

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2588.

KÖTELES ISTVÁN

A gyógyszerészeti tudományok korszerű kutatási irányai
című program

Programvezető: Dr. Antal István, egyetemi tanár

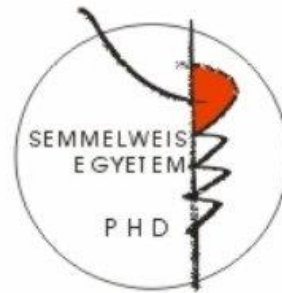
Témavezető: Dr. Hosztafi Sándor, tudományos főmunkatárs

Morfinvázás haptének szintézise és szerkezetvizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Köteles István

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hosztafi Sándor, CSc., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Bölcskei Hedvig, CSc., c. egy. docens
Dr. Deme Ruth, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Keserű Miklós György, MTA lev. tagja,
kutatóprofesszor
Dr. Zelles Tibor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2021

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| Rövidítések jegyzéke | 5 |
| 1. Bevezetés (irodalmi áttekintés) | 6 |
| 1.1. Kábítószer helyzetkép | 6 |
| 1.2. A mák és a morfin | 7 |
| 1.3. Kábítószer-vakcináció | 9 |
| 1.3.1. Általános megfontolások | 10 |
| 1.3.2. Opioid vakcinák | 11 |
| 1.3.3. Haptének | 14 |
| 1.3.4. Radio-immunanalítika | 18 |
| 1.4. Morfin vegyületek funkcionalizálása | 20 |
| 1.4.1. 3- <i>O</i> -alkil haptének | 21 |
| 1.4.2. <i>N</i> -alkil haptének: karboxil-származékok | 23 |
| 1.4.3. C6-haptének | 27 |
| 1.4.4. <i>N</i> -alkil haptének: ciano-származékok | 27 |
| 1.4.5. <i>N</i> -alkil haptének: amino-származékok | 30 |
| 1.4.6. Anti-oxikodon haptének | 30 |
| 1.4.7. Anti-heroin haptének | 31 |
| 2. Célkitűzések | 42 |
| 3. Módszerek | 44 |
| 3.1. Alkalmazott reakciók | 44 |
| 3.2. Reagensek és oldószerek | 44 |
| 3.3. Műszeres módszerek és vékonyréteg-kromatográfia | 44 |
| 4. Eredmények | 46 |
| 4.1. 3- <i>O</i> -karboximetil-haptének szintézise | 46 |
| 4.1.1. 3- <i>O</i> -karboximetil-haptén észterek szintézise | 46 |
| 4.1.2. 3- <i>O</i> -karboximetil-haptén észterek hidrolízise | 48 |
| 4.2. <i>N</i> -karboxialkil-haptének szintézise | 49 |
| 4.2.1. <i>N</i> -demetilizési reakciók | 49 |
| 4.2.2. <i>N</i> -karboxialkil-haptén észterek előállítása | 50 |
| 4.2.3. <i>N</i> -karboxialkil-haptén észterek hidrolízise | 52 |
| 4.3. <i>N</i> -acetilglicin-haptének szintézise | 52 |

| | |
|---|----|
| 4.3.1. <i>N</i> -karboxialkil-haptének kapcsolási kísérlete..... | 52 |
| 4.3.2. <i>N</i> -acetilglicin-haptén észterek előállítása norvegyületekből..... | 53 |
| 4.3.3. <i>N</i> -acetilglicin-haptén észterek hidrolízise | 54 |
| 4.4. <i>N</i> -aminoalkil-haptének szintézise..... | 54 |
| 4.4.1. Etilénketál-védőcsoport kialakítása C6-oxo-származékoknál | 54 |
| 4.4.2. <i>N</i> -cianoalkil-haptén prekursorok szintézise..... | 55 |
| 4.4.3. <i>N</i> -cianoalkil-haptén prekursorok redukciója..... | 56 |
| 5. Megbeszélés | 57 |
| 5.1. Norvegyületek előállítása és jellemzése..... | 57 |
| 5.2. 3- <i>O</i> -karboximetil-haptének | 57 |
| 5.3. <i>N</i> -karboxialkil-haptének | 58 |
| 5.4. <i>N</i> -acetilglicin-haptének..... | 59 |
| 5.5. <i>N</i> -cianoalkil-haptén prekursorok..... | 60 |
| 5.6. Kísérletes rész..... | 61 |
| 5.6.1. 3- <i>O</i> -karboximetil-haptének szintézise..... | 61 |
| 5.6.1.1. 3- <i>O</i> -karboximetilhaptén észterek szintézise..... | 61 |
| 5.6.1.2. 3- <i>O</i> -karboximetilhaptén észterek hidrolízise..... | 63 |
| 5.6.2. <i>N</i> -karboxialkil-haptének szintézise | 66 |
| 5.6.2.1. <i>N</i> -demetilizési reakciók | 66 |
| 5.6.2.2. <i>N</i> -karboximetil-haptén észterek szintézise | 69 |
| 5.6.2.3. <i>N</i> -karboximetil-haptén észterek hidrolízise..... | 72 |
| 5.6.2.4. <i>N</i> -karboxietil-haptén észterek szintézise | 75 |
| 5.6.2.5. <i>N</i> -karboxietil-haptén észterek hidrolízise..... | 78 |
| 5.6.3. <i>N</i> -acetilglicin-haptének szintézise..... | 81 |
| 5.6.3.1. <i>N</i> -acetilglicin-haptén észterek szintézise..... | 81 |
| 5.6.3.2. <i>N</i> -acetilglicin-haptén észterek hidrolízise | 84 |
| 5.6.4. <i>N</i> -cianoalkil-haptén prekursorok szintézise..... | 87 |
| 5.6.4.1. <i>N</i> -cianometil-haptén prekursorok szintézise | 87 |
| 5.6.4.2. <i>N</i> -cianoetil-haptén prekursorok szintézise | 90 |
| 6. Következtetések..... | 93 |
| 7. Összefoglalás | 95 |
| 8. Summary..... | 96 |

| | |
|--------------------------------------|-----|
| 9. Irodalomjegyzék | 97 |
| 10. Saját publikációk jegyzéke | 103 |
| 11. Köszönetnyilvánítás | 104 |

Rövidítések jegyzéke

| | |
|----------------------|--|
| BSA | bovine serum albumin = szarvasmarha szérumfehérje |
| cAMP | ciklikus adenzin-monofoszfát |
| CPBAD | competitive protein binding assay = vetélkedő fehérjekötési analízis |
| DCCI | <i>N,N'</i> -diciklohexil-karbodiimid |
| DSM-5 | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders |
| EDAC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid |
| EDTA | etilén-diamin-tetraecetsav |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay = enzim kapcsolt immunanalitika |
| ENSZ | Egyesült Nemzetek Szervezete |
| GPCR | G-protein coupled receptor = G-fehérje kapcsolt receptor |
| HOBt | 1-hidroxibenzotriazol |
| IgG | immunglobulin G |
| KLH | keyhole limpet hemocyanin |
| MVD | mouse vas deferens = egér <i>vas deferens</i> |
| NOP | nociceptin opioid peptid receptor |
| NORBNI | norbinaltorfimin |
| Red-Al | nátrium bisz-(2-metoxietoxi-alumíniumhidrid) |
| RIA | radioimmunoassay = radio-immunanalitika |
| sc. | <i>subcutan</i> |
| SM(PEG) ₂ | szukcinimid-maleimid-polietylén-glikol |
| TT | tetanusz toxoid |

1. Bevezetés (irodalmi áttekintés)

1.1. Kábítószer helyzetkép

A kábítószer abúzus és függőség jelen korunk társadalmának egyik komoly problémája. [1,2] Az ENSZ 2020-as World Drug Report-ja szerint a szerhasználók száma (amibe beletartoznak az egyszeri és többszöri használók is) az elmúlt egy év alatt 210 millió főről 269 millióra nőtt. A tiltott szerek közül a kannabisz (192 millió), az opioidok (58 millió, ebből 30 millió ópiát), a pszichostimulánsok (48 millió) és a kokain (19 millió) a legnépszerűbbek. [3] Az illegális ópiumtermelő országok száma 50-re tehető, viszont az elmúlt 5 évben a feketepiacon jelenlévő mennyiség 97%-át három ország szolgáltatta: Afganisztán (84%), Mianmar (7%) és Laosz (1%). Világviszonylatban a mákföldek területe 2018-ban 17%-kal, majd 2019-ben 30%-kal csökkent, viszont még így is nagyobb területről beszélünk (240 800 ha), mint 10 évvel ezelőtt. Ráadásul az aszály és fertőzések se tépázták meg a terményt, így a területvesztés ellenére a termelés csak 0,1%-kal csökkent. 7 610 tonna ópiumból becslések szerint 472-722 tonna tiszta heroint állítottak elő a kábítószer kereskedelem számára.

A hatóságok által lefoglalt heroin és morfin mennyisége szintén elgondolkodtató. Európában 30 tonnát koboztak el, amivel megdőlt a 2008-as 29 tonnás rekord. Az amerikai kontinensen évek óta folyamatosan emelkedik a lefoglalt mennyiség. Ugyanakkor az egyik legaggasztóbb számadat, az évente elveszett egészséges életévek számában mutatkozik meg. Noha 192 millió kannabisz használóval számolhatunk, 2017-ben a 42 millió elveszett egészséges életévek 80%-áért opioid szerek voltak felelősek. [3] Ebből is látszik, hogy az opioidok abúzusa komoly károkat okoz mind társadalmilag, mind gazdaságilag, éppen ezért az ellene való küzdelem mindannyiunk közös érdeke.

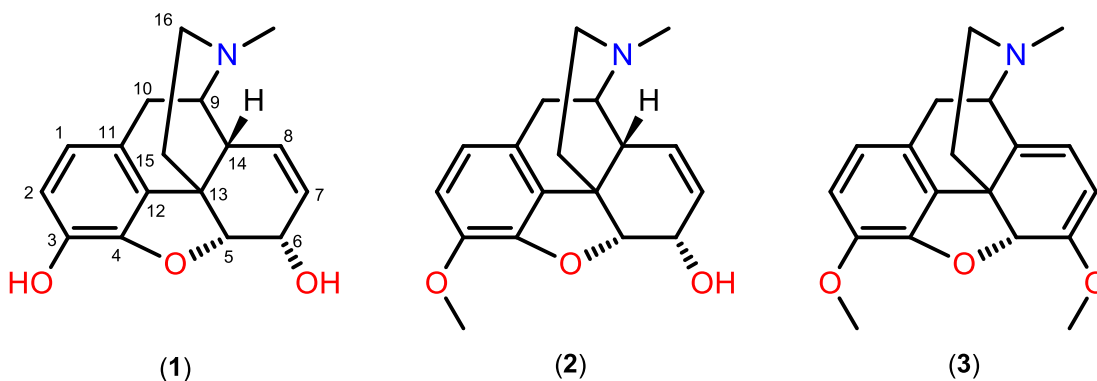
1.2. A mák és a morfin



1. ábra *Papaver somniferum* L.

(https://hu.wikipedia.org/wiki/Kerti_m%C3%A1k#/media/F%C3%A1jl:Papaver_somniferum_-_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-102.jpg, letöltve: 2021.02.23.)

A kerti mák (*Papaver somniferum* L.) (1. ábra) az egyik fontos kultúrnövényünk. A boglárkavirágúak (*Ranunculales*) rendjében a mákfélék (*Papaveraceae*) családjának



tagja. Magját étkezési, míg a növényből kinyerhető alkaloid típusú vegyületeit gyógyászati célokra használjuk fel. A növényben előforduló morfin (1) és kodein (2) (sok más egyéb vegyülettel együtt) nem csak a gyógyításban fontosak, hanem a tebainnal (3) együtt gyógyszeripari alapanyagként is jelentősek. Kabay János magyar gyógyszerész 1931-es szabadalma a morfin száraz mákszalmából való kinyerésére, mind a mai napig a morfin ipari méretű előállításának alapját képezi az egész világon. [4]

A morfin és származékai hatástanilag a major analgetikumok csoportjába tartoznak. [5,6] Ezek a vegyületek kiemelt fontossággal bírnak a krónikus és súlyos fájdalmak

enyhítésében. Hatásukat a szervezet opioid-receptorain fejtik ki. Jelenleg négy típust különböztetünk meg egymástól, μ , κ , δ és nociceptin opioid fehérje (NOP) receptorokat. Mindegyik a G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) családjába tartozik, azon belül is a $G_{i/o}$ alcsaládba. Az adenilát-cikláz gátlása révén csökkentik a cAMP szintet, ami a cAMP-függő fehérje kinázok gátlásában nyilvánul meg. Az egyes receptorokon agonisták által kiváltott hatásokat/mellékhatásokat az 1. táblázat foglalja össze. (A NOP-receptor hatásai nem kerültek feltüntetésre, mivel nem, vagy alig kötik a morfinvázas vegyületeket.)

1. Táblázat Agonisták élettani hatásai az opioid-receptorokon [5,6]

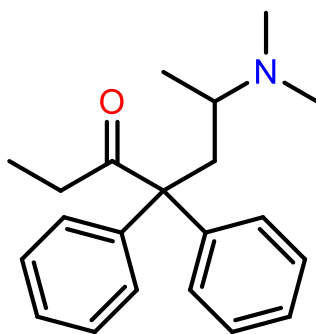
| Hatás | μ -receptor | δ -receptor | κ -receptor |
|---------------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| Fájdalomcsillapítás | +++ | +/- | ++ |
| Szedáció | ++ | - | ++ |
| Légzésdepresszió | +++ | ++ | - |
| Székrekedés | ++ | ++ | + |
| Eufória | +++ | - | - |
| Diszfória | - | - | +++ |
| Depresszió | - | - | +++ |
| Hallucináció | +/- | - | +++ |
| Fizikai dependencia | +++ | - | + |

+/- nem egyértelmű; - nincs hatás; + alacsony hatás; ++ közepes hatás; +++ erős hatás

Jól látható, hogy az analgetikus hatásért többé-kevésbé mindegyik receptor felel, míg az életet veszélyeztető mellékhatások jelentős részéért a μ -receptor okolható. A legfontosabbak ezek közül a légzésdepresszió, az obstipáció, és az eufória. Utóbbival a rekreációs célú használatkor kell kifejezetten számolni, ami függőséghez és hosszútávú használat során tolerancia, illetve addikció kialakulásához vezethet. Az addikció általában olyan súlyos függőségi állapotot jelent, amelyben fizikai és pszichés dependencia együttesen van jelen. [7] Ezt az Amerikai Pszichiátriai Társaság, mint pszichiátriai betegséget definiálta. A kritériumrendszer a *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-5) tartalmazza, amely nemzetközileg egységes szempontrendszer alkalmazását teszi lehetővé. [8] A pszichés dependencia (függőség) droggereső magatartásban, a szer megszerzésére kényszerítő vágyban, sóvárgásban manifesztálódik, míg fizikai dependenciáról akkor beszélhetünk, amikor a szerek

megvonása jellegzetes elvonási vagy absztinencia-szindrómát idéz elő, amelynek tünetei sokszor ellentétesek az illető drog akut hatásaival („*rebound*”), és rendszerint annak már csekély dózisaival enyhíthetők (szuppresszió). Ez általában hosszabb szerhasználat következtében alakul ki.

A központi idegrendszer érintettsége miatt kezelése összetett, energia-, idő- és pénzigényes. A gyógyszeres terápián túl kiemelten fontos a beteg pszichés, emocionális és szociális támogatása is. Az opioid függőség kezelésére legelterjedtebb módszer a metadon (4) szubsztitúciós terápia. [9] Ennek lényege, hogy a függőség tárgyát képező



(4)

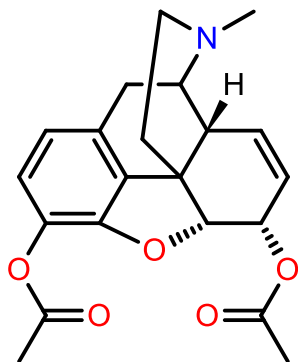
szernél hosszabb felezési idejű, de ugyanolyan potens metadonra szoktatják át a beteget. Ezt követően elhagyják az abuzált szert, majd pedig folyamatosan csökkentik a metadon mennyiségét is. A hosszabb felezési idő miatt az elvonási tünetek enyhébbek és jobban tolerálhatók. Ugyan elvben ideális terápiának számít, viszont a gyakorlatban számos buktatóval kell szembenézni. Ha a beteg a kezelés során bármikor újra használja az elhagyni kívánt szert, akkor a terápiával minden addig elért eredmény kárba vész. A legnagyobb problémát viszont a visszaesések száma és azok következményei okozzák. A metadon terápia végeztével, az abúzusserrel kapcsolatos tolerancia is visszaáll az eredeti szintjére. Ez a légzésdepresszióval kapcsolatban nagyon fontos tény, mivel a visszaesők gyakran a terápia előtti nagy dózisokat használják újra, ami tragédiába torkollva a beteg légzésbénulásához és halálához vezet. Ezt az eseményt szokás „aranylövésnek” nevezni.

1.3. Kábítószer-vakcináció

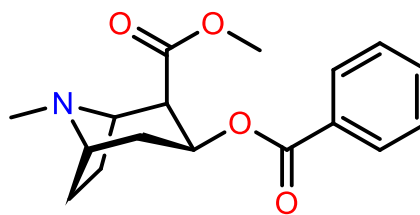
Noha a metadon terápián kívül léteznek más módszerek is, egyik sem mondható eredményesebbnek nála. Éppen ezért kívánatos újabb terápiás lehetőségek kidolgozása.

A fertőzések visszaszorításában és leküzdésében kiemelt jelentőségű a védőoltások alkalmazása. [10] Ha a kábítószerfüggőségre is az emberiség központi idegrendszerét

megbetegítő kórsággként tekintünk, akkor nem meglepő, hogy a kábítószer-vakcináció ötlete már negyven éves.



(5)



(6)

Kezdetben a heroinnal (5), illetve kokainnal (6) kísérleteztek. Mindkét molekula észter típusú vegyület, és a szervezetben előforduló észterázok hasítják őket, hogy aztán további reakciók során hatástalanná váljanak. Kimutatták, hogy egyes mikroorganizmusok butiril-kolinészterázai hatékonyabban bontják ezeket a molekulákat, ami jelentősen csökkenti a koncentrációjukat a véráramban. Viszont a kokainnal ellentétben ez a módszer nem alkalmazható a heroin esetében, mivel az inaktív kokain metabolitokkal szemben a heroin több metabolitja is aktív, így az ilyen típusú vakcinák fejlesztése elmarad a kokainétól.

Nem észter típusú vegyületeknél másféle mechanizmusú vakcinát kell alkalmazni. A lehetőségek közül kiemelendő a kábítószer-makromolekula konjugáció, aminek működése már bizonyított más bevált oltóanyagok esetében. Aktív immunizáláskor a beoltott személy vérében játszódik le az antigén-antitest reakció, ami a későbbiekben is védeltséget nyújt a szerrel szemben. Passzív védelemkor más élőlényekben termeltetik meg az antitesteket, amiket aztán tisztított formában alkalmaznak. A hatásmechanizmus tekintetében vagy a molekula lebontását segítik elő, vagy – és ez a gyakoribb eset – olyan makromolekulát hoznak létre, ami már nem képes átjutni a vér–agy gáton.

1.3.1. Általános megfontolások

A vakcinamodell fejlesztésekor a kérdéses kis molekulatömegű addiktív szert egy hordozó molekulához (*carrier*) kell kötni, ami lehet fehérje, lipid vagy poliszacharid. [11-13] Ezt általában egy nyílt szénláncú szerkezeti egységen keresztül (*spacer linker*) tehetjük meg. A fehérjét úgy célszerű megválasztani, hogy önmaga is immunogén legyen, illetve rendelkezzen olyan oldallánccal, amivel konjugálni lehet a molekulánkat. Ehhez az arginin guanidino-, vagy a lizin ϵ -amino-oldallánca a legalkalmasabb. [14] Ezt

követően a molekulánk már a konjugátum epitópját fogja képezni, ami a humorális immunválasz aktiválásában lesz lényeges. A morfin és társvegyületei közvetlenül nem alkalmasak hordozó molekulával való konjugációra, viszont megfelelő szerkezetmódosítást követően már igen. Maga a funkcionizált vegyület továbbra se lesz antigén tulajdonságú, viszont a konjugálást követően azzá válik. Az ilyen típusú molekulákat hapténeknek nevezzük, amikről a későbbiekben lesz szó, és lehetséges szintéziseik a disszertáció fő tárgyát képezik.

Az előállított immunkonjugátumok az epitópjaik révén erős válaszreakcióra készítenek a B-limfocitákat, amik specifikus anti-drog antitesteket termelnek. Ismételt adagolást követően az állatokban olyan antitestek keletkeznek, amik védekező mechanizmust jelentenek a vér cirkulációs kompartmentjében. Az immunizált állatok szérumban jelenlévő specifikus antitestek megkötik az abúzust okozó kábítószermolekulákat. Mivel az immunglobulinok nagy móltömeggel rendelkeznek (kb. 150 kDa), nem képesek átjutni a vér–agy gáton, így az antitest által megkötött molekulák se jutnak be az agyba. Az anti-drog antitestek alkalmazása ezzel azt a kezelési opciót veti fel, hogy az abuzált szer megkötésével az agyba penetrálható molekulák koncentrációját csökkentjük le, mielőtt az agyba jutnának. [14]

Ezeket az elveket alkalmazva sikerült bizonyítani az immunterápia hatékonyságát. Kokain vagy nikotin adagolásakor a molekulák 80%-a nem érte el a központi idegrendszert. Ez azért lényeges, mert a nagymértékben addiktív szerek, mint a heroin vagy kokain, amik percekben belül indukálják a központi idegrendszer jutalmazó (*reward*) folyamatait, ilyen formában egyáltalában nem, vagy csak nagyon kis koncentrációban érik el a szükséges agyterületeket. [14]

Mivel ez a típusú terápia csak perifériásan támadja az opioid vegyületeket, így biztonságosabbnak nevezhető, mint más, közvetlenül az agyban jelenlévő opioid receptoron ható anti-opioid kezelés (metadon, naltrexon, buprenorfin).

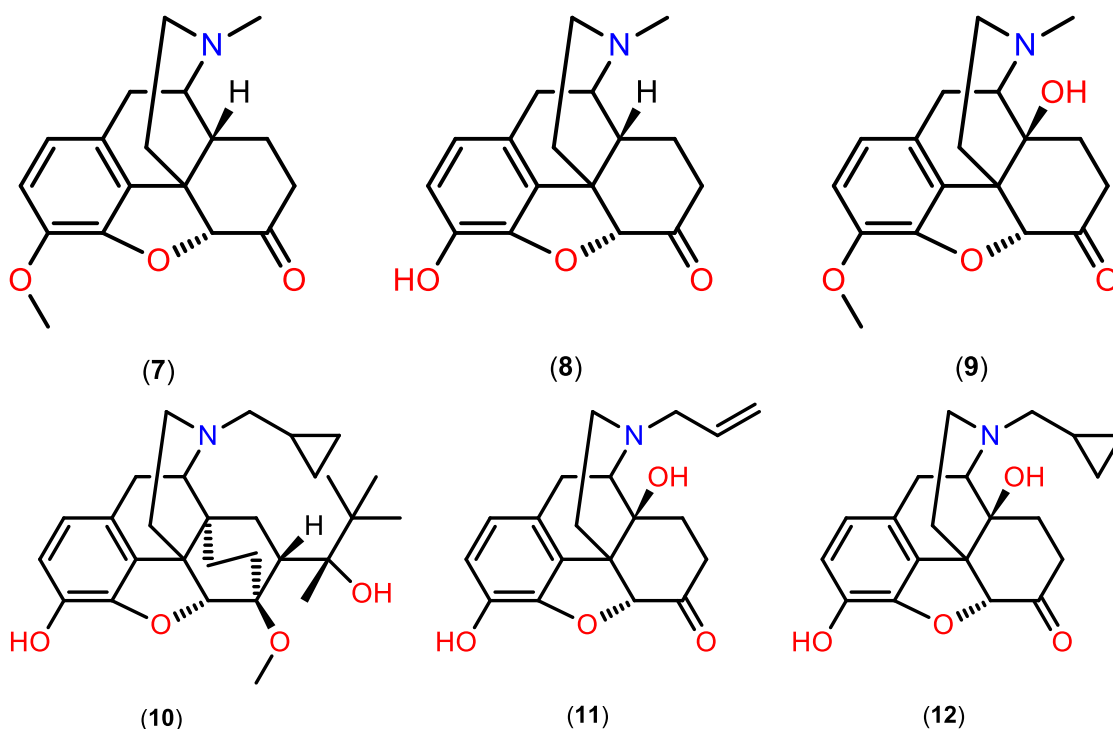
1.3.2. Opioid vakcinák

Fontos pont az opioid vakcinák tervezése során, hogy a szarvasmarha szérumfehérje (BSA) és a *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) nem engedélyezett emberi oltóanyag felhasználására. Emiatt egyre inkább tetanusz toxoiddal (TT) történnek a konjugálások, mivel a humán vakcinálási protokollok során is ezzel az antigén fehérjével

lehet a leggyakrabban találkozni. Eddigi tapasztalat szerint a TT mellékhatásai minimálisak. [12]

Lényeges befolyásoló tényezővel bír a haptént és hordozót összekötő lánc hossza és szterikus szabadságfoka. Ez a kapocs megfelelő távolságot kell, hogy biztosítson a hapténnek a hordozó fehérje strukturális doménjétől, illetve megfelelő térbeli orientációt kell nyújtson az immunrendszer sejtjeinek, hogy azok domináns epitópként észleljék a funkcionizált molekulát. Ezek optimalizálásával a haptén nagymértékben immunogén lesz, és magas antitest titer érték érhető el a konjugátummal szemben. Maga az összekötőlánc általában váltakozó hosszúságú szénlánc, újabban viszont polietilén-glikol egységekből felépülő kapcsokkal is próbálkoznak. [12] A vizsgálatok során a BSA–3-*O*-karboximetilmorfin konjugátumban a morfin C3-as oxigénatomja és a fehérje lizin oldalláncának C ϵ -atomja közötti távolság kb. 8,96 Å. A BSA–morfin-6-hemiszukcinátban a C6-os oxigénatom és a C ϵ -atom között 12,41 Å, míg TT esetében, ha γ -aminokapronsavon keresztül kötötték a morfin-6-hemiszukcinátot, 20,15 Å volt ez az érték. [14]

Kiemelt jelentőségű, hogy az immunválasz mennyire specifikus az opioid haptén szerkezeti egységeire. Mindenképpen tanulmányozni kell, hogy az adott molekula mely része rendelkezik számottevő antigén-kötő tulajdonsággal, és ha szükséges akár az anti-morfin antitestek heterogén populációját kell előállítani. Példaként, ha a morfint valamelyik hidroxilcsoportján keresztül funkcionizáljuk, és kötjük a hordozóhoz, akkor számolnunk kell a molekula azon részének szterikus zsúfoltságával. Az ezzel ellentétes oldal viszont olyan domináns epitópkat fog tartalmazni, amik közösek lesznek más fenantrénvázas opioidokkal. [12] A 3-*O*-karboximetilmorfin–KLH, morfin-6-hemiszukcinát–BSA és TT konjugátumok olyan antitesteket generáltak, amelyek nem ismerték fel a C3-as és C6-os helyzetben szubsztituált morfin analógokat, és eltérő specifitással kötötték a kodeint, heroint, dihidrokodeinont (7), dihidromorfinont (8) és



oxikodont (9). Az antitestek kölcsönösen alacsony specifitást mutattak más származékokra, mint a buprenorfin (10), naloxon (11) és naltrexon (12). Ez utóbbiakban közös szerkezeti elem, hogy az előbb említett molekulákkal ellentétben az *N*-metil csoport helyett ún. antagonistá szubsztituenst tartalmaznak. Terápiás szempontból ezeket az antitest specifitásokat lehetne kihasználni a humán klinikumban, ugyanis az említett morfin hapténekből preparált immunkonjugátumok alkalmazásakor nemcsak a morfint, hanem a heroint is kötni lehetne. Továbbá az is lényeges, hogy a vakcina legyen képes az ezekből a vegyületekből keletkező metabolitokat is semlegesíteni, nevezetesen a morfin-C6-acetátot illetve morfin-C6-glükuronidot. [12] Az ezek ellen termelt antitestek még a központi idegrendszerbe jutás előtt képesek megfogni őket, csökkentve a véráramban jelenlévő anyag koncentrációját. Ugyanakkor az anti-morfín/heroín antitestek nem mutatnak specifitást más opioidokkal szemben, mint a naloxon, naltrexon és metadon. Ezek a vegyületek a heroínfüggők kezelésében használatosak, és így a különböző terápiás lehetőségek egymás mellett is biztonságosan alkalmazhatók. [5]

Az antigén hordozóhoz kovalensen kötött opioid-hapténnel való vakcinálást követően 5-10 napra van szükség az immunválasz aktiválásához. A vérben keletkező IgG antitestek felezési ideje kb. 3-4 hét, így célszerű a konjugátumot többször, periodikusan adagolni a minél magasabb antitest szint elérése érdekében. A morfinből előállított

haptént már többféle immunogén hordozóhoz sikerült kötni. Az első sikeresen előállított immunkonjugátumokkal először nyulakat és patkányokat immunizáltak, hogy poliklonális antitesteket hozzanak létre morfinnal szemben. A vizsgálatok során ugyanakkor keresztreakciókat tapasztaltak más opioidokkal szemben (heroin, kodein, dihidromorfinon). Noha az előállított vegyületek nem voltak alkalmasak vakcinálásra, ugyanakkor felismerték az opioid vegyületek biológiai közegben való mérésének lehetőségét. Emiatt számos kutatás immunanalitikai módszerek kifejlesztése felé mozdult el, mint azt a későbbiekben láthatjuk is.

Bonese és munkatársai 1974-ben számoltak be az első aktív vakcinálásról. [15] A morfin-6-hemiszukcinát-észtert BSA-hoz kötötték, majd ezzel heroin önadagolásra betanított *Rhesus* majmokat immunizáltak. Az immunválasz megjelenése után megszűnt a dependens állatok heroin felvétele. Ez egyben az anti-morfin antitestek heroinnal való keresztreakcióját is bizonyította.

Noha az aktív vakcinálással bizonyítást nyert, hogy immunkonjugátum alkalmazásával a heroin önadagolás hatékonyan akadályozható, ezeket a sikeres kísérleteket nem folytatták, ami valószínűleg annak tudható be, hogy az 1970-es évek elején számos félszintetikus (naloxon (1971), buprenorfin (1981), naltrexon (1984)) és szintetikus (metadon (1950-es évektől)) származék került be a klinikumba, amivel lényegesen megnőtt a kezelési módok száma.

1.3.3. Haptének

A legtöbb gyógyszer- illetve kábítószermolekula méretüket tekintve kicsinek számít. Éppen ezért a szervezetbe, véráramba kerülve nem váltanak ki immunválaszt. Ehhez a korábban már említett módon, funkcionalizálni kell a szerkezetüket, hogy egy immunogén hordozóhoz kötve epitópként viselkedjenek. Így már a szervezet immunsejtjei fellépnek a testidegennek számító konjugátummal szemben, és antitesteket termelnek ellene. Legközelebb, mikor a hordozó nélküli molekula kerül be a szervezetbe, képes az antitesteket kötni, miközben az immunválasz elmarad (erre csak a haptén-hordozó konjugátum képes). Az immunizálást megelőzően a kapcsolásra szánt, módosított molekula nem antigén, csak a konjugáció után lesz képes az antitestek kötésére. Definíció szerint ezeket a módosított, nem antigén sajátosságú, de immunogén hordozóval azzá tehető molekulákat nevezzük hapténeknek. [16]

A számos, ilyen típusú vegyület talán legismertebb példája a mérges szömörce (*Toxicodendron radicans* vagy *Rhus radicans*) (2. ábra) okozta kontakt dermatitisz. (3. ábra)



2. ábra *Toxicodendron/Rhus radicans*

(<https://www.pinterest.es/pin/63754150963673381/>, letöltve: 2021.02.23.)

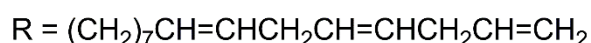
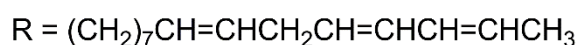
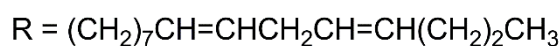
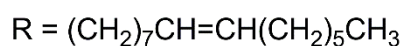
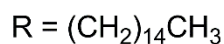
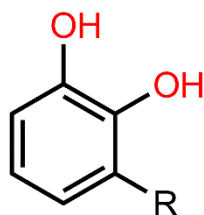


3. ábra Mérges szömörce okozta allergiás reakció

(<https://www.healthline.com/health/outdoor-health/poison-ivy-pictures-remedies>,

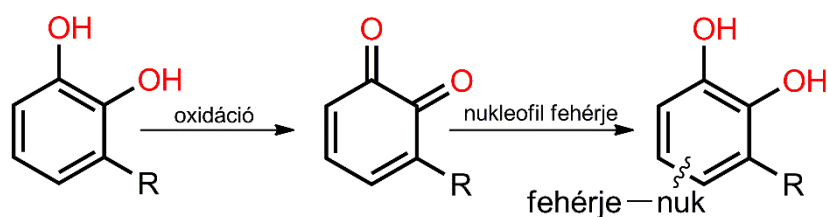
letöltve: 2021.02.23.)

Az *Anacardiaceae* családba tartozó növény számos társával együtt alkil-pirokatechinben gazdag tejnedvvel rendelkezik. [17] A mérges szömörce kontaktallergénjei az uruziolok (toxikodendronsavak), melyek csak a 3-as helyzetű oldallánc hosszában és a kettőskötések számában térnek el egymástól. (4. ábra)



4. ábra Uruziolok szerkezete

A bőrbe felszívódva oxidáción mennek keresztül, majd pedig a bőr nukleofil fehérjéivel reagálva konjugátumot képeznek. (5. ábra)



5. ábra Uruziol haptén-kojugátum létrejötte a bőrben

A szerkezet számára ezek testidegennek számítanak: a hordozófehérjét a T-limfociták azonosítják, míg a hapténnek számító, kinon származékká oxidálódott uruziolokat a B-limfociták. A T- illetve B-sejtek proliferálnak, miközben a B-limfociták haptén specifikus antitesteket termelnek. Ezzel kialakul az immunrendszer memóriája. A növényvel való újabb érintkezéskor súlyos allergiás reakció alakul ki, amit a IV-es típusú túlérzékenységi reakciók közé sorolunk.

Egy másik gyakori eset a henna- (*Lawsonia inermis*) (6. ábra) tetoválások hamisítása. [18]



6. ábra *Lawsonia inermis* L.

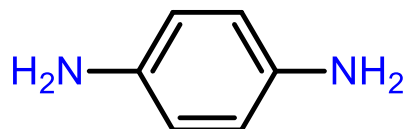
(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f7/Lawsonia_inermis_Blanco_art.png, letöltve: 2021.02.23.)

A hagyományos vörös-barna henna-tetoválás elkészítése órákat vesz igénybe. Ezzel szemben a turisztikai célpontokon található standoknál, ahol a „minél rövidebb idő alatt minél több kuncsaftot kell kiszolgálni” elv érvényesül, a fekete henna (7. ábra) lehető fel, amivel akár fél óra alatt is el lehet készíteni a tetoválást.



7. ábra Fekete henna-tetoválás első alkalommal

(<https://www.my-beauty.org/product/3-black-golecha-henna-cones/>, letöltve: 2021.02.23.)



(13)

Ehhez *p*-fenilén-diamint (13) használnak, ami a bőrbe jutva hasonló reakción megy keresztül, mint az uruziolok. Sajnálatos módon újabb tetoválás készítésekor ugyanolyan

súlyos kontakt dermatitiszre kell számítani, mint a mérges szömörce esetében. (8. ábra) Emiatt a *p*-fenilén-diamin kozmetikai célú használata széleskörűen tiltott.



8. ábra Fekete henna-tetoválás okozta kontakt dermatitisz

(<http://www.clevelandhenna.com/black-henna-warning>, letöltve: 2021.02.23.)

Gyógyszerészi szempontból az egyik legfontosabb allergiás reakció, a penicillin-érzékenység is haptén típusú mechanizmusokra vezethető vissza. [19]

1.3.4. Radio-immunanalitika

Az antigén-antitest specifikus kötődést az analitikában nano- illetve pikogramm mennyiségű haptén kvantitatív meghatározására is lehet használni. Ennek egyik lehetősége a radio-immunanalitika (*radioimmunoassay*, RIA). [20]

A RIA segítségével az említett tartományokban lehet meghatározni: (i) fehérje- és szteroidhormonokat; (ii) fehérjéket; (iii) gyógyszereket és kábítószereket; (iv) metabolitokat; (v) mérgeket; (vi) vitaminokat (B₁₂). A mérés kombinálja az antigén-antitest reakciók kiemelkedő specifikusságát, illetve az izotópmérés rendkívüli érzékenységét. A mérések kiértékelése standardokkal készült kalibrációs görbékkel történik, amihez mindig azonos mennyiségű antitest és jelzett antigén, valamint ismert mennyiségű, nem jelzett antigén szükséges. Az alábbiakban röviden ismertetem a klinikai gyakorlatban egyre szélesebb körben elterjedő módszer menetét.

