



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Környezeti Kémiai és Technológiai Tanszék

TDK dolgozat

Dihidropiridin származékok biomimetikus oxidatív átalakulásainak vizsgálata

Készítette:

Mohácsi Zsombor

Gyógyszervegyszmérnök Msc hallgató

Témavezető:

Dr. Balogh György Tibor
egyetemi tanár

Konzulensek:

Decsi Balázs
egyetemi tanársegéd

2023

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek **Dr. Balogh György Tibor** egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget biztosított a kutatómunkám elvégzésére, és hogy ezen keresztül megismerhettem a metabolitkutatás széles világát.

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

Köszönöm **Szabó Katalinnak**, MSc gyógyszer-vegyészmérnök hallgatónak, hogy az áramlásos kémiai reakciókban nyújtott munkájával segítette a dolgozatom létrejöttét.

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

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. Citokróm P450 enzimek 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.....	13
2.3. Szintetikus metalloporfirinek.....	14
2.3.1. Szintetikus metalloporfirinek szerkezete és csoportosítása	14
2.3.2. Metalloporfirinek alkalmazása biomimetikus katalizátorként.....	15
2.3.3. A metalloporfirinek pH függő oxidációs mechanizmusa	17
2.4. Gyógyszermetabolitok szintézise.....	20
2.5. Az áramlásos kémia alapjai.....	20
2.5.1. Töltött ágyas reaktorok az áramlásos kémiában.....	21
2.6. Korábbi eredmények bemutatása	22
3. Célkitűzés	24
4. Kísérleti rész.....	25
4.1. Felhasznált vegyszerek, analitikai módszerek, berendezések és szoftverek.....	25
4.2. Analitikai módszerek	25
4.2.1. Kromatográfiás módszer – HPLC-DAD-MS	25
4.3. Kísérletek leírása	26
4.3.1. Biomimetikus reakciók általános leírása.....	26
4.3.2. Heterogén szakaszos optimalizálás	27
4.3.3. Metalloporfirin rögzítése szilikára.....	27
4.3.4. Folyamatos kémiai reakciók általános leírása	28
5. Eredmények	29
5.1. Biomimetikus és a humán metabolit termékprofilok összehasonlítása dihidropiridin egységet tartalmazó vegyületek esetén.....	29

5.1.1.	Amlodipin.....	30
5.1.2.	Ftaloil-amlodipin	31
5.1.3.	Bisz-aminoetoxi-amlodipin	31
5.1.4.	Dimetil-amlodipin-dimetil-észter	32
5.1.5.	Benidipin	32
5.1.6.	Nifedipin	34
5.1.7.	Nitrendipin	35
5.1.8.	Dimetil-nitrendipin.....	35
5.1.9.	Dietil-Nitrendipin	36
5.2.	Folyamatos áramú kémiai reakció optimalizálása	37
5.2.1.	Amlodipin áramlásos kémiai reakciójának optimalizációja.....	38
5.2.2.	Benidipin folyamatos áramú kémiai reakciójának vizsgálata.....	43
5.2.3.	Dimetil-nitrendipin folyamatos áramú kémiai reakciójának vizsgálata	43
5.3.	Kitekintés	50
6.	Összefoglalás	51
7.	Függelék.....	52
8.	Irodalomjegyzék	53

Rövidítések jegyzéke

HTS	High Throughput System – Nagy áteresztőképességű rendszer
UDP	Uridin-difoszfát-glükóz
CyP	citokróm
CyP450	citokróm P450 enzimesalád
NADPHCyP	citokróm P450 reduktáz
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája
TPP	mezo-tetrafenilporfirin
FeTPPS	<i>mezo</i> -tetra(4-szulfoniloxifenil)porfirin–vas(III) klorid
HPLC-MS	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrométer
HRMS	Nagyfelbontású tömegspektrométer
NMR	Mágneses magrezonancia
HPLC-DAD	Diódasoros detektorral ellátott nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
HPLC-DAD-MS	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrométer Diódasoros detektorral
REIMS-HRMS	Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry High Resolution Mass Spectrometry Gyors párologtatással történő ionizációval működtetett Nagy felbontású tömegspektrométer
QSAR	Kvantitatív szerkezet-hatás összefüggések
QSPR	Kvantitatív szerkezet-tulajdonság összefüggések

1. Bevezetés

A gyógyszeripar számára az egyik legnagyobb kihívást az új (originális) hatóanyagok fejlesztése jelenti. A gyógyszerkönyvtár folyamatos bővülése miatt egyre nehezebb és költségesebb feladattá válik a szerkezetileg új, korábbi hatóanyagoknál kedvezőbb tulajdonságú kismolekulás hatóanyagok piacra vitele. A mai napig több mint 100 millió előállított (Pubchem adatbázisa alapján), különböző szerkezetű szerves molekula¹ közül nagyszámú kísérlettel lehet kiválasztani a megfelelő farmakodinámiás hatással és farmakokinetikai tulajdonsággal rendelkező vegyületeket, azonban még ez sem garantálja, hogy a gyógyszerkutatás felfedezési és vezérmolekula optimalizálási lépéseiben ígéretesnek talált vegyület a preklinikai és klinikai vizsgálatokban is megfelel, és végül a hatóság engedélyével piacra kerül.

A felfedező kémia kutatási és vezérmolekula optimalizálási lépés során követelmény, a hatóanyagok nagy mennyiségű kémiai, fizikai-kémiai és in vitro, esetenként in vivo farmakológiai információjának megszerzése és feldolgozása, a lehető legrövidebb idő alatt. A nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatok (HTS: High Throughput Screening) az egyik leggyakrabban alkalmazott metódus a korábban említett információk megszerzésére. A módszer lényege, hogy kellően robusztus, automatizált rendszerben nagyszámú molekulát in vitro kémiai és farmakológiai teszten vizsgálva szűrhetjük, azonosíthatjuk a potenciálisan kedvező tulajdonságú vegyületeket, illetve szerkezeti elemeket. Az így megszerzett tudás felhasználásával olyan szerkezet-hatás / szerkezet-tulajdonság (QSAR/QSPR) alapú modell építhető, mellyel lehetőségünk lehet új vegyületek HTS rendszerben adott válaszát előre jelezni, így segítve a kísérletes és gyógyszerkémiai tervező munkát.

A következő lépés a kedvező tulajdonságú vegyületek (vezérmolekulák) szerkezetének optimalizálása korai in vitro felszívódási és metabolizmus vizsgálati, majd in vivo állatkísérletes, korai toxikológiai vizsgálati adatok alapján. Ahhoz, hogy minden szempontból megfelelőnek lehessen nyilvánítani a gyógyszerjelölt vegyületet, nem csak a hatásosságát kell igazolni, hanem szigorú biztonsági előírásoknak is meg kell felelnie. A hatóanyagjelöltre, valamint a belőle képződő anyagcsere termékekre, azaz metabolitokra is komoly toxikológiai és felszívódási vizsgálatokat írnak elő a hatóságok. A metabolitok vizsgálatát tovább nehezíti, hogy a hagyományos in vitro és in vivo vizsgálati rendszerekben csupán nagyon kis mennyiségekkel lehet dolgozni, így a metabolitok elválasztását, szerkezeti azonosítását nehézkes megoldani.

Az utóbbi évtizedek gyógyszerkutatási stratégiájának eszközparkjában egyre nagyobb mértékben jelennek meg különböző biológiai folyamatokat / enzimek működését utánozó 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 kilenc különböző dihidropiridin szerkezeti egységet tartalmazó vegyület átalakulását vizsgáltam biomimetikus oxidációs rendszerben, keresve a jellemző oxidatív átalakulásukat és keletkező termékeket. Referenciaként a gyógyszerkutatásban is általánosan alkalmazott in vitro patkány mikroszóma alapú rendszerben bekövetkező metabolikus átalakulásokkal, valamint az irodalmi in vivo eredményekkel, hasonlítottam össze a biomimetikus eredményeket, így következtetve a rendszer alkalmazhatóságára a dihidropiridin gyűrűt tartalmazó vérnyomáscsökkentő hatású hatóanyagok metabolizmusának előrejelzésében. Emellett három vegyület biomimetikus oxidációját elvégeztem folyamatos áramú rendszerbe integrálva is, vizsgálva az áramlási sebesség, a biomimetikus metalloporfirin katalizátor, az oxidálószer és szubsztrát koncentrációjának, valamint a reakciótér hőmérsékletének hatását a konverzióra és a keletkező termékösszetételre.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Citokróm P450 enzimrendszer

2.1.1. Metabolikus folyamatok

A homeosztázis fenntartó folyamatait együttesen anyagcserének nevezzük. Az anyagcsere tartalmazza az endogén (a szervezet saját) és exogén (a külvilágból származó) anyagok 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 metabolikus folyamatoknak vagy metabolizmusnak nevezzük. A metabolikus folyamatok célja és eredménye, hogy a testidegen anyagokat a szervezet könnyebben kiválasztható formába alakítsa és így minél gyorsabban eltávolítsa. Ez a gyógyszerhatóanyagok esetében azt jelenti, hogy a jellemzően lipofil molekula enzimatiszus átalakulások hatására hidrofilebbé válik, majd jellemzően a vesén és az epén keresztül távozik a szervezetből. A folyamatban keletkező metabolit(ok) farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságai is jelentősen eltér(het)nek az anyavegyületétől.

A metabolikus folyamatokat 2 fő csoportra oszthatjuk, melyet Fázis I és Fázis II metabolizmusnak nevezzük. A Fázis I reakciók során az enzimek redox reakciók segítségével alakítják át a xenobiotikumokat (**1. táblázat**), míg a Fázis II folyamatokban az exogén molekula valamely poláros endogén molekulával konjugálódik (**2. táblázat**). Ezek a folyamatok elsősorban a májhoz köthetők, mivel a májban található a legnagyobb mennyiségben azok az enzimek melyek a Fázis I és II folyamatok lejátszódásáért felelnek.²

1. táblázat Fázis I metabolikus folyamatok csoportosítása

Fázis I metabolikus reakciók		
	Típus	Reakciók
Oxidáció	Mikroszómális*	alifás és aromás hidroxilálás, epoxidáció; <i>N</i> -, <i>O</i> -, <i>S</i> -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, gyűrűfelynyílás, dimerképzés, transzaminálás, dekarboxilezés

*mikroszóma: endoplazmatikus retikulum izolátum

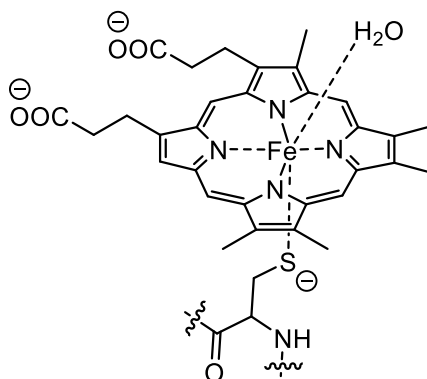
2. táblázat Fázis II metabolikus folyamatok csoportosítása

Fázis II metabolikus reakciók		
Reakció	Enzim	Konjugálódó funkcióscsoport
Glükuronidáció	UDP Glükuronil transzferáz	-OH, -COOH, -NH ₂ , -SH
Szulfonálás	szulfontranszferáz	-OH, -NH ₂ , -SO ₂ NH ₂
Metilálás	metiltranszferáz	-OH, -NH ₂
Acilezés	acetiltranszferáz	-OH, -NH ₂
Aminosav konjugáció	-	-SO ₂ NH ₂ , -COOH
Glutation konjugáció	Glutation-S-transzferáz	epoxidok, -NO ₂
Zsírsav konjugáció	-	-OH

2.1.2. Citokróm P450 enzimcsalád

Klingenberg³ és Garfinkel⁴ egymástól függetlenül patkány májsejtekből izolált egy CO-kötő fehérje-pigmentet 1958-ban, amelynek szerkezetére csak 1967-ben tett javaslatot Sato és Omura.⁵ Az enzimet a kutatók a *hem*-fehérjék közé sorolták, mivel egyik része protoporfirin IX egységet tartalmaz. 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 megfelel a *Hückel-szabálynak*, így az aktív centrum egy heterociklusos aromás rendszernek tekinthető. A CyP450

izoenzimesalád egyaránt részt vesz mind az exogén, mind pedig az endogén anyagok metabolizmusában.⁶



1. ábra Protoporfirin IX váz, axiális ligandumként ciszteinnel

Az enzimek csoportosítása elsődlegesen a fehérjeszekvenciák 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 enzimesaládot azonosítottak, melyből 18 található meg emlősökben. Közülük a CyP1, CyP2, és CyP3 családok szerepe jelentős a xenobiotikumok és kismolekulás gyógyszerhatóanyagok lebontásában. Ezek az enzimesaládok, ugyan különböző mennyiségben és arányban, de minden sejtben megtalálhatók. A humán CyP450 enzimek jellemzően a mitokondrium és az endoplazmatikus retikulum membránrendszeréhez kötve találhatók meg. A *hem* tartalmú aktív rész a sejt plazma felőli oldalon helyezkedik el úgy, hogy a szubsztrát kötőhely minden esetben 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+} , ami alapállapotban Fe^{2+} formájában van jelen. Ez utóbbi formában csak az axiális ligandummal képes koordinálódni.⁷

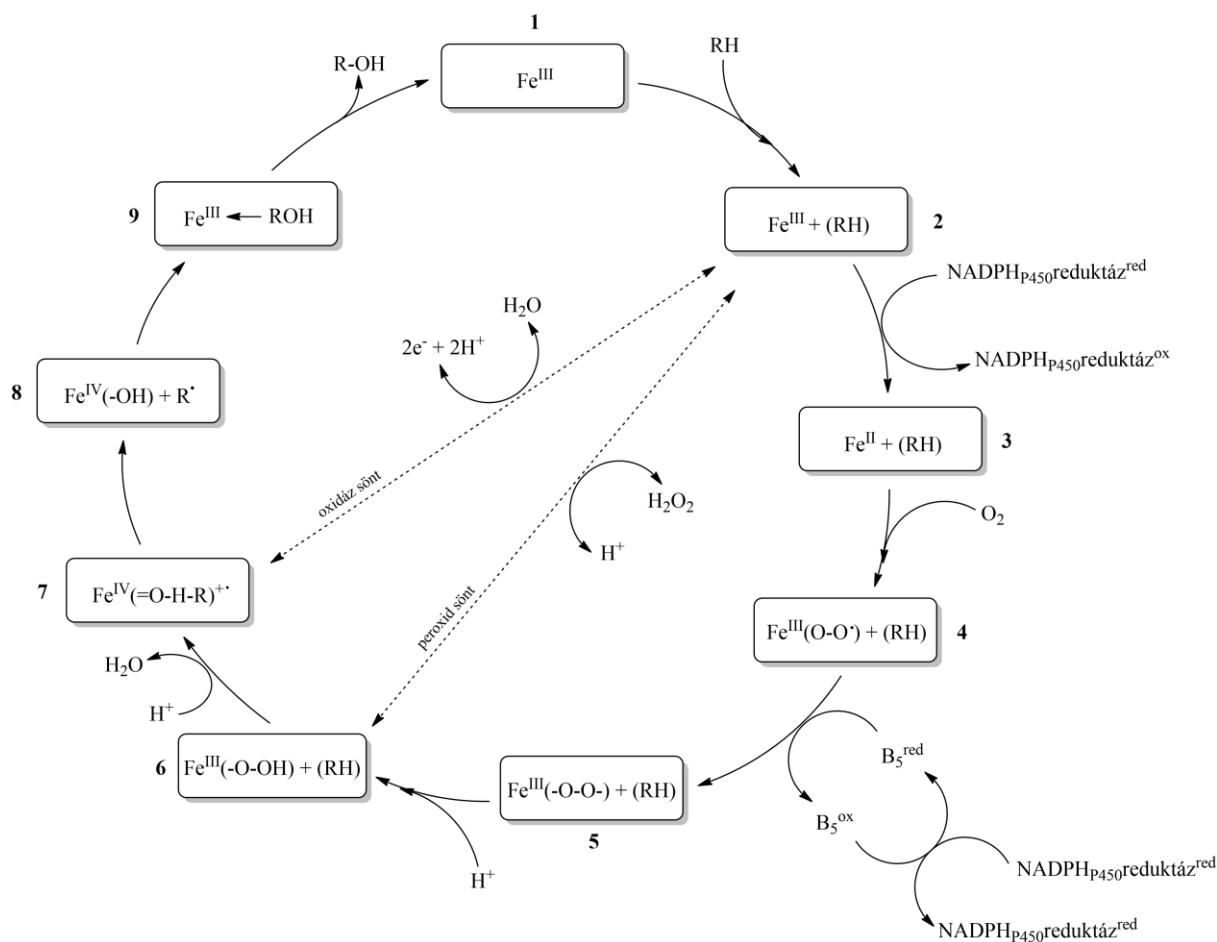
2.1.3. Citokróm P450 enzimek oxidációs mechanizmusa

Ahogy korábban említettem (lásd **2.1.2. alfejezet**), a CyP1, CyP2 és CyP3-as családba tartozó enzimek játszik a legnagyobb szerepet a Fázis I metabolizmusban, melyek közül öt a gyógyszermetabolizmus 95%-áért felelős. (3A4 (36%), 2D6 (19%), 2C9 (16%), 1A2 (11%), 2C19 (13%). A többi izoenzim főleg endogén anyagok átalakításában vesz részt (pl.: szteroidok, epesavak, zsírsavak és eikozanoidok). A Fázis I oxidációk zömét a hem-fehérje perferrioxi-komplexe (**1**) végzi. A folyamat maga egy elektron átmenetével lejártszódó oxidációs reakció. A CyP enzimek által katalizált reakciók részleges sztereo- és regioszelektivitást mutatnak.⁸

A CyP enzimek kevert típusú monooxygenáz enzimek. Az általuk katalizált oxidációs reakciókban, 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 található, legtöbbször vízzel koordinálódva. 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 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 újrakötődési mechanizmust (oxygen rebound, **9**), mely során kialakul a végső hidroxilált termék és a vas (III)-ion regenerálódik. Ezután a ciklus újraindul.⁹

A **2. ábrán** a két pontozott nyíl két 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 oxidálószerrel 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 Citokróm P450 katalitikus mechanizmusa

A CyP450 enzimek a szervezetben számos oxidatív folyamatot katalizálnak. A legfontosabb ezek közül az alifás és aromás szén hidroxilációs-, a heteroatomok dealkilációs-, illetve oxidációs-, telítetlen szén kötések epoxidációs reakciói, valamint különböző dehidrogénezési reakciók.¹¹

2.2. Metabolizmus vizsgálati módszerek

2.2.1. Hagyományos in vitro metabolizmus vizsgálatok

Egy új gyógyszerjelölt hatóanyag preklinikai fejlesztése során jellemzően in vivo és élő szervezeteken alapuló in vitro módszereket alkalmaznak a metabolizmus vizsgálatához. Az állatkísérletek minimalizálása érdekében 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 hatóanyagból képződő toxikus vagy reaktív metabolitokat, valamint a gyógyszerkémikusok számára információt szolgáltatni a vegyület metabolikusan érzékeny pontjairól, ezáltal javítható a gyógyszerjelöltek metabolikus stabilitása.

