

ZÁRÓJELENTÉS

a 37188 számú,

**Nagyfelbontású elválasztástechnikai módszerek
(MEKC, CZE) kidolgozása. Gyakorlati alkalmazások biológiailag aktív molekulák
fizikai-kémiai és biológiai tulajdonságainak jellemzésére.**

című pályázathoz

témavezető: Idei Miklós

I. A pályázat az alábbi feladatok végrehajtását tűzte ki:

Az analizált molekulák és a micellák közötti kölcsönhatás jellemzése micelláris elektrokinetikai kromatográfiában (MEKC).

A MEKC-ben alkalmazott pseudostacioner fázisok jellemzése.

Gyógyszermolekulák és biomembránok közötti kölcsönhatás modellezése

Biológiailag aktív molekulák hidrofóbicitásának jellemzése.

Antitumor hatású, illetve multi drug rezisztencia (MDR) ellenes kombinációs molekulakönyvtárak analízise.

Polimer gyógyszerhordozó molekulák jellemzése

II. A pályázat keretében elért eredmények rövid ismertetése

1. Módszerfejlesztés

1.1. Az analizált molekulák és a pseudo-stacioner fázisok közötti kölcsönhatás jellemzése

Módszert dolgoztunk ki a micelláris elektrokinetikai kromatográfiában (MEKC) a normalizált retenciós faktor (k'') felhasználásával az un. fázistartózkodási idő számítására. Ez az adat megadja, hogy az analizált molekula mennyi időt tölt a hidrofil vizes-, illetve a hidrofób micelláris (pseudo-stacioner) fázisban. Először SDS pseudo-stacioner fázison állapítottuk meg, hogy jó lineáris összefüggés van a micelláris fázistartózkodási idő és a kémiai szerkezet

alapján számított lipofilitási érték (CLOGP) között, bizonyítottuk, hogy a micelláris fázistartózkodási idő így alkalmas a molekula lipofilitásának gyors kísérleti meghatározására: minél nagyobb az analizált molekula lipofilitása, annál nagyobb a micelláris fázistartózkodási ideje. A lipofilitás és a micelláris fázistartózkodási idő közötti összefüggés vizsgálatát kiterjesztettük az SDS-en kívül más micellaképzőkre is. Összesen 6, kémiaiilag különböző (kationos és anionos) pszeudo-stacioner fázison (SDS, TTAB, HTAB, SC, SDC, LiPFOS) végeztük el a fázistartózkodási idők meghatározását és a számított lipofilitással (CLOGP) való összevetését. Az SDS-en tett megállapításokat így kiterjeszthetjük, általánosíthatjuk: jó lineáris összefüggés áll fenn az analizált molekula micelláris fázistartózkodási ideje és lipofilitása között (ez a megállapítás nemcsak az SDS esetében igaz).

Bevezettük a relatív (normalizált) fázistartózkodási időt, amely megadja, hogy az analizált molekula teljes analízisidejének mekkora hányadát tölti a pszeudo-stacioner fázisban. A relatív fázistartózkodási idő esetében is bizonyítottuk a számított lipofilitással (CLOGP) való jó összefüggését mind a 6 vizsgált pszeudo-stacioner fázisra. Ez a paraméter, relatív adat lévén, alkalmasabb összehasonlítási célokra, mint az abszolút fázistartózkodási idő.

1.2. Pszeudo-stacioner fázisok jellemzése, összehasonlítása

Az előzőekben nyert adatok nemcsak a vizsgált molekulák lipofilitásának jellemzésére, összehasonlítására, hanem a pszeudo-stacioner fázisként alkalmazott micellaképzők jellemzésére alkalmazhatóak. Kidolgoztunk egy olyan számítási módszert, amellyel egy megfelelően kiválasztott tesztelegy tagjai normalizált micelláris fázistartózkodási időinek meghatározásával egy, az állófázis lipofilitásának számszerű jellemzésére alkalmas adathoz jutunk. Bevezettük a $CLOGP_{50}$ fogalmát: az a lipofilitási (CLOGP) érték, amely $CLOGP$ értékkel rendelkeznie kell egy virtuális molekulának ahhoz, hogy teljes analízisidejének a felét töltsen a micelláris fázisban. Ez az adott fázisra, annak lipofilitására jellemző érték, amely jellemzi az adott állófázis lipofil molekulákkal való kölcsönhatásra való hajlandóságát. Meghatároztuk a vizsgált 6 pszeudo-stacioner fázis $CLOGP_{50}$ értékeit és bizonyítottuk, hogy ez a számadat alkalmas a különböző pszeudo-stacioner fázisok lipofilitásának, a lipofil molekulákkal való kölcsönhatásuk erősségének összevetésére.