Az immunanalitika jellegzetessége, hogy a meghatározandó vegyület és a meghatározó reagens antigén-antitest viszonyban áll. Éppen ezért a RIA sikerességét nagyban befolyásolják a használt antitestek. Az antitesteknek minimális koncentrációban specifikus affinitást kell mutatniuk a kívánt antigénnel szemben. Maga a reakció

megfordítható, egyensúlyra vezető folyamat, és a keletkező komplex stabilitási állandója (K_s) rendszerint igen nagy, nem ritka a 10^9 - 10^{10} mol⁻¹ érték sem. [21,22] Az antiszérumban jelzett antigén követésével lehet meghatározni, amihez különböző koncentrációjú antiszérumokat kell használni. Erre a célra leginkább az antigének 50%-ának megkötésére képes hígítást alkalmaznak. Az antitestek meghatározásához használt végső hígítást nevezzük titernek. Sikeres immunizálás esetén a magas titerű antiszérumban nagy hígítása miatt akár több millió meghatározás is kivitelezhető. Mivel az antiszérumok specifikussága, érzékenysége és titere az immunizációval változik, így gondos titrálással kell az antiszérumot beállítani, majd pedig 20 °C-on tárolni.

Az antigén jelzését ¹³¹I; ¹²⁵I; ³H; ¹⁴C vagy ⁵⁵Co-tal lehet megoldani. Ezek közül a jód-izotópok a fehérje típusú antigének esetében számítanak elterjedtnek. A jelzést követően oszlopkromatográfiával, cellulóz-por kromatográfiával, dialízissel, gélszűréssel, vagy ioncserélő kromatográfiával oldható meg a tisztítás. Szükséges az izotópok specifikus aktivitásának meghatározása is, aminek a lehető legnagyobbnak kell lennie. Az immunreakcióban bekövetkező változásokat is érdemes figyelemmel kísérni, amire egy előzetes RIA-meghatározás a legalkalmasabb. Természetüktől függően a jelzett antigéneket 2-4 °C-on vagy -20 °C-on kell tárolni.

Az antigének csak megfelelő időtartamú és hőmérsékletű inkubációt követően képesek kötődni az antitestekhez. A protokollok a módszerektől függően változnak. Ugyanakkor minden esetben kerülni kell az érzékeny antitestek károsodását, amit okozhat a plazmafehérjékkel, szabad gyökökkel, oxidálószerekkel vagy fehérjebontó enzimekkel való hosszú idejű érintkezés.

A RIA egyik legfontosabb lépése a kötött és szabad antigének elválasztása, mivel ez határozza meg a módszer pontosságát. A számos kidolgozott módszer közül a két antitesttel való lecsapás a leginkább alkalmazott. Ilyenkor egy teljesen különböző ellenanyaggal lecsapják a már képződött antigén-antitest komplexet, aminek három előnye is van: (i) minden RIA-módszerben alkalmazható; (ii) a kötött és szabad antigének teljes mértékben elválaszthatók egymástól; (iii) nagy térfogatú inkubációs oldat esetében is alkalmazható. Az igen kis mennyiségű csapadékot cellulózacetát-szűrőt használva választják el a szabad antigéntől. A leggyakrabban dextranszal fedett csontszén elválasztást kombinálnak hűtött centrifugálással.

A γ -sugárzó jód-izotópokat üreges NaI-kristályban mérik, ami a kibocsátott γ -sugarakat fényenergia impulzussá alakítja. Ehhez γ -spektrofotométer használható. Ezzel szemben a β -sugarakat folyadék-szcintillációs spektrométerrel határozzák meg.

Előnynek tudható be, hogy a RIA alapelve nem csak az antigén-antitest kölcsönhatásra korlátozódik. A módszer kiterjeszhető olyan esetekre is, amikor az antitestet lecserélik a kívánt molekulát specifikusan kötő szérumfehérjére. Ezt a vetélkedő fehérjekötési analízisnek nevezett módszert *Ekins* dolgozta ki tiroxin meghatározására, melyhez specifikus tiroxinkötő globulint alkalmazott. [23]

Érdemes megemlíteni, hogy a radio-immunanalitikai eljárások elnevezése nem egységes a szakirodalomban, különösen az angolszász területeken. Sokszor eltérő neveket használnak azonos módszerekre, ami nemegyszer vezet félreértésekhez. A vetélkedő fehérjekötési analízis (*competitive protein binding assay* = CPBA) sem szerencsés elnevezés, mivel az antitest is fehérje, és emiatt a RIA a CPBA egyik változatának tekinthető. A RIA elvén alapuló eljárásokat egyre elterjedtebben nevezik radioligand-analitikának (*radioligand assay*), függetlenül a meghatározandó vegyületet specifikusan kötő fehérje típusától. Utóbbit receptornak, a meghatározandó vegyületet ligandumnak, míg ennek radioaktív izotóppal jelzett változatát radioligandumnak nevezik.

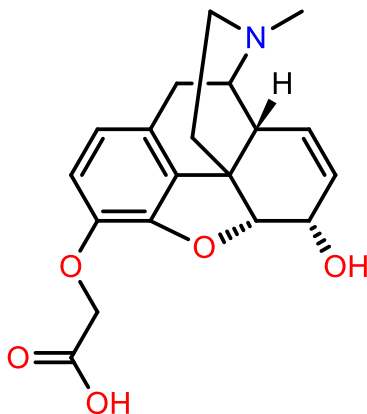
A radioligand-analitika használata azért is szerencsés, mert jelzi, hogy a módszer radioaktív izotóp alkalmazásán alapul, és ez elhatárolja a nem radioizotóppal jelzett ligandumok használatától, továbbá ebbe a vizsgálati körbe egyensúlyi eljárások tartoznak, míg az ettől eltérőket külön jelölik.

1.4. Morfin vegyületek funkcionálizálása

A morfin és származékai elleni immunizáláshoz megfelelő haptén vegyületekre van szükség. Ehhez a kívánt molekulát funkcionálizálni kell, amire az alábbi lehetőségek adottak: (i) C3-as fenolos hidroxilcsoport *O*-alkilezése; (ii) a C6-os hidroxilcsoport észter vagy a C6-os karbonilcsoport oxim képzése; (iii) a norvegyületek *N*-alkilezése; (iv) addíció a $\Delta 7,8$ kettőskötésre; (v) a C14-es hidroxilcsoport észterképzése.

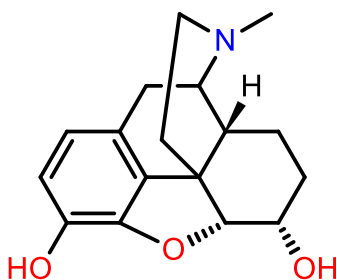
1.4.1. 3-*O*-alkil haptének

Az első morfin haptént, egy 3-*O*-alkilszármazékot *Spector* és *Parker* állították elő radio-immunanalitikai meghatározás céljából. [24,25] A morfin bázist etanolban oldották és nátrium-klóracéttal 3-*O*-karboximetilmorfinná (**14**) alakították át. A terméket BSA-



(14)

hoz kapcsolták 1-etil-3-(dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDAC) segítségével. A konjugátummal nyulakat immunizáltak, majd pedig a vérüket 5-7 napig gyűjtötték, és az antiszérumot elkülönítették. Tríciummal jelölt dihidromorfinnal (**15**) inkubálták, és az



(15)

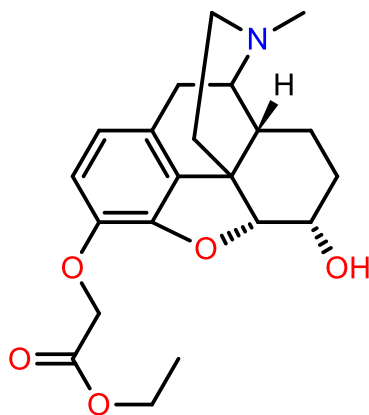
antitesthez kötődött dihidromorfint izolálták, végül szolubilizálták. A radioaktivitást mérve meghatározták a kötött radioaktív dihidromorfint. Ezután egyre nagyobb adag nem radioaktív jelzett morfint adtak azonos mennyiségű jelzett dihidromorfinhoz és anti-morfin antitesthez. A morfin kompetitív gátlással akadályozta az antitest-haptén komplex képződését. Ábrázolva a gátlást a hozzáadott nem jelzett morfinmennyiség függvényében egyenest kapunk. A módszer olyan érzékeny, hogy akár 0,5 nanogramm morfin is pontosan mérhető.

Rubinstein és *Ullman* a morfin nátrium sóját képezte etanolban nátrium-hidroxiddal, és ezt reagáltatta nátrium klóracéttal. [26] A reakciót követően alkoholos sósavval csapták ki a 3-*O*-karboximetilmorfin sósavas sót az oldatból. Ezután vegyes anhidrides módszerrel kapcsolták BSA-hoz: a 3-*O*-karboximetilmorfint

dimetilformamidban oldották, és klórszénsav-izobutilészterrel reagáltatták trietil-amin jelenlétében, majd pedig a vegyes anhidridet hűtés közben kapsolták a BSA-hoz.

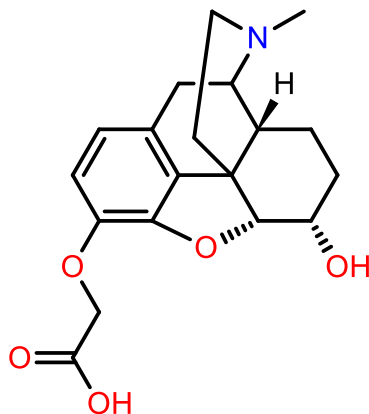
Buechler a 3-*O*-karboximetilmorfint úgy nyerte, hogy etanolban leválasztotta kálium-karbonáttal a morfin bázist a szulfát sójából, majd pedig brómecetsavval 3-*O*-alkilezte. [27] Az oldatból sósavval választotta le a 3-*O*-karboximetilmorfin sósavas sót.

Heiman és munkatársai kálium sót képeztek morfinból etanolban kálium-etiláttal, és brómecetsav-etilészterrel reagáltatták. Katalitikus hidrogénezést követően 3-*O*-karboximetildihidromorfin-etilészterhez (16) jutottak, amit metanolban számított



(16)

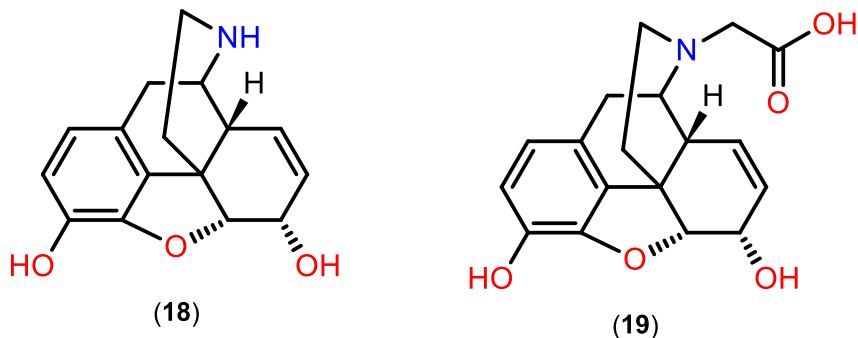
mennyiségű 2M nátrium-hidroxiddal hidrolizáltak, majd pedig az oldatot savanyítva a 3-*O*-karboximetildihidromorfin (17) sósavas sóját kapták. [28]



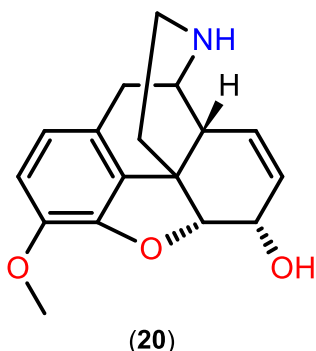
(17)

1.4.2. *N*-alkil haptének: karboxil-származékok

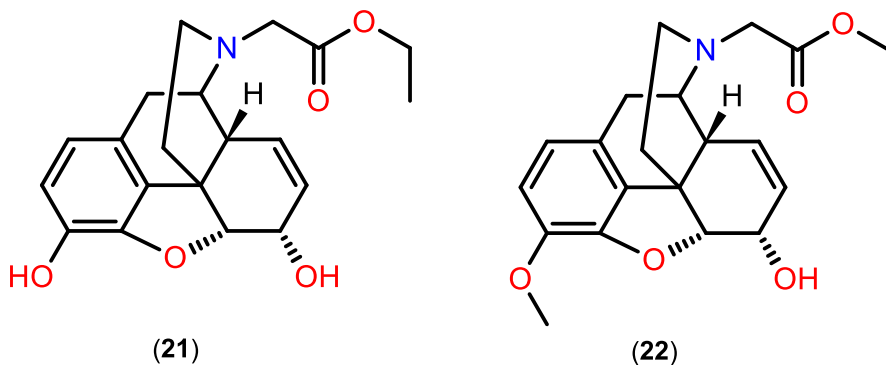
Schneider a normorfint (**18**) brómcetsav nátrium sóval forralta abszolút metanolban, és *N*-karboximetilnormorfint (**19**) kapott 75%-os hozammal. [29] Ezt a már ismertetett vegyes anhidrides módszerrel kapcsolta BSA-hoz, illetve hasonló reakcióban állított elő lizozimmal kapcsolt konjugátumot is.



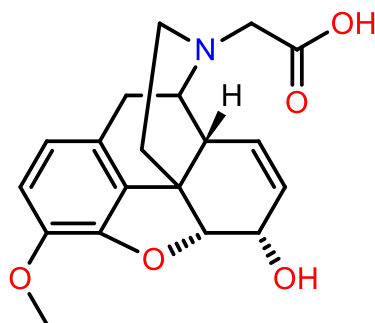
Gintzler és munkatársai egyidejű meghatározást dolgoztak ki morfinra és kodeinre RIA módszerrel. [30] Az immunogén származékokat az alábbi módon állították elő: normorfint (norkodeint (**20**)) reagáltattak brómcetsav-etilészterrel dimetilformamidban,



savmegkötőként nátrium-hidrogénkarbonátot alkalmaztak. Az alkilezőszert kis feleslegben használva (1,1x) csak *N*-alkilezés játszódott le. A reakcióban keletkező *N*-karboximetilnormorfin/norkodein-etilésztert (**21**) (**22**) 2N sósavval forralták, amivel



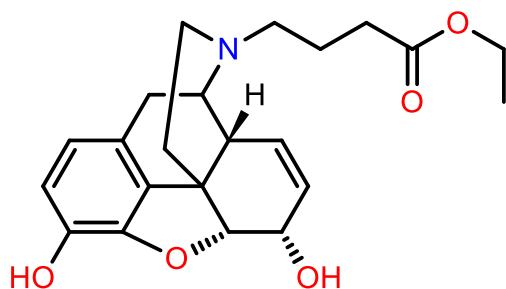
megtörtént az észtercsoport hidrolízise. A termékek szerkezetét (*N*-karboximetilnormorfin (**19**) és *N*-karboximetilnorkodein (**23**)) IR, UV és NMR mérések



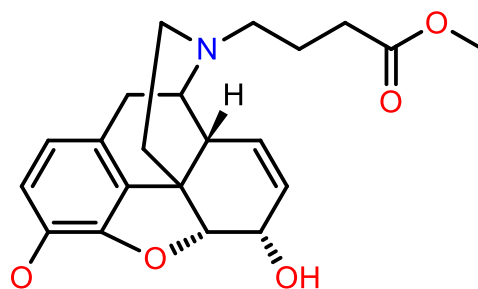
(23)

alapján igazolták. A származékot BSA-hoz kötötték. A reakciót 0,01N sósav jelenlétében EDAC vízelvonószerrel végezték. Az immunogén normorfin, illetve norkodein származékokkal nyulakat immunizáltak, és a vérükből két hét után izolálták az antiszérumot. A kötődést tríciummal jelzett dihidromorfinnal mérték RIA módszerrel. Ezzel 15-30 pikogramm morfin volt biztonsággal meghatározható. Az előállított két immunogén segítségével a morfin specifikusan mérhetővé vált kodein jelenlétében.

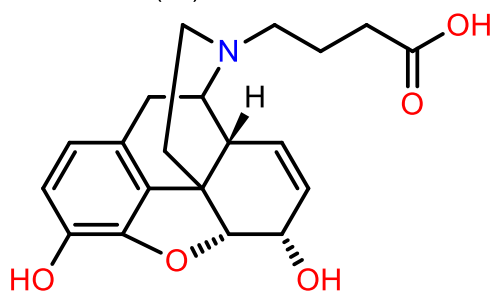
Findlay és munkatársai hasonló immunogéneket állítottak elő normorfinból és norkodeinből. [31] Alkilezőszerként γ -bromvajsav-etilésztert használtak. A keletkező észtereket (24) (25) metanolban nátrium-hidroxiddal hidrolizálták, és a kívánt *N*-(γ -



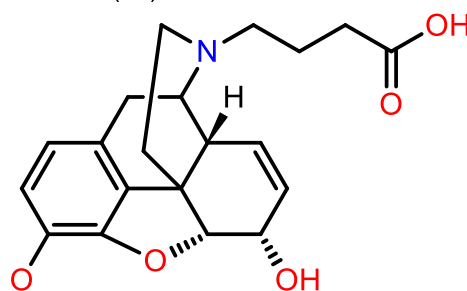
(24)



(25)



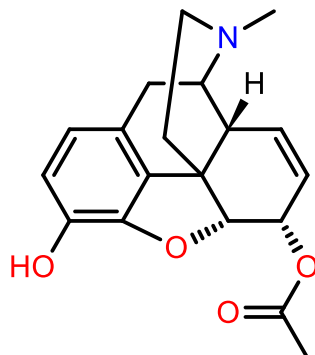
(26)



(27)

karboxipropil) származékhoz jutottak (26) (27). A szabad karboxilcsoportokat tartalmazó vegyületeket itt is BSA-hoz kapcsolták a már említett vegyszerekkel. Egy másik eljárás során a keletkező savat ioncserés kromatográfiával tisztították (XAD 2 gyanta) és a kapcsolást tirozin-etilészterrel végezték diciklohexil-karbodiimid (DCCI) jelenlétében.

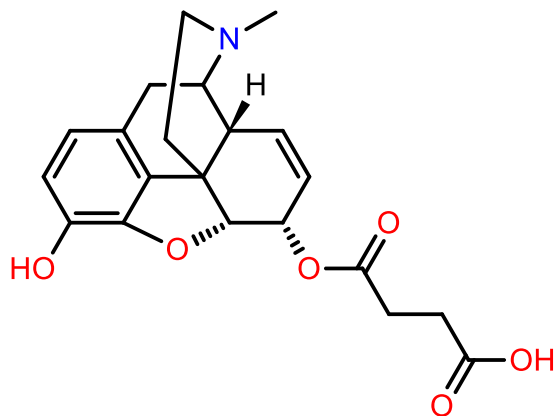
A BSA-val konjugált norkodein származékot nyulaknak adták be, és tríciummal jelölt kodeinnel vizsgálták a szérumból izolált antitest kötődését. Az antitest nagymértékben specifikus volt kodeinre, miközben a heroin, morfin és 6-*O*-acetilmorfin (28)



(28)

nem mutatott keresztreaktivitást. Ezzel a kodein nagy pontossággal mérhető biológiai közegben (vizelet, vér) heroin vagy morfin jelenlétében. [32]

Herndon és munkatársai normorfint *N*-alkileztek brómcetsav-etilészterrel (dimetilformamid, nátrium-hidrogénkarbonát), az *N*-karboximetilnormorfin-etilésztert szilikagél-oszlopkromatográfiával tisztították, majd az észtert metanol-víz elegyben kálium-hidroxiddal hidrolizálták. [33] Az *N*-karboximetilnormorfint vízoldható karbodiimid jelenlétében BSA-hoz kapcsolták. Az így kapott BSA-konjugátummal nyulakat és patkányokat immunizáltak. Összehasonlításképpen előállították a 3-*O*-karboximetilmorfin (14) és a morfin-6-hemiszukcinát-észter (29) BSA konjugátumait is,

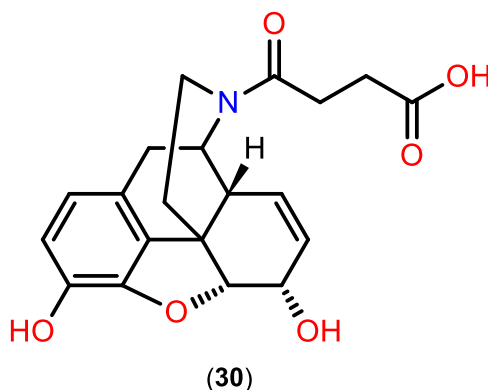


(29)

melyekkel szintén nyulakat és patkányokat oltottak be. Ezek után ¹⁴C-jelölt-morfinnal az antitestekhez való specifikus kötődését (kompetitív inhibíciós kísérletekben) vizsgálták. A 3-*O*-karboximetilmorfin–BSA antitestek specifitása kodein–morfin–heroin sorrendben csökkent, míg a morfin-6-hemiszukcinát–BSA antitest esetében a heroin és morfin volt hatásos a kompetitív gátlásban. Meglepő módon az *N*-

karboximetilnormorfin–BSA konjugátum hatására keletkezett antitestek nem kötöttek meg a radioaktív jelzett morfint. Ezek az eredmények nincsenek összhangban a *Gintzler* és munkatársai által közölt megfigyelésekkel.

Morris és munkatársai normorfint reagáltattak borostyánkősavanhidriddel DCCI jelenlétében, és a kapott *N*-szukcinoilnormorfint (**30**) BSA-hoz kapcsolták EDAC



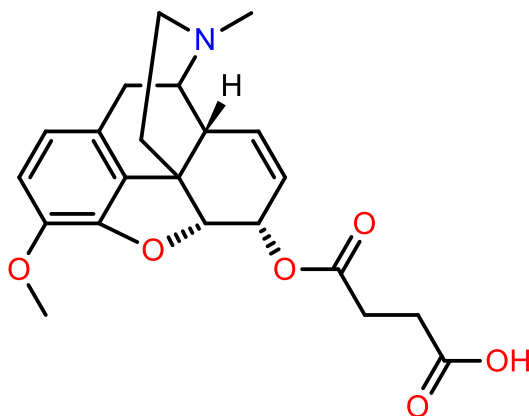
segítségével. [34] Az immunkonjugátummal juhokat, patkányokat és nyulakat immunizáltak. Az izolált antitestek juhon és patkányon nem mutattak keresztreakciót kodeinnel, és a juhokon képződött antitestek szintén nem mutattak keresztreakciót a heroinnal szemben.

Metcalf és munkatársai a normetazocint *N*-alkilezték halogénszubsztituált észterekkel (brómecetsav-etilészter, β -brómpropionsav-etilészter, γ -brómvajsvav-etilészter), a reakciókat dimetilformamid–tetrahydrofuran oldószerkelegyben hajtották végre, nátrium-karbonát savmegkötő jelenlétében. A kapott észtereket etanolban kálium-hidroxid felesleggel forralták, majd savval a pH értéket 7-re állították. A karbonsavakat sósavas só formában izolálták. [35] Az izolált vegyületeket nem hapténként állították elő, viszont a szerkezetmódosítások az általunk vizsgált vegyületek előállítására használhatók. A hat új vegyület biológiai vizsgálata során a *hot-plate* és fenilkinon *writhing* teszten inaktívnak bizonyult, mint fájdalomcsillapító, az *N*-(γ -karboxipropil)-származék hatáserőssége a morfinnál ötször gyengébb volt. A receptorkötődési teszten a morfín ED₅₀ értéke 23,6 nmol volt, míg a legaktívabb γ -brómpropil-észter-származék ED₅₀ értéke 1 μ mol. Az egér *vas deferens* (MVD) izolált szervén szintén inaktív volt valamennyi vegyület, bár az *N*-karboximetil-etilészter-származék gyenge antagonist hatást mutatott.

1.4.3. C6-haptének

Wainer és munkatársai a morfin C6 pozíciójába észterképződési reakcióval építették be a karboxilcsoportot. Morfint benzolos oldatban borostyánkősavanhidriddel reagáltattak piridin katalizátor jelenlétében, és ekkor a morfin-6-hemiszukcinát-észterhez (29) jutottak. [36-39] Ezt a vegyületet egyidejűleg *Simon* és munkatársai is előállították. [40] *Wainer* és munkatársai első közleményükben tévesen C3 hemiszukcinát szerkezetet adtak meg, de ezt egy újabb dolgozatban helyesbítették. A morfin-6-hemiszukcinátot a vegyes anhidrides módszerrel BSA-hoz kötötték. Átlagosan 6,5 molekula morfin konjugálódott minden egyes fehérje molekulához. A konjugátummal nyulakat immunizáltak, és az antitesteket nyolc hét után izolálták. Ezek az antitestek gyakorlatilag azonos affinitással megkötötték (a ^{14}C -jelzett morfin kötődésének gátlását mérve) a morfint, a kodeint és a heroint.

Ugyanez a kutatócsoport hasonló módszert dolgozott ki a kodein meghatározására is, kodeinből szintetizálták a kodein-6-hemiszukcinát-észtert (31), melyet a vegyes



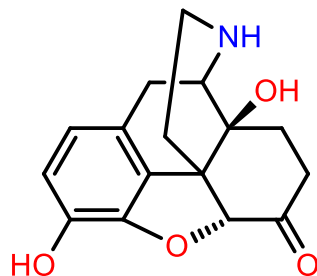
(31)

anhidrides módszerrel BSA-hoz kapcsolták. Az antitestek előállítására nyulakat immunizáltak a kodein konjugátummal, és az így izolált antitestek specifikusan kötötték a kodein-észter–BSA konjugátumot.

1.4.4. *N*-alkil haptének: ciano-származékok

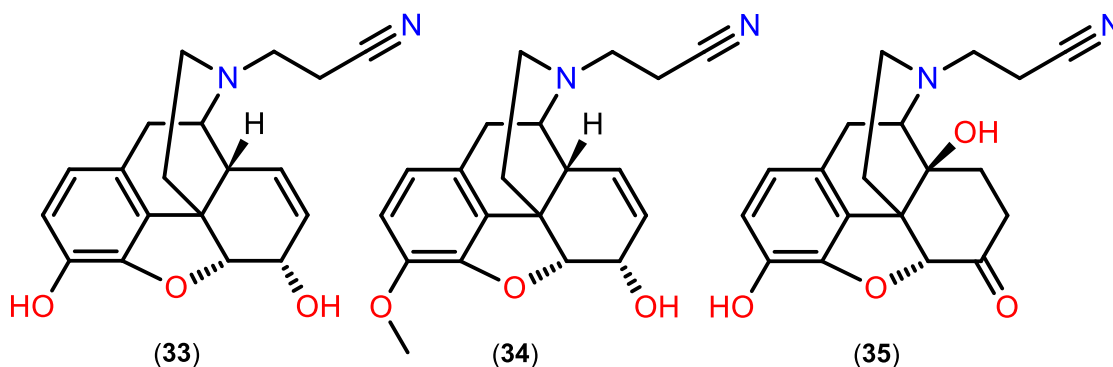
Noha az *N*-cianoalkil opioid vegyületek nem tekinthetők hapténnek, viszont két dolog miatt mindenképpen említést kell tenni róluk: (i) széleskörűen vizsgálták a szerkezet-hatás összefüggések változásait; (ii) redukciójukat követően aminocsoportot tartalmazó hapténekké válnak.

Jacobson és munkatársai az *N*-metil→*N*-cianoalkil szubsztitúció hatásváltozásait vizsgálták a 4,5- α -epoximorfínán, a szintetikus morfínán és a 6,7-benzomorfinán származékoknál. [41] Normorfint, norkodeint és noroximorfot (**32**) akrilnitrillel



(32)

reagáltattak trietil-amin jelenlétében, így nyerték az *N*-(β -cianoetil)-norszármazékokat (**33**) (**34**) (**35**). Hasonló reakcióban állították elő normetazocinból és 3-hidroxi-morfínából az *N*-(β -cianoetil)-származékokat. Az *N*-cianometil-norvegyületeket klórecetsav-nitriles reakcióval készítették.



(33)

(34)

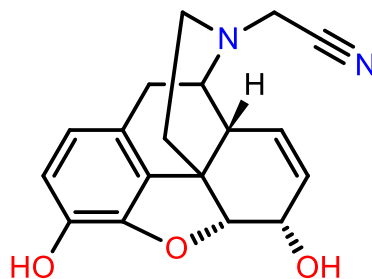
(35)

Az *N*-(β -cianoetil)-normorfín (norkodein) és az *N*-(β -cianoetil)-noroximorfon *hot-plate* teszten gyenge fájdalomcsillapító hatást mutatott. Gyenge aktivitást mértek a receptorkötési teszteken is. Az *N*-metil→*N*-(β -cianoetil)-szubsztitúció a metazocin és a 3-hidroxi-*N*-metilmorfínán esetében a fájdalomcsillapító hatás növekedését (10-12x morfín) eredményezte, valamint ezek az analógok a szuppressziós teszteken nem helyettesítették a morfint dependens *Rhesus* majmokban. Az *N*-cianometil-származékok is erősebb fájdalomcsillapítók, mint a morfín.

May és munkatársai további *N*-cianoalkil-szubsztituált normetazocinok előállításáról és részletes farmakológiai (*in vivo* és *in vitro*) vizsgálatáról számoltak be. [42] Normetazocint reagáltattak ω -brómalkil-cianidokkal ($\text{Br}-(\text{CH}_2)_n-\text{CN}$, $n=1-6$) dimetilformamid-tetrahidrofurán oldószerkeletben kálium-hidrogénkarbonát jelenlétében. A fájdalomcsillapító tesztek (egereken, sc. adagolás) alapján az *N*-(β -cianoetil)-normetazocin és az *N*-(γ -cianopropil)-normetazocin a fenilkinon *writhing*, *hot-*

plate és *tail-flick* teszteken sokkal erősebb (5-40x) fájdalomcsillapítónak bizonyult, mint a standard morfin. A többi vegyület gyenge fájdalomcsillapítónak viselkedett, vagy inaktív volt. A receptorkötési teszten a vizsgált vegyületek a κ -opioid receptorhoz mutattak magas affinitást, a μ -opioid receptoron a K_i értékek egy nagyságrenddel kisebbek, és a δ -opioid receptorhoz gyenge affinitást mutattak. Ezekkel az eredményekkel összhangban az *N*-(β -cianoetil)-normetazocin és az *N*-(γ -cianopropil)-normetazocin analgetikus aktivitása a *tail-flick* teszten a κ -opioid antagonistá norbinaltorfimin (NORBNI) adagolásával antagonizálható. A szuppressziós teszten morfin-dependens *Rhesus* majmokon az *N*-cianometilnormetazocin és az *N*-(δ -cianobutil)-normetazocin a morfint teljes mértékben tudta helyettesíteni, viszont az *N*-(β -cianoetil)-normetazocin és az *N*-(γ -cianopropil)-normetazocin esetében csak részleges helyettesítést tapasztaltak.

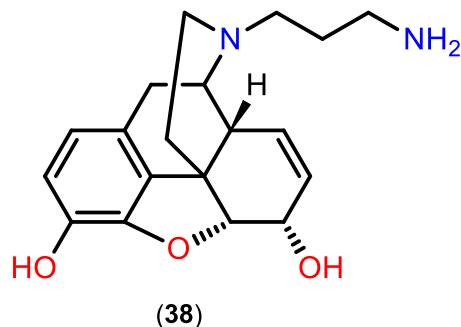
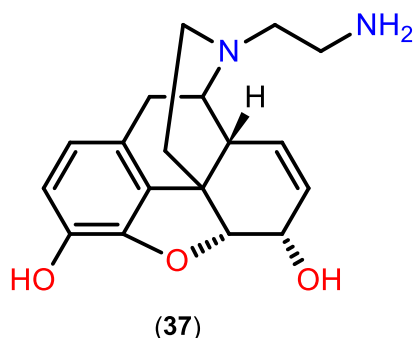
Az előzőekben már tárgyalt *Schneider* cianovegyületeket is készített. [29] Az *N*-cianometilnormorfin (36) előállításához normorfint reagáltatott klórecetsav-nitrillel



(36)

metanolban, refluxhőmérsékleten, amit azután benzolos oldatban Red-Al reagenssel [nátrium bisz-(2-metoxietoxi-alumíniumhidrid)] redukált. Ekkor az *N*-(β -aminoetil)-normorfin (37) képződött, melynek reakciója tiofoszgénnel *N*-(β -izotiocianátoetil)-normorfinhoz vezetett.

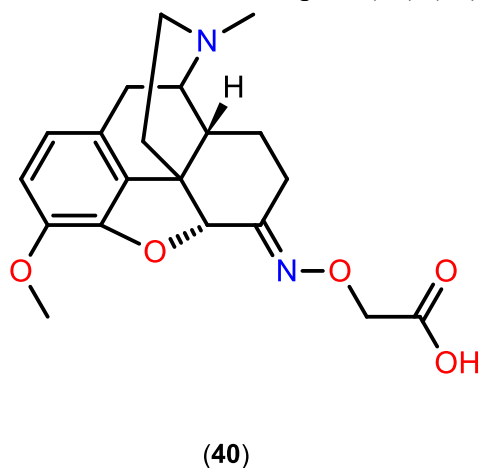
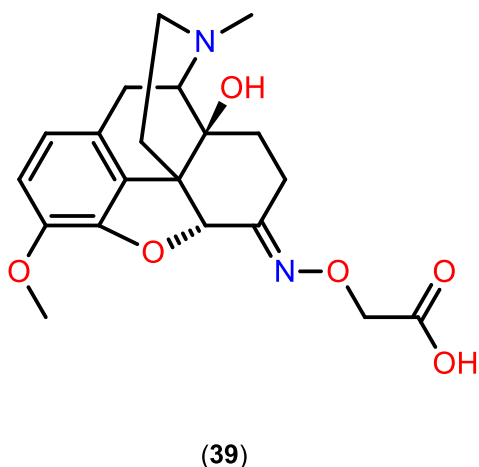
1.4.5. *N*-alkil haptének: amino-származékok



Normorfint γ -trifluoracetamido-propilbromiddal *N*-alkileztek dimetilformamidban, majd a trifluoracetilcsoportot metanolban lúggal (1M NaOH) távolították el, és megkapták az *N*-(γ -aminopropil)-normorfint (38). [43] Az immunogén előállításakor a BSA-t aktiválták, glutaraldehyddel bevezettek aldehid funkciós csoportokat, és az aktivált fehérjéhez kapcsolták az *N*-(γ -aminopropil)-normorfint.

1.4.6. Anti-oxikodon haptének

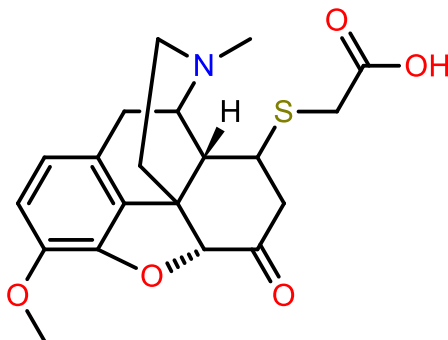
Pravetoni és munkatársai 2012-ben oxikodon és dihidrokodeinon típusú hapténeket állítottak elő, amelyekkel patkányokat és egereket vakcináltak, és ennek eredményeképpen a fájdalomcsillapító teszteken a vakcinált kísérleti állatok csökkent antinociceptív hatást mutattak. A haptének alapvegyületein C6 és C8 helyzetben képeztek származékot. [44-46] Az oxikodont, illetve a dihidrokodeinont karboximetil-hidroxilaminnal reagáltatták, és ezáltal a C6 *O*-szubsztituált oximokat kapták (39) (40).



A szabad karboxilcsoportokat tartalmazó vegyületeket vízmentes dimetilformamidban glicin-tetrapeptid-tercierbutil-észterrel reagáltatták 1-hidroxibenztriazol (HOBT), DCCI és 4-dimetilaminopiridin (DMAP) jelenlétében. A fehérje hozzákapcsolása után a C-terminális védőcsoportot trifluoecetsavval eltávolították.

Egy másik lehetőség volt, hogy a szabad karboxilcsoportokat tartalmazó oximokat *S*-tritol-ciszteaminnal reagáltatták HOBt, DCCI és DMAP jelenlétében, vízmentes dimetilformamidban. Ezután trifluorecetsavval a tritol-védőcsoportot eltávolították, így a szabad láncvégi merkaptocsoportot tartalmazó hapténhez jutottak.

További lehetőség a dihidrokodeinon haptén előállítására a C8 pozícióban történő származékképzés. A kodeinon kettőskötésére tioglikolsavat addicionáltak, így a merkaptocsoport a C8-as pozícióhoz kapcsolódott (41). A kapott C8 karboximetil-



(41)

származékot glicin-tetrapeptiddel, illetve *S*-tritol-ciszteaminnal reagáltatták az előzőekben ismertetett módon. [46]

Az immunogének specificitását vizsgálva az oxikodon-6-karboximetil-oximból és tetraglicilpeptidből előállított hapténről megállapították, hogy sokkal hatékonyabban képződtek a polispecifikus antitestek a dihidrokodeinon és oxikodon ellen. Az így kapott immunogén megakadályozta mind a dihidrokodeinon, mind az oxikodon bejutását az agyba, illetve gátolta a fájdalomcsillapító hatást is.

1.4.7. Anti-heroin haptének

A heroinisták kezelésében a heroin specifikus vakcinák kifejlesztésekor a morfin származékot egy hordozó fehérjéhez kell kapcsolni. A radio-immunanalitikai módszerek kidolgozása során nyert tapasztalatok természetesen e területen is hasznosíthatók.

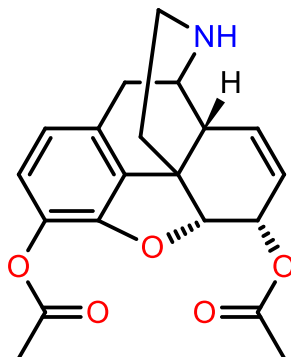
Ezen a téren a már korábban ismertetett módon először *Bonese* és munkatársai értek el eredményeket 1974-ben. [15] Évtizedekkel később *Anton* és munkatársai számoltak be elsőként a TT hordozó fehérje alkalmazásáról a heroin/morfin vakcina modellek tervezésében. [47] A morfin-6-hemiszukcinátot két lépésben kapcsolták a hordozó fehérjéhez. Először az ϵ -*N*-trifluoracetamido-kaprónsav *N*-hidroxi-szukcinimid aktív észtert kötötték a TT-hoz. Az így kapott fehérje konjugátum trifluoracetil-védőcsoportjának az eltávolítása után a szabad ϵ -aminocsoportot acilezték morfin-6-

hemiszukcináttal, EDAC kondenzálószer alkalmazásával. A kapott immunkonjugátumban a fehérjét és a haptén molekulát összekötő szénlánc (*spacer linker*) hossza kb. 20 Å, ami sokkal nagyobb távolság más immunkonjugátumokkal összehasonlítva. Ez utóbbi azért lényeges, mert az összekötő nyílt szénlánc hossza befolyásolja a domináns epitóp determinánsokat, tekintettel a haptén-analagon és az immunsejtek kölcsönhatására. Egy másik jelentős fejlesztés volt az adjuváns formuláció (alumínium-hidroxid gél) alkalmazása az immunkonjugátum adagolásakor.

