

**MORFINVÁZAS MŰ ÉS DELTA SZELEKTÍV OPIOID  
LIGANDUMOK TRÍCIÁLÁSA**

Egyetemi doktori értekezés

Készítette:  
Ötvös Ferenc

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONTJA  
"B" szintű Izotóp Laboratóriuma

Szeged  
1992

## TARTALOMJEGYZÉK

1.	Bevezetés.....	1
2.	Irodalmi áttekintés .....	4
2.1.	Nagy moláris aktivitású, tríciummal jelzett vegyületek előállításával kapcsolatban fellépő problémák áttekintése .....	4
2.2.	Morfinvázias alkaloidok radioaktív jelölése .....	9
3.	Anyagok és módszerek.....	27
4.	Kísérleti eredmények .....	31
4.1.	Izomorfin származékok előállítása triciált formában.....	31
4.1.1.	A 6-amino-izomorfin és a 6-amino-14-hidroxi-izomorfin triciálása .....	32
4.1.2.	A savamidok előállítása a jelölt morfinszármazékokból.....	34
4.2.	Triciált ciprodin előállítása.....	39
4.2.1.	1-bróm-ciprodin enzimatiszintézise.....	40
4.2.2.	1-bróm-ciprodin triciálása.....	42
4.3.	Metilcsoportban triciált morfin előállítása .....	43
4.3.1.	A metil-jodid triciált prekursorának előállítása .....	45
4.3.2.	A normorfin N-metilezése triciált metil-jodiddal .....	47
4.4.	Naltrindol jelölése .....	50
4.4.1.	A brómozott prekursorok szintézise .....	50
4.4.1.1.	5'-bróm-naltrindol előállítása .....	51
4.4.1.2.	1,5'-dibróm-naltrindol előállítása.....	51
4.4.2.	Vékonyréteg-kromatográfiás körülmények kidolgozása a naltrindol és brómozott prekursorainak elválasztására.....	58
4.4.3.	A brómozott prekursorok triciálása.....	60
4.4.3.1.	5'-jelzett-naltrindol .....	60
4.4.3.2.	1,5'-jelzett-naltrindol .....	61
4.4.4.	Izomerizációs jelenség kimutatása radioaktív nyomjelzéssel .....	62
5.	Eredmények értékelése.....	65
6.	Összefoglalás.....	72
7.	Irodalomjegyzék.....	75

## 1. BEVEZETÉS

A fájdalomérzet megszüntetése és pszichés, illetőleg ilyen eredetű szervi problémák feloldása az emberiség ősidők óta fennálló igénye, amelyet különböző szerek alkalmazásával - ennek deviáns megnyilvánulásaként az örömrészlet kábítószerrel való kiváltásával - mindmáig elérni, egyszersmind hatékonyabbá tenni próbál. Ezen hatások közvetítéséért fiziológiásan elsősorban az úgynevezett ópiát- vagy opioid receptorok felelősek, melyek elnevezésüket az éretlen máktokból nyert, különböző alkaloidokból álló ópium révén kapták, amely egyike az említett célok eléréséhez legrégebben használt szereknek. Ezek, valamint az időközben felfedezett és szintetizált újabb anyagok azonban előnyeik mellett számos kellemetlen mellékhatással is járnak (hozzászokás, függőség). A nemkívánatos mellékhatások kiküszöbölése, amelyek között "előkelő" helyen áll a napjainkban egyre elterjedtebbé váló kábítószerfogyasztás okozta függőség, a modern orvostudomány eddig még nem kielégítően megoldott problémája.

A biológiai és biokémiai vizsgálatok alapján az opioid receptorok jelenlegi ismereteink szerint három csoportba sorolhatók, de az általuk közvetített biológiai hatások külön-külön nem teljesen ismertek. Ennek oka az, hogy a receptorfehérjék teljes szerkezetét (aminosav szekvencia, s az ebből következő másodlagos- és harmadlagos-, végül az információátvitelben fontos negyedleges szerkezet) még nem derítették fel, bár ennek ismeretében lehetne legcél tudatosabban - és leggyorsabban - kifejleszteni olyan új fájdalomcsillapító gyógyszereket, amelyek pozitív és negatív hatásai előre kiszámíthatók, s így az utóbbiak mindinkább elkerülhetők lesznek. Mivel az opioid receptorok koncentrációja az egyes szövetekben igen kicsi (pl. az agyban maximum néhány száz fmol/mg fehérje), emellett az említett szerkezetfelderítéshez az egyes receptorfehérjéket tiszta formában kellene izolálni, így biológiai-biokémiai viselkedésüket más módon kell vizsgálni.

Az 1970-es években kidolgozták a biokémiai receptorkötési tesztet, amely az egyes receptortípusokhoz megfelelő szelektivitással kötődő radioaktív ligandumok alkalmazásával elegendően érzékeny módszernek bizonyult ahhoz, hogy a receptor-ligandum kölcsönhatást - legalább makroszkópos jellemzőkkel - kielégítő részletességgel leírják. Adott receptortípusnál a kötődés szelektivitása, affinitása, a kiváltott agonista vagy antagonistá hatás a ligandumok szerkezetétől függ, tehát ezek megfelelő módosítása az első lépés a receptor-ligandum komplex kialakulásának és további sorsának megértésében.

#### Célkitűzés:

Csoportunk az MTA SzBK "B" szintű Izotóp Laboratóriumában 1978. óta foglalkozik opioid ligandumok szintézisével és radioaktív jelölésével. Munkánk egy összetett kísérleti program része, amelynek célja egyrészt az ópiát-receptorok működési mechanizmusának felderítése, illetve ennek alapján az eddigieknél jobb, lehetőleg mellékhatásoktól mentes fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztése.

Ennek érdekében munkánkat az MTA Központi Kémiai Kutatóintézete Peptidkémiai Kutatócsoportjának, az Alkaloida Vegyészeti Gyár és az MTA SzBK Biokémiai Intézete Opioid Receptor Munkacsoportjának vegyészeivel és biokémikusaival együttműködve végezzük.

Célul tűztük ki olyan, nagy moláris aktivitású radioaktív opioid ligandumok szintézisét, amelyek eleget tesznek a következő feltételeknek:

- a.) Nagy affinitással kötődnek a receptorhoz, és hatásukat tekintve van közöttük agonista (biológiai hatást kiváltó) és antagonistá (hatást felfüggesztő) is.
- b.) Nagy receptor altípus-specifitással rendelkeznek.

Megbízható és pontos biológiai hatásvizsgálatok végzéséhez a radioaktívan jelölt vegyületnek lehetőleg minél nagyobb moláris aktivitásúnak kell lennie, és a jelzést a tesztek körülményei között stabil helyzetben kell tartalmaznia. Emellett fontos követelmény, hogy a radioizotóp ne zavarja a biológiai választ. E feltételeket legjobban a tríciummal való jelölés elégíti ki, hiszen kémiaiilag stabil helyzetben levő hidrogént gyakorlatilag minden biológiailag aktív vegyület tartalmaz, és nem túl hosszú felezési ideje miatt a jelzett vegyületek kedvező moláris aktivitással rendelkeznek.

Ezek az elvárások olyan új szintézisutak kidolgozását igénylik, amelyekkel a kapott vegyületek a továbbiakban hatékony biológiai kutatások eszközei lesznek.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Nagy moláris aktivitású, tríciummal jelzett vegyületek előállításával kapcsolatban fellépő problémák áttekintése

A biológiai vizsgálatokhoz használt radioaktív vegyületek előállításánál cél:

- nagy moláris aktivitás elérése,
- specifikusan jelzett termékek szintézise.

A trícium bevitele a molekulába történhet izotópcserével vagy kémiai szintézissel. Az elemi tríciumgázzal végzett trícíálás speciális vákuumkészüléket igényel, mivel az illékony radioaktív anyag kezelése eltér a szokványos gázokkal végzett műveletektől. Eleinte csupán az urántrícid formában történő tárolás és a Toeplitz-pumpával való mozgatás volt a fejlesztés tárgya ezen a téren [1,2]. Újabban speciális, saválló acélból készült készüléket is kifejlesztettek az elemi tríciumgázzal végzett munkákhoz, amely törhetetlensége mellett azt az előnyt is nyújtja, hogy a trícium cseppfolyós héliummal kifagyasztható és összegyűjthető a rendszer tetszőleges pontjában [3,4].

Az izotópcseré legegyszerűbben ún. random jelöléssel történhet, amelyben a jelölendő anyagot pl. szobahőmérsékleten tríciumgázzal hozzuk érintkezésbe, és bizonyos idő eltelte után az anyag radioaktívvá válik (Wilzbach reakció) [5]. Másik módszer a trícium *in situ* előállítása [6] a rendszerben. Utóbbi eljárás azonban már az ún. "forróatom-kémiához" vezet, amely alkalmasabb reakcióutaknak és a molekulák reaktivitásának tanulmányozására, mint preparatív célra [7]. Az eljárás további hátránya a preparatív munkákban, hogy a termékek sokfélesége általában bonyolult

tisztítási eljárásokat igényel, ami jelentős anyagveszteséggel jár, emellett a termék moláris aktivitása eléggé kicsi [5,7].

Wilzbach eljárásának javítására heterogén katalitikus eljárásokat dolgoztak ki a trícium kicserélődéssel történő bevitelére [8,9], amelyek (a katalizátortól és a szubsztráttól függően) helyzet-specifikusabb jelölést és nagyobb moláris aktivitást eredményeztek. A molekulánkénti 0,5 trícium atom bevitelt azonban még így is csak kivételes esetekben sikerült meghaladni [8,10], és az eredmény nagymértékben függött a szubsztrát minőségétől. A területen elért eredményekről azóta számos szerző számolt be [10,11,12,13].

A nagyobb moláris aktivitás elérhető a molekulába beépített trícium atomok számának növelésével, illetve általában követendő cél az elméletileg lehetséges értékek elérése. Ha a jelölő atom(ok) helye (és így száma) rögzített, ez egyúttal megszabja az illető vegyület maximális moláris aktivitását is. A receptorkutatás területén általános igény, hogy a tríciumot tartalmazó vegyületek legalább 740 GBq/mmol (20 Ci/mmol) moláris aktivitásúak legyenek, és sok esetben meghatározott helyen kell jelölni a molekulát. Ez molekulánként egy jelző atom esetében már elég közel áll az elméletileg lehetséges 1077 GBq/mmol (29,12 Ci/mmol) értékhez, ezért a tríciummal való jelöléskor mindenképpen törekedni kell az elméletileg lehetséges legnagyobb moláris aktivitás elérésére.

Belátható, hogy ezek a követelmények nem teljesíthetők az előzőekben említett jelölési módszerekkel, ezért más úton, kémiai szintézissel célszerű kialakítani az aktív végterméket. A szokásos prekursorok - telítetlen kettős kötést, halogén szubsztituenseket tartalmazó vegyületek - katalitikus telítése, illetve dehalogénezése biztosítja a nagy moláris aktivitás elérését és a trícium bevitelét meghatározott helyzetbe. Általában azonban a kémiai reakció mellett izotópcseré is történik, amely néhány esetben emelheti, de gyakrabban csökkenti az elméletileg elérhető moláris aktivitást. A reakciósebességbeli

különbség határozza meg a kémiai reakcióban, illetőleg izotópcserével kapott termékek eloszlását, így a reakcióidő helyes megválasztásával növelhetjük a kívánt termék mennyiségét.

A termékeloszlást megváltoztathatjuk a katalizátor előtelítésével is [14,15]. A reakciókörülmények (az oldószer fajtája és minősége, a tríciumgáz nyomása, a hőmérséklet, a katalizátor minősége és mennyisége) határozzák meg a beépülés mértékét, tehát ezek gondos mérlegelése, szisztematikus vizsgálata szükséges a lehetőségek szerint legnagyobb moláris aktivitású, specifikusan jelzett vegyületek előállításához. Lényeges a kiindulási anyag minősége és mennyisége is. A vegyületekben az izotópcserére legalkalmasabbak a benzil helyzetű és az oxocsoport melletti hidrogének, illetve különlegesen nagymértékű lehet katalitikus körülmények között az úgynevezett allil- és vinil-csere [16]. Meglepő módon azonban Oehlke és munkatársai [17] az *N*-acetyl-dijód-tirozin-amid deuterálásánál nem találtak deutériumot a tirozin  $\beta$ -metilén csoportjában, ami mutatja az izotópcsere reakciók érzékenységét a szubsztrát szerkezetére. Néhány jelentősebb biogén amin izotópcserével végzett jelölése azonban közel kvantitatívan játszódott le [10]. A telítést befolyásolja a kettős kötés elhelyezkedése a molekulában, pl. hosszú szénláncú alifás vegyületek jelölésekor problémát okozhat a kettőskötés-vándorlás [2,18]. *N*-propargil-morfinszármazékok alkalmas reakcióidő és Lindlar-katalizátor választásával részlegesen telíthetők *N*-allil származékká [19,20,21]. Újabban telítetlen aminosavakat szilárd fázisban trícíáltak oldószer nélkül, 100-140 °C hőmérsékleten [22]. A dehalogénezés sebessége a klór, bróm, jód sorrendben nő, és elérhető, hogy egy molekulán belül a klór szubsztituens mellől főként a bróm vagy a jód "kiredukálódjon". A dehalogénezést a szabad halogénhidrogén savak inhibálják [9,10], ezért ezeket valamilyen bázissal szükséges közömbösíteni. A bázis általában tercier amin, leggyakrabban trietil-amin. Ugyanakkor



megállapították, hogy a dehalogénezési reakciót és a (nem kívánatos) nemspecifikus cserét a trietil-ammonium ion, jodid ion és a tioglikolsav gátolja [14]. Kéntartalmú peptidek trícíálásakor a reakciósebesség és a moláris aktivitás erősen csökken [15]. Lényeges a katalizátor/szubsztrát arány is [10,23].

Igen fontosak azok a vizsgálatok, amelyeket az oldószer izotópcseré reakciói vonatkozásában végeztek, ezek ugyanis általában csökkentik a jelzett vegyület moláris aktivitását és a jelölés specificitását, tehát nemkívánatos jelenségek. A szisztematikus vizsgálatokat nehezíti, hogy meglehetősen kevés kutató foglalkozik ezekkel a kérdésekkel, így a legtöbb tapasztalatot konkrét vegyületek előállítása során szerezték. Nem hagyható figyelmen kívül az sem, hogy a radioaktív munka drága és az egészségre ártalmas. Ennek ellenére, főként kelet-európai szerzők néhány általánosítható eredményről számoltak be.

Sokáig általánosan elfogadott nézet volt, hogy protikus oldószer használatakor a trícíálás során a katalizátor felületén gyors csere történik, különösen savas oldatban [8], így a tríciumgáz moláris aktivitása lecsökken, ami maga után vonja a termék moláris aktivitásának a csökkenését is. Ezért általában célszerű mozgékony hidrogént nem tartalmazó oldószereket alkalmazni. Ez a magyarázat azonban túlzottan leegyszerűsített, és néhány kísérleti tény is jelzi, hogy nem kielégítő. Lehet közel elméleti moláris aktivitást elérni metanolban [24], ugyanakkor tetrahidrofuranban is kaptak igen kis moláris aktivitású terméket telítetlen aminosavak trícíálásakor. Hasonló példák találhatóak a dehalogénezésnél is.

Az ellentétes eredmények késztettek több szerzőt részletes vizsgálatok végzésére az oldószer, a szubsztrát és a tríciumgáz között lejátszódó izotópcseré-reakciókkal kapcsolatban.

Márton és Kovács [25] dehidroaminosav származékok trícíálásakor metanol és etilacetát oldószerekben az előzőkhöz hasonló eredményeket kaptak. A reakcióidő növelése csökkentette a termék moláris aktivitását. Megállapították, hogy a katalitikus csere és a telítés a trícíálás során nem egymástól független reakciók, hanem párhuzamosan játszódnak le: a tríciumgáz a katalizátor felületén hígul az izotópkicserélődés, mint mellékreakció miatt. Bizonyították a közvetlen hidrogén-átmenetet is az oldószerről a trícíálendő anyagra: ha hidrogént használtak a reakcióban és az oldószer (etilacetát) volt trícíált, a trícium megjelent a hidrogéngázban és a termékben is, de a hidrogéngázban az aktivitás meglehetősen kicsi volt.

Hanus és munkatársai [26] megállapítása szerint a különböző aprotikus oldószerekbe beépült trícium elenyésző része származik a Wilzbach reakcióból, amennyiben az oldószerek igen tiszták. Egészen kis mennyiségű szennyezés jelenléte azonban sokszorosára növelheti a kicserélődést. Katalizátorok jelenlétében minden esetben nagyobb mértékű volt az oldószerek radioaktivitása, azonban kimutatták, hogy az aktivitás legnagyobb részét a katalizátorok hatására képződött redukciós bomlástermékek tartalmazzák. A redukciónak jobban ellenálló oldószerekben gyakorlatilag csak a katalizátorokból képződött trícíált víz volt radioaktív.

Oehlke és munkatársai alátámasztották a közvetlen hidrogéncserére vonatkozó megállapításokat halogénezett fenilalanin [27], dehidroprolin [23], valamint diacetil-dijód-tirozin-amid [17] deuterálása és trícíálása során. Bebizonyították, hogy a tríciumgáz hígulása nem játszik jelentős szerepet a termék moláris aktivitásának csökkentésében. A direkt oldószer-trícium szubsztrát-hidrogén csere a katalizátor felületén megtörténik, amit úgy bizonyítottak, hogy trícíált vizet használtak oldószerként az *N*-acetil-dijód-tirozin-amid katalitikus hidrogénezése során, és a termékben megjelent a trícium, de a radioaktivitás alig változott az oldószerben. Ha a katalizátor

felületén jelentős lenne az oldószer és a gáz közötti csere, az oldószer radioaktivitása jelentősen csökkenne. Hasonló eredményt kaptak, ha  $d_9$ -dimetil-acetamidot használtak oldószerként és a deutériumot a termékben tömegspektrométerrel mérték.

A cserereakció mértéke jelentősen függött a katalizátor/szubsztrát aránytól, kisebb mértékben a pH-tól is. Savas pH-nál a beépülés kisebb, de a nem dehalogénezéssel beépült trícium mennyisége itt nagyobb, mint lúgos közegben. Mivel a  $K_H/K_D$  izotópeffektus arány 7 körüli érték, előnyösebb a triciálást deuterált oldószerekben végezni [17]. Az izotópcseré reakciót minimumra lehet csökkenteni, ha a szubsztrát/katalizátor arány nagy [14,27,28]. Ezáltal nőni fog a szubsztrátba beépült trícium helyzetének specifikitása is.

## 2.2. Morfinvázás alkaloidok radioaktív jelölése

A morfinvázás alkaloidok jelölése az 1950-es évektől napjainkban is állandóan fejlődő kutatási terület. Ennek egyik oka, hogy az ópiátreceptorokra ható ligandumok között az endogén eredetű opioid peptidek mellett léteznek ugyanolyan hatást kiváltó morfinvázás vegyületek is, amelyek azonban a receptorok aktív centrumának "letapogatásához" igen előnyös tulajdonsággal rendelkeznek: lényegesen könnyebb őket szintetizálni és - merev vázú, kis molekulák lévén - szerkezetileg jellemezni, mint a flexibilis peptideket. Emellett *in vivo* a peptidek a morfinszármazékoknál gyorsabban bomlanak le, utóbbiaktól tehát hosszabb hatás várható.

A radioaktívan jelzendő morfinalkaloidok jellemzőit lényegében a biológiai kutatások igényei szabják meg, így a jelölési módszerek összefoglalása egyúttal ennek fejlődését is tükrözi. Ugyanakkor a jelölő nuklid minősége behatárolja az alkalmazási lehetőségeket, tehát logikusnak tűnik a

nuklidok szerinti csoportosítás, amelyek közül részletesen a tríciummal való jelöléssel foglalkozunk.

A bioszintézis és biotranszformáció reakcióútjának megismeréséhez elsősorban  $^{14}\text{C}$  jelzett prekursorokat állítottak elő [29,30,31,32], bár található  $^3\text{H}$ -jelölés is [33].

A  $^{125}\text{I}$ -dal történő jelölések elsősorban radioimmuno-assay (RIA) céljára készültek, és főként a morfint jelölték [34,35,36,37].

A ciklotronok hozzáférhetősége lehetővé tette rövid felezési idejű izotópokkal jelzett vegyületek előállítását és alkalmazását is. Az opioid ligandumok jelzésében példaként a  $^{11}\text{C}$  [38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48] és a  $^{18}\text{F}$  [49,50,51,52,53] említhetők. Mindkét nuklidnak előnye, hogy radioaktív bomlása közben pozitront emittál, és így használható a pozitron emissziós transzaxiális tomográfiában (PETT). Ez az új technika *in vivo* lehetővé teszi az opioid receptorok "vizuális" észlelését, segítségével az opioid receptorok eloszlása pl. az agyban lokalizálható.

A tríciummal való jelzést kiterjedten alkalmazzák a radioimmuno-assay (RIA) területén, *in vitro* farmakológiai vizsgálatokban, de a jelzett vegyületek egyes szervekben, szövetekben való eloszlásának feltérképezésében is.

Bár a fotoaffinitás-jelölő reagensek szintén radioaktív izotóppal jelzett anyagok, külön tárgyalásuk mégis indokolt felhasználásuknak a többtől eltérő jellege miatt: tartalmazznak egy olyan önálló funkciós csoportot, amelynek elvben nincs biológiai szerepe, azonban képes kovalensen kapcsolódni a receptorhoz, lehetővé téve annak megjelölését. A fotoaktiválás előnye a többi reaktív csoporthoz képest az, hogy a kovalens kötés létrehozása tetszőleges időpontban történhet, elkülönítve a többi folyamattól, pl. a receptor-ligandum komplex egyensúlyának kialakulásától.

## Trícium-jelölt vegyületek

A morfinalkaloidok tríciummal való jelölésével számos közlemény foglalkozik. A RIA kifejlesztése, valamint az ópiátreceptorok vizsgálata irányában megnyilvánuló nagy érdeklődés sok nagy moláris aktivitású radioligandum előállítását eredményezte. Ezek kifejlesztésekor, a ligandumnak a receptorhoz mutatott affinitásán túlmenően, a legfőbb szempont az egyes receptor-altípusokhoz való kötődés szelektivitása.

A receptorhoz kötődő ligandumok farmakológiai hatásuk alapján lehetnek agonisták és antagonisták. Jelölésüket ezen csoportosításuk alapján foglaljuk össze.

## Ópiátagonisták $^3\text{H}$ -jelölése

A morfin jelölését izotópcseré-reakcióval, vagy kémiai szintézissel végezték.

A hidrogén-trícium cserét a Wilzbach-eljárással, illetve sav- vagy bázis katalízissel valósították meg.

L. B. Achor [54] a morfint (1a, 12. oldal) Wilzbach eljárásával [5] jelölte, és a kapott triciált morfint egységes terméként írta le. Misra és Woods [55] megismételték a jelölést morfinnal és normorfinnal is, és a kristályosítás mellett papírkromatográfiával bizonyították, hogy a termék két radioaktív vegyületet is tartalmaz: a főtermék a morfin, és az összemérhető radioaktív szennyeződés a dihidromorfin (8a, 16. oldal), ami kb. 1 %-ot tett ki.