Bizonyítottuk, hogy a relatív fázistartózkodási idő, a Martin egyenlet alkalmazásával lehetővé teszi az állófázisok metilén szelektivitásának jellemzését és összehasonlítását is.

1.3. Elválasztási mechanizmus befolyásolása, az elválasztási mechanizmus vizsgálata

1.3.1. Szerves oldószerek, mint puffermódosítók szerepe a CZE elválasztásban

A pályázat végrehajtása során folytattuk a kapilláris elektroforézisben puffer módosítóként alkalmazott szerves oldószerek elválasztásra gyakorolt hatásának vizsgálatát. Megállapítottuk, hogy a szerves oldószerek, mint puffermódosítók megváltoztatják a háttér elektrolit viszkozitását, ez a változás azonban nem elégséges a szerves oldószerek mobilitásra, migrációs sorrendre gyakorolt hatásának magyarázására. Szomatosztatin analóg peptideket, mint modell vegyületeket alkalmazva vizsgáltuk a peptidek diffúzióállandójában a szerves puffermódosító hatására bekövetkező változást. A vizsgált peptideknek a különböző szerves oldószer tartalmú pufferekben kísérletileg (ultracentrifugával) meghatározott ($D_{\text{mért}}$) illetve az Einstein egyenlet alapján számított (D_{calc}) diffúzió állandóit összehasonlítottuk. Bizonyítottuk, hogy a peptid és az alkalmazott szerves oldószer közötti kölcsönhatás eredményeképpen az analizált molekula hidrodinamikai paramétereit befolyásoló konformáció-, illetve solvatáció változás is fellép. Ezek, a diffúzió állandó változását okozó kölcsönhatások is hatással vannak a mobilitásra és ezáltal az elválasztásra, melyeket figyelembe kell vennünk a puffer módosítóknak az elválasztásra gyakorolt hatása vizsgálatakor.

1.3.2. Polimer hordozók vizsgálata, alkalmazási lehetőségei CZE-ben

Polimer bevonatok speciális alkalmazása a kapilláris módosításánál kaphat jelentőséget. Szerepe lehet az elektrooszmotikus áramlás (eof) befolyásolásában, az adszorpció szabályozásában. Különböző polimerek adszorpciós, bevonatképző tulajdonságait, így pluronic blokkos kopolimerek adszorpciójának a szilárd felület nedvesedésére, illetve adszorpciós sajátosságaira gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az orvosi-, illetve gyógyszerészeti gyakorlatban (pl. gyógyszerhordozóként) elterjedten alkalmazott politejsavnak (PLA) hátránya hidrofób jellegéből következő erős hajlama a fehérje/peptid adszorpcióra. Az erősen hidrofób politejsav (PLA) hidrofil poli-etilénoxid (PEO) tartalmú polimerrel (Pluronic) alkotott különböző összetételű kopolimerjeinek felületi adszorpciós tulajdonságait, valamint a különböző összetételű kopolimerek felületének hidrofilitását vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy megfelelő összetételű PLA/Pluronic kevert rendszerek kialakításával a kevert polimer felületének hidrofóbitása, és ezzel a nemkívánatos fehérje-, illetve peptid adszorpció jelentősen csökkenthető. Vagyis a kapilláris falának megfelelő összetételű polimerrel történő bevonásával módosíthatjuk az elektrooszmózist, illetve csökkenteni tudjuk az analizált minta kapilláris falon végbemenő adszorpcióját, az elválasztás során fellépő, az analitikai eredményt

torzítani-, és a reprodukálhatóságot csökkenteni képes mintaveszteséget. Mindezeket, a modell anyagokon megszerzett ismereteket hasznosíthatjuk a jövőben részben a hordozók analízisében, részben pedig az un. biokompatibilis, pl. fehérjék, peptidek analízisére alkalmas kapilláris elektroforetikus módszerek, az ilyen analízisekhez megfelelő felületi tulajdonságokkal rendelkező kapilláris borítások tervezésében, kidolgozásában.

