

# Morfinszármazékok konjugált metabolitjainak szintézise

Doktori tézisek

**Dr. Váradi András**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Gergely András egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Czompa Andrea, egyetemi adjunktus, Ph.D.  
Dr. Bölcskei Hedvig, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Lemberkovich Éva egyetemi tanár, Ph.D.  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Krajsovsky Gábor egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Perjési Pál egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest  
2012

## Bevezetés

A gyógyítás során a betegségeket és sérüléseket kísérő fájdalom csökkentése mindig is a terápia egyik nélkülözhetetlen eszköze volt. A gyógyászatban felhasznált leghatékonyabb fájdalomcsillapító szerek közé tartoznak az opioid alkaloidok és a szerkezeti vázelemeik alapján kifejlesztett szintetikus analgetikumok.

A vegyületcsalád legrégebben ismert képviselője az alkaloidként izolált, majd az emberi szervezetben endogén vegyületként is azonosított morfin, amelyet manapság, 200 év után is a legnagyobb mennyiségben alkalmaznak a gyógyításban. Erős fájdalomcsillapító hatása mellett a morfin számos nemkívánatos mellékhatással rendelkezik (pl. eufória, légzésdepresszió, székrekedés, hányinger, hányás, hozzászokás, függőség), amelyek befolyásolják felhasználhatóságát. Mindemellett a morfinszármazékok, mint erős kábítószeresek komoly visszaélési potenciállal is rendelkeznek, ezért hatósági kontroll alatt állnak.

Sok évtizede kiterjedt kutatás folyik az opioidok analgetikus hatásmechanizmusának felderítésére, amelynek alapvető célja, az opioid rendszer felépítésének, működési elveinek megismerésével

új, szelektívebb, káros mellékhatásoktól mentes hatóanyagok kifejlesztése a természetes ópiumalkaloidok (ópiátok) kémiai átalakításával nyert új félszintetikus vegyületek és szintetikus opioidok előállítása révén, amelyek a morfinéhoz hasonló vagy annál erősebb fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek.

A gyógyszerhatás kifejtésének lényeges eleme, amely a gyógyszerek szerkezetbeli sorsát is döntően meghatározza, a hatóanyagok metabolikus átalakulása. A morfinvázas vegyületek esetén is lényeges szerepet játszik a metabolizmus, ezért tekintem át az erre vonatkozó ismereteket. A gyógyszerkémiában a metabolizmus a testidegen anyagoknak tekintett hatóanyagoknak a szervezetben történő biokémiai transzformációit jelenti, a folyamatok során olyan átalakulások játszódnak le, amelyek növelik a vegyületek polaritását, vízdékonyságát, ezáltal segítik a gyógyszermolekulák fokozatos kiürülését, elsősorban a vesén keresztül történő kiválasztását.

Állatkísérletek és humán vizsgálatok adatai szerint a morfin több úton metabolizálódik a három heteroatomon történő enzimatisz átalakításokkal

(a) konjugációs reakciókban morfin-3-*O*-glükuroniddá, morfin-6-*O*-glükuroniddá, morfin-3-

*O*-szulfáttá, morfin-3-*O*-glükoziddá vagy morfin-6-*O*-glükoziddá alakul.

(b) *N*-demetilálással normorfin képződik, ami részt vesz konjugációs és oxidációs reakciókban.

(c) Eddig nem feltárt mechanizmusú oxidációs és redukciós folyamatokban dihidromorfinon keletkezik.

Az 1970-es évek elején fedezték fel, hogy a morfin-6-*O*-glükuronid fájdalomcsillapító hatással rendelkezik. Perifériás adagolást követően a morfin-3-*O*-szulfát és a morfin-3-*O*-glükuronid egyáltalán nem vagy csak minimális fájdalomcsillapító hatást fejt ki. Ezzel éles ellentétben a morfin-6-*O*-glükuronid és a C-6 helyzetben észteresített, szintetikus előállított metabolit analogon morfin-6-*O*-szulfát a morfinnál erősebb fájdalomcsillapító hatékonyságú perifériás adagolás esetén is.