Az antitestek képződését enzim-immunanalitikai módszerrel (ELISA) határozták meg. Maximális antitest titer értékeket kaptak a negyedik injekció után, ezután elegendő volt három havonként injektálni az immunkonjugátumot, hogy megmaradjon egy hatékony antitest szint, akár egy évig is. Az anti-morfin antitestek semlegesítették a heroin hatását olyan patkányokon, melyeket betanítottak a heroin önadagolására. Természetesen a vakcinakezelés hatékonysága nagymértékben függ az antitest szinttől, nyilvánvaló módon a magasabb titerek hatékonyabbak. Fontos megfigyelés az is, hogy a morfin-6-észter haptén immunkonjugátum hatására képződő antitestek keresztreakciót mutattak a heroinnal (az antitestek nem tudják a két vegyületet megkülönböztetni) és így a specifitás ekvivalens a morfinra és a heroinra.

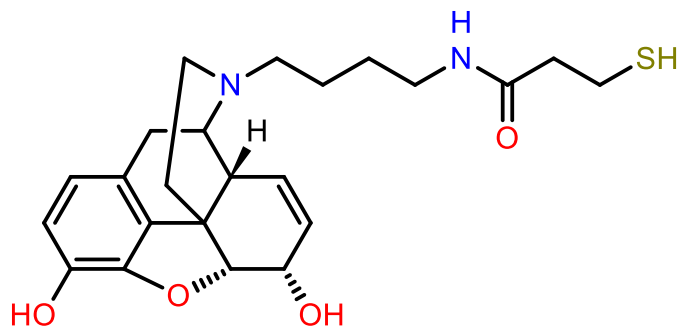
Mivel az immunglobulinok nem képesek átjutni a vér-agy gáton, ezért az anti-morfin antitestek a morfint és a heroint a plazmában megkötik, és így visszatartják ezeket a vegyületeket, megakadályozva ezzel, hogy bejussanak a központi idegrendszerbe. Ez tehát egy hatékony kezelési módszer lehet a heroin/morfin függőség gyógyításában. Miután a detoxifikálás vagy a fenntartó kezelések során az opioidok a központi idegrendszerben fejtik ki hatásukat, az ezekkel együtt jelentkező mellékhatások is itt közvetítődnek. A vakcinálás előnye ezzel összefüggésben, hogy a semlegesített drogok nem jutnak be a központi idegrendszerbe. Ugyanakkor a vakcinálás alkalmazása előtérbe kerülhet, mint kiegészítő terápia az ún. klasszikus farmakoterápia alkalmazása mellett.

Stowe és munkatársai (2011) számos heroin-szerkezetű haptént állítottak elő, amelyeket hordozó fehérjéhez kapcsolva heroin-vakcinákat kaptak. [48,49] A vegyületek szintézisének 3,6-diacetil-normorfinból (42) indultak ki, melyet redukív aminálási



(42)

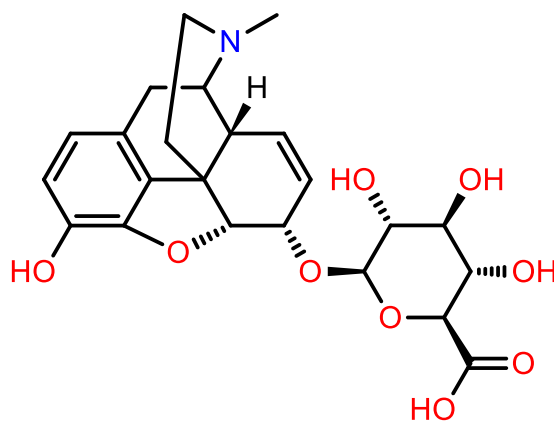
reakcióban *N*-Boc- δ -aminobutanállal reagáltattak nátrium-triacetoxibórhidriddel, ecetsavas közegben. A védőcsoportot trifluorecetsavval eltávolítva kapták az *N*-szubsztituált 3,6-diacetil-normorfin, mely az aminocsoportot δ -helyzetben tartalmazza. Ezt a vegyületet reagáltatták trietil-amin jelenlétében a β -tritolmerkapto-propionsav *N*-hidroxi-szukcinimid aktív észterrel. Amennyiben a reakcióelegyet lúggal hidrolizálták, az acetilcsoportokat el tudták távolítani. Az így kapott savamidból trifluorecetsavval a tritol-védőcsoportot eltávolítva láncvégi szabad merkaptocsoportot tartalmazó haptént kaptak (43). Ezt a vegyületet maleinimid-aktivált KLH-val és BSA-val is kapcsolták. A



(43)

γ -karboxipropil-*N*-szubsztituált-maleinimidet EDAC-es kondenzációval kapcsolták a hordozó fehérjéhez, majd az így kapott konjugátum maleinimid-kettőskötésére addicionált a haptén molekula láncvégi merkaptocsoportja, miután a tritol-védőcsoportot trifluorecetsavval a konjugátum jelenlétében eltávolították. Így kétféle immunkonjugátumot kaptak, az egyik morfin-, a másik pedig heroinszerű. Mindkét típusú immunkonjugátum magas titerű immunválaszt produkált. Ezekkel patkányokat immunizáltak, majd az antitestek izolálása után vizsgálták a morfinszerű vakcina és a

heroinszerű vakcina specificitását. A heroinszerű immunkonjugált vakcina elsősorban a 6-acetil-morfínnal szemben mutatott kiemelkedő affinitást, a heroint és a morfint csökkent affinitással kötötte. A morfinszerű vakcina nagy affinitást mutatott a morfínnal szemben, viszont csökkent aktivitást mutatott a heroinnal szemben, a 6-acetil-morfint viszont nem kötötte meg. A kétféle vakcinatípus nem mutatott keresztreakciót a morfin-6-glükuroniddal (44), a kodeinnel, a naloxonnal és a naltrexonnal. Ez a megfigyelés azért



(44)

lényeges, mert így a heroin-immunterápia alkalmazásakor a heroinisták kezelése során az antagonisták is használhatók. A heroin vakcina gátolta a heroin fájdalomcsillapító hatását (sc. adagolás, *hot-plate* teszt) és emellett patkányokon gátolta a heroin önadagolást.

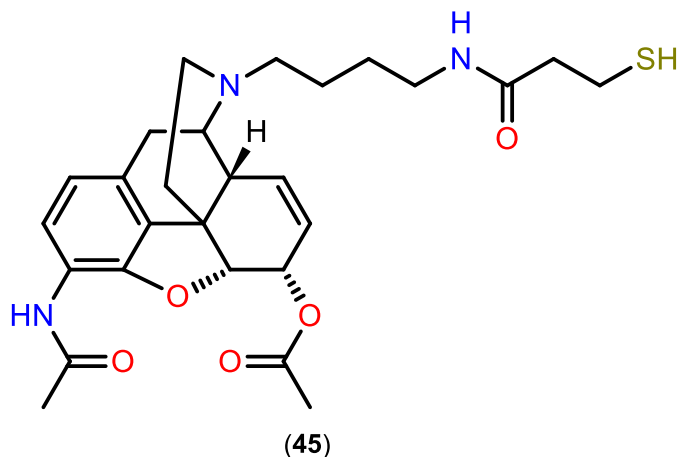
Schlosburg és munkatársai vizsgálták a heroin vakcina hatását heroin-dependens patkányokon. A kísérleti állatok megtanulták a heroin injekció használatát, és kialakult a kényszerítő önadagolás. [50] A vakcina hatására a heroin felvétel csökkent, és a fizikális dependencia jeleit tapasztalták. A heroin vakcina patkányokon szintén gátolta a heroin-kereső magatartást, amit kondicionált hely preferencia teszten vizsgáltak.

A heroin–KLH vakcina a *hot-plate* teszten (patkány) megakadályozta a heroin antinocéptív hatását, viszont a morfin–KLH vakcina a *hot-plate* teszten nem befolyásolta a heroin fájdalomcsillapító hatását. Ezzel szemben a heroin–KLH vakcina védelmet nyújtott a morfin-indukált antinocéptív hatással szemben.

Bremer és *Janda* egy olyan heroin analogon haptént szintetizáltak, amely a C3 helyzetben nem *O*-acetyl, hanem *N*-acetyl csoportot tartalmaz. [51] Ez a vegyület a heroin-vázis hapténnel ellentétben nem érzékeny hidrolízisre.

A szintézis során 3-dezoxi-3-aminomorfinból indultak ki, ami morfinból öt lépésben nyerhető. Ezt acetyl-bromiddal reagáltatva kapták a 3-acetyl-amino-4,5 α -epoxi-7,8-didehidro-6-*O*-acetyl-*N*-metil morfinánt. Ebből a heroin analogonból *N*-

demetilezéssel, majd *N*-alkilezéssel az *N*-butilaminoszármazékhoz jutottak, melyet β -tritolmerkapto-propionsavval acileztek (45).



A heroin esetében olyan antitestek indukciója indokolt, melyek felismerik a heroint és fő metabolitjait (morfin és 6-*O*-acetilmorfin), mivel a heroin a vérben gyorsan dezacetileződik, elsősorban a C3 helyzetben és kisebb mértékben a C6 helyzetben. A heroin és metabolitjai, mint haptének nem képesek indukálni az antitestek képződését, ezért a haptént egy konjugációs reakcióval alkalmas fehérje hordozóhoz kell kapcsolni. Ezen kívül célszerű egy olyan adjuváns alkalmazása, amely biztonságos és hatékony a humán alkalmazásra, és kiterjedt profilú, magas titerű anti-haptén antitestek létrehozására képes.

A heroin vakcina tartalmaz egy haptén szerkezetet, amely tükrözi az opioid vázszerkezetet, és kémiaiilag kötött egy immunogén hordozó fehérjéhez. Ha ezt a haptén-fehérje konjugátumot injektáljuk, akkor létrejön egy humorális immunválasz(reakció) a heroinnal szemben. A poliklonális antitestek a periférián magas fokú specifitással megkötik a kábítószer, megakadályozva a belépést az agyba, és így blokkolják a központi idegrendszeri hatásokat.

Amennyiben az immunkonjugátum formulációja egy immunstimuláns adjuvánssal megoldható, ez fokozza a humorális válaszreakciót a célzott antigénnel szemben. Tehát a vakcina rendelkezik egy heroinszerű hapténnel és egy megfelelő adjuvánssal, így ez egy potenciálisan hatásos kezelés lehet a heroin addikcióra.

Az előbb említett *Bremer* és *Janda* által tervezett immunkonjugátum magába foglal egy kémiai epitóp stabilitást is, és várhatóan a haptén kiváltja az anti-heroin humorális immunválaszreakciót. Ugyanakkor a haptén megnövelt stabilitása fokozni fogja az anti-heroin antitest titer.

Az immunfarmakoterápia (vakcinák alkalmazása a kábítószerrel szemben) potenciálisan egy sokkal vonzóbb kezelési opció a heroin-addikció gyógyításában, összehasonlítva a farmakoterápiával.

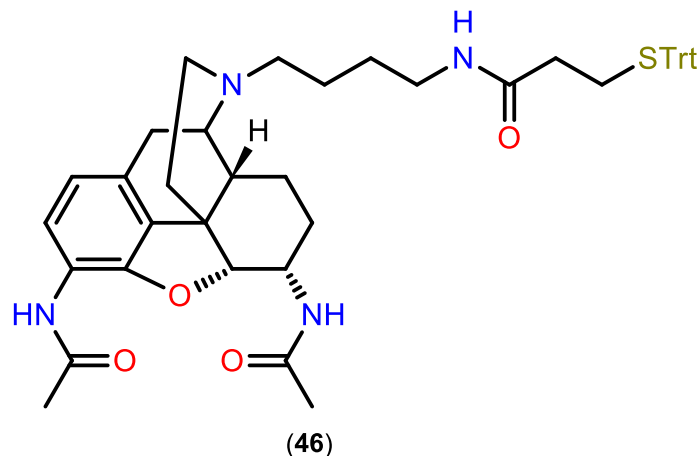
Az észter típusú heroin-haptének egyébként $\text{pH} \approx 7,4$ pufferben $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on nem stabilak, kb. 97 óra a felezési idejük. Ezért az immunkonjugátumokat gyakorlatilag a preparálás után fel kell használni.

Bremer és Janda a KLH fehérjéhez kötött 3-acetamido-6-*O*-acetilmorfin hapténnel egereket immunizáltak, az immunkonjugátumot alumínium só adjuvánssal formulálták.

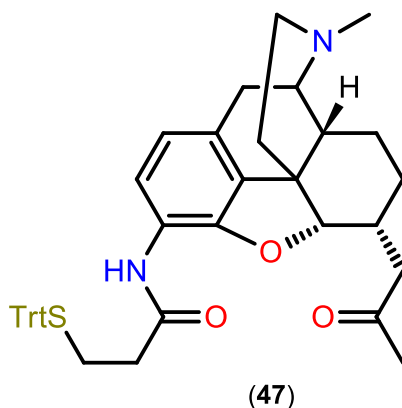
Összehasonlították a 3-acetamido-6-*O*-acetilmorfin- és a 3,6-diacetilmorfin-haptén immunkonjugátumok injektálásakor képződő antitestek tulajdonságait enzim-immunanalitikai mérésekkel. Gyakorlatilag mindkét haptén konjugátum egyformán immunogénnek bizonyult, az antiheroin antitest titerek közel azonosak voltak. A C3-acetamid antitest affinitás a 6-*O*-acetilmorfinra szignifikánsan lecsökkent a C3 *O*-acetil-hapténre mért affinitásokhoz hasonlítva. Ugyanakkor a stabilabb C3 acetamid antitest kb. 12-szer gyengébben köti a heroint, és a szerzők ezt azzal magyarázzák, hogy a C3 acetamid haptén esetében egy kismértékben megváltozott epitóppal kell számolni, mint a C3 *O*-acetil haptén esetében. Bár a C3 acetamid vakcina megnövekedett rezisztenciát mutat a hidrolízissel szemben, a szignifikánsan lecsökkent antitest affinitása a 6-*O*-acetilmorfinnal szemben korlátozza a terápiás potenciálját, mint heroin vakcina.

Li és munkatársai három haptén szintéziséről számoltak be, melyeket nyílt szénláncokon keresztül TT hordozóhoz kapcsolnak. [52] A vegyületek szintézisét dihidromorfinból valósították meg több (>10) lépésben, de mindhárom haptén esetén a kiindulási vegyület 3-dezoxi-dihidromorfinon volt. Az első vegyület a C3 és C6 helyzetben tartalmazott funkciós csoportokat: a C6 α helyzetben 2-oxopropilcsoportot, míg a C3-asban az amino-szubsztituenst β -tritolmerkaptó-propionsavval acilezték. A következő haptén alapvegyülete a 3-dezoxidihidromorfinon, amely C3 és C6 α helyzetben 2-oxopropilcsoportot tartalmaz, míg a nitrogént δ -aminobutylcsoporttal alkilezték, és a láncvégi aminocsoportot β -tritolmerkaptó-propionsavval acilezték. A harmadik haptén a C3, C6 α és a 17 (N) helyzetben tartalmazott funkciós csoportokat. A

C3 és a C6 α szubsztituens acetamidocsoport, míg a nitrogén szubsztituens ugyanaz volt, mint az előző vegyületnél.

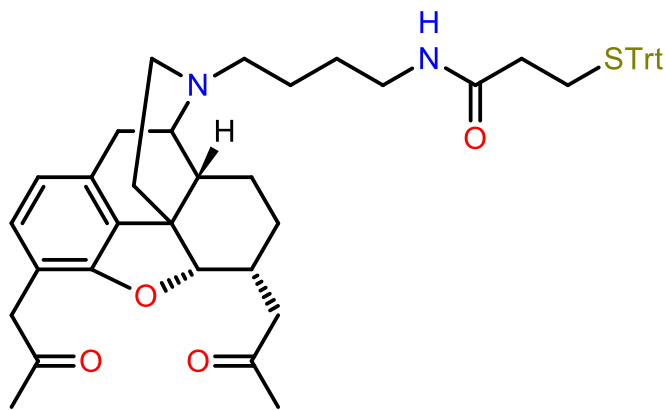


A DiAmHap (46) előállításakor 3-dezoxidihidromorfinból indultak ki, melyet benzilammal reagáltatva Schiff-bázist kaptak. Ennek a sztereospecifikus redukciója nátrium-triacetoxibórhidriddel történt, majd a C6 α -benzilamint katalitikus hidrogénezéssel (H₂/Pd-C) *N*-debenzilezték, és a C6 α -aminocsoportot acetilezték. Ezután a C1 pozíciót halogénezéssel védték (*N*-klórszukcinimid–trifluorecetsav), és így sikerült a nitrocsoport regioszelektív beépítése (nátrium-nitrit–trifluorecetsav) a C3 helyzetbe. Katalitikus hidrogénezéssel (H₂/Pd-C) a nitrocsoport redukciója aminná, és a C1 klór védőcsoport eltávolítása egy lépésben megoldható, majd a C3 aminocsoportot acetilezték ecetsavanhidriddel. A 3,6 α -diacetamid *N*-demetilézését klórszénsav α -klóretilészterrel végezték, és a norvegyület *N*-alkilezésével nyerték a kérdéses haptén analogont.



A 6-PrOxyHap (47) szintézise során 3-dezoxi-dihidromorfinból Wittig-reakcióval 6-dezoxi-6-metilén-származékot kaptak, melyből hidroborálással (BH₃–dimetilszulfid) a C6 α -hidroximetil származékhoz jutottak. A továbbiakban a primer alkoholos hidroxilcsoportot mezilezték, majd a meziloxicsoportot cianidra cserélték S_N2 reakcióban. A C6 α -cianometil-származék Grignard-reakciójában metilmagnézium-

joddal kialakult a C6 α -2-oxopropil-oldallánc. Ezután a C1 pozíciót klór-szubsztituens (*N*-klórszukcinimid–trifluoecetsav) beépítéssel védték, majd a C3 helyzetben nitráltak (nátrium-nitrit–trifluoecetsav). A nitrocsoport redukcióját aminná katalitikus



(48)

hidrogénezéssel ($H_2/Pd-C$) végezték, ekkor a C1 dehalogéneződés is végbement.

A DiPrOxyHap (48) előállításánál dihidrokodeinon volt a kiindulási vegyület. Itt az előző vegyületre alkalmazott reakciósorral először beépítették a C6 α -2-oxopropil-oldalláncot. A C3 metilétert *O*-demetilezték bór-tribromiddal, majd a fenolos hidroxilcsoportot észteresítették *N*-fenil-bisz-trifluormetánszulfonimiddel. A C3 triflát-észtert Stille kapcsolási reakcióval allil-tributil-ón reagenssel C3-dezoxi-C3-allil-származékká alakították. Az allilcsoport oximerkurálási reakciója, majd a higany eltávolítása után (1. $Hg(OAc)_2$, 2. $PdCl_2-CuCl_2-LiCl$) a C3-dezoxi-2-oxopropil-származékhoz jutottak.

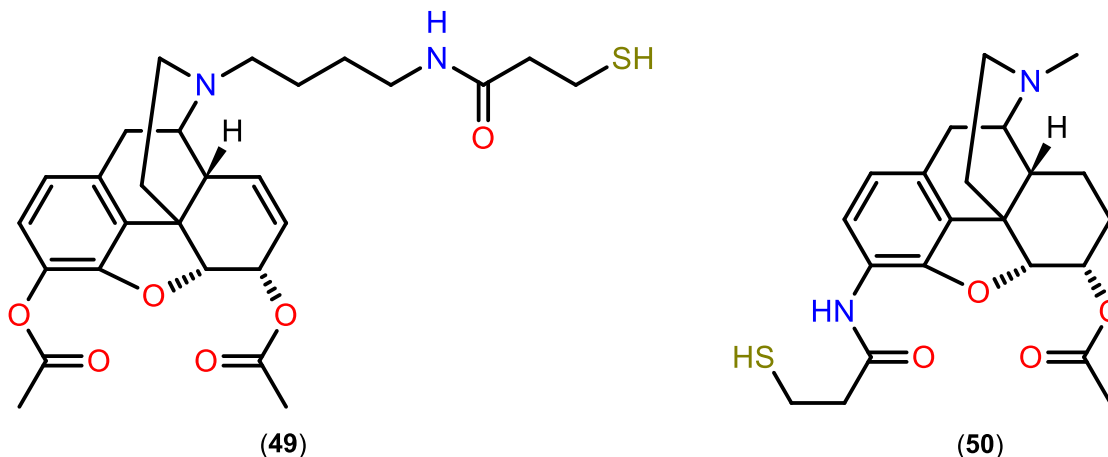
A hapténeket TT-hoz kapcsolták, majd liposzómákat alkalmaztak, mint adjuváns, és a konjugátumokkal egereket immunizáltak. A képződő antitestek titerértékei az alábbi sorrendet mutatták: DiAmHap (46) >> DiPrOxyHap (48) > 6-PrOxyHap (47).

Vizsgálták a heroin, a morfin és a 6-*O*-acetilmorfin kötődését az anti-haptén antitestekhez. A 6-PrOxyHap–TT-dal immunizált állatokon a képződő antitesteken mindhárom vegyület gátló hatású. A DiPrOxyHap–TT anti-haptén antitestek esetén a morfin nem versengett a kötőhelyen, a heroin és a 6-*O*-acetilmorfin gátolta a kötődést. A DiAmHap–TT konjugátummal kapcsolatos eredményeket korábban közölték.

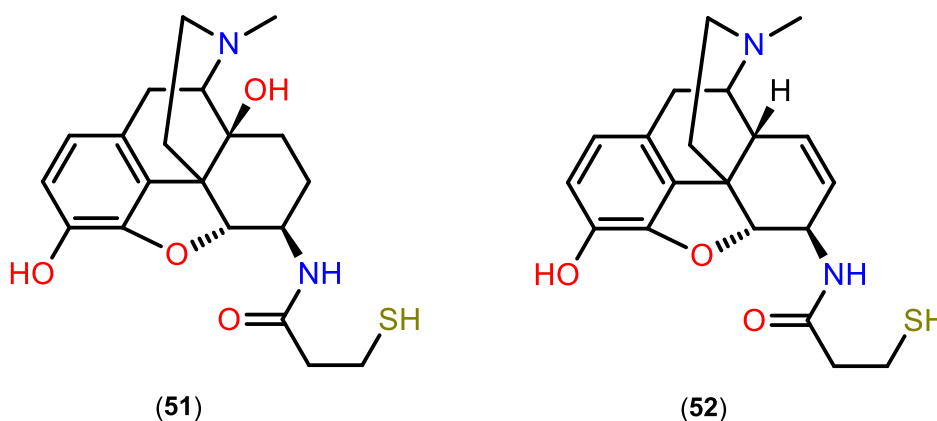
Az immunizált egereken vizsgálták a heroin fájdalomcsillapító hatását (*hot-plate* teszt), és a heroin hatásának csökkenését mérték a DiAmHap–TT és a 6-PrOxyHap–TT

konjugátumok alkalmazásakor. A DiPrOxyHap–TT anti-haptén antitesteknek ilyen jellegű védőhatása nem volt.

Matyas és munkatársai négy heroin haptén analogon antitest indukáló hatását vizsgálták. [53] Előállították a Stowe és munkatársai által közölt diacetyl-normorfin haptént (HerHap) (49), amely a nitrogénen δ -amino-butyl-szubsztituenst tartalmaz, és a



láncevégi nitrogén β -merkpto-propionsavval van acilezve. A 6-*O*-acetildihidromorfin haptén (6-AcMorHap) (50) a C3 helyzetben aminocsoportot tartalmaz, amit szintén β -merkpto-propionsavval acileztek. Előállítottak egy oximorfon haptént (OMAHap) (51) is: a 6 β -oximorfamint a β -merkpto-propionsav *N*-hidroxiszukcinimid aktívészterrel reagáltatták és a savamidhoz jutottak. A 3-hidroxi-6 β -amino-4,5-epoxi-7,8-didehidro-*N*-metilmorfinánból β -merkpto-propionsavval kaptak C6-amidot (MorHap) (52).



A haptén analogonokat hordozó fehérjékhez (BSA, TT) kötötték, HOBt és EDAC alkalmazásával. Az immunizálás előtt a konjugátumokat liposzómákkal formulálták, melyek monofoszfóril-lipid-A-t tartalmaztak. Ezt a hatékony adjuváns rendszert korábban sikeresen alkalmazták humán vakcinálási vizsgálatokban.

A TT-hoz kapcsolt négy heroin haptén konjugátummal egereket immunizáltak, és a képződő antitestek magas titereket produkáltak MorHap (52) > HerHap (49) >> 6-AcMorHap (50) >> OMAHap (51) sorrendben.

A heroin vakcina kifejlesztése során az antitestek indukciója mind a heroinra, mind az aktív metabolitjaira (morfin, 6-*O*-acetilmorfin) szükséges, mivel a heroin kis molekula, amely az adagolás után gyorsan dezacetileződik a C3 helyzetben a véráramban, majd utóbb a C6 észtercsoport is hidrolizál. [54] A kutatócsoport két heroin analogon haptén, a MorHap (52) és a DiAmHap (46) vizsgálatáról számolt be. Mindkét morfin-származékot BSA és TT hordozóhoz kötötték, és monofoszforil-lipid-A liposzóma adjuváns alkalmazásával egereket immunizáltak. Lényeges, hogy a DiAmHap hidrolitikusan stabil a diacetyl-haptén analogonnal szemben, mivel az utóbbi az immunizálás alatt elbomlott és független immunreakciókat indukált mind a heroinra, mind a metabolitjaira. Ez azt eredményezte, hogy az antiszérum antitestek keverékéből állt. A DiAmHap, amely a nitrogéneken keresztül egy hosszú szénláncal kötődik a hordozó fehérjéhez az izoszter acetamido C3 és C6 csoportok miatt olyan antitesteket indukál, melyek reaktívak a heroin C3 és C6 acetilcsoportjaival. A MorHap–TT által kiváltott antitesteken vizsgálva a kompetitív gátlást a morfin és a 6-*O*-acetilmorfin gátló hatása nagyobb volt, mint a heroiné. A DiAmHap–TT által indukált antitestek esetében egyik vegyület sem mutatott kompetitív gátlást, vagyis ezek az antitestek nem specifikusak a heroinra és metabolitjaira. Ugyanakkor az antitestek gátolhatók magával a haptén molekulával, és az antitestek nagymértékben haptén-specifikusak. Ugyanezen antitestek a MorHap molekulával keresztreakciót mutattak. Az immunizált egereken vizsgálták a heroin fájdalomcsillapító hatását *hot-plate* teszten. A MorHap–TT-dal és a DiAmHap–TT-dal immunizált egereken a heroin hatása csökkenést mutatott, az immunizálás a heroin-indukált antinociceptív hatás gátlását eredményezte. A heroin esetében a haptén analogont egy hidrolitikusan stabilis, vagy a nitrogénhez egy hosszú szénláncon keresztül, vagy a C6 helyzetben konjugációs reakcióra alkalmas csoporttal a TT hordozóhoz kötjük, majd egy liposzóma jellegű adjuvánsal formulációt létrehozva az immunkonjugátummal kiváltjuk az immunválaszt. Így az antitestek magas titerrel keletkeznek, és keresztreakciót mutatnak a heroin metabolitjaival szemben.

Torres és munkatársai a 6β-aminomorfinból β-tritilmerkaptó-propionsavval acilezve kapott haptén analogont BSA-hoz kapcsolták szukcinimid-maleimid-polietylén-

glikol (SM(PEG)₂) linkert alkalmazva. [55] Az SM(PEG)₂ linker egy *N*-alkilezett maleinimid származék, ahol az alkilcsoport két PEG egységből áll, és tartalmaz egy láncvégi ω-karboxilcsoportot. Ebből a karbonsavból *N*-hidroxi-szukcinimiddel aktívésztert állítottak elő, majd EDAC jelenlétében a BSA-hoz, illetve a fehérje lizin oldalláncának ε-aminocsoportjához kötötték. Ezután a BSA-konjugátum jelenlétében a MorHap tritil védőcsoportját trifluorecetsavval lehasították. Ekkor a MorHap szabad merkaptocsoportja addicionált a BSA-konjugátum maleinimid kettőskötésre. Az így létrejött MorHap–BSA konjugátumban a linker és a MorHap mennyiségét változtatva a hordozó fehérjéhez kapcsolt haptén molekulák száma rögzíthető volt. A kapcsolási módszerrel olyan konjugátumokat preparáltak, ahol a hordozó fehérje meghatározott számú (pl.3,5,10,15) haptén molekulát tartalmazott. A fehérjéhez kapcsolt haptén molekulák számának a meghatározására több mérési módszert dolgoztak ki, úgy mint tömegspektroszkópia, illetve enzim-immunanalitikai meghatározások.

2. Célkitűzések

Célunk a bevezetésben ismertetett hapténeken kívül újabb származékok előállítása és szerkezetvizsgálata lett. A szerkezeti módosítások lehetőségeit figyelembe véve háromféle haptén szintézisét kívántuk megvalósítani: i) *N*-karboxialkil-haptének; ii) *N*-aminoalkil-haptének; iii) 3-*O*-karboxialkil-haptének.

A legegyszerűbb utat a 3-*O*-származékok előállítása jelenti, itt ugyanis nincs szükség előzetes szerkezetmódosításra. Az *O*-alkilezéshez klór- illetve brómecetsav-etilésztert célszerű használni. Ugyanakkor az észterek csak a haptének prekursorainak tekinthetők, így ezek hidrolízisének megvalósításával nyerhetjük a kívánt vegyületeket.

Az *N*-alkil-származékok szintéziséhez szükségünk van a megfelelő norvegyületre. Ezt *N*-demetilézési reakcióval céloztuk megvalósítani, klórszénsav- α -klóretilésztert alkalmazva, ami a széleskörűen alkalmazott klórszénsav-vinilészter reakcióján alapuló módosított reagens. Mivel a szakirodalomban nem teljeskörű a norszármazékok analitikája, így ezek NMR asszignációját is feladatunknak tekintettük.

Az összekötőlánc hosszától függően alkalmazhatunk klór/brómecetsav-etilésztert vagy pedig etil-akrilátot a karboxi-haptének előállítására szolgáló *N*-alkilezési reakciókhoz. A termékekre továbbra is igaz lesz, hogy haptén prekursoroknak tekinthetők, így a 3-*O*-hapténekhez hasonlóan hidrolízissel nyerhetjük a kívánt vegyületeket.

Az *N*-aminoalkil-haptének elővegyületének az *N*-cianoalkil-származékok tekinthetők. Ezek előállítására a karboxil-vegyületekhez hasonló reagenseket terveztük használni, úgy mint klórecetsavnitril, illetve akrilnitril. Ezekből redukcióval juthatunk el az amino-származékokhoz, amit lítium-alumíniumhidriddel vagy nátrium-bórhidriddel valósíthatunk meg. Ugyanakkor figyelni kell arra, hogy a C6-oxo kiindulási vegyületeket (noroximorfon, noroxikodon) előzőleg védenünk kell, hogy megakadályozzuk a redukciójukat. Ezt etilén-ketál védőcsoporton keresztül kívántuk megvalósítani, amit a reakcióút legvégén savas hidrolízissel lehet eltávolítani.

Végezetül az előállított haptének fehérjékkel való kapcsolási reakcióinak vizsgálata volt a célunk. Ezt modellezendő a legegyszerűbb aminosavhoz, a glicinhez terveztük kapcsolni a vegyületeinket a szakirodalomban ismertetett karbodiimidés módszereket alkalmazva.

Az így nyert származékok a haptén és farmakológiai vizsgálatok szempontjából mind ígéretesnek számítanak. Az előállított molekulák szerkezetét és tisztaságát NMR, MS és olvadáspont mérésekkel kívántuk igazolni.

3. Módszerek

3.1. Alkalmazott reakciók

A célvegyületek előállításához *O*- és *N*-alkilezést választottunk. Az *N*-alkilezést megelőzően szükséges a morfin származékok *N*-demetilézése. Az előállított észtereket lúgos hidrolízissel alakítottuk át szabad karboxilcsoportot tartalmazó vegyületekké. A molekulák kapcsolását fehérjekémiai reakciókkal próbáltuk megvalósítani. A reakciók részletes leírására a 5. Megbeszélések fejezet 5.6. Kísérletes rész alfejezetében kerül sor.

3.2. Reagensek és oldószerek

A szintézisekhez felhasznált ópiátokat (morfin, dihidromorfin, kodein, dihidrokodein, oximorfon, oxikodon, naloxon, naltrexon) az Alkaloida Vegyészeti Gyár Zrt.-től (Tiszavasvári, Magyarország) szereztük be. A reagensek a Sigma-Aldrich (Steinheim, Németország) és Alfa Aesar (Ward Hill, MA, Amerikai Egyesült Államok) cégektől származtak. Az oldószereket a Molar Chemicals (Budapest, Magyarország) és a Merck (Darmstadt, Németország) cégek szállították. Az NMR spektroszkópiához felhasznált deuterált oldószereket (>99,5 % izotóptisztaságú DMSO-*d*₆ és >99,5 % izotóptisztaságú kloroform-*d*₁, >99,5 % izotóptisztaságú D₂O) a Sigma-Aldrich és a Merck cégektől rendeltük.

3.3. Műszeres módszerek és vékonyréteg-kromatográfia

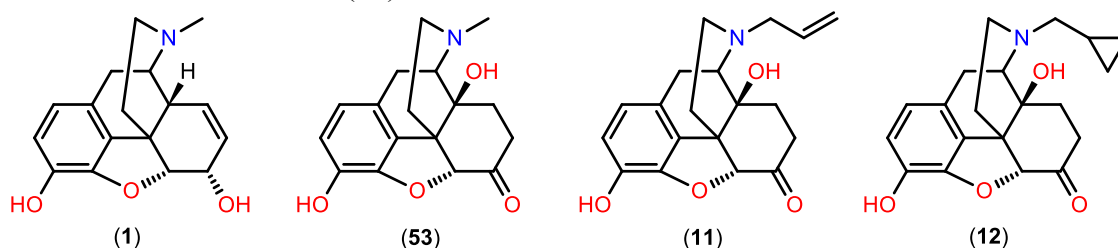
A vegyületek ¹H-NMR és ¹³C-NMR spektrumait Varian 600 MHz VNMRS (Varian Inc., NMR Systems, Palo Alto, CA, USA, Varian azóta az Agilent Technologies részét képezi) spektrométeren rögzítettük. A kémiai eltolódások (δ) értékei a DMSO-*d*₆ (¹H 2,50 ppm; ¹³C 39,5 ppm) és kloroform-*d*₁ (¹H 7,26 ppm; ¹³C 77,2 ppm) oldószer jeléhez viszonyítva kerültek megállapításra. Az anyagok ¹H-NMR és ¹³C-NMR jeleinek egyértelmű hozzárendelését egy- és kétdimenziós, homo- és heteronukleáris spektrumaik (gHSQCAD, gHMBCAD, gCOSY) elemzésével végeztük. A spektrumok kiértékelését Varian VnmrJ (Version 4.2 revision A) és MestReNova (Version 9.0.1-13254, Mestrelab, Santiago de Compostela, Spanyolország) szoftverek segítségével történt. A jelek multiplicitásának jelölésére szolgáló rövidítések: s – szingulett; d – dublett; dd – dublett dublett; ddd – dublett dublett dublett; t – triplett; dt – dublett triplett; q – kvartett; m – multipllett. Az olvadáspontmérést Stuart SMP-3 (Global Science NZ Ltd., Auckland, Új-Zéland) készülékkel végeztük.

A nagyfelbontású tömegspektrumokat az alábbi összeállításban mértük: Dionex Ultimate 3000 UHPLC, Orbitrap Q Exactive Focus Mass Spectrometer elektropray ionizációval (ESI) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). A tömegspektrumokat Agilent MassHunter B.02.00 szoftverrel értékeltük. A reakciók követésére vékonyréteg-kromatográfiát (VRK) használtunk szilika gél F254 alumínium lemezen (Darmstadt, Németország), leggyakrabban kloroform:metanol 9:1, illetve kloroform:aceton:diethylamin 5:4:1 mozgófázist alkalmazva. Az oszlop-kromatográfiás tisztítást Kieselgel 60-on (részecskeméret 0,040-0,063 mm, VWR Chemicals, Radnor, PA, USA) végeztük.

4. Eredmények

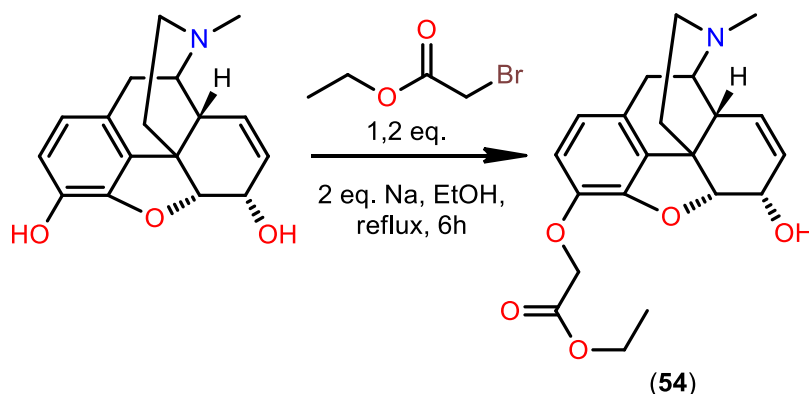
4.1. 3-*O*-karboximetil-haptének szintézise

A célul kitűzött vegyületek közül a C3 hidroxilcsoportot tartalmazó molekulák szerkezetmódosítása tekinthető egyszerűbb feladatnak, tekintettel arra, hogy nem szükséges előzetes reakciót végeznünk (l. *N*-alkil-származékok). A reakciókhoz négy vegyületből indultunk ki: morfin (1) hidroklorid sója, oximorfon (53), naloxon (11), naltrexon (12). Négy észter- és négy savszármazékot állítottunk elő, amelyek közül csak a 3-*O*-karboximetilmorfin (14) volt ismert.



