

Metalloporfirin alapú biomimetikus oxidáló rendszerek fejlesztése a hordozó rendszertől az alkalmazásig

Dr. DECSI Balázs,^{a,*} Dr. BALOGH György Tibor^{a,b} és Dr. BALOGH-WEISER Diána^a

^aBudapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Műegyetem rakpart 3, 1111, Budapest, Magyarország

^bSemmelweis Egyetem, Üllői út 26, 1085, Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A hatóanyag-metabolizmus felderítése a gyógyszerkutatás egyik kiemelt feladata. Ennek fő oka, hogy a szervezetben enzimatisz uton képződő metabolitok átfogó ismeretét az engedélyező hatóság elvárja. A szervezetben az elsődleges metabolikus út jellemzően a citokróm P450 (CyP450) által katalizált oxidációs lépéssel indul. Tekintettel arra, hogy a gyógyszerkincsünk több mint 70%-a szenved el valamilyen CyP450 katalizálta oxidációs átalakítást¹, egy új hatóanyag fejlesztése során fontos információt hordoz ezen biotranszformációs utak feltárása.

Hagyományosan a CyP450 függő reakciók primer vizsgálatát a máj mikroszoma frakciójának felhasználásával végzik, azonban a biológiai rendszerek számos hátránnyal bírnak. A vizsgált hatóanyag, mint enzim szubsztrát csak alacsony koncentrációban alkalmazható, emiatt csekély mennyiségben keletkeznek metabolitok. A reakcióelegyben a mikroszoma komplex biológiai mátrixa megnehezíti az analitikai vizsgálatot, így elsődlegesen csupán kvantitatív információ nyerhető a képződő metabolitokról. A mikroszoma élettartama a reakció körülményei között 1-2 óra². Mindezek miatt nagyobb mennyiségű metabolit nem állítható elő gazdaságosan máj mikroszómális rendszereket alkalmazva.

Az előbbiekben ismertetett hagyományos mikroszoma alapú rendszerek hátrányait kiküszöbölve alternatív megoldást nyújthatnak az ún. biomimetikus modellek. Az egyik leggyakrabban alkalmazott biomimetikus rendszer alapjául a CyP450 enzimek aktív helyén található protoporfirin IX egységgel szerkezeti hasonlóságot mutató szintetikus metalloporfirinek szolgálnak. Előnyük, hogy a gyógyszer(jelölt) vegyületből egy lépésben lehetővé válik a metabolitok előállítás a sokszor nehézkes és többlépéses, gyakran az anyavegyület előállításától független reakcióutak alkalmazását jelentő totálszintézis nélkül. A reakciókörülmények változtatásával nem csak a kívánt metabolitok állíthatók elő, hanem a szerkezeti sokszínűséget szélesítve, új kémia teret képviselő vegyületek is gazdagíthatják a gyógyszerkutatási programok kiindulópontját. Emellett elmondható, hogy az in vitro biológiai rendszerekkel szemben a biomimetikus kémiai modellek robusztusabbak, az eredmények ezáltal jól reprodukálhatók. A komplex biológiai mátrix hiánya és a kiindulási vegyület nagyobb koncentrációja növe-

li a követő analitikai vizsgálatok hatékonyságát, és nagyobb mennyiségű metabolit gazdaságos előállítása is megoldhatóvá válik³.

2. Eredmények

A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karának, Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszékén működő Biomimetikus Technológiák Kutatócsoportjában, (ezt megelőzően a Richter Gedeon NyRt. volt Szintézistámogató Laboratóriumában) már évek óta vizsgálják a szintetikus metalloporfirinek alkalmazhatóságát gyógyszerhatóanyagok biomimetikus oxidációjában. A kutatócsoportban felhalmozott tapasztalatok rámutattak, hogy a szintetikus metalloporfirin alapú rendszerek sem mentesek a megoldandó hátrányoktól. A reakciók biomimetikus jellegét igazolni szükséges, azaz meg kell állapítani, hogy metalloporfirin hiányában, a katalizátor aktiválásához szükséges oxidálószer önmagában képes-e átalakítani a szubsztrátot. Emellett a metalloporfirinek homogén oxidatív közegben gyors degradációt szenvedhetnek el, valamint a homogén reakcióelegyből az elválasztásuk, ezáltal újra felhasználhatóságuk nehézkes vagy egyáltalán nem megoldható. A Szerves Kémia és Technológia Tanszék Bioorganikus és Kémiai Kutatócsoportjában hosszabb idő óta zajlanak különféle hordozó fejlesztésére, illetve biokatalizátor rögzítésére irányuló kutatások, melyeknek célja stabilabb, kezelhetőbb és hatékonyabb biotranszformációs eljárások megvalósítása.