Igény van olyan nagy polaritású, állandó töltéssel rendelkező morfinszármazékok kifejlesztésére, amelyek agyi penetráció nélkül, perifériás adagolás mellett képesek például gyulladáscsökkentő állapotokat kísérő fájdalom csillapítására. Az utóbbi években a morfin metabolitok, valamint kémiai módosításokkal előállított származékaik szintetikus és hatástani

tanulmányozása újra előtérbe került, ezért részben a korábbi eredményekre alapozva kapcsolódtunk morfinvázas vegyületek ismert és potenciális metabolitjainak vizsgálatához, másrészt a mai modern szerkezetvizsgálati eszközökkel felülvizsgálva és kiegészítve a korábbi ismereteket újabb, hatékony származékok kialakítására is törekedtünk.

## **Célkitűzés**

A morfinánvázas vegyületek metabolizmusáról rendelkezésre álló irodalmi közlemények áttekintése alapján célkitűzésünk volt morfin- és kodeinszármazékok metabolikus úton képződő szulfátésztereinek és glükozidjainak előállítására alkalmas szintetikus módszerek tanulmányozása és az irodalmi eljárások kiterjesztése számos természetes metabolit, illetve szintetikus szulfátészter és glükozid metabolitanalagon előállítására. Kevés kivételtől eltekintve a korábban már előállított irodalmi anyagokról nem állt rendelkezésre kielégítő mennyiségű és minőségű spektroszkópiai (NMR, MS, cirkuláris dikroizmus (CD), UV/VIS) adat, így ezek ismételt vagy módosított előállítása és szerkezetvizsgálata is indokoltnak látszott, mégis szintetikus munkánk

jelentős része az irodalomban korábban nem közölt, új molekulák kialakítására irányult.

Irodalmi előzmények alapján a C-14 helyzetben alkoxicsoportot tartalmazó morfinszármazékok kiemelkedő fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek. Célul tűztük ki a 14-metoximorfin, 14-metoxikodein, valamint szulfátészterek előállítását. Bár ikerionos szerkezetük folytán a szulfátészterek látszólag nem képesek átjutni a vér-agy gáton, kiemelkedő farmakológiai aktivitásuk miatt feltehetően perifériás fájdalomcsillapítóként szerepük lehet a jövő klinikai gyakorlatában.

A szintetizált vegyületeink tisztaságát kromatográfias módszerekkel (VRK, HPLC) és spektroszkópiai mérésekkel kívántuk igazolni. Szerkezetük részletes jellemzését mágneses magrezonancia ( $^1\text{H-NMR}$  és  $^{13}\text{C-NMR}$ ) spektrumaik teljes asszignációjával, valamint nagyfelbontású tömegspektrumaik (HRMS) elemzésével terveztük elvégezni. Királis jellemzésükre optikai módszereket (ORD, CD) szándékoztunk bevonni. A spektrális adatok, illetve az általuk hordozott szerkezeti információ egyszerűsíti a morfin metabolitok és metabolit analogonok - akár biológiai mintákból történő - azonosítását, a vegyületekkel kapcsolatos további

vizsgálatokhoz pedig hasznos viszonyítási alapot szolgáltatnak. A tervezett vegyületek potenciális fájdalomcsillapító anyagok, néhány kiválasztott anyag esetében a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetével együttműködésben terveztünk részletes hatástani vizsgálatot.

## Módszerek

A szintézisekhez felhasznált ópiátokat az Alkaloida Vegyészeti Gyár Zrt.-től (Tiszavasvári, Magyarország) szereztük be. A reagenseket a Sigma-Aldrich (Steinheim, Németország) és Alfa Aesar (Ward Hill, MA, Amerikai Egyesült Államok) cégektől származnak. Az oldószereket a Molar Chemicals (Budapest, Magyarország) és a Merck (Darmstadt, Németország) cégek szállították. Az NMR spektroszkópiához felhasznált deuterált oldószerek: >99,5 % izotóptisztaságú DMSO- $d_6$  és >99,5 % izotóptisztaságú kloroform- $d_1$ . A deuterált oldószereket a Sigma-Aldrich és a Merck cégektől rendeltük.

