

Biológiailag aktív, többcsoportos molekulák észterhidrolízis sebességének jellemzése részecske- specifikus paraméterekkel

Doktori tézisek

dr. Szöcs Levente

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Noszál Béla, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Hegedűs Tamás, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Gáspár Vilmos, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, D.Sc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Krajsovszky Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2017

1. Bevezetés

Észtercsoportot tartalmazó vegyületek nagy számban találhatók a gyógyszerkincsben, de számos kábítószer is észter típusú molekula, mint például a kokain és a heroin.

Az észtercsoportot tartalmazó vegyületek legfontosabb biotranszformációs útvonala a hidrolízis, ami következtében történhet hatáscsökkenés, esetleg hatásvesztés, profarmakonok esetében viszont a hidrolízis eredményez biológiailag aktív molekulát.

Éppen ezért a hidrolízis kinetikájának egzakt mennyiségi jellemzése nagyon fontos a vegyületek metabolizmusának vizsgálata szempontjából, illetve az új prodrugok tervezésénél is.

A heroin és a kokain (I. táblázat), a két legismertebb kemény drog, egyaránt két észter- és egy aminocsoportot tartalmaz. Részleges hidrolízisük során a keletkező termékeken egy észtercsoport mellett megjelenik egy újabb protonálható csoport is, mely nagyban befolyásolja a metabolizmus további lépéseit.

A heroin (3,6-diacetilmorfin) (1. ábra) a morfin funkcionális prodrug-ja, így híres-hírhedt hatásainak farmakokinetikai fázisában heroinként, farmakodinámiás fázisában pedig – hidrolízis után – morfinként funkcionál, és utóbbi formában kötődik a receptorhoz. A heroin molekula két észter- és egy aminocsoportot tartalmaz. Hidrolízisében az észtercsoportok száma csökken, a bázikus csoportok száma azonban nőhet is, amennyiben a hármask helyzetű észtercsoport hidrolizál elsőként. Bomlásának sebességét elektronküldő és –szívó tényezők egyaránt befolyásolják, ezért ideális modellvegyület a hidrolízis sebességét befolyásoló intramolekuláris tényezők általános megismeréséhez, így prodrugok tervezéséhez.

A kokain (1. ábra) központi idegrendszeri hatásainak kiváltásához mind a 2-es pozícióban lévő karboxilcsoportnak, mind a 3-as helyzetben lévő szekunder alkoholos hidroxilcsoportnak észteresítve kell lenniük. A molekula részleges hidrolízise hatásvesztéshez vezet, ezért a hidrolízis egzakt kinetikai és termodinamikai ismerete elengedhetetlen a vegyület

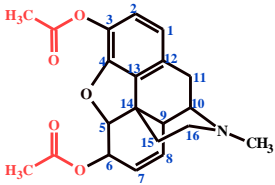
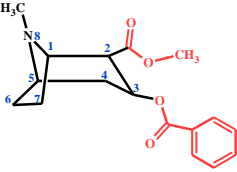
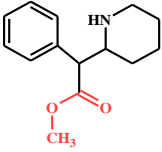
farmakokinetikájának és farmakodinámiájának megértéséhez.

Közös pontok a heroin és a kokain estében, hogy a hidrolízis kaszkád 4 kovalens rendszert, 10 protonálódási állandót, 10 hidrolízis mikroállandót, benne konszekutív és szimultán kinetikai elemeket is tartalmaz, ezért – bár a molekulák és hatásaik mintegy 120 éve ismertek – részletes bomláskinetikájukat még nem tárták fel. A teljes részecske-specifikus hidrolízis feltérképezéséhez szükség volt a közti és a végtermékek protonálódási mikro- és makroállandóinak meghatározására illetve a közti termékek részecske-specifikus sebességi állandóinak meghatározására is.

A metilfenidát (1. ábra) egy pszichotróp vegyület, amit főleg figyelemhiányos hiperaktivitás-zavarban (ADHD) illetve narkolepsziában szenvedő betegek kezelésére használnak. Magyarországon fokozottan ellenőrzött szerként van nyilvántartva. Szerkezetét tekintve egy észter- és egy szekunder aminot tartalmaz. Hidrolízis után a keletkező vegyület már nem rendelkezik biológiai hatásokkal. A metilfenidát esetében is

feltérképeztük a vegyület részecske-specifikus hidrolízis sebességi illetve protonálódási makro- és mikroállandóit.

A vizsgált vegyületek szerkezetét az 1. ábra foglalja össze.