Doktori munkám során célul tűztam ki olyan szintetikus metalloporfirin alapú rendszerek fejlesztését, amelyek képesek lehetnek kiküszöbölni a fent megfogalmazott homogén rendszerekre jellemző hátrányokat. Munkám három különböző, de egymásra épülő és egymással összefüggő szintre tagolható. Egyfelől referenciaként elvégeztük a hagyományos homogén fázisú katalitikus reakciót és azonosítottuk a keletkező metabolitokat. Emellett célunk volt a metalloporfirin katalizátor rögzítése különböző nanostrukturált hordozók felületére, melynek részeként a kötés módjának optimalizálását is el kívántuk végezni. Végezetül, a heterogén katalizátorrendszer integrálását kívántuk megoldani folyamatos üzemű, átfolyásos reaktorokba. Ehhez a hordozórendszer jellegével harmonizáló mikro- és mezo-

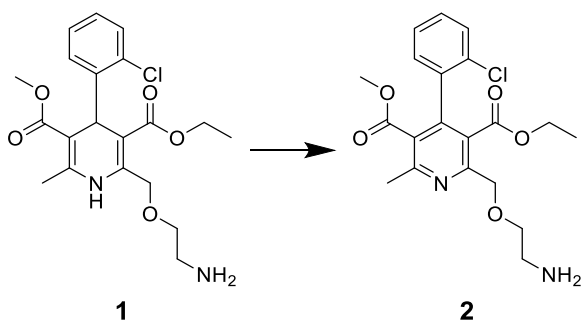
* Főszerező. Tel: +36 1 463 2574; e-mail: balazsdecsi@vbk.bme.hu

reaktorokat (mikrofluidikai chip- és hagyományos töltött ágyas reaktorok) alkalmaztunk.

Összefoglalva, munkám a reakcióvezetés megtervezésétől, a katalizátorhordozó fejlesztésén keresztül a folyamatos áramú reaktortechnológiák alkalmazásáig terjedt.

2.1. Mágneses nanorészecske (MNP) alapú biomimetikus katalizátorok fejlesztése^{4,5}

Mágneses nanorészecskék (MNP) kiválóan alkalmazhatók, mint különböző katalizátor molekulák hordozói. Nagy fajlagos felületük mellett előnyük, hogy mágneses tulajdonságukból következően állandó mágnes jelenlétében szeparálhatók a reakcióközegeből vagy kívánt helyen csapódhatnak. A felületükön kialakítható szilika réteg, ami lehetőséget nyújthat a megfelelő aktív vagy inert csoport(ok) rögzítésére az adott csoportot tartalmazó szilánok hidrolízisével. Különböző inert csoportok alkalmazásával a katalizátor hordozó felületi tulajdonságai optimalizálható, ezáltal növelhető a katalitikus aktivitás. Ez abból a szempontból fontos, hogy a katalizátorok rögzítésével kialakulhat egy ún. diffúziós gát, amely ronthatja az aktivitásukat. Mágneses nanorészecskék felületén aktív funkcióként 3-aminopropilcsoportot alkalmaztunk, míg inert csoportként különböző méretű (metil-, fenil-, propil-, és vinilcsoport) csoportokat rögzítettünk. Katalizátorként *mezo*-tetra(pentafluorofenil)vasporfirint (FeTPPF) és *mezo*-tetra(paraszulfoniloxifenil)vasporfirint (FeTPPS) használtunk. FeTPPF-et kovalens kötással, míg FeTPPS-t elektrosztatikus kölcsönhatással rögzítettük felületmódosított MNP felületére. Inert módosítóként mindkét metalloporfirin katalizátor esetében a metilcsoport bizonyult optimálisnak, így a további kísérletekben ezt alkalmaztuk. A felületi csoportokat tartalmazó szilánok anyagmennyiségét állandónak vettük (64 mM). Az aktív és inert csoportokat a felületmódosító elegyben szisztematikusan különböző molarányban alkalmaztuk. Így öt, felületén az aktív csoportot különböző felületi sűrűségben (aktív:inert = 1:0, 1:1, 1:4, 1:16, valamint vak mintaként 0:1) tartalmazó hordozót állítottunk elő. Modellvegyületeként egy kalciumcsatorna blokkolót, az amlodipin (1) hatóanyagot választottuk. Biomimetikus reakciójában dehidroamlodipin (2) humán major metabolit keletkezik egyedüli terméként, így a reakció UV-vis spektrofotometriás módszerrel követhető.

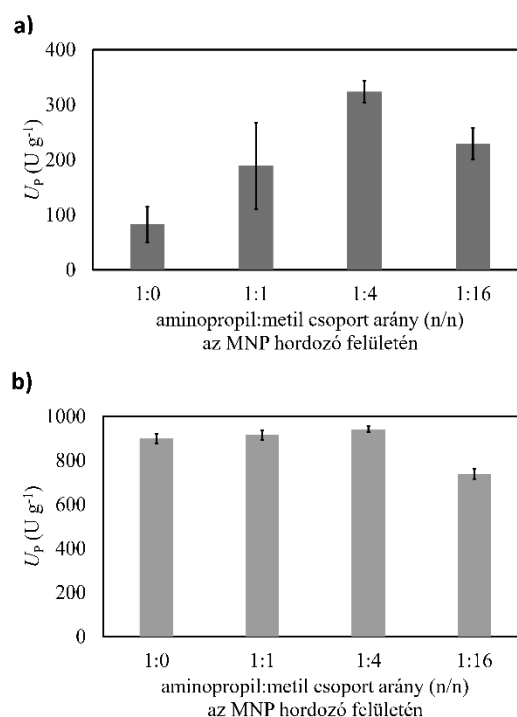


1. ábra. Amlodipin (1) és in vivo humán / biomimetikus metabolitja (dehidroamlodipin, 2)