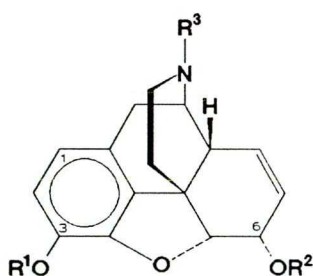
Fischman és munkatársai [56] a morfin jelölésére a Wilzbach-módszer módosított változatát használták, a tríciumgázt mikrohullámmal aktiválták. A morfint szilárd formában helyezték el a cseppfolyós nitrogénnel hűtött reaktorban, amelyben 0,53 kPa (4 torr) nyomású tríciumgáz keringett. A 20

perces reakció terméke 100 MBq/mmol (2,70 Ci/mmol), meglehetősen kis moláris aktivitású termék volt.

A morfin és trícium víz közötti cserét Battersby és munkatársai [57] írták le. A morfint és a 3,7 GBq/mmol (0,1 Ci/mmol) aktivitású trícium vizet 93 órán át melegítették dimetil-formamid (DMF) közegben, 100-120 °C-on. A trícium a 2-es helyzetbe épült be, de csak mintegy 3 %-ban. Kirby és munkatársai [58] trícium víz helyett deutérium-oxidot használtak, DMF-ben vagy dimetil-szulfidban (DMSO) végezve a reakciót; megállapították, hogy a reakciót a DMF-ben jelenlévő nyomnyi dimetil-amin katalizálja.

A morfin jelölését kémiai szintézissel a következő módszerekkel végezhetjük el:

1. morfin *N*-demetilézése, majd metilezése trícium formaldehiddel vagy trícium metil-jodiddal
2. [6-<sup>3</sup>H]morfin előállítása morfinon-acetátból [<sup>3</sup>H]lítium-[tetrahidrido-borát]-os redukcióval
3. 1-jód-morfin katalitikus dehalotriciálása



a:  $R^1 = R^2 = H, R^3 = CH_3$

b:  $R^1 = R^2 = R^3 = H$

c:  $R^1 = R^3 = CH_3, R^2 = H$

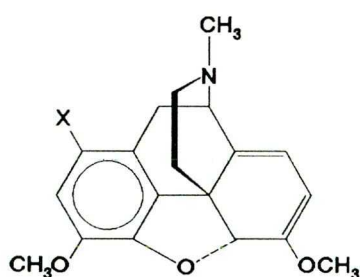
1

Werner és munkatársai [59] normorfint (1b) metileztek [<sup>3</sup>H]formaldehiddel főlös hangyasav jelenlétében, etanolos közegben, 110 °C-on 90 percig. Az összes radioaktivitásnak kb. 13 %-a jelent meg a 17-[<sup>3</sup>H-metil]-morfinban. A moláris aktivitás 2,47 GBq/mmol (0,067 Ci/mmol) volt, ami nem érte el a

[ $^3\text{H}$ ]formaldehid moláris aktivitását. Ha a normorfint nagyobb moláris aktivitású tríciumforrással, pl. trícíált metil-jodiddal vagy formaldehiddel jelölik, akkor az elérhető moláris aktivitás is nagyobb lesz.

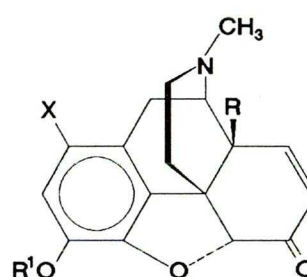
Fischman és munkatársai [60] [ $^3\text{H}$ ]nátrium-[tetrahidrido-borát]-ot használtak tríciumforrásként. A morfint először acetilezték, hogy megvédjék a fenolos hidroxilcsoportját, majd mangán-dioxiddal oxidálták a 6-os hidroxilcsoportot. A 3-acetil-morfinont (**3c**,  $\text{X}=\text{H}$ ) [ $^3\text{H}$ ]nátrium-[tetrahidrido-borát]-tal (9,25 GBq/mmol; 0,25 Ci/mmol) etanosos közegben szobahőmérsékleten redukálták, majd sósavas hidrolízissel kapták a [ $^3\text{H}$ ]morfint 2,15 GBq/mmol (0,058 Ci/mmol) moláris aktivitással.

Duquette és munkatársai [33] C-6-trícíált kodeint (**1c**) állítottak elő, a kodein metabolikus *O*- és *N*-demetilizését tanulmányozva. Közleményükben a Fischman által leírt módszert alkalmazták: kodeinont (**3b**,  $\text{X}=\text{H}$ ) redukáltak [ $^3\text{H}$ ]nátrium-[tetrahidrido-borát]-tal. A kémiai és radiokémiai hozam 99 % volt, a trícíált kodein moláris aktivitása 2,37 GBq/mmol (0,064 mCi/mmol).



a:  $\text{X}=\text{H}$   
b:  $\text{X}=\text{I}$

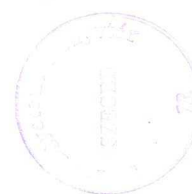
**2**



a:  $\text{R}^1=\text{R}=\text{H}$   
b:  $\text{R}=\text{H}$ ,  $\text{R}^1=\text{CH}_3$   
c:  $\text{R}=\text{H}$ ,  $\text{R}^1=\text{Ac}$

**3**

Két közlemény számolt be a tebain trícium-jelöléséről. Choudry és munkatársai [61] [ $^3\text{H}$ ]tebain szintézisét írták le, [ $^3\text{H}$ ]kodeinon köztiterméken keresztül, valamint 1-jód-tebain közvetlen trícíálásával: 1-jód-kodein (1-jód-**1c**) oxidációjával 1-jód-kodeinont (**3b**,  $\text{X}=\text{I}$ ) kaptak, amelyet benzolban 2,2-dimetoxi-propánnal vízmentes *p*-toluol-szulfonsavval melegítve

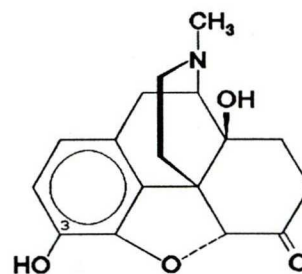


1-jód-tebain (2b) képződött. A jód eltávolítása trícíálással (palládium/aktívszén) 80 %-os hozammal sikerült, a tebain (2a) moláris aktivitása 592 GBq/mmol (16 Ci/mmol).

Tríciummal jelzett coclaurin és norcoclaurin a *Papaver somniferumba* beépülve C-6-metoxi csoportban jelzett tebaint eredményezett [32].

Varga É. és munkatársai [62] 8-<sup>3</sup>H-jelzett oximorfazont (12b, X=N-NH<sub>2</sub>, 19. oldal) állították elő, amely fontos irreverzibilis ligandum az opioid receptorok tanulmányozásában.

A 14-hidroxi-morfinonból (3, R<sup>1</sup>=X=H, R=OH) a C-8 helyzetben trícíált oximorfon (4) képződött. Az oximorfon keto-enol tautomériája miatt a C-7 trícium labilis volt. Az oximorfon reakciója hidrazin felesleggel adta az oximorfazont 640 GBq/mmol (17,3 Ci/mmol) moláris aktivitással.

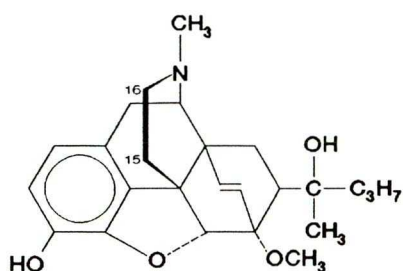


4

A morfin és dihidromorfin mellett az etorfin (5) a leggyakrabban használt ópiátagonista, és bár nem annyira  $\mu$ -receptorszpecifikus, de kétszer annyi receptorhely felismerésére képes.

Az etorfin jelölését E. J. Simon és munkatársai [63] katalitikus izotópcserével valósították meg. Az etorfint etilacetátban oldották és palládium/aktívszén katalizátor jelenlétében tríciumgázzal reagáltatták. Moláris aktivitása 122 GBq/mmol (3,30 Ci/mmol) volt. Bizonyították, hogy ilyen kísérleti körülmények között az etorfinban levő kettős kötés nem telítődik.





## 5

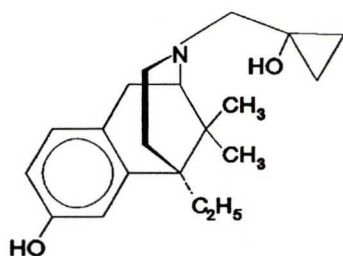
Lane és munkatársai [64] az etorfint meglehetősen bonyolult módon, szintézissel jelölték a 8-as helyzetben. Hidrogénnel hígított tríciumgázt és szénmonoxidot keringtettek kvarccsőben, miközben a csövet higanygőzlámájával megvilágították. A keletkező formaldehidet dietil-aminnal acetonban, sósav jelenlétében hevítve 4-dietil-amino-bután-2-ont kaptak. Az aminoketont tebainnal etilbenzolban reagáltatták leforrasztott csőben, 140 °C-on. Ezt a terméket *n*-propil-magnézium-jodiddal reagáltatták, majd 3-O-demetilézéssel jutottak a jelzett etorfinhoz, amelynek moláris aktivitása 1,78 GBq/mmol (0,05 Ci/mmol) volt. A várt moláris aktivitás ennél nagyobb, a csökkenést a szerzők izotópeffektussal magyarázták.

Lewis és munkatársai [65] a fenti módszert több oripavinszármazéknál is alkalmazták. A trícium víz mellett trícium tetrahidrido-borátot is használtak, ekkor 15,16-<sup>3</sup>H-jelzett termék jött létre. Etorfint jelöltek a 15,16-os helyzetben úgy is, hogy az enamín kettős kötését tríciumgázzal telítették. Ebben az esetben kapták a legnagyobb moláris aktivitást (133 GBq/mmol; 3,59 Ci/mmol). Ez az érték minden bizonnyal még növelhető is, mivel elméletileg 2154 GBq/mmol (58,24 Ci/mmol) moláris aktivitású termék nyerhető.

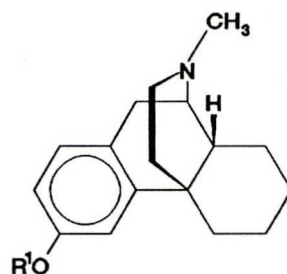
Gong Jia Ling és munkatársai [66] etorfint és dihidroetorfint jelöltek, feltehetően a 15,16-dehidro-származékon keresztül.

A benzomorfanok közül a bremazocin (6) jelölését Römer és munkatársai [67] írták le. A bremazocint a 3-as helyzetben brómozták, majd

katalitikusan dehalogéneztek tríciumgázzal. Moláris aktivitása 888 GBq/mmol (24,0 Ci/mmol) volt.



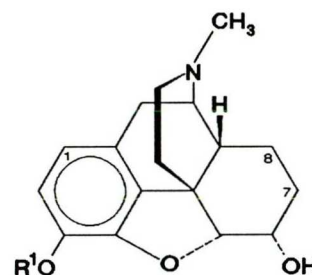
6



7

Craviso és munkatársai [68] a köhögéscsillapító dextrometorfán (7,  $R^1 = \text{CH}_3$ ) tríciumozásáról számoltak be. A dextrometorfánt (7,  $R^1 = \text{H}$ ) jódozták elemi jóddal, majd a jódot tríciumra cserélték (palládium/aktív szén katalizátor). A dextrometorfán fajlagos aktivitása 2,23 GBq/mg (60,4 mCi/mg) volt. Metilezéssel (diazometán) jutottak a 960 GBq/mmol (26 Ci/mmol) moláris aktivitású dextrometorfánhoz.

Korábban több kutató foglalkozott a 7,8-helyzetben tríciumot tartalmazó dihidromorfin (8a) előállításával, s ez a ligandum fontos szerepet játszott az opioid receptorok felderítésében és finomszerkezetük megismerésében. Hug és Mellett [69] a morfin kettős kötését etilacetátban palládium katalizátor jelenlétében tríciumgázzal telítette.



a:  $R^1 = \text{H}$   
 b:  $R^1 = \text{CH}_3$   
 c:  $R^1 = \text{C}_2\text{H}_5$

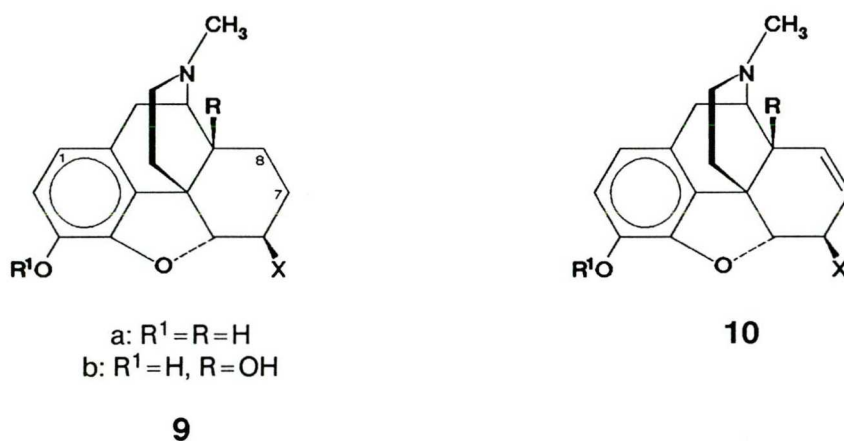
8

A moláris aktivitás növelésének igénye újabb szintézisek kidolgozására vezetett. Tóth G. és munkatársai [70] a morfin 7,8-as kettős kötésének telítése mellett az 1-es helyzetbe is beépítettek tríciumot, így a dihidromorfin moláris aktivitása 2500 GBq/mmol (67,5 Ci/mmol) lett, s ez az ópiatreceptorok vizsgálatában igen hatékony

eszköznek bizonyult. Az 1-es helyzetbe először jódot vittek be kodein jódozásával, majd az 1-jód-kodein bór-tribromidos *O*-demetilezésével 1-jód-morfint (1-jód-1a) kaptak, amit palládium-oxid katalizátor jelenlétében tríciumgázzal redukáltak. Az [1,7,8,-<sup>3</sup>H]dihidromorfin nagy affinitást mutatott patkány agyi ópiátreceptorokhoz.

Tóth G. és munkatársai [71] a trícíált dihidrokodeint (8b) (1900 GBq/mmol; 51,3 Ci/mmol) és a dihidro-etilmorfint (8c) (1850 GBq/mmol; 50,0 Ci/mmol) állították elő kodeinből és a 3-etil-morfinból (1, R<sup>1</sup>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sup>2</sup>=H, R<sup>3</sup>=CH<sub>3</sub>) kiindulva, a 7,8-as kettős kötést redukálva tríciumgázzal palládium-oxid katalizátor jelenlétében DMF-es oldatban.

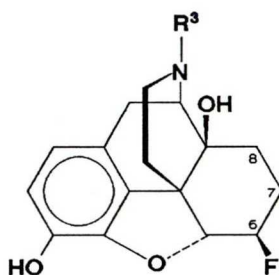
A C-6 epimer dihidro-izomorfin (9a, X=OH) jelöléséről Varga É. és munkatársai [72] számoltak be. A vegyület főként *mú*- és *kappa*-receptorokhoz mutat nagy affinitást, de ezenkívül kötődik a dopaminreceptorokhoz is. Az izomorfin (10, R<sup>1</sup>=R=H, X=OH) trícíálásával kapott ligandum moláris aktivitása 1280 GBq/mmol (34,7 Ci/mmol).



Az azidomorfin (9a, X=N<sub>3</sub>) és származékainak metabolizmusát, felszívódását, valamint élő szervezetben való megoszlását Knoll és munkatársai [73,74,75] vizsgálták. A trícíált származékokat Zólyomi G. állította elő, de kísérleti adatokat nem közöltek. Az alábbi vegyületek moláris aktivitásait adták meg: [7,8-<sup>3</sup>H]azidomorfin (9a, X=N<sub>3</sub>; 11,08 GBq/mmol;

0,299 Ci/mmol) [7,8-<sup>3</sup>H]-14-hidroxi-azidomorfin (**9b**, X=N<sub>3</sub>; 12,4 GBq/mmol; 0,337 Ci/mmol [7,8-<sup>3</sup>H]azidokodein (**9**, X=N<sub>3</sub>, R=H, R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>; 6,64 GBq/mmol; 0,179 Ci/mmol) [7,8-<sup>3</sup>H]azido-etilmorfin (**9**, X=N<sub>3</sub>, R=H, R<sup>1</sup>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 5,25 GBq/mmol; 0,142 Ci/mmol).

Rice és munkatársai [49,50,76,77] oximorfonból (**4**, 14. oldal) és naltrexonból (**12c**, X=O) előállították a 6-fluor származékokat, mely vegyületek alkalmas ligandumnak bizonyultak a pozitron emissziós transzaxiális tomográfias vizsgálatokban [49,50].



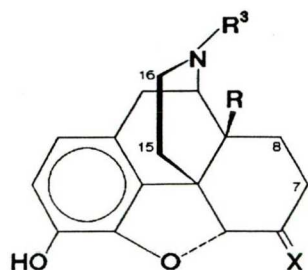
a: R<sup>3</sup>=CH<sub>3</sub>  
b: R<sup>3</sup>=ciklopropil-metil

### 11

Mindkét vegyületet sikerült trícíált formában is preparálni. A 6-dezoxi-6β-fluoro-14-hidroxi-dihidromorfin (FOXY) (**11a**) brómozása az 1,2-dibróm-FOXY-t eredményezte, melyből trícíálással (T<sub>2</sub>; Pd/C; metanol) a FOXY-t 590 GBq/mmol (16 Ci/mmol) moláris aktivitással kapták. Hasonlóképpen jelölték a CYCLOFOXY-t (**11b**) is, amely azonban már antagonistá hatású vegyület.

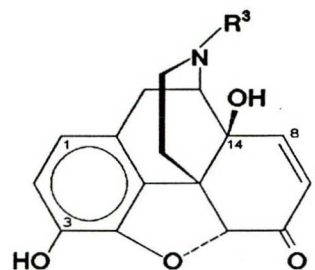
### Ópiátantagonisták <sup>3</sup>H-jelölése

Az ópiátantagonisták közül a tiszta antagonistának számító naloxont (**12d**, X=O) használják leggyakrabban a naltrexon és nalorfin (**12**, X=O, R=H, R<sup>3</sup>=allil) mellett.



- a: R=H, R<sup>3</sup>=CH<sub>3</sub>  
 b: R=OH, R<sup>3</sup>=CH<sub>3</sub>  
 c: R=OH, R<sup>3</sup>=ciklopropil-metil  
 d: R=OH, R<sup>3</sup>=allil

12



- a: R<sup>3</sup>=CH<sub>3</sub>  
 b: R<sup>3</sup>=H

13

A naloxon jelölését elsőként Snyder és Pert [78] végezte el hidrogén-trícium izotópcserével. A csere a naloxon és a trícíált víz között trifluorecetsavas közegben, 5 %-os ródiom/alumínium-oxid katalizátor jelenlétében 18 órán át történt, 80 °C-on. Moláris aktivitása 225 GBq/mmol (6,08 Ci/mmol). Pert és munkatársai [78] ezen radioligand segítségével a specifikus ópiatreceptor létezését bizonyították be 1973-ban. A moláris aktivitás kicsiny volta azonban mérési pontatlanságot eredményezett, ezért indult meg a kutatás más naloxon jelölési módszerek kidolgozására.

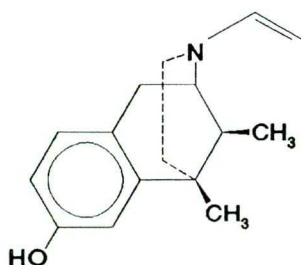
J. Fischman és munkatársai [79] szintetikus úton jutottak el jelölt naloxonhoz: 14-hidroxi-morfinonból (13a) indultak ki, amelyből 3,14-diacetil származékot készítettek, majd brómcíános *N*-demetilézéssel és savas hidrolízissel a 14-hidroxi-normorfinont (13b) kapták, amely a trícíálás közvetlen prekuzora volt. A 7,8-as kettős kötés telítését etanolos közegben palládium/aktívszén katalizátor jelenlétében végezték, szobahőmérsékleten, 8 órás redukcióval. A norszámazékot lúgos közegben allil-bromiddal való 18 órás forralással allilezték. Feldolgozás után 1480 GBq/mmol (40,0 Ci/mmol) moláris aktivitású terméket kaptak, melynek biológiai stabilitását is megvizsgálták és megállapították, hogy a 7,8-as helyzetben lévő trícium nem cserélődik biológiai rendszerben. Más kérdés, hogy az 1480 GBq/mmol

moláris aktivitás nehezen képzelhető el, mivel a 6-os oxocsoport melletti trícium a lúgos allilezési körülmények között nem tekinthető stabilisnak.

Brine és Kepler [80] a naloxon és naltrexon jelölését J. W. Lewis módszerének [65] felhasználásával végezte el. A naloxont és naltrexont higany-oxiddal oxidálták, és így 15,16-didehidro-származékot állítottak elő. A naltrexon ciklopropil-metil csoportja nem bomlik el a katalitikus hidrogénezés során, ezért a 15,16-os kettős kötést tríciumgázzal, palládium/aktív-szén katalizátor jelenlétében telítették. 566 GBq/mmol (15,3 Ci/mmol) moláris aktivitást kaptak. A viszonylag kis moláris aktivitást azzal magyarázták, hogy a 15,16-dehidro-származék imíniumformában is létezik, és ebben az esetben főként  $16\text{-}^3\text{H}$ -termék keletkezik. A naloxon jelölését 15,16-didehidro-származékból hidrogén-trícium cserével oldották meg, triciált vízzel, majd a kettős kötés telítését nátrium-[ciano-tetrahidrido-borát]-tal végezték el. A moláris aktivitás 148 GBq/mmol (4,00 Ci/mmol).

Egy újabb jelölési módszert szinte egyidőben három kutatócsoport is kifejlesztett. Ezeknek az a lényege, hogy prekuzorként olyan vegyületeket használtak, amelyek az allilcsoport helyett propargilcsoportot tartalmaztak. A propargilszármazék részleges telítésével elérhető, hogy a kettős kötést tartalmazó, jelzett allilszármazékhoz jussunk.

Filer és munkatársai [19] naloxon, nalorfin és az *N*-allil-normetazocin (**14**) jelölését végezték el az említett módszerrel. A részleges telítést előredukált Lindlar-katalizátor jelenlétében végezték tríciumgázzal.



Mivel a redukció nem áll meg a kettős kötés kialakulásával, hanem propilszármazék is keletkezik, ezért kétszeres vékonyréteg-kromatográfiával tisztították a nyersterméket. A termék tisztaságát ezen kívül HPLC-vel is ellenőrizték. Meghatározták a jelzés

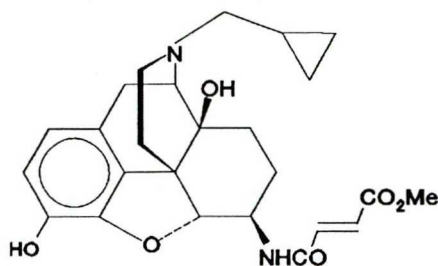
specifitását is trícium-NMR-rel, amely alapján megállapították, hogy a trícium az allil oldalláncban van. A jelzett ligandumok moláris aktivitása 1850 GBq/mmol (50 Ci/mmol), 1370 GBq/mmol (37 Ci/mmol) és 1630 GBq/mmol (44 Ci/mmol) a naloxonra, nalorfinra, illetve *N*-allil-normetazocinra (SKF-10047).

Gong Jia-Ling és munkatársai [20] hasonló elvek alapján állítottak elő [<sup>3</sup>H]naloxont, de Lindlar-katalizátor helyett Pd/BaSO<sub>4</sub> katalizátort alkalmaztak. A moláris aktivitásról nincs tudomásunk.