A hatóanyagok jelentős részének a metabolizmusa a májban játszódik le, emiatt az in vitro metabolikus módszerek is jellemzően máj, illetve májszövet alapúak. Legjelentősebb közülük a májsejt mikroszóma alapú rendszere, melyeket széleskörben alkalmaznak a gyógyszerjelöltek metabolikus stabilitásának vizsgálatában. A máj mikroszóma a hepatociták (májsejtek) homogenizátumából többlépcsős ultracentrifugálással nyert endoplazmatikus retikulumának izolátuma. Különböző fajspecifikus (humán, patkány, egér stb.) mikroszóma alapú standardizált módszerrel nyert izolátumai elérhetők kereskedelmi forgalomban is, melyek így széleskörben a kutatók rendelkezésére állnak. Relatív olcsók, viszont az általuk katalizált reakciókban kofaktorokat (NADH/NADPH, glükóz-6-foszfát) kell alkalmazni, valamint szükségesek még egyéb CyP koenzimek is (pl.: glükóz-6-foszfát reduktáz) az in vitro rendszer megfelelő működéséhez. Az in vitro modell hátránya, hogy a vizsgált elegy biológiai mátrixa rendkívül összetett háttérrel rendelkezik, ami nagymértékben nehezíti az in vitro minták analitikai vizsgálatát. Ezen felül a májenzimek aktivitása és mennyisége jellemzően egyedfüggő, emiatt a mikroszóma izolátum előállítása során nagyszámú, eltérő egyedekből származó májat szükséges felhasználni, (ún. *pool*-ozott izolátum keverék). Így a vizsgálat során az egyedi eltéréseket elnyom(hat)juk és a hatóanyagok metabolizmusáról egy sokkal általánosabb képet kaphatunk.^{12,13}

2.2.2. In vitro metabolikus modell rendszerek

Az előző fejezetpont végén felsorolt nehézségek miatt előnyös lehet a biomimetikus rendszerek alkalmazása metabolizmus vizsgálatokban is. Ezen rendszerek előnye, hogy jellemzően nem tartalmaznak biológiai eredetű (sejt- és enzimmaradékokat) komponenseket, így kofaktorokat sem, így kiküszöbölve a komplex biológiai mátrix zavaró hatását a vegyületek oxidációs útvonalainak vizsgálatakor.

Az irodalomban három fő modellezési módszert különböztetnek meg, amelyek alkalmazhatók az in vitro metabolizmus vizsgálatokra. Ezek a *Fenton-reakció*, az elektrokémiai cellával történő oxidáció, valamint a szintetikus metalloporfirinek alkalmazása.

A fent említett módszerek közül talán az egyik leggyakrabban alkalmazott in vitro vizsgálati módszer a biomimetikus szintetikus előállított metalloporfirin katalizátorokon alapuló rendszerek, melyek alkalmazásával diverz termékprofil kapható. A megfelelő körülmények mellett hidroxiláció, heteroatomon végbemenő dealkiláció, epoxidáció, S-oxidáció, N-oxid képzés, oxo csoportok kialakítása, és dehidrogénezés is megfigyelhető.^{14,15}

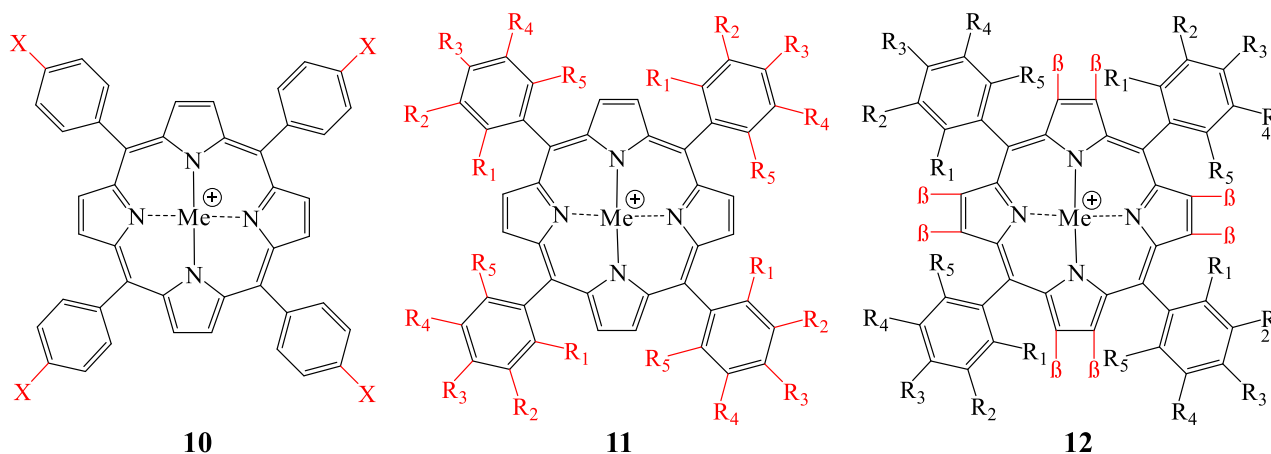
2.3. Szintetikus metalloporfirinek

2.3.1. Szintetikus metalloporfirinek szerkezete és csoportosítása

A Cyp450 enzimesalád aktív centrumához hasonlóan, amelyet egy protoporfirin IX egység alkot (2.1.1. **alfejezet; 1. ábra**), a szintetikus metalloporfirinek szerkezetének alapját is egy szubsztituált porfirinváz adja. A protoporfirin IX egységgel ellentétben viszont nem csupán a pirrol gyűrűkön találhatók szubsztituensek, hanem az őket összekötő metilén hidak szénatomjain is (3. ábra).

A biomimetikus oxidációk során alkalmazott szintetikus metalloporfirinek a szerkezetük alapján lehet csoportosítani, ami követi az előállításuk időrendi sorrendjét is. Az első irodalmi említés, amely vas-porfirinek biomimetikus katalizátorként alkalmazza oxidációs rendszerben, 1979-ből származik *Groves és mtsai.* A vas porfirinek a CyP450 katalizálta hidroxilációs és epoxidációs reakciók modellezésében alkalmazták, alkánok és olefinek esetében. Ehhez *mezo* helyzetben fenilcsoportokat tartalmazó porfirint alkalmaztak (mezo-tetrafenilporfirin, TPP).¹⁶ Ezt nevezzük *1. generációs porfirinnek*. A TPP alkalmazása során felmerülő probléma az alacsony katalitikus aktivitás volt, mivel az érzékeny porfirin szerkezet könnyen degradálódott a reakció körülményi között, illetve lúgos közegben (pH 8-11) jellemzően ún. μ -*oxo-dimereket* képzett, ami a porfirin inaktiválódásához vezetett.

A *2. generációs porfirinek* fenilcsoportjai nagy térkitöltésű csoportokkal, illetve halogénatomokkal lettek szubsztituálva. A legjobb alkalmazhatósággal a fenil gyűrűkön alkil, O-alkil, és szulfonsav csoporttal szubsztituált, illetve perfluorozott, perklórozott és perbrómozott származékok rendelkeztek. Az így kapott metalloporfirin származékok előnye, hogy a szubsztituált fenilcsoportok szterikus hatása révén gátolt a μ -*oxo-dimerek* képződése, valamint a fenilcsoportokon 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.



3. ábra Különböző generációs metalloporfirinek¹ (X = H, első generáció; X = -COOH, -SO₃H, -NR₄⁺, vízzoldható; R₁₋₅ = halogén, második generáció; β, R₁₋₅ = halogén, harmadik generáció)

A 3. generációs porfirinek pirrol gyűrűit β-helyzetben halogénnel 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.

A másik csoportosítási lehetőség a nitrogének által koordinált fématom minősége szerint történik. Leggyakrabban alkalmazott központi fémionok a Fe²⁺, Mn²⁺, Cr²⁺, és Ru²⁺. Ezeket a komplexeket hem-fehérjék működését utánozó katalizátorként alkalmazzák, olefinek epoxidálásában, illetve alkánok oxidációjában.^{17,18}

2.3.2. Metalloporfirinek alkalmazása biomimetikus katalizátorként

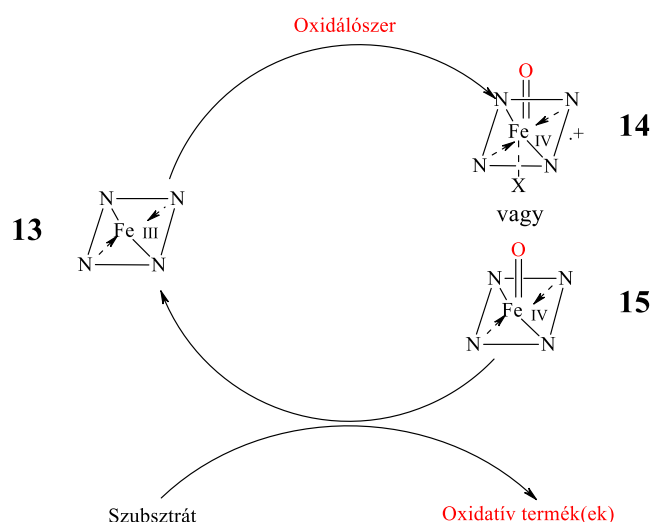
Ahogy az előző pontban említettem elsőként *Groves és mtsai* alkalmazták sikerrel a szintetikus metalloporfirineket biomimetikus oxidációs reakciókban. Mezo-tetrafenilporfirin vas(III)–jodozilbenzol rendszert alkalmazva sikeresen modellezték a hidroxilációs és epoxidációs reakciókat, melyeket a CyP450 katalizált, egyszerű alkánok és olefinek esetében.¹⁶

Napjainkban 3 eltérő oxidációs rendszert különböztetünk meg, a porfirin aktiválása szempontjából. A legelterjedtebben alkalmazott rendszerben Fe²⁺, Cr²⁺ vagy Mn²⁺ központú metalloporfirin mellett oxigén donort alkalmaznak, mint pl. H₂O₂, más szerves peroxidok, jodozilbenzol, perjodátok stb. Az így létrehozott rendszert a CyP450 peroxid sönt (**1. ábra**) mechanizmusához hasonlóan képes a szubsztrátok oxidálására. Egy másik megvalósítása a reakciónak, hogy a metalloporfirinek aktiválására molekuláris O₂-t és redukálószer, pl.

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

NaBH₄-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 O₂ 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 metalloporfirinből az oxidálószer hatására magas oxidációs állapotú, reaktív oxo-metalloporfirin keletkezik. Ez kétféle úton jöhet létre, melyek közül a gyakoribb esetben **14** oxo-fém(IV) porfirin gyökkation keletkezik. A másik, és sokkal ritkább eset akkor lép fel, ha nincs axiális ligandumnak megfelelő vegyület, illetve 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 termékévé vagy termékékké alakítja őket, miközben visszaalakul alapállapotba.



4. ábra Biomimetikus oxidáció mechanizmusa

Számos kutatás folyik napjainkban a szintetikus metalloporfirinek alkalmazására. A porfirinváz alapú fémkomplexek alkalmazhatóak a CyP450 enzimek működésének direkt utánzására (*biomimicri*). Ahogy dolgozatom során korábban említettem (**2.3.1. alfejezet**), a szintetikus metalloporfirinek tulajdonságai befolyásolhatók a megfelelő oldalcsoportok alkalmazásával, így javítva a katalizátor aktivitását és stabilitását. Emellett alkalmazhatók továbbá hem-fehérjék (CyP450, lignin peroxidáz, nitrogén monoxid szintetáz) által katalizált oxidatív folyamatok modellezésre is.

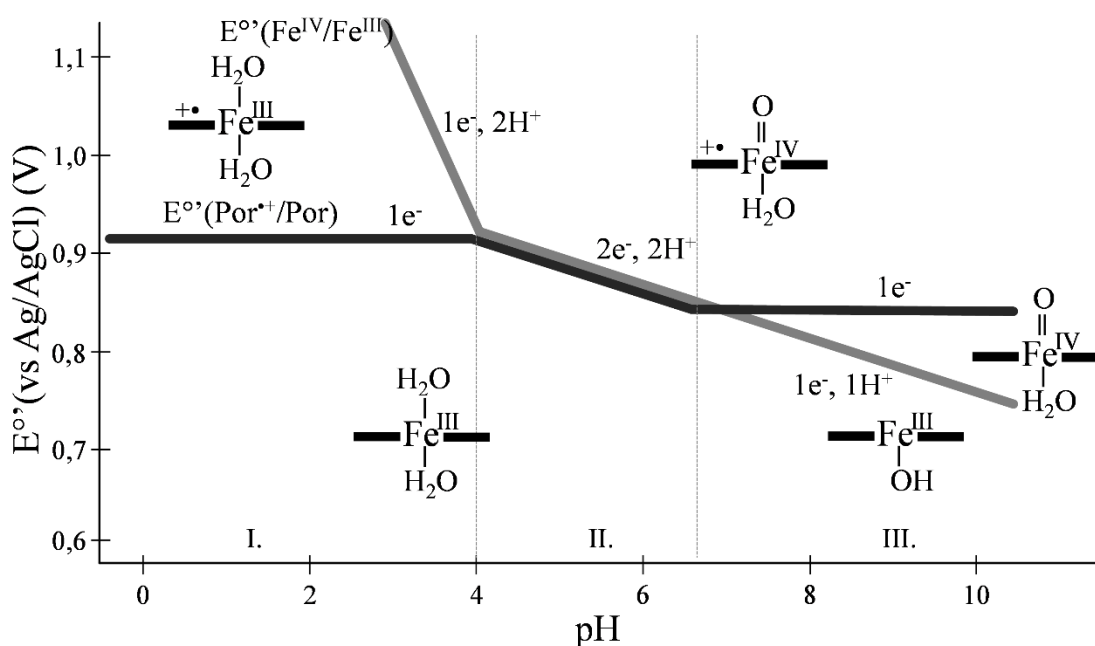
Hátrányuk azonban, hogy homogén oxidatív közegben a szintetikus metalloporfirinek degradálódni képesek, így elveszítik katalitikus aktivitásukat.¹⁹

Az in vitro biomimetikus alkalmazáson túl számos más ipari alkalmazásra is található példa. Iparban alkalmazásuk kiterjed pl. ipari színezékek lebontására²⁰, ciklohexanon előállítását megoldották ciklohexánból kobaltporfirin alkalmazásával²¹, mangán központi iont tartalmazó porfirineket alkalmaznak valencén oxidálására nootkatonná amelyet citrancsaromaként, illetve rovarírtóként alkalmaznak.^{22–24} Egy másik mangán központú metalloporfirint cisz-polibutadién oxidációjára alkalmazzák, hogy poliepoxiiddá, azaz polialkohol előanyagává alakítsák.²⁵ A szintetikus felhasználásukon kívül különböző analitikai módszer esetében is alkalmazzák őket, például biológiai esszékben a célproteinek felismerésére²⁶, valamint metalloporfirin alapú elektronikus „orrok” és „nyelvek” alkalmasak vörösborok objektív minősítésére²⁷

2.3.3. A metalloporfirinek pH függő oxidációs mechanizmusa

A biomimetikus oxidációt mezo-tetra(4-szulfoniloxifenil) porfirin – vas (III) klorid (FeTPPS) katalizátorral végeztem előnyös tulajdonságai miatt (jó vízoldhatóság, nincs jelen sztérikusan gátló halogén, a fenil csoportokon található szulfonsav csoport ionos kötést képesek kialakítani savas kémhatáson).

Wolak és mtsai eredményei alapján a reakcióközeg pH-ja meghatározó a szelektivitás, a rendszerben képződő inaktív μ -oxo-dimer képződési sebessége, valamint a degradáció sebessége és az oxidációs mechanizmus szempontjából. Feltételezésük alapján az oxidáció a központi atom oxidációjával ($\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{IV}}$), vagy pedig a porfirinváz gyökkationná alakulásával történhet. Az utóbbi folyamat nem érzékeny, míg az előbbi, a reaktív oxo-ligandumot eredményező folyamat, függ az alkalmazott közeg pH értékétől. Tehát az $E_{\text{Fe}^{\text{IV}}/\text{Fe}^{\text{III}}}^{0'}$ pH függésének következtében az $E_{\text{Fe}^{\text{IV}}/\text{Fe}^{\text{III}}}^{0'}$ és a $E_{\text{P}^+/ \text{P}}^{0'}$ 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) oxidációjának potenciál függése a közeg pH-jától ²⁸

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

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

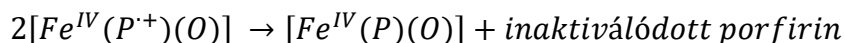
II. tartomány ($3,5 < \text{pH} < 6,5$): $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})(\text{H}_2\text{O})_2] \rightarrow [\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{P}^+)(\text{O})\text{H}_2\text{O}] + 2 e^- + 2 \text{H}^+$

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

Ez alapján $\text{pH} < 3,5$ és $\text{pH} > 7$ tartományokban a porfirin komplex az O-O közötti kötés homolitikus hasadását segíti elő, mint redox partner a peroxid kötést tartalmazó oxidálószeres esetében (jódtartalmú oxidálószeres esetén O-I kötést hasítja), ez egy elektron átmenetével járó oxidációs mechanizmus. Ezzel szemben a $4 < \text{pH} < 7$ közötti tartományban a porfirin a heterolitikus kötéshasítást részesíti előnyben, amely egy két elektron átmenetével járó reakció és mechanizmusát tekintve ez felel meg a szervezetben végbemenő folyamatnak (mikroszómális CyP450 enzimrendszer által katalizált folyamatoknak felel meg). Ezen kívül más tulajdonságok is tudják befolyásolni a porfirin katalitikus mechanizmusát (oxidálószer minősége, porfirin szerkezete, az oldószer minősége, axiális ligandum jelenléte vagy hiánya, fém ellenionja aprotikus közegben).