A különböző katalizátorrendszerek aktivitását az ún. fajlagos specifikus katalitikus aktivitással (U_p , **1. egyenlet**) jellemeztük, amely megmutatja, hogy a teljes katalizátor rendszer egységnyi metalloporfirin mennyisége (m_p , g) egységnyi idő alatt (t , perc) mekkora mennyiségű terméket ($n_s \cdot c$, ahol n_s -szubsztrát kiindulási mennyisége (μmol), c -konverzió,) képes előállítani (vagy szubsztrátot átalakítani).

$$U_p (U \text{ g}^{-1}) = n_s c t^{-1} m_p^{-1} \quad (1)$$

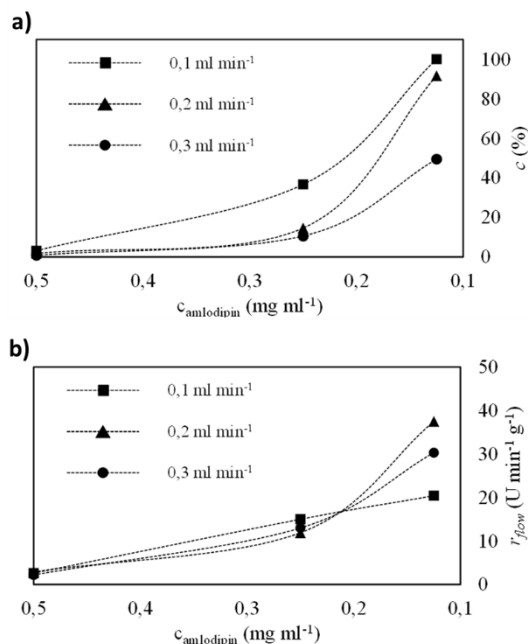
Elsőként mindkét két porfirin esetében az aktív csoportnak az optimális felületi sűrűségét kívántuk meghatározni. Ezt heterogén szakaszos rendszerben végeztük el. Az eredmények a **2. ábrán** láthatók. Általánosan elmondható, hogy a legaktívabbnak mindkét metalloporfirin esetében az 1:4-es módosítási arány bizonyult. Amennyiben a hordozó nem tartalmazott aktív aminosoprotot a felületén, abban az esetben metalloporfirin nem rögzült a hordozóra, illetve nem történt katalitikus átalakulás a heterogén szakaszos rázatott rendszerben. Az ionosan rögzített FeTPPS aktivitása közel háromszorosa a kovalensen rögzített FeTPPF biomimetikus katalizátornak, így folyamatos üzemű, mikrofluidikai reakcióban az előbbi katalizátorrendszert alkalmaztuk.



2. ábra. Heterogén, szakaszos katalitikus rendszerek fajlagos specifikus biomimetikus aktivitása a) FeTPPF, b) FeTPPS porfirint alkalmazva.

Az optimálisnak talált 1:4 amino:metilcsoportot tartalmazó rendszert az amlodipin (1) folyamatos üzemű biomimetikus oxidációjában vizsgáltuk. A reakciót az amlodipin (1) koncentrációja ($c_{\text{amlodipin}} = 0,5; 0,25$ és $0,125 \text{ mg ml}^{-1}$), illetve az áramlási sebesség ($v = 0,1; 0,2$ és $0,3 \text{ ml min}^{-1}$) változtatása mellett optimalizáltuk. Az állandósult állapot beálltát követően mintát vettünk a kifolyó reakcióelegyből, amit HPLC-

DAD, valamint HPLC-DAD-MS módszerrel vizsgáltuk. Az eredmények alapján el lehet mondani, hogy a magnechip reaktor hasonlóan viselkedett, mint a hagyományos (pl.: töltött ágyas) folyamatos áramú reaktorok. Amennyiben növeltük az áramlási sebességet vagy a szubsztrát koncentrációt, csökkent a mért konverzió (3. ábra). Az eredményekből látható, hogy az amlodipin (3) teljes mennyisége átalakult 0,1 ml min⁻¹-es áramlási sebesség és 0,125 mg ml⁻¹ szubsztrátkoncentráció mellett. A reaktor produktivitása (r_{flow}) ugyanezen koncentráció, de magasabb áramlási sebesség (0,2 ml min⁻¹) mellett volt a legnagyobb.

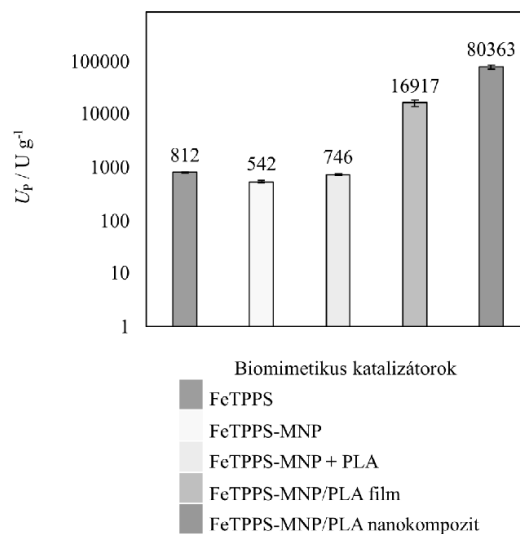


3. ábra. Amlodipin (1) folyamatos áramú biomimetikus reakciójának konverziója (a) és reaktor produktivitása (b) a koncentráció függvényében

