

HORMONOK ÉS NEUROTRANZMITTEREK IMMUNOLÓGIAI  
VIZSGÁLATÁHOZ SZÜKSÉGES VEGYÜLETEK SZINTÉZISE

Doktori értekezés

VARGA JÁNOS

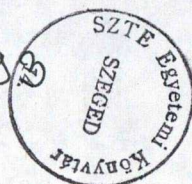


Szeged 1982

Szegedi Orvostudományi Egyetem  
Orvosi Vegytani Intézete



B 5098



E 2.200



## Tartalomjegyzék

|      |                                                                |     |
|------|----------------------------------------------------------------|-----|
| I.   | Bevezetés                                                      | 1   |
| II.  | Elméleti rész                                                  |     |
| A/1  | Immunológiai alapfogalmak                                      | 4   |
| 2    | Antigének általános jellemzése                                 | 4   |
| 3    | Az antigén modell                                              | 5   |
| 4    | Antigének minőségellenőrzése                                   | 6   |
| 5    | Ellenanyagok jellemzése                                        | 6   |
| B/6  | Részletes célkitűzések                                         |     |
| 1    | Szteroid-hormonok                                              | 10  |
| 2    | Neurotranszmitterek                                            | 17  |
| C/1  | Szteroid-antigének szintézisének irodalmi áttekintése          | 23  |
| 2    | Neurotranszmitter-antigének szintézisének irodalmi áttekintése | 28  |
| 3    | Az előállított vegyületek jegyzéke                             | 34  |
| D/   | Antigének szintézise                                           |     |
| 1    | Szteroid-antigének előállítása                                 | 37  |
| 2    | Neurotranszmitter-antigének előállítása                        | 42  |
| 3    | Immobilizált származékok előállítása                           | 58  |
| E/   | Aznantigének felhasználásával elért biológiai eredmények       | 61  |
| III. | Kísérleti rész                                                 | 63  |
| IV.  | Összefoglalás                                                  | 104 |
| V.   | A disszertáció témájából megjelent saját publikációk jegyzéke  | 106 |
| VI.  | Felhasznált szakirodalom                                       | 111 |
| VII. | Függelék                                                       | 117 |



## A dolgozatban felhasznált rövidítések jegyzéke

A rövidítések általában megfelelnek az IUPAC javaslatának /J. Biol. Chem. 247 977 /1972/, a ritkábban használt rövidítések a következők:

|                  |   |                                      |
|------------------|---|--------------------------------------|
| RIA              | - | radioimmun-analitika                 |
| ICC              | - | immuncitokémia                       |
| AGS              | - | adrenogenitális szindróma            |
| GABA             | - | gamma-amino-vajsav                   |
| DANSYL           | - | 5-dimetilamino-naftalin-szulfonil-   |
| BSA              | - | marha szérumalbumin                  |
| ACTH             | - | adreno-kortikotrop hormon            |
| DHEA             | - | dehidro-epi-androszteron             |
| PNMT             | - | fenil-etanolamin-N-metil-transzferáz |
| DDC              | - | DOPA-dekarboxiláz                    |
| DBH              | - | dopamin-béta-hidroxiláz              |
| FITC             | - | fluoreszcein-izo-tiocianát           |
| NMR              | - | mágneses magrezonancia               |
| HS               | - | hemiszukcinát                        |
| BCMO             | - | bisz-karboximetil-oxim               |
| CMO              | - | karboximetil-oxim                    |
| BOC              | - | terc-butiloxikarbonil-               |
| OBu <sup>t</sup> | - | terc-butilészter                     |
| SDS              | - | nátrium-dodecilszulfát               |
| Z                | - | benziloxikarbonil-                   |
| DOPS             | - | dihidroxifenilszerin                 |
| DOPA             | - | dihidroxifenilalanin                 |
| TAI              | - | triklór-acetil-izocianát             |
| Et               | - | etil-                                |
| Me               | - | metil-                               |
| DCHA             | - | diciklohexilamin                     |
| SMC              | - | szukcinil-monokolin                  |
| DMF              | - | dimetilformamid                      |
| TPS              | - | trimetilszilil-propánszulfonsav-Na   |
| TMS              | - | tetrametilszilán                     |



## B E V E Z E T É S

A heterotrof szervezetek regulációjában két integratív rendszer vesz részt; a hormonrendszer és az idegrendszer. A kettő működése olyannyira egybefonódik, hogy elválasztásuk sok esetben indokolatlan, ezért szokták együttesen neurohumorális rendszernek is nevezni. Az összefüggést bizonyítja az is, hogy régebben az ideggyógyaszatban tárgyalt diencefalon-hipofízis-rendszer betegségei ma már az endokrinológia tárgykörébe tartoznak. Néhány jellegzetes különbséget azonban felismerhetünk a kétféle reguláció között.

A humorális szabályozás vegyi alapjai a hormonok. Jellemző rájuk, hogy termelési helyüktől rendszerint távol és igen kis koncentrációban is hatásosak. A célsejtekhez /target cells/ a véráram juttatja el azokat. Koncentrációjuk a plazmában igen alacsony, pontos mennyiségi meghatározásukat ez a körülmény - a legutóbbi évtizedig - megakadályozta. Kémiaailag a fehérjék, polipeptidok, lipoidok, illetve az aminosav-származékok csoportjába tartoznak.

A neurotranszmitterek az idegingerület kémiai átvivő anyagai. Jellemzőiket Vizi /1/ alapján a következő pontokban foglalhatjuk össze:

- a/ mennyiségük idegingerlés hatására a nyugalmi értékhez képest jelentősen megnő,
- b/ jelenlétük farmakológiai, fiziológiai és kémiai módszerekkel egyaránt igazolható,
- c/ bizonyítható, hogy a szervezetbe történő adagolásuk az idegingerléssel azonos hatást vált ki,
- d/ bizonyos vegyületek azonosan befolyásolják az idegingerlést, illetve a beadott anyag hatását,
- e/ az adott idegsejtben a transzmitter szintéziséért felelős specifikus enzimrendszer mutatható ki,



f/ a transzmittort enzim, vagy enzimrendszer bontja le, hatástalanítja.

Történeti érdekesség, hogy a Schäfer és Oliver által 1894-ben mellékveséből izolált presszor hatású anyagról - hormonról - később kiderült, hogy mind a vegetatív mind a központi idegrendszerben igen fontos szerepet betöltő neurotranszmitter. Az utóbbi 10-15 évben hasonló jelenségeknek lehetünk tanúi, a gyomor-bél traktus ismert hormonjait - gasztrint, kolekisztokinin-pankreoizimint, "igen nagy" - a gyomor-bél rendszeri koncentrációjukat lényegesen meghaladó mennyiségben megtalálták a központi idegrendszerben, s ma már egyre többen vallják, hogy neurotranszmitter, illetve neuromodulátor funkciót látnak el. Ezt a szemléletet tükrözi a neuropeptid elnevezés is.

A mai kutatási színvonalon elengedhetetlen a hormonok, neurotranszmitterek és egyéb biológiailag aktív vegyületek szervezetben lévő koncentrációjának pontos mérése. A kutatási követelményeken túlmenően ma már magas színvonalu orvosi ellátás - pl. az endokrinológia területén - elképzelhetetlen pontos mérések nélkül.

A XX.sz. második felében ezt a régóta meglévő igényt, azükségletet a radioimmun-analitika, illetve az immuncitológia kifejlesztésével sikerült kielégíteni.

### Kísérleteink célja:

olyan szteroid hormon- és neurotranszmitter-származékok előállítására, melyek alkalmasak a fent említett két módszer /RIA, ICC/ kidolgozására.

Mivel kísérleteink elsődlegesen a kutatás és a klinikai, orvosi gyakorlatban felmerült igények kielégítését szolgálták, így minden esetben a biológiai vizsgálatokat végző partnerekkel egyetértésben döntöttünk arról, hogy mely neurotranszmittert vagy szteroid hormont használjuk fel.



A munkánk során felhasznált vegyületeket a következőképpen csoportosíthatjuk:

A/ Szteroid hormonok

- a/ Glükokortikoid diagnosztikában felhasználható szteroidok
- b/ Mineralokortikoid diagnosztikában felhasználható szteroidok
- c/ Androgén diagnosztikában felhasználható szteroidok
- d/ Adrenogenitális szindróma /AGS/ diagnosztikájában felhasználható szteroidok
- e/ Szintetikus szteroidok
- f/ Néhány egyéb szteránvázas vegyület
- g/ Néhány radiojód-jelzett szteroidszármazék szintézise.

B/ Neurotranszmitterek

Adrenalin  
Noradrenalin  
Dopamin  
Szerotonin  
Hisztamin  
Acetilcolin  
GABA

- C/ Neurotranszmitterek, illetve azok antigénjeinek Sepharose 4B-n immobilizált származékai.



## Elméleti rész

### A/ Immunológiai alapfogalmak

Mind a radioimmun-analitikai mind az immuncitokémiai meghatározáshoz, illetve kimutatáshoz antiszérumra /antitestre/ van szükség. Ezt általában mesterséges immunizálással állítjuk elő. Az immunizálás elengedhetetlen előfeltétele az antigén megléte. A szteroidok, illetve a neurotranszmitterek antigénjei a természetben nem fordulnak elő, ezért ezeket mesterségesen kell előállítani.

Mit jelent az antigén fogalom?

Az elnevezés Detre Lászlótól származik és olyan anyagot értünk alatta, mely fejlett és ép immunrendszerrel bíró gerinces szervezetében specifikus immunválaszt eredményező folyamatot képes megindítani és a folyamat produktumához - az antitesthez - in vivo és in vitro specifikusan képes kötődni.

### Az antigének általános jellemzése

A különböző antigének különböző erősségű immunogénitással rendelkeznek. A legerősebb immunogének a fehérjék. Egebben ezen tulajdonság megjelenését kizárólag a molekulasúly függvényének tekintették. A legkisebb vegyület, mely még önmagában is antigén - jóllehet gyenge immunogénitással rendelkezik - a vazopresszin /Ms: 1082/. Az ezres molekulatömeg alatti vegyületek már a haptének, vagy a haptidok csoportjába tartoznak. A fentiek ellenére legalább ennyire fontos a molekulák merevsége is, ezért ma már nemcsak molekulatömeget tekintik döntő kritériumnak. Landsteiner figyelte meg először /1921-ben/, hogy bizonyos kis molekulatömegű anyagokk fehérjékhez kapcsolva immunogénekké válnak. Ezeket az anyagokat hapténeknek nevezte el. /2/. Az immunizáláskor nyert antisavó nemcsak a élő fehérjével, hanem a hozzákapcsolt hapténnel is reagálni fog. A szteroidok és a neurotransmitte-



rek is a haptének közé tartoznak.

### Az antigén modell

Jó tulajdonságu antitestek nyeréséhez elengedhetetlenül szükséges a megfelelő minőségű, antigén; ugyanis, ha az nem egységes, sok szennyeződést tartalmaz, nem lehet jó minőségű, megfelelő jellemzőkkel rendelkező antiszérumot nyerni.

A kísérletek során kiderült, hogy bár a tisztaság szükséges, de nem elégséges feltétel. Midglay és Niswender /3/ nevéhez fűződik az antitestek néhány fontos tulajdonságának tisztázása. Ők állapították meg, hogy az antitest legtöbb esetben "far sighted" azaz "messzelátó". Ez azt jelenti, hogy nem ismeri fel a haptén fehérjéhez való kapcsolási helyéhez közel lévő csoportok minőségét.

Az antitest másik fontos tulajdonsága: "non remembered", ami azt jelenti, hogy a fehérjéhez való kapcsolatban részt vevő csoportok korábbi - a kötés előtti - szerkezetét sem ismeri fel. E két tulajdonságot egy-egy példán szeretném illusztrálni.

A 11-es helyzetben kapcsolt szteroid-protein-konjugátumokkal szemben nyert antitest a legnagyobb specificitást az A,Dagyűrűre, illetve az oldalláncra mutat. A 6-os helyzetben kapcsolt konjugátumokkal szemben nyert antiszérum viszont tekintélyes-mértékű keresztreakciót ad a 6-os szénatomhoz közeli 5-hidroxi, illetve 4-én származékokkal. / /

Grota és Brown /4/ tiramint, oktopamint és szinefrint 3-as helyzetben formaldehiddel kapcsolt fehérjéhez. Mivel így a 3-as helyzetben metilénecsoport alakult ki, az antiszérum "nem emlékezett", hogy eredetileg ott hidrogén, hidroxil vagy metoxicsoport volt-e jelen; ezért érthető, hogy pl. a kapott antiszérum metanefrinnel szemben többszáz százalékos keresztreakciót adott.

A fenti okok miatt a kutatók keresik azokat a kapcsolási lehetőségeket, amelyek új funkciós csoportok bevitelével valósulnak meg. Az eredeti funkciós csoportokat



lehetőleg érintetlenül hagyják. Erre is szeretnék egy példát bemutatni.

A tesztoszteron esetében a 4-es helyzetű kettőskötés lehetővé teszi az allil-helyzetű brómozást. Ezt követően vízmentes tioglikolsavval tioétert alakítottak ki. Másik esetben pedig a 6-os helyzetű kettős-kötésre addicionálták a vízmentes tioglikolsavat. Így jutottak a 6-os és 7-es helyzetben kapcsolt konjugátumokhoz.

Szintén jelentős a kapcsoláshoz használt összekötőlánc /spacer/ hossza is. Egy bizonyos távolságot el kell érnie, ez kb. 7-10 Å. Minél jobban kiemelkedik a fehérje felszínéről a haptén, annál jobb lesz az immun-válasz. /Ezért használják szívesen a szteroidok esetében a 4 szénatomos borostyánkősavat./ Fontos, hogy a hordozó molekula jó immunogén legyen, ugyanis ha gyenge immunogén, akkor csak alacsony titerű antiszérumra számíthatunk.

A fentieken kívül az immun-választ nagy mértékben befolyásolja a hordozóhoz kapcsolt haptének száma, vagy más kifejezéssel élve a haptén/hordozó hányados. E mutató tényleges jelentőségéről megoszlanak a vélemények. Elvileg minél nagyobb ez a hányados, annál jobb immun-válasz várható. Tudunk olyan sikeres immunizálásról is, amikor a haptén/hányados értéke csupán 7-10 között volt. /Béta-ekldizon/ Annyit mindenesetre leszögezhetünk, hogy a mesterséges antigének kémiai minőségellenőrzésének egyik sarkalatos pontja a haptén/hordozó arány megállapítása.

### Antigének minőségellenőrzése

A számtalan elméleti és gyakorlati lehetőség közül csak azokat emeljük ki, melyeket munkánk során alkalmaztunk.

#### 1/ Ultraibolya spektrofotometria

Ez a módszer csak abban az esetben alkalmazható, ha a molekula szerkezete bizonyos feltételeknek eleget tesz /van ultraibolya elnyelése/. Ebben az esetben a leg-



nagyobb hullámhosszuságú abszorpciós maximum eltolódásából, illetve a moláris dekadikus extinkciós koeficiens nagyságának megváltozásából számíthatjuk a haptén/hordozó arányt.

## 2/ Isoelektromos fókuszálás

A BSA I.E.P.-ja 4.88. A bázikus jellegű aminosavak savamid-kötésbe vitelével arányosan csökken a fehérjén a bázikus csoportok száma, így az I.E.P.-ja is. A csökkenés mértékéből következtethetünk a haptén/hordozó arányára. Ezt a módszert szteroid-antigénjeink és az acetilkolin-antigén esetében alkalmaztuk. A kapott eredmények 4.4-4.6 közé estek. Az acetilkolin-antigén I.E.P.-ja 5.3 volt.

## 3/ Nitrogén-analízis

A szteroidok nitrogént általában nem tartalmaznak. Az általunk előállított hemiszukcinátokban szintén nincs nitrogén; az oximokban 1, illetve 2 van. Ez utóbbi esetben a szteroidok nitrogén tartalma 1-5 % közé esik, ha tehát ilyen molekulát fehérjéhez kovalensen kapcsolunk, akkor a konjugátum nitrogén tartalmának értéke a fehérje nitrogén tartalma / 16% / és a szteroid nitrogén tartalma között lesz. Az eredeti értéktől való eltérésekből számolható a felkötött szteroid mennyisége. Szteroid-konjugátumaink nitrogén tartalma minden esetben 11-13% között volt. Neurotranszmitterek esetében ez a módszer nem alkalmazható, mivel ezen vegyületek nitrogén tartalma nem tér el lényegesen a fehérjék nitrogén tartalmától.

## 4/ Aminosav-analízis

Néhány neurotranszmitter esetében alkalmazott módszer, melynek segítségével valamely ismert - a hordozó fehérjében előforduló stabil aminosavhoz - u.n. belső standardhoz képest meghatározzuk a neurotranszmitter - karbonsav arányát. Ismerve, hogy hány standard aminosav található a hordozó molekulában, számolható a haptén/hordozó arány.



## 5/ Spektrofluorimetria

A mérés azon az elven alapul, hogy a konjugátum szabadon maradt aminos csoportjaihoz fluorimetriás mérésekhez alkalmas vegyületet kötünk, pl. 5-dimetilamino-nafta - linszulfonil-csoportot viszünk be. A DANSYL-BSA, ill. a DANSYL-konjugátum fluoreszcenciájának intenzitásbeli különbségéből következtethetünk a haptén/hordozó arányára. Szteroid-konjugátumaink esetében ez az érték 30-70 % között mozgott. /Ez jó egyezést mutat a nitrogén-analízis eredményével./

## 6/ Radioaktív izotop alkalmazása

Az izotopot tracer mennyiségben alkalmaztuk. A kapott konjugátum aktivitásának mértékéből - teljes biztonsággal - számíthatjuk a haptén/hordozó arányt. Munkánk során ezt a módszert az acetikolin-antigén ellenőrzésekor alkalmaztuk.

## Az ellenanyagok jellemzése

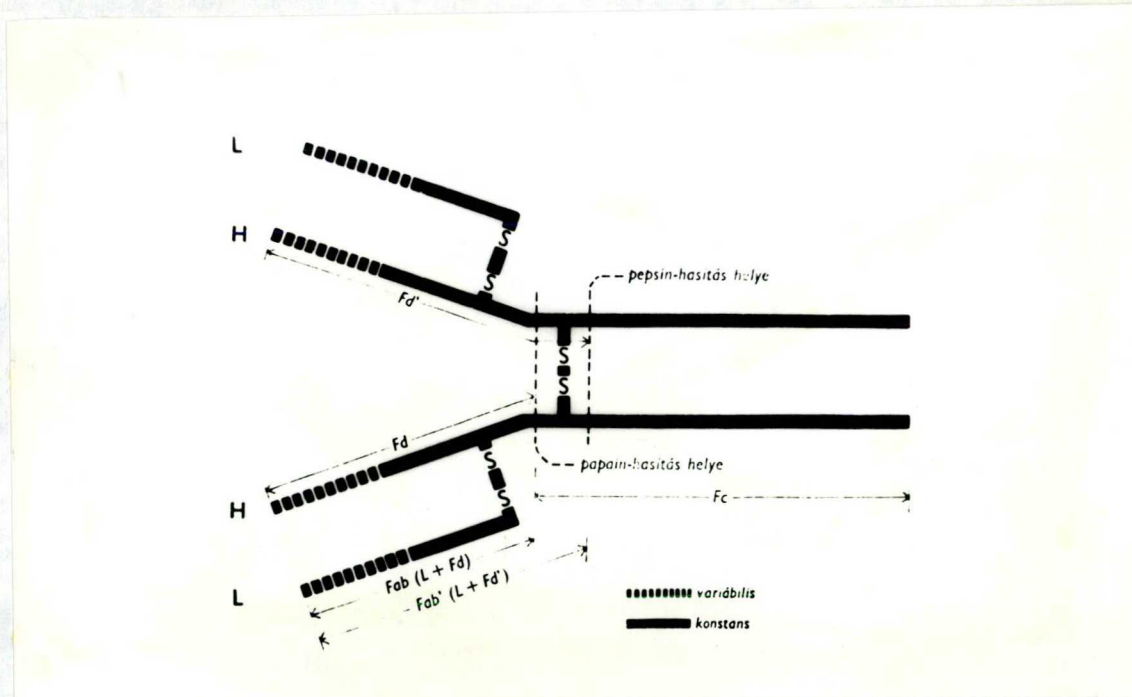
Az ellenanyagok szervezetben való bioszintézisét még nem ismerjük tökéletesen, néhány fontosabb részlet azonban már bizonyított. Biztosra vehető, hogy egy antitest-termelő sejt mindig csak egy adott antitestet termel. Az antitest-antigén reakcióról Landsteiner nyomán feltételeztük, hogy nem kovalens jellegű, hanem hidrogén- illetve van der Waals-kötések alakulnak ki. Az immunglobulinok két könnyű /light/ és két nehéz /heavy/ láncból épülnek fel. Az IgG esetében két antigén-kötőhellyel rendelkezik az antitest. Az antigén-kötőrész a homológ antigén determináns csoportjainak tükörképe. A kettő úgy illeszkedik egymásba, mint a kulcs a zárba. /"A key fitting in its lock"./ /2/

A WHO 1964-ben tette közzé az immunglobulinok felosztását. A felosztás alapja a molekula szerkezete, a molekula súlya, biológiai felezési ideje stb. A fentiek alapján 6 osztályt különböztetünk meg: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE és IgU. Az egyes osztályok ismertetése helyett csak a mole -



kula szerkezetében fellelhető közös tulajdonságokat emeljük ki /5/.

Minden immunglobulin szerkezete alap-vonásaiban megegyezik: páros számú polipeptid-láncok alkotják őket, melyeket diszulfidhidak kapcsolnak össze. Egy immunglobulin molekulán belül egy pár kisebb molekulasúlyú könnyű láncot és egy pár nagyobb molekulasúlyú nehéz láncot különböztetünk meg. A könnyű láncok azonosságán alapszik az immunglobulin osztályok szerkezeti rokonsága, míg a nehéz láncok különbsége adja az osztályok közötti szerkezeti különbséget. Az immunglobulinok aminosavszekvencia-analizise alapján megállapították, hogy mind a könnyű mind a nehéz lánc tartalmaz egy változó szekvenciájú N-terminális részt /variable region/ és egy konstans szekvenciájú C-terminális részt. Az immunkémiai specificitásért a variábilis részek, a biológiai specificitásért pedig a konstans részek a felelősek. Az ellenanyagok bivalens antigén-kötőhellyel rendelkeznek. Feltételezhető, hogy az antigén-antitest kötődés kialakulásakor az immunglobulin molekulák egy adott kapocspont körül szétnyílnak.





## C é l k i t ű z é s e k

A kooperáló orvoscsoportok kérésére a következő vegyületek immunkémiában használható származékainak előállítását tűztük ki célul: / a vegyület neve után röviden utalunk orvosi jelentőségére/.

### A/ Szteroid-antigének

Jelentőségük, illetve diagnosztikában betöltött szerepük alapján a következő csoportokba sorolhatók:

- a/ glükokortikoidok
- b/ mineralokortikoidok
- c/ androgének
- d/ adrenogenitalis szindrómában szerepet játszó szteroidok
- e/ szintetikus szteroidok
- f/ egyéb szteroidok

#### a/1 kortizol

különleges jelentőségét az adja meg, hogy emberben ez a fő glükokortikoid. Diagnosztikailag szintén fontos, ugyanis kortizol anyagcserezavaron sok betegség alapul, illetve anyagcserezavara számos betegségben előfordul;

- primer mellékvese-elégtelenség /pl. Addison kór/
- szekunder mellékvese-elégtelenség
- totális vagy részleges adrenalektomia
- Waterhouse-Friderichsen szindróma
- Cushing szindróma
- stressz állapotok
- mellékvese karcinoma
- ektopiás ACTH szindróma
- anorexia nervosa
- depresszió
- hemodialízis, stb.



a/2 Kortizon

Egy májban lévő enzim - a 11-dehidrogenáz - hatására kortizolból keletkezik. Klinikai - diagnosztikai jelentősége nem nagy.

a/3 Kortikoszteroid

Emberben a második legfontosabb glükokortikoid. Ennek megfelelően diagnosztikai jelentősége vetekszik a kortizol diagnosztikai jelentőségével. Mineralokortikoid hatása kifejezettebb a kortizolnál, ezért szintjének mérése az a/1 pontban felsoroltakon kívül fontos lehet még:

- hipertóniában
- hipokorticismusban

a/4 11-dezoxi-kortizol

A kortizol anyagcsere során képződik a mellékvesében.

Biológiai hatása alig ismert. Mérése fontos:

- metopiron-tesztben /11-hidroxiláz-gátlás/
- 11-hidroxiláz defektusok kimutatásában

a/5 6-hidroxi-kortizol

A kortizol - 6-hidroxikortizol átalakulás a 6-hidroxiláz hatására megy végbe. Ez az enzim a máj mitokondriumában található. Megfigyelték az enzim aktivitásának változását pl. altatószer-mérgezésben. A kortizol/6-hidroxi-kortizol arány a máj detoxikáló képességét mutatja.

b/1 Aldoszteron

Legfontosabb mineralokortikoid szerepét, fontosságát a következő kórképekben érdemes kiemelni /6/:

1/ hiperaldoszteronizmus

primær:

- mellékvesekéreg adenoma
- mellékvesekéreg hiperplázia

szekunder:

- hipertóniák
- vese-arteria szűkület
- akut és krónikus vesecélgeztelenség
- malignus hipertónia
- renin-produkáló vesetumzorok



Számos olyan kórképben lényegesen az aldoszteron-szint mérése, ahol hipertónia nem fordul elő pl.

- ödéma / májcirrhotosis ascites-szel, nephrosis/
- Bartter szindróma
- pseudo Bartter szindróma
- mellékvesekéreg betegségek /pl. 21-hidroxiláz defektus/

## 2/ Hipoaldoszteronizmus

primer:

pl. aldoszteron bioszintézis-zavar vagy az AGS speciális formája

szekunder:

pl. hipofízis-elégtelenség vagy megnövekedett ACTH szekrécióval járó Cushing szindróma

### b/2 18-hidroxi-kortikoszteron

Mineralokortikoid hatása igen csekély. Jelentősége abban áll, hogy az aldoszteron számbajöhető prekursora.

### b/3 18-hidroxi-dezoxi-kortikoszteron

Mineralokortikoid aktivitása nagyon csekély. Jelentősége - a 18-hidroxi-kortikoszteronnal együtt - abban áll, hogy az aldoszteron feltételezett prekursora.

### b/4 dezoxi-kortikoszteron

Az aldoszteron mellett a másik legaktívabb mineralokortikoid. Klinikai jelentősége abban áll, hogy megnövekedett ACTH termelés esetén /pl. hipofízis Cushing szindróma/ termelése megemelkedik és magas vérnyomást hoz létre.

### b/5 Astonin-H

Mineralokortikoid, igen jelentős gyógyszer: hipotóniában alkalmazzák. Metabolizmus vizsgálatra készült antigénje.

### b/6 Tetrahidro-aldoszteron

Meglehetősen biztonsággal alkalmazható hipertóniás betegek hiperaldoszteronizmusának kizárására, illetve a hiperaldoszteronizmussal járó kórképek felderítésére.



c/1 Tesztoszteron

A legfontosabb him szexuálhormon. Diagnosztikai jelentőségét a következőkben foglalhatjuk össze:

a/ kromoszóma elváltozások

Klinefelter szindróma

XX szindróma férfiaknál

Turner szindróma

kevert gonád fejlődési zavar

valódi hermafroditizmus

b/ gonádok elváltozásai

gonádok tiszta fejlődészavara

hiányzó herék

here hipoplazia, gyulladás, tumor, stb.

kriptorizmus

c/ szexuális fenotípus elváltozás

női pseudo-hermafroditizmus

férfi pseudo-hermafroditizmus

tesztoszteron bioszintézis zavara

androgén rezisztencia

a Müller és Wolf csövek izolált fejlődési zavara, stb.

c/2 Dihidro-tesztoszteron

A periférián keletkezik tesztoszteronból. Jelentősége abban áll, hogy a célszervek sejtjei rendelkeznek dihidro-tesztoszteron receptorokkal, így sok hatásért talán nem a tesztoszteron, hanem a dihidro-tesztoszteron a felelős.

c/3 Dehidro-epi-androszteron

A mellékvesekéregben keletkezik. Jelentősége, hatása főbb vonalakban a tesztoszteronnal egyezik meg.

d/ Valamennyi eddig tárgyalt szteroid szintjének mérése szükséges lehet az AGS pontos típusának meghatározásában. Ezen kívül kiemelt jelentőségű még a

17- $\alpha$ -hidroxi-progeszteron

a kongenitális mellékvese-hiperplazia egyik fajtájában a 21-hidroziláz defektus miatt 17- $\alpha$ -hidroxi-progeszteron nem alakul át 11-dezoxi-kortizollá. Ezért a 17- $\alpha$ -hidroxi-progeszteron és a belőle keletkező



pregnantriol felszaporodik a vizeletben.

Pregnenolon

3-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz hiánya miatt a pregnenolon-progeszteron átalakulás nem megy végbe, ezért szintje megemelkedik /jelentősen megemelkedik a DHEA szintje is./

17- $\alpha$ -hidroxipregnenolon

A 17- $\alpha$ -hidroxiláz hiánya miatt nem keletkezik pregnenolonból. A 17- $\alpha$ -hidroxiprogesteronnál finomabb diagnózist tesz lehetővé.

- e/ Prednizolon  
Triamcinolon  
Betametazon  
Dexametazon  
Beklometazon

Mindenek előtt a kísérletes és klinikai farmakológiában van nagy jelentőségük. RIA segítségével meghatározható a felszívódásuk, transzportjuk, kiválasztódásuk, egyéni variációk stb.

f/1 Substanz A

Patkányban ez a fő kortikoid, ugyanis 17- $\alpha$ -hidroxiláz hiánya miatt hidrokortizon nem keletkezik. Ez /ritkán/ emberben is előfordul.

f/2 Allo-tetrahydro-kortizol

A tetrahydro-kortizol allo derivátuma. Megjelenése minden esetben metabolikus zavarra utal. Egyes szerzők felvetik az allo-derivátumok megjelenése és a gyengeelméjűség közötti összefüggés lehetőségét.

f/3 D<sub>3</sub>-vitamin

Szintjének ismerete igen fontos. Ezáltal felismerhetők a vitaminhiányos állapotok s a rachitis megelőzhető, másrészt tuladagolása is elkerülhető. Metabolizmusának vizsgálata szintén jelentős.

A kísérleteink során felhasznált többi szteroid antigénjét a RIA mérési lehetőségek kibővítése céljából állítottuk elő.





#### f/4 Radioaktív származékok szintézise

A radioimmun-analitika kidolgozásának egyik alapvető, elengedhetetlen feltétele, hogy a szükséges szteroid radioaktív származéka rendelkezésre álljon. Megoszlanak a vélemények arról, hogy a triciált vagy a radiojód származék az előnyösebb-e?

Mi szól a trícium mellett?

- hosszú felezési ideje,
- a jelölt származék sokáig eltartható
- tökéletesen egyezik a nativ hormonnal
- a kibocsátott sugárzás áthatolóképesége aránylag kicsi

Mi szól ellene?

