

Beszámoló

*Folsavval célzott poliaszpartamid-doxorubicin konjugátum előállítására rákos
megbetegedések hatékony kezelésére*

Molnárné Krisch Enikő, PhD

1. A kutatási projekt rövid összefoglalása

A gyógyszerészet területén már régóta alkalmaznak polimereket, például a tablettázás elősegítésére vagy kioldódást befolyásoló filmbevonatok, kapszulák előállítására [1]. Azonban a legfontosabb polimerekhez kapcsolódó gyógyszerészeti kutatások fő célja a célzott és szabályozott hatóanyag-leadó rendszerek kiépítése, amelyekkel növelhető a terápia hatékonysága, ezáltal csökkenthető az alkalmazott dózis mennyisége [2,3]. Hatóanyag-hordozó rendszerek segítségével továbbá megnövelhető a hatóanyag keringési ideje, hiszen sok gyógyszerhatóanyag nagyon gyorsan kiürül a szisztémás keringésből a vesék vagy a máj által, ezáltal nagyon kicsi a hasznosulásuk [4,5]. Gyógyászati területen elengedhetetlen, hogy olyan alapanyagokat alkalmazzunk, melyek biokompatibilisek, azaz a szervezetbe kerülve nem okoznak erős immunválaszt és biodegradábilisek, azaz a szervezetben lebomlanak és a bomlástermékek a szervezet számára felhasználhatóak vagy a szervezetből kiürülnek. Ígéretes alapanyagoknak számítanak a szervezet fehérjéinek szerkezetét utánzó szintetikus poliaminosavak, mint például a poliaszparaginsav (PASP), amelyek peptid kötése révén enzimátikus körülmények között biodegradábilisek. [6]. A PASP a szintetikus úton előállítható poliszukcinimdből (PSI) egyszerű hidrolízissel nyerhető, jól szabályozható molekulatömeggel és szerkezettel. A PASP tehát ötvözi a természetes eredetű és a szintetikus polimerek előnyös tulajdonságait. További előnye, hogy anhidridje, a PSI, primer aminokkal enyhe reakciókörülmények között és jó konverzióval módosítható, így számos funkció csoport kapcsolható rá [7]. Az így nyert PSI származékok hidrolízisével tehát a felhasználáshoz szükséges szerkezetű PASP származék állítható elő.

Jelen munka célja egy PASP alapú polimer-hatóanyag konjugátum előállítása volt, egy széles körben alkalmazott kemoterápiás szer, a doxorubicin terápiás hatékonyságának növelése érdekében. A formulálás előnye, hogy megnő a doxorubicin keringési ideje és stabilitása, ezáltal csökkenthető a terápiás dózis. Továbbá, a PASP- doxorubicin konjugátumon található folsav egységeknek köszönhetően a hatóanyag célzottan a rákos sejtekbe juttatható, csökkentve ezáltal a nem kívánt és veszélyes mellékhatásokat. A munkára Dr. Puskás Judit Éva kutatócsoportjában, a The Ohio State University-n (Wooster, Ohio, USA) került sor.

Hivatkozások jegyzéke

[1] M.D. Sangamesh Kumbar, Cato Laurencin, Natural and Synthetic Biomedical Polymers, First Edit, Elsevier Inc., Burlington, 2014.

- [2] J. Ye, M.C. Shin, Q. Liang, H. He, V.C. Yang, 15 years of attempts: A macromolecular drug delivery system based on the CPP-mediated intracellular drug delivery and antibody targeting, *J. Control. Release*. **2015**, 205, 58–69
- [3] M. Hrubý, S.K. Filippov, P. Štěpánek, Smart polymers in drug delivery systems on crossroads: Which way deserves following?, *Eur. Polym. J.* **2015**, 65, 82–97.
- [4] S. Thatte, K. Datar, R.M. Ottenbrite, Perspectives on: Polymeric drugs and drug delivery systems, *J. Bioact. Compat. Polym.* **2005**, 20, 585–601.
- [5] T.M. Allen, P.R. Cullis, Drug Delivery Systems : Entering the Mainstream, *Science*, **2003**, 303, 1818–1823.
- [6] D. Juriga, K.S. Nagy, A. Jedlovsky-Hajdu, K. Perczel-Kovach, Y.M. Chen, G. Varga, M. Zrinyi, Biodegradation and osteosarcoma cell cultivation on poly(aspartic acid) based hydrogels, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2016**, 8, 23463–23476.
- [7] E. Krisch, L. Messenger, B. Gyarmati, V. Ravaine, A. Szilágyi, Redox- and pH-responsive nanogels based on thiolated poly(aspartic acid), *Macromolecular Materials and Engineering*, **2016**, 301(3), 260-266

