

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A KÉMIAI TÉR TERMÉSZETES ANYAGOKON ALAPULÓ
BŐVÍTÉSE ÚJ BIOAKTÍV ANYAGOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Hunyadi Attila

Készült a Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Karának
Farmakognóziai Intézetében

Szeged

2021

Ajánlás

Ezt az értekezést feleségemnek, Dr. Ana Sofia Fernandes Martins-nak ajánlom, aki mind az életben, mind a tudományban együttműködő partnerem – neki köszönhetem a rezisztens tumorsejteken itt bemutatott farmakológiai vizsgálatok többségének elvégzését is –, és a mindkettőnk életét bearanyozó kisfiunknak, Áronnak.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik nélkül ez a munka nem születhetett volna meg. Báthori Mária professzorasszonynak, korábbi témavezetőmnek, aki megszerettette velem az ekdiszteroid-kutatást és bátorította a kutatómunkához való játékos, kreatív hozzáállást. Szendrei Kálmán professzor úrnak, aki az ekdiszteroid témát intézetünkben elindította, és aki ötleteivel, jótanácsaival közvetlenül is hozzájárult az itt bemutatott munka sikeréhez. Hálás vagyok Prof. Yang-Chang Wu-nak, akinek kutatócsoportjában elkezdhettem a protoflavonokkal kapcsolatos posztdoktori munkámat, és Prof. Fang-Rong Chang-nak, aki a Tajvanon töltött időszak alatt és azóta is igazi jóbarátként segítette és segíti munkámat. Hálásan köszönöm Hohmann Judit professzorasszony folyamatos támogatását, ami kulcsfontosságú volt az önálló kutatócsoport építéshez.

Az itt bemutatott eredmények természetesen csapatmunkából származnak, hálásan köszönöm azon munkatársaim hozzájárulását, akik ebben tevékenyen részt vettek és vesznek, ezek elsősorban végzett PhD hallgatóim – Dr. Dankó Balázs, Dr. Csábi József, Dr. Meriem Issaadi, Dr. Ahmed D. Latif, Dr. Zoofishan, Dr. Vágvölgyi Máté, Dr. Wan-Chun Lai, és Dr. Yu-Chi Tsai, és azok, akik PhD munkája jelenleg is folyamatban van – Fási Laura és Girst Gábor. Hálás vagyok azon munkatársaimnak is, akiknek munkája itt nem jelenik meg, de a kutatás továbbvitelében jelentős szerepet játszik – posztdoktoraim, Dr. Gonda Tímea és Dr. Szőri Kornél, PhD hallgatóim, Orinamhe Agbadua, Sara Ahmed, Háznagy Márton és Laczkó Dávid, és valamennyi korábbi és jelenlegi diákkörös hallgatóm. Külön is kiemelném tapasztalt asszisztensünk, Hevérté Herke Ibolya nagy önállósággal végzett, elhivatott és minőségi munkáját.

Hálásan köszönöm együttműködő partnereink és szerzőtársaim hozzájárulását. Kiemelném hazai részről Tóth Gábor professzor úrnak az ekdiszteroid származékok szerkezetvizsgálatában nyújtott jelentős segítségét, Prof. Molnár Józsefnek, Prof. Zupkó Istvánnak, Dr. Szakács Gergelynek és Dr. Spengler Gabriellának a biológiai vizsgálatokhoz, és Prof. Kónya Zoltánnak a nanorészecskék vizsgálatához való hozzájárulását. Hálás vagyok valamennyi, a jelen munkához hozzájáruló nemzetközi partnerünknek, kiemelten Prof. Hui-Chun Wang, Prof. Chin-Chung Wu, Dr. Ching-Ying Kuo, Dr. Tusty-Jiuan Hsieh, Dr. Da-Wei Chuang, Dr. Li-Kwan Chang és Dr. Michael S. Chen (Tajvan), Dr. Milica Pešić (Szerbia), Prof. Patrick Trouillas és Dr. Florent Di Meo (Franciaország), Prof. Daniele Passarella (Olaszország), Dr. Jean-Yves Servais és Dr. Carole Seguin-Devaux (Luxemburg). Köszönöm az európai COST együttműködési hálózatokban megismert barátaimnak és együttműködő partnereinknek a jelen munkát nagymértékben előmozdító, inspiráló nemzetközi munkakörnyezetet.

Hálásan köszönöm mindazon tapasztalt kutatók segítségét, akik jótanáccsal, tudományos diszkusszióval járultak hozzá munkámhoz, közülük is kiemelném a közelmúltban eltávozott atyai jóbarátomat, Prof. Leonard „Len” Amaral-t; a vele folytatott érdekes beszélgetések sokat segítettek abban, hogy önálló kutatóvá váljak. Hálás vagyok Fülöp Ferenc professzor úr támogatásáért, és különösen az antioxidáns-inspirálta munkánkkal kapcsolatos lelkes biztatásáért.

Köszönöm a Farmakognóziai Intézet valamennyi munkatársának a baráti, kollegiális légkört, amelyben ez a munka megszülethetett. Köszönöm családom folyamatos háttértámogatását.

Az itt bemutatott kutatómunkát az EEA and Norway Grants, az NKFIH (K-119770), az Emberi Erőforrások Minisztériuma (GINOP-2.3.2-15-2016-00012, EFOP-3.6.1-16-2016-00008 és 20391-3/2018/FEKUSTRAT), a Bolyai János kutatási ösztöndíj, a tajvani National Science Council (NSC), az MTA/NSC és MTA/MOST Magyarország-Tajvan bilaterális mobilitási pályázata, és számos európai COST Action STSM pályázata támogatták.

Tartalomjegyzék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények, tematika és fordított időrend szerint	5
Az értekezés témájával szorosan összefüggő, de annak alapját nem képező saját közlemények	8
1. BEVEZETÉS – TERMÉSZETES ANYAGOK A GYÓGYSZERKUTATÁSBAN	10
2. CÉLKITŰZÉS.....	12
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	14
4. EKDISZTEROIDOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA	16
4.1. AZ EKDISZTEROIDOK ELŐFORDULÁSA, KÉMIAJA ÉS FARMAKOLÓGIÁJA.....	16
4.2. KERESKEDELMI FORGALOMBAN ELÉRHETŐ EKDISZTEROID-TARTALMÚ KIVONATOK VIZSGÁLATA [S1, S2]	20
Irodalmi áttekintés az 1. Tézishez	20
Étrend-kiegészítők vizsgálata: hogyan lesz a Cyanotis-ból spenót? [S2]	21
Minor fitoekdiszteroidok előállítása a <i>C. arachnoidea</i> kereskedelmi kivonatából [S1]	25
4.3. OXIDÁLT ÉS FOTO-TRANSZFORMÁLT EKDISZTEROID SZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA [S3-S7].....	29
Irodalmi áttekintés a 2. Tézishez	29
A 20E auto-oxidált származékainak előállítása és vizsgálata [S4-S6]	30
C21 ekdiszteroid metabolitok előállítása és vizsgálata [S3].....	35
A 20E UV lézer flash fotolízise [S7].....	38
4.4. TUMOR REZISZTENCIA CSÖKKENTŐ HATÁSÚ EKDISZTEROID SZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA [S8-S18].....	41
Irodalmi áttekintés a 3. Tézishez.....	41
Szűrővizsgálatok és a dioxolán funkciók szerepének feltérképezése [S12-S13, S16-S18]	43
A posztsteron 2,3-diolján szubsztituált származékok előállítása és vizsgálata [S12]	51
F-, S-, vagy N-tartalmú származékok előállítása és vizsgálata [S8, S11, S14-S15]	53
Önrendeződő, ekdiszteroid-tartalmú nanorészecskék előállítása és vizsgálata [S8, S10, S11] ..	56
5. BIOAKTÍV PROTOFLAVONOID ANALÓGOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA	60
Irodalmi áttekintés a 4. Tézishez.....	60
Antitumor hatású protoflavon származékok előállítása és vizsgálata [S20-S24]	62
Protoflavonok xantin-oxidáz gátló hatásának vizsgálata [S22]	68
Antivirális hatású, nem citotoxikus protoflavon származékok előállítása és vizsgálata [S19] ..	71
6. A KÉMIAI TÉR ANTIOXIDÁNS INSPIRÁLTA KITERJESZTÉSE	75
Irodalmi áttekintés az 5. Tézishez [S26].....	75
A metil- <i>p</i> -kumarát ROS befogással összefüggő metabolit terének vizsgálata [S27].....	80
A metil- <i>p</i> -kumarát és metil-kaffeát RONS mediált bioreleváns oxidációja [S25]	86
7. ÖSSZEFOGLALÁS	92

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények, tematika és fordított időrend szerint

I. Kereskedelmi *Cyanotis arachnoidea* kivonatok vizsgálata (1. TÉZIS)

S1. Issaadi HM, Tsai YC, Chang FR, **Hunyadi A***

Centrifugal Partition Chromatography in the isolation of minor ecdysteroids from a commercial extract of *Cyanotis arachnoidea*. *J Chromatogr B*, **2017**, 1054, 44-49.

IF: 2,441;¹ Q1;² Hiv: 4³

S2. **Hunyadi A***, Herke I, Lengyel K, Báthori M, Kele Z, Simon A, Tóth G, Szendrei K*

Ecdysteroid containing food supplements from *Cyanotis arachnoidea* on the European market: evidence for spinach product counterfeiting. *Sci Rep*, **2016**, 6: 37322.

IF: 4,259; D1; Hiv:12

II. Ecdiszteroidok oxidatív és fotokémiai átalakítása (2. TÉZIS)

S3. Issaadi M, Csábi J, Hsieh TJ, Gáti T, Tóth G, **Hunyadi A***

Side-chain cleaved phytoecdysteroid metabolites as activators of Protein Kinase B. *Bioorg Chem*, **2019**, 82, 405-413.

IF=4,831; Q1; Hiv: 2

S4. Issaadi HM, **Hunyadi A***, Németh K*

Capillary electrophoresis study on the base-catalysed formation of bioactive oxidized metabolites of 20-hydroxyecdysone. *J Pharm Biomed Anal*, **2017**, 146, 188-194

IF=2,831; Q1; Hiv: 1

S5. Gáti T, Simon A, **Hunyadi A**, Csábi J, Kele Z, Tóth G.*

New ring-rearranged metabolite of 20-hydroxyecdysone obtained by base-catalyzed auto-oxidation. *Magn Reson Chem*, **2016**, 54, 391-395.

IF: 1,601; Q2; Hiv: -

S6. Csábi J, Hsieh TJ, Hasanpour F, Martins A, Kele Z, Gáti T, Simon A, Tóth G, **Hunyadi A***

Oxidized Metabolites of 20-Hydroxyecdysone and their Activity on Skeletal Muscle Cells: Preparation of a Pair of Desmotropes with Opposite Bioactivities. *J Nat Prod* **2015**, 78, 2339-2345.

IF: 3,662; D1; Hiv: 5

S7. Lai WC, Dankó B, Csábi J, Kele Z, Chang FR, Pascu ML, Gáti T, Simon A, Amaral L, Tóth G*, **Hunyadi A***

Rapid, Laser-Induced Conversion of 20-Hydroxyecdysone – a Follow-up Study on the Products Obtained. *Steroids* **2014**, 89:56-62.

IF: 2,639; Q2; Hiv: 4

III. Apoláris ecdiszteroid származékok előállítása és vizsgálata (3. TÉZIS)

S8. Vágvölgyi M, Béltéky P, Bogdán D, Nové M, Spengler G, Latif AD, Zupkó I, Gáti T, Tóth G, Kónya Z, **Hunyadi A***

Squalenoylated Nanoparticle Pro-Drugs of Adjuvant Antitumor 11 α -Hydroxyecdysteroid 2,3-Acetonides Act as Cytoprotective Agents Against Doxorubicin and Paclitaxel. *Frontiers Pharmacol*, **2020**, 11, 552088.

IF=4,225; Q1; Hiv: -

S9. Vágvölgyi M, Martins A, Kulmány Á, Zupkó I, Gáti T, Simon A, Tóth G, **Hunyadi A***

Nitrogen-containing ecdysteroid derivatives vs. multi-drug resistance in cancer: Preparation and antitumor activity of oximes, oxime ethers and a lactam. *Eur J Med Chem* 144:730-739 (2018)

IF=4,833; Q1; Hiv: 8

* Levelező szerző

¹ A WoS JCR 2021.04.08-án elérhető adatai alapján, a megjelenés évét figyelembe véve

² A ScimagoJR adatai alapján, a megjelenés évét figyelembe véve

³ Független idézettség 2021.03. 18-ig rögzített mtmt adatok alapján, disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül

- S10.** Fumagalli G, Giorgi G, Vágvölgyi M, Colombo E, Christodoulou M, Collico V, Prosperi D, Dosio F, **Hunyadi A**, Montopoli M, Hyraci M, Silvani A, Lesma G, Dalla Via L*, Passarella D*
Heteronanoparticles by self-assembly of ecdysteroid and doxorubicin conjugates to overcome cancer resistance. *ACS Med Chem Lett*, **2018**, 9, 468-471.
IF=3,737; Q1; Hiv: -
- S11.** Bogdán D, Haessner R, Vágvölgyi M, Passarella D, **Hunyadi A**, Gáti T, Tóth G*
Stereochemistry, and complete ^1H and ^{13}C NMR signal assignment of C-20-oxime derivatives of posterone 2,3-acetonide in solution state. *Magn Reson Chem*, **2018**, 56, 859-866.
IF=1,731; Q2; Hiv: -
- S12.** **Hunyadi A***, Csábi J, Martins A, Molnár J, Balázs A, Tóth G
Backstabbing P-gp: side-chain cleaved ecdysteroid 2,3-dioxolanes hyper-sensitize MDR cancer cells to doxorubicin without efflux inhibition. *Molecules*, **2017**, 22, 199.
IF=3,098; Q1; Hiv: 8
- S13.** Müller J, Martins A, Csábi J, Fenyvesi F, Könczöl A, **Hunyadi A***, Balogh GT*
BBB Penetration-targeting Physicochemical Lead Selection: Ecdysteroids as Chemo-sensitizers Against CNS Tumors. *Eur J Pharm Sci* **2017**, 96, 571–577.
IF=3,466; Q1; Hiv: 7
- S14.** Balázs A, **Hunyadi A**, Csábi J, Tillekeratne LMV, Martins A, Tóth G*
New cyclic 2,3-sulfite ester derivatives of poststerone – Discriminating diastereomers and probing spatial proximities by NMR and DFT. *Magn Reson Chem*, **2017**, 55, 1102-1107.
IF=1,776; Q2; Hiv: 4
- S15.** Csábi J, Martins A, Sinka I, Csorba A, Molnár J, Zupkó I, Tóth G, Tillekeratne LMV, **Hunyadi A***
Synthesis and *in vitro* evaluation of the antitumor potential and chemo-sensitizing activity of fluorinated ecdysteroid derivatives. *MedChemComm*, **2016**, 7: 2282-2289.
IF=2,608; Q1; Hiv: 4
- S16.** Martins A, Sipos P, Dér K, Csábi J, Miklos W, Berger W, Zalatnai A, Amaral L, Molnár J, Szabó-Révész P, **Hunyadi A***
Ecdysteroids sensitize MDR and non-MDR cancer cell lines to doxorubicin, paclitaxel, and vincristine but tend to protect them from cisplatin. *Biomed Res Int* **2015**, ID 895360, 8 p.
IF=2,134; Q2; Hiv: 6
- S17.** Martins A*, Csábi J, Kitka D, Balázs A, Amaral L, Molnár J, Simon A, Tóth G, **Hunyadi A***
Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Novel Ecdysteroid Dioxolanes as MDR Modulators in Cancer. *Molecules* **2013**, 18, 15255-15275.
IF=2,095; Q1; Hiv: 5
- S18.** Martins A, Tóth N, Ványolós A, Béni Z, Zupkó I, Molnár J, Báthori M, **Hunyadi A***.
Significant activity of ecdysteroids on the resistance to doxorubicin in mammalian cancer cells expressing the human ABCB1 transporter. *J Med Chem* **2012**, 55, 5034-5043.
IF=5,614; D1; Hiv: 19