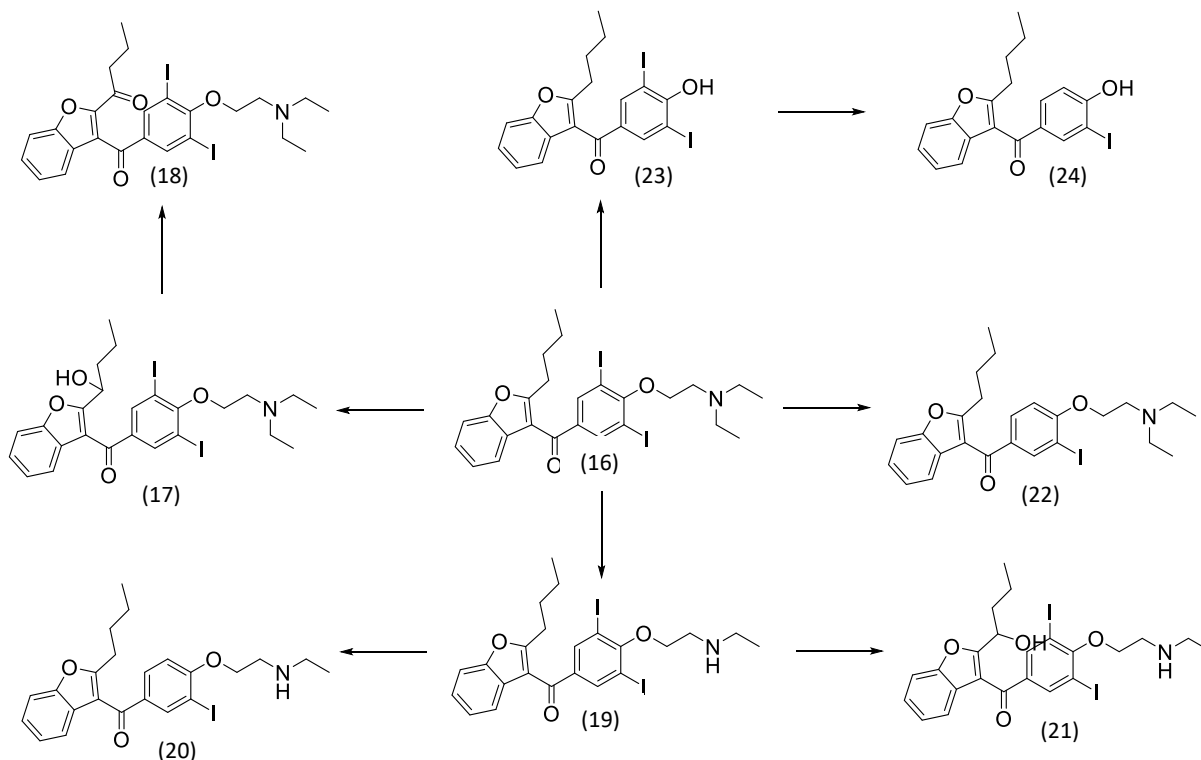
Fontos ismételt megemlíteni, hogy a rendszer egyik gyengepontja, a homogén oxidatív közegben való érzékenysége a katalizátornak. Az oxidálószer O-O nem porfirin katalizálta kötéshasadásánál a képződő gyökök képesek reagálni a porfirin vázával, ezáltal

a katalizátor degradációját okozva. Egy másik lehetséges degradációs utat mutat be a következő folyamat:



Ez utóbbi porfirin molekulák szempontjából bimolekuláris degradációs út háttérbe szorítására szolgálhat a szilárd hordozóhoz rögzített porfirinek alkalmazása, ahol az aktivált porfirin komplexek reakciója gátolt.^{28–31}

A fent bemutatott oxidációs mechanizmusokat az amiodaron (**16**) példáján kívánom szemléltetni.²⁹ A biomimetikus oxidáció fő termékei erősen savas pH tartományban az 1-es szénatomon történő hidroxiláció (**17**), illetve a belépő hidroxil csoport tovább oxidálódása oxo-csoporttá (**18**). Ezzel összehasonlítva 4,5-ös pH értéken a fő metabolit az egyszerűen *N*-deetilált származék (**19**), valamint megjelenik mellette a deetilált származék olyan módosulata, amelyről a 13-as szénatomon található jód atom eliminálódott (**20**). Enyhén lúgos pH értéken végzett biomimetikus oxidáció pedig egy harmadik átalakulási képet adott számunkra, ahol lényegesen alacsonyabb a konverzió értéke, de a fő (major) metabolit még mindig a deetilált származék, illetve mellette sokkal diverzebb a termékösszetétel. Jelen van 1-oxo amiodaron (**18**), azaz 1'-hidroxi amiodaronnak (**17**) is keletkeznie kellett, valamint az egyik etil csoport metil csoportra cserélődik az egyik származékban.



6. ábra Amiodaron (**16**) biomimetikus oxidációs termékei

Ez alapján is látszik, hogy mennyire eltérő termékösszetételeket kapunk, ahogy különböző pH értéken végezzük a reakciókat.^{32–35}

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 szerkezetét és mennyiségét különböző analitikai rendszerek (HPLC-MS, HRMS, NMR) alkalmazásával igyekeznek minél nagyobb pontossággal megadni. Ezen felül a gyógyszerhatóságok megkövetelik a 10%-nál nagyobb mennyiségben keletkező metabolitok hatástani és toxikusságának vizsgálatát.³⁶ Ezekhez a vizsgálatokhoz azonban akár több grammos mennyiség is szükséges az adott metabolitból, melyet in vivo vagy a korábban említett in vitro mikroszómális vizsgálati rendszerekből rendkívül nehéz lenne izolálni. Emiatt az analitikai vizsgálatok során azonosított metabolitot, vagy metabolitokat jellemzően költséges úton, totálszintézissel kell előállítani. Az esetek nagy részében ez rendkívül körülményes, mert többlépéses szintéziseket kell alkalmazni, egzotikus reakcióutakon. Sajnos a lehetőség azonban így is fenn áll, hogy a szintetikus vegyész nem képes kidolgozni egy kellően gazdaságos módszert a megfelelő szerkezetű metabolit előállítására.,

A biomimetikus reakcióutak alkalmazása mindkét esetben előnyös lehet, mivel a metabolitok szintézise az anyavegyületből direkt úton, egy lépésben megvalósítható lehet, így elkerülhető az új reakcióutak keresése. Biomimetikus rendszerek alkalmazása során nem csak szerkezet meghatározásra nyílhat lehetőség, hanem a toxikológiai vizsgálatokhoz szükséges grammos mennyiség is könnyen előállíthatóvá válik, amit a biomimetikus rendszer folyamatos áramú rendszerbe integrálásával hatékonyabbá és zöld kémiai szempontból is fenntarthatóbbá tehetünk. Jelen dolgozatban is a biomimetikus rendszer folyamatos áramú rendszerbe való integrálásával foglalkozom, a rendszert 5 faktor mentén optimalizálva, hogy a lehető legnagyobb konverzióértéket érjem el a stacioner állapotban.^{37–41}

2.5. Az áramlós kémia alapjai

Számos előnyük ellenére a folyamatos üzemű áramlós reaktorok alkalmazása a gyógyszeriparban még jelenleg sem tekinthető nagyobb mértékben elterjedtnek. Mégis számos előnye közül néhányat kiemelve, úgyszint mint a kitűnő reprodukálhatóság, a nagyfokú automatizálhatóság, megnövelt biztonság és megbízhatóság, fokozatosan nő a szerepe az iparban. Ezen felül a folyamatos áramú körülmények között egyszerűen biztosíthatók az állandó reakciókörülmények mivel a kis átmérőjű áramlási csatornákkal rendelkező reaktorokban kitűnő keveredés és hőátadás lép fel. Ennek következtében folyamatos áramú reaktorokban akár

olyan reakciókat is el tudunk végezni, melyek hagyományos berendezésekben nem megvalósíthatók. Ilyenek pl. a nagyon reaktív, robbanás veszélyes vagy korrozív kiindulási anyagokkal történő ipari méretű szintézisek megvalósítása.⁴² Ezen felül az áramlásos reaktorok kedvezőbb térfogat/felület arányai leegyszerűsítik a méretnövelést a hagyományos kevert tartályreaktorokkal szemben, mivel a további optimalizálási lépésektől el lehet tekinteni mert a laboratóriumi körülmények is ipari gyártásba vihetők.⁴³

Szakaszos reakcióvezetés esetén a reakció addig zajlik, amíg a szükséges hőmérsékleti intervallumban tartjuk az elegyet. A reakció előrehaladását az eltelt idővel jellemezhetjük, a tökéletesen kevert rendszerben ideálisan a koncentráció minden pontban azonosnak tekinthető és a reaktánsok koncentrációja a teljes térfogatban ugyanúgy változik. A folyamatos áramú rendszerekben a reaktánsok oldatait pumpák segítségével áramoltatják a kívánt hőmérsékleten termosztált reaktorok csatornáin keresztül. A reakció addig tart, amíg a reakcióelegy a reaktorban tartózkodik. Ezt nevezzük tartózkodási időnek, ami a reaktor térfogatától és a fluidum áramlási sebességtől függ, emellett a reakció előrehaladása a reaktor hossza mentén a megtett úttal jellemezhető. Állandó áramlási sebesség esetében a megtett út függvényében exponenciálisan csökken a reaktánsok koncentrációja.

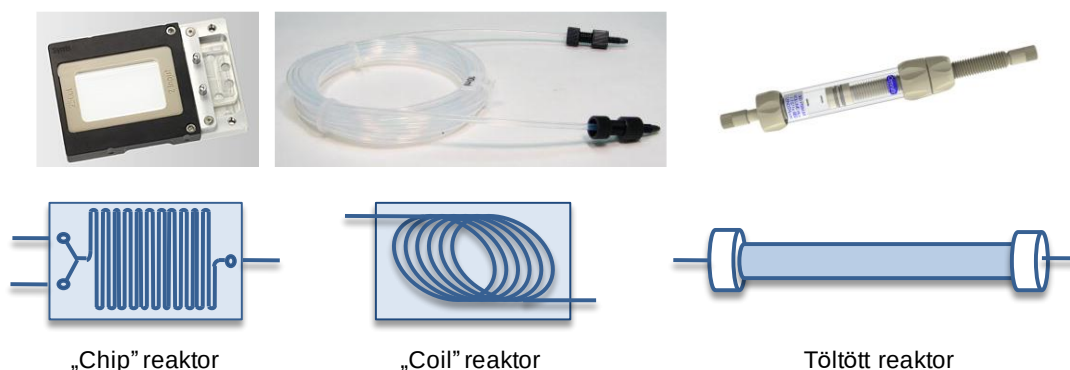
A folyamatos üzemű, áramlásos és a szakaszos üzemű technológiák összehasonlítására alkalmas mérőszám a reaktor produktivitás vagy volumetrikus produktivitás (angolul *space time yield*, STY), mely megadja az egy liter reaktortérfogatban (V_r) egy óra alatt (t) előállítható termék tömegét (m_t) milligramm egységben (**1. egyenlet**).

$$STY = \frac{m_t}{V_r \times t}; \left[\frac{mg}{l \times h} \right] \quad \text{1. egyenlet}$$

2.5.1. Töltött ágyas reaktorok az áramlásos kémiában

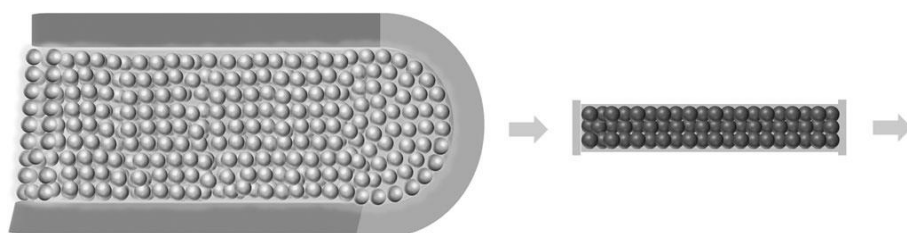
A folyamatos áramlású rendszerekben alkalmazott reaktorok hasznos térfogata alapján megkülönböztetünk mikro- (átmérőjük 10 – 500 μm) és minireaktorokat (átmérőjük 500 μm – néhány mm). Előbbiek esetében a kis átmérőjű csatornáknál tökéletes keveredéstről, illetve hőátadásról beszélhetünk, ám egyben ez a hátrányukat is jelenti, hiszen a várhatóan nagymértékű nyomásesés miatt korlátozott áramlási sebességgel lehet terhelni a rendszert, illetve a csatornák könnyen eltömődhetnek, ami a szerkezetük miatt javíthatatlan hibát eredményezhet. Ilyenek lehetnek a „chip”, illetve a „coil” reaktorok. (**7. ábra**). Utóbbi csoportjuk folyamatos reakciómegvalósítás szempontjából kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkezik, hiszen javulnak az áramlási viszonyok, az eltömődés veszélye sem áll fent. Minireaktorokkal akár ipari szintéziseket is megvalósíthatunk, hiszen a megnövelt térfogat és

áramlási sebesség több kilogrammos tételek legyártását is lehetővé teszi. További előnyük, hogy töltött reaktorokat is alkalmazhatunk (7. ábra).



7. ábra Mikroreaktorok típusai

A folyamatos áramú töltött ágyas mikro- és minireaktorok kitűnő hőátadó tulajdonsággal rendelkeznek, ami ideálissá teszi őket heterogén katalitikus reakciók végrehajtására, mivel alkalmazásuk esetén nem alakulnak ki *hotspotok* a reaktor mentén, rövid tartózkodási idő alatt nem történik nagy arányú radiális diffúzió, illetve szelektívebben játszódhatnak le reakciók, mint a hagyományos megvalósítás esetén. További előnyük az alacsony katalizátor és reagens felhasználás, így kevesebb az általuk generált hulladék, amit kezelni kell, ezáltal környezetbarát eljárásról beszélhetünk. A reaktánsok kezelése egyszerűvé válik, biztosított a termék folyamatos előállítása, valamint erélyes körülmények közötti reakcióvezetés és a katalizátor újrahasznosítása is könnyen megoldható. Töltött ágyas reaktorokban a katalizátort oldhatatlan hordozó részecskék felületére rögzítik. A reaktoron belül ezek a részecskék véletlenszerűen helyezkedhetnek el. A 8. ábra a töltet és a reaktor felépítése látható.⁴⁴



8. ábra Töltött ágyas reaktor felépítése

2.6. Korábbi eredmények bemutatása

Kutatócsoportunkban korábban kifejlesztettek egy 96-lyukú mérőtálcán (*plate*) alapuló, közepes áteresztőképességű biomimetikus oxidáción alapuló szűrőrendszert, amelyet HPLC-DAD-MS 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 oxidálószer (tBuOOH, H₂O₂ és NaIO₄) alkalmazása mellett.

Az így kialakított biomimetikus rendszerben az amiodaron (**16**) antiaritmikus hatóanyag pH függő oxidációját részletesen is vizsgálta a kutatócsoport, melyet a **2.3.3. alfejezetben** mutattam be részletesen. Külön kiemelendő, hogy e munkában **16** több, az emberi szervezetben képződő, korábban nem azonosított metabolitját sikerült izolálni és NMR vizsgálatok alapján szerkezetüket megadni, pontosítani.²⁹

A Bsc munkám során a korábban optimalizált biomimetikus rendszeren vizsgáltam 100 gyógyszerhatóanyag biomimetikus átalakulását FeTPPS porfirin és tBuOOH oxidálószer alkalmazva. A reakciókat hatóanyagonként négy független pH értéken végeztem el (pH=2,7; 4,5; 6,5; 7,4) és a reakciókat HPLC-DAD-MS és mérőtálca olvasó alapú REIMS-HRMS módszerekkel jellemeztem. A kapott metabolikus profilok jó egyezést mutatnak az in vivo irodalmi adatokkal így alátámasztva a rendszer alkalmazhatóságát a gyógyszerkutatásban.

3. Célkitűzés

Munkám során célul tűztem ki, hogy a korábbi munkám során alkalmazott biomimetikus szűrési rendszer felhasználásával megvizsgáljam a dihidropiridin vegyületcsalád tagjainak biomimetikus átalakulását.

Ennek érdekében kiválasztottam kilenc dihidropiridin alapvázal rendelkező vegyületet, amiket a biomimetikus szűrőrendszerben kívánok vizsgálni. A biomimetikus reakciókat négy különböző pH értéken kívánom elvégezni és a reakcióelegyeket HPLC-DAD-MS és HRMS módszerekkel kívánom vizsgálni.

A munkám másik célja, hogy a kilenc vegyület közül hármat áramlásos kémiai rendszerben is vizsgáljak és optimalizáljam a reakcióparamétereket a lehető legnagyobb konverzió eléréséhez.

Emellett a vegyületek biomimetikus metabolitprofilját össze kívánom hasonlítani az emberi szervezetben képződő metabolitokkal. A céloom nem csupán a szervezetben keletkező metabolitok biomimetikus rendszerben történő előállítás, 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 (tBuOOH), az analitikai méréseknél használt hangyasavat 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. A mérések során használt desztillált vizet Millipore (Bedford, Massachusetts, USA) Milli-Q víz tisztító rendszerrel állítottuk elő. Az alkalmazott organoszilán prekursorok közül a 3-aminopropil-trimetoxiszilán és az *N*-[3-(trimetoxiszilil)propil]-dietilén-triamin a Sigma-Aldrich Kft.-től származik, az *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimetoxiszilán a Merck termék

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

4.2. Analitikai módszerek

4.2.1. Kromatográfiás módszer – HPLC-DAD-MS

A kísérleteket Waters 2695 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 μ m) (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:H₂O 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 μ l-re állítottuk be, és a kromatográfiás profilt 220 ($\pm$ 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.

4.3. Kísérletek leírása

4.3.1. 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 oxidálószer tartalmazó és a biomimetikus mintákhoz hozzáadtam 100 µl megfelelő pH-jú vizes puffer oldatot (64 mM). Az így elkészített reakcióelegyekhez ezután 6,8 µl *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:

$$C_{\text{porfirin}}:C_{\text{szubsztrát}}:C_{\text{tBuOOH}} = 1:10:100$$

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 hígítottam.
- pH=4,5
201,3µl jégcet és 236,16 mg vízmentes NaOAc-ot kimértem, majd 100 ml-re hígítottam desztillált vízzel.
- pH=6,5
0,41 g Na₂HPO₄·2H₂O és 0,49g NaH₂PO₄-et mértem ki, majd 100 ml-re állítottam desztillált vízzel.
- pH=7,4:
0,86 g Na₂HPO₄·2H₂O és 0,19g NaH₂PO₄-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.

4.3.2. Heterogén szakaszos optimalizálás

Az áramlásos kémiai kísérletek megelőzően előkísérletet végeztem a szilika és a metalloporfirin közötti linker hosszára vonatkozóan, mivel a kutatócsoport korábbi eredményei arra utaltak, hogy annak is hatása lehet a konverzió értékre⁴⁵. A vizsgált szilikatípusok az alábbiak voltak: 3-aminopropil oldallánccal módosított szilikagél, *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropil oldallánccal módosított szilikagél, és *N*-[3-(trimetoxiszilil)propil]-diétilén-triaminnal módosított szilikagél. Ezeket a szilikagéleket a kutatócsoport már korábban előállította, jelen TDK munkámban csupán felhasználtam őket. A vizsgálatokhoz kimértem 9 mikrocentrifuga csőbe ~2-2 mg szilikát, mindhárom szilikatípusból triplikálva. Ezután bemértem 100 µl 0,735mM FeTPPS-oldatot, 100 µl pH=4,5-ös NaOAc puffert, amit a 4.3.1-es pontban leírt módon készítettem el, majd 73,5 µl 10mM-os hatóanyag törzsoldatot adtam az elegyhez és metanollal 450 µl-re egészítettem ki. Az elegyeket ezután 10 percig rázattam 25°C-on (Eppendorf Thermomixer Comfort, 1100 RPM), majd hozzáadtam 50 µl *t*BuOOH törzsoldatot (14,7mM) és további 1 órán keresztül rázattam a reakcióelegyeket. Az így kapott reakcióelegyeket ezután hígítás nélkül vizsgáltuk a **4.1.1. pontban** leírt HPLC-DAD-MS módszerrel.

