



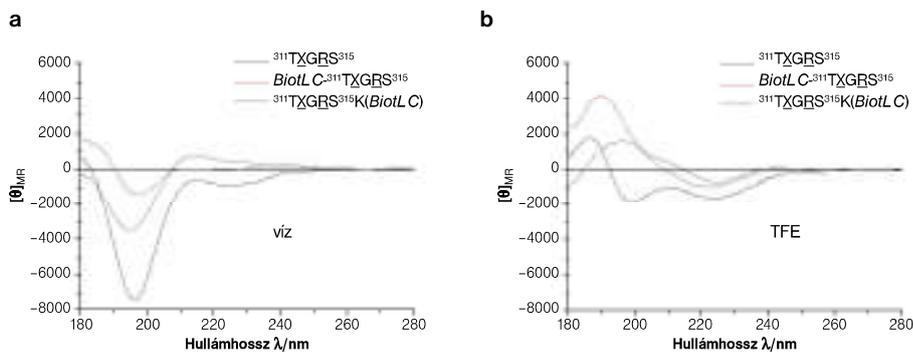
filaggrin<sup>311-315</sup> epitópok arginin- és citrullin-tartalmú analógiáinak spektrális tulajdonságait vízben és trifluoretanolban (TFE), és azt tapasztaltuk, hogy az arginin-citrullin csere nincs hatással a peptidek oldatbeli szerkezetére.

Ezenkívül a citrullin-tartalmú biotin nélküli és biotinnal konjugált epitóp peptidek ECD-spektrumait is összehasonlítottuk (2–3. ábra).

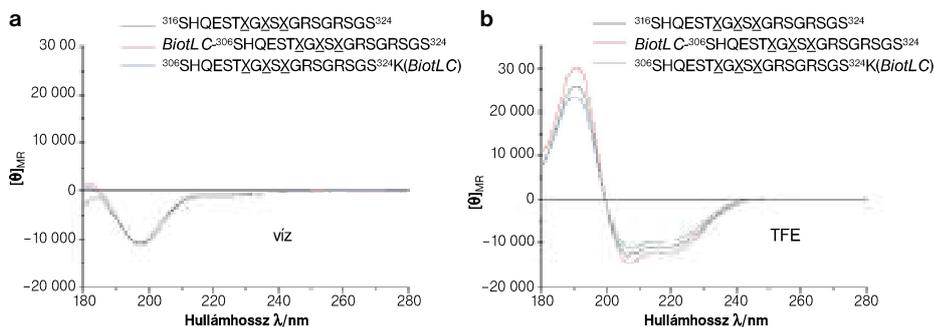
Azt tapasztaltuk, hogy a filaggrin<sup>311-315</sup> epitóp esetén a biotin jelenléte és helyzete nagymértékben befolyásolja a peptid konformációját, mind vízben, mind TFE-ben. Ezzel szemben a filaggrin<sup>306-324</sup> epitóp régió konformációjára lényegében nincs hatással.

Az eredményekből arra következtetünk, hogy a filaggrin<sup>306-324</sup> epitóp régió esetén csak a peptid primer szerkezete határozza meg az RA-specifikus autoantitesthez való kötődést. A biotin helyzete ebben az esetben azért nem befolyásolta a kötődést, mert az epitóp magja, a minimum epitóp az epitóp régió szekvenciájának a közepén helyezkedik el, egyenlő távolságra mind az N-, mind a C-terminálistól. Ezzel szemben az filaggrin<sup>311-315</sup> minimum epitóp esetén mind a primer, mind a szekunder szerkezet hatással van az antitestkötődésre. Ezzel azt is bizonyítottuk, hogy a biotin pozíciója nagymértékben befolyásolja a kötődést és így az ELISA érzékenységét is [5].