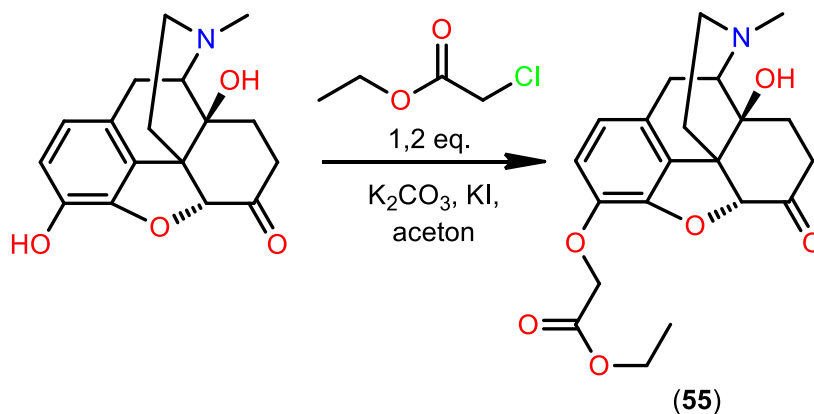
4.1.1. 3-*O*-karboximetil-haptén észterek szintézise

Fém nátriumot abszolút etanolban oldottunk, majd pedig morfin sósavas sót adtunk hozzá, hogy a morfin nátrium sójához jussunk. Az oldatot brómcetsav-etilészterrel 6 órát refluxáltattuk. Az átalakulást VRK-val követtük. A reakciót feldolgozva 3-*O*-karboximetilmorfin-etilészterhez (54) jutottunk. (9. ábra)



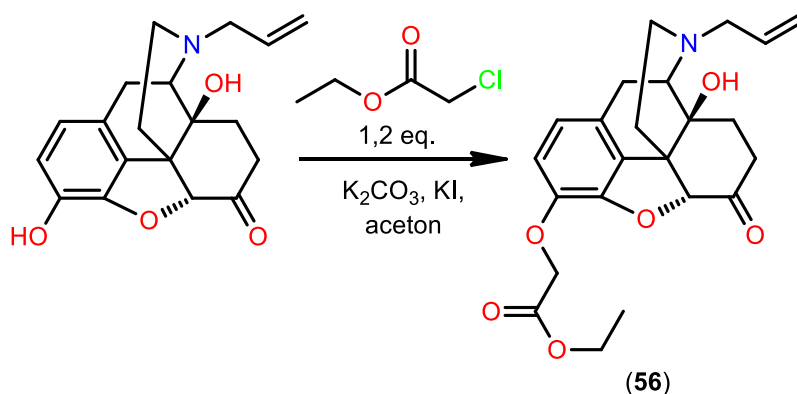
9. ábra 3-*O*-karboximetilmorfin-etilészter előllítása

Az oximorfont acetonban oldva, klórecetsav-etilészterrel reagáltatva kálium-karbonát savmegkötő és kálium-jodid jelenlétében 3-*O*-karboximetiloximorfon-etilészterhez (55) jutunk. (10. ábra)



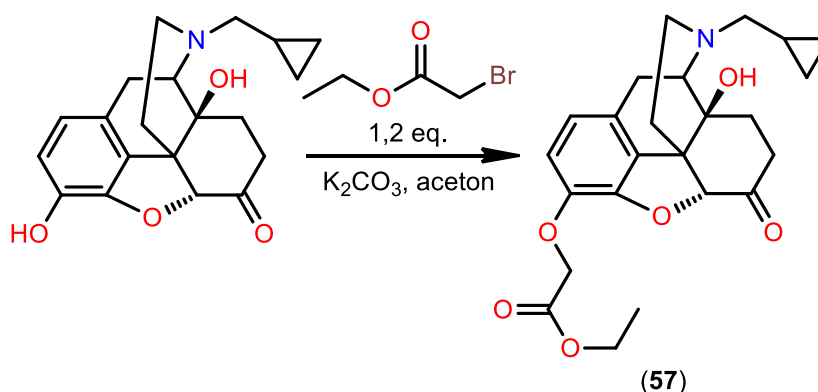
10. ábra 3-*O*-karboximetiloximorfon-etilészter előállítása

A naloxon származék előállítása megegyezik az oximorfonéval. A termék nem más, mint 3-*O*-karboximetilnaloxon-etilészter (56). (11. ábra)



11. ábra 3-*O*-karboximetilnaloxon-etilészter előállítása

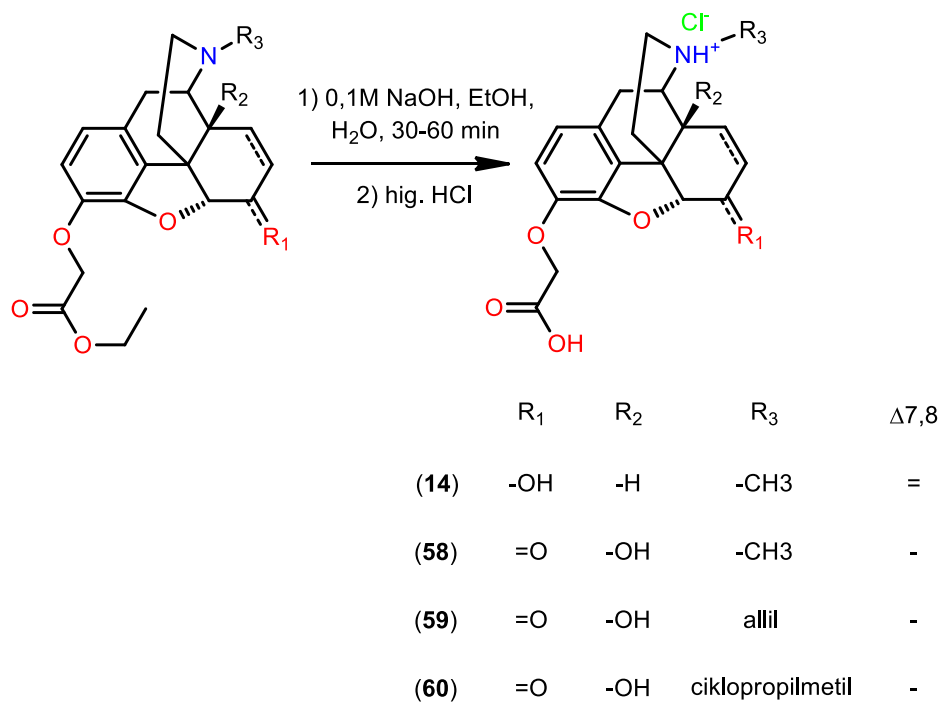
A naltrexonnal is hasonlóképpen jártunk el. A termék 3-*O*-karboximetilnaltrexon-etilészter (57) lett. (12. ábra)



12. ábra 3-*O*-karboximetilnaltrexon-etilészter előállítása

4.1.2. 3-*O*-karboximetil-haptén észterek hidrolízise

Ezt követően mindegyik észtert hidrolizáltuk, ugyanazt a protokollt követve. Minimális mennyiségű etanolt használva koszolvensként, nátrium-hidroxid vizes oldatával végeztük a reakciót. Az átalakulást követően hígított sósavval 2-3-ra állítottuk a pH-t, így a feldolgozást követően mindegyik esetben a karboxilcsoportot tartalmazó származék sósav sójához **(14)** **(58)** **(59)** **(60)** jutottunk. (13. ábra)

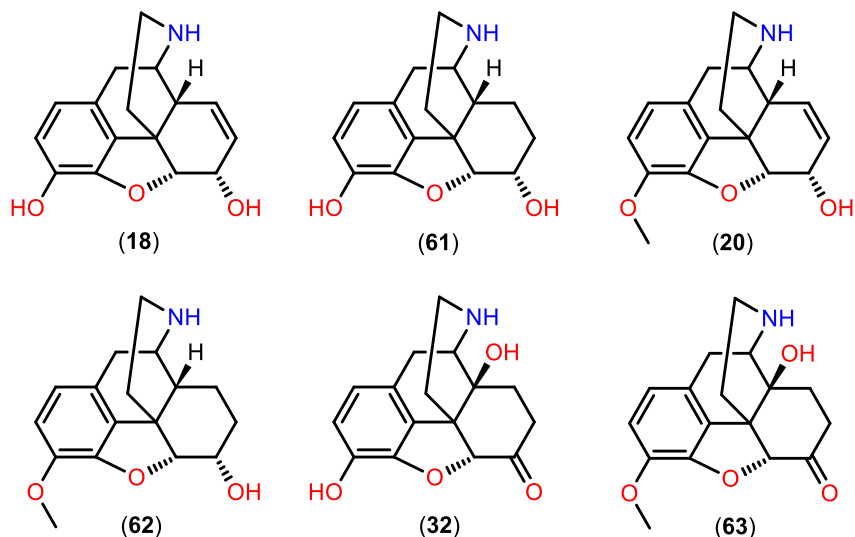


13. ábra A 3-*O*-karboximetil-haptén észterek hidrolízise

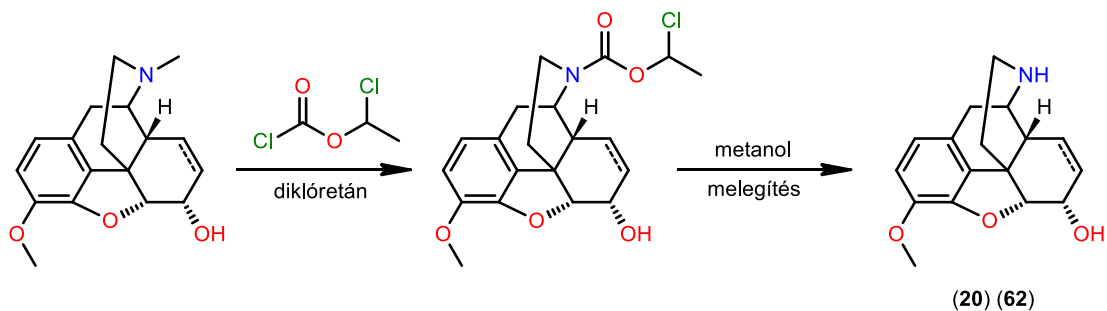
4.2. *N*-karboxialkil-haptének szintézise

4.2.1. *N*-demetilézési reakciók

Az *N*-alkil haptén származékokhoz szükségünk volt a megfelelő norvegyületekre. Mivel ezek nem álltak rendelkezésünkre, így nekünk kellett előállítanunk a további reakciókhoz szükséges kiindulási vegyületeket: normorfin (**18**), dihidronormorfin (**61**), norkodein (**20**), dihidronorkodein (**62**), noroximorfon (**32**), noroxikodon (**63**). [56-62]

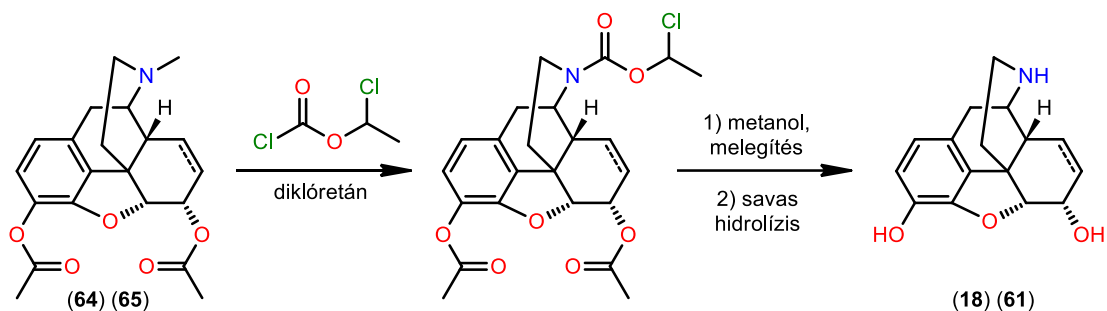


A kodein és dihidrokodein *N*-demetilézését diklórétánban végeztük klórszénsav- α -klóretilészterrel. A köztitermék karbamátot metanolban melegítettük, hogy a norkodein, illetve dihidronorkodein sósavas sóját kapjuk. (14. ábra)



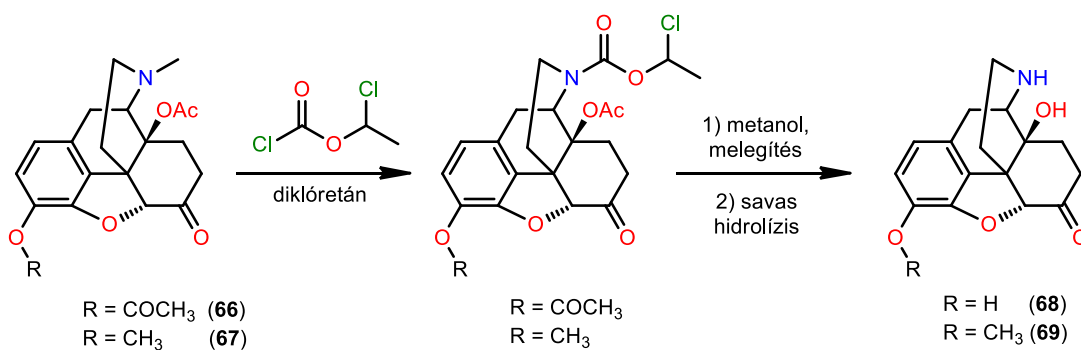
14. ábra Kodein és dihidrokodein *N*-demetilézése

A (dihidro)morfin esetében a 3,6-diacetil származékból (**64**) (**65**) kell kiindulni. A klórszénsav- α -klóretilészterrel végzett reakciót követően a 3,6-diacetil(dihidro)normorfin sósavas sóját kapjuk. Savas hidrolízis és feldolgozás után nyerjük a (dihidro)normorfint (**18**) (**61**). (15. ábra)



15. ábra Normorfin és dihidronormorfin előállítása

A 3,14-di-*O*-acetiloximorfon (66) és a 14-*O*-acetiloxikodon (67) *N*-demetilizését követően a 3,14-di-*O*-acetilnoroximorfon és a 14-*O*-acetilnoroxikodon sósavas sójához jutunk, amiket sósavval hidrolizálva nyerjük a noroximorfont (68) és noroxikodont (69). A 14-*O*-acetil védelemre azért van szükség, hogy megakadályozzuk a hidroxilcsoporton lejátszódó egyéb mellékreakciókat. Az acetilcsoport eltávolítását 10 %-os sósavval a norvegyületek sósavas sójával kell végeznünk, mivel a 14-*O*-acetil-norvegyületek bázisainak felszabadításakor $N \rightarrow O$ vándorlás történne. (16. ábra)

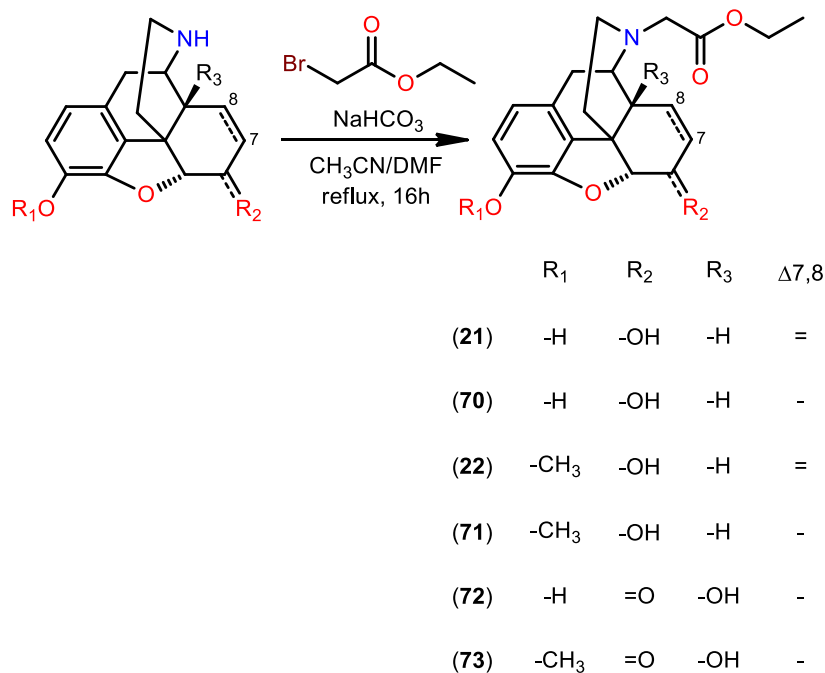


16. ábra Noroximorfon és noroxikodon előállítása

4.2.2. *N*-karboxialkil-haptén észterek előállítása

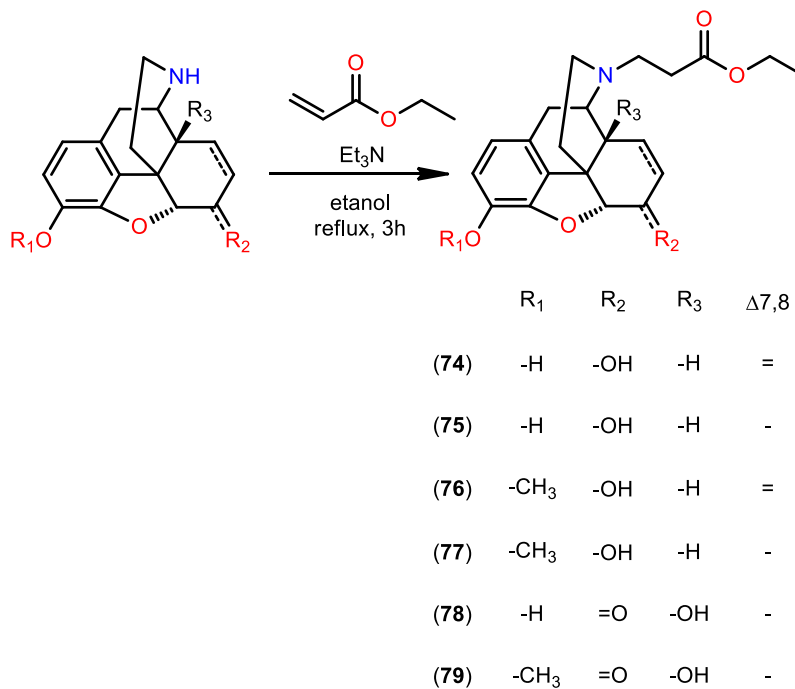
Az előállított nor-vegyületekből *N*-alkilezéssel lehet haptént előállítani. Ehhez az összekötő szénlánc hosszától függően kell megválasztani a reagenst.

Metilénhid esetében brómcetsav-etilésztert használtunk. A kiindulási norvegyület oldhatóságát figyelembe véve dimetilformamid (morfin sorozat) vagy acetonitril (kodein sorozat) oldószert alkalmaztunk. A savmegkötő nátrium-hidrogénkarbonát volt, és az elegyet 16 órát refluxáltattuk. Az átalakulást ezeknél a reakciónál is VRK-val követtük. Ezzel a módszerrel az *N*-karboximetilnorvegyületek etilésztereit kaptuk (21) (70) (22) (71) (72) (73). (17. ábra)



17. ábra *N*-karboximetil-haptén észterek előállítása

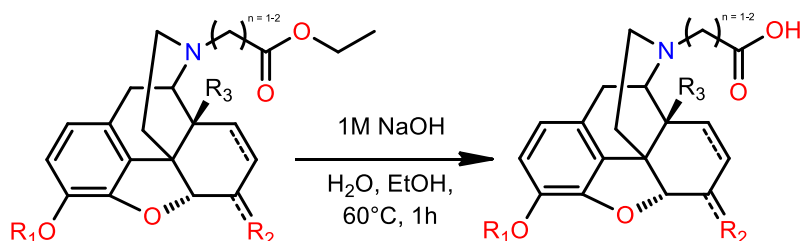
Az etilénhidas származékok szintéziséhez etil-akrilátot használtunk. A norvegyületeket etanolban oldottuk, és trietil-amin jelenlétében 3 órát refluxáltattuk a reagenssel. Az átalakulás minden esetben teljes volt, és az *N*-karboxietilnorvegyületek etilésztereit (74) (75) (76) (77) (78) (79) kiváló hozammal állítottuk elő. (18. ábra)



18. ábra *N*-karboxietil-haptén észterek előállítása

4.2.3. *N*-karboxialkil-haptén észterek hidrolízise

Miután előállítottuk a fent említett észtereket, mindegyiket hidrolizáltuk is a 3-*O*-alkil-haptén észterek hidrolízisének említett protokoll szerint. Minden esetben az *N*-alkil-haptének sósavas sói voltak a végtermékek (19) (80) (23) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89). (19. ábra)



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Δ7,8 | n |
|------|------------------|----------------|----------------|------|---|
| (19) | -H | -OH | -H | = | 1 |
| (80) | -H | -OH | -H | - | 1 |
| (23) | -CH ₃ | -OH | -H | = | 1 |
| (81) | -CH ₃ | -OH | -H | - | 1 |
| (82) | -H | =O | -OH | - | 1 |
| (83) | -CH ₃ | =O | -OH | - | 1 |
| (84) | -H | -OH | -H | = | 2 |
| (85) | -H | -OH | -H | - | 2 |
| (86) | -CH ₃ | -OH | -H | = | 2 |
| (87) | -CH ₃ | -OH | -H | - | 2 |
| (88) | -H | =O | -OH | - | 2 |
| (89) | -CH ₃ | =O | -OH | - | 2 |

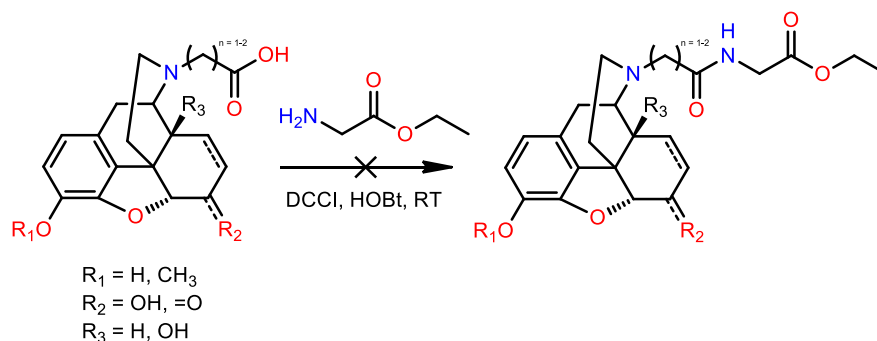
19. ábra *N*-karboxialkil-haptén észterek hidrolízise

4.3. *N*-acetyl-glicin-haptének szintézise

4.3.1. *N*-karboxialkil-haptének kapcsolási kísérlete

Szerettük volna tanulmányozni a szabad karboxilcsoporttal rendelkező *N*-alkil-haptének fehérjékkel való kapcsolási reakcióit. Ennek modellezésére először glicin-etilésztert használtunk. A konjugációhoz a peptid kémiában általánosan használt

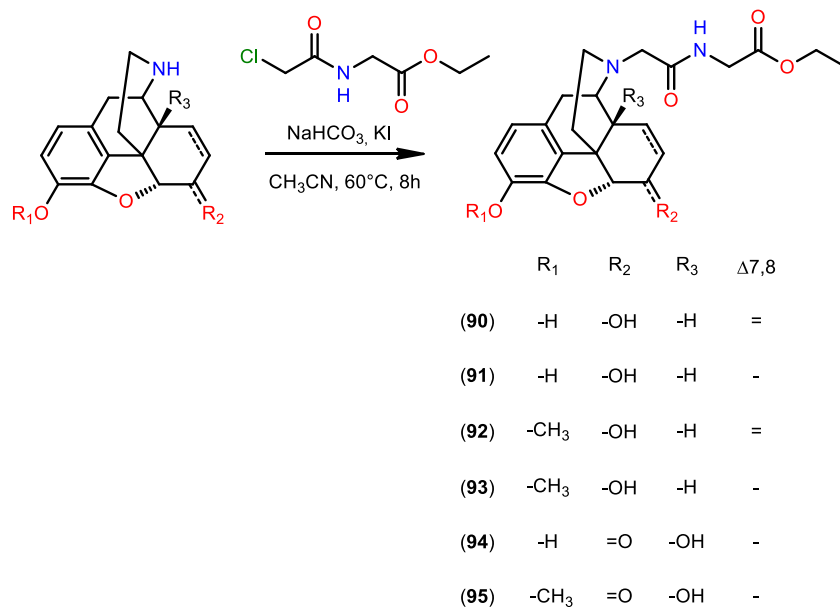
reagenseket alkalmaztuk, úgy mint DCCI, EDAC és HOBT. Sajnos a kivitelezett reakciók – ha működtek egyáltalán – nagyon alacsony hozammal mentek végbe, a reakciókat nagyon nehéz volt feldolgozni, és sokszor nem is a kívánt terméket eredményezték. (20. ábra) Emiatt a glicin-származékok előállítására más reakcióutat kerestünk.



20. ábra Sikertelen aminosav kapcsolási kísérlet

4.3.2. *N*-acetilglicin-haptén észterek előállítása norvegyületekből

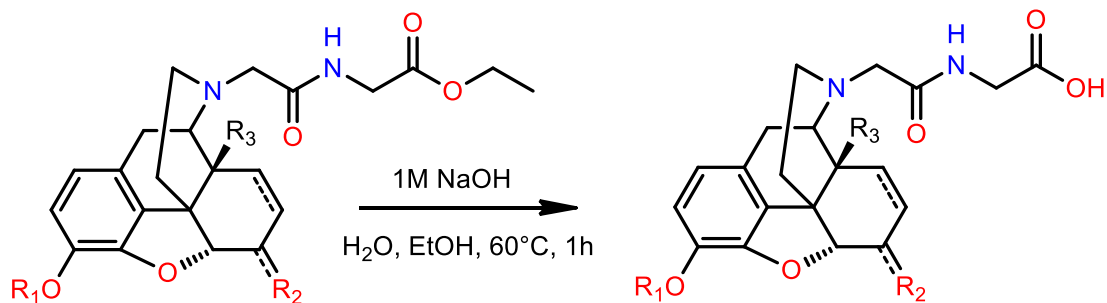
A metilénhidat tartalmazó vegyületek esetében a retroszintetikus analízis felfedte, hogy a kívánt termékek előállítására *N*-klóracetilglicin-etilészter reagensre van szükség. A norvegyületeket acetonitrilben oldottuk, és nátrium-hidrogénkarbonát illetve kálium-jodid jelenlétében melegítettük *N*-klóracetilglicin-etilészterrel. Az átalakulást követően feldolgoztuk az elegyet, és így a kívánt *N*-acetilglicin-norvegyületek etilészteréhez jutottunk (90) (91) (92) (93) (94) (95). (21. ábra)



21. ábra *N*-acetilglicin-haptén észterek előállítása

4.3.3. *N*-acetilglicin-haptén észterek hidrolízise

Az észtereket a már korábban bemutatott módon hidrolizáltuk **(96)** **(97)** **(98)** **(99)** **(100)** **(101)**. (22. ábra)



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Δ _{7,8} |
|--------------|------------------|----------------|----------------|------------------|
| (96) | -H | -OH | -H | = |
| (97) | -H | -OH | -H | - |
| (98) | -CH ₃ | -OH | -H | = |
| (99) | -CH ₃ | -OH | -H | - |
| (100) | -H | =O | -OH | - |
| (101) | -CH ₃ | =O | -OH | - |

22. ábra *N*-acetilglicin-haptén észterek hidrolízise

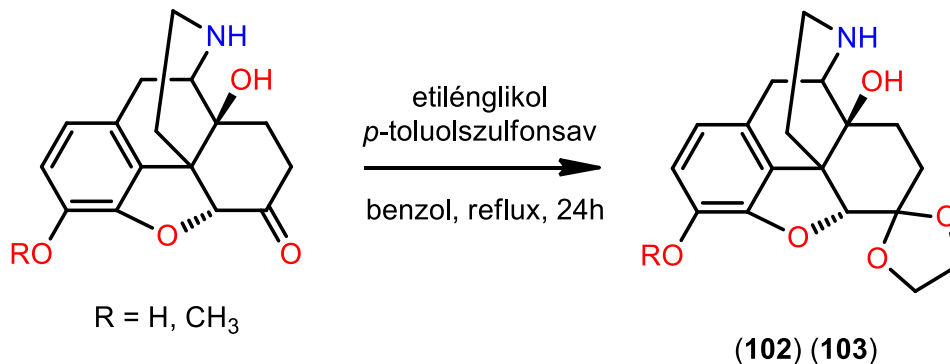
4.4. *N*-aminoalkil-haptének szintézise

A láncvégi aminocsoport beépítését cianocsoporton keresztül lehet megvalósítani. Az *N*-alkilezést követően a cianoszármazékok redukciójával nyerhetjük a kívánt aminokat. Ugyanakkor szem előtt kell tartani, hogy a noroximorfon és noroxikodon C6-os oxocsoportja szintén reagálhat, és nem kívánt alkohollá redukálódhat. Így ebben a két esetben a kiindulási molekulákat védenünk kellett.

4.4.1. Etilénketál-védőcsoport kialakítása C6-oxo-származékoknál

A noroximorfon és noroxikodon esetében a C6 helyzetben etilénketál-védőcsoportot vezettünk be, hogy a köztitermék ciano-vegyületek későbbi redukciós lépésében megvédjük a vegyületeinket. A reakció végeztével, savas hidrolízissel a védőcsoport könnyen eltávolítható.

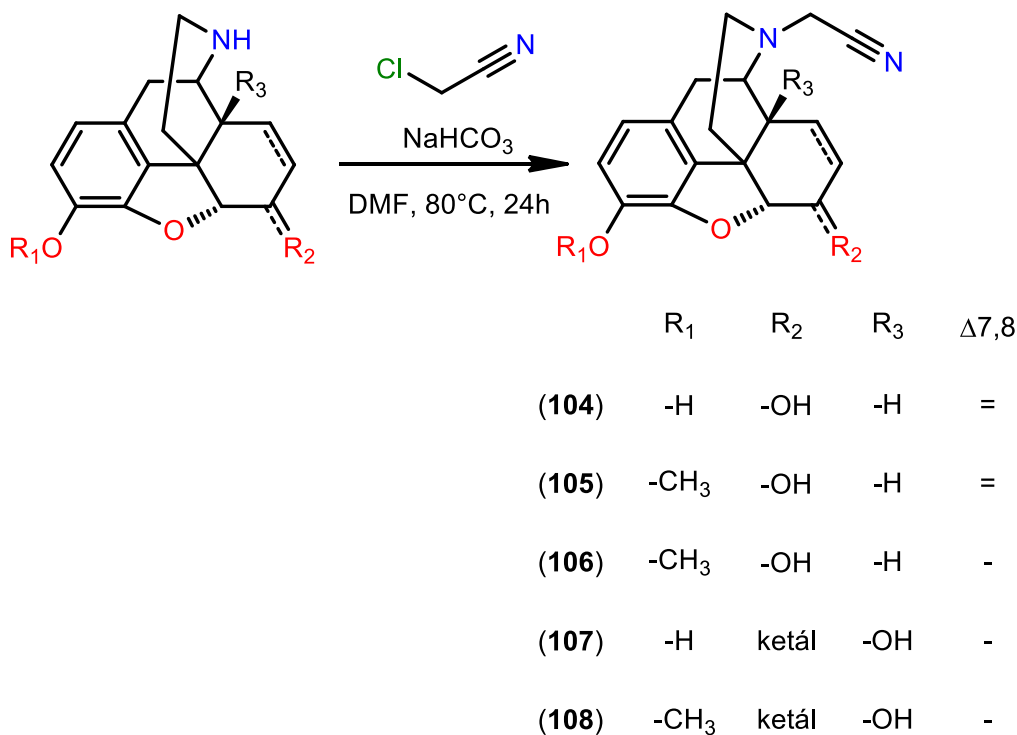
Mindkét vegyület esetében benzolos oldatot készítettünk, és *p*-toluolszulfonsav jelenlétében etiléneglikollal reagáltattuk. (23. ábra) A termékek – noroximorfon-etilénketál (**102**) és noroxikodon-etilénketál (**103**) – kristályos anyagok lettek.



23. ábra Noroximorfon és noroxikodon ketálozása

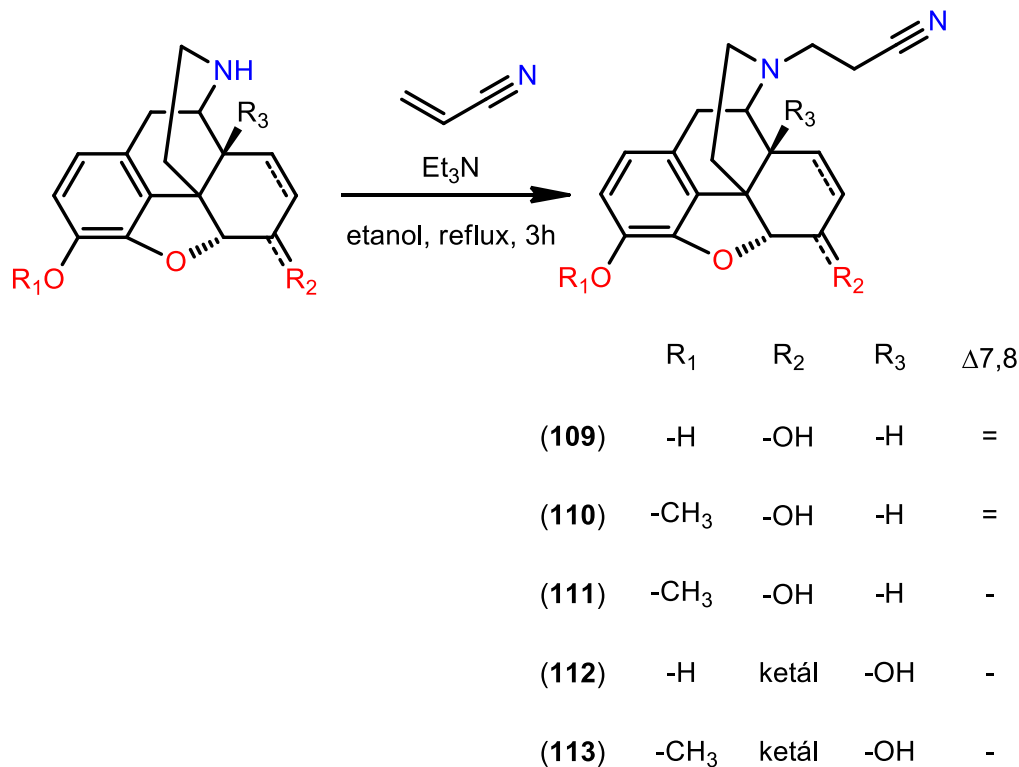
4.4.2. *N*-cianoalkil-haptén prekursorok szintézise

Akárcsak a karboxialkil származékok esetében, így itt is különböző hosszúságú összekötőlánccokat építettünk be a molekulákba. A metilénhidas sorozathoz a norvegyületeket dimetilformamidban oldottuk, és nátrium-hidrogénkarbonát jelenlétében klórecetsavnitrillel végeztük a reakciót. Ezzel az *N*-cianometil-norvegyületekhez jutottunk (**104**) (**105**) (**106**) (**107**) (**108**). (24. ábra)



24. ábra *N*-cianoalkil-haptén prekursorok előállítása

Az etilénhidas származékokat akrilnitril reagens alkalmazásával sikerült előállítani. Etanolban oldva végeztük a reakciót trietil-amin jelenlétében. Termékként az *N*-(β -cianoetil)-norvegyületeket kaptuk **(109)** **(110)** **(111)** **(112)** **(113)**. (25. ábra)



25. ábra *N*-(β -cianoetil)-haptén prekursorok előállítása

4.4.3. *N*-cianoalkil-haptén prekursorok redukciója

Ahhoz, hogy a kívánt aminokhoz jussunk (*N*-(β -aminoetil)- és *N*-(γ -aminopropil)-norszármazékok) a megfelelő *N*-cianoalkil-norvegyületet redukálnunk kell. Kísérletet tettünk lítium-alumíniumhidrides redukcióra, amit dietil-éterben, tetrahydrofuranban vagy dioxánban lehet elvégezni. Mivel molekuláink túlnyomó része nem oldódott be, ezekben az oldószerekben a reakció sikertelen volt.

Vegyületeink viszont jól oldódnak metanolban, így kézen fekvő volt a nátrium-bórhidrides redukció vizsgálata. Mivel önmagában ez a reagens nem képes redukálni a ciano-vegyületeket, kobalt(II)-kloriddal kellett aktiválnunk. A reakcióelegy feldolgozását nehezítette, hogy az oldatba került kobalt(II)-ionok olyan stabil komplexet képeztek a keletkező diaminokkal, amit még EDTA-val való extrakcióval se sikerült megbontanunk. Így a ciano-vegyületek redukációjára, illetve a megfelelő amino-származékok előállítására a későbbiekben más módszert kell találnunk.

5. Megbeszélés

5.1. Norvegyületek előállítása és jellemzése

Kutatócsoportunk előzetesen klórszénsav-vinilésztert alkalmazott a norvegyületek előállítására. [63-65] Ez a módszer kiválóan alkalmazható volt: gyorsan, jó hozammal lehetett a kívánt kiindulási vegyületnek szánt termékekhez jutni. Ugyanakkor a köztitermék karbamát továbbalakításához szükség volt sósav gáz bevezetésére. Ekkor a vinilcsoporton a Markovnyikov-szabály szerint addíció játszódott le. A keletkezett termék nem más volt, mint amit a klórszénsav- α -klóretilészterrel lehet nyerni. [66-68] Így a reakció egyszerűbbé tételére az utóbbi módszert alkalmaztuk az összes norvegyület előállítására.

