontok száma az alkalmazott keresztkötő molekulák számának $25 \pm 5\%$ -a.
9. Megvizsgáltam különböző pH-jú vizes puffer oldatokba helyezett poliszukcinimid és poliaszparaginsav gélek duzzadásának kinetikáját. Megállapítottam, hogy a relaxációs idők és a kooperatív diffúzióállandók nagymértékben függenek a vizsgált gél minőségétől és az alkalmazott közeg pH-jától. Megállapítottam, hogy diaminobutánnal keresztkötött poliszukcinimid gélek duzzadása két, egymást követő folyamat eredője.

10. Megállapítottam, hogy a poliszukcinimid gélek egyensúlyi duzzadásfoka $\text{pH} = 7,3$ -nál ugrásszerűen, mintegy háromszorosára nő. Ennek oka a hidrofób szukcinimidgyűrűk kémiai bomlása. Megállapítottam, hogy cisztaminnal keresztkötött gélek duzzadásfoka $\text{pH} > 8,5$ pufferekben folyamatosan nő, egészen a gél felbomlásáig.
11. A Brannon-Peppas—Peppas-modell kiterjesztésével tetszőleges pH -jú és ionerősségű oldatokra, elméletet dolgoztam ki polielektrolit gélek egyensúlyi duzzadásfokának pH -függésére. Az elmélet helyességét cisztaminnal és diaminobutánnal keresztkötött poliaszparaginsav géleken végzett egyensúlyiduzzadásfok-vizsgálatokkal igazoltam. Az elmélet segítségével meghatároztam a vizsgált gélek Flory–Huggins-állandóját (χ) és hálópontsűrűségét (v^*).
12. Megállapítottam, hogy a cisztaminnal és diaminobutánnal egyidejűleg térhálósított gélek egyensúlyi duzzadásfoka közepesen erős bázis ($\text{pH} \approx 10$) vagy ditiotreitól hatására a keresztkötők arányával előre tervezhető mértékben változtatható. A duzzadt és az eredeti gélek térfogatának aránya $0,25 \text{ M}$ ionerősségű oldatban 1 és 5 között, desztillált vízben 1 és 100 között változtatható.

Alkalmazási lehetőségek

Az előállított gélek kizárólag az emberi szervezetben megtalálható molekulákból épülnek fel, így hasznosításuk elsősorban humánbiológiai alkalmazások területén várható. pH-érzékenységüket főként orálisan bevitt szabályozott hatóanyag-leadó rendszerekben lehet felhasználni. Emellett más orvosbiológiai alkalmazások (szintetikus izmok, protézisek, implantátumok) alapanyagai is lehetnek.

A PhD értekezéssel kapcsolatos közlemények

Publikációk:

Könyvben cikk:

1. Filipcsei G., Fehér J., Szilágyi A., **Gyenes T.** és Zrínyi M.: Intelligens lágy anyagok,; Közgyűlési előadások 2000, 3. kötet, pp. 1065-1078, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest 2001
2. **Gyenes T.**, Filipcsei G., Zrínyi M.: Polimergélek mint hatóanyag hordozók, A gyógyszerészeti reológiai kutatás 40 éve Szegeden (1964-2004), Kedvessy Emlékkönyv, p119-127, ed.: Erőss István, JatePress 2004

Folyóiratcikkek:

3. **Gyenes T.**, Zrínyi M.: Szabályozott hatóanyag-leadó rendszerek: Paradigmaváltás a gyógyszerészetben
Acta Pharmaceutica Hungarica, 2001. 71,(4) pp. 405-421
4. Torma V., **Gyenes T.**, Szakács Z., Noszál B., Némethy A., Zrínyi M.: Novel amino acid-based polymers for pharmaceutical applications
Polymer Bulletin 2007, 59, 311-318
5. **Gyenes T.**, Torma V., Zrínyi M.: Swelling Properties of Aspartic Acid-Based Hydrogels
Colloids and Surfaces A doi:10.1016/j.colsurfa. 2007.06.016
6. **Gyenes T.**, Torma V., Gyarmati B., Zrínyi M.: Synthesis and swelling properties of novel pH sensitive poly(aspartic acid) gels.
Acta Biomaterialia, közlésre elfogadva (minor revision)

Szabadalom:

7. Zrínyi M., **Gyenes T.**, Torma V., Némethy Á., Gyarmati B.: Poliszukcinimid alapú gélek előállítása

Konferenciárészvétel:

Előadások:

8. **Gyenes T.**: Aszparaginsav alapú hidrogélek. BME VBK 4. Doktoráns konferencia, 2007.
9. **Gyenes T.**, Torma V., Gyarmati B., Némethy Á., **Zrínyi M.**: Responsive Properties of Smart Poly(amino acid) Based Gels. GelSympo2007 Tokió
10. **Gyenes T.**, Torma V., Némethy Á., Gyarmati B., Zrínyi M.: Responsive Properties of Smart Poly(amino acid) Based Gels. 9CCC Siófok
11. **Gyarmati B.**, **Gyenes T.**, Némethy Á., Torma V., Szilágyi A., Zrínyi M.: A környezet pH-jára és redox-potenciáljára érzékenyen reagáló poliaminosav-gélek. XXX. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2007
12. **Némethy Á.**, **Gyenes T.**, Gyarmati B., Torma V., Szilágyi A., Zrínyi M.: Poliaminosav-gél alapú hatóanyag-leadó rendszerek szintézise és tulajdonságai. XXX. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2007

Poszterek:

13. **Gyenes T.**, Szabó D., Zrínyi M.: Electric and Magnetic Field Controlled Drug Delivery Systems Realised by Intelligent Hydrogels. 6th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies. Eilat, Israel, 2001
14. **Gyenes T.**, Torma V., Szakacs Z., Gyarmati B., Solt H., Némethy Á., Zrínyi M.: Swelling properties of aspartic acid-based hydrogels, poszter, ECIS konferencia, Budapest, 2006
15. **Gyenes T.**, Torma V., Szakacs Z., Gyarmati B., Solt H., Némethy Á., Zrínyi M.: Swelling properties of aspartic acid-based hydrogels. poszter, Summer School at the Institut d'Etudes Scientifiques de Cargese (Corsica, Fr), 2007
16. **Némethy Á.**, **Gyenes T.**, Torma V., Gyarmati B., Zrínyi M.: Amino Acid Based Hydrogels for PH Induced Drug Delivery. Poszter, 9CCC Siófok, 2007

17. Gyarmati B., **Gyenes T.**, Torma V., Némethy Á., Zrínyi M.: Aspartic Acid Based Hydrogels. Poszter, 9CCC Siófok, 2007