

# Morfinvázas 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

## 1. Bevezetés

A kábítószerkereskedelem világszerte virágkorát éli, és noha egyre nagyobb számban jelennek meg újabb szerek, a legtöbb egyéni, társadalmi és anyagi kárt az opioid szerek okozzák (morfin, heroin).

A legelterjedtebb módszer a morfin- és heroinfüggőség kezelésére a metadon terápia. Ennek lényege, hogy a hosszabb felezési idővel és így enyhébb elvonási tünetekkel rendelkező metadonra szoktatjuk át a beteget, majd pedig fokozatosan csökkentjük a dózist a szer teljes elhagyásáig. A terápia egyik problémája, hogy sok múlik a beteg együttműködésén. Ha a beteg időközben újra az illegális szerhez nyúl, az egész addigi elért eredmény kárbavész. Ráadásul a visszaesés sem ritka, ami gyakran a beteg halálával végződik. A kezelés során a toleranciaszint rövid időn belül visszaáll a fiziológiás szintre, és a legutóbb használt dózis ismételt alkalmazásakor a morfinszármazékok legsúlyosabb mellékhatása, a légzésbénulás végez az egyénnel.

Már az 1970-es években megfogalmazódott a központi idegrendszert „fertőző” függőség elleni vakcináció gondolata. A legtöbb szervezetbe kerülő

vegyület nem rendelkezik antigén tulajdonságokkal, viszont megfelelő szerkezetmódosításokkal azzá tehető. Ehhez hapténekké kell alakítani őket. Definíció szerint a haptén önmagában nem immunogén molekula, viszont rendelkezik olyan funkciós csoporttal (karboxil, amino), ami lehetőséget biztosít egy antigén jellegű hordozómolekulához (pl. fehérje) való kötéshez. Az így kialakított konjugátum, és a haptén, mint epitóp ellen az immunsejtek antitesteket termelnek, és legközelebb a haptén anyavegyülete ellen is fellépnek. Az antitest-kábítószer makromolekula már nem lesz képes bejutni az agyba, és ezzel megakadályozhatók mind a hatások, mind pedig a mellékhatások.

## **2. Célkitűzések**

Célunk volt, hogy a szakirodalomban már ismert hapténeken kívül újabb származékokat állítsunk elő, és ezek szerkezetét megfelelő módszerekkel (NMR, MS) igazoljuk is. A kísérleteket főleg a 3-*O*-alkil- és az *N*-alkil-származékok szintézise felé fordítottuk.

### 3. Módszerek

A szükséges vegyületek esetében *N*-demetilezést végeztünk, majd pedig szubsztitúciós, illetve addíciós reakciókkal módosítottuk a szerkezetet. A továbbalakítást észterhidrolízissel és redukcióval próbáltuk megvalósítani. Tanulmányoztuk a vegyületek aminosavval való kapcsolásának lehetőségét is. Az így nyert származékok a haptén és farmakológiai vizsgálatok szempontjából mind ígéretesnek számítanak.

Az előállított molekulák szerkezetét és tisztaságát vékonyréteg kromatográfiával, NMR, MS és olvadáspont mérésekkel igazoltuk.

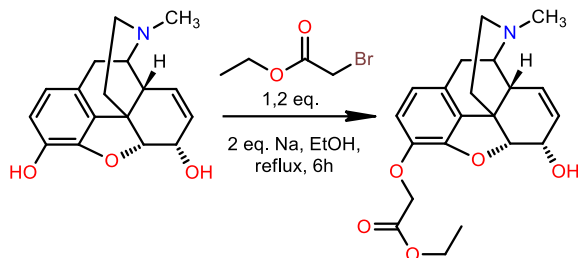
### 4. Eredmények

#### 4.1. 3-*O*-karboxialkil-haptén észterek szintézise

A célul kitűzött vegyületek közül a C3 hidroxilcsoportot tartalmazó vegyületek szerkezetmódosítása tekinthető egyszerűbb feladatnak, tekintettel arra, hogy nem szükséges előzetes reakciót végeznünk. Erre a célra négy kiindulási vegyületet választottunk: morfin, oximorfon, naloxon, naltrexon.