Tekintettel arra, hogy a vizsgálati eredmények alapján a linkerhossz nem volt hatással a konverzióra egyik vegyület esetében sem, így mindhárom vegyületet a 3-aminopropil oldallánccal módosított szilikagélből készült oszlopon vizsgáltam.

4.3.3. Metalloporfirin rögzítése szilikára

Az áramlásos kémiai reakciók megvalósításához először el kellett készítenem a megfelelő porfirintartalommal rendelkező hordozós rendszert. Ehhez kimértem 2-ször 350 mg 3-aminopropil oldallánccal módosított szilikát és mindkettőhöz hozzáadtam a megfelelő mennyiségű porfirin oldatot (0,735mM, MeOH:acetát puffer 4:1 arányú elegye, pH=4,5) úgy, hogy az egyik esetben a porfirin koncentrációja 5mg/g szilika legyen, a másikban pedig 15mg/g. Ezután 10 percig ráztam kézzel az elegyeket, hogy a 3-aminopropil és az FeTPPS szulfonsav csoportjai közt kialakulhasson az ionos kötés és rögzüljön a porfirin a módosított szilikagél amin-csoportjaira. Ezután 2-ször 10 percig centrifugáltam őket 5000 RPM-en (Sigma 3-15 Universal Table Top Centrifuge, Sigma kft., Budapest). A felülúszó fázisból mintát vettem a rögzítés hatásfokának vizsgálata céljából, majd lecentrifugált és dekantált szilikát 6 napig szárítottam levegőn, majd betöltöttem az oszlopokba. A 4 mm átmérőjű oszlopokat 15 mm

magasságig töltöttem, amit 5mg/g-os oszlopnál 140mg a 15mg/g-os oszlopnál 150mg porfirinrögzített szilikagél bemérésével értem el, majd lezártam őket.

A rögzítés mértéke 100%-os volt, mivel a felülúszó fázisban egyik mintánál sem tapasztaltam az FeTPPS-re jellemző elnyelési csúcsot 460 nm hullámhossznál.

4.3.4. Folyamatos áramú kémiai reakciók általános leírása

A reakciókhoz készítettem 8-8 törzsoldatot a 2 féle szubsztrátkoncentrációhoz (1,5mM és 3mM) mindhárom vegyületből, a törzsoldatok oldószere MeOH:NaOAc-puffer 4:1 arányú elegye. A törzsoldatokhoz a mérés előtt hozzáadtam a szubsztrát mennyiségéhez képest 1 vagy 5 ekvivalensnyi *t*BuOOH-t, amit a 70 m/m%-os oldatból adtam hozzá. Ezután felszívtam fecskendőbe a törzsoldatokból 5 ml-t majd fecskendőpumpa segítségével a megfelelő áramlási sebességgel áramoltattuk a reakcióelegyet az oszlopon és az utolsó 1ml-ből mintát vettem.

Az így kapott reakcióelegyeket hígítás nélkül vizsgáltuk a **4.2.1. pontban** leírt HPLC-DAD-MS módszerrel.

5. Eredmények

Ahogy azt a **2.6. 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 tulajdonságot a saját korábbi munkám során is tapasztaltam, ahol 100 gyógyszerhatóanyagot vizsgáltam a korábban bemutatott biomimetikus rendszerrel. Itt jó egyezést tapasztaltam az in vivo metabolizmus eredményeivel, valamint új biomimetikus oxidatív termékeket is előállítottam.

Fentiek ismeretében kezdtem bele a 9 dihidropiridin szerkezeti egységet tartalmazó vegyületet a biomimetikus rendszerben történő oxidációs vizsgálatába, illetve térképeztem fel és hasonlítottam össze a metabolikus és biomimetikus termékprofiljaikat.

5.1. Biomimetikus és a humán metabolit termékprofilok összehasonlítása dihidropiridin egységet tartalmazó vegyületek esetén

A munkám során vizsgált 9 dihidropiridin alapvázal rendelkező vegyület biomimetikus oxidációjából nyert adatokat fogom bemutatni, ahol a korábbi in vivo vizsgálatok alapján azonosított humán metabolitokat is bemutatom (zöld körrel jelölve az ábrákon- ) , illetve a biomimetikus termékeket is feltüntetem. Az ábrákon a négy különböző pH értéken végzett vizsgálatokat négy különböző színnel jelölöm (pH = 2,7 – piros ; pH = 4,5 – sárga ; pH = 6,5 – lila ; pH = 7,4 – kék ).

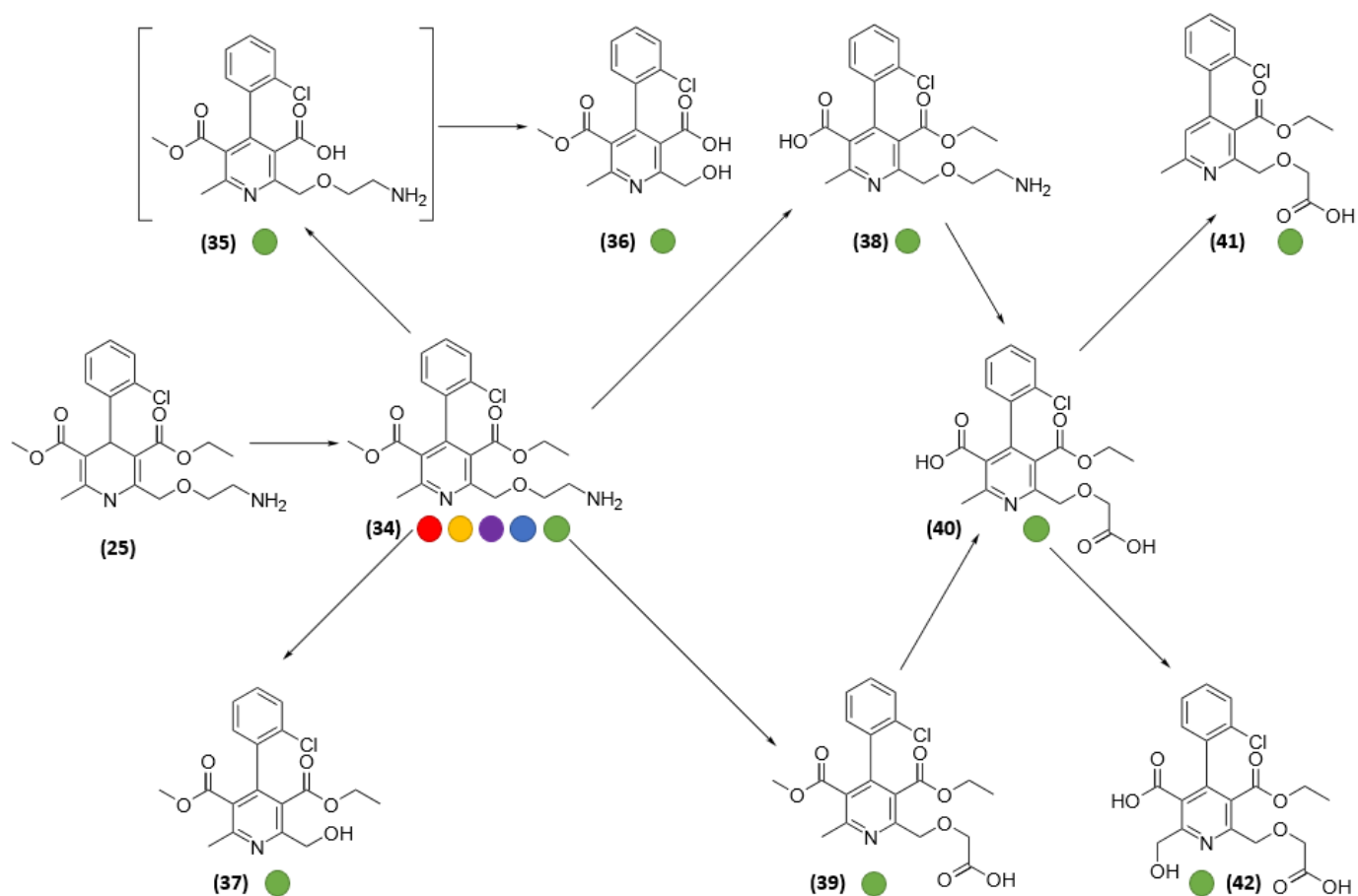
Amennyiben a reakcióelegyekhez nem adtam metalloporfirin katalizátort jellemzően nem történt átalakulás, azaz a következőkben bemutatott termékek nagyrészt biomimetikus úton keletkeztek. Ahol keletkezett nem biomimetikus termék ott azt külön jelzem. A reakcióelegyeket a **4.2.1. alfejezetben** leírt HPLC-DAD-MS technikával jellemeztem.

Az alábbiakban megadott biomimetikus termékek szerkezetét az MS spektrumaik alapján számított tömegváltozás alapján adatom, vagyis ezek valószínűsített szerkezeteknek tekinthetők. Kivételt képez az amlodipin (**25**), a benidipin (**29**) és a nifedipin (**30**), mivel ezen vegyületek esetében rendelkezésre álltak az in vivo metabolit standardok, melyeket korábbi munkám során már HR-MS mérések és retenciós idők összevetése alapján azonosítani tudtam.

A mért tömeg és a monoizotópikus tömeg relatív eltérését ppm-ben adtam meg és azokat a szerkezeteket fogadtam el, ahol ez az eltérés 10 ppm érték alatt volt

5.1.1. Amlodipin

Az amlodipin (25) egy Ca^{2+} -ion csatorna blokkoló vegyület, amit magas vérnyomás és iszkémiás szívbetegség kezelésére alkalmaznak. Az emberi szervezetben számos metabolitja keletkezik, köztük a 34 piridinszármazék a humán major metabolit, amelyet a biomimetikus rendszerben is előállítottunk mind a 4 pH értéken.^{46,47}



9. ábra Amlodipin (25) humán metabolitjai és biomimetikus terméke

3. táblázat Amlodipin pH függő biomimetikus termékprofilja

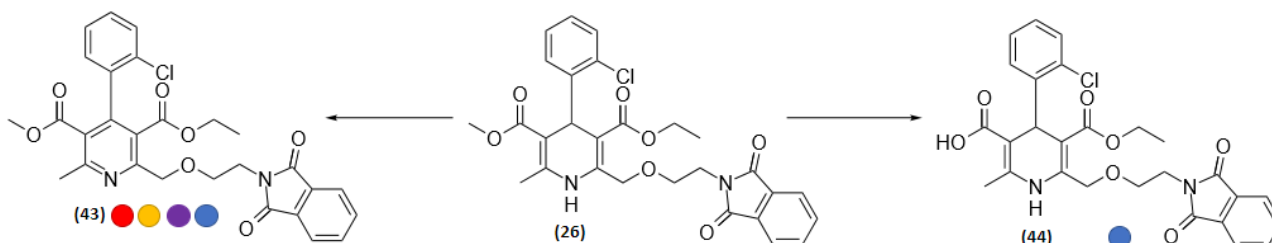
	r_t	m/z	Δm	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 6,5	pH 7,4
34	5,80	407	-2	dehidrogénezés	100	100	39,7	12,8
25	6,25	409	0	anyavegyület	72,8	45,3	60,3	87,2

Mind a négy vizsgált pH értéken a fő- és egyedüli termék a 34-es humán metabolit. 2,7-es és 4,5-ös pH értéken az anyavegyület nem detektálható a reakcióelegyben, így a konverzió 100%-os. Az enyhén savas és enyhén lúgos kémhatáson az amlodipin átalakulása alacsonyabb

mértékű volt, ami jelezheti a μ -oxo-dimer képződését. A **34**-es humán metabolitot korábban már izoláltuk és NMR mérésel igazoltuk a szerkezetét.

5.1.2. Ftaloil-amlodipin

A ftaloil-amlodipin (**26**) az amlodipin szintézis egyik izolálható köztterméke.⁴⁸ Irodalmi in vivo metabolizmusa nem ismert.



10. ábra Ftaloil-amlodipin (**26**) és a biomimetikus termékei

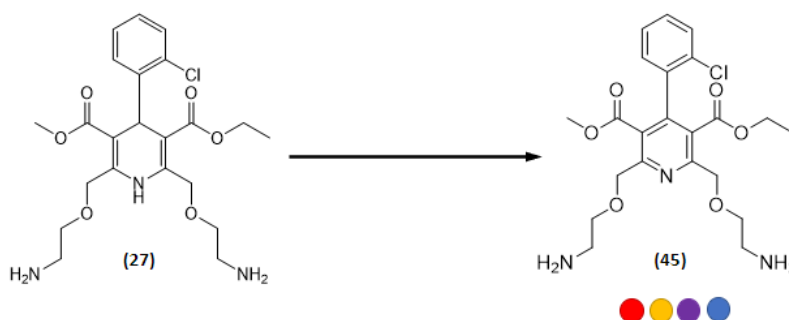
4. táblázat Ftaloil-amlodipin (**26**) pH függő biomimetikus termékprofilja

	r_t	m/z	Δm	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 6,5	pH 7,4
44	9,75	525	-14	hidrolízis	0	0	0	9,7
43	10,82	537	-2	dehidrogénezés	100	100	53,9	29,5
26	11,85	539	0	anyavegyület	0	0	46,1	60,8

Biomimetikus rendszerben mind a négy pH értéken keletkezett a **43** dehidrogénezett piridin származék. Ebben az esetben is megfigyelhető az amlodipin (**25**) esetében bemutatott konverzió csökkenés a pH értékének növelésével. 2,7-es és 4,5-ös pH értéken ebben az esetben is totál konverziót értem el. 7,4-es pH értéken viszont egy új, nem biomimetikus, a porfirint nem tartalmazó elegyben megjelenő termék is keletkezett. Ez a termék az *O*-demetilált-ftaloil-amlodipin (**44**), amely lúgos hidrolízis eredményeképpen keletkezett a rendszerben.

5.1.3. Bisz-aminoetoxi-amlodipin

A bisz-aminoetoxi-amlodipin (**27**) az amlodipin gyártása során képződő egyik melléktermék, amit a feldolgozás során eltávolítanak. Biológiai átalakulása nem ismert.



11. ábra Bisz-aminoetoxi-amlodipin (**27**) és a biomimetikus terméke

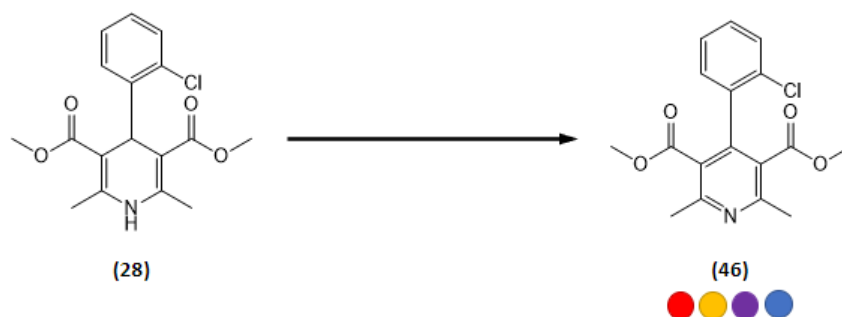
5. táblázat Bisz-aminoetoxi-amlodipin (27) pH függő biomimetikus termékprofilja

	r_t	m/z	Δm	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 6,5	pH 7,4
45	4,07	466	-2	dehidrogénezés	100	100	29,9	8,9
27	4,72	468	0	anyavegyület	0	0	70,1	91,1

27 esetében egy termék keletkezett mind a négy pH értéken, a 45 dehidro-bisz-aminoetoxi-amlodipin. 45 a korábbiaknak megfelelően képződött, azaz képződése kedvezőbb és az anyavegyület teljes mennyisége átalakult alacsonyabb pH értékeken.

5.1.4. Dimetil-amlodipin-dimetil-észter

A dimetil-amlodipin-dimetil-észter (28) az amlodipin (25) gyártásása során keletkező melléktermék, irodalmi in vivo metabolizmusa szintén nem ismert.



12. ábra Dimetil-amlodipin-dimetil-észter (28) és biomimetikus terméke

6. táblázat Dimetil-amlodipin-dimetil-észter (28) pH függő biomimetikus termékprofilja

	r_t	m/z	Δm	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 6,5	pH 7,4
46	9,62	334	-2	dehidrogénezés	100	100	70,5	48,4
28	9,80	336	0	anyavegyület	0	0	29,5	51,6

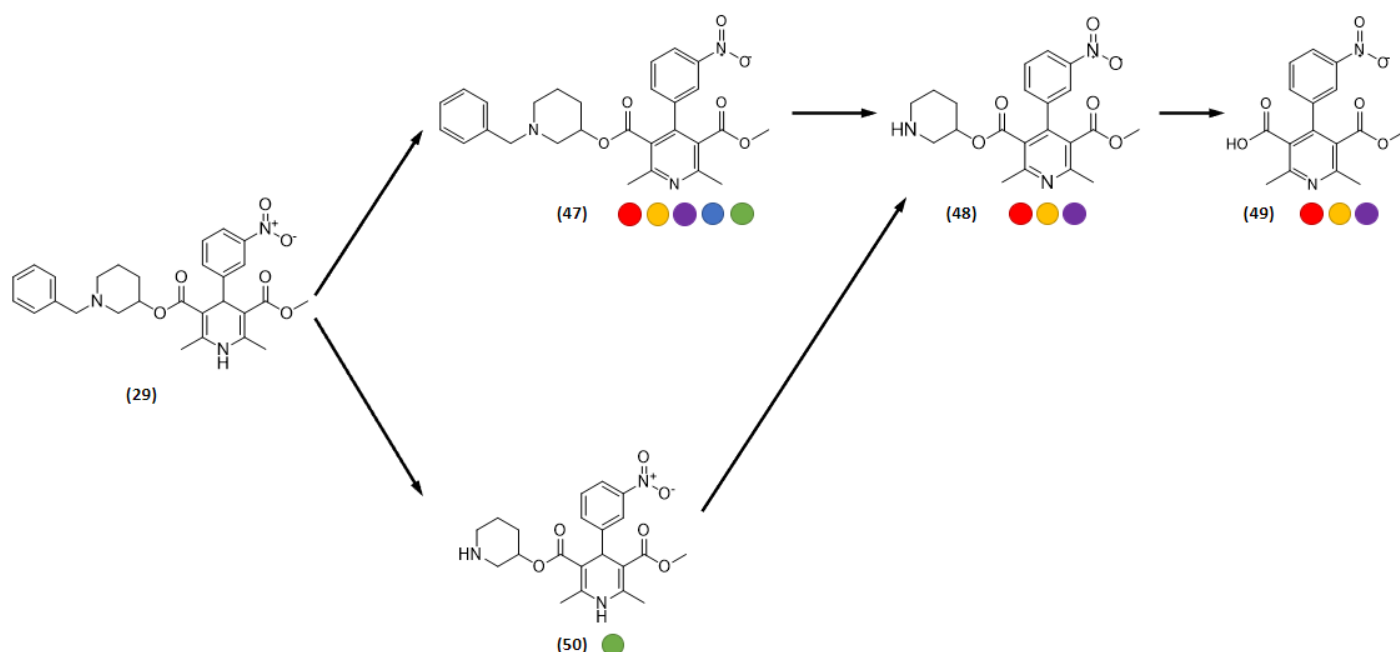
28 hasonló reaktivitást mutatott a többi amlodipin származékhoz. Savasabb kémhatáson teljes átalakulást, míg enyhén savas vagy lúgos pH értéken csökkent reaktivitást mutatott.

