Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

TDK Dolgozat

Közepes áteresztőképességű biomimetikus modell alkalmazása gyógyszermetabolizmus vizsgálatában

Készítette:

Mohácsi Zsombor

Vegyészmérnök Bsc hallgató

Témavezető:

Dr. Balogh-Weiser Diána

Egyetemi adjunktus

Konzulensek:

Dr. Balogh György Tibor

Egyetemi docens

Decsi Balázs

PhD hallgató

2021

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek **Dr. Balogh-Weiser Diánának**, hogy lehetőséget biztosított a kutatómunkám elvégzésére, és hogy ezen keresztül megismerhettem a metabolitkutatásnak széles világát.

Köszönettel tartozom **Dr. Balogh György Tibornak**, aki szakmai útmutatásával és hasznos tanácsaival támogatta a dolgozat létrejöttét.

Hálával Tartozom **Decsi Balázs** PhD hallgatónak, aki segített eligazodni a kutatási témámban, és mindig elérhető volt bármilyen kérdéssel is fordultam hozzá.

Köszönöm **Takács Gergőnek**, hogy Kemiinformatikai munkájával segítette a dolgozatom létrejöttét.

Köszönetet mondok a Waters Research Center Kft. munkatársaiak, **Karancsi Tamásnak**, és **Márton Andrásnak**, hogy lehetőséget biztosítottak a HRMS mérések elvégzésére.

Köszönetet mondok továbbá a **Bioorganikus kutatócsoport tagjainak**, illetve az ott dolgozó hallgatóknak, hogy kérdéseimre mindig készségesen válaszoltak és segítségemre voltak.

Végül pedig szeretném megköszönni a **biomimetikus technológiák kutatócsoport tagjainak**, hogy segítségemre a voltak a biomimetikus oxidációs reakciók elvégzésében.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás ... 2
Tartalomjegyzék ... 3
Rövidítések jegyzéke ... 5
1. Bevezetés ... 6
2. Irodalmi áttekintés ... 8
2.1. Citokróm P450 enzimrendszer ... 8
2.1.1. Metabolikus folyamatok ... 8
2.1.2. Citokróm P450 enzimcsalád ... 9
2.1.3. CYP 450 oxidációs mechanizmusa ... 10
2.2. Metabolizmus vizsgálati módszerek ... 12
2.2.1. Hagyományos in vitro metabolizmus vizsgálatok ... 12
2.2.2. In vitro metabolikus modell rendszerek ... 12
2.3. Szintetikus metalloporfirinek ... 13
2.3.1. Szintetikus metalloporfirinek szerkezete és csoportosítása ... 13
2.3.2. Metalloporfirinek alkalmazása biomimetikus katalizátorként ... 15
2.3.3. A porfirinek pH függő oxidációs mechanizmusa ... 17
2.4. Gyógyszermetabolitok szintézise ... 19
2.5. Korábbi eredmények bemutatása ... 20
3. Célkitűzés ... 21
4. Kísérleti rész ... 22
4.1. Felhasznált vegyszerek, analitikai módszerek, berendezések és szoftverek ... 22
4.1.1. Kromatográfiás módszer – HPLC-DAD-MS ... 22
4.1.2. HRMS ... 22
4.2. Kísérletek leírása ... 23
4.2.1. Biomimetikus reakciók általános leírása ... 23
5. Eredmények ... 25
5.1. A vizsgált molekulák elhelyezkedése a gyógyszerkémiai térben ... 25
5.1.1. A kiválasztott hatóanyagok által reprezentált kémiai tér a Lipinski-szabály alapján 26
5.1.2. Molekulák sav-bázis karakterének vizsgálata ... 29
5.2. Biomimetikus eredmények bemutatása ... 31
5.2.1. Inert molekulák ... 31
5.2.2. Nem-biomimetikus átalakulást mutató vegyületek ... 33

5.2.3. A biomimetikus reakciók konverziójának vizsgálata a pH szerint 34
5.2.4. Az átalakulások vizsgálata a molekulák sav bázis tulajdonságai alapján 35
5.2.5. További terveink az adatkészletünk jellemzésére 36
5.3. Biomimetikus és humán metabolitprofil összehasonlítása különböző vegyületek példáján 37
5.3.1. Ametopterin (25) 37
5.3.2. Benidipin (32) 39
5.3.3. Klomipramin (43) 40
5.3.4. Dibukain (49) 42
5.3.5. Diltiazem (52) 43
5.4 Kitekintés 44
6. Összefoglalás 46
7. Irodalomjegyzék 47

Rövidítések jegyzéke

ADME(T)	adszorpció, disztribúció, metabolizmus, elimináció, (toxicitás)
CYP450	citokróm P450 enzimcsalád
CYP	citokróm
DMSO	Dimetilszulfoxid
FeTPPS	*mezo*-tetra(4-szulfoniloxifenil)porfirin–vas(III) klorid
HPLC-DAD	Diódasoros detektorral ellátott Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
HPLC-DAD-MS	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrométer Diódasoros detektorral
HPLC-MS	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrométer
HRMS	Nagy felbontású tömegspektrométer
HTS	nagy áteresztőképességű szűrő rendszer
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája
NADPHCYP	citokróm P450 reduktáz
NMR	Mágneses magrezonancia
TPP	mezo-tetrafenilporfirin

1. Bevezetés

A gyógyszeripar egyik legnagyobb kihívását az új (originális) hatóanyagok fejlesztése jelenti. A gyógyszerkincs folyamatos bővülésével egyre nehezebb és költségesebb feladattá válik a szerkezetileg új, a korábbi hatóanyagoknál kedvezőbb tulajdonságú hatóanyagok piacra vitele. A mai napig több mint 100 millió előállított (PubChem adatbázisa alapján), különböző szerkezetű szerves molekula [1] közül nagyszámú kísérlettel lehet kiválasztani a megfelelő farmakodinámiás hatással és farmakokinetikai tulajdonsággal rendelkező vegyületeket. Azonban még ez sem garancia arra, hogy a gyógyszerkutatás felfedező és vezérmolekula optimalizálási lépésében ígéretesnek talált vegyület a preklinikai és klinikai vizsgálatokat is sikerrel veszi és végül a hatóság engedélyével piacra kerül.

A felfedező kémiai kutatási és vezérmolekula optimalizálási lépés során követelmény a hatóanyagok nagy mennyiségű kémiai, fizikai-kémiai és in vitro, esetenként in vivo farmakológiai információjának beszerzése és feldolgozása minél rövidebb idő alatt. Ennek egyik eszköze a nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatok (HTS: High Throughput Screening) alkalmazása, melynek lényege, hogy kellően robusztus, automatizált rendszerben nagyszámú molekulát in vitro kémiai és farmakológiai teszten vizsgálva kiszűrhetjük a potenciálisan kedvező tulajdonságú vegyületeket, illetve szerkezeti elemeket. Az így megszerzett információt felhasználásával olyan szerkezet-hatás / szerkezet-tulajdonság alapú modell építhető, mellyel a lehetőségünk lehet új vegyületek HTS rendszerben adott hatását előre jelezni, így segítve a kísérletes és gyógyszerkémiai tervező munkát.

Ezután következik a kedvező tulajdonságú vegyületek (vezérmolekula) szerkezetének optimalizálása korai in vitro felszívódási és metabolizmus vizsgálati, majd in vivo állatkísérletes, korai toxikológiai vizsgálati adatok alapján. Ahhoz, hogy minden szempontból optimálisnak legyen nyilvánítva egy gyógyszerjelölt, nem csak hatásosságát kell igazolni, hanem szigorú biztonsági előírásoknak is meg kell felelnie. Mind a hatóanyagjelöltre, mind a hatóanyagjelöltből képződő anyagcsere termékekre, azaz metabolitokra is, komoly felszívódási és toxikológiai vizsgálatokat írnak elő a hatóságok. A metabolitok vizsgálatát tovább nehezíti, hogy a hagyományos in vitro és in vivo vizsgálti rendszerekben csupán nagyon kis mennyiségekkel lehet dolgozni, így a metabolitok elválasztását, szerkezeti azonosítását nehézkes megoldani.

Az utóbbi évtizedek gyógyszerkutatási stratégiájának eszközparkjában egyre nagyobb mértékben jellenek meg olyan különböző biológiai folyamatokat / enzimek működését utánzó ún. biomimetikus rendszerek, amelyek a hagyományos in vivo, illetve élő szervezeteken

alapuló in vitro rendszerek kiegészítésére, illetve bizonyos esetekben akár azok kiváltására is alkalmasak lehetnek.

Munkám során egy olyan biomimetikus szűrő modellrendszer fejlesztésében vettem részt, amely nagyszámú vegyület felhasználásával képes jellemezni, illetve várhatóan előre jelezni gyógyszerjelölt vegyületek oxidatív metabolizmusát, továbbá a biomimetikus rendszerben bekövetkező oxidációjának mértékét és irányát. A kidolgozott modell ily módon nem csupán a gyógyszermetabolizmus előrejelzésében, hanem potenciális új kémiai környezet előállításának eszközeként is szolgálhat.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Citokróm P450 enzimrendszer

2.1.1. Metabolikus folyamatok

A szervezet önfenntartó folyamatait együttesen anyagcserének nevezzük. Az anyagcsere magában foglalja az endogén (a szervezet saját) és exogén (a külvilágból származó) anyagok a szervezetben, enzimek hatására bekövetkező változásait. Az enzimek különböző anabolikus (lebontó) és katabolikus (felépítő) folyamatokat katalizálnak, amelyek a szervezet viszonylagos állandóságát biztosítják. Az exogén anyagok vagy xenobiotikumok, így a gyógyszerek átalakulásait összefoglalóan metabolizmusnak vagy metabolikus folyamatoknak nevezzük. A metabolikus folyamatok eredménye, hogy a testidegen anyagok metabolit formájában gyorsan kiválasztónak a szervezetből. Ez a gyógyszerhatóanyagok esetében azt jelenti, hogy a jellemzően lipofil molekula, enzimatikus átalakulások hatására hidrofilebbé válik, majd jellemzően a vesén és az epén keresztül kiürül a szervezetből. A folyamatban keletkező metabolit(ok) farmakokinetikai és farmakodinámiás tulajdonságai is jelentősen eltérnek az anyavegyületétől. A metabolikus folyamatokat 2 fő csoportra oszthatjuk, melyet Fázis I. és Fázis II. metabolizmusnak nevezzük. A Fázis I. reakciók során az enzimek redoxreakciókat végeznek a metabolizálandó molekulán (**1. táblázat**), míg a Fázis II. folyamatokban az exogén molekula endogén molekulával konjugálódik (**2. táblázat**). Ezek a folyamatok elsősorban a májhoz köthetőek, mivel a májban találhatók a legnagyobb koncentrációban azok az enzimek melyek a Fázis I és II folyamatok lejátszódásáért felelnek. [2]

1. táblázat Fázis I metabolikus folyamatok csoportosítása

Fázis I metabolikus folyamatok		
Típus		Reakciók
Oxidáció	Mikroszómális*	alifás és aromás hidroxilálás, epoxidáció; N-, O, S-oxidáció és dealkilálás; dehalogénezés; alkohol oxidáció
	Nem mikroszómális	alkohol oxidáció; aromatizáció; amin-oxidáció
Redukció		azo-, nitro-, epoxid-, heterociklusos vegyületek redukciója
Hidrolízis		észter-, amid-, azid vegyületek hidrolízise
Izomerizáció		epoxidok izomerizációja
Vegyes reakciók		gyűrűzárás, gyűrűfelnyílás, dimerképézés, transzaminálás, dekarboxilezés

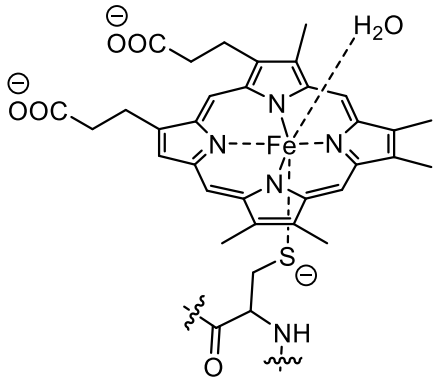
*mikroszóma: endoplazmatikus retikulum

2. táblázat Fázis II metabolikus folyamatok csoportosítása

Fázis II reakciók metabolikus reakciók típusai		
Reakció	Enzim	Konjugálódó funkciós csoport
Glükuronidáció	UDP Glükuronil transzferáz	-OH, -COOH, -NH_2, -SH
Szulfonálás	szulfontranszferáz	-OH, -NH_2, -SO_2NH2
Metilálás	metiltranszferáz	-OH, -NH_2
Acilezés	acetiltranszferáz	-OH, -NH_2
Aminosav konjugáció	-	-SO_2NH_2, -COOH
Glutation konjugáció	Glutation-S-transzferáz	epoxidokm, -NO_2
Zsírsav konjugáció	-	-OH

2.1.2. Citokróm P450 enzimcsalád

Klingenberg [3] és Garfinkel [4] 1958-ban egymástól függetlenül patkány májsejtekből izolált egy CO-kötő fehérje-pigmentet, amelynek szerkezetére csak 1967-ben tett javaslatot Sato és Omura. [5] A protoporfirin IX egységet tartalmazó rész miatt az enzimet a kutatók a *hem*-fehérjék közé sorolták. Az enzim CO-dal képzett komplexének jellegzetes 450 nm hullámhossz körüli fényelnyelése miatt Citokróm P450-nek (CYP450) nevezték el. Az enzim aktív része egy porfirin alapvázból álló protoporfirin IX egység, ami négy alfa helyzetű metilénhíddal összekapcsolt pirrol molekulából felépülő gyűrűből áll. (**1. ábra**) A gyűrű eleget tesz a Hückel szabálynak, így az aktív centrum egy heterociklusos aromás rendszernek tekinthető. A CYP450 izoenzimcsalád egyaránt részt vesz mind az exogén, mind pedig az endogén anyagok metabolizmusában. [6]



1. ábra Protoporfirin IX váz, axiális ligandumként ciszteinnel

Csoportosításuk elsődlegesen a fehérjeszekvenciáik alapján történik. Amennyiben az aminosav sorrend legalább 40%-ban egyezik, akkor azonos családjelet kap a CYP rövidítés után, amelyet egy arab szám jelöl (pl.: CYP4). Amennyiben legalább 55%-ban azonos a szekvenciájuk, akkor latin betűvel jelzett alcsalád jelölést kapnak (pl.: CYP3A). Napjainkra

több, mint 270 különböző CYP450 enzimcsaládot azonosítottak, melyből 18 található meg emlősökben. Közülük a CYP1, CYP2, és CYP3 családok szerepe jelentős a xenobiotikumok és kismolekulás gyógyszerhatóanyagok lebontásában. Ezek az enzimcsaládok, ugyan különböző mennyiségben és arányban, de minden sejtben megtalálhatók. A humán CYP450 enzimek a sejtekben membránokhoz kötve találhatók meg jellemzően a mitokondriumban, illetve az endoplazmatikus retikulumban. A *hem* tartalmú aktív rész a sejtplazma felőli oldalon helyezkedi el úgy, hogy a szubsztrát kötőhely minden esteben a membrán felőli oldalra néz. A membránon két csatorna található, egy a hidrofil, egy pedig a hidrofób szubsztrátok számára. Az aktív centrum általában Fe^{3+}, míg alapállapotban azonban Fe^{2+} formában van jelen. Ez utóbbi formában csak az axiális ligandummal képes koordinálódni. [7]

2.1.3. CYP 450 oxidációs mechanizmusa

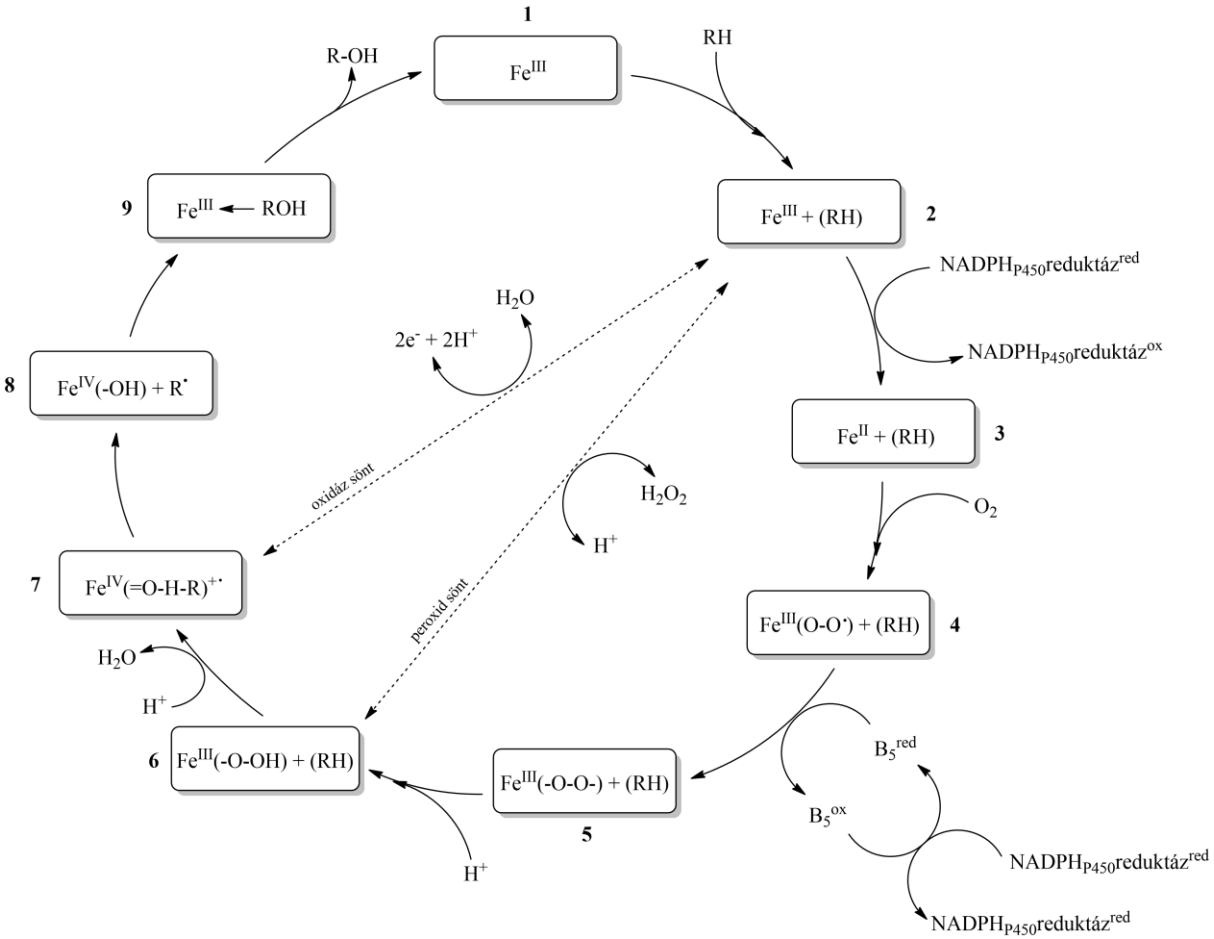
Ahogy korábban említettem, a CYP1, CYP2 és CYP3-as családba tartozó enzimek játszák a legnagyobb szerepet a Fázis I metabolizmusban, melyek közül az öt legjelentősebb, a gyógyszermetabolizmus 95%-áért felelős izoenzim a CYP3A4 (46%), 2C9 (16%), 2D6, 1A1, 1A?. A többi izoenzim főleg endogén anyagok átalakításában vesz részt (pl.: szteroidok, epesavak, zsírsavak és eikozanoidok). A Fázis I oxidációk zömét a hem-fehérje perferriloxi (**1**) komplexe végzi. A folyamat maga egy elektron átmenetével lejátszódó oxidációs reakció. A CYP enzimek által katalizált reakciók részleges sztereo- és regioszelektivitást mutatnak. [8]

A CYP enzimek kevert típusú monooxigenáz enzimek. Az oxidációs reakcióban, amelyet katalizálnak a sejtlégzésből származó molekuláris oxigén egyik atomja a szubsztrátba épül be, míg a másik vízként távozik a rendszerből.

A katalitikus ciklust a **2. ábra** mutatja be. Az enzim központi vas atomja nyugalmi állapotban vas(III) komplexként (**1**) van jelen, melyben a vas egy alacsony spinállapotban, legtöbbször vízzel koordinálódik. Amikor a szubsztrát (RH) vízkilépés közben belép az aktív helyre, a komplex ötös koordinációs állapotot vesz fel és egy magas spinállapotú vas (III)-komplex (**2)** jön létre. A NADPHCYP reduktáz egy-elektronos elektrontranszferláncon keresztül a vas (III)-at (**2**) vas(II)-ionná (**3**) redukálja. Ezt közvetlenül követi a molekuláris oxigén koordinációja a vasatomhoz, miközben egy instabil, úgynevezett vas-oxo komplex (**4**) keletkezik. Egy elektron (**5**) és egy proton addíciójával vas-hidroperoxo komplex (**6**) jön létre. A két oxigén atomot összekötő kovalens kötés heterolitikusan hasad és a keletkező aktív komplex (**7**) egy hidrogénatomot hasít le a szubsztrát molekuláról, miközben egy szubsztrát-gyök és egy vas-hidroxi intermedier keletkezik (**8**). Az intermedier beindítja az ún. oxigén újra-

kötődési mechanizmust (oxygen rebound, **9**), mely során kialakul a végső hidroxilált termék és a vas (III)-ion regenerálódik. Ezután a ciklus újraindul. [9]

A **2. ábra** a két nyíllal jelölt rész két ún. degradációs útvonalat jelöl. Az első az ún. *peroxid sönt,* mely során **6**-ból **2** keletkezik, egy molekula víz kilépése közben. A reakció megfordítható, ha **2**-höz peroxid tartalmú oxidálószert adunk a **6**-os vegyületet kapjuk. Ez lehetőséget nyújt szintetikus úton aktiválható porfirin katalizált reakciók kivitelezésére. A módszer előnye, hogy elhagyhatók a drága és érzékeny reagensek, mint a NADPH, illetve a CYP-reduktáz enzim. Az oldhatósági paraméterek így kiterjeszthetők, ezáltal a reakciók akár vízmentes közegben (pl.: acetonitril, diklórmetán) is elvégezhetők. A másik degradációs útvonal az ún. *oxidáz sönt,* melyben **7** spontán vízvesztés közben szintén **2**-vé alakulhat. [10]



2. ábra A CYP450 katalitikus mechanizmusa

A CYP450 enzimek a szervezetben számos oxidációs reakciót katalizálnak. Ezek közül a legfontosabbak az alifás és aromás szenek hidroxilációs, a heteroatomok dealkilációs, illetve oxidációs, telítetlen szén kötések epoxidációs reakciói, valamint különböző dehidrogénezéses reakciók. [11]

2.2. Metabolizmus vizsgálati módszerek

2.2.1. Hagyományos in vitro metabolizmus vizsgálatok

Egy új gyógyszerjelölt hatóanyag fejlesztése során hagyományosan in vivo és élő szervezeteken alapuló in vitro módszereket alkalmaznak metabolizmus vizsgálatokban. Annak érdekében, hogy minimalizálják a szükséges élőállat kísérleteket a gyógyszerfejlesztés korai fázisában jellemzően in vitro humán és más fajspecifikus vizsgálatokat végeznek el. Ezen vizsgálatok során a cél előrejelezni a hatóanyag lehetséges metabolizmusát, feltérképezni a reaktív vagy toxikus metabolitokat, valamint a gyógyszerkémikusoknak információt nyújtani a vegyület metabolikusan érzékeny pontjairól, így lehetőség nyílik a gyógyszerjelöltek metabolikus stabilitását javítani.