IV. Protoflavon származékok előállítása és vizsgálata (4. TÉZIS)

- S19.** Vágvölgyi M, Girst G, Kúsz N, Ötvös SB, Fülöp F, Hohmann J, Servais JY, Seguin-Devaux C, Chang FR, Chen MS, Chang LK, **Hunyadi A***
Less Cytotoxic Protoflavones as Antiviral Agents: Protoapigenone 1'-O-isopropyl ether Shows Improved Selectivity Against the Epstein-Barr Virus Lytic Cycle. *Int J Mol Sci*, **2019**, 20, 6269. IF=4,556; Q1; Hiv: 1
- S20.** Dankó B, Tóth S, Martins A, Vágvölgyi M, Kúsz N, Molnár J, Chang FR, Wu YC, Szakács G, **Hunyadi A***
Synthesis and SAR Study of Anticancer Protoflavone Derivatives: Investigation of Cytotoxicity and Interaction with the ABCB1 and ABCG2 Multidrug Efflux Transporters. *ChemMedChem*, **2017**, 12: 850-859. IF=3,009; D1; Hiv: 5
- S21.** Stanković T, Dankó B, Martins A, Dragoj M, Stojković S, Isaković A, Wang HC, Wu YC, **Hunyadi A**, Pešić M*. Lower capacity of multidrug-resistant cancer cells to manage oxidative stress confers collateral sensitivity to protoflavone derivatives. *Cancer Chemother Pharmacol* **2015**, 76, 555-565. IF=2,824; Q1; Hiv: 5
- S22.** **Hunyadi A***, Martins A, Danko B, Chuang DW, Trouillas P, Chang FR, Wu YC, Falkay G
Discovery of the first non-planar flavonoid that can strongly inhibit xanthine oxidase: Protoapigenone 1'-O-propargylether. *Tetrahedron Lett*, **2013**, 54, 6529-6532. IF=2,391; Q2; Hiv: 10
- S23.** Danko B, Martins A, Chuang DW, Wang HC, Amaral L, Molnar J, Chang FR, Wu YC*, **Hunyadi A***
Cytotoxic activity of novel protoflavone analogs – selectivity towards a multidrug resistant cancer cell line. *Anticancer Res.* **2012**, 32, 2863-2870. IF=1,713; Q2; Hiv: 6
- S24.** **Hunyadi A**, Chuang DW, Danko B, Chiang MY, Lee CL, Wang HC, Wu CC, Chang FR*, Wu YC*
Direct Semi-synthesis of the Anticancer Lead-drug Protoapigenone from Apigenin, and Synthesis of Further New Cytotoxic Protoflavone Derivatives. *PLoS ONE* **2011**, 6, e23922. IF=4,092; D1; Hiv: 8

V. A kémiai tér antioxidáns inspirált kiterjesztése (5. TÉZIS)

- S25.** Fási L, Latif AD, Zupkó I, Lévai S, Dékány M, Béni Z, Könczöl Á, Balogh GT*, **Hunyadi A***
AAPH or Peroxynitrite-Induced Biorelevant Oxidation of Methyl Caffeate Yields Potent Antitumor Metabolite. *Biomolecules*, **2020**, 10, 1537. IF=4,082; Q1; Hiv: -
- S26.** **Hunyadi A***
The mechanism(s) of action of antioxidants: from scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the generation of bioactive secondary metabolites. *Med Res Rev*, **2019**, 39, 2505-2533. IF=9.300; D1; Hiv: 16
- S27.** Fási L, Di Meo F, Kuo CY, Stojkovic Buric S, Martins A, Kúsz N, Béni Z, Dékány M, Balogh GT, Pesic M, Wang HC, Trouillas P, **Hunyadi A***
Antioxidant-inspired drug discovery: antitumor metabolite is formed in situ from a hydroxycinnamic acid derivative upon free radical scavenging. *J Med Chem*, **2019**, 62, 1657-1668. IF=6.205; D1; Hiv: 10

Összesen: IF=95,753; Hiv: 150

Az értekezés témájával szorosan összefüggő, de annak alapját nem képező saját közlemények

Ekdiszteroidokhoz kapcsolódó egyéb saját közlemények (1-3. Tézis)

- SR1.** Csábi J, Rafai T, **Hunyadi A***, Zádor E*
Poststerone increases muscle fibre size partly similar to its metabolically parent compound, 20-hydroxyecdysone. *Fitoterapia*, **2019**, 134, 459-464. IF=2,527
- SR2.** Hornok S*, Csorba A, Kováts D, Csörgő T, **Hunyadi A***
Ecdysteroids are present in the blood of wild passerine birds. *Sci Rep*, **2019**, 9, 17002. IF=3,998
- SR3.** Kalász H, **Hunyadi A**, Tekes K, Dolesal R, Karvaly G
HPLC Analysis and Blood-Brain Penetration of 20-Hydroxyecdysone Diacetone. *Acta Chromatogr*, **2017**, 29, 375-383. IF=0,773
- SR4.** Hornok S, Kováts D, Flaisz B, Csörgő T, Könczöl Á, Balogh GT, Csorba A, **Hunyadi A**
An unexpected advantage of insectivorous: insect moulting hormones ingested by song birds affect their ticks. *Sci Rep*, **2016**, 6, 23390. IF: 4,259
- SR5.** Balázs A, **Hunyadi A**, Csábi J, Jedlinszki N, Martins A, Simon A, Tóth G
¹H and ¹³C NMR investigation of 20-hydroxyecdysone dioxolane derivatives, a novel group of MDR modulator agents. *Magn Reson Chem*, **2013**, 51, 830-836. IF: 1,559
- SR6.** **Hunyadi A**, Danko B, Boni M, Militaru A, Alexandru T, Nastasa V, Andrei IR, Pascu ML, Amaral L
Rapid, laser-induced conversion of 20-hydroxyecdysone and its diacetone – experimental set-up of a system for photochemical transformation of bioactive substances. *Anticancer Res*. **2012**, 32, 1291-1298. IF: 1,713
- SR7.** Tóth N, **Hunyadi A**, Báthori M, Zádor E
Phytoecdysteroids and Vitamin D Analogues – Similarities in Structure and Mode of Action. *Curr Med Chem* **2010**, 17, 1974-1994. IF: 4,630
- SR8.** Báthori M, Tóth N, **Hunyadi A**, Márki Á, Zádor E
Phytoecdysteroids and Anabolic-Androgenic Steroids – Structure and Effects on Humans. *Curr Med Chem* **2008**, 15, 75-91. IF: 4,823

Protoflavonoidokhoz kapcsolódó egyéb saját közlemények (4. Tézis)

- SR9.** Latif AD, Jernei T, Podolski-Renić A, Kuo CY, Vágvolgyi M, Girst G, Zupkó I, Develi S, Ulukaya E, Wang HC, Pešić M, Csámpai A*, **Hunyadi A***
Protoflavone-Chalcone Hybrids Exhibit Enhanced Antitumor Action Through Modulating Redox Balance, Depolarizing the Mitochondrial Membrane, and Inhibiting ATR-Dependent Signaling. *Antioxidants*, **2020**, 9, 519. IF=5,014
- SR10.** Csekés E, Vágvolgyi M, **Hunyadi A**, Račková L
Protoflavones in melanoma therapy: Prooxidant and pro-senescence effect of protoapigenone and its synthetic alkyl derivative in A375 cells. *Life Sci*, **2020**, 260, 118419. IF=3,647
- SR11.** Latif AD, Gonda T, Vágvolgyi M, Kúsz N, Kulmány Á, Ocsovszki I, Zomborszki ZP, Zupkó I*, **Hunyadi A***
Synthesis and In Vitro Antitumor Activity of Naringenin Oxime and Oxime Ether Derivatives. *Int J Mol Sci*. **2019**, 20, pii: E2184. IF=4,556

- SR12.** Ötvös SB*, Vágvölgyi M, Girst G, Kuo CY, Wang HC, Fülöp F*, **Hunyadi A***
 Synthesis of Non-Toxic Protoflavone Derivatives through Selective Continuous-Flow Hydrogenation of the Flavonoid B-Ring. *ChemPlusChem*, **2018**, 83,72-76. IF=3,441
- SR13.** Ricci F, Carrassa L, Christodoulou MS, Passarella D, Michel B, Benhida R, Martinet N, **Hunyadi A**, Ioannou E, Roussis V, Musso L, Dallavalle S, Silvestri R, Westwood N, Mori M, Ingallina C, Botta B, Kavetsou E, Detsi A, Majer Z, Hudecz F, Bosze S, Kaminska B, Hansen TV, Bertrand P, Athanassopoulos CM, Damia G
 A high-throughput screening of a chemical compound library in ovarian cancer stem cells. *Comb Chem High Throughput Screen.* **2018**, 21, 50-56. IF=1.503
- SR14.** **Hunyadi A***, Martins A, Danko B, Chang FR, Wu YC*
 Protoflavones: a class of unusual flavonoids as promising novel anticancer agents. *Phytochem Rev* **2014**, 13:69-77. IF: 2.407
- SR15.** Poór M, Li Y, Kunsági-Máté S, Varga Z, **Hunyadi A**, Dankó B, Chang FR, Wu YC, Kőszegi T
 Protoapigenone derivatives: albumin binding properties and effects on HepG2 cells. *J Photochem Photobiol B* **2013**, 124, 20–26. IF: 2.803
- SR16.** Wang HC, Lee AYL, Chou WC, Wu CC, Tseng CN, Liu KYT, WL, Chang FR, Chuang DW, **Hunyadi A**, Wu YC
 Inhibition of ATR-Dependent Signaling by Protoapigenone and Its Derivative Sensitizes Cancer Cells to Interstrand Cross-link-Generating Agents In Vitro and In Vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, 11, 1443-1453. IF=5.599
- SR17.** Tung CP, Chang FR, Wu YC, Chuang DW, **Hunyadi A**, Liu ST
 Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by protoapigenone. *J Gen Virol* **2011**, 92, 1760-1768. IF: 3.363

1. BEVEZETÉS – TERMÉSZETES ANYAGOK A GYÓGYSZERKUTATÁSBAN

A természetes anyagok, és ezen belül is elsősorban a növényi másodlagos anyagcseretermékek egy a kismolekulás felfedező gyógyszerkutatás szempontjából privilegizáltak, különösen értékesnek tekinthető kémiai teret jelölnek ki.^[1] Változatos farmakológiai célpontokat befolyásoló, nagy jelentőségű gyógyszervegyületeink származnak közvetlenül a természetből: a penicillin és számos egyéb antibiotikum, a morfin, kinin, pilokarpin, atropin csak néhány önkényesen kiragadott, közismert példa. Különösen nagy számban találhatunk a természetből izolált tumorelles gyógyszervegyületeket, mint a paklitaxel (Taxol),^[2] doxorubicin,^[3] Vinca alkaloidok (vinblasztin, vinkrisztin),^[4] és az ipari forrásnövényének felfedezése révén a szegedi Farmakognóziai Intézethez^[5] is kötődő ingenol 3-angelát.^[6] A tradicionális kínai medicina eszköztáraként legalább 1700 éve lázcsillapítóként használt egynyári ürömből (*Artemisia annua*) az antimaláriás hatású artemizinin felfedezését,^[7] és az annak köszönhető terápiás paradigmaváltást 2015-ben orvosi-élettani Nobel-díjjal ismerték el.^[8]

A fenti jól ismert példától elvonatkoztatva a természetes anyagokra általánosságban is jellemző a nagy gyógyszerkutatási jelentőség. Ez több tényezőre vezethető vissza. Egy a vonatkozó szakirodalomban gyakran felbukkanó, első ránézésre talán filozofikusnak tűnő, de valójában nagyon is gyakorlatias magyarázat szerint ezek az anyagok a növényvilág evolúciója során arra a célra fejlődtek ki, hogy a növények élő és élettelen környezetéhez való adaptációját elősegítsék. A növényt körülvevő élő környezet (patogének, kártevők, szimbiózisban élő mikro- és makroorganizmusok, beporzást végző rovarok, magokat terjesztő magasabb rendű állatok stb.) a növény élet- és reprodukciós lehetőségeit folyamatosan és alapvetően meghatározza, s az ehhez a környezethez való proaktív, kismolekulás anyagcseretermékek segítségével való megfelelő adaptációhoz hatékony kémiai információátvitelre van szükség. Nem meglepő tehát, hogy az állatvilág (és természetesen az ember) kismolekulás anyagokkal befolyásolható biokémiai jelátviteli rendszereinek nagyon jelentős részére találhatunk azokon valamilyen módon hatást kifejtő növényi anyagokat. Mivel ezen jelátviteli rendszerek között nagy számban találhatók a gyógyszerelés szempontjából is számításba jöhető célpontok, a „fűben-fában orvosság” közismert népi bölcsessége ilyen alapon is értelmezhető.