Érdekes azonban megvizsgálni az amlodipinek esetében a dehidrogénezett származékok relatív termék mennyiségét. A dihidropiridin gyűrűben lévő nitrogén melletti csoportok térbeli nagysága és lipofilitása nagyban befolyásolta a reakciót enyhén savas, illetve lúgos kémhatás mellett. A leghidrofilebb származék (27) esetében csupán 10%-os, míg a leglipofilebb származék (28) 7,4-es pH értéken is közel 50%-ban átalakult.

5.1.5. Benidipin

A benidipint (29) szintén vérnyomáscsökkentő gyógyszerek hatóanyagaként alkalmazzák, a Ca^{2+} -csatorna blokkoló hatása miatt. A szervezetben két metabolitja keletkezik

a dehidro-benidipin (**47**) és az *N*-debenzilezett származéka a benidipinnek (**50**). Előbbi az egyik főterméke a biomimetikus oxidációnak, amíg a másik csak a szervezetben keletkezik azonosítható mennyiségben.^{36,49} Biomimetikus rendszerben a belőle konszekutív módon keletkező *N*-debenzil-dehidro-benidipin (**48**) sikerült azonosítanunk.



13. ábra Benidipin (**29**) humán metabolitjai és biomimetikus termékei

7. táblázat Benidipin (**29**) pH függő biomimetikus termékprofilja

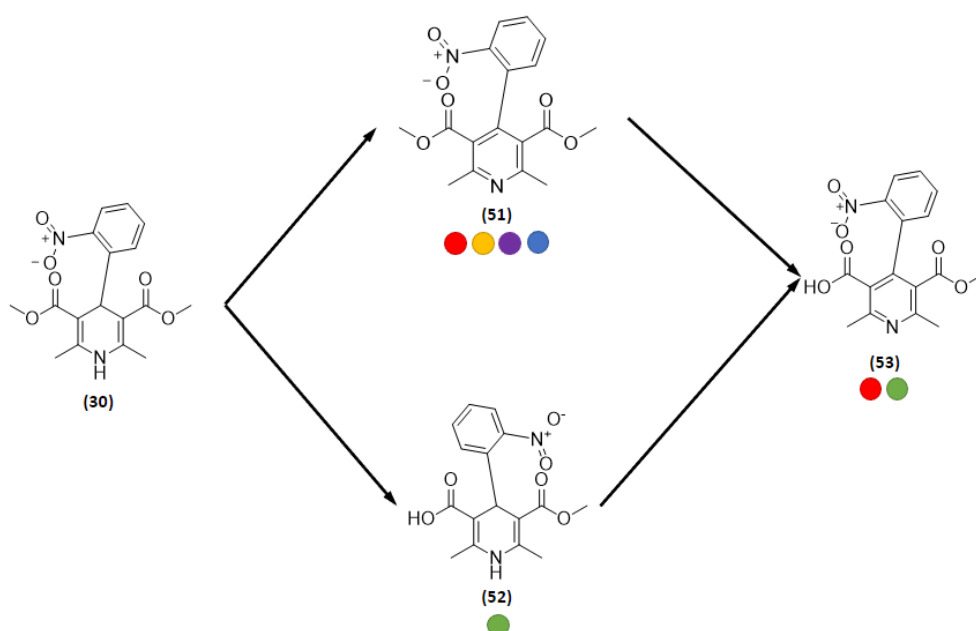
	rt	m/z	Δm	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 6,5	pH 7,4
48	5,40	414	-92	dehidrogénezés, <i>N</i> -dealkiláció	7,5	6,3	2,2	0
47	6,42	504	-2	dehidrogénezés	70,6	78,2	53,2	32,2
29	6,52	506	0	anyavegyület	0	0	41,1	67,8
49	7,20	331	-175	dehidrogénezés, <i>O</i> -dealkiláció	7,8	8,1	1,7	0

A benidipin (**29**) esetében a biomimetikus rendszerben a dehidrogénezési reakció mellett *N*- és *O*-dealkiláció is történt. Utóbbi két reakció csak savas kémhatáson játszódik le, 7,4-es pH értéken termékként csupán a dehidro-származék detektálható a reakció elegyben, mely mind a négy pH értéken a major biomimetikus metabolit. Ebből arra következtethetünk, hogy a dihidropiridin gyűrű nitrogénje protonálva van és ez nagyban befolyásolja a biomimetikus reakciót. A vegyületről korábban készült HR-MS mérés, az eltérés a mért és a

számolt tömegérték között a **47**-es humán metabolit esetén 6,3 ppm volt, a **48**-as biomimetikus termék esetében 6,5 ppm és a **49**-es biomimetikus termék esetén 0,6 ppm volt.

5.1.6. Nifedipin

A nifedipin (**30**) szintén a Ca^{2+} -csatorna blokkolók családjába tartozik. Magas vérnyomás, koszorúérelmeszesedés, ujjbéli érelzáródások és koraszülés kezelésére, valamint terhesség során is alkalmazható vérnyomáscsökkentésre. A szervezetben két metabolitja keletkezik, az *O*-demetil-nifedipin (**52**) és az *O*-demetil-dehidro-nifedipin (**53**). Az utóbbit a biomimetikus rendszerben is előállítottam.⁵⁰



14. ábra Nifedipin (**30**) humán metabolitjai és biomimetikus termékei

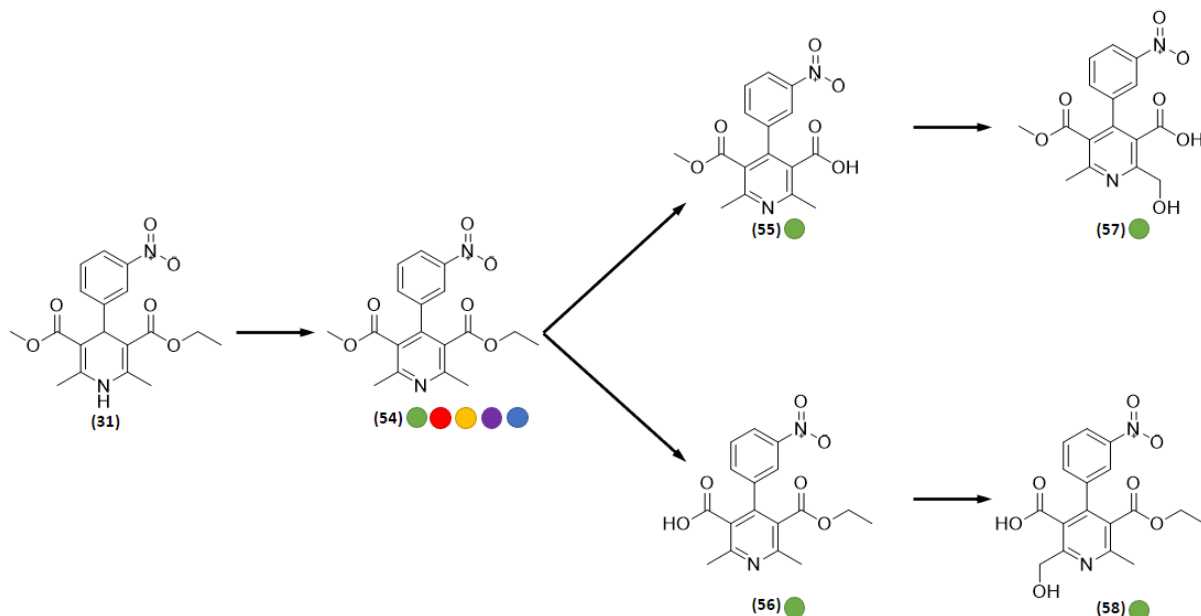
8. táblázat Nifedipin (**30**) pH függő biomimetikus termékprofilja

	rt	m/z	Δm	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 6,5	pH 7,4
51	8,87	345	-2	dehidrogénezés	96,7	100	62,9	44,0
30	9,02	347	0	anyavegyület	0	0	37,1	56,0
53	10,20	331	-16	dehidrogénezés <i>O</i> -dealkiláció	3,3	0	0	0

A nifedipin (**30**) esetében két biomimetikus terméket tudtam azonosítani. Erősen savas körülmények között a dehidrogénezett származék továbbalakult és egy hidrolitikus termék keletkezett. Ezen kívül a már korábban ismertetetett reaktivitást mutatta. A vegyületről korábban készült HR-MS mérés, az eltérés a mért és a számolt tömegérték között a **51**-es biomimetikus termék esetén 1,2 ppm volt

5.1.7. Nitrendipin

A Nitrendipin (**31**) szintén a Ca^{2+} -csatorna blokkolók családjába tartozik, fő alkalmazási területe az időskori magas vérnyomás kezelése. A szervezetben számos metabolitja keletkezik, köztük a dehidro származék (**52**) amelyet mind a 4 pH értéken előállítottunk.⁵¹



15. ábra Nitrendipin (**31**) humán metabolitjai és biomimetikus terméke

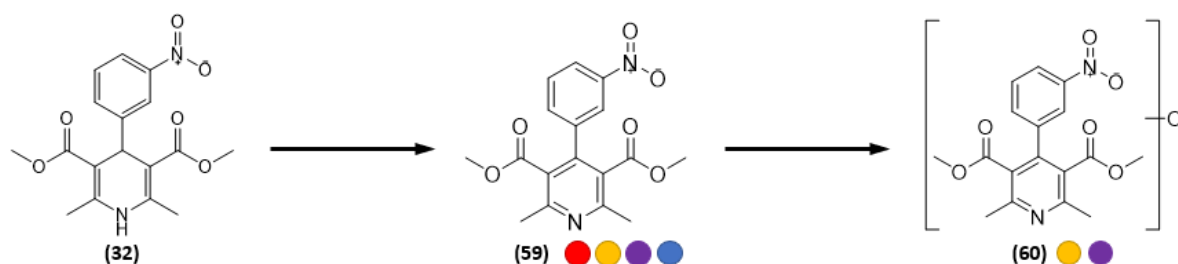
9. táblázat Nitrendipin (**31**) pH függő biomimetikus termékprofilja

	rt	m/z	Δm	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 6,5	pH 7,4
54	9,99	334	-2	dehidrogénezés	100	100	100	100
31	10,04	336	0	anyavegyület	0	0	0	0

31 esetében csupán a dehidro-származék keletkezett. A hatóanyag mind a négy pH értéken teljes átalakulást mutatott. A nifedipinhez (**30**) képest a nitro csoport átkerült *meta* helyzetbe. Ez nagy mértékben befolyásolta a vegyület reaktivitását.

5.1.8. Dimetil-nitrendipin

A dimetil-nitrendipin (**32**) a nitrendipin (**31**) gyártásása során keletkező melléktermék⁵⁰. Irodalmi in vivo metabolizmus nem ismert.



16. ábra Dimetil-nitrendipin (32) és biomimetikus termékei

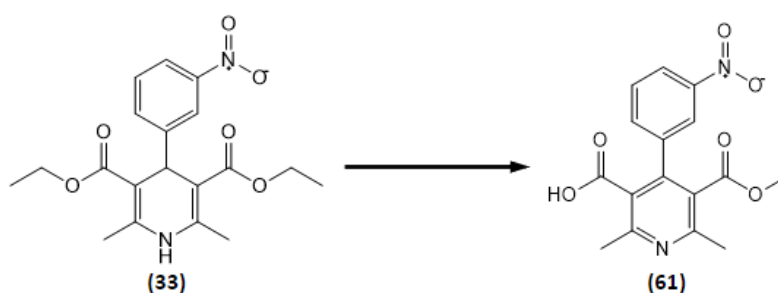
10. táblázat Dimetil-nitrendipin (32) pH függő biomimetikus termékprofilja

	rt	m/z	Δm	Reakció típusa	pH 2,7	pH 4,5	pH 6,5	pH 7,4
59	9,49	345	-2	dehidrogénezés	100	92,7	93,1	71,4
32	9,57	347	0	anyavegyület	0	0	0	28,6
60	10,55	361	+16	dehidrogénezés, hidroxiláció	0	7,3	6,9	0

A nitrendipinhez (31) képest egy etil-csoport helyett egy metil-csoporttal van észterezve a dihidropiridin gyűrű 3-as szénatomján található karboxil csoport. Ez az apró változtatás nagy mértékben befolyásolta a vegyület reaktivitását. 2,7-es pH értéken egyedül az 59-es dehidrogénezett származék keletkezett. Az anyavegyület nem detektálható a reakcióelegyben, így a konverzió 100%-os. 4,5-ös és 6,5-ös pH értéken a főtermék 59 mellett ~7 relatív termékszázalékban egy új termék valószínűleg dehidro-dimetil-nitrendipin-*N*-oxid (60) is keletkezett. Ezen két pH értéken szintén 100%-os volt a konverzió. 7,4-es pH értéken a konverzió lecsökken és ismét csak a dehidro-származék keletkezik biomimetikus termékként.

5.1.9. Dietil-Nitrendipin

A dietil-nitrendipin (33) a nitrendipin gyártásása során keletkező melléktermék⁵⁰, in vivo metabolizmusa szintén nem ismert.



17. ábra Dietil-nitrendipin (33) és biomimetikus terméke

A dietil-nitrendipin (**33**) analitikai vizsgálata során nem tudtam alapvonalí elválasztást elérni, így csupán annyi információt tudtam nyerni, hogy egy termék keletkezik, **33** dehidro származéka (**61**), így nem tudtam konverziót számolni az eredményekből. HPLC-módszer fejlesztését jövőbeni feladatnak tekintem, amely nem képezi ezen dolgozat részét.

5.2. Folyamatos áramú kémiai reakció optimalizálása

A szakaszos biomimetikus reakciók elvégzését követően kiválasztottam három vegyületet, az amlodipint (**25**), a benidipint (**29**), és a dimetil-nitrendipint (**32**), amelyeknek az áramlásos kémiai reakcióját optimalizálni kívántam. A vegyületeket úgy választottam ki, hogy legyen egy vegyület, amelynek csak egy biomimetikus terméke képződik, ez az amlodipin (**25**), és legyen két vegyület, amelynek több biomimetikus terméke is keletkezik, így vizsgálható, hogy a paraméterek befolyásolása kihatással van-e a termékösszetételre, ezen vegyületek a benidipin (**29**) és a dimetil-nitrendipin (**32**). Az optimalizációt 5 faktor mentén végeztem: a reakcióközeg hőmérséklete, a szubsztrát koncentrációja, az oxidálószer mennyisége a szubsztrát koncentrációjához képest, a rögzített metalloporfirin mennyisége az oszlopon, és az alkalmazott térfogatáram. A faktorok szintjeit és középértékeit a **11. táblázatban** foglaltam össze. A kísérletek beállításait a Függelék **F1. táblázatában** tüntetem fel.

11. táblázat Vizsgált faktorok középértékei és alsó-felső szintjei és variációs intervallumai

Faktorok	Hőmérséklet (°C)	Szubsztrát koncentráció (mM)	Oxidálószer koncentráció (szubsztrát ekvivalens)	Porfirin koncentráció (mg porfirin/ g szilika)	Térfogatáram (ml/perc)
Középérték	25	2,25	3	10	0,25
Variációs intervallum	15	0,75	2	5	0,10
Felső szint	40	3	5	15	0,35
Alsó szint	10	1,5	1	5	0,15

A faktorok optimalizációját egy $2^{(5-1)}$ -es kísérlettervvel végeztem, így az egyszeres hatások csak négyszeres hatásokkal keverednek, amik ezáltal jól kiértékelhetők, illetve később *foldover*-tervet alkalmazva kiértékelhetővé válnak a másodrendű hatások is, szemben egy $2^{(5-2)}$ -os kísérlettervvel, ahol a *foldover* terv után is 16 változót kellene illeszteni 16 adatra.

5.2.1. Amlodipin áramlásos kémiai reakciójának optimalizációja

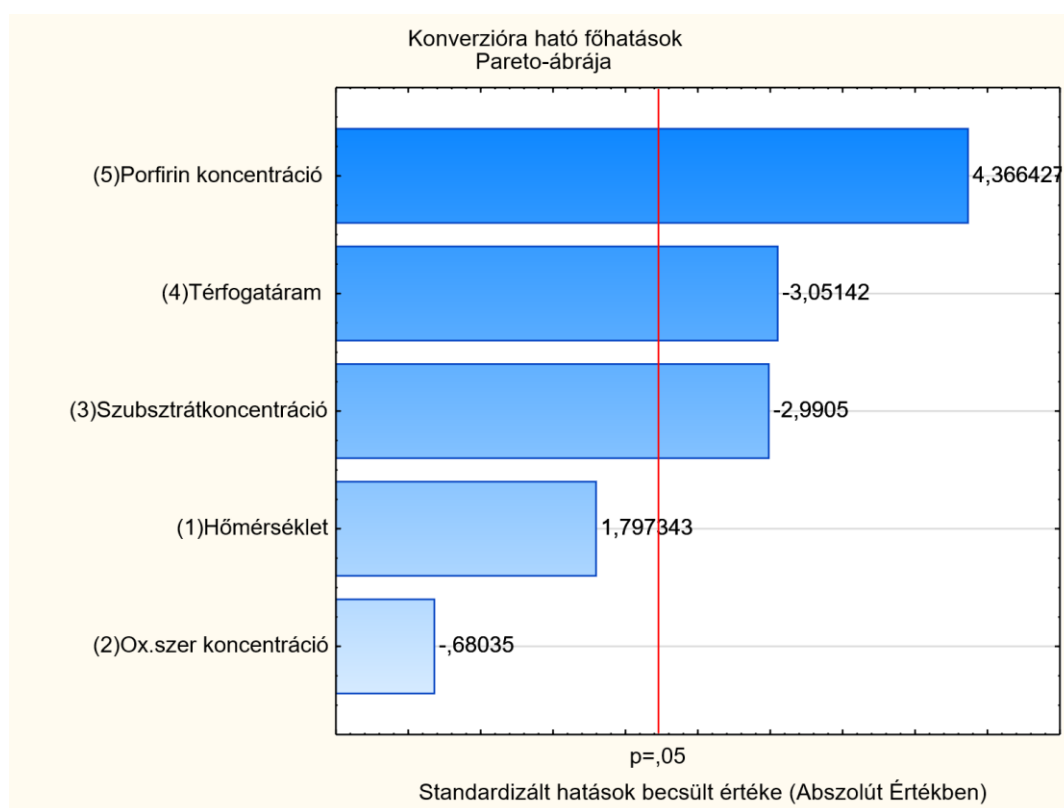
Elsőként az amlodipin (**25**) áramlásos kémiai reakcióját mutatom be. A reakció egyetlen terméke a dehidro-amlodipin (**34**), más vegyület nem keletkezik a rendszerben. Az amlodipin átlagos konverziója 46,1%-volt, a legmagasabb konverzióértéket az **1.** és a **13.** mérési beállításoknál értem el (ld. **F1. táblázat**), ami mindkét esetben 84,1% volt. A legalacsonyabb konverzió értéket, 19,1 %-ot pedig **8.** mérési beállításnál mértem.