2.2. Nanoszál alapú biomimetikus katalizátorok fejlesztése⁶

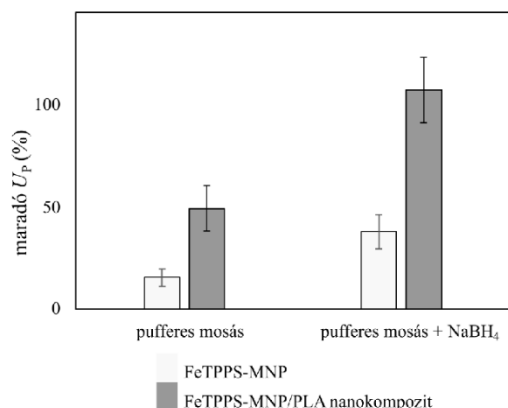
Az elektrosztatikus szálképzéssel készült nem szőtt anyagú nanoszálak mátrix kitűnő tulajdonságokkal rendelkező katalizátorhordozó. Az elkészítése kíméletes (a polimer anyagától függően akár szerves oldószer nélkül is előállítható), így alkalmazásukkal lehetőség nyílik akár enzimek rögzítésére is. Szintetikus metalloporfirin beágyazását nanoszálak mátrixba korábban nem vizsgálták, emiatt előkísérletként szükséges volt elvégezni a szabad porfirin rögzítését, valamint a kioldódásának a vizsgálatát. A kísérleteink során politejsav (PLA) nanoszálak mátrixot használtunk az FeTPPS rögzítésére. A kész nanoszálak terméket kioldódásvizsgálatnak alávetve azt tapasztaltuk, hogy a metalloporfirin közel 90%-ban kioldódott a reakció közegében való ráztatás során. Emiatt alternatív rögzítési módot volt szükséges kidolgoznunk, ami a 2.1-es fejezetben ismertetett MNP alapú hordozó alkalmazását jelentette, így egy PLA/MNP kompozit katalizátorrendszert hoztunk létre. A kompozit katalizátor MNP-FeTPPS tartalmát optimalizáltuk és további kísérleteinkben a legjobbnak bizonyult 1,25 w/w% MNP-FeTPPS-t

alkalmaztuk a száraz PLA mennyiségére vonatkoztatva. Az optimálisnak talált összetétel mellett vizsgáltuk a különböző formulációk hatását a rögzített metalloporfirin katalizátor aktivitására (4. ábra). Az eredmények megerősítették, hogy az PLA kompozit formuláció jelentős aktivitás növelő hatással rendelkezik a szabad, oldott vagy szabad MNP kötött formához képest. A PLA jelenléte önmagában nem befolyásolta a metalloporfirin aktivitását. Fontos megemlíteni, hogy a PLA film és a nanoszálak rendszert összehasonlítva az látható, hogy a nagyobb fajlagos felülete az utóbbinak nagymértékben képes befolyásolni a katalizátor aktivitását azáltal, hogy kiváló átjárhatóságot biztosít és így javítja az anyagtranszportot a katalizátor és az oldat tömbfázisa között.



4. ábra. Amlodipin (1) különböző típusú FeTPPS katalizátor tartalmú rendszerek általi oxidációjának specifikus biomimetikus aktivitása

A rögzített katalizátorok egyik fontos tulajdonsága, hogy könnyen elválaszthatók a reakcióelegytől és egy újabb reakcióban felhasználhatók. Emiatt fontos vizsgálni a különböző katalizátor rendszerek újrahasznosíthatóságát. A maradó aktivitást a szabad MNP-hez és a PLA/MNP kompozitba rögzített FeTPPS esetében kétféle módon vizsgáltuk. Az első esetben a kiszűrés után a reakció közegével történő mosást végeztünk a következő reakció előtt, míg a második esetben a mosás után nátrium-borohidrides kezelést alkalmaztunk. Az 5. ábrán látható eredmények alapján elmondható, hogy a PLA nanoszálak rendszer a borohidrides kezelés nélkül is nagyobb maradó reaktivitással rendelkezett, mint a szabad MNP-FeTPPS. A nátrium-borohidrides kezelés növelte a maradó aktivitását mindkét katalizátorrendszernek, ami azt bizonyítja, hogy a borohidrid egy jó regeneráló ágense az FeTPPS katalizátornak. Így a PLA kompozit közel teljes aktivitása megmaradt a borohidrides kezelés után, ami a nanoszálak PLA kiváló védőhatását bizonyítja.



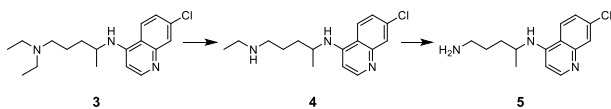
5. ábra. Különböző rögzített metalloporfirin tartalmú rendszer újrahaználhatóságának vizsgálata mosás, illetve NaBH₄-es kezelés után.