- a hulladékát hosszú ideig kell tárolni
- csak bonyolult szintézis árán építhető be a szteroid molekulába
- folyadék-szcintillációval mérhető, aminek igen nagy vegyszer igénye van
- alacsony specifikus aktivitás érhető el vele
- aránylag kevés triciált szteroid kapható a kereskedelemben

A fenti hátrányokkal szemben a radiojód-jelölésnek számos előnye van:

- rövid felezési ideje / napok vagy hetek /
- magas specifikus aktivitás érhető el vele
- könnyen előállítható a jelölt hormon
- az aktivitás gamma-számlálóval mérhető
- olcsó

Hátrányai

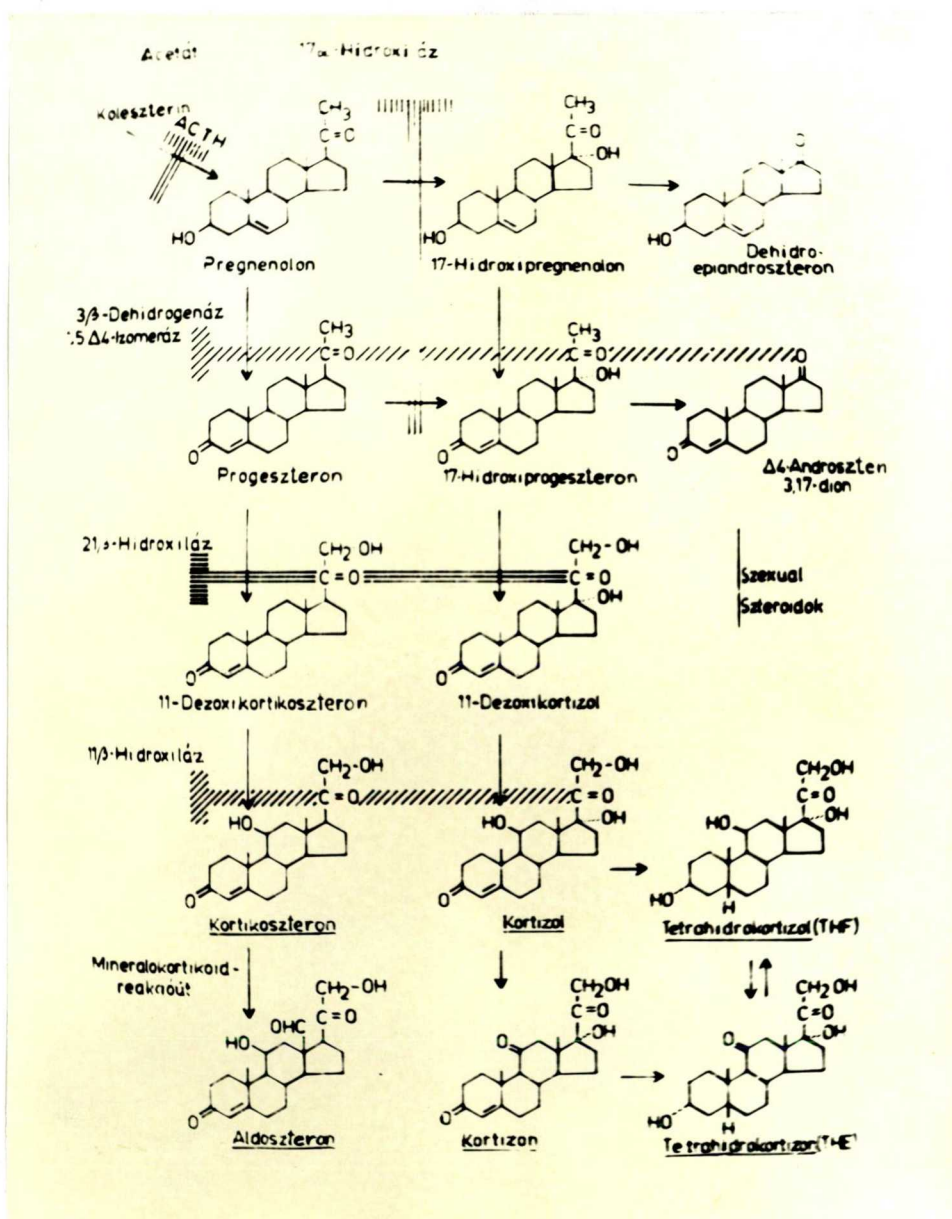
- rövid ideig tartható el
- a radioaktív származék szerkezete eltér a nativ hormon szerkezetétől
- relative nagy áthatoló képességű sugárzást bocsát ki
- a levegőbe került jód a pajzsmirigyben kumulálódik



Látható, hogy a két izotóp előnyei, hátrányai nagyjából kiegyensúlyozzák egymást, ezért még ma sem egyértelmű annak eldöntése, hogy melyik élvezzen abszolút elsőbbséget.

### A szteroidok bioszintézise

A bonyolult szintézis utak tárgyalása helyett egyszerűsített ábrán tüntettük fel a kísérleteinkben szereplő természetes szteroidokat, azok egymásba történő átalakulását. A klinikai szempontból jelentősebb enzimeket külön jeleltük.





Míg a szteroid-hormonok esetében a kizárólagos cél a RIA volt, addig neurotranszmitterek esetében mind RIA mind ICC kidolgozását tervbe vették kooperáló partnereink.

A RIA-nak különös jelentősége abban áll, hogy a szakirodalomban mind a mai napig nem jelent meg olyan neurotranszmitter mérési módszer, mely rutinvizsgálatokra gyorsan, egyszerűen, nagy számban és kellő pontossággal elvégezhető lenne. Ennek illusztrálására röviden tekintsük át a mai klinikai gyakorlatban alkalmazott módszereket.

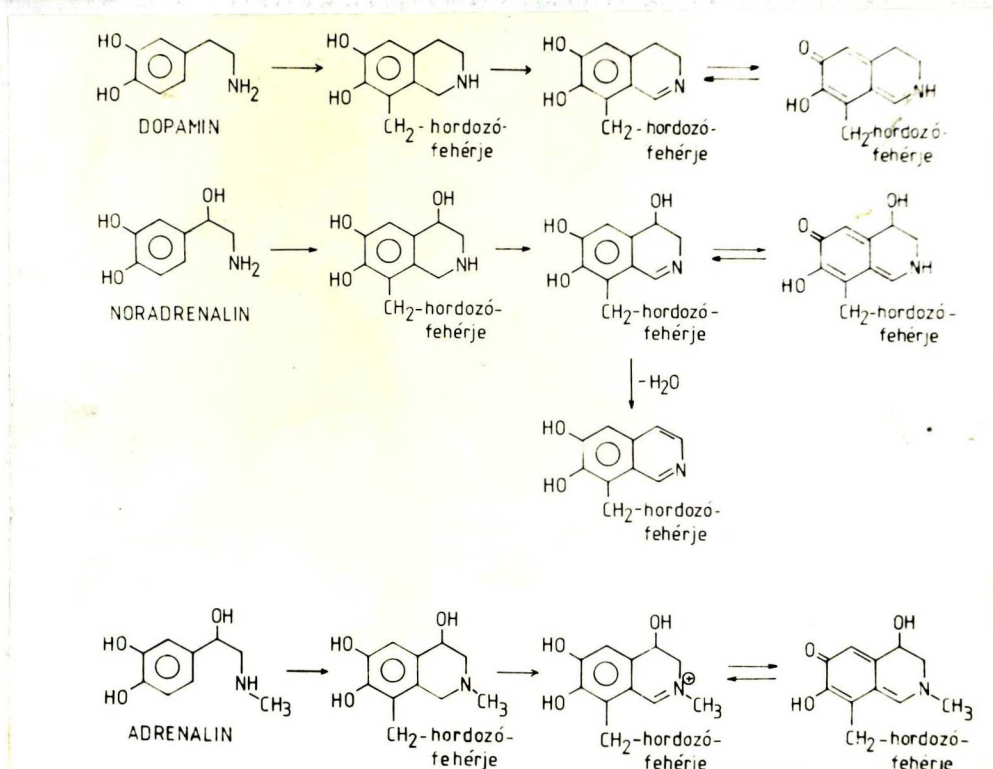
A leggyakrabban használt radioenzimatikus módszert Engelman és mtsai dolgozták ki, melyet Passon fejlesztett tovább /7/. Végülis a Da Prada-féle változat /8/ terjedt el a legjobban. A módszer egyetlen hátránya az alkalmazott kromatográfiás módszer lassúsága. Ezen igyekszik segíteni Enderit /9/, aki a lassu vékonyréteg-kromatográfiát gyors HPLC-re cserélte fel. Sajnos ma még HPLC nem áll mindenütt rendelkezésre.

Fluoreszcens technika alkalmazásával is igyekeztek catekolaminokat mérni. Ily módon először Cohen és mtsai-nak 1957-ben sikerült catekolaminokat meghatározniuk. /10/

A catekolaminokat trihidroxi-indol-származékká oxidált formában mérték. 1962-ben Anton és Shyre /11/ adrenalin és noradrenalin egymás melletti analizise céljából az oxidált származékok fluoreszcenciáját különböző pH-n mérték. Ezt a módszert Valori /12/ módosította. 1962-ben a Falk és Hillarp /13, 14/ által kifejlesztett módszer segítségével először sikerült a központi idegrendszerben sejtszinten a catekolaminok kimutatása. Módszerük lényege az volt, hogy a szövet-metszeteket formaldehid-gőzzel kezelték, minek hatására a catekolaminok és a szerotonin fluoreszkáló származékokká alakultak át. Munkájuk eredményeként lehetővé vált a dopamin, noradrenalin, adrenalin és a szerotonin szöveten belüli lokalizációja. A catekolaminok közötti differenciálást azonban csak fenntartásokkal fogadhatjuk el, mivel mind a három fluoreszkáló vegyület közel azonos gerjesztési és emissziós hullámhosszal rendelkezik. Az eljárás hátrányai ellenére is igen jelentős, nagy előrelépést jelentett.



Igen sokan foglalkoztak a formaldehid-gőz hatására a szövetben lejátszódó folyamatokkal. A reakciók tisztázásában Corrodi, Hillarp és Jonsson játszottak kiemelkedő szerepet /15,16/. Kutatásaik alapján a következőkben foglalhatjuk össze a fluoreszcencia megjelenésének kémiai fokait:



Az adott transzmitter valamilyen aldehid reagens /legtöbbször formaldehid vagy glioxilsav /17/ hatására izokinolin gyűrűt zár /Pictet-Spender reakció /18/. A maximális fluoreszcencia pH függését Corrodi és mtsai átmeneti kinoidális, tautomer formák megjelenésével magyarázzák /20/19/. Ugyancsak ők hívták fel a figyelmet a fehérjék dehidrogénezési lépésben játszott szerepére. 1965-ben szintén ők ismerik fel a 3-as helyzetű hidroxilcsoport labilitását és kidolgozzák a noradrenalin és a dopamin közötti differenciálást is /81/. Axelsson és mtsai /22/ részletesen foglalkoztak a szerotonin esetében jelentkező fluoreszcencia kémiai okával.



### Immuncitokémia

Az itt ismertetett módszert Coons és mtsai /23/ fejlesztették ki majd Geffen és mtsai /24/ módosították. Az általuk kidolgozott eljárás alapja a következő volt: a neurotranszmitterek / ez esetben a katekolaminok/ bioszintézisében résztvevő enzimmel, mint antigénnel szemben termeltettek antiszérumot. A kapott antiszérum felhasználásával a homológ szintetizáló enzimmel rendelkező sejt, illetve neuron specifikusan jelölhetővé válik. Az eljárásnak a Hillarp módszerrel szemben egyik legnagyobb előnye az, hogy elkülöníthető egymástól mind a három katekolamin. A módszer másik előnye, hogy valamennyi neurotranszmitter szintézisében résztvevő enzimmel szemben termeltethető antitest, így az eljárás elvileg bármely neurotranszmitterre kiterjeszthető.

Hátrányként kell megemlíteni azt, hogy az immunizáláshoz szükséges nagy tisztaságú enzimek csak rendkívül hosszantartó időigényes folyamat árán izolálhatók és miután fehérjékről van szó, melyek fajspecifikusak, nem garantálható, hogy a kapott antiszérum minden állatfajban egyaránt alkalmazható lesz.

Az eljárással kimutatott neurotranszmitter mennyisége nem határozható meg. Nem ad választ arra a kérdésre sem, hogy az adott sejtben mennyi neurotranszmitter található a vizsgálat pillanatában. Az eredmény alapján nem dönthető el száz-százalékos biztonsággal, hogy a kimutatott enzim aktív vagy inaktív állapotban van-e jelen. Mindössze egyetlen kérdés válaszolható meg: a vizsgált sejtben a neurotranszmitter szintéziséhez szükséges enzim rendelkezésre áll-e, vagy sem.

Elvileg nem zárható ki, hogy a metszetek beágyazása során a vizmontesítés és a szerves oldószerek hatására valamely enzim antigenitása megváltozik. A fenil-etanolamin-N-metil-transzferáz /PNMT/ esetében ilyet nem észleltek /25/, míg a DOPA-dekarboxiláz /DDC/ és a dopamin- $\beta$ -hidroxiláz /DBH/ esetében a beágyazást követően többé nem észleltek fluoreszcenciát /26/.



Kevesebb hibalehetőséggel kell számolnunk, ha közvetlenül neurotranszmitterekkel szemben termeltetett antiszérumokat használunk. Ez esetben a szövet vizmentesítése során nem kell tartanunk a transzmitter antigenitásának megváltozásától. A módszer kifejlesztéséhez nincs szükség enzimizolálásra, így nagyon sok idő takarítható meg. A szintetizáló-enzimekkel ellentétben a neurotranszmitterek nem fajspecifikusak, így a kapott antiszérumok minden állatfajban egyaránt alkalmazhatók. Mivel az eljárás közvetlenül neurotranszmittereket mutat ki, a jelentkező fluoreszcencia kvantitatív mérési eredményéből kiszámíthatjuk a sejt aktuális neurotranszmitter tartalmát.

A neurotranszmitterek antigénjeit /!/ kivétel nélkül alapkutatói célokra állítottuk elő, de röviden szeretnénk néhány olyan területet is megjelölni, ahol az elért eredmények a klinikai gyakorlatban is hasznosíthatók lennének.

#### Adrenalin

Az egyik legrébbben ismert neurotranszmitter. Szintjének mérésére a mai orvosi gyakorlatban legtöbbször pheochromocytoma gyanújakor kerül sor. Jelentős szerepet játszik a stressz-folyamatokban is. Cohen és mtsai szerint szerepe lehet az alkoholizmus kifejlődésében is. /27/

#### Noradrenalin

Az egyik legfontosabb neurotranszmitter. Mérésének, ill. sejtszintű lokalizációjának Wise és Stein szerint nagy jelentősége lenne a skizofréniában. /28/ Elméletük szerint ugyanis a skizofrénia oka a centrális noradrenalinerg neuronok károsodása. Ez az elmélet ma még éppen a mérési nehézségek miatt nem eléggé megalapozott /29/. A noradrenalin-szint változások mérése alapvető jelentőségű lenne gyógyszerek /pl. neuroleptikumok, major trankvillánsok/ hatásmechanizmusának megismerésében.

#### Dopamin

Jelentőségét több betegségben betöltött fontos szerepe



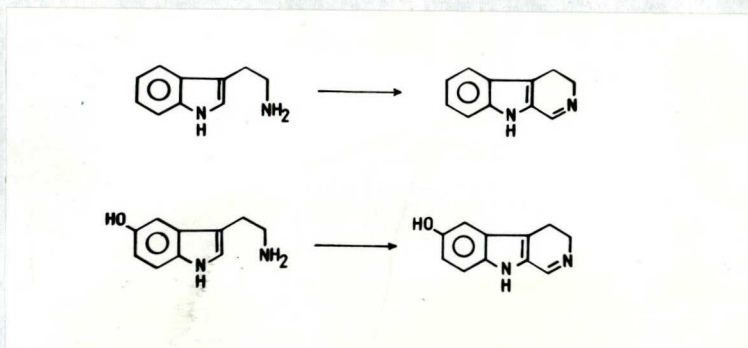
adja meg. Legteljesebben a parkinsonizmusban ismerjük funkcióját /ill. funkció kiesését/.

A skizofrénia másik jelentős elmélete szerint a betegség kialakulásában legfontosabb tényező a dopamin - anyagcsere megváltozása /30, 31, 32/. Mint a noreadrenalin esetében, úgy ebben az esetben is nagy segítséget nyújtanak a dopamin-szint pontos mérése a különböző központi idegrendszerre ható gyógyszerek hatásmechanizmusának felderítésében.

### Szerotonin

Számos folyamatban betöltött - és ismert - szerepe mellett ismét pszichiátriai jelentőségére szeretnénk utalni. A skizofrénia transzmetilálási elmélete szerint nemcsak katekolaminokból alakulhatnak ki hamisan metilezett és endogén hallucinációt kiváltó anyagok, hanem indolalkilaminokból is./33/

Igen érdekes új elméletet bizonyítottak 1978-ban /34/. Ennek értelmében a szervezetben triptaminból, illetve szerotoninból tetrahydro-norharman, illetve 6-hidroxi-tetrahydro-norharman keletkezik.



A különböző allergiás betegségek diagnosztikájában esetleges mechanizmusának felderítésében szintén nagy segítséget jelentene a szerotonin anyagcsere pontosabb ismerete.

### Hisztamin

A hisztaminerg agyi pályák feltérképezésén kívül komoly gyakorlati jelentősége lenne a hisztamin meghatározásának gyulladásos, allergiás folyamatokban. Pl. kidolgozhatóvá válna egy egyszerű in vitro allergológiai vizsgálat



/Igy nem kell a beteget kellemetlenségnek, illetve kockázatnak kitenni penicillin vagy bármely egyéb gyógyszer-allergia vizsgálatánál/. A módszer kidolgozása tömeges méretű szűrővizsgálatokat tenne lehetővé.

#### Acetilcholin

Ma még nem áll rendelkezésre olyan módszer, melynek segítségével az acetilcholin pontosan, sejtszinten mérhető lenne, így annak felhasználási területére csak következtetni tudunk. Elméleti, illetve alap kutatásban való használatán kívül jelentős lenne az acetilcholin Parkinson kórban játszott szerepének pontosabb tisztázásában is /35/. Szintjének pontos ismerete nagy segítséget nyújthatna a Myasthenia gravis súlyosságának megítélésében is.

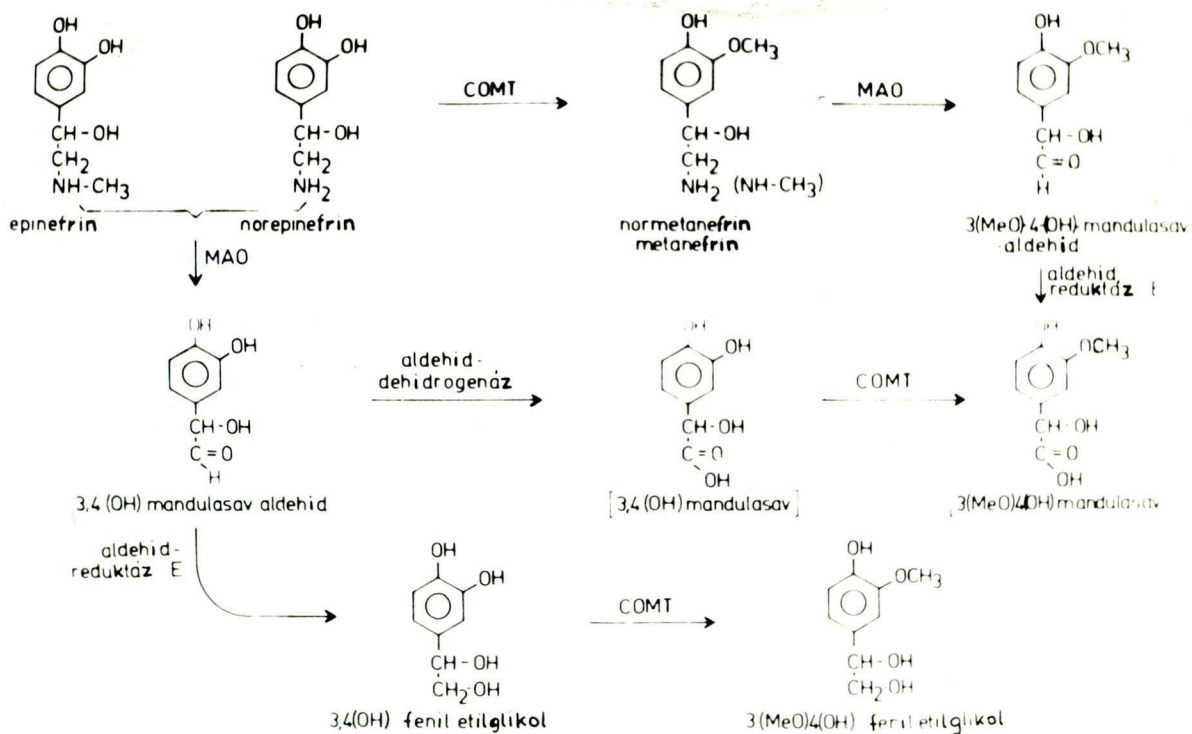
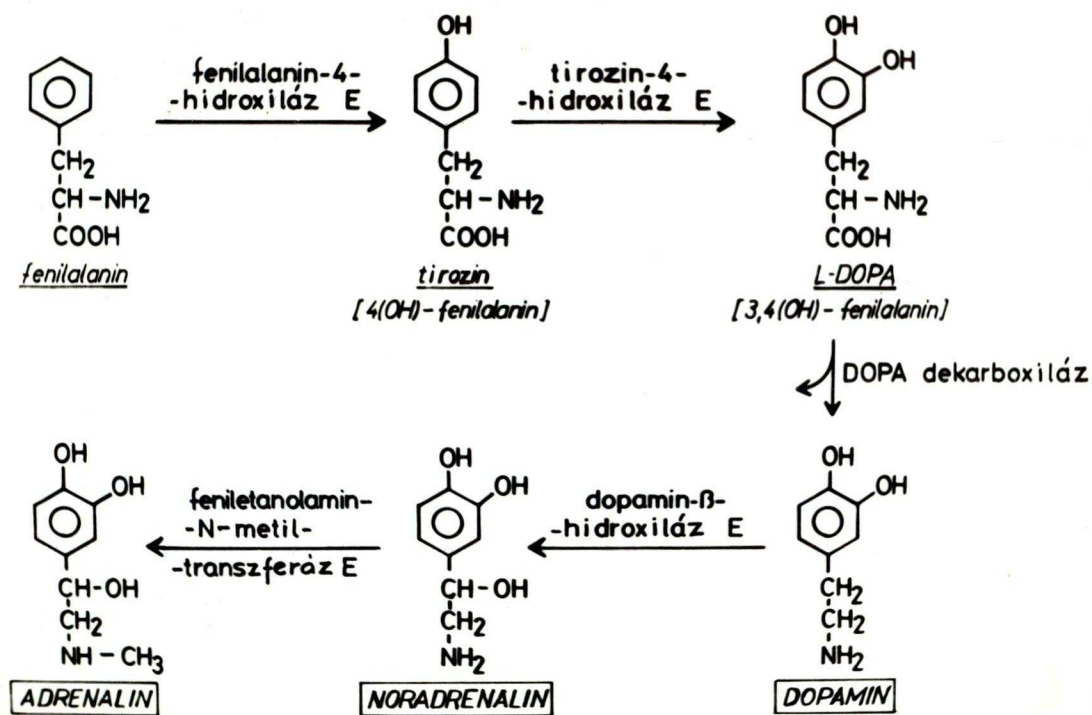
#### GABA

A gátló szinapszisok ismert transzmittere. Pontos szerepének feltérképezéséhez készítettük el antigénjét.

### Neurotranszmitterek bioszintézise

A szintézis-utak tárgyalása helyett ábrán tüntetjük fel a kísérleteinkben szereplő neurotranszmittereket, azok átalakulásait és lebomlásukat. A klinikai szempontból fontosabb enzimeket külön jelöltük. Ugyanezt az elvet követtük a szteroidok anyagcserejének rövid képletes bemutatásakor is.







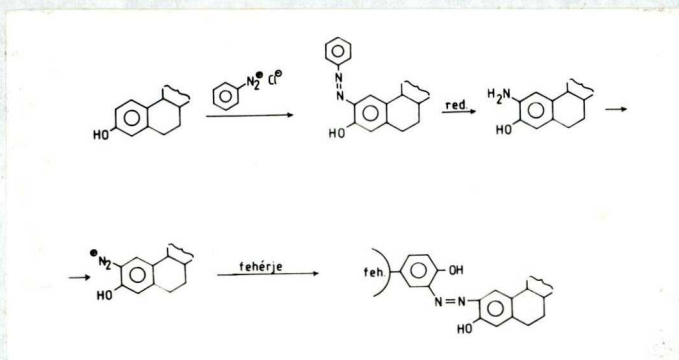
## Fehérjéhez való kapcsolásra alkalmas szteroid-származékok előállítása

Az antigén-szintézis megkezdése előtt döntenünk kell, hogy a szteroid hormont

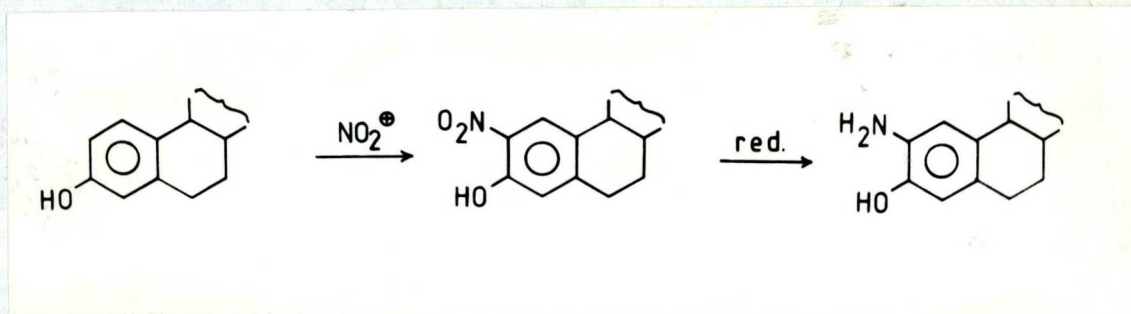
- a/ összekötő lánc /spacer/ nélkül, vagy
- b/ spacer segítségével kapcsoljuk fehérjéhez

a/ Ebben az esetben valamilyen reakcióképes csoportot kell kialakítanunk a szteroid molekulán. Ősztrogének esetében ez történhet pl. aminocsoport kiépítésével.

Meinzinger /36/ előbb azoktést alakított ki, majd ezt redukálta aminná és az így kapott amino-ősztrogént diazotálva kapcsolta fehérjéhez. Antiszérumot nem sikerült termeltetnie.



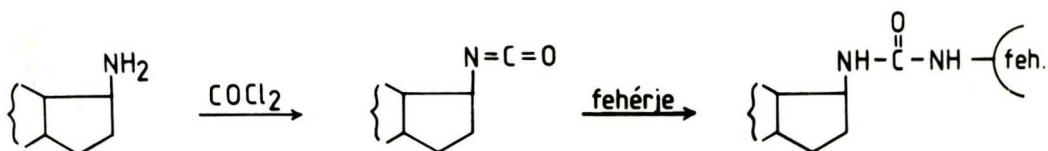
Goodfriend az aminocsoport kiépítését más módszerrel oldotta meg /38/:



A módszer szűk körben, aromás A gyűrű esetében alkalmazható csak.



Hopkins és Wermall megfigyelését hasznosítva Goodfriend és Schon /37/ az amino-szteroidot már nem diazotálta /így elkerülhető a testidegen azokötés képződése/ hanem izocianátot képzett, és karbamidszerű kötést kialakítva kapcsolta fehérjéhez.



Az antiszérum FITC-jelölésével ICC-t dolgozott ki /39/.

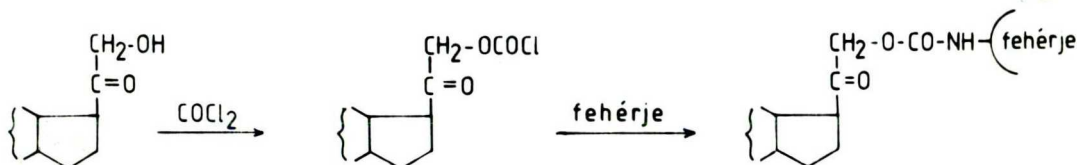
A későbbi szakirodalom szinte kizárólagosan a spaceren keresztüli kapcsolást említi. Legelőnyösebb, ha a spacer karboxilcsoportra, vagy annak valamilyen aktivált származékára végződik. Ennek kialakítására is számos lehetőség kínálkozik. Itt csak néhány fontosabbat szeretnénk kiemelni.

#### b/ Karboxilcsoport kiépítése a molekulán

1/ A meglévő funkciós csoportok felhasználásával:

##### Schotten-Baumann módszer

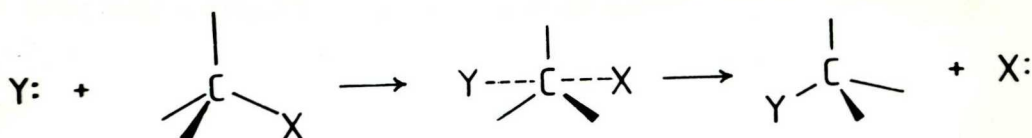
Szteroidokra Erlanger alkalmazta 1957-ben először / 40, 41/. A módszer lényege, hogy szteroid-molekula hidroxilcsoportját foszgénnel reagáltatják, s az így keletkező klórformiát savamid-kötést létesít a fehérje molekula szabad aminosocsoportjaival.





Borostyánkősav-anhidriddel történő észterezés

Az alkoholok észterezése a nukleofil szubsztitúciók kétféle mechanizmusa szerint lehet végbem. /A reakciók során alkalmazott körülmények között csak a bimolekulás nukleofil szubsztitúció mechanizmusával kell számolni.



Az észterképzés során valamennyi esetben borostyánkősav-anhidridet alkalmaztunk, ezért az észterezések közti különbség csak a hidroxilcsoporthoz kapcsolódó oldallánc szerkezetétől függhetett.

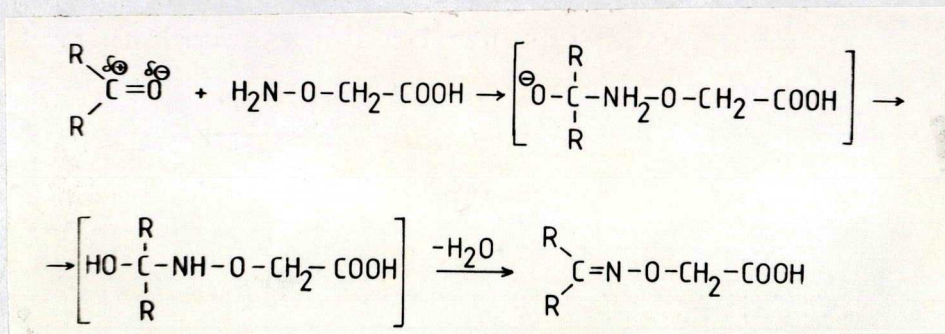
- A fenolos hidroxilcsoport a legkönnyebben észterezhető. /Az aromás gyűrű elektronszívó tulajdonsága megkönnyíti a proton disszociációját és az így keletkező fenolát-anion erős nukleofil reagens./

- Ha az aromás elektronszívó rendszert alifás, elektronszívó csoporttal helyettesítjük, lényeges reaktivitásbeli csökkenést tapasztalunk. Az elektronszívó R-csoportok csökkentik a hidroxilcsoportot tartalmazó szénatom pozitív polárositását, ezáltal az kevésbé válik alkalmassá nukleofil támadásra. Legkevésbé reakcióképesekkel a primer alkoholok jellemezhetők /itt ugyanis csak egyetlen elektronszívó csoport kapcsolódik a hidroxilcsoportot tartalmazó szénatomhoz/. A szekunder alkoholoknál már jobban érvényesül a két R-csoport elektronszívó effektusa, ezért reakcióképesége elmarad a primer alkoholok mögött. Legkevésbé reakcióképesek a tertiár alkoholok. Az alkilcsoportok számának növekedésén kívül sokszor térszerkezeti sajátosságok is gátolják a reakció lezaj-

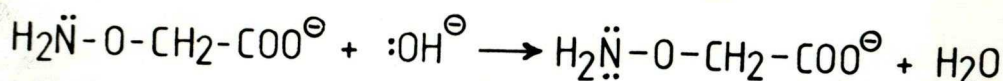


lását. A legtöbb esetben ezért a szteroidok 17- $\alpha$ -hidroxilcsoportja nem észtereszíthető. /A terciér alkoholok egyébként a legtöbb esetben már  $S_N1$  reakció-mechanizmus szerint reagálnak.

Ketocsoport reakciója hidroxamino-ecetsavval /40,41/  
A kondenzációs reakció bevezető lépése addíció, majd proton-leadobással épül ki a kettőskötés.



A reakciót alkalikus közegben végezzük. A bázisos katalizátor a nitrogén atomról protont hasít le, ezáltal növeli az elektronsűrűséget, aminek következtében lényegesen megnő a reagens nukleofil ereje.



## 2/ Új funkciós csoport bevitele

Ezzel a módszerrel a természetben elő nem forduló szteroidokat állítunk elő. Előnye: hogy az új funkciós csoportot tetszés szerint bármelyik gyűrűn kialakíthatjuk, ezáltal a későbbi keresztreakciók mértékét csökkenthetjük.

Hátránya:

- a meglévő funkciós-csoportokat védeni kell
- általában nem egységes termék keletkezik
- tisztításuk nehéz
- nagy anyagmennyiséget igényel



Főleg az utóbbi ok miatt mi is tulnyomó többségében a már meglévő funkciós csoportok közül használtuk fel azokat, amelyeknél aránylag kismértékű keresztreakciók fellépését vártuk.

Az új csoport kiépítésére a szakirodalomban leírt sokféle reakciót közül hármat szeretnénk kiemelni:  
a/  $\Delta^4$ -szteroidok B-gyűrűjének 6-os szénatomára allil-helyzetű brómozással bróm-szubsztituenszt viszünk be /Ziegler-féle brómozás/, ezt később vízmentes tioglikolsavval karboximetil-tioéterré alakítjuk,

b/ A 11-es szénatomra mikrobiológiai úton hidroxilcsoportot viszünk be és ezt észtereszítjük,

c/ a szteroid molekula B-gyűrűjének 6-os helyzetében oxidációval ketocsoportot építünk ki és ezt reagáltatjuk tovább.