A főhatások elemzése a **12. táblázat** alapján állt össze, mely során 6 változót illesztettem 16 adatpontra, így a szabadsági foka a rendszernek 10.

12. táblázat Főhatások statisztikai vizsgálata amlodipin (25) esetében (t=10, α=0,05)

Faktorok	Hatás	Standard hiba (SE)	t(10)-re vizsgált próbastatisztika	p-érték
Átlag/tengelymetszet.	46,08	2,462	18,715	0,0000
(1) Hőmérséklet	8,85	4,924	1,797	0,1025
(2) Oxidálószer koncentráció	-3,35	4,924	-0,680	0,5117
(3) Szubsztrátkoncentráció	-14,73	4,924	-2,991	0,0136
(4) Térfogatáram	-15,03	4,924	-3,051	0,0122
(5) Porfirin koncentráció	21,50	4,924	4,366	0,0014

A statisztikai elemzés alapján a hőmérsékletnek és az alkalmazott oxidálószer mennyiségének nincs statisztikailag bizonyítható hatása. A szubsztrát- és porfirinkoncentrációnak, valamint a térfogatáramnak pedig statisztikailag szignifikáns hatása van. Ezt támasztja alá az ebből készített Pareto-ábra is (18. ábra).

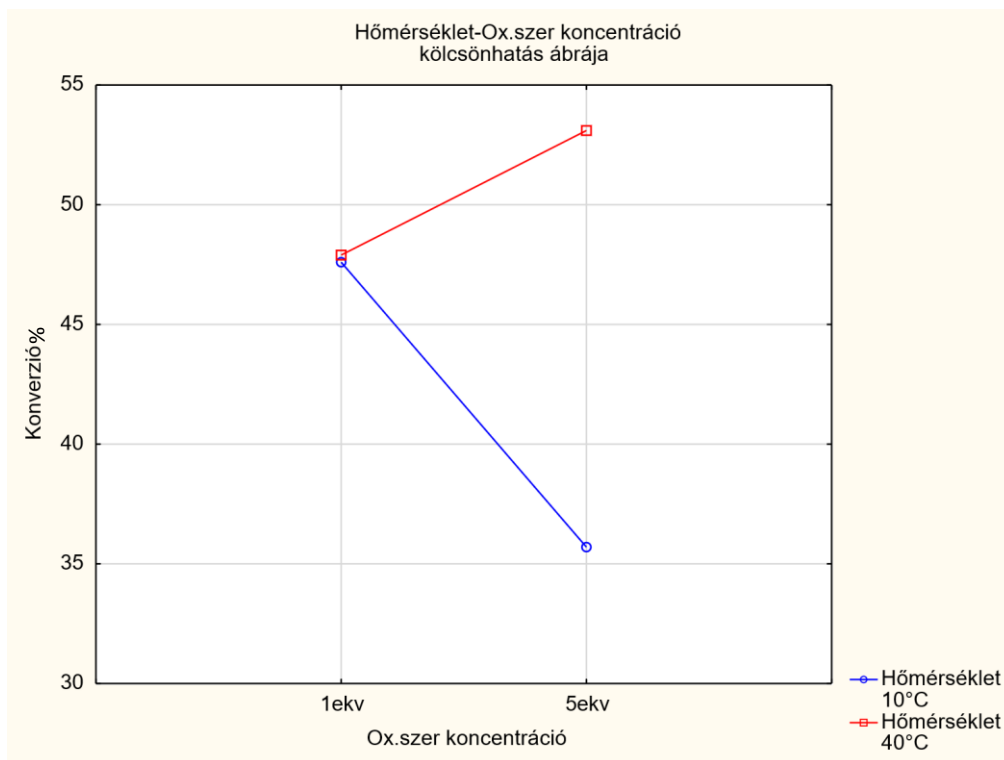
**18. ábra** Amlodipine (25) főhatásainak Pareto-ábrája

Ezek alapján a felírható konverziót becsülő egyenlet, az alább megadott módon:

$$Y = 46,08 - 7,36x_3 - 7,51x_4 + 10,75x_5 \quad \text{2. egyenlet}$$

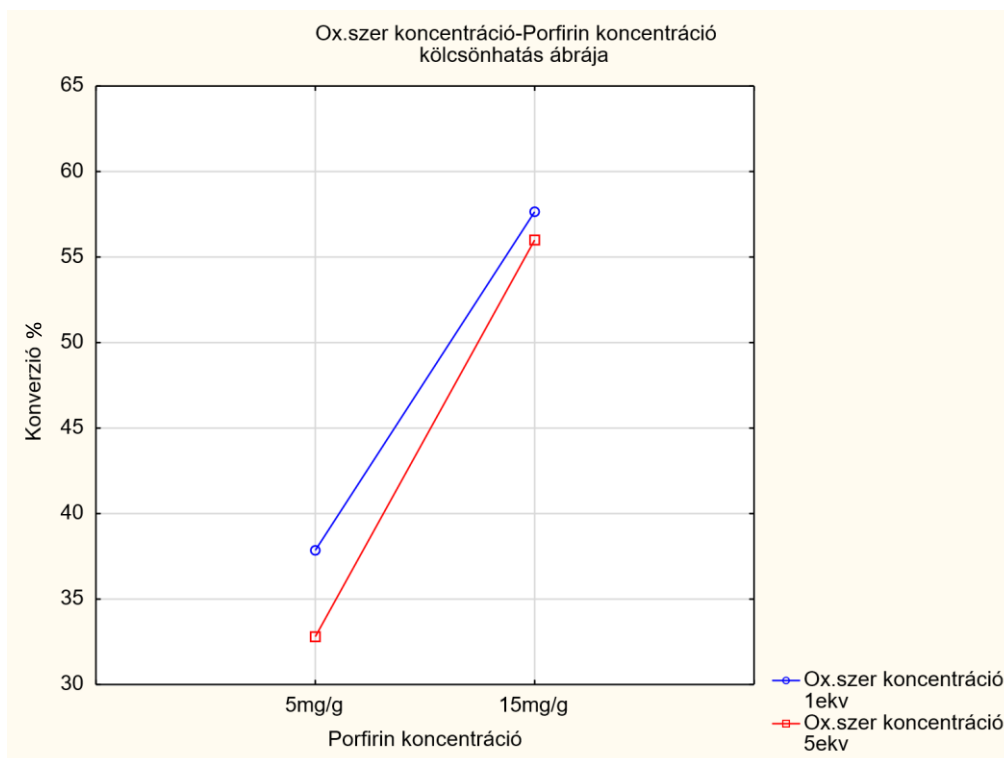
Sajnos ezen egyenlet pontossága alacsony, ami arra utal, hogy a főhatások kölcsönhatnak egymással, így ezt ezzel a kísérlettervvel nem (?) lehetséges kiértékelni, mert 16

változót illesztenék 16 adatpontra, így nem végezhető statisztikai próba rajtuk. Viszont a meglevő adatokból lehet következtetni azon főhatás párokra, amelyeket érdemes vizsgálni a *foldover-terv* során.



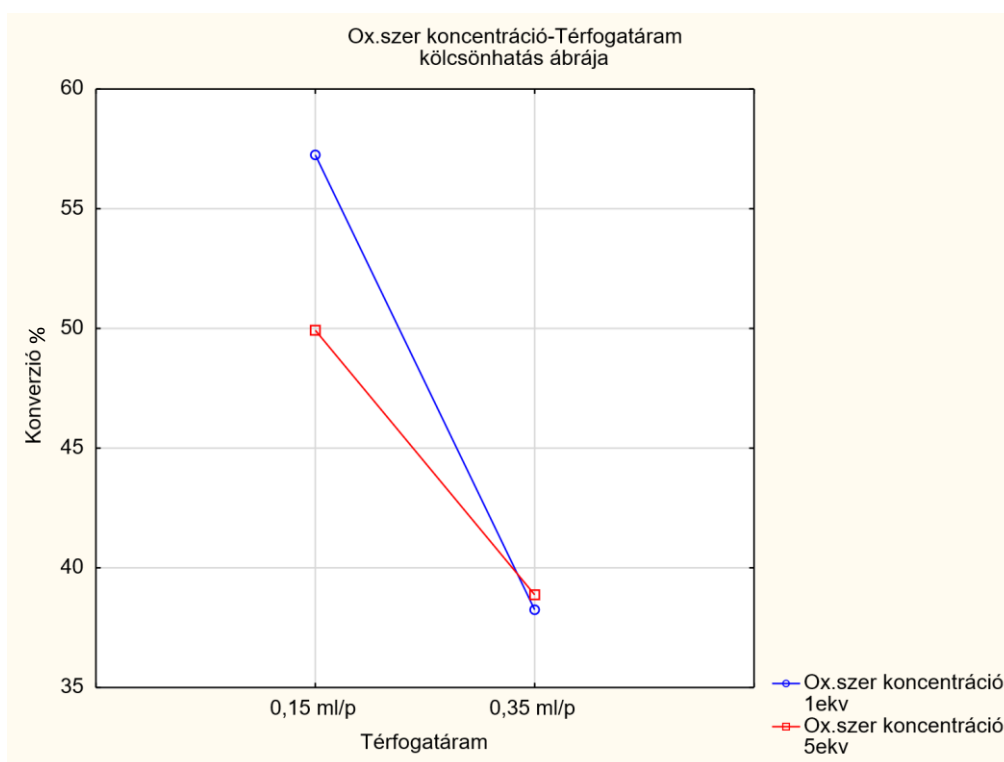
19. ábra Hőmérséklet–oxidálószer kölcsönhatás

A hőmérséklet és az oxidálószer koncentrációja között kölcsönhatást várunk (**19. ábra**), mivel az alacsonyabb hőmérsékleten az oxidálószer mennyiségének növelése a konverzió csökkenését okozta, ezzel szemben a magasabb hőmérsékleti beállításon az oxidálószer mennyiségének növelése a konverzió növekedését eredményezi.



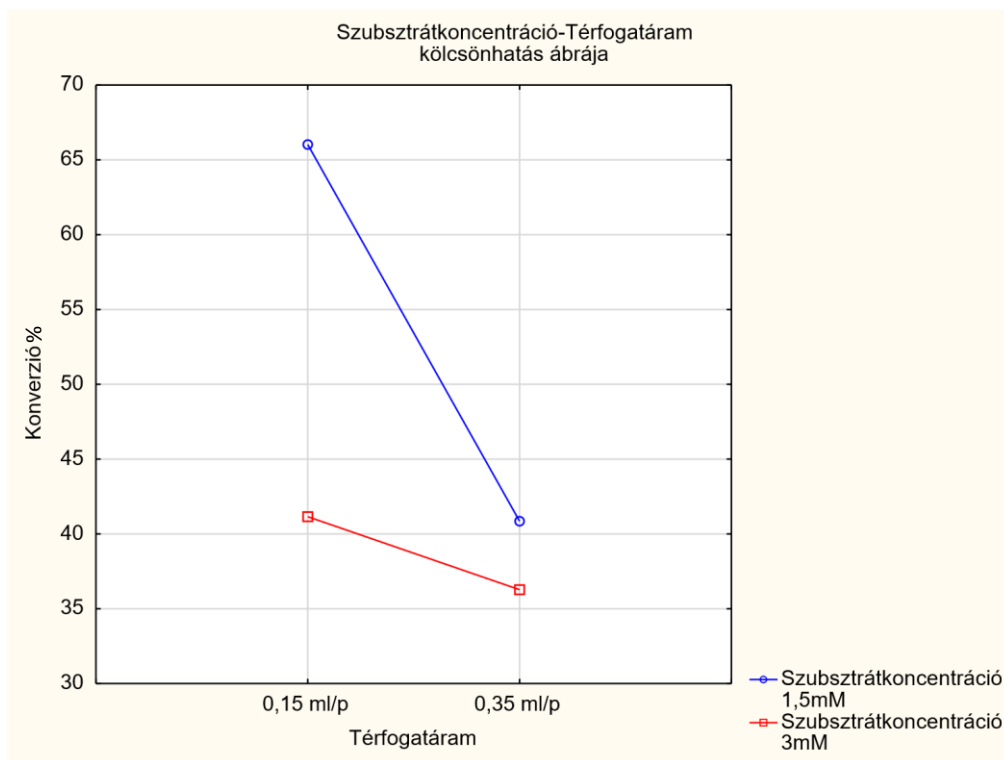
20. ábra Oxidálószer–porfirin koncentráció kölcsönhatás

Az oxidálószer és a porfirin koncentrációja között egy kismértékű kölcsönhatást várunk, a **20. ábra** alapján a magasabb porfirin koncentráció alkalmazása mellett a magasabb oxidálószer mennyisége nagyobb koncentrációnövekedést eredményez.



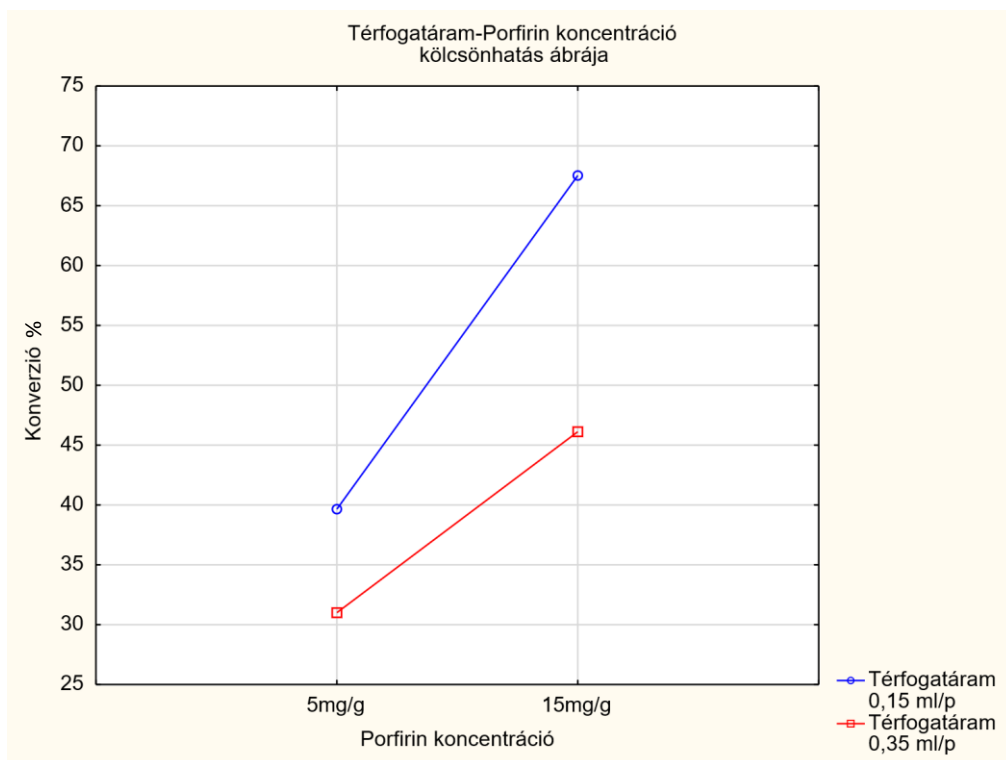
21. ábra Oxidálószer–térfogatáram kölcsönhatás

Az oxidálószer és a térfogatáram között kölcsönhatást várunk (21. ábra). A térfogatáram növelése során a magasabb oxidálószer koncentráció alkalmazása esetén kisebb mértékben csökken a konverzió, mint az alacsonyabb oxidálószer mennyisége esetén.



22. ábra Szubsztrátkoncentráció—térfogatáram kölcsönhatás

A szubsztrátkoncentráció és térfogatáram között kölcsönhatást várunk (22. ábra), mivel a magasabb szubsztrátkoncentráció esetén lényegesen kisebb mértékben csökkent a konverzió a térfogatáram növelésekor, mint az alacsonyabb szubsztrátkoncentráció esetében.



23. ábra Térfogatóram–porfirin koncentráció kölcsönhatás

A térfogatáram és a porfirin koncentráció között kölcsönhatást várunk (**23. ábra**), mivel az alacsony térfogatáram esetén a porfirin koncentráció növelése lényegesen nagyobb mértékű konverzió növekedést eredményez, mint a magas térfogatáram esetén.

5.2.2. Benidipin folyamatos áramú kémiai reakciójának vizsgálata

Második lépésben a benidipin (**29**) vizsgálata kapcsán kapott eredményeket mutatnám be. Sajnos az áramlásos kémiai kísérletek során mérési hibák miatt több mérési pontban is 0%-os volt a konverzió, így nem tudtam kiértékelni a kísérlettervet és a kísérletek újonnan elvégzésére idő szűkében nem volt lehetőségem. A meglévő adatok alapján az egyetlen biomimetikus termék a dehidro-benidipin (**47**), melynek az átlagos konverzió értéke 18,9% volt, a legmagasabb konverzióértéket, 56,1 %-ot a **13.** mérési beállításnál mértem,. A legalacsonyabbat pedig **14.** mérési beállításnál mértem, 3,2%-os volt a konverzió.