Noha a norvegyületek már ismertek voltak, ezek részletes spektrális jellemzéseit nem, vagy csak igen hiányosan érhetők el. Emiatt a szerkezetüket részletező 1D és 2D NMR méréseket végeztem, amik alapján egyértelműen hozzá tudtam rendelni a szerkezethez az összes hidrogén- és szénatomot. (L. 5.6.2.1. fejezet)

5.2. 3-*O*-karboximetil-haptének

Összesen nyolc C3-szubsztituált morfin-származékot állítottunk elő, amik közül csak a 3-*O*-karboximetilmorfin-etilészter (**54**) és a 3-*O*-karboximetilmorfin (**14**) voltak ismertek. Ezek és az általunk először előállított molekulák szerkezetét NMR és HR-MS mérésekkel igazoltuk.

Az anyavegyületekhez képest a C3-szubsztituens jellegzetes jeleit érdemes kiemelni, amiket a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. Táblázat 3-*O*-karboximetil-haptének C3-szubsztituensének ^1H és ^{13}C NMR asszignációi

| | DMSO- d_6 | | | D $_2$ O | |
|-------------|--|--------------------------------|-------------|--|--------------------------------|
| | CH $_2$ -híd (^1H - ^{13}C) ppm | C=O (^{13}C) ppm | | CH $_2$ -híd (^1H - ^{13}C) ppm | C=O (^{13}C) ppm |
| (54) | 4,71-66,2 | 169,5 | (14) | 4,62-66,1 | 173,7 |
| (55) | 4,82-65,9 | 169,2 | (58) | 4,66-66,6 | 174,2 |
| (56) | 4,81-65,8 | 168,6 | (59) | 4,69-66,7 | 174,0 |
| (57) | 4,77-65,7 | 168,7 | (60) | 4,64-66,8 | 174,5 |

5.3. *N*-karboxialkil-haptének

Az előállított 24 vegyület közül (6 db *N*-karboximetilészter, 6 db *N*-karboximetil, 6 db *N*-karboxietilészter, 6db *N*-karboxietil) előzőleg csak 4 volt ismert a szakirodalomban **(19)** **(21)** **(22)** **(23)**. A 3-*O*-karboxialkil-származékokhoz hasonlóan 1D és 2D NMR mérések segítségével azonosítottam a szerkezetüket. Az oldalláncok jellegzetes kémiai eltolódásait a 3. és 4. táblázatban foglaltam össze.

3. Táblázat *N*-karboximetil-haptének *N*-szubsztituensének ¹H és ¹³C NMR asszignációi

| | DMSO- <i>d</i> ₆ | | | D ₂ O | |
|-------------|--|-------------------------------|-------------|--|-------------------------------|
| | CH ₂ -híd (¹ H- ¹³ C) ppm | C=O (¹³ C) ppm | | CH ₂ -híd (¹ H- ¹³ C) ppm | C=O (¹³ C) ppm |
| (21) | 3,40/3,26-56,5 | 170,9 | (19) | 4,00-54,9 | 169,2 |
| (70) | 3,31/3,15-56,8 | 171,0 | (80) | 3,94-55,0 | 168,3 |
| (22) | 3,23-55,9 | 170,6 | (23) | 4,08-54,8 | 168,8 |
| (71) | 3,32/3,16-56,8 | 170,9 | (81) | 3,89-55,1 | 168,5 |
| (72) | 3,43/3,31-55,6 | 171,3 | (82) | 3,93/3,69-54,7 | 168,8 |
| (73) | 3,44/3,32-55,7 | 171,3 | (83) | 3,86/3,63-55,2 | 169,2 |

4. Táblázat *N*-karboxietil-haptének *N*-szubsztituensének ¹H és ¹³C NMR asszignációi

| | DMSO- <i>d</i> ₆ | | | D ₂ O | |
|-------------|--|-------------------------------|-------------|--|-------------------------------|
| | C ₂ H ₄ -híd (¹ H- ¹³ C) ppm | C=O (¹³ C) ppm | | C ₂ H ₄ -híd (¹ H- ¹³ C) ppm | C=O (¹³ C) ppm |
| (74) | 2,78/2,64/2,44- 50,8/33,7 | 172,3 | (84) | 3,44/2,71-50,7/29,6 | 175,3 |
| (75) | 2,79/2,64/2,45- 49,9/32,6 | 172,2 | (85) | 3,41/2,78-50,0/29,0 | 174,2 |
| (76) | 2,78/2,63/2,44- 49,9/32,9 | 171,7 | (86) | 3,51/2,75-50,6/29,4 | 175,1 |
| (77) | 2,74/2,58/2,41- 50,6/33,6 | 172,4 | (87) | 3,43/2,79-49,9/28,9 | 173,8 |
| (78) | 2,75/2,67/2,50- 49,7/32,9 | 172,0 | (88) | 3,41/2,77-49,7/28,2 | 175,0 |
| (79) | 2,76/2,68/2,51- 49,2/32,4 | 172,1 | (89) | 3,42/2,82-49,7/28,2 | 174,9 |

5.4. *N*-acetylglucine-haptének

Az acetylglucine származékok létrehozásával a haptének fehérjékkel való konjugációs reakcióit szeretnénk tanulmányozni. Noha a fehérjekémiában használt kapcsolószerekkel nem volt kivitelezhető a reakció, kerülőúttal sikerült előállítani a kívánt vegyületeket. Szerkezetük azonosításával támpontot nyertünk arra vonatkozólag, hogy a konjugációs reakció optimalizálásával milyen új kémiai eltolódásokra lehet számítani az oldalláncban. Ráadásul a hidrolizált származékok továbbra is tartalmaznak szabad karboxilcsoportot, ami miatt ezek a vegyületek is hapténeknek tekinthetők. Így további aminosavakkal, fehérjékkel való kapcsolásra ideális jelöltnek számítanak. A jellegzetes kémiai eltolódásokat az 5. és 6. táblázatban foglaltam össze.

5. Táblázat *N*-acetylglucine-haptén észterek *N*-szubsztituensének ^1H és ^{13}C NMR asszignációja

| | DMSO- d_6 | | | |
|-------------|--|-----------------------------------|--|---------------------------------------|
| | CH ₂ -híd (^1H - ^{13}C) ppm | C=O-NH (^{13}C) ppm | glicin CH ₂ (^1H - ^{13}C) ppm | glicin C=O (^{13}C) ppm |
| (90) | 3,20/2,98-58,9 | 171,0 | 3,85-40,9 | 170,3 |
| (91) | 3,19/2,93-59,2 | 171,0 | 3,88/3,85-41,0 | 170,6 |
| (92) | 3,20/2,98-58,9 | 170,9 | 3,86-40,9 | 170,5 |
| (93) | 3,20/2,93-59,1 | 171,0 | 3,88/3,84-40,9 | 170,4 |
| (94) | 3,23/2,96-59,5 | 170,5 | 3,95/3,80-40,9 | 170,4 |
| (95) | 3,24/2,97-59,4 | 170,4 | 3,94/3,79-40,7 | 170,3 |

6. Táblázat *N*-acetylglucine-haptének *N*-szubsztituensének ^1H és ^{13}C NMR asszignációja

| | D ₂ O | | | |
|--------------|--|-----------------------------------|--|---------------------------------------|
| | CH ₂ -híd (^1H - ^{13}C) ppm | C=O-NH (^{13}C) ppm | glicin CH ₂ (^1H - ^{13}C) ppm | glicin C=O (^{13}C) ppm |
| (96) | 3,51-57,6 | 165,3 | 3,94-41,2 | 173,1 |
| (97) | 2,89-57,0 | 165,3 | 3,96-41,4 | 172,9 |
| (98) | 4,19-54,5 | 165,4 | 3,94-41,3 | 173,2 |
| (99) | 2,78-54,4 | 165,6 | 3,94-41,4 | 172,8 |
| (100) | 4,19/3,95-53,6 | 165,2 | 3,94-41,6 | 172,4 |
| (101) | 4,18/3,95-53,8 | 165,2 | 3,79-42,8 | 175,1 |

5.5. *N*-cianoalkil-haptén prekursorok

Az előállított 10 vegyület közül (5 db cianometil-származék, 5 db cianoetil-származék) előzőleg csak 3 volt ismert a szakirodalomban (*N*-cianometilnormorfin, *N*-cianometilnoroxikodon, *N*-(β -cianoetil)-noroximorfon). Az előállított vegyületek szerkezetét 1D és 2D NMR mérések segítségével azonosítottam. Az oldalláncok kémiai eltolódásait a 7. és 8. táblázatban foglaltam össze.

7. Táblázat *N*-cianometil-haptén prekursorok *N*-szubsztituensének ^1H és ^{13}C NMR asszignációja

| | DMSO- <i>d</i> ₆ | |
|-------|--|--|
| | CH ₂ -híd (^1H - ^{13}C) ppm | CN (^{13}C) ppm |
| (104) | 3,61/3,52-43,7 (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁) | 116,9 (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁) |
| (105) | 3,81/3,73-42,5 | 118,1 |
| (106) | 3,76/3,67-42,5 | 117,9 |
| (107) | 3,83/3,71-42,4 | 117,9 |
| (108) | 3,83/3,74-42,5 | 117,9 |

8. Táblázat *N*-cianoetil-haptén prekursorok *N*-szubsztituensének ^1H és ^{13}C NMR asszignációja

| | D ₂ O | | |
|-------|---|---|-------------------------------|
| | N-CH ₂ (^1H - ^{13}C) ppm | CH ₂ -CN (^1H - ^{13}C) ppm | CN (^{13}C) ppm |
| (109) | 2,77/2,64-50,0 | 2,66-16,5 | 120,1 |
| (110) | 2,77/2,64-49,8 | 2,66-16,3 | 120,1 |
| (111) | 2,74/2,58-49,7 | 2,62-16,2 | 120,1 |
| (112) | 2,72/2,63-48,8 | 2,71-16,0 | 119,8 |
| (113) | 2,74/2,64-48,7 | 2,73-16,0 | 119,7 |

5.6. Kísérletes rész

5.6.1. 3-*O*-karboximetil-haptének szintézise

5.6.1.1. 3-*O*-karboximetilhaptén észterek szintézise

3-*O*-karboximetilmorfin-etilészter (**54**) (etil-2-((7-hidroxi-3-metil-2,3,4,4a,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-9-il)-oxi)-acetát): Fém nátriumot (0,16 g, 6,96 mmol) oldunk etanolban (30 ml), majd morfin sósavas só (1,00 g, 3,11 mmol) és bróm-ecetsav-etilésztert (0,41 ml, 3,73 mmol) adunk hozzá. 6 órát kevertetjük és refluxáltatjuk. Az átalakulást VRK-val követjük. A szerves oldatot szűrjük, és szárazra pároljuk az oldatot. A nyers terméket oszlopkromatográfiásan tisztítjuk kloroform:metanol 9:1 eluenssel. Hozam: 62 %, o.p.: 58°C, C₂₁H₂₅NO₅, Mt = 371,43, HR-MS [M+ H⁺]: számított 372,1805, mért 372,1799

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,56 (d, *J* = 8,2 Hz, H-2), 6,45 (d, *J* = 8,2 Hz, H-1), 5,53 (ddt, *J* = 9,9, 3,2, 1,5 Hz, H-7), 5,25 (dt, *J* = 9,8, 2,8 Hz, H-8), 4,71 (m, H-5, CH₂-híd), 4,13 (q, *J* = 7,1 Hz, észter CH₂), 4,11 (m, H-6), 3,27 (dd, *J* = 6,2, 3,2 Hz, H-9), 2,91 (d, *J* = 18,6 Hz, H-10), 2,55 (m, H-14), 2,46 (dd, *J* = 12,1, 4,8 Hz, H-16), 2,30 (s, N-CH₃), 2,27 – 2,17 (m, H-10, H-16), 1,99 (td, *J* = 12,5, 5,0 Hz, H-15), 1,61 (dt, *J* = 11,8, 2,5 Hz, H-15), 1,19 (t, *J* = 7,1 Hz, észter CH₃)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,5 (észter C=O), 147,1 (C4), 139,5 (C3), 133,2 (C7), 131,7 (C12), 128,4 (C11), 128,3 (C8), 118,5 (C1), 115,5 (C2), 92,0 (C5), 66,1 (C6, CH₂ híd), 60,4 (észter CH₂), 57,7 (C9), 45,7 (C16), 42,8 (C13), 42,5 (N-CH₃), 40,2 (C14), 35,1 (C15), 20,0 (C10), 14,0 (észter CH₃)

3-*O*-karboximetiloximorfon-etilészter (**55**) (etil-2-((4a-hidroxi-3-metil-7-oxo-2,3,4,4a,5,6,7,7a-oktahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-9-il)-oxi)-acetát): Oximorfon bázist (0,50 g, 1,66 mmol) oldunk acetonban (30 ml) kálium-karbonát (0,37 g, 2,68 mmol) és kálium-jodid (0,40 g, 2,41 mmol) jelenlétében. Az elegyhez klór-ecetsav-etilésztert (0,25 ml, 2,34 mmol) adunk. 12 órát kevertetjük és refluxáltatjuk, majd pedig szárazra pároljuk. A maradékot sós vízben szuszpendáljuk, kétszer extraháljuk kloroformmal (25 ml), a szerves fázisokat egyesítjük és nátrium-szulfáton szárítjuk. A szárítószeret kiszűrjük, és az oldatot szárazra pároljuk. Hozam: 70 %, o.p.: 92°C, C₂₁H₂₅NO₆, Mt = 387,43, HR-MS [M+ H⁺]: számított 388,1755, mért 388,1749

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,71 (d, $J = 8,3$ Hz, H-2), 6,65 (d, $J = 8,2$ Hz, H-1), 4,87 (s, H-5), 4,82 (d, $J = 8,6$ Hz, CH₂ híd), 4,16 (q, $J = 7,1$ Hz, észter CH₂), 3,10 (d, $J = 18,7$ Hz, H-10), 2,96 – 2,85 (m, H-9, H-15), 2,55 – 2,52 (m, H-10), 2,45 (dd, $J = 11,7, 5,0$ Hz, H-16), 2,39 (td, $J = 12,5, 5,2$ Hz, H-8), 2,34 (s, N-CH₃), 2,08 (dt, $J = 14,0, 3,2$ Hz, H-15), 1,97 (td, $J = 11,9, 3,9$ Hz, H-16), 1,76 (ddd, $J = 13,5, 5,1, 3,0$ Hz, H-7), 1,47 – 1,39 (m, H-7), 1,32 – 1,26 (m, H-8), 1,20 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH₃)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 208,7 (C6), 169,2 (észter C=O), 144,1 (C4), 140,1 (C3), 130,1 (C12), 126,6 (C11), 119,3 (C1), 116,8 (C2), 89,9 (C5), 69,8 (C14), 65,9 (CH₂ híd), 63,5 (C9), 60,4 (észter CH₂), 49,7 (C13), 44,7 (C16), 42,1 (N-CH₃), 35,3 (C15), 31,1 (C7), 29,4 (C8), 21,3 (C10), 13,7 (észter CH₃)

3-*O*-karboximetilnaloxon-etilészter (56) (etil-2-((3-allil-4a-hidroxi-7-oxo-2,3,4,4a,5,6,7,7a-oktahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-9-il)-oxi)-acetát): Naloxon bázist (0,80 g, 2,44 mmol) acetonban (25 ml) oldunk. Kálium-karbonát (0,42 g, 3,04 mmol) és kálium-jodid (0,50 g, 3,01 mmol) jelenlétében klór-ecetsav-etilésztert (0,32 ml, 3,00 mmol) adunk hozzá. 12 órát kevertetjük és refluxáltatjuk, a szervetlen sókat szűrjük, és az oldatot szárazra pároljuk. A nyers terméket oszlopkromatográfiásan tisztítjuk kloroform:metanol 9:1 eluenst alkalmazva. Hozam: 67 %, o.p.: olaj, C₂₃H₂₇NO₆, Mt = 413,46, HR-MS [M+ H⁺]: számított 414,1911, mért 414,1905

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,71 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,65 (d, $J = 8,3$ Hz, H-1), 5,86 (ddt, $J = 16,7, 10,1, 6,3$ Hz, allil CH), 5,24 (dq, $J = 17,3, 1,7$ Hz, allil =CH₂), 5,15 (dt, $J = 10,1, 1,5$ Hz, allil CH₂), 4,87 (s, H-5), 4,86 – 4,76 (m, CH₂ híd), 4,16 (q, $J = 7,1$ Hz, észter, CH₂), 3,19 – 3,09 (m, allil CH₂ híd), 3,06 (d, $J = 18,6$ Hz, H-10), 2,98 – 2,87 (m, H-9, H-15), 2,56 – 2,52 (m, H-10, H-16), 2,36 (td, $J = 12,5, 5,1$ Hz, H-8), 2,08 (dt, $J = 13,9, 3,2$ Hz, H-15), 1,95 (td, $J = 12,2, 3,8$ Hz, H-16), 1,75 (ddd, $J = 13,4, 5,0, 3,0$ Hz, H-7), 1,47 – 1,37 (m, H-7), 1,34 – 1,26 (m, H-8), 1,20 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH₃)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 208,0 (C6), 168,6 (észter C=O), 144,1 (C4), 140,0 (C3), 135,5 (allil CH), 130,0 (C12), 126,6 (C11), 119,0 (C1), 117,0 (allil =CH₂), 116,7 (C2), 89,8 (C5), 69,8 (C14), 65,8 (CH₂ híd), 61,1 (C9), 60,1 (észter CH₂), 56,5 (allil CH₂ híd), 50,1 (C13), 42,6 (C16), 35,3 (C15), 31,0 (C7), 29,4 (C8), 22,0 (C10), 13,7 (észter CH₃)

3-*O*-karboximetilnaltrexon-etilészter (**57**) (etil-2-((3-(ciklopropilmetil)-4a-hidroxi-7-oxo-2,3,4,4a,5,6,7,7a-oktahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-9-il)-oxi)-acetát): Naltrexon bázist (0,34 g, 1,00 mmol) acetonban (20 ml) oldunk és brómecetsav-etilészterrel (0,13 ml, 1,20 mmol) reagáltatjuk kálium-karbonát (0,69 g, 5,00 mmol) jelenlétében. Az elegyet 12 órát kevertetjük és refluxáltatjuk. A szervesen oldott szűrjük, és az oldatot szárazra pároljuk. A nyers terméket oszlopkromatográfiásan tisztítjuk kloroform:metanol 9:1 eluenst alkalmazva Hozam: 83 %, o.p.: 107°C, C₂₄H₂₉NO₆, Mt = 427,20, HR-MS [M+ H⁺]: számított 428,2068, mért 428,2061

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,70 (d, *J* = 8,2 Hz, H-2), 6,63 (d, *J* = 8,2 Hz, H-1), 4,88 (s, H-5), 4,86 – 4,74 (m, CH₂ híd), 4,16 (q, *J* = 7,1 Hz, észter CH₂), 3,14 (d, *J* = 5,7 Hz, H-9), 3,01 (d, *J* = 18,6 Hz, H-10), 2,92 (td, *J* = 14,3, 5,0 Hz, H-15), 2,65 (dd, *J* = 12,1, 5,0 Hz, H-16), 2,53 (d, *J* = 24,9 Hz, H-10), 2,37 (m, H-8, N-CH₂ híd), 2,09 (dt, *J* = 14,0, 3,2 Hz, H-15), 1,95 (td, *J* = 12,2, 3,7 Hz, H-16), 1,78 (ddd, *J* = 13,5, 5,0, 3,0 Hz, H-7), 1,44 (td, *J* = 14,1, 2,7 Hz, H-7), 1,31 (dd, *J* = 12,6, 3,5 Hz, H-8), 1,20 (t, *J* = 7,1 Hz, észter CH₃), 0,93 – 0,81 (m, ciklopropil CH), 0,48 (qt, *J* = 8,8, 4,4 Hz, ciklopropil CH₂), 0,13 (td, *J* = 6,0, 5,6, 3,0 Hz, ciklopropil CH₂)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 208,2 (C6), 168,7 (észter C=O), 144,0 (C4), 140,1 (C3), 130,1 (C12), 126,2 (C11), 119,1 (C1), 117,0 (C2), 90,0 (C5), 69,3 (C14), 65,7 (CH₂ híd), 60,8 (C9), 60,3 (észter CH₂), 58,2 (N-CH₂ híd), 50,2 (C13), 42,9 (C16), 35,4 (C15), 31,1 (C7), 29,8 (C8), 22,0 (C10), 13,8 (észter CH₃), 9,1 (ciklopropil CH), 3,0 (ciklopropil CH₂)

5.6.1.2. 3-*O*-karboximetilhaptén észterek hidrolízise

Mindegyik észter hidrolízisét az alábbi módszerrel valósítottuk meg. Az észtereket minimális mennyiségű alkoholban oldjuk, és az oldatot 0,1 M nátrium-hidroxid oldattal 30-60 percig 60°C-on kevertetjük. A pH-t hígított sósavval 2-3 értékre állítjuk, és az oldatot szárazra pároljuk. Mindegyik esetben a megfelelő 3-*O*-alkilhaptén sósavas só a termék.

3-*O*-karboximetilmorfin HCl (**14**) (2-((7-hidroxi-3-metil-2,3,4,4a,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-9-il)-oxi)-ecetsav): (**54**)-et (0,13 g, 0,35

mmol) etanolban (0,1-0,2 ml) oldunk és nátrium-hidroxid oldattal (3,50 ml) reagáltatjuk. Hozam: 70 %, o.p.: > 138°C bomlás, C₁₉H₂₁NO₅, Mt = 345,39, HR-MS [M+ H⁺]: számított 346,1649, mért 346,1640

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,70 (d, *J* = 8,3 Hz, H-2), 6,62 (d, *J* = 8,2 Hz, H-3), 5,67 – 5,60 (m, H-7), 5,31 – 5,25 (m, H-8), 4,96 (dd, *J* = 6,4, 1,3 Hz, H-5), 4,62 (s, CH₂ híd), 4,31 – 4,19 (m, H-6), 4,09 (dd, *J* = 6,7, 3,1 Hz, H-9), 3,25 (dd, *J* = 13,2, 4,9 Hz, H-16), 3,19 (d, *J* = 20,1 Hz, H-10), 3,02 (dd, *J* = 13,1, 4,5 Hz, H-14), 2,96 (dd, *J* = 20,1, 6,9 Hz, H-16), 2,86 (s, N-CH₃), 2,82 (d, *J* = 20,2 Hz, H-10), 2,19 (td, *J* = 13,8, 4,9 Hz, H-15), 2,05 (dd, *J* = 14,3, 4,1 Hz, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 173,7 (karboxil C=O), 146,1 (C4), 140,2 (C3), 132,9 (C7), 129,5 (C12), 125,1 (C8), 124,9 (C11), 120,2 (C1), 115,6 (C2), 90,4 (C5), 66,1 (CH₂ híd), 65,4 (C6), 60,4 (C9), 47,0 (C16), 45,1 (C13), 40,9 (N-CH₃), 39,1 (C14), 32,2 (C15), 20,7 (C10)

3-*O*-karboximetiloximorfon HCl (**58**) (2-((4a-hidroxi-3-metil-7-oxo-2,3,4,4a,5,6,7,7a-oktahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-9-il)-oxi)-ecetsav): (**55**)-öt (0,10 g, 0,26 mmol) etanolban (0,1-0,2 ml) oldunk és nátrium-hidroxid oldattal (2,60 ml) reagáltatjuk. Hozam: 97 %, O.p.: > 255°C bomlás, C₁₉H₂₁NO₆, Mt = 359,37, HR-MS [M+ H⁺]: számított 360,1442, mért 360,1433

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,79 (d, *J* = 8,3 Hz, H-2), 6,76 (d, *J* = 8,5 Hz, H-1), 4,95 (s, H-5), 4,66 (s, CH₂ híd), 3,64 (d, *J* = 6,0 Hz, H-9), 3,35 (d, *J* = 20,1 Hz, H-10), 3,13 (dd, *J* = 13,2, 4,7 Hz, H-16), 3,05 (dd, *J* = 20,0, 6,2 Hz, H-10), 2,88 (td, *J* = 14,8, 5,1 Hz, H-15), 2,82 (s, N-CH₃), 2,69 (td, *J* = 13,2, 4,0 Hz, H-16), 2,58 (td, *J* = 13,5, 4,9 Hz, H-8), 2,21 (dt, *J* = 15,0, 3,2 Hz, H-15), 1,94 (ddd, *J* = 14,5, 5,2, 3,0 Hz, H-7), 1,64 (m, H-7, H-8)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 211,4 (C6), 174,2 (karboxil C=O), 144,2 (C4), 140,9 (C3), 127,6 (C12), 123,8 (C11), 121,2 (C1), 117,2 (C2), 89,6 (C5), 70,7 (C14), 66,6 (CH₂ híd), 66,2 (C9), 48,5 (C13), 47,0 (C16), 40,9 (N-CH₃), 34,5 (C15), 30,5 (C7), 26,9 (C8), 23,2 (C10)

3-*O*-karboximetilnaloxon (**59**) (2-((3-allil-4a-hidroxi-7-oxo-2,3,4,4a,5,6,7,7a-oktahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-9-il)-oxi)-ecetsav): (**56**)-t (0,14

g, 0,33 mmol) etanolban (0,1-0,2 ml) oldunk és nátrium-hidroxid oldattal (3,30 ml) reagáltatjuk. : Hozam: 80 %, o.p.: > 220°C bomlás, C₂₁H₂₃NO₆, Mt = 385,41, HR-MS [M+ H⁺]: számított 386,1604, mért 386,1598

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,80 (dd, *J* = 8,4, 1,3 Hz, H-2), 6,75 (d, *J* = 8,4 Hz, H-1), 5,83 – 5,75 (m, allil CH), 5,55 – 5,48 (m, allil =CH₂), 4,95 (s, H-5), 4,69 (s, CH₂ híd), 3,83 – 3,71 (m, H-9, allil CH₂ híd), 3,33 (d, *J* = 20,0 Hz, H-10), 3,17 (dd, *J* = 13,1, 4,8 Hz, H-16), 3,00 (dd, *J* = 20,1, 6,2 Hz, H-10), 2,88 (td, *J* = 14,8, 5,1 Hz, H-15), 2,69 (td, *J* = 13,1, 4,0 Hz, H-16), 2,58 (td, *J* = 13,4, 4,8 Hz, H-8), 2,20 (dt, *J* = 14,9, 3,3 Hz, H-15), 1,91 (ddd, *J* = 14,6, 5,3, 3,0 Hz, H-7), 1,66 – 1,63 (m, H-7, H-8)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 211,3 (C6), 174,0 (karboxil C=O), 144,2 (C4), 141,0 (C3), 128,1 (C12), 126,4 (allil CH₂), 126,1 (C1), 125,6 (allil CH), 124,0 (C11), 121,1 (C2), 89,6 (C5), 70,7 (C14), 66,7 (CH₂ híd), 62,2 (C9), 55,8 (N-CH₂ híd), 49,6 (C13), 46,2 (C16), 34,5 (C15), 30,7 (C7), 27,0 (C8), 22,8 (C10)

3-*O*-karboximetilnaltrexon (60) (2-((3-(ciklopropilmetil)-4a-hidroxi-7-oxo-2,3,4,4a,5,6,7,7a-oktahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-9-il)-oxi)-ecetsav): (57)-et (0,10 g, 0,24 mmol) etanolban (0,1-0,2 ml) oldunk és nátrium-hidroxid oldattal (2,40 ml) reagáltatjuk. Hozam: 98 %, O.p.: > 240°C bomlás, C₂₂H₂₅NO₆, Mt = 399,44 HR-MS [M+ H⁺]: számított 400,1755, mért 400,1752

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, H-2), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, H-1), 5.10 (s, H-5), 4.77 (s, CH₂-híd), 4.20 (d, *J* = 6.1 Hz, H-9), 3.45 (d, *J* = 19.9 Hz, H-10), 3.40 (dd, *J* = 13.8, 7.1 Hz, N-CH₂), 3.30 – 3.20 (m, H-10, H-16), 3.04 (m, H-15, N-CH₂), 2.81 (td, *J* = 13.0, 3.9 Hz, H-16), 2.74 (td, *J* = 13.3, 4.6 Hz, H-8), 2.37 (dt, *J* = 15.0, 3.2 Hz, H-15), 2.10 (ddd, *J* = 14.5, 5.2, 2.9 Hz, H-7), 1.83 (d, *J* = 3.5 Hz, H-7), 1.79 (dd, *J* = 14.9, 3.3 Hz, H-8), 1.12 (ddt, *J* = 10.3, 7.5, 3.8 Hz, ciklopropil CH), 0.84 (tt, *J* = 8.2, 4.4 Hz, ciklopropil CH₂), 0.76 (tt, *J* = 9.6, 4.4 Hz, ciklopropil CH₂), 0.51 – 0.48 (m, ciklopropil CH₂)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 211,3 (C6), 174,5 (karboxil C=O), 144,2 (C4), 141,0 (C3), 128,1 (C12), 123,6 (C11), 121,1 (C1), 117,0 (C2), 89,6 (C5), 70,7 (C14), 66,8 (CH₂ híd), 62,0 (C9), 57,9 (N-CH₂ híd), 49,6 (C13), 46,1 (C16), 34,6 (C15), 30,7 (C7), 27,1 (C8), 23,0 (C10), 5,6 (ciklopropil CH), 4,6 (ciklopropil CH₂), 2,3 (ciklopropil CH₂)

5.6.2. N-karboxialkil-haptének szintézise

5.6.2.1. N-demetilizési reakciók

Kodeint/dihidrokodeint (3 mmol) oldunk szárított 1,2-diklóretánban (30ml), majd pedig nátrium-hidrogénkarbonátot (0,84 g) adunk hozzá. Jeges hűtés közben cseppenként klórszénsav- α -klóretilésztert (10 mmol) adunk hozzá és 30 percet szobahőmérsékleten kevertetjük, majd pedig 90 °C-ra melegítve egy éjszakán át folytatjuk a kevertetést. A keletkező szuszpenziót szobahőmérsékletre hagyjuk hűlni, és kiszűrjük a szervesetlen sókat. Szárazra pároljuk, a maradékot metanolban oldjuk, és 6 órán át 60 °C-on kevertetjük. Ismét szárazra párolva kristályos anyaghoz jutunk, ami a norkodein/dihidronorkodein sósavas sója. A sóra 10%-os nátrium-hidroxid oldatot öntünk (pH = 9), és kloroformmal extraháljuk. A szerves fázisokat nátrium szulfáton szárítjuk. Szűrés után szárazra párolva a norkodein/dihidronorkodein bázishoz jutunk.

Norkodein (**20**): Hozam: 87%, o.p.: 185 °C (acetone), C₁₇H₁₉NO₃, Mt = 285,34

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,60 (d, *J* = 8,2 Hz, H-2), 6,44 (d, *J* = 8,2 Hz, H-1), 5,52 (m, H-7), 5,21 (dt, *J* = 9,8, 2,8 Hz, H-8), 4,64 (dd, *J* = 5,9, 1,4 Hz, H-5), 4,09 (dq, *J* = 5,4, 2,6 Hz, H-6), 3,72 (s, OCH₃), 3,46 (dd, *J* = 5,9, 3,3 Hz, H-9), 2,71 (m, H-10), 2,67 (m, H-16), 2,65 (m, H-10), 2,46 (q, *J* = 2,8 Hz, H-14), 1,82 (td, *J* = 12,2, 5,5 Hz, H-15), 1,59 (dt, *J* = 12,3, 2,4 Hz, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 147,7 (C4), 141,6 (C3), 133,7 (C7), 131,8 (C12), 129,1 (C8), 128,3 (C11), 118,7 (C1), 113,6 (C2), 93,1 (C5), 66,8 (C6), 56,5 (OCH₃), 51,5 (C9), 44,3 (C13), 41,1 (C14), 38,4 (C16), 36,9 (C15), 31,3 (C10)

Dihidronorkodein (**62**): Hozam: 83% o.p.: 194 °C (etanol), C₁₇H₂₁NO₃, Mt = 287,35

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,69 (d, *J* = 8,1 Hz, H-2), 6,53 (d, *J* = 8,1 Hz, H-1), 4,43 (d, *J* = 4,9 Hz, H-5), 3,81 (m, H-6), 3,76 (s, OCH₃), 3,17 (s, H-9), 2,81 (dd, *J* = 18,1, 6,2 Hz, H-10), 2,61 (m, H-10), 2,59 (m, H-16), 2,54 (m, H-16), 2,06 (ddd, *J* = 11,8, 6,7, 2,8 Hz, H-14), 1,66 (td, *J* = 12,3, 5,2 Hz, H-15), 1,45 (m, H-15), 1,36 (m, H-8), 1,32 (m, H-7), 1,18 (m, H-7), 0,83 (tt, *J* = 11,9, 6,1 Hz, H-8)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 147,5 (C4), 141,2 (C3), 130,9 (C12), 127,8 (C11), 118,5 (C1), 114,4 (C2), 91,1 (C5), 66,3 (C6), 56,7 (OCH₃), 52,3 (C9), 43,0 (C13), 39,1 (C14), 38,4 (C16), 38,1 (C15), 30,5 (C10), 26,4 (C7), 20,2 (C8)

(Dihidro)normorfint a diacetil-(dihidro)morfín *N*-demetilezésén keresztül nyerhetünk. A fent említett módszert használva és a karbamátot metanollal kezelve 60 °C-on a diacetil-(dihidro)normorfín sósavas sójához jutunk. (Dihidro)normorfint a diacetil-(dihidro)normorfín x HCl savas hidrolízisével állíthatunk elő 5 % HCl-ban 100 °C-on 4 órás reakcióval. A (dihidro)normorfín bázist 25 %-os ammónia oldattal (pH = 9-10) csapjuk ki, és végezetül szűrjük.

Normorfín (**18**): Hozam: 84%, o.p.: 273-275 °C, C₁₆H₁₇NO₃, Mt = 271,31

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,46 (d, J = 8,0 Hz, H-2), 6,35 (d, J = 8,1 Hz, H-1), 5,55 (m, H-7), 5,20 (dt, J = 9,8, 2,8 Hz, H-8), 4,67 (dd, J = 6,1, 1,3 Hz, H-5), 4,07 (dd, J = 6,1, 3,1 Hz, H-6), 3,72 (m, H-9), 2,88 (dd, J = 13,2, 4,7 Hz, H-16), 2,73 (m, H-10), 2,72 (m, H-16), 2,55 (m, H-14), 1,92 (td, J = 13,0, 5,0 Hz, H-15), 1,68 (m, H-15), 1,20 (s, H-10)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 146,7 (C4), 139,2 (C3), 134,5 (C7), 130,7 (C12), 127,6 (C8), 124,7 (C11), 119,1 (C1), 117,1 (C2), 92,1 (C5), 66,4 (C6), 51,4 (C9), 43,6 (C13), 39,6 (C14), 37,9 (C16), 35,0 (C15), 29,2 (C10)

Dihidronormorfín (**61**): Hozam: 80%, o.p.: 265 °C (etanol), C₁₆H₁₉NO₃, Mt = 273,33

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,53 (d, J = 7,9 Hz, H-2), 6,42 (d, J = 8,0 Hz, H-1), 4,42 (d, J = 4,9 Hz, H-5), 3,81 (ddd, J = 8,6, 4,9, 3,5 Hz, H-6), 3,23 (dd, J = 6,2, 2,8 Hz, H-9), 2,79 (dd, J = 18,2, 6,3 Hz, H-10), 2,64 (m, H-16), 2,62 (m, H-10), 2,57 (m, H-16), 2,07 (ddd, J = 11,6, 6,7, 2,9 Hz, H-14), 1,69 (td, J = 12,5, 5,0 Hz, H-15), 1,48 (ddd, J = 12,5, 3,7, 1,5 Hz, H-15), 1,37 (m, H-8), 1,31 (m, H-7), 1,19 (m, H-7), 0,83 (tt, J = 12,2, 6,2 Hz, H-8)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 146,4 (C4), 138,4 (C3), 130,3 (C12), 125,4 (C11), 118,4 (C1), 117,2 (C2), 90,5 (C5), 66,4 (C6), 52,3 (C9), 43,1 (C13), 38,6 (C14), 38,3 (C16), 37,7 (C15), 29,9 (C10), 26,3 (C7), 20,1 (C8)

14-*O*-Acetiloxikodon (2 mmol) *N*-demetilezése is klórszénsav- α -klóretilészterrel (10 mmol) történik 16 órán át. A reakciót VRK-val követjük, és ha szükséges újabb 5 mmol klórszénsav- α -klóretilésztert adunk hozzá. A karbamátot metanollal bontjuk, ami a 14-*O*-acetilnoroxikodon sósavas sóját eredményezi. 10 %-os sósavval hidrolizálva 6 órán keresztül a noroxikodon sósavas sójához jutunk. A noroxikodon bázis a savas oldatból 10 %-os nátrium-hidroxid oldattal (pH = 10) lúgosított oldatból extrahálható kloroformmal. A szerves fázisok egyesítése és szárítása után az oldatot szárazra pároljuk. Ekkor a noroxikodon bázis olajos, ami dietil-éterrel dörzsölve kristályosodik.