2. Fizikai-kémiai paraméterek meghatározása elválasztási módszerekkel

2.1. pK_a érték meghatározása CZE-vel

Gyors kapilláris elektroforetikus módszert dolgoztunk ki és alkalmaztunk morfolin gyűrűt tartalmazó Mannich ketonok pK_a értékének kísérleti meghatározására. Ezeket a kísérletileg meghatározott értékeket összevetettük a kémiai szerkezet alapján számított pK_a értékekkel. A pH – mobilitás görbék felvétele alapján nemcsak a vizsgált molekulák pK_a értékeit, hanem az elválasztásukhoz szükséges optimális pH értéket is meg tudtuk határozni. Olyan módszert dolgoztunk ki, amely (ellentétben a kémiai szerkezet alapján történő pK_a predikcióval) alkalmasnak bizonyult az egymástól pl. csak a morfolinhoz kapcsolódó gyűrű tagszámában különböző molekulák báziserősség különbségének meghatározására, valamint az ezen pK_a különbség alapján történő elválasztásukhoz szükséges paraméterek gyors meghatározására.

Vizsgáltuk a molekula szerkezete és báziserőssége közötti összefüggést. A báziserősség befolyásolja a Mannich ketonok szerkezeten belüli lebomlása első dezaminációs lépésének a sebességét, ennek a lépésnek pedig döntő szerepe van a Mannich ketonok biológiai hatásossága szempontjából. Az eddigi adatok alapján megállapítható, hogy a Mannich ketonok báziserőssége a szerkezettől függő módon csökkent az anyamolekula (morfolin) báziserősségéhez képest. Ez alátámasztja az előállított új molekulák báziserőssége kísérleti meghatározásának fontosságát, hogy azt összevethessük a későbbi vizsgálatokban ugyanezen molekulák biológiai hatásosságával illetve bomlási mechanizmusával.

2.2. Lipofilitás meghatározása HPLC-vel

Fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszereket dolgoztunk ki különböző szerkezetű molekulakönyvtárak tagjai elválasztására, lipofilitásának jellemzésére. A kísérletileg meghatározott lipofilitási adatokat minden esetben összevetettük ugyanezen molekuláknak a kémiai szerkezet alapján számított lipofilitási értékeivel (CLOGP). Vizsgáltuk a kísérletileg

meghatározott, illetve számított lipofilitási adatok és ugyanezen molekulák biológia aktivitása (citotoxikus-, illetve citosztatikus hatás, tirozin kináz gátló hatás) közötti korrelációt.

A kidolgozott elválasztási módszereket számos, különböző kémiai szerkezeti típusú, antiproliferatív hatású molekulakönyvtár jellemzése során alkalmaztuk (kondenzált-, illetve konjugát Mannich ketonok; auronok, tioauronok, kromanonok, tetralonok és hetero analógjaik, valamint szubsztituált származékaik; oxigén-, illetve kén heteroatomot tartalmazó carboxamide könyvtárak)

Az oxigén-, illetve kén hetero atomot tartalmazó parallel könyvtárak esetében bizonyítottuk, hogy az oxigén kén hetero atomra történő cseréje minden esetben a lipofilitás (retenció) és egyben a molekula biológiai (antiproliferatív) hatásának növekedésével jár.

Bizonyítottuk valamennyi vizsgált molekulakönyvtár esetében a kísérletileg meghatározott és a szerkezet alapján számított lipofilitási adatok közötti jó lineáris korrelációt. Ezzel bizonyítottuk, hogy a megfelelően kidolgozott fordított fázisú HPLC módszer alkalmas arra, hogy felhasználásával a vizsgált molekulák lipofilitását jellemző, kevés anyagot igénylő gyors módszerrel meghatározható számszerű kísérleti adathoz jussunk. A kidolgozott HPLC módszer alkalmasnak bizonyult az izomerek (pl. orto-, para izomerek) elválasztására, a köztük lévő csekély lipofilitási különbség kimutatására. Ugyanezen (egyébként biológiai hatásukban is különböző) izomerek lipofilitási különbségeire a predikciós módszerek nem bizonyultak érzékenyek.

A kísérletileg meghatározott lipofilitási értékek a biológiai aktivitás közötti jó korreláció felhasználható az előállított molekulakönyvtárak tagjai várható biológiai hatásának, gyors mérés alapján történő becslésére. Ez megkönnyítheti a fejlesztés során az első lépésben előállított un. diverz molekulakönyvtárak szűkítését, a szerkezet optimalizálásához a leginkább megfelelő molekulák kiválasztását. A kísérleti lipofilitási érték és a biológiai hatás közötti korreláció meghatározása támpontot adhat a következő sorozatok szintéziseinél a megfelelő aktivitással rendelkező szerkezetek tervezéséhez, és így ezeket az információkat felhasználhatjuk a szintetikus munka (tervezés) támogatására. A kidolgozott módszer gyakorlati alkalmazása során aril-metil tetralon molekulakönyvtár esetében sikerült meghatároznunk a jó antiproliferatív hatás eléréséhez szükséges optimális lipofilitási értéket.