2.3. Nanopórusos mikrorészecske alapú biomimetikus katalizátorok fejlesztése⁷

Végezetül a hordozó felületének és a katalizátor molekulák távolságának befolyásoló hatását vizsgáltuk. E célból a szilikarészecskék felületét 3 különböző hosszúságú aminocsoportot tartalmazó linkermolekulát (Si-1: 3-aminopropil-trimetoxiszilán, Si-2: 3-aminoetil-aminopropil-trimetoxiszilán, Si-3: *N*-[3-(trimetoxiszilil)propil]-di-etilén-triamin)) alkalmazva módosítottuk, majd FeTPPS metalloporfirin katalizátort rögzítettünk a felületére ionos kötéssel. Elsőként szakaszos körülmények között heterogén katalitikus oxidációban vizsgáltuk az amlodipin (**1**), illetve a klorokin (**3**) esetében a linker hosszának hatását a katalizátor aktivitására (**1. táblázat**). Előbbi esetében a közepes hosszúságú, míg klorokin (**3**) esetében a legrövidebb linker bizonyult a legjobbnak. Amlodipin (**1**) esetében a már korábban ismertetett dehidroamlodipin (**2**) keletkezett mindhárom rögzített katalizátor esetében, míg klorokin (**3**) reakciójában két metabolit, egy egyszeres (**4**) és egy kétszeres (**5**) dealkilálást eredményező klorokin származék keletkezett (**6. ábra**). Klorokin esetében elmondható, hogy a linker hossza nem csupán a konverziót befolyásolta, hanem a metabolitprofil is eltért a rövidebb és hosszabb linkerek alkalmazásával (**2. táblázat**).

1. táblázat. Amlodipin (**1**) és klorokin (**3**) heterogén, szakaszos biomimetikus oxidációjának konverzióértékei

	Si-1-FeTPPS	Si-2-FeTPPS	Si-3-FeTPPS
c _{amlodipin}	12,4	37,4	28,0
c _{klorokin}	52,6	26,4	18,6

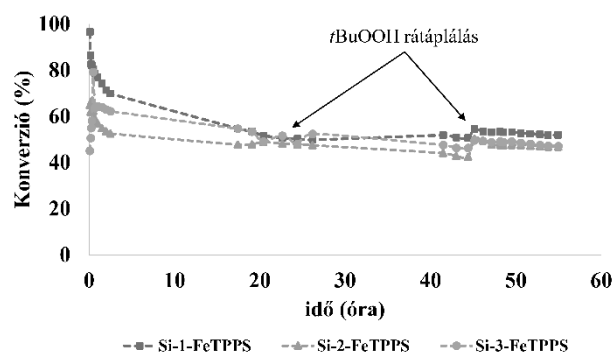


6. ábra. Klorokin (**3**) és biomimetikus metabolitjai

2. táblázat. Klorokin (**3**) heterogén, szakaszos biomimetikus oxidációjának metabolitprofiljai

	Si-1-FeTPPS	Si-2-FeTPPS	Si-3-FeTPPS
3	47,4	73,6	81,4
4	39,6	19,8	13,8
5	12,5	6,6	-
Egyéb	0,5	-	4,8

A szakaszos reakciók mellett folyamatos áramú reakcióban is vizsgáltuk a linkermolekula hosszúságának hatását. Az áramlási sebesség korábban optimalizált értéke 250 μl min⁻¹ és 2 ekvivalens oxidálószer mennyiség mellett vizsgáltuk a rendszer működését. Amlodipin (**1**) folyamatos áramú biomimetikus oxidációs reakciójában a három különböző hordozós katalizátor (Si-1-FeTPPS, Si-2-FeTPPS és Si-3-FeTPPS) élettartamát hasonlítottuk össze (**7. ábra**). A kezdeti nagy konverzió folyamatosan lecsökkent, míg közel állandó 55%-os értékre állt be. 24, majd 48 órás folyamatos reakció után friss oxidálószer oldatot készítettünk és azt áramoltattuk át a töltött ágyas reaktoron. Közel 60 órán keresztül a konverzió nem változott számottevően egyik hordozós katalizátor alkalmazása mellett sem.



7. ábra. Különböző hosszúságú linkermolekula hatása a rögzített katalizátor élettartamára

A töltött ágyas reaktorban a klorokin (**3**) biomimetikus oxidációját vizsgáltuk. A mért termékprofil szerint a deetil- (**4**) és bisz-deetil-klorokin (**5**) volt azonosítható (**6. ábra**). Az eredményeket a **3. táblázatban** foglaltam össze. A folyamatos áramú reakcióban a közepes hosszúságú linker (Si-2) bizonyult optimálisnak, míg a szakaszos reakcióvezetésben legjobban teljesítő Si-1 linker alkalmazása csupán 2%-os konverzió eredményezett, ahol egyetlen termék, a deetil-klorokin (**4**) keletkezett. A közepes hosszúságú mellett, a leghosszabb láncú linker is jó aktivitást mutatott több, mint 50%-os konverzió értékkel.

3. táblázat. Klorokin (**3**) heterogén, folyamatos áramú biomimetikus oxidációjának metabolitprofiljai és konverzióértékei

	Si-1-FeTPPS	Si-2-FeTPPS	Si-3-FeTPPS
3	98,0	23,6	49,6
4	2,0	29,3	29,9
5	-	36,6	19,3
Egyéb	-	10,4	2,1
c _{klorokin}	2,0	76,4	50,4

A szakaszos és folyamatos módban végrehajtott biomimetikus reakciók összehasonlítása érdekében meghatároztuk az ún. volumetrikus produktivitás (STY, Space Time Yield, **2. egyenlet**) értékeket (**4. táblázat**).