### Neurotranszmitterek antigénjének szintézise

Az egyes neurotranszmitter-antigének szintézisét, azok irodalmi előzményeit célszerű teljesen külön tárgyalni. Ezt egyrészt a szintézis során felmerülő más jellegű problémák, másrészt a szintézis eltérő kémiai jellege indokolja. A szteroid-antigének szintézisének követett logikai sort- miszerint először általánosságban, majd az egyes konkrét példák esetében térünk ki a szintézis problémáira - a neurotranszmittereknél nem minden esetben tudjuk betartani. Ennek oka, hogy a neurotranszmitter fogalom nemcsak azonos kémiai csoportba tartozó vegyületeket fed. Pl. az adrenalin és az acetilkolin antigénjének szintézisében nagyon kevés rokon vonás van. Mindezek ellenére, ahol erre lehetőség kínálkozik, először az általános érvényű szabályt és csak azt követően tárgyaljuk a speciális viszonyokat.



#### A/ Katekolaminok

Ha egyúttal időrendi áttekintést is akarunk adni, akkor első helyen mindenképpen Kesztyüs és Went munkáját kell megemlítenünk /42/. Amint a szteroidok esetében Goodfriend /37,38/, úgy Kesztyüs is nitrocsoport redukciójával aminocsoportot alakított ki pirokatechinon. Az így kapott amino-pirokatechinrel Stolz 1904-es szintézisének analógjára amino-adrenalin állított elő, melyet azoktéssel kapcsolt fehérjéhez. Immunizálással sikerült - közelebbről nem jellemzett - antiszérumot előállítani. A módszer hátrányaként kell megemlíteni, hogy az antigén szintézisét testidegen kötés segítségével oldja meg.

Jelentős metodikai újításnak számított a formaldehiddel történő kapcsolás alkalmazása. A formaldehides reakció már 1876 óta ismert volt, de fehérjék és haptének összekapcsolására csak 1945-ben Frankel-Conrat /43/ és Wozniak /44/ alkalmazta először. A reakció során a formaldehid amino-/45/, guanidino-/46/, és indol-/47/ csoportokkal reagált. Elsősorban a fehérje lizin és hisztidin, valamint a tirozin részén jön létre a kötés, de kisebb mértékben a fenilalanin és a triptofán is reagál. E módszer legnagyobb előnyét az jelenti, hogy a kialakuló kötés nem testidegen.

A formaldehides reakció mechanizmusának  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroszkópiával történő vizsgálata /48/ azt mutatta, hogy a formaldehid a fehérje lizinjének aminocsoportjaival első lépésben egy N-metilol-származékot képez és ezen keresztül jön létre a kötés.  $^{13}\text{C}$ -NMR módszer segítségével  $^{13}\text{CH}_2\text{O}$  alkalmazásával lehetővé vált, hogy ne csak egy-egy aminosav, hanem komplett fehérje reakcióit is tanulmányozzák. Tome és mtsai /49/ a fenti eljárás segítségével megállapították, hogy első lépésben valóban addíció játszódik le és ennek eredményeként metilol-származékok keletkeznek. A reakció az amino-, guanidino-, hidroxil-, indolil-, és imidazolcsoportokkal nem teljes, a szulfhidril- és amidocsoportok viszont kvantitatív reakcióba lépnek. Azt tapasztalták, hogy az aszparagin



troonin, hisztidin és triptofán hidroxil-metil-csoportjai az oldallánc bázikus csoportjaival ciklikus vegyületeket képesnek.

Mivel a katekolaminok könnyen oxidálódnak, és a körülmény lényegesen megnehezíti antigénjeik előállítását. Greta és Brown /4/ 1976-ban olyan megoldást dolgozott ki, melyvel az a probléma megkerülhető volt. Kísérleteikben nem katekolaminokat, hanem azok 3-as helyzetű hidroxilcsoportot nem tartalmazó analógjait használták fel /oktopamin, szinefrin, tiramin/. Az így kapott antigéneket immunizálásra használták, de a kapott antiszérumok száma százalókat meghaladó mértékű keresztreakciót adtak a 3-as helyzetű metoxilcsoportot tartalmazó analógokkal. Miwa és mtsai az antigének szerkezetének egységesebbé tétele érdekében a kapcsolni kívánt hepténeket először maleil védőcsoporttal látták el /50/. A heptén/hordozó hányados meghatározására Doty módszerét alkalmazták /51/. A kapott antiszérumok nagymértékű keresztreakciót mutattak. Egy későbbi publikációjukban a heptén/hordozó hányados meghatározására aminosav-analízist alkalmaztak /52/. Véleményünk szerint aminosav-analízisre csak abban az esetben kerülhet sor, illetve megbízható eredményeket csak akkor kapunk, ha a fehérjét előtte nem kezelték formaldehiddel. A korábban említett IHR tanulmányokra /49/ szeretnénk hivatkozni, miszerint a formaldehid nem specifikusan a fehérje számos funkció csoportjával reakcióba lép. A kialakuló kötés az aminosav-analízis előtti aminosavas hidrolízissel nem megbontható, tehát a mérési eredményeket meghamisítja.

Miwa és mtsai további kísérleteikben egyszerűbb vegyületeken modellezték az antigén-szintézis körülményeit. /53/ Megállapították, hogy a metilén-híd a fenolos hidroxilcsoportokhoz képest orto helyzetben épül ki.

A szakirodalomban legnagyobb terjedelmben tárgyalt és legfontosabbnak tartott formaldehidos kapcsolás mellett sok eredeti és igen ötletes antigén-szintézis található, melyek közül jó néhány eredményes. Ezek illusztrálására szeretnénk néhány példát megemlíteni a teljesség igénye nélkül.



1973-ban Spector /54/ Z-L-Lys-HCA és  $\gamma$ -benzil-L-Glu-HCA-ból kopolimert képzett, majd ezeket dimetoxifenil-etilamminnal reagáltatta. A védőcsoportokat bórtribromidos hasítással távolította el. Immunizálás után -olyan antissérumot kapott, mely normetanefrin, feniletilamin és tiramin megkötésére volt képes.

Cheng magas titerű, nagy specificitású antissérum termeltetésére alkalmas amfetamin-antigént állított elő /55/. Első lépésben az adott fenilalkilamint N/4-Br-butyl/-ftálimiddel reagáltatta. Következő lépésben a védőcsoportot hidrazinolízissel távolította el. A kapott anyagot izolálás után vizsgálható karbodiimidess módszerrel kapcsolta fehérjéhez. Az általa alkalmazott kísérleti körülmények a katekolamin-antigének szintézisét nem tessik lehetővé.

Keeton 1981-ben /56/ a noradrenalin egy metabolitjának, a metoxifenilén-glikolnak az antigénjét állította elő úgy, hogy a fenolos hidroxilcsoportra éterkötéssel egy 6 szénatomos spacer épített ki, melynek segítségével a molekulát tiroglobulinhoz kapcsolta. A kapott antissérum radioimmuno-assay kidolgozását tette lehetővé.

### B/ Hisztamin

Jóllehet a hisztamin korántsem olyan érzékeny oxidációra, fényre mint a katekolaminok, mégsem állíthatjuk, hogy lényegesen "egyszerűbb" vegyület lenne, mint az adrenalin, noradrenalin vagy a dopamin. A kémiai nehézségeket az imidazol gyűrű különleges sajátságai okozzák. A gyűrűben lévő két nitrogén közül az egyik pirrol-szerű, a másik piridin-szerű /Kajtar H./. Mindkét nitrogén /1/ acilezhető. A pirrol-nitrogénre bevitt acilcsoport aránylag stabil. A piridin-szerű nitrogén azonban csak kvaternorizálódás árán acilezhető, s a kialakult kvaternor amóniumsó nem stabil, hanem acil-átvivőként funkcionál. Ez a funkció okozza azt a nagyszámú mellékreakciót, rossz termelési esálsalékot, amelyek jól ismertek a peptidkémiai-  
ból. /L.hisztidin/.



A hisztamin-antigén előállításának időrendi áttekintését Kesztyűs és Went /41/, valamint Fell kísérleteivel /57/ kell kezdenünk, akik azokötés kialakításával szintetizálták antigénjüket. Fell spacerként aromás gyűrűt alkalmazott. Az immunizálások után kapott antiszérumok csak "bizonyos fokú" antihisztamin aktivitást mutattak. Choen-Fell módszerét megismételve - a kapott antiszérumot a klinikai gyakorlatban hatásosnak találta /58/. Rodney és Fell hisztamint foszfónnal reagáltatott /59/, majd az így kapott izocianátot kapcsolta fehérjéhez. Ez az eljárás lényegében azonos a Goodfriend és Schon által szteroidok esetében alkalmazott módszerrel /37/.

Spector és Davis /60/ egymástól függetlenül vizoldható karbodiimidés módszerrel kapcsoltak hisztamint fehérjéhez.

A hisztamin aldehidekkel adott reakcióját többen tanulmányozták /83,84,85/.

Formaldehides kapcsolást Martin alkalmazott először /61/. Kovács és Csaba /62/ Fell módszerét követve állította elő antigénjét majd a kapott antiszérumot FITC-tal jelezte. Ugyancsak ők dolgozták ki a hisztamin direkt immun-citológiai kimutatását.

### C/ Szerotonin

A szerotonin molekula rendelkezik mindazon hátrányos tulajdonságokkal, amelyekről a katekolaminok és a hisztamin esetében már beszéltünk. Hőre, fényre, oxigénre éppen olyan érzékeny, mint a katekolaminok hiszen fenolos hidroxilcsoportja és aminocsoportja egyaránt van. Ezenkívül savakra is érzékeny, hiszen pirrol-származék. A pirrol-szerű nitrogénjén éppúgy létrejöhet mellékreakció - aránylag stabil acileződés -, mint a hisztidin pirrol-szerű nitrogénje esetén. Az elmondott csupa rosszra kiváló scavenger tulajdonsága teszi fel a koronát, mely igen könnyű C-alkileződést tesz lehetővé. Fenolos hidroxilcsoportja igen könnyen oxidálható, aminek eredményeként kinoidális strukturájú vegyületek keletkeznek. Összehasonlításképpen ismét csak a peptidkémia területéről a triptofánt említenénk meg.



A szerotonin-antigént azokötés felhasználásával először Filipp és mtsai állítottak elő /63/. Ranadive és Schon antigén-szintézisükhöz 5-hidroxi-indolil-ecetsavat használtak. /64/. Ennek anhidridjét képezték és így acileztek fehérjét. A kapott antiszérumokat anafilaxiás sokk kivédésére gyakorolt hatásán keresztül jellemezték.

Spector para-amino-fenilalanint kapcsolt fehérjéhez, majd az aromás aminocsoportot diazotálva készítette el a szerotonin antigénjét /65, 66/.

Szerotonin esetében formaldehides kapcsolást Ranadive és Schon alkalmazott először. A kapott antiszérum titere alacsony volt, így nem tette lehetővé radioimmuno-assay kidolgozását /67/.

A szerotonin immunhisztokémiai meghatározásának céljából Ranadive és Schon kapcsolási módszerével Steinbusch és mtsai állítottak elő szerotonin-antigént /68/. A kapott antiszérum alkalmas volt a szerotonin központi idegrendszerben történő lokalizációjára. A Buffa által kidolgozott immuncitokémiai módszer szintén használható volt a szerotonin lokalizálására, bár az antiszérum keresztreakciót adott az 5-metoxi-triptaminnal /69/.

Radioimmuno-assay céljaira Spector és Peskar állított elő antigént /66/ és bár antigénjüket szintén azokötés felhasználásával szintetizálták és a kapott antiszérum titere nem érte el az 50-et, a szerzők szerint módszerük mégis alkalmas szerotonin vérben történő meghatározására.

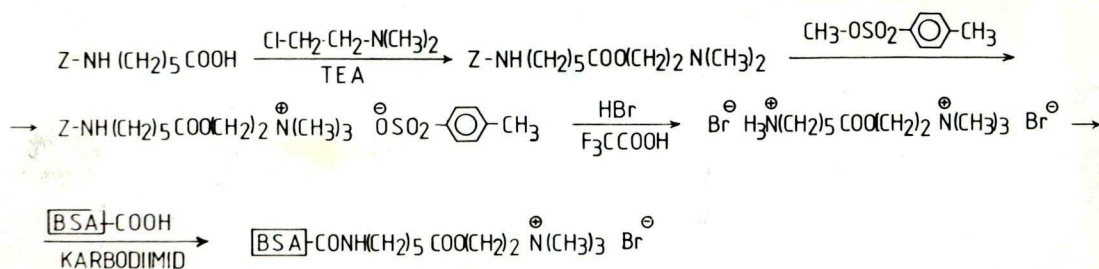
Delaage és mtsai borostyánkősav spaceren keresztül kapcsoltak szerotonint fehérjéhez. /70/. A kapott antiszérum titere meghaladta 10 000-et. Radioimmuno-assay meghatározáshoz a plazmát minden esetben derivatizálni kell.

#### D/ Acetilcholin

Az acetilcholin-antigén előállításának problémái alapvetően eltérnek az eddig tárgyaltakétól. Ez a molekula lényegesen kisebb mint a többi neurotransmitter molekula ugyanakkor teljesen "csupasz". Nincs rajta egyetlen "kapaszkodó", egyetlen funkciós csoport sem. A molekula natív formájában teljesen alkalmatlan antigén-szintézisre.



Minden esetben az acetylcsoporthoz mentes kiindulási vegyületet - a kolint - kell alkalmas módon átalakítani, vagy kerülő szintézissel utólag kvaternizálni a nitrogén atomot. A fentiek alapján érthető, hogy csak a legutóbb időkben jelent meg - kis számu - publikáció. A legrégebbi szintézis Spector nevéhez fűződik. 1978-ban /1/ közölt szintézise a következő - volt: /70/71/



A szintézis során kapott  $\epsilon$ -amino-kaproil-kolint vizoldható karbodiimiddel kapcsolta BSA-hoz. Az immunizálással nyert antiszérummal RIA-módszert dolgozott ki. Érdekes, hogy a nagyjelentőségű publikáció több mint 4 éve megjelent, mégsem található a szakirodalomban utalás rá. Ez a tény mindenestre megkérdőjelezi a Spector által kidolgozott RIA alkalmazhatóságát.

A szintézis másik lehetséges útjára példa Kawashima módszere /72/. A kolint glutársavval acilezte és így egy lépésben kapcsolásra alkalmas, szabad karboxilcsoporttal rendelkező glutaril-kolint kapott. Az immunizálás elvégzése után 6 is beszámolt RIA kidolgozásáról. Jóllehet ez a közlemény már 2 évvel ezelőtt megjelent, más kutatók mégsem számoltak be az eredmények reprodukálhatóságáról. A neurotranszmitterek esetében - az acetylcholin kivételével - nincs irodalmi adat arra, hogy karboxilált vegyületet használtak fel antigénként. Kísérleteink során mi ezt a lehetőséget is megvizsgáltuk.



A fent tárgyalt módszerek segítségével állítottuk elő az alábbi szteroid - illetve neurotransmitter-származékainkat:

A/ Szteroid-származékok

1. hidrokortizon-21-HS
2. hidrokortizon-3, 20-BCMO
3. 17- $\alpha$ -OH-progeszteron-6-karboximetil-tioéter
4. aldosteron-3-CMO
5. aldosteron-3, 20-BCMO
6. 4-pregnene-11- $\beta$ -17- $\alpha$ -diol-3, 20-dion-20-CMO
7. 18-hidroxikortikoszteron- $\gamma$ -etiolakton-3-CMO
8. 5- $\beta$ -dihidroaldosteron- $\gamma$ -etiolakton-3-CMO
9. 5- $\alpha$ -dihidroaldosteron- $\gamma$ -etiolakton-3-CMO
10. prednolidén-3-CMO
11. pregnenolon-3-HS
12. pregnenolon-20-CMO
13. 17- $\alpha$ -OH-pregnenolon-3-HS
14. 17- $\alpha$ -OH-pregnenolon-20-CMO
15. prednizon-21-HS
16. prednizon-20-CMO
17. prednizon-3,20-BCMO
18. dexametazon-21-HS
19. dexametazon-3-CMO
20. dexametazon-3,20-BCMO
21. betametazon-21-HS
22. betametazon-3-CMO
23. betametazon-3,20-BCMO
24. DHEA-3-HS
25. DHEA-17-CMO
26. kortizon-21-HS
27. kortizon-3-CMO
28. kortizon-3,20-BCMO
29. substanz A-21-HS
30. pregnandiol-3-HS
31. pregnandiol-20-HS
32. pregnantriol-20-HS
33. antonin H-21-HS
34. triamcinolon-21-HS
35. 6-OH-kortizol-3-CMO



36. 6-OH-kortizol-3,20-BCMO
37. kortikoszteron-21-HS
38. kortikoszteron-3-CMO
39. 21-dezoxi-kortizon-20-CMO
40. 21-dezoxi-kortizon-3,20-BCMO
41. 18-hidroxi-kortikoszteron-3-CMO
42. 11-dezoxi-kortikoszteron-21-HS
43. D<sub>3</sub>-vitamin-3-HS
44. 5- $\beta$ -dihidro-kortizon-21-HS
45. 5- $\alpha$ -dihidro-kortizon-21-HS
46. 5- $\alpha$ -dihidro-kortizol-21-HS
47. 5- $\beta$ -dihidro-kortizol-21-HS
48. 5- $\beta$ -dihidro-11-dezoxi-kortizol-21-HS
49. 5- $\alpha$ -dihidro-11-dezoxi-kortizol-21-HS
50. 5- $\alpha$ -dihidro-kortikoszteron-21-HS
51. 5- $\alpha$ -dihidro-tesztoszteron-17-HS
52. 5- $\beta$ -dihidro-kortizon-20-CMO
53. 5- $\alpha$ -dihidro-kortizon-20-CMO
54. 5- $\alpha$ -dihidro-kortizon-3,20-BCMO
55. 5- $\alpha$ -dihidro-kortizol-20-CMO
56. 5- $\beta$ -dihidro-kortizol-20-CMO
57. 5- $\beta$ -dihidro-11-dezoxi-kortizol-20-CMO
58. 5- $\alpha$ -dihidro-tesztoszteron-3-CMO
59. tetrahidro-aldoszteron-20-CMO
60. tetrahidro-11-dezoxi-kortizol-20-CMO
61. tetrahidro-11-dezoxi-kortikoszteron-20-CMO
62. tetrahidro-kortikoszteron-20-CMO
63. tetrahidro-kortizol-20-CMO
64. tetrahidro-11-dehidro-kortizol-21-HS
65. tetrahidro-11-dezoxi-kortizol-21-HS



B/ Kapcsolásra közvetlenül alkalmas neurotranszmitter  
származékok

66. BOC-L-adrenalin
67. BOC-L-noradrenalin
68. BOC-dopamin
69. BOC-szerotonin
70. BOC-hisztamin
71. BOC-D,L-treo-dihidroxifenilszerin
72. BOC-D,L-eritro-dihidroxifenilszerin
73. BOC-L-DOPA
74. BOC-D-DOPA
75. BOC-D,L-5-OH-triptofán
76. BOC-L-5-OH-triptofán
77. BOC-D-5-OH-triptofán
78. /BOC/<sub>2</sub>-L-hisztidin
79. /BOC/<sub>2</sub>-D-hisztidin
80. BOC-L-Glu/Obu/-OH
81. BOC-D-Glu/Obu/-OH
82. szukcinil-monokolin
83. mukonil- $\beta$ -alanil-kolin



## A n t i g é n e k   s z i n t é z i s e

### A/ Szteroid-antigének előállítása

Sok esetben a szteroid hormonok hasonló szerkezete miatt azonos kémiai problémát kellett megoldani. Emiatt nem törtünk ki részletesen minden egyes származék előállításának körülményeire, hanem most csak a specifikusát emeljük ki az általánosból.

A szteroid-hemiszuksinátokat az Upjohn Co. szabaddalma alapján állítottuk elő /73/. A szuksin-anhidrid/szteroid molarányban oltértünk az Abraham és Grover által javasolt 4.5 - 5-szörös feleslegtől s csupán 3.5 -4-szeres mennyiségben alkalmaztuk. Amennyiben a molekulán több primer hidroxilcsoport nincs, úgy tisztán, melléktermék nélkül nyerhető a célvegyület, mivel a szekunder és a tercier alkoholos hidroxilcsoportok lényegesen lassabban reagálnak. Termelésünk ilyen esetekben megközelítette az elméleti maximumot. A megfelelő reakcióidő eltelte után, amit a reakcióból vett próba vékonyréteg-kromatográfiás ellenőrzése után döntöttünk el, a reakciót hígított sósavval leállítottuk és az elegyet feldolgoztuk.

Érdekességként említjük meg, hogy a hemiszuksinát - képzés primer alkoholos hidroxilcsoport esetében pár óra alatt lezajló reakció. Szekunder alkoholos hidroxilcsoport reakciója lényegesen lassabb. Ez a szelektivitás azonban olyan mértékű, hogy csak néhány dihidró -, illetve tetrahidro-származékokat sikerült melléktermék-mentesen reagáltatnunk. Ez esetekben a reakcióelegy további tisztítása preparatív rétegekromatográfiával történt.

A hidroxilcsoportok rendűsége mellett azok térállása - alfa vagy béta - döntően befolyásolhatja a reakciókészséget. Ennek bizonyítására a dehidro-epi-androszteron-17-hemiszuksinátjának előállítása a példa. Ezt a vegyületet csak 480 órás /több mint 2 hetes/ 50°C-os hőmérsékleten végrehajtott acilezéssel tudtuk csak előállítani, míg a



pregnandiol- 3-as helyzetű hidroxilcsoportja igaz, hogy csak 10 %-ban, de pár órás reakcióidő alatt is észterecsitődött.

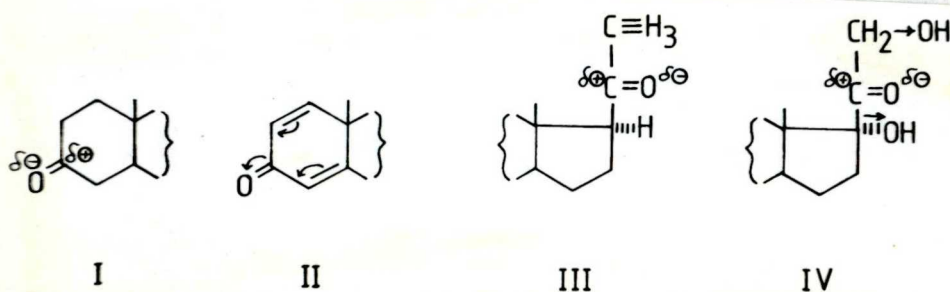
A 17- $\alpha$ -OH-progeszteron-17-HS-jának előállításával már régebben próbálkoztak /74/. A szerzők erről az utról többnyire lebeszélnek. Erélyes és speciális körülmények között azonban megvalósítható az észterecsités, de /75/ nem elég magas termelési %-kal és igen nehézkesen. A fenti okok miatt döntöttünk a 6-Br-származék szintézise mellett. A reakciót Kaufman 6-Br-progeszteron előállítási receptjének analógiájára /76/ szerettük volna megvalósítani. A progeszteron és a 17- $\alpha$ -OH-progeszteron között azonban jelentős oldékonyságbeli különbségek vannak. Emiatt módosítottuk az eredeti eljárást. Ennek lényege, hogy oldószert változtattunk és az izolálási technikát is módosítottuk. Az izolálást nagymértékben megkönnyítette annak a körülménynek a felismerése, hogy a 6-Br-17- $\alpha$ -OH-progeszteron kloroformban és acetonban rosszul oldódik, így aránylag könnyen olváasztható a reakció során képződő szukcinimidtől, mely acetonban jól oldódik.

Az oxin-származékok előállítására az irodalomban sok utalás található /77,78,79,80/. Valamennyi szerző szinté teljesen azonos módon dolgozik, csupán a szteroid/hidroxamino-acetsav arányban térnek el egymástól. Saját tapasztalataink Abraham /77/ véleményét támasztották alá miszerint a hidroxamino-acetsav arányának növelésével a termelés javítható. Nem tudunk egyetérteni Deen és Exley /79/ szerzőpárossal, akik még a kétszeres felesleget sem javasolják. Kísérleteink során 2-5-szörös feleslegben alkalmaztuk a reagenst. Ismételten szeretnénk hangsúlyozni, hogy ezáltal igen jó termeléseket /több esetben kvantitatív termelést/ értünk el. A módszer természetesen hátránya, hogy ha több ketocsoport van a molekulán, ritkán jutunk egységes termékhez. Az oximképzést nátrium-acetáttal katalizáltuk, és vízmentes metilalkohol közegben dolgoztunk. A megfelelő idő elteltével, illetve az ellenőrzött vékonyréteg-kromatográfiás eredmény elérése után a reakciót leállítottuk. A feldolgozás során a hamisuk-



cinditoknál alkalmazott sósav helyett az oximoknál citronsavat alkalmaztunk - hűtés mellett. Ezeket a változtatásokat az oxim-kötés savérzékenységére indokolja. Ha a szteroid molekulán csupán egyetlen ketocsoport van, akkor a végtermék izolálása könnyen megoldható a karboxilcsoport jelenléte miatt.

Több ketocsoportot tartalmazó hormonok esetén a különböző ketocsoportok eltérő sebességgel reagálnak, jellelhető az a különbség korántsem olyan nagy, mint a különböző rendűségű alkoholok hidroxilcsoportjának reakcióképességbeli különbsége.



Kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy a legreakcióképesebb ketocsoport a II. emél részletesebb sorrend felállítása gyakorlati munkánkban nem nyújt segítséget.

A fenti reakciókegyeket preparatív réteghromatográfiás úton választottuk szét. A fehérjéhez való kapcsolást valamennyi izolált és egységes karboximetil-oxim-származékkal végrehajtottuk.

#### Bonyolult szerkezetű szteroidok homiosukcinátjának előállítása

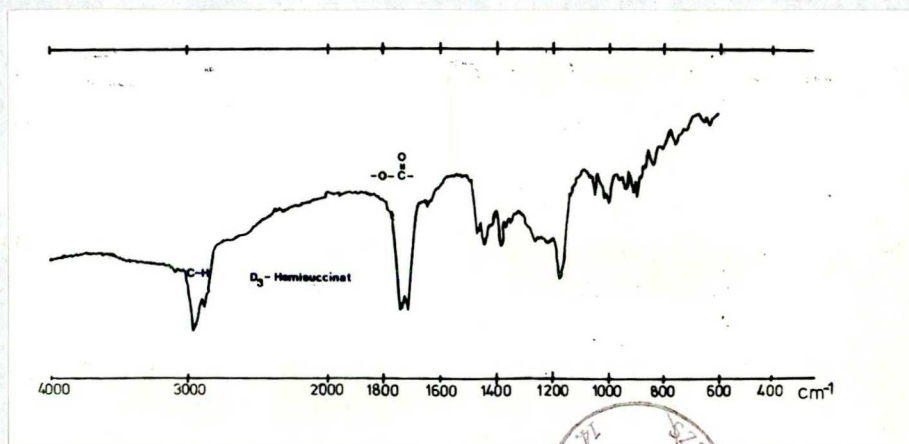
"Bonyolult szerkezetű szteroidokon" ebben az esetben olyan vegyületeket értünk, melyen mintegy 5-7 vagy annál több hidroxil- illetve ketocsoport található. A hidroxilcsoportok szelektív észterecitése általában nem okoz problémát. Vannak olyan hormonok, amelyek több, hasonló reakcióképességgel funkció csoportot tartalmaznak. Ebben az esetben is számolnunk kell a nem egységes reakciótermékek fellépésével. Ilyen pl. minden tetrahidro-, dihidro-származék, pregnandiol, pregnatriol, triamcinolon, stb. Jellelhető a fenti értelemben véve csak a triamcinolon a bonyolult szerkezetű szteroid, mégis valamennyi fent említett esetben



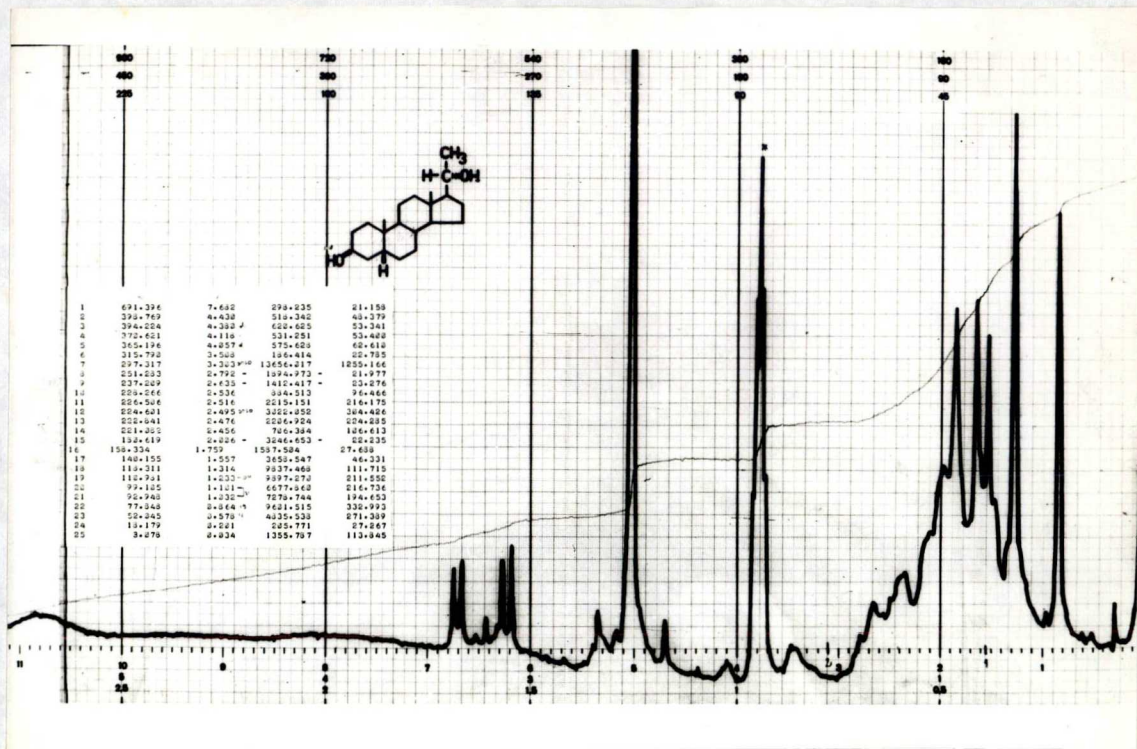
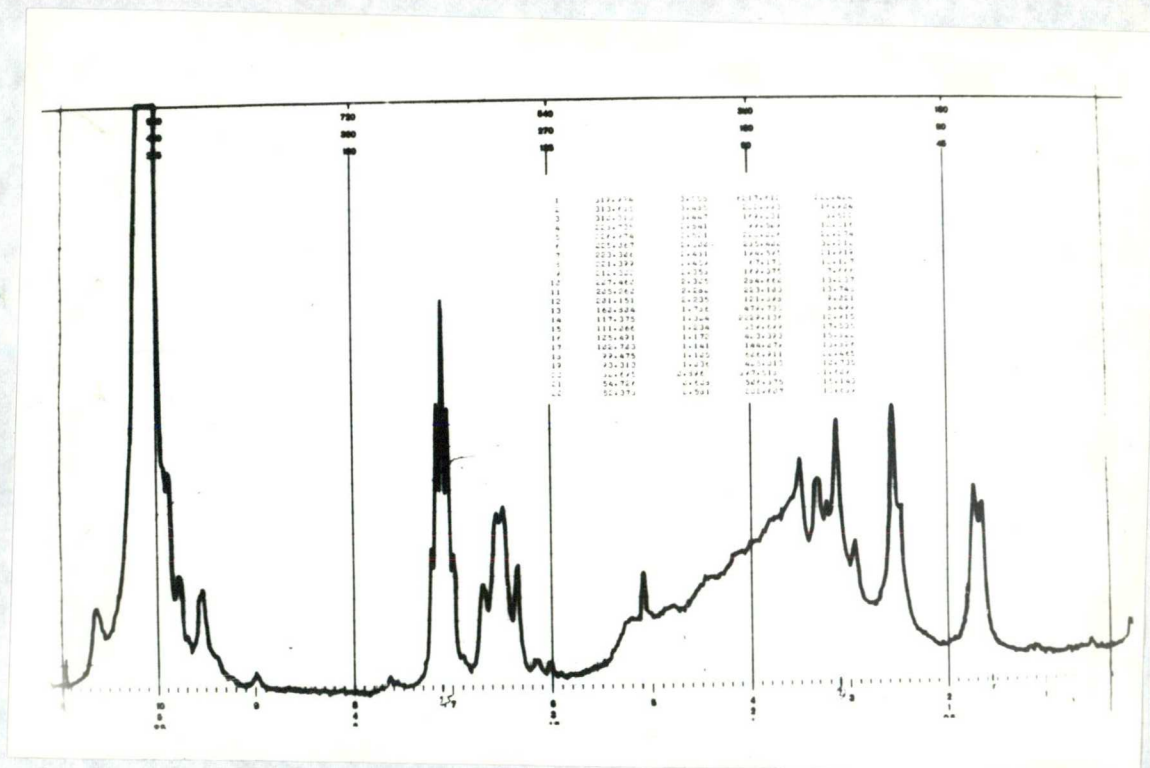
Különböző hemiszukcinátokat /illetve bisz-hemiszuksinátokat / tartalmazó reakcióelegyet kaptunk. Ennek tisztítása szintén preparatív rétegkromatográfiával történt. Ahol a molekula szerkezete lehetővé tette, UV detektálást használtunk.