2. Kutatómunka leírása

2.1 Poliszukcinimid szintetizálása

A poliszukcinimidet (PSI) L-aszparaginsavból kiindulva 180°C-on, vákuumban, oldószermentes eljárásban állítottam elő. Tisztítását vízben történő kicsapással végeztem, majd metanolos mosást követően szárítottam. Fehér porszerű polimert kaptam eredményül. Az előállított PSI kémiai szerkezetét proton- és karbon mag mágneses rezonanciát (¹H-NMR és ¹³C NMR) alkalmaztam, mely igazolta az előállított, tiszta PSI szerkezetét.

2.2 PSI módosítása közvetlenül Doxorubicinnal és folsavval

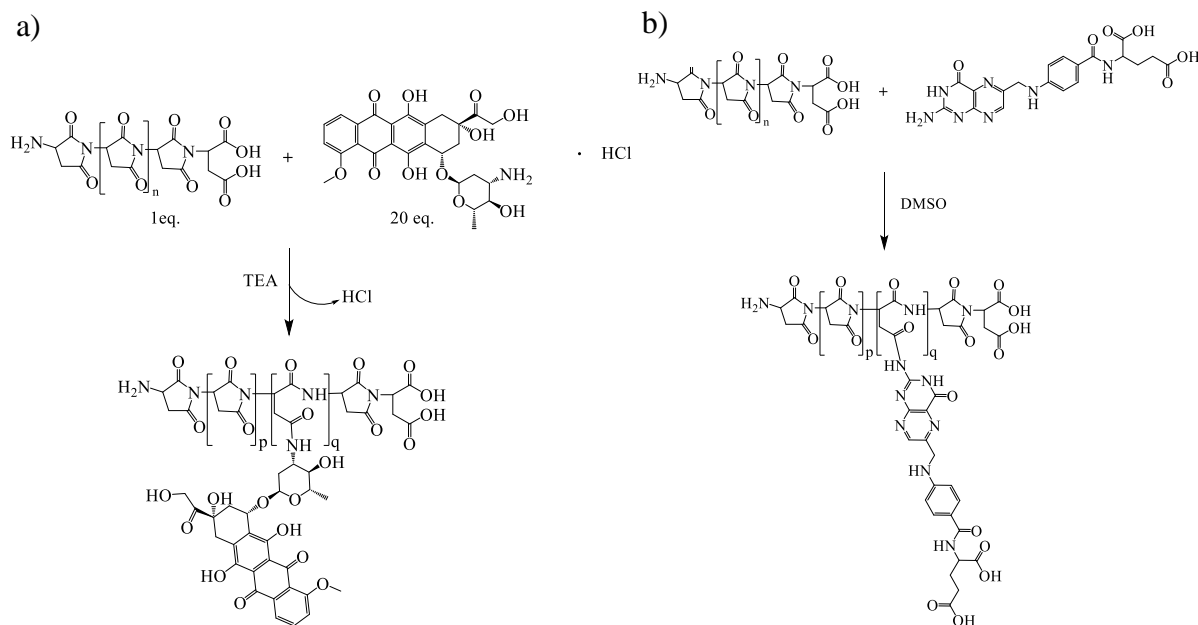
PSI módosítása Doxorubicinnel

PSI reaktív szukcinimid gyűrűket tartalmaz, melyeken keresztül enyhe körülmények között módosítható, például primer amincsoportokat tartalmazó vegyületekkel. A PSI módosíthatóságának gátat szab ugyan, hogy csak két oldószere van, a dimetilformamid (DMF) és a dimetil-szulfoxid (DMSO). Első lépésben kísérletet tettem a Doxorubicin (Dox) közvetlen PSI-hez kapcsolására, annak primer amincsoportján keresztül. A reakció kivitelezéséhez a PSI-t és a DOX.HCl-t is DMSO-ban oldottam fel, majd a Dox felszabadításához trietil-amint (TEA) adtam a reakcióelegyhez. Kétféle módosítási aránnyal is elvégeztem a reakciót: 2 és 10 mol%-os elméleti Dox módosításokkal. A reakciót szobahőmérsékleten, 24 órán keresztül végeztem, majd vízben történő kicsapást követően metanollal mostam a polimert. A Dox rossz oldhatóságából adódóan nagyon sok mosási ciklusra szükség volt, a mosási folyamat addig tartott, amíg a szűrlet színtelen nem lett. Vákuumban történő szárítást követően a polimer szerkezetét ¹H NMR méréssel derítettem fel. Az NMR spektrumon felfedezhetők a Dox-hoz köthető csúcsok, a Dox és a polimer kötődése viszont nem bizonyítható.