A fibrin epitópok esetén is (ELISA-mérések alapján) megfigyelhettük a filaggrin epitópoknál is látható különbségeket, amelyet a biotin pozíciója és ezáltal a peptidek orientációja okoz: a fibrin  $\alpha$ -láncának epitópjai esetén a C-terminális biotinálás az előnyösebb. A fibrin  $\beta$ -láncán lévő epitó-



2. ábra. A filaggrin <sup>311</sup>TXGRS<sup>315</sup> minimum epitóp és biotinnal konjugátumainak ECD spektrumai a) vízben és b) trifluoretanolban



3. ábra. A filaggrin <sup>306</sup>SHQESTXGXSGXGRSGRSGS<sup>324</sup> epitóp régió és biotinnal konjugátumainak ECD-spektrumai a) vízben és b) TFE-ben

pok esetén az N-terminális biotinálás a kedvezőbb [7].

Végül következtetésként arra jutottunk, hogy a biotin-avidin komplex árnyékoló hatása érvényesül, vagyis a biotin pozíciója – és ezáltal a peptidek orientációja – az ELISA-kísérletekben meghatározó. Ez a tény új megközelítést ad az ELISA-alapú diagnosztikumok fejlesztésének.

IRODALOM

[1] Vincent, C. et al., *Autoimmunity* (2005) 38, 17–24.  
 [2] Magyar, A. et al., *Collection Symposium Series* (2011) 13, 80–84.  
 [3] Sebbag, M. et al., *Eur. J. Immunol.* (2006) 36, 2250–2263.  
 [4] Iobagiu, C. et al., *J. Autoimmunity* (2011) 37, 263–272.  
 [5] Babos, F. et al., *Bioconjugate Chem.* (2013) 24, 817–827.  
 [6] Szarka, E. et al., *Immunology* (2014) 141, 181–191.  
 [7] Cornillet, M. et al., *Ann. Rheum. Dis.* (2014) 73, 1246–1252.

Hosztafi Sándor

■ Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet

# Opiooid metabolitok előállítása és tulajdonságai

**A** gyógyszerkémiaiában a metabolizmus a testidegen anyagoknak tekintett hatóanyagok szerkezetben történő biokémiai transzformációit jelenti. A folyamatok során olyan átalakulások játszódnak le, amelyek növelik a vegyületek polaritását, vízoldékonyságát, ezáltal segítik a gyógyszer-molekulák fokozatos kiürülését, elsősorban a vesén keresztül történő kiválasztását.

Az opiooidok metabolizmusa [1] detoxifikációs folyamat, de eredményezhet aktív és inaktív metabolitokat is. A metabolizmus elsősorban a májban játszódik le, amely erre a célra enzimeket termel. Az opiooidok esetén számolni kell O-dealkilációval, N-demetilációval, oxocsoport-redukcióval, dezacetilációval (heroin): így az 1. fázisú metabolitok képződnek. Glükur-

onsavas konjugációval a glükuronidok, míg kénsav konjugációval a szulfátészterek képződnek, melyek az úgynevezett 2. fázisú metabolitok.

A metabolitok szintézisének tanulmányozása fontos az opiooidok metabolizmusának vizsgálata szempontjából, ugyanis az azonosításhoz autentikus minta előállítása szükséges, és az anyavegyülettől való



elválasztáshoz analitikai módszert kell kidolgozni. Lényeges szempont a metabolit biológiai aktivitásának a meghatározása, mivel a metabolit lehet aktív metabolit vagy toxikus hatású.