4. táblázat. Különböző rendszerek termelékenységének összehasonlítása

Katalizátor	Reakció megvalósítás	STY (mg l ⁻¹ h ⁻¹)
HLM	Szakaszos, heterogén	0,32
RLM		0,31
MLM		0,64
Homogén FeTPPS		184
Si-1-FeTPPS	Szakaszos, heterogén	296
Si-2-FeTPPS		119
Si-3-FeTPPS		84
Si-1-FeTPPS	Folyamatos áramú, heterogén	2309
Si-2-FeTPPS		88213
Si-3-FeTPPS		58193

A volumetrikus produktivitás megadja az egységnyi reaktortérfogatban (V_r , l), egységnyi idő alatt (t, h) előállítható termék tömegét (m_p , mg).

$$\text{STY (mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}) = m_p V_r^{-1} t^{-1} \quad (2)$$

A **4. táblázat** eredményei alapján elmondható, hogy a homogén és heterogén szakaszos biomimetikus reakciók termelékenysége összemérhető, azonban legjobb a folyamatos áramú rendszer két nagyságrenddel nagyobb értékkel rendelkezik, mint a legjobb szakaszos rendszer. Az in vitro, heterogén fázisú, szakaszos, mikroszóma alapú rendszerek rendelkeztek a legrosszabb hatékonysággal, amely alátámasztja a bevezetőben megfogalmazott gazdaságossági megfontolást, miszerint a biomimetikus rendszerek alkalmasak nagyobb mennyiségű metabolit előállítására.

3. Összefoglalás

Doktori munkám során szintetikus metalloporfirin alapú, heterogén biomimetikus oxidáló rendszerek fejlesztésével foglalkoztam. A hordozós metalloporfirin katalizátorokat folyamatos áramú rendszerekbe integrálva gyógyszerhatóanyagok oxidatív metabolitjait állítottuk elő egy lépésben, közvetlenül az anyavegyületből kiindulva. Ezen rendszerek fejlesztése abból a szempontból fontos, hogy a hagyományos in vivo, illetve in vitro sejtes alapú rendszereket kiegészítve segítséget nyújthatnak gyógyszerfejlesztés során az új hatóanyagok tervezésében és optimalizálásában, illetve metabolitjainak előrejelzésében és előállításában.

Elsőként a szintetikus eredetű metalloporfirint kovalens és ionos kötással rögzítettük különböző módon felületmódosított, szilikáréteggel bevont mágneses nanorészecskék felületére. A felület fizikai-kémiai tulajdonságait különböző inert csoportokkal módosítottuk, melyek közül egy op-

timalizációs kísérletsorozatban a metilcsoport bizonyult a legjobbnak, így a további reakciókban a mágneses nanorészecske (MNP) alapú rendszerek esetében ezt alkalmaztuk. Az MNP alapú rendszer működését szakaszos reakcióban vizsgáltuk, valamint meghatároztuk az aktív amino-, valamint az inert metilcsoportok optimális arányát a hordozó felületén. Az optimálisnak talált MNP-FeTPPS katalizátort mikrochipreaktorba töltve/csapdázva amlodipin (**1**) folyamatos áramú mikrofluidikai biomimetikus oxidációját végeztük el, egy olyan stabil, kis szubsztrátigényű rendszert létrehozva, amely megfelelő analitikai módszerrel integrálva alkalmassá tehető akár új, gyógyszerjelölt vegyületek metabolitjainak előállítására és azonosítására.

Először rögzítettünk elektrosztatikus szálképzéssel készített politejsav alapú nanoszálak készítménybe szintetikus metalloporfirint. Megállapítottuk, hogy önmagában a nanoszálak politejsav nem alkalmas a metalloporfirin megfelelő visszatartására, ezért MNP-hez rögzítve elsőként állítottunk elő szintetikus metalloporfirint tartalmazó nanoszálak kompozit katalizátort, amely már megfelelően képes a katalizátor rögzítésére. Amlodipin (**1**) biomimetikus oxidációjában optimalizáltuk a nanoszálak kompozit készítmény MNP-FeTPPS tartalmát. A politejsav formulációját vizsgálva bebizonyítottuk, hogy az MNP tartalmú formulált PLA készítmények jelentősen javítják a metalloporfirin katalizátor katalitikus aktivitását, amit a nanoszálak formula tovább javított. A katalizátor aktivitása mellett, a nanoszálak formula az élettartamát is javította az MNP-hez rögzített metalloporfirin katalizátornak.

Aminocsoportokkal felületmódosított szilika felületére FeTPPS katalizátort rögzítettünk szakaszos és folyamatos áramú körülmények között. Amlodipin (**1**) és klorokin (**3**) heterogén szakaszos és folyamatos üzemi biomimetikus oxidációjában három különböző hosszúságú linker molekulát alkalmazva vizsgáltuk a szilárd hordozó és az FeTPPS porfirin katalizátor távolságának hatását a katalizátor aktivitására. Amlodipin (**1**) optimalizált folyamatos áramú biomimetikus oxidációjában vizsgáltuk a rögzített metalloporfirin katalizátor élettartamát. Elmondható, hogy élettartamukat tekintve a különböző hosszúságú linkerek között nem találtunk érdemi különbséget, valamint a rendszer kellően stabilnak bizonyult, mivel több mint 50 óra után sem csökkent lényegesen az oszlopon mérhető konverzió. A folyamatos áramú kísérleteket a korábban optimálisnak talált áramlási sebesség és oxidálószer mennyiség alkalmazásával végeztük. A linkerhosszúságra vonatkozóan a szakaszos rázatott reakcióban amlodipin (**1**) esetében a közepes, míg klorokin (**3**) esetében a legrövidebb linker bizonyult optimálisnak a biomimetikus transzformációban. A folyamatos áramú reakcióban amlodipin (**1**) esetében nem találtunk lényeges különbséget, míg a klorokin (**3**) esetében a közepes hosszúságú linker bizonyult optimálisnak a biomimetikus oxidációs átalakulásra vonatkozóan.