		
3,6-diacetilmorfin	kokain	metilfenidát

1. ábra Vizsgált vegyületeink szerkezete

2. Célkitűzések

Céljaim közt szerepelt a két legismertebb kemény drog, a kokain és a heroin, illetve egy pszichotróp szer, a metilfenidát hidrolízisének feltérképezése, különös tekintettel a különböző protonáltsági állapotok hatásainak vizsgálata a hidrolízis sebességére. A heroin és a kokain két-két észtercsoportot tartalmaznak, hidrolízisük első lépésében is észterek keletkeznek, ezért a teljes hidrolízis

leírásához szükségünk van a közttermékek hidrolízis kinetikáinak meghatározására is.

Ezen kívül a vegyületek és származékaik protonálódási makro- és mikroállandóinak meghatározása 37 °C-n is a céljaim között szerepelt, figyelembe véve, hogy az egyik vegyület - a benzoilelgonin - egyensúlyi állandó értékeire az irodalomban nincs egységes állásfoglalás.

3. Módszerek

Minden mérést állandó hőmérsékleten ($t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$) végeztünk, az oldatok ionerősségét KCl hozzáadásával állítottuk be konstans értékre ($I=0,15\text{M}$).

Egyensúlyi állandók meghatározása: Az egyensúlyi állandókat NMR-pH titrálással határoztam meg. A pH-t egy Metrohm 6.0234.110 pH kombinált üvegelektóddal felszerelt Metrohm 780-as pH mérővel határoztam meg. A mért pH-k az NBS által előírt 4 puffer kalibrációiból lettek számolva, amelyek a következők: 0,05 M kálium-tetraoxalát ($\text{pH}=1,690$), 0,05 M kálium-hidrogén-ftalát ($\text{pH}=4,022$), 0,025 M kálium-dihidrogén-foszfát+0,025 M dinátrium-hidrogén-foszfát ($\text{pH}=6,841$) és 0,01 M bórax puffer ($\text{pH}=9,088$). A vizsgált vegyületek 5% (v/v) nehézvizet tartalmazó 0,01 M HCl-ban illetve NaOH-ban lettek feloldva. Az oldatok elegyítése és pH mérés után vettem fel az ^1H NMR spektrumokat. Az ionerősséget minden esetben 0,15 M-ra állítottam be NaCl segítségével. Az adatok kiértékelése Origin 8 programmal történt.

Hidrolízis sebességi állandók meghatározása:

A hidrolízis nyomon követése *in situ* történt NMR spektroszkópiával. A bomlások vizsgálata pufferelt közegben történt, melyet 0,05 M nátrium-dihidrogén-foszfát és 0,025 M bórax különböző arányával állítottam be. Az észterekből 2-5 mg-ot mértem be, majd 2 ml puffert adtam hozzá, ami 5% nehézvizet tartalmazott. A hidrolízist legalább az anyavegyület 75%-os bomlásáig követtem. 8,5-ös pH alatt 20-30 percenként vettem fel egy spektrumot, 8,5 fölött pedig 5-7 percenként. Morfin észterek esetében a hidrolízis nyomon követésére az aromás, a 7-es, a 8-as, az 5-ös, a 6-os, az N-metil illetve a metoxi-csoportok protonjait használtam fel. Az ekgonin észtereknél a 2-es, a 3-as az N-metil, illetve ahol lehetett az *O*-metil és az aromás protonok jeleit használtam a hidrolízis nyomon követésére. A metilfenidát bomlása során az *O*-metil, a fenil gyűrű orto helyzetű protonjait illetve a két kiralitáscentrum protonjait (az α helyzetű szénatom és a mellette lévő kiralitáscentrum) követtem nyomon. A vízelnyomás miatt az oldószer közelében lévő jeleket nem használtam a kinetikai számításokban. Az adatok kiértékelése és az állandók kiszámítása

nemlineáris paraméterillesztéssel az Origin 8 programmal történt.

4. Eredmények

Meghatároztam hét morfinán vázas vegyület – a heroin, a kodein, a 6-acetilkodein, a 6-acetil-*N*-metilmorfin, a 3-acetilmorfin, a 6-acetilmorfin és a morfin – makroszkopikus protonálódási állandó értékeit NMR-pH titrálást követő nemlineáris paraméterillesztéssel. A morfin és a 6AM esetében a mikroállandók is meghatározásra kerültek.

Meghatároztam továbbá a kokain, az ekgonin-metilészter, a benzoilekgonin-metilamid és a benzoilekgonin makroszkopikus protonálódási állandó értékeit. A BE és az ekgonin esetén a mikroállandókat is meghatároztuk. Az ekgonin észterek protonálódási állandó értékeit potenciometriás titrálással is meghatároztuk.

Megmértem a metilfenidát és a ritalinsav makroállandóit is NMR-pH titrálással, az utóbbi esetében kiszámoltam a mikroállandókat is.