A vegyületek  $^1\text{H-NMR}$  és  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumait Varian 600 MHz VNMRS (Palo Alto, CA, Amerikai Egyesült Államok) spektrométeren

rögzítettük. A kémiai eltolódások ( $\delta$ ) értékei a tetrametil-szilánhoz (TMS) viszonyítva kerültek megállapításra. A spektrumok kiértékelését Varian VnmrJ és MestReNova (Santiago de Compostela, Spanyolország) szoftverek segítségével végeztük. A tömegspektrumokat (szulfátészterek) Agilent 6410 Triple Quad (Santa Clara, CA, Amerikai Egyesült Államok) tripla kvadrupól műszeren rögzítettük elektronspray ionizációval (ESI) és negatív polaritású üzemmódban. A nagyfelbontású tömegspektrumokat (glükozidok) Agilent 6230 time-of-flight (TOF) tömegspektrométerrel rögzítettük ESI-vel, pozitív polaritású üzemmódban. A mintákat Agilent 1260 Infinity folyadékkromatográffal juttattuk a mérőműszerre. A tömegspektrumokat Agilent MassHunter B.02.00 szoftverrel értékeltük. A CD, UV/VIS és ORD spektrumokat Jasco J-720 (Tokyo, Japán) és Jasco J-810 spektropolarimétereken rögzítettük. Morfinszármazékok glükozidjainak folyadékkromatográfiás elválasztásához használt HPLC összeállítása: Jasco PU-980 Intelligent HPLC pumpa, Rheodyne 7725i injektor és Jasco UV-975 Intelligent UV/VIS detektor. Állófázis: Hypercarb (100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) oszlop (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Amerikai



Egyesült Államok). A kromatogramokat Borwin kromatográfiás szoftver (v. 1.21) segítségével rögzítettük. Vékonyréteg-kromatográfia: állófázisként Merck Silica Gel 60 F254 lemezt használtunk.

## **Eredmények**

Szulfátésztereket a megfelelő szabad hidroxilcsoportot tartalmazó morfinszármazékok és feleslegben adott (3 mólekivivalens) piridin-SO<sub>3</sub> komplex reakciójával állítottunk elő vízmentes piridinben, 60 °C-n 3,5 órán keresztül kevertetve. A morfin és a dihidromorfin két hidroxilcsoporttal rendelkezik, az általunk alkalmazott körülmények között mind a kettő készségesen reagál a piridin-SO<sub>3</sub> komplexszel. A C-3 fenolos és a C-6 alkoholos hidroxilcsoport reaktivitása között nincs akkora különbség, ami lehetővé tenné a közvetlen regioselektív reakciót, ezért a monoszubsztituált szulfátészterek szintézise kizárólag védőcsoportok alkalmazása mellett valósítható meg. Munkánk során a hozzáférhetőség, egyszerű kivitelezés és eltávolíthatóság miatt acetyl védőcsoportokat alkalmaztunk.

Előállítottuk a morfin, dihidromorfin, kodein és dihidrokodein, valamint ugyanezen vegyületek

kvaterner nitrogénatomot tartalmazó származékainak és egyes antagonisták szulfátésztereit. Szintetizáltuk a 14-metoxikodeint, 14-metoximorfint és ezek szulfátésztereit. A szulfát monoészterek előállítását piridin-SO<sub>3</sub> komplex, a szulfát diésztereket kénsav/DCC reagensek alkalmazásával oldottuk meg.

Morfinszármazékok glükozidjainak szintéziséhez glükózforrásként  $\alpha$ -acetobrómglükózt használtunk. C-6 helyzetben az *O*-glükozilálást a Koenigs-Knorr módszerrel valósítottuk meg. A megfelelő védőcsoporttal ellátott morfinszármazékot benzolban oldottuk, majd ezüst-karbonát aktivátor jelenlétében  $\alpha$ -acetobrómglükózzal végeztük a glükozilálást.