A fentiek mellett fontos megjegyezni, hogy a bioszintetikus előállítás jellegzetességeinek köszönhetően a természetes, másodlagos anyagcseretermékek kemodiverzitása egy kiralitáscentrumokban, változatos, összetett gyűrűrendszerekben és poláris szubsztituensekben rendkívül gazdag kémiai teret jelöl ki. Ezen tulajdonságok kialakítása mindmáig jelentős

kihívást jelent a bioaktív anyagok klasszikus szintetikus kémiai módszerekkel való előállításában.^[9] Nem meglepő tehát, hogy az ismert természetes anyagok és a tisztán szintetikus, leginkább kombinatorikus kémiai megközelítéssel létrehozott nagy vegyülettárak által elfoglalt kémiai tér szegmensek csak részben fednek át, és számos, farmakológiai tulajdonságokat alapvetően meghatározó fizikai-kémiai jellemző (pl. méret, flexibilitás, polaritás, aromaticitás, heteroatomok típusa és száma) szempontjából is markánsan és szisztematikusan eltérnek.^[10-12]

A természetes anyagok gyógyszerkutatási potenciálját jól illusztrálja a Newman és Cragg nevével fémjelzett összefoglaló cikkek sorozata, amelynek hatodik, legújabb kiadása az 1981. január 1. és 2019. szept. 30. között világszerte (elsőként) törzskönyvezett, összesen 1881 originális gyógyszervegyületet osztályozza eredet és terápiás cél szerint.^[1] A mintegy 1394 kismolekulás gyógyszervegyületből a tisztán természetes anyagok részaránya 5,1% (+1% standardizált növényi kivonat), amely talán nem tűnik olyan soknak, ugyanakkor kismolekulás gyógyszereink több, mint fele természetes eredetű vagy természetes farmakofórt tartalmaz, és közel 70%-ban természetes anyagokkal hozhatók kapcsolatba, legalább ötletadóként.^[1]

Ez az összegzés ugyanakkor azt is jól mutatja, hogy míg a fent említett evolúciós szelekció nyilvánvalóan hatékony kémiai eszköztárral látta el a növényvilágot a környezethez való adaptáció elősegítésére, ezen anyagok leginkább fizikai-kémiai (farmakokinetikai), farmakológiai és/vagy toxikológiai tulajdonságaik optimalizálását követően válnak a modern terápiában is alkalmazhatóvá. Ez a megfontolás volt az alapja a jelen értekezésben bemutatott kísérletes munkának, amely a klasszikus, természetes forrásból izolált növényi vegyületeket alapul véve változatos kémiai megközelítések segítségével igyekezett új, félszintetikus, vagy egy jól meghatározott természetes farmakofór által inspirált totálszintetikus bioaktív anyagok előállításával bővíteni a jelenleg lefedett kémiai teret.

2. CÉLKITŰZÉS

A fentieknek megfelelően az értekezésben bemutatott munka célja bioaktív természetes és/vagy fél-szintetikus anyagok diverzitás-orientált előállítása és vizsgálata volt. A kutatási stratégiát egy-egy jól definiált természetes anyag csoport köré építettük, oly módon, hogy a modern elválasztástechnikai módszerek alkalmazását a szintetikus kémia eszköztárával ötvözve minél nagyobb kémiai-farmakológiai változatosságot érjünk el.

Ezt a változatosságot a három alapul vett természetes anyagcsoport diverzitása, illetve származékaik lehetséges diverzitása volt hivatott megalapozni. Ezek az anyagcsoportok az alábbiak voltak: 1) egy királis információban gazdag, merev alapvázú, rendkívül gazdagon funkcionálizálható, és a természetben eleve nagy kémiai diverzitással jelen levő terpenoid család, az ún. ekdiszteroidok; 2) egy ritka flavonoid csoport, az ún. protoflavonoidok, amelyek szokatlan helyzetben megtört síkú térszerkezettel, és nem aromás, illetve sok esetben részben vagy teljesen telített B-gyűrűvel jellemezhetőek, ezáltal funkcionálizálhatóságuk messze túlmutat a klasszikus flavonoidokén; végül pedig, egy lehetséges új gyógyszerkutatási stratégia perspektívájának „proof-of-concept” jellegű vizsgálataként 3) önmagukban egyszerű, de oxidatív átalakulásokkal változatos szerkezeteket kialakítani képes hidroxifahéjsav származékok.

A felsorolt három anyagcsoport kémiai terének bővítéséhez természetes anyag izolálást, fél-szintetikus átalakításokat, és totálszintetikus megközelítést is igénybe vettünk, és az alábbi specifikus célokat tűztük ki.

- **Növényi és fél-szintetikus ekdiszteroidok előállítása és vizsgálata.** Célul tűztük ki egy bőséges fitoekdiszteroid nyersanyagforrás, a világszerte forgalmazott ekdiszteroid-tartalmú étrend-kiegészítők egyik fő forrásául szolgáló *Cyanotis arachnoidea* tartalomanyagainak kémiai vizsgálatát (1. Tézis), s az ebből nyert alapvegyületekből potenciálisan anabolikus és/vagy antidiabetikus hatású oxidált származékok (2. Tézis), ill. apoláris csoportokkal szubsztituált, antitumor hatású származékok (3. Tézis) előállítását. A preparatív kémiai jellegű munka mellett célunk volt továbbá a farmakológiai vizsgálatok eredményeinek komplex kiértékelésében való aktív részvétel, amely a 3. Tézis esetében a nyers adatok feldolgozását is magába foglalta, valamint a szerkezet-hatás összefüggések feltérképezése.
- **Protoflavon származékok előállítása és vizsgálata.** Célul tűztük ki bioaktív, nem aromás B-gyűrűvel rendelkező protoflavonoidok és származékaik fél- és/vagy totálszintetikus

előállítását, az anyagok antitumor és egyéb biológiai hatásainak vizsgálatát és a szerkezet-hatás összefüggések feltérképezését (4. Tézis).

- **Oxidált antioxidáns metabolitok előállítása és vizsgálata.** Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy reaktív oxigén és/vagy nitrogén fajták befogásával keletkező antioxidáns metabolitoknak lehet-e gyógyszerkutatási szempontból jelentősége. Ezt az összetett kémiai-farmakológiai kérdést hidroxifahéjsav származékok, mint modellvegyületek segítségével vizsgáltuk (5. Tézis).

Valamennyi, de különösen az első és harmadik célkitűzés esetén olyan megközelítést alkalmaztunk, amelyben a kémiai átalakítások elsődleges célja a kémiai tér bővítése, a változatosság növelése volt. Ilyen értelemben a reakciók szelektivitása sok esetben másodlagos szempont, sőt adott esetben akár részben nemkívánatos is volt: terveink között szerepelt több olyan, előreláthatóan összetett termékprofilt eredményező átalakítás elvégzése is, amelyek a termékek izolálását követően változatos farmakológiai információ kinyerését tették lehetővé. Fontosnak érzem kihangsúlyozni, hogy az anyagok döntő többségének előállítása kifejezetten bioaktivitásuk vizsgálatának céljából történt, és a többnyire kutatási együttműködésben végzett farmakológiai vizsgálatok megtervezésében és/vagy értékelésében sok esetben magam is tevékenyen részt vettem. Ennek megfelelően a kutatócsoportunkban végzett kémiai munka eredményeinek bemutatása és megbeszélése mellett igyekeztem az értekezésben a farmakológiai vonatkozásokat is jelentőségüknek megfelelően tárgyalni.

Eredményeinket a fent említett három fő kémiai megközelítés szerint csoportosítva mutatom be.

3. ANYAGOK ÉS MŰSZERES HÁTTÉR

A bemutatott eredmények három, jól elkülöníthető természetes anyag csoport változatos kémiai megközelítésekkel való előállításán és sokrétű farmakológiai vizsgálatán alapulnak, ezért a módszerek külön fejezetben való részletes bemutatása szétfeszíteni az értekezés terjedelmi kereteit. A munka bemutatása során arra törekedtem, hogy lehetőség szerint az ábrafeliratokban, ill. helyenként a szövegben adjak tömör összefoglalást az egyes anyagcsoportok előállításának és vizsgálatának körülményeiről, és az alkalmazott módszerekről. Ezt kiegészítendő, az alábbiakban a kiindulási anyagok, és a belőlük nyert termékek előállítására és vizsgálatára felhasznált műszeres háttér rövid bemutatására szorítkozom.

Az 1-3. Tézis analitikai és preparatív kémiai munkájának alapjául szolgáló, a *Cyanotis arachnoidea* kivonataiként értékesített növényi kivonatokat két forrásból szereztük be. Az E1 kivonatot (deklarált 20E tartalom HPLC alapján 95%) a Shaanxi KingSci Biotechnology Co., Ltd. (Shanghai, Kína), az E2 kivonatot (deklarált 20E tartalom UV alapján 50%) a Xi'an Olin Biological Technology Co., Ltd. (Xi'an, Kína) szolgáltatta. Az 1. Tézisben vizsgált étrendkiegészítőket a VerdeVital Beratungs-, Import und Vertriebsgesellschaft mbH (Bovenden, Németország) gyártotta 2013-ban, a termékek neve és a dobozokon feltüntetett tétel azonosítójuk a következő: VerdeFit (L13761012), VerdeKlimEx (L09760711), VerdeDry (L09810711), VerdeOs (L09800711) és VerdeArthroSan (L00250113). Az 1. Tézis folyadék-folyadék kromatográfiás módszerfejlesztését az E2 kivonat egy frakciójából, a 20E valamennyi félszintetikus módosítását (2-3. Tézis) pedig az E1 kivonat etilacetát:metanol/2:1 térfogatarányú elegyből való átkristályosításával nyert tiszta anyagból végeztük. A 2-3. Tézisben rövidítéssel jelzett, nem a jelen munka keretében előállított ekdiszteroidokat kutatócsoportunk korábbi fitokémiai munkája során nyertük *Serratula* (zsoltina),^[13, 14] *Ajuga* (ínfű),^[15] vagy *Silene* (habszegfű)^[16-18] fajokból.

A 4. Tézisben bemutatott munkához a 4'-hidroxiflavonokat az Indofine Chemical Company Inc. (Hillsborough, NJ, USA) szolgáltatta, a 4-5. Tézisben bemutatott szintetikus kémiai munkához a vegyszereket és reagenseket a Sigma-Aldrich-től szereztük be.

Az 5. Tézis antioxidáns alapvegyületeit (metil-*p*-kumarát és metil-kaffeát) részben a Sigma-Aldrich-től szereztük be, részben magunk is előállítottuk *p*-kumársav kénsavas közegben metanollal való észterezéssel, ill. kávésavból Dowex kationcserélő gyanta, mint környezetbarát katalizátor felhasználásával.^[19]

Az előállított anyagok kromatográfiás elválasztását változatos analitikai és preparatív módszerekkel végeztük. Analitikai célra rétegekromatográfiát, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC; Jasco gradiens rendszer: PU2080 pumpák, AS-2055Plus automata injektor és MD-2010 Plus diódasoros detektor, Jasco, Tokió), és szuperkritikus fluid kromatográfiát (SFC; Jasco gradiens rendszer: PU-4386 és PU-4086 pumpák, AS-4350 SFC automata injektor, CO4060 oszloptermosztát, BP-4340 háttérnyomás-szabályzó) használtunk. A preparatív célra használt klasszikus oszlopkromatográfiás elválasztásokat poliamid, szilika, vagy oktadecilszilika állófázisokon végeztük. Preparatív kromatográfiás célra a következő készülékeket használtuk: flash kromatográfia (Biotage Flash+, Biotage, Uppsala, Svédország, vagy CombiFlash® Rf+ Lumen, TELEDYNE Isco, Lincoln, NE, USA), centrifugális megoszlásos kromatográfia (CPC; Armen Spot CPC 250 mL, Armen Instrument, Saint Ave, Franciaország), és preparatív HPLC (a fent említett SFC készülék HPLC módban való felhasználásával, vagy a CPC készülék pumpáját, detektorát és frakciószedőjét HPLC rendszerként alkalmazva).

Az előállított anyagok tömegspektrumait egy API 2000 hármas kvadrupól tandem tömegspektrométerrel (AB SCIEX, Foster City, CA, USA), vagy egy Waters Acquity I-Class UHPLC (Waters Co., Milford, MA, USA) rendszerhez kapcsolt, HESI ionforrással felszerelt Thermo Scientific Q Exactive Plus Orbitrap tömegspektrométerrel (Thermo Fisher Scientific, Scoresby, Ausztrália) vettük fel.

Az előállított anyagok szerkezetfelderítését mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) segítségével végeztük. Az 1-3. Tézisben bemutatott, jelen munka során előállított ekdiszteroidok szerkezetvizsgálatát Prof. Tóth Gáborral (BME Szervetlen és Analitikai Kémiai Intézet, Budapest) együttműködésben végeztük, ezen munka során egy Bruker Avance 500 NMR spektrométert, a szkvalénnel konjugált ekdiszteroidok teljes jelhozzárendelésének eléréséhez pedig kriogén mérőfejjel ellátott Bruker Avance III (500, 800, vagy 950 MHz) spektrométereket használtunk.

A 4-5. Tézisben bemutatott anyagok NMR spektrumait egy Bruker Avance DRX-500, vagy egy kriogén mérőfejjel ellátott Bruker Avance NEO 500 MHz spektrométerrel vettük fel.

4. EKDISZTEROIDOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA

4.1. AZ EKDISZTEROIDOK ELŐFORDULÁSA, KÉMIÁJA ÉS FARMAKOLÓGIÁJA

Az ekdiszteroidok a természetes szteroidok egyik, ha nem a legnépesebb csoportja. Felfedezésük a XX. század második fele természetes anyag kémiájának egyik szenzációja volt: 1954-ben Butenandt és Karlson a korabeli elválasztástechnika csúcsteljesítményeként 500 kg selyemhernyó báb feldolgozásával nyert ki mindössze 25 mg rovar vedlési hormont, amelyet az „ecdysis” (=vedlés, lat.) kifejezés nyomán ekdizonnak neveztek el.^[20] Kb. egy évtizeddel később fedezte fel Nakanishi kutatócsoportja egy rokon szerkezetű vegyület, a ponaszteron A jelentős mennyiségének jelenlétét a Tajvanon gyűjtött *Podocarpus nakaii* nevű növény levelében, ami egy addig kifejezetten specifikus állati hormonnak tartott vegyület növényi előfordulását jelentette.^[21] Ezután sorra jelentek meg a rendkívül változatos szerkezetű, és a rovarokban mértnél nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben előforduló növényi ekdiszteroidokat leíró közlemények. Mára nyilvánvaló, hogy ezek az anyagok a növényvilágban rendkívül elterjedtek, magasabb rendű növények mellett egyes algákban, sőt gombákban is előfordulnak. Ekdiszteroidokban különösen gazdag növénycsaládok pl. az Asteraceae (pl. *Serratula*,^[13, 14, 22] *Leuzea* fajok^[23, 24]), Lamiaceae (pl. *Ajuga* fajok^[15, 25, 26]), Caryophyllaceae (pl. *Silene* fajok^[16, 27]), és Commelinaceae (pl. *Cyanotis* fajok^[28, 29]). Dinan szerint valószínűsíthető, hogy az ekdiszteroid bioszintézisre való képesség a növényvilágban genotípus szintjén általános jelenség, amely képességet „nem ekdiszteroid-tartalmú” növényekben is fel lehet ébreszteni megfelelő környezeti stresszhatásokkal.^[30]

A növényi ekdiszteroidok szerkezeti változatosságát jól illusztrálja, hogy az online elérhető ekdiszteroid adatbázis (ecdybase) legutóbbi, 2020. novemberi frissítése alapján 526 természetes ekdiszteroidot tartalmaz.^[31] Ezek az anyagok többnyire 27–29 szénatomos, többszörösen hidroxilezett (rendszerint 3–8 hidroxil-csoportot tartalmazó) szteránvázas vegyületek, ennek következtében legtöbb képviselőjük inkább hidofil, mérsékelten vízzoldékony anyag. Közös szerkezeti jellemzőjük a 7-én-6-on kromofór csoport jelenléte a szteránváz B gyűrűjében. Szerkezeti változatosságukat a szteránváz sokszínű szubsztitúciós mintázata (ideértve a hidroxilcsoportokon kapcsolódó változatos szubsztituensek, glikozid, éter-, vagy észter csoport lehetőségét), további kettőskötések kialakulása, láncrövidülés és/vagy további gyűrűzárások, ritkábban az A-B és/vagy C-D gyűrűkapcsolódás szokásostól eltérő sztereokémiája adja [SR7,SR8]. A széles szerkezeti változatossággal kapcsolatban ugyanakkor érdemes megjegyezni, hogy a növények rendszerint alig néhány fő ekdiszteroidot tartalmaznak (ezek

közül is magasan kiemelkedik a 20-hidroxiiekdizon, „béta-ekdizon, „ecdysterone”; 20E), és a komplexitás jelentős részét ún. minor ekdiszteroidok adják, amelyek mennyisége a 20E-hez képest akár 4-5 nagyságrenddel is kisebb lehet.^[32]

Az ekdiszteroidok farmakológiai szempontból is rendkívül sokoldalú vegyületek. Rovarhormon hatásuk alapján magától értetődőnek tűnhet növényvédelmi alkalmazásuk, ilyen szempontból ugyanakkor leginkább modellvegyületként váltak be; alapvetően hidrofíl természetük nem teszi lehetővé permetezőszerként való felhasználásukat.^[33] Emlősökben ugyanakkor érdekes módon nem-hormonális anabolikus [SR8], és változatos előnyös metabolikus hatásokkal, egy összességében stressztűrő-fokozó (adaptogén) hatásként jellemezhető hatásspektrummal rendelkeznek.^[32, 34, 35] Különösen az anabolikus hatás nagy tudományos, és (étrend-kiegészítőként való alkalmazásra, lásd 1. Tézis) piaci érdeklődést is kiváltott. A 20E-t jelenleg klinikai II. fázisban vizsgálják sarcopenia (jellemzően idős korban kialakuló kóros izomerő- és izomtömeg-csökkenés) kezelésére,^[36] a Nemzetközi Doppingellenes Ügynökség (World Anti-Doping Agency; WADA) pedig bevette ezt az anyagot a 2020-as ún. monitoring programjába, amely a sportteljesítmény fokozás visszaélészerű használatát figyeli, és amelyet általában a doppinglista előszobájának is tekintenek.^[37] A 20E-t változatos egyéb, általánosságban a stressztűréssel, és sejtek-szövetek védelmével összekapcsolható *in vitro* és *in vivo* farmakológiai modelleken is hatásosnak találták, leírták többek között antiapoptotikus,^[38] antioxidáns és neuroprotektív,^[39] valamint antidiabetikus^[40, 41] hatását is.

Az ekdiszteroidok emlős szervezetekben kiváltott hatásainak mechanizmusa csak részben felderített és tudományos vita tárgya. Összefüggésbe hozható lehet a D-vitamin nongenomikus hatásaival [SR7], egy G-protein kapcsolt receptor (GPCR) aktiválódásával (amely az Akt kináz Ca^{2+} -függő aktiválódásán keresztül fokozza a sejtek túlélését és a fehérjeszintézist),^[42] mások szerint pedig indirekt bizonyítékok alapján a β -ösztrogénreceptoron ($\text{ER}\beta$) kifejtett hatás a kulcs mechanizmus,^[43, 44] bár az ösztrogénreceptor kötődés vitatható.^[45] Legújabb vizsgálatok szerint (jelen sorok írása közben csak bírálaton át nem esett preprint-ként elérhető eredmények) a G-protein kapcsolt (GPCR) típusú Mas-receptor és egy plazmamembránhoz kötött ösztrogénreceptor kooperatív aktiválódása magyarázhatja a 20E változatos hatásspektrumát.^[46] Az angiotenzin-(1-7)/Mas-receptor tengely a renin-angiotenzin rendszer protektív ágát képezi, és a Mas receptor agonisták alkalmazását egy olyan új terápiás stratégiaként javasolták, amely megoldást kínálhatna a jelenleg világszerte dühöngő pandémiát kiváltó SARS-CoV-2 fertőzés fatális légzőszervi és érrendszeri tüneteinek hatékony kezeléséhez.^[47, 48] Ennek alapján a 20-

hidroxiekdizon, mint a legnagyobb mennyiségben és olcsón hozzáférhető ekdiszteroid COVID-19 betegekben való 2-es és 3-as fázisú klinikai vizsgálata megkezdődött és a jelenleg rendelkezésre álló információk szerint a résztvevők toborzása zajlik. [36, 49]

Fontos kihangsúlyozni, hogy ekdiszteroidokkal kiterjedt szerkezet-hatás összefüggéseket is feltérképező biológiai vizsgálatokat csak rovar modelleken, hormonhatás vizsgálatára végeztek. Emlős (és humán) vonatkozásban a farmakológiai vizsgálatok döntő többségének alanya a 20E, és néhány esetben egy-két nagyobb mennyiségben hozzáférhető ekdiszteroid volt. Ilyen értelemben a több, mint 500 ismert természetes (és a mások által eddig előállított fél-szintetikus) ekdiszteroid farmakológiai potenciálja gyakorlatilag teljesen feltérképezetlen.

Az ekdiszteroidok emlősökön kifejtett hatásaival, kiváltképp az anabolikus hatással kapcsolatban régóta élő felvetés volt a témát kutatók körében, hogy mi lehet ezen anyagok esetleges metabolitjainak szerepe a hatás kialakulásában. Az ekdiszteroidok metabolizmusát rágcsálókban és humán önkénteseken is vizsgálták. [34] Girault és mtsai. izolálást követően ¹H NMR alapján azonosították fehér egerekből a 20E C-14 dehidroxilezett, majd B-gyűrűn redukált 6 α -OH csoportot, és/vagy C-3 epimerizálódott származékát. [50] Az ezt követő két további vizsgálatban csak tömegspektrum alapján azonosítottak metabolitokat, s hasonló átalakulásokat, ideértve a B-gyűrű részleges, vagy teljes redukcióját, a 14-OH csoport redukatív eliminációját, és a 22-OH csoport 22,23-olefint eredményező eliminációját írták le mint lehetséges metabolikus átalakulásokat. [51, 52] Különösen érdekes egy a közelmúltban publikált tanulmány, amelynek szerzői triciált 20E-kezelt egerek vizeletéből és székletéből izoláltak metabolitokat, s azok szerkezetét behatóan tanulmányozták. A korábban is azonosított redukált származékok mellett egy oxidatív lánchasítással keletkező, a 17-es szénatomon acetilcsoportot tartalmazó ekdiszteroidot, a 21 szénatomos posztszteront mutatták ki az egyik fő metabolitként. [53] Ennek az átalakulásnak különös jelentőséget ad az, hogy a minor komponensként a növényekben is előforduló lánchrövidült ekdiszteroid származékok kémiai rokonságban állnak a neuroszteroidokkal, s az emlős szteroid hormonokhoz is közelebb állnak, mint a szterol oldallánccal rendelkező analógjaik. [54] A fent említett tanulmány szerzői ugyanakkor az előállított anyagok biológiai aktivitását nem vizsgálták. [53]

Az ekdiszteroidok összetett ökológiai szerepével kapcsolatban érdemesnek tartom megemlíteni két, a közelmúltban publikált, de jelen értekezés alapját nem képező saját munkánkat: felfedeztük, hogy rovarrevő, vadon élő énekesmadarak vérében jelentős mennyiségben, és nagy szerkezeti változatossággal halmozódnak fel ezek az anyagok, s ez összefüggést mutat a

madarakon elősködő kullancsok szokatlan, gazdaszervezeten tapasztalható vedlésével [SR2, SR4].

Összességében az ekdiszteroidok mind kémiai, mind farmakológiai szempontból sokoldalú, a természetben széles körben elterjedt anyagok, és az általuk lefedett (és különösen a lehetséges származékaik által lefedhető) kiterjedt kémiai tér tényleges farmakológiai potenciáljáról alig tudunk valamit. Ennélfogva ezek az anyagok ideális választást jelentenek egy új bioaktív anyagok felfedezésére irányuló, diverzitás alapú megközelítéssel végzett természetes anyag kutatási program célvegyületeiként. Az 1-3. Tézisben az ezzel kapcsolatos preparatív kémiai munkánk, és a kapcsolódó farmakológiai vizsgálatok eredményeit mutatom be.

4.2. KERESKEDELMI FORGALOMBAN ELÉRHETŐ EKDISZTEROID-TARTALMÚ KIVONATOK VIZSGÁLATA [S1, S2]

1. TÉZIS. Ekdiszteroid tartalmú **étrend-kiegészítők** vizsgálatával egy szokatlan **termékhamisítást** mutattunk ki: a deklarált spenót tartalom helyett *Cyanotis arachnoidea* C.B.Clarke kivonatot tartalmazó termékeket azonosítottunk, ami azt valószínűsíti, hogy ez a piac jelentős mértékben a távol-keleti *Cyanotis* kivonatok felhasználásán alapul. Kimutattuk, hogy a *Cyanotis arachnoidea* kereskedelmi forgalomban **ipari léptékben is gazdaságosan** elérhető kivonatai kiaknázhatóak különleges ekdiszteroidok gazdag forrásaiként, és/vagy ezek nagy mennyiségben való félszintetikus előállítására alkalmas **nyersanyagforrásként**. Bár számos ekdiszteroidot izoláltak *Cyanotis* fajokból, a feldolgozott kivonatok gazdag ekdiszteroid összetételüknek köszönhetően **új anyagok izolálására is** messzemenően **alkalmas** nyersanyagforrások. Az így előállított új vegyületek az ipari előállítás műtermékei is lehetnek, kémiai/farmakológiai vizsgálatuk ugyanakkor a humán felhasználásra szánt étrend-kiegészítőkben való jelenlétük miatt kiemelten fontos. Ezen munka során összesen **13 ekdiszteroid** származékot, köztük **2 új vegyületet** állítottunk elő, és **folyadék-folyadék kromatográfiás módszert** dolgoztunk ki két minor ekdiszteroid grammos léptékű preparatív elválasztására.

A tézishoz kapcsolódó közlemények:

S1, S2 (IF=2,441 + 4,259 = 6,700)

Irodalmi áttekintés az 1. Tézishez

Az ekdiszteroidok emlősökön mutatott jótékony metabolikus hatásai, ezek közül is elsősorban a nem hormonális anabolikus hatás logikusan vezetett a főként sportolóknak szánt étrend-kiegészítők tömeges megjelenéséhez és világszerte való forgalmazásához.^[45] Kutatócsoportunk jelen munkát megelőzően Prof. Báthori Mária vezetésével több évtizeden keresztül foglalkozott hazai növényfajok ekdiszteroid tartalmának vizsgálatával, amelynek során nagyszámú új fitoekdiszteroid felfedezése mellett gazdag ekdiszteroid forrásnövények azonosítása is megtörtént.^[55]

Az itt bemutatott munka egy a korábbiaktól jelentős mértékben eltérő természetes anyag kémiai megközelítést vett alapul. Egy egyszerű online kereséssel nyilvánvalóvá válik, hogy a világszerte forgalmazott ekdiszteroid tartalmú étrend-kiegészítők előállításához egy jelentős háttérpar épült ki a Távol-Keleten. Az egyik legnagyobb online értékesítő felületen cégek

százai kínálnak ekdiszteroid-gazdag növényi kivonatokat, ill. tiszta 20-hidroxiiekdizont.⁴ A hirdetésekben leggyakrabban szereplő növényfaj a *Cyanotis arachnoidea*, amelynek gyökere jelentős, akár 4-5%-ot is elérő mennyiségben tartalmaz ekdiszteroidokat.^[56] A változatos tisztaságú kivonatokból egy-egy kínai székhelyű cég akár évi több tonnás igények kiszolgálását is vállalja, van olyan cég, ahol a legkisebb rendelhető mennyiség 200 kg, s a legolcsóbb online hirdetések 1 USD/kg árat adnak meg. Ez a megdöbbentő kínálat nyilvánvalóan a kereslethez igazodik; az egyik ilyen cég közvetítőjével folytatott levelezésünkben kiderült, hogy tisztítottsági szinttől függően leginkább emberi fogyasztásra szánt (anabolikus) étrend-kiegészítők előállítására, de mezőgazdasági, ill. aquakultúrákban való felhasználásra is vásárolják ezeket a kivonatokat.

Tekintve, hogy a kiterjedt nagyüzemi előállítás és forgalmazás egyáltalán nem jelent hasonló léptékű tudományos vizsgáltságot, feltételeztük, hogy ilyen kivonatok az ekdiszteroidokkal kapcsolatos természetes anyag kémiai és/vagy farmakológiai kutatásoknak is vonzó és gazdag nyersanyagai lehetnek. Bár a *Cyanotis arachnoidea*-ból mintegy 22 ekdiszteroidot írtak le főként távol-keleti kutatócsoportok,^[28, 57-63] az ezekből fakadó kémiai-farmakológiai lehetőségek tudományos igényű vizsgálata messze nem tekinthető kimerítőnek. Mind a több kg nagyságrendben gazdaságosan hozzáférhető tiszta 20-hidroxiiekdizon (és esetleges félszintetikus származékai), mind a kevésbé tisztított kivonatokból előállítható „szennyező” minor ekdiszteroidok (és az azokból előállítható félszintetikus származékok) jelentős mértékben bővíthetik az ilyen jellegű kutatások mozgásterét. Ebből az alapvetésből kiindulva tűztük ki célul annak vizsgálatát, hogy a kereskedelmi forgalomban elérhető *Cyanotis* kivonatok nyersanyagforrásként való felhasználása alkalmas lehet-e arra, hogy kiszolgálja és/vagy új szintre emelje az ekdiszteroidokkal kapcsolatos kutatómunkánkat, és ezáltal biztosítsa a 2. és 3. Tézisben bemutatott munka nyersanyag igényét is.