Meghatároztam a metilfenidát, a heroin illetve a kokain részecske- (és oldallánc-) specifikus hidrolízis sebességi állandóit. Ezen kívül meghatároztam a heroin és a kokain köztes hidrolízis termékeinek is a részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandóit is. Új módszert dolgoztam ki a két észter- és egy protonálható csoportot tartalmazó vegyületek konszekutív és szimultán hidrolízisének a leírására.

A különböző hidrogén-ion koncentráció mellett meghatározott látszólagos észterhidrolízis sebességi állandókból, számítottam ki az észterek egyes mikrorészecskéihez tartozó pH-független, részecske- és (oldallánc-)specifikus észterhidrolízis sebességi állandókat. Alacsonyabb pH-n a hidrolízis lassabb folyamat, akár több hétig is eltarthat, ezért az alacsonyabb pH-n mért részecske-specifikus sebességi állandók értékeinek nagyobb a hibája, mint a magasabb pH-n mért állandók értékeinek.

5. Következtetések

Doktori munkám során három észter típusú farmakon hidrolízis kinetikáját térképeztem fel, amelyek a következők: metilfenidát, kokain és heroin. Kettő közülük (a heroin és a kokain) két észter- és egy protonálható csoportot tartalmaznak, ezért bomlásuk során mind szimultán, mind konszekutív folyamatokat is figyelembe kell venni.

Kutató munkám eredményeképpen szubmolekuláris szinten magyarázhatóvá vált számos eddig csak empirikusan ismert tény a kokain, a heroin illetve a metilfenidát biokémiai szerepével kapcsolatban. Legfontosabb tudományos eredményeim és az ezekből levonható következtetések az alábbiakban foglalhatóak össze:

Meghatároztam a kokain, a heroin, a metilfenidát és származékaik makroszkopikus protonálódási állandóit ^1H NMR-pH titrálással. Deduktív módszer segítségével meghatároztam az alábbi molekulák mikroszkopikus protonálódási állandó értékeit szintén ^1H NMR-pH titrálással: 6-acetilmorfin, morfin, benzoilekgonin,

ekgonin és ritalinsav. Az ekgonin vázas észterek protonálódási állandóit direkt potenciometriás módszerrel is meghatároztuk, mivel az irodalomban főleg a benzoilekgoninra vonatkozóan ellentmondásos adatokat találtam. Minden mérést 37 °C-n és $I=0,15$ M ionerősség mellett végeztem.

A morfinán vázas vegyületek esetében megállapítottam, hogy egy acetilcsoport bevitele - akár 3-as akár 6-os helyzetbe - minden esetben csökkenti az aminocsoport bázicitását.

Az ekgonin vázas vegyületek esetén a benzoilekgonin protonálódási állandói hasonlítanak az α -aminosavak protonálódási állandó értékeihez. A jelenség magyarázata az, hogy a terciér amino- és a karboxilcsoport térben nagyon közel helyezkedik el egymáshoz és egy intramolekuláris hidrogén-híd jöhet létre a két funkciós csoport között.

Megállapítottam továbbá, hogy mind a kettes, mind pedig a hármas helyzetben történő észteresítés a vegyület bázicitását csökkenti.

Meghatároztam egy pszichoaktív szer, a metilfenidát illetve két kemény drog, a kokain és a heroin részecske- és oldallánc-specifikus hidrolízis sebességi állandóit.

A heroin és a kokain is egy protonálható és két észtercsoportot tartalmaznak. Hidrolízisük során keletkező köztitermékek szintén rendelkeznek egy észtercsoporttal. Először a köztitermékek részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandóit határoztam meg: a 3-acetilmorfinét és a 6-acetiolmorfinét illetve a benzoilekgoninét és az ekgonin-metilészterét. Ezután sor került a heroin és a kokain részecske- és oldallánc-specifikus hidrolízis sebességi állandóinak a meghatározására is.

A heroin és származékai esetében megvizsgáltam a molekula protonáltsági állapotának és acetilcsoportok számának szerepét a hidrolízis sebességére. Az ekgonin észtereknél megvizsgáltam a protonáltsági állapotok, a sztérikus effektusok és az oldalláncok szerepét a hidrolízis sebességére.

A metilfenidát egy észtercsoportot tartalmaz, azonban jelentős különbség adódott a semleges és a protonált forma hidrolízisének sebessége között.

Összességében elmondható, hogy protonálódás hatására csökken az elektronsűrűség, a hidrolízis sebessége pedig minden esetben gyorsabb lesz.

A sebességet továbbá az oldalláncok is jelentősen befolyásolják, mert egy nagy térkitöltésű csoport (pl. benzoil) hatására a nukleofil támadás „nehezebbé” válik, bimolekuláris reakció révén a tetraédes intermediér kialakulása is lassúbb lesz, ami a hidrolízis sebességének csökkenéséhez vezet.