A 3-*O*-glükopiranozilmorfin szintézisét más módszerrel valósítottuk meg: A morfint  $\alpha$ -acetobrómglükózzal kevertettük acetonban híg vizes nátrium-hidroxid oldat hozzáadását követően. A nyers termékeket oszlopkromatográfiával tisztítottuk. Az acetyl védőcsoportok eltávolítására leírt Zemplén módszer (katalitikus mennyiségű nátrium-metoxid) nem eredményezett homogén terméket, a glükozidos kötés is jelentős mértékben bomlott szenvedett. Az acetyl védőcsoportok eltávolítását az acetilezett köztitermékeket lítium-

hidroxid kis feleslegével (1,2 mólekvalens lítium-hidroxid) metanolos oldatban szobahőmérsékleten kevertetve végeztük.

A vegyületek részletes spektroszkópai elemzését elvégeztük (NMR, MS, CD, UV/VIS). Kidolgoztunk egy egyszerű és gyors HPLC eljárást morfin és kodein glükozidjainak az anyavegyületeiktől és glükuronidkonjugátumaiktól való elválasztására. Kiválasztott anyagok hatástani vizsgálatát a SE Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetben végezték, a 14-metoximorfin-6-*O*-szulfát a morfinnál mintegy 2000-szer erősebb fájdalomcsillapító, hatástartama is hosszabb és perifériás adagolás esetén is hatékony. A vegyület a jövőben akár a klinikai gyakorlatban is felhasználást nyerhet perifériás fájdalomcsillapítóként.

## **Következtetések**

- A széleskörűen tanulmányozott opioid rendszer felépítésének, működésének és szabályozásának folyamatosan bővülő ismeretanyaga mindig újabb irányokat jelöl ki a gyógyszerkémia számára a fájdalomcsillapítás kezelésének megoldására. Máiig megoldatlan feladat a morfinhoz mérhető erősségű, de sokkal kevesebb káros mellékhatással

rendelkező félszintetikus vagy szintetikus opioid kifejlesztése.

- Az opioid rendszerre ható metabolit típusú vegyületek vizsgálata az utóbbi évek során az izolálási, szerkezet-meghatározási és farmakológiai kutatások eredményeinek köszönhetően előtérbe került. Kutatócsoportunk a világszerte folyó opioidkémiaili kutatásokba morfin-származékok metabolitjainak és szintetikus metabolitanalogonjainak előállításával kapcsolódott be. Doktori munkám során szulfátészterek és glükozidok előállítására szolgáló szintetikus módszereket tekintettem át. Ezeket némely esetben továbbfejlesztve alkalmaztam számos morfin-származék szulfát- és glükozidkonjugátumainak előállítására.

- Doktori értekezésemben a potenciális opioid metabolitok és új hatóanyag-származékok fejlesztése során a morfin-származékok körében 20 új szulfátésztert, valamint 4 új C-3 és C-6 glükozidot állítottam elő. A szelektív észterezésűeket alkalmas védőcsoportok használatával oldottuk meg. Részletes szerkezeti és királis elemzéssel jellemeztük az előállított anyagokat.

- Előállítottuk morfin- és kodeinszármazékok szulfát monoésztereinek sorozatát. Szintetizáltuk a morfin-3,6-*O*-diszulfát és oximorfon-3,14-*O*-diszulfát diésztereiket. Az egyszeres szulfátészterek túlnyomó többségét piridin-SO<sub>3</sub> komplex reagenssel állítottuk elő, egy részüket, elsősorban a diszulfátokat tömény kénsavval, DCC jelenlétében szintetizáltuk.
- A kvaterner nitrogénatomot tartalmazó opioid antagonisták állandó töltésük miatt nem jutnak át a vér-agy gáton, ezért a gyógyászatban felhasználják őket az opioidkezelés perifériás mellékhatásainak csökkentésére. E vegyületek mintájára előállítottuk a naloxon és naltrexon szintén állandó töltéssel rendelkező szulfátésztereit. A két antagonistában C-14 helyzetben szulfátésztercsoportot tartalmazó származéka a bélcsatornából feltehetően nem képes felszívódni, azonban MOR antagonisták hatásuknak köszönhetően alkalmasak lehetnek orálisan adagolva a morfinterápia egyik legfontosabb mellékhatásának, a székrekedésnek kiküszöbölésére.
- Vizsgáltuk a szulfátészterezés szelektivitását C-14 helyzetben hidroxilcsoportot tartalmazó morfinszármazékokban. Megállapítottuk, hogy a piridin-SO<sub>3</sub> komplex készségesen reagál terciár