PSI módosítása folsavval

A PSI Dox-szal történő módosításának menete szerint tettem kísérletet a PSI folsavval történő módosítására is. A reakciót DMSO-ban végeztem, 7,25 mol%-os elméleti folsav módosítással, 24 óráig, szobahőmérsékleten. A reakciót vékonyréteg kromatográfiával követtem. 24 óra elteltével vízben kicsaptam a polimert, majd metanollal mostam. Szárítást követően sárgás polimert nyertem.

A polimer ^1H NMR spektrumán megjelentek a folsavhoz köthető csúcsok, azonban a módosítást bizonyító - a folsav amin csoportjával reagáló szukcinimid metilén és metin protonjaihoz tartozó - dublettek 3,27-3,31 és 5,59-5,63 ppm tartományban nem jelennek meg.



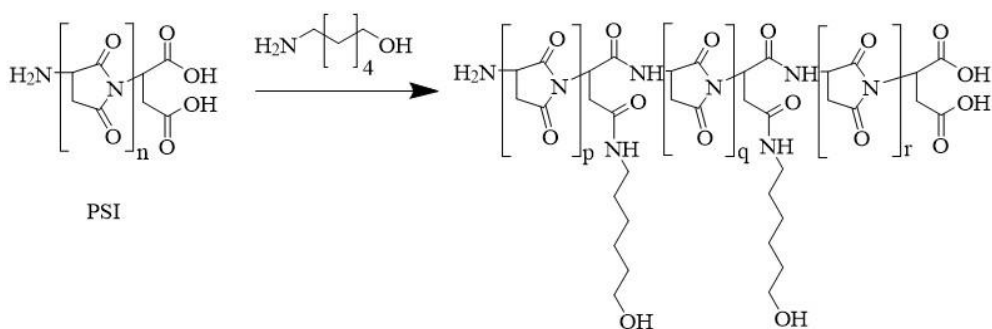
1. ábra: PSI módosítása Doxorubicinnel (a) és folsavval (b)

2.3 PSI módosítása Doxorubicinnel és folsavval akrilát csoportokon keresztül

PSI módosítása 6-aminohex-1-ollal

Első lépésben a PSI-t 6-aminohex-1-ol-al módosítottam DMSO-ban. Az elméleti módosítási fok 10% volt, tehát minden 10-edik ismétlődő egységre esett egy oldallánc (1. ábra). A módosítás mértékét a sztöchiometriával tudjuk szabályozni. A szintézist 24 órán keresztül végeztem, szobahőmérsékleten. A polimer kinyerésére és tisztítására oldószer próbákat végeztem, melyek alapján vízben csaptam ki a polimert, majd hideg metanollal mostam, végül vákuumban szárítottam.

A módosított polimer (PSI-AH) szerkezetét ^1H NMR vizsgálatokkal igazoltam. 1,23, 1,38, 2,99, 3,35 és 4,29 ppm-nél új csúcsok jelentek meg a kiindulási PSI ^1H NMR spektrumához viszonyítva. Az első kettő, 1,23 és 1,38 ppm, a kapcsolt aminohexanol középső CH_2 csoportjának 4 db protonjához köthető, míg a 4,29 ppm-es csúcs a felnyílt gyűrű melletti zárt gyűrű metincsoportjához tartozik. A többi a felnyílt gyűrű metincsoportjaihoz és az aminohexanol metilcsoportjaihoz tartozik. A kapcsolt aminohexanol középső CH_2 csoportjának 4 protonjához tartozó csúcsok, és a zárt gyűrű metincsoportjához tartozó csúcs integráljaiból számolva a módosítási arány 8,4%-nak bizonyult.