A vegyületek részecske-specifikus hidrolízis sebességi állandóinak a meghatározásának elméleti és gyakorlati jelentősége van.

Elméleti szinten most először kíséreltük meg a szimultán és konsekutív folyamatok együttes kezelését több észtercsoportot tartalmazó vegyületek esetén, meghatározva azokat az intramolekuláris tényezőket, amik az észtercsoport környékén lévő elektroneloszlást

befolyásolják, így hatással vannak a hidrolízis sebességére.

A sebességi állandók meghatározásának gyakorlati jelentősége abban rejlik, hogy információt szolgáltat a molekulák hidrogénion kötő képességéről, így jobban értelmezhetők a farmakokinetikai illetve farmakodinámiás tulajdonságok, főleg az észterázokhoz való kötődés.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapját képező publikációk

1. **Levente Szöcs**, Gábor Orgován, Gergő Tóth, Márta Kraszni, Lajos Gergő, Sándor Hosztafi, Béla Noszál. (2016) Site-and Species-specific Hydrolysis Rates of Heroin, Eur J Pharm Sci, **89**:105-114,
2. **Levente Szöcs**, Ákos Urai, Gergely Völgyi, Gergő Tóth, Sándor Hosztafi, Béla Noszál (2017) Site-and Species-specific Hydrolysis Rates of Cocaine, J Pharm Biomed Anal, **145**:372-378

Az értekezés alapját nem képező közlemények

1. Rusu Aura, Gergo Toth, **Levente Szöcs**, József Kökösi, Márta Kraszni, Árpád Gyéresi, Béla Noszál. (2012) Triprotic Site-specific Acid-base Equilibria and Related Properties of Fluoroquinolone Antibacterials

J Pharm Biomed Anal, **66**:50-57

2. Zoltán-István Szabó, **Levente Szöcs**, Daniela-Lucia Muntean, Béla Noszál, Gergő Tóth. (2016) Chiral Separation of Uncharged Pomalidomide Enantiomers Using Carboxymethyl-beta-cyclodextrin: A Validated Capillary Electrophoretic Method

Chirality, **28** (3):199-203

3. Zoltán-István Szabó, Foroughbakhshfasaei Mohammadhassan, **Levente Szöcs**, József Nagy, Balázs Komjáti, Béla Noszál, Gergő Tóth. (2016) Stereoselective Interactions and Liquid Chromatographic Enantioseparation of Thalidomide on Cyclodextrin-bonded Stationary Phases

J Incl Phenom Macrocycl Chem, 85 (3):227-236

4. Zoltán-István Szabó, **Levente Szöcs**, Balázs Komjáti, József Nagy, Béla Noszál, Gergő Tóth. (2016) LC-MS Enantioseparation of Pomalidomide on Cyclodextrin-bonded Chiral Stationary Phases and Elucidation of Chiral Recognition Mechanisms by NMR Spectroscopy and Molecular Modeling

J Sep Sci, **39**(15):2941-2949

5. Ákos Urai, András Váradi, **Levente Szöcs**, Balázs Komjáti, Valerie Le Rouzic, Amanda Hunkele, Gavril Pasternak, Susruta Majumdar, Sándor Hosztafi. (2017) Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Selective MOR Agonist 6 β -Pyridinyl Amidomorphines Exhibiting Long-lasting Antinociception

Med. Chem.Comm. **8**, 152-157

6. Zoltán-István Szabó, Réka Gál, **Levente Szöcs**, Róbert Ludmerczki, Daniela-Lucia Muntean, Béla Noszál, Gergő Tóth:

Validated capillary electrophoretic method for the
enantiomeric quality control of R-praziquantel
Electrophoresis, 2017, in press

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Noszál Bélának doktori munkám irányításáért.

Köszönöm Dr. Tóth Gergőnek és Dr. Orgován Gábornak az NMR mérésekben nyújtott segítségért.

Külön köszönet illeti meg Dr. Hosztafi Sándort és Urai Ákost a modellvegyületek szintézisében nyújtott segítségért.

Köszönöm Dr. Völgyi Gergelynek az értékes konzultációkat és a potenciometriás titrálásokban való segítséget.

Köszönöm Dr. Gergó Lajosnak a matematikai levezetésekben nyújtott segítségét.

Hálával tartozom a Gyógyszerészi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának a baráti atmoszféra megteremtéséért.

Végül, de kiemeltem szeretném hálás köszönetemet kifejezni Családomnak, hogy nyugodt, szeretetteljes háttérrel biztosítottak számomra.