A hatóanyagok jelentős részének a metabolizmusa a májban történik, így az in vitro metabolikus módszerek is jellemzően máj vagy májszövet alapúak. Ezek közül kiemelkednek az ún. máj mikroszóma alapú rendszerek, amely rendszereket széleskörűen alkalmazzák a hatóanyagok metabolikus stabilitásának vizsgálatában. A máj mikroszóma a hepatociták (májsejtek) homogenizátumából többlépcsős ultracentrifugálásával nyert endoplazmatikus retikulumának izolátuma. Különböző fajspecifikus (humán, patkány, egért stb.) mikroszóma standardizált módszerrel nyert izolátumai kereskedelmi forgalomban is elérhetők, melyek így egységes modellként állnak a kutatók rendelkezésére. Relatív olcsóságuk mellett hátrányuk azonban, hogy az általuk katalizált reakciókban kofaktorokat (NADH/NADPH) kell alkalmazni. Másfelől a máj enzimek aktivitása és mennyisége jellemzően egyénfüggők, emiatt a mikroszóma izolátum előállítása során nagy számú, különböző egyéntől származó májat szükséges felhasználni, (ún. poolozott izolátum keverék). Így a vizsgálat során az egyedi eltéréseket elnyomjuk, a hatóanyagok metabolizmusáról általános képet kaphatunk. [12][13]

2.2.2. In vitro metabolikus modell rendszerek

Az előző pont végén említett okok miatt érdemes lehet biomimetikus rendszerek felé fordulni, amelyek sejtmaradékok és kofaktorok, ezáltal a zavaró biológiai mátrix nélkül képesek a vegyületeket oxidálni.

Az irodalomban 3 fő modellezési módszert használnak általánosan az in vitro metabolizmusra, melyek a fenton reakció, az elektrokémiai cellával történő oxidáció, valamint a szintetikus metalloporfirinek alkalmazása.

A fenton reakció a legrégebben alkalmazott a három említett módszer közül, de a mechanizmusa máig vitatott. Két fő komponense a H_2O_2 és valamilyen vas(III)-só. A

vegyületek oxidációját a reakcióban keletkező hidroxil-gyökök végzik a legnagyobb valószínűséggel.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\bullet \quad \text{1. egyenlet}$$

A fő reakció típusok, amelyeket a Fenton reagens által katalizált reakciókban megfigyeltek az *N*-dealkilációs, a hidroxilációs és a *S*-oxidációs reakciók. A fő alkalmazási területe az olyan metabolitok előállítása, amelyet más úton nehéz lenne előállítani, emiatt kiegészítő vizsgálati módszerként szokták alkalmazni.

Elektrokémiai oxidáció egy másik elterjedt in vitro modellezési módszer. Az elektrokémiai cella anódján történik a szubsztrátok oxidációja, a kapott termékek pedig legtöbb esetben jó egyezést adnak az in vivo és a metalloporfirinekkel végzett vizsgálatokkal. A fő megfigyelt oxidációs mechanizmus az *N*-dealkiláció, ami a metalloporfirinek által jellemző katalizálta folyamattal szemben egy-elektron transzferrel megy végbe. Bizonyos hatóanyagokat képes (pl. foszfamid és ifoszfamid) hidroximetilálni is. A technológia előnye, hogy könnyű in-line analitikai eszközökhöz csatolni.

Szintetikus metalloporfirinek a leggyakrabban alkalmazott in vitro biomimetikus katalizátorok, amelyek alkalmazásával a korábban említett módszereknél diverzebb termékprofil állítható elő. A megfelelő körülmények mellett hidroxiláció, *N*-dealkiláció, epoxidáció, *S*-oxidáció, *N*-oxid képzés, oxo csoportok kialakítása, és dehidrogénezés is megfigyelhető. [14][15]

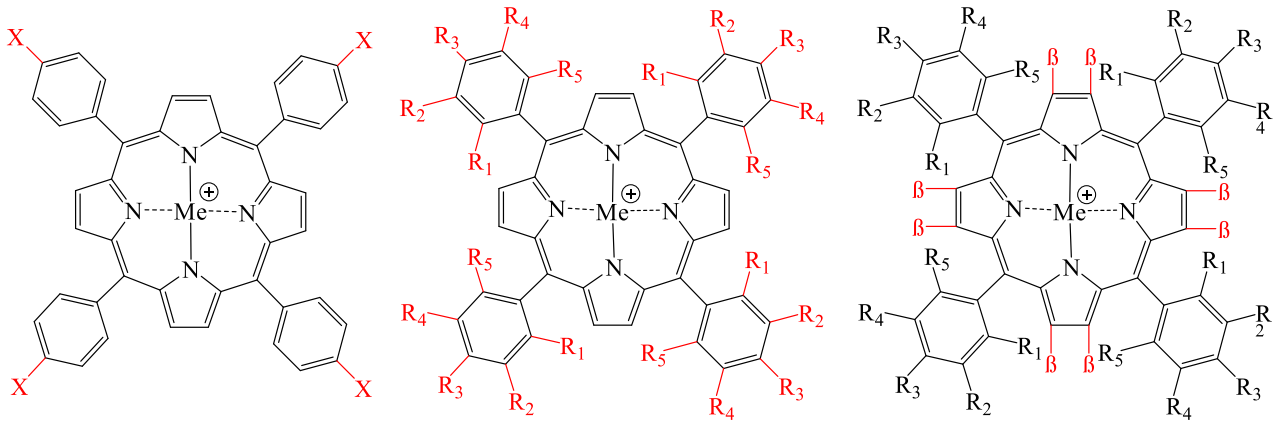
2.3. Szintetikus metalloporfirinek

2.3.1. Szintetikus metalloporfirinek szerkezete és csoportosítása

A biomimetikus oxidációkban alkalmazott szintetikus metalloporfirineket szerkezetük alapján tudjuk csoportosítani, ami egyben a felfedezésük időrendi sorrendjét is leköveti. Az első szintetikus vas-porfirineket, mint biomimetikus katalizátort alkalmazó oxidációs rendszert, 1979-ben Groves és mtsai alkalmazták a CYP450 katalizálta hidroxilációs és epoxidációs reakciók modellezésében, alkánok és olefinek esetében. Ehhez mezo helyzetben fenilcsoportokat tartalmazó porfirint alkalmaztak (mezo-tetrafenilporfirin, TPP). [16] Ezt nevezzük 1. generációs porfirinnek. A probléma az TPP-vel az alacsony katalitikus aktivitása, mivel az érzékeny porfirin szerkezet könnyen degradálódott a reakció körülményei között, illetve lúgos közegben (pH 8-11) jellemzően ún. μ-oxo-dimereket képzett, ami a porfirin inaktiválódásához vezetett.

A második generációs porfirinek fenilcsoportjai nagy térikitöltésű csoportokkal, illetve halogénatomokkal lettek bővítve. A legjobb felhasználhatósággal a fenil gyűrűkön alkil, O-alkil, és szulfonsav csoporttal szubsztituált, illetve perfluorozott, perklórozott és perbrómozott származékok rendelkeztek. Az így kapott metalloporfirin származékok előnye, hogy gátolt a μ-oxo-dimerek képződése a szubszitulált fenilcsoportok sztérikus hatása révén, illetve a rajtuk található elektronszívó csoportok növelik az aktivált oxo-fém forma elektrofil jellegét, így növelve annak katalitikus aktivitását, ezáltal robusztusabb természetű katalizátor állítható elő. Ezen felül a poláris vagy apoláris csoportok bevitelével a porfirin komplex vízoldhatósága javítható.

A harmadik generációs porfirinek pirrol gyűrűit β-helyzetben halogénekkel szubsztituálták, amelyek tovább csökkentik az aromás rendszer elektronsűrűségét, így jobban polarizálják az aktivált komplex vas-oxigén kötését. Ennek következtében ezek a porfirinkomplexek még reaktívabbak, de cserébe a szelektivitásuk lecsökken.



10 **11** **12**

3. ábra Különböző generációs metalloporfirinek**1** (X = H, első generáció; X = -COOH, -SO_3H, -NR_4^+, vízoldható; R_{1-5} = halogén, második generáció; β, R_{1-5} = halogén, harmadik generáció)

A másik csoportosítási lehetőség a nitrogének által koordinált fématom minősége szerint történik. Leggyakrabban alkalmazott központi fémionok a Fe^{2+}, Mn^{2+}, Cr^{2+}, és Ru^{2+}. Ezeket a komplexeket hem-fehérjék működését utánzó katalizátorként alkalmazzák, olefinek epoxidálásában, illetve alkánok oxidációjában. [17] [18]

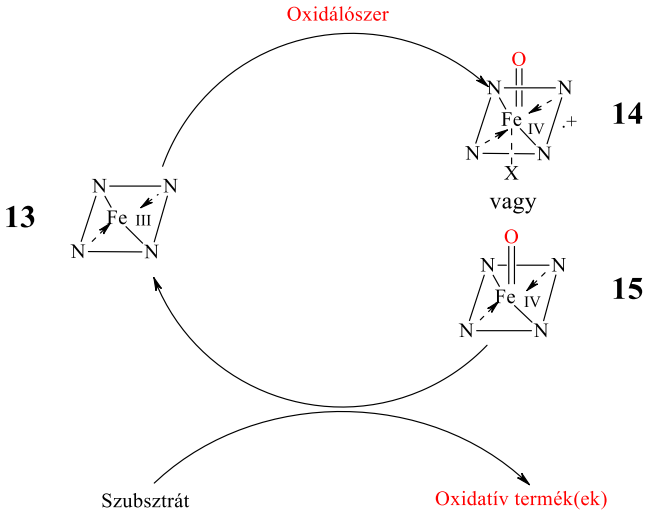
1 A metalloporfirinek szerkezeti képletét irodalmi példák alapján készítettem. Lásd Nagakagi és F. G. Doro munkáit.

2.3.2. Metalloporfirinek alkalmazása biomimetikus katalizátorként

Először 1979-ben alkalmazták sikerrel a szintetikus metalloporfirineket biomimetikus oxidációs reakciókban Groves és munkatársai. Mezo-tetrafenilporfirin vas(III)−jodozilbenzol rendszert alkalmazva sikeresen modellezték a hidroxilációs és epoxidációs reakciókat, melyeket a CYP450 katalizált, egyszerű alkánok és olefinek esetében. [16]

Napjainkban 3 eltérő oxidációs rendszert különböztetünk meg, a porfirin aktiválása szempontjából. A legelterjedtebben alkalmazott rendszerben Fe^{2+}, Cr^{2+} vagy Mn^{2+} központú metalloporfirin mellett oxigén donort alkalmaznak, mint pl. H_2O_2, más szerves peroxidok, jodozilbenzol, perjodátok stb. Az így létrehozott rendszert a CYP450 peroxid sönt (**1. ábra**) mechanizmusához hasonlóan képes a szubsztrátok oxidálására. Egy másik megközelítésben a metalloporfirinek aktiválására molekuláris O_2-t és redukálószert, pl.: $NaBH_4$-et vagy aszkorbinsavat alkalmaznak. Ebben az esetben a teljes CYP450 katalitikus ciklus modellezhetővé válik. Ezen felül *transz*-dioxo-Ru(VI) porfirin katalizátorok esetében elég a molekuláris O_2 jelenléte az oxidációs reakciók lejátszódásához, ezt elsősorban olefinek epoxidációjára használják.

A szintetikus metalloporfirinek oxidációs mechanizmusa az **4. ábrán** látható. Az alapállapotban a **13** (III) oxidációs állapotú központi fématommal rendelkező metalloprfirinből az oxidálószer hatására magas oxidációs állapotú, reaktív oxo-metalloporfirin keletkezik. Ez kétféle úton jöhet létre, a gyakoribb eset 14 oxo-fém(IV) porfirin gyökkation keletkezik. A másik, és sokkal ritkább eset akkor lép fel, ha nincs sem axiális ligandumnak megfelelő vegyület, és ionok sincsenek a rendszerben. Ekkor a torma peroxidáz enzim aktív állapotának megfelelő **15** oxo-fém(IV) porfirin keletkezik. Az így létrejött reaktív oxo-metalloporfirin reagál a rendszerben található szubsztráttal és a megfelelő termékké vagy termékekké alakítja őket, miközben visszaalakul alapállapotba.



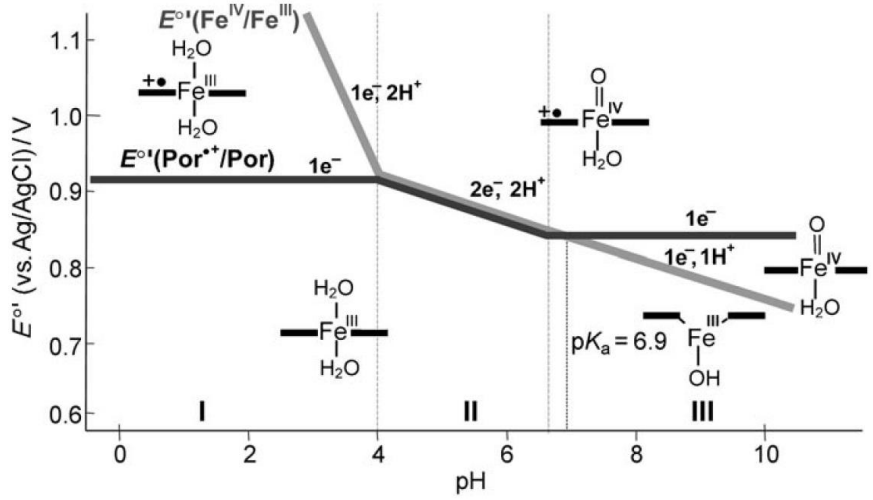
4. ábra Biomimetikus oxidáció mechanizmusa

A szintetikus metalloporfirinek különböző alkalmazásaira számos kutatás folyik napjainkban. Az in vitro biomimetikus alkalmazáson túl számos ipari alkalmazásra is van példa. Iparban alkalmazzák pl. ipari színezékek lebontására, H_2O_2 oxidálószer jelenlétében. [19] Ciklohexanon előállítása ciklohexánból Kobaltporfirin alkalmazásával, [20] Mn központú porfirineket alkalmaznak Valencene oxidálására Nootkatone-ná amelyet Grépfrútaromaként, illetve Rovarírtóként alkalmaznak [21][22][23] továbbá egy másik Mn központú variációt pedig cisz-polibutadién oxidációjára alkalmaznak, hogy poliepoxiddá, azaz polialkohol előanyagává alakítsák. [24]

A porfirinváz alapú fémkomplexek alkalmazhatók CYP450 enzimek működésének közvetlen utánzására (biomimicri), ami az enzim aktív magjában található protoporfirin IX egységgel való hasonlóságon alapul. Ahogy korábban említettem, szintetikus porfirinek módosíthatók különböző oldalcsoportokkal, amelyek javítják a katalizátor hatékonyságát. Ezáltal ezek a szintetikus porfirinszáramzékok fontos szerephez jutnak a metabolitkutatásban, mert a segítségükkel előrejelezhetők a kismolekulás gyógyszerek metabolitjai, illetve egy szintézis lépésben elő lehet állítani őket. Alkalmazhatók továbbá hem-fehérjék (Citokróm P450, lignin peroxidáz, nitrogén monoxid szintetáz) által katalizált oxidatív folyamatok modellezésre is. Ipari alkalmazása is egyre jobban elterjedt mert alkalmazható alkánok, alkének (akár kőolajfrakciók is) oxidációjához oxaziridinek átrendeződéséhez, epoxidok izomerizációjához, hidroxilcsoport szililezési reakciójához, valamint aziridin gyűrű képzésére, akár áramlásos reaktorban is, szerves vegyületek sztereo-, illetve regioszelektív oxidációjára, szennyezőanyagok detoxifikációjára.

2.3.3. A porfirinek pH függő oxidációs mechanizmusa

A biomimetikus oxidációt mezo-tetra(4-szulfoniloxifenil) porfirin – vas (III) klorid (FeTSPP) katalizátorral végeztem előnyös tulajdonságai miatt (jó vízoldhatóság, nincs sztérikusan gátló halogén benne, belső ionkötéseket képes kialakítani), viszont Wolak és mtsai eredményei alapján a reakcióközeg pH-ja meghatározó a szelektivitás, a degradáció sebessége és az oxidációs mechanizmus szempontjából. Feltételezésük alapján az oxidáció a porfirinváz gyökkationná alakulásával, vagy pedig a központi atom oxidációjával (Fe^{III} -> Fe^{IV}) történhet. Az első folyamat nem érzékeny a pH-ra, míg a második, az oxo-ligandumot eredményező folyamat, függ a közeg pH-jától. Tehát az $E^{0\prime}_{Fe^{IV}/Fe^{III}}$ pH függésének következtében az $E^{0\prime}_{Fe^{IV}/Fe^{III}}$ és a $E^{0\prime}_{P^{\cdot+}/P}$ relatív helyzete a pH skálát három részre osztja, mely egyben meghatározza a termodinamikailag legstabilabb oxidált forma szerkezetét is.



5. ábra *Mezo-tetra(2,4,6-trimetil-3-szulfoniloxifenil) vasporfirin (FeTPPS) elektrokémiai oxidációjának potenciál függése a közeg pH-jától [25]*

Az **5. ábrán** megjelölt három pH tartományban ennek megfelelően a következő oxidációs folyamatok játszódhatnak le:

I. tartomány (pH < 3,5): $[Fe^{III}(P)(H_2O)_2] \rightarrow [Fe^{III}(P^{\cdot+})(H_2O)_2] + 1\ e^-$

II. tartomány (3,5 < pH < 6,5): $[Fe^{III}(P)(H_2O)_2] \rightarrow [Fe^{IV}(P^{\cdot+})(O)H_2O] + 2\ e^- + 2\ H^+$

III. tartomány (pH > 7): $[Fe^{III}(P)(H_2O)_2] \rightarrow [Fe^{IV}(P)(O)H_2O] + 1\ e^- + H^+$

Ez alapján a porfirin komplex, mint redox partner a peroxid kötést tartalmazó oxidálószerek O-O (jódtartalmú oxidálószerek esetén O-I) homolitikus kötéshasadását segíti pH<3,5 és pH>7 tartományokban (1e$^-$-os oxidáció), amíg 4<pH<7 közötti tartományban a heterolitikus kötéshasadás a kedvezményezett. Ez a 2 e$^-$-os oxidáció, mechanizmusát tekintve megfelel a fiziológiásan végbemenő folyamatnak (mikroszomális CYP450 enzimrendszer által

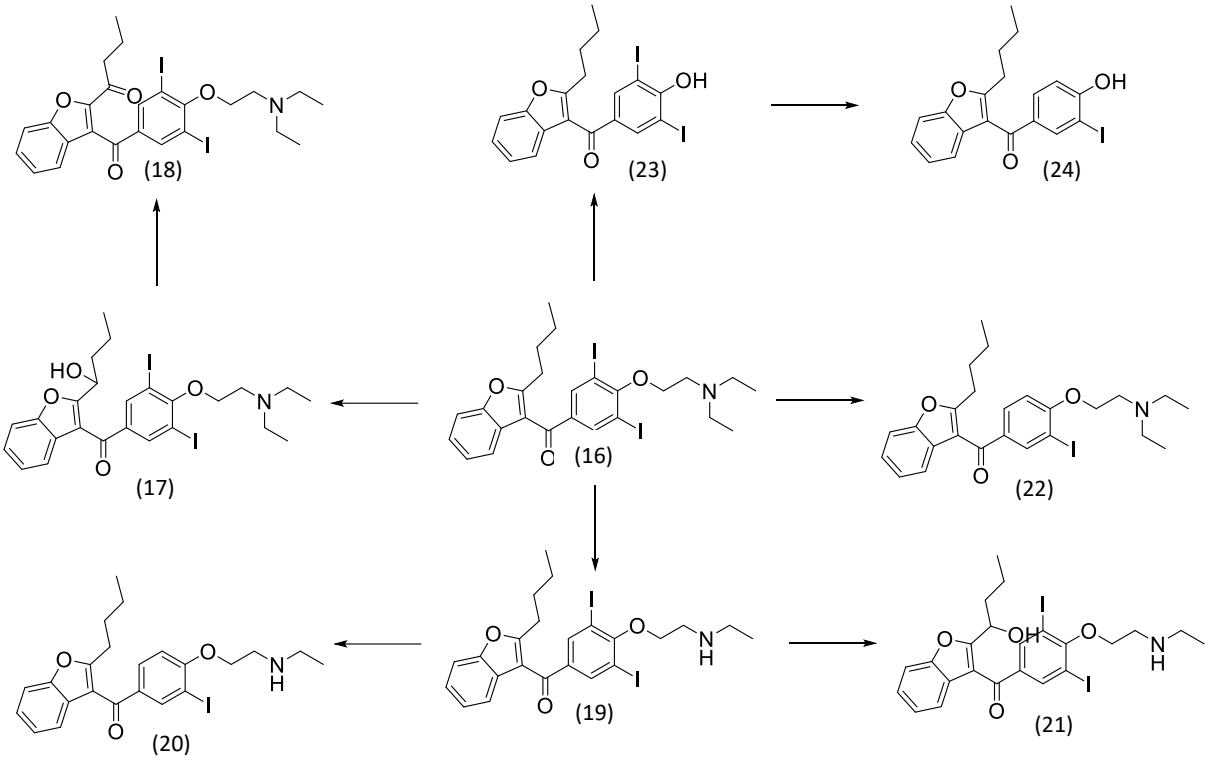
katalizált folyamatoknak felel meg). Ezen kívül más tulajdonságok is tudják befolyásolni a mechanizmust (oxidálószer minősége, porfirin szerk., oldószer minősége, axiális ligandum jelenléte, fém ellenionja aprotikus közegben). Fontos továbbá megjegyezni, hogy az oxidálószer O–O kötésének homolitikus, vagy heterolitikus felhasadásának nem megfelelő módja gyakran a porfirin alapú biomimetikus rendszerek gyengepontja, mivel ez a porfirin degradációját okozhatja. Az O–O kötések homolitikus hasadása során képződő gyökök magával a porfirinnel is képesek reagálni, inaktiválva azt.