Külön említést érdemel a pregnandiol-20-hemiszuksinátjának előállítására. Az aránylag nagy mennyiségű reakcióelegyből két különböző hemiszuksinát sikeresen izoláltunk. Az infravörös-spektroszkópia mindkét esetben igazolta a hemiszukcinát-képződés lezajlását. A létrejött észterkötés helyzetének megállapítására - miután volt elegendő mennyiségű ANYAGUNK - NMR spektroszkópiát használtunk. Ennek segítségével sikerült egyértelműen bizonyítanunk, hogy az észterizáció a 20-as helyzetben megy végbe nagyobb mértékben.

A D<sub>3</sub>-vitamin-3-hemiszuksinátjának előállításánál az alapvegyület érzékenysége okozta a problémát. Hogy a mi szempontunkból nem specifikus elváltozásokat kiküszöböljünk, a reakciót fénytől védve, in nitrogén-atmoszféra alatt hajtottuk végre. A vegyület kímélése céljából a reakcióidőt rövidítettük, s nem törekedtünk jó termelésre sem. A preparatív módon a detektálást UV<sub>254</sub> nm-n végeztük úgy, hogy három 0.5 cm-es csíkot fedetlenül hagytunk. Ezáltal a lehető minimumra csökkentettük a vegyület bomlásának veszélyét. A lepról történő elválást szintén fénytől védve hajtottuk végre. / ez után a lépés után történt az infravörös spektrum felvétele/. A további tisztítást sósav helyett az oxim-származékoknál használt cimetronsav-oldattal végeztük. A kapott anyag szerkezetének bizonyítására infravörös spektrumát használtuk fel.



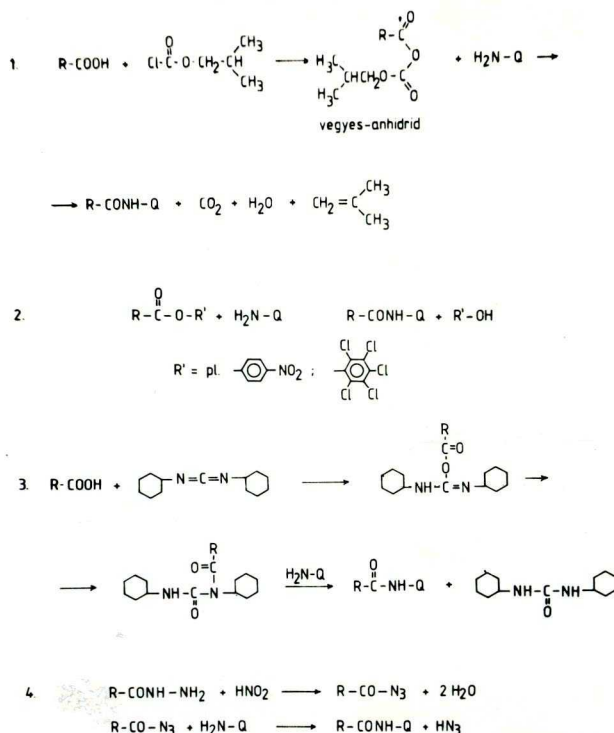


Pregnenolone  $^1\text{H}$ -NMR spektruma /0-8 ppm/Pregnenolone-20-HS  $^1\text{H}$ -NMR spektruma /0-4 ppm/



## Szteroid-protein-konjugátumok előállítás

Karboxilcsoportot tartalmazó vegyületek fehérjéhez való kapcsolására elméletileg igen sok módszer alkalmazható. A gyakorlat azonban azt mutatta /1. oldal/, hogy nem minden kötés felel meg a célra. Beható vizsgálatok szerint a savamid-kötés a legelőnyösebb, mert kémiaiilag stabil kovalens kötés, ugyanakkor biológiailag is stabil, mivel a szervezet enzimeit csak lassan támadják meg. A fentiek alapján kísérleteink során minden esetben peptid-kötést alakítottunk ki. Hordozó molekulának fehérje molekulát, nazha-szérumalbumint /BSA/- választottunk. A fehérje molekulatömege, magas liszintartalma miatt kísérleteink számára előnyös volt. Fehérjéhez való-kapcsolására peptid-kémiai módszert választottunk. A leggyakrabban használt 4 módszert röviden a következőképp tekinthetjük át:



1/ vegyes-anhidrides kapcsolásnál a karboxilcsoport aktiválására valamennyi esetben klórhangyacsav-izobutil-észtert használtunk. Oldószerként poláros, aprotikus oldószereket választottunk. A reakció különösen érzékeny a pH változásra; lúgos közegben a keletkezett vegyes-anhidrid gyorsan bomlik. Az aktiválás - saját



megfigyeléseink szerint - mintegy 30-60 mp alatt nagy végbe. Ez az idő lényegesen rövidebb, mint amit a szakirodalom megad.

2/ Tapasztalataink szerint az antigén-szintézis szempontjából lényeges különbség van a vegyes-anhidridos és a karbodiimidos módszer között. Ez utóbbi módszerrel előállított antigének kevésbé voltak használhatók immunizálás céljára. Ezt úgy tudjuk magyarázni, hogy karbodiimidos kapcsolás alkalmazásakor a végbenemő kémiai reakció nem vezet homogén termékhez, emellett a reakciót bizonyos foka fehérje-polimerizáció kíséri. A fentiek érthetővé tesszik, hogy szteroid-származékainkat előszörben vegyes-anhidridos kapcsolással kötöttük fehérjéhez.

3/ Mivel a vegyes-anhidridek gyorsabban és jobb termeléssel állíthatók elő, ezen kívül további reakciókhoz izolálás nélkül használhatók, aktív észtereket nem állítottunk elő.

4/ Az észterek esetében is érvényes minden, amit az aktív észterekről mondtunk, annyi különbséggel, hogy az észteres kapcsolás peptid-kémiai meggyilvánuló előnyét /a racemizáció alacsony foka/ a szteroid-antigénjeink szintézisével nem lehet kihasználni.

#### Neurotransmitter-antigének előállítása

Míg a szteroid-antigénjeinket kizárólag radioimmuno-assay céljaira kívántuk előállítani, addig a neurotransmitter-származékok előállításával többszörös célt követünk:

- a/ antigén-szintézis RIA céljára
- b/ antigén-szintézis ICC céljára
- c/ immobilizált származékok előállítása

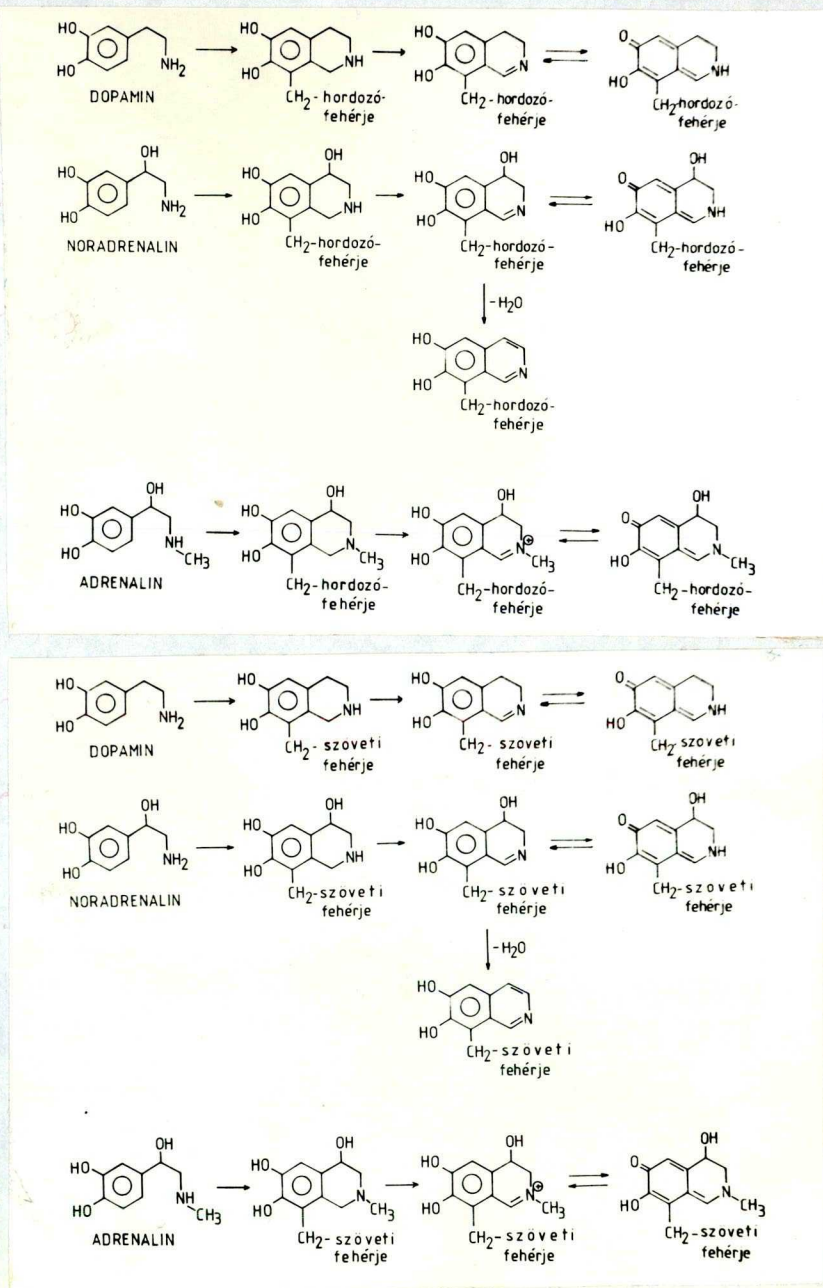


Az A/ és B/ pont szétválasztása - irodalmi előzmények hiányában - értelmetlenné tűnhet .

Eredeti elképzelésünk szerint mi sem tettünk különbséget a két cél között. Első kísérletsorozatunkban ugyanolyan kísérleti körülményeket alkalmaztunk az antigén - szintézis során függetlenül attól, hogy melyik célra kívántuk az kapott antigént felhasználni.

Az immunizálások során kapott antiszérumok ellenőrzésének eredményei bizonyították, hogy a kapott antiszérumok nem alkalmasak egyidejűleg mindkét eljárásra.

Felmerült a kérdés, hogy az adott antiszérum miért alkalmas ICC-ra és miért nem alkalmas RIA-ra. Szeretnénk újra Jonsson és mtsaira hivatkozni, akik a fluoreszcencia fellépését a következő képletssorral magyarázták: /alatta az antigénjeink valószínűsített szerkezetét bemutató ábrát közöljük/.





Észre kell venni, hogy a szövetet ugyanúgy formaldehid kezelés éri /fixálás/, mint a fehérjét az antigén-szintézis során. Ha az antigén-szintézist más módszerrel hajtjuk végre, pl. karboxilcsoport felhasználásával, akkor nem kapunk immunfluoreszcenciát. Ennek a fordítottja is igaz. Az ICC-ban bevált antiszérumok nem kötik meg a szabad radioaktív neurotranszmittert.

Általánosságban kimondhatjuk, hogy az antigén szintézist - ilyen kis molekulák esetében - mindig a kívánt felhasználási cél figyelembevételével kell megtervezni és végrehajtani.

Konkrétabban fogalmazva ez azt jelenti, hogy ICC-ra készülő antigén szintézisének a szöveti fixálás módszere a döntő. Ha pl. a fixálást formaldehiddel végzik, akkor az antigénszintézist is formaldehiddel kell végrehajtani. Ebben az esetben a szövetben fixált neurotranszmitter szerkezete és az antigén szerkezete között alig lesz különbség, az antigénnel szemben termeltetett antiszérum 100 %-os keresztreakciót fog adni a szövetben fixált neurotranszmitterrel.

RIA esetében a cél éppen fordított. Mivel a szérumban lévő szabad neurotranszmittert kívánjuk kimutatni, az antigénszintézis során vigyázni kell arra, hogy a haptén valamennyi funkciós csoportja érintetlenül maradjon.

#### Formaldehides kapcsolások

Kísérleteink kezdetén formaldehides kapcsolással szintetizáltuk neurotranszmitter antigénjeinket. Később az immunizálási eredmények birtokában és a hipotézis felállítását követően a formaldehides és a karboxilcsoporton keresztüli kapcsolat párhuzamosan folyt. A formaldehides kapcsolásnál két alapvető problémát kellett megoldani:

- a/ katekolaminok és szerotonin oxidációtól való védelme
- b/ a reakció során történő kicsapódás megakadályozása



A szakirodalomból mindkét probléma ismert. Mi a szakirodalomtól eltérő módon antioxidáns adagolásával kísérleteztünk. A kísérleti körülmények optimalizálása során az aszkorbinsav bizonyult a legalkalmasabb antioxidánsnak. Előnyei: 1/ kellő védelmet nyújt

2/ nem okoz mellékreakciót

3/ nem okoz kicsapódást

4/ könnyen eltávolítható a reakciókezeléssel

A kicsapódás megakadályozására az irodalom rövid reakcióidőket javasol. Ennek hátránya, hogy alacsony haptén/hordosó arány érhető el a kevésbé reakcióképes katekolaminoknál /pl. adrenalin/.

Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy a reakciókezelés kellő mértékű hígítása megakadályozza a kicsapódást, ugyanakkor a haptén/hordosó hányadosát csak enyhén mérsékelte. A kicsapódások elkerülése mellett másik célunk a hapténok számának növelése volt. Feltételeztük, hogy a formaldehides kapcsolás jelentős része a lizin - aminosortjain keresztül történik. A BSA 99 lizin részből mintegy 30 helyeszkedik el a molekula felületén, más szóval az aminosortoknak kb. csak a fele "elérhető" a kapcsolás számára. Ugy gondoltuk, ha a kapcsolásban résztvevő aminosortok számát növelni tudnánk, akkor magasabb haptén/BSA arányt érhetnénk el. Ezt a célt denaturáló ágensek /karbamid, SDS/ adagolásával értük el. Ezzel a módszerrel általában 20-40 haptént tudunk egy fehérje molekulára felkapcsolni.

Érdekes, hogy hellelőn híg oldat esetén a reakció hőmérsékletét is emelhetjük és ezzel növelhető a felkötött haptén mennyisége. A szakirodalommal ellentétben az adrenalin antigénjét antioxidáns jelenlétében 42°C-on szintetizáltuk. Ilyen körülmények között 40-60 adrenalin molekula kapcsolódik fel egyetlen BSA molekulára. Szerotonin, noradrenalin, dopamin esetén a hőmérséklet emelése növeli a kicsapódási készséget. Ezzel ellentétben, ha alacsonyabb hőmérsékleten, de hosszabb reakcióidőt választva hajtjuk végre a kapcsolást, akkor 100-nál több haptén is kapcsolódhat hordosó molekulánként.

Érdekes kísérletet végeztünk a kicsapódott szerotonin antigénnel. Megállapítottuk, hogy az acetonnal oldha-



tó: így lehetővé vált a haptén/BSA arány meghatározása. Már a konjugátum fizikai tulajdonságából arra következtettünk, hogy nagyszámu szerotonin molekula kapcsolódhatt fel egyegy BSA-ra. A mérések szerint ez a szám jóval meghaladta a 100-at. A fent említett kísérleti adat/ok/birtokában a következő hipotézist állítottuk fel a kicsapódás magyarázatára:

relatív tömény oldatban a fehérje molekulán lévő tirozin, triptofán, hisztidin stb. megfelelő csoportjai úgy reagálnak formaldehiddel, hogy intermolekuláris metilén-hidak képződnek. Ez a-nagyfoku polimerizáció vezet elsősorban kicsapódáshoz, nem pedig a haptének nagyszámu kapcsolódása. Ez utóbbit támasztja alá az a tény is, hogy szerotonin esetében is, hig oldatban kicsapódás nélkül érhető el igen magas, gyakran 100 körüli haptén/BSA hányados.

A formaldehides kapcsolás során jelentkező általános problémákon túl röviden szeretnénk megemlíteni az egyes neurotranszmitterek sajátosságait.

#### Adrenalin

Hőre, fényre, oxigénre a "legkevésbé" érzékeny a katekolaminok között. Ennek ellenére 10-12 perc alatt a oldatban történő állás után már kimutatható bomlása. Kicsapódásra a legkevésbé hajlamos. Klasszikus körülmények között csak alacsony haptén/BSA arány érhető el. A reakciólogy higitásával és a hőmérséklet emelésével is csak 60 körüli arányt sikerült elérnünk. Az aszkorbinsav az oxidációtól tökéletesen megvédi.

#### Noradrenalin

Az adrenalinmál lényegesen "kényesebb" vegyület. Hőre, fényre, oxigénre, pH-ra érzékeny. Kicsapódásra hajlamos. Kapcsolására legoptimálisabb körülmények a következők: nagy higitás, argonnal átbuborékoltatott oldószerek, szobahő. Legjobb esetben 100-120 közötti haptén/BSA arány érhető el. Az aszkorbinsav az oxidációtól nagyrészt megvédi.



### Dopamin

A három katekolamin között a legérzékenyebb és ugyanakkor a legreakcióképesebb is. Nagy higitást, rövid kapcsolási időt igényel. A kicsapódás elkerülése érdekében 10-20°C-on dolgoztunk. Az elért legmagasabb haptén/BSA arány 60-80 között mozgott. Az aszkorbinsav az oxidációtól nagy részt megvédi.

### Szerotonin

Nagy reakcióképességi, hőre, fényre, oxigénre, pH-ra érzékeny vegyület. Antigénje kicsapódásra igen hajlamos. Antigénjének szintézisekor az összes vegyület közül itt alkalmaztuk a legnagyobb higitást, ennek ellenére a kicsapódást nem tudtuk teljes biztonsággal elkerülni. Azonos körülmények között végzett paralel kísérletsorozatban az esetek egy részében kicsapódik, míg máskor nem. Az aszkorbinsav az oxidációtól megvédi.

### Hisztamin

Reakcióképes, hőre, fényre, oxigénre alig érzékeny vegyület. Kellően hig oldatot alkalmazva kicsapódása megakadályozható. Antigénjének szintézise során aszkorbinsav alkalmazására nincsen szükség. Igen komoly problémát okoz a felkapcsolt hisztamin mennyiségének meghatározása. Erre a célra, más lehetőség hiányában, UV spektrofotometriát alkalmaztunk. A kapott eredményeket csupán kvalitatív, tájékoztató jellegű értékeknek tekintettük.

### Acetilcholin

A molekula szerkezete formaldehides kapcsolást nem tett lehetővé.

A radioimmun-analitikai célokra olyan antigént igyekeztünk szintetizálni, ahol valamennyi funkciós csoportot érintetlenül hagyva alakítunk ki kötést a haptén és a fehérje között, másrészt lehetőleg olyan kapcsolási módszert akarunk választani, amely egyértelmű szerkezetű antigénhez vezet. Ez utóbbi kritériumnak nem tett eleget a formalde-



hides kapcsolás. A fenti célok elérése érdekében a neurotransmitter molekulákat karboxilcsoporttal bővítettük, vagyis a neurotransmitterek karboxilált változataival végeztük az antigénszintézist. A védett, karboxilált neurotransmitterek kapcsolására a szteroid-antigének szintéziséénél /1.old. / tárgyalt okok miatt ez esetben is vegyes-anhidrides módszert alkalmaztunk.

Kísérleteink során az egyértelmű kémiai kötés kialakítása érdekében neurotransmitter-karbonsavaink kapcsolásában részt nem vevő funkciós csoportjait a peptid-kémiából ismert védőcsoportok valamelyikével védeni kell. Az aminoscsoportok átmeneti védelmére BOC-, FMOC- ill. Z-csoportokat, a fenolos hidroxilcsoportok védelmére benzil-, az alkoholos hidroxilcsoportok védelmére terc.-butil-védőcsoportot használtunk.

Az adrenalin és noradrenalin kivételével eredetileg optikailag inaktív neurotransmitterekből a karboxilcsoportok bevitelével optikailag aktív neurotransmitter-karbonsavak keletkeznek. /Az adrenalin, illetve noradrenalin esetében a második aszimmetria-centrum alakul ki/. Antigénszintéziseinket mind a természetes L mind a szervezetben elő nem forduló D enantiomerrel végrehajtottuk. A D konfigurációju neurotransmitter-karbonsavak antigénjeitől az alábbi előnyöket reméltük:

Várhatóan erősebb antigenitással rendelkeznek, mint az L-származékok; emellett feltételzhetően az enzimés lebontásnak jobban ellenállnak és feltételezhetően kisebb keresztreakciót adnak. Ez utóbbi várakozásunkat arra alapoztuk, hogy az L izomerrel szemben D módosulatok a szervezetben nem fordulnak elő. Az eredeti neurotransmitterrel szemben adott reakciót ez a változtatás előre láthatóan nem befolyásolja, mivel azok aszimmetria-centrumot nem tartalmaznak, illetve a változtatás eredetileg optikailag inaktív szénatomon történik.



Kapcsolódása alkalmas karboxilált neurotransmitter-  
karbonsavak előállítására

Adrenalin

Kísérleteink célja a megfelelően védett "adrenalin-karbonsav" /3,4 - dihidroxifenil-N-metil-szerin/ előállítása volt. A kitűzött vegyületet 1947-ben Dalglish és mtsai állították elő /81/. A szakirodalomban ez az egyetlen cikk, amely beszámol az adrenalin-karbonsav szintéziséről. Előállításuk módja nagyon bonyolult, nehézkes és igen rossz /3.9 %/ termeléssel jár. Ezért nem a recept reprodukciója, hanem új szintézist kidolgozása mellett döntöttünk. Termünk megvalósításához több lehetőség is kínálkozott. Egyik megoldásként a Hogedüs-féle leírás kínálkozott, ahol glicin helyett szarkosinnal hajtjuk végre a reakciót. Ez az út nem vezetett eredményre. Hasonlóképpen nem volt eredményes a Knoevenagel-Cope szintézis sem, ahol diisobutíldit benzaldehydot N-metil-N-acetamidomalonészterrel kívántunk reagáltatni. Hasonlóképpen kudarccal járt a dimetoxikávéssav epoxidálása is, ahol ezt követően az epoxidot metilammal kívántuk felnyitni. Ezen eredmények /kudarcai/ után döntöttünk úgy, hogy a célvegyületet dihidroxifenilszerinből fogjuk előállítani. Várakozásunknak megfelelően a diisometános metilezés nem vezetett egységes termékhez. A különbözőféleképpen metilezett termékek szétválasztása nem volt járható út. Ezt követően az Olsen-féle metilezési eljárással próbáltunk célt érni /82/. A megfelelően védett vegyületet esüst-oxid katalizátor jelenlétében metiljodiddal reagáltattuk. A kívánt vegyület helyett feltehetően béta-elimináció miatt eltérő szerkezeti termékhez jutottunk.

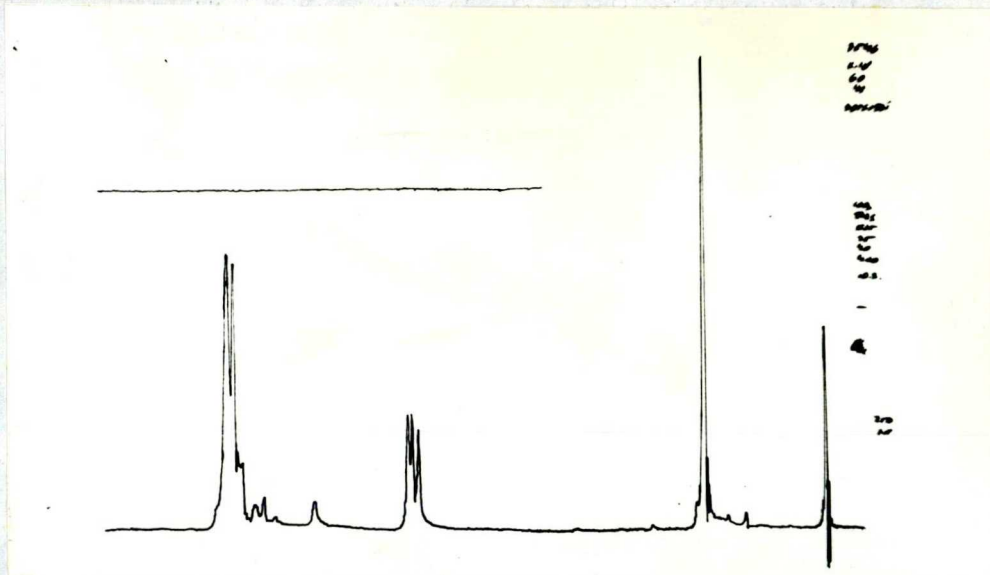
Jobb eredményt vártunk a hidroxilcsoportok előzetes védeésétől. A szerin és treonin hidroxilcsoportjainak benzilcsoporttal történő védeését Hruby írta le /86/ és treonin esetében csak 6 %-os termelést jósol. A szerin és treonin összehasonlítását az teszi indokolttá, hogy a treonin szekunder hidroxilcsoportjához hasonlóan a szerin - eredetileg primer hidroxilcsoportja - a fenilszerin vagy DOPS



esetében szekunderré válik. Emiatt, bár a vegyület nevében a szerinnel való rokonság tükröződik célvegyületünket mi mégis a treoninhoz közelebb állónak érezzük. A várakozásnak megfelelően az alkoholos hidroxilcsoport védelme dibenziloxi-Z-fenilszerin esetében is rossz termeléssel ment végbe, amihez még a nagy térkitöltésű védőcsoportok gátlóhatása is hozzájárult.

A tribenzil-Z-származékot csak hosszadalmas oszlopkromatográfia árán, rossz termeléssel sikerült izolálnunk. Az igen kicsi mennyiségben előállított védett vegyületet megpróbáltuk metilezni. Így sem jutottunk egységes termékhez.

A hidroxilcsoport védelmét végülis a Schröder /87/ által leírt módszerrel oldottuk meg. Alacsony termelési százalékkal, oszlopkromatográfia után, tisztán nyertük az öt-szörösen védett, karboxilált termékünket. A kapott, védett származék szerkezetének igazolására NMR spektroszkópiát alkalmaztunk.



A TAI jelenlétében felvett spektrum igazolta, hogy a molekulán szabad hidroxilcsoport nincs. A teljesen védett származék metilezése folyamatban van.

Jobb lehetőséget kínált a Coggins-féle metilezési eljárás /88/. Ezt a módszert Z-védett aminosavakra írták le és jó termeléssel jellemezték. A reakció tetrahidrofuranban nátrium-hidrid jelenlétében metiljodid segítségével megy végbe. Szerin és treonin metilezésekor úgy találták, hogy a kívánt N-metileződés mellett O-metile-



zódás is lejátszódik. Ezek alapján kétféle reakció-termékre számíthattunk. A várakozással összhangban két kristályos frakciót izoláltunk, melyről feltételeztük, hogy az N-, ill. O-metil-származékoknak felel meg. A vegyület karboxilcsoportja csak igen kis mértékben metil-lazódott. A két kristályos frakciót további tisztítás után NMR spektroszkópia segítségével vizsgáltuk. 60 MHz-s felbontású készülékkel csak valószínűsíteni lehetett a metilcsoport helyzetét, ezért 90 MHz-s felbontású készülékkel is elvégeztük az analízist. A kisebb mennyiségben kapott termékről sikerült igazolni, hogy O-metil-származék. Ez a vegyület kb. 20 %-ban keletkezett.

A nagyobb mennyiségben keletkezett termék spektruma alapján megállapítottuk, hogy a 2.9 ppm-nél jelentkező csúcs megfelelhet egy nagyN-metil-csoportnak. Az integrálgörbe kiértékelése 5 aromás proton és 1 benzil-metilén-csoport hiányára utalt. Ez megerősítette feltevésünket egy benzilcsoport kihasadásának lehetőségéről. A spektrum alapján nem volt eldönthető, hogy az említett csoport honnan hasadt ki. Némi támpontot adott, hogy a két CH-csoport között lévő csatolási állandó megfelel egy 5-tagú gyűrű cisz-helyzetű protonjainak. Ennek alapján bizonyossá vettük, hogy termékünk tisztán N-metil származék. A vegyület kémiai viselkedése is meglepő volt, pl. a Z-védő-csoportot semmilyen körülmények között sem sikerült lehídrálnunk. Termékünk egyenértéksúlyát titrálás alapján határoztuk meg. A fogyás/pH görbe alakja egyértelműen arra utalt, hogy a molekulában egyetlen nátronluggal titrálható savas csoport van. A titrálásból számított egyenértéksúly kilencven egységgel bizonyult kevesebbnek az összegképletből számítottnál. Az a tény, hogy a benzilcsoport kihasadása nem járt együtt új savas csoport megjelenésével, egyéb, mélyreható szerkezeti változások lehetőségét vetette fel. A párhuzamosan elkészített infravörös spektrum-felvételekből két karbonilcsoport egyidejű jelenléte volt igazolható. Az elemi analízis eredménye  $C_{25}H_{23}NO_6$  összegképletű vegyület mellett szólt, ami egy  $C_7H_7$ -csoporttal kevesebb a számítottnál.



A termék pontos szerkezetének megállapítása érdekében  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum felvétele mellett döntöttünk. A spektrum részletes elemzésekor kiderült, hogy a szénjelek száma egy benzilcsoporttal kevesebb a vártnál. A további elemzésből három részletet érdemes kiemelni:

- 1/ 31.7 ppm-nél jelentkező eltolódás egyértelműen N-metil csoportra utal /az O-metil jelének 51.0 ppm-nél kellene jelentkeznie/.
- 2/ 172.2 ppm-nél a szabad sav karbonil-szén eltolódására jellemző jelet látunk
- 3/ 153.3 ppm-nél egy oxazolidin-gyűrűbe zárt karbonilcsoport szénének megfelelő eltolódást találunk.

A fentiek alapján termékünk szerkezetét bizonyítottuk tekintettük.

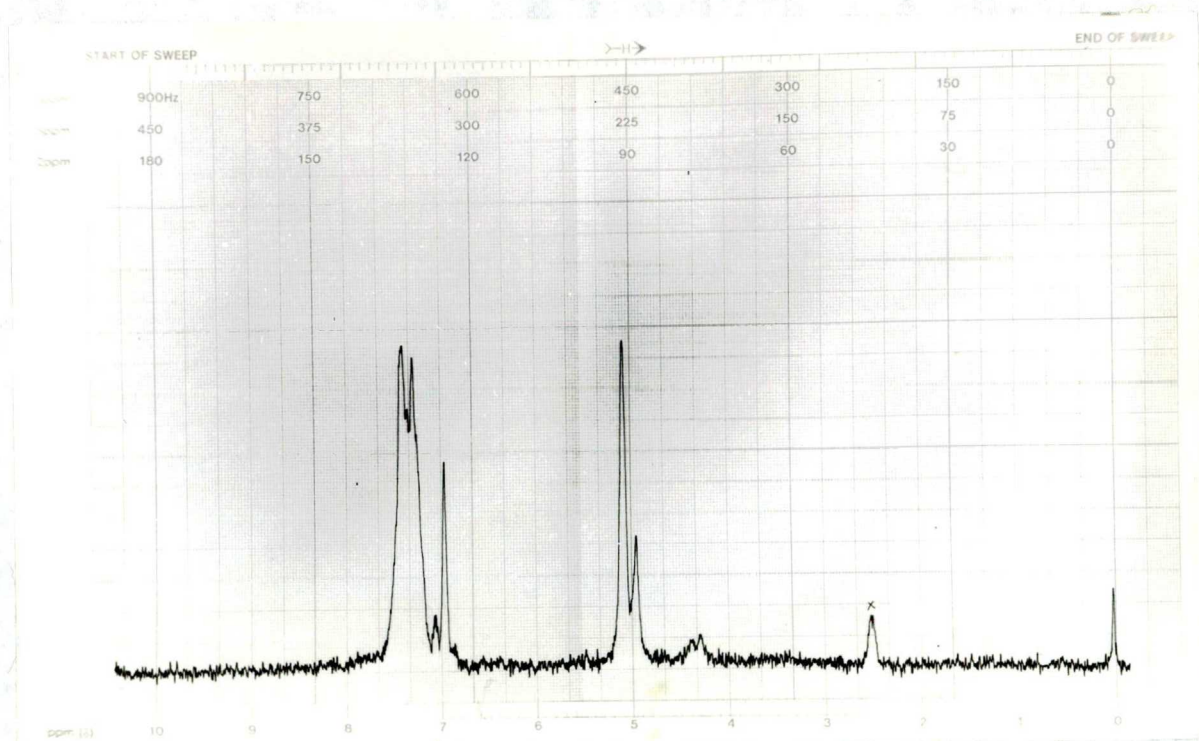
Érdekesnek ígérkezik a fenti reakciósor eritro-módosulattal történő elvégzése is és a két eredmény összehasonlítása után várhatóan a reakció finomabb mechanizmusára tudunk következtetni.