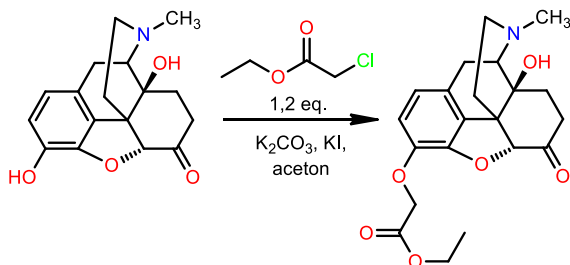
Fém nátriumot abszolút etanolban oldottunk, majd pedig morfin sósavas sót adtunk hozzá, hogy a morfin

nátrium sójához jussunk. Az oldatot brómcetsav-  
etilészterrel 6 órát refluxáltattuk. Az átalakulást VRK-val  
követtük. A reakciót feldolgozva 3-*O*-  
karboximetilmorfin-etilészterhez jutottunk. (1. ábra)



**1. ábra** 3-*O*-karboximetilmorfin-etilészter előállítása

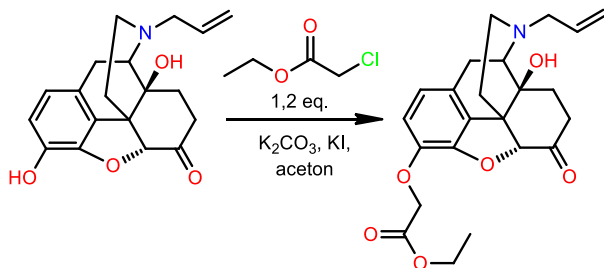
Az oximorfont acetonban oldva, klórcetsav-  
etilészterrel reagáltatva kálium-karbonát savmegkötő és  
kálium-jodid jelenlétében 3-*O*-karboximetiloximorfon-  
etilészterhez jutunk. (2. ábra)



**2. ábra** 3-*O*-karboximetiloximorfon-etilészter előállítás

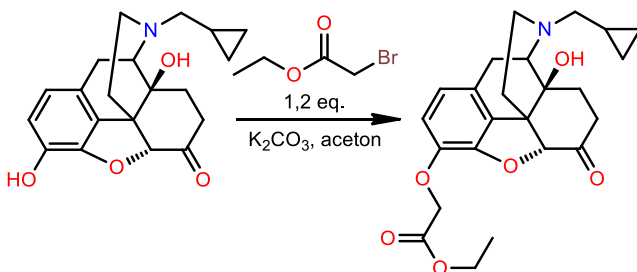
A naloxon származék előállítását megegyezik az  
oximorfonéval. A naloxon bázist acetonban oldjuk, majd

pedig klórecetsav-etilészterrel reagáltatjuk kálium-karbonát és kálium-jodid jelenlétében. A termék nem más, mint 3-*O*-karboximetilnaloxon-etilészter. (3. ábra)



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

A naltrexonnal is hasonlóképpen jártunk el. A termék 3-*O*-karboximetilnaltrexon-etilészter lett. (4. ábra)

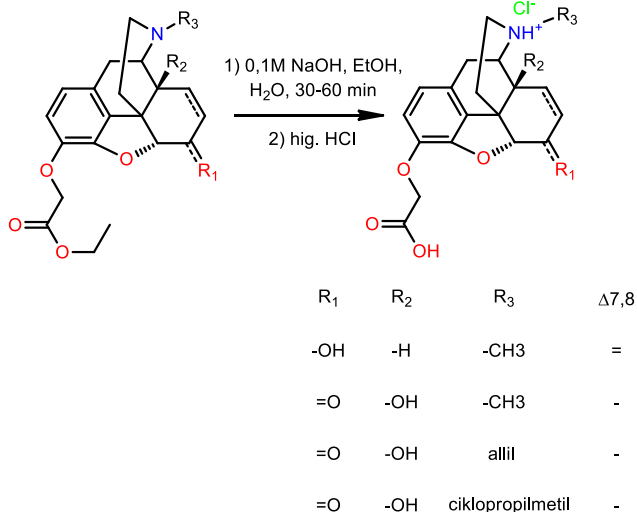


**4. ábra** 3-*O*-karboximetilnaltrexon-etilészter előállítása

#### 4.2. 3-*O*-alkil-haptén észterek hidrolízise

Ezt követően mindegyik észtert hidrolizáltuk, ugyanazt a protokollt követve. Minimális mennyiségű etanolt használva koszolvensként nátrium-hidroxid vizes oldattal hidrolizáltuk az észtereket. Az átalakulást

követően hígított sósavval 2-3-ra állítottuk a pH-t, és a feldolgozást követően mindegyik esetben a karboxilcsoportot tartalmazó származék sósav sójához jutottunk. (5. ábra)



5. ábra A 3-O-alkil-haptén-észterek hidrolízise

### 4.3. N-demetilezési 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, dihidronormorfin, norkodein, dihidronorkodein, noroximorfon, noroxikodon.