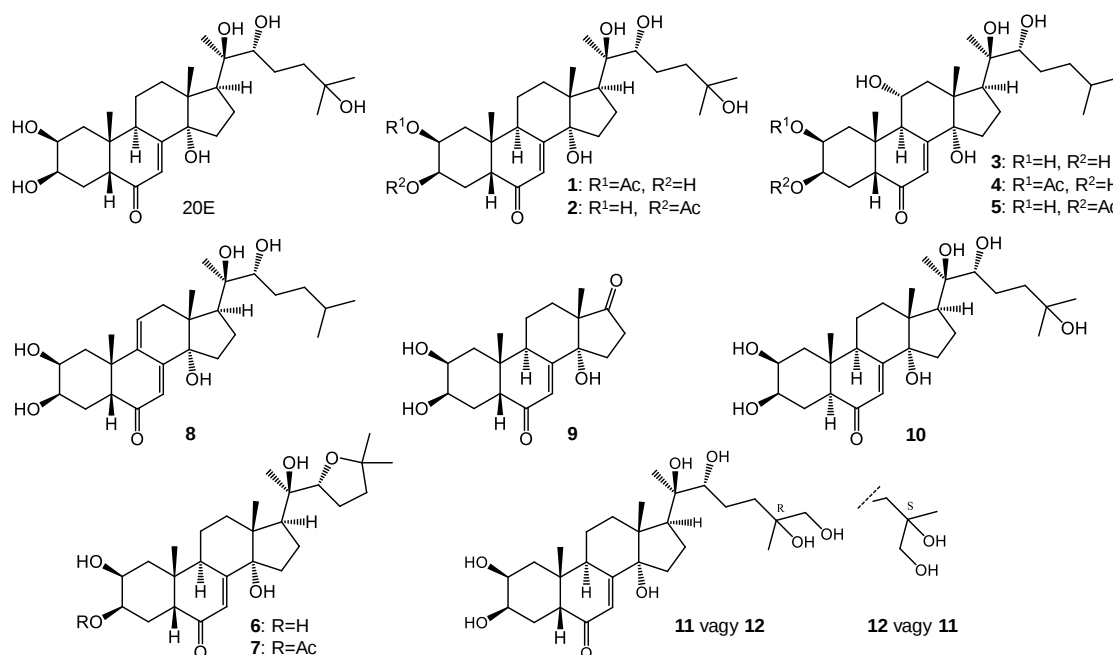
Étrend-kiegészítők vizsgálata: hogyan lesz a *Cyanotis*-ból spenót? [S2]

A *Cyanotis* kivonatok vizsgálatát célzó munka megkezdéséhez két ekdiszteroid-tartalmú kivonatot szereztünk be, 1 kg HPLC alapján 95% tisztaságúként deklarált 20-hidroxiiekdizont (E1), valamint egy 20 kg-os mintát, amelyet 50% 20-hidroxiiekdizonként árusítottak (E2). Az E1 minta saját méréseink alapján 93%, az E2 pedig mindössze kb. 15% 20-hidroxiiekdizont tartalmazott. Rétegekromatográfiás vizsgálatok alapján ugyanakkor mindkét minta „szennyezésprofilja” gazdag minor ekdiszteroid mintázatot mutatott.

⁴ https://www.alibaba.com/trade/search?fsb=y&IndexArea=product_en&CatId=&SearchText=ecdysterone (megnyitva 2020.09.30-án)

A kivonatok feldolgozása közben intézetünk emeritus professzora, Szendrei Kálmán ötlete alapján elvégeztük egy spenót kivonatként hirdetett és forgalmazott, Németországból származó étrend-kiegészítő család (VerdeFit, VerdeKlimEx, VerdeDry, VerdeOs, és VerdeArthroSan) ekdiszteroid profiljának vizsgálatát. A felvetést különösen érdekessé tette számunkra, hogy a spenót ekdiszteroid tartalmának 1982-ben való felfedezése a szegedi Farmakognóziai Intézetben az általa akkoriban létrehozott ekdiszteroid kutatócsoporthoz kötődik.^[64] Már az első rétegekromatogramok vizsgálata nyilvánvalóvá tette, hogy a készítmények a meglehetősen csekély (friss föld feletti részben 0,005–0,08%) ekdiszteroid tartalmú,^[65] ámde erősítő, roboráló hatású, egészséges ételként közismert spenót kivonatai helyett *Cyanotis* kivonatokat tartalmaznak.

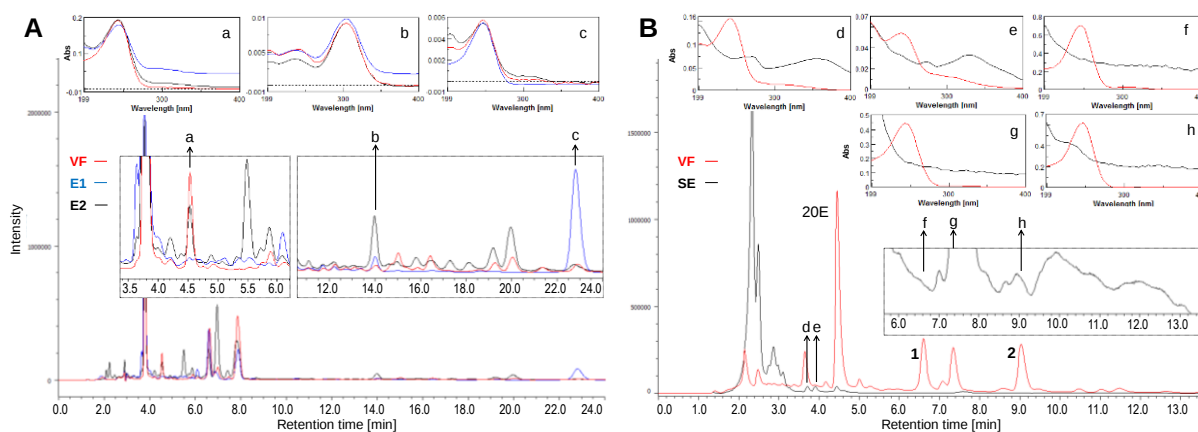
Ezt a felismerést követően a legmagasabb ekdiszteroid tartalmú készítményt (VerdeFit) komplex tisztításnak vetettük alá az ekdiszteroidok izolálása céljából. Mintegy 20 g készítményt dolgoztunk fel eltérő szelektivitású kromatográfiás módszerek egymást követő alkalmazásával; ehhez flash kromatográfiát, centrifugális rétegekromatográfiát, kristályosítást, valamint normál és fordított fázisú HPLC-t alkalmaztunk (szilika, C8, C18, és/vagy bifenil oszlopokon). Az izolált anyagok szerkezetét a 2. ábra mutatja be.



2. Ábra. A VerdeFit étrend-kiegészítő termékből izolált ekdiszteroidok. 20E: 20-hidroxiekdizon, **1**: 20E 2-acetát, **2**: 20E 3-acetát, **3**: ajugaszteron C, **4**: ajugaszteron C 2-acetát, **5**: ajugaszteron C 3-acetát, **6**: sidaszteron, **7**: sidaszteron 3-acetát, **8**: dakrihainanszteron, **9**: rubroszteron, **10**: 5 α -20E, **11** és **12**: 20,26-dihidroxiekdizon. A **11** és **12** epimereket tisztán előállítottuk és ezek NMR spektroszkópiás vizsgálat segítségével egymástól megkülönböztethetőek voltak, a 25-ös szénatom konfigurációját azonban egyik anyagnál sem határoztuk meg. A **4** és **7** vegyületek új ekdiszteroidok; természetes, vagy műtermék voltukat nem vizsgáltuk.

Ez a munka két új ekdiszteroid, az ajugaszteron C 2-acetát (4) és a sidaszteron 3-acetát (7) előállításához is vezetett. Ezek mellett számos további acetát származék, így a 20-hidroxi-ekdizon 2- és 3-acetátja (1 és 2) is jelen volt a kivonatban, ez utóbbiak fő anyagként. Fontos megjegyezni, hogy mivel egy lényegében ismeretlen körülmények között előtisztított növénykivonatról van szó, ezek természetes, vagy esetleges műtermék eredetét a klasszikus növénykémiai munkákhoz képest jóval nehezebb megítélni, és ez valamennyi ilyen módon izolált anyagra igaz.⁵ Ennél az alapkutatósi szempontból valóban fontos kérdésnél ugyanakkor lényegesebb szempont lehet az, hogy az ilyen kivonatokból előállítható anyagok végeredményben emberi fogyasztásra kerülnek. Praktikus szempontokból tehát vizsgálatuk nagy jelentőségű, függetlenül attól, hogy a növény által bioszintetizált, vagy az ipari előállítás során keletkező anyagokról van szó.

Az előállított anyagokat ezután referenciaként használtuk a termékek további HPLC analíziséhez. A 3. ábrán a VerdeFit termék és az általunk korábban beszerzett *Cyanotis* kivonatok, valamint egy a szegedi piacon beszerzett spenót minta diódasoros detektálással felvett összehasonlító ujjlenyomat kromatogramjai láthatók. Az egyes izolált anyagokat a termékcsaládban mennyiségileg is meghatároztuk, az eredményeket az 1. táblázat foglalja össze.



3. Ábra. (A) A VerdeFit (VF) készítmény (piros), az E1 *Cyanotis* kivonat kristályosítási anyalúgja (kék), és az E2 *Cyanotis* kivonat (fekete) HPLC ujjlenyomat kromatogramjai. a-c: Rt=4,53, 14,08 és 22,88 percnél felvett UV spektrumok; kromatográfiás körülmények: Kinetex Biphenyl 4,6 × 250 mm, 5 µm, 25% ACN (aq), áramlás: 1 ml/perc. **(B)** VF (piros) és egy általunk készített spenót kivonat (SE, fekete) ujjlenyomat kromatogramjai. d-h: Rt=3,72, 3,92, 6,59, 7,33 és 9,03 percnél felvett UV spektrumok; kromatográfiás körülmények: Kinetex XB-C18 4,6 × 250 mm, 5 µm, 52% MeOH (aq), áramlás: 1 ml/perc. 1: 20E 2-acetát, 2: 20E 3-acetát. VF, E1 és E2 kvalitatív ujjlenyomat kromatogramjai a minor anyagok szintjén is közel tökéletesen azonosak, míg VF és SE összehasonlításában a 20E kivételével közös komponensek nem azonosíthatóak.

⁵ Bár céljaink között ez szerepel, mindeddig sikertelenül próbálkoztunk azzal, hogy a Kínában nagyüzemi körülmények között termesztett növényből autentikus mintát szerezzünk az izolált anyagok natív voltának vizsgálatához.

1. Táblázat. A VF termékből izolált anyagok mennyiségei a spenót kivonatként forgalmazott *Cyanotis* alapú étrend-kiegészítőkben, 20E mennyiségére kalibrálva ($R^2=0.9999$). **10** és **11** szerkezete és így mennyiségeik is felcserélhetőek; *: nyomokban azonosítható. A mennyiségek meghatározása egy mérés alapján történt.[#]

Termék	20E	20E ekvivalens (m/m%)							
		1	2	4	6	8	10	11 v. 12	12 v. 11
VerdeFit (VF)	2.40	0.90	1.17	0.08	0.09	0.18	0.03	0.02	0.02
VerdeKlimEx	0.28	0.27	0.26	0.04	0.03	0.08	*	*	*
VerdeDry	0.29	0.21	0.30	0.02	0.01	0.04	*	0.07	*
VerdeOs	0.20	*	*	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02	*
VerdeArthroSan	1.11	0.30	0.41	0.03	0.04	0.07	0.02	*	*

[#] Mivel egy ismeretlen eredetű étrend-kiegészítő pontos összetétele nagyszámú ismeretlen tényezőtől (kivonási és feldolgozási módszerek, tárolási és szállítási körülmények stb.) függően tételről-tételre jelentős eltéréseket mutathat, elegendőnek ítéltük a mennyiségeket egy mérés alapján számolt két tizedes pontossággal megadni.

A fenti analízisek alapján jól látható, hogy a szűrőpróba-szerűen megvizsgált készítmény család valóban *Cyanotis* kivonatokból készült, és vélhetően egyáltalán nem tartalmaz spenótot. Ez a termékhamisítás egy szokatlan, és újszerű példája: nem szintetikummal „erősítik”, vagy helyettesítik a természetesként (tehát ártalmatlanként) hirdetett emberi fogyasztásra szánt terméket, hanem egy sokkal nagyobb hatóanyagtartalommal bíró, rendkívül olcsó, és nagy mennyiségben könnyen hozzáférhető távol-keleti ipari növény kivonatával helyettesítenek egy jól ismert, Európában időtlen idők óta fogyasztott és becsült étrendi növényt. A cél természetesen a klasszikus hamisításhoz hasonló, hiszen a spenót ekdiszteroid tartalmának ilyen mértékű dúsítása nem lenne gazdaságos. Mivel azonban az olcsó, nagy ekdiszteroid tartalmú, és így vélhetőleg sokkal hatékonyabb *Cyanotis* kivonatok Európában novel food-nak számítanak (fogyasztásuknak nincsen hagyománya, biztonságosságuk nem egyértelmű), így azokat nem lehetne legálisan emberi fogyasztásra szánt készítmények formájában forgalmazni. Fontos megjegyezni azt is, hogy míg a *Cyanotis* fajok, és főként a *C. arachnoidea* az ekdiszteroidok előállítására hasznosított ipari nyersanyagként szolgálnak, ez a növény Kínában sem az étrend része, és a Kínai Gyógyszerkönyvben sem hivatalos.⁶ A *Cyanotis* kivonatok Európában forgalmazott, esetlegesen más növényfajt (pl. spenót) forrásként deklaráló étrend-kiegészítőkben való jelenlétéről nincsenek egyértelmű további információink.⁷ Eredményeink a távol-keleti kínálat fényében mindenesetre azt sugallják, hogy ezek a kivonatok az emberi

⁶ Személyes kommunikáció, Prof. De-An Guo (Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai, Kína; a Kínai Gyógyszerkönyv 2010. kiadásának főszerkesztője), 2015.09.04.