A szakirodalomból ismert, hogy a Z-csoport nukleofil reagensekkel támadható, miközben karbamid-, illetve hidantoin-származékok keletkeznek. A Z-csoport lúgérzékenységet több szerző is megfigyelte. Pl. Z-Ser-Tyr-OMe hidrolizisekor csak 50 %-os termeléssel tudták a Z-Ser-Tyr-OH-t előállítani /89/. Ugyanezt figyelték meg /90/ a Z-Ser-Tyr-OEt és a Z-D, L-Ser-Gly-OEt esetében is /91/. A lúgérzékenységekben igen fontos szerepet játszik a szerin szabad hidroxilcsoportja, amit bizonyít, hogy ennek védelme esetén megszűnik a lúg-labilitás /92/.

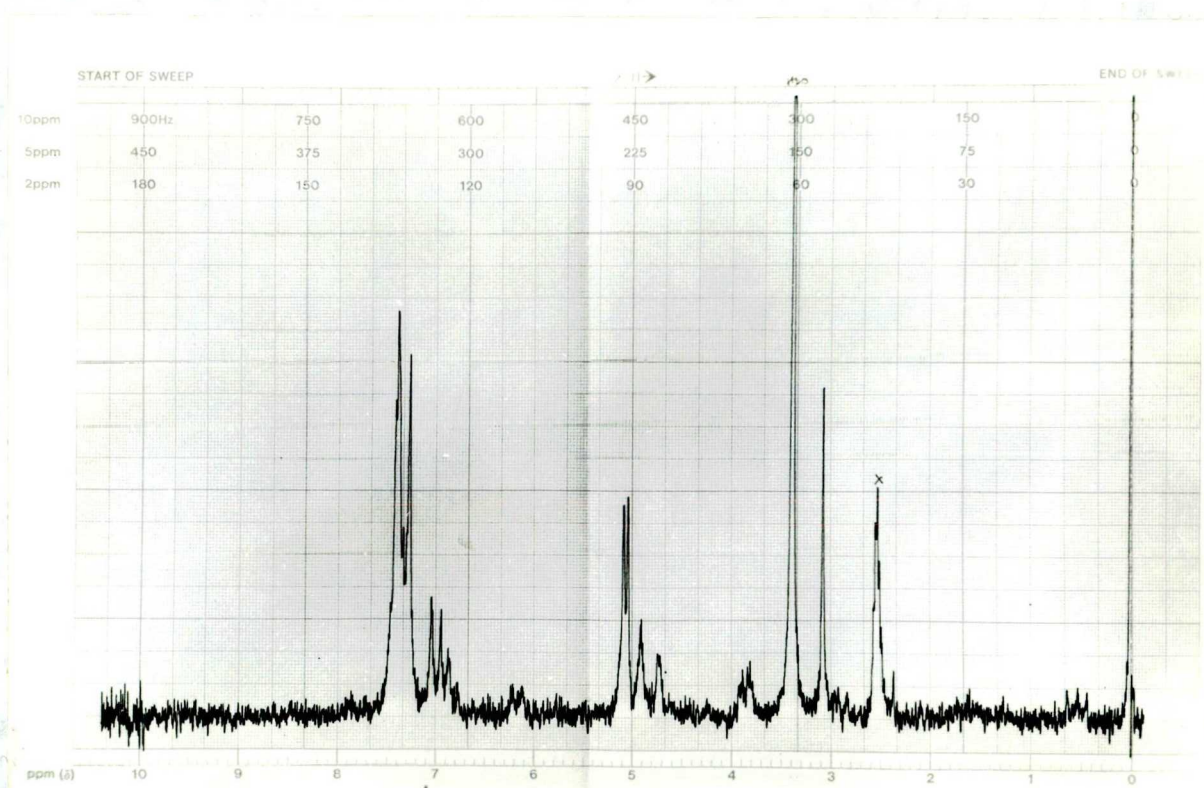
A magyarázatot Bergel és mtsai /93/ adják meg, akik Z-D, L-treoninnal dolgoztak a szokásos Bergmann /94/ technikát alkalmazva és a kívánt vegyület helyett 5-metil-2-oxo-oxazolidin-4-karbonsavat kaptak. A reakciót azóta alkalmazták "ciklo-treonin" tartalmu peptidek szintézisére is /95/.

Saját megfigyelésink szerint - a szakirodalomban nem közölt módon - vízmentes közegben is létrejön a gyűrűzáródás, ennek megakadályozására az alkalmazott közegtől függetlenül /vizes vagy nem vizes/ elengedhetetlen az alko -





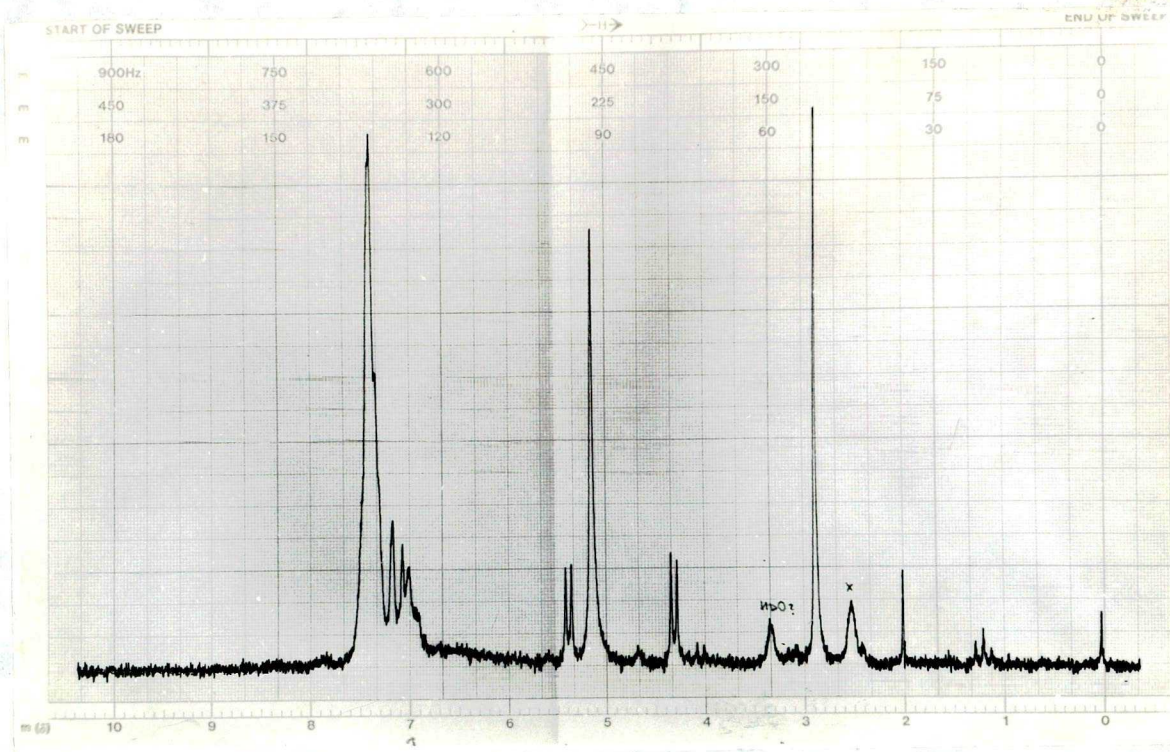
Z-Bzl<sub>2</sub>-DOPS-OH <sup>1</sup>H-NMR spektruma



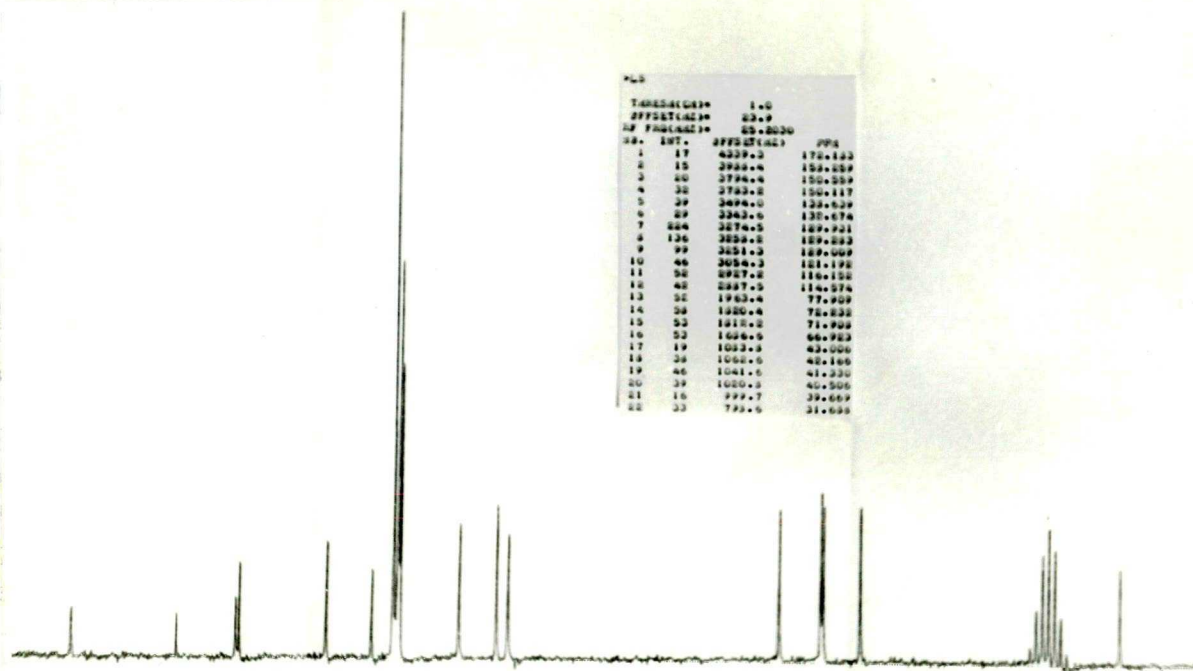
Z-Bzl<sub>2</sub>-DOPS/OMe/OH <sup>1</sup>H-NMR spektruma







Gyűrűzárt vegyület  $^1\text{H}$ -NMR spektruma

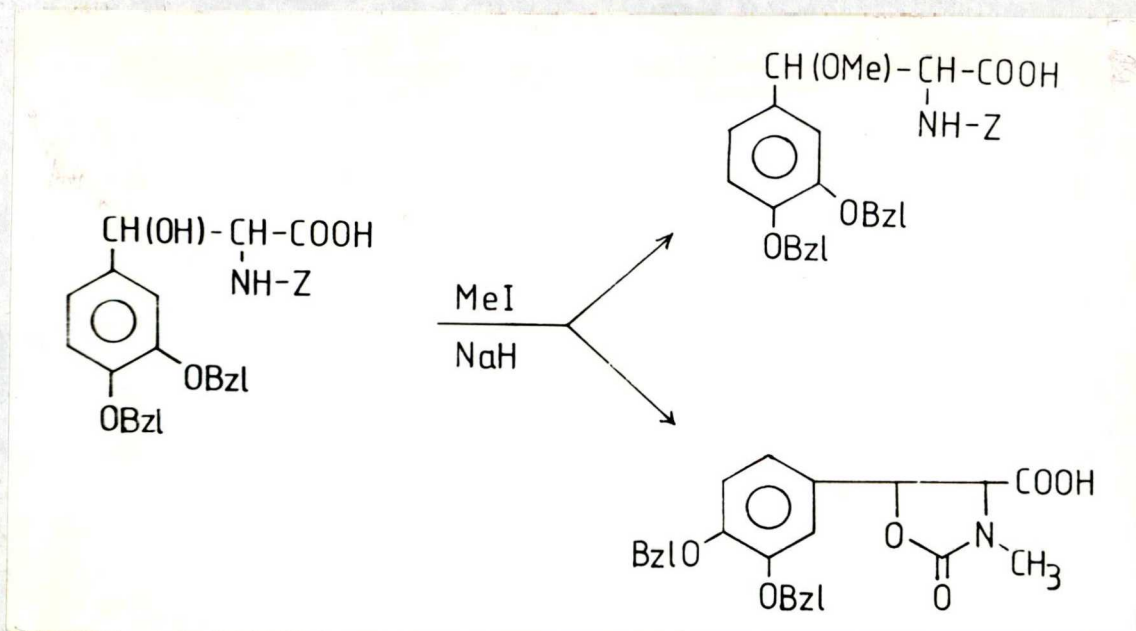


Gyűrűzárt vegyület  $^{13}\text{C}$ -NMR spektruma



holos hidroxilcsoport védelme.

A reakció lefolyását a következő ábrán foglalhatjuk össze:



### Noradrenalin

A fehérjéhez való kapcsolásra közvetlenül alkalmatlan BOC-D,L-treo-DOPS előállítására kézenfekvőnek látszott a kereskedelmi forgalomban beszerezhető D,L-treo-DOPS BOC-védésével. A szintézisnek hátránya, hogy a jelenlévő sok funkciós csoport közül a BOC-pirokarbonát nem specifikusan reagál az aminosocporttal, így melléktermékek keletkeznek. A BOC-csoport bevitelére lugos közegben történik, ahol a noradrenalin-karbonsav bomlása igen gyors. Bár a BOC-csoport bevitelét nem BOC-aziddal oldottuk meg, hanem minden esetben BOC-pirokarbonátot alkalmaztunk, a reakcióidőt így sem sikerült pár óra alá csökkenteni. Sajnos a drága kiindulási anyagból is kevés állt rendelkezésünkre, ezért elhatároztuk, hogy a DOPS-t illetve annak védett származékát totálszintézissel állítjuk elő.

A dihidroxifenil szerint először Rosenmund /96/ szintetizálta több mint 60 éve. A vegyület akkor vált igazán elérhetővé, amikor Bolhofer /97/ a hidroxilcsoportok védelmére benzilcsoportot alkalmazott. Ezt a módszert Hegedűs /98/



fejlesztette tovább, akinek leírását munkánk során követ-  
tük. Ő dibenziloxi-benzaldehidet reagáltatott glicinnel  
vizes-etanolos közegben nátriumhidroxid jelenlétében. Az  
irodalmi adatokkal egyezően a fenti reakciót végrehajtva  
a DOPS treo-eritro módosulatának 3:1 arányu keverékét kap-  
tuk. A módosulatokat Z-védett származékuk DCHA sójának  
frakcionált kristályosításával választottuk szét. Jó ter-  
meléssel, nagy tisztaságban tudtuk a D,L-treo-módosulatot  
izolálni, amit későbbi szintéziseinkhez használtunk fel.  
Más esetekben a módosulatok szétválasztásától eltekintet-  
tünk és a szabad aminocsoportot BOC-pirokarbonát segitsé-  
gével védjük. A benzilcsoportokat katalitikus hidrogéne-  
zéssel távolítottuk el. Így jó termeléssel kapcsolásra al-  
kalmas tiszta terméket nyertünk. Anyagunk DCHA-só formájá-  
ban fénytől védve, hidegen, hosszú ideig bomlás nélkül tá-  
rolható.

#### Dopamin

A BOC-védett, karboxilált származék leírása megtalálható  
az irodalomban /99/. A szerzők az aminocsoport védelmére  
BOC-azidot alkalmaztak. Ez a megoldás a szerzők szerint  
is csak rossz termelési %-kal jellemezhető. Munkánk so-  
rán az irodalomban közölt módszerrel ellentétben a BOC-  
csoport bevitelére BOC-pirokarbonátot alkalmaztunk. Ezzel  
módosítással mintegy 80 %-os termelést tudtunk elérni. Ter-  
mékünket DCHA-sóján keresztül tisztítottuk, illetve ebben  
alakban tároltuk.

#### Hisztamin

A karboxilált származékát /a hisztidint/ a dopaminnál le-  
írt módon állítottuk elő. A reakcióközeg pH-jának alkalmas  
megválasztásával fő terméként N-BOC-hisztidint, illetve  
/BOC/<sub>2</sub>-hisztidint tudtunk fő terméként előállítani. Kisér-  
leteinket mind az L, mind a D módosulattal elvégeztük.



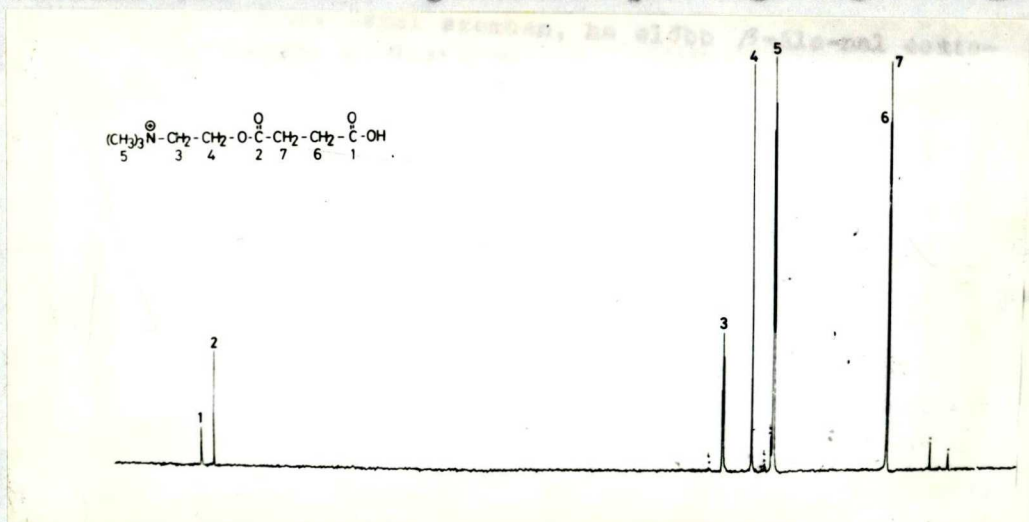
## Szerotonin

A karboxilált származék BOC-védését, illetve a BOC-védett származék tárolását a dopaminnál leírt módon oldottuk meg.

## Acetilkolin

Az acetilkolin helyett annak karboxilált származékát, a szukcinil-monokolint /SMC/ kapcsoltuk fehérjéhez. Emellett a megoldás mellett szólt, hogy az acetilkolinnal szemben az SMC kapcsolásra alkalmas karboxilesoporttal rendelkezik, hosszabb molekula mint az acetilkolin, így az ismert elv szerint jobban kiemelkedik a hordozó fehérje felületéről, ezért jobban felismerhető lesz.

Az SMC előállítására a kolint borostyánkősav-anhidriddel észterezítettük piridin-DMP elegyében. A kapott termék szerkezetét  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroszkópia segítségével igazoltuk.



Az asználást a következőképp adhatjuk meg:

|    |            |                                   |
|----|------------|-----------------------------------|
| 1. | 176.9 ppm  | -COOH                             |
| 2. | 174.2 "    | -CH <sub>2</sub> OCO-             |
| 3. | 65.0 " /t/ | -N <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> - |
| 4. | 58.9 "     | -CH <sub>2</sub> OCO-             |
| 5. | 54.3 " /t/ | -N <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub>  |
| 6. | 29.3 "     | -CH <sub>2</sub> COOH             |
| 7. | 29.1 "     | -OCOCH <sub>2</sub> -             |

A 3. és 5. jelek tripletre hasadnak fel a  $^{13}\text{C}$ - $^{14}\text{N}$  csatolás miatt:  $J = 3.5 - 3.7$  Hz.

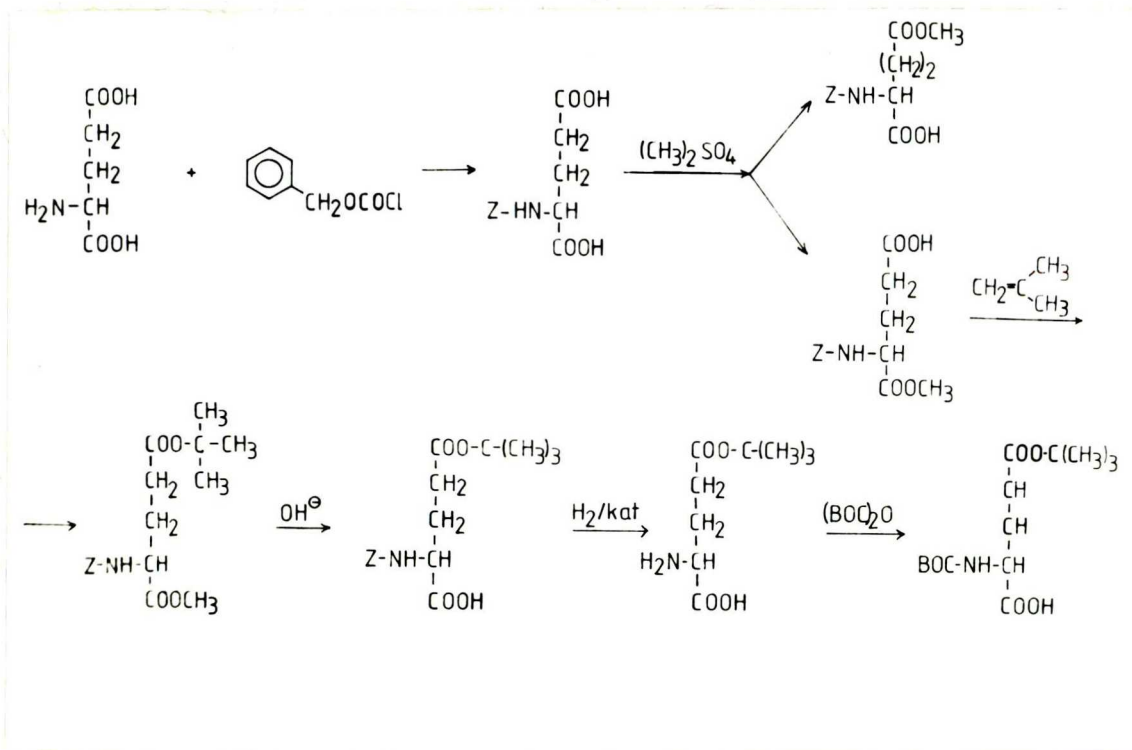






# GABA

A GABA tulajdonképpen dekarboxilezett glutaminsav, ezért a GABA kapcsolását védett glutaminsav /"karboxilezett GABA"/ alakjában végeztük el. A BOC-L-Glu/Obu<sup>+</sup>/-OH és a BOC-D-Glu/Obu<sup>+</sup>/OH előállítására irodalmi receptek /100, 101, 102, 103/ reprodukciója volt, ezért a szintézis menetét csak egy képletsorban foglaljuk össze:





### Immobilizált származékok előállítás

A neurotranszmitterek immobilizált származékai több szempontból is érdekes, sokoldalúan felhasználható adszorbensek.

1. alkalmasak affinitás-kromatográfia céljaira /104,105, 106, 107/
2. affinitás-mikroszkópiás célokra /108/
3. ICC-re termeltetett antiszérumok jellemzésére /109/
4. diagnosztikus célokra

1. A módszer lényege, hogy az antitest-antigén folyamat esetében az oldatban lévő antitest és a Sepharose felszínéhez kovalensen kötött antigén között jön létre. A reakció specificitásánál fogva a fehérje-elegyből csak az adott antitest kötődik ki és ezáltal elválasztható a többi komponenstől és igen nagyfokú tisztítás érhető el egyetlen lépésben.
2. Az alkalmasan elkészített Sepharose-hoz nemcsak fehérjék, hanem intakt, élő sejtek is kikötődnek. Ezek a sejtek ezután mikroszkóppal tanulmányozhatók. E módszer segítségével megállapítható, hogy a sejtek milyen felületi receptorokkal rendelkeznek, illetve, hogy a Sepharose-hoz kötött hormon, transzmitter stb. receptorával rendelkeznek-e. A módszer segítségével a sejtek receptoraik alapján izolálhatók.
3. Mint már korábban említettük /1: o./ korántsem olyan biztos, hogy egy antiszérum RIA-ra és ICC-re egyaránt alkalmazható. A RIA alkalmazhatóságát aránylag könnyen - radioaktív-származék kötésének mérésével - megállapíthatjuk. ICC esetében azonban a kapott negatív eredménynek több oka is lehet:
  - a/ az antiszérum nem alkalmas ICC-re
  - b/ a fixálás megváltoztatta az antigén szerkezetét
  - c/ a kimutatni kívánt anyagot nem sikerült fixálni.



Immobilizált származékok segítségével eldönthetjük, hogy melyik eset forog fenn. A Sepharose-hoz kötött antigén mintegy mesterséges szövetként funkcionál, mely már biztosan fixált /kiméletes módszerekkel, kovalens kötéssel/ tehát további fixálást nem igényel.

- 4/ Diagnosztikus célokra már több mint egy évtizede kifejlesztettek immobilizált származékokat, melyek a gyakorlatban jól beváltak /pl. Pregnostisee, Organon/.

A szakirodalomból ismert /110/, hogy kis molekulásulyu anyagok Sepharose-hoz történő kapcsolás után alig rendelkeznek biológiai aktivitással. Ez érthető, ha a kapcsolási technikákat végig gondoljuk. Ezeket u.i. közvetlenül BrCN-aktivált Sepharose-hoz kapcsolták vagy AH-Sepharose-hoz vizoldható karbodiimides módszer segítségével. Az előbbi kapcsolás a molekula aminocsoportját, az utóbbi pedig a karboxilcsoportját veszi igénybe. Ilyen kis molekulák esetében azonban elengedhetetlen, hogy valamennyi funkciós csoport érintetlenül maradjon.

Kísérleteinkben ezeknek a körülményeknek a következőképpen tettünk eleget:

- 1/ AH-Sepharose-hoz az új funkciós csoporttal bővített karboxilált neurotranszmittereket kapcsoltuk.
- 2/ Sepharose-hoz magát a teljes antigént kapcsoltuk

Az első esetben is védett neurotranszmitter-karbonsavakat vegyes-anhidrides módszerrel kapcsolunk. Kapcsolás után a gél dehidráltuk. Ezt óvatosan, felszálló acetonsorral végeztük. Technikai okok miatt az acetont diklórmetánra cseréltük és vízmentes trifluor-ecetsavas kezeléssel eltávolítottuk az alkalmazott védőcsoportokat. Diklórmetános mosás után a gél acetonnal mostuk, majd óvatosan rehidráltuk. Ezzel az eljárással a szakirodalomban először közöltünk polifunkciós vegyületek célzott immobilizálására alkalmas eljárást.



Sepharose-hoz kapcsoltuk az ICC céljára készült antigéneket is. Háromféle technikát alkalmaztunk.

- 1/ formaldehides kapcsolást
- 2/ aktiv észteres kapcsolást
- 3/ BrCN-os kapcsolást

A három kapcsolási technika elvileg teljesen egyenértékű. Azonos nagyságrendű a felkötődés; mindhárom esetben "deaktiválni" kell a gél, azaz a megmaradt aktiv csoportokat el kell reagáltatni. Várakozásunkkal ellentétben ICC ellenőrzésre csak a brómcianós aktiválást követő kapcsolás vált be. A másik két esetben igen erős nem specifikus affinitást mutatott a gél a normál szérummal szemben is. Ez a kötés nem kovalens jellegű, mert pH=2.5 illetve ez alatt megszüntethető. Erőssége megegyezik az antitest-antigén kötés erősségével, attól nem különböztethető meg. Ezért az előző két módszerrel készült Sepharose-származékok ICC ellenőrzési célokra nem használhatók. A jelenség pontos magyarázatára további vizsgálatok szükségesek.



Antigénjeink felhasználásával elért biológiai eredmények

Szteroid-RIA területén elért eredmények

Az elmúlt évek során - az általunk szintetizált antigének felhasználásával - 45 /1/ szteroidra sikerült RIA-t kidolgozni.

Ezek közül 9 esetben olyan specifikus antiszérumot sikerült előállítani, mely közvetlen meghatározást tesz lehetővé.

Ezek a szteroidok:

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| 1. aldosteron            | /vizeletben/ |
| 2. 6 -hidroxi-kortizol   | /vizeletben/ |
| 3. tetrahidro-kortizon   | /vizeletben/ |
| 4. tetrahidro-Substanz S | /vizeletben/ |
| 5. kortol                | /vizeletben/ |
| 6. DHEA                  | /plazmában/  |
| 7. deksametazon          | /plazmában/  |
| 8. betametazon           | /plazmában/  |
| 9. beklometazon          | /plazmában/  |

Ezen antiszérumok részletesebb jellemzését a függelékben adjuk meg.



Neurotranszmitter-antigénekkal elért eredmények

A neurotranszmitterekkel folytatott kísérletek időben lényegesen később követték a szteroid-antigének szintézisét. Így érthető, hogy az immunizálások, biológiai tesztelések még nem fejeződtek be, ezért csak néhány kezdeti eredményről számolhatunk be.

Az alábbi esetekben sikerült immuncitokémiai meghatározást kidolgozni:

adrenalin  
noradrenalin  
szerotonin

Biztató eredmények születtek a dopamin és a hisztamin antiszérumok felhasználásával is.

Ennek illusztrálására szeretnénk néhány immunfluoreszcens felvételt bemutatni /1: függelék/.

A többi, általunk szintetizált származékkal nemrég kezdődtek meg a vizsgálatok, így eredmény még nem áll rendelkezésre.



## K I S É R L E T I R É S Z

### Általános megjegyzések

Az olvadáspontok mérése Koffler-készülékkel történt. Az optikai forgatóképességet Zeiss asztali polariméteren mértük, a vékonyréteg-kromatogramokat Kieselgel GF<sub>254</sub>/Merck/adszorbensen fejlesztettük ki. A lapokat 254 ill. 360 nm-n detektáltuk minden olyan esetben, amikor a molekula szerkezete ezt lehetővé tette.

Előhívószerként ninhidrint, jódot, klór-tolidint és 50 %-os foszforsavat használtunk.

### Futtatószer-rendszerek:

|                                           |                      |
|-------------------------------------------|----------------------|
| 1/ kloroform: etanol                      | 95:5                 |
| 2/ kloroform: etanol                      | 98 : 2               |
| 3/ kloroform: metanol:ecetsav             | 85 : 10 : 5          |
| 4/ kloroform: metanol: n-hexan            | 9 : 1 : 1            |
| 5/ kloroform: metanol: viz                | 60 : 30 : 5          |
| 6/ kloroform: metanol                     | 6 : 3                |
| 7/ kloroform: metanol: ecetsav            | 95 : 5 : 0.2         |
| 8/ kloroform: acetón                      | 9 : 1                |
| 9/ kloroform: acetón: ecetsav             | 9 : 1 : 0.1          |
| 10/ ecetsav: metanol: n-hexan: etilacetát | 10 : 4.5 : 13.5 : 72 |
| 11/ butanol: ecetsav: viz                 | 5 : 4 : 1            |
| 12/ kloroform: metanol: viz               | 2 : 8 : 1            |
| 13/ butanol: ecetsav: viz: piridin        | 30 : 24 : 6 : 20     |
| 14/ butanol: ecetsav: viz                 | 4 : 1 : 1            |
| 15/ butanol: ecetsav: viz                 | 8 : 5 : 4            |
| 16/ etilacetát: /metanol,:ecetsav: viz    | 75:10:24/ 98 : 2     |
| 17/ etilacetát: /metanol:ecetsav:viz      | 75:10:24/ 95 : 5     |
| 18/ etilacetát: /metanol:ecetsav:viz      | 75:10:24/ 90 : 10    |
| 19/ etilacetát: /metanol:ecetsav:viz      | 75:10:24/ 80 : 20    |



|                 |           |          |     |          |         |
|-----------------|-----------|----------|-----|----------|---------|
| 20/ etilacetát: | /piridin: | ecetsav: | viz | 20:6:11/ | 98 : 2  |
| 21/ etilacetát: | /piridin: | ecetsav: | viz | 20:6:11/ | 95 : 5  |
| 22/ etilacetát: | /piridin: | ecetsav: | viz | 20:6:11/ | 80 : 20 |
| 23/ etilacetát: | /piridin: | ecetsav: | viz | 20:6:11/ | 60 : 40 |

A haptén/BSA molarányok meghatározását UV-spektrofotométerrel, Spektromom 204 típusu készüléken végeztük.

Az aminosav-analiziseket AAA 881 /Automatikus Aminosav Analizátor, Mikrotechna/ típusu készüléken végeztük.

A munkánk során felhasznált liofilizátor WKF L 05 típusu volt.

Az UV-spektrumok Specord UV-Vis, az IR-spektrumok Unicam SP 200, az  $^1\text{H}$ -NMR-spektrumok JEOL 60, a  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektrumok VARIAN-XL-100-12 típusu készüléken tetrametilszilán belső standard alkalmazásával készültek.



Általános előírat szteroid-hemiszukcinátok előállítására

1 millimol szteroidot és 3-4 millimol borostyánkősav-anhidridet 4-5 ml vízmentes piridinben oldunk. A reakcióelegyet szobahőn állni hagyjuk /gondoskodva arról, hogy a reakciótérbe vizgőz ne juthasson be/. Kevésszéreakcióképes szteroidok esetében a hőmérsékletet szükség szerint 50°C-ig emelhetjük. Rendszeres időközönként vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatot végzünk. A reakció lezajlása után a kromatográfiás eredménytől függően dolgozzuk fel az elegyet.