A kodein és dihidrokodein *N*-demetilezését diklóretánban végeztük klórszénsav- $\alpha$ -klóretilészterrel. A köztitermék karbamátot metanolban melegítettük, hogy a norkodein, illetve dihidronorkodein sósavas sóját kapjuk.

A (dihidro)morfín esetében a 3,6-diacetil származékból kell kiindulni. A klórszénsav- $\alpha$ -klóretilészterrel végzett reakciót követően a 3,6-diacetil(dihidro)normorfín sósavas sójához jutunk. Savas hidrolízist és feldolgozást követően nyerjük a (dihidro)normorfint.

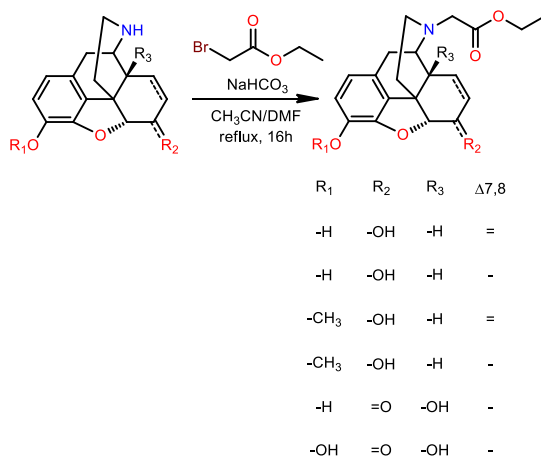
A 3,14-di-*O*-acetiloximorfon és a 14-*O*-acetiloxikodon *N*-demetilezését követően szintén a norszármazékok sósavas sóját kapjuk, melyeket sósavval hidrolizálva nyerjük a noroximorfont és noroxikodont. A 14-*O*-acetil védésre azért van szükség, hogy megakadályozzuk a hidroxilcsoporton lejátszódó egyéb 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 történik.



#### 4.4. *N*-karboxialkil-haptén észterek előállítása

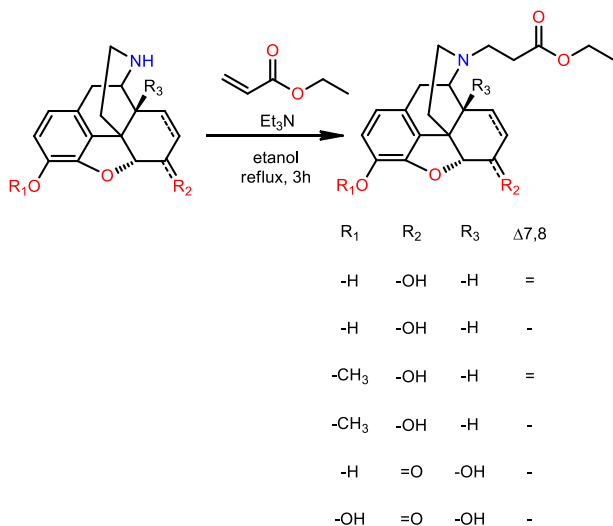
A haptén készítés következő lépése az *N*-alkilezés. Ehhez az összekötő szénlánc hosszától függően kell megválasztani a reagenst.