3. MDR (multidrug rezisztencia) ellenes molekulakönyvtár vizsgálata

A kemoterápia súlyos problémája a kezelések során kialakuló multidrug rezisztencia (MDR). Kialakulásának egyik oka bizonyos transzport fehérjéknek a tumoros sejtek plazma membránján való megjelenése és működése. Ezek az ún. multidrug transzporterek katalizálják a citotoxinok sejtéből való eltávolítását, és ezzel akadályozzák a terápiás szereket hatásuk kifejtésében. Csoportunk az előző pályázati ciklusban erősen hidrofób peptideket (REVERSIN[®] elnevezéssel ismertté vált vegyületeket), valamint aminosav- illetve terciér aminosav származékokat állított elő, amelyek felhasználásra számíthatnak az MDR ellenes terápiában. Jelen pályázatban vizsgáltuk tirozin kináz inhibitorok MDR-ben játszott szerepét. Megállapítottuk, hogy a tumoros betegségek klinikai kezelésében jelentős szereppel bíró tirozin kináz inhibitorok szubsztrátjai az MDR proteinnek, amit a terápiás hatékonyság szempontjából nagyon fontos lehet. Ez alapján folytattuk újabb MDR ellenes alkalmazásra kipróbálható peptidek, peptido-mimetikumok előállítását, illetve az előállított molekulák elválasztási módszerekkel (HPLC, MEKC) való minősítését.

III. Összefoglalás

Az elválasztási módszerek fejlesztése során vizsgáltuk a CZE-ben puffer módosítóként alkalmazott szerves oldószereknek az elválasztási mechanizmusra gyakorolt hatását. Megkezdtük a biokompatibilis CZE módszerek kifejlesztése során alkalmazható polimer bevonatok tulajdonságainak, alkalmazhatóságának vizsgálatát.

Bizonyítottuk, hogy a bevezetett normalizált (relatív) micelláris fázistartózkodási idő alkalmas egyrészt az analizált molekulák lipofilitásának kísérleti meghatározására, másrészt – megfelelően megválasztott teszteleg alkalmazásával – alkalmas a MEKC-ben alkalmazandó micelláris (pszeudo-stacioner) fázisok lipofilitásának számszerű jellemzésére. Bizonyítottuk, hogy a CLOGP₅₀ érték alkalmas a micelláris fázisok egymással való összehasonlítására. Ez támpontot adhat a MEKC módszerfejlesztés során az adott elválasztási feladathoz leginkább megfelelő megosztófázis kiválasztására.

CZE és HPLC módszereket dolgoztunk ki a vizsgált molekulák fizikai-kémiai paramétereinek meghatározására. Bizonyítottuk a kísérleti lipofilitási adatok és a molekulák biológiai aktivitása közötti jó összefüggést. Ezeket a módszereket különböző kémiai szerkezetű molekulakönyvtárak jellemzésében, lipofilitásuk meghatározásában, valamint a szintetikus tervezőmunka támogatásában az optimalizálni érdemes szerkezetek kiválasztásában használtuk fel.

IV. A pályázat végrehajtása során elért eredmények

A pályázat keretében elért eredményeinket **9** közleményben, **14** előadásban és **23** poszterben ismertettük, valamint **1** szabadalmi bejelentést tettünk. A pályázat témakörében megjelent közlemények egyesített impakt faktora: **19.57**.

A pályázat témakörében megjelent közleményeinkre az eddigi hivatkozások száma: **9**

V. A kutatómunka folytatásának további lehetséges irányai:

Micelláris elektrokinetikai kromatográfiában a normalizált fázistartózkodási idő és a CLOGP₅₀ érték alkalmazási lehetőségének vizsgálata kevert (többféle micellát) tartalmazó pszeudo-stacioner fázisok jellemzésére.

A kidolgozott elválasztási módszerek (HPLC, CZE, MEKC) gyakorlati alkalmazása antiproliferatív hatású molekulakönyvtárak tagjainak jellemzésére, fizikai-kémiai paramétereik meghatározására. A meghatározott fizikai-kémiai paraméterek és a mért biológiai hatások közötti korreláció elemzése alapján a szintetikus tervezést támogató, illetve az előállított molekulák várható biológiai hatásainak becslésére alkalmas predikciós módszerek kidolgozása és gyakorlati alkalmazása. A meghatározott fizikai-kémiai jellemzők QSAR számításokban történő felhasználása.

2006. február 14.

Dr. Idei Miklós
témavezető