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált anyagok és vegyszerek

A kísérleteinkben felhasznált *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimetoxiszilánt (Si-2) a Merck Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. Amlodipin (1), klorokin (3), terc-butil-hidroperoxid, tetraetoxiszilán (TEOS), 3-aminopropil-trimetoxiszilán (Si-1), *N*-[3-(trimetoxiszilil)propil]-dietilén-triamin (Si-3) és a metil-trimetoxiszilánt (MeTMOS) a Sigma-Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország) terméke volt. 5,10,15,20-tetrakis-(4-szulfoniloxifenil)vas(II) porfirint (FeTPPS) és 5,10,15,20-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)vas(II) porfirint (FeTPPF) a Frontier Scientifictől (Logan, UT, USA) szereztük be. Desztillált vizet Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q víz tisztító rendszerrel állítottunk elő és ezt használtuk a vizes oldatokhoz. Humán, patkány és egér máj mikroszóma Xenotech Llc. (Kansas City, USA) terméke volt.

4.2. Hatóanyagok metalloporfirin katalizálta homogén szakaszos biomimetikus oxidációja

Egy Eppendorf mikrocentrifuga csőbe bemértük a megfelelő szubsztrát oldatát, majd oldószer kiegészítést adtunk hozzá, továbbá metalloporfirin oldatot és az oxidálószer oldatát (*t*BuOOH) pipettáztunk hozzá. Az elegyet ezt követően 1 órán át rázattuk, majd HPLC-DAD-MS módszerrel elemeztük.

4.3. Hatóanyagok rögzített metalloporfirin katalizálta heterogén szakaszos biomimetikus oxidációja

Eppendorf mikrocentrifuga csővekbe bemértünk rögzített metalloporfirint tartalmazó MNP-t, rögzített metalloporfirint tartalmazó szilikát vagy metalloporfirint tartalmazó nanoszálak készítményt, majd ehhez a megfelelő szubsztrátok oldatát adtuk. A heterogén rendszert rázattal vagy ultrahanggal diszpergáltuk. Az oldatot 1 ml-re kiegészítettük, majd a reakciót az oxidálószer (*t*BuOOH, 5 mólekvalens a szubsztrátok mennyiségére vonatkoztatva) hozzáadásával indítottuk. A reakcióelegyeket 1 órán át szobahőmérsékleten rázzuk. Mintavétel után HPLC-DAD-MS vagy UV-vis spektrofotométerrel vizsgáltuk a reakcióelegyeket.

4.4. Folyamatos áramú mikrofluidikai mikrochip-reaktorban megvalósított reakciók

A reaktor feltöltését és a mikrofluidikai biomimetikus oxidációt egyaránt a Magneflow rendszer alkalmazásával valósítottuk meg. A metalloporfirinnel borított mágneses nanorészecskék szuszpenzióját fecskendőpumpa segítségével áramoltattuk keresztül a mikrofluidikai chipen. A reakciókamrákban felhalmozódó hordozós katalizátorokat a kamrák alatt elhelyezkedő állandó mágnesek tartották helyhez kötve. A katalizátor ágyon keresztül fecskendőpumpa segítségével a megfelelő szubsztrát törzsoldatát áramoltattunk

keresztül, amely oxidálószer is tartalmazott (*t*BuOOH 70 %-os vizes oldata, 5 ekvivalens a szubsztrátokra vonatkoztatva). A reakciót különböző áramlási sebességek mellett hajtottuk végre. Az egyensúlyi koncentrációk beállta után mintát vettünk, amelyet feldolgozás nélkül, közvetlenül mértünk HPLC-DAD-MS technikával.

4.5. Szubsztrátok biomimetikus oxidációja folyamatos áramú körülmények között mezoreaktorban

Oxidálószer (*t*BuOOH, 2 mólekvalens) tartalmazó szubsztrát oldatot áramoltattuk át a megfelelő szilikáthoz (Si-1, Si-2 vagy Si-3) rögzített FeTPPS katalizátorral töltött reaktoron keresztül. Mintát 20 perc elteltével 5 percen keresztül vettünk, és HPLC-DAD-MS módszerrel vizsgáltuk.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek **Dr. Balogh-Weiser Dianának**, hogy lehetőséget biztosított kutatómunkám elvégzésére, bizalmával megtisztelt és támogatott a kutatómunkám és a dolgozatom elkészítése során. Hálatelt szívvel mondom köszönetet konzulensemnek és korábbi témavezetőmnek **Dr. Balogh György Tibornak**, hogy lehetőséget biztosított a munkám során felmerült analitikai vizsgálatok elvégzésére és a sok beszélgetésért, amik nélkül nem tudtam volna a doktori munkám végére érni. Köszönetet mondom konzulensemnek **Dr. Poppe Lászlónak**, aki a Bioorganikus Kémiai Kutató csoportban lehetőséget biztosított a heterogén és folyamatos áramú kémiai kísérleteim elvégzésére. Köszönetet mondom **Dr. Kupai Józsefnek** és **Dr. Földi Tamásnak**, akik nélkül nem ismertem volna meg témavezetőimet, konzulenseimet és a kutatási témámat. Köszönetet szeretnék mondani hallgatóimnak, családomnak és az összes kollégának, aki doktori munkám során segítséget nyújtott. A doktori munkám a Servier-Beregi ösztöndíj támogatásával valósult meg.