Metilénhid esetében brómecetsav-etilésztert használtunk. A kiindulási norvegyület oldhatóságát figyelembe véve dimetilformamid vagy acetonitril 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. (6. ábra)



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

Az etilénhidas származékok szintéziséhez etilakrilátot használtunk. A norvegyületeket etanolban oldottuk és trietilamin jelenlétében 3 órát refluxáltattuk a reagenssel. Az átalakulás minden esetben teljes volt, és az *N*-karboxietilnorvegyületek etilésztereit kiváló hozammal állítottuk elő. (7. ábra)



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

#### 4.5. *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.

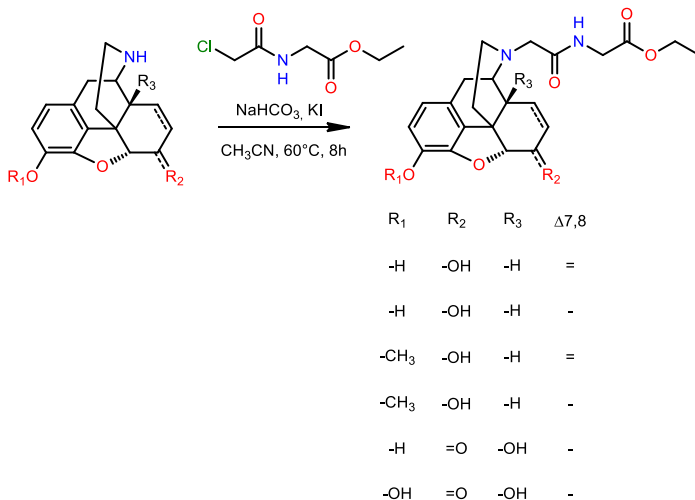
#### 4.6. Kapcsolási kísérletek

Szerettük volna tanulmányozni a szabad karboxilcsoporttal rendelkező *N*-alkil-haptének fehérjékkel való kapcsolási reakcióit. Ennek modellezésére először glicin-etilésztert használtunk. A konjugációhoz a fehérje kémiában általánosan használt reagenseket alkalmaztuk, úgy mint *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid (DCCI), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid és 1-hidroxibenzotriazol (HOBT). Sajnos a kivitelezett reakciók – ha működtek egyáltalán – nagyon alacsony hozammal mentek, a reakciókat nagyon nehéz volt feldolgozni, és sokszor nem is a kívánt terméket eredményezték. Emiatt a glicin-származékok előállítására más reakcióutat kerestünk.

#### 4.7. *N*-acetilglicin-haptén észterek előállítása

A metilénhidat tartalmazó vegyületek esetében a retroszintetikus analízis felfedte, hogy a kívánt termékek előállítására *N*-klóracetilglicin-etilészter reagensre van szükség. A norvegyületeket acetonitrilben vagy dimetilformamidban oldottuk, és nátrium-hidrogénkarbonát, illetve kálium-jodid jelenlétében melegítettük *N*-klóracetilglicin-etilészterrel. Az

átalakulást követően feldolgoztuk az elegyet, és így a kívánt *N*-acetilglicinnorvegyületek etilészteréhez jutottunk. (8. ábra)



**8. ábra** *N*-acetilglicin-haptén észterek előállítás

#### 4.8. *N*-acetilglicinhaptén észterek hidrolízise

Az észtereket a már bemutatásra került módon hidrolizáltuk.

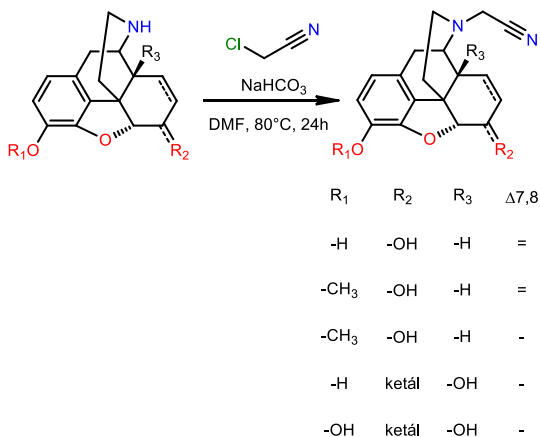
#### 4.9. Etilénketál-védőcsoport

A noroximorfon és noroxikodon esetében a C6 helyzetben etilénketál-védőcsoportot vezetünk be, hogy a későbbi redukciós lépésben megvédjük a vegyületeinket. A reakció végeztével, savas hidrolízissel a védőcsoport könnyen eltávolítható.

Mindkét vegyület esetében benzolos oldatot készítettünk, és *p*-toluolszulfonsav jelenlétében etilén-glikollal reagáltattuk. A termékek – noroximorfon-etilénketál és noroxikodon-etilénketál – kristályos anyagok lettek.