Homogén rendszerben a porfirin váz degradációjának másik lehetséges útja a következő folyamat:

$$2[Fe^{IV}(P^{\cdot+})(O)] \rightarrow [Fe^{IV}(P)(O)] + inaktiválódott\ porfirin$$

Fenti degradációs út háttérbe szorítására szolgálhat a szilárd hordozóhoz rögzített porfirinek alkalmazása, ahol az aktívált porfirin komplexek reakciója gátolt. [25][26][27]

A fent említett oxidációs mechanizmusokat az Amiodaron (**16**) példáján fogom bemutatni. Savas pH-n a biomimetikus oxidáció fő termékei az 1'-es szénatomon történő hidroxilálás (**17**) és 1'-es szénatomra oxo csoport bevitel (**18**) révén képződtek. Ezzel összevetve pH 4,5-ön a fő metabolit az az egyszeresen *N*-deetilált származék (**19**), valamint megjelenik mellette a deetilált származék olyan változata, amelyről a 13-as szénatomon le lett szedve a jódatom (**20**). A pH 7,4-en végzett biomimetikus rendszer pedig egy harmadik metabolikus átalakulási képet adott számunkra, ahol lényegesen kisebb a konverzió, de a fő (major) metabolit még mindig a deetilált származék, illetve mellette sokkal diverzebb a termékösszetétel. Jelen van 1'-oxo származék, azaz 1'- hidroxi származék, valamint az egyik etil csoport metil csoportra cserélődik az egyik származékban.



6. ábra Amiodaron biomimetikus oxidációs termékei

Ez alapján is látszik, hogy mennyire eltérő termékösszetételeket kapunk, ahogy különböző pH-kon végezzük a reakciókat. [28][29][30][31]

2.4. Gyógyszermetabolitok szintézise

A gyógyszerek preklinikai fejlesztésének az egyik fontos lépése az adott hatóanyag metabolitjainak azonosítása. Az in vitro, illetve in vivo metabolizmus vizsgálatokban a gyógyszerjelölt molekulából képződő metabolitok mennyiségét és szerkezetét különböző analitikai rendszerekben (HPLC-MS, HRMS, NMR) igyekeznek meghatározni.

A gyógyszerhatóságok megkövetelik egyes, 10%-nál nagyobb mennyiségben keletkező metabolitok toxikusságának vizsgálatát. [37] Ehhez azonban akár több grammos mennyiség szükséges, mely mennyiséget egy élő szervezetből, azaz in vivo vizsgálat során rendkívül nehéz izolálni. Emiatt az analitikai vizsgálatok alapján azonosított metabolitot, vagy metabolitokat jellemzően költséges úton, totálszintézissel elő kell állítani. Sok esetben ez csak meglehetősen körülményesen, egzotikus reakcióutakon, többlépéses szintézissel valósítható meg, de előfordulhat az is, hogy a szintetikus vegyész nem képes gazdaságos módszert kidolgozni megfelelő mennyiségű metabolit előállítására.

Mindkét esetben előnyös lehet a biomimetikus reakcióutak alkalmazása, hiszen a metabolitok szintézise ezzel a módszerrel az anyavegyületből egy lépésben megvalósítható, így nem szükséges új reakcióutak keresése. Biomimetikus rendszerek alkalmazása során nem csak

szerkezet meghatározásra nyílhat lehetőség, hanem a toxikológiai vizsgálatokhoz szükséges grammos mennyiség is könnyen előállíthatóvá válik, amennyiben folyamatos áramú rendszerbe integráljuk a biomimetikus rendszert. Kutatócsoportunkban ilyen irányú kísérletek is folynak, azonban jelen dolgozatban a biomimetikus rendszer keminformatikai eszközökkel történő leírására törekedtünk.[32][33][34][35][36]

2.5. Korábbi eredmények bemutatása

Kutatócsoportunkban korábban kifejlesztettek egy 96-lyukú mérőtálcán (plate) alapuló, közepes áteresztőképességű biomimetikus oxidáló szűrőrendszert, amelyet HPLC-DAD technika segítségével jellemeztek. A módszer alkalmas volt a szubsztrátok biomimetikus stabilitásának meghatározására, azaz az anyavegyület konverziója, valamint a minor metabolit/összes metabolit aránya a rendszer két fő paramétere. A biomimetikus rendszerben 45 különböző, a klasszikus gyógyszerkincsből kiválasztott vegyület átalakulását vizsgálták, pH4,5-es közegben, metanol koszolvens jelenlétében, FeTPPS porfirint biomimetikus katalizátor és különböző oxidálószerek (*t*BuOOH, H_2O_2 és $NaIO_4$) alkalmazása mellett.

Az így kialakított biomimetikus rendszerben a kutatócsoportunk az Amiodaron antiarritmikus hatóanyag pH függő oxidációját részletesen is vizsgálta, melyet a 2.x.x fejezetben mutattam be részletesen. Külön kiemelendő, hogy e munkában az Amiodaron több, az emberi szervezetben képződő, korábban nem azonosított metabolitot sikerült izolálni és NMR vizsgálatok alapján szerkezetüket megadni, pontosítani. [26]**Hiba! A hivatkozási forrás nem található.**

3. Célkitűzés

Munkám során célul tűztem ki a kutatócsoportunk korábbi munkájában kifejlesztett és az Amiodaron hatóanyag metabolitjainak előállítása során optimalizált biomimetikus rendszer felhasználásával egy előre megadott vegyületkönyvtáron végezzek biomimetikus szűrővizsgálatot.

Ennek érdekében kiválasztottam több mint száz vegyületet, amiket a biomimetikus szűrésemben vizsgálni kívánok. A biomimetikus reakciókat 3 különböző pH-n kívánom elvégezni és a reakció elegyeket HPLC-DAD-MS és HRMS módszerekkel kívánom vizsgálni.

A munkám másik célja az előbb leírt módon nyert adatokat különböző statisztikai módon feldolgozni. Így akár később megjósolhatóvá válhatnak a vegyületek biomimetikus átalakulása.

Emellett a vegyületek biomimetikus metabolitprofilját össze kívánom hasonlítani az emberi szervezetben képződő metabolitokkal. A célom nem csupán a szervezetben keletkező metabolitok biomimetikus rendszerben történő előállítása, hanem a minél szélesebb termékprofil, amivel a gyógyszerkémiai teret kívánom bővíteni.

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált vegyszerek, analitikai módszerek, berendezések és szoftverek

A kísérletek során analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk. A metanolt, acetonitrilt, ecetsavat, nátrium-dihidrogén- és dinátrium-hidrogén foszfátot, illetve az oxidálószerként alkalmazott *terc*-butil-hidroperoxidot (*t*BuOOH) és a gyógyszer szubsztrátokat a Merck Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A mezo-tetra(szulfoniloxifenil)vasporfirin (FeTPPS) katalizátort a Frontier Scientific Inc.-től (Logan, Utah, USA) rendeltük. Az analitikai méréseknél használt hangyasavat az Alfa Aesar-tól (Ward Hill, Massachusetts, USA) vásároltuk. A mérések során használt desztillált vizet Millipore (Bedforf, Massachusetts, USA) Milli-Q víz tisztító rendszerrel állítottuk elő.

A dolgozatban leírt fizikai-kémiai paramétereket számítása ACD/Percepta v2020 Build 3382 szoftverrel történt.

4.1.1. Kromatográfiás módszer – HPLC-DAD-MS

A kísérleteket Waters 2795 folyadékkromatográfiás rendszerhez kapcsolt Water Micromass Quattro Ultima Pt tandem kvadrupol tömegspektrométerrel (Milford, MA, USA) végeztük. A detektálást Waters 2487 Dual λ Absorbance detektorral végeztük. Az elemzést 40 °C- on végeztük Kinetex XB C18 oszlopon (150x4,6 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) 1 ml/perc mozgófázis áramlási sebességgel. Az alkalmazott A eluens összetétel 0,1 térfogatszázalék Hangyasav vízben oldva, B eluens pedig MeCN:H2P 95:5 arányú elegye, amihez 0,1 térfogatszázalék hangyasavat adtunk. A gradiens elúciós program: 0 – 11 perces tartományban 5-100% B lineáris gradienst, 11 – 13 perces tartományban 100% B izokratikus szakaszt alkalmaztunk. Ezt egy 2 perces kiegyenlítési periódus követett a következő injekció előtt 5% B összetétel alkalmazásával. Az injektálási térfogatot 5 μl-re állítottuk be, és a kromatográfiás profilt 220 (± 4) nm hullámhosszon regisztráltuk. A tömegspektrometriás körülmények a következők voltak: ionforrás: ESI, pozitív ionmód, pásztázó ion üzemmód (150 – 600 m/z), szárítógáz (N2) hőmérséklete 350 °C, áramlási sebessége 5,5 l/perc, porlasztó gáz (N2) nyomás 6 bar, kvadrupol hőmérséklete 120 °C, kapilláris feszültség 2500 V, fragmentor feszültség 60 V. Az adatok feldolgozása MassLynx 4.0 szoftverrel történt.

4.1.2. HRMS

A termékelegyekben található vegyületek pontos tömegét Waters Xevo G2-XS QTOF nagyfelbontású tömegspektrométer (Milford, MA, USA) segítségével határoztuk meg. A minta injektálása REIMS autosamplerrel történt (Wellplate reader). A mintaoldat mobilizálása 2940

nm es hullámhosszú 7 ns pulzusszéleségű 5 mJ/impulzus energiájú lézerimpulzusokkal, 20 Hz frekvenciával történt. A tömegspektrometriás körülmények a következők voltak: REIMS, pozitív ionmód, pásztázó ion üzemmód (50-1200 m/z), 0,5 s scan time. Lockmass-ként leucin-enkefalin belső sztenderdet használtunk 0,1 g/l koncentrációban, izopropil alkoholos oldatban. A kromatogrammok felvétele és kiértékelése Masslynx 4.2 szoftver segítségével történt.

4.2. Kísérletek leírása

4.2.1. Biomimetikus reakciók általános leírása

A kísérleteimet 1,5 ml térfogatú mikrocentrifuga csövekben (Eppendorf® Safe-Lock) végeztem. A reakcióelegyek össztérfogata minden esetben 0,5 ml volt. Minden vegyület esetében készítettem csak kiindulási vegyületet tartalmazó referencia, valamint ellenőrizendő a kiindulási vegyület oxidálószerrel szembeni stabilitását porfirin nélküli, csak *t*BuOOH-t tartalmazó reakció elegyeket. Ebben a két esetben az hiányzó térfogato(ka)t metanollal pótoltam. A kísérletekbe bevont hatóanyagokból minden esetben 10 mM-os törzsoldatokat készítettem DMSO felhasználásával. Amennyiben az adott anyag nem oldódott fel teljes mértékben DMSO-ban más oldószert alkalmaztam, amelyet a függelékben tüntetek fel. Minden csőbe 370 µl metanolt, 10 µl 10 mM-os gyógyszerhatóanyag törzsoldatot mértem be. A biomimetikus mintákhoz 13,6 µl FeTPPS (0,735 mM, metanolban oldva) oldatot adtam, majd a pH-függő, csak oxidálószert tartalmazó és a biomimetikus mintákhoz hozzáadtam 100 µl megfelelő pH-jú vizes puffer oldatot (64 mM). Az így elkészített reakcióelegyekhez ezután 6,8µl *t*BuOOH törzsoldatot (147 mM) adagoltam. A törzsoldatok és porfirinoldat koncentrációja úgy van beállítva, hogy a végső reakcióelegyben az egyes komponensek arányai a következők legyenek:

c(porfirin):c(szubsztrát):c(*t*BuOOH) = 1:10:100

A reakcióelegyeket 1 órán keresztül 37 °C-on rázattuk (Eppendorf Thermomixer Comfort, 1100 RPM). Az így kapott reakcióelegyeket hígítás nélkül vizsgáltuk a **4.1.1. pontban** leírt HPLC-DAD-MS módszerrel.

A reakcióban alkalmazott puffereknek az alábbi módokon készítettem el.

- pH=2,7
  64 ml 0,1 M-os hangyasav oldatot desztillált vízzel 100ml-re higítottam.
- pH=4,5
  201,3µl jégecet és 236,16 mg vízmentes NaOAc-ot kimértem, majd 100 ml-re higítottam desztillált vízzel.

- pH=6,5

  0,41 g $Na_2HPO_4*2H_2O$ és 0,49g NaH_2PO_4-et mértem ki, majd 100 ml-re állítottam desztillált vízzel.

- pH=7,4:

  0,86 g $Na_2HPO_4*2H_2O$ és 0,19g NaH_2PO_4-et kimértem, majd 100 ml-re állítottam desztillált vízzel.

Minden esetben pH mérővel ellenőriztem az oldatok kémhatását és amennyiben szükséges volt 0,1 M-os sósav vagy 0,1 M-os NaOH oldattal állítottam be a közeg pH értékét.

5. Eredmények

Ahogy azt a 2.5. fejezetben említettem, kutatócsoportunkban korábban már végeztek 45 vegyület bevonásával biomimetikus szűrővizsgálatot. Azonban ezen munkának a célkitűzése kimerült a vegyületek pH-4,5-es közegben végzett biomimetikus stabilitásának vizsgálatában, különböző oxidáló szerekkel szemben, FeTPPS porfirin hiányában, illetve jelenlétében. Az ebben az esetben alkalmazott HPLC-DAD követő analitikai vizsgálat csupán limitált információt volt képes szolgáltatni, így csak az anyavegyület konverzióját, valamint a minor metabolit/összes metabolit arányt határozták meg.

Kutatócsoportunk egy másik munkája rávilágított arra, hogy a biomimetikus oxidáció termékprofilja függ a reakcióközeg pH-jától.

Ezen két kutatási témát összekapcsolva végzetem el a vizsgálataimat. A vizsgált vegyület készletet úgy válogattam össze, hogy a gyógyszerkémiai teret szerkezeti és fizikai-kémiai értelemeben vett diverzitás alapján megfelelően le tudjam fedni.

5.1. A vizsgált molekulák elhelyezkedése a gyógyszerkémiai térben

Gyógyszerkémiai téren az összes előállítható molekulát értjük, azonban ezen molekulák közül nem mindegyik alkalmas arra, hogy gyógyszerhatóanyaggá váljon. Ehhez arra van szükség, hogy egy molekula eleget tegyen bizonyos farmakológiai és farmakokinetikai tulajdonságoknak. Ezeket a kritériumokat összefoglaló néven gyógyszerszerűségnek vagy gyógyszer hasonlóságnak (drug-likeness) nevezzük. Ezek olyan minőségi követelmények, amelyet a gyógyszerkincsünk alapján statisztikai módszerekkel határoztak meg. Az egyik legismertebb gyógyszerszerűségi követelményrendszer az ún. Lipinski-szabály, melyet 1997-ben Christopher A. Lipinski fogalmazott meg, melynek egyik alapja, hogy az orálisan adagolt gyógyszerhatóanyagok nagy többsége relatív alacsony molekulatömegű és mérsékelt a lipofilitása. [38] A Lipinski-szabályt a következőképpen írja le a várhatóan jó *per os* biohasznosulással rendelkező hatóanyagokat. Azok a molekulák számítanak gyógyszerszerűnek, amelyeknek a molekulatömege 500 Da-nál kisebb, az oktanol-víz megoszlási hányadosuk logaritmusa (log*P*) kisebb mint 5, a molekulában lévő hidrogén donorok száma kisebb, mint 5 és a hidrogén akceptor molekuláknak a száma kevesebb mint 10. Fontos azonban kiemelni, hogy a törzskönyvezésre kerülő új, orálisan adható hatóanyagoknak csupán 50%-a felel meg a Lipinski-szabálynak.

A Lipinski-szabályt számos módon kiegészítették az elmúlt, közel 25 évben és más tulajdonságok kritériumaival egészítették ki. Ilyen tulajdonság például a molekulát alkotó atomok száma, vagy a poláris molekulafelület nagysága (TPSA). A Lipinski-szabály mellett

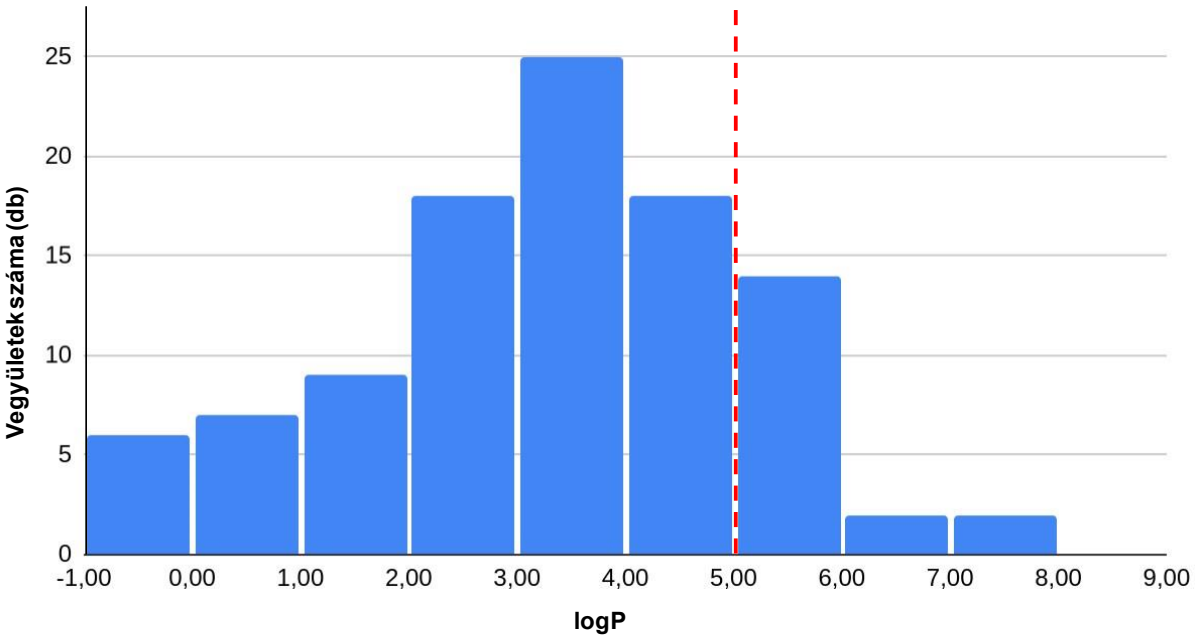
más, a gyógyszerszerűséget jellemző kritérium-rendszereket is kidolgoztak. Ilyen pl. a gyógyszerfejlesztésben használt vezérmolekula szerűség (lead-likeness). [40]**Hiba! A hivatkozási forrás nem található.** Azonban jelen munkában utóbbi alkalmazása nem előnyös, mivel jelentősen leszűkítené az alkalmazott kémiai teret.

Az általunk, a jelen dolgozatban vizsgált 101 db vegyület (**F1. ábra, Függelék**) tulajdonságait összegeztük és a következő diagrammokon ábrázoltuk (**7.-13. ábrák**), valamint jellemeztük a gyógyszerkémiai térnek való megfelelőségét a Lipinski-szabály alapján.