Tóth G. és munkatársai [21] a 14-hidroxi-normorfinont (**13b**) állították elő tebainból, amelynek 7,8-as kettős kötését telítették palládium-oxid katalizátor jelenlétében tríciumgázzal. A trícíált norvegyületet DMF-ben kálium-karbonát jelenlétében, propargil-bromiddal, szobahőmérsékleten 20 percig reagáltatták. Vékonyréteg-kromatográfiás tisztítás után a hármas kötést tartalmazó vegyületet Lindlar-katalizátor jelenlétében, DMF-es közegben, gondosan ellenőrzött körülmények között tríciumgázzal részlegesen telítették. Ilyen körülmények között is keletkezett propilszármazék (propil-naloxon), és jelen volt minimális propargilszármazék (propargil-naloxon) is. A tisztítás vékonyréteg-kromatográfiával történt. A [7,8,19,20-<sup>3</sup>H]naloxon moláris aktivitása 3090 GBq/mmol (83,5 Ci/mmol), ami az eddig előállított trícíált naloxon preparátumok közül a legnagyobb. A propilszármazékot szintén kinyerték, amelynek moláris aktivitása 4660 GBq/mmol (126 Ci/mmol) volt. Biológiai tesztek alapján [71] a naloxon, propargil-naloxon és propil-naloxon gyakorlatilag azonos hatású vegyületek.

A [<sup>3</sup>H]naloxont fölös hidrazinnal reagáltatva [<sup>3</sup>H]naloxazont (**12d**, X=N-NH<sub>2</sub>) is előállítottak, a naloxonéval azonos moláris aktivitással. A naloxazon irreverzibilisen kötődik az opiátreceptor  $\mu_1$  altípusához. Több közlemény jelent meg a tríciummal jelölt irreverzibilis  $\mu$  antagonistá  $\beta$ -funaltrexamin ( $\beta$ FNA) (**15**) vizsgálatáról, elsősorban a receptorkötődési

kinetikát tanulmányozták [81,82,83]. A jelzett vegyület előállítása során feltehetően [ $^3\text{H}$ ]naltrexonból redukív aminálással, majd acilezéssel kapták a kérdéses vegyületet.



15

#### Fotoaffinitás-jelölő reagensek

Az ópiatreceptorok lokalizációjának és komplex biológiai rendszerből történő izolálásának egyik lehetősége, hogy a receptor makromolekulájához irreverzibilisen kötődő radioaktív jelet használjunk. Fotokémiai affinitásjelölésnél az ópiátligandumból készült analógnak meg kell tartania az eredeti anyag farmakológiai aktivitását, sötétben kötődnie kell a specifikus receptorhoz, nagy moláris aktivitásúnak kell lennie, hogy meglehetősen kis koncentrációban lehessen használni a nem specifikus kötés alacsony szinten tartására, és a fotólízis után az irreverzibilis kötés a kívánt kötőhelyen jöjjön létre.

A reagensek tervezésénél és szintézisének olyan vegyületek jöhetnek számításba, melyeket már hosszabb hullámhosszú UV sugárzás is képes aktiválni. Ez azért fontos, mivel pl. 254 nm hullámhosszú besugárzás után az opioid receptorok jelentős mértékben károsodnak [84]. Másrészt kimutatták, hogy az ópiátok, mint pl. a morfin, etorfin, ilyen körülmények hatására kovalensen kötődnek. Erre számos példa van az irodalomban, így Kooper és munkatársai [85] közölték, hogy a [ $^3\text{H}$ ]oximorfon irreverzibilisen jelölte a

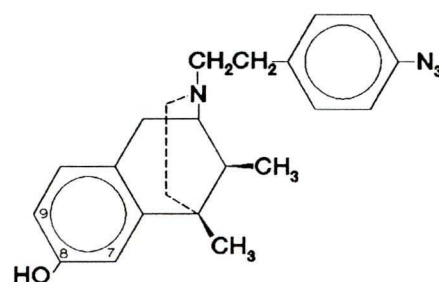




receptorokat fotoaktiválás hatására. Miután radioaktív ligandumokat használtak, ez a módszer alkalmas volt membránfehérjék jelölésére, azaz a receptorok molekuláris jellemzésére. Hasonló megállapításokat tettek Rothman és munkatársai [77]: vizsgálataik szerint a [ $^3\text{H}$ ]FOXY alkalmas a receptorok fotoaffinitás jelölésére.

A morfinszármazékok körében széleskörűen vizsgálták az aril-azido szerkezeti egységet, mint lehetséges fotoaffinitásjelölő csoportot. Említést érdemelnek a normetazocin, norlevorfanol, dihidromorfin és a morfinon származékai.

De Costa és Bowen [86] a (+)-4'-azido-fenazocin (**16**) trícilálását vizsgálta, amely egy *sigma*-receptor-szelektív fotoaffinitás-jelölő ligandum. (+)-normetazocin *p*-azido-fenil-etanol mezilátjával kapták a (+)-4'-azido-fenazocint, amit 2 ekvivalens brómmal kezelve a 7,9-dibróm-származékot nyerték. A



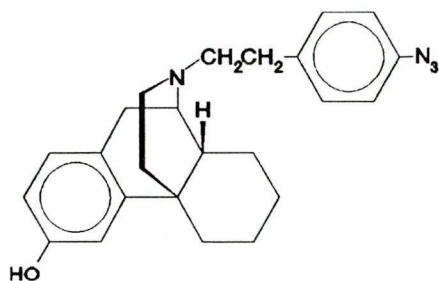
**16**

trícilálás során nemcsak dehalogénezés, hanem az azidocsoport redukciója is végbement (moláris aktivitása: 847 GBq/mmol; 22,9 Ci/mmol) ezért ezt Sandmeyer reakcióban visszaalakították (+)-4'-azido-fenazocinná.

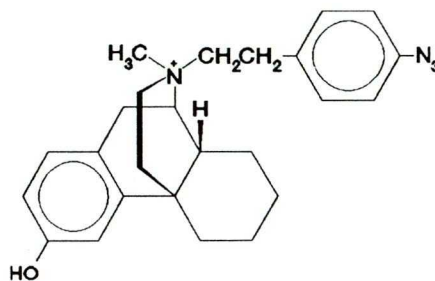
Hasonló vegyületeket morfinánokból is előállítottak:

Winter és Goldstein [87] a levorfanol radioaktív analógját, a [ $^3\text{H}$ ]N- $\beta$ -(*p*-azidofenil)-etil-norlevorfanolt (**17**) szintetizálták és használták fotokémiai affinitásreagensként opiát-receptorok jelölésére. A *p*-amino-fenil-ecetsavból metil-észtert készítettek és trícilált lítium-[tetrahidrido-aluminát]-tal *p*-aminofenil-etanollá redukáltak. Az amint diazotálták, majd nátrium-aziddal nyerték a *p*-azidofenil-etanolt. Ezt tionil-bromiddal bromozták, és a keletkező  $\beta$ -(*p*-azidofenil)-etil-bromidot norlevorfanollal reagáltatták metanolos közegben, kálium-karbonát jelenlétében. A termék moláris aktivitása

27,7 MBq/mmol (0,749 Ci/mmol). A kis moláris aktivitás miatt  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban kellett a receptorjelölést elvégezni, és így nagy volt a nem specifikus kötés aránya is.



17

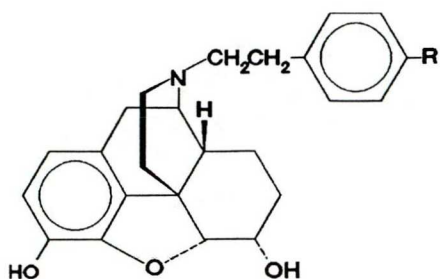


18

DeGraw és Engstrom [88] gyakorlatilag az előbbi utat követte azzal a különbséggel, hogy a lítium-[tetrahidrido-aluminát]-os redukció helyett a nátrium-[tetrahidrido-aluminát]-alumínium-klorid komplex hidriddel való reakciót alkalmazták, és a *p*-aminofenil-etil-bromid helyett a megfelelő tozilátot állították elő, ami a kitermelést növelte. A trícíált *N*- $\beta$ -(*p*-azidofenil)-etil-norlevorfanol moláris aktivitása 46,2 GBq/mmol (1,25 Ci/mmol). Ugyanígy állították elő a  $^{14}\text{C}$ -levorfanol analógot is.

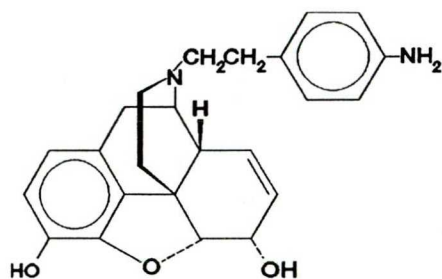
Schulz és Goldstein [89] az előbbi vegyület kevésbé lipofil kvaterner sóját (**18**) vizsgálták. A vegyület fotoaktiválás hatására irreverzibilisen kötődött az opioid receptorhoz.

Cooper és Rapoport [90] a feniletil-dihidro-normorfin 4'-azidoszármazékát (**19a**) állították elő, mint lehetséges fotoaffinitásjelölő reagenst, 7,8-ditrícíált formában. A (**20**) morfinszármazékot dioxánban platina-dioxid katalizátor jelenlétében trícíálták, majd (**19b**) Sandmeyer reakciója eredményezte (**19a**)-t, a moláris aktivitás 1110 GBq/mmol (30 Ci/mmol) volt.



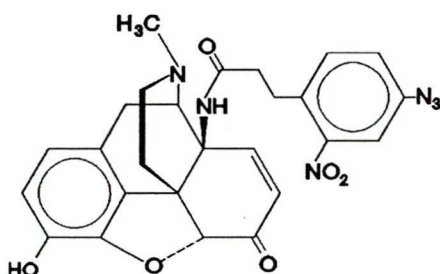
a: R=N<sub>3</sub>  
b: R=NH<sub>2</sub>

**19**

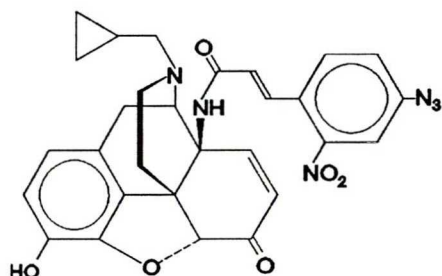


**20**

Szintén aril-azid típusú fotoaffinitás-jelölőket állítottak elő Rance és munkatársai [91,92] a 14-amino-morfinon származékok acetilezésével. A **(21)** vegyület, amely a 14-amino-morfinon *p*-azido-dihidrofahéjsavval acilezett származéka, a kontroll kísérletekben a legnagyobb affinitást mutatta.



**21**



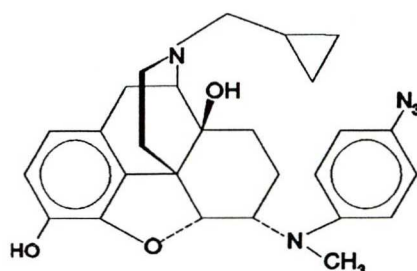
**22**

Fotolízis hatására irreverzibilis kötődést tapasztaltak.

Előállítottak egy antagonistát **(22)** is az *N*-ciklopropilmetil-14-amino-normorfinon 2-nitro-4-azido-fahéjsavval való acetilezésével, de ez a vegyület nem bizonyult alkalmas fotoaffinitásjelölőnek.

Galzi és munkatársai [93,94] az  $\alpha$ -Naltrexamin *N*-metil-*N*-*p*-azidofenil-származékát **(23)** állították elő, amelyről kimutatták a reverzibilis kötődést a receptorhoz, bár a vegyület nem volt szelektív, egyforma affinitást mutatott a *mű*-, *delta*-, *kappa*-receptorokhoz. A *p*-azido-fenil szerkezeti egység azért is

előnyös, mivel a fotoaktiválás hullámhossza 300 nm vagy hosszabb. Besugárzás után (23) irreverzibilisen alkilezte a receptort.



23

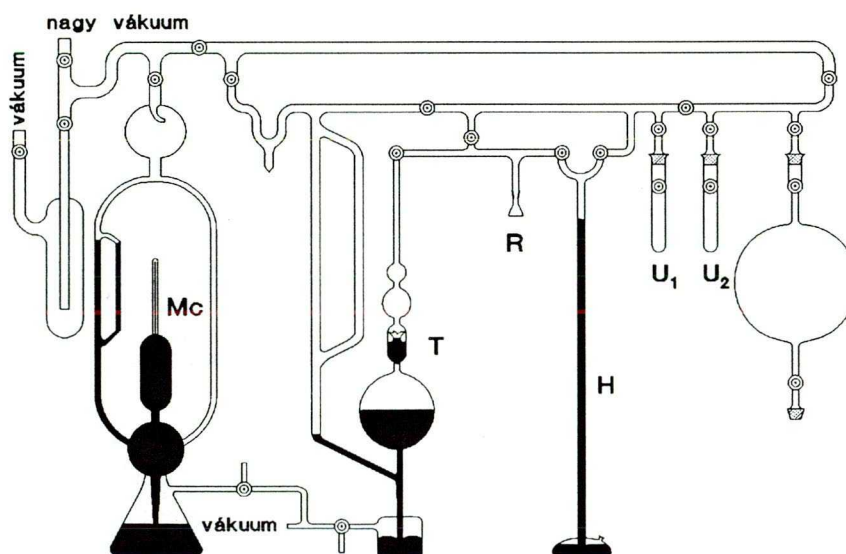
Végezetül általánosságban megjegyezhető, hogy a radioaktív jelölési technikák fejlődése egyre nagyobb moláris aktivitású, specifikusan jelzett vegyületek széles skáláját hozta létre, ami elsősorban az élettudományok terén jelentett, és jelent mindinkább táguló kutatási-vizsgálati lehetőségeket. Maguk a morfinszármazékok ezen belül kis részt képviselnek, de a jelzett analógokon keresztül különböző radioizotópok alkalmazása követhető nyomon. A nukleáris mérés technika újdonságaival együtt finomabb részletek deríthetők fel, akár egyes anyagok metabolizmusáról, akár pl. a receptorok altípusairól vagy alegység-szerkezetéről van szó. A tríciummal történő jelölés több évtizedes kísérleti tapasztalattal rendelkező terület, és megfelelő szintetikus eljárásokkal hasznos segédeszközöket nyújt az említett biológiai problémák megoldásához, miközben a radioaktív jelölések eredménye önmagában is értékes ismereteket ad a molekulák szerkezetére és tulajdonságaira vonatkozóan.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### Tríciálási és hidrogénezési eljárás

A tríciumgázzal történő tríciálás olyan radiokémiai munka, amelyet nagy mennyiségű illékony aktív anyaggal végzünk, így kivitelezése a mindennapos laboratóriumi gyakorlattól gyökeresen eltér. A nagyszámú veszélyes hibalehetőség miatt minden egyes reakciót és műveleti lépést megelőzően inaktív anyagokkal kell elvégezni, s csak ezek sikeres végrehajtása után lehet áttérni az aktív munkára.

A Laboratóriumban előállított radioaktív anyagok rendszerint egyediek és viszonylag kicsiny összes aktivitásban kerülnek felhasználásra, így szintézisük is mikromódszerekkel történik. A kiindulási vegyületek anyagmennyisége általában  $1 \cdot 10^{-6}$  -  $50 \cdot 10^{-6}$  mol tartományban van, és a tríciáláshoz, illetve az azt megelőző mikrohidrogénezési kísérletekhez a Laboratóriumban korábban épített vákuumkészülék [10] lényegében ezen követelményeknek felel meg. A tríciáló készülék vázlatát az alábbi ábrán látható:



Tríciáló készülék

1. ábra

A tríciumot pirofóros uránban ( $\underline{U}_1$ ) elnyelve tároljuk, amelyből 300-450 °C-ra hevítés során szabadul fel az elemi tríciumgáz. A megfelelő hőmérsékletet szabályozható elektromos kályha biztosítja. A reakció lejátszódása után a visszamaradt, izotópcseré miatt hígult tríciumot egy másik, ugyancsak pirofóros uránnal töltött csapdában ( $\underline{U}_2$ ) nyeletjük el. A rendszerben levő gáz nyomása egyszáras  $\underline{H}$  higanymanométerrel, illetve  $\underline{Mc}$  McLoad-manométerrel mérhető. A vákuumot rotációs és higanydiffúziós szivattyú biztosítja.

A triciálási/hidrogénezési reakció kivitelezése általában a következőképpen történik: az  $\underline{R}$  reakcióedényben cseppfolyós  $N_2$ -nel megfagyasztjuk az előzetesen bemért oldószer és a reaktánsok elegyét, majd a rendszert evakuáljuk és elzárjuk a szivattyúktól is. További hűtés közben a nyomásmérővel ellenőrizve 370-740 GBq (10-20 Ci) összes aktivitású tríciumgázt engedünk be a reakciótérbe. A hűtés megszüntetése és a reakcióelegy megolvadása után a hidrogénezési reakció a keveréssel megindítható.

A reakció előrehaladása (a cserereakciók kivételével) jól követhető a reakciótér nyomásának változásával, és megfelelő időben a reakcióelegy cseppfolyós  $N_2$ -nel megfagyasztva leállítható. Ekkor a használt, hidrogénnel hígult tríciumot pirofóros uránt tartalmazó gyűjtőben elnyeletjük, a reakcióedényt eltávolítjuk, majd felolvadás után a katalizátort a reakcióelegyből Whatman GF/C üvgszálal szűrőpapíron leszűrjük és metanollal mossuk. Az összegyűjtött szűrletet vákuumbepárlón lepároljuk. A reakcióelegyben maradt labilis tríciumot a következőképpen távolítjuk el: a terméket 10-15 ml etanol-víz 1:1 elegyben oldjuk, majd az oldószert rövid állás után lepároljuk; a műveletet 3-4 alkalommal megismételve labilis helyzetű trícium lényegében nem marad, így a további feldolgozás már nyitott reakcióedényben is történhet.

## Tisztítási módszerek

### a.) Vékonyréteg-kromatográfia

*Merck* DC Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> UV indikátorral adalékolt lapokat használtunk. Az alkalmazott futtatórendszereket a kísérleti eredmények ismertetése során közöljük. A foltok előhívására először általában UV megvilágítást használtunk, az egyes anyagokra alkalmazott előhívó reagenseket a Kísérleti eredményekben közöljük. A radioaktivitás eloszlását a vékonyréteg lapokon *Packard Model 7201 Radiochromatogram Scanner*rel, illetve *Berthold Radiochromatogram Tracemaster*rel vizsgáltuk. Nagyobb aktivitású mintáknál autoradiográfiát alkalmaztunk, amelyhez *Medifort RP* röntgenfilmet használtunk. Az expozíciós idő a minta radioaktivitásától függött, pl. 20 x 20 cm-es lapra teljes szélességben felvitt 720 MBq (20 mCi) aktivitásnál 1-2 óra volt.

### b.) HPLC kromatográfia

Ezt a módszert elsősorban tisztaságellenőrzésre használtuk, a részletek a Kísérleti eredmények fejezetben találhatóak.

### A radioaktivitás mérése

A radioaktivitást folyadékszintillációs módszerrel határoztuk meg. A mintákat toluolos (4-5 g PPO, 50 mg POPOP 1000 ml toluolban), vagy toluol-Triton X-100-as koktélaban (1000 ml toluolos koktél, 500 ml Triton X-100) mértük. A mérés határfokát quench korrekciós görbe segítségével határoztuk meg (csatornahányados módszer). A mérésekhez *Searle Delta 300* spektrométert használtunk. A trícium mérés során a levegő trícium tartalmát folyamatosan mértük egy *Jonston* ionizációs kamrával. A belélegzett és beépült trícium koncentrációja a vizelet radioaktivitásának mérésével követhető.

## Mennyiségi meghatározások

A triciált termékek mennyiségét UV-spektrumuk alapján határoztuk meg *UV VIS Spectrometerrel* (Zeiss), illetve *Shimadzu UV VIS 160* spektrofotométerrel. A vegyületek UV-spektroszkópiai adatait részben irodalmi adatokból [95], részben saját méréseinkből vettük. A mért adatok a Kísérleti eredményekben találhatóak.

## Anyagok

A tríciumgázt a Szovjetúnióból vásároltuk (*Technabexport*) és urán-tricid formájában tároljuk. A fém urán *Merck* termék. A fém uránból a pirofóros uránt és az urán-tricidet Burke és Smith módszere [96] alapján állítottuk elő. A hidrogénezéshez/triciáláshoz használt katalizátorok *Merck* gyártmányúak voltak.

Az *N*-metil-morfolin, klórhangyasav-izobutil-észter *Aldrich*, a trietil-amin, fenilhidrazin, 4-bróm-fenilhidrazin *Fluka* készítmény.

A morfinszármazékokat (kodein, morfin, izomorfin-származékok, naltrexon), fumársav-monometil-észtert, klórecetsavat a *Tiszavasvári Alkaloida Vegyészeti Gyártól*, a ciprodimot *Dr. Helmut Schmidhammertől* kaptuk. A normorfin-, naltrindol-, halogénezett naltrindol származékok laboratóriumunkban készültek. A standardként használt 5'- és 6'-klór- és bróm-naltrindol származékokat *Dr. Tóth Géza* állította elő.

## Műszeres vizsgálatok

Az NMR felvételek *Varian-Gemini 200* és *Bruker AM 400* spektroszkópon, a tömegspektrumok *VG-TRIO-2* készüléken készültek, EI (70 mV) üzemmódban. Az olvadáspontokat *Elektrothermal* (8103) készüléken határoztuk meg, az adatok nem korrigáltak.



## 4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

### 4.1. Izomorfin származékok előállítása triciált formában

A fotoaffinitás- és elektrofil affinitás-jelölők kulcsfontosságú vegyületek az opioid receptorok kutatásában. Amennyiben az említett vegyületek valamilyen radioaktív nuklidot is tartalmaznak, akkor megjelölhetjük velük a receptort, illetőleg opioid receptorok esetében a receptor egy altípusát (*mű*, *delta*, *kappa*), ha a radioaktív ligand specifikusan kötődik ezek valamelyikéhez. Morfin alkaloidok elsősorban a *mű*-receptorokhoz kötődnek, ezért ezeknek az affinitásjelölő származékai várhatóan szintén *mű*-specifikusak. Az irodalmi adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a legszokványosabb út az affinitásjelölő morfinszármazékok szintéziséhez az, ha a 6-os helyzetben módosítjuk a morfinvázat [84,97]. Az antagonistá naloxon és naltrexon 6-amino epimerpárjaival végzett farmakológiai vizsgálatokban [98,99] a morfinhoz képest megnövekedett *mű* szelektivitást tapasztaltak. A későbbiekben a szelektivitás és különösen az affinitás növelésére irányuló próbálkozások különböző elektrofil csoportokat (klóralkil-aminok,  $\alpha,\beta$ -telítetlen karbonsavak észterei,  $\alpha$ -halogénkarbonsavak, izotiocianátok) tartalmazó, irreverzibilisen kötődő ligandumok kifejlesztéséhez vezettek [97,100], amelyekkel megállapították a  $\beta$ -térállás kedvezményezett szerepét [97]. Legszelektívebbnek a legkevésbé reaktív  $6\beta$ -fumáramid oldalláncot tartalmazó származékokat találták [97,100], amelyek közül a metil-észter bizonyult a legnagyobb affinitásúnak [101]. Az eredmények alapján az antagonistá hatású naltrexon  $6\beta$ -fumáramido-metil-észter ( $\beta$ -funaltrexamin) származékot triciált formában is előállították [81,82], bár a szintézis leírását ezek a publikációk nem közlik.