Noroxikodon (**63**): Hozam: 86%, o.p.: 163-166°C, C₁₇H₁₉NO₄, Mt = 301,34

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,70 (d, *J* = 8,2 Hz, H-2), 6,62 (d, *J* = 8,2 Hz, H-1), 4,70 (s, H-5), 3,78 (s, OCH₃), 2,96 (m, H-10), 2,94 (m, H-9), 2,91 (m, H-7), 2,88 (m, H-10), 2,58 (dd, *J* = 13,3, 4,7 Hz, H-16), 2,34 (td, *J* = 12,6, 3,2 Hz, H-16), 2,30 (td, *J* = 12,0, 4,5 Hz, H-15), 2,08 (dt, *J* = 14,1, 3,2 Hz, H-7), 1,74 (ddd, *J* = 13,6, 5,1, 2,9 Hz, H-8), 1,40 (td, *J* = 14,1, 3,4 Hz, H-8), 1,14 (dd, *J* = 12,1, 3,0 Hz, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 208,9 (C6), 144,9 (C4), 142,3 (C3), 130,3 (C12), 126,8 (C11), 119,5 (C1), 115,1 (C2), 90,5 (C5), 70,1 (C14), 57,3 (C9), 56,8 (OCH₃), 51,0 (C13), 37,9 (C16), 36,3 (C7), 32,2 (C10), 32,0 (C8), 30,2 (C15)

A 3,14-di-*O*-acetiloximorfon *N*-demetilezése a 3,14-di-*O*-acetilnoroximorfon sósavas sóját eredményezi. Ezt 10 %-os sósav oldattal hidrolizáljuk, és a noroximorfon bázist 25 %-os ammónia oldattal kicsapatjuk. A szűrt és szárított terméket nem kellett tisztítani a további reakciókhoz.

Noroximorfon (**32**): Hozam: 81%, o.p.: > 280 °C, C₁₆H₁₇NO₄, Mt = 287,31

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,52 (d, *J* = 8,1 Hz, H-2), 6,49 (d, *J* = 8,1 Hz, H-1), 4,64 (s, H-5), 2,97 (m, H-9), 2,91 (m, H-10), 2,90 (m, H-7), 2,83 (m, H-10), 2,62 (dd, *J* = 13,1, 4,6 Hz, H-16), 2,37 (td, *J* = 12,8, 3,6 Hz, H-16), 2,29 (dd, *J* = 12,3, 4,8 Hz, H-15), 2,07 (dt, *J* = 14,2, 3,2 Hz, H-7), 1,74 (ddd, *J* = 13,6, 5,2, 2,9 Hz, H-8), 1,42 (td, *J* = 14,0, 3,5 Hz, H-8), 1,15 (dd, *J* = 12,1, 3,2 Hz, H-15)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 209,1 (C6), 143,9 (C4), 139,8 (C3), 130,0 (C12), 124,4 (C11), 119,4 (C1), 117,6 (C2), 89,9 (C5), 70,1 (C14), 57,3 (C9), 50,9 (C13), 37,8 (C16), 36,3 (C7), 31,83 (C10), 31,77 (C8), 30,0 (C15)

5.6.2.2 *N*-karboximetil-haptén észterek szintézise

A szükséges norvegyületet (2 mmol) 30 ml acetonitrilben vagy dimetilformamidban oldjuk, és nátrium-hidrogénkarbonát jelenlétében (10 mmol) brómecetsav-etilészterrel (2,4 mmol) reagáltatjuk reflux hőmérsékleten 16 órát. A szervesen sókat szűrjük, és az oldatot szárazra pároljuk. Vízben (30 ml) felvesszük a maradékot és az oldat pH-ját 9-re állítjuk tömény ammóniával. Kloroformmal extraháljuk (3x25 ml), és az egyesített szerves fázisokat nátrium-szulfáton szárítjuk. Szűrjük, szárazra pároljuk, és szükség esetén oszlopkromatográfiásan tisztítjuk (kloroform : metanol 9:1).

N-karboximetilnormorfin-etilészter (**21**) (etil-2-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,7,7a-tetrahydro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetát): Hozam: 86%, o.p.: 116°C, C₂₀H₂₃NO₅, Mt = 357,40, HR-MS [M+ H⁺]: számított 358,1649, mért 358,1636

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,40 (d, J = 8,0 Hz, H-2), 6,31 (d, J = 8,0 Hz, H-1), 5,49 (m, H-7), 5,19 (dt, J = 9,7, 2,8 Hz, H-8), 4,64 (dd, J = 6,1, 1,3 Hz, H-5), 4,09 (dd, J = 6,1, 3,1 Hz, H-6), 4,06 (q, J = 7,1 Hz, észter CH₂), 3,40 (d, CH₂ híd), 3,35 (m, C-9), 3,26 (d, J = 16,5 Hz, CH₂ híd), 2,77 (d, J = 18,5 Hz, H-10) 2,58 (m, H-16), 2,55 (m, H-14), 2,31 (td, J = 12,2, 3,4 Hz, H-16), 2,26 (dd, J = 18,5, 6,4 Hz, H-10), 1,98 (m, H-15), 1,58 (dt, J = 11,0, 2,2 Hz, H-15), 1,16 (t, J = 7,1 Hz, észter CH₃)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 170,9 (észter C=O), 146,6 (C4), 138,9 (C3), 133,8 (C7), 131,3 (C12), 128,6 (C8), 125,7 (C11), 118,9 (C1), 116,7 (C2), 91,9 (C5), 66,7 (C6), 60,4 (észter CH₂), 57,2 (C9), 56,5 (CH₂ híd), 44,9 (C16), 43,5 (C13), 40,66 (C14), 35,6 (C15), 22,4 (C10), 14,5 (észter CH₃)

N-karboximetildihidronormorfin-etilészter (**70**) (etil-2-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetát): Hozam: 84%, o.p.: 86°C, C₂₀H₂₅NO₅, Mt = 359,42, HR-MS [M+ H⁺]: számított 360,1805, mért 360,1789

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,49 (d, $J = 8,0$ Hz, H-2), 6,38 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1), 4,41 (d, $J = 4,8$ Hz, H-5), 4,04 (q, $J = 7,1$ Hz, észter CH_2), 3,79 (dd, $J = 9,1, 4,4$ Hz, H-6), 3,31 (d, (CH_2 híd), 3,15 (d, $J = 16,4$ Hz, CH_2 híd), 3,02 (dd, $J = 6,0, 2,8$ Hz, H-9), 2,71 (d, $J = 18,3$ Hz, H-10), 2,49 (m, H-16) 2,31 (dd, $J = 18,4, 6,0$ Hz, H-10), 2,18 – 2,09 (m, H-14, H-15), 1,78 (d, $J = 5,1$ Hz, H-15), 1,44 – 1,38 (m, H-15), 1,35 (dd, $J = 13,4, 6,8$ Hz, H-8), 1,28 (ddt, $J = 12,8, 6,5, 3,9$ Hz, H-7), 1,15 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH_3), 1,11 (m, H-7), 0,83 (tt, $J = 12,5, 6,4$ Hz, H-8)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 171,0 (észter C=O), 146,4 (C4), 138,4 (C3), 130,4 (C12), 125,4 (C11), 118,4 (C1), 117,1 (C2), 90,3 (C5), 66,5 (C6), 60,4 (észter CH_2), 58,3 (C9), 56,8 (CH_2 híd), 44,9 (C16), 42,2 (C13), 38,2 (C14), 37,4 (C15), 26,0 (C7), 21,9 (C10), 19,9 (C8), 14,6 (észter CH_3)

N-karboximetilnorkodein-etilészter (**22**) (etil-2-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,7,7a-tetrahydro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetát):

Hozam: 90%, o.p.: olaj, $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_5$, Mt = 371,43, HR-MS [$\text{M}^+ \text{H}^+$]: számított 372,1805, mért 372,1800

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,58 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,42 (d, $J = 8,2$ Hz, H-1), 5,49 (ddt, $J = 9,8, 3,2, 1,5$ Hz, H-7), 5,19 (dt, $J = 9,8, 2,8$ Hz, H-8), 4,66 (dd, $J = 6,0, 1,3$ Hz, H-5), 4,10 (m, H-6), 4,05 (q, $J = 7,1$ Hz, észter CH_2), 3,69 (s, OCH_3), 3,38 (d, CH_2 híd), 3,23 (d, $J = 16,6$ Hz, CH_2 híd), 2,81 (d, $J = 18,6$ Hz, H-10), 2,56 (m, H-14, H-16), 2,34 – 2,25 (m, H-10, H-16), 1,98 (td, $J = 12,6, 5,0$ Hz, H-15), 1,62 – 1,53 (m, H-15), 1,16 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH_3)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 170,6 (észter C=O), 147,2 (C4), 141,7 (C3), 133,9 (C7), 131,6 (C12), 128,7 (C8), 127,5 (C11), 118,9 (C1), 113,7 (C2), 92,5 (C5), 67,0 (C6), 60,5 (észter CH_2), 57,3 (C9), 56,5 (OCH_3), 55,9 (CH_2 híd), 44,9 (C16), 43,5 (C13), 40,6 (C14), 35,6 (C15), 22,6 (C10), 14,6 (észter CH_3)

N-karboximetildihidronorkodein-etilészter (**71**) (etil-2-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetát):

Hozam: 88%, o.p.: olaj, $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_5$, Mt = 373,44, HR-MS [$\text{M}^+ \text{H}^+$]: számított 374,1961, mért 374,1959

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,66 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,50 (d, $J = 8,2$ Hz, H-1), 4,43 (dd, $J = 7,8, 4,9$ Hz, H-5), 4,04 (q, $J = 7,1$ Hz, észter CH₂), 3,79 (dt, $J = 8,7, 4,1$ Hz, H-6), 3,72 (s, OCH₃), 3,32 (d, CH₂ híd), 3,16 (d, $J = 16,4$ Hz, CH₂ híd), 3,04 (dd, $J = 5,9, 2,7$ Hz, H-9), 2,75 (d, $J = 18,4$ Hz, H-10), 2,51 – 2,48 (m, H-16), 2,34 (dd, $J = 18,4, 6,0$ Hz, H-10), 2,17 – 2,09 (m, H-16, H-14), 1,79 (td, $J = 12,4, 5,0$ Hz, H-15), 1,40 (ddd, $J = 12,5, 3,6, 1,7$ Hz, H-15), 1,34 (dd, $J = 13,3, 6,7$ Hz, H-8), 1,29 (ddd, $J = 13,4, 7,2, 4,2$ Hz, H-7), 1,15 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH₃), 1,13 – 1,08 (m, H-7), 0,84 (tt, $J = 11,9, 6,1$ Hz, H-8)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 170,9 (észter C=O), 147,4 (C4), 141,3 (C3), 130,7 (C12), 127,3 (C11), 118,4 (C1), 114,4 (C2), 90,7 (C5), 66,3 (C6), 60,3 (észter CH₂), 58,2 (C9), 56,8 (CH₂ híd), 56,7 (OCH₃), 44,9 (C16), 42,4 (C13), 38,4 (C14), 37,3 (C15), 26,1 (C7), 22,0 (C10), 19,8 (C8), 14,5 (észter CH₃)

N-karboximetilnoroximorfon-etilészter (**72**) (etil-2-((7aR)-4a,9-dihidroxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetát): Hozam: 82%, o.p.: 160°C, C₂₀H₂₃NO₆, Mt = 373,40, HR-MS [M+ H⁺]: számított 374,1598, mért 374,1588

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,53 (d, $J = 8,1$ Hz, H-2), 6,50 (d, $J = 8,1$ Hz, H-1), 4,74 (s, H-5), 4,12 – 4,06 (q, észter CH₂), 3,43 (d, $J = 17,1$ Hz, CH₂ híd), 3,31 (d, $J = 17,2$ Hz, CH₂ híd), 2,97 (d, $J = 18,5$ Hz, H-10), 2,90 (d, $J = 5,9$ Hz, H-9), 2,89 – 2,82 (m, H-7), 2,57 (d, $J = 5,9$ Hz, H-10), 2,49 (m, H-16), 2,38 – 2,29 (m, H-15), 2,18 (td, $J = 12,0, 3,6$ Hz, H-16), 2,06 (dt, $J = 14,2, 3,2$ Hz, H-7), 1,71 (ddd, $J = 13,4, 5,0, 3,0$ Hz, H-8), 1,40 (td, $J = 14,1, 3,4$ Hz, H-8), 1,28 – 1,22 (m, H-15), 1,18 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH₃)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 209,0 (C6), 171,3 (észter C=O), 143,8 (C4), 139,8 (C3), 129,6 (C12), 123,6 (C11), 119,5 (C1), 117,6 (C2), 89,7 (C5), 70,4 (C14), 62,8 (C9), 60,7 (észter CH₂), 55,6 (CH₂ híd), 50,3 (C13), 43,9 (C16), 36,2 (C7), 31,5 (C8), 30,6 (C15), 24,3 (C10), 14,5 (észter CH₃)

N-karboximetilnoroxikodon-etilészter (**73**) (etil-2-((7aR)-4a-hidroxi-9-metoxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetát): Hozam: 87%, o.p.: 144°C, C₂₁H₂₅NO₆, Mt = 387,43, HR-MS [M+ H⁺]: számított 388,1755, mért 388,1752

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,72 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,63 (d, $J = 8,2$ Hz, H-1), 4,81 (s, H-5), 4,15 – 4,03 (q, észter CH_2), 3,75 (s, OCH_3), 3,44 (d, $J = 17,1$ Hz, CH_2 híd), 3,32 (d, $J = 17,1$ Hz, CH_2 híd), 3,01 (d, $J = 18,6$ Hz, H-10), 2,92 (d, $J = 5,7$ Hz, H-9), 2,87 (td, $J = 14,4, 5,0$ Hz, H-7), 2,59 (dd, $J = 18,7, 5,8$ Hz, H-10), 2,52 – 2,48 (m, H-16), 2,34 (td, $J = 12,5, 5,3$ Hz, H-15), 2,17 (td, $J = 12,0, 3,6$ Hz, H-16), 2,06 (dt, $J = 14,1, 3,2$ Hz, H-7), 1,72 (ddd, $J = 13,5, 5,0, 3,0$ Hz, H-8), 1,43 – 1,34 (m, H-8), 1,30 – 1,23 (m, H-15), 1,18 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH_3)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 208,8 (C6), 171,3 (észter $\text{C}=\text{O}$), 144,8 (C4), 142,4 (C3), 129,9 (C12), 125,8 (C11), 119,7 (C1), 115,2 (C2), 90,2 (C5), 70,3 (C14), 62,8 (C9), 60,7 (észter CH_2), 56,8 (OCH_3), 55,7 (CH_2 híd), 50,2 (C13), 43,8 (C16), 36,3 (C7), 31,6 (C8), 30,5 (C15), 24,3 (C16), 14,5 (észter CH_3)

5.6.2.3. *N*-karboximetil-haptén észterek hidrolízise

Az *N*-karboximetil-haptén-etilésztert (0,5 mmol) alkohol (60 μl) és víz (2,5 ml) elegyében oldjuk. Az elegyet nátrium-hidroxid oldattal (1 M, 0,5 mmol) reagáltatjuk 1 órán át 60 °C-on. A hidrolízist VRK-val követjük, és a kiindulási anyag feltjának eltűnését követően a pH-t 3-4 körülire állítjuk 10 %-os sósav oldattal. Szárazra párolva a kívánt vegyület sósavas sóját kapjuk.

N-karboximetilnormorfin HCl (**19**) (2-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,7,7a-tetrahydro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 92%, o.p.: > 270°C bomlás, $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_5$, Mt = 329,35, HR-MS [$\text{M}^+ \text{H}^+$]: számított 330,1336, mért 330,1332

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6,61 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,53 (d, $J = 8,2$ Hz, H-1), 5,60 (m, H-7), 5,24 (d, $J = 10,0$ Hz, H-8), 4,92 (d, $J = 6,5$ Hz, H-5), 4,27 (m, H-9), 4,25 (m, H-6), 4,00 (dd, CH_2 híd) 3,48 (q, $J = 7,1$ Hz, H-16), 3,11 (d, $J = 20,1$ Hz, H-10), 2,99 (d, $J = 18,1$ Hz, H-14), 2,80 (dd, $J = 20,0, 6,8$ Hz, H-10), 2,39 – 2,19 (m, H-15), 2,02 (d, $J = 14,6$ Hz, H-15)

^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 169,2 (észter $\text{C}=\text{O}$), 145,5 (C4), 137,8 (C3), 132,9 (C7), 129,0 (C12), 125,4 (C8), 123,0 (C11), 120,0 (C1), 117,6 (C2), 89,9 (C5), 65,5 (C6), 60,2 (C9), 54,9 (CH_2 híd), 47,1 (C16), 41,8 (C13), 38,1 (C14), 32,2 (C15), 21,9 (C16)

N-karboximetildihidronormorfin HCl (**80**) (2-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 93%, o.p.: > 315°C bomlás, C₁₈H₂₁NO₅, Mt = 331,36, HR-MS [M+ H⁺]: számított 332,1492, mért 332,1482

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,69 (d, *J* = 7,9 Hz, H-2), 6,62 (d, *J* = 8,2 Hz, H-1), 4,64 (dd, H-5), 4,07 – 3,83 (m, H-6, H-9, CH₂ híd), 3,34 (dd, *J* = 13,4, 4,4 Hz, H-16), 3,06 (d, *J* = 20,2 Hz, H-10), 2,91 (dd, *J* = 19,9, 6,0 Hz, H-10), 2,82 (ddd, *J* = 17,3, 13,9, 7,6 Hz, H-16), 2,47 (t, *J* = 11,5 Hz, H-14), 2,08 (td, *J* = 13,9, 5,0 Hz, H-15), 1,78 (dd, *J* = 14,7, 3,7 Hz, H-15), 1,44 (m, H-7, H-8), 0,99 – 0,83 (m, H-8)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 168,3 (karboxil C=O), 145,2 (C4), 137,1 (C3), 128,4 (C12), 122,6 (C11), 119,8 (C1), 117,8 (C2), 89,0 (C5), 66,1 (C6), 61,5 (C9), 55,0 (CH₂ híd), 47,5 (C16), 40,2 (C13), 38,3 (C14), 34,1 (C15), 26,0 (C7), 21,4 (C10), 17,7 (C8)

N-karboximetilnorkodein HCl (**23**) (2-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,7,7a-tetrahydro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 95%, o.p.: > 260°C bomlás, C₁₉H₂₁NO₅, Mt = 343,37, HR-MS [M+ H⁺]: számított 344,1492, mért 344,1481

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,79 (d, *J* = 8,3 Hz, H-2), 6,65 (d, *J* = 8,3 Hz, H1), 5,68 – 5,54 (m, H-7), 5,33 – 5,18 (m, H-8), 5,03 – 4,87 (m, H-5), 4,39 – 3,94 (m, H-9, H-6, CH₂ híd), 3,72 (s, OCH₃), 3,55 – 3,40 (m, H-16), 3,16 (d, *J* = 20,1 Hz, H-10), 3,10 – 2,73 (m, H-14, H-10), 2,31 (t, H-15), 2,05 (d, *J* = 14,9 Hz, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 168,8 (karboxil C=O), 146,4 (C4), 141,9 (C3), 133,1 (C7), 128,9 (C12), 125,5 (C8), 124,0 (C11), 120,4 (C1), 114,7 (C2), 90,6 (C5), 65,9 (C6), 60,5 (C9), 56,4 (OCH₃) 54,8 (CH₂ híd), 46,8 (C16), 41,7 (C13), 38,4 (C14), 32,4 (C15), 21,9 (C10)

N-karboximetildihidronorkodein HCl (**81**) (2-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 90%, o.p.: > 275°C bomlás, C₁₉H₂₃NO₅, Mt = 345,39, HR-MS [M+ H⁺]: számított 346,1649, mért 346,1644

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,85 (d, *J* = 8,2 Hz, H-2), 6,72 (d, *J* = 8,2 Hz, H-1), 4,69 (d, *J* = 5,4 Hz, H-5), 4,16 – 3,79 (m, H-6, H-9, CH₂ híd), 3,75 (s, OCH₃), 3,38 – 3,29

(m, H-16), 3,09 (d, $J = 20,2$ Hz, H-10), 2,99 – 2,87 (m, H-10), 2,80 (t, $J = 12,6$ Hz, H-16), 2,46 (d, $J = 11,6$ Hz, H-14), 2,08 (dd, $J = 14,7, 10,0$ Hz, H-15), 1,78 (d, $J = 14,0$ Hz, H-15), 1,45 (m, H-7, H-8), 0,98 – 0,87 (m, H-8)

^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 168,5 (karboxil C=O), 145,8 (C4), 141,3 (C3), 127,8 (C12), 123,4 (C11), 119,9 (C1), 115,0 (C2), 89,2 (C5), 66,0 (C6), 61,5 (C9), 56,7 (OCH₃), 55,1 (CH₂ híd), 47,4 (C16), 40,1 (C13), 38,2 (C14), 34,1 (C15), 26,0 (C7), 21,4 (C10), 17,6 (C8)

N-karboximetilnoroximorfon HCl (**82**) (2-((7aR)-4a,9-dihidroxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 96%, o.p.: > 290°C bomlás, C₁₈H₁₉NO₆, Mt = 345,35, HR-MS [M+ H⁺]: számított 346,1285, mért 346,1283

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6,70 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,68 (d, $J = 8,3$ Hz, H-1), 4,92 (s, H-5), 3,93 (d, $J = 16,7$ Hz, CH₂ híd), 3,88 (d, $J = 6,2$ Hz, H-9), 3,69 (d, $J = 16,7$ Hz, CH₂ híd), 3,29 (d, $J = 20,0$ Hz, H-10), 3,18 (dd, $J = 13,1, 4,9$ Hz, H-16), 3,06 (dd, $J = 20,1, 6,4$ Hz, H-10), 2,89 (td, $J = 14,8, 5,1$ Hz, H-7), 2,81 (td, $J = 13,0, 4,1$ Hz, H-16), 2,65 (td, $J = 13,5, 5,0$ Hz, H-15), 2,20 (dt, $J = 14,9, 3,2$ Hz, H-7), 1,96 (ddd, $J = 14,6, 5,2, 2,9$ Hz, H-8), 1,65 (dd, $J = 12,9, 3,7$ Hz, H-15), 1,60 (dd, $J = 14,6, 3,6$ Hz, H-8)

^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 209,3 (C6), 168,8 (karboxil C=O), 143,0 (C4), 138,5 (C3), 127,2 (C12), 121,7 (C11), 121,1 (C1), 118,7 (C2), 89,2 (C5), 70,7 (C14), 64,9 (C9), 54,7 (CH₂ híd), 48,6 (C13), 46,7 (C16), 34,6 (C7), 30,5 (C8), 27,5 (C15), 23,9 (C10)

N-karboximetilnoroxikodon HCl (**83**) (2-((7aR)-4a-hidroxi-9-metoxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 94%, o.p.: > 210°C bomlás, C₁₉H₂₁NO₆, Mt = 359,37, HR-MS [M+ H⁺]: számított 360,1442, mért 360,1435

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6,86 (d, $J = 8,4$ Hz, H-2), 6,78 (d, $J = 8,4$ Hz, H-1), 4,95 (s, H-5), 3,94 – 3,79 (m, H-9, CH₂ híd), 3,74 (s, OCH₃), 3,63 (d, $J = 16,4$ Hz, CH₂ híd), 3,31 (d, $J = 20,0$ Hz, H-10), 3,17 (ddt, $J = 13,1, 5,0, 1,4$ Hz, H-16), 3,12 – 3,05 (m, H-10), 2,90 (td, $J = 14,8, 5,1$ Hz, H-7), 2,80 (td, $J = 13,0, 4,1$ Hz, H-16), 2,65 (td, $J = 13,5, 5,0$ Hz, H-15), 2,21 (dt, $J = 14,9, 3,2$ Hz, H-7), 1,96 (ddd, $J = 14,5, 5,1, 2,9$ Hz, H-8), 1,65 (dd, $J = 14,2, 3,8$ Hz, H-15), 1,60 (dd, $J = 14,6, 3,5$ Hz, H-8)

^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 210,3 (C6), 169,2 (karboxil C=O), 143,9 (C4), 142,4 (C3), 127,1 (C12), 122,5 (C11), 121,1 (C1), 115,6 (C2), 89,4 (C5), 70,4 (C14), 64,9 (C9), 56,7 (OCH₃), 55,2 (CH₂ híd), 48,7 (C13), 46,6 (C16), 34,5 (C7), 30,5 (C8), 27,6 (C15), 23,9 (C10)

5.6.2.4. *N*-karboxietil-haptén észterek szintézise

A szükséges norvegyületet (2 mmol) 30 ml etanolban oldjuk, és trietil-amin (1 ml) jelenlétében etil-akrilátot (2,4 mmol) adunk az oldathoz. Az elegyet 3 órát kevertetjük, és refluxáltatjuk. VRK-s ellenőrzést követően szárazra pároljuk a reakcióelegyet. Szükség esetén oszlopkromatográfiásan tisztítjuk a terméket (kloroform : metanol 9:1.)

N-karboxietilnormorfin-etilészter (74) (etil-3-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,7,7a-tetrahydro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propanoát): Hozam: 98%, o.p.: 158°C, $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_5$, Mt = 371,43, HR-MS [$\text{M}^+ \text{H}^+$]: számított 372,1805, mért 372,1798

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,44 (d, $J = 8,0$ Hz, H-2), 6,34 (d, $J = 8,1$ Hz, H-1), 5,52 (m, H-7), 5,22 (dt, $J = 9,8, 2,8$ Hz, H-8), 4,66 (dd, $J = 6,1, 1,3$ Hz, H-5), 4,15 – 4,00 (m, H-6, észter CH₂), 3,35 (m, H-9), 2,78 (m, H-10, etilén híd CH₂), 2,64 (dt, $J = 12,9, 6,6$ Hz, etilén híd CH₂), 2,60 – 2,53 (m, H-16), 2,48 – 2,39 (m, H-14, etilén híd CH₂), 2,33 – 2,21 (m, H-16, H-10), 1,92 (td, $J = 12,5, 5,0$ Hz, H-15), 1,61 (ddd, $J = 12,5, 3,4, 1,7$ Hz, H-15), 1,19 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH₃)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 172,3 (észter C=O), 146,8 (C4), 138,7 (C3), 133,9 (C7), 131,2 (C12), 128,8 (C8), 125,7 (C11), 118,9 (C1), 116,8 (C2), 92,0 (C5), 66,8 (C6), 60,3 (észter CH₂), 57,1 (C9), 50,8 (etilén híd CH₂), 44,6 (C16), 43,8 (C13), 41,6 (C14), 36,0 (C15), 33,7 (etilén híd CH₂), 22,2 (C10), 14,7 (észter CH₃)

N-karboxietildihidronormorfin-etilészter (75) (etil-3-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propanoát): Hozam: 96%, o.p.: 120°C, $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_5$, Mt = 373,44, HR-MS [$\text{M}^+ \text{H}^+$]: számított 374,1961, mért 374,1960

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,53 (d, $J = 8,0$ Hz, H-2), 6,41 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1), 4,44 (d, $J = 4,8$ Hz, H-5), 4,06 (q, $J = 7,1$ Hz, észter CH₂), 3,80 (m, H-6), 3,16 – 2,99

(m, H-9), 2,77 (d, $J = 18,5$ Hz, H-10), 2,51 (m, H-16), 2,46 (d, $J = 6,9$ Hz, etilén híd CH₂), 2,12 (m, H-16), 1,82 – 1,72 (m, H-15), 1,46 (d, $J = 12,4$ Hz, H-15), 1,38 (dq, $J = 13,5, 6,9$ Hz, H-8), 1,30 (dtd, $J = 13,2, 6,5, 3,4$ Hz, H-7), 1,18 (m, H-7, észter CH₃), 0,87 (dt, $J = 12,6, 6,4$ Hz, H-8)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172,2 (észter C=O), 146,5 (C4), 138,3 (C3), 130,1 (C12), 125,2 (C11), 117,8 (C1), 116,6 (C2), 89,6 (C5), 65,8 (C6), 59,6 (észter CH₂), 57,4 (C9), 49,9 (etilén híd CH₂), 44,0 (C16), 42,7 (C13), 37,6 (C14), 36,7 (C15), 32,6 (etilén híd CH₂), 25,4 (C7), 20,9 (C10), 19,3 (C8), 14,2 (észter CH₃)

N-karboxietilnorkodein-etilészter (76) (etil-3-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,7,7a-tetrahydro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propanoát): Hozam: 97%, o.p.: olaj, C₂₂H₂₇NO₅, Mt = 385,45, HR-MS [M+ H⁺]: számított 386,1962, mért 386,1951

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,61 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,45 (d, $J = 8,2$ Hz, H-1), 5,53 (m, H-7), 5,23 (dt, $J = 9,8, 2,8$ Hz, H-8), 4,67 (dd, $J = 5,9, 1,3$ Hz, H-5), 4,11 (dt, $J = 5,7, 2,9$ Hz, H-6), 4,07 (q, $J = 7,1$ Hz, észter CH₂), 3,71 (s, OCH₃), 3,36 (s, H-9), 2,86 – 2,74 (m, H-10, etilén híd), 2,64 (dt, $J = 12,9, 6,7$ Hz, etilén híd), 2,61 – 2,53 (m, H-16), 2,49 – 2,42 (m, H-14, etilén híd), 2,31 (dd, $J = 18,6, 6,3$ Hz, H-10), 2,24 (td, $J = 12,2, 3,4$ Hz, H-16), 1,92 (td, $J = 12,5, 5,0$ Hz, H-15), 1,61 (ddd, $J = 12,6, 3,4, 1,7$ Hz, H-15), 1,18 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH₃)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171,7 (észter C=O), 145,0 (C4), 141,2 (C3), 133,1 (C7), 130,7 (C12), 128,0 (C8), 127,0 (C11), 118,1 (C1), 113,0 (C2), 91,7 (C5), 66,2 (C6), 59,5 (észter CH₂), 56,2 (C9), 55,8 (OCH₃), 49,9 (etilén híd CH₂), 43,7 (C16), 43,4 (C13), 40,2 (C14), 35,2 (C15), 32,9 (etilén híd CH₂), 21,5 (C10), 14,0 (észter CH₃)

N-karboxietildihidronorkodein-etilészter (77) (etil-3-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propanoát): Hozam: 93%, o.p.: olaj, C₂₂H₂₉NO₅, Mt = 387,47, HR-MS [M+ H⁺]: számított 388,2118, mért 388,2111

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,69 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,53 (d, $J = 8,1$ Hz, H-1), 4,45 (dd, $J = 6,7, 4,9$ Hz, H-5), 4,06 (m, észter CH₂), 3,84 – 3,77 (m, H-6), 3,76 (s, OCH₃), 3,04 (dd, $J = 5,9, 2,8$ Hz, H-9), 2,81 – 2,70 (m, H-10, etilén híd CH₂), 2,59 (ddd,

$J = 12,8, 6,6, 5,9$ Hz, etilén híd CH₂), 2,46 – 2,38 (m, etilén híd CH₂), 2,36 (dd, $J = 18,4, 6,0$ Hz, H-10), 2,12 – 2,02 (m, H-14, H-16), 1,74 (ddd, $J = 14,3, 11,2, 4,9$ Hz, H-15), 1,44 (ddd, $J = 12,4, 3,6, 1,7$ Hz, H-15), 1,37 (dt, $J = 13,4, 6,8$ Hz, H-8), 1,31 (dq, $J = 10,0, 3,5$ Hz, H-7), 1,18 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH₃), 1,16 – 1,11 (m, H-8), 0,94 – 0,82 (m, H-7)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172,4 (észter C=O), 147,4 (C4), 140,9 (C3), 130,7 (C12), 127,2 (C11), 118,4 (C1), 114,4 (C2), 90,7 (C5), 66,3 (C6), 60,1 (észter CH₂), 57,9 (C9), 56,7 (OCH₃), 50,6 (etilén híd CH₂), 44,5 (C16), 42,6 (C13), 38,6 (C14), 37,5 (C15), 33,6 (etilén híd CH₂), 26,1 (C7), 21,6 (C10), 19,8 (C8), 14,6 (észter CH₃)

N-karboxietilnoroximorfon-etilészter (**78**) (etil-3-((7aR)-4a,9-dihidroxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propanoát): Hozam: 99%, o.p.: 137°C, C₂₁H₂₅NO₆, Mt = 387,43, HR-MS [M+ H⁺]: számított 388,1754, mért 388,1740

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,56 (d, $J = 8,1$ Hz, H-2), 6,52 (d, $J = 8,1$ Hz, H-1), 4,75 (s, H-5), 4,08 (qd, $J = 7,1, 2,8$ Hz, észter CH₂), 2,97 (d, $J = 18,5$ Hz, H-10), 2,91 (d, $J = 5,9$ Hz, H-9), 2,90 – 2,84 (m, H-7), 2,75 (dt, $J = 12,7, 7,2$ Hz, etilén híd CH₂), 2,67 (dt, $J = 12,6, 6,2$ Hz, etilén híd CH₂), 2,58 – 2,46 (H-10, H-16, etilén híd CH₂), 2,27 (td, $J = 12,6, 5,1$ Hz, H-15), 2,08 (dt, $J = 14,1, 3,2$ Hz, H-7), 2,02 (td, $J = 12,1, 3,7$ Hz, H-16), 1,74 (ddd, $J = 13,3, 5,0, 2,9$ Hz, H-8), 1,43 (td, $J = 14,0, 3,4$ Hz, H-8), 1,32 – 1,25 (m, H-15), 1,21 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH₃)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 208,7 (C6), 172,0 (észter C=O), 143,4 (C4), 139,4 (C3), 129,4 (C12), 123,3 (C11), 119,0 (C1), 117,2 (C2), 89,3 (C5), 69,8 (C14), 62,6 (C9), 59,9 (észter CH₂), 50,1 (C13), 49,7 (etilén híd CH₂), 42,7 (C16), 35,8 (C7), 32,9 (etilén híd CH₂), 31,1 (C8), 30,2 (C15), 23,1 (C10), 14,2 (észter CH₃)

N-karboxietilnoroxikodon-etilészter (**79**) (etil-3-((7aR)-4a-hidroxi-9-metoxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propanoát): Hozam: 98%, o.p.: 119°C, C₂₂H₂₇NO₆, Mt = 401,45, HR-MS [M+ H⁺]: számított 402,1911, mért 402,1905

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,74 (d, $J = 8,3$ Hz, H-2), 6,66 (d, $J = 8,2$ Hz, H-1), 4,83 (d, $J = 7,8$ Hz, H-5), 4,09 (qd, $J = 7,1, 2,8$ Hz, észter CH₂), 3,78 (s, OCH₃), 3,02 (d, $J = 18,6$ Hz, H-10), 2,94 (d, $J = 5,7$ Hz, H-9), 2,89 (d, $J = 5,0$ Hz, H-7), 2,81 – 2,72

(m, etilén híd CH₂), 2,68 (dt, $J = 12,6, 6,2$ Hz, etilén híd CH₂), 2,59 (dd, $J = 18,7, 5,8$ Hz, H-10), 2,57 – 2,46 (m, H-16, etilén híd CH₂), 2,28 (td, $J = 12,6, 5,2$ Hz, H-15), 2,08 (dt, $J = 14,1, 3,2$ Hz, H-7), 2,00 (td, $J = 12,2, 3,7$ Hz, H-16), 1,75 (ddd, $J = 13,4, 5,0, 3,0$ Hz, H-8), 1,46 – 1,37 (m, H-8), 1,33 – 1,26 (m, H-15), 1,21 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH₃)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 208,3 (C6), 172,1 (észter C=O), 144,2 (C4), 141,9 (C3), 129,5 (C12), 125,5 (C11), 118,9 (C1), 114,4 (C2), 89,4 (C5), 69,8 (C14), 62,5 (C9), 59,4 (észter CH₂), 55,9 (OCH₃), 50,2 (C13), 49,2 (etilén híd CH₂), 42,7 (C16), 35,5 (C7), 32,4 (etilén híd CH₂), 30,8 (C8), 29,7 (C15), 22,8 (C10), 13,9 (észter CH₃)

5.6.2.5. *N*-karboxietil-haptén észterek hidrolízise

Az *N*-karboxietil-haptén-etilésztert (0,5 mmol) alkohol (60 μ l) és víz (2,5 ml) elegyében oldjuk. Az elegyet nátrium-hidroxid oldattal (1 M, 0,5 mmol) reagáltatjuk 1 órát 60 °C-on. A hidrolízist VRK-val követjük, és a kiindulási anyag feltűnését követően a pH-t 3-4 körülire állítjuk 10 %-os sósav oldattal. Szárazra párolva a kívánt vegyület sósavas sóját kapjuk.