⁷ A spenót kivonatok hamisításához egy érdekes adalék, hogy a közelmúltban egy független, német kutatóként bemutatkozó személy érdeklődött a témában publikált cikkünk [S2] kapcsán afelől, hogy vizsgáltunk-e egy másik cég által forgalmazott (és szintén spenót-kivonatként hirdetett) ekdiszteroid tartalmú étrend-kiegészítőt is, az illető kiléte ugyanakkor könnyedén lenyomozható volt a vizsgált termékek forgalmazását végző, Luxemburgban bejegyzett cég termékfejlesztőjeként.

fogyasztásra szánt ekdiszteroid készítmények piacán jelentős mértékben jelen vannak, és az egyes készítmények nem feltétlenül a fogyasztó számára kideríthető módon tartalmazzák őket.

A fentieken túlmenően a kémiai tér bővítése szempontjából különösen biztató eredmény az, hogy egy mindössze 20 g mennyiségű *C. arachnoidea* kivonat minta feldolgozásával két új ekdiszteroidot tudtunk előállítani. Ez az eredmény jól illusztrálja az ilyen kivonatok nagyléptékű feldolgozásában rejlő természetes anyag kémiai lehetőségeket.

Minor fitoekdiszteroidok előállítása a *C. arachnoidea* kereskedelmi kivonatából [S1]

Az E2 *Cyanotis* kivonat kromatográfiás feldolgozását egy 5,46 kg-os mennyiséggel kezdtük meg. A metanolban nem oldódó, tulajdonságai alapján feltehetően vízzel készült kivonatból metanolos perkolálással, majd szilikagélén végzett lépcsős (CH_2Cl_2 – MeOH, 97:3-tól 85:15 arányig emelkedő) gradiens elúció segítségével nyertünk 6 nyers előtisztított frakciót. A CH_2Cl_2 – MeOH (93:7) eleggyel eluálódott frakciót (244,8 g) további tisztításnak vetettük alá szilikagélén (*n*-hexán – acetone – EtOAc, 6:4:0-tól 6:5:3-ig emelkedő lépcsős gradiens), amelynek egyik alfrakciója (13,2 g) két fő ekdiszteroidot tartalmazott. Ezeket az anyagokat korábban előállított referencia ekdiszteroidokkal^[13][S2] való kromatográfiás összehasonlítás segítségével dakrihainanszteronként (**8**) és kaloniszteronként (**13**) azonosítottuk, amelyek ismert, de rendkívül korlátozott mértékben hozzáférhető minor fitoekdiszteroidok.

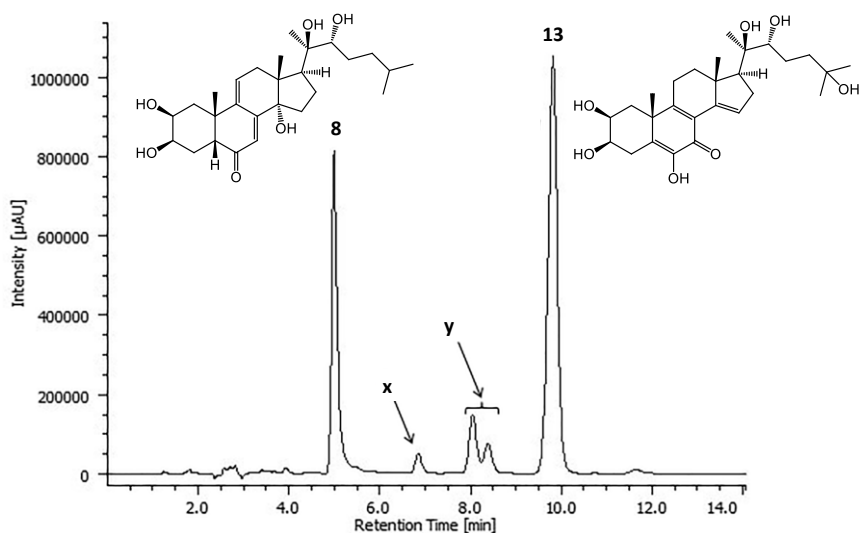
A **8** és **13** anyag hatékony preparatív tisztítására ellenáramú folyadék-folyadék megoszlásos kromatográfiás (CPC) módszert dolgoztunk ki. A megoszlásos kromatográfia, mint preparatív módszer számos előnnyel bír a klasszikusnak tekinthető szilárd-folyadék kromatográfiás módszerekkel szemben. Mivel az álló fázis is folyadék, nincsen irreverzibilis adszorpció, így a kinyerés gyakorlatilag kvantitatív, a csúcsalakok szimmetrikusak, a bomlás lehetősége elenyésző, nincsen szükség drága állófázisokra, és a szilárd módszerekhez képest jóval nagyobb pH tartomány tolerálható.^[66] Módszerfejlesztési szempontból különösen fontos, hogy készülék paramétereinek és a megoszlási hányadosok ismeretében az elválasztandó anyagok elúciós ideje és egymástól való elválásuk egzakt módon tervezhető.^[66-68]

A kétfázisú oldószerrendszer kiválasztásának kulcslépése volt az egyes (i) elválasztandó anyagokra vonatkozó, alsó (A) és felső (F) oldószerfázisok közötti megoszlási hányadosok (K), és az ezekből számítható szelektivitási értékek (α) kiszámítása az alábbi egyenletek szerint.

$$K_{(F/A)i} = C_{Fi} / C_{Ai}. \quad (1)$$

$$\alpha = K_{(F/A)i} / K_{(F/A)(i-1)} \text{ ahol } K_{(F/A)i} > K_{(F/A)(i-1)} \quad (2)$$

CPC esetén elfogadható futási idő alatti hatékony elválasztáshoz a $K_{(F/A)i}$ értékek a 0,5-2 tartományba kell, hogy essenek. Az értékek az álló és mozgó fázis kiválasztásához is irányt mutatnak: $1 \leq K_{(U/L)i} < 2$ esetén a felsőt (általában a szerves, “normál fázisú” elválasztás), $0,5 \leq K_{(U/L)i} < 1$ esetén az alsót (általában a vizes, “fordított fázisú” elválasztás) célszerű mozgó fázisként alkalmazni.^[69] A módszerfejlesztésre kiválasztott oldószerkelegyekben a megoszlási hányadosokat HPLC segítségével számítottuk: a minta egy kis mennyiségét a kétfázisú rendszerrel fiolában összeráztuk, majd a két fázis analízisét követően csúcsterület arányokat számoltunk. A tisztítandó minta HPLC kromatogramját és az elválasztandó anyagok szerkezetét a 3. ábra, a mintakomponenseknek a vizsgált oldószer elegyekben mutatott jellemzőit pedig a 2. táblázat mutatja be.



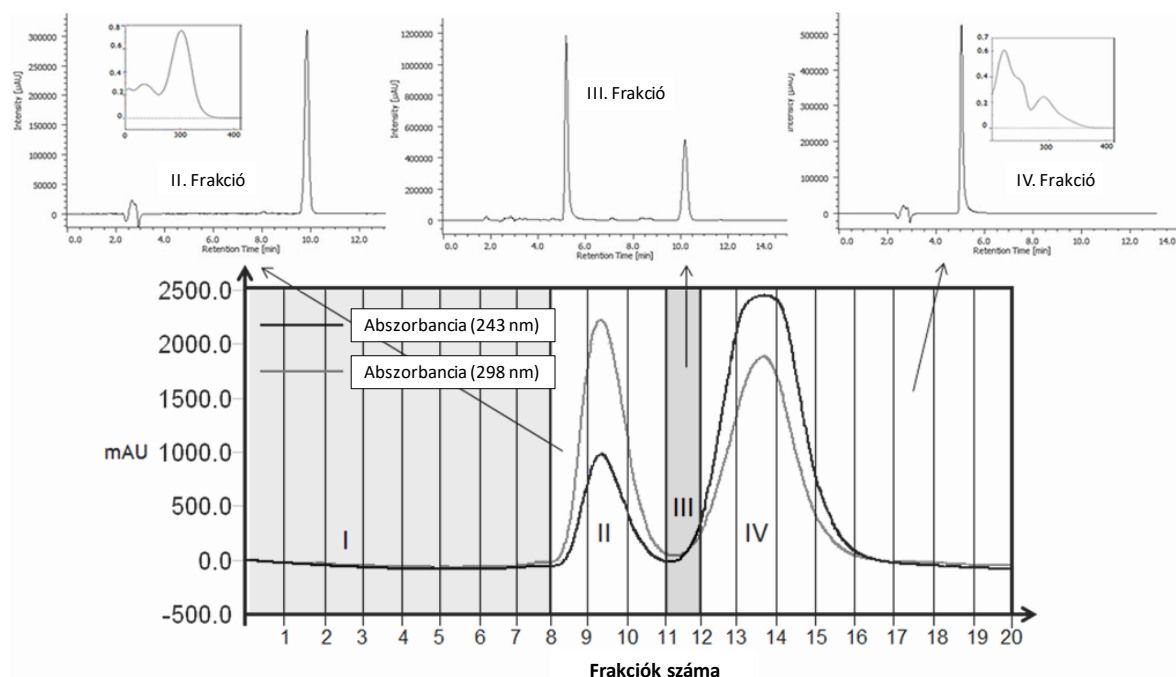
3. Ábra. A *Cyanotis arachnoidea* kereskedelmi forgalomból beszerzett kivonatának részben tisztított frakciójának HPLC kromatogramja. Oszlop: Kinetex XB-C18 250 × 4.6 mm, 5 μm; mozgó fázis: 30% vizes acetonitril, áramlás: 1 ml/perc; λ = 243 nm. **8:** dakrihainanszteron, **13:** kaloniszteron, **x** és **y:** nem azonosított, minor ekdiszteroidok.

2. Táblázat. Megoszlási hányadosok és szelektivitási tényezők néhány kiválasztott kétfázisú rendszerben a **8** és **13** vegyület, valamint az **x** és **y** szennyezők elválasztására. F: felső, A: alsó fázis

Oldószerkeleg	Megoszlási hányados				Szelektivitás			
<i>n</i> -hexán : EOAc : MeOH : víz (v/v/v/v)	$K_{(F/A)13}$	$K_{(F/A)8}$	$K_{(F/A)x}$	$K_{(F/A)y}$	$\alpha_{(13/8)}$	$\alpha_{(8/x)}$	$\alpha_{(x/y)}$	$\alpha_{(13/y)}$
0:1:0:1	10,916	5,260	6,343	7,880	2,075	1,206	1,242	1,385
1:10:1:10	2,699	1,542	1,798	2,283	1,750	1,166	1,270	1,182
1:5:1:5	2,042	1,136	1,730	1,307	1,800	1,523	1,323	1,562
5:20:5:20	1,341	0,702	0,395	0,887	1,910	1,777	2,246	1,512
3:10:3:10	0,965	0,529	0,375	0,566	1,824	1,411	1,509	1,705

A 2. Táblázat alapján az *n*-hexán – EOAc – MeOH – víz (1:5:1:5) arányú elegyét választottuk ki, mint a felállított kritériumrendszernek leginkább megfelelőt a két célvegyület (**8** és **13**) elválasztásához, felszálló, tehát mozgó fázisként a felső, szerves fázist használó üzemmódban.

A CPC elválasztás további kulcsparaméterei az alábbiak voltak: nyomás 86 bar, áramlás: 10 ml/perc, rotor forgási sebesség: 2400 rpm. Egy jellegzetes kromatogramot és az egyesített frakciók HPLC-PDA ujjlenyomatát a 4. ábra mutatja be.



4. Ábra. A *Cyanotis arachnoidea* kereskedelmi forgalomból beszerzett kivonatának részben tisztított frakciójának preparatív CPC kromatogramja, az egyesített II, III és IV frakciók HPLC-PDA ujjlenyomata (max. abszorbancia, $\lambda = 200\text{--}650\text{ nm}$), és a tisztított fő anyagok UV kromatogramjai.

A két célvegyület CPC tisztítása gyakorlatilag alapvonalas elválasztással valósult meg, a II frakció 93% tisztaságú dakrihainanszteront (**8**), a IV frakció 96% tisztaságú kaloniszteront (**13**) tartalmazott. Az elválasztást a fenti számítások mellett a 3-7 egyenletek segítségével jellemeztük, és reprodukálhatóságát 6 egymást követő injektálás során követtük (3. Táblázat).

Az állófázissal feltöltött rotor mozgófázissal való ekvilibrációja során mérőhengerbe gyűjtöttük az egyensúly beállta előtt kiszorított állófázist, amelynek visszatartási térfogataránya (S_f):

$$S_f = \frac{V_c - V_e}{V_c} \quad (3),$$

ahol V_c a rendelkezésre álló teljes térfogat (250 ml), V_e pedig a kiszorított állófázis térfogata. CPC esetén a várt retenciós térfogat (V_R) a K_i megoszlási hányadoshoz kötődik, amelyet az állófázisban és a mozgófázisban található mintamennyiség hányadosával fejezünk ki. Így tehát V_R az alábbiak szerint függ a mozgófázis és a rotorban megmaradó állófázis térfogatától (rendre V_M és V_S):

$$V_R = V_M + K_i * V_S \quad (4),$$

a várt retenciós idő (t_R) pedig V_R és az áramlási sebesség hányadosa. Az egyes elválasztások után a rendszer hatékonyságát az elméleti tányérszám (N) kiszámításával, s a két célvegyületre vonatkozó N értékek átlagával jellemeztük.

$$N = 16 * \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (5),$$

ahol t_R az eluálódó mintakomponens retenciós ideje, w pedig a talpi csúcsszélesség. A felbontást (R_s) a klasszikus egyenlet szerint számítottuk.

$$R_s = \frac{2*(t_{R2}-t_{R1})}{w_2+w_1} \quad (6), \text{ a fentiek összegzésével tehát:}$$

$$R_s = S_f \frac{\sqrt{N}}{4} \left[\frac{K_2-K_1}{1-S_f \left[1-\frac{K_1+K_2}{2} \right]} \right] \quad (K_2 > K_1) \quad (7).$$

3. Táblázat. A **8** és **13** anyagok CPC elválasztásának számolt és kísérletesen meghatározott jellemzői 6 egymást követő injektálás során. V_R , N és R_s , rendre: átlagos retenciós térfogat, elméleti tányérszám és felbontás.

Elválasztási jellemző	Sf	V_R (mL)	V_{Ri} átlag (mL)	Injektálás száma					
				N / R_s					
				1.	2.	3.	4.	5.	6.
Kaloniszteron (13)	0.7	229	236	250 /	238/	256/	219/	210/	203/
Dakrihainanszteron (8)		160	169.1	1.383	1.350	1.400	1.294	1.268	1.262

Bár az elválasztások előrehaladtával az elméleti tányérszám és a felbontás enyhén csökkent (amely valószínűleg az oszlop kismértékű szivárgásával függ össze), a módszer reprodukálhatósága összességében jónak volt mondható. Az itt jellemzett 6 injektálás során feldolgozott 1 g keverékből nagy tisztaságban nyertük a célvegyületként kiválasztott két minor ekdiszteroidot (**8**: 357,3 mg; **13**: 299,2 mg), s a fennmaradó tömeggel (I. frakció: 89,5 mg, III. frakció: 38,7 mg, bepárolt állófázis: 168 mg) együtt a visszanyerés 95,3% volt.