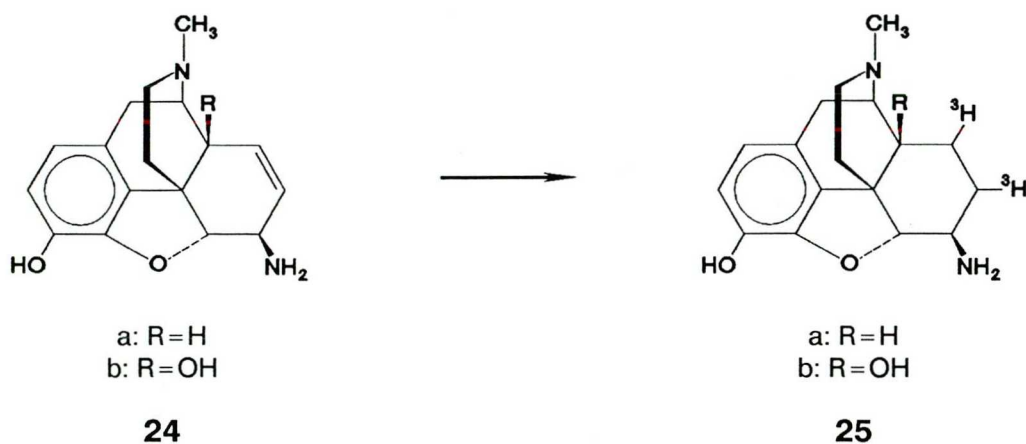


A  $\beta$ -funaltrexamin agonista analógja a 6 $\beta$ -amino-6-dezoxi-14 $\beta$ -hidroxí-7,8-dihidromorfin (**25b**), amelynek biológiai aktivitását nem jelzett anyaggal már vizsgálták [100], valamint a 14-es hidroxí csoport szerepének felderítésére összehasonlították a 14 $\beta$ -dezoxí vegyülettel [102].

Az irodalmi adatok alapján érdemesnek tűnt az agonista vegyületcsoport tagjainak farmakológiai jellemzését elvégezni trícíált anyagokkal is, így Laboratóriumunkban előállítottuk a [7,8- $^3\text{H}$ ]6 $\beta$ -amino-6-dezoxí-7,8-dihidromorfinnak (**25a**) fumáramido-metil-észter és klóracetamido származékát, valamint e vegyületek 14 $\beta$ -hidroxí analógjait (**25b**). A jelölést mindkét vegyületnél a morfinváz 7,8-as kettős kötésének katalitikus telítésével (2. ábra) végeztük el, majd a radioaktív anyagok 6-os aminocsoportjához savamid kötéssel kapcsoltuk a fumársav-metil-észtert és a klórecetsavat.

#### 4.1.1. A 6-amino-izomorfin és a 6-amino-14-hidroxí-izomorfin trícíálása

A trícíáláshoz a 6-amino-izomorfin analógokat *Hosztafi Sándortól* (Alkaloida, Tiszavasvári) kaptuk, aki munkatársaival sztereoszelektív módszert [103] dolgozott ki a 6 $\beta$ -epimerek előállítására, amely tisztább terméket és jobb kitermelést eredményezett a korábban leírt [99] eljárásnál.



2. ábra

[7,8-<sup>3</sup>H]6-amino-6-dezoxi-7,8-dihidro-izomorfin ([7,8-<sup>3</sup>H]DIHIM, **25a**)

2,0 mg (7  $\mu$ mol) 6-amino-6-dezoxi-izomorfint (**24a**) feloldottunk 0,9 ml DMF-ben. Katalizátorként 5,3 mg PdO-ot használtunk. A reakcióedény egy 3 ml térfogatú csiszolatos gömblombik volt, amit elláttunk mágneses keverővel. A reakcióedényt csatlakoztattuk a tríción készülő készülékhez, cseppfolyós nitrogénnel lehűtöttük és a megfagyott reakciókeverékről a levegőt vákuum segítségével elszívattuk. A továbbiakban a tríción az *Anyagok és módszerek* részben leírtak szerint történt. A reakciót 165 percig folytattuk 370 GBq (10 Ci) aktivitású hordozómentes tríciummal. A kezdeti nyomás 45,3 kPa (340 torr) volt, a trícium fogyását manometrikusan követtük. A reakció befejezése után a katalizátort leszűrtük Whatman GF/C üvegszűrőn, a katalizátort metanollal mostuk. Az oldószert, valamint a PdO-ból keletkezett tríción vizet lepároltuk, és a maradékot 50 % etanol-víz elegyében (25 ml) feloldottuk. A labilis tríciumot 3x25 ml oldószerelegylepárlásával távolítottuk el. A végső bepárlás után 20 ml etanolban vettük fel, megmértük a radioaktivitását, ami 4,92 GBq-nek (134 mCi) adódott. A radioaktív termék tisztaságát jelzetlen standard alkalmazásával vékonyréteg-kromatográfián határoztuk meg, szilikagél lapon (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) kloroform-aceton-metanol-ammónium-hidroxid 40:30:10:5 eluenssel (**A** futtatórendszer). A foltokat Dragendorff reagenssel (0,06 % bázisos bizmut-nitrát és 1,5 % KI oldata 15 %-os vizes ecetsavban) hívtuk elő, míg a radioaktivitás helyét a rétegen Packard radiokromatogram scannerrel azonosítottuk, aminek alapján a nyers termék kromatográfián tiszta volt ( $R_f=0,18$ ).

A nem radioaktív telítetlen prekursor jelenlétét Dragendorff színreakcióval vizsgáltuk nagyobb mennyiségű radioaktív anyag felcseppentésével. Kiindulási anyagot nem detektáltunk. Az anyagmennyiséget UV spektrum alapján határoztuk meg (UV-VIS Zeiss spektrométer) nem radioaktív standard

alkalmazásával. A moláris extinkciós koefficiens etanolban  $1510 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$  volt.

Termelés: 4,92 MBq (134 mCi), 5,39  $\mu\text{mol}$  (77 %).

Moláris aktivitás: 918 GBq/mmol (24,8 Ci/mmol).

A trícíált izomorfin származékok vékonyréteg-kromatográfiás adatai és a radioaktív szintézisek termelésének értékei a 1. táblázatban a 38. oldalon található.

[7,8- $^3\text{H}$ ]6-amino-6-dezoxi-7,8-dihidro-14 $\beta$ -hidroxi-izomorfin  
 ([7,8- $^3\text{H}$ ]14-OH-DIHIM, **25b**)

4,0 mg (13,2  $\mu\text{mol}$ ) 6-amino-6-dezoxi-14-hidroxi-izomorfint (**24b**) 0,8 ml DMF-ben oldottunk. 11 mg PdO katalizátort adtunk hozzá és a trícíálást az előzőhöz hasonlóan hajtottuk végre. A reakcióidő 150 perc volt, a nyerstermék radioaktivitása 14,5 GBq (473 mCi). Vékonyréteg-kromatográfia szerint a fenti futtatórendszerben ( $R_f=0,35$ ) a termék tisztítást nem igényelt, a további reakciókhoz megfelelő volt.

Termelés: 14,5 GBq (473 mCi), 11,9  $\mu\text{mol}$  (90 %).

Moláris aktivitás: 1470 GBq/mmol (39,7 Ci/mmol).

#### 4.1.2. A savamidok előállítása a jelölt morfinszármazékokból

A (**26**) és (**27**) (36. oldal) amidszármazékok szintézisét a peptidek racemizációmentes folyadékfázisú szintézisére kidolgozott vegyes anhidrides kapcsolási módszerrel [104,105] végeztük el, mivel mind a fumáramid, mind a klórecetsav tartalmaz egy szabad, aktiválható karboxilcsoportot, így a kapcsolást minden esetben azonos módon végezhetjük el. A szintézisekben általában 925 MBq (25 mCi) aktivitású trícíált alapanyagból indultunk ki, ami a

dihidro-izomorfin (**25a**) esetében  $1 \mu\text{mol}$ , a 14-hidroxi analógnál (**25b**) pedig  $0,63 \mu\text{mol}$  kémiai anyagmennyiséget jelentett. A rendkívül kis mennyiségek miatt több olyan tényezővel is számolnunk kellett, amelyek a "normál" szintéziseknél nem okoznak problémát. Bár kevés ( $200 \mu\text{l}$ ) oldószerben oldottuk fel a reaktánsokat, a reakcióelegy igen híg volt. Emiatt gondosan tisztított és vízmentesített oldószereket és reagenseket kellett használnunk a mellékreakciók [104] visszaszorítására. A Portugese és munkatársai által leírt módszer [100] fumaroil-klorid-monometil-észterrel részben a tisztítás, részben az alacsony kitermelés (68 %, feltehetően nagyobb anyagmennyiségekkel) miatt itt nem használható, a klórecetsav származék aktív észteres kapcsolása [106] pedig még több szennyezővel járt volna.

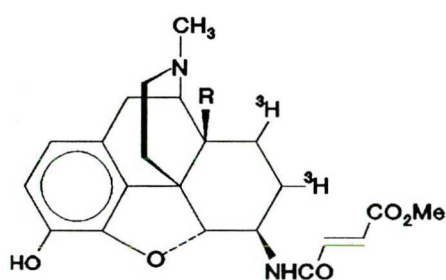
A fentiek alapján választott kapcsolási eljárásban a képződő melléktermékek illékonyak ( $\text{CO}_2$  és a klórhangyasav-észterből származó alkohol), a kapcsolat hatásfoka - amelyre a kis anyagmennyiség és a híg oldatok miatt fokozottan kellett ügyelni - pedig 96-98 %. Ez klórhangyasav-izobutil-észter anhidridképző reagenssel és *N*-metil-morfolin bázis alkalmazásával [104,107] érhető el, tetrahydrofuran oldószerben. A reakció teljesebbé tétele érdekében a reagenseket kb. ötszörös feleslegben alkalmaztuk.

[7,8- $^3\text{H}$ ]6-amino-6-dezoxi-7,8-dihidro-izomorfin kapcsolása fumársav monometil-észterrel (DIHIM-fumarát, **26a**)

925 MBq (25 mCi,  $1 \mu\text{mol}$ ) [7,8- $^3\text{H}$ ]6-amino-6-dezoxi-7,8-dihidro-izomorfint feloldottunk  $0,2 \text{ ml}$  vízmentes tetrahydrofuranban és só-jég hűtőkeverékkel lehűtöttük  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra.  $0,65 \text{ mg}$  ( $5 \mu\text{mol}$ ) fumársav-monometil-észtert és  $0,65 \mu\text{l}$  ( $5 \mu\text{mol}$ ) klórhangyasav-izobutil-észtert szintén feloldottunk  $0,2 \text{ ml}$  tetrahydrofuranban és lehűtöttük  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra. A lehűlés után hozzápipettáztuk  $0,5 \mu\text{l}$  ( $5 \mu\text{mol}$ ) *N*-metil-morfolin tetrahydrofurános oldatát,

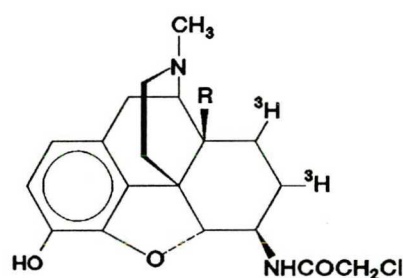
majd a két oldatot egyesítettük és  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 5 percig állni hagytuk. A reakcióidő letelte után mintát vettünk és szilikagél vékonyrétegen (10 cm-es lapon) megfuttattuk az **A** futtatórendszerben. A vékonyréteg-kromatográfiás körülmények a 1. táblázatban (38. oldal) láthatók (DIHIM:  $R_f=0,18$ , DIHIM-fumarát:  $R_f=0,32$ ). A kifejlesztés után felvett radiokromatogramból megállapítottuk, hogy az 5 perces reakcióidő alatt a konverzió körülbelül 40-50 %-os volt, így a reakciót 0,5 ml metilalkohol hozzáadásával leállítottuk - ezzel kb. 40 perc reakcióidőt biztosítottunk - és vákuumbepárlón bepároltuk a reakcióelegyet.

A maradékot a végtermék kinyerése céljából feloldottuk 0,5 ml metanolban és szilikagél lapon tisztítottuk az **A** futtatórendszerben. Megmértük az aktivitását, ami 368 MBq (9,94 mCi) volt. A végső tisztaságot az **A** és **B** (etilacetát-metanol-trietil-amin 90:20:5) eluensekkel ellenőriztük, a (**26a**) termék radiokémiai tisztasága mindkét esetben legalább 95 % volt.



a: R=H  
b: R=OH

**26**



a: R=H  
b: R=OH

**27**

[7,8- $^3\text{H}$ ]6-amino-6-dezoxi-7,8-dihidro-izomorfin kapcsolása  
klórecetsavval (DIHIM-klóracetát, **27a**)

A (**27a**) vegyületet a fumáramid származéknál leírt módon állítottuk elő azzal a különbséggel, hogy a fumársav-monometil-észter helyett 0,47 mg

(5  $\mu\text{mol}$ ) klórecetsavat használtunk a 925 MBq (25 mCi, 1  $\mu\text{mol}$ ) aktivitású (25a) kiindulási alapanyaghoz. A  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ -on lejátszódó reakciót 40 perc után leállítottuk és az elegy bepárlása után a terméket az **A** futtatóban történő tisztítással nyertük ki. A vegyület radiokémiai tisztaságát vékonyréteg-kromatográfiásan (1. táblázat) ellenőriztük az **A** és a **B** futtatórendszerekben, ami szerint a radioaktív termék kromatográfiásan egységes volt. A visszanyert aktivitás 398 MBq (10,8 mCi) volt, ami 43 %-os kitermelésnek felel meg.

[7,8- $^3\text{H}$ ]6-amino-6-dezoxi-14-hidroxi-7,8-dihidro-izomorfin kapcsolása  
fumársav monometil-észterrel (14-OH-DIHIM-fumarát, 26b)

A szintézis és tisztítás azonos módon történt, mint a DIHIM fumáramido származékánál. 925 MBq (25 mCi, 0,63 mol) kiindulási 14-OH-DIHIM-ből és 0,65 mg (5 mol) fumársav-monometil-észterből 40 perces reakcióidővel az **A** futtatórendszerben való tisztítás után 702 MBq (19 mCi, 76 %) aktivitású, vékonyréteg-kromatográfiásan (**A** és **B** eluenssel) egységes (26b) terméket nyertünk.

[7,8- $^3\text{H}$ ]6-amino-6-dezoxi-14-hidroxi-7,8-dihidro-izomorfin kapcsolása  
klórecetsavval (14-OH-DIHIM-klóracetát, 27b)

A kapcsolást a 14-dezoxi analógnál leírtak szerint végeztük el, azonban ebben az esetben 1850 MBq (50 mCi, 1,26  $\mu\text{mol}$ ) volt a (25b) kiindulási anyagmennyisége, amihez ebben az esetben 0,94 mg (10  $\mu\text{mol}$ ) klórecetsavat adtunk. A reakció kivitelezése és a tisztítás is azonos módon történt. Mindkét eluenssel ellenőrizve radiokémiailag tiszta (27b) terméket kaptunk.

Termelés: 1020 GBq (27,6 mCi), 55 %.

1. táblázat  
A trícíált izomorfin származékok kromatográfiás adatai és kitermelése

Vegyület	R <sub>f</sub>		Radioak- tivitás		Termelés %
	A	B	MBq	(mCi)	
DIHIM	0,18	0,06	4950	(134)	77,0
DIHIM- monometil-fumarát	0,32	0,18	367	(9,94)	40,0
DIHIM- klóracetát	0,37	0,11	398	(10,8)	43,0
14-OH-DIHIM	0,35	0,12	7490	(473)	90,0
14-OH-DIHIM- monometil-fumarát	0,63	0,38	702	(19,0)	76,0
14-OH-DIHIM- klóracetát	0,59	0,38	1020	(27,6)	55,0

**A:** kloroform-aceton-metanol-ammonium-hidroxid 40:30:10:5

**B:** etilacetát-metanol-trietil-amin 90:20:5

A négy irreverzibilis ligand moláris aktivitását nem adtuk meg, mert az igen kis mennyiségű termékek UV spektrumaiból csak nagy hibával lettek volna meghatározhatók. A valószínű moláris aktivitások becsülhetők a trícíált aminokból, mivel a kapcsolási reakciók nem érintik a molekula 7,8-as helyzetét, ahol a trícium található.

A későbbiekben kiderült, hogy az UV spektrumok bizonytalansága ismételt kromatográfiás tisztítással nő, amit a kromatográfiás rétegen adszorbeálódott szennyeződések okoztak. A probléma kiküszöbölésére a

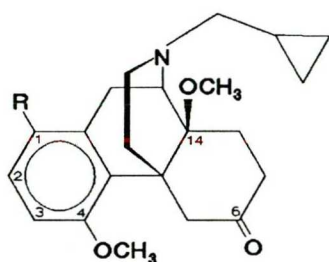


preparatív tisztításhoz használt vékonyréteg lapokat felhasználás előtt spektroszkópai tisztaságú etanollal leszálló kromatográfiás megoldással [108] 2-3 napig mostuk és 110 °C-on 1 óra hosszát aktiváltuk. Ezzel a módszerrel sikerült elérni, hogy a visszanyert anyag tiszta és UV spektruma a mennyiségi meghatározásra alkalmas legyen. Az így számított moláris aktivitások mind a négy irreverzibilis ligandra megegyeztek a kiindulási amin moláris aktivitásával, ami azt bizonyítja, hogy a 6-os aminocsoport szubsztitúciója nem változtatja meg a vegyületek moláris aktivitását.

#### 4.2. Tríciált ciprodim előállítás

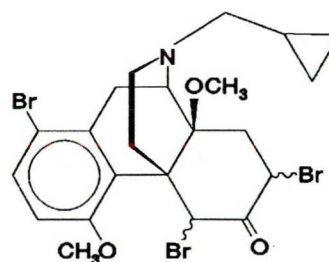
A ciprodim [(-)-17-(ciklopropil-metil)-4,14 $\beta$ -dimetoxi-morfinán-6-on, (28a)] egy nemrégiben felfedezett *mű* opioid receptor szelektív antagonistája [109,110], amely ezidáig a legnagyobb *mű* szelektivitást mutatta a nem peptid ligandok közül. Reverzibilitása mellett a leglényegesebb tulajdonsága, hogy tiszta antagonistaként viselkedik [111].

Pozitív tulajdonságai indokolták, hogy ezt a *mű* ligandumot későbbi vizsgálatok céljára jelzett formában állítsuk elő.



- a: R=H (ciprodim)  
 b: R=Br  
 c: R=<sup>3</sup>H

28



29

#### 4.2.1. 1-bróm-ciprodim enzimatisz szintézise

Laboratóriumunkban korábban történtek próbálkozások a ciprodin brómozására. Mivel az aromás gyűrűben történő monobrómozásra tett kísérletek nem vezettek egységes eredményre, a szokásos brómozási eljárással a tribróm származékot állították elő: a ciprodinot szobahőmérsékleten 3 ekvivalens elemi brómmal reagáltatták jégecet oldatban. A reakció a várt **(29)** 1,5,7-tribróm-ciprodinot eredményezte, ennek trícilása azonban nem vezetett egységes termékhez, és az elegy tisztítása vékonyréteg-kromatográfiásan megoldhatatlannak bizonyult.

A probléma kiküszöbölésére monobróm származék előállítását tűztük ki célul, azonban a korábbi kémiai módszer helyett enzimatisz halogénezéssel próbálkoztunk. Kísérleteinkhez a klórperoxidáz (EC 1.11.1.10, *Sigma*) enzimet választottuk. 44,67 mg (102  $\mu\text{mol}$ ) ciprodin·HBr sót 4 ml 3,6-os pH-jú acetátpufferben (0,1 M) oldottunk, és hozzáadtuk 54,87 mg (460  $\mu\text{mol}$ ) KBr és 565  $\mu\text{l}$  3 %-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu\text{mol}$ ) oldatát. A reakció 229 U enzim hozzáadásával indult, és vékonyréteg-kromatográfiás ellenőrzés alapján 10 perc alatt befejeződött. Ezután vizes ammónia-oldattal az elegy pH-ját 8-ra állítottuk, és a szabad bázist 3x5 ml kloroformmal extraháltuk. A szerves fázisokat egyesítettük, amelyek bepárlása után 35,2 mg (79 %) színtelen kristályos maradékot kaptunk. Ezt abs. etanolból átkristályosítva 20,2 mg tiszta **(28b)** terméket nyertünk, amelynek szerkezetét analitikai módszerekkel igazoltuk.



## 2. táblázat

A ciprodin és az 1-bróm-ciprodin vékonyréteg-kromatográfiás adatai

	$R_f$	
	ciprodin	1-bróm-ciprodin
<b>A</b>	0,38	0,56
<b>B</b>	0,72	0,80
<b>C</b>	0,28	0,51

**A:** kloroform-metanol 9:1

**B:** kloroform-metanol-cc. ammónia 90:10:1

**C:** diklór-metán-metanol 9:1

Az anyag vékonyréteg-kromatográfiás tulajdonságai eltértek a ciprodinétól, az adatok a 2. táblázatban láthatók. Három futatórendszerben hasonlítottuk össze a ciprodinot a brómszármazékkal, és az utóbbi mindegyikben nagyobb  $R_f$  értékkel vándorolt, ami általában jellemző a halogénnel helyettesített morfin-származékokra.

Termelés: 20,2 mg (45 %), o.p. 160-162 °C.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), (ppm): 7,37 (d,  $J=8,2$ ; 1 H, aromás), 6,64 (d,  $J=8,2$ ; 1 H, aromás), 3,82 (s, 3 H; 4-OMe), 3,42 (s, 3 H; 14-OMe).

EI-MS: ( $m/e$ ), ( $M^+$ ): 433 (9 %), 403 (47 %), 392 (15 %), 306 (30 %).

A tömegspektrumból látható volt, hogy a reakció monobróm származékot eredményezett, azonban a halogén helye nem volt egyértelműen eldönthető az egyszerű  $^1\text{H-NMR}$  spektrum alapján. A bróm szubsztituens 1-es helyzetét NOE különbségi spektroszkópia [112] erősítette meg, amit hasonlóan végeztünk el, mint Davies és munkatársai [113] az 1-bróm-kodein esetében.