N-karboxietilnormorfin HCl (**84**) (3-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,7,7a-tetrahydro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propionsav hidroklorid): Hozam: 96%, o.p.: > 290°C bomlás, C₁₉H₂₁NO₅, Mt = 343,37, HR-MS [M+ H⁺]: számított 344,1492, mért 344,1483

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,64 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,56 (d, $J = 8,2$ Hz, H-1), 5,62 (d, $J = 9,7$ Hz, H-7), 5,27 (d, $J = 10,1$ Hz, H-8), 4,94 (dd, $J = 6,4, 1,3$ Hz, H-5), 4,29 – 4,18 (m, H-6, H-9), 3,48 – 3,33 (m, H-16, etilén híd CH₂), 3,13 (d, $J = 20,1$ Hz, H-10), 2,96 (t, $J = 13,2$ Hz, H-16), 2,89 – 2,78 (m, H-14, H-10), 2,71 (td, $J = 7,0, 2,7$ Hz, etilén híd CH₂), 2,22 (t, $J = 13,8$ Hz, H-15), 2,04 (d, $J = 14,3$ Hz, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 175,3 (karboxil C=O), 145,1 (C4), 137,8 (C3), 129,3 (C12), 133,1 (C7), 125,5 (C8), 123,2 (C11), 120,3 (C1), 117,6 (C2), 90,3 (C5), 65,6 (C6), 58,8 (C9), 50,7 (etilén híd CH₂), 46,0 (C16), 41,8 (C13), 38,1 (C14), 32,5 (C15), 29,6 (etilén híd CH₂), 21,2 (C10)

N-karboxietildihidronormorfin HCl (**85**) (3-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propionsav

hidroklorid): Hozam: 96%, o.p.: > 295°C bomlás, C₁₉H₂₃NO₅, Mt = 345,39, HR-MS [M+ H⁺]: számított 346,1649, mért 346,1647

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,70 (dd, *J* = 8,2, 0,9 Hz, H-2), 6,63 (d, *J* = 8,1 Hz, H-1), 4,65 (d, *J* = 5,5 Hz, H-5), 4,02 (td, *J* = 5,9, 2,8 Hz, H-6), 3,91 (dd, *J* = 6,4, 2,6 Hz, H-9), 3,48 – 3,32 (m, etilén híd CH₂), 3,26 (dd, *J* = 13,1, 5,3 Hz, H-16), 3,08 (d, *J* = 19,7 Hz, H-10), 2,90 (dd, *J* = 19,9, 6,1 Hz, H-10), 2,83 – 2,72 (m, H-16, etilén híd CH₂), 2,33 (ddd, *J* = 11,7, 5,3, 2,8 Hz, H-14), 2,01 (td, *J* = 13,6, 4,8 Hz, H-15), 1,83 – 1,76 (m, H-15), 1,51 – 1,38 (m, H-7, H-8), 1,00 – 0,86 (m, H-8)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 174,2 (karboxil C=O), 145,1 (C4), 137,3 (C3), 128,1 (C12), 122,4 (C11), 119,8 (C1), 117,9 (C2), 88,9 (C5), 66,0 (C6), 60,0 (C9), 50,0 (etilén híd CH₂), 46,9 (C16), 40,6 (C13), 38,3 (C14), 34,0 (C15), 29,0 (etilén híd CH₂), 25,9 (C7), 20,5 (C10), 17,6 (C8)

N-karboxietilnorkodein HCl (**86**) (3-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,7,7a-tetrahydro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propionsav

hidroklorid): Hozam: 93%, o.p.: > 200°C bomlás, C₂₀H₂₃NO₅, Mt = 357,40, HR-MS [M+ H⁺]: számított 358,1649, mért 358,1634

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,78 (d, *J* = 8,3 Hz, H-2), 6,65 (d, *J* = 8,3 Hz, H-1), 5,61 (d, *J* = 9,8 Hz, H-7), 5,26 (d, *J* = 9,9 Hz, H-8), 4,94 (dd, *J* = 6,4, 1,3 Hz, H-5), 4,32 – 4,15 (m, H-6, H-9), 3,71 (s, OCH₃), 3,51 (q, *J* = 7,1 Hz, etilén híd CH₂), 3,48 – 3,34 (m, H-16), 3,17 (d, *J* = 20,3 Hz, H-10), 3,00 – 2,78 (m, H-16, H-14, H-10), 2,75 (td, *J* = 7,0, 2,5 Hz, etilén híd CH₂), 2,22 (d, *J* = 13,9 Hz, H-15), 2,03 (d, *J* = 14,4 Hz, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 175,1 (karboxil C=O), 146,3 (C4), 142,0 (C3), 133,1 (C7), 129,00 (C12), 125,6 (C8), 124,0 (C11), 120,3 (C1), 114,4 (C2), 90,5 (C5), 65,7 (C6), 58,9 (C9), 56,4 (OCH₃), 50,6 (etilén híd CH₂), 46,1 (C16), 41,9 (C13), 38,3 (C14), 32,5 (C15), 29,4 (etilén híd CH₂), 21,2 (C10)

N-karboxietildihidronorkodein HCl (**87**) (3-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-

propionsav hidroklorid): Hozam: 95%, o.p.: > 220°C bomlás, C₂₀H₂₅NO₅, Mt = 359,42, HR-MS [M+ H⁺]: számított 360,1805, mért 360,1791

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6,82 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,70 (d, $J = 8,2$ Hz, H-1), 4,64 (d, $J = 6,8$ Hz, H-5), 3,99 (q, $J = 4,9$ Hz, H-6), 3,92 (dd, $J = 6,3, 2,6$ Hz, H-9), 3,73 (s, OCH_3), 3,43 (dt, $J = 14,1, 7,2$ Hz, etilén híd CH_2), 3,37 (dt, $J = 13,7, 7,0$ Hz, etilén híd CH_2), 3,25 (dd, $J = 13,2, 4,7$ Hz, H-16), 3,10 (d, $J = 19,8$ Hz, H-10), 2,90 (dd, $J = 19,9, 6,2$ Hz, H-10), 2,79 (td, $J = 7,1, 4,4$ Hz, etilén híd CH_2), 2,71 (td, $J = 13,3, 4,1$ Hz, H-16), 2,35 (ddd, $J = 12,0, 5,4, 2,7$ Hz, H-14), 2,03 (td, $J = 13,7, 4,8$ Hz, H-15), 1,77 – 1,68 (m, H-15), 1,48 – 1,34 (m, H-8, H-7), 0,90 (tt, $J = 11,3, 6,0$ Hz, H-8)

^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 173,8 (karboxil $\text{C}=\text{O}$), 146,0 (C4), 141,5 (C3), 128,1 (C12), 123,5 (C11), 119,9 (C1), 114,9 (C2), 89,2 (C5), 66,0 (C6), 60,1 (C9), 56,6 (OCH_3), 49,9 (etilén híd CH_2), 46,9 (C16), 40,5 (C13), 38,1 (C14), 34,1 (C15), 28,9 (etilén híd CH_2), 25,8 (C7), 20,6 (C10), 17,6 (C8)

N-karboxietilnoroximorfon HCl (**88**) (3-((7aR)-4a,9-dihidroxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propionsav hidroklorid): Hozam: 99%, o.p.: $> 280^\circ\text{C}$ bomlás, $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_6$, Mt = 359,37, HR-MS [$\text{M}^+ \text{H}^+$]: számított 360,1442, mért 360,1332

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6,72 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,69 (d, $J = 8,3$ Hz, H-1), 4,93 (s, H-5), 3,74 (d, $J = 6,1$ Hz, H-9), 3,41 (m, etilén híd CH_2), 3,34 – 3,25 (m, H-16, H-10), 3,05 (dd, $J = 19,9, 6,3$ Hz, H-10), 2,89 (td, $J = 14,8, 5,1$ Hz, H-7), 2,85 – 2,66 (m, H-16, etilén híd CH_2), 2,60 (td, $J = 13,4, 4,8$ Hz, H-15), 2,21 (dt, $J = 14,8, 3,2$ Hz, H-7), 1,95 (ddd, $J = 14,5, 5,2, 3,0$ Hz, H-8), 1,64 (ddd, $J = 17,9, 13,7, 3,5$ Hz, H-8, H-15)

^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 211,5 (C6), 175,0 (karboxil $\text{C}=\text{O}$) 143,2 (C4), 138,7 (C3), 127,2 (C12), 121,7 (C11), 120,9 (C1), 118,7 (C2), 89,5 (C5), 70,6 (C14), 64,0 (C9), 49,7 (etilén híd CH_2), 49,1 (C13), 45,8 (C16), 34,4 (C7), 30,5 (C8), 28,2 (etilén híd CH_2), 27,1 (C15), 23,1 (C10)

N-karboxietilnoroxikodon HCl (**89**) (3-((7aR)-4a-hidroxi-9-metoxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propionsav hidroklorid): Hozam: 96%, o.p.: $> 260^\circ\text{C}$ bomlás, $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_6$, Mt = 373,40, HR-MS [$\text{M}^+ \text{H}^+$]: számított 374,1598, mért 374,1597

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6,87 (d, $J = 8,3$ Hz, H-2), 6,78 (d, $J = 8,4$ Hz, H-1), 4,95 (s, H-5), 3,75 (m, H-9, OCH_3), 3,42 (t, $J = 6,6$ Hz, etilén híd CH_2), 3,32 (m, H-10,

H-16), 3,08 (dd, $J = 20,0, 6,3$ Hz, H-10), 2,89 (td, $J = 14,8, 5,1$ Hz, H-7), 2,82 (dt, $J = 18,2, 6,6$ Hz, etilén híd CH₂), 2,70 (ddd, $J = 13,5, 12,9, 4,5$ Hz, H-16), 2,60 (td, $J = 13,4, 4,8$ Hz, H-15), 2,20 (dt, $J = 14,9, 3,2$ Hz, H-7), 1,95 (ddd, $J = 14,6, 5,2, 3,0$ Hz, H-8), 1,68 – 1,59 (m, H-8, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 211,0 (C6), 174,9 (karboxil C=O), 144,3 (C4), 142,6 (C3), 127,1 (C12), 122,4 (C11), 121,1 (C1), 115,6 (C2), 89,4 (C5), 70,2 (C14), 64,0 (C9), 56,7 (OCH₃), 49,7 (etilén híd CH₂), 48,4 (C13), 45,9 (C16), 34,4 (C7), 30,5 (C8), 28,2 (etilén híd CH₂), 27,2 (C15), 23,1 (C10)

5.6.3. *N*-acetilglicin-haptének szintézise

5.6.3.1. *N*-acetilglicin-haptén észterek szintézise

A szükséges norvegyületet (2 mmol) 30 ml acetonitrilben vagy dimetilformamidban oldjuk, és nátrium-hidrogénkarbonát (10 mmol), illetve kálium-jodid (2,4 mmol) jelenlétében *N*-klóracetilglicin-etilésztert (2,4 mmol) adunk az oldathoz. Az elegyet 8 órát kevertetjük, és refluxáltatjuk. VRK-s ellenőrzést követően kiszűrjük a szervesetlen sókat, és szárazra pároljuk az oldatot. Szükség esetén oszlopkromatográfiásan tisztítjuk a terméket (kloroform : metanol 9:1).

N-acetilglicinnormorfin-etilészter (**90**) (etil-2-(2-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,7,7a-tetrahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-acetát):
Hozam: 94%, o.p.: 105°C, C₂₂H₂₆N₂O₆, Mt = 414,45, HR-MS [M+ H⁺]: számított 415,1863, mért 415,1848

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,42 (d, $J = 8,0$ Hz, H-2), 6,32 (d, $J = 8,1$ Hz, H-1), 5,53 (m, H-7), 5,20 (dt, $J = 9,8, 2,8$ Hz, H-8), 4,67 (dd, $J = 6,1, 1,3$ Hz, H-5), 4,06 (q, $J = 7,1$ Hz, észter CH₂), 3,85 (qd, $J = 17,4, 6,2$ Hz, glicin CH₂), 3,35 (dd, $J = 6,1, 3,0$ Hz, H-9), 3,20 (d, $J = 16,1$ Hz, CH₂ híd), 2,98 (d, $J = 16,1$ Hz, CH₂ híd), 2,76 (d, $J = 18,4$ Hz, H-10), 2,71 (dd, $J = 4,7, 2,5$ Hz, H-14), 2,55 (dd, $J = 12,1, 4,6$ Hz, H-16), 2,41 – 2,29 (m, H-10, H-16), 2,05 (td, $J = 12,5, 4,9$ Hz, H-15), 1,61 (d, $J = 12,7$ Hz, H-15), 1,16 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH₃),

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171,0 (amid C=O), 170,3 (észter C=O), 146,7 (C4), 139,1 (C3), 133,8 (C7), 131,2 (C12), 128,7 (C8), 125,4 (C11), 119,0 (C1), 116,7

(C2), 91,8 (C5), 66,9 (C6), 60,8 (észter CH₂), 58,9 (CH₂ híd), 57,6 (C9), 45,0 (C16), 43,5 (C13), 40,9 (glicin CH₂), 40,7 (C14), 35,7 (C15), 23,3 (C10), 14,5 (észter CH₃)

N-acetylglucindihidronormorfin-etilészter **(91)** (etil-2-(2-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-acetát): Hozam: 91%, o.p.: 76°C, C₂₂H₂₈N₂O₆, Mt = 416,47, HR-MS [M+ H⁺]: számított 417,2020, mért 417,2020

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,53 (d, *J* = 8,0 Hz, H-2), 6,42 (d, *J* = 8,0 Hz, H-1), 4,47 (d, *J* = 4,8 Hz, H-5), 4,09 (q, *J* = 7,1 Hz, észter CH₂), 3,88 (d, *J* = 6,4 Hz, glicin CH₂), 3,85 (d, *J* = 6,0 Hz, glicin CH₂), 3,83 – 3,78 (m, H-6), 3,19 (d, *J* = 16,1 Hz, CH₂ híd), 3,07 (d, *J* = 3,2 Hz, H-9), 2,93 (d, *J* = 16,0 Hz, CH₂ híd), 2,73 (d, *J* = 18,3 Hz, H-10), 2,48 (m, H-16), 2,38 (t, *J* = 18,5 Hz, H-10), 2,29 (s, H-14), 2,26 – 2,18 (m, H-16), 1,90 (td, *J* = 12,3, 4,9 Hz, H-15), 1,46 (dt, *J* = 10,8, 2,3 Hz, H-15), 1,40 (dq, *J* = 13,8, 7,1 Hz, H-8), 1,32 (td, *J* = 6,7, 3,6 Hz, H-7), 1,18 (m, észter CH₃, H-7), 0,86 (d, *J* = 18,8 Hz, H-8),

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171,0 (amid C=O), 170,6 (észter C=O), 146,5 (C4), 138,5 (C3), 130,4 (C12), 125,3 (C11), 118,5 (C1), 117,2 (C2), 90,4 (C5), 66,7 (C6), 61,0 (észter CH₂), 59,2 (CH₂ híd), 58,8 (C9), 45,1 (C16), 42,5 (C13), 41,0 (glicin CH₂), 38,2 (C14), 37,5 (C15), 26,0 (C7), 23,0 (C10), 20,0 (C8), 14,6 (észter CH₃)

N-acetylglucinnorkodein-etilészter **(92)** (etil-2-(2-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,7,7a-tetrahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-acetát): Hozam: 90%, o.p.: olaj, C₂₃H₂₈N₂O₆, Mt = 428,48, HR-MS [M+ H⁺]: számított 429,2020, mért 429,2011

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,59 (d, *J* = 8,2, H-2), 6,44 (d, *J* = 8,3, H-1), 5,53 (d, *J* = 9,8 Hz, H-7), 5,21 (dt, *J* = 7,4, 3,4 Hz, H-8), 4,69 (d, *J* = 5,4 Hz, H-5), 4,10 (m, H-6), 4,06 (q, *J* = 7,2, 4,7, 2,6 Hz, észter CH₂), 3,86 (m, glicin CH₂), 3,69 (s, OCH₃), 3,37 (dt, *J* = 7,6, 3,8 Hz, H-9), 3,20 (dd, *J* = 16,3, 4,2 Hz, CH₂ híd), 2,98 (dd, *J* = 15,7, 3,8 Hz, CH₂ híd), 2,80 (dd, *J* = 18,5, 4,1 Hz, H-10), 2,75 – 2,69 (m, H-14), 2,58 (m, H-16), 2,41 – 2,31 (m, H-10, H-16), 2,11 – 1,99 (m, H-15), 1,61 (d, *J* = 12,9 Hz, H-15), 1,16 (t, *J* = 7,1, 4,7, 2,3 Hz, észter CH₃)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 170,9 (amid C=O), 170,5 (észter C=O), 147,7 (C4), 141,8 (C3), 133,7 (C7), 131,5 (C12), 128,7 (C8), 127,5 (C11), 118,8 (C1), 113,8 (C2), 92,4 (C5), 67,0 (C6), 60,9 (észter CH₂), 58,9 (CH₂ híd), 55,5 (OCH₃), 57,7 (C9), 44,9 (C16), 43,6 (C13), 40,9 (glicin CH₂), 40,6 (C14), 35,7 (C15), 23,4 (C10), 14,5 (észter CH₃)

N-acetylglucindihidronorkodein-etilészter (**93**) (etil-2-(2-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-acetát): Hozam: 89% o.p.: 76°C, C₂₃H₃₀N₂O₆, Mt = 430,49, HR-MS [M+H⁺]: számított 431,2177, mért 431,2165

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,70 (d, J = 8,2 Hz, H-2), 6,54 (d, J = 8,2 Hz, H-1), 4,49 (dd, J = 4,9, 3,6 Hz, H-5), 4,08 (q, J = 7,1 Hz, észter CH₂), 3,88 (d, J = 6,3 Hz, glicin CH₂), 3,84 (d, J = 5,9 Hz, glicin CH₂), 3,82 (q, J = 3,9 Hz, H-6), 3,76 (s, OCH₃), 3,20 (d, J = 16,1 Hz, CH₂ híd), 3,09 (dd, J = 6,1, 2,7 Hz, H-9), 2,93 (d, J = 16,1 Hz, CH₂ híd), 2,77 (d, J = 18,4 Hz, H-10), 2,48 – 2,40 (m, H-10), 2,30 (ddd, J = 11,5, 6,7, 2,7 Hz, H-14), 2,20 (td, J = 12,2, 3,4 Hz, H-16), 1,90 (td, J = 12,4, 4,9 Hz, H-15), 1,45 (dd, J = 11,6, 3,1 Hz, H-15), 1,39 (dt, J = 13,4, 6,8 Hz, H-8), 1,32 (qd, J = 6,8, 4,7 Hz, H-7), 1,18 (t, J = 7,1 Hz, észter CH₃), 0,89 (tt, J = 12,7, 6,4 Hz, H-8)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 171,0 (amid C=O), 170,4 (észter C=O), 147,4 (C4), 141,3 (C3), 130,6 (C12), 127,2 (C11), 118,5 (C1), 114,5 (C2), 90,7 (C5), 66,4 (C6), 60,8 (észter CH₂), 59,1 (CH₂ híd), 58,6 (C9), 55,9 (OCH₃), 45,0 (C16), 42,3 (C13), 40,9 (glicin CH₂), 38,3 (C14), 37,3 (C15), 26,1 (C7), 22,9 (C10), 19,8 (C8), 14,5 (észter CH₃)

N-acetylglucinnoroximorfon-etilészter (**94**) (etil-2-(2-((7aR)-4a,9-dihidroxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-acetát): Hozam: 95%, o.p.: 83°C, C₂₂H₂₆N₂O₇, Mt = 430,45, HR-MS [M+H⁺]: számított 431,1813, mért 431,1799

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,56 (d, J = 8,1 Hz, H-2), 6,53 (d, J = 8,1 Hz, H-1), 4,77 (s, H-5), 4,09 (qd, J = 7,1, 1,2 Hz, észter CH₂), 3,95 (d, J = 6,7 Hz, glicin CH₂), 3,80 (d, J = 5,7 Hz, glicin CH₂), 3,23 (d, J = 16,0 Hz, CH₂ híd), 3,02 – 2,89 (m, H-9, H-10, H-15, CH₂ híd), 2,59 – 2,53 (m, H-16), 2,53 – 2,51 (m, H-10), 2,43 (td, J = 12,6, 5,0 Hz, H-15), 2,08 (dt, J = 14,3, 3,2 Hz, H-7), 1,99 (td, J = 12,0, 3,7 Hz, H-16), 1,73 (ddd,

$J = 13,3, 5,2, 3,0$ Hz, H-8), 1,29 (dt, $J = 11,9, 2,7$ Hz, H-15), 1,18 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH_3),

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 209,3 (C6), 170,5 (amid C=O), 170,4 (észter C=O), 143,8 (C4), 139,8 (C3), 130,1 (C12), 123,9 (C11), 119,5 (C1), 117,6 (C2), 89,7 (C5), 70,7 (C14), 64,0 (C9), 60,9 (észter CH_2), 59,5 (CH_2 híd), 50,1 (C13), 44,2 (C16), 40,9 (glicin CH_2), 36,2 (C7), 31,6 (C8), 29,8 (C15), 24,5 (C10), 14,5 (észter CH_3)

N-acetylglucinnoroxikodon-etilészter (**95**) (etil-2-(2-((7aR)-4a-hidroxi-9-metoxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-acetát): Hozam: 96% o.p.: 81°C, $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7$, Mt = 444,48, HR-MS [$\text{M}^+ \text{H}^+$]: számított 445,1969, mért 445,1964

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 6,75 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,67 (d, $J = 8,2$ Hz, H-1), 4,85 (s, H-5), 4,09 (qd, $J = 7,1, 1,4$ Hz, észter CH_2), 3,94 (d, $J = 5,7$ Hz, glicin CH_2), 3,79 (d, $J = 5,6$ Hz, glicin CH_2), 3,78 (s, OCH_3), 3,24 (d, $J = 16,0$ Hz, CH_2 híd), 3,08 – 2,92 (m, CH_2 híd, H-7, H-10), 2,65 – 2,54 (m, H-10, H-16), 2,40 – 2,37 (m, H-15), 2,08 (dt, $J = 14,1, 3,1$ Hz, H-7), 1,97 (td, $J = 12,0, 3,7$ Hz, H-16), 1,75 (ddd, $J = 13,3, 5,1, 2,9$ Hz, H-8), 1,51 – 1,37 (m, H-8), 1,32 – 1,27 (m, H-15), 1,19 (t, $J = 7,1$ Hz, észter CH_3)

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 209,0 (C6), 170,4 (amid C=O), 170,3 (észter C=O), 142,5 (C3), 144,8 (C4), 130,3 (C12), 126,1 (C11), 119,8 (C1), 115,3 (C2), 90,1 (C5), 70,6 (C14), 60,9 (észter CH_2), 59,4 (CH_2 híd), 56,8 (OCH_3), 50,2 (C13), 44,1 (C16), 40,7 (glicin CH_2), 36,0 (C7), 31,8 (C8), 63,9 (C9), 29,4 (C15), 24,6 (C10), 14,5 (észter CH_3)

5.6.3.2. *N*-acetylglucin-haptén észterek hidrolízise

Az *N*-acetylglucin-haptén-etilésztert (0,5 mmol) alkohol (60 μl) és víz (2,5 ml) elegyében oldjuk. Az elegyet nátrium-hidroxid oldattal (1 M, 0,5 mmol) reagáltatjuk 1 órát 60 °C-on. A hidrolízist VRK-val követjük, és a kiindulási anyag feltjának eltűnését követően a pH-t 3-4 körülire állítjuk 10 %-os sósav oldattal. Szárazra párolva a kívánt vegyület sósavas sóját kapjuk.

N-acetylglucinnormorfin HCl (**96**) (2-(2-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,7,7a-tetrahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-ecetsav

hidroklorid): Hozam: 98%, o.p.: > 205°C bomlás, C₂₀H₂₂N₂O₆, Mt = 386,40, HR-MS [M+ H⁺]: számított 387,1551, mért 387,1547

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,65 (d, *J* = 8,1 Hz, H-2), 6,57 (d, *J* = 8,2 Hz, H-1), 5,63 (dd, *J* = 9,8, 2,8 Hz, H-7), 5,25 (d, *J* = 10,0 Hz, H-8), 4,96 (dd, *J* = 6,4, 1,2 Hz, H-5), 4,33 – 4,00 (m, H-6, H-9), 3,94 (s, glicin CH₂), 3,51 (d, *J* = 7,1 Hz, CH₂ híd), 3,38 (m, H-16), 3,15 (d, *J* = 20,1 Hz, H-10), 3,02 (s, H-14), 2,88 (d, H-10), 2,42 – 2,23 (m, H-15), 2,05 (d, *J* = 14,4 Hz, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 173,1 (karboxil C=O), 165,3 (amid C=O), 145,5 (C4), 138,0 (C3), 133,1 (C7), 129,2 (C12), 125,5 (C8), 123,0 (C11), 120,3 (C1), 117,7 (C2), 90,3 (C5), 65,2 (C6), 60,4 (C9), 57,6 (CH₂ híd), 47,1 (C16), 41,7 (C13), 41,2 (glicin CH₂), 38,0 (C14), 32,2 (C15), 22,0 (C10)

N-acetylglucindihidronormorfin HCl (**97**) (2-(2-((7aR)-7,9-dihidroxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 94%, o.p.: > 225°C bomlás, C₂₀H₂₄N₂O₆, Mt = 388,41, HR-MS [M+ H⁺]: számított 389,1707, mért 389,1765

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,83 (d, *J* = 8,3 Hz, H-2), 6,65 (d, *J* = 8,3 Hz, H-1), 4,74 (d, *J* = 5,6 Hz, H-5), 4,41 – 4,17 (m, H-6, H-9), 4,16 – 4,00 (m, H-6, H-9), 3,96 (d, *J* = 3,6 Hz, glicin CH₂) 3,31 (d, *J* = 14,0 Hz, H-16), 3,11 (t, *J* = 19,5 Hz, H-10), 2,89 (d, *J* = 13,5 Hz, CH₂ híd), 2,53 (m, H-14), 2,11 (s, H-15), 1,81 (d, *J* = 13,0 Hz, H-15), 1,47 (m, H-8), 0,95 (m, H-8)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 172,9 (karboxil C=O), 165,3 (amid C=O), 145,6 (C4), 138,5 (C3), 128,7 (C12), 123,2 (C11), 120,0 (C1), 117,1 (C2), 89,7 (C5), 66,1 (C6), 61,1 (C9), 57,0 (CH₂ híd), 47,8 (C16), 41,4 (glicin CH₂), 41,2 (C13), 38,2 (C14), 32,9 (C15), 25,7 (C7), 21,6 (C10), 17,9 (C8)

N-acetylglucinnorkodein HCl (**98**) (2-(2-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,7,7a-tetrahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 99%, o.p.: > 200°C bomlás, C₂₁H₂₄N₂O₆, Mt = 400,43, HR-MS [M+ H⁺]: számított 401,1707, mért 401,1704

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,80 (d, *J* = 8,3 Hz, H-2), 6,66 (d, *J* = 8,3 Hz, H-1), 5,62 (d, *J* = 9,9 Hz, H-7), 5,25 (d, *J* = 10,0 Hz, H-8), 4,97 (d, *J* = 6,3 Hz, H-5), 4,29 –

4,23 (m, H-6, H-9), 3,94 (m, CH₂ híd, glicin CH₂), 3,72 (s, OCH₃), 3,39 (m, H-16), 3,20 – 3,17 (m, H-10, H-16), 3,03 (m, H-14), 2,33 (t, $J = 13,0$ Hz, H-15), 2,04 (d, $J = 14,5$ Hz, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 173,2 (karboxil C=O), 165,4 (amid C=O), 146,3 (C4), 142,2 (C3), 133,0 (C7), 128,8 (C12), 125,2 (C8), 123,8 (C11), 120,2 (C1), 114,7 (C2), 90,7 (C5), 65,7 (C6), 60,4 (C9), 56,8 (OCH₃), 54,5 (CH₂ híd), 47,1 (C16), 41,3 (glicin CH₂), 41,9 (C13), 37,9 (C14), 32,2 (C15), 22,1 (C10)

N-acetylglucindihidronorkodein HCl (**99**) (2-(2-((7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 95%, o.p.: > 205°C bomlás, C₂₁H₂₆N₂O₆, Mt = 402,44, HR-MS [M+ H⁺]: számított 403,1864, mért 403,1852

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,87 (d, $J = 8,3$ Hz, H-2), 6,74 (d, $J = 8,4$ Hz, H-1), 4,70 (d, $J = 5,4$ Hz, H-5), 4,03 (d, $J = 4,7$ Hz, H-6), 3,94 (s, H-9, glicin CH₂), 3,76 (s, OCH₃), 3,30 (d, $J = 13,0$ Hz, H-16), 3,12 (d, $J = 19,4$ Hz, H-10), 2,97 (d, $J = 20,0$ Hz, H-10), 2,87 (d, $J = 12,9$ Hz, H-16), 2,80 – 2,74 (m, CH₂ híd), 2,49 (s, H-14), 2,11 (s, H-15), 1,79 (d, $J = 14,0$ Hz, H-15), 1,48 – 1,43 (m, H-7, H-8), 0,96 – 0,91 (m, H-8)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 172,8 (karboxil C=O), 165,6 (amid C=O), 145,8 (C4), 141,7 (C3), 127,9 (C12), 123,3 (C11), 120,0 (C1), 115,1 (C2), 89,2 (C5), 66,0 (C6), 61,5 (C9), 57,0 (OCH₃), 54,4 (CH₂ híd), 47,9 (C16), 41,4 (glicin CH₂), 40,6 (C13), 38,2 (C14), 33,9 (C15), 26,0 (C7), 21,4 (C10), 17,6 (C8)

N-acetylglucinnoroximorfon HCl (**100**) (2-(2-((7aR)-4a,9-dihidroxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 98%, o.p.: > 190°C bomlás, C₂₀H₂₂N₂O₇, Mt = 402,40, HR-MS [M+ H⁺]: számított 403,1500, mért 403,1495

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,73 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2), 6,70 (d, $J = 8,3$ Hz, H-1), 4,95 (s, H-5), 4,19 (d, $J = 16,1$ Hz, CH₂ híd), 3,99 – 3,88 (m, CH₂ híd, glicin CH₂), 3,83 (d, $J = 6,1$ Hz, H-9), 3,33 (s, H-10), 3,20 (dd, $J = 13,2, 4,9$ Hz, H-16), 3,08 (dd, $J = 20,1, 6,3$ Hz, H-10), 2,90 (td, $J = 14,8, 4,8$ Hz, H-7), 2,68 (td, $J = 13,5, 5,0$ Hz, H-15), 2,22 (dt, $J = 14,8, 3,2$ Hz, H-7), 1,99 – 1,92 (m, H-8), 1,72 – 1,59 (m, H-8, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 211,5 (C6), 172,4 (karboxil C=O), 165,2 (amid C=O), 143,2 (C4), 138,8 (C3), 127,1 (C12), 121,5 (C11), 121,1 (C1), 118,7 (C2), 89,3 (C5), 70,7 (C14), 65,0 (C9), 53,6 (CH₂ híd), 48,7 (C13), 47,0 (C16), 41,6 (glicin CH₂), 34,5 (C7), 30,4 (C8), 27,4 (C15), 23,8 (C10)

N-acetilglicin-noroxikodon HCl (**101**) (2-(2-((7aR)-4a-hidroxi-9-metoxi-7-oxo-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-acetamido)-ecetsav hidroklorid): Hozam: 93%, o.p.: > 180°C bomlás, C₂₁H₂₄N₂O₇, Mt = 416,42, HR-MS [M+ H⁺]: számított 417,1656, mért 417,1642

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 6,89 (d, *J* = 8,3 Hz, H-2), 6,81 (d, *J* = 8,4 Hz, H-1), 4,98 (s, H-5), 4,18 (d, *J* = 16,1 Hz, CH₂ híd), 3,95 (d, *J* = 16,2 Hz, CH₂ híd), 3,86 (d, *J* = 6,2 Hz, H-9), 3,79 (d, *J* = 3,6 Hz, glicin CH₂), 3,77 (s, OCH₃), 3,35 (d, *J* = 20,1 Hz, H-10), 3,22 (dd, *J* = 13,0, 4,8 Hz, H-16), 3,11 (dd, *J* = 20,1, 6,3 Hz, H-10), 2,97 – 2,83 (m, H-7, H-16), 2,69 (td, *J* = 13,5, 5,0 Hz, H-15), 2,22 (dt, *J* = 14,9, 3,3 Hz, H-7), 1,98 (ddd, *J* = 14,5, 5,3, 3,1 Hz, H-8), 1,73 – 1,66 (m, H-15), 1,63 (td, *J* = 14,6, 3,4 Hz, H-8)

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 211,3, 175,1 (karboxil C=O), 165,2 (amid C=O), (C6), 144,0 (C4), 142,8 (C3), 127,1 (C12), 122,5 (C11), 121,0 (C1), 115,6 (C2), 89,4 (C5), 70,8 (C14), 65,0 (C9), 56,5 (OCH₃), 53,8 (CH₂ híd), 48,8 (C13), 47,0 (C16), 42,8 (glicin CH₂), 34,4 (C7), 30,4 (C8), 27,3 (C15), 23,8 (C10)

5.6.4. *N*-cianoalkil-haptén prekurzorok szintézise

5.6.4.1. *N*-cianometil-haptén prekurzorok szintézise

A norvegyületeket (2 mmol) dimetilformamidban (30 ml) oldjuk, és nátrium-hidrogénkarbonát jelenlétében (10 mmol) klórecetsavnitrillel (2,2 mmol) reagáltatjuk 80 °C-on egy teljes napot. A reakciót VRK-val követjük a kiindulási folt eltűnéséig. A szervetlen sókat szűrjük, és az oldatot szárazra pároljuk. Vízben (30 ml) felvesszük a maradékot, és az oldat pH-ját 9-re állítjuk tömény ammóniával. Kloroformmal extraháljuk (3x25 ml), és az egyesített szerves fázisokat nátrium-szulfáton szárítjuk. Szűrjük, szárazra pároljuk, és szükség esetén oszlopkromatográfiásan tisztítjuk (kloroform : metanol 9:1).

N-cianometil-normorfin (**104**) (2-((7*S*,7*aR*)-7,9-dihidroxi-4,4*a*,7,7*a*-tetrahidro-1*H*-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-3-(2*H*)-il)-acetonitril): Hozam: 86%, C₁₈H₁₈N₂O₃, Mt = 310,35

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 6,66 (d, J = 8,1 Hz, H-2), 6,52 (d, J = 8,1 Hz, H-1), 5,70 (ddt, J = 9,9, 3,1, 1,5 Hz, H-7), 5,27 (dt, J = 10,0, 2,8 Hz, H-8), 4,91 (dd, J = 6,5, 1,3 Hz, H-5), 4,22 (dq, J = 5,0, 2,5 Hz, H-6), 3,61 (d, J = 16,7 Hz, CH₂ híd), 3,57 – 3,49 (m, H-9, CH₂ híd), 3,01 (d, J = 18,7 Hz, H-10), 2,76 – 2,70 (m, H-16), 2,68 (p, J = 2,9 Hz, H-14), 2,63 (td, J = 12,0, 3,6 Hz, H-16), 2,43 (dd, J = 18,7, 6,2 Hz, H-10), 2,08 (td, J = 12,4, 5,2 Hz, H-15), 1,93 (ddd, J = 12,7, 3,7, 1,8 Hz, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 145,3 (C4), 138,2 (C3), 133,3 (C7), 133,1 (C12), 130,4 (C11), 127,9 (C8), 120,3 (C1), 117,1 (C2), 116,9 (CN), 91,4 (C5), 66,6 (C6), 58,0 (C9), 44,8 (C16), 43,7 (CH₂ híd), 43,2 (C13), 40,9 (C14), 35,4 (C15), 22,0 (C10)

N-cianometil-norkodein (**105**) (2-((7*S*,7*aR*)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4*a*,7,7*a*-tetrahidro-1*H*-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-3-(2*H*)-il)-acetonitril): Hozam: 91%, C₁₉H₂₀N₂O₃, Mt = 324,37

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,63 (d, J = 8,1 Hz, H-2), 6,47 (d, J = 8,1 Hz, H-1), 5,55 (d, J = 9,4 Hz, H-7), 5,25 (dt, J = 9,8, 2,8 Hz, H-8), 4,70 (d, J = 6,0 Hz, H-5), 4,13 (tq, J = 5,6, 2,6 Hz, H-6), 3,81 (d, J = 17,1 Hz, CH₂ híd), 3,73 (m, CH₂ híd, OCH₃), 3,49 (dd, J = 6,2, 3,2 Hz, H-9), 2,97 (d, J = 18,7 Hz, H-10), 2,64 (dd, J = 12,0, 4,9 Hz, H-16), 2,58 (q, J = 2,9 Hz, H-14), 2,42 (td, J = 12,3, 3,5 Hz, H-16), 2,37 (dd, J = 18,8, 6,2 Hz, H-10), 2,02 (td, J = 12,6, 5,1 Hz, H-15), 1,71 – 1,65 (m, H-15)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 147,2 (C4), 141,2 (C3), 133,3 (C7), 130,5 (C12), 127,6 (C8), 126,7 (C11), 118,4 (C1), 118,1 (CN), 113,3 (C2), 91,8 (C5), 66,3 (C6), 56,9 (C9), 55,8 (OCH₃), 43,5 (C16), 42,8 (C13), 42,5 (CH₂ híd), 40,3 (C14), 34,9 (C15), 21,8 (C10)

N-cianometil-dihidronorkodein (**106**) (2-((7*S*,7*aR*)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4*a*,5,6,7,7*a*-hexahidro-1*H*-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-3-(2*H*)-il)-acetonitril): Hozam: 89%, C₁₉H₂₂N₂O₃, Mt = 326,39

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,70 (d, J = 8,2 Hz, H-2), 6,53 (d, J = 8,1 Hz, H-1), 4,47 (d, J = 5,0 Hz, H-5), 3,82 (ddt, J = 10,2, 8,2, 5,2 Hz, H-6), 3,79 – 3,73 (m, OCH₃,

CH₂ híd), 3,67 (d, *J* = 17,0 Hz, CH₂ híd), 3,17 (dd, *J* = 5,8, 2,8 Hz, H-9), 2,91 (d, *J* = 18,6 Hz, H-10), 2,54 (dd, *J* = 11,8, 4,8 Hz, H-16), 2,42 (dd, *J* = 18,6, 5,8 Hz, H-10), 2,26 (td, *J* = 12,1, 3,7 Hz, H-16), 2,14 (ddd, *J* = 11,8, 6,4, 2,8 Hz, H-14), 1,82 (td, *J* = 12,4, 5,1 Hz, H-15), 1,50 (ddd, *J* = 12,5, 3,7, 1,7 Hz, H-15), 1,41 – 1,27 (m, H-7, H-8), 1,26 – 1,14 (m, H-7), 0,91 (tt, *J* = 11,8, 6,1 Hz, H-8)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146,9 (C4), 141,0 (C3), 129,8 (C12), 126,3 (C11), 118,1 (C1), 117,9 (CN), 114,1 (C2), 89,9 (C5), 65,6 (C6), 58,1 (C9), 56,2 (OCH₃), 43,7 (C16), 42,5 (N-CH₂), 41,6 (C13), 38,2 (C14), 36,4 (C15), 25,9 (C7), 21,4 (C10), 18,9 (C8),

N-cianometil-noroximorfon-etilén-ketál (107) (2-((7aR)-4a,9-dihidroxi-1,2,4,4a,5,6-hexahidrospiro-[4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-7,2'-[1,3]-dioxolán]-3-(7aH)-il)-acetonitril): Hozam: 92%, C₂₀H₂₂N₂O₅, Mt = 370,40

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,54 (d, *J* = 8,0 Hz, H-2), 6,44 (d, *J* = 8,0 Hz, H-1), 4,33 (s, H-5), 4,04 (td, *J* = 7,0, 4,6 Hz, ketál CH₂), 3,90 (q, *J* = 6,8 Hz, ketál CH₂), 3,83 (d, *J* = 17,2 Hz, CH₂ híd), 3,76 (dd, *J* = 14,0, 7,0 Hz, ketál CH₂), 3,73 – 3,66 (m, ketál CH₂, CH₂ híd), 3,13 (d, *J* = 18,3 Hz, H-10), 2,94 (d, *J* = 5,0 Hz, H-9), 2,55 (dd, *J* = 18,4, 5,3 Hz, H-10), 2,31 – 2,16 (m, H-7, H-16), 2,04 (dt, *J* = 11,9, 6,9 Hz, H-8), 1,44 – 1,32 (m, H-8), 1,24 (d, *J* = 6,0 Hz, H-7)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 144,7 (C4), 138,9 (C3), 130,1 (C12), 122,2 (C11), 117,9 (CN), 117,4 (C1), 116,6 (C2), 108,1 (C6), 92,1 (C5), 69,7 (C14), 65,7 (ketál CH₂), 63,9 (ketál CH₂), 63,2 (C9), 46,8 (C13), 43,2 (C16), 42,4 (CH₂ híd), 29,0 (C7), 28,3 (C8), 23,6 (C10)

N-cianometil-noroxikodon-etilén-ketál (108) (2-((7aR)-4a-hidroxi-9-metoxi-1,2,4,4a,5,6-hexahidrospiro-[4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-7,2'-[1,3]-dioxolán]-3-(7aH)-il)-acetonitril): Hozam: 91%, C₂₁H₂₄N₂O₅, Mt = 384,43

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,75 (d, *J* = 8,2 Hz, H-2), 6,58 (d, *J* = 8,1 Hz, H-1), 4,38 (s, H-5), 4,07 – 3,99 (m, ketál CH₂), 3,86 – 3,67 (m, ketál CH₂, CH₂ híd), 3,77 (s, OCH₃), 3,18 (d, *J* = 18,3 Hz, H-10), 2,97 (d, *J* = 5,0 Hz, H-9), 2,58 (dd, *J* = 18,5, 5,2 Hz, H-10), 2,50 (m, H-16), 2,27 – 2,18 (m, H-7, H-16), 2,09 – 2,00 (m, H-8), 1,44 – 1,33 (m, H-8), 1,24 (d, *J* = 9,3 Hz, H-7)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 145,7 (C4), 141,7 (C3), 130,3 (C12), 124,5 (C11), 117,9 (CN), 117,8 (C1), 113,9 (C2), 108,3 (C6), 92,5 (C5), 69,5 (C14), 65,6 (ketál CH₂), 64,0 (ketál CH₂), 63,1 (C9), 56,3 (OCH₃), 46,9 (C13), 42,9 (C16), 42,5 (CH₂ híd), 29,5 (C7), 28,4 (C8), 23,6 (C10)

5.6.4.2. *N*-cianoetil-haptén prekurzorok szintézise

A norvegyületeket (2 mmol) abszolút etanolban (30 ml) oldjuk, és trietil-amin savmegkötő jelenlétében (10 mmol) akrilnitrillel (2,2 mmol) refluxáltatjuk 3 órát. A reakciót VRK-val követjük a kiindulási folt eltűnéséig. Szükség esetén még egy részlet akrilnitrilt adunk az oldathoz. Az oldatot szárazra pároljuk, és ha kell oszlopkromatográfiásan tisztítjuk (kloroform : metanol 9:1).