Összességében kijelenthető, hogy a *C. arachnoidea* kereskedelmi forgalomban rendkívül gazdaságosan beszerezhető kivonatai különösen gazdag ekdiszteroid forrásnak tekinthetők, s ezek az ekdiszteroidok azután sokoldalúan felhasználhatóak tudományos célokra (lásd 2-3. Tézis). A növénykémiai kutatómunka egyik legnagyobb korlátja rendszerint a nyersanyag, és az abból előállítható sokszor nagyon kis mennyiségű tiszta vegyület. Egy korábbi munkánk során pl. mintegy 2 kg pompás zsoltina (*Serratula wolffii*) szárított föld feletti rész fáradságos, sok tisztítási lépést igénylő feldolgozásával sikerült kb. 7 mg dakrihainanszteront (**8**) előállítani.^[13] A fent bemutatott vizsgálatok során feldolgozott kb. 5 kg gyökérkivonat a nyersanyag minőségétől függően több mázsa gyökérdrognak is megfeleltethető lehet, amelynek hatékony feldolgozása laboratóriumi léptékben nem kivitelezhető. A magasabb tisztítottsági fokú (pl. HPLC alapján >50%) 20-hidroxiekdizon néhány kilogrammja pedig néhány grammtól akár több száz grammig terjedő mennyiségekben tartalmazhat olyan ritka mellék- ill. minor ekdiszteroidokat, amelyeket más módon rendkívül nehéz és költséges lenne előállítani.

4.3. OXIDÁLT ÉS FOTO-TRANSZFORMÁLT EKDISZTEROID SZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA [S3-S7]

2. TÉZIS. Kimutattuk, hogy a növényi ekdiszteroidok **oxidatív lánchasításával**, és/vagy **auto-oxidációjával** előállítható ekdiszteroid metabolitok, ill. származékok értékes bioaktív anyagok. Sikeresen állítottunk elő egy oldatban pH-függően stabil **ekdiszteroid dezmotróp párt**, amelyek bioaktivitása is eltérőnek mutatkozott. Mintegy 20 oxidált származék előállítása és vizsgálata alapján az ekdiszteroid **B-gyűrű telítetlenségének** növelése fokozza az anyagok hatását a sejtek életképességét alapvetően befolyásoló **protein kináz-B (Akt) foszforilációjára**. Ezáltal az így előállított anyagok anabolikus / adaptogén / sejtvédő / antidiabetikus hatások szempontjából különösen ígéretesek. Módszert dolgoztunk ki a 20E láncrövidült metabolitja, a **posztszteron gazdaságos előállítására**, amely lehetővé tette hatásának kutatási együttműködés keretében való *in vivo* vizsgálatát. Ennek során elsőként mutattuk ki egy **metabolit** egyértelmű szerepét az ekdiszteroidok emlősejtekben kifejtett **anabolikus** hatásában.

A 20E **UV-lézer** katalizált **fotokémiai** átalakításával tovább bővítettük az előállított anyagok körét, a gyökös átalakulásoknak köszönhetően további oxidált, és különleges szerkezetű, szénatom beépüléssel vagy gyűrű-átrendeződéssel képződő származékokat is nyertünk.

Ezen munka során összesen **27 ekdiszteroid** származék, köztük **15 új vegyület** előállítását és vizsgálatát végeztük el.

A tézishoz kapcsolódó közlemények:

S3, S4, S5, S6, S7 (IF=3,929 + 2,831 + 1,601 + 3,662 + 2,639 = 14,662)

Irodalmi áttekintés a 2. Tézishez

Az 1. Tézis eredményei, valamint a kilogrammos tételben beszerzett tiszta 20-hidroxiiekdizon (E1 *Cyanotis* kivonat) megnyitotta az utat kutatócsoportunk korábbi, elsősorban minor anyagok különböző növényfajokból való izolálására fókuszáló ekdiszteroid kutatásainak jelentős átstrukturálására, és ezen anyagok változatosságának félszintetikus átalakításokkal való kiterjesztésére, valamint az így előállított anyagok farmakológiai vizsgálatára. Ebben a fejezetben az oxidatív és fotokémiai átalakítások kapcsán végzett munkánkat mutatom be.

A 20E bázis-katalizált auto-oxidációja egy érdekes lehetőséget kínált a B-gyűrű átalakítására. Ezt a reakciót korábban Suksamrarn és mtsai. publikálták,^[70] s a vizes metanolban NaOH hozzáadásával szobahőmérsékleten való kevertetést követően két ritka minor ekdiszteroidot, kaloniszteront és 9 α ,20-dihidroxiiekdizont írtak le főtermékként (rendre 35 és 29 % termeléssel). Az ezzel kapcsolatos, akkor már folyamatban levő munkánkkal párhuzamosan Savchenko és

mtsai. publikálták a 20E és a ponaszteron A 2,3;20,22-diacetonid származékainak auto-oxidációját metanolban, ők rendre 68 és 70% termeléssel írták le a kiindulási anyagok 5 α -epimerjeinek 9 α -hidroxilezett származékainak keletkezését, kaloniszteron analógok keletkezéséről ugyanakkor nem tettek említést.^[71]

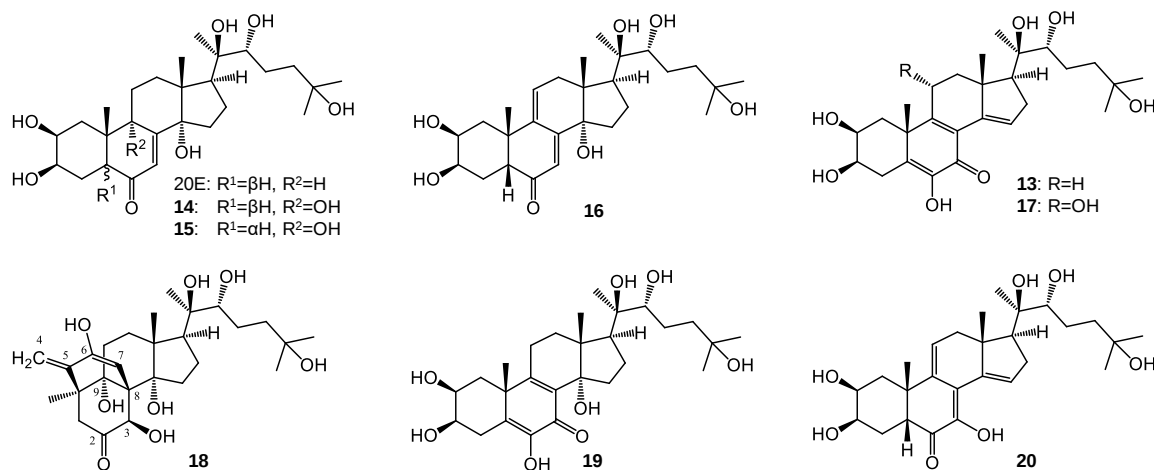
Az ekdiszteroidok 20,22-diolja között végbemenő oxidatív lánchasítás lehetősége különösen érdekes volt számunkra, mivel a 20E-ből így keletkező posztszteront egerekben a 20E *in vivo* metabolitjaként azonosították^[53] (lásd 4.1. fejezet, 17. old.), ugyanakkor emlősökben ilyen típusú ekdiszteroidok hatását korábban nem vizsgálták. A posztszteron 20E oxidatív lánchasításával való előállítását korábban két tanulmány írta le, az egyik esetben NaIO₄ alkalmazásával végezték és nem adtak meg termelést,^[72] a másik esetben pedig Jones reagenst alkalmazva értek el 62%-os termelést, 3-oxoposztszteron, mint fő melléktermék izolálásával.^[73] Egyéb, intakt oldalláncot tartalmazó fitoekdiszteroidok ilyen típusú átalakításáról nem találtunk irodalmi hivatkozást.

A 20E fotokémiai átalakításáról két korábban publikált közleményről van tudomásunk. Canonica és mtsai. a B-gyűrű enon csoportjának szokatlan fotokémiai viselkedéséről számoltak be a 20E egy Pyrex szűrővel ellátott Hg UV lámpával ($\lambda > 290$ nm), vizes közegben való besugárzását követően. Főtermékként (35%) a Δ^{8-14} ketont írták le, 14 α -deoxi-20E (15%) és két gyűrűátrendeződéssel képződő termék (23 és 18%) keletkezése mellett, s 14 α -hidroperoxi-20E jelenlétét is kimutatták.^[74] Érdekes, hogy a nagyobb termeléssel képződött gyűrűátrendeződött terméket, egy szokatlan 13(14 $\rightarrow$ 8)-abeo származékot a szerzők később sikeresen, 85% termeléssel tudták előállítani a 20E 14-hidroperoxid Fe(II) katalizált átalakításával.^[75] A Harmatha és mtsai. által az első fotokémiai átalakítást csaknem 20 évvel később követő hasonló munka során igyekeztek argon gázzal kizárni az oxidáció lehetőségét, s új termékeként a 14-epi-20E és a Δ^{8-14} keton egy 7-7' homodimerjét írták le (ez utóbbi termelése egyenes arányban volt a 20E koncentrációjával), a monomer Δ^{8-14} keton keletkezését ugyanakkor nem tapasztalták.^[76]

A 20E auto-oxidált származékainak előállítása és vizsgálata [S4-S6]

A 20E auto-oxidációját először a Suksamrarn és mtsai. által publikált módon^[70] kíséreltük meg, s mivel ők nem részletezték az izolálás menetét, rutin tisztítási eljárással próbálkoztunk semlegesítést követően szilikagél oszlopkromatográfia segítségével. Ez nem teljes konverzióval néhány főtermék jelenléte mellett egy a referencia munkát nem reprodukáló, összességében rendkívül komplex elegyet eredményezett. Bár nagyon alacsony termelés

mellett, de sikeresen izoláltunk ugyanakkor négy vegyületet: $9\alpha,20$ -dihidroxiekdiszont (**14**), $(5\alpha)-9\alpha,20$ -dihidroxiekdiszont (**15**), 25-hidroxidakrihainanszteront (**16**), és egy új ekdiszteroidot, 11α -hidroxikaloniszteront (**17**). Kaloniszteront (**13**), a korábban leírt egyik főterméket ugyanakkor nem nyertünk.⁸ Ezután több kisléptékű kísérlet és rétegekromatográfiás ellenőrzés alapján igyekeztünk optimalizálni az oxidáció időtartamát, majd a méretnövelt reakcióelegyet a szilikagélnél jóval kíméletesebb módon, CPC-vel tisztítottuk. Meglepetésünkre egy korábban nem észlelt főtermék a frakciók vákuum-bepárlása során egy másik anyaggá alakult, amelyet a szerkezetvizsgálat során kaloniszteronként (**13**) azonosítottunk. Kinyertünk továbbá egy minor, gyűrűátrendeződéssel keletkező anyagot (**18**). Ezt követően a bomlékony közttermék izolálása céljából ismét elvégeztük a reakciót, és az óvatos semlegesítést és CPC frakcionálást követően valamennyi frakciót nitrogénárammal szárítottuk be. Ily módon sikeresen előállítottuk a korábban kaloniszteronra bomló köztterméket (**19**), valamint egy újabb főterméket (**20**), maga a kaloniszteron ugyanakkor csak nyomokban volt jelen. Az előállított anyagok szerkezetét az 5. ábra mutatja be.

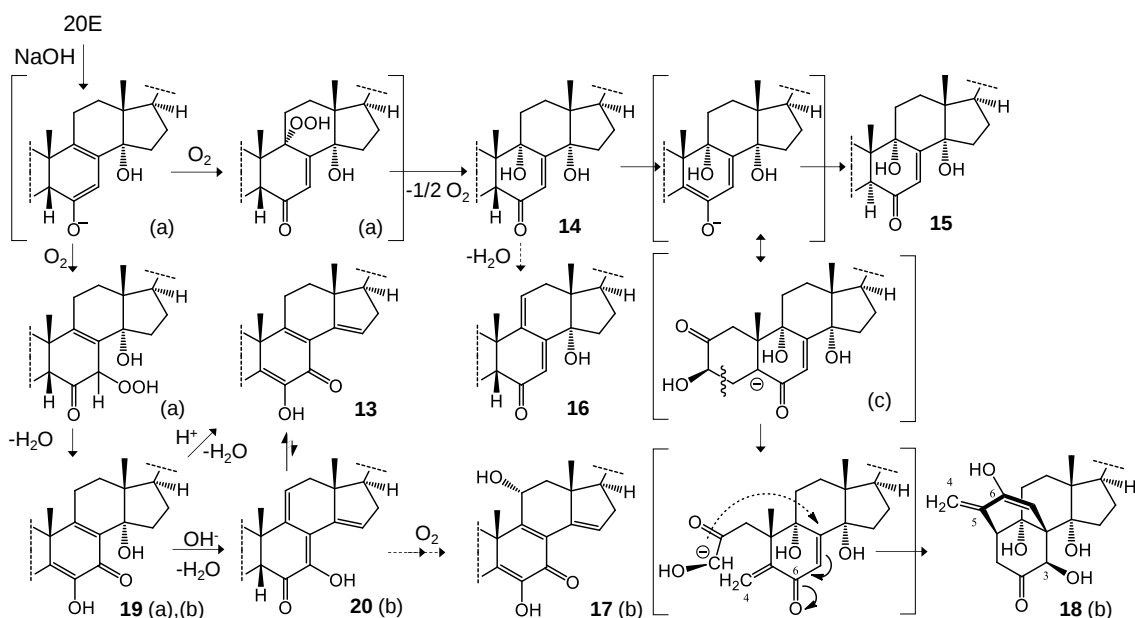


5. Ábra. A 20E auto-oxidációjából izolált termékek szerkezete. A **17-20** anyagok új ekdiszteroid származékok.

A **13**, **14** és **15** vegyületek a korábbi publikációk által várt termékek, s a **14** vegyület 9α -OH csoportjának eliminációjával a **16** vegyület kialakulása is intuitíven magyarázható. A **17** és **18** minor termékek kialakulásához több oxidációs lépés szükséges (a feltételezett reakciómechanizmust lásd a 6. ábrán). A **19** termék egy Suksamrarn által is feltételezett közttermék, amelyet elsőként sikerült előállítanunk. Rendkívül érdekes a **20** vegyület, amely a kaloniszteron (**13**) protomerje, és amely a második preparatív léptékű (kaloniszteront eredményező) reakcióban nem keletkezett, ismétléskor ugyanakkor a kaloniszteron helyett

⁸ Az itt bemutatott munka időrendben az [S1](1. Tézis)-ben leírtak előtt zajlott, a kaloniszteron (**13**) referencia anyagként ekkor még nem állt rendelkezésünkre; minor terméként feltehetően képződött.