5.2.3. Dimetil-nitrendipin folyamatos áramú kémiai reakciójának vizsgálata

Utolsóként a dimetil-nitrendipin (**32**) áramlásos kémiai reakcióját mutatnám be. A reakciók során két terméket találtam, kisebb mennyiségben keletkezett a dehidro-dimetil-nitrendipin (**59**), míg a főtermék a szakaszos reakciókkal ellentétben, a hidroxi-dehidro-dimetil-nitrendipin (**60**) volt. A **32** átlagos konverziója 15,1% volt, a legmagasabb konverziót, 45 %-ot

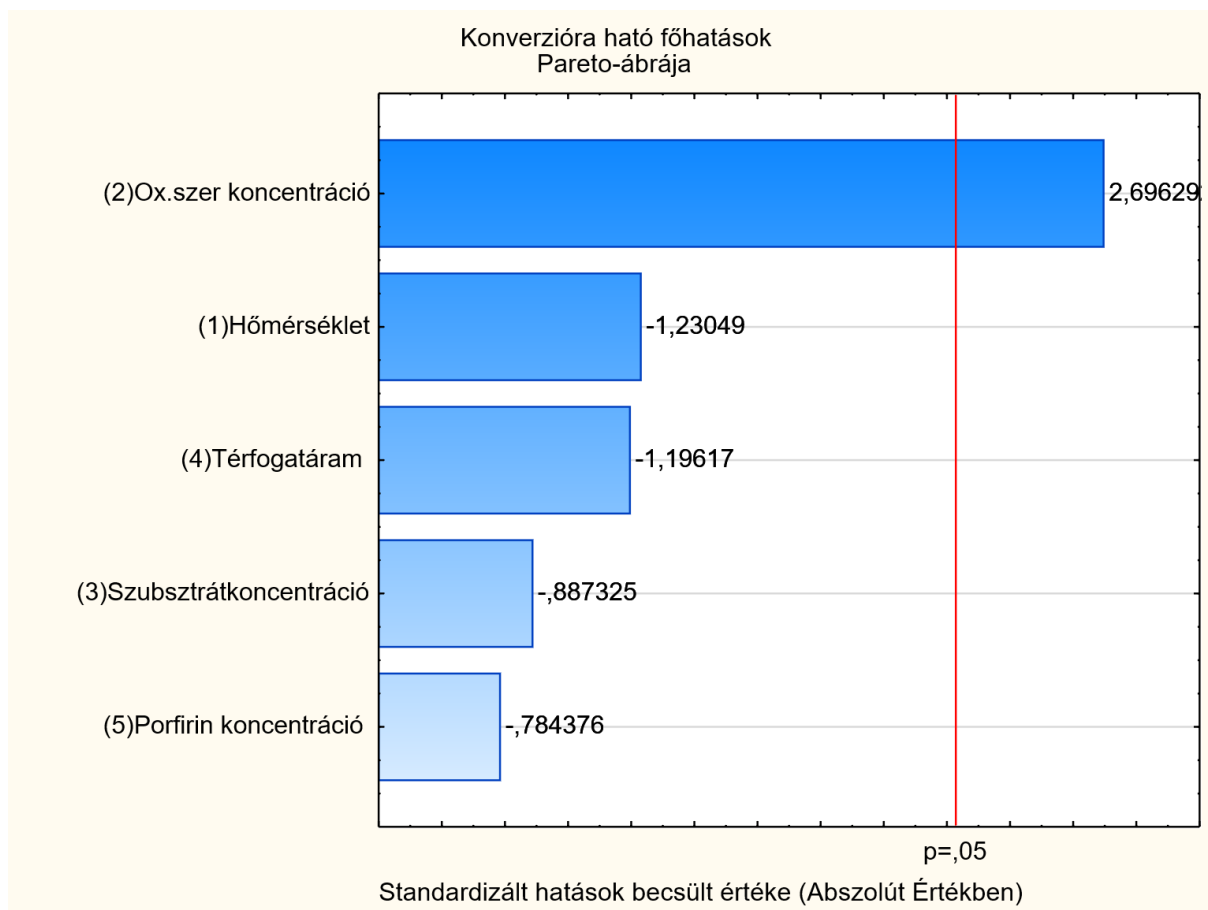
az 5. mérési beállításban mértem. A legalacsonyabb konverziót, 2,7 %-ot a 3. mérési beállításban mértem.

A főhatások elemzése alapján a 13. táblázatban bemutatott értékeket kaptam. Az elemzés során 6 változót illesztettem 16 adatpontra, így a szabadsági foka a rendszernek 10

13. táblázat Főhatások statisztikai vizsgálata ($t=10$, $\alpha=0,05$) dimetil-nitrendipin (32) esetén

Faktorok	Hatás	Standard hiba (SE)	t(10)-re vizsgált próbastatisztika	p-érték
Átlag/tengelymetszet.	15,13	2,550	5,932	0,0001
(1) Hőmérséklet	-6,28	5,100	-1,230	0,2467
(2) Ox.szer koncentráció	13,75	5,100	2,696	0,0225
(3) Szubsztrátkoncentráció	-4,53	5,100	-0,887	0,3957
(4) Térfogatáram	-6,10	5,100	-1,196	0,2592
(5) Porfirin koncentráció	4,00	5,100	0,784	0,4510

A statisztikai elemzés alapján a hőmérsékletnek, a szubsztrátkoncentrációnak, a térfogatáramnak és a porfirinkoncentrációnak nincs statisztikailag bizonyítható hatása. Az alkalmazott oxidálószer mennyiségének pedig statisztikailag szignifikáns hatása van. Ezt támasztja alá az ebből készített *Pareto-ábra* (24. ábra) is.

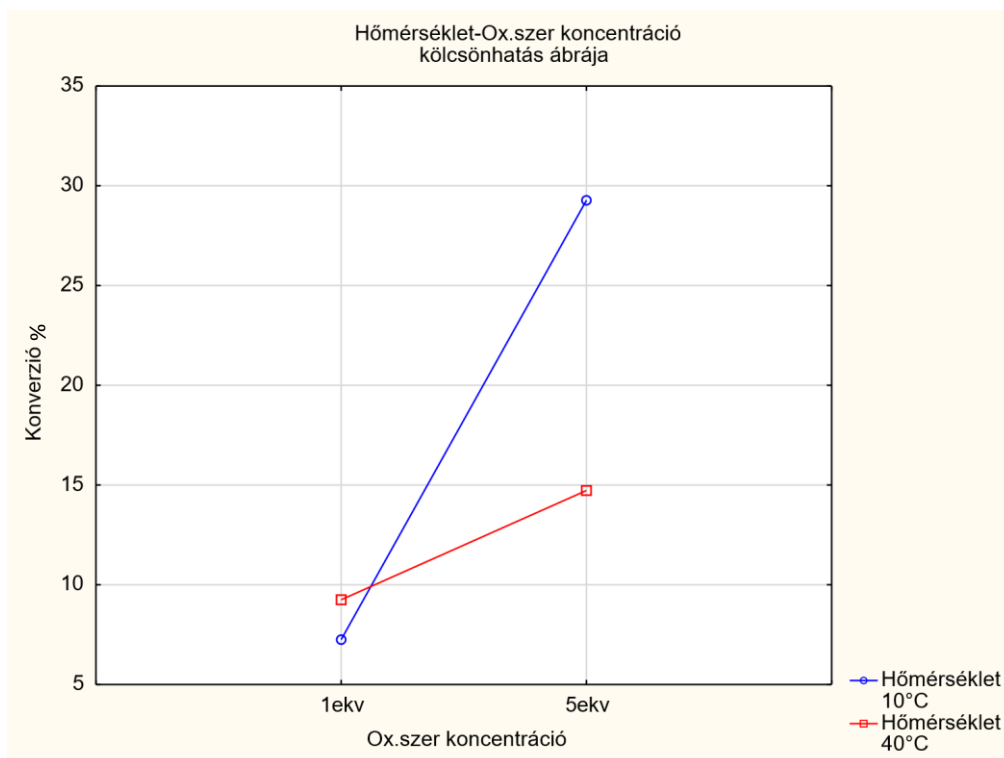


24. ábra Dimetil-nitrendipin (32) főhatásainak Pareto-ábrája

Ezek alapján a felírható konverziót becsülő egyenlet az alábbi módon adható meg:

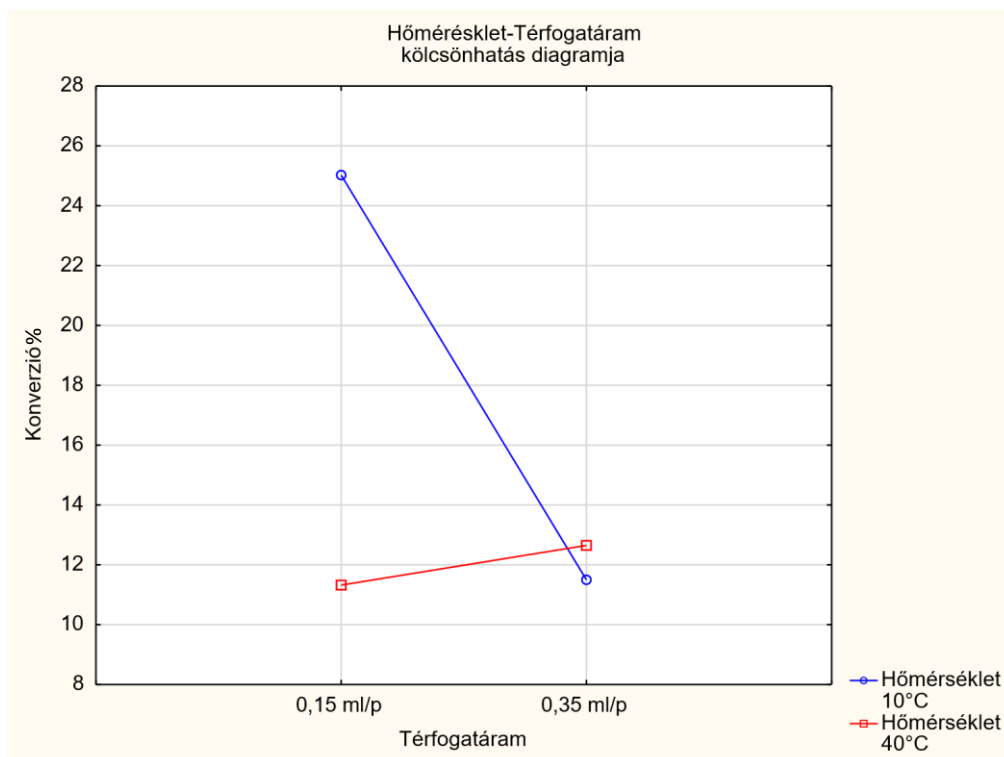
$$Y = 15,1 + 6,875x_2 \quad \text{3. egyenlet}$$

Sajnos ezen egyenletnek a pontossága alacsony, ami arra utal, hogy a főhatások kölcsönhatnak egymással, így ezt ezzel a kísérlettervvel nem lehet kiértékelni, mert 16 változót illesztenék 16 adatpontra, vagyis ily módon nem végezhető statisztikai próba rajtuk. Viszont a meglévő adatokból lehet következtetni azon főhatás párokra, amelyeket érdemes lesz vizsgálni a *foldover*-terv során.



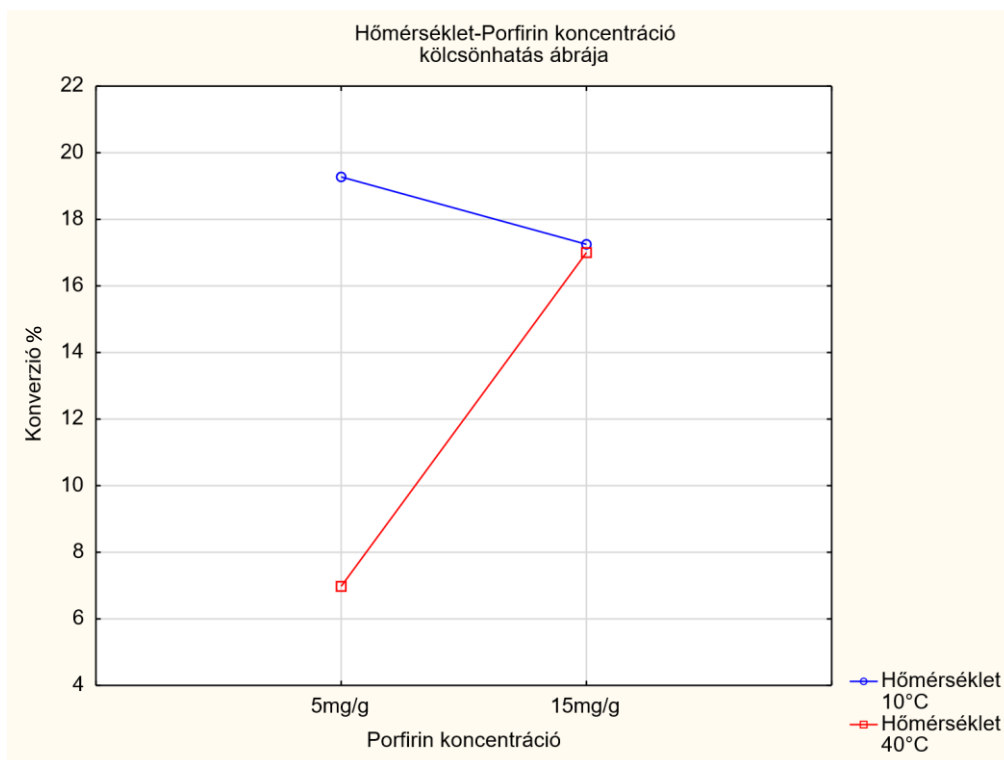
25. ábra Hőmérséklet–oxidálószer koncentráció kölcsönhatása

A hőmérséklet és oxidálószer koncentráció között kölcsönhatást várunk (**25.ábra**), mivel az alacsonyabb hőmérsékleti beállítás mellett az oxidálószer mennyiségének növelése lényegesen nagyobb konverzió növekedést eredményez, mint a magasabb hőmérsékleti beállítás esetén.



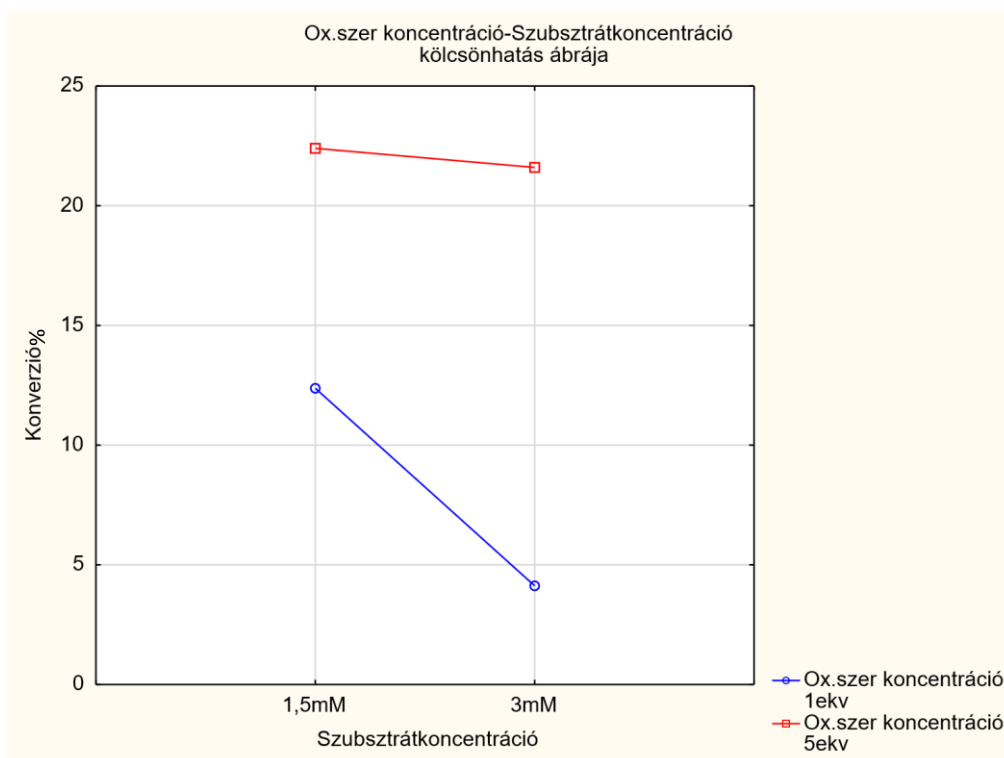
26. ábra Hőmérséklet–térfogatáram kölcsönhatás

A hőmérséklet és a térfogatáram között kölcsönhatást várunk (26. ábra), mivel az alacsonyabb hőmérsékleti beállítás mellett a térfogatáram növelése nagymértékű konverzió csökkenést eredményez, ezzel szemben a magasabb hőmérsékleti beállítás esetén térfogatáram növelése konverzió növekedést eredményez.



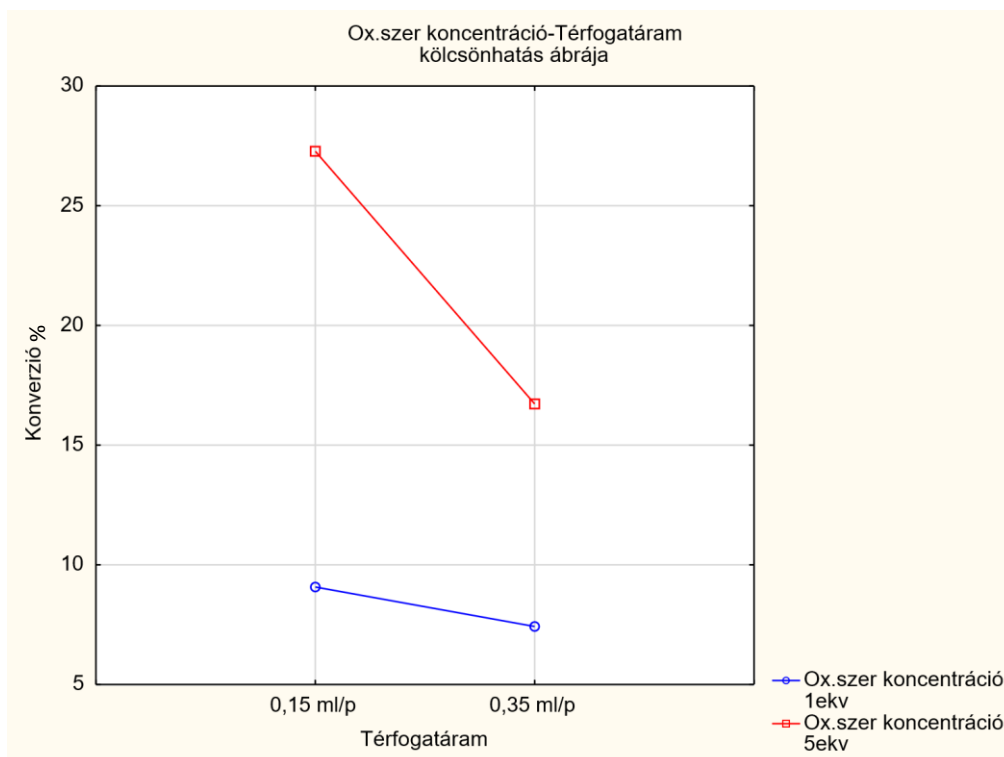
27. ábra Hőmérséklet–porfirin koncentráció kölcsönhatás

A hőmérséklet és a porfirin koncentráció között kölcsönhatást várunk (27. ábra), mivel az alacsonyabb hőmérsékleti beállítás mellett a porfirin koncentrációjának emelése konverzió csökkenést eredményez. Ezzel szemben a magasabb hőmérsékleti beállítás mellett a porfirin koncentrációjának emelése konverzió növekedést okoz.