Hivatkozások

1. Nebert, D. W.; Russell, D. W. Clinical Importance of the Cytochromes P450. *The Lancet* **2002**, 360 (9340), 1155., [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7)
2. Asha, S.; Vidyavathi, M. Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs—A Review. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* **2010**, 160 (6), 1699., <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8689-6>
3. Földi, T. *et al.* Biomimetic Synthesis of Drug Metabolites in Batch and Continuous-Flow Reactors. *Chem. Eur. J.* **2018**, 24 (37), 9385., <https://doi.org/10.1002/chem.201800892>
4. Decsi, B. *et al.* Liver-on-a-Chip—Magnetic Nanoparticle Bound Synthetic Metalloporphyrin-Catalyzed Biomimetic Oxidation of a Drug in a Magnechip Reactor. *Micromachines* **2019**, 10 (10), 668., <https://doi.org/10.3390/mi10100668>

5. Balogh-Weiser, D. *et al.* Magnetic Nanoparticles with Dual Surface Functions—Efficient Carriers for Metalloporphyrin-Catalyzed Drug Metabolite Synthesis in Batch and Continuous-Flow Reactors. *Nanomaterials* **2020**, *10* (12), 2329, <https://doi.org/10.3390/nano10122329>
6. Balogh-Weiser, D. *et al.* Novel Biomimetic Nanocomposite for Investigation of Drug Metabolism. *J. Mol. Liq.* **2022**, *368*, 120781., <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120781>
7. Balogh, Gy. T. *et al.* 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>

Development of metalloporphyrin-based biomimetic oxidizing systems from carrier system to application

During my doctoral work, I focused on the development of synthetic metalloporphyrin-based heterogeneous biomimetic oxidation systems. By integrating carrier-supported metalloporphyrin catalysts into continuous-flow systems, we produced oxidative metabolites of pharmaceutical active ingredients in a single step, directly starting from the parent compound. The development of these systems is important as they can complement traditional *in vivo* and *in vitro* cell-based systems, aiding in optimizing new active ingredients and predicting or producing their metabolites during drug development.

Initially, synthetic metalloporphyrin was covalently and ionically attached to the surfaces of magnetic nanoparticles (MNPs) coated with a silica layer that had been modified in various ways. The surface's physicochemical properties were altered using different inert groups, among which the methyl group proved optimal in a reaction optimization process. Therefore, this was used in subsequent reactions involving MNP-based systems. The MNP-based system's operation was studied in batch reactions, and the optimal ratio of active amino groups to inert methyl groups on the carrier surface was determined. The optimized MNP-FeTPPS catalyst was packed/trapped in a microchip reactor to perform the continuous-flow microfluidic biomimetic oxidation of amlodipine (**1**). This resulted in a stable system with low substrate requirements that, coupled with suitable analytical methods, could be used for producing and identifying metabolites of new drug candidates.

For the first time, synthetic metalloporphyrin was incorporated into a polylactic acid-based nanofiber matrix prepared via electrospinning. It was found that polylactic acid nanofibers alone could not sufficiently retain the metalloporphyrin. Therefore, by attaching it to MNPs, we created the first synthetic metallopor-

phyrin-containing nanofiber composite catalyst, which was effective in securing the catalyst. In the biomimetic oxidation of amlodipine (**1**), the MNP-FeTPPS content of the nanofiber composite was optimized. Analyzing the polylactic acid formulation demonstrated that MNP-containing formulated PLA significantly enhanced the catalytic activity of the metalloporphyrin catalyst, further improved by the nanofiber formulation. Besides increasing catalytic activity, the nanofiber formulation also extended the lifespan of the MNP-bound metalloporphyrin catalyst.

FeTPPS catalysts were immobilized on the surface of silica gel modified with amino groups under batch and continuous-flow conditions. During the heterogeneous batch and continuous biomimetic oxidation of amlodipine (**1**) and chloroquine (**3**), the effect of the distance between the solid support and the FeTPPS porphyrin catalyst on activity was examined using three linker molecules of different lengths. In the optimized continuous-flow biomimetic oxidation of amlodipine (**1**), the lifetime of the immobilized metalloporphyrin catalyst was evaluated. It was observed that there were no significant differences in lifespan among the linkers of different lengths, and the system demonstrated adequate stability, with no substantial decrease in column conversion even after more than 50 hours. Continuous-flow experiments were performed using the previously optimized flow rate and oxidant quantity. Regarding linker length, in batch-shaken reactions, the medium-length linker was optimal for amlodipine (**1**), while the shortest linker was optimal for chloroquine (**3**) in biomimetic transformations. In continuous-flow reactions, no significant difference was observed for amlodipine (**1**), whereas the medium-length linker was optimal for the biomimetic oxidation of chloroquine (**3**).