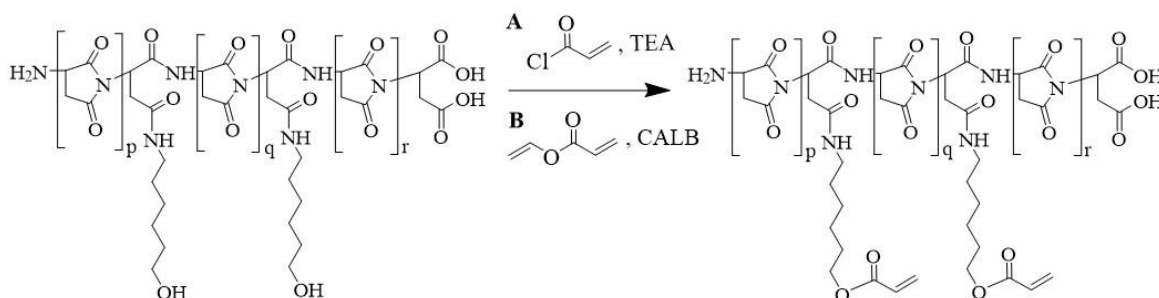


2. ábra.: Poliszukcinimid módosítása 6-aminohex-1-ollal

2.3) Akrilát csoportok kapcsolása a PSI-re

A következő lépés volt az akrilát csoport kapcsolása a PSI-n található hidroxil oldalcsoportokra. Ezt kétféleképpen kíséreltem meg (3. ábra). Elsőként a környezettudatosabb, enzim katalizált reakcióra tettem kísérletet, a *Candida Antarctica* lipase B (CALB) enzimmel mediált vinil-akrilát transzészterifikációjára. A kinyert PSI-AH-t DMSO-ban vinil-akriláttal reagáltattam szobahőmérsékleten 24 óráig, CALB enzim jelenlétében. A vinil-akrilátot az aminohexanolhoz viszonyítva 10%-os feleslegben alkalmaztam. Szilikáreszecskekre rögzített CALB enzimet alkalmaztam (Novozyme 435), melyet a reakció végeztével szűréssel távolítottam el a reakcióelegyből. Az enzimmészítmény mosást, szárítást követően ismét felhasználható - az irodalom, és az eddigi eredmények alapján - jelentős aktivitáscsökkenés nélkül. A polimert ezt követően vízben csaptam ki, majd hideg metanollal mostam, végül vákuumban szárítottam. A polimer ^1H NMR spektrumán nem jelennek meg az akriláthoz tartozó csúcsok, ezért megkíséreltem az akrilát csoportok felvitelét a másik módszerrel is.

A másik módszer az akrilát csoportok felvitelére az $-\text{OH}$ csoportok reakciója akrilóil-kloriddal trietilamin (TEA) jelenlétében enyhe lúgos körülmények között (3. ábra). A reakciót DMSO-ban végeztem, jeges fürdőben, hiszen a reakció jelentős hőtermeléssel jár. 24 óra elteltével a polimert vízben kicsaptam, majd metanollal mostam. A polimert szárítás után ^1H NMR méréssel vizsgáljuk, azonban az eredményeket még nem kaptam meg.



2. ábra: Akrilát csoportok kapcsolása a poliszukcinimidre

A munka folytatásaként a csoport terve, hogy a PSI-n található akrilát csoportokra kapcsolják a folsavat, majd a Doxorubicint CALB enzimmel DMSO-közegben a Puskás Judit csoportja által kidolgozott és korábban publikált eljárás szerint.¹

¹ J.E. Puskas, M. Castano, P. Mulay, V. Dudipala, C. Wesdemiotis, Method for the Synthesis of γ -PEGylated Folic Acid and Its Fluorescein-Labeled Derivative, *Macromolecules*, **2018**, 51

3. Összefoglalás

Összefoglalva a munkát tehát elmondható, hogy a sikeres PSI szintézist követően a Doxorubicin és a folsav közvetlen kapcsolása a polimerre sikertelen volt. Annak ellenére, hogy mindkét molekula rendelkezik szabad primer amincsoporttal, mely elméletileg könnyen reakcióba tud lépni a PSI szukcinimid gyűrűjével, sajnos a molekulák nagy méretéből adódó sztérikus gátlás túl erős volt.

Ezt követően a molekulákat közvetetten próbáltam felvinni a PSI-re, így először a „távtartóként” is funkcionáló aminohexanollal -OH csoportokat, majd azokon keresztül akrilát csoportokat vittem a PSI-re. A munka folytatásaként a fogadó csoport az akrilát csoportokra viszi fel a folsavat és a Doxorubicint, enzim katalizált Michael addícióval. Az így előállított polimer-gyógyszer konjugátum vizsgálata remélhetően egy jövőbeni együttműködés, illetve közös pályázat részét képezi majd.