#### 4.2.2. 1-bróm-ciprodim trícíálása

A redukív dehalogénezést a szokott módszerrel, heterogén katalitikus úton végeztük. 2,38 mg (5,45  $\mu\text{mol}$ ) 1-bróm-ciprodimot és 1  $\mu\text{l}$  (7,2  $\mu\text{mol}$ ) trietil-amint 1 ml DMF-ben oldottunk és 20 mg PdO/BaSO<sub>4</sub> (10 % PdO) katalizátor jelenlétében 555 GBq (15 Ci) hordozómentes tríciumgázzal redukáltuk. 60 perc után a reakciót leállítottuk, a katalizátort leszűrtük és metanollal mostuk. Az egyesített oldószerelegyet lepároltuk és a labilis tríciumot etanol-víz 1:1 oldószer háromszori lepárlásával (10-10 ml) távolítottuk el. 6,36 GBq (172 mCi) aktivitású nyersteget nyertünk. A tisztítás kétszeri vékonyréteg-kromatográfiás elválasztással történt, előmosott és aktivált szilikagél lapon. Az első tisztítást kloroform-metanol-cc. ammónia 90:10:1 eluenssel végeztük, autoradiográfiával meghatároztuk az aktív termék helyét, és a réteg lekaparása után leoldottuk. 1,695 GBq (45,8 mCi) aktivitású anyagot kaptunk, ami azonban az alkalmazott futtatórendszerekben (2. táblázat) nem bizonyult egységesnek, ezért újra megtisztítottuk. Másodsorra diklór-metán-metanol 9:1 összetételű futtatórendszert használtunk, és az autoradiográfiát követő lekaparás és leoldás után 1,22 GBq (32,9 mCi) aktivitású tiszta (**28c**) terméket kaptunk. Az anyagmennyiséget az UV spektrumból határoztuk meg 276,6 nm-nél ( $\epsilon = 2200 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ), ami alapján a végtermék moláris aktivitása 1170 GBq/mmol (31,6 Ci/mmol) volt. A második tisztítás után az aktív anyagot jelzetlen standarddal együtt mindhárom futtatószerrel kifejlesztettük, és a radiokromatogram alapján a termék radiokémiai tisztasága nagyobb, mint 95 % volt.

Termelés: 1,22 GBq (32,9 mCi), 1,04  $\mu\text{mol}$  (19 %).

Moláris aktivitás: 1170 GBq/mmol (31,6 Ci/mmol).

#### 4.3. Metilcsoportban trícíált morfin előállítása

Célunk trícíált morfin előállítása volt, amit a kettős kötés megtartásával nem lehetséges elemi tríciumgázzal, redukív módszerrel kivitelezni. Könnyen megoldható azonban a normorfin trícíált metil-jodiddal történő *N*-metilezésével. A trícíált metil-jodiddal általában egyszerű körülmények között kivitelezhető a jelölés elsősorban *N*-atomon, de alkoholok, tiolok is könnyen alkilezhetők vele, sőt aminosavak *C*-metilezésére is használják [114,115].

A kereskedelmi forgalomban kapható tritrício-metil-jodid igen nagy - gyakorlatilag elméleti - moláris aktivitású, amellyel speciális laboratóriumi felszerelések nélkül is igen nagy moláris aktivitású vegyületeket lehet előállítani. Ennek azonban az ára mellett egy másik hátránya, hogy nem tárolható hosszabb ideig sem maga a metil-jodid, sem pedig a vele jelölt anyag: a tapasztalatok szerint a radiolízis miatt a nagy moláris aktivitású metilcsoportot tartalmazó vegyületek néhány hónap alatt gyakorlatilag teljesen elbomlanak. Emiatt a monotrício-metil-jodid lehetőleg elméleti moláris aktivitással történő laboratóriumi előállítása a radiokémikusok körében régóta kitűzött cél. A probléma megoldását nehezíti az a követelmény, hogy a metil-jodidon kívül ne legyen jelen más illékony komponens, és a szintézis lehetőleg "egy-kémcső reakció" legyen. Közel elméleti moláris aktivitást sikerült elérni bisz-klórmetil-éter prekursor trícíálásával [116], ez azonban veszélyes karcinogén, emellett illékony és nehezen kezelhető anyag. Ezt a hátrányt Saljoughian és munkatársai [117] klórmetil-fenil-szulfid prekursor alkalmazásával küszöbölték ki, azonban egyfelől a trício-tioanizol folyadék halmazállapota miatt még mindig nem az ideális metil-jodid forrás, másrészt ennek hasítása meglehetősen lassú (48 óra 150 °C-on). 4-bifenilsav-klórmetil-észter prekuzorral [118] megvalósítható a könnyű kezelhetőség

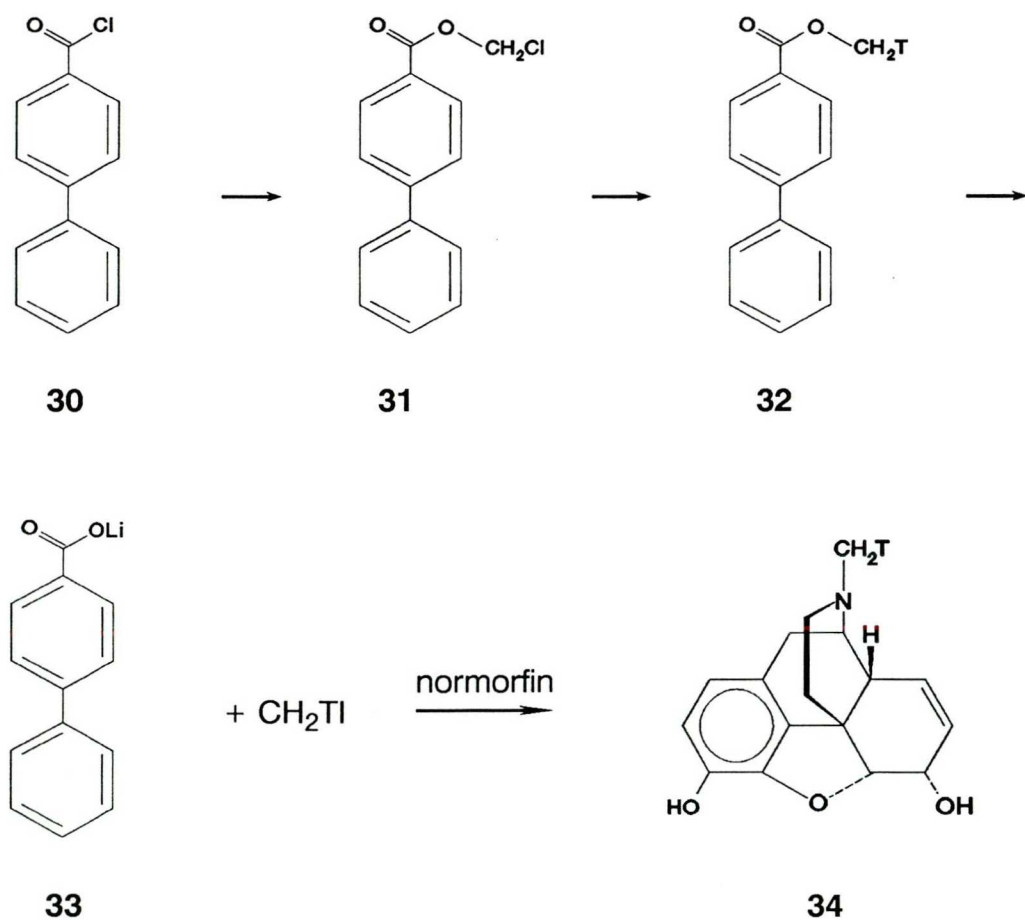
vákuumkészülékben és viszonylag gyorsabbak a reakciók, bár az így kapott metil-jodid moláris aktivitása kevesebb, mint fele az előző eljárással kapottnak.

Az irodalom [117] alapján a metil-jodidot metilcsoportban trícíált 4-bifenilsav-metil-észter LiI-dal történő hasításával állítottuk elő, s a képződött metil-jodidot *in situ* felhasználtuk a normorfin metilezésére.

Munkánk így a következő részekből állt:

- nem radioaktív klórmetil-észter előállítás és tisztítása,
- a klórmetil-észter katalitikus dehalohidrogénezése, illetve dehalotrícíálása, majd a termék tisztítása,
- a trícíált metil-jodid előállítása és *in situ* N-metilezés.

A szintézis lépései a 3. ábrán láthatók.



3. ábra

#### 4.3.1. A metil-jodid triciált prekursorának előállítása

A klórmetil-észter előállítása:

A triciálás prekursorául szolgáló 4-bifenilsav-klórmetil-észtert az irodalomban [119] leírt eljárással, 4-bifenil-karbonil-klorid és formaldehid reakciójával állítottuk elő: 1,4 g (6,5 mmol) 4-bifenil-karbonil-kloridot 10 ml száraz, tisztított benzolban oldottunk, hozzáadtunk 1,5 g (50 mmol) paraformaldehidet és nyomnyi mennyiségű vízmentes  $ZnCl_2$ -ot. Másfél óras refluxálás után az oldószert bepároltuk. A tisztításhoz nem állt rendelkezésre preparatív radiális kromatográfiás készülék, így az irodalomtól eltérően közönséges vékonyréteg-kromatográfiával végeztük szilikagél lapon. A Saljoughian és munkatársai [118] által megadott futtatórendszerekben az anyagok a startról el sem mozdultak, így az elválasztás körülményeit magunk dolgoztuk ki. Legjobb eluensnek a tiszta kloroform bizonyult, ebben a klórmetil-észter  $R_f=0,74$  retenciós faktorral futott (Kieselgel 60  $F_{254}$ , Merck). Mivel a reakcióban igen sok melléktermék is keletkezett, először klórtartalmú vegyületekkel színreakciót adó difenil-amin-cink-klorid reagenssel valószínűsítettük a kívánt termék helyét. Ezután preparatív vékonyréteg lapon 100 mg-onként tisztítottuk a reakcióelegyet. Az adszorbens lekaparása és az anyag leoldása után a kapott anyagot éter-petroléter elegyből átkristályosítottuk. A terméket az olvadáspontja alapján kívántuk azonosítani, azonban a mért olvadáspont (106,5-107,5 °C) mintegy 4-5 °C-kal volt magasabb az irodalminál (101-102 °C, [118]). Mivel ez volt az egyetlen klórtartalmú anyag a vékonyréteg lapon, így az anyag minőségéről végül  $^1H$ -NMR spektruma alapján győződünk meg, ami megegyezett az irodalomban [118] közölttel.

UV spektroszkópia:  $\epsilon_{279,6}=27200 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$  kloroformban.

#### 4-bifenilsav-metil-észter standard előállítása (31)

1,4 g (6,5 mmol) 4-bifenil-karbonil-kloridhoz 10 ml benzolban azonos mennyiségű (6,5 mmol) piridint adtunk, majd fölös mennyiségű metilalkohollal szobahőmérsékleten kb. 1 óráig kevertettük. Az elegyhez kloroformot adtunk, majd a piridin nagyobb részét és a piridinium-hidrokloridot vízzel kiráztuk. A szerves fázis bepárlása után a terméket forró etanolból aktív szenes derítés után kristályosítottuk. Azonosítottuk olvadáspontja (117-118 °C) és  $^1\text{H-NMR}$  spektruma alapján. Az előzőekben leírt vékonyréteg-kromatográfiás körülmények között  $R_f=0,57$  retenciós értékkel futott.

UV spektroszkópia:  $\epsilon_{272,8}=22500 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$  kloroformban;

$\epsilon_{205,8}=24300 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{272,4}=24600 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$  etanolban.

#### 4-bifenilsav-klórmetil-észter dehalo-hidrogénezése:

Az inaktív előkísérletben 5,2 mg (20  $\mu\text{mol}$ ) klórmetil-észtert 1 ml dimetilformamidban oldottunk, hozzáadtunk 10 mg PdO-t és 5  $\mu\text{l}$  trietil-amint. 66 kPa (500 torr) hidrogéngázzal 2 órás reakcióidő után teljes átalakulást tapasztaltunk, vékonyréteg-kromatográfiával követve a reakciót.

#### [ $^3\text{H}$ -metil]4-bifenilsav-metil-észter előállítása:

10,4 mg (40  $\mu\text{mol}$ ) klórmetil-észtert (31) 1 ml DMF-ben oldottuk, hozzáadtunk 12 mg PdO-ot, 8  $\mu\text{l}$  trietil-amint, 555 GBq (15 Ci) aktivitású tríciumgázt és 6 óráig kevertettük, majd a labilis tríciumot 3x10 ml 50 %-os vizes etanol lepárlásával eltávolítottuk. Összesen 18,5 GBq (500 mCi) nyersterméket kaptunk. Ebből 3,7 GBq-t (100 mCi) vékonyréteg-kromatográfiásan megtisztítottunk. Mivel a kisebb anyagmennyiség miatt itt nem volt mód kristályosítással is tisztítani a terméket, a két anyagot jobban elválasztó benzolt alkalmaztuk eluensként (Kieselgel 60  $F_{254}$ , Merck; klórmetil-



észter (**31**)  $R_f=0,47$ , metil-észter  $R_f=0,21$ ). 1 órás autoradiográfia után az adszorbenst lekapartuk és etanollal extraháltuk. 1,18 GBq (31,9 mCi) aktív anyagot kaptunk.

Anyagmennyisége UV spektruma alapján 1,67 mol volt.

Moláris aktivitása 707 GBq/mmol (19,1 Ci/mmol).

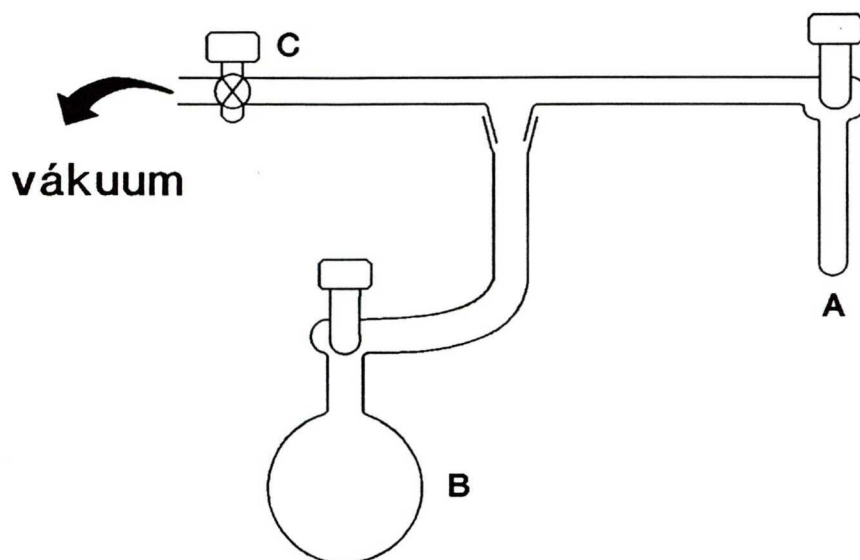
#### 4.3.2. A normorfin N-metilezése triciált metil-jodiddal

A metilezést a 4. ábrán látható készülékben végeztük. A reakció a folyamatosan átdesztilláló metil-jodiddal  $K_2CO_3$  savmegkötő jelenlétében zajlott. A "reaktor" leegyszerűsített felépítése miatt az anyag mozgatása csak párologtatással és cseppfolyós nitrogénnel történő kifagyasztással történhetett. Mivel ebben az esetben is igen kicsi anyagmennyiséggel dolgoztunk, célszerű volt az egész folyamatot ugyanannyi nem jelzett anyaggal kidolgozni a veszteség minimálisra csökkentése érdekében. A képződött metil-jodidot külön nem detektáltuk, hanem a normorfinnal lejátszódó N-metilezési reakciójában képződő jelzett morfint használtuk "indikátorként", amelynek képződését vékonyréteg-kromatográfiásan detektáltuk (UV-aktív szilikagél lap, kloroform-*n*-butanol-metanol-cc. ammónia 40:30:30:1; normorfin:  $R_f=0,18$ , morfin:  $R_f=0,42$ ). Optimálisnak találtuk a metil-észter/normorfin 1,5 arányt, ekkor a normorfin teljes mennyisége átalakult kevés kvaternereződött termék képződése mellett.

4-bifenilsav-metil-észter hasítása Lil-dal:

Oldószer nélküli kísérleteinkben a kapott metilezett termék mennyisége lényegesen elmaradt a várttól. Ezt feltehetően az okozta, hogy a 4-bifenilsav-metil-észter olvadék kis mennyisége miatt a heterogén fázisú reakcióelegyben

a komponensek érintkezése nem volt kielégítő. A legjobb eredményt DMF-es oldatban, kb. hatszoros LiI fölösleggel, 140 °C-on való melegítéssel kaptuk.



A metil-jodid előállítására szolgáló készülék

4. ábra

Az **A** csőbe 3,2 mg (15  $\mu$ mol) 4-bifenilsav-metil-észtert, 250  $\mu$ l DMF-et és 50 mg LiI-ot tettünk, a **B** lombikba 1 ml DMF-ben oldott 2,6 mg (10  $\mu$ mol) normorfint és 10 mg vízmentes  $K_2CO_3$ -ot. Mindkét edényt cseppfolyós  $N_2$ -nel hűtve az egész készüléket evakuáltuk, majd a **C** csappal lezártuk. Ezután a telített góztér kialakulása érdekében mindkét edényt hagytuk szobahőmérsékletre melegedni, majd az **A** csövet blokktermosztáttal melegíteni kezdtük. Kb. 60 °C elérése után (a LiI ekkor oldódott fel a DMF-ben) a **B** lombikot újra lehűtöttük cseppfolyós  $N_2$ -nel, hogy a képződő metil-jodid átdestilláljon. Az 1 órás reakcióidőt az **A** cső 140 °C-ra melegedéséig számítottuk, ekkor a **B** lombikot elzártuk, és a hűtését megszüntetve kb. 1/2 óráig szobahőmérsékleten mágneses keverővel kevertettük. Eközben az **A** csövet tovább melegítettük. Ezután a lombikot újra lefagyasztottuk, és kinyitva

további 1/2 óráig folytattuk a metil-jodid átdesztillálását, majd a lombikot elzárva megismételtük az előbbi műveletet.

A lombiknak a készülékről való eltávolítása után a metilezett termék képződését az előzőekben leírt körülmények között vékonyréteg-kromatográfiásan ellenőriztük.

#### 17- $^3\text{H}$ -metil]-morfin előállítása normorfinból:

Az inaktív *N*-metilezés körülményeivel megegyező módon jártunk el: az **A** csőbe bevittük az előzőekben kapott 1,18 GBq (31,9 mCi, 1,67  $\mu\text{mol}$ ) prekuzort és 50 mg LiI-ot. A lombikba 1,3 mg (5  $\mu\text{mol}$ ) normorfint és 10 mg  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -ot mértünk be. A további műveleteket a fentebb leírt módon végeztük. A reakció befejezése után az aktív anyagot a lombikból átvittük másik edénybe, és az esetleg jelenlévő illékony trícíált vegyületeket 10 ml 50 %-os vizes etanol lepárlásával eltávolítottuk. 370 MBq (10 mCi) nyersterméket kaptunk, amelyet vékonyréteg-kromatográfiával elválasztottunk és 7,5 órás autoradiográfiával a trícíált morfin helyét megállapítottuk. Az adszorbens lekaparása és etanolos extrakciója után 154 MBq (4,17 mCi) aktív morfint kaptunk. Anyagmennyisége az UV spektruma alapján 0,263  $\mu\text{mol}$  volt, így moláris aktivitása 585 GBq/mmol-nak (15,8 Ci/mmol) adódott.

Mindezek alapján a módszer alkalmasnak látszik megfelelően nagy moláris aktivitású trícíált metil-jodid, illetve vele metilcsoportban jelzett vegyületek kényelmes előállítására. A prekuzor nem illékony, tárolása nem jelent nehézséget, és felhasználása során az egyetlen illékony és reaktív komponens a metil-jodid.

#### 4.4. Naltrindol jelölése

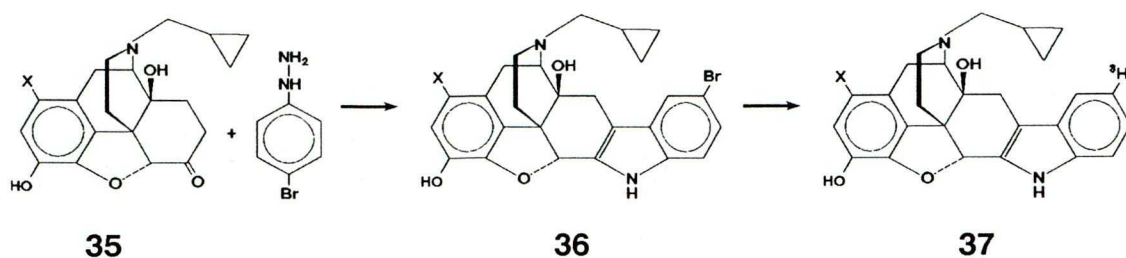
A message-address koncepció alapján [120,121] Portoghese és munkatársai az elmúlt években számos szelektív opioid ligandot állítottak elő. Ezek közé tartozik a naltrindol [(-)-17-(ciklopropil-metil)-6,7-dehidro-4,5 $\alpha$ -epoxi-3,14 $\beta$ -dihidroxi-6,7-2',3'-indolomorfinán)], amely a morfinváz C gyűrűjéhez kondenzált indolvázat tartalmazó vegyület és egyike a máig ismert legnagyobb aktivitású és legszelektívebb *delta* opioid ligandumoknak [122,123]. Ezen félszintetikus ópiát kiváló farmakológiai tulajdonságai alapján [122,124,125] érdemesnek bizonyult radioaktív formában való előállításra, majd további biológiai jellemzésre [126].

A jelzett naltrindol szintézisét kétféleképpen végeztük el, először az egy tríciumatomot tartalmazó [5'-<sup>3</sup>H]naltrindolt állítottuk elő, utána pedig a kétszeresen triciált [1,5'-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]naltrindolt. A triciálást mindkét esetben a brómozott prekursorok redukzív dehalogénezésével végeztük.

##### 4.4.1. A brómozott prekursorok szintézise

A naltrindol brómozott származékának előállítását a Portoghese és munkatársai eljárása szerint [123] a Fischer indol-szintézissel végeztük: naltrexon és fenil-hidrazin (illetve ezek brómozott származékai) savas oldatban, katalizátor jelenlétében történő refluxálásával. A tisztítás szempontjából előnyösnek tartottuk a metanosós sav-oldattal történő refluxálást, mert így a terméket kivéve minden komponens jól oldódott éterben, amivel a reakció befejezése után dekantáltuk. A szintézis és az azt követő triciálási lépés sémája a 5. ábrán látható.





5. ábra

#### 4.4.1.1. 5'-bróm-naltrindol előállítása (36, X=H)

190 mg (0,50 mmol) naltrexon hidrokloridot [(-)-17-(ciklopropil-metil)-3,14β-dihidroxi-4,5α-epoxi-morfinán-6-on] és 170 mg (0,76 mmol) *p*-bróm-fenilhidrazin hidroklorid HCl-dal telített metanolos oldatát öt óra hosszat refluxáltuk. Az oldószer, majd újabb 3x5 ml metanol lepárlása után az etanolban feloldott reakcióelegyből éter hozzáadására kicsapódott az 5'-bróm-naltrindol, amelynek szerkezetét <sup>1</sup>H-NMR és EIMS spektrumok megerősítették. Az NMR csúcsok hozzárendelését Houlihan [127] összefoglaló művében leírt indolvázás vegyületek spektrumainak elemzése segítette.

Termelés: 202 mg (76 %), o.p.: 280 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), (ppm): 7,49 (s, 1 H; 4'-H); 7,32 (d, 1 H; 7'-H); 7,20 (d, 1 H; 6'-H); 6,67-6,58 (dd, 2 H; 1-H, 2-H); 5,69 (s, 1 H; 5β-H).

EIMS (m/e), (M<sup>+</sup>): 494.