A/ Egységes reakciótermék esetében az elegyet állandó keverés mellett 30 ml N sósavba öntjük, melyben jégdarábok úsznak. A vizes fázist háromszor azonos térfogatú etilacetáttal kirázzuk, az egyesített szerves fázist kétszer 10 ml desztillált vízzel mossuk, 1 órán át vízmentes nátrium-szulfáton állni hagyjuk, majd bepároljuk.

B/ Különböző hemiszukcinátokat tartalmazó elegy esetén a fenti eljárást végrehajtva a bepárlási maradékot kevés / 0.2 - 0.5 ml/ vízmentes metanolban oldjuk, majd gyári preparatív rétegen elválasztjuk. A lapról történő eluálást metanollal végezzük. A metanolt bepároljuk, a maradékot kloroformban oldjuk, a szilikagél-nyomok eltávolítása céljából szűrjük, majd újra bepároljuk.



A hemiszukeinát-szintézis eredményeinek táblázatos összefoglalása

| Szteroid                          | feldolg. | észterositett<br>OH-csoport.helysz. | term.<br>%        | R <sub>F</sub>        | reakció-<br>idő /h/ |
|-----------------------------------|----------|-------------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|
| Hidrokortizon                     | A        | 21                                  | 94.5              | /1/ 0.46              | 2                   |
| Pregnenolon                       | B /IR/   | 3                                   | 79.0 <sup>0</sup> | /5/ 0.75              | 150                 |
| 17- <del>α</del> -OH-pregnenolon  | A /IR/   | 3                                   | 87                | /5/ 0.70              | 140                 |
| Prednizon                         | A /IR/   | 21                                  | 88.5              | /5/ 0.70              | 20                  |
| Dexametazon                       | A        | 21                                  | 95.7              | /5/ 0.60              | 15                  |
| DHEA                              | A /IR/   | 3                                   | 98.4              | /5/ 0.75              | 140                 |
| Betametazon                       | A        | 21                                  | 82.4              | /5/ 0.65              | 20                  |
| Kortizon                          | A        | 21                                  | 96.5              | /5/ 0.70              | 10                  |
| Substanz A                        | A        | 21                                  | 81.2              | /5/ 0.65              | 20                  |
| Pregnandiol                       | B        | 20                                  | 86.9              | /5/ 0.65              | 250                 |
| Prednandiol                       | B        | 3                                   | 6.1               | /5/ 0.70              | 250                 |
| Pregnantriol                      | B        | 20                                  | 61.7              | /5/ 0.60              | 100                 |
| Astonin H                         | A        | 21                                  | 95.0              | /5/ 0.45              | 24 <sup>2</sup>     |
| Triamcinolon                      | B        | 21                                  | 39.9              | /5/ 0.52              | 24                  |
| Kortikoszteroidon                 | A        | 21                                  | 98.0              | /5/ 0.82              | 24                  |
| D <sub>3</sub> -vitamin           | B        | 3                                   | 40.0 <sup>3</sup> | /5/ 0.900<br>/8/ 0.60 | 85                  |
| 5-β-dihidro-kortizon              | A        | 21                                  | 92.0              | /5/ 0.75              | 40                  |
| 5- <del>α</del> -dihidro-kortizon | A        | 21                                  | 91.0              | /5/ 0.72              | 70                  |



|                                             |   |    |                 |          |                  |
|---------------------------------------------|---|----|-----------------|----------|------------------|
| 5- $\alpha$ -dihidro-kortizol               | B | 21 | 74              | /5/ 0.65 | 40               |
| 5- $\beta$ -dihidro-kortizol                | A | 21 | 95              | /5/ 0.60 | 40               |
| 5- $\beta$ -dihidro-11-dezoxi-<br>kortizol  | A | 21 | 88              | /5/ 0.75 | 40               |
| 5- $\alpha$ -11hidro-11-dezoxi-<br>kortizol | A | 21 | 72 <sup>1</sup> | /5/ 0.80 | 40               |
| 5- $\alpha$ -dihidro-kortiko-<br>szteron    | A | 21 | 72 <sup>1</sup> | /5/ 0.60 | 45               |
| 5- $\alpha$ -dihidro-teszto-<br>szteron     | A | 17 | 90              | /5/ 0.80 | 480 <sup>2</sup> |
| 11-dezoxi-kortikoszteron                    | A | 21 | 98              | /5/ 0.85 | 24               |
| tetrahidro-11-dezoxi-<br>kortizol           | B | 21 | 55 <sup>1</sup> | /5/ 0.65 | 100              |

1/ A kis anyagmennyiség miatti relatív nagy feldolgozási veszteség okozza az alacsony termelési százalékot.

2/ 50°C-on

3/ A kiindulási anyag kimélése miatt nem választottunk hosszabb reakcióidőt, nem törekedtünk magasabb termelési százalékra.



Általános előírat szteroid-karboximetil-oximok előállítására

1 millimól szteroidot és 5-10 millimól hidroxamino-ecetsav hidrekloridot és 250-400 mg vízmentes nátrium-acetátot 7-8 ml vízmentes metanolban oldunk. A reakcióelegyet szobahőn állni hagyjuk, gondoskodva arról, hogy a reakciótérbe vízgőz nem juthasson be. Kevésbé reakcióképes szteroidok esetén a hőmérsékletet 50°C-ig emeljük. A reakciót vékonyréteg-kromatográfiával követjük. A reakció lezajlása után a kromatográfiás eredménytől függően felgezzük az elegyet.

A/ Egységes reakciótermék esetén az elegyet állandó keverés mellett 30 ml 5 %-os citrónsavoldathoz öntjük, melyben jégdarabok úsznak. A vizet háromszor azonos térfogatú etilacetáttal kizsajátítjuk, az egyesített szerves fázist kétszer 10 ml desztillált vízzel mossuk, 1 óráig át vízmentes nátrium-szulfáton állni hagyjuk, majd vákuumban bepároljuk.

B/ Különböző karboximetil-oximokat tartalmazó elegy esetén a fenti eljárás elvégzése után a bepárlási maradékot kevés /0.2 - 0.5 ml/ vízmentes metanolban oldjuk, majd preparatív vékonyrétegen elválasztjuk. A lapról törtető eluálást metanollal végezzük. A metanolt vákuumban bepároljuk, a maradékot kloroformban oldjuk, a szilikagél-nyomok eltávolítása céljából szűrjük, majd vákuumban újra bepároljuk.



A karboximetil-oxim-képzés eredményeinek táblázatos összefoglalása

| Szteroid                                                  | feldolg. | oxim helye | term. %         | R <sub>F</sub>       | reakció-<br>idő /h/ |
|-----------------------------------------------------------|----------|------------|-----------------|----------------------|---------------------|
| Hidrokortizon                                             | A        | 3,20       | 80              | /3/ 0.22             | 16 <sup>2</sup>     |
| Aldoszteron                                               | B        | 3          | 40              | /5/ 0.50             | 15                  |
| Aldoszteron                                               | B        | 3,20       | 52              | /5/ 0.05             | 15                  |
| 4-pregnene-11- $\beta$ ,17- $\alpha$ -<br>diol-3,20-dion  | B        | 20         | 22              | /5/ 0.42             | 20                  |
| 18-hidroxi-kortikoszteron-<br>$\gamma$ -etiolakton        | B        | 3          | 75              | /3/ 0.05             | 20 <sup>2</sup>     |
| 5- $\beta$ -dihidro-aldoszteron-<br>-etiolakton           | A        | 3          | - <sup>6</sup>  | /5/ 0.95             | 20                  |
| 5- $\alpha$ -dihidro-aldoszteron-<br>$\gamma$ -etiolakton | A        | 3          | - <sup>6</sup>  | /5/ 0.90<br>/6/ 0.42 | 20                  |
| Prednilidén                                               | B        | 3          | 35              | /5/ 0.92             | 48                  |
| 18-hidroxi-kortikoszteron                                 | A        | 3          | 42              | /5/ 0.37             | 9                   |
| 18-hidroxi-kortikoszteron                                 | B        | 20         | 52              | /5/ 0.39             | 9                   |
| Pregnenolon                                               | A        | 20         | 59 <sup>4</sup> | /5/ 0.80             | 20 <sup>2</sup>     |
| 17- -hidroxi-pregnenolon                                  | A        | 20         | 81              | /5/ 0.40             | 40 <sup>2</sup>     |
| Prednizon                                                 | B        | 20         | 32              | /5/ 0.70             | 1.5 <sup>2</sup>    |
| Prednizon                                                 | B        | 3,20       | 65              | /5/ 0.15             | 1.5 <sup>2</sup>    |
| Dexametazon                                               | B        | 3          | 67              | /5/ 0.90             | 4 <sup>2</sup>      |
| Dexametazon                                               | B        | 3,20       | 25              | /5/ 0.60             | 4 <sup>2</sup>      |



|                                        |                             |                   |                 |          |     |
|----------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------|----------|-----|
| Betametazon                            | B                           | 3 <sup>5</sup>    | 80              | /5/ 0.45 | 20  |
| Betametazon                            | B                           | 3,20 <sup>5</sup> | 12              | /5/ 0.11 | 20  |
| DHEA                                   | A                           | 17                | 86              | /5/ 0.50 | 20  |
| Kortizon                               | B                           | 3                 | 59              | /5/ 0.95 | 2   |
| Kortizon                               | B                           | 3,20              | 30              | /5/ 0.45 | 2   |
| 6-hidroxi-kortizol                     | B                           | 3                 | 41 <sup>1</sup> | /5/ 0.30 | 220 |
| 6-hidroxi-kortizol                     | B                           | 3,20              | 15 <sup>1</sup> | /5/ 0.15 | 220 |
| Kortikoszteron                         | A                           | 3                 | 85              | /5/ 0.78 | 12  |
| 21-dezoxi -kortizon                    | B                           | 3                 | 42              | /5/ 0.45 | 20  |
| 21-dezoxi-kortizon                     | B                           | 3,20              | 57              | /5/ 0.11 | 20  |
| 5- $\beta$ -dihidro-kortizon           | A                           | 3                 | 78              | /5/ 0.52 | 16  |
| 5- $\alpha$ -dihidro-kortizon          | B                           | 3                 | 35              | /5/ 0.62 | 16  |
| 5- $\alpha$ -dihidro-kortizon          | B                           | 3,20              | 21              | /5/ 0.50 | 16  |
| 5- $\alpha$ -dihidro-kortizol          | B                           | 20                | 60              | /5/ 0.48 | 16  |
| 5- $\beta$ -dihidro-kortizol           | B                           | 20                | 35              | /5/ 0.42 | 16  |
| 5- $\beta$ -dihidro-11-dezoxi-kortizol | A                           | 20                | 82              | /5/ 0.55 | 16  |
| 5- $\alpha$ -dihidro-tesztoszteron     | A                           | 3                 | 84              | /5/ 0.72 | 15  |
| Tetrahidro-aldoszteron                 | A nem egységes <sup>6</sup> |                   | - <sup>6</sup>  | /3/ 0.55 | 20  |



|                                   |   |    |    |          |     |
|-----------------------------------|---|----|----|----------|-----|
| Tetrahydro-11-dezoxi-<br>kortizol | A | 20 | 90 | /5/ 0.40 | 240 |
| Tetrahydro-kortikoszteron         | A | 20 | 88 | /5/ 0.35 | 80  |
| Tetrahydro-kortizol               | A | 20 | 79 | /5/ 0.40 | 240 |

1/ A kis anyagmennyiség miatt relativ nagy feldolgozási veszteség okozza az alacsony termelési százalékot.

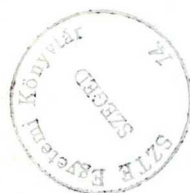
2/ 50° C-on

3/ A kiindulási anyag kiméltése miatt nem választottunk hosszabb reakcióidőt.

4/ Izolálási veszteségek miatt

5/ Higroszkópos

6/ A kis anyagmennyiség miatt nem volt tisztítható és a termelési százalék sem számolható.





6-Br-17 $\alpha$ -OH-progeszteron

1 g 17- $\alpha$ -hidroxi-progeszteront 30 ml széntetraklorid-kloroform 2:1 elegyében oldunk. Az oldatot 20 ml-re bepároljuk / a visznyomok eltávolítása céljából / és 0.72 g N-bróm-szukeinimidet adunk hozzá, majd 1 órát át visszafolyós hűtés mellett forraljuk. A forralás befejezése után fél órán át sós-jeges hűtést alkalmazunk. A kivált kristályokat kloroform-széntetraklorid 1:3 arányu elegyében szuszpendáljuk. Az oldhatatlan részt / szukeinimid / kiszűrjük. /300 mg/ Az anyalúgot vákuumban bepároljuk. Kétszeri átkristályosítás után az anyagból brómanalízist végzünk.

|                  |         |
|------------------|---------|
| Számított érték: | 19.56 % |
| Talált érték     | 19.49 % |

|          |                |
|----------|----------------|
| Termelés | 95 mg /9.5 % / |
|----------|----------------|

$R_F^2$  0.58

$R_F^8$  0.62

$R_F^4$  0.74

Op.: 169.5-170°C

17- $\alpha$ -hidroxi-progeszteron-6-/O-karboximetil-tioéter

325 mg KOH-t oldunk 32.5 ml metanolban és hozzáadunk 800 mg 6-Br-17- $\alpha$ -hidroxi-progeszteront /2mmol / és 210  $\mu$ l /3 mmol/ vízmentes tioglikolsavat, és az elegyet 2 órán át refluxáltatjuk. A reakció-elegyet 32.5 ml desztillált vízzel hígítjuk és 10 %-os sósavval addig svanyítjuk, míg az oldat pH-ja 1 körül nem lesz. Ettől a lépéstől kezdve a feldolgozás a hemiszukeinát-származékoknak megfelelően történik.

|           |               |
|-----------|---------------|
| Termelés: | 215 mg /26 %/ |
|-----------|---------------|

$R_F^9$  0.51

Op.: 172-174°C



### Radiojód-jelzett kortizol-származék előállítása

A jelölésre alkalmas kortizol-21-hemiszukeinátot az általános előíratban közölt módon, a táblázatban megadott eredménnyel állítottuk elő.

### Kortizol-21-HS-kapcsolása tirozin-metilészterhez

230 mg /0.5 mmol/ kortizol-21-hemiszukeinátot 2 ml vízmentes dimetilformamidban oldunk és 0°C-ra hűtjük. 70 ul / 0.5 mmol/ trietilamint és 65 ul /0.5 mmol/ klórhangyasav-izobutilésztert adunk hozzá. A reakció-elegyet 3 percig 0°C-on kevertetjük, majd 130 mg /0.5 mmol/ tirozin-metilészter hidroklorid vízmentes dimetilformamidban készült oldatát adjuk a reakció-elegyhez. A pH-t trietilamin segítségével 7.5 - 8.0-ra állítjuk. A reakcióelegyet 2 órán át 0°C-on kevertetjük, a pH-t többször ellenőrizzük. Szükség esetén trietilamin adagolásával a pH-t 7.5 - 8.0 értéken tartjuk.

Feldolgozás: A reakcióelegyet alacsony hőfokon motor-vákuumban bepároljuk. A maradékot 50 ml-t etilacetátban felvesszük. Háromszor 15 ml N sócavval, majd háromszor 15 ml N nátriumhidroxiddal mossuk a felvett fázist. Végül a háromszor 15 ml desztillált vízzel távolítjuk el a lugnyomokat. Az etilacetátos fázist egy órán át vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk, majd bepároljuk. Tiszta, egységes termékhez jutunk.

Súly: 217.5 mg

Termelés: 87 %

R<sub>f</sub> 0.18 /kloroform-aceton 7:3/

### Kortizol-21-HS kapcsolása hisztaminhoz

230 mg /0.5 mmol/ kortizol-21-hemiszukeinátot 2 ml vízmentes dimetilformamidban oldunk és az oldatot 0°C-ra hűtjük.



70 ul /0.5 mmol/ trietilamin és 65 ul klórhangyasav-izobutilésztert adunk hozzá. A reakció-elegyet 3 percig 0°C-on kevertetjük, majd 1 mmol /kétszeres felesleg/ hisztamin-dihidrokloridot adunk hozzá dimetilformamidos szuszpenzió alakjában. A pH-t ez esetben is többször ellenőrizzük. A hisztamin-dihidrokloridot in situ szabadditjuk fel sójából trietilamin segítségével.

Feldolgozás: megegyezik a kortizol-21-hemiszekuinát-tirozin-metilészter feldolgozásával. Figyelemre méltó, hogy sósavas mosás során csak a szabad hisztamin megy át a vizes fázisba, a kapcsolt származék nem. Bár így nagyfokú tisztítás érhető el, de teljesen tiszta, egységes termékhez csak kromatografálás után lehet eljutni.

Súly: 165 mg  
Termelés: 67.5 %  
 $R_F^{23}$  0.22

#### Kortizol-21-HS-hisztamin jódosása

Oldatok: /frissen készítve/

|                                     |                     |         |
|-------------------------------------|---------------------|---------|
| 1/ Kortizol-21-HS-hisztamin         | 120 ng/2 ul diexán/ | 0.2 nM  |
| 2/ 0.5 mCi Na <sup>125</sup> I/NaOH | 10 ul               | 0.26 nM |
| 3/ Klóramin-T                       | 140 ug/ml 5 ul      | 2.5 nM  |

A reakció-edényben először a Na<sup>125</sup>I oldatot mérjük be, majd a szteroidot tartalmazó oldatot, utolsónak a klóramint adjuk a reakció-elegyhez. A reakcióidő mérését a klóramin hozzáadásától számítjuk. 120mp eltelte után a reakciót 100 ul 0.3 %-os nátrium-metabiszulfít hozzáadásával állítjuk le. 5 ml etilacetátot és 1 ml 0.1 %-os vizes aszkorbinsavat öntünk az elegyhez, majd 1 perc ráztatás után a szerves fázist elválasztjuk és újra 1 ml 0.1 %-os aszkorbinsav oldattal extraháljuk a szervetlen anyagokat. Az aszkorbinsav



nyomok eltávolítása céljából a szerves fázist 1 ml deszt. vízzel mossuk.

Tapasztalataink szerint a hisztamin-származék jódozása erősen pH-függő. Különböző pH-t választva más-más %-ban épül be a jód a szteroidszármazékba. Legelőnyösebb a 6.5 - 7.5 közötti pH. Ez esetben 20 % körüli a jód beépülése. A jódbeépülés alapján számított specifikus aktivitás kb. 400 Ci/nM volt.

RIA-ban bevált antiszérum segítségével kísérletileg is meghatároztuk a specifikus aktivitást. Ez az érték 47 Ci/nM-nek adódott. Ez azt jelenti, hogy a jódozott származékot az antiszérum nem köti olyan erősen, mint a jód-mentest.

Elképzelhető volt, hogy tirozin-származék jódozása esetén kedvezőbb kötési viszonyokat kapunk.

#### Kortizol-21-HS-tirozin-metilészter jódozása

##### Alkalmazott oldatok: /frissen készítve/

|                                       |                        |        |
|---------------------------------------|------------------------|--------|
| 1/ kortizol-21-HS-tirozin-metilészter | 120 ng/2 ul dioxánban/ | 0.2 nM |
| 2/ 1.0 mCi Na <sup>125</sup> I        | 20 ul                  | 0.4 nM |
| 3/ klóramin-T                         | 700 ng/5 ul            | 2.5 nM |

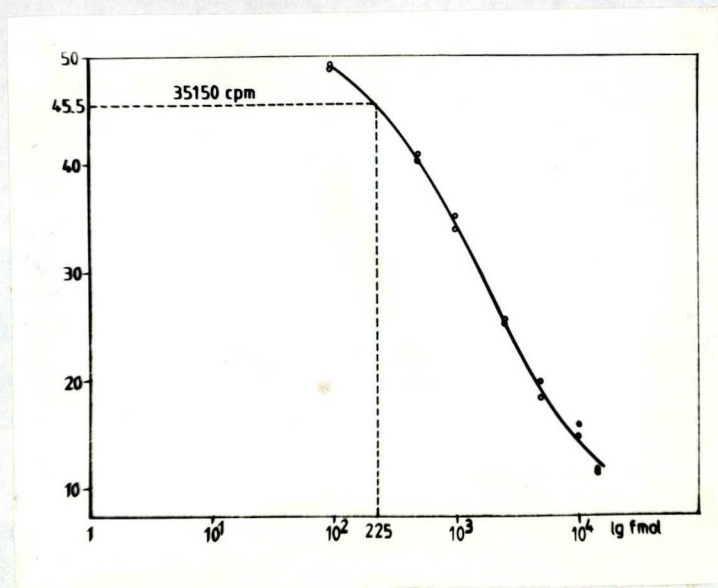
A jódozást és a reakció-elegy feldolgozását az előzőekben leírt módon végeztük. Mint a hisztamin-származék esetében, úgy itt is erősen pH-függő a reakció sebessége és a jódbeépülés mennyisége.

A pH optimalizálási kísérleteink eredményeit grafikonon mutatjuk be. A grafikonról kitűnik, hogy legelőnyösebb a semleges, illetve gyengén savas közeg 1-2 perces reakció-idő megválasztása mellett.



A jódoszat pH 7.1-a 120 mp-ig végezve mintegy 25 % jódbeépülést kaptunk. Termékünk  $R_f$ -je kloroform-aceton 7:3 rendszerben 0.37.

A jódbeépülés alapján kb. 500 nCi/ml-nak adódott származékunk számított specifikus aktivitása. Ez esetben is olvasszük a specifikus aktivitás kísérleti meghatározását antitestum segítségével.



A görbéről leolvasható, hogy a munkához adott  $5 \times 35140$  cpm aktivitás 225 fmoI kortisolnak felel meg. Átszámolva 1 pH jódoszt származék aktivitása 238 nCi, tehát a mért specifikus aktivitás 238 nCi/ml.

Ilyen specifikus aktivitású tracer alkalmazása lehetővé teszi, hogy a jódoszt szteroidot hosszabb ideig használjuk, hiszen lefelesése után is kellően magas a specifikus aktivitás másrészt az antitestum nagyobb hígításban is használható, nagyobb érzékenységgel lesz a mérés.

A kapott jódoszt származék radiokromatogram alapján egységes, szervesetlen jódattól és oxidáció termékektől mentes.



Általános előírat neurotranszmitterek formaldehidés  
kapcsolásához

A/oldat:

0.4 mM neurotranszmittert és 40 mg aszkorbinsavat 2 ml először nitrogénnel vagy argonnal átbuborékolgatott desztillált vízben oldunk.

B/oldat:

100 mg BSA-t 2 ml nitrogénnel vagy argonnal átbuborékolgatott desztillált vízben oldunk 20 ul 0.1 N nátriumhidroxid segítségével.

A két oldatot egyesítjük, majd 1.33 ml 3 M-s nátriumacetátot és 1.33 ml 7.5 %-os formaldehidet adunk hozzá. Az egyes neurotranszmittereknek megfelelően a reakciót 2 --20 órán keresztül végeztük. A reakcióidő lejártá után a reakcióelegyet 1 %-os aszkorbinsav-oldattal szemben 72 óráig, majd desztillált vízzel szemben dializáltuk.

A kapott termék haptén/hordozó hányadosát UV spektrofotometriával határoztuk meg. A konjugátum -értékből levontuk a BSA saját elnyelését és az így kapott értéket használtuk fel számításainkhoz. A méréseket 280 nm-n, 1 cm-es kvare kivettában végeztük.

A pH optimalizálására külön kísérletsorozatot végeztünk.

Felhasznált oldatok:

A/ 0.4 mM adrenalint és 40 mg L-aszkorbinsavat 2 ml először nitrogénnel átbuborékolgatott desztillált vízben oldunk.

B/ 100 mg BSA-t 2 ml oxigénmentes desztillált vízben oldunk.

A két oldat összeöntése után 1.3 ml 7.5 %-os formaldehid oldatot adunk hozzá és a pH-t különböző pufferrel állítjuk be.



A haptén/hordozó arány pH-függését az adrenalin esetében az alábbi táblázat mutatja be:

| pH  | felkapcsolt<br>haptén | reakcióidő<br>/h/ |
|-----|-----------------------|-------------------|
| 3.0 | 12.7                  | 20                |
| 6.8 | 21.5                  | 20                |
| 8.0 | 9.7                   | 20                |
| 9.0 | 13.8                  | 20                |

További kísérleteinkben mindig semleges körüli pH-t alkalmaztunk. A kapott eredményeket a következő táblázat mutatja be:

| neurotranszmitter | reakcióidő<br>/h/ | pH  | felkapcs.<br>haptén |
|-------------------|-------------------|-----|---------------------|
| Adrenalin         | 20                | 6.8 | 21.5                |
| Noradrenalin      | 8                 | 6.5 | 28                  |
| Dopamin           | 2                 | 6.5 | 35                  |
| Szerotonin        | 2                 | 6.8 | 15                  |
| Hisztamin         | 10                | 6.8 | 6                   |

Formaldehides kapcsolás denaturáló ágens jelenlétében

Több denaturáló-szer jöhet számításba, ilyen pl. a karbamid. Egyetlen kísérletsorozatot végeztünk

Oldatok:

1/ 0.4 mM neurotranszmitter, 40 mg aszkorbinsavat és 1.35 g nátriumacetátot oldunk 5 ml desztillált vízben.



- 2/ 100 mg BSA-t 1 ml desztillált vízben oldunk és 4 ml 10 M-os karbamidot adunk hozzá
- 3/ 7.5 %-os formaldehid oldat, mely karbamidra nézve 8 M-os.

Az első két oldat egyesítése után 2 ml 7.5 %-os /karmidos formaldehidet adunk hozzá. 20 órás reakcióidőt választva a haptén/BSA hányadosok így alakultak:

|                          |                  |
|--------------------------|------------------|
| Adrenalin-antigén        | nem kapcsolt /0/ |
| Noradrenalin-antigén     | 21               |
| Dopamin-antigén          | 16               |
| Szerotonin-antigén       | 5                |
| BOC-noradrenalin-antigén | 6.5              |
| BOC-dopamin-antigén      | 8                |
| BOC-adrenalin-antigén    | 1 /?/            |

A karbamid minden esetben csökkentette a felkapcsolt transzmitter mennyiségét.

Kedvezőbb hatást vártunk nátrium-dodecil-szulfát/SDS/ alkalmazásától. A nátrium-dodecil-szulfátot úgy adagoltuk, hogy végső -koncentrációja a reakció-elegyen néhány tized százalék legyen. A kapott eredményeket táblázatosan mutatjuk be.

| Antigén          | SDS<br>koncentráció | haptén/BSA |
|------------------|---------------------|------------|
| Adrenalin        | 0.1 %               | 22         |
| Adrenalin        | 0.2 %               | 25         |
| BOC-noradrenalin | 0.3 %               | 8          |
| Dopamin          | 0.2 %               | 40         |



### Védőcsoportok eltávolítása

5 ml 85 %-os hangyasavat 0°C-ra hűtöttünk és 100 mg liofilizátumot oldottunk benne. Lassan 20°C-ra hagytuk melegedni az oldatot és 60 percen át szobahőn állni hagytuk. Desztillált vízzel szemben dializáltuk, és újra liofilizáltuk.

A haptén/BSA hányadosokat minden esetben liofilizátumból határoztuk meg.

### Karboxilált neurotransmitter-származékok előállítása

#### 2-oxo-5/3,4-dibenziloxifenil/-oxazolidin-4-karbonsav előállítása

527 mg 1 mM Z-Bzl<sub>2</sub>-DOPS-t oldottunk 3 ml vismentes tetrahidrofuranban, majd az oldatot 0°C-ra hűtöttük. Ezután 8 mM /0.5 ml/ metiljodidot, majd 0.132 g /3 mM, 55 %-os/ nátriumhidrid-szuszpenziót adtunk hozzá állandó keverés mellett, majd a reakció-elegyet további 24 órán át szobahőn kevertettük. Pár csepp desztillált víz hozzáadásával megbontottuk a nátriumhidrid felesleget. Pár óra állás után szürkésfehér kristályok válnak ki, melyeket kiszűrtünk / 95 mg/. További tisztítás céljából a terméket 10 ml etilacetátban oldottuk, majd a szerves fázist háromszor 2 ml N sósavval extraháltuk. A savnyomok eltávolítására kétszer 2 ml desztillált vízzel mostuk, majd 1 órán át vismentes nátrium-szulfáton szárítottuk. Bepárlás után fehér kristályokhoz jutunk, melyről műszeres analízis segítségével igazoltuk, hogy -OMe származék.

|                              |           |                              |      |  |
|------------------------------|-----------|------------------------------|------|--|
| Termelés:                    | 80 mg     | /15 % /                      |      |  |
| Op.:                         | 195-196°C |                              |      |  |
| R <sub>F</sub> <sup>20</sup> | 0.25      | R <sub>F</sub> <sup>21</sup> | 0.30 |  |
| R <sub>F</sub> <sup>22</sup> | 0.95      |                              |      |  |



Az OMe-származék kiszűrése utáni anyalugot vákuumban szárazra pároltuk. A bepárlási maradékot 20 ml etil-acetátban felvettük, háromszor 5 ml N sósavval mostuk, a savnyomokat kétszer 5 ml desztillált vizes mosással eltávolítottuk, a szerves fázisból a szabaddá vált jódot nátrium-tioszulfátos mosással távolítottuk el. Ezt követően kétszer 5 ml desztillált vízzel mostuk az etil-acetátot, majd 1 órán át vízmentes nátrium-szulfáton szárítottuk. Az etilacetátot vákuumban bepároltuk. Halvány-sárga, nem teljesen egységes kristályos termékhez jutottunk. További tisztítását DCHA-sóján keresztül oldottuk meg.

360 mg /kb. 0.7 mM/ terméket 4-5 ml 50°C-os etilacetátban oldottunk, majd 130  $\mu$ l / 0.66 mM/ DCHA-t adtunk hozzá és egy éjszakán keresztül hűtőszekrényben állni hagytuk. A kivált kristályokat szűrtük, majd 2 N kénsavval DCHA-sójából felszabadítottuk. Az így nyert termék adatai a következők:

Súly: 325 mg /60 % /

Op.: 175-177°C

$R_f^{21}$  0.10

$R_f^{22}$  0.60

#### Dibenziloxi-fenilszerin előállítása

40.8 g /128 mM/ 3,4-dibenziloxi-benzaldehydet 170 ml vízmentes etilalkoholban oldottunk, és ehhez 6.42 g /160 mM/ nátriumhidroxid és 4.8 g /84 mM/ glicin 21 ml vízben készült oldatát adtuk lassu cseppekben állandó keverés mellett. További folyamatos keverés mellett a reakció-elegy hőmérsékletét 72°C-ra emeltük mikoris a dibenziloxi-benzaldehyd kevés maradék kivételével oldatba megy. Ekkor a reakció-elegyet további keverés mellett lassan 40°C-ra hagyjuk hűlni. Ekkor 150 ml 2 N sósavat csepegtetünk hozzá olyan ütemben, hogy a belső hőmérséklet sohase lépje túl a 45°C-t. A csapadékos reakció-elegyet további 3 órán át kevertettük, majd a kivált



csapadékot szűrtük, 20 ml 2 N sósavval és 20 ml 96 %-os etanollal mostuk és végül szárítottuk. Az ily módon visszanyert dibenziloxi-fenilszerint ugyanerre a célra további tisztítás nélkül ismét felhasználtuk. A szűrlethez tömény vizes nátrium-acetát oldatot adtunk, míg annak pH-ja 5.5 - 6-re be nem állt. A kezdetben kivált olajos csapadék 3 óra + 4°C-on történő tárolása után megszilárdult. Kapott csapadékot szűrtük, szárítottuk, majd kloroformmal a dibenziloxi-benzaldehid nyomok eltávolítása céljából kétszer kifőztük. Termékünket etanol-víz elegyből átkristályosítottuk.

Súly: 20.5 g

Termelés: 39.9 %

Op.: 152-155°C

$R_f^{19}$  0.50

N/benziloxi-karbonil/-3,4-dibenziloxi-fenilszerin  
előállítása

9.5 g /24 mM/dibenziloxi-fenilszerint 0.966 g /24 mM/ nátriumhidroxid segítségével 200 ml desztillált vízben oldottunk, majd lassu ütemben, pH 9.0 mellett 4.59 g /26 mM/ benziloxikarbonil-kloridot csepegtettünk hozzá. A pH állandó értéken tartását folyamatos 2 N nátriumhidroxid adagolásával értük el. Az utolsó részlet benziloxikarbonil-klorid beadagolásától számítva a reakcióelegyet még 2 órán át kevertettük. A lugos elegyet kétszer 50 ml dietilésterrel kiráztuk /az elreagálatlan benziloxikarbonil-klorid valamint az ennek hidrolizációból keletkező benzilalkohol eltávolítása céljából/. A vizes fázis pH-ját 4 N sósav segítségével 2.0-ra állítottuk és háromszor 70 ml etilacetáttal kiráztuk. Az egyesített szerves fázist kétszer 20 ml desztillált vízzel mostuk, majd 1 órán át vízmentes nátrium-



szulfáton szárítottuk. Bepárlás után fehér kristályos termékhez jutottunk.