N-cianoetil-normorfin (**109**) (3-((7*S*,7*aR*)-7,9-dihidroxi-4,4*a*,7,7*a*-tetrahydro-1*H*-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-3-(2*H*)-il)-propánnitril): Hozam: 88%, C₁₉H₂₀N₂O₃, Mt = 324,37

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,46 (d, J = 8,1 Hz, H-2), 6,34 (d, J = 8,0 Hz, H-1), 5,54 (d, J = 9,8 Hz, H-7), 5,22 (dt, J = 9,8, 2,8 Hz, H-8), 4,68 (d, J = 6,0 Hz, H-5), 4,12 (m, H-6), 3,54 – 3,31 (m, H-9), 2,76 (m, H-10, N-CH₂), 2,71 – 2,57 (m, H-16, N-CH₂, CH₂-CN), 2,55 – 2,52 (m, H-14), 2,34 – 2,27 (m, H-10, H-16), 1,97 (td, J = 12,6, 4,9 Hz, H-15), 1,63 (d, J = 12,4 Hz, H-15)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 146,3 (C4), 138,5 (C3), 133,6 (C7), 130,9 (C12), 128,2 (C8), 125,2 (C11), 120,1 (CN), 118,5 (C1), 116,4 (C2), 91,5 (C5), 66,4 (C6), 56,6 (C9), 50,0 (N-CH₂), 43,9 (C13), 43,3 (C16), 40,4 (C14), 35,4 (C15), 22,2 (C10), 16,5 (CH₂-CN)

N-cianoetil-norkodein (**110**) (3-((7*S*,7*aR*)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4*a*,7,7*a*-tetrahydro-1*H*-4,12-metanobenzofuro-[3,2-*e*]-izokinolin-3-(2*H*)-il)-propánnitril): Hozam: 94%, C₂₀H₂₂N₂O₃, Mt = 338,40

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,61 (d, J = 8,1 Hz, H-2), 6,46 (d, J = 8,0 Hz, H-1), 5,54 (dddd, J = 9,8, 3,3, 2,1, 1,3 Hz, H-7), 5,23 (dt, J = 9,7, 2,8 Hz, H-8), 4,69 (dd, J = 6,0, 1,3 Hz, H-5), 4,13 (tq, J = 5,6, 2,6 Hz, H-6), 3,72 (s, OCH₃), 3,47 – 3,40 (m, H-9), 2,83 – 2,72 (m, H-10, N-CH₂), 2,70 – 2,60 (m, H-16, N-CH₂, CH₂-CN), 2,55 (m, H-14), 2,38 – 2,25 (m, H-10, H-16), 1,98 (td, J = 12,6, 5,0 Hz, H-15), 1,67 – 1,60 (m, H-15)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 147,2 (C4), 141,0 (C3), 133,3 (C7), 131,0 (C12), 127,7 (C8), 126,8 (C11), 120,1 (CN), 118,0 (C1), 112,8 (C2), 91,8 (C5), 66,1 (C6), 56,1 (C9), 55,7 (OCH₃), 49,8 (N-CH₂), 43,4 (C16), 41,7 (C13), 40,0 (C14), 35,1 (C15), 21,9 (C10), 16,3 (CH₂-CN)

N-cianoetil-dihidronorkodein (**111**) (3-((7S,7aR)-7-hidroxi-9-metoxi-4,4a,5,6,7,7a-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-3-(2H)-il)-propánitril): Hozam: 92%, C₂₀H₂₄N₂O₃, Mt = 340,42

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,69 (d, J = 8,1 Hz, H-2), 6,53 (d, J = 8,2 Hz, H-1), 4,46 (dd, J = 17,2, 4,8 Hz, H-5), 3,86 – 3,79 (m, H-6), 3,76 (s, OCH₃), 3,12 – 3,07 (m, H-9), 2,78 – 2,70 (m, N-CH₂, H-10), 2,65 – 2,60 (m, CH₂-CN), 2,59 – 2,52 (m, N-CH₂, H-10), 2,39 (dd, J = 18,5, 5,9 Hz, H-10), 2,16 – 2,07 (m, H-14, H-16), 1,79 (td, J = 12,5, 5,0 Hz, H-15), 1,49 – 1,28 (m, H-7, H-8- H-15), 1,16 (ddd, J = 16,0, 13,5, 6,9 Hz, H-7), 0,88 (ddd, J = 18,0, 13,0, 6,6 Hz, H-8)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 146,7 (C4), 140,7 (C3), 130,2 (C12), 127,0 (C11), 120,1 (CN), 117,8 (C1), 113,6 (C2), 90,0 (C5), 65,4 (C6), 57,2 (C9), 49,7 (N-CH₂), 43,4 (C16), 42,2 (C13), 37,9 (C14), 36,7 (C15), 25,5 (C7), 21,3 (C10), 19,1 (C8), 16,2 (CH₂-CN)

N-cianoetil-noroximorfon-etilén-ketál (**112**) (3-((7aR)-4a,9-dihidroxi-1,2,4,4a,5,6-hexahidrospiro-[4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-7,2'-[1,3]-dioxolán]-3-(7aH)-il)-propánitril): Hozam: 97%, C₂₁H₂₄N₂O₅, Mt = 384,43

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 6,54 (d, J = 8,0 Hz, H-2), 6,45 (d, J = 8,1 Hz, H-1), 4,35 (s, H-5), 4,05 (td, J = 6,9, 4,5 Hz, ketál CH₂), 3,91 (q, J = 6,8 Hz, ketál CH₂), 3,77 (q, J = 7,0 Hz, ketál CH₂), 3,70 (td, J = 6,5, 4,6 Hz, ketál CH₂), 2,92 (d, J = 18,3 Hz, H-10), 2,87 (d, J = 5,4 Hz, H-9), 2,77 – 2,68 (m, N-CH₂, CH₂-CN), 2,71 – 2,61 (m, N-CH₂), 2,58 – 2,51 (m, H-10, H-16), 2,14 (td, J = 12,4, 4,9 Hz, H-7), 2,09 – 1,99 (m, H-8, H-16), 1,45 – 1,35 (m, H-8), 1,25 – 1,18 (m, H-7)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 144,5 (C4), 138,9 (C3), 130,3 (C12), 122,7 (C11), 119,8 (CN), 117,4 (C1), 116,6 (C2), 108,2 (C6), 92,3 (C5), 69,2 (C14), 65,7 (ketál CH₂), 64,0 (ketál CH₂) 62,7 (C9), 48,8 (N-CH₂), 47,3 (C13), 42,2 (C16), 30,5 (C7), 28,7 (C8), 23,3 (C10), 16,0 (CH₂-CN)

N-cianoetil-noroxikodon-etilén-ketál (113) (3-((7aR)-4a-hidroxi-9-metoxi-1,2,4,4a,5,6-hexahidrospiro-[4,12-metanobenzofuro-[3,2-e]-izokinolin-7,2'-[1,3]-dioxolán]-3-(7aH)-il)-propánnitril): Hozam: 97%, C₂₂H₂₆N₂O₅, Mt = 398,18

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,74 (d, *J* = 8,2 Hz, H-2), 6,58 (d, *J* = 8,2 Hz, H-1), 4,40 (s, H-5), 4,06 – 4,00 (m, ketál CH₂), 3,85 – 3,76 (m, ketál CH₂), 3,76 (s, OCH₃), 3,70 (q, *J* = 5,8 Hz, ketál CH₂), 2,96 (d, *J* = 18,4 Hz, H-10), 2,90 (d, *J* = 5,3 Hz, H-9), 2,78 – 2,52 (m, H-10, H-16, N-CH₂, CH₂-CN), 2,15 (td, *J* = 12,5, 5,0 Hz, H-7), 2,03 (tt, *J* = 12,1, 3,2 Hz, H-8), 1,46 – 1,33 (m, H-8), 1,22 (d, *J* = 18,4 Hz, H-7)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 145,6 (C4), 141,8 (C3), 130,3 (C12), 124,7 (C11), 119,7 (CN), 117,6 (C1), 113,8 (C2), 108,2 (C6), 92,4 (C5), 69,3 (C14), 65,5 (ketál CH₂), 63,9 (ketál CH₂), 62,5 (C9), 56,1 (OCH₃), 48,7 (N-CH₂), 47,1 (C13), 42,2 (C16), 30,4 (C7), 28,5 (C8), 23,2 (C10), 16,0 (CH₂-CN)

6. Következtetések

Figyelembe véve az elmúlt negyven év eredményeit a kábítószer elleni vakcinák fejlesztésében, új, potenciális haptén típusú molekulák szintézisét terveztük meg. Ehhez a morfin és társvegyületeinek funkcionálására volt szükség, amit többféle módon valósítottunk meg.

A C3-as helyzetben fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó vegyületeket *O*-alkileztük bróm-, illetve klórecetsav-etilészterrel, majd pedig hidrolizáltuk a molekulákat, hogy kapcsolásra alkalmas karboxilcsoportot alakítsunk ki. Ezzel a szakirodalomban eddig nem ismert 6 új vegyületet állítottunk elő.

A nitrogéneken keresztül funkcionizált vegyületek szintéziséhez először szükségünk volt a megfelelő *nor*-származékokra. Ezt a klórszénsav-vinilészterrel végzett *N*-demetilés módosításán keresztül értük el, amihez klórszénsav- α -klóretilészter reagenst használtunk. Ezzel a módszerrel, jó hozammal és tisztasággal jutottunk a kívánt kiindulási molekulákhoz.

Ezt követően brómecetsav-etilészterrel, illetve etil-akriláttal végzett *N*-alkilezési reakciókon keresztül jutottunk a metilén-, illetve etilén-hídon keresztül kapcsolt karboxil-származékok észtereihez. A 3-*O*-alkil-haptén észterekhez hasonlóan hidrolízissel nyertük a szabad savakat. A 24 előállított vegyület közül 20-at a kutatócsoportunk publikált először.

A kábítószer vakcinák és az immunanalitikai meghatározásokhoz feltétlenül szükséges a funkcionizálással előállított haptének kapcsolása hordozómolekulákhoz, jelen esetben fehérjékhez. Ezt modellezendő glicin-etilésztert választottunk, hogy a fehérjekémiában általánosan használt kapcsolószerekkel végzett reakciókat tanulmányozzuk. Sajnos a próbareakciók nem hoztak sikert, így alternatív megoldást kellett találni erre a problémára.

A metilén-hidas származékok esetében egy lépésben lehetett megvalósítani a funkcionizálást és konjugációt. Az így nyert *N*-acetilglicin-haptén-etilészterek hidrolízisével szintén szabad karboxilcsoportot tartalmazó, haptén-típusú vegyületekhez jutottunk.

Noha a haptén és fehérje (aminosav) közötti konjugációt nem tudtuk megvalósítani, az összes előállított vegyület szerkezetfelfedését elvégeztük, amivel értékes adatbázist nyertünk a funkcionizált morfin-származékok spektrális adataira vonatkozóan. Az

acetylglucosamin-származékok esetében további lehetőségek kínálkoznak hordozómolekulával való konjugációra, mivel alkalmas molekuláknak számítanak szilárdfázisú fehérjekapcsolási reakciókhoz.

Ugyan a dolgozat fő témája és célkitűzése új típusú haptén molekulák előállítása, amiket immunizálásra lehet felhasználni, nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a vegyületek továbbra is a major analgetikumok csoportjába tartozó morfinszármazékok. Ahogyan azt az irodalmi áttekintésben a ciano-vegyületek esetében láthattuk, a nitrogén metil szubsztituensének változtatásával lényegesen befolyásolhatjuk a vegyületek hatását. Így az általunk előállított molekuláknál is számítani kell hatásbeli változásra, ami miatt a legpotensebb származékokat (normorfin, dihidronormorfin, noroximorfon, noroxikodon) elküldtük *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokra, amik jelenleg is zajlanak.

7. Összefoglalás

A legkülönbözőbb szerek használata az emberiséggel egyidős. Az, hogy társadalmilag mit tartunk még elfogadottnak, állandóan változott az évezredek során, és ez a folyamat még napjainkban is tart (pl. kannabisz legalizálásának kérdése). Viszont a legkomolyabb társadalmi, gazdasági és egyéni problémát okozó abúzusos szerek, élükön a morfinnal és heroinnal valószínűleg sose fognak a nyugati típusú társadalmak elfogadott rekreációs célú szereit közé tartozni. Ennek ellenére a kábítószerkereskedelelem virágkorát éli, és a globalizálódó világunkban egyre könnyebben és gyorsabban lehet hozzájutni ezekhez az illegális szerekhez. A függőséggel küszködők számára így még fontosabb újabb alternatív terápia kidolgozása.

A 2000-es években újra a tudományos figyelem középpontjába került a már négy évtizede megfogalmazódott kábítószer vakcináció kérdése. Ráadásul ezek az immunológiai aktív vegyületek nem csak a védekezés terén mutatkoznak ígéretesnek, hanem a kábítószer biológiai közegből való kvantitatív meghatározásában is.

Doktori munkám során 54 olyan vegyületet állítottunk elő, és azonosítottuk a szerkezetüket, amik a morfin-haptén kutatásokban potenciális jelöltek lehetnek későbbi vizsgálatok során (3-*O*-karboximetil-morfin, oximorfon, naloxon és naltrexon, illetve ezek etilészterei; *N*-karboximetil-, valamint etil-normorfin, dihidronormorfin, norkodein, dihidronorkodein, noroximorfon, noroxikodon és etilészterei; továbbá *N*-acetilglicin-normorfin, dihidronormorfin, norkodein, dihidronorkodein, noroximorfon, noroxikodon és mindegyik etilésztere; végezetül *N*-cianometil- és etil-normorfin, norkodein, dihidronorkodein, noroximorfon-etilénketál és noroxikodon-etilénketál). Ezek közül 44-et elsőként szintetizáltunk, míg az 1D és 2D NMR mérések alapján történt pontos asszignációkat pár kivételtől eltekintve magam végeztem.

A legnagyobb abúzus potenciállal rendelkező származékokat (normorfin, dihidronormorfin, noroximorfon, noroxikodon) biológiai vizsgálatokra is elküldtük, ezek az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok jelenleg is tartanak.

Fontosnak tartom megjegyezni, hogy noha nem a saját doktori munkámat képezik, viszont az intézetünkben folyó egyéb kutatások keretén belül a ciano-vegyületek kivételével az összes termék protonálódási makro- és mikroállandóit meghatározták. Ezzel az általunk előállított vegyületek szerkezetbeni sorsáról és pH-függő részecskeeloszlásukról kaphatunk fontos információt. [69, 70]

8. Summary

Use of the most various substances is as old as mankind. The judgement of society is continuously changing about what is illicit and nowadays the question of legalization is more actual than ever (eg. cannabis). However legalizing morphine or heroin for recreational use in Western cultures is very unlikely, as these substances cause the most harm in every aspect of life (social, economical, individual). Despite of these the golden age of drug trafficking is already present because of our globalizing world. Buy and sell is easier, faster and more secure than ever in history. Thus helping the drug addicts with new possibility of therapies is a major task.

The four decades old concept of drug vaccination has gained scientific spotlight in the 2000s again. The immunological active molecules have proved their ability to fight against drug abuse and in addition they can be used for quantitative determination of illegal substances in biological samples.

During my PhD work 54 molecules were synthesized and characterized, which could be proven as potential morphine hapten derivatives during *in vitro* and *in vivo* experiments (3-*O*-carboxymethyl-morphine, oxymorphone, naloxone és naltrexone, and their ethyl esters; *N*-carboxymethyl-, and ethyl-normorphine, dihydronormorphine, norcodeine, dihydronorcodeine, noroxymorphone, noroxycodone and their ethyl ester derivatives; *N*-acetylglycine- normorphine, dihydronormorphine, norcodeine, dihydronorcodeine, noroxymorphone, noroxycodone and their ethyl esters; *N*-cyanomethyl- and ethyl- normorphine, norcodeine, dihydronorcodeine, noroxymorphone ethylene ketal, noroxycodone ethylene ketal). 44 of these were synthesized and the exact structures were determined for almost all of them for the first time using 1D and 2D NMR measurements.

The *in vitro* and *in vivo* tests of the compounds with the highest abuse potential (normorphine, dihydronormorphine, noroxymorphone, noroxycodone) are in progress.

I would like to mention that although determining the protonation macro- and microconstants was not part of my PhD work, these physicochemical parameters were measured by my colleagues. Thus gaining information about the fate in human body and the pH dependent distribution of our synthesized compounds is also possible. [69, 70]

9. Irodalomjegyzék

- [1] Olson ME, Eubanks LM, Janda KD. (2019) Chemical Interventions for the Opioid Crisis: Key Advances and Remaining Challenges. *J. Am. Chem. Soc.*, 141: 1798-1806.
- [2] Hosztafi S. (2011) A heroin addikció. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 81: 173-184.
- [3] UNODC. World Drug Report 2020. Elérhető online: <https://www.unodc.org/wdr2020/> (utolsó megtekintés 2021.02.25.)
- [4] Kabay J. (1932) Process for obtaining opium alkaloids from dried poppy straw. US Patent 2,009,181
- [5] Szász Gy, Takácsné Novák K, Fülöp F, Noszál B. Opioid analgetikumok és antagonistáik. In: Fülöp F, Noszál B, Szász Gy, Takácsné Novák K (szerk.), *Gyógyszerészi kémia*. Semelweis Kiadó, Budapest, 2010: 177-196.
- [6] Füst Zs. Opioid agonisták és opioid antagonisták. Kábítószer-abúzus. Élvezeti szerek. In: Gyires K, Füst Zs (szerk.), *A farmakológia alapjai*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2011: 472-549.
- [7] Köteles I. (2018) Kábítószer- és egyéb függőségek kialakulása és kezelési stratégiái. *Gyógyszerészet*, 62: 726-734.
- [8] American Psychiatric Association (szerk.) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, Fifth Edition. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013.
- [9] Hosztafi S, Füst Zs. (2014) A heroinaddikció gyógyítása. *Neuropsychofarmacologia Hungarica*, XVI. évf. 3. szám
- [10] Szendrei K, Nagy G. (2004) Drogfogyasztás és kezelése. *Farmakoterápia*. 4. rész. Immunológiai eszközök – új terápiás lehetőségek a drogfüggők kezelésében? *Gyógyszerészet*, 48: 531-542.
- [11] Kinsey B. (2014) Vaccines against drugs of abuse: Where are we now? *Adv. Vaccines*, 2: 106-117.
- [12] Torres O, Alving C, Jacobson A, Rice K, Matyas G. Practical Considerations for the Development of Vaccines Against Drugs of Abuse. In: Montoya ID (szerk.), *Biologics to Treat Substance Use Disorders: Vaccines, Monoclonal Antibodies, and Enzymes*. Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016: 397–424.

- [13] Bremer PT, Schlosburg JE, Banks ML, Steele FF, Zhou B, Poklis JL, Janda KD. (2017) Development of a Clinically Viable Heroin Vaccine. *J. Am. Chem. Soc.*, 139: 8601-8611.
- [14] Anton B, Salazar A, Flores A, Matus M, Marin R, Hernandez JA, Leff P. (2009) Vaccines against morphine/heroin and its use as effective medicatio for preventing relapse to opiate addictive behaviors. *Human Vaccines*, 5: 214-229.
- [15] Bonese K, Wainer BH, Fitch FW, Rothberg RM. (1974) Changes in self-administration by a Rhesus monkey after morphine immunization. *Nature*, 252: 708-710.
- [16] Landsteiner K, Jacobs J. (1935) Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.*, 61: 643-656.
- [17] Marczal G, Balázs A, Szőke É. Toxikus növényi vegyületek, növényi mérgezések. In: Szőke É. (szerk.), *Gyógynövénytől a gyógyításig*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2019: 486.
- [18] Rubio L, Lores M, Garcia-Jares C. (2020) Monitoring of Natural Pigments in Henna and Jagua Tattoos for Fake Detection, *Cosmetics*, 7: 74.
- [19] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Hapten". *Encyclopedia Britannica*, 21 Nov. 2018, <https://www.britannica.com/science/hapten>. (hozzáférve 2021.06.24.)
- [20] Morvay J, Tóth D. (1977) Gyógyszerek radio-immunanalitikai (RIA) meghatározása. *Gyógyszerészet*, 21: 131-137.
- [21] Tóth G. (1982) Az immunanalitika korszerű módszerei. *Magyar Kémikusok Lapja*, 37: 549-557.
- [22] Morvay J, Németh P. (1981) Gyógyszerek enzim-immun-analízise (EIA). *Gyógyszerészet*, 25: 401-408.
- [23] Ekins R. (1985) Roles of serum thyroxine-binding proteins and maternal thyroid hormones in fetal development. *Lancet*, 1: 1129-1132.
- [24] Spector S, Parker C. (1974) Opioid alkaloid specific antibodies. US Patent 3,822,245
- [25] Spector S, Parker CW. (1970) Morphine : Radioimmunoassay. *Science*, 168: 1347-1348.
- [26] Rubinstein KE, Ullman EF. (1980) Inhibitible enzyme amplification assay. USA Patent 4,203,802

- [27] Buechler KF. (1997) Opiate derivatives and protein and polypeptide opiate derivative conjugates and labels. US Patent 5,610,283
- [28] Heiman DF, Raden DS, Dubler RE. (1986) Immunoassay for opiate alkaloids and their metabolites, tracers, immunogens and antibodies. US Patent 4,939,264
- [29] Schneider RS. (1975) Normorphine derivatives bonded to proteins. USA Patent 3,884,898
- [30] Gintzler AR, Mohacsi E, Spector S. (1976) Radioimmunoassay for the simultaneous determination of morphine and codeine. *Eur. J. Pharmacology*, 38: 149-156.
- [31] Findlay JWA, Butz RF, Jones EC. (1981) Relationships between immunogen structure and antisera specificity in the narcotic alkaloid series. *Clinical Chemistry*, 27: 1524-1535.
- [32] Findlay JWA, Butz RF, Welch RM. (1976) A codeine radioimmunoassay exhibiting insignificant cross-reactivity with morphine. *Life Sciences*, 19: 389-394.
- [33] Herndon BL, Paull K, Ringle DA. (1976) Comparison of immunogenicity of opiates bound to protein at different sites on the molecule: N-carboxy morphine-BSA. *Pharmacol. Research Communications*, 8: 325-335.
- [34] Morris B, Robinson J, Piall E, Aherne G, Marks V. (1975) Development of radioimmunoassay for morphine having minimal cross-reactivity with codeine. *J. Endocrinology*, 64: 6-7.
- [35] Metcalf MD, Aceto MD, Harris LS, Woods JH, Traynor JR, Coop A, May EL. (2008) The influence of esters and carboxylic acids as the N-substituent of opioids. Part 1: Benzomorphans. *Bioorg. Medicinal Chemistry*, 16 869-873.
- [36] Wainer BH, Fitch FW, Rothberg RM, Fried J. (1972) Morphine-3-succinyl-bovine serum albumin: an immunogenic hapten-protein conjugate. *Science*, 176: 1143-1145.
- [37] Wainer BH, Fitch FW, Rothberg RM, Fried J. (1972) The structure of morphine monohemisuccinate. *Science*, 178: 647-648.
- [38] Wainer BH, Fitch FW, Fried J, Rothberg RM. (1973) Measurement of the specificities of antibodies to morphine-6-hemisuccinyl-BSA by competitive inhibition of ^{14}C -morphine binding. *J. Immunol.*, 110: 667-673.

- [39] Wainer BH, Fitch FW, Fried J, Rothberg RM. (1974) Immunochemical studies of opioids: Specificities of antibodies against of codeine and hydromorphone. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 3: 155-170.
- [40] Simon EJ, Dole W, Hiller J. (1972) Coupling of a new active morphine derivative to sepharose for affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 1835-1837.
- [41] Jacobson AE, Rice KC, Reden J, Lupinacci L, Brossi A, Streaty RA, Klee WA. (1979) Paradoxical effects of N-cyanoalkyl substituents upon the activities of several classes of opioids. *J. Med. Chem.*, 22: 328-331.
- [42] May EL, Jacobson AE, Mattson MV, Traynor JR, Woods JH, Harris LS, Bowman ER, Aceto MD. (2000) Synthesis and in vitro and in vivo activity of (-)-(1R, 5R, 9R)- and (+)-(1S, 5S, 9S)-N-alkenyl-, N-alkynyl-, and N-cyanoalkyl-5,9-dimethyl-2'-hydroxy-6,7-benzomorphan homologues. *J. Med. Chem.*, 43: 5030-5036.
- [43] Beike J, Blaschke G, Mertz A, Köhler H, Brinkmann B. (1998) A specific immunoassay for the determination of morphine and its glucuronides in human blood. *Int. J. Legal. Med.*, 112: 8-14.
- [44] Pravetoni M, Le Naour M, Harmon TM, Tucker AM, Portoghese PS, Pentel PR. (2012) An oxycodone conjugate vaccine elicits drug-specific antibodies that reduce oxycodone distribution to brain and hot-plate analgesia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 341: 225-232.
- [45] Pravetoni M, Raleigh MD, Le Naour M, Tucker AM, Harmon TM, Jones JM, Birnbaum AK, Portoghese PS, Pentel PR. (2012) Co-administration of morphine and oxycodone vaccines reduces the distribution of 6-monoacetylmorphine and oxycodone to brain in rats. *Vaccine*, 30: 4617-4624.
- [46] Pravetoni M, Le Naour M, Tucker AM, Hawley TM, Portoghese PS, Pentel PR. (2013) Reduced antinociception of opioids in rats and mice by vaccination with immunogens containing oxycodone and hydrocodone haptens. *J. Med. Chem.*, 56: 915-923.
- [47] Anton B, Leff P. (2006) A novel bivalent morphine/heroin vaccine that prevents relapse to heroin addiction in rodents. *Vaccine*, 24: 3232-3240.
- [48] Stowe GN, Vendruscolo LF, Edwards S, Schlosburg JE, Misra KK, Schulteis G, Mayorov AV, Zakhari JS, Koob GF, Janda KD. (2011) A vaccine strategy that induces protective immunity against heroin. *J. Med. Chem.*, 54: 5195-5204.

- [49] Stowe GN, Schlosburg JE, Vendruscolo LF, Edwards S, Misra KK, Schulteis G, Zakhari JS, Koob GF, Janda KD. (2011) Developing a vaccine against multiple psychoactive targets: A case study of heroin. *CNS & Neurological disorders- Drug Targets*, 10: 865-875.
- [50] Schlosburg JE, Vendruscolo LF, Bremer PT, Lockner JW, Wade CL, Nunes AAK, Stowe GN, Edwards S, Janda KD, Koob GF. (2013) Dynamic vaccine blocks relapse to compulsive intake of heroin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110: 9036-9041.
- [51] Bremer PT, Janda KT. (2012) Investigating the effects of a hydrolytically stable hapten and a Th1 adjuvant on heroin vaccine performance. *J. Med. Chem.*, 55: 10776-10780.
- [52] Li F, Cheng K, Antoline JFG, Iyer MR, Matyas GR, Torres OB, Jalah R, Beck Z, Alving CR, Parrish DA, Deschamps JR, Jacobson AE, Rice KC. (2014) Synthesis and immunological effects of heroin vaccines. *Org. Biomol. Chem.*, 12: 7211-7232.
- [53] Matyas G, Mayorov AV, Rice KC, Jacobson AE, Cheng K, Iyer MR, Li F, Beck Z, Janda KD, Alving CR. (2013) Liposomes containing monophosphoryl lipid A: A potent adjuvant system for inducing antibodies to heroin hapten analogs. *Vaccine*, 31: 2802-2810.
- [54] Matyas G, Rice KC, Cheng K, Li F, Antoline JFG, Iyer MR, Jacobson AE, Mayorov AV, Beck Z, Torres OB, Alving CR. (2014) Facial recognition of heroin vaccine opiates : Type 1 cross-reactivities of antibodies induced by hydrolytically stable haptenic surrogates of heroin, 6-acetylmorphine, and morphine. *Vaccine*, 32: 1473-1479.
- [55] Torres OB, Jalah R, Rice KC, Li F, Antoline JFG, Iyer MR, Jacobson AE, Boutaghou MN, Alving CR, Matyas GR. (2014) Characterization and optimization of heroin hapten – BSA conjugates : Method development for the synthesis of reproducible hapten-based vaccines. *Anal. Bioanal. Chem.*, 406: 5927-5937.
- [56] Olofson RA, Martz JT, Senet JP, Piteau M, Malfroot T. (1984) A new reagent for the selective high yield *N*-dealkylation of tertiary amines: Improved synthesis of naltrexone and nalbuphine. *J. Org. Chem.*, 49: 2081-2082.
- [57] Ninan A, Sainsbury M. (1992) An improved synthesis of noroxymorphone. *Tetrahedron*, 48: 6709-6716.
- [58] Olofson RA, Schnur RC, Bunes LA. (1975) *N*-Dealkylation of tertiary amines. US Patent 3 905 981

- [59] Olofson RA, Pepe JP. (1979) *N*-dealkylation of *N*-alkyl-14-hydroxymorphinans and derivatives thereof. US 4 141 897
- [60] Olofson RA, Pepe JP. (1979) *N*-alkyl-14-hydroxymorphinans and derivatives. US 4 161 597
- [61] Blumberg H, Pachter IJ, Matossian Z. (1967) 14-Hydroxydihydronormorphinone derivatives. US 3 332 950
- [62] Thavaneswaran S, McCamley K, Scammells PJ. (2006) *N*-Demethylation of Alkaloids. Nat. Prod. Comm., 10: 885-897.
- [63] Hosztafi S, Berényi S, Tóth G, Makleit S. (1992) Morphine Alkaloids Part 114. A Stereohomogenous Synthesis of *N*-Demethyl-*N*-Substituted-14-Hydroxydihydromorphines. Monatsh. Chem., 123: 435-441.
- [64] Hosztafi S, Simon C, Makleit S. (1992) Synthesis of *N*-Demethyl-*N*-Substituted Dihydroisomorphine and Dihydroisocodeine Derivatives. Synth. Commun. 22: 1673-1682.
- [65] Tóth G, Ötvös F, Hosztafi S. (1993) Tritium Labelling of Naltrindole, a δ -Receptor-Selective Opioid Antagonist via 1-Bromonaltrexone. Helv. Chim. Acta, 76: 2274-2278.
- [66] Olofson RA, Schnur RC, Bunes L, Pepe JP. (1977) Selective *N*-dealkylation of tertiary amines with ninyl chloroformate: an improved synthesis of naloxone. Tetrahedron Lett., 18: 1567-1570.
- [67] Olofson RA, Schnur RC. (1977) Value of the ninyloxycarbonyl unit in hydroxyl protection: application to the synthesis of nalorphine. Tetrahedron Lett. 18: 1571-1574.
- [68] Olofson RA, Pepe JP. (1977) An efficient synthesis of *N*-cyclobutylmethylnoroxymorphone from thebaine. Tetrahedron Lett. 18: 1575-1578.
- [69] Köteles I, Mazák K, Tóth G, Tűz B, Hosztafi S. (2020) Synthesis of Potential Haptens with Morphine Skeleton and Determination of Protonation Constants. Molecules, 17: 4009.
- [70] Köteles I, Mazák K, Tóth G, Horváth P, Kiss E, Tűz B, Hosztafi S. (2021) Synthesis of 3-*O*-Carboxyalkyl Morphine Derivatives and Characterization of Their Acid-Base Properties. Chem. Biodiversity, 18: e2100135

10. Saját publikációk jegyzéke

Köteles I, Mazák K, Tóth G, Horváth P, Kiss E, Tűz B, Hosztafi S. (2021) Synthesis of 3-*O*-Carboxyalkyl Morphine Derivatives and Characterization of Their Acid-Base Properties. *Chem. Biodiversity*, 18: e2100135

Köteles I, Mazák K, Tóth G, Tűz B, Hosztafi S. (2020) Synthesis of Potential Haptens with Morphine Skeleton and Determination of Protonation Constants. *Molecules*, 17: 4009.

Köteles I, Hosztafi S. (2019) Vaccines against Drug Abuse: Morphine-Hapten Design and Synthesis. *Proceedings*, 41: 48.

Köteles I. (2018) Kábítószer- és egyéb függőségek kialakulása és kezelési stratégiái. *Gyógyszerészet*, 62: 726-734.

A doktori disszertációhoz nem kapcsolódó egyéb közlemények

Fejős I, Tóth G, Várnai B, Szabó ZI, **Köteles I**, Malanga M, Béni Sz. (2021) Enantioseparation of solriamfetol and its major impurity phenylalaninol by capillary electrophoresis using sulfated gamma cyclodextrin. *Electrophoresis*, 0: 1-8.

Köteles I, Foroughbakhshfasaei M, Dobó M, Ádám M, Boldizsár I; Szabó ZI, Tóth G. (2020) Determination of the Enantiomeric Purity of Solriamfetol by High-Performance Liquid Chromatography in Polar Organic Mode Using Polysaccharide-Type Chiral Stationary Phases. *Chromatographia*, 83: 909-913.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Hosztafi Sándornak, hogy végig segítette munkámat, kezdve a TDK-val, folytatva a szakdolgozat készítésével, most pedig a doktori disszertációval. A támogatásának hála ízelítőt kaphattam a morfin-kémia végtelennek tűnő világába, aminek hihetetlen mennyiségű tudással rendelkező szakembere.

Szeretném köszönetemet kifejezni a Gyógyszerészi Kémiai Intézet összes munkatársának. Szívem szerint egyesével kiemelnék mindenkit, de féltő, hogy hosszabb lenne, mint a doktori disszertációm egésze. Így mindenkinek szól, mikor hálát adok a szakmai, szellemi, lelki és mindennapi támogatásért.

Köszönet illeti meg szüleimet, hogy nevelésük, segítségük és támogatásuk révén azzá válhattam, és ott tarthatok az életben, aki és ahol vagyok. Egy egész élet is kevés lenne rá, hogy mindezt megháláljam, és viszonzzam nekik.

Köszönettel tartozom feleségemnek, hogy ahogyan az életünk minden területén és pillanatában, úgy ezen a szakaszon is végig velem volt és rendületlenül támogatott. A végeredmény lehet, hogy az enyém, de a munka most is, mint mindig közös. Egy újabb fejezet zárul le életünk regényében, és kíváncsian várom a következőt.

Végezetül pedig szeretném nagymamám emlékének ajánlani a disszertációm. Köszönök mindent, Babi mama!