5.1.1. A kiválasztott hatóanyagok által reprezentált kémiai tér a Lipinski-szabály alapján

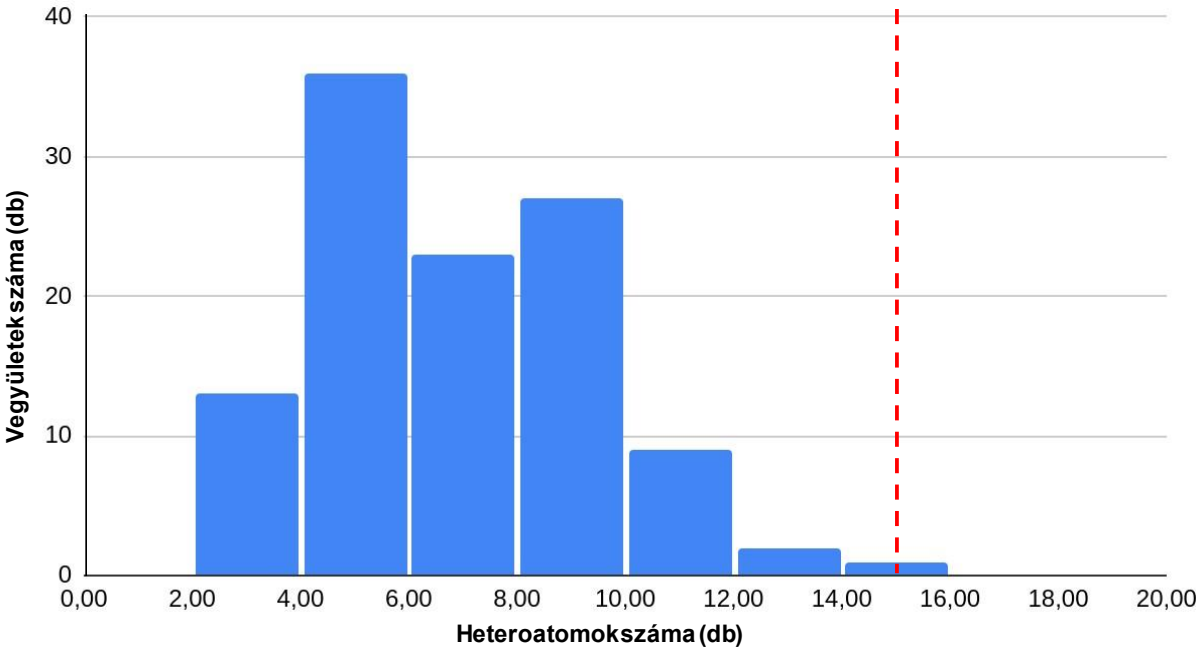
Ahogy a célkitűzésben említettem munkánk szempontjából fontos volt, hogy kellő mértékben lefedjük a gyógyszerkémiai teret, mivel ezeket az eredményeket később, gyógyszerszerű vegyületek biomimetikus oxidációjának előrejelzésében kívánjuk használni. A kiválasztott vegyületkészletünk tulajdonságait az alábbiakban bemutatom be, illetve vizsgálom, hogy a Lipinski-szabálynak megfelelő kémiai teret fedjük le ezekkel.

A gyógyszereknek egy fontos tulajdonsága a lipofilitásuk, hiszen ez határozza meg a sejtmembránokon való felszívódásukat és a szervezetben való eloszlásukat. Ezt a paramétert az ún. log*P* paraméter jellemzi, amely az adott vegyület oktanol-víz kétfázisú rendszerben történő megoszlásának a tízes alapú logaritmusa. Minél lipofilebb egy molekula, a log*P* értéke annál nagyobb és a vízoldhatósága jellemzően annál rosszabb, így a hatás kialakulásához szükséges koncentráció a szervezetben nehezen vagy egyáltalán nem alakul ki. Azonban a kis log*P* érték sem előnyös, mivel ez hatóanyagok biológiai membránokon való passzív transzportját nehezíti, így a hatás helyét nehezebben érheti el. A Lipinski-szabály a log*P* értéket 5-nél kisebb értékben határozza meg. Jól látható a **7. ábrán**, hogy a szűrőrendszerünkben lévő vegyületek döntő többsége ezt a kritériumot teljesíti. A vegyületek számát megvizsgálva jól látható, hogy egy normális eloszlású hisztogrammot kapunk, aminek a leggyakoribb értéke 3 és 4 között található. A log*P* gyakoriság profil összességében a vegyületkészlet megfelelő diverzitását igazolja.



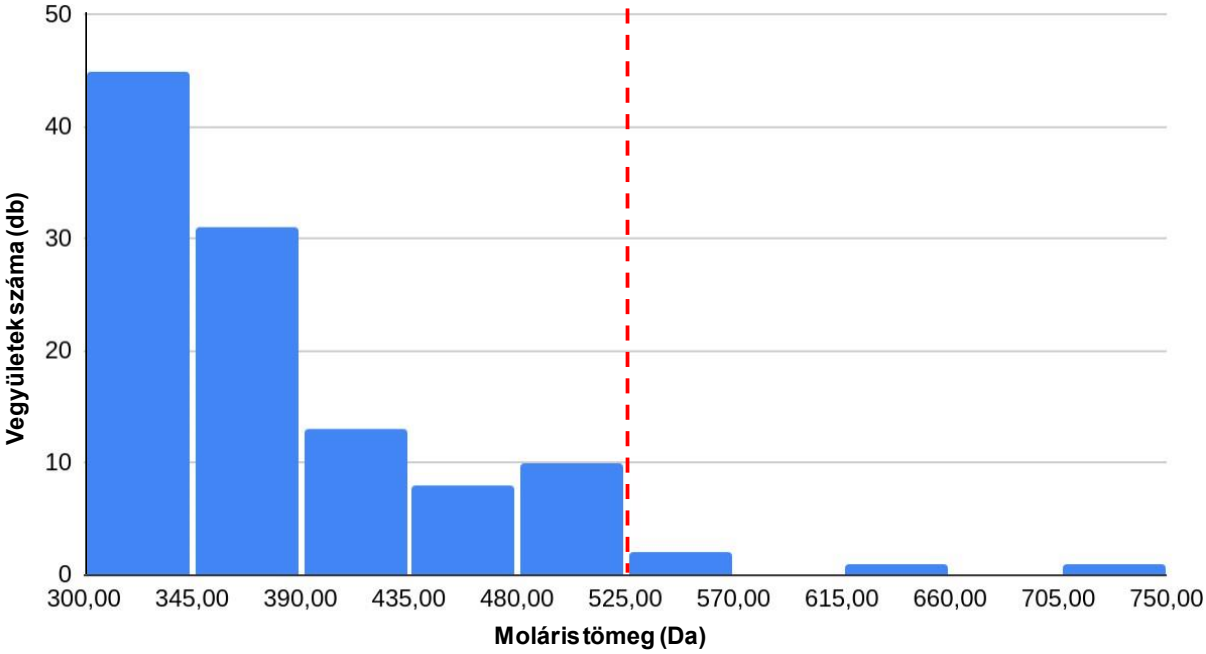
7. ábra A vegyületeink log*P* eloszlása

A Lipinski-szabály kitér a hidrogén híd kölcsönhatás donor és akceptor atomok számára is. Hidrogén híd kölcsönhatásban jellemzően olyan hidrogének vesznek részt, amelyek valamilyen szénnél nagyobb elektronegativitású heteroatomhoz kapcsolódnak. Ezt a számot 5-ben maximalizálja a szabály. Emellett a hidrogén hidas kölcsönhatásban részt vevő akceptorok optimális számára is megadja a szabály, amelyet 10-ben maximalizál. Együttesen a hidrogén hidas kölcsönhatásban résztvevő atomok számát jól közelíthetjük a heteroatomok számával, amely így 15-nél nem lehet több. A **8. ábrán** látható a vegyületeinkben található heteroatomok számának eloszlása, ami alapján igazolható a fizikai-kémiai diverzitás, illetve, hogy ezt a kritériumot mindegyik vegyületünk teljesíti.



8. ábra Vegyületek eloszlása a heteroatomok számának függvényében

Végül a Lipinski-szabály kitér a molekulatömegre vonatkozó kritérium megfogalmazására is. Eszerint egy gyógyszerszerű vegyület molekulatömege nem lehet nagyobb 500 Da-nál. Az **9. ábrán** látható a molekulák száma a molekulatömeg függvényében. Jól látható, hogy a vegyületeink döntő többsége teljesíti ezt a kritériumot is.



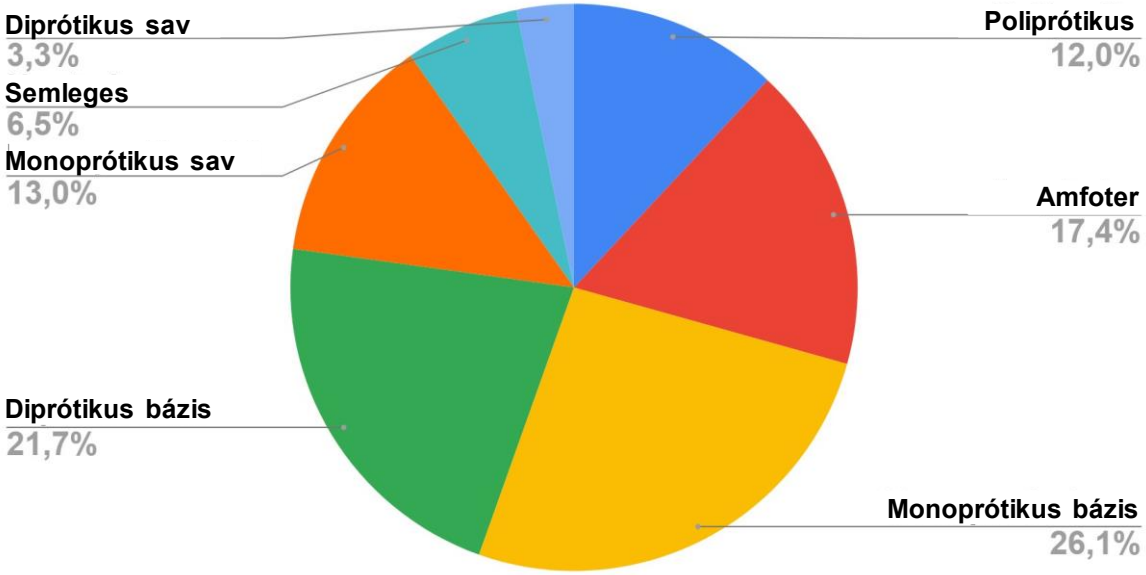
9. ábra A vegyületek molekulatömeg szerinti eloszlása

Összefoglalva elmondhatom, hogy a jelenlegi molekulakészletünk jól leírja a gyógyszerkémiai teret és fizikai-kémiai értelemben is kellően diverz. Ez a megállapítás nem

meglepő, hiszen kísérleteinkben jellemzően piacra került, törzskönyvezett gyógyszerhatóanyagokat választottunk változatos terápiás körből.

5.1.2. Molekulák sav-bázis karakterének vizsgálata

A gyógyszervegyületek egyik fontos tulajdonsága a sav-bázis karakterük. Amennyiben egy vegyület tartalmaz olyan funkciós csoportot, ami a szervezetben előforduló különböző pH-kon eltérő ionizációs vagy akár semleges formában jelen tud lenni, az jelentősen befolyásolja az adott vegyület oldhatóságát, a szervezetben történő eloszlását, illetve a megváltozott szerkezet miatt akár annak a hatását is. Az alábbi kördiagrammon az általunk kiválasztott gyógyszervegyületek felosztása látható, a bennük lévő savas, illetve bázikus karakterű funkciós csoportok száma alapján.

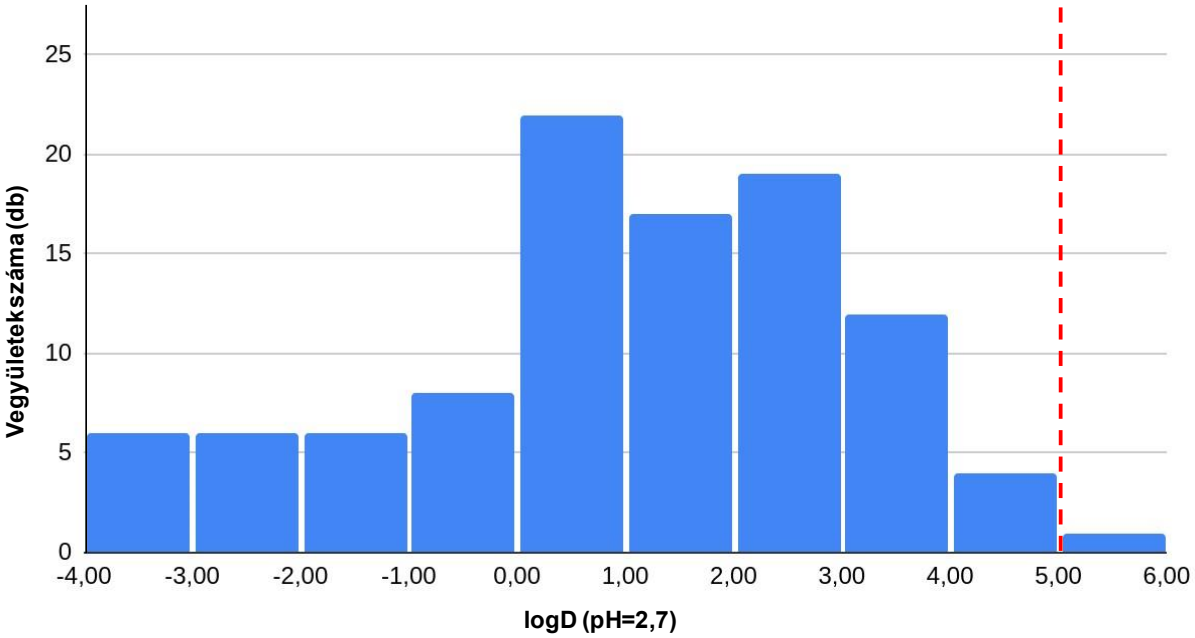


10. ábra A vegyületek sav-bázis karaktekének megoszlása

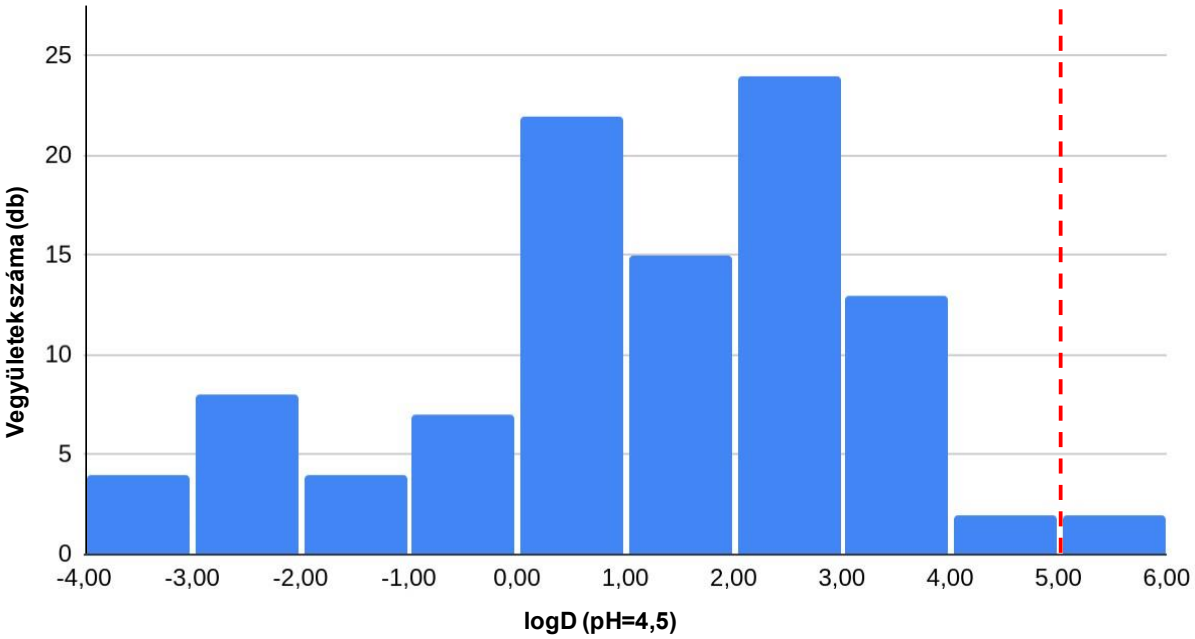
Jól látható a bázikus karakterű vegyületcsoportok túlsúlya a gyógyszerkészletünkben, mivel a vegyületek több mint kétharmada tartalmazott ilyen csoportot. Emellett érdemes felhívni a figyelmet a semleges, nem-disszociáló vegyületek kis számára.

Emellett meghatároztuk az alkalmazott hatóanyagok várható log*D* értékeit az alkalmazott pH-kon. A log*D* érték, hasonlóan a log*P* értékhez, a vegyület lipofilitásáról ad információt, azonban a megoszlási hányadost ebben az esetben nem a vegyület semleges formájára, hanem különböző pH-jú vizes puffer jelenlétében, azaz a széles pH tartományban határozzák meg, értelmezzük. Jól látható az alábbi, **11.-13. ábrákon** a növekvő pH értékek mellett a vegyületek log*D* értékének eloszlás-változása. Minél savasabb a közeg kémhatása, a

bázikus csoportok annál inkább protonálódnak. A protonált vegyületek a töltésükből kifolyólag inkább a vizes, mint az oktanolos fázisban oszlanak meg. Ezt mutatja 11. és 12. ábra, ahol pH 2,7 és 4,5-ös közegekben a vegyület nagyobb száma vesz fel negatív log*D* értéket.

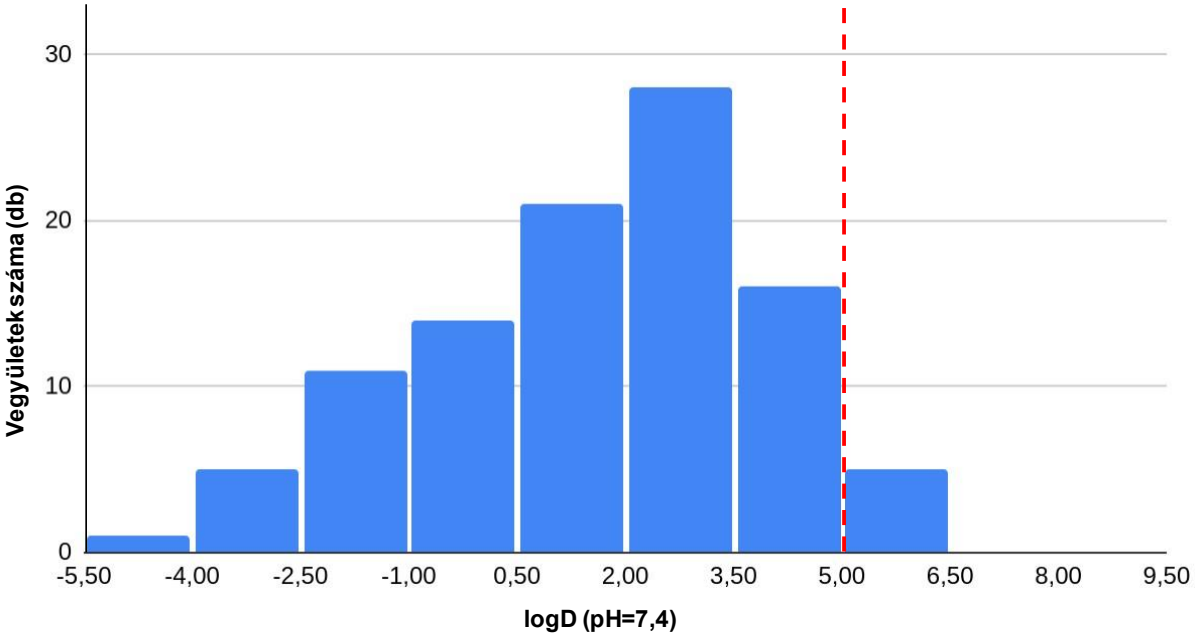


11. ábra Log*D* értékek eloszlása pH = 2,7-en



12. ábra Log*D* értékek eloszlása pH = 4,5-ön

A pH emelésével azonban a protonáltsági fok is változik, jellemzően csökken, így a log*D* értékek is összességében növekedni fognak.



13. ábra Log*D* értékek eloszlása pH = 7,4-en

Az ábrákról jól látható, hogy a vegyületeink log*D* értéke jellemzően minden pH-n 5 alatti.

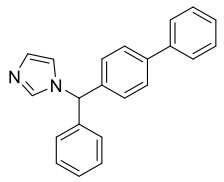
5.2. Biomimetikus eredmények bemutatása

Mielőtt a biomimetikus kísérletek eredményeit ismertetném, néhány mondatban bemutatom a biomimetikus szűrőrendszer általános felépítését.

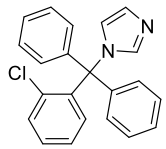
Minden vegyület esetében 10 mM-os DMSO oldószeres törzsoldatot készítettünk. Azonban nem minden vegyületet oldódott DMSO-ban ez esetben más oldószert alkalmaztunk, amelyet a függelékben lévő táblázatban (**F1 ábra, Függelék**) feltüntettünk. A vegyületeket tartalmazó törzsoldatokból a reakcióelegyekbe történt a bemérés. Minden biomimetikus reakció esetén a kereskedelmi forgalomban kapható mezo-tetra(paraszulfoniloxifenil) vasporfirint (FeTPPS) alkalmaztam, mint biomimetikus katalizátort, melynek kedvező oldhatósági viszonyokat az alkalmazott vizes-metanolos rendszer biztosít. Oxidálószerként a korábbi munkák során kedvezőnek talált *t*BuOOH oxidálószert alkalmaztam. Minden vegyület esetében, minden pH értéken végeztünk porfirint nem tartalmazó, csak oxidálószer jelenlétében végzett kísérleteket, hogy a nem biomimetikus átalakulásokat kiszűrjem. A reakcióelegyeket 1 órán keresztül rázattam, majd hígítás nélkül vizsgáltam a reakcióelegyeket HPLC-DAD-MS segítségével.

5.2.1. Inert molekulák

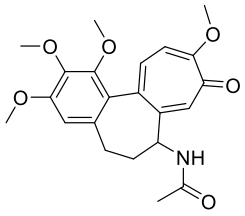
A vizsgált 101 vegyület közül 15 nem mutatott átalakulást a biomimetikus rendszerünkben, melyeket a **14. ábran** mutatom be.