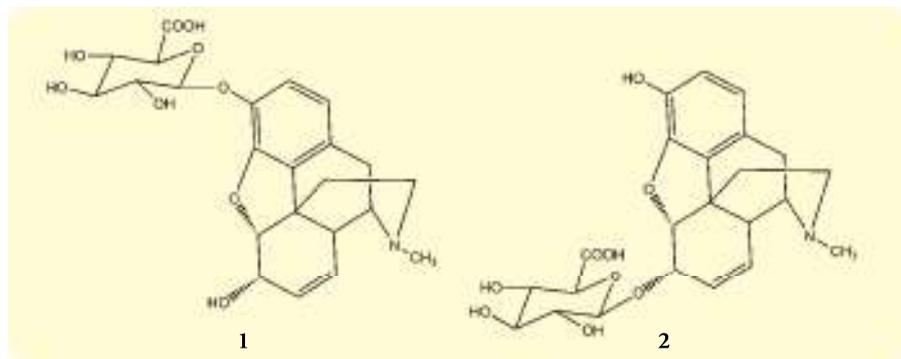
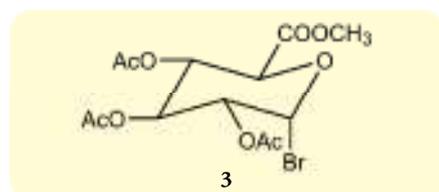
Az utóbbi években az opioid metabolitok, valamint kémiai módosításokkal előállított származékaik szintetikus és farmakológiai tanulmányozása újra előtérbe került, ezért részben a korábbi eredményekre alapozva kapcsolódunk morfinvázas vegyületek ismert és potenciális metabolitjainak vizsgálatához, másrészt a mai modern szerkezetvizsgálati eszközökkel felülvizsgálva és kiegészítve a korábbi ismereteket újabb, hatékony származékok előállítására is törekedtünk.

### Glükuronid-konjugátumok előállítása

A morfin két legfontosabb humán metabolitja a morfin-3-glükuronid (1) és a morfin-6-glükuronid (2). Az adagolás módjától függően a morfindózis 45–55%-a C-3 glükuroniddá és 10%-a C-6 glükuroniddá alakul. Az opioidok esetén jelentős first-pass metabolizmussal kell számolni a májban, mielőtt belépnek a szisztémás keringésbe. A farmakológiai vizsgálatok alapján a morfin-6-glükuronid hatékonyabb fájdalomcsillapító, mint az anyavegyület morfin, és igazolták, hogy a morfin adagolásakor képződő morfin-6-glükuronid hozzájárul a morfin fájdalomcsillapító hatásához. A morfin-6-glükuronid képződése elsősorban ismétlődő orális adagolás esetén számottevő [1,2].

A morfin- és kodeinszármazékok C-6 glükuronidjait Koenigs–Knorr-reakcióban [3–5] állítottuk elő, glikozil-komponensként az  $\alpha$ -bróm-triacetil-glükuronsav-metilésztert (3) reagáltattunk 3-O-acilmorfinnal (4) és kodeinnel (5), az aktivátor ezüst-karbonát volt. A védőcsoportokat tartalmazó C-6 glükuronidokat (6,7) lítium-hidroxiddal egy lépésben hidrolizáltuk metanolban vagy tetrahidrofurán oldószerben. A kodein és a morfin C-6 glükuronidok katalitikus hidrogénezésével a megfelelő dihidroszármazékokat nyertük.

### 2. ábra. 2-Br-triacetil-glükuronsav-metilészter



1. ábra. Morfin-3- és morfin-6-glükuronid

A morfin és  $\alpha$ -bróm-triacetil-glükuronsav-metilészter reakcióját metanolban lítium-hidroxid jelenlétében végrehajtva sikerült izolálni a védőcsoportokat tartalmazó C-3 glükuronidot, melynek további hidrolízisével kaptuk a morfin-3-glükuronidot. Utóbbi vegyület katalitikus hidrogénezésével dihidromorfin-3-glükuronidhoz jutottunk.