#### 4.4.1.2. 1,5'-dibróm-naltrindol előállítása (36, X=Br)

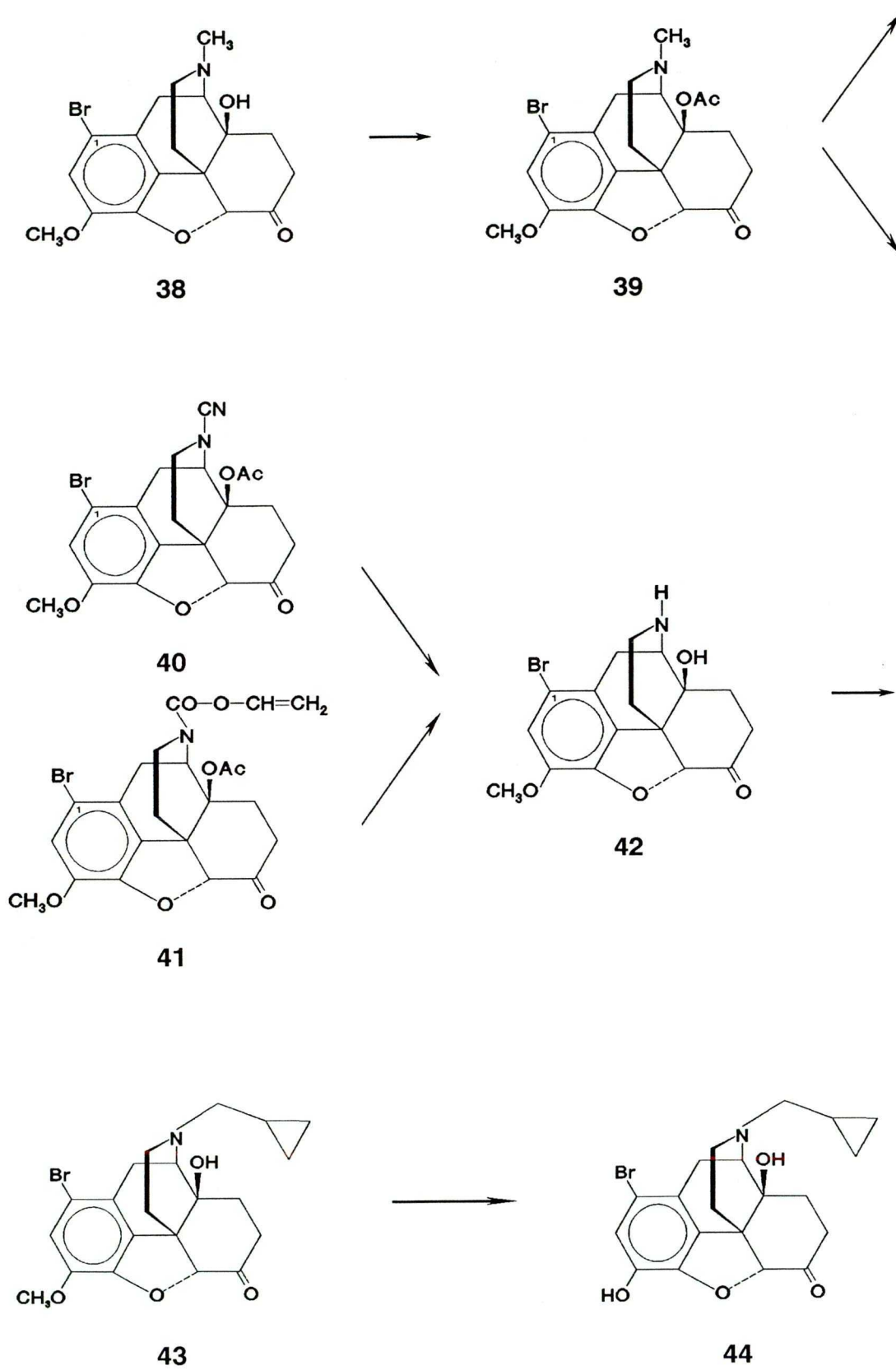
A dibróm-naltrindolt ugyancsak a Fischer indol-kondenzációval állítottuk elő, 4-bróm-fenilhidrazin és 1-bróm-naltrexon reakciójával (5. ábra). Az 1-bróm-naltrexon előállítására a szakirodalomban nem találtunk példát.

Szintézisét 14-hidroxi-dihidrokodeinból kiindulva kerülő úton valósítottuk meg, mivel a morfinváz oxidációra rendkívül érzékeny [34,37].

A szintézis lépései a 6. ábrán láthatók, a részletek az alábbiakban foglalhatók össze: A 14-hidroxi-dihidrokodeinon HBr sóját vizes közegben brómozva az 1-bróm-14-hidroxi-dihidrokodeinont **(38)** kaptuk. Ezt a vegyületet, valamint acetil-származékát **(39)** korábban Speyer és Sarre leírta [128].

A továbbiakban **(39)** *N*-demetilézési lehetőségeit vizsgáltuk. A von Braun reakcióban brómcíánnal **(40)** képződött, míg klórszénsav-vinil-észtert alkalmazva a **(41)** uretán származékot kaptuk. Mindkét vegyület hidrolízise az 1-bróm-14-hidroxi-dihidrokodeinont **(42)** eredményezte. **(40)** hidrolízisét 10 %-os sósavval hajtottuk végre, míg **(41)** átalakítását három lépésben valósítottuk meg: 1.) sósavgáz addíció a vinilcsoportra, 2.) metanolos forralás, 3.) *O*-deacetilezés 10 %-os sósavval. **(42)** reakciója ciklopropil-metil-bromiddal dimetil-formamidban az 1-bróm-naltrexon-3-metil-étert **(43)** eredményezte. A célvegyület 1-bróm-naltrexonhoz **(44)** bór-tribromidos *O*-demetilézéssel jutottunk el.

Meglepő módon az átalakulás a  $BBr_3$  nagy feleslege ellenére sem volt teljes. A végterméket és a kiindulási vegyületet többszöri oszlopkromatográfiával sikerült elválasztani.



6. ábra

1-bróm-14-hidroxi-dihidrokodeinon (**38**)

A célvegyületet Speyer és Sarre [128] módszerével állítottuk elő.

Termelés: 90 %; O.p.: 181-183 °C (Irodalmi o.p.: 182 °C).

$^1\text{H-NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ ), (ppm); 6,95 (s, 1 H; 2-H), 4,7 (s, 1 H; 5-H), 3,95 (s, 3 H; OMe), 2,4 (s, 3 H; N-Me).

MS: (m/e), ( $\text{M}^+$ ); 393 (90 %), 336 (14 %), 308 (32 %).

1-bróm-14-acetoxi-dihidrokodeinon (**39**)

Az 1-bróm-14-hidroxi-dihidrokodeinon acetilezését Speyer és Sarre [128] szerint végeztük.

Termelés: 60 %; O.p.: 215-217 °C (etanolból kristályosítva) (Irodalmi o.p.: 217 °C).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), (ppm); 6,9 (s, 1 H; 2-H), 4,7 (s, 1 H; 5-H), 4,25 (d, 1 H; 9-H), 3,9 (s, 3 H; OMe), 2,35 (s, 3 H; N-Me), 2,2 (s, 3 H; OAc).

MS (m/e), ( $\text{M}^+$ ); 435 (90 %), 392 (66 %).

N-ciano-1-bróm-14-acetoxi-dihidro-norkodeinon (**40**)

8,0 g (18,3 mmol) (**39**)-t 50 ml száraz kloroformban oldottunk és hozzáadtuk 4,1 g (39 mmol) brómcían 40 ml kloroformos oldatát. 8 óra forralás után újabb 4,1 g brómciant adtunk a reakcióelegyhez, majd ismételt 8 órás forralás után vékonyréteg-kromatográfiás ellenőrzés alapján a kiindulási vegyület elreagált. Az oldat bepárlása után a maradékot etanolból kristályosítottuk.

Termelés: 4,0 g (49 %), o.p.: 277-280 °C.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), (ppm); 7,0 (s, 1 H; 2-H), 4,85 (d, 1 H; 9-H), 4,7 (s, 1 H; 5-H), 3,9 (s, 3 H; OMe), 2,25 (s, 3 H; OAc).

EIMS (m/e), ( $\text{M}^+$ ); 447 (32 %).



N-viniloxikarbonil-1-bróm-14-acetoxi-dihidro-norkodeinon (**41**)

5,5 g (12,5 mmol) 1-bróm-14-acetoxi-dihidrokodeinont 70 ml szárított 1,2-diklór-etános oldatához 2,5 g nátrium-hidrogénkarbonátot, valamint 5,0 ml (59 mmol) klórszénsav-vinil-észtert adtunk. 8 óra kevertetés és refluxálás, majd további 2,5 ml klórszénsav-vinil-észter hozzáadása és 8 órás refluxálás után vékonyréteg-kromatográfia szerint a reakció lejátszódott.

A szervesen só leszűrése után a szűrletet bepároltuk, a maradékot kloroformban oldottuk, majd az oldatot vízzel mostuk és szárítottuk. A kapott nyersterméket metanolból kristályosítottuk.

Termelés: 4,12 g (66 %) o.p.: 202-204 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), (ppm); 7,2-7,1 (m, 1 H), 6,95 (s, 1 H; 2-H), 5,8-5,6 (m, 1 H), 5,0-4,8 (m, 1 H), 4,7 (s, 1 H; 5-H), 4,5 (m, 1 H), 3,9 (s, 3 H; OMe), 2,15 (d, 3 H; acetyl-protonok).

MS (m/e), (M<sup>+</sup>); 491 (3 %).

1-bróm-14-hidroxi-dihidro-norkodeinon I. (**40**-ből **42**)

4,0 g (**40**)-t 50 ml 10 %-os sósavban szuszpendáltunk és nitrogén atmoszférában 15 órát forraltuk. Lehűtésre a norvegyület klórhidrátja kivált, amit szűrés és hideg vízzel való mosás után bázissá alakítottunk. A termék vékonyréteg-kromatográfiásan homogénnek bizonyult.

Termelés: 2,0 g (59 %), o.p.: 212-214 °C (etanolból kristályosítva).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), (ppm); 6,9 (s, 1 H; 2-H), 4,7 (s, 1 H; 5-H), 3,9 (s, 3 H; OMe).

MS (m/e), (M<sup>+</sup>); 379 (100 %) 294 (35 %).

1-bróm-14-hidroxi-dihidro-norkodeinon II. (**41**-ből **42**)

(**41**) 4 g-ját 80 ml szárított diklór-metánban oldottuk majd kevertetés és hűtés közben 1 órán át száraz sósavgázt vezettünk be. Ezután a reakcióelegyet bepároltuk, a maradékot 100 ml abs. metanollal forraltuk 2 óra

hosszat. A metanol lepárlása után a maradékot 70 ml 10 %-os sósavval melegítettük 100 °C-on 4 óráig. A kristályos klórhidrát kivált, és a fentiek szerint bázissá alakítottuk.

Termelés: 2,0 g, 65 %.

#### N-ciklopropil-metil-1-bróm-14-hidroxi-dihidro-norkodeinon (**43**)

1,0 g (2,6 mmol) (**42**) 30 ml absz. dimetil-formamidos oldatához hozzáadtunk 0,5 g nátrium-hidrogén-karbonátot és 0,4 ml (3,0 mmol) ciklopropil-metil-bromidot. A reakcióelegyet 20 órát kevertettük 90 °C-on. A szervesetlen só kiszűrése után a szűrletet vákuumban bepároltuk. A maradékhoz vizet adtunk és kloroformmal extraháltuk. A kloroform lepárlása után kapott nyers termék színtelen olaj.

A tiszta frakciók éterrel eldörzsölve kristályosodtak.

Termelés: 0,9 g (79 %), o.p.: 116-119 °C.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), (ppm); 6,9 (s, 1 H; 2-H), 4,7 (s, 1 H; 5-H), 3,9 (s, 3 H; OMe), 1,0-0,2 (m, 5 H; ciklopropil-protonok).

MS (m/e), ( $\text{M}^+$ ); 433.

#### 1-bróm-naltrexon (**44**)

30 ml száraz kloroformban 2,0 ml (21 mmol) bór-tribromidot oldottunk, majd jeges hűtés, kevertetés és nitrogénbevezetés közben (**43**) 0,9 g-jának (2 mmol) 30 ml kloroformos oldatát csepegtettük be 20 perc alatt, majd 1 óra kevertetés következett jeges hűtés közben, végül 1 óra szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet jégre öntöttük, a vizes fázist pH=9-re állítottuk 10 %-os ammónium-hidroxiddal. A fázisokat elválasztottuk, a vizes fázist 3x50 ml kloroformmal extraháltuk. A kloroformos extraktumot  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -on szárítottuk és bepároltuk, végül a nyers terméket kétszer oszlopkratografáltuk

(szilikagél, benzol-metanol 9:1). Tiszta terméket kaptunk, ami acetontól lassan kristályosodott.

Termelés: 0,3 g (34 %), o.p.: 186-188 °C.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), (ppm); 6,92 (s, 1 H; 2-H), 4,68 (s, 1 H; 5-H), 1,0-0,2 (m, 5 H; ciklopropil-protonok).

MS (m/e), ( $\text{M}^+$ ); 419 (100 %).

#### 1,5'-dibróm-naltrindol (**36**, X=Br)

A morfinváz és a fenilhidrazin rész kondenzációját a már ismert módon végeztük, a reakció sémája a 5. ábrán (51. oldal) látható (**35** és **36**, X=Br).

A szintézist 16 mg (32  $\mu\text{mol}$ ) 1-bróm-naltrexonból kiindulva végeztük el, amelyet 14,7 mg (66  $\mu\text{mol}$ ) 4-bróm-fenilhidrazin hidrokloriddal metanolos HCl-oldatban 5 óra hosszat refluxáltunk. Az oldószer lepárlása után a maradék HCl-ot 3x5 ml metanol lepárlásával távolítottuk el. A szilárd maradékot kb. 0,7 ml etanolban oldottuk, majd az éter hozzáadására kicsapódott terméket ammónia-oldat lepárlásával bázissá alakítottuk. Tisztaságát vékonyréteg-kromatográfiásan és HPLC-vel (Vydac 218TP104 oszlop, 35 % acetonitril 0,1 %-os trifluor-ecetsavban, 1 ml/perc áramlási sebesség, t=18,5 perc) ellenőriztük.

Az anyag  $^1\text{H-NMR}$  spektruma és tömegspektruma alapján a kívánt halogénezett prekursornak bizonyult.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ), (ppm): 7,49 (s, 1 H; 4'-H); 7,33 (d, 1 H; 7'-H); 7,21 (d, 1 H; 6'-H); 6,92 (s, 1 H; 2-H); 5,74 (s, 1 H; 5 $\beta$ -H).

EIMS (m/e), ( $\text{M}^+$ ): 572 (76 %), 531 (43 %).

#### 4.4.2. Vékonyréteg-kromatográfiás körülmények kidolgozása a naltrindol és brómozott prekursorainak elválasztására

Kísérleteink során először a naltrindol és az 5'-bróm-naltrindol elválasztását tűztük ki célul, mivel a korábban leírt [123] kloroform-metanol-cc. ammónia 90:10:0,5 futtatórendszerrel az elválasztás nem volt lehetséges. A halogénszármazékok tisztítására alkalmas körülményeket csak HPLC-vel dolgozták ki [129], és ez az irodalomban csak vizsgálatainkat követően jelent meg.

Az említett futtatórendszer különböző módosításai - más halogénezett oldószerek, más alkoholok, eltérő arányok - nem vezettek eredményre, így más jellegű eluensekkel próbálkoztunk.

Elég jó elválasztást sikerült elérni az acetonitril-*n*-butanol-víz 40:60:5 összetételű futtatórendszerrel, amellyel a következő érdekes eredményre jutottunk: mind a naltrindol, mind halogénezett származékai (5'-bróm-, 6'-bróm-, 5'-klór- és 6'-klór-naltrindol) kétfoltos kromatogramot adtak  $R_f=0,23$ , illetve  $R_f=0,42$  retenciós értékkel. Megfigyelhető volt azonban az anyagmennyiségek két folt közötti megoszlásában, hogy az 5' helyzetben helyettesített származékok lényegesen nagyobb hányada futott a nagyobb retenciós értékű helyre, míg a 6'-helyettesített származékok a kisebb retenciós faktorú foltban dúsultak. A helyettesítetlen naltrindol megoszlása a két folt között kb. azonos volt. Ez a futtatórendszer tehát lehetőséget nyújtott arra, hogy a trícilálás során a nem teljes átalakulás miatt megmaradó prekursor legnagyobb részét - ennek mennyisége azonban igen kicsi, ha a halogén jódbrom volt - eltávolítsuk a jelzett végterméktől, mivel azt az alsó foltból nyertük ki.

Víz helyett 1 mólos sósavoldatot vagy jégecetet alkalmazva, a retenciós értékek és a foltok közötti megoszlás megváltozott, de a kétfoltosság megmaradt. Ha a vizet híg ammónia-oldattal helyettesítettük, vagy csupán a

kromatogramot ammóniagőzben fejlesztettük ki, minden anyag egyetlen foltban, közvetlenül az oldószerfront alatt futott.

Mindezek arra utaltak, hogy a komponensek sav-bázis tulajdonságai jelentős szerepet játszanak az elválasztásban. A naltrindol molekulájában található két nitrogénatom, illetve környezetük a legérzékenyebb az eluensek sav vagy bázis tartalmára. Közülük a 17-es piperidin-nitrogén elég messze van a halogénatomoktól, így várhatóan egyformán befolyásolja az indolrészben szubsztituált vegyületek elúciós tulajdonságait. Figyelmünket ezért elsősorban a kondenzált indolváz sav-bázis viselkedésére összpontosítottuk. Felvettük a naltrindol és a négy halogénszármazék UV-spektrumát 0,05 M HCl-oldatban, semleges oldószerben (vízben), és 0,05 M NaOH-oldatban  $I=0,5$  M azonos ionerősségnél, amit 0,5 M KCl-dal biztosítottunk.

A különböző savasság hatására elsősorban az indolvázra legjellemzőbb 200-250 nm tartományban következett be változás. A hosszabb hullámhossz-tartományban a sávalakok változatlanok maradtak, csupán néhány nm-es eltolódás látható.

A lúgos oldatban felvett spektrumok igen jelentős változást mutattak a semleges oldatban kapottakhoz képest, de gyakorlatilag mind az öt anyagnál megegyeztek. Ez azonosságot mutatott a kromatográfiás eredményekkel, amelyek szerint lúgos eluensekkel az  $R_f$  értékek mind az öt anyagnál megegyeztek.

Semleges és savas oldatban az azonosan helyettesített klór- és brómszármazékok spektrumai lényegében megegyeztek, a különbségeket a halogén szubsztituensek helyzete szabta meg. A spektrumok közötti különbség azonban eltérő mértékben, de hasonló volt mind az öt anyagnál: a 210 nm körüli sáv intenzitása kis mértékben nőtt a 230 nm körüli sáv intenzitásához képest, és 2-3 nm-rel a hosszabb hullámhosszú tartomány felé tolódott. A helyettesítetlen naltrindolnál volt legkisebb a változás, lényegében

alig észrevehető, így feltételeztük, hogy savas eluenssel a naltrindol elválasztható a halogénezett származéktól.

Az említett eredmények alapján legjobbnak találtuk a metanol-ecetsav-víz 1:1:8 összetételű rendszert, amellyel a trícíálás utáni tisztítás szempontjából lényeges anyagokra a retenciós értékek a következők voltak: naltrindol  $R_f=0,35$ , 5'-bróm-naltrindol  $R_f=0,18$ , 1,5'-dibróm-naltrindol  $R_f=0,13$  (Merck Kieselgel 60 F<sub>254</sub> lapon).

#### 4.4.3. A brómozott prekursorok trícíálása

A trícíálást a már ismert módon, hordozómentes tríciumgázzal végeztük PdO/BaSO<sub>4</sub> katalizátor jelenlétében.

##### 4.4.3.1. 5'-jelzett-naltrindol (37, X=H)

2,5 mg (4,72  $\mu$ mol) 5'-bróm-naltrindolt és 5  $\mu$ l (35  $\mu$ mol) trietil-amint 1 ml, molekulaszűrőn szárított DMF-ben oldottunk és 10 mg PdO/BaSO<sub>4</sub> (10 % Pd) katalizátort adtunk hozzá. A redukciót szobahőmérsékleten, 555 GBq (15 Ci) hordozómentes tríciumgáz jelenlétében 60 kPa (450 torr) nyomáson 60 percig végeztük, ennyi idő alatt a trícium fogyása befejeződött. A katalizátor leszűrése után a labilis tríciumot 3x10 ml 50 %-os vizes etanol lepárlásával távolítottuk el.

A nyerstermék összes aktivitása 3,66 GBq (99 mCi) volt. Összetételét vékonyréteg-kromatográfiásan vizsgáltuk szilikagél lapon (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck) két eluens rendszerrel, a radioaktivitás eloszlását *Berthold Radiochromatogram Tracemasterrel* mértük. A kloroform-metanol-cc. ammónia 90:10:0,5 futtatórendszerrel a nem jelzett standarddal megegyező helyen ( $R_f=0,47$ ) az aktivitás 82 %-a volt mérhető. Az acetonitril-*n*-butanol-víz

40:60:5 rendszerrel kapott radiokromatogram két fő csúcsot mutatott a nem jelzett standard két foltjának helyén ( $R_f=0,23$  és  $0,42$ ), amelyekben az aktivitás 28, illetve 36 %-a volt található. A tisztításhoz a korábbi tapasztalatok alapján az acetonitriles futtatórendszert választottuk, és autoradiográfiával megállapítottuk az aktív sávok helyét. A két fő sávot lekapartuk és spektroszkópai etanollal külön-külön leoldottuk a két anyagot a szilikagélről. Az alsó sávból kinyert anyag UV spektruma a naltrindoléval megegyezett, a másiké azonban teljesen különböző volt, így csak az előbbit tekinthettük jelzett naltrindolnak. A radioaktív tisztaság ellenőrzésére a kloroform-metanol-cc. ammónia 90:10:0,5 rendszert használtuk, amely alapján a termék 95 %-osnál tisztább volt. Az anyagmennyiséget az anyag UV spektruma alapján határoztuk meg.

Termelés:  $1,33 \mu\text{mol}$  (28 %), aktivitás  $1,01 \text{ GBq}$  (27,4 mCi).

Moláris aktivitás:  $785 \text{ GBq/mmol}$  (20,5 Ci/mmol).

#### 4.4.3.2. 1,5'-jelzett-naltrindol (37, X=Br)

Az első trícíálási kísérlet sikertelen volt, amit a következőképpen magyaráztunk: a tömegspektrum felvételéhez a sósavas sóból a szabad bázist ammónium-hidroxiddal szabadítottuk fel. Feltehetően a melléktermékként keletkező  $\text{NH}_4\text{Cl}$  inhibálta a trícíálást, sőt maga a katalizátor sem redukálódott. Ezt a feltételezést alátámasztotta, hogy a kontroll kísérletben, amelyben azonos körülmények között a reakcióelegyben a katalizátor, trietil-amin, az oldószer és kb. 50 mg ammónium-klorid volt, szintén nem indult meg a hidrogénezési reakció, ammónium-klorid távollétében viszont igen. Így előzetesen vékonyréteg-kromatográfiával megtisztítottuk a sótól kloroform-metanol-ammónia 90:10:0,5 rendszerben. A visszanyert anyagot ezután 1 ml dimetil-formamidban oldottuk és  $2 \mu\text{l}$  trietil-



amin bázis jelenlétében 555 GBq (15 Ci) tríciumgázzal katalitikusan (13,8 mg, 10 % PdO/BaSO<sub>4</sub>, Merck) dehalogénezük. A katalizátor leszűrése és a labilis trícium eltávolítása után (3x10 ml etanol-víz 1:1 elegy lepárlásával) az anyagot vékonyréteg-kromatográfiásan tisztítottuk meg: először a kloroform-metanol-ammónia 90:10:0,5 eluenssel, majd a réteg lekaparása és az anyag leoldása után az acetonitril-*n*-butanol-víz 40:60:5 eluenssel. Az anyag mennyiségét UV spektroszkópiával határoztuk meg.