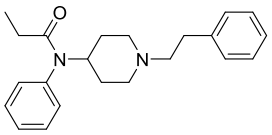
Bifonazol
(**35**)



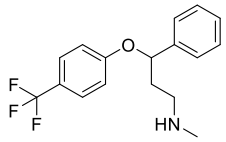
Klotrimazol
(**45**)



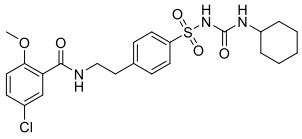
Kolchicin
(**47**)



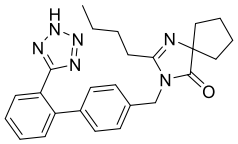
Fentanil
(**60**)



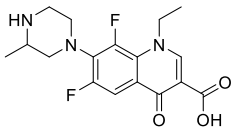
Fluoxetin
(**63**)



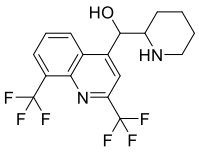
Glibenklamid
(**66**)



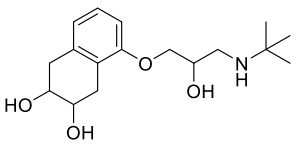
Irbezartán
(**74**)



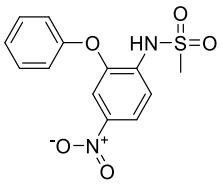
Lomefloxacin
(**80**)



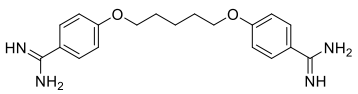
Meflokin
(**82**)



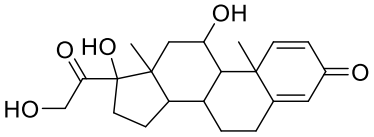
Solgol/Nadolol
(**86**)



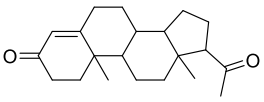
Nimeszulid
(**90**)



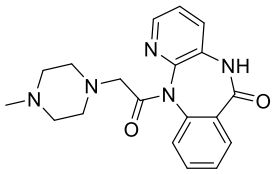
Pentamidin
(**97**)



Prendizolin
(**102**)



Progeszteron
(**104**)



Pirenzepin
(**100**)

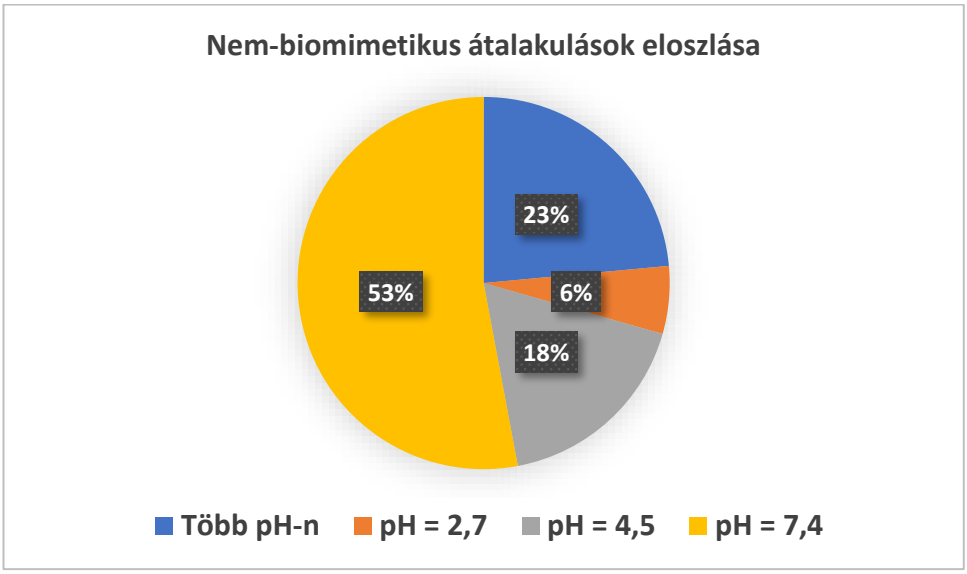
14. ábra Biomimetikus átalakulást nem mutató vegyületek szerkezete

Fizikai-kémiai paramétereiket és sav-bázis karakterüket megvizsgálva nem mondható el általános szabály, hogy miért nem történt átalakulás. A szerkezeteket megvizsgálva azonban annyi elmondható, hogy a legtöbb esetben nagy számú, esetenként kondenzált gyűrűt tartalmazó vegyületekről beszélhetünk, ami sok esetben sztérikus gátlást okozhat a metalloporfirin és a szubsztrát molekulák között.

5.2.2. Nem-biomimetikus átalakulást mutató vegyületek

Ahogy korábban említettem, mindhárom alkalmazott pH-n végeztünk csak az oxidálószerrel szembeni stabilitás vizsgálatokat. A rendszerünkben vizsgált 101 vegyületből 17 mutatott valamilyen jelentősebb (>10%) nem biomimetikus átalakulást (**F2 ábra, Függelék**).

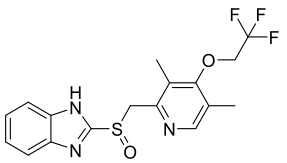
Érdemes megnézni azt, hogy jellemzően milyen pH-n történtek ezek az átalakulások, illetve az átalakult vegyületek, valamint a keletkezett metabolitok szerkezetét megvizsgálva ennek oka is több esetben meghatározható.



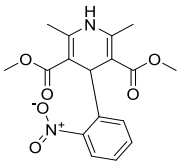
15. ábra Nem-biomimetikus átalakulások eloszlása

15. ábran bemutatott nem-biomimetikus átalakulások pH szerinti megoszlása alapján jól látható, hogy az enyhén lúgos 7,4-es pH történt a nem-biomimetikus átalakulások több mint fele. A szerkezeteket megvizsgálva elmondható, hogy ezeken a molekulákon a legtöbb esetben található valamilyen pH érzékeny csoport, pl. a Diltiazem esetében észter, a Famotidin esetében szulfonamid csoport. A termékek tömegváltozásait megvizsgálva jellemzően az mondható, hogy a pH érzékeny csoportok hidrolízisét katalizálta a *t*BuOOH jelenléte.

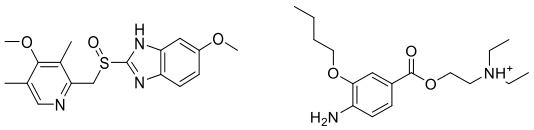
A 101 vegyületből csupán 4 volt olyan, melyek több pH-n is nem-biomimetikus átalakulást mutattak.



Lanzoprazol
(**79**)



Nifedipin
(**89**)

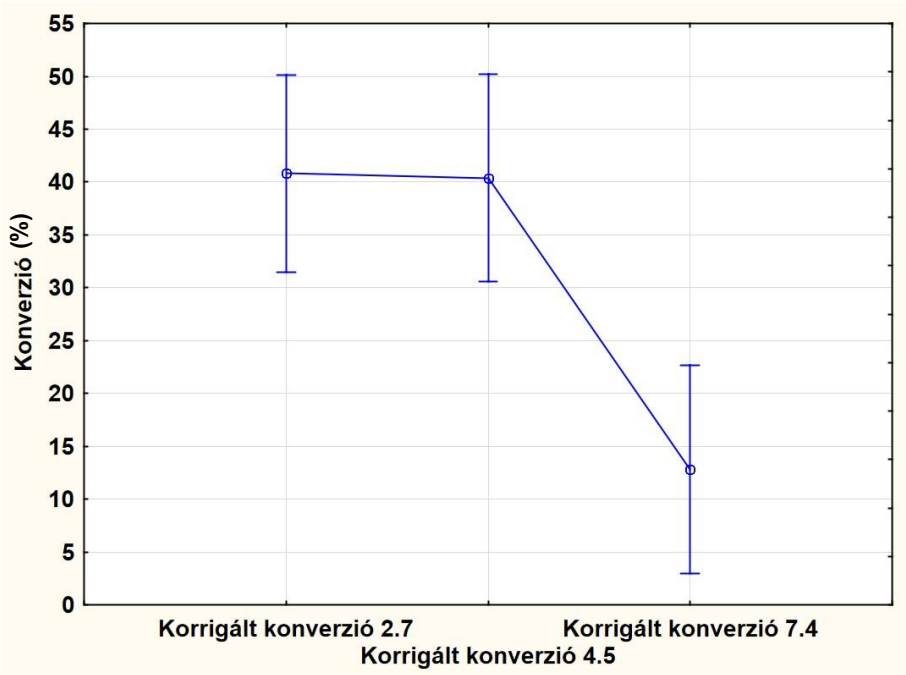


Omeprazol (**93**) Oxibuprokain (**94**)

16. ábra Több pH-n is nem-biomimetikus átalakulást mutató vegyületek és szerkezetük

5.2.3. A biomimetikus reakciók konverziójának vizsgálata a pH szerint

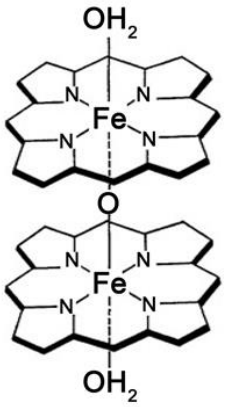
A rendszerünkben vizsgált vegyületek konverzióját összegeztük. A konverziókat úgy határoztuk meg, hogy készítettünk olyan mintákat, amelyekben csak a szubsztrát volt jelen, azonos koncentrációkban, mint a reakciókban a kiindulási koncentráció volt, és ezeket is lemértük a **4.1.1. pontban** leírt módon. Az összes reakcióelegyből készült kromatogrammokat integráltuk. Az anyavegyületekre összegyűjtöttük a görbe alatti területeket és ezeket elosztottuk a csak anyavegyületet tartalmazó oldat területével és ezt az értéket megszoroztuk 100-al. Ezt a konverzió százalékértéket átlagoltuk, majd a pH szerint diagrammon ábrázoltuk, ami a **17. án** látható.



17. ábra A vegyületek átlagos átalakulása a pH függvényében

A **17. án** látható, hogy 2,7-es és 4,5-ös pH-kon nem azonosítható különbség, míg 7,4-es pH esetében jelentős konverzió csökkenés látható. A 2,7-es és 4,5-ös pH-k esetében a különbség hiánya érdekes, hiszen a **2.3.3. pontban** bemutatott pH függő oxidáció alapján nem ezt várnánk. 7,4-es pH esetében a konverzió-csökkenés oka a porfirinek már a **2.3.1. pontban**

említett μ-oxo-dimer (**18.**) fokozott jelenlétével magyarázható, ami az alkalmazott metalloporfirin inaktiválódását okozhatja.

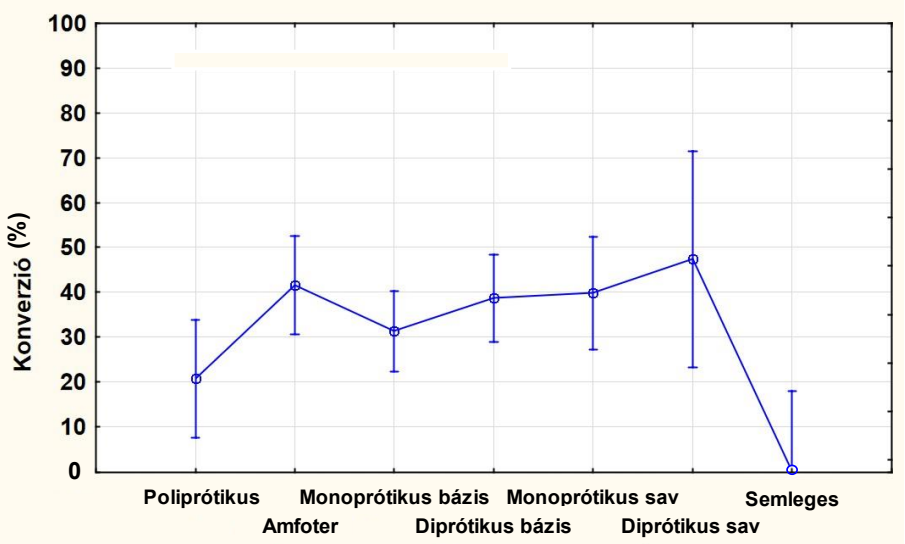


18. ábra A metalloporfirinek által jellemzően pH 8-11 tartományben képzett μ-oxo-dimer szerkezete

A 4,5-ös és 7,4-es pH-k esetében tapasztalt nagy aktivitásbeli különbség miatt egy köztes pH értéken is érdemes lenne megvizsgálni a vegyületek reaktivitását. A pH 6,5-es közegben a köetkező időszakban tervezzük elvégezni a vegyületek vizsgálatát.

5.2.4. Az átalakulások vizsgálata a molekulák sav bázis tulajdonságai alapján

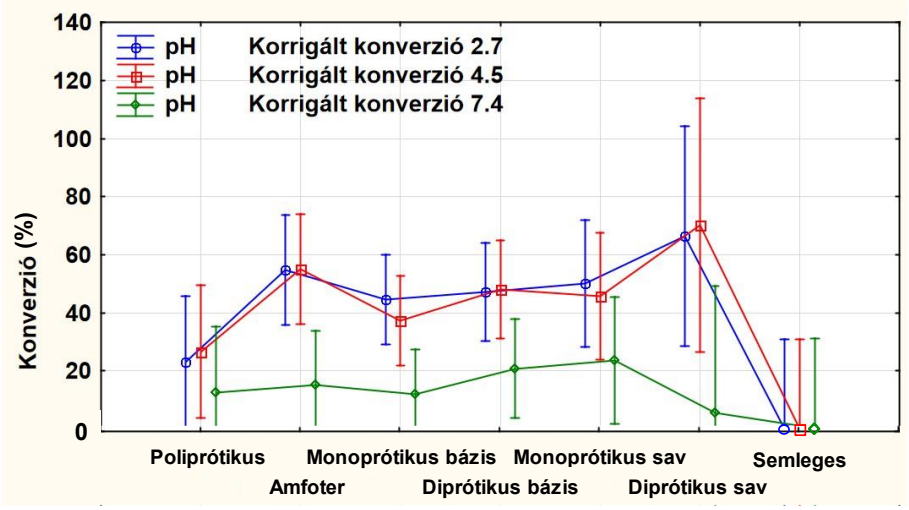
Annak érdekében, hogy megértsük, hogy a vegyületek sav-bázis karaktere mennyire befolyásolja a biomimetikus oxidációban való aktivitását egy vegyületnek, a sav-bázis karakterének függvényében ábrázoltuk az anyagok átlagolt konverzióit (**19.**).



19. ábra A vegyületek átalakulásának átlaga a sav-bázis karakterük szerint ábrázolva

A **19.** alapján jellemzően nem találtunk nagy eltérés a különböző sav-bázis karakterű vegyületek aktivitása között, azonban két vegyületcsoport kitűnik a többi közül. A poliprotikus

vegyületek az átlagnál alacsonyabb konverziós aktivitást mutatnak. A legszembetűnőbb azonban az, hogy a semleges karakterű vegyületek szinte egyáltalán nem reagálnak a biomimetikus rendszerben.



20. ábra A vegyületek átalakulásának átlaga a sav-bázis karakterük szerint pH szerint felbontva

pH függő módon ábrázolva a vegyületek sav-bázis karaktere alapján az átlagos konverziókat, az előző bekezdésben leírt megállapításokat tehetjük itt is. Ami ez esetben is szembetűnő, hogy a 7,4-es pH-n a konverziók nagy arányú csökkenése szintén azonosítható. Ez csak megerősíti azt a feltételezést, hogy egy köztes pH-n is érdemes lenne a vegyületeket vizsgálni.

5.2.5. További terveink az adatkészletünk jellemzésére

Az adatkészlet további feldolgozási lépései abból fognak állni, hogy összevetjük a fennmaradó vegyületek metabolitprofiljait az in vivo irodalmi adatokkal, hogy vizsgáljuk a rendszerünk mennyire képes modellezi a szervezetben lejátszódó metabolizmust, vizsgáljuk a HR-MS-alapján a pontos tömegeiket (elemi összetételüket) és további analitikai módszerekkel azonosítani a nem egyértelmű specieszeket. A vegyületek szerkezete alapján megpróbáljuk azonosítani a leggyakoribb lebontási útvonalakat, valamint az eredményeinket olyan magasabb rendű QSPR keminformatikai rendszerrel kívánjuk elemezne, mely képes lehet a biomemimetikus oxidációs átalakulásokat, illetve annak valószínűségét előrejelezni korábban nem vizsgált kémiai terek esetében is.

5.3. Biomimetikus és humán metabolitprofil összehasonlítása különböző vegyületek példáján

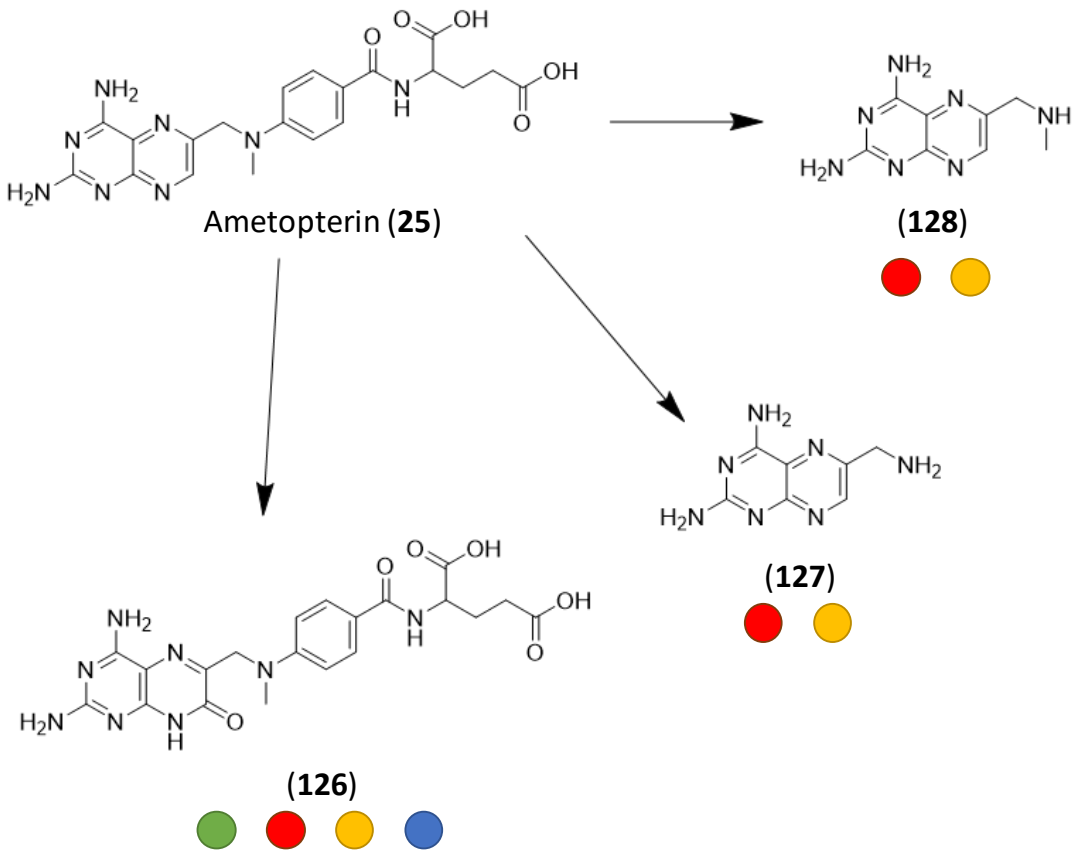
A munkám során vizsgált 101 vegyület biomimetikus oxidációjából nyert adatok feldolgozása a rendelkezésre álló idő rövidsége, valamint az új mérések szükségessége miatt még nem fejeződött be viszont az eddig kiértékelt vegyületek közül kiválasztottam néhány reprezentatív példát, melyet az alábbiakban bemutatok be. Ezek olyan vegyületek, amelynek ígéretes a biomimetikus metabolizmusa. Minden vegyület esetében az emberi szervezetben végbemenő metabolizmust is bemutatom (zöld körrel jelölve az ábrákon- 🟢), illetve a biomimetikus termékeket is feltüntetek. A három különböző pH-t három különböző színnel jelölöm (pH = 2,7 - piros 🔴; pH = 4,5 - sárga 🟡; pH = 7,4 - kék 🔵).

A reakcióelegyeket HPLC-DAD-MS technika mellett HRMS technikával is vizsgáltam. A Waters Kft. lehetőséget biztosított egy új típusú HRMS kipróbálására, amely képes 96 lyukú mérőtálcáról mintát venni és HRMS spektrumot felvenni. Ez a lehetőség nagyban segíti a biomimetikus metabolitok feltételezett szerkezetének a meghatározását.

5.3.1. Ametopterin (25)

Az ametopterin (metotrexát, **25**) egy daganatellenes szer, amelyet számos rákos megbetegedés, valamint súlyos pikkelysömör, súlyos rheumatoid arthritis és fiatalkori rheumatoid arthritis kezelésére használnak. Az emberi szervezetben csak kis mértékben alakul át. Major és az egyetlen azonosított metabolitja egy hidroxilált származék (**126**).[40]

Az ametopterin a biomimetikus rendszerben aktívnak bizonyul. Az emberi szervezetben keletkező major metabolit mellett két másik terméket is elő tudtam állítani. Ez a két új biomimetikus metabolit 2,7-es és 4,5-ös pH-n jelent meg, ezen a két pH-n az anyavegyület teljesen elbomlott. A szervezetben keletkező metabolit pedig pH=4,5-ön és pH=7,4-en jelent meg.



21. ábra Az ametopterin humán metabolitja és biomimetikus termékei

3. táblázat Az ametopterin pH függő biomimetikus termékprofilja

rt	m/z	Δm	Termék	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 7,4
1,05	206	-249	**128**	*N*-dealkiláció	14,5	19,5	0,0
1,34	191	-264	**127**	*N*-dealkiláció	72,8	45,3	0,0
3,02	469	+14	**126**	Hidroxiláció	0,0	24,2	14,0
3,65	455	0	**25**	Anyavegyület	0,0	0,0	86,0
5,65	-	-	Egyéb	-	12,7	11,1	0,0

A 2,7-es pH a főtermék a **128**-as számú metilamino-diamino-pteridin származék volt, ami mellett kisebb mennyiségben metil-diamino-pteridin (**127**) is keletkezett.