Súly: 11.2 g

Termelés: 88 %

Op.: 83-85°C

$R_f^{17}$  0.70

### Treo-eritro módosulatok szétválasztása

9.3 g /17.5 mM/ N/benziloxikarbonil/-3,4-dibenziloxi-fenilszerint 108 ml 45°C-os vízmentes, analitikai tisztaságú acetonitrilben oldottunk, majd állandó keverés közben 3.4 g /19 mM/ frissen desztillált diciklohexilamint csepegtettünk hozzá. Az oldatot 72 órára hűtőszekrénybe helyeztük, majd a kivált anyagot szűrtük.

Súly: 4.7 g

Op.: 140-145°C

$R_f^{17}$  0.70

Megfigyeléseink szerint DCHA-só kiválására csak abban az esetben számíthatunk, ha a felhasznált N/benziloxikarbonil/3,4-dibenziloxi-fenilszerin teljesen tiszta. A módosulatok szétválasztása előtt ezért célszerű a védett terméket frakcionált kristályosítással vagy DCHA-sóján keresztül előzetesen tisztítani.

Az acetonitrilből kivált treo módosulatot DCHA-sójából 2 N kénsavval a szokásos eljárás szerint felszabadítottuk. A kapott szabad savat N-hexán segítségével kristályosítottuk.

Súly: 2.9 g

Termelés: 83 % /treo módosulatra számolva/

Op.: 118-123°C

$R_f^{17}$  0.70



BOC-/3,4-dibenziloxi/-fenilszerin előállítása

1072 mg /2.5 mM/ 3,4-dibenziloxi-fenilszerint 15 ml dioxán-víz 2:1 arányu elegyében oldottuk és 700 mg / 3 mM/ BOC-pirokarbonátot adtunk hozzá szilárd alakban. A reakció-elegy pH-ját folyamatosan ellenőriztük és N nátriumhidroxiddal 7.5 - 8 értéken tartottuk. A BOC csoport bevitele ilyen körülmények között kb. 4 órát vesz igénybe, amit a kiindulási anyag beoldódása jelez. A reakció-elegyet pH 9-en alacsony hőfokon, motor vákuumban a dioxán teljes eltávolításáig pároltuk, majd 10 ml desztillált víz hozzáadása után kétszer 10 ml dietiléterrel kiráztuk. A vizes fázist 0°C-ra hűtöttük, majd 5 %-os citromsav oldattal a pH-ját 3.0-ra állítottuk. Háromszor 20 ml etilacetáttal extraháltuk, az egyesített szerves fázist a savnyomok eltávolítására kétszer 5 ml desztillált vízzel mostuk, majd 1 órán át vízmentes nátriumsulfáton szárítottuk és bepároltuk. Fehér kristályos terméket kaptunk.

Súly: 900 mg

Termelés: 73 %

Op.: 128-135°C /az elhúzóó olvaóapontot  
a treo-eritro móóosulatok  
egyidejű jelenléte okozza/

$R_f^{17}$  0.40

$R_f^{19}$  0.80

$D_{20}^{20} + 73.3^\circ$  /c = 1, metanol/

DL-terc.-butiloxikarbonil-3,4-dihidroxi-fenilszerin  
előállítása

495 mg / 1 mM/ BOC-dibenziloxi-fenilszerint 10 ml vizm.  
metanolban oldunk és 50 mg palládium-korom jelenlétében



5y → a  
1 órán át hidráltuk. A katalizátor eltávolítása után a metanolt bepároltuk, a maradékot 5 ml vízmentes dietiléterben felvettük és 190 ul /1 mM/ DCHA-t adtunk hozzá és pár órán át hűtőszekrényben állni hagytuk. A kivált fehér kristályokat szűrtük, dietiléterrel mostuk, szárítottuk.

Súly: 422 mg  
Termelés: 81 %  
Op.: 130-132°C  
 $R_f^{17}$  0.15  
 $R_f^{18}$  0.50

#### BOC-L-dihidroxi-fenilalanin előállítása

1050 mg /5.25 mM/ L-dihidroxi-fenilalanint 15 ml dioxán-víz 1-1 arányu elegyében oldottunk és 6 mM BOC- piro-karbonátot adtunk szilárd formában az oldathoz. 200 mg aszkorbinsav 1 ml desztillált vízzel készült oldatának hozzáadása után a pH-t 7.5 - 8.0 közé állítottuk, majd ezen az értéken tartva /N nátriumhidroxid segítségével/ 20 órán át szobahőn, fénytől védve állni hagytuk. A dioxánt motor vákuumban bepároltuk, a vizes fázist kétszer 5 ml dietiléterrel extraháltuk, majd 0°C-ra hűtöttük, és a pH-t 5 %-os citromsav oldattal 3.0-ra állítottuk. A vizes fázist háromszor 20 ml etilacetáttal extraháltuk, majd az egyesített szerves fázist deszt. vízzel savmentesre mostuk és 1 órán át vízmentes nátrium-szulfáton szárítottuk. Bepárlás után halványsárga, felhabzó olajat kaptunk.

Súly: 1900 mg  
Termelés: 76 %  
 $R_f^{21}$  0.42  
 $R_f^{22}$  0.88





DCHA-só képzés:

A kapott olajat 25 ml vízmentes dietiléterben oldottuk és keverés közben cseppenként 980  $\mu$ l / 5 mM/ DCHA-t adtunk hozzá. Hűtőszekrényben egy éjszakán át állni hagytuk. A kivált kristályokat szűrtük, éterrel mostuk, szárítottuk.

Súly: 2600 mg

Termelés: 85 %

Op.: 110-132°C

$D^{20}$

$D + 26.3^\circ / c = 1, \text{ metanol/}$

A kapott 2600 mg kristályos terméket 10 ml 40°C-os vízmentes metanolban oldottunk, majd kezdeti zavarosodásig peroxid-mentes dietilétert adtunk hozzá. Egy éjszakán keresztül hűtőszekrényben állni hagytuk, majd a kivált kristályokat szűrtük és peroxid-mentes dietiléterrel mostuk.

Súly: 1900 mg

Termelés: 73 %

Op.: 142-144°C

$D^{20}$

$D + 25.4^\circ / c = 1, \text{ metanol/}$

BOC-D-dihidroxi-fenilalanin előállítása

Mindenben az L-módosulathoz leírtak szerint jártunk el. Átkristályosítás után termékünk jellemzői a következők voltak:

Súly: 2650 mg

Termelés: 87 %

Op.: 143 - 145°C

$R_f^{20}$

- 25.3



N<sup>α</sup>  
N -BOC-His-OH előállítása

7.5 g /50 mM/ hisztidint 70 ml dioxán-víz 1-1 arányu elegyében pH 10-en oldottunk, majd 100 mM /kétszeres felesleg/BOC-pirokarbonátot adtunk hozzá. N nátrium-hidroxid segítségével a pH az egész reakció időtartama alatt 10-es értéken tartottuk. 24 óra elteltével a pH-t 5.6-re állítottuk és motor vákuumban szárazra pároltuk a reakció-elegyet. A termékünket etanollal extraháltuk. Az etanol bepárlása után - 20°C-on kristályosítva egységes termékhez jutottunk.

Súly: 7.1 g

Termelés: 57 %

Op.: 188 - 191°C

R<sub>f</sub><sup>22</sup> 0.65

R<sub>f</sub><sup>23</sup> 0.82

N<sup>α</sup>  
N -,N<sup>im</sup>-BOCVL-His-OH előállítása

5g  
jw j.  
7.5 g /50 mM/ hisztidint 100 ml dioxán-víz 1-1 arányu elegyében oldottunk, majd a pH-t N nátriumhidroxid segítségével 7.5 - 8.0 közötti értékre állítottuk be. Ez után 43.6 g /200 mM, kétszeres felesleg/ BOC-pirokarbonátot adtunk hozzá. N nátrium-hidroxid segítségével a pH-t a reakció egész időtartama alatt 7.5 - 8.0 közötti értéken tartottuk. 24 óra elteltével a dioxánt motor vákuumban bepároltuk, a vizes fázis pH-ját 0°C-on 5 %-os citromsav segítségével 3.0-ra állítottuk be. A vizes fázist háromszor 35 ml etilacetáttal extraháltuk, az egyesített szerves fázist 5 % citromsavval, desztillált vízzel mostuk és nátrium-szulfáton szárítottuk. Bepárlás után halványsárga olajat kaptunk.

Súly: 2510 mg

Termelés: 14.8 %

R<sub>f</sub><sup>21</sup> 0.18



BOC-D-5-hidroxi-triptofán előállítása

*Ind → n*  
220 mg /1 mM/ D-5-hidroxi-triptofánt 2.5 ml dioxán-víz 1-1 arányu elegyében oldunk, majd 50 mg aszkorbinsavat adunk hozzá és a pH-t N nátriumhidroxid segítségével 10-es értékre állítjuk be. 270 mg /1.2 mM/ BOC-pirokarbonátot adunk az elegyhez és 5 órán keresztül 10-es pH mellett kevertettük. A reakció-elegyet ezután desztillált vízzel ötszörösére hígítottuk és háromszor 10 ml dietiléterrel extraháltuk. A vizes fázist 0°C-ra hűtöttük és cimtromsav oldattal a pH-ját 3.0-ra állítottuk. Háromszor 10 ml etilacetáttal kiráztuk és az egyesített szerves fázist desztillált vízzel semlegesre mostuk és 1 órán át vizmentes nátrium-szulfáton fénytől védve száritottuk. Vákuum-bepárlás után barna olajat kaptunk.

Súly: 260 mg

Termelés: 92 %

$R_F^{17}$  0.55

DCHA-só képzés

*jav. t*  
4 ml vizmentes etilacetátban felvettük az olajos bepárlási maradékot és 180 ul /0.95 mM/ DCHA-t adtunk hozzá. Pár óra állás után fehér kristályos termék válik ki.

Súly: 317 mg

Termelés: 68 %

Op.: 200-205°C

BOC-D,L-5-hidroxi-triptofán előállítása

Mindenben a D-izomernél leírtak szerint jártunk el. Kiindulási mennyiség 480 mg /2.18 mM/ volt.

Súly: 560 mg

Termelés: 80 %

Op.: 177-180°C

$R_F^{18}$  0.52



$^{14}\text{C}$ -szukcinil-monokolin előállítása

10 ul  $^{14}\text{C}$ -kolin-kloridot / 3 000 000 cpm/ és 576 mg / 2 mM/ kolin kloridot 5 ml vízmentes dimetilformamid és 6 ml vízmentes piridin elegyében oldottunk. 400 mg / 4 mM/ borostyánkősav-anhidridet adtunk hozzá, majd argon atmoszféra alatt fél órán keresztül  $100^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk az elegyet és további 24 órán át szobahőn kevertettük. Ezt követően 600 mg / 6mM/ borostyánkősav-anhidridet adtunk hozzá és egy órán át  $100^{\circ}\text{C}$ -ra melegítettük. Ezt követően a reakció-elegyet 1 éjszakán át  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. A kivált kristályokat szűrtük, majd forró etanolból átkristályosítottuk.

Súly: 800 mg

Termelés: 100 %

$R_f^{12}$  0.45

Fmoc- alanin előállítása

4.45 g /50 mM/ béta-alanint 95 ml 10 %-os nátrium-karbonátban oldottunk, majd 40 ml dioxánt adtunk hozzá és  $0^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttük. Egy óra alatt 11.5 g fluorenil-metiloxi-karbonil klorid 80 ml dioxános oldatát csepegtetünk hozzá. 1 órán át  $0^{\circ}\text{C}$ -on, majd 24 órán át szobahőn kevertettük. Ezután 1500 ml jeges vízre öntöttük a reakció-elegyet, majd kétszer 100 ml dietiléterrel extraháltuk. A vizes fázis pH-ját N kénsav segítségével 2.0-ra állítottuk, majd négyszer 100 ml etilacetáttal extraháltuk. Az egyesített szerves fázist desztillált vízzel savmentesre mostuk, majd 1 órát át vízmentes nátrium-szulfáton szárítottuk, bepároltuk. Fehér kristályos termékhez jutottunk.

Súly: 12.4 g

Termelés: 79 %

$R_f^{12}$  0.90

Op.:  $129-130^{\circ}\text{C}$



FMOC- -alanil-klorid előállítása

10 g /30 mM/ FMOC-béta-alanint 50 ml 0°C-ra hűtött tionil-kloridban oldunk és 30 percen át 0°C-on állni hagyjuk. Dél órán át refluxáltatjuk a reakció-elegyet. A tionil-klorid felesleget vákuumban bepároljuk. A kapott sárgás olajat n-hexán segítségével kristályosítjuk.

Súly: 9.5 g

Termelés: 92 %

$R_F^2$  0.85 / észter alakban/

FMOC- - alanil-kolin előállítása

10 g /30 mM/ FMOC-béta-alanil-kloridot 20 ml vízmentes dimetil formamidban oldottunk és 1.85 g /13 mM/ kolin-kloridot adtunk hozzá. A pH-t tributilamint segítségével 6 - 6.5-re állítottuk. /Az előnyösebb, enyhén lugos pH-t a FMOC-csoport lugérzékenysége miatt nem alkalmazhattuk./ Pár óra eltelte után a kolin-klorid nagy része oldatba ment. Az elegyet további 36 órán át szobahőn kevertettük. Ezt követően motor vákuumban bepároltuk, a maradékot 100 ml kloroformban felvettük és kétszer 20 ml desztillált vízzel extraháltuk. A vizes fázist háromszor 50 ml oktilalkohollal kiráztuk, majd az egyesített oktilalkoholos fázist kétszer 10 ml vízzel ráztuk ki. Bepárlást követően igen higroszkopos anyaghoz jutunk./Ez a tulajdonság nem adott lehetőséget az anyag közelebbi jellemzésére./

$R_F^{12}$  0.17

$R_F^{14}$  0.56

$R_F^{15}$  0.47

-alanil-kolin előállítása

250 mg /0.55 mM/ FMOC-béta-alanil-kolint 2.5 ml vízmentes metanolban oldottunk és 62  $\mu$ l 4N nátriumhidroxidot



adtunk hozzá. 12 óra elteltével - kromatogram alapján - további 240 ul 4N nátriumhidroxidot adtunk hozzá. Ettől számított 20 perc alatt a reakció lezajlott. A pH-t 7-re állítottuk, bepároltuk. A maradékot kétszer éterrel utána etilacetáttal, majd kloroformmal, végül etanollal főztük ki. Célvegyületünk melléktermékektől kísérve az etanolos közegben található. Az etanolt bepárolva termékünket preparatív rétegen tisztítottuk.

Súly: 204 mg /higroszkópos/

Termelés: /nem ítéltető meg teljes biztonsággal az igen nagyfokú

$R_f^{12}$  0.10 nedvszívó képesség miatt/

$R_f^{14}$  0.08

$R_f^{13}$  0.22

#### Z-D-glutaminsav előállítása

Mindenben az N/benziloxi-karbonil/-3,4-dibenziloxi-fenilszerinnél leírtak alapján jártunk el.

Kiindulási mennyiség: 50 g /330 mM/

Kapott anyag súlya: 50 g

Termelés: 49 %

Op.: 120-121°C

$R_f^{17}$  0.76

#### Z-D-glutaminsav-metilészter előállítása

56  
52,-  
19.6 ml /140 mM/ vizmentes trietilamin és 250 ml vizmentes kloroform elegyéhez 38.7 g /140 mM/ Z-D-glutaminsavat és 14.7 ml /158 mM/ dimetil-szulfátot adunk. Az elegyet 1 éjszakán keresztül állni hagyjuk, majd bepároltuk. A maradékot etilacetátban felvettük, desztillált vízzel mostuk és 1 órán át vizmentes nátrium-szulfáton szárítottuk. A szárítószer kiszűrése után 27.5 ml /140 mM/ DCHA-t adtunk hozzá. A kivált kristályokat szűrtük, majd 900 ml



forró desztillált vizből átkristályosítottuk. A kivált termék súlya 29.7 g volt. /Op.: 170-171°C/.

A kapott kristályos termékből 2 N kénsav segítségével DCHA-só felszabadítást végeztünk.

Súly: 9.3 g

Termelés: 90 %

$R_f^{17}$  0.76

#### Z-D-Glu/OBu<sup>t</sup>/-OMe előállítása

14 g /50 mM/ Z-glutaminsav-alfa-metilésztert 100 ml vízmentes kloroformban oldottunk és 0.75 ml tömény kénsavat adtunk hozzá, majd -10°C-on 100 ml izobutént öntöttünk rá és a reakcióedényt légmentesen lezártuk. A reakcióelegyet 3 napig szobahőn állni hagytuk. Bepárlás után a maradékot 150 ml etilacetátban felvettük és négyszer 20 ml 5 %-os nátrium-hidrogén-karbonáttal kiráztuk. Az etilacetátos fázist desztillált vízzel semlegesre mostuk, majd 1 órán át vízmentes nátrium-szulfáton szárítottuk. Bepárlás után szintelen olajat kaptunk.

Súly: 15.2 g

Termelés: 90 %

$R_f^{16}$  0.92

#### Z-D-glutaminsav- -terc-butilészter előállítása

10 g /30 mM/ Z-D-Glu/OBu<sup>t</sup>/-OMe-t 50 ml dioxán-víz 1-1 arányu elegyében oldottuk és 33 mM 1 N nátriumhidroxidot adtunk hozzá. 1 óra múlva a reakció pH-ját sósav -val 7.0-ra állítottuk. A dioxánt motor vákuumban lepároltuk. A maradék vizes oldat pH-ját sósav segítségével 1.0-ra állítottuk. Etilacetáttal extraháltuk, a szerves fázist desztillált vízzel semlegesre mostuk, majd nátrium-szulfáton szárítottuk és bepároltuk. Nehezen



5-  
kristályosodó olajat kaptunk.

Súly: 9.3 g  
Termelés: 95 %  
Op.: 80-84°C  
 $R_f^{20}$  0.65

H-D-Glu/OBu<sup>t</sup>/-OH előállítás

2. f.  
Pd/C katalizátoron metanolos közegben hidráltuk a megfelelő Z-védett kiindulási anyagot.

Felhasznált mennyiség: 8.5 g /26.4 mM/  
Kapott termék súlya: 4.1 g  
Termelés: 84 %  
Op.: 183-185°C  
 $R_f^{19}$  0.11

BOC-D-Glu/OBu<sup>t</sup>/-OH előállítás

Mindenben a BOC-dibenziloxi-fenilszerin előállításánál leírtak szerint jártunk el.

Felhasznált anyagmennyiség: 2.2 g /12 mM/  
Kapott termék súlya: 3.0 g /olaj/

$R_f^{16}$  0.85

A kapott olajból egy ekvivalens DCHA felhasználásával sót képeztünk.

Súly: 4.1 g  
Termelés: 72 %  
Op.: 106-108°C

DCHA-só felszabadítás után termékünk kristályosodott:

Op.: 102-103°C



Karbodiimides kapcsolással előállított konjugátumok

A kapcsolásokhoz a klasszikus diciklohexil-karbodiimid helyett vizoldható karbodiimidet használtunk. / 1-ciklohexil/-3-/-2-morfolinoetil-/-karbodiimid-meto-p-toluolszulfonát; morfo-CDI.

A reakciók során használt mennyiségeket és azok koncentrációját az alábbiak szerint választottuk meg:

| <u>BSA</u> | <u>Szteroid-származék</u> | <u>CDI</u> |
|------------|---------------------------|------------|
| 100 mg     | 100 mg                    | 150 mg     |
| 40 mg/ml   | 100 mg/ml                 | 200 mg/ml  |

BSA-oldat: 40 mg BSA-t állandó keverés közben kis részletekben oldunk 1 ml vízben 40 µl N nátrium-hidroxid segítségével.

Szteroid-oldat: 40 mg szteroid-származéket 0.4 ml piridin-víz 1-1 arányu elegyében oldunk.

Karbodiimid-oldat: 60 mg morfo-CDI-t 0.38 ml piridin-víz 1-1 arányu elegyében oldunk.

A szteroid-oldathoz hozzáadtuk - állandó keverés mellett - a karbodiimid-oldatot, majd szobahőn további 30 percig kevertettük. A keverés további folytatása mellett lassu ütemben csepegtettük a BSA-oldatot az aktivált szteroid -hoz. A reakció-elegyet szobahőn 24 órán át állni hagytuk.

Feldolgozás:

A reakció-elegyeket 24 órán át csapvízzel szemben dializáltuk. Néhány esetben kicsapódást, zavarosodást észleltünk. Ilyen esetekben a dializátumot centrifugáltuk és a ~~szülszót~~ liofilizáltuk.

Reakció-elegeinket néhány esetben Sephadex G-25 oszlopon kromatografáltuk, majd liofilizáltuk.



5- A fenti módszer segítségével állítottuk elő a következő konjugátumokat:

| Szteroid-BSA konjugátum           | Szteroid/BSA arány |
|-----------------------------------|--------------------|
| Tetrahidro-dezoxi-kortikoszteron  | 38                 |
| Tetrahidro-kortizon               | 32                 |
| Tetrahidro-kortikoszteron         | 34                 |
| Tetrahidro-kortizol               | 27                 |
| Tetrahidro-aldoszteron            | 29                 |
| 18-OH-kortikoszteron- -etiolakton | 23                 |

Vegyes-anhidrides kapcsolással előállított BSA konjugátumok

Általános előírat szteroid konjugátumok-előállítására

F- 0.1 mM szteroid-származékot 1 ml vízmentes dimetilformamidban oldottunk /néhány esetben szuszpendáltunk/ majd - 10°C-ra hűtöttük. Ezen a hőmérsékleten 16 ul klórhangyasav-izobutilésztert, majd 18 ul trietilamint adtunk hozzá, és a reakció-elegyet 1-3 percig kevertettük. /Azokban az esetekben, amikor a szteroid-származék dimetilformamidban nem oldódott tökéletesen sav megkötőnek trietilamin helyett tributilamint alkalmaztunk, és az aktiv észterképzést addig folytattuk, míg a kiindulási szteroid-származék teljesen oldatba nem ment./

210 mg BSA-t 10 ml dioxán-víz 1-1 arányu elegyében 0.21 ml N nátriumhidroxid segítségével oldottunk.



A két oldatot egyesítettük és 0°C-on 4 órán át állni hagytuk /közben a fehérje oldatban tartása céljából és az acilezés végbemenetelének biztosítására a pH-t 7.5 - 8 értéken tartottuk.

Feldolgozás: A reakció-elegyeket 24 órán át áramló csapvízzel szemben dializáltuk. Kicsapódást egyetlen esetben sem észleltünk. További 24 órán át desztillált vízzel szemben folytattuk a dializálást. Az így tisztított reakció-elegeinket fagyasztva szárítottuk.

A haptén/BSA arány megállapítására nitrogén-analizist, spektrofluorimetriát, és néhány esetben - ahol a szteroid szerkezete ezt lehetővé tette - UV spektrofotometriát alkalmaztunk.

Vegyes-anhidrides kapcsolás segítségével a 34. és 35. oldalon felsorolt valamennyi szteroid-származékot marhaszérumalbuminhoz kapcsoltuk.

Az elvégzett analízisek eredményei bizonyították, hogy valamennyi konjugátum esetében a felkapcsolt haptén mennyisége 25 és 40 között változott BSA molekulánként.

#### Védett neurotranszmitter-karbonsavak kapcsolása marha szérumalbuminhoz

Általános előírat: 0.1 mM védett neurotranszmitter-karbonsavat 1 ml vízmentes dimetilformamidban oldunk és - 10°C-ra hűtjük és 14  $\mu$ l /0.1 mM/ fém nátriumról desztillált trietilamin és 13  $\mu$ l /0.1 mM/ klórhangyasav-izobutilésztert adunk hozzá. A reakció-elegyet 10 percig -10°C-on kevertettük.

120 mg BSA-t /1.75  $\mu$ M/ 6 ml dioxán-víz 1:2 arányu elegyében oldottunk és a pH-t N nátriumhidroxiddal 7.5 - 8 közé állítottuk. Az oldatot 0°C-ra hűtöttük



és az előzőekben elkészített vegyes-anhidridet lassu ütemben hozzácsoljuk. A pH-t többször ellenőriztük és 7.5 - 8.0 között tartottuk. A reakció-elegyet 4°C-on 4 órán át állni hagytuk.

Tisztítás: A reakció-elegyet 24 órán keresztül áramló csapvizzel, majd desztillált vízzel szemben dializáltuk. Dialízis után fagyasztva szárítottunk.

#### Az alkalmazott BOC-védőcsoport eltávolítása

81 A liofilizálással nyert terméket 15 ml 0°C-ra hűtött nitrogénnal átbuborékolatott 80-85 %-os hangyasavban oldottuk és 2 órán át szobahőn állni hagytuk. A hangyasavat dialízissel távolítottuk el. A dializátumot fagyasztva szárítottuk.

8 E22 A haptén/BSA molarány aminosav-analizissel, ultraibolya spektrofotometriával és egy esetben radioaktív izotóp alkalmazásával határoztuk meg.

Ezzel az eljárással készítettük a következő antigénjeinket:

| Neurotranszmitter antigén      | haptén/BSA arány |
|--------------------------------|------------------|
| D,L-DOPS /noradrenalin/        | 29               |
| D-DOPA /dopamin/               | 16               |
| L-DOPA /dopamin/               | 17               |
| D-hisztidin /hisztamin/        | 12               |
| D-5-OH-triptofán /szerotonin/  | 37               |
| DL-5-OH-triptofán /szerotonin/ | 26               |
| SMC /acetilkolin/              | 17               |
| D-glutaminsav /GABA/           | 42               |
| L-glutaminsav /GABA/           | 41               |



BOC-L-DOPA-BSA előállítása /karbamidban/

A/-oldat: 170 mg /0.3 mM/ BOC-L-DOPA-t közvetlenül kapcsolás előtt a szokásos módon DCHA-sójából felszabadítottuk. A kapott szabad savat 1 ml vízmentes dimetil-formamidban oldottuk, majd 0°C-ra hűtve 43 ul /0.28 mM/ klórhangyasav-izobutilésztert és 45 ul /0.33 mM/ trietilamint adtunk hozzá és 5 percig 0°C-on kevertettük.

B/ oldat: 100 mg BSA-t 10 ml 8 M karbamid-acetonitril 1-1 arányu elegyében oldottunk.

Az A/ pont an elkészített vegyes-anhidridet a B/ pontban leirt BSA-oldathoz öntöttük 0°C-on. Az egyesített reakció-elegyet 0°C-on 4 órán át állni hagytuk.

A feldolgozást mindenben az általános előiratban közölt módon végeztük. A haptén/BSA hányados értékét UV spektrofotometriával határoztuk meg, és 24.5-nek adódott.

<sup>14</sup>C-SMC-BSA előállítása /0.4 % SDS jelenlétében/:

A/ oldat: 96 mg /0.4 mM/ <sup>14</sup>C-SMC 8 ml vízmentes dimetil-formamidban szuszpendáltunk /0°C-on/ és 90 ul tributilamint és 52 ul /0.4 mM/ klórhangyasav-izobutilésztert adtunk hozzá. A reakció-elegyet 0°C-on 45 percig kevertettük. /A reakció befejeződését a <sup>14</sup>C-SMC oldatban menetele jelezte./

B/ oldat: 150 mg BSA-t oldottunk 10 ml desztillált vízben majd állandó keverés mellett 1 ml 5 %-os SDS-t csepegtettünk hozzá, a pH-t 1 N nátriumhidroxid segítségével 7.5 - 8-ra állítottuk, majd a keverés folytatása mellett 4 ml dioxánt adtunk hozzá.

A két elegy egyesítése után a reakciót 4 órán át 0°C-on állni hagytuk. A reakció feldolgozását az általános előiratban megadott módon - az izotópokra vonatkozó szabályok betartása mellett - végeztük. A haptén/BSA értékét aktivitás-méréssel határoztuk meg: és 42-nek adódott.



BSA-mukonil- -alanil-kolin előállítás

- A/ oldat: 28.4 mg /0.2 mM/ mukosavat 0.5 ml vízmentes dimetilformamidban oldottunk, majd az oldatot  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttük. Ekkor 26  $\mu\text{l}$  /0.2 mM/ klórhangyasav-izobutilészter és 47.5  $\mu\text{l}$  /0.2 mM/ tributilamint adtunk hozzá és 15 percig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on aktiváltuk.
- B/ 15 perc eltelte után 47.7 mg /0.2 mM/ H- -alanil-kolin 0.5 ml vízmentes dimetilformamidban készült oldatát adtuk az A/ oldathoz, majd 47.5  $\mu\text{l}$  tributilamint csepegtettünk hozzá. A reakció-elegyet 60 percig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on majd 2 órán át  $-5^{\circ}\text{C}$ -on állni hagytuk.
- C/ A reakcióidő letelte után 26  $\mu\text{l}$  /0.2 mM/klórhangyasav-izobutilésztert és 47.5  $\mu\text{l}$  /0.2 mM/ tributilamint adtunk hozzá, és 15 percig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on aktiváltunk.
- D/ 120 mg BSA-t 6 ml dioxán-víz 1-1 arányu elegyében oldottunk és az oldat pH-ját N nátriumhidroxid segítségével 7.5 - 8.0-ra állítottuk, majd az oldatot  $0^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttük.

A C/ pontban elkészített vegyes-anhidridet hozzáön -töttük a D/ pontban elkészített BSA oldathoz és 4 órán át  $+4^{\circ}\text{C}$ -on állni hagytuk.

A feldolgozást mindenben a  $^{14}\text{C}$ -SMC-BSA előállítási receptjében megadottak szerint végeztük.

A haptén/hordozó arány meghatározását kétféleképpen végeztük:

UV spektrofotometria segítségével meghatároztuk a hordozón lévő mukonsav mennyiségét. Ez az érték 11-nek adódott.

Aminosav-analizissal a hordozón lévő béta-alanin tartalmat határoztuk meg, ami 9-10-nek adódott.

A fentiek alapján konjugátumunk haptén/BSA aránya: 9-11.



Neurotranszmitterek immobilizálása BrCN-aktivált  
Sepharose 4B-n

A/ A Sepharose aktiválása:

100 g ülepitett gélét nuccson ötször mostuk nagy mennyiségű desztillált vízzel. Ezután a géllal azonos térfogatú desztillált vizet gyűjtünk hozzá, s jól szivó funke alatt 500 ml-es széles-szájú főzőpohárba öntjük, melybe hőmérő, pH-mérő elektródja merül. A szuszpenziót KPG keverővel kevertettük. A gélhez  $11.0 \pm 0.1$  pH-n,  $18-20^{\circ}\text{C}$  közötti hőmérsékleten kis részletekben apróra darabolt brómciant adagoltunk. A pH-t 4 N nátriumhidroxid folyamatos csepegtetésével biztosítottuk. A hőmérsékletet - szükség esetén - jeges-vizes hűtéssel állítottuk be. Az utolsó részlet brómcian beadagolásától számítva kb. 1-1.5 órán át kevertettük a szuszpenziót, majd a reakciót nagy mennyiségű jég hozzáadásával állítottuk le. A gélét gyorsan  $1/1$  szűrtük, nagy mennyiségű  $1/5$  l / kálium-hidrogén-karbonát oldattal mostuk, majd a kapott aktivált Sepharose-t azonnal /50-90 mp/ további célra használtuk fel.

B/ Antigének kapcsolása:

10-10 g aktivált gélhez 100 mg neurotranszmitter-antigén 10 ml 5 %-os kálium-hidrogén-karbonát oldatban készült oldatát adtuk. /pH 9.0/. A reakció-elegyet 24-48 órára hűtőszekrénybe tettük és sűrűn megkevertük. Ezt követően a gélét szűrtük, nagy mennyiségű kálium-hidrogén-karbonát oldattal mostuk és 100 ml 2 M-os glicin oldatot /5 %-os  $\text{KHCO}_3$ -ban/ öntöttünk rá és további 24 órán át hűtőszekrényben, végül 2 órán át szobahőn állni hagytuk. A gél kiszűrése után sok kálium-hidrogén-karbonáttal mostuk, majd 2 M káliumkloriddal végül desztillált vízzel mostuk.



50 A gél tárolása

0.1 M acetát-pufferben /pH 4.75/, mely 0.02 % nátrium-azidot tartalmaz.

Oxidációra érzékeny neurotranszmitterek esetében a tároló puffer a nátriumazidon kívül 0.1 % aszkorbinsavat is tartalmazott.

A fenti kapcsolással a következő eredményeket értük el:

| Alkalmazott antigén          | felkapcsolt mennyiség      |
|------------------------------|----------------------------|
| -----                        |                            |
| Adrenalin-formaldehid-BSA    | $1.8 \times 10^{-4}$ M/kg  |
| Noradrenalin-formaldehid-BSA | $2.17 \times 10^{-4}$ M/kg |
| Dopamin-formaldehid-BSA      | $0.92 \times 10^{-4}$ M/kg |
| Szerotonin-formaldehid-BSA   | $1.57 \times 10^{-4}$ M/kg |
| Hisztamin-formaldehid-BSA    | $1.72 \times 10^{-4}$ M/kg |

A felkapcsolt mennyiség meghatározását minden esetben aminosav-analizissel határoztuk meg, mely 5 percig nuccson szárított gélből történt mintavétel után készült. /nuccs-száraz gél/.