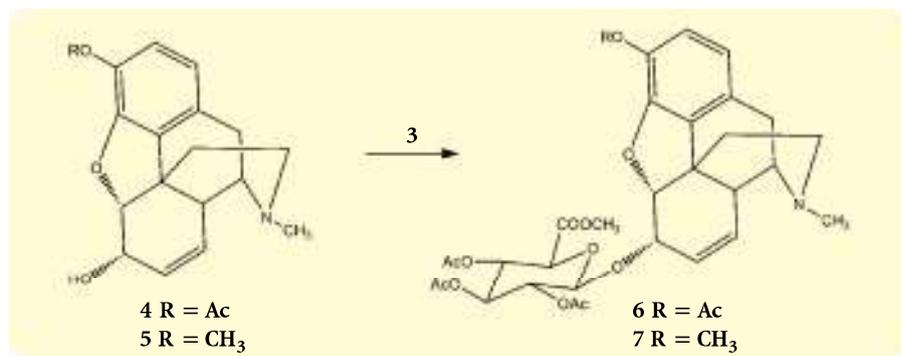
Az opioid-antagonista naloxon és naltrexon C-3 glükuronidjait is a morfin esetében alkalmazott módszerrel sikerült preparálni. Megoldottuk a norkodein-6-glükuronid szintézisét is: a kodein C-6 védett glükuronidot (7) N-demetileztük klórhangyasav  $\alpha$ -klóretilészterrel, majd a kapott köztiterméket metanollal reagáltatva kaptuk a norkodein C-6 védett glükuronid só-

savas sóját, melynek a hidrolízise vezetett a konjugált norkodeinhez.

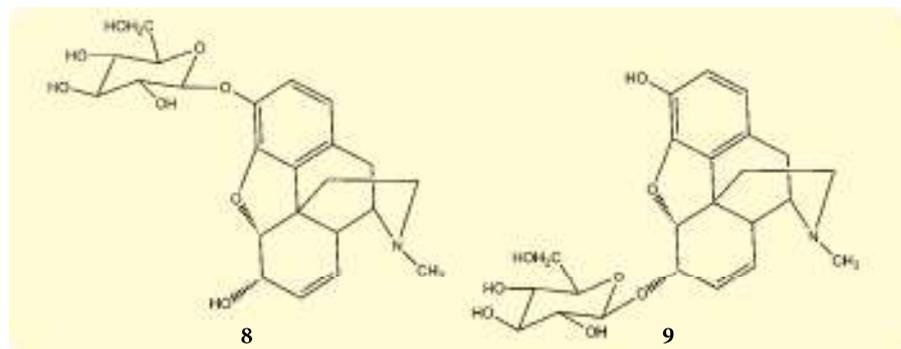
### Morfinszármazékok C-3 és C-6 glükozidjainak előállítása

Egy kínai kutatócsoport [6] a morfin-metabolizmust vizsgálva a morfin-3-glükuronid és a morfin-6-glükuronid detektálása mellett beszámol két új metabolit azonosításáról is: kimutatták a morfin-3-glükozid (8) és a morfin-6-glükozid (9) képződését. Orálisan adagolt morfinnal kezelt daganatos betegek vizeletében a metabolitokat HPLC segítségével választották el, majd a tiszta frakciók tömegspektrumát meghatározva igazolták a két új metabolit szerkezetét. Mindkét glükozid hidrolizált