A visszanyert aktivitás 396 MBq (10,7 mCi), a moláris aktivitás 1705 GBq/mmol (46,1 Ci/mmol) volt.

#### 4.4.4. Izomerizációs jelenség kimutatása radioaktív nyomjelzéssel

A tríciummal jelzett és a jelzetlen naltrindol egyaránt két, határozottan különböző retenciós faktorú foltot adott az acetonitril-*n*-butanol-víz 40:60:5 rendszerben ( $R_f=0,23$  és  $R_f=0,42$ ). A radioaktív termék tisztításakor mindkét sávot lekapartuk és jelzett anyagokat 95 %-os etanollal leoldottuk a szilikagél rétegről. Bár UV spektruma alapján csak a kisebb retenciós faktorú bizonyult naltrindolnak, ellenőrzésképpen mindkettőt megfuttattuk vékonyrétegen a kloroform-metanol-cc. ammónia 90:10:0,5 összetételű, és az acetonitril-*n*-butanol-víz 40:60:5 eluenssel.

Meglepő módon vékonyréteg-kromatográfiásan mindkét anyagféleség azonosan viselkedett: a kloroformos futtatóban a naltrindollal azonos helyre futottak, az acetonitriles eluenssel pedig ugyancsak a jelzetlen naltrindol standardéval megegyező helyeken két-két csúcsot kaptunk a radiokromatogramokon. A különböző eluensekkel kapott radiokromatogramok a 6. ábrán (64. oldal) láthatók. Ezek után nem jelölt naltrindollal is megismételtük az acetonitriles futtatóval végzett preparatív tisztítási eljárást, a

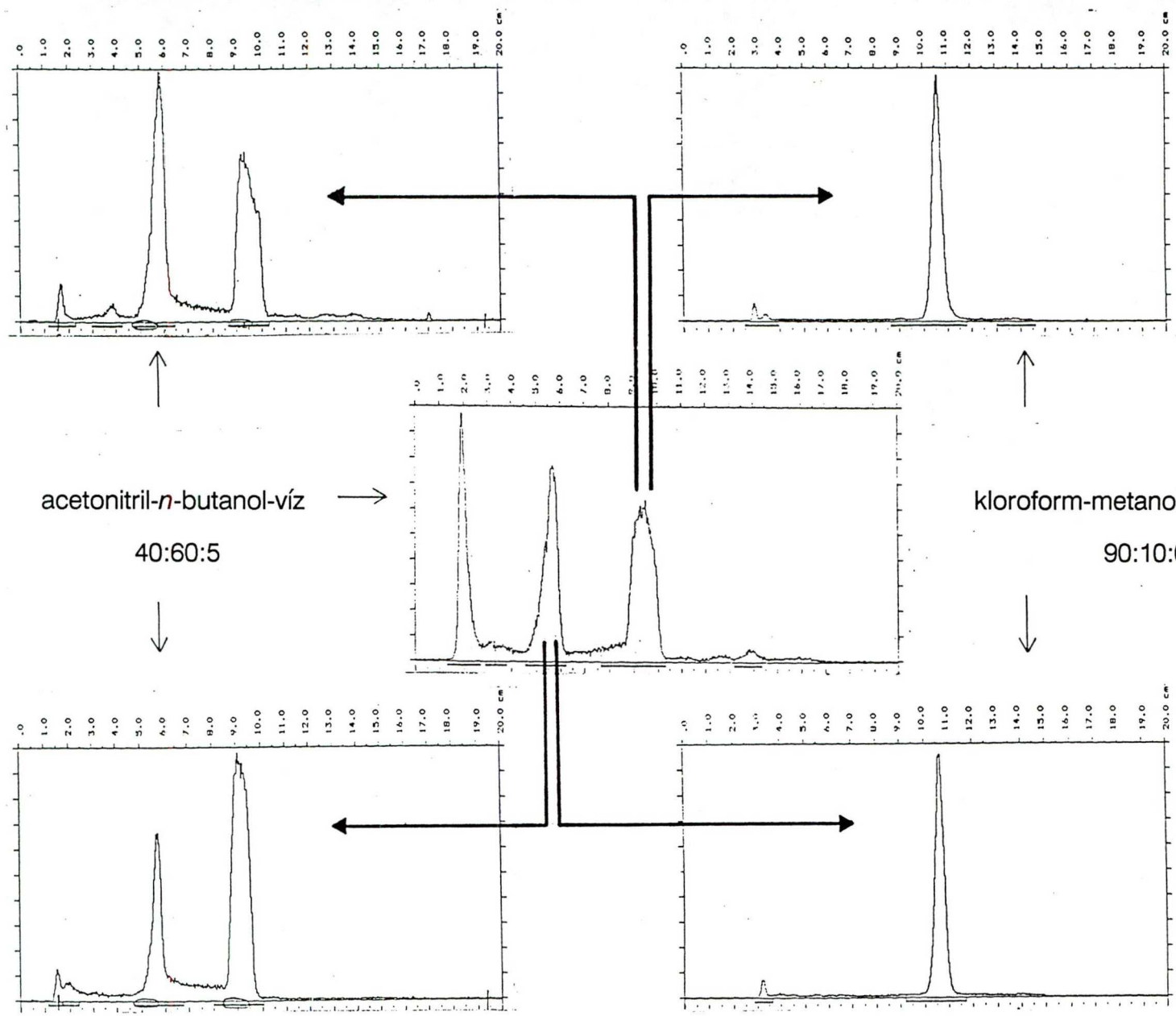


kapott két sáv helyén lekapartuk a réteget és leoldottuk a termékeket. Tömegspektrumuk megegyezett a naltrindoléval ( $M^+ = 415$ ; szabad bázis).

A fentiek alapján a morfinváz merevsége és az indolváz stabilis aromás volta ellenére a naltrindol esetében valamilyen szerkezeti izomériára (tautomériára) következtethetünk. A nagyobb retenciós faktorú komponens UV spektruma alapján az indolrészben következett be változás, hiszen a sávok helyzete és intenzitása is megváltozott, az indolra jellemző sáv szerkezet nem ismerhető fel. Összességében az UV spektrum átrendeződése a tautomer *3H*-indol (indolenin) szerkezet [130] kialakulását sejteti. Közvetlen, pl. NMR adatokkal a hasonló jellegű tautomerizációt más esetben sikerült bizonyítani [131], a naltrindol bonyolultabb szerkezete azonban nehezíti a jelenség tisztázását. Maga az izomerizáció (tautomerizáció) azonban a rendszer reverzibilis viselkedése alapján elég valószínű.

A jelzett naltrindol frakciók radiokromatogramjai

7. ábra



## 5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Munkánk során biológiailag aktív vegyületek radioaktív jelölését végeztük heterogén katalitikus eljárással, elemi tríciumgázzal. Ezen belül két gyakran alkalmazott módszert követtünk: az izomorfin származékoknál kettős kötés telítésével, a többi esetben pedig dehalo-tríciálással vittük be a jelölő atomot a molekulába. A metil-jodiddal történő trício-metilezés pedig "jelzett reagens" használatát jelentette.

Anyagaink további felhasználhatóságát kémiai és radiokémiai tisztaságuk, de méginkább moláris aktivitásuk szabta meg, aminek növelése viszont már szintetikus kémiai-radiokémiai feladatként jelentkezett. Éppen ezért a moláris aktivitás nagysága munkánkban végig központi kérdés volt, és nagymértékben befolyásolta a prekursorok és módszerek megválasztását.

Az affinitásjelölő agonista izomorfin származékok tríciálásakor a kettős kötés telítésével próbáltunk az irodalomban leírt antagonistá analógokénál nagyobb moláris aktivitást elérni. Liu-Chen és munkatársai [81,82]  $6\alpha$  helyzetben tríciált  $\beta$ -funaltrexamint (**15**, 22. oldal) használták kísérleteikben, 988 GBq/mmol (26,7 Ci/mmol), illetve 807 GBq/mmol (21,8 Ci/mmol) moláris aktivitással. A vegyületben a 7,8-as kötés telített, így magától értetődőnek tűnt azt a szintézis végén, a tríciáláskor létrehozni, ezáltal nagyobb moláris aktivitású terméket kapni. A kötés telítéséhez hordozómentes PdO katalizátort használtunk, aminek kiválasztásában több előzetes kísérleti eredmény játszott szerepet. Az aktív szén hordozós palládiumot azért zártuk ki, mert az a kettős kötések telítésében kevésbé aktív, mint más hordozós katalizátorok, vagy éppen a hordozómentes. A PdO/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> használatával korábban szintén elég kis (851 GBq/mmol = 23 Ci/mmol) moláris aktivitású dihidromorfint lehetett kapni. Másik gyakran alkalmazott katalizátor a PdO/BaSO<sub>4</sub>, amely igen aktív, emellett általában hatékony katalizátora a cserereakcióknak. Ezt az adott esetben nem akartuk kihasználni, hiszen a kettős kötés telítésével elvben két

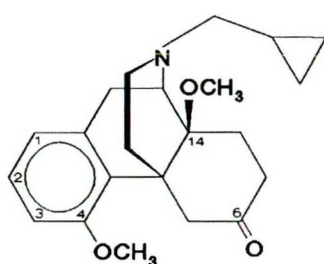
tríciumatomot vittünk be a molekulába. Éppen ezért volt meglepő a DIHIM 918 GBq/mmol (24,8 Ci/mmol) és a 14-OH-DIHIM 1470 GBq/mmol (39,7 Ci/mmol) moláris aktivitása, ami mindössze 42, illetve 68 %-a az elméletileg számítottnak. Az eredményt indokolhatja egyrészt a 6-os aminocsoport lazító hatása, másrészt az, hogy  $\beta$  térállású, ami a telítés folyamatát befolyásolhatja. Utóbbi feltételezésre alapot adhat korábbi munkák eredménye. A szintén katalitikus hidrogénezéssel előállított [7,8- $^3\text{H}$ ]dihidrokodein és [7,8- $^3\text{H}$ ]dihidro-etilmorfin moláris aktivitása 2000 GBq/mmol (54,1 Ci/mmol), illetve 1910 GBq/mmol (51,7 Ci/mmol) volt [70], míg a [7,8- $^3\text{H}$ ]dihidro-izomorfin esetében csak 1280 GBq/mmol (34,7 Ci/mmol) [72]. Ez a feltevés természetesen megalapozottabb lenne, ha az említett kísérletek szigorúan azonos körülmények között zajlanak.

A kapcsolási reakciókat összehasonlítva (1. táblázat, 38. oldal) megállapítható az is, hogy a 14-hidroxi származékokat általában nagyobb kitermeléssel sikerült előállítani annak ellenére, hogy kisebb anyagmennyiségekből indultunk ki (0,63  $\mu\text{mol}$ , illetve 1  $\mu\text{mol}$ ).

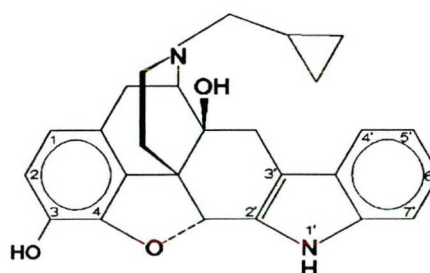
A szintén *mű* szelektív ciprodin jelzését redukzív dehalogénezéssel végeztük, amit a legkönnyebben az aromás gyűrűben lehet kivitelezni. Ennek oka egyrészt az, hogy az aril-halogenidek hidrogenolízise könnyebben megy végbe az alkil-halogenidekéhez képest, másrészt az aromás gyűrű irányító hatása miatt egyszerűbb a szintézisük is. Feltehetően az utóbbi hatásnak köszönhető, hogy az általunk alkalmazott, enyhe reakció-körülmények között végrehajtott enzimátikus brómozás során a halogén specifikusan az 1-es helyzetbe épült be. Ezt a reakcióelegy vékonyréteg-kromatográfiás ellenőrzése mutatta. A hagyományos, elemi brómmal történő brómozás során több komponensű termékelegy keletkezett (szintén vékonyréteg-kromatográfiás ellenőrzés szerint), s az 1-bróm-ciprodinot nem lehetett tisztán előállítani. Tiszta terméként csak az 1,5,7-tribróm-ciprodin volt

kinyerhető, valószínűleg az alkalmazott erősebb reakció-körülmények ( $\text{Br}_2$ , jégecet) miatt, amelyek között a tribrom származékig megy a reakció - ennek viszont a trícíálása nem adott szétválasztható elegyet.

Az 1-bróm-ciprodidot trícíálva 1170 GBq/mmol (31,6 Ci/mmol) moláris aktivitású terméket kaptunk, ami kb. 8 %-kal nagyobb az elméletileg számítottnál és így kismértékű izotópcserére utal. Trícium-NMR híján a csere helyzetét természetesen nem lehetséges megállapítani, azt azonban mindenképpen megállapíthatjuk, hogy a ciprodin aromás gyűrűjén az 1-es helyzetben a bróm hidrogenolízise nagyobb moláris aktivitással megy végbe, mint az eggyel több szubsztituenszt tartalmazó morfin- vagy kodein-származékoknál [70]. Ez a tapasztalat összefüggésbe hozható a gyűrű különböző szubsztituenseivel: a ciprodinnál a halogénhez képest található egy *para* helyzetű alkoxicsoport, valamint egy *orto* és egy *meta* helyzetű alkilcsoport, a többi származék esetében ehhez járul még egy *meta* helyzetű hidroxil vagy alkoxi csoport is. A hidrogenolízis folyamatát és ezzel együtt a végtermék moláris aktivitását befolyásolhatja az, hogy a ciprodin esetében a szubsztituensek irányító hatása egyértelműbb, mint a többiekénél.



ciprodin

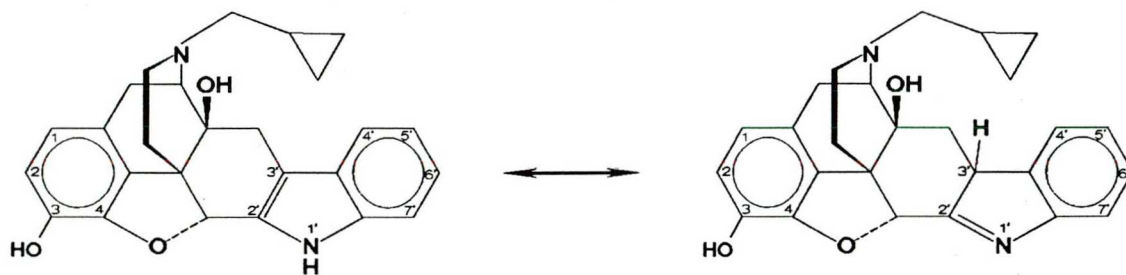


naltrindol

A naltrindol kétféle jelölését összehasonlítva azt láthatjuk, hogy a jelzés nem egyformán oszlik meg az 5' és az 1 helyzet között. Jóllehet trícium-NMR adatokkal ezt nem tudjuk közvetlenül bizonyítani, más eredményekkel összevetve ez igen valószínű. Saját kísérleteinkben az  $[5'\text{-}^3\text{H}]$ naltrindol moláris

aktivitása 758 GBq/mmol (20,5 Ci/mmol) volt, az [1,5'-<sup>3</sup>H]naltrindolé pedig 1705 GBq/mmol (46,1 Ci/mmol), ami szerint a trícium megoszlása az 1 (morfinánváz aromás gyűrűje) és az 5' helyzetben (indolváz) 947 és 758 GBq/mmol (25,6 és 20,5 Ci/mmol). Dorn és munkatársai időközben megjelent közleménye [129] szerint, amelyben a naltrindolt az 5' és a 7' helyzetben jelölték tríciummal, a kapott moláris aktivitás 1460 GBq/mmol (39,5 Ci/mmol). Itt mindkét tríciumatom az indolvázon található, <sup>3</sup>H-NMR méréseik szerint azonos megoszlásban, ami kb. 730 GBq/mmol-nak (19,75 Ci/mmol) felel meg és nagyjából megegyezik saját jelzésünk eredményével az 5' helyzetben. Ezen tapasztalatok alapján úgy tűnik, hogy a naltrindol jelölését érdemesebb a morfinváz aromás gyűrűjében végezni, mert az nagyobb moláris aktivitást eredményez.

A naltrindol triciálása és tisztítása során kapott kromatográfiás és UV spektroszkópiás eredmények izomerizációra (tautomerizációra) utalnak, ami feltehetően összefügg az indolrész 1' nitrogénatomján levő hidrogén jelenlétével. Ugyanazon körülmények között az 1'-metilezett származékkal nem tapasztaltunk hasonló jelenséget, ami az 1' helyzetű hidrogén részvételét valószínűsíti a folyamatban. A feltételezett tautomer átalakulás az alábbi ábrán látható:



A kromatográfiás tisztítással kapott két, különböző anyagféleség UV spektruma erre az átalakulásra utal. Az egyik anyag ( $R_f=0,23$ ) az indol (naltrindol) spektrumához mutatott hasonlóságot – nagy intenzitású sáv

210 nm körül és egy lényegesen kisebb intenzitású 230 nm körül –, a másik ( $R_f=0,42$ ) pedig a 3*H*-indoléhoz hasonlót – két, közel azonos intenzitású sáv 210 és 230 nm körül.

Párhuzam vonható ezen elképzelés és a már rendelkezésre álló biológiai eredmények között. Patkány agy preparátumon végzett receptorkötési tesztekben irreverzibilitást tapasztaltak a nem jelzett [123] anyaggal, a jelzettel pedig ezt számszerűen is megerősítve kb. 70 %-os irreverzibilis kötődést mértek [132]. Ezzel szemben az irodalomban nem említettek ilyen viselkedést sem az 1'-metil származéknál, sem pedig a szintén vizsgált benzofurán analógnál, amelyben az indol NH-ja helyett O-atom van. Természetesen a receptorkötésben tapasztalt irreverzibilitás már nem értelmezhető egyszerű protonvándorlással, hanem egy ezzel kapcsolatos kovalens kötés kialakulását feltételezi, ennek tisztázása azonban későbbi vizsgálatok tárgyát képezi.

A 4-bifenilsav-klórmetil-észter trícíálása 707 GBq/mmol (19,1 Ci/mmol) moláris aktivitású metil-észtert eredményezett. Tekintettel arra, hogy a hasítás körülményei között lazított, cserélődésre képes protonokkal nem kell számolni, az előállított trícíált metil-jodid moláris aktivitását azonosnak vehetjük a vele kapott [17-metil-<sup>3</sup>H]morfin moláris aktivitásával, de legalábbis ennél nem kevesebbnek. A különbség a metil-észter javára izotópcseré reakciónak tulajdonítható, amelyek növelik a teljes moláris aktivitást, ugyanakkor csökkenthetik azt egy meghatározott helyzetben. Alátámasztják ezt az irodalomban [118] található eredmények: 10 % PdO/C katalizátorral 12 órás trícíálás során 555 GBq/mmol (15 Ci/mmol) moláris aktivitású metil-észtert kaptak, amelynek LiI-os hasítása 444 GBq/mmol (12 Ci/mmol) moláris aktivitású *N,N*-dimetil-anilint eredményezett *N*-metil-anilinból. Az összességében kisebb moláris aktivitás értékek a hosszabb trícíálási idővel [117] magyarázhatók, ami viszont a 10 % PdO/C katalizátor használatakor szükséges volt. 30 % PdO/C katalizátorral [117] rövidebb reakcióidő is

elegendő és nagyobb moláris aktivitás érhető el. Ezen előzetes ismeretek birtokában választottuk a hordozómentes PdO-ot, és rövidebb (6 órás) reakcióidőt, még a konverzió csökkenésének árán is. A változtatások eredményeként a kapott 17- $^{3}\text{H}$ -metil]-morfin moláris aktivitása 585 GBq/mmol (15,8 Ci/mmol) lett.

A monotrício-metil-jodid moláris aktivitásának további növelésére adhat esélyt brómmetil- vagy jódmetil-észter prekursor alkalmazása, ami a szénhalogén kötés erősségének csökkenése révén lényegesen gyorsabb dehalogénezést eredményezne. Érdeemes megjegyezni, hogy az előállított triciált metil-észter 20 hónapos tárolás után ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, etanolos oldatban, radioaktív koncentráció 370 MBq/ml = 10 mCi/ml) kb. 80 %-os tisztaságúnak bizonyult. Ez azért előnyös, mert a speciális felszereltséget igénylő triciálással előállított, nagyobb mennyiségű metil-jodid prekursor tetszőleges részletekben, később is felhasználható.

A triciált vegyületeknek az ópiátreceptorok vizsgálatában játszott fontos szerepét a velük eddig elvégzett biológiai vizsgálatok eredménye mutathatja legjobban. Az affinitásjelölő izomorfin származékokkal történő vizsgálatok folyamatban vannak, a naltrindollal és ciprodimmal kapott eredmények [112,126] rövid kivonata az alábbi táblázatban látható:



## 3. táblázat

A triciált ligandumok receptorkötési adatai

	$K_d$ (nM)	$B_{max}$ (fmol/mg)	szelektivitási hányados			
			$\delta / \mu$	$\kappa / \mu$	$\mu / \delta$	$\kappa / \delta$
ciprodin	3,8	70	130	1130	-	-
naltrindol	0,037	63	-	-	110	17000

$K_d$ : a receptor-ligandum komplex disszociációs állandója  
patkányagy homogenizátumon mért kötődésben

$B_{max}$ : a receptorfehérje koncentrációja a homogenizátum összes  
fehérje tömegére vonatkoztatva

A  $K_d$  értékekből látható, hogy mindkét antagonistát igen nagy affinitással kötődik a receptorokhoz. Nem radioaktív ligandumokkal végzett leszorításos kísérletekből a két radioligandum szelektivitása is megadható. *Delta* szelektív kompetítorként naltrindolt, [ $D$ -Pen<sup>2</sup>, $D$ -Pen<sup>4</sup>]enkefalint deltorfin II-t (Tyr- $D$ -Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH<sub>2</sub>), *mu* szelektív kompetítorként DAGO-t (Tyr- $D$ -Ala-Gly-N-MePhe-Gly-ol), dihidromorfint és ciprodinot, *kappa* opioid ligandumként pedig U-50488H-t vagy U-69593-at használtunk. A szelektivitási arányt az egyes ligandumok  $K_i$  inhibíciós állandóinak hányadosa adja meg. Ezek alapján a ciprodin *mu*, a naltrindol *delta* opioid szelektív ligandum. A triciált naltrindollal megerősítették a *delta* opioid receptorok *altípusainak* létezését [126], irreverzibilis sajátságának jobb megismerése pedig lehetővé teheti affinitásjelölőként való alkalmazását is.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban biológiailag jelentős vegyületek radioaktív jelölését írtuk le. Az egyes vegyületek kiválasztását nem elsősorban kémiai szempontok vezérelték, hanem biológiai, biokémiai problémák megoldása. Az opioid receptorok működési mechanizmusának vizsgálatához a különböző altípusokhoz szelektíven kötődő trícíált radioligandumokat állítottunk elő.

A jelölések során elért eredmények az alábbiakban összegezhetők:

A dolgozatban leírt izomorfin származékok, a ciprodin és a naltrindol radioaktív jelölését elsőként valósítottuk meg.