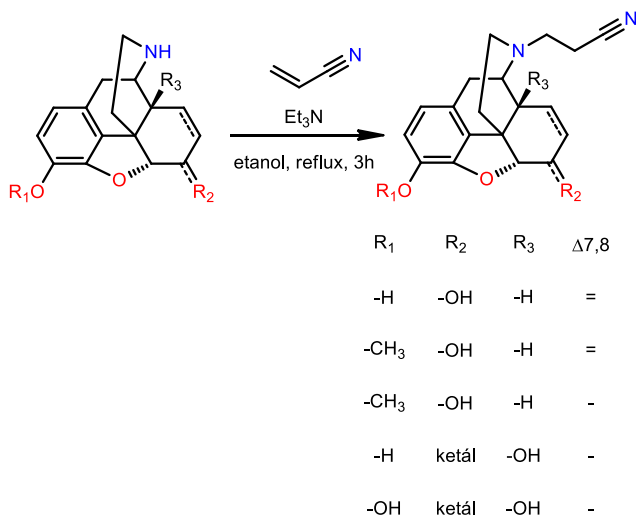
#### 4.10. *N*-cianoalkil-haptének szintézise

Akárcsak a karboxialkil származékok esetében, így itt is különböző hosszúságú összekötőláncokat építettünk be a molekulákba. A metilén-hidas sorozathoz a norvegyületeket dimetil-formamidban oldottuk, és nátrium-hidrogénkarbonát jelenlétében klórecetsavnitrilrel végeztük a reakciót. Ezzel az *N*-cianometilnorvegyületekhez jutottunk. (9. ábra)



9. ábra *N*-cianometil-haptének előállítása

Az etilénhidas származékokat akrilnitril reagens alkalmazásával sikerült előállítani. Etanolban oldva végeztük a reakciót trietilamin jelenlétében. Termékként az *N*-( $\beta$ -cianoetil)-norvegyületeket kaptuk (10. ábra)



10. ábra *N*-( $\beta$ -cianoetil)-haptének előállítása

#### 4.11. *N*-cianoalkil-haptének redukciója

Ahhoz, hogy a kívánt aminokhoz jussunk a megfelelő *N*-cianoalkilnorvegyületet redukálnunk kell. Kísérletet tettünk lítium-alumíniumhidrides reakcióra. Ezt dietil-éterben, tetrahydrofuranban vagy dioxánban végezhetjük, viszont molekuláink túlnyomó része nem oldódott be, így a reakció sikertelen volt.

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

## **5. Következtetések**

Figyelembe véve az elmúlt negyven év eredményeit a kábítószer elleni vakcinák fejlesztésében, mint alternatív leszoktatási módok új, potenciális haptén típusú molekulák szintézisét terveztük meg. Ehhez a morfin és társvegyületeinek funkcionálására volt szükségünk, 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 ismet 6 új vegyületet állítottunk elő.

A nitrogéneken keresztül funkcionizált vegyületek előállításához először szükségünk volt a megfelelő norszámazéokra. Ezt a klórszénsav-vinilészterrel végzett *N*-demetilézés módosításán keresztül értük el, amihez klórszénsav- $\alpha$ -klóretilészter reagenst használtunk. Ezzel a módszerrel jó hozammal és tisztasággal jutottunk a kívánt kiindulási molekulákhoz.

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

A kábítószervakcinákhoz és az immunanalitikai meghatározásokhoz feltétlenül szükséges a funkcionizálással előállított haptének kapcsolása hordozómolekulákhoz, jelen esetben fehérjékhez. Ezt modellezendő glicin-etilésztert választottunk, hogy a fehérje kémiában 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 funkcionálizálást 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 volt lehetőségünk megvalósítani, az összes előállított vegyület szerkezetfelderítését elvégeztük, amivel értékes adatbázist nyertünk a funkcionálizált morfin-származékok spektrális adataira vonatkozóan. Az acetilglicin-származékok esetében további lehetőségek kínálkoznak a kapcsolási reakciók megvalósítására, 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. 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 éppen zajlanak.

## **6. Saját publikációk jegyzéke**

### **6.1. A disszertáció alapját képező publikációk**

**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.

### **6.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk**

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.