### 3. ábra. C-6 glükuronidok szintézise



4. ábra. Morfin-3- és morfin-6-glükozid



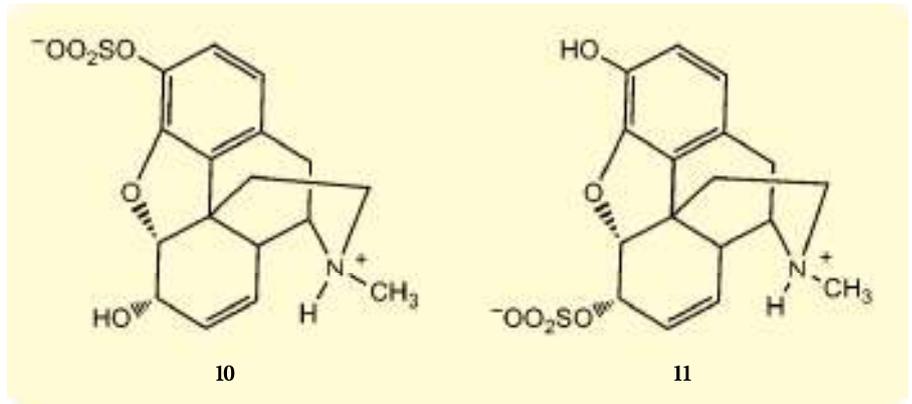


$\beta$ -glükozidáz enzimmel és morfin keletkezett. Autentikus mintákkal nem rendelkeztek.

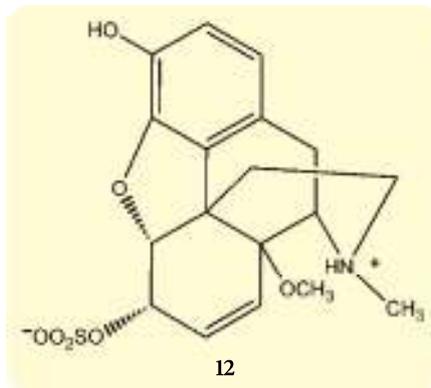
Tanulmányoztuk a morfin, illetve kodein C-6 glükozidjainak előállítását [7] a Koenigs-Knorr-reakcióval. Cukorkomponensként acetobrom-glükózt, aktivátorként ezüst-karbonátot használtunk. A reakcióban C-6  $\beta$ -anomer glükozidok tetraacetátjai képződtek. A vegyületek szerkezetét és térkémiáját NMR-vizsgálattal igazoltuk. Korábban a kodein-6-glükuronid tetraacetát-metilészter hidrolízisével sikerrel alkalmaztuk a lítium-hidroxidot. Ez a módszer itt is bevált, mivel a kodein-6-glükozid tetraacetátot metanolban kis feleslegben vett (1,2M LiOH/acetilcsoport) lítium-hidroxiddal a reakció szobahőmérsékleten kb. három óra alatt lejátszódik számottevő bomlás nélkül. A hidrolízis termékek szerkezetét egyrészt a tömegspektrumok, másrészt az NMR-spektrumok igazolták. Az összes vizsgált glükozid-származék  $^1\text{H}$ -NMR-spektrumában a H-1' és H-2' protonok csatolási állandója 7,0 és 8,0 Hz közötti. Ez bizonyítja azt, hogy a Koenigs-Knorr-reakcióval előállított glükozidok  $\beta$ -anomerek. A C-3 glükozidok előállításánál morfint és dihidromorfint reagáltattunk acetóban, lúg jelenlétében, acetobrom-glükózzal. A reakcióban C-3 glükozid-tetraacetátok képződtek, melyeknek a szerkezetét szintén NMR- és MS-vizsgálatok bizonyították. A metanolos lítium-hidroxidos hidrolízis ezeknél a vegyületeknél is a várt C-3 glükozidokat eredményezte. Valamennyi vegyületre részletes NMR-analízist végeztünk.

### Morfinszármazékok szulfátészterei

Szulfátkonjugáció csak a morfin fenolos hidroxilcsoportján játszódik le, a morfin-3-szulfátészter (10) morfinfüggő egyének vizeletéből izolálható mint minor metabolit. Ezzel szemben a morfinnal kezelt macskák és csirkék vizeletében a morfin-3-szulfátészter a fő metabolit. A metabolit-analógon morfin-6-szulfátészter (11) erős fájdalomcsillapító hatású.