A *mű* szelektív affinitásjelölő radioligandok közül előállítottuk az agonista hatású 6-amino-6-dezoxi-7,8-dihidro-izomorfin és a 6-amino-6-dezoxi-7,8-dihidro-14-hidroxi-izomorfin metil-fumáramido és klóracetamido származékait. Megállapítottuk, hogy az amidkötés kialakítása nem változtatta meg a moláris aktivitásokat (918 GBq/mmol=24,8 Ci/mmol, illetve 1470 GBq/mmol=39,7 Ci/mmol), így a négy irreverzibilis ligand alkalmas lehet affinitásjelölésre.

A ciprodin jelöléséhez a brómtartalmú prekuzort enzimatis halogénezéssel állítottuk elő, amely az alkaloidok körében eddig nem alkalmazott módszer. Az eljárással kíméletes reakciókörülmények között, szelektíven vihető be a bróm a morfinánváz 1-es helyzetébe. A vegyület dehalotrícíálása az elméleti értéket valamivel meghaladó moláris aktivitású (1170 GBq/mmol=31,6 Ci/mmol) végterméket adott, ami bizonyos mértékű izotópcserére utal.

A naltrindol jelölését kétféleképpen is elvégeztük. Előállítottuk a 758 GBq/mmol (20,5 Ci/mmol) moláris aktivitású 5'-jelzett vegyületet és az 1,5'-ditrício származékot 1705 GBq/mmol (46,1 Ci/mmol) moláris aktivitással, ami az eddigiek között a legnagyobb. Kidolgoztuk a vékonyréteg-kromatográfiás körülményeket a naltrindol és brómszármazékai

elválasztásához, és ennek kapcsán kimutattuk a naltrindol izomerizációját (tautomerizációját) az adott körülmények között.

A morfin jelölését ugyan már sokszor elvégezték, ebben az esetben mégis jelentős eredmény a molekula kettős kötésének megtartásával történő trícium-jelzés. Az elméleti moláris aktivitás felét értük el, a jelölés specifikusan a 17-es metilcsoportban van. Lényeges, hogy sikerült megvalósítani a triciált metil-jodid egy kényelmesen kezelhető alapanyagának előállítását és további felhasználását.

A szervezetben az alkaloid típusú ligandumok hosszabb élettartamúak az opioid peptideknél, mert legalábbis a peptidázok hatásának ellenállnak. Másik előnyük a vér-agy gáton való úgyszólván zavartalan átjutás, ami lehetővé teszi az agyi ópiatreceptorokra való közvetlen hatást kis mennyiségek adagolásával. Mindezek alapján a fájdalomcsillapító hatású és a kábítószer-antagonista vegyületek vizsgálata, aminek végső célja új gyógyszer(ek) kifejlesztése lehet, az ópiátok között a legbiztosabb. Választásunk ezért esett a morfinvázis ligandumokra, amelyek hatását a jelzett anyagokkal mélyrehatóbban lehet vizsgálni. Együttműködő partnereink - biológus kutatócsoportok - visszajelzése a biológiai eredményekről pedig lehetővé teszi a ligandumok szerkezetének tudatos változtatását a hatás további javítása érdekében.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban leírt szintetikus munka része annak a radioaktív jelölés-sorozatnak, amely Dr. Tóth Géza tudományos főmunkatárs kezdeményezésére, a hazai opioid receptorkutatás támogatására kezdődött az MTA Szegedi Biológiai Központjában az Alkaloida Vegyészeti Gyár együttműködésével, majd a Tucsoni Egyetem (USA, Arizona) és az Innsbrucki Egyetem (Ausztria) különböző csoportjainak részvételével nemzetközi szintűvé szélesedett.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Tóth Géza tudományos főmunkatársnak, hogy lehetővé tette dolgozatom elkészítését. Külön köszönöm, hogy munkámat a kísérletekben való részvételével és hasznos tanácsaival egyaránt segítette.

Köszönöm Dr. Hosztafi Sándornak, az Alkaloida Vegyészeti Gyár kutatójának értékes tanácsait és a közös kutatásban végzett lelkiismeretes munkáját. Köszönöm az Alkaloida Vegyészeti Gyár anyagi támogatását is.

Köszönet illeti Dr. Helmut Schmidhammert, az Innsbrucki Egyetem kutatóját a ciprodin jelölésében nyújtott segítségért, és Dr. Henry Yamamura-t, a Tucsoni Egyetem kutatóját a jelzett naltrindollal elvégzett biológiai tesztek eredményeiért.

Köszönöm Dr. Borsodi Annának és az MTA SzBK Biokémiai Intézete Opioid Receptor Munkacsoportja dolgozóinak a jelzett anyagokkal elvégzett receptorkötési vizsgálatok naprakész eredményeit.

Köszönettel tartozom a Szegedi Regionális Műszerpark NMR Laboratóriuma és az Alkaloida Vegyészeti Gyár Analitikai Laboratóriuma munkatársainak a műszeres vizsgálatok elvégzéséért.

Külön köszönet illeti az MTA SzBK "B" szintű Izotóp Laboratóriumának valamennyi munkatársát a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségükért és az értekezés összeállítása során tett hasznos kritikai észrevételekért.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Wilson, E.J.: Vacuum, 4, 303 (1954)
2. Glascock, R.F.; Reinius, L.R.: Biochem. J. 62, 529 (1956)
3. Morgat, J.L.; Desmares, J.; Cornu, M.: J. Labelled Compd. 11, 257 (1975)
4. Morgat, J.L.; Billon, H.; Schott, D.: A New Automatic Gas Transfer Unit for Tritium Labellings; Proc. 4th Int. Simp. on The Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds, Toronto, 1991.
5. Wilzbach, K.E.: J. Am. Chem. Soc. 79, 1013 (1957)
6. Wolfgang, R.; Rowland, F.S.; Turton, C.N.: Science 121, 715 (1955)
7. Urch, D.S.: Radiochem. Radioanal. Letters 25, 273 (1976)
8. Evans, E.A.; Hilary, C.S.; Turner, J.C.; Warrell, D.C.: J. Labelled Compounds 10, 569 (1974)
9. Evans, E.A.: "Tritium and its Compounds", Butterworths, London, 1974.
10. Tóth, G.; Sirokmán, F.: Izotóptechnika (Budapest) 24, 259 (1981)
11. Buchman, O.; Pri-bar, I.: J. Label. Comp. Radiopharm. 14, 263 (1978)
12. Cerny, B.; Hanus, J.; Benes, J.: Radiochem. Radioanal. Letters 35, 211 (1978)
13. Veres, K.; Siglerova, V.; Tóth, G.; Dufek, P.; Sedmera, P.: Radiochem. Radioanal. Letters 46, 307 (1981)
14. Oehlke, J.; Niedrich, H.; Zöpfl, H.-J.; Franke, P.: J. Labelled Compd. Radiopharm. 28, 387 (1990)
15. Morgat, J.; Fromageot, P.: Radiopharmaceuticals and Labelled Compounds, 109, IAEA, Wien, 1973.
16. Vader, J.; Sperling, E.; Kaspersen, F.; Wagenaars, G.; Funke, C.: Exchange Reactions During Reductive Tritiation with  $^3\text{H}_2$ -Pd/C; Proc. 4th Int. Symp. on The Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds, Toronto, 1991.



17. Oehlke, J.; Niedrich, H.; Zöpfl, H.-J.; Franke, P.: *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 27, 861 (1989)
18. Sgoutas, D.S.; Kummerow, F.A.: *Biochemistry* 3, 406 (1964)
19. Filer, C.N.; Ahern, D.G.; Fazio, R.; Seguin, R.J.: *J. Org. Chem.* 46, 4968 (1981)
20. Gong Jia-Ling; Zhu Tong: *Shanghai Ti 11. Hsuch Yuan Hsuch Pao* 8, 133 (1981); *Chem. Abstr.* 95, 187477n
21. Tóth, G.; Kramer, M.; Sirokmán, F.; Borsodi, A.; Rónai, A.: *J. Label. Compd. Radiopharm.* 19, 1021 (1982)
22. Zolotarev, Y.A.; Kozik, V.S.; Dorokhova, E.M.; Myasoedov, N.F.: *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 29, 997 (1991)
23. Oehlke, J.; Niedrich, H.; Zöpfl, H.-J.; Franke, P.: *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 25, 1087 (1988)
24. Birkofer, L.; Hempel, K.: *Chem. Ber.* 96, 1373 (1963)
25. Márton, J.; Kovács, Á.: *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 73, 11 (1972)
26. Hanus, J.; Cerny, B.; Benes, J.: *J. Labelled Compd.* 10, 523 (1974)
27. Oehlke, J.; Bienert, M.; Niedrich, H.; Zöpfl, H.-J.; Franke, P.: *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 23, 935 (1986)
28. Lebl, M.; Barth, T.; Crankshaw, D.J.; Cerny, B.; Daniel, E.E.; Grover, A.K.; Jost, K.: *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* 49, 1921 (1984)
29. Andersen, K.S.; Woods, L.A.: *J. Org. Chem.* 24, 274 (1959)
30. Rapoport, H.; Lovell, C.H.; Tolbert, B.M.: *J. Am. Chem. Soc.* 73, 5900 (1951)
31. Yost, Y.; Holtzman, J.L.: *J. Label. Compd. Radiopharm.* 18, 1793 (1981)
32. Loeffler, S.; Stadler, R.; Nagakura, N.; Zenk, M.H.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1160 (1987)
33. Duquette, P.H.; Peterson, F.J.; Crankshaw, D.L.; Lindemann, N.J.; Boltzman, J.L.: *Drug metabolism and Disposition* 11, 477 (1983)
34. Davis, R.; Feldhaus, J.; Heveran, J.; Wicks, R.; Peckham, M.: *Clin. Chem.* 21, 1498 (1975)
35. Hunter, W.M.; Greenwood, F.C.: *Nature* 194, 495 (1962)

36. Liebman, A.A.; Malarek, D.H.; Blount, J.F.; Nelson, N.R.; Delanly, C.M.: J. Org. Chem. 43, 737 (1978)
37. Mason, P.A.; Law, B.; Ardrey, R.E.: J. Label. Compd. Radiopharm. 18, 1497 (1981)
38. Kloster, G.; Röder, E.; Machulla, H.J.: J. Label. Compd. Radiopharm. 16, 441 (1979)
39. Langstrom, B.; Antoni, G.; Halldin, C.; Svärd, H.; Bergson, G.: Chem. Scripta 20, 46 (1982)
40. Allen, D.R.; Beumier, P.L.: J. Label. Compd. Radiopharm. 16, 61 (1979)
41. Svaerd, H.; Antoni, G.; Bergson, G.; Dannals, R.F.; Halldin, C.; Naagren, K.; Malmborg, P.; Ravert, H.; Soeberg, S.; Langstrom, B.: Turun Yliopiston Julk., Sar. D. 17, 192 (1984). Chem. Abstr. 104 149209y (1986)
42. Rimland, A.; Obenius, U.; Bergson, G.; Soeberg, S.; Langstrom, B.: J. Label. Compd. Radiopharm 23, 1355 (1986)
43. Rimland, A.; Bergson, G.; Obenius, U.; Soeberg, S.; Langstrom, B.: Appl. Radioat. Isot. 38, 651 (1987)
44. Luthra, S.K.; Pike, V.W.; Brady, F.: J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1423, (1985)
45. McPherson, D.W.; Hwang, D.-R.; Fowler, J.S.; Wolf, A.P.; MacGregor, R.M.; Arnett, C.D.: J. Label. Compd. Radiopharm. 23, 505 (1986)
46. Lever, J.R.; Dannals, R.F.; Wilson, A.A.; Ravert, H.T.; Wagner, H.N.: Tetrahedron Letters 28, 4015 (1987)
47. Luthra, S.K.; Pike, V.W.; Brady, F.; Horlock, P.R.; Prenant, C.; Crousel, C.: Appl. Radioat. Isot. 38, 65 (1987)
48. Lever, J.R.; Mazza, S.M.; Dannals, R.F.; Ravert, H.T.; Wilson, A.A.; Wagner, H.N.: Appl. Radioat. Isot. 41, 745 (1990)
49. Pert, C.B.; Danks, J.A.; Channing, M.A.; Eckelman, W.C.; Larson, S.M.; Bennett, J.M.; Burke, T.R.; Rice, K.C.: FEBS Letters 177, 281 (1984)
50. Burke, T.R.; Rice, K.C.; Pert, C.B.: Heterocycles 23, 99 (1985)
51. Shiue, C.Y.; Bai, L.G.; Teng, R.; Wolf, A.P.: J. Label. Compd. Radiopharm. 23, 1038 (1986)

52. Chesis, P.L.; Welch, M.J.: Appl. Radioat. Isot. 41, 259 (1990)
53. Chesis, P.L.; Hwang, D.-R.; Welch, M.J.: J. Med. Chem. 33, 1482 (1990)
54. Achor, L.B.: J. Pharm. Exp. Therapy 1A, 122 (1958)
55. Misra, A.L.; Woods, L.A.: Nature 185, 304 (1960)
56. Fischman, J.; Norton, B.J.; Hembree, W.: J. Label. Compd. 9, 563 (1973)
57. Battersby, A.R.; Marlin, J.A.; Brochmann-Hanssen, E.: J. Chem. Soc. (C) 1785 (1967)
58. Kirby, G.W.; Ogunkoya, L.: J. Chem. Soc. (C) 6914 (1965)
59. Werner, G.; von der Heyde, O.: J. Label. Compd. 7, 232 (1971)
60. Fischman, J.; Norton, B.I.; Cotter, M.; Hahn, E.F.: J. Med. Chem. 17, 778 (1974)
61. Choudry, S.C.; Serico, L.; Cupano, J.; Malarek, D.H.; Malarek, A.A.: J. Label. Compd. Radiopharm. 27, 1403 (1989)
62. Varga, É.; Tóth, G.; Benyhe, S.; Hosztafi, S.; Borsodi, A.: Life Sciences 40, 1579 (1987)
63. Simon, E.J.; Miller, J.M.; Edelman, J.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1947 (1973)
64. Lane, A.C.; McCoubrey, A.; Peaker, R.: J. Label. Compd. 2, 284 (1966)
65. Lewis, J.W.; Rance, M.J.; Young, G.R.: J. Med. Chem. 17, 465 (1974)
66. Gong, Jia-Ling; Zong, Gorozen: Sanghai Yixueyuan Xuebao 10, 47 (1983)
67. Römer, D.; Buscher, H.; Hill, R.C.; Maurer, R.; Percher, T.J.; Welle, H.B.A.; Bakel, H.C.C.K.; Akkerman, A.M.: Life Sci. 27, 971 (1980)
68. Craviso, G.L.; Nodar, R.; Mussachio, J.M.: J. Liquid Chrom. 5, 2311 (1982)
69. Hug, C.C.; Mellett, L.B.: Univ. Mich. Med. Bull. 29, 165 (1963)
70. Tóth, G.; Kramer, M.; Szűcs, M.; Benyhe, S.; Sirokmán, F.: Radiochem. Radioanal. Letters 56, 209 (1983)
71. Tóth, G.: nem publikált eredmények
72. Varga, É.; Hosztafi, S.; Borsodi, A.: Adv. in Biosci. 75, 391 (1989)
73. Knoll, J.; Zsilla, G.; Makleit, S.: Med. Biology 53, 501 (1975)



74. Knoll J., Magyar K., Makleit S., Zólyomi G., Zsilla G.: *Orvostudomány* 26, 111 (1975)
75. Knoll, J.; Magyar, K.; Zólyomi, G.: *Acta Phys. Acad. Sci. Hung.* 46, 163 (1975)
76. Rothman, R.B.; McLean, S.; Bykov, V.; Lessor, R.A.; Jacobson, A.E.; Rice, K.C.; Holaday, J.W.: *Eur. J. Pharmacol.* 142, 73 (1987)
77. Rothman, R.B.; Bykov, V.; Rice, K.C.; Jacobson, A.E.; Kooper, G.N.; Bowen, W.D.: *Neuropeptides* 11, 1 (1988)
78. Pert, C.B.; Snyder, S.H.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 2243 (1973)
79. Fischman, J.; Cotter, M.L.; Norton, B.I.: *J. Med. Chem.* 16, 556 (1973)
80. Brine, G.A.; Kepler, J.A.: *J. Label. Compd. Radiopharm.* 12, 401 (1976)
81. Liu-Chen, L.Y.; Philips, C.A.: *Mol. Pharmacol.* 32, 321 (1987)
82. Liu-Chen, L.Y.; Li, S.; Tallarida, R.J.: *Mol. Pharmacol.* 37, 243 (1990)
83. Liu-Chen, L.Y.; Li, S.; Rohrbach, K.W.; Lewis, M.E.: *Prog. Clin. Biol. Res.* 328, 61 (1990)
84. Takemori, A.E.; Portoghese, P.S.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 193 (1985)
85. Kooper, G.N.; Levinson, N.R.; Copeland, C.F.; Bowen, D.W.: *Mol. Pharmacol.* 33, 316 (1988)
86. De Costa, B.R.; Bowen, W.D.: *J. Label. Compd. Radiopharm.* 29, 443 (1991)
87. Winter, B.A.; Goldstein, A.: *Mol. Pharm.* 8, 601 (1972)
88. DeGraw, J.A.; Engstrom, J.S.: *J. Label. Compd.* 11, 233 (1975)
89. Schulz, R.; Goldstein, A.: *Life Sciences* 16, 1843 (1975)
90. Cooper, G.K.; Rapoport, H.: *J. Label. Compd. Radiopharm.* 22, 1201 (1985)
91. Rance, M.J.; Kobylecki, R.J.; Lane, A.C.; Holdgate, M.J.; Barnard, E.A.: *Adv. Endog. Exog. Opioids. Proc. INRC 12th* 408 (1891) *Chem. Abstr.* 97 174871c (1982)
92. Peers, E.M.; Rance, M.J.; Barnard, E.A.; Haynes, A.S.; Smith, C.F.C.: *Life Sciences* 33, (Suppl.I) 439 (1983)

93. Galzi, J-L.; Mejean, A.; Ilien, B.; Mollereau, C.; Meunier, J.-C.; Goeldner, M.; Hirth, C.: *J. Med. Chem.* 33, 2456 (1990)
94. Mejean, A.; Goeldner, M.; Hirth, C.: *Progress in Clin. Biol. Res.* 328, 101 (1990)
95. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 52E (1971-72)
96. Burke, J.E.; Smith, C.S.: *J. Am. Chem. Soc.* 69, 2500 (1947)
97. Sayre, L.M.; Larson, D.L.; Fries, D.S.; Takemori, A.E.; Portoghese, P.S.: *J. Med. Chem.* 26, 1229 (1983)
98. Jiang, J.B.; Hanson, R.N.; Portoghese, P.S.: *J. Med. Chem.* 20, 1100 (1977)
99. Sayre, L.M.; Portoghese, P.S.: *J. Org. Chem.* 45, 3366 (1980)
100. Portoghese, P.S.; Larson, D.L.; Sayre, L.M.; Fries, D.S.; Takemori, A.E.: *J. Med. Chem.* 23, 233 (1980)
101. Schoenecker, J.W.; Takemori, A.E.; Portoghese, P.S.: *J. Med. Chem.* 29, 1868 (1986)
102. Schoenecker, J.W.; Takemori, A.E.; Portoghese, P.S.: *J. Med. Chem.* 30, 1040 (1987)
103. Simon, Cs.; Hosztafi, S.; Makleit, S.: *Synth. Comm.* 22, 913 (1992)
104. Vaughan, J.R.; Osato, R.L.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 676 (1952)
105. Anderson, G.W.; Zimmerman, J.E.; Callahan, F.M.: *J. Am. Chem. Soc.* 88, 1338 (1966)
106. Wilchek, M.; Givol, D.: *Methods. Enzymol.* 46, 153 (1977)
107. Anderson, G.W.; Zimmerman, J.E.; Callahan, F.M.: *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5012 (1967)
108. Stanley, W.L.; Vannier, S.H.; Gentili, B.: *J. Ass. Off. Agric. Chem.* 40, 282 (1957)
109. Schmidhammer, H.; Burkard, W.P.; Eggstein-Aeppli, L.; Smith, C.F.C.: *J. Med. Chem.* 32, 418 (1989)
110. Schmidhammer, H.: *Trends in Medicinal Chemistry '88*, (van der Goot, H.; Domany, G.; Pallos, L.; Timmerman, H.; szerk.), Elsevier Science Publishers B.V.; Amsterdam, 1989.

111. Schmidhammer, H.; Smith, C.F.C.; Erlach, D.; Koch, M.; Krassnig, R.; Schwetz, W.; Wechner, C.: *J. Med. Chem.* **33**, 1200 (1990)
112. Ötvös, F.; Tóth, G.; Schmidhammer, H.: *Helv. Chim. Acta*, megjelenés alatt
113. Davies, S.G.; Pyatt, D.: *Heterocycles* **28**, 163 (1989)
114. Bloxside, J.P.; Elvidge, J.A.; Gower, M.; Jones, J.R.; Evans, E.A.; Kitcher, J.P.; Warell, D.C.: *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **18**, 1141 (1981)
115. Johnstone, R.A.W.; Rose, M.E.: *Tetrahedron* **35**, 2169 (1979)
116. Schwob, R.; Wuersch, J.: *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **14**, 355 (1978)
117. Saljoughian, M.; Morimoto, H.; Rapoport, H.: *J. Org. Chem.* **54**, 4689 (1989)
118. Saljoughian, M.; Morimoto, H.; Dorsky, A.M.; Rapoport, H.; Andres, H.; Tang, Y.S.; Susan, A.: *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **27**, 767 (1989)
119. Ulich, L.H.; Adams, R.: *J. Am. Chem. Soc.* **43**, 660 (1921)
120. Schwyzer, R.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **297**, 3 (1977)
121. Portoghese, P.S.; Sultana, M.; Nagase, H.; Takemori, A.E.: *Recent Advances in Receptor Chemistry* 307 (1988)
122. Rogers, H.; Hayes, A.G.; Birch, P.J.; Traynor, J.R.; Lawrence, A.J.: *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 358 (1990)
123. Portoghese, P.S.; Sultana, M.; Takemori, A.E.: *J. Med. Chem.* **33**, 1714 (1990)
124. Abdelhamid, E.E.; Sultana, M.; Portoghese, P.S.; Takemori, A.E.: *J. Pharm. Exp. Ther.* **258**, 299 (1991)
125. Drower, E.J.; Stapelfeld, A.; Rafferty, M.F.; DE Costa, B.R.; Rice, K.C.; Hammond, D.L.: *J. Pharm. Exp. Ther.* **259**, 725 (1991)
126. Yamamura, M.S.; Horvath, R.; Toth, G.; Otvos, F.; Malatynska, E.; Knapp, R.J.; Porreca, F.; Hruby, V.J.; Yamamura, H.I.: *Life Sci.* **50**, PL119-PL124 (1992)
127. Houlihan, William J. (ed.): *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Indoles*; John Wiley & Sons, 1972, Hanover, New Jersey.

128. Speyer, E.; Sarre, K.: Ber. 57 1409 (1924)
129. Dorn, Clifford R.; Markos, Charles S.; Dappen, Michael S.; Pitzele, Barnett S: J. Labelled Compd. Radiopharm. 31, 375 (1992)
130. Hinman, R.L.; Whipple, E.B.: J. Am. Chem. Soc. 84, 2534 (1962)
131. Harley-Mason, J.; Leeney, T.J.: Proc. Chem. Soc. 368 (1964)
132. Borsodi Anna és munkatársai (MTA SzBK Biokémiai Intézet): nem közölt eredmények