alkohollokkal, így alkalmas morfinszármazékok C-14 tercier hidroxilcsoportjának észterezésére is. 14-Hidroxi-származékok C-6 szulfátészterei csak a C-14 hidroxilcsoport védését követően valósítható meg.

- Az előállított szulfátésztereket különféle spektroszkópiai módszerekkel részletesen jellemeztük. Tizenhat szulfátészter esetében a teljes NMR spektrum asszignációját homo- és heteronukleáris, egy- és kétdimenziós mérések elemzése alapján elvégeztük, az összes proton- és szénjel egyértelmű hozzárendelése megtörtént. Az anyagok spektrális viselkedése alapján következtetéseket vontunk le szerkezetüket illetően.
- A szulfátészterek részletesen bemutatott  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR, valamint CD, ORD és UV/VIS elnyelési adatai további fiziko-kémiai vizsgálatok számára teremtenek stabil alapot, de jelentősen megkönnyítik az anyagok biológiai mintákból történő azonosítását is.
- Az előállított ikerionos szulfátészterek többsége potenciális perifériás fájdalomcsillapító hatású anyag, az ikerionos szerkezetre jellemző állandó töltésnek köszönhetően feltehetően minimális központi idegrendszeri mellékhatással. Néhány

kiválasztott szulfátészter hatástani tulajdonságait a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetben vizsgálták.

- Előállítottuk a C-14 helyzetben metoxicsoportot tartalmazó 14-metoxikodeint és 14-metoximorfint, valamint ezek szulfátésztereit. A 14-metoximorfin-6-*O*-szulfát három nagyságrenddel erősebb fájdalomcsillapítónak bizonyult, mint a morfin, de a morfin-6-*O*-szulfátnál is hatásosabbnak találták. Fontosabb megfigyelés, hogy a 14-metoximorfin-6-*O*-szulfát a bőr alá adva is sokkal hatékonyabbnak bizonyult, mint a morfin. További vizsgálatok szükségesek a mellékhatások feltérképezésére, de reményeink szerint a 14-metoximorfin-6-*O*-szulfát a jövő klinikai gyakorlatában szerepet kaphat, mint perifériás fájdalomcsillapító.
- Morfin- és kodeinszármazékok összesen hat glükozidját szintetizáltuk, a glükozidok és a szintézisük acetilezett köztitermékeinek szerkezeti tulajdonságait NMR, CD és UV/VIS spektroszkópiával vizsgáltuk. Az előállított glükozidok feltehetően előnyös farmakokinetikai tulajdonságú, aktív molekulák, melyek akár ópiát prodrugként is felhasználást nyerhetnek.
- Kifejlesztettünk egy hatékony HPLC módszert a glükozidok és glükuronid metabolitok

elválasztására, az eljárás alkalmas lehet biológiai mintákból glükozidok izolálására.

- A szintetizált morfin és kodein glükozidok kedvező vízdékonysággal rendelkező vegyületek, melyek a szulfátészterekkel és glükuronidokkal ellentétben nem ikerionos szerkezetűek, így a fájdalomcsillapító terápiában esetlegesen prodrugként nyerhetnek felhasználást.