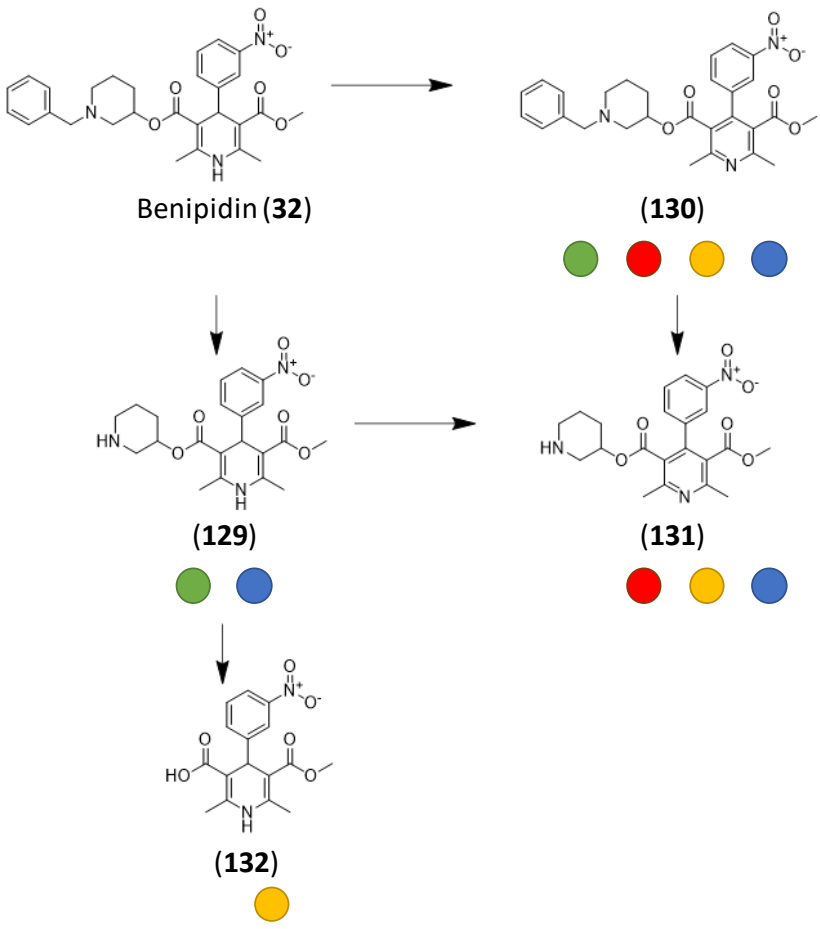
4,5-ös pH-n a két dealkilált termék mellett megjelent a humán major metabolit a hidroxilált ametopterin (**126**) is. A fő termék ebben az esetben is a **127**-es vegyület. Mindkét savas pH-n 100%-ban átalakult az anyavegyület.

7,4-es pH-n azonban már nem teljes az anyavegyület átalakulása, mindössze 14%-os volt a konverzió. Ebben az esetben csupán egy termék a humán major metabolit (**126**) keletkezett.

Az ametopterin esetében a HRMS mérés megtörtént, azonban időhiány miatt még nem kaptam meg a mérési file-okat.

5.3.2. Benidipin (32)

A benipidin (**32**) egy szintetikus dihidropiridin származék, amely kalciumcsatorna-blokkoló hatású vegyület. Magas vérnyomás és angina pectoris kezelésére használják. Az emberi szervezetben két metabolit képződik, melyek közül az egyik a dehidrobenipidin (**130**) a másik pedig a debenzil-benipidin (**129**). [41] A biomimetikus rendszerben a szervezetben képződő két metaboliton felül két másik biomimetikus metabolitot állítottam elő, a debenzil-dehidrobindipint (**131**), illetve a debenzil-depiperidine-dehidrobenipidnt (**132**).



22. ábra A benidipin humán metabolitjai és biomimetikus termékei

4. táblázat A benidipin pH függő biomimetikus termékprofilja

rt	m/z	Δm	Termék	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 7,4
5,2	414	-92	**131**	*N*-dealkiláció, dehidrogénezés	36,5	58,4	36,5
5,45	416	-90	**129**	*N*-dealkiláció	0,0	0,0	2,7

6,25	504	-2	**130**	Dehidrogénezés	43,6	23,1	5,3
6,35	506	0	**32**	Anyavegyület	0,0	0,0	52,2
6,68	331	-175	**132**	Hidrolízis	0,0	5,7	0,0
-	-	-	Egyéb	-	19,9	12,9	3,35

2,7-es pH-n a **130**-as humán metabolit és a **131**-es biomimetikus metabolit keletkezett, közel azonos mennyiségben. Anyavegyület nem detektálható a reakcióelegyben, így a konverzió 100%-os.

4,5-es pH-n a két terméken, amelyek 2,7-es pH-n képződtek, kívül egy új termék jelent meg (**132**). Az anyavegyület ebben az esetben is 100%-os átalakulást mutatott.

7,4-es pH-n a konverzió lecsökken nagyjából 50%-osra. Ez esetben is képződött egy új termék, azonban a csupán a 2,7-es pH-n képződő termékek mellett, a 132-es vegyület ebben az esetben sem képződött.

Érdemes megjegyezni, hogy a pH emelésével a benipidin esetében a dehidrogénezési reakció egyre kevésbé kedvezményezett. Ebből arra következtethetünk, hogy a dihidropiridin gyűrű nitrogénjének nagy mértékben protonálva kell lennie, hogy végbemenjen ez a reakció.

5. táblázat A benidipin és az azonosított biomimetikus termékeinek HR-MS adatai

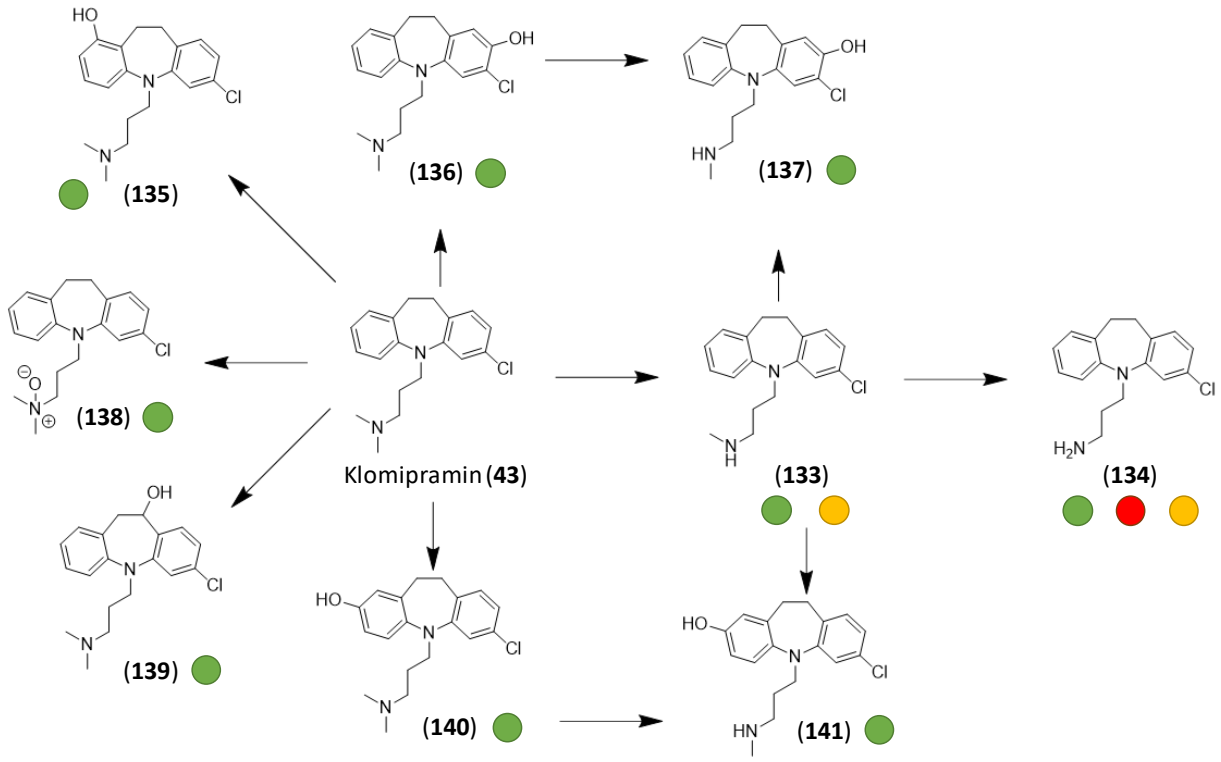
	rt (perc)	**m/z (MS találat) [M+1]+ (g/mol)**	**m/z (HRMS találat) [M+1]+ (g/mol)**	**m/z (elméleti számított) [M+1]+ (g/mol)**
131	5,2	414	414,1758	414,1587
129	5,45	416	416,3123	416,1743
130	6,25	504	504,2311	504,2056
32	6,35	506	506,3503	506,2213
132	6,68	331	330,9904	331,0852

A HRMS méréseket kiértékelve azt tapasztaltuk, hogy a feltételezett specieszek megfelelnek a feltételezetteknek. Az ismeretelen specieszeket továbbra sem tudtuk azonosítani.

5.3.3. Klomipramin (43)

A klomipramin (**43**) egy triciklusos antidepresszáns, amelyet rögeszmés-kényszeres betegség és rögeszmés-kompulzív komponensű rendellenességek, például depresszió, skizofrénia és Tourette-betegség kezelésére használnak. Az emberi szervezetben rendkívül diverz metabolizmust mutat. Többféle hidroxilált, hidroxilált és demetilált, valamint N-oxid képződése tapasztalható. **Hiba! A hivatkozási forrás nem található.** A szervezetben lejátszódó metabolizmusnak csak részben felelt meg biomimetikus rendszerben kapott

átalakulások, így az anyavegyületből csak az egyszeresen (**133**) és a kétszeresen demetilált (**134**) származékot tudtam előállítani.



23. ábra A klomipramin humán metabolitjai és biomimetikus termékei

6. táblázat A klomipramin pH függő biomimetikus termékprofilja

rt	m/z	Δm	Termék	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 7,4
6,32	287	28	**134**	*N*-dealkiláció	10,71	0,00	0,00
6,43	301	14	**133**	*N*-dealkiláció	75,17	34,79	0,00
6,55	315	0	**43**	Anyavegyület	14,12	65,21	100,00

2,7-es pH-n az egyszeresen demetilált klomipramin (**133**) a major metabolit, mellette kis mennyiségben keletkezik a didemetil klomipramin. A konverzió nem volt teljes ebben az esetben. 4,5-ös pH-n csupán az egyszeresen demetilált származék keletkezik. Ez a **133** szelektív előállítását teszi lehetővé. pH=7,4-en nem tapasztaltam átalakulást

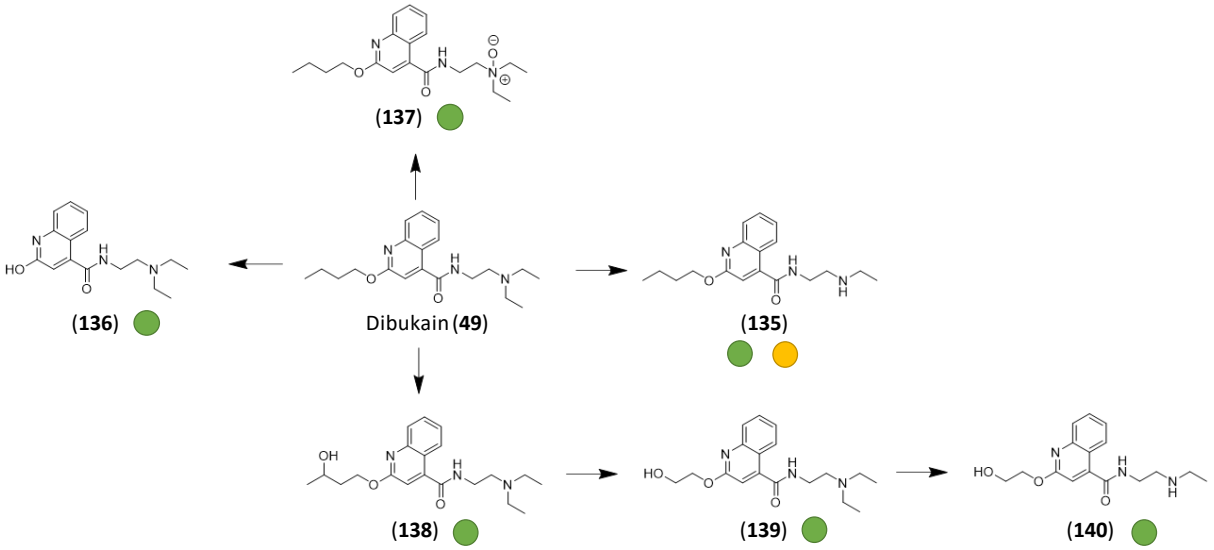
7. táblázat A klomipramin és biomimetikus termékeinek HR-MS adatai

	rt (perc)	m/z (MS találat) [M+1]+ (g/mol)	m/z (HRMS találat) [M+1]+ (g/mol)	m/z (elméleti számított) [M+1]+ (g/mol)
43	6,55	315	315,1666	315,1550
133	6,43	301	301,1474	301,1393
134	6,32	287	287,1585	287,1240

A HRMS méréseket elvégezve és kiértékelve minden termékünk azonosítható és a feltételezettnek megfelelt a szerkezete.

5.3.4. Dibukain (49)

A Dibukain (cinkokain, **49**) egy érzéstelenítő hatású hatóanyag, melyet helyi vagy regionális érzéstelenítésben használnak. Az emberi szervezetben változatos metabolitprofillal rendelkezik különböző hidroxilált, egy *O*-dealkilezett, egyszeresen *N*-dealkilezett és *N*-oxidált származékokat azonosítottak, [44] azonban ezek közül a biomimetikus rendszerben csupán az egyszeresen *N*-deetilált (135) származék keletkezett.



24. ábra A dibukain humán metabolitjai és biomimetikus terméke

8. táblázat A dibukain pH függő biomimetikus termékprofilja

rt	m/z	Δm	Termék	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 7,4
5,72	316	28	**135**	*N* dealkiláció	0,0	55,9	0,0
6,02	344	0	**49**	Anyavegyület	100,0	44,1	100,0

2,7-es és 7,4-es pH-n a vegyületet inertnek mutatkozott, nem keletkezett semmilyen biomimetikus termék. pH=4,5-ön a konverzió 55,91%-os és az egyetlen termék a deetilált származék (**135**).

9. táblázat A dibukain és biomimetikus termékének HRMS adatai

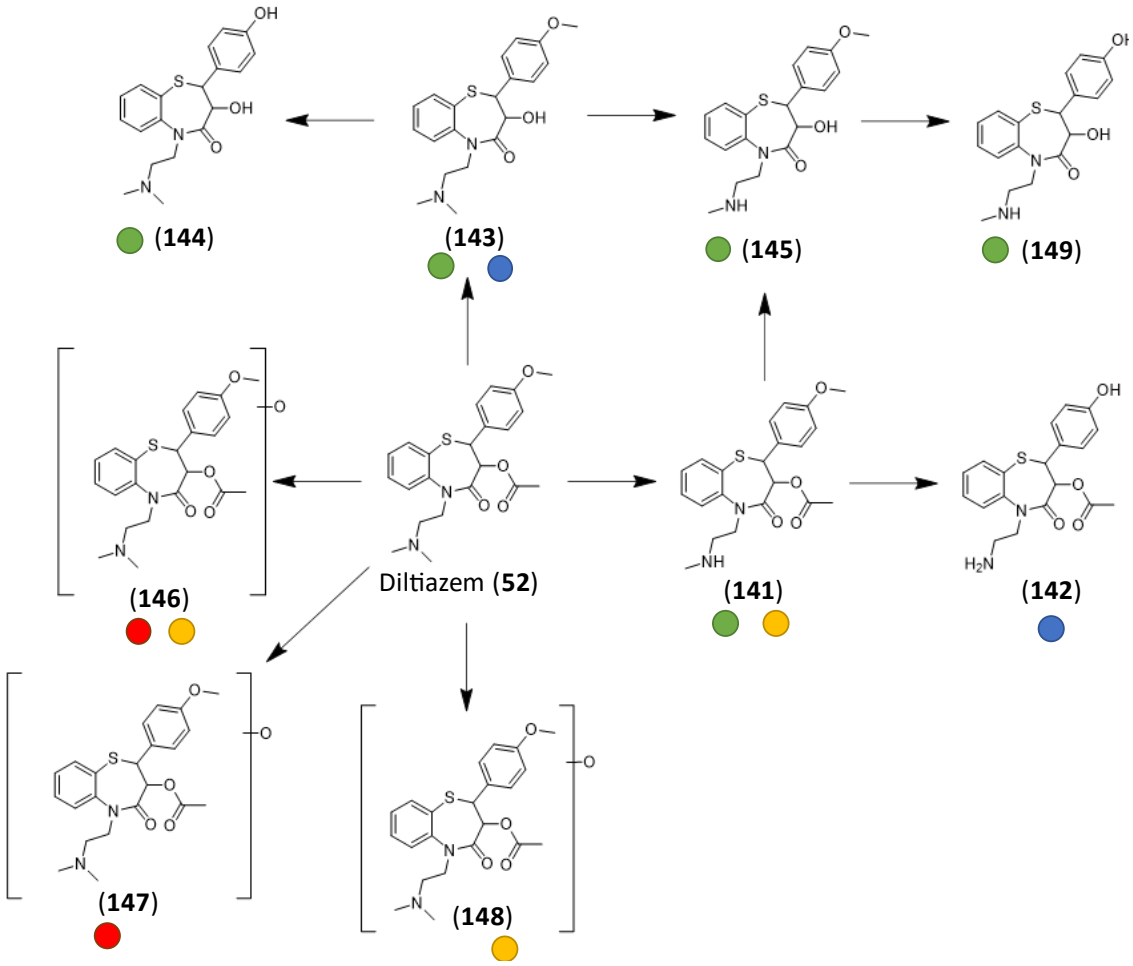
	rt (perc)	m/z (MS találat) [M+1]+ (g/mol)	m/z (HRMS találat) [M+1]+ (g/mol)	m/z (elméleti számított) [M+1]+ (g/mol)
49	6,02	344	344,2449	344,2260
135	5,72	316	316,1104	316,1948

A HRMS adatok ebben az esetben is a feltételezett szerkezeteket erősítették meg.

5.3.5. Diltiazem (52)

A diltiazem (**52**) egy kalciumcsatorna-blokkoló hatású hatóanyag, amelyet magas vérnyomás kezelésére és krónikus stabil angina kezelésére használnak. Az emberi szervezetben történő metabolizmusa során különböző mértékű demetilációt szenved el. Emellett a tiazepin gyűrűn lévő hidroxilcsoport acetil csoportja is elhidrolizálódik a szervezetben. [44] A biomimetikus modell rendszerben nagyrészt a szervezetben képződő deacetilált és demetilált metabolitok keletkeztek. Mellettük három különböző oxidált származék is keletkezett.

2,7-es pH-n jó konverziót értünk el. Két különböző oxidált származék is keletkezett. 4,5-es pH-n a fő termékként a humán major metabolit, a demetilált származék keletkezett. Emellett még két oxidált származékot sikerült azonosítani, melyek közül az egyik új termék. pH 7,4-en az LC-MS alapján nem megállapító meg, hogy milyen átalakulás következik be. Ebben az esetben a diltiazem csak oxidálószert tartalmazó reakcióban is mutatott átalakulást. Ezen adatok alapján a termék vagy egy tridemetilált származék (**142**) vagy pedig a deacilezett származék (**143**).



25. ábra A diltiazem humán metabolitjai és biomimetikus termékei

10. táblázat A diltiazem pH függő biomimetikus termékprofilja

rt	m/z	Δm	Termék	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 7,4, *t*BuOOH	pH 7,4
4,45	431	16	**146**		64,9	12,4	0,0	0,0
4,62	431	16	**147**		13,9	0,0	0,0	0,0
5,05	373	-42	**142** vagy **143**	?	0,0	0,0	71,9	66,9
5,59	401	-14	**141**		0,0	49,7	0,0	0,0
5,67	415	0	**52**	Anyavegyület	21,2	31,5	28,1	33,1
5,74	431	16	**148**		0,0	6,4	0,0	0,0

11. táblázat A diltiazem és biomimetikus termékeinek HRMS adatai

	rt (perc)	m/z (MS találat) [M+1]+ (g/mol)	m/z (HRMS találat) [M+1]+ (g/mol)	m/z (elméleti számított) [M+1]+ (g/mol)
146	4,45	431	430,9533	431,1563
147	4,62	431	430,9533	431,1563

143	5,05	373	372,9732	373,1144
142				373,1508
141	5,59	401	400,9541	401,1457
52	5,67	415	414,968	415,1613
148	5,74	431	430,9533	431,1563

A diltiazem esetében készült HR-MS mérés az oxidált származékok esetében nem tudott különbséget tenni. Azonban a 7,4-es pH-n keletkezett bizonytalan szerkezetű vegyület HR-MS adatai alapján a deacetilált származék volt a tényleges termék.

5.4. Kitekintés

A munkám végső célja a szerkezetileg diverz hatóanyagok biomimetikus átalakulási adatai felhasználásával egy általánosan alkalmazható QSPR modell kidolgozása, amely segítségével meg lehet jósolni a potenciális hatóanyagok szervezetben keletkező metabolitjait, ezáltal lecsökkentve a hatóanyagfejlesztéshez szükséges időt. A további vizsgálati szempontok, amivel foglalkozni szeretnék a jövőben, hogy a hatóanyagok különböző diasztereomerei befolyásolják-e a biomimetikus terméket, valamint olyan reakcióutak keresése, amely alkalmazható lenne hatóanyagszintézisben kiváltva ezzel a drága szintézisutakat, melyek idő, energia és anyagigényesek.

6. Összefoglalás

A preklinikai vizsgálatok során a különböző in vitro biológiai modellek alkalmazása széles körben elfogadott. Ezen vizsgálatokkal a potenciális gyógyszerjelölt hatóanyagok ADMET tulajdonságainak meghatározása és optimalizálása történik. Ezen kutatási megközelítés egyik fontos része a gyógyszerjelöltek metabolikus stabilitásának vizsgálatával foglalkozik. A gyógyszerek metabolikus átalakulásának egyik legfontosabb típusa a CYP450 izoenzimcsalád által katalizált oxidáció, mely főleg a májhoz köthető. Az in vitro máj mikroszómális vizsgálatok jó pontossággal visszaadják az in vivo Fázis I. metabolizmus oxidációs termékei, viszont az így kapott metabolitok izolálása drága és nehézkes. Ígéretes alternatíva lehet a szintetikus metalloporfirinek alkalmazása, amelyek szerkezeti hasonlóságot mutatnak a CYP enzimek aktív helyével, a prosztetikus hem csoporttal.