51 C/ AH-Sepharose előállítása:

100 g aktivált gél 100 ml 2 M-os diamino-hexán oldatba öntjük /pH 9.5/ és 48 órára hűtőszekrénybe tesszük és sűrűn kevergetjük. A reakcióidő eltelte után a gél szűrjük, nagy mennyiségű /5 l/ kálium-hidrogén-karbonáttal 2 M-os, káliumkloriddal, desztillált vízzel, végül 0.1 M acetát-pufferrel mossuk.

A felkapcsolt diamino-hexán mennyiségét DNFB-kezelés után spektrofotometriával határoztuk meg.

A kapott érték:  $2.8 \times 10^{-2}$  M/l.



Védett neurotranszmitter-karbonsavak kapcsolása  
AH-Sepharose-hoz

Általános előírat:

5c 1 mM BOC-védett neurotranszmitter-karbonsavat 2 ml vízmentes dimetilformamidban oldunk, és  $-10^{\circ}\text{C}$ -on 0.14 ml / 1 mM/ trietilamint és 0.13 ml /1 mM/ klórhangyasav-izobutilésztert adunk hozzá. A reakció-elegyet  $-10^{\circ}\text{C}$ -on 5 percig kevertetjük, majd azután a képződött vegyes - anhidrid oldatát 20 ml AH-Sepharose-hoz öntjük, amely 20 ml dimetilformamid-aceton-víz 2:2:1 arányu elegyben volt szuszpendálva. A heterogén reakció-elegyet  $+4^{\circ}\text{C}$ -on 24 órára át rázattuk. A reakcióidő letelte után a gél szűrjük, majd dimetilformamid-aceton-víz 2:2:1 arányu elegyével gtször mostuk.

Jen-re A védőcsoportok eltávolítása előtt a gél 20, 50, 80 % acetont tartalmazó aceton-víz eleggyel, majd vízmentes acetonnal, ezt követően 20, 40, 60, 80,% diklórmétánt tartalmazó acetonnal végül vízmentes diklormetánnal mostuk. Az ily módon vízmentesített gél 30 ml  $0^{\circ}\text{C}$ -os trifluorecetsav-diklormetán 1-1 arányu elegyében szuszpendáltuk, majd 1 órára át szobahőn állni hagytuk. A reakcióidő elteltével a gél diklórmetánnal savmentesre mostuk, majd az előbbivel ellentétes oldószer-gradienssel rehidráltuk. A gél a szokásos módon tároltuk.

A felkapcsolt transzmitterek mennyiségét UV spektrofotometriával, aminosav-analizissal, illetve radioaktivitás méréssel határoztuk meg. Az ily módon kapcsolt neurotranszmitter-származékok jellemzését a következő táblázat adja meg:





| Karboxilált<br>neurotranszmitter | AH-Sepharose 4B-n<br>mért koncentráció | Meghatározási<br>módszer |
|----------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| 3,4-dihidroxifenilszerin         | $1.8 \times 10^{-2}$ M/l               | UV                       |
| 3,4-dihidroxid-fenilalanin       | $4.3 \times 10^{-3}$ M/kg              | aminosav-<br>analízis    |
| 3,4-dihidroxid-L-fenilalanin     | $4.2 \times 10^{-3}$ M/kg              | aminosav-<br>analízis    |
| D-hisztidin                      | $1.9 \times 10^{-3}$ M/kg              | aminosav-<br>analízis    |
| L-hisztidin                      | $2.0 \times 10^{-3}$ M/kg              | aminosav-<br>analízis    |
| D,L-5-hidroxitriptofán           | $1.2 \times 10^{-2}$ M/l               | UV                       |
| D-5-hidroxitriptofán             | $1.2 \times 10^{-2}$ M/l               | UV                       |
| D-glutaminsav                    | $1.5 \times 10^{-2}$ M/kg              | aminosav-<br>analízis    |
| L-glutaminsav                    | $1.5 \times 10^{-2}$ M/kg              | aminosav-<br>analízis    |
| $^{14}\text{C}$ -SMC             | $2.8 \times 10^{-3}$ M/kg              | radioakt.<br>mérés       |



## Ö s s z e f o g l a l á s

Szteroid-hormonok és neurotranszmitterek immunológiai meghatározásának kidolgozásához alkalmas származékokat állítottunk elő.

5b 5-  
5-  
Szteroid-antigénjeink nagy részét a már meglévő funkciós csoportok felhasználásával, kisebb részét új funkciós csoport kiépítésével szintetizáltuk. A két eljárás együttes alkalmazásával 65 szteroid-antigént állítottunk elő. A szteroid-RIA kifejlesztésének övítésére kidolgoztuk a szteroid-hormonok kromatográfiás tisztítási lépést nem igénylő radiojódozását.

17 neurotranszmitter-származék és kiindulási neurotranszmitterek felhasználásával, különböző kapcsolási technika segítségével antigéneket szintetizáltunk. Affinitás-kromatográfiás célokra a neurotranszmitterek immobilizált származékait is elkészítettük. Ezen származékok antiszérumok jellemzésére is felhasználhatók.

Eredményeink alapján érdekes következtetésre jutottunk: neurotranszmitterek és egyéb kis molekulájú anyagok antigénje nem alkalmas RIA és ICC egyidejű kifejlesztésére. Megállapítottuk, hogy a szintézis során döntő szempontként kell figyelembe venni, hogy milyen célra készül az antigén.

Szoros Korreláció-t találtunk az ICC kifejlesztésére alkalmas antigének és a szövetben fixált neurotranszmitterek szerkezete között.

Az adrenalin-karbonsav szintézise során a szakirodalomban - ilyen körülmények között - le nem írt gyűrűzáródást figyeltünk meg. A gyűrűzárt vegyület szerkezetét egyenértékűség-meghatározás, elemi analízis, IR-, UV-,  $^1\text{H}$ -NMR-,  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroszkópia segítségével felderítettük.

Antigénjeink minőségellenőrzésére UV-spektrofotometriát, izoelektromos fókuszálást, nitrogén-analízist, aminosav-analízist, spektrofluorimetriát és radioaktív izotopokat használtunk.



59  
Konjugátumainkkal végzett immunizálások bizonyították, hogy azok antitestek termelődését váltják ki. A kapott szteroid-antiszérumok segítségével 45 esetben sikerült kooperáló csoportoknak RIA-t kidolgozni, mely közül 9 esetben olyan specifikus volt az antiszérum, hogy a meghatározás előtt nincs szükség a minta előzetes kromatográfiás tisztítására.

A neurotranszmitter-antiszérumok segítségével az adrenalin, noradrenalin, dopamin, szerotonin és hisztamin esetében sikerül ICC-t kidolgozni.

A RIA kifejlesztése folyamatban van.

Az immobilizált származékok felhasználásával sikerült a szerotonin-antiszérumot jellemezni.



A disszertáció témájából megjelent saját publikációk  
jegyzéke

A. Előadások

1. Varga J., Penke B., Kovács K., Faredin I., László F.  
Sztteroid-antigének előállítása RIA céljára  
Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Debrecen 1978
2. Varga J., Péntes K., Penke B., Kovács K.  
Mediátor antigének előállítása  
Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, 1979
3. K. Lichtwald, E. Mayer, H. Schmidt-Gayk, J. Varga and  
S. Walch  
Hemisuccinates of Vitamin D<sub>3</sub> and of its metabolites  
Congress on vitamin-D, West-Berlin, Febr. 1979.
4. H.W.M. Steinbusch, A.A.J. Verhofstad, B. Penke, J. Varga  
and H.W.J. Joosten  
Immunohistochemical Characterization of monoamine  
containing Neurons  
XXI. Symposium der Gesellschaft für Histochemie,  
Gargellen, Österreich, 1979.
5. A.A.J. Verhofstad, H. Steinbusch, B. Penke, J. Varga  
The Use of Antibodies to Noradrenaline and Adrenaline  
in Immunochemistry  
III. International Symposium on Nervous Transmission,  
Helsinki, Sept. 1979.
6. A.A.J. Verhofstad, H.W.M. Steinbusch, B. Penke, J. Varga  
and H.W.J. Joosten  
Over het aantonen van noradrenaline- en adrenaline-  
producerende cellen in het bijniervormig met behulp van  
immunohistochemie  
Meeting Dutch Anatomical Society, Nijmegen, Oct. 1979.
7. T. Hökfelt, M. Goldstein, K. Fuxe, O. Johansson, A. Verhofstad,  
H. Steinbusch, B. Penke and J. Varga  
Histochemical Identification of Adrenaline Containing  
Cells with Special Reference to Neurons  
Meeting on Central Adrenaline Neurons, Stockholm, Sept. 1979.
8. B. Penke, J. Varga, K. Péntes, K. Kovács, A.A.J. Verhofstad  
and H. Steinbusch  
Synthesis and Characterisation of Various Antigens  
Related to Catecholamines  
9th Congress of the Hungarian Society of Endocrinology  
and Metabolism 1979, Szeged



9. A.A.J.Verhofstad, H.W.M.Steinbusch, B.Penke and J.Varga  
Localization of catecholamine-storing cells in the adrenal medulla by immunohistochemistry.  
9th Congress of the Hungarian Society of Endocrinology and Metabolism 1979, Szeged
10. A.A.J.Verhofstad, H.W.M. Steinbusch, B.Penke, J.Varga and H.W.J. Joosten  
The use of antibodies to biogenic amines in immunohistochemistry  
Vith International Histochemistry and Cytochemistry Congress Brighton /England/ Aug.1980
11. J.Vargas, B.Penke, K.Pengzes, K.Kovács, A.A.J.Verhofstad and H.W.M.Steinbusch  
Synthesis and characterization of various antigens related to neurotransmitters and neuromodulators.  
XXVIII. International Congress of Physiological Sciences, Budapest, 1980
12. M.Zarándy, Penke B., Náfrády J., Herczeg O., Varga J., Karácsnyai A., Kovács K., Varró V.  
Első sejtek izolálása kutya gyomor nyálkahártyájából; a sejtek kötődésének vizsgálata  
Magyar Gasztroenterológiai Társaság XXII.Kongr.  
Keszthely, 1980.máj.21-24
13. Varga János  
Új módszerek neurotranszmitterek RIA és immuncitokémiai meghatározása, valamint receptorjaik kimutatására  
I. Országos Gyógyszerkutató Konferencia  
Budapest, 1980.dec. 4-5
14. Varga J., Penke B., Joó B., Kovács K., Pelczar J.,  
Nem várt gyűrűzárási reakció dibenziloxifenilserin-metilézéseinél  
Magyar Kémikusok Egyesülete 1981. Vegyészkonferencia  
Szeged, 1981. júl. 21-24
15. B.Penke, J.Varga, G.Tóth, M.Zarándy, K.Kovács, A.Verhofstad  
New approach for targeted immobilization of amino acids, peptides and neurotransmitters  
4th International Symposium on Affinity Chromatography and Related Techniques, 22-26. June 1981, Bildhoven
16. Tóth G., Varga J., Penke B., Kovács K.  
Egy D-lizin analóg: az HCO<sub>2</sub>-aminoetil-izosaszparagin előállítás és peptidkémiai alkalmazása



17. B.Penke, J.Varga, K.Kovács and A.A.J.Verhofstad  
Immunohistochemical localization of Noradrenaline  
I. Efforts as the preparation of suitable antigens.  
Symposium on Regulation of pituitary Functions  
Pécs. Augustus 17-19. 1981
18. A.A.J.Verhofstad, H.W.M.Steinbusch, B.Penke and  
J.Varga  
Immunohistochemical localization of noradrenaline  
II. Some immunohistochemical findings Symposium on  
Regulation of pituitary functions  
Pécs, Augustus 17-19, 1981
19. Török A., Varga J., Penke B., Kovács K.  
Receptorok kimutatására alkalmas neurotranszmitterek  
és származékainak előállítása  
MTA P ptidkémiai Munkabizottság ülése  
Balatonfüred, 1981.május
20. Varga János, Pelczér I., Penke B., Kovács K.  
Védett neurotranszmitter-karbonsavak előállítása  
és azok peptidkémiai alkalmazása  
MTA Peptidkémiai Munkabizottság ülése  
Balatonfüred, 1982.máj.
21. M.Zarándy, B.Penke, J.Varga, A.Holzinger, P.Pham  
What is the minimum active centre of gastrin?  
XVII. European Peptide Symposium  
Prága, 1982.aug.

#### B. Írásos közlemények

1. K. Lichtwald, E.Mayer und Varga J.  
Methoden zur Kopplung von Steroiden an Proteine  
Medezintechnik 98, /3/ 50-57 /1978
2. K. Lichtwald, E.Mayer, Schmidt-Gayk, J.Varga and  
S.Walch  
Hemisuccinates of vitamin D<sub>3</sub> and of its metabolites  
Vitamin D, Basic Research and its Clinical Application,  
Walter de Gruyter Co., Berlin-New York, 1979.
3. A.A.J.Verhofstad, H.W.M.Steinbusch, B.Penke, J.Varga  
und H.W.J. Joosten  
Use of Antibodies to Norepinephrine and Epinephrine  
in Immunohistochemistry  
in "Histochemistry and Cell Biology of Autonomic  
Neurons SIF Cells, and Paraneurons" /ed.O.Eröké/  
Raven Press, New York 1980.



4. T. Hükfelt, M. Goldstein, K. Fuxe, O. Johansson, A. Verhofstad, H. Steinbusch, B. Penke, J. Varga  
Histochemical Identification of Adrenaline Containing Cells with special Reference to Neurons  
In Central Adrenaline Neurons /Wenner-Gren Center International Symposium Series Vol. 33./Ed. K. Fuxe et al./ Pergamon Press Oxford, 1980. 19-47
5. A.A.J. Verhofstad, H.W.M. Steinbusch, B. Penke, J. Varga and H.W.J. Joosten  
Serotonin-immunoreactive cells in the superior cervical ganglion of the rat. Evidence for the existence of Separate serotonin- and catecholamine-containing small ganglionic cells  
Brain Research, 212, /1981/ 39-49
6. H.W.M. Steinbusch, A.A.J. Verhofstad, B. Penke, J. Varga and H.W.J. Joosten  
Immunohistochemical characterization of monoamine-containing neurons in the central nervous system by antibodies to serotonin and noradrenaline. A study in the rat and the lamprey  
Acta histochemical, Suppl. Band XXIV. S. 107-122 /1981/
7. J. Varga, B. Penke, I. Pelczar and K. Kovács  
Ring-formation by methylation of phenylserine derivatives  
Tetrahedron letters /készítés alatt/



Diákköri munkák

- 1/ Szteroid-protein-konjugátumok előállítása immun-  
kémiai vizsgálatok /Radioimmunoassay/ céljára  
Pályamunka 1975.
- 2/ Szteroid-protein-konjugátumok előállítása immun-  
kémiai vizsgálatok /Radioimmunoassay/ céljára.  
Országos Diákköri Konferencia 1977.
- 3/ Ujabb szteroid-protein-konjugátumok előállítása  
immunkémiai vizsgálatok céljára.  
Országos Diákköri Konferencia 1978.
- 4/ Szteroid-protein-konjugátumok előállítása immun-  
kémiai vizsgálatok /Radioimmunoassay/ céljára  
Pályamunka 1978.
- 5/ Mediátor anyagok BSA-val képzett konjugátumainak  
előállítása radioimmunoassay céljára  
Pénzes Katalin - Varga János  
Pályamunka, 1978.
- 6/ Immuno-analitikai célra alkalmas antigének és  
immobilizált mediátorok szintézise  
Varga János és Pénzes Katalin  
Országos Diákköri Konferencia 1979.



Felhasznált irodalom

1. Vizi Sz..  
A biológia újabb eredményei 12. kötet
2. Landsteiner K.  
Biochem.Z. 119, /1921/ 294
3. Niswender G.D., Midgley A.R.  
Hapten-radioimmunoassay for steroid-hormones  
Ch.8. Immunologic Methods in Steroid Determination  
/PERCH P.G., Chaldwell B.V. Appleton-Centura-Crofts  
New York 1970.
4. Grotz L., Brown G.M.  
Endocrinology 98, 615 /1976/
5. Gergely J., Hana H.O.,  
Az elméleti és klinikai immunológia alapjai  
Budapest, 1974
6. Hinweise für Steroidbestimmungen  
/Zusammengestellt von P.Vecsei, D. Haack und  
K. Lichtwald, Heidelberg, 1980./
7. Passon P.G., Penler J.D.  
Anal. Biochem. 51, 618-631 /1973.
8. Da Prada, Zürcher G.,  
Life Sci. 19, 1164-1174 /1976/
9. Enderb E.  
Clin. Chim. Acta 96, 233-239 /1979/
10. Cohen E., Goldenberg M.,  
J. Neurochem. 2, 71-80 /1957/
11. Anton H.A., Shyre D.P.  
J. Pharm.Exp. Ther. 138, 360-375 /1962/
12. Valeri G., Brunori C.H., Rensini V., Corea  
Anal. Biochem. 33, 138-167 /1970/
13. Falk B.  
Acta Physiol.Scand. 56, /197/ 1-21 /1962/
14. Falk B., Hillarp N.A., Thione G., Thorp A.  
J. Histochem. Cytochem. 10, 348-354 /1962/
15. H.Corrodi, G. Jonsson  
J. Histochem. Cytochem. 15, 65-78 /1967/
16. G. Jonsson  
Histochemie 8, 288-296 /1967/
17. D.Lindvall, H.Björklund, B.Falck, L.Svensson  
Histochemistry 46, 27-52 /1975
18. H. Corrodi, N.Hillarp, G. Jonsson  
J.Histochem. Cytochem. 12, 582-586 /1964
19. H.Corrodi, N.Hillarp  
Helv. Chim. Acta 47, 911-918 /1964/



20. H. Corrodi, N. Hillarp  
Helv. Chim. Acta 46, 2425-2430 /1963/
21. H. Corrodi, G. Jonsson  
J. Histochem. Cytochem. 13, 484-487 /1965/
22. S. Axelsson, A. Björklund, D. Linvall  
J. Histochem. Cytochem. 20, 435-444 /1972/
23. A.H. Coons  
Fluorescent antibody methods in general cytochemical  
methods  
Academic Press, New York 1958
24. Geffen L.B., Livett G.D., Rush R.A.  
J. Physiol. /London/ 204, 593-605 /1969/
25. Håkfelt T., Fuxe K., Goldstein M.,  
Histochemie 33, 231-254 /1973/
26. Gervais A.G.  
Experientia /Basel/ 28, 342-343 /1972/
27. Cohen G., Collins M.  
Science 167, 1749-1751 /1970/
28. Wise C.D., Stein L.  
Science 181, 344-347 /1973/
29. Schöpf J.,  
Schweiz. Med. Wochenschrift 105, 1201-1209 /1975/
30. Håkfelt T., Ljungdahl A., Fuxe K., Jonsson O.  
Science 184, 177-179 /1974/
31. Taylor K.M., Snyder S.H.  
Science 168, 1487-1489 /1970/
32. Angrist B.M., Shopsin B., Greshon S.  
Nature 234, 152-153 /1971/
33. Boulton A.A.  
Nature 231, 22-28 /1971/
34. Henoecker H., Rommelspacher H.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm. 305, 135-141 /1968/
35. Snyder S.H., Banerjee S.K. P., Yamamura H.I.  
Greenberg D.  
Science 184, 1243-1253 /1974/
36. Meinsinger E.  
Doktori disszertáció USA 1946
37. Goodfriend L., Schon A.H.  
Can. J. Biochem. and Physiol. 35, 1177-1184 /1958/
38. Goodfriend L., Schon A.H.  
Nature 185, 764-766 /1960/
39. Goodfriend L., Schon A.H.  
Can. J. Biochem. and Physiol. 39, 967-971 /1961/
40. Erlanger B.F., Borek F., Boiser S.M., Lieberman S.  
J. Biol. Chem. 228, 713 /1957/



41. Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M., Lieberman S.  
J. Biol. Chem. 234 1090 /1959/
42. Went S., Kesztyis L.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm. 193, 609-614 /1939/
43. Frankel-Conrat H., Cooper M., Olcott A.S.  
J. Am. Chem. Soc. 67, 950 /1945/
44. Wormell R.L., Kaye M.A.G.  
J. Soc. Chem. Ind. 64, 75 /1945/
45. Frankel-Conrat H., Olcott H.S.  
J. Biol. Chem. 174, /1948/
46. Swain A.P., Kokes E.L., Hipp H.J., Wood J.L., Jackson R.W.  
Ind. and Eng. Chem. 40, 465 /1948/
47. Frankel-Conrat H., Brandon B.A., Olcott H.S.  
J. Biol. Chem. 168, 99 /1947/
48. Dewar M.K., Johns R.B., Kelly D.P., Yates J.F.  
Aust. J. Chem. 28 917-924 /1975/
49. Tome D., Naulet H.  
Int. J. Peptide proteine Res. 17, 501-507 /1981/
50. Miwa A., Yoshioka M., Shirahata A., Nakagawa Y., Tamura Z.  
Chem. Pharm. Bull. 24, /6/ 1422 - 1424 /1976/
51. Doty J.  
Anal. Chem. 20,, 1166 /1948/
52. Miwa A., Yoshioka M., Shirahata A., Tamura Z.  
Chem. Pharm. Bull. 25 /8/ 1904-1910 /1977/
53. Miwa A., Yoshioka M., Tamura Z.  
Chem. Pharm. Bull. 26 /11/ 3347-3352 /1978/
54. Spector S., Dalton C., Felix A.M.  
Frontiers in Chatecolamine /1973/ pp. 345-349  
Pergamon Press, Printed in Great Britain
55. Cheng L.T., Kim S.Y., Chung A., Castro A.  
FEBS Letters 36/3 339-342 /1973/
56. Keeton T.K., Kruttsch H., Lowenberg W.  
Science 211, 586-588 /1981/
57. Fell N., Rodney G., Marschall D.E.  
J. Immunol. 47, 237 /1943/
58. Cohen M.B., Friedman H.J.,  
J. Allergy 18, 7-12 /1947/
59. Rodney G., Fell N.  
J. Immunol. 47, 251-259 /1943/
60. Davis T.R.A., Meade K.M.  
Nature 226, 360 /1970/
61. Martin G.J., Lam D.P., Marini M.A.  
Bioorganic Chemistry 4, 22-29 /1975/
62. Kovách P., Csaba Gy.  
Acta Histochem. 66 50-58 /1980/



63. Philipp G., Schneider H.,  
Acta Allergologica 19, 216-218 /1964/
64. Ranadive N., Schon A.H.  
Can. J. Biochem. 45, 1681-1689 / 1967/
65. Spector S., Berkovitz B., Flynn E. J., Peskar B.  
Pharmacol. Rev. 25, 281-291 / 1973/
66. Peskar B., Spector S.,  
Science 179, 1340-1341 /1973/
67. Ranadive N., S., Schon A.H.,  
Can. J. Biochem. 45, 1701-1710 / 1967/
68. Steinbusch H.W.M., Verhofstad A.A.J., Joosten H.W.J.  
Neuroscience 3, 811-819 / 1978/
69. Buffa R., Crivellio, Iavarini C., Sessa F., Verme G.,  
Histochemistry 68, 9-15 / 1980/
70. Delage M.A., Puisillout J.J.,  
J. Physiol. Paris 77, 339-347 / 1981/
71. Spector S., Felix A., Smenuk G., Pinberg J.P.M.  
Neurochemistry 30, 685-689 / 1978/
72. Kawashima K., Isikawa H., Mochizuki M.,  
J. Phyrn. Met. 3, 115-123 / 1980/
73. Upjohn Co. Brit. P. Soc 889 / 1958. 09. 03./
74. Kirk D.N., Hartshorn N.P.,  
Steroid Reaction Mechanisms Monograph 7.  
Elsevier Publishing Co., Amsterdam-London-New York  
1968 p 26
75. Csordás Tóth Éva  
Diplomamunka 1973, Szeged
76. Sondheimer P., Kaufmann St.  
J. Am. Chem. Soc. 75, 4712 / 1953/
77. /G. E. Abraham, P. K. Grover  
Principles of Competitive Protein-Binding-Assay  
Lippincott, Philadelphia pp. 140. /1971/
78. E. Kuss, R. Goebel  
Steroids 19, 509-732/1972/
79. Exley D., Johnson M. W., Dean P. D. G.  
Steroids 18, 605 /1971/
80. P. Bayard, I. Z. Beitins, A. Kowarski, C. G. Nigean  
J. Clin. Endocrinology 31, 1. /1970/
81. C. E. Dalgliesh, F. G. Mann  
J. Chem. Soc. 1947, 658-662
82. A. Olson  
J. Org. Chem. 35/6/ 1912 /1970/
83. S. Fränkel, K. Zeimer  
Biochem. Z. 110, 234 /1920/
84. D. Heyl, E. Lutz, S. A. Harris, K. Folkers  
J. Am. Chem. Soc. 70, 3669 /1948/



85. D. H. Hoffman, S. A. Harris, K. Folkers  
US Pat. 2 540 946 / febr. 06. 1951./
86. A. Hruby  
J. Org. Chem. 35, 1690 /1970/
87. E. Schröder  
Justus Liebig's Ann. Chem. 670, 127 /1963/
88. R. Coggins, W. L. Benoiton,  
Can. J. Chem. 49, 1968 /1971/, 51, 1915 /1973/
89. S. Guttman, R. A. Boissonas  
Helv. Chim. Acta 41, 1852-67 /1958/
90. K. Hofmann, A. Jühl, A. E. Furlenmeier, H. Kappeler  
J. Am. Chem. Soc. 79, 1636-1641 /1958/
91. H. Zahn, E. Schmabel  
Justus Liebig's Ann. Chem. 605, 212-213 /1957/
92. J. Harris, J. S. Fruton  
J. Biol. Chem. 191, 143-151 /1951/
93. F. Bergel, Roy Wade  
J. Chem. Soc. /London/ 941-947 /1959/
94. M. Bergmann, L. Zervas  
Chem. Ber. 65, 1192 /1932/
95. S. Yitzhak, T. Mati, Z. Veral, Z. Vis  
Int. J. Peptide Protein Res. 12, 130-138 /1978/
96. K. W. Rosenmund, H. Dornsauff  
Chem. Ber. 52, 1734 /1919/
97. W. A. Bolhofer  
J. Am. Chem. Soc. 76, 1322 /1954/
98. B. Hegedüs, A. P. Krassó, K. Noack, P. Zeller  
Helv. Chim. Acta 58, 147-162 /1975/
99. N. Bodor, K. B. Sloan, T. Higuchi, K. Sasahara  
J. Med. Chem. 20, 1035 /1977/
100. S. Goldschmidt, C. Jutz  
Chem. Ber. 86, 1116 /1913/
101. E. Klieger, E. Schröder, H. Gibian  
Justus Liebig's Ann. Chem. 640, 157 /1961/
102. R. Schwytzer, H. Kappeler  
Helv. Chim. Acta 44, 1961 /1961/
104. P. Cuatrecasas  
Procl. Natl. Acad. Sci. USA 63, 540-7 /1967/
105. P. Cuatrecasas, J. Parikh  
Methods in Endocrinology 34, 657-660 /1975/
103. E. Schröder, E. Klieger  
Justus Liebig's Ann. Chem. 673, 196 / 1964/
106. R. Sellinger, M. Civen,  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, /1971/



107. E. Hurwitz, F. Dietrich, M. Sela  
European J. Biochem 17, 273 /1970/
108. M. Zarándy, B. Penke, J. Náfrádi, O. Herczegh,  
J. Varga, G. Kárácsnyi, K. Kovács, V. Varró  
Magyar Gastroenterológiai Társ. XIII. Kongr. Keszthely, 1980
109. L.I. Larsson, S. Childers, S.H. Snyder  
Nature, 282, 407-410, / 1979/
110. C.R. Lowe  
An introduction to affinity chromatography  
North Holland Publ. Co. , Amsterdam-New York-Oxford  
pp. 390-395 /1979/



## F ü g g e l é k

### 1. Az aldoszteron-antiszérum keresztreakciói:

|                                  |       |   |
|----------------------------------|-------|---|
| aldoszteron                      | 100   | % |
| 18-hidroxi-kortikoszteron        | 0.25  | % |
| kortikoszteron                   | 0.28  | % |
| dezoxi-kortikoszteron            | 1.07  | % |
| 17-hidroxi-progeszteron          | 0.023 | % |
| 18-hidroxi-dezoxi-kortikoszteron | 0.12  | % |
| tesztoszteron                    | 0.72  | % |
| progeszteron                     | 0.10  | % |
| dihidro-aldoszteron              | 50.6  | % |
| tetrahidro-aldoszteron           | 21.0  | % |

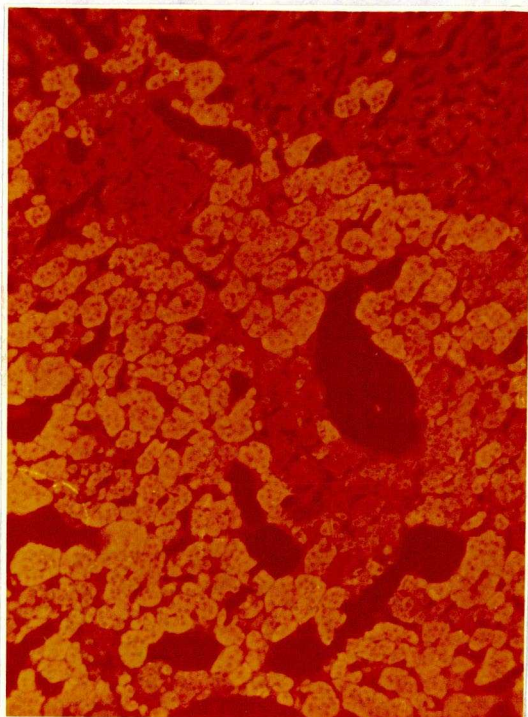
### 2. A tetrahidro-kortizol antiszérum keresztreakciói:

|                            |      |   |
|----------------------------|------|---|
| tetrahidro-kortizol        | 100  | % |
| tetrahidro-kortizon        | 0.32 | % |
| tetrahidro-kortikoszteron  | 1.5  | % |
| tetrahidro-dezoxi-kortizol | 3.97 | % |
| dihidro-kortizol           | 0.05 | % |
| dihidro-kortizon           | 0.01 | % |
| tetrahidro-kortizon        | 0.01 | % |
| tetrahidro-kortikoszteron  | 1.5  | % |
| tetrahidro-dezoxi-kortizol | 3.97 | % |

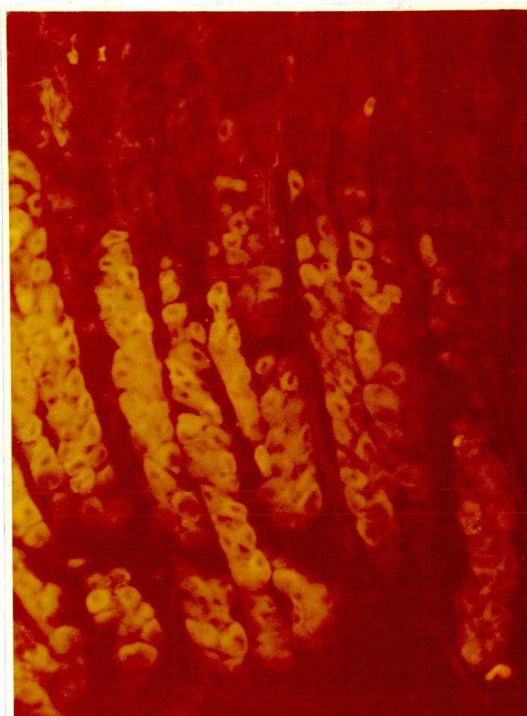
### 3. A DHEA-antiszérum keresztreakciói

|                       |      |   |
|-----------------------|------|---|
| DHEA                  | 100  | % |
| DHEA-szulfát          | 30   | % |
| dezoxi-kortikoszteron | 0.05 | % |
| 17-OH-progeszteron    | 0.05 | % |
| tesztoszteron         | 0.16 | % |
| dihidro-tesztoszteron | 0.05 | % |
| 16-OH-DHEA            | 1.2  | % |
| androsztendion        | 15.9 | % |
| androszteron          | 10.4 | % |
| pregnenolon           | 0.05 | % |





Patkány mellékvese-velő; anti-adrenalin antiszérummal kezdve



Patkány gyomor corpus részlet; anti-hisztamin antiszérummal kezelve



Köszönetet mondok Dr. Kovács Kálmán professzornak, a kémiai tudományok doktorának, az intézet vezetőjének, hogy disszertációm elkészítését intézetében lehetővé tette.

Köszönöm Dr. Penke Botondnak, a kémiai tudományok kandidátusának, témavezetőmnek a témaválasztásban, valamint kísérleti munkám során nyújtott sokirányú segítségét.

Az aminosav-analizisek és az ábrák elkészítését Ferenci Richárdnak köszönöm meg. Az NMR spektrumok elkészítését Pelczer Istvánnak és Dombi Györgynek, az UV és IR spektrumok elkészítését Kiss Jánosnak köszönöm meg.

Szeretnék köszönetet mondani az intézet minden dolgozójának.