## **Saját publikációk jegyzéke**

### **Folyóiratcikkek az értekezés témájában:**

1. Váradi A, Gergely A, Béni Sz, Jankovics P, Noszál B, Hosztafi S, (2011) Sulfate esters of morphine derivatives: Synthesis and characterization. Eur J Pharm Sci, 42 (1-2): 65-72.
2. Lackó E, Váradi A, Rapavi R, Zádor F, Riba P, Benyhe S, Borsodi A, Hosztafi S, Tímar J, Noszál B, Füst S, Al-Khrasani M, (2012) A novel  $\mu$ -opioid receptor ligand with high in vitro and in vivo agonist efficacy. Curr Med Chem, 19 (27): 4699-4707.
3. Váradi A, Lévai D, Tóth G, Horváth P, Noszál B, Hosztafi S, (2012) Glucosides of morphine



derivatives: synthesis and characterization. *Monatsh Chem*, DOI: 10.1007/s00706-012-0868-4.

**Az értekezés témájához nem kapcsolódó folyóiratcikkek:**

1. Takács M, Bubenyák M, Váradi A, Blazics B, Horváth P, Kőkösi J, (2011) Synthesis of novel ceramide-like penetration enhancers. *Tetrahedron Lett*, 52 (16): 1863-1865.
2. Jankovics P, Váradi A, Tölgyesi L, Lohner Sz, Németh-Palotás J, Kőszegi-Szalai H, (2011) Identification and characterization of the new designer drug 4'-methylethcathinone (4-MEC) and elaboration of a novel liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) screening method for seven different methcathinone analogs. *Forensic Sci Int*, 210 (1-3): 213-220.
3. Kőkösi J, Váradi A, Bubenyák M, Rácz Á, Takács M, Horváth P, Noszál B, Szász Gy, Hermecz I, (2011) Bioizoszter alkaloid hibridek szintézise. *Magyar Kémikusok Lapja*, 56: 263-264.

4. Jankovics P, Váradi A, Tölgyesi L, Lohner Sz, Németh-Palotás J, Balla J, (2012) Detection and identification of the new potential synthetic cannabinoids 1-pentyl-3-(2-iodobenzoyl)indole and 1-pentyl-3-(1-adamantoyl)indole in seized bulk powders in Hungary. *Forensic Sci Int*, 214 (1-3): 27-32.
5. Váradi A, Horváth P, Kurtán T, Mándi A, Tóth G, Gergely A, Kökösi J, (2012) Synthesis and configurational assignment of 1,2-dihydroimidazo[5,1-b]quinazoline-3,9-diones: novel NMDA receptor antagonists. *Tetrahedron*, 68 (50): 10365-10371.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom *Dr. Noszál Béla* igazgató úrnak, hogy a Gyógyszerészi Kémiai Intézetben végezhettem munkámat.

*Dr. Hosztafi Sándornak*, aki doktori témámat kialakította, napi szinten felügyelte munkámat és iránymutatásával segítette a kutatási téma előrehaladását.

Témavezetőmnek, *Dr. Gergely Andrásnak*, aki témaválasztásommal egyetértett, és a disszertációs munka során felmerülő problémák megoldásában mindig segítségemre volt.

*Dr. Kökösi Józsefnek* az önzetlen segítségéért, ötleteiért, a szakmai és tudományos együttműködésért.

*Dr. Horváth Péternek* a szakmai együttműködésért, inspiráló beszélgetésekért.

*Dr. Takácsné Novák Krisztinának* az oktatással és szakmai kérdésekkel kapcsolatos segítségéért, tanácsaiért.

Minden szerzőtársamnak munkájukért és tanácsaikért.

*Dr. Béni Szabolcsnak* és *Mazákné Dr. Krasznai Mártának* az NMR vizsgálatokban nyújtott segítségért, *Tóth Gergőnek* a HRMS, *Dr. Jankovics Péternek* az ESI-MS mérésekért. *Schmidtné Farkas Gabriellának* és *Matalin Istvánnának* a technikai kivitelezésben nyújtott segítségükért.

*Dr. Fürst Zsuzsannának és Dr. Mahmoud Al-Khrasaninak,* a SE Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet munkatársainak az együttműködési lehetőségért, a hatástani vizsgálatokért és ötleteikért.

*A Richter Gedeon Centenáriumi Alapítványnak* az anyagi támogatásért.