Munkám során, kutatócsoportunkban korábban már optimalizált biomimetikus rendszer segítségével vizsgáltam egy, a kémiai teret lefedő, 101 vegyületet tartalmazó, hatóanyag-könyvtárat, melynek célja a biomimetikus rendszerben való átalakulásainak pontosabb feltérképezés, későbbiekben az adatok keminformataki feldogozása. A kísérleteimet három különböző pH-n végeztem. A reakcióelegyeimet HPLC-DAD-MS és HR-MS technikával elemezte.

A 101 vegyület közül 15 nem mutatott átalakulás (inert vegyületek) a rendszerünkben egyik vizsgált pH-n sem, továbbá 17 vegyület esetében igazoltunk nem biomimetikus átalakulást.

A vegyületek konverzióinak összefüggését különféle statisztikai módszerekkel vizsgáltam. Fontos megállapítás a neutrális vegyületek inert viselkedése a biomimetikus rendszerben. Az adatok alapják egy új, köztes pH 6,5-es közegben is el kívánom végezni a biomimetikus kísérletet, hogy ez alapján még pontosabb képet kaphassunk a biomimetikus rendszer működéséről.

Emellett a vegyületek biomimetikus termékprofilját összehasonlítottam a szervezetben azonosított metabolitokkal. Időhiány miatt azonban ezekkel a vizsgálatokkal még nem tudtam végezni, azonban az eddig eredmények alapján elmondható, hogy a rendszer jó pontossággal utánozza a szervezetben történő metabolizmust.

7. Irodalomjegyzék

[1] Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; Li, Q.; Shoemaker, B. A.; Thiessen, P. A.; Yu, B.; Zaslavsky, L.; Zhang, J.; Bolton, E. E. PubChem in 2021: New Data Content and Improved Web Interfaces. Nucleic Acids Res. 2021, 49 (D1), D1388–D1395. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971.

[2] Orvosi biokémia, szerkesztette Ádám Veronika, Semmelweis Kiadó, Budapest, pp. 254-266, 1996.

[3] Klingenberg, M. Pigments of Rat Liver Microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 1958, 75 (2), 376–386. https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90436-3.

[4] Garfinkel, D. Studies on Pig Liver Microsomes. I. Enzymic and Pigment Composition of Different Microsomal Fractions. Arch. Biochem. Biophys. 1958, 77 (2), 493–509. https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90095-X.

[5] Omura, T.; Sato, R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239* (7), 2370–2378. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)82245-5.

[6] Nebert, D. W.; Russell, D. W. Clinical Importance of the Cytochromes P450. Lancet. Elsevier October 12, 2002, pp 1155–1162. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7.

[7] Chapman, C. M.; Pruneau, J. M.; Laverack, C. A.; Dutton, A. S.; Jones, G. B. Biomimetic Oxidation of Acetaminophen Prodrugs Catalyzed by Iron Porphyrins: Effect of Nitrogen and Thiolate Axial Ligands on Drug and Metabolite Formation. Appl. Catal. A Gen. 2016, 510, 204–215. https://doi.org/10.1016/j.apcata.2015.11.031.

[8] Bussy, U.; Boujtita, M. Advances in the Electrochemical Simulation of Oxidation Reactions Mediated by Cytochrome P450. Chemical Research in Toxicology. American Chemical Society October 20, 2014, pp 1652–1668. https://doi.org/10.1021/tx5001943.

[9] Wang, Y.; Li, Y.; Li, Y.; Ma, X.; Yang, S.; Yang, L. Investigations into the Analysis and Modeling of the Cytochrome P450 Cycle. J. Phys. Chem. B 2006, 110 (20), 10139–10143. https://doi.org/10.1021/jp061119i.

[10] Johnson, W. W. Cytochrome P450 Inactivation by Pharmaceuticals and Phytochemicals: Therapeutic Relevance. Drug Metabolism Reviews. Taylor & Francis January 2008, pp 101–147. https://doi.org/10.1080/03602530701836704.

[11] Ortiz De Montellano, P. R.; De Voss, J. J. Substrate Oxidation by Cytochrome P450 Enzymes. In Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry: Third edition; Springer, Boston, MA, 2005; pp 183–245. https://doi.org/10.1007/0-387-27447-2_6.

[12] Baranczewski, Paweł & Stanczak, Andrzej & Sundberg, Kathrin & Svensson, Richard & Wallin, Asa & Jansson, Jenny & Garberg, Per & Postlind, Hans. (2006). Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. Pharmacological reports : PR. 58. 453-472

[13] Kremers P. Liver microsomes: a convenient tool for metabolism studies but ...; In: Boobis AR, Kremers P, Pelkonen O, Pithan K, editors, European symposium on the prediction of drug metabolism in man: progress and problems. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg; 1999. p. 38-52

[14] Lohmann, W., & Karst, U. (n.d.). Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism Strategies, advantages and limitations. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1794-x

[15] Baumann, A., & Karst, U. (2010). Online electrochemistry/mass spectrometry in drug metabolism studies: Principles and applications. In Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology (Vol. 6, Issue 6, pp. 715–731). Informa Healthcare. https://doi.org/10.1517/17425251003713527

[16] Groves, J. T.; Viski, P. Asymmetric Hydroxylation, Epoxidation, and Sulfoxidation Catalyzed by Vaulted Binaphthyl Metalloporphyrins. J. Org. Chem. 1990, 55 (11), 3628–3634. https://doi.org/10.1021/jo00298a046.

[17] Che, C. M.; Huang, J. S. Metalloporphyrin-Based Oxidation Systems: From Biomimetic Reactions to Application in Organic Synthesis. Chemical Communications. The Royal Society of Chemistry June 30, 2009, pp 3996–4015. https://doi.org/10.1039/b901221d.

[18] Balogh György Tibor, Biológiai oxidációk biomimetikus modellezése, 2003.

[19] Zucca, P., Neves, C. M. B., Simões, M. M. Q., Neves, M. D. G. P. M. S., Cocco, G., & Sanjust, E. (2016). Immobilized Lignin Peroxidase-Like Metalloporphyrins as Reusable Catalysts in Oxidative Bleaching of Industrial Dyes. Molecules, 21(7). https://doi.org/10.3390/molecules21070964

[20] Guo, C. C.; Liu, X. Q.; Liu, Q.; Liu, Y.; Chu, M. F.; Lin, W. Y. First Industrial-Scale Biomimetic Oxidation of Hydrocarbon with Air over Metalloporphyrins as Cytochrome P-450 Monooxygenase Model and Its Mechanistic Studies. J. Porphyr. Phthalocyanines 2009, 13 (12), 1250–1254. https://doi.org/10.1142/S1088424609001613.

[21] de Melo, C. N.; Moreira Meireles, A.; da Silva, V. S.; Robles-Azocar, P.; DeFreitas-Silva, G. Manganese Complex Catalyst for Valencene Oxidation: The First Use of Metalloporphyrins for the Selective Production of Nootkatone. Inorganica Chim. Acta 2021, 515, 120031. https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.120031.

[22] Leonhardt, R. H.; Berger, R. G. Nootkatone. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2015, 148, 391–404. https://doi.org/10.1007/10_2014_279.

[23] Api, A. M.; Belsito, D.; Biserta, S.; Botelho, D.; Bruze, M.; Burton, G. A.; Buschmann, J.; Cancellieri, M. A.; Dagli, M. L.; Date, M.; Dekant, W.; Deodhar, C.; Fryer, A. D.; Gadhia, S.; Jones, L.; Joshi, K.; Lapczynski, A.; Lavelle, M.; Liebler, D. C.; Na, M.; O'Brien, D.; Patel, A.; Penning, T. M.; Ritacco, G.; Rodriguez-Ropero, F.; Romine, J.; Sadekar, N.; Salvito, D.; Schultz, T. W.; Siddiqi, F.; Sipes, I. G.; Sullivan, G.; Thakkar, Y.; Tokura, Y.; Tsang, S. RIFM Fragrance Ingredient Safety Assessment, Nootkatone, CAS Registry Number 4674-50-4. Food and Chemical Toxicology. Pergamon July 15, 2020, p 111426. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111426.

[24] Tornaritis, M. J.; Coutsolelos, A. G. Metalloporphyrins Catalyse Cis-Polybutadiene to Polyepoxide. Polymer (Guildf). 1992, 33 (8), 1771–1772. https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)91081-C.

[25] Wolak, M.; Van Eldik, R. Mechanistic Studies on Peroxide Activation by a Water-Soluble Iron(III)-Porphyrin: Implications for O-O Bond Activation in Aqueous and Nonaqueous Solvents. Chem. - A Eur. J. 2007, 13 (17), 4873–4883. https://doi.org/10.1002/chem.200601148.

[26] Fődi, T.; Ignácz, G.; Decsi, B.; Béni, Z.; Túrós, G. I.; Kupai, J.; Weiser, D. B.; Greiner, I.; Huszthy, P.; Balogh, G. T. Biomimetic Synthesis of Drug Metabolites in Batch and Continuous-Flow Reactors. Chem. - A Eur. J. 2018, 24 (37), 9385–9392. https://doi.org/10.1002/chem.201800892.

[27] Nam, W.; Han, H. J.; Oh, S. Y.; Lee, Y. J.; Choi, M. H.; Han, S. Y.; Kim, C.; Woo, S. K.; Shin, W. New Insights into the Mechanisms of O-O Bond Cleavage of

Hydrogen Peroxide and Tert-Alkyl Hydroperoxides by Iron(III) Porphyrin Complexes. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122 (36), 8677–8684. https://doi.org/10.1021/ja994403e.

[28] T. Yuan, Amiodarone in Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics, Vol 2 (Eds.: P. W. Lee, H. Aizawa, L. L. Gan, C. Prakash, D. Zhong), Wiley, Hoboken, NJ, 2014, pp. 864 –867.

[29] Deng, P.; You, T.; Chen, X.; Yuan, T.; Huang, H.; Zhong, D. Identification of Amiodarone Metabolites in Human Bile by Ultraperformance Liquid Chromatography/Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. Drug Metab. Dispos. 2011, 39 (6), 1058–1069. https://doi.org/10.1124/dmd.110.037671.

[30] Kawasaki, M.; Kuriss, A.; Fukushima, M.; Sawada, A.; Tatsumi, K. Effects of PH and Organic Co-Solvents on the Oxidation of Naphthalene with Peroxosulfate Catalyzed by Iron(III) Tetrakis(p-Sulfonatophenyl)Porphyrin. J. Porphyr. Phthalocyanines 2003, 7 (9–10), 645–650. https://doi.org/10.1142/s1088424603000811.

[31] Walsh, J. S.; Reese, M. J.; Thurmond, L. M. The Metabolic Activation of Abacavir by Human Liver Cytosol and Expressed Human Alcohol Dehydrogenase Isozymes. Chem. Biol. Interact. 2002, 142 (1–2), 135–154. https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00059-5.

[32] Catucci, G.; Gilardi, G.; Sadeghi, S. J. Production of Drug Metabolites by Human FMO3 in Escherichia Coli. Microb. Cell Fact. 2020, 19 (1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01332-1.

[33] Hrynchak, I.; Sousa, E.; Pinto, M.; Costa, V. M. The Importance of Drug Metabolites Synthesis: The Case-Study of Cardiotoxic Anticancer Drugs. Drug Metabolism Reviews. Taylor & Francis April 3, 2017, pp 158–196. https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1316285.

[34] Vail, R. B.; Homann, M. J.; Hanna, I.; Zaks, A. Preparative Synthesis of Drug Metabolites Using Human Cytochrome P450s 3A4, 2C9 and 1A2 with NADPH-P450 Reductase Expressed in Escherichia Coli. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2005, 32 (2), 67–74. https://doi.org/10.1007/s10295-004-0202-1.

[35] Shelton, J.; Lu, X.; Hollenbaugh, J. A.; Cho, J. H.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. Chemical Reviews. American

Chemical Society December 14, 2016, pp 14379–14455. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00209.

[36] Weber, J.; Vaclavikova, M.; Wiesenberger, G.; Haider, M.; Hametner, C.; Fröhlich, J.; Berthiller, F.; Adam, G.; Mikula, H.; Fruhmann, P. Chemical Synthesis of Culmorin Metabolites and Their Biologic Role in Culmorin and Acetyl-Culmorin Treated Wheat Cells. Org. Biomol. Chem. 2018, 16 (12), 2043–2048. https://doi.org/10.1039/c7ob02460f.

[37] Yao, K.; Nagashima, K.; Miki, H. Pharmacological, Pharmacokinetic, and Clinical Properties of Benidipine Hydrochloride, a Novel, Long-Acting Calcium Channel Blocker. J. Pharmacol. Sci. 2006, 100 (4), 243–261. https://doi.org/10.1254/jphs.DTJ05001X.

[38] Safety Testing of Drug Metabolites, Guidance for Industry, FDA https://www.fda.gov/media/72279/download

[39] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. Advanced Drug Delivery Reviews. Elsevier January 15, 1997, pp 3–25. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1.

[40] Ursu, O.; Rayan, A.; Goldblum, A.; Oprea, T. I. Understanding Drug-Likeness. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. John Wiley & Sons, Ltd September 1, 2011, pp 760–781. https://doi.org/10.1002/wcms.52.

[41] Inoue, K.; Yuasa, H. Molecular Basis for Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis Therapy. Drug Metabolism and Pharmacokinetics. Elsevier January 1, 2014, pp 12–19. https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-13-RV-119.

[42] Yao, K.; Nagashima, K.; Miki, H. Pharmacological, Pharmacokinetic, and Clinical Properties of Benidipine Hydrochloride, a Novel, Long-Acting Calcium Channel Blocker. J. Pharmacol. Sci. 2006, 100 (4), 243–261. https://doi.org/10.1254/jphs.DTJ05001X.

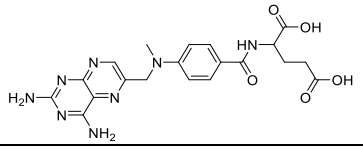
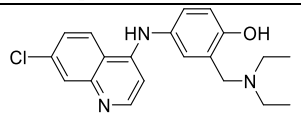
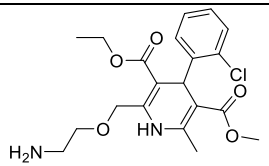
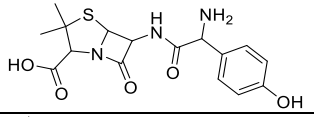
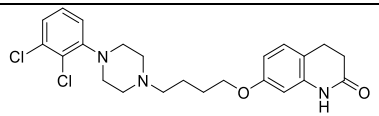
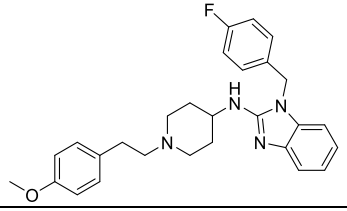
[43] Balant-Gorgia, A. E.; Gex-Fabry, M.; Balant, L. P. Clinical Pharmacokinetics of Clomipramine. Clinical Pharmacokinetics. Springer November 9, 1991, pp 447–462. https://doi.org/10.2165/00003088-199120060-00002.

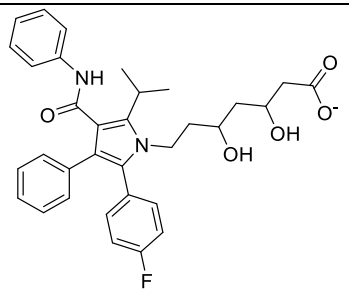
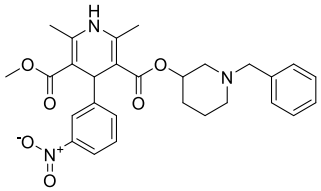
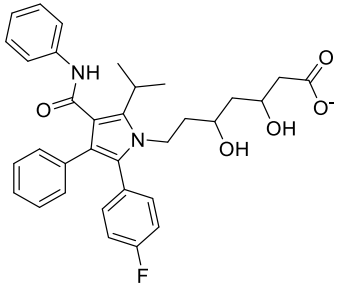
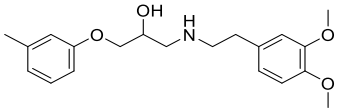
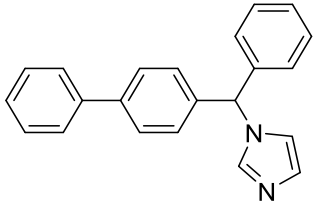
[44] Igarashi, K.; Kasuya, F.; Fukui, M. Metabolism of Dibucaine: Isolation and Identification of Urinary Basic Metabolites in the Rat, Rabbit and Man. J. Pharmacobiodyn. 1983, 6 (8), 538–550. https://doi.org/10.1248/bpb1978.6.538.

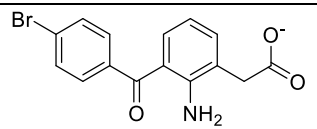
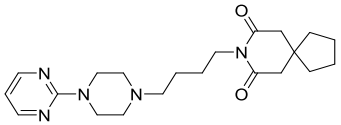
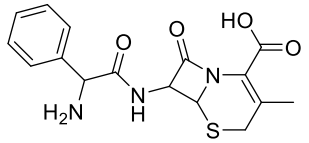
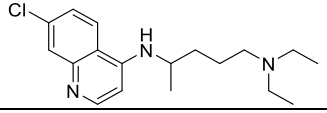
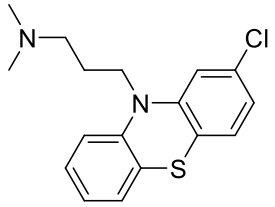
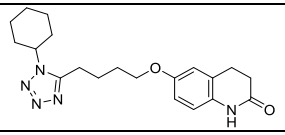
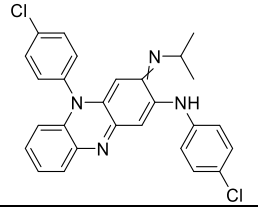
[45] Sugihara, J.; Sugawara, Y.; Ando, H.; Etoh, A.; Kohno, K. Studies on the Metabolism of Diltiazem in Man. J. Pharmacobiodyn. 1984, 7 (1), 24–32. https://doi.org/10.1248/bpb1978.7.24.

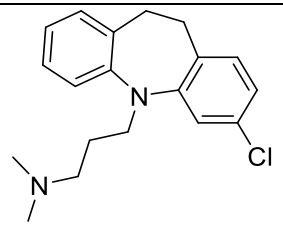
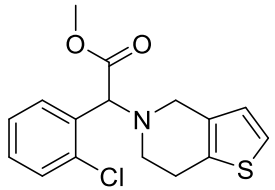
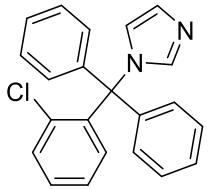
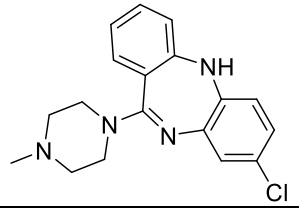
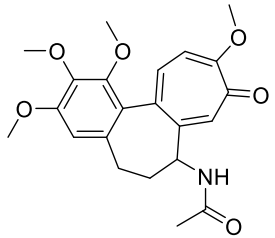
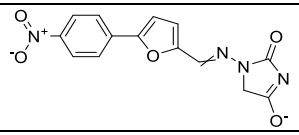
8. Függelék

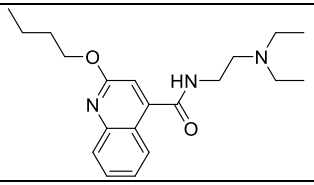
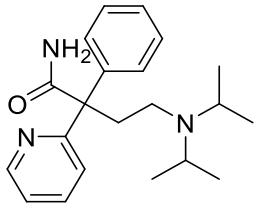
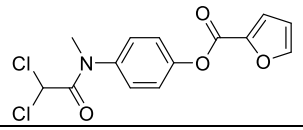
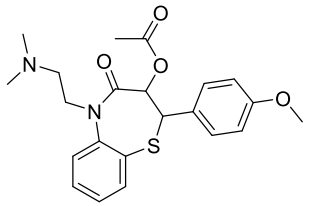
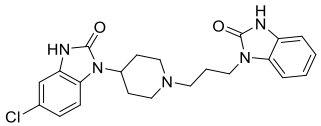
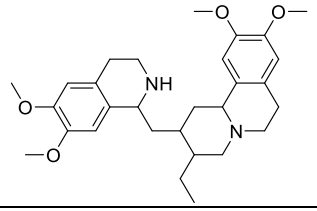
F1. táblázat A munkába bevont 101 vegyület szerkezete és fizikai kémiai adatai

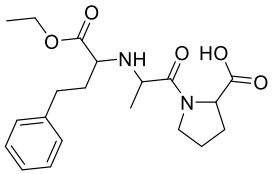
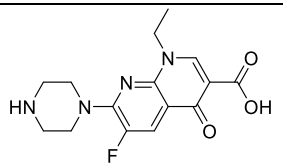
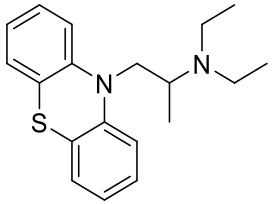
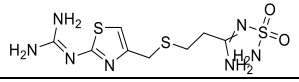
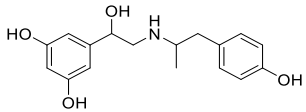
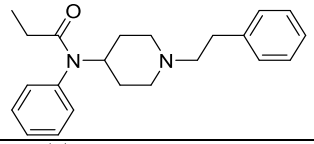
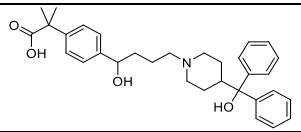
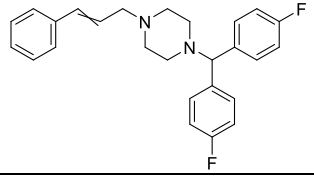
	Vegyület megnevezése	Szerkezet	LogP	LogD (pH=2,7)	LogD (pH=4,5)	LogD (pH=7,4)	sav-bázis karakterisztika	Heteroatomok száma
25	Ametopterin (Metotrexát)		-0,56	-3,06	-3,22	-5,22	Poliprótikus	13
26	Amodiakin		4,42	0,32	0,51	2,2	Amfoter	5
27	Amlodipin		3,42	0,27	0,34	1,91	Monoprótikus bázis	8
28	Amoxicillin		0,48	-2,15	-2,02	-2,72	Poliprótikus	9
29	Aripiprazol		5,21	2,1	2,64	4,99	Amfoter	7
30	Asztemizol		5,64	1,54	1,67	4,2	Diprótikus bázis	6