5. ábra. Morfin C-3 és C-6 szulfátészterei



6. ábra. 14-O-metil-morfin-6-szulfátészter

Új módszert dolgoztunk ki [8] a morfin- és kodeinszármazékok szulfátésztereinek szintézisére: a reakciót piridinben piridin-kén-trioxid komplexfelesleggel végeztük. A morfin reakcióiban a C-3, illetve C-6 hidroxilcsoportokat acetilezéssel védjük, majd az észterítés után az O-acetil-csoportokat hidrolizáltuk. Morfin és dihidromorfin kvaterner nitrogénatomot tartalmazó szulfátésztereinek előállításánál célszerű első lépésben a morfin és dihidromorfin megfelelő hidroxilcsoportjának acetilezése. A C-6, illetve C-3 helyzetben acetilezett anyagokat reagáltattuk acetóban metil-joddal. A kvaterner nitrogénatomot tartalmazó morfin- és dihidromorfin-származékok a már ismertetett eljárással szulfátészterezhetőek. Az acetil-

védőcsoport hidrolízise után jutottunk a végtermékekhez.

Vizsgálataink szerint a C-14 helyzetben tercier hidroxilcsoportot tartalmazó vegyületek (pl. oxikodon) is észterezhetőek a piridin-kén-trioxid komplex alkalmazásával. A fenolos hidroxilcsoport védelme lehetővé tette a naloxon-14-szulfátészter és a naltrexon-14-szulfátészter szintézisét. Előállítottuk a C-14 helyzetben metoxycsoportot tartalmazó 14-metoxi-kodeint és 14-metoximorfint, valamint ezek szulfátésztereit. A 14-metoximorfin-6-O-szulfát (12) három nagyságrenddel erősebb fájdalomcsillapítónak bizonyult, mint a morfin, de a morfin-6-O-szulfátnál is hatásosabb [9].

### IRODALOM

- [1] H.S. Smith, Clin. Journal of Pain (2011) 27, 824.
- [2] H. Kalász, G. Petrojanu, S. Hosztafi, F. Darvas, T. Csermely, E. Adeghate, A. Siddiq and K. Tekes, Mini Reviews in Medicinal Chemistry (2013) 13, 1560.
- [3] E.M. Kaspersen, C.A.A. Van Boeckel Xenobiotica (1987) 17, 1451.
- [4] A. V. Stachulski, G.N. Jenkins Nat. Products Rep. (1998) 15, 173.
- [5] A. V. Stachulski, X. Meng Nat. Products Rep. (2013) 30, 806.
- [6] X.Y. Chen, L.M. Zhao, DE Zhong Br. J. Clin. Pharmacol. 55 570 (2003)
- [7] A. Váradi, D. Lévai, G. Tóth, P. Horváth, B. Noszál, S. Hosztafi Monatshefte für Chemie (2013) 144, 255.
- [8] A. Váradi, A. Gergely, Sz. Béni, P. Jankovics, B. Noszál, S. Hosztafi : Eur. J. Pharmaceut. Sci. (2011) 42 , 65.
- [9] E. Lackó, A. Váradi, R. Rapavi, F. Zádor, P. Riba, S. Benyhe, A. Borsodi, S. Hosztafi, J. Timár, B. Noszál, S. Fürst, M. Al-Khrasani Curr. Med. Chem. (2012) 19, 4699.



## A legnagyobb európai K+F vállalatok listájára került a Richter

Az Európai Bizottság december elején állította össze azoknak a gazdasági társaságoknak a rangsorát, amelyek az Európai Unióban a legtöbb pénzt költik kutatási és fejlesztési programokra.

A Richter – amely 2013-ban mintegy 42 milliárd forintot, éves árbevételének a 12 százalékát költötte kutatás-fejlesztésre – a 166. helyen áll az összesített listán, a gyógyszeripari vállalatok rangsorában pedig a 19. helyen végzett.

A lista élén három autóiipari társaság áll, a közép-kelet-európai régióból a Richterén kívül egyetlen cég sem került be az első kétszázba. Az eredményekből az is kiderül, hogy a legnagyobb K+F „költő” cégeket Nagy-Britannia, Németország és Franciaország adja. (A hvg.hu nyomán)

ZA