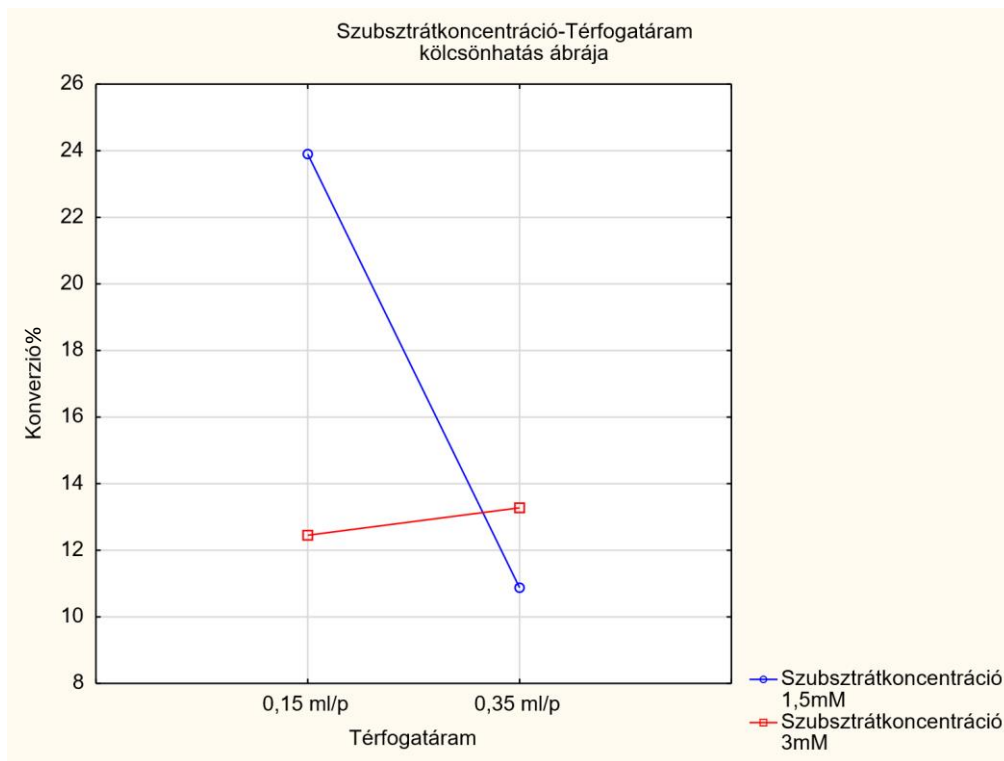
28. ábra Oxidálószer–szubsztrátkoncentráció közötti kölcsönhatás

Az oxidálószer és szubsztrát-koncentrációk közötti kölcsönhatást várunk (28. ábra), mivel 1 ekvivalensnyi oxidálószer esetén a szubsztrátkoncentráció növelése kismértékben csökkenti a konverziót, míg 5 ekvivalensnyi oxidálószer esetén a szubsztrátkoncentráció növelése lényegesen nagyobb mértékben csökkenti a konverziót.



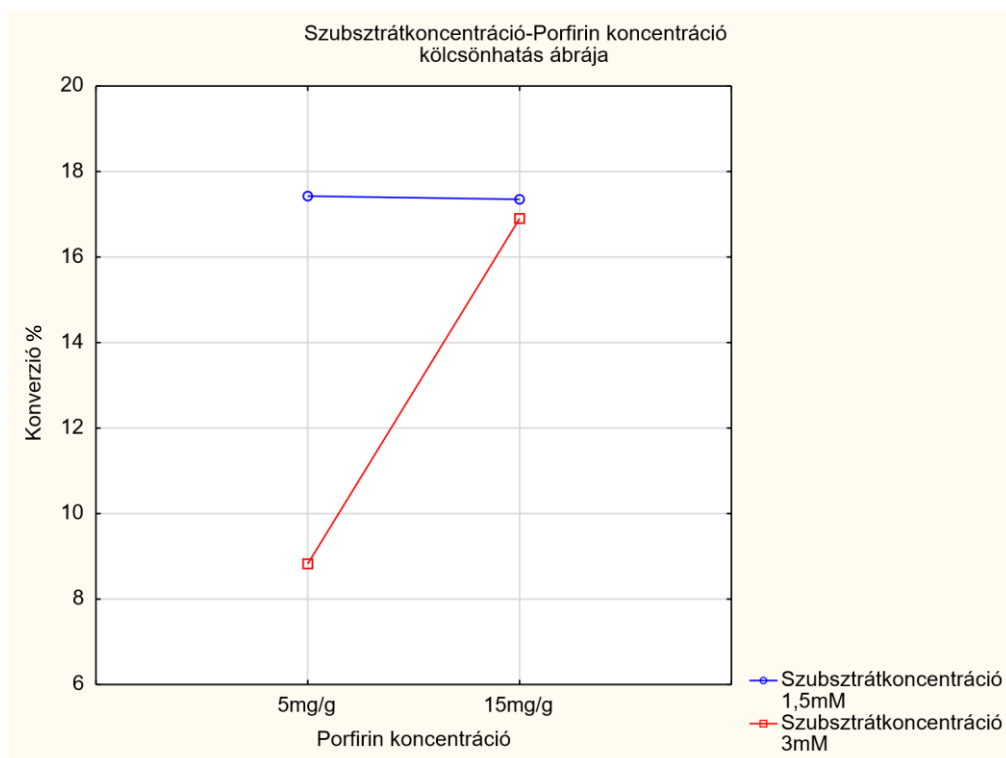
29. ábra Oxidálószer koncentráció–térfogatáram kölcsönhatás

Az oxidálószer koncentrációja és a térfogatáram között kölcsönhatást várunk (**29. ábra**), mivel 1 ekvivalensnyi oxidálószer esetén a térfogatáram növelése kismértékben csökkenti a konverziót, míg 5 ekvivalensnyi oxidálószer esetén a térfogatáram növelése lényegesen nagyobb mértékben csökkenti a konverziót.



30. ábra Szubsztrátkoncentráció—térfogatáram kölcsönhatás

A szubsztrátkoncentráció és térfogatáram között kölcsönhatást várunk (**30. ábra**), mivel az alacsonyabb szubsztrátkoncentráció esetén a térfogatáram növelése nagymértékű konverzió csökkenést eredményez, ezzel szemben magasabb szubsztrátkoncentráció esetén a térfogatáram növelése kismértékű konverzió növekedést eredményez.



31. ábra Szubsztrátkoncentráció—porfirin koncentráció kölcsönhatás

A szubsztrátkoncentráció és a porfirinkoncentráció között kölcsönhatást várunk (31. ábra), mivel az alacsonyabb szubsztrátkoncentráció esetén a porfirinkoncentráció növelése elhanyagolhatóan csökkenti a konverziót. Ezzel szemben a magasabb szubsztrátkoncentráció esetén a porfirin koncentráció növelése nagymértékű konverzió növekedést eredményez.

5.3. Kitekintés

A munkám végső célja a dihidropiridin alapvázal rendelkező vegyületek biomimetikus rendszerben való átalakulásának vizsgálatával feltérképezhessem azt, hogy a különböző szubsztituenseknek milyen hatása van a keletkező biomimetikus termékprofilra. Ezáltal elősegítve egy predikciós modell kidolgozását. Valamint az áramlásos kémiai rendszert vizsgálva feltérképezem, hogy melyek a jellemző átalakulások ebben a technológiában, amik később alapjául szolgálhat más gyógyszerhatóanyagok szintézisének is. További vizsgálatok melyekkel a szerkezeti adatintegritás pontosságát szeretném növelni a jövőben: a szakaszos (batch) reakciók során további dihidropiridin alapvázú vegyületek vizsgálata diverz oldalláncokkal, a gyártási melléktermék vegyületek mikroszómán lejátszódó átalakulásainak vizsgálata, a szakaszos reakcióelegyek HR-MS vizsgálata, valamint az áramlásos kémiai kísérletek megvalósítása más vegyületeken, akár szélesebb faktortartományok között.

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 izoenzimes család 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, melyek megfelelő szerkezeti hasonlóságot mutatnak a CyP enzimek aktív helyével, a *prosztetikus hem* csoporttal.

Munkám során, kutatócsoportunkban korábban már optimalizált biomimetikus rendszer segítségével vizsgáltam 9 dihidropiridin alapvázal rendelkező vegyületet, melynek célja a különböző oldallánccal rendelkező dihidropiridin származékok átalakulásának összehasonlítása volt. A kísérleteket négy pH értéket képviselő közegben végeztem el, a reakcióelegyeket HPLC-DAD-MS technikával elemeztem. Ezen felül három vegyületet AZ amlodipint (**25**), a benidipint (**29**), és a dimetil-nitrendipint (**32**) áramlásos kémiai rendszerben is vizsgáltam, ahol 5 paraméter szerint optimalizáltam a biomimetikus átalakulásait egy $2^{(5-1)}$ -es kísérletterv segítségével.

A vegyületek vizsgálata során a preferált biomimetikus transzformáció a dihidropiridin egység piridinné történő oxidációja, az összes vegyületnél ez volt a főtermék, illetve több esetben az egyetlen termék is. Ez jó párhuzamot mutat az élő szervezetben történő biotranszformációs úttal, mivel irodalmi adatok alapján ez az első átalakulási lépése a vizsgált gyógyszerhatóanyagoknak a szervezetben.

Összességében eredmények alapján elmondható, hogy a rendszer jó pontossággal utánozza a szervezetben történő metabolizmust, így támasztva alá annak biomimetikus jellegét, illetve alkalmasságát a metabolikus vizsgálatok elvégzésére dihidropiridin vegyületek esetében.

7. Függelék

F1. táblázat 2⁽⁵⁻¹⁾-es kísérletterv mérési beállításai

Faktorok	Hőmérséklet	Oxidálószer koncentráció	Szubsztrát koncentráció	Térfogatáram	Porfirin koncentráció
1.	10°C	1 ekv.	1,5 mM	0,15 ml/p	15 mg/g
2.	10°C	1 ekv.	1,5 mM	0,35 ml/p	5 mg/g
3.	10°C	1 ekv.	3 mM	0,15 ml/p	5 mg/g
4.	10°C	1 ekv.	3 mM	0,35 ml/p	15 mg/g
5.	10°C	5 ekv.	1,5 mM	0,15 ml/p	5 mg/g
6.	10°C	5 ekv.	1,5 mM	0,35 ml/p	15 mg/g
7.	10°C	5 ekv.	3 mM	0,15 ml/p	15 mg/g
8.	10°C	5 ekv.	3 mM	0,35 ml/p	5 mg/g
9.	40°C	1 ekv.	1,5 mM	0,15 ml/p	5 mg/g
10.	40°C	1 ekv.	1,5 mM	0,35 ml/p	15 mg/g
11.	40°C	1 ekv.	3 mM	0,15 ml/p	15 mg/g
12.	40°C	1 ekv.	3 mM	0,35 ml/p	5 mg/g
13.	40°C	5 ekv.	1,5 mM	0,15 ml/p	15 mg/g
14.	40°C	5 ekv.	1,5 mM	0,35 ml/p	5 mg/g
15.	40°C	5 ekv.	3 mM	0,15 ml/p	5 mg/g
16.	40°C	5 ekv.	3 mM	0,35 ml/p	15 mg/g

8. 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 2023 Update. *Nucleic Acids Res.* **2023**, 51 (D1), D1373–D1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>.
- (2) Orvosi biokémia | Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió Kft. <http://www.semmelweiskiado.hu/termek/715/orvosi-biokemia> (accessed 2023-10-02).
- (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](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](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90095-X).
- (5) Omura, T.; Sato, R. THE CARBON MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. II. SOLUBILIZATION, PURIFICATION, AND PROPERTIES. *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 2379–2385.
- (6) Nebert, D. W.; Russell, D. W. Clinical Importance of the Cytochromes P450. *The Lancet* **2002**, 360 (9340), 1155–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](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. 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. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, 27 (10), 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 Metab. Rev.* **2008**, 40 (1), 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*; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2005; pp 183–245. https://doi.org/10.1007/0-387-27447-2_6.

- (12) Baranczewski, P.; Stańczak, A.; Sundberg, K.; Svensson, R.; Wallin, A.; Jansson, J.; Garberg, P.; Postlind, H. Introduction to in Vitro Estimation of Metabolic Stability and Drug Interactions of New Chemical Entities in Drug Discovery and Development. *Pharmacol. Rep. PR* **2006**, 58 (4), 453–472.
- (13) Pelkonen, O.; Turpeinen, M.; Uusitalo, J.; Rautio, A.; Raunio, H. Prediction of Drug Metabolism and Interactions on the Basis of in Vitro Investigations. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, 96 (3), 167–175. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto960305.x>.
- (14) Lohmann, W.; Karst, U. Biomimetic Modeling of Oxidative Drug Metabolism. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391 (1), 79–96. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1794-x>.
- (15) Baumann, A.; Karst, U. Online Electrochemistry/Mass Spectrometry in Drug Metabolism Studies: Principles and Applications. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2010**, 6 (6), 715–731. <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. *Chem. Commun.* **2009**, No. 27, 3996–4015. <https://doi.org/10.1039/B901221D>.
- (18) Ph. D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI BIOLÓGIAI OXIDÁCIÓK BIOMIMETIKUS MODELLEZÉSE. Balogh György Tibor - PDF Free Download. <https://docplayer.hu/113367644-Ph-d-ertekezes-tezisei-biologiai-oxidaciok-biomimetikus-modellezese-balogh-gyorgy-tibor.html> (accessed 2023-10-02).
- (19) Stability of various metalloporphyrin catalysts during hydrogen peroxide epoxidation of alkene - University of Surrey. <https://openresearch.surrey.ac.uk/esploro/outputs/journalArticle/Stability-of-various-metalloporphyrin-catalysts-during/99515620002346> (accessed 2023-10-09).
- (20) Zucca, P.; Neves, C. M. B.; Simões, M. M. Q.; Neves, M. D. G. P. M. S.; Cocco, G.; Sanjust, E. Immobilized Lignin Peroxidase-Like Metalloporphyrins as Reusable Catalysts in Oxidative Bleaching of Industrial Dyes. *Molecules* **2016**, 21 (7), 964. <https://doi.org/10.3390/molecules21070964>.
- (21) 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>.

- (22) 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>.
- (23) Leonhardt, R.-H.; Berger, R. G. Nootkatone. In *Biotechnology of Isoprenoids*; Schrader, J., Bohlmann, J., Eds.; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 391–404. https://doi.org/10.1007/10_2014_279.
- (24) 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 Chem. Toxicol.* **2020**, *141*, 111426. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111426>.
- (25) Tornaritis, M. J.; Coutsolelos, A. G. Metalloporphyrins Catalyse Cis-Polybutadiene to Polyepoxide. *Polymer* **1992**, *33* (8), 1771–1772. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)91081-C](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)91081-C).
- (26) Sullivan, M. V.; Nanalal, S.; Dean, B. E.; Turner, N. W. Molecularly Imprinted Polymer Hydrogel Sheets with Metalloporphyrin-Incorporated Molecular Recognition Sites for Protein Capture. *Talanta* **2024**, *266*, 125083. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125083>.
- (27) Di Natale, C.; Paolesse, R.; Burgio, M.; Martinelli, E.; Pennazza, G.; D'Amico, A. Application of Metalloporphyrins-Based Gas and Liquid Sensor Arrays to the Analysis of Red Wine. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513* (1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.11.017>.
- (28) 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. – Eur. J.* **2007**, *13* (17), 4873–4883. <https://doi.org/10.1002/chem.200601148>.
- (29) Földi, 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. – Eur. J.* **2018**, *24* (37), 9385–9392. <https://doi.org/10.1002/chem.201800892>.

- (30) 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>.
- (31) Serra, A. C.; Marçalo, E. C.; Rocha Gonsalves, A. M. d'A. A View on the Mechanism of Metalloporphyrin Degradation in Hydrogen Peroxide Epoxidation Reactions. *J. Mol. Catal. Chem.* **2004**, *215* (1), 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2004.01.023>.
- (32) Lee, P. W. Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics. *No Title*.
- (33) 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>.
- (34) 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**, *07* (09), 645–650. <https://doi.org/10.1142/S1088424603000811>.
- (35) 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), 135–154. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00059-5).
- (36) 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>.
- (37) Catucci, G.; Gilardi, G.; Sadeghi, S. J. Production of Drug Metabolites by Human FMO3 in Escherichia Coli. *Microb. Cell Factories* **2020**, *19* (1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01332-1>.
- (38) Hrynychak, I.; Sousa, E.; Pinto, M.; Costa, V. M. The Importance of Drug Metabolites Synthesis: The Case-Study of Cardiotoxic Anticancer Drugs. *Drug Metab. Rev.* **2017**, *49* (2), 158–196. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1316285>.
- (39) 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>.
- (40) 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. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (23), 14379–14455. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00209>.
- (41) Weber, J.; Vaclavikova, M.; Wiesenberger, G.; Haider, M.; Hametner, C.; Fröhlich, J.; Berthiller, F.; Adam, G.; Mikula, H.; Fruhmman, 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>.
- (42) Koenig, S. G.; Sneddon, H. F. Recent Advances in Flow Chemistry in the Pharmaceutical Industry. *Green Chem.* **2017**, *19* (6), 1418–1419. <https://doi.org/10.1039/C7GC90017A>.
- (43) Wegner, J.; Ceylan, S.; Kirschning, A. Ten Key Issues in Modern Flow Chemistry. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (16), 4583–4592. <https://doi.org/10.1039/C0CC05060A>.
- (44) Munirathinam, R.; Huskens, J.; Verboom, W. Supported Catalysis in Continuous-Flow Microreactors. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (6), 1093–1123. <https://doi.org/10.1002/adsc.201401081>.
- (45) Balogh, G. T.; Decsi, B.; Krammer, R.; Kenéz, B.; Ender, F.; Hergert, T.; Balogh-Weiser, D. Effect of Binding Linkers on the Efficiency and Metabolite Profile of Biomimetic Reactions Catalyzed by Immobilized Metalloporphyrin. *Metabolites* **2022**, *12* (12), 1269. <https://doi.org/10.3390/metabo12121269>.
- (46) Beresford, A. P.; McGibney, D.; Humphrey, M. J.; Macrae, P. V.; Stopher, D. A. Metabolism and Kinetics of Amlodipine in Man. *Xenobiotica* **1988**, *18* (2), 245–254. <https://doi.org/10.3109/00498258809041660>.
- (47) Ananchenko, G.; Novakovic, J.; Lewis, J. Chapter 2 - Amlodipine Besylate. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; Brittain, H. G., Ed.; Academic Press, 2012; Vol. 37, pp 31–77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397220-0.00002-7>.
- (48) Raemsch, K. D.; Sommer, J. Pharmacokinetics and Metabolism of Nifedipine. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **1983**, *5* (4 Pt 2), II18-24. https://doi.org/10.1161/01.hyp.5.4_pt_2.ii18.
- (49) Yoon, Y.-J.; Kim, K.-B.; Kim, H.; Seo, K.-A.; Kim, H.-S.; Cha, I.-J.; Kim, E.-Y.; Liu, K.-H.; Shin, J.-G. Characterization of Benidipine and Its Enantiomers' Metabolism by Human Liver Cytochrome P450 Enzymes. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35* (9), 1518–1524. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.013607>.

- (50) Medina, I. Preparative High-Performance Liquid Chromatography for the Purification of Nitrendipine and Its Dimethyl Ester. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1999**, 22 (13), 1987–1995. <https://doi.org/10.1081/JLC-100101780>.
- (51) Rämsch, K. D.; Graefe, K. H.; Scherling, D.; Sommer, J.; Ziegler, R. Pharmacokinetics and Metabolism of Calcium-Blocking Agents Nifedipine, Nitrendipine, and Nimodipine. *Am. J. Nephrol.* **1986**, 6 Suppl 1, 73–80. <https://doi.org/10.1159/000167224>.