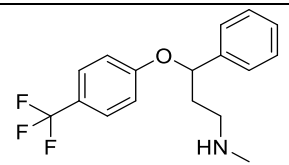
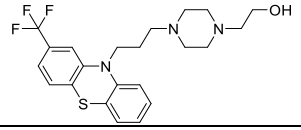
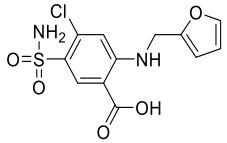
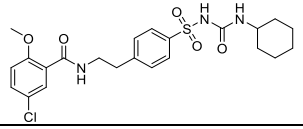
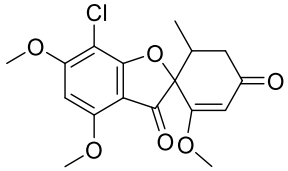
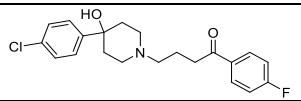
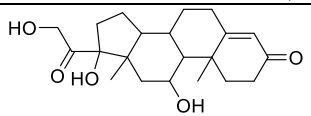
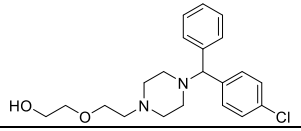
31	Atorvasztatin		4,35	4,33	3,86	1,25	Monoprótikus sav	8
32	Benidipin		5,04	1,77	2,94	4,97	Diprótikus bázis	9
33	Bepridil		5,14	1,57	2,04	3,4	Diprótikus bázis	3
34	Bevantolol		2,68	-0,42	-0,4	1,07	Monoprótikus bázis	5
35	Bifonazol		5,23	2,75	3,31	5,17	Monoprótikus bázis	2

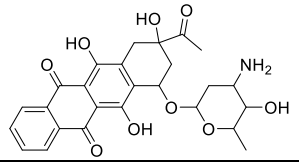
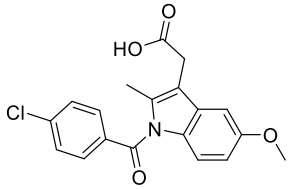
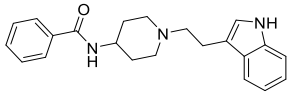
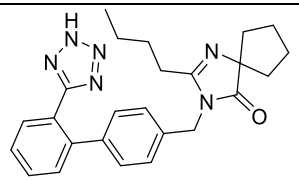
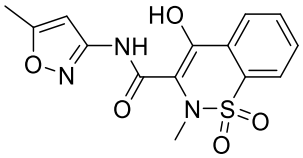
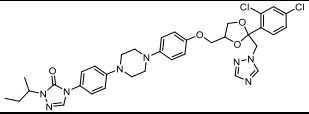
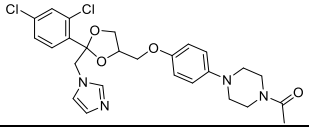
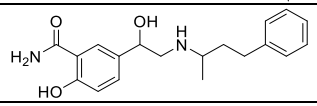
36	Bromfenák		3,26	3,25	2,81	0,2	Monoprótikus sav	5
37	Buspiron		3,04	-0,96	0,11	2,68	Diprótikus bázis	7
38	L-Cefalexin		-0,34	-3,14	-2,8	-3,62	Amfoter	8
39	Klorokvin		4,56	0,46	0,46	0,99	Diprótikus bázis	4
40	Klórpromazin		5,36	2,26	2,27	3,42	Monoprótikus bázis	4
41	Cilostazol		3,01	2,87	3,01	3,01	Amfoter	7
42	Klofazimin		7,44	5,44	5,44	5,78	Monoprótikus bázis	6

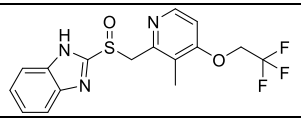
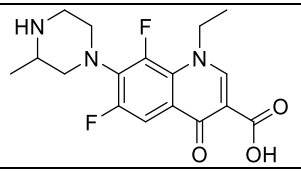
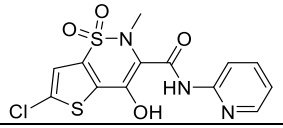
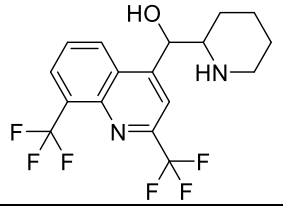
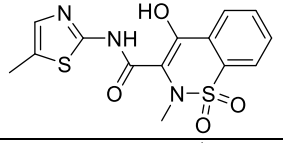
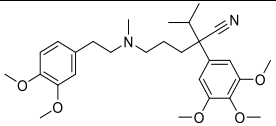
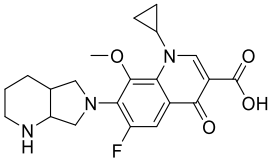
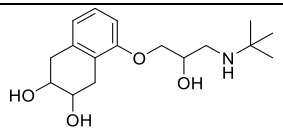
43	Klomipramin		5,29	2,19	2,2	3,3	Monoprótikus bázis	3
44	Klopidogrél		4,22	2,38	3,89	4,22	Monoprótikus bázis	5
45	Klotrimazol		5,25	2,8	3,67	5,23	Monoprótikus bázis	3
46	Klozapin		3,1	-0,98	-0,36	2,49	Diprótikus bázis	5
47	Kolchicin		1,1	1,1	1,1	1,1	Neutral	7
48	Dantrolén		0,77	0,77	0,77	0,75	Monoprótikus sav	9

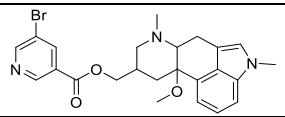
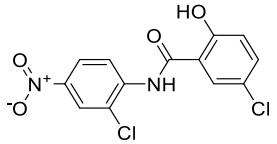
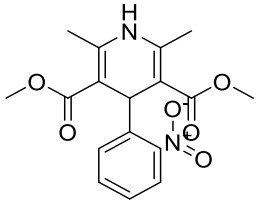
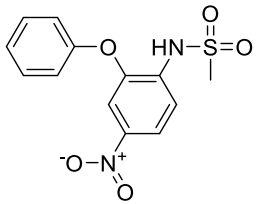
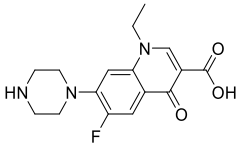
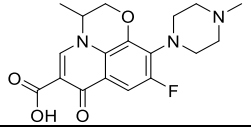
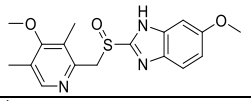
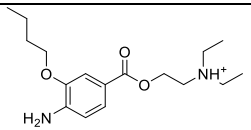
49	Dibukain		3,67	0,26	0,57	1,77	Diprótikus bázis	5
50	Dizopiramid		2,76	-1,15	-0,42	0,35	Diprótikus bázis	4
51	Diloxanid		2,34	2,34	2,34	2,34	Semleges	7
52	Diltiazem		3,43	0,33	0,36	2,06	Monoprótikus bázis	7
53	Domperidon		4,27	1,17	1,22	3,15	Amfoter	8
54	Emetan		4,62	0,52	0,52	2,34	Diprótikus bázis	6

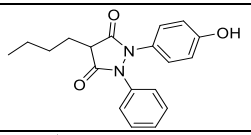
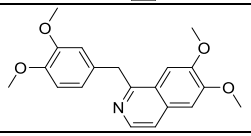
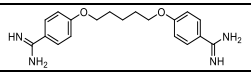
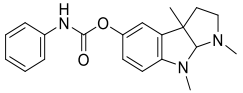
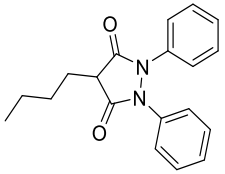
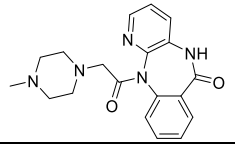
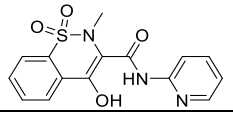
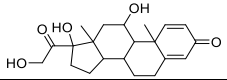
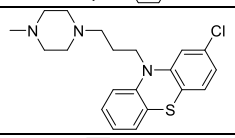
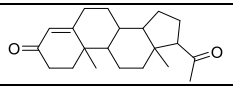
55	Enalapril		2,14	-0,26	0,3	-1,43	Amfoter	7
56	Enoxacin		-0,62	-3,79	-3,56	-2,83	Poliprótikus	8
57	Etopropazin (Profenamin)		5,19	2,09	2,09	2,85	Monoprótikus bázis	3
58	Famotidin		-0,8	-3,56	-2,84	-1,67	Amfoter	12
59	Fenoterol		1,21	-1,89	-1,88	-0,45	Amfoter	5
60	Fentanil		4,09	0,99	1,05	3,01	Monoprótikus bázis	3
61	Fexofenadin		4,93	1,85	2,25	2,43	Amfoter	5
62	Flunarizin		4,85	1,67	2,43	4,7	Diprótikus bázis	4

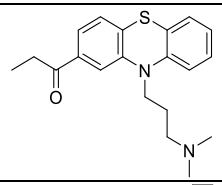
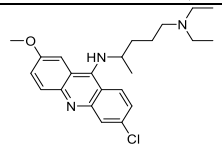
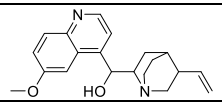
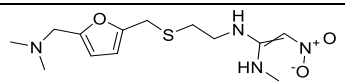
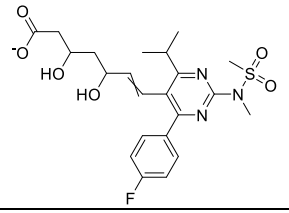
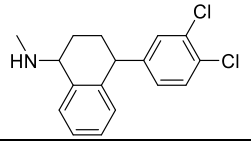
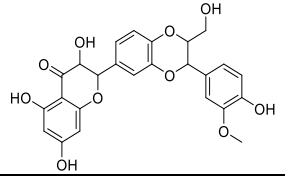
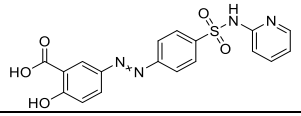
63	Fluoxetin		4,23	1,13	1,13	1,71	Monoprótikus bázis	5
64	Flufenazin		4,46	0,83	1,7	4,12	Diprótikus bázis	8
65	Furoszemid		2,35	2,17	0,85	-0,78	Diprótikus sav	9
66	Glibenklamid		3,79	3,79	3,56	1,86	Monoprótikus sav	10
67	Grizeofulvin		3,16	3,16	3,16	3,16	Semleges	7
68	Haloperidol		3,48	0,38	0,49	2,65	Monoprótikus bázis	5
69	Hidrokortizon		1,66	1,66	1,66	1,66	Semleges	5
70	Hidroxizin		2,73	-0,4	0,59	2,65	Diprótikus bázis	5

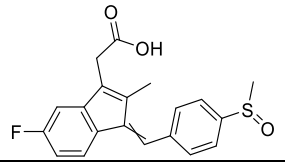
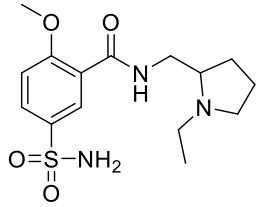
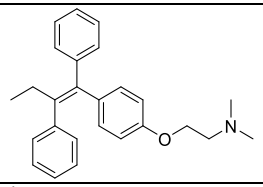
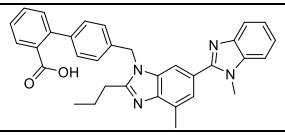
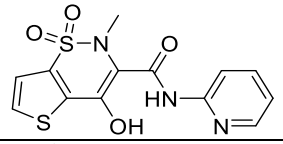
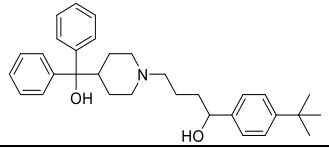
71	Idarubicin		1,87	-1,23	-1,19	0,39	Poliprótikus	10
72	Indometacin		4,01	3,99	3,36	0,74	Monoprótikus sav	6
73	Indoramin		3,38	0,28	0,31	2	Monoprótikus bázis	4
74	Irbezartán		3,43	3,11	2,99	1,46	Amfoter	7
75	Izoxikám		2,12	2,03	0,93	-1,28	Monoprótikus sav	9
76	Itrakonazol		5,2	1,62	3,15	5,14	Diprótikus bázis	14
77	Ketokonazol		3,66	0,35	1,43	3,54	Diprótikus bázis	10
78	Labetalol		2,74	-0,36	-0,35	0,85	Amfoter	5

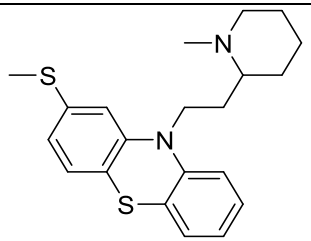
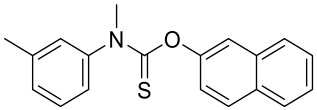
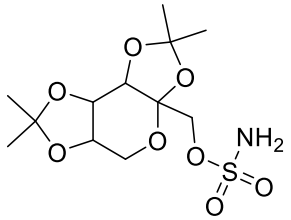
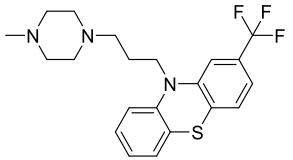
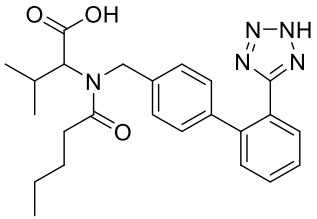
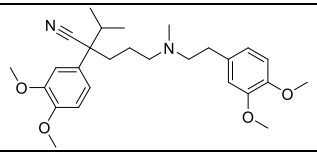
79	Lanzoprazol		2,41	0,69	2,19	2,4	Poliprótikus	9
80	Lomefloxacin		-0,37	-3,51	-3,12	-2,89	Poliprótikus	8
81	Lornoxikám		2,33	0,11	-0,29	-1,17	Amfoter	10
82	Meflokin		3,19	0,09	0,1	1,45	Monoprótikus bázis	9
83	Meloxicam		2,39	1,72	1,12	-1,02	Amfoter	9
84	Gallopamil		3,89	0,79	0,81	2,33	Monoprótikus bázis	7
85	Moxifloxacin		0,78	-2,37	-2,24	-1,72	Poliprótikus	8
86	Solgol/Nadolol		1,24	-1,86	-1,86	-0,86	Monoprótikus bázis	5

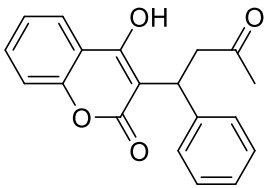
87	Nicorgolin/Nicergolin		4,51	1,52	2,7	4,47	Monoprótikus bázis	7
88	Niklozamid		4,72	4,72	4,72	4,48	Monoprótikus sav	8
89	Nifedipin		3,45	3,16	3,44	3,45	Monoprótikus bázis	8
90	Nimeszulid		2,71	2,71	2,7	1,57	Monoprótikus sav	8
91	Norfloxacin		-0,56	-3,69	-3,44	-3,04	Poliprótikus	7
92	Ofloxacin		0,17	-2,91	-2,35	-2,08	Amfoter	8
93	Omeprazol		2,09	-0,32	1,16	2,08	Poliprótikus	7
94	Oxibrupokain		3,74	0,48	0,65	1,96	Diprótikus bázis	5

95	Oxifenbutazon		2,48	2,48	2,31	0,25	Monoprótikus sav	5
96	Papaverin		3,32	0,85	1,58	3,29	Monoprótikus bázis	5
97	Pentamidin		1,88	-1,12	-1,12	-1,12	Diprótikus bázis	6
98	Phenserine (Fenszerin?)		3,17	0,07	0,2	2,43	Monoprótikus bázis	5
99	Fenilbutazon		2,9	2,89	2,67	0,59	Monoprótikus sav	4
100	Pirenzepin		0,31	-2,88	-2,36	0,03	Poliprótikus	7
101	Piroxikám		2,22	0,61	0,81	-1,16	Amfoter	8
102	Prednizolin		1,66	1,66	1,66	1,66	Semleges	5
103	Proklórperazin		4,83	0,93	1,83	4,23	Diprótikus bázis	5
104	Progeszteron		3,73	3,73	3,73	3,73	Semleges	2

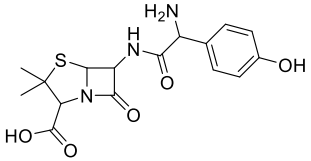
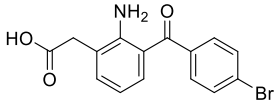
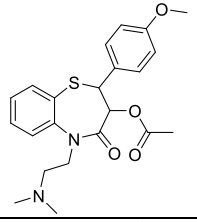
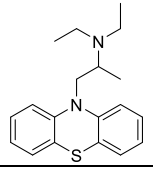
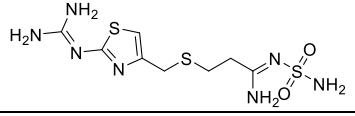
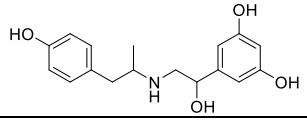
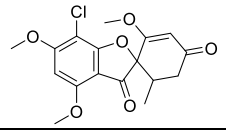
105	Propionilpromazin		4,68	1,58	1,59	2,73	Monoprótikus bázis	4
106	Kvinakrin (Mepakrin)		5,26	1,16	1,16	1,96	Diprótikus bázis	5
107	Kinin		3,02	-1,03	-0,32	1,78	Diprótikus bázis	4
108	Ranitidin		0,37	-2,89	-2,66	-0,63	Diprótikus bázis	8
109	Rozuvasztatin		1,36	1,34	0,85	-1,77	Monoprótikus sav	11
110	Szertralin		5,14	2,04	2,05	3,1	Monoprótikus bázis	3
111	Szilibinin		2,22	2,22	2,22	1,72	Diprótikus sav	10
112	Szulfaszalazin		3,37	2,59	0,96	0,22	Diprótikus sav	10

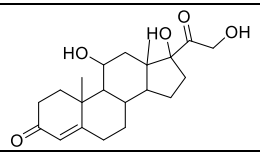
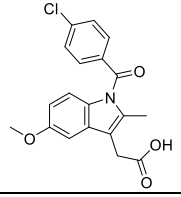
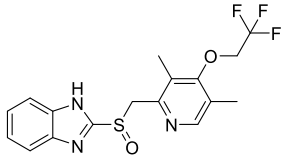
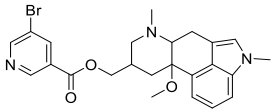
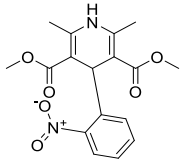
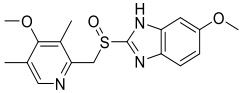
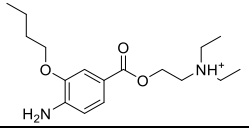
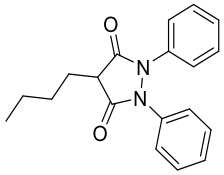
113	Szulindak		3,34	3,33	2,9	0,3	Monoprótikus sav	5
114	Szulpirid		0,85	-2,25	-2,24	-0,99	Amfoter	8
115	Tamoxifen		6,96	3,86	3,89	5,65	Monoprótikus bázis	2
116	Telmizartán		7,36	4,41	5,78	4,37	Poliprótikus	6
117	Tenoxikám		1,74	-0,45	-0,79	-1,75	Amfoter	2
118	Terfenadin		5,68	2,58	2,59	3,67	Monoprótikus bázis	3

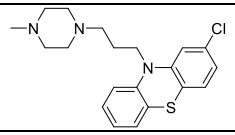
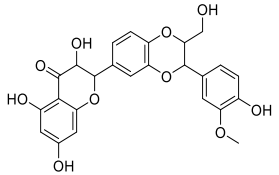
119	Tioridazin		6,1	3	3	3,69	Diprótikus bázis	4
120	Tolnaftát		4,68	4,68	4,68	4,68	Monoprótikus bázis	3
121	Topiramát		2,15	2,15	2,15	2,14	Amfoter	10
122	Trifluoperazin		5,01	1,11	2,01	4,41	Diprótikus bázis	7
123	Valzartán		3,85	3,72	2,05	-0,88	Poliprótikus	7
124	Verapamil		4,01	0,91	0,93	2,44	Monoprótikus bázis	6

125	Warfarin		3,11	3,1	2,81	0,31	Semleges	4

F2. táblázat Nem biomimetikus átalakulást mutató vegyületek

Név	Szerkezet	pH = 2,7	pH = 4,5	pH = 7,4
Amoxicillin (28)				X (100%)
Bromfenák (36)		X (80,3%)		
Diltiazem (52)				X (59,1%)
Etopropazin (Profenamin) (57)			X (60,5%)	
Famotidin (58)				X (55,5%)
Fenoterol (59)				X (63,6%)
Grizeofulvin (67)				X (8,84%)

Hidrokortizon (69)				X (97,6%)
Indometacin (72)				X (100%)
Lanzoprazol (79)		X (71,5%)	X (87,6%)	
Nicergolin (87)				X (68,8%)
Nifedipin (89)		X (36,8%)	X (55,7%)	X (43,5%)
Omeprazol (93)			X (63,8%)	X (19,6%)
Oxibuprokain (94)		X (36,1%)	X (35,2%)	X (29,6%)
Fenilbutazon (99)			X (64,6%)	

Proklórperazin (103)			X (100%)	
Szilibinin (111)				X (67,5%)