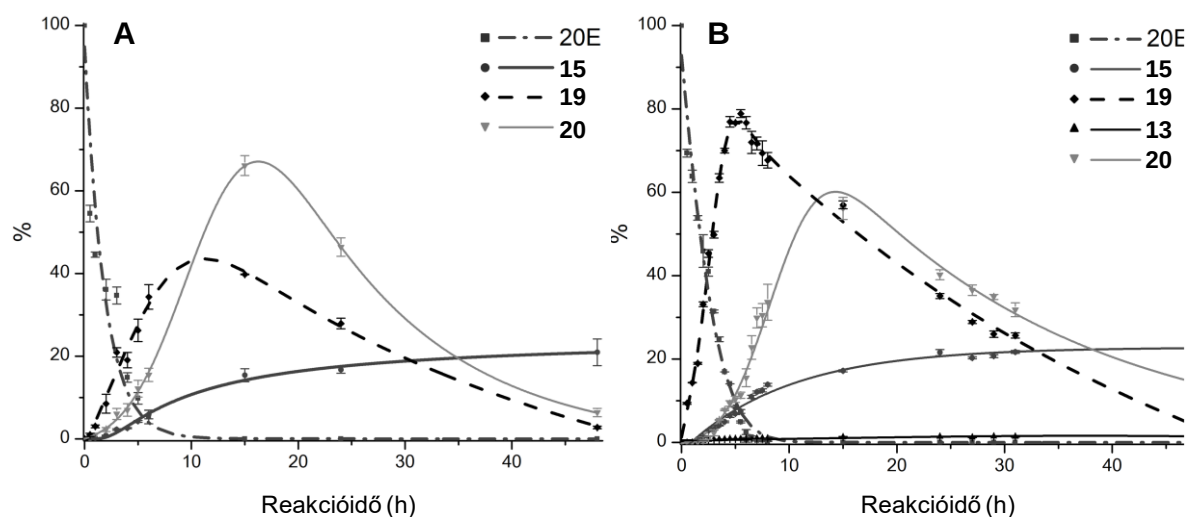
izoláltuk főtermékként. Fontos megjegyezni, hogy mindkét vegyület szilárd és metanolos oldat formájában is stabilnak mutatkozott, el tudtuk végezni a teljes NMR jelhozza rendelésüket. Keletkezésük körülményei ugyanakkor felvetették az egymás közötti, pH és/vagy hőmérsékletfüggő tautomer átalakulás lehetőségét. Szobahőmérsékleten mindkét anyagot stabilnak találtuk mind semleges, mind enyhén savas (pH=3) és lúgos (pH=8) közegben. A **20** vegyület pH semleges, vizes oldata ugyanakkor melegítés (80 °C) hatására lassú (4 nap alatt kb. 1:1 arányt eredményező) átalakulást mutatott a **13** irányába. A **13** vegyület hasonló melegítése ugyanakkor csak nyomnyi mennyiségű **20** megjelenéséhez vezetett, azt sugallva, hogy a **13** a stabilabb forma. Egy későbbi vizsgálat során azt is észleltük, hogy erősen lúgos (tehát az auto-oxidáció körülményeihez közelebb álló) pH-n ugyanakkor a **13** gyorsan átalakul a **20** vegyületté, megmagyarázva ezáltal azt is, hogy rendkívül elővigyázatos semlegesítést követően mellett miért utóbbi izolálható az auto-oxidáció főtermékeként. Érdekesség továbbá, hogy a **19** vegyület enyhén savas közegben a **13**, lúgos közegben a **20** vegyületté alakul, a 14-OH eliminációja tehát olyan kulcslépés, ami ismét az elegy feldolgozási körülményeinek fontosságát hangsúlyozza. A fentiek alapján tehát a **13** és **20** ekdiszteroid egy különleges izomer pár, ún. dezmotrópok. A dezmotrópia jelensége leginkább a krisztallográfiához kötődik,^[77] oldatban való előfordulása rendkívül szokatlan. A 20E auto-oxidációjának feltételezett mechanizmusa a 6. ábrán látható.



6. Ábra. A 20E bázis katalizált auto-oxidációjának feltételezett mechanizmusa az izolált új anyagok fényében. (a) Korábban feltételezett köztitermékek,^[70] (b) új anyagok, (c) a **18** anyaghoz vezető reakciót egy általunk feltételezett köztiterméke, amelynek 2-OH csoportja valamelyik megelőző lépésben, egy független oxidációs lépésben alakulhatott oxo-csoporttá.

Az auto-oxidáció időfüggését először HPLC [S6], majd egy későbbi, célzott analitikai vizsgálat keretében [S4] kapilláris elektroforézis (CE) segítségével is megvizsgáltuk. Utóbbi

vizsgálathoz a módszerfejlesztést és az analitikai elválasztások felügyeletét Dr. Németh Krisztina (MTA-TTK, Budapest) végezte, jelen értekezésben az együttműködésben végzett munka szintetikus vonatkozásaira kívánok koncentrálni. A két vizsgálati módszer között a legfontosabb különbség, hogy HPLC esetén az analízisre legalkalmasabb fordított fázisú oszlopok bázikus körülmények közötti sérülékenysége miatt a mintaelőkészítés (elsősorban a pH semlegesítés) rendkívül fontos, míg CE esetén akár a reakciókörülményeknek megfelelő erősen lúgos (kb. pH=11) minták is közvetlenül vizsgálhatóak. Mivel a preparatív munka során azt tapasztaltuk, hogy a pH változtatása jelentős mértékben módosíthatja a termékprofilt (lásd **19**, és az ebből keletkező **13** és **20** anyagok), a lehetséges termelések vizsgálatához különösen fontos lehet az, hogy az analízis előtti mintaelőkészítést minimálisra csökkentsük. A CE további előnye volt ugyanakkor az is, hogy mikroanalitikai módszerként jóval rövidebb időt igényelt egy-egy elválasztás (6 perc, szemben a HPLC kb. 20 perces időtartamával), ami gyakoribb mintavételezést és így a reakció időbeli lefutásának jóval pontosabb értékelését tette lehetővé. A 20E auto-oxidációjának HPLC-vel és CE-vel nyert időfüggését a 7. ábra mutatja be.

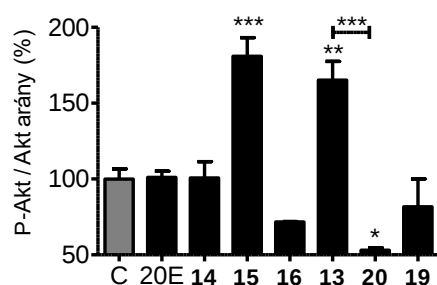


7. Ábra. A 20E bázis katalizált auto-oxidációjának időfüggése HPLC (A) és CE (B) alapján vizsgálva. Az ordináta a kiindulási 20E mennyiségének %-ban fejezi ki a mennyiségeket, amelyeket az izolált termékek, mint standardok segítségével felvett kalibrációk alapján határoztunk meg. A: HPLC analízisek előtt a NaOH tartalmú mintákat óvatos pH semlegesítést követően injektáltuk fordított fázisú rendszerben, B: a CE analízisek során a reakcióelegyet hígítás után közvetlenül injektáltuk az erősen lúgos közegben végzett elválasztáshoz. Mindkét grafikon 3 független reakció analízisét mutatja, a vizsgálati pontok átlag $\pm$ SEM-ként kerültek feltüntetésre. A görbeillesztésekre alkalmazott nemlineáris modelleket automatikusan, az OriginPro 9.1 szoftver beépített Leveberg-Marquardt algoritmusával választottuk ki.

A függetlenül elvégzett 3-3 oxidáció során a reakció jó reprodukálhatóságát tapasztaltuk. A két módszerrel nyert eredmények alapján ugyanakkor a mintaelőkészítés (preparatív célú munka esetén a reakcióelegy feldolgozása és előtisztítása) a kitermelés szempontjából valóban kritikus pont lehet egyes anyagok, elsősorban a bomlékony **19** anyag szempontjából. A 20E viszonylag

gyors (CE alapján $t_{1/2}=1,72$ h) bomlásával párhuzamosan a **19** anyag a reakcióelegyben közel 80% maximális mennyiséget ér el, így megfelelő feldolgozás mellett meglepően jó termeléseket lehetne elérni. Ezt követően mennyisége a **20** anyaggá való bomlása folytán meredeken csökkenni kezd. A CE analízis egy érdekes tanulsága, hogy a nyers elegyből ily módon a **13** vegyület is kimutatható volt, míg a HPLC-s mérésekkel a reakcióelegyből nem volt közvetlenül azonosítható; HPLC segítségével csak a **19** vegyületet is tartalmazó minták savas pH-ra állítása, és/vagy hőközléssel való vákuum-bepárlása után észleltük. CE segítségével így tehát igazolni tudtuk, hogy másodlagos termékként a dezmotróp ekdiszteroid pár mindkét formája keletkezik az auto-oxidáció bázikus körülményei között is.

Az előállított anyagok farmakológiai tesztelésére a protein kináz B (Akt) foszforilációjára kifejtett hatásuk vizsgálatát választottuk, két fő megfontolás alapján: 1) az Akt aktivációja szerepet játszik a 20E emlősökben kifejtett anabolikus hatásában,^[42] és 2) a PI3K/Akt jelátviteli út kulcsfontosságú a sejtek túlélésének/apoptózisának szabályozásában is,^[78] ami az ekdiszteroidok citoprotektív hatásának kapcsán lehet lényeges. Ezt nemzetközi kutatási együttműködés keretében végeztük (Dr. T.-J. Hsieh, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Tajvan), *in vitro*, C2C12 egér harántcsíkolt izom sejt vonalból differenciált mio-tubulusokon; eredményeinket a 8. ábrán mutatom be.



8. Ábra. Az auto-oxidáció során nyert anyagok hatása az Akt foszforilációjára. Az oszlopdiagram átlag $\pm$ SEM értékeket mutat, *, **, és ***: rendre $p < 0,05$, $0,01$, és $0,001$ egyutas variancia-analízist követő Dunnett próba alapján a kontrollhoz (C) viszonyítva, ill. a **13** és a **20** anyag összehasonlítása esetében Bonferroni próba alapján. A módszer részletes leírását a hivatkozott saját publikáció [S6] tartalmazza, az alkalmazott dózis $30 \mu\text{g/ml}$ volt.

Az anyagok tesztelése az együttműködő partner rutin, antidiabetikus hatású anyagainak vizsgálatára optimalizált módszere szerint történt, amely jelentősen eltért a 20E Akt foszforiláción kifejtett hatását korábban leíró közleményben használt módszertől (dózis, kezelés időzítése, stb.).^[42] Feltehetőleg ezzel magyarázható, hogy a 20E kísérletünkben hatástalannak bizonyult.⁹ Erős hatást tapasztaltunk ugyanakkor a **15** és a **13** vegyületek esetében, és meglepő módon a **20** vegyület volt az egyetlen, amely szignifikánsan csökkentette a foszforilált (ily módon aktivált) Akt részarányát. Ez alapján tehát a két dezmotróp nem csak,

⁹ A későbbi vizsgálataink során az ekdiszteroidokra leírt irodalmi módszerhez közelítettük a protokollt, amely megerősítette a 20E publikált hatását, lásd következő alfejezet, C21 ekdiszteroidok *in vitro* hatásvizsgálata [S3].

hogy oldatban kellőképpen stabil a külön-külön elvégezhető teljes NMR spektroszkópiás jellemzéshez, de a két forma biológiai környezetben is eltérő módon viselkedik. Ennek kapcsán fontos megjegyezni, hogy a farmakológiai vizsgálat során rendkívül sokféle behatás éri a vizsgált anyagokat, ideértve pl. a sejtek és sejtorganellek által történő felvételt és/vagy exkréciót (aktív / passzív transzportfolyamatok), és a metabolizmust is. Ebből fakadóan ezt az észrevételt nem lehet egy az egyben a két forma azonos célponton kifejtett gátló vagy serkentő hatásaként értelmezni, szükségszerűen egy összetett rendszerrel való sokrétű kölcsönhatásaik eredője volt az, amely az alkalmazott dózisban eltért. Ettől függetlenül különösen érdekes, és a szakirodalomban általunk sehol másutt nem talált jelenség az, hogy egy dezmotróp pár két tagja egy sejtes alapú farmakológiai teszten szignifikánsan eltérő, sőt, összességében ellenkező irányú biológiai hatást váltson ki.

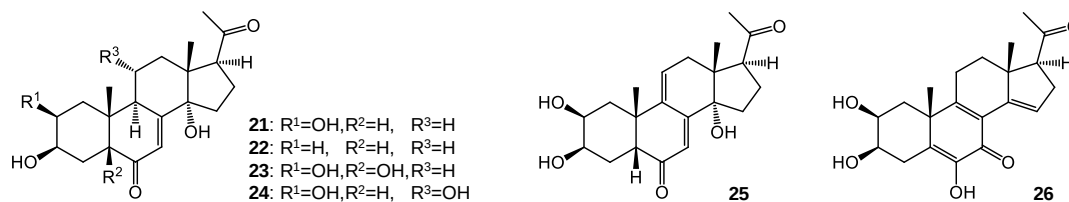
C21 ekdiszteroid metabolitok előállítása és vizsgálata [S3]

A 20E $\rightarrow$ posztiszteron *in vivo* metabolikus átalakulás ismeretében,^[53] és azt is figyelembe véve, hogy a posztiszteron típusú, C21 ekdiszteroidok emlősökben való bioaktivitása teljesen feltérképezetlen volt, célul tűztük ki a posztiszteron *in vivo* farmakológiai vizsgálatokra is elegendő léptékű félszintetikus előállítását. Célunk volt továbbá egyéb természetes ekdiszteroidok 20,22-szénatomjai között lánchasított analógjainak előállítása és vizsgálata is; ezek a posztiszteron analógiája alapján nagy valószínűséggel az adott ekdiszteroid emlős szervezetben keletkező metabolitjai lehetnek. Farmakológiai módszerként ismét a 20E auto-oxidált származékainál alkalmazott protein kináz B (Akt) aktivációját választottuk ki, a fentebb részletezett megfontolások alapján.

A reakció optimalizálása céljából több oxidálószer is kipróbáltunk, végül (diacetoxijód)benzol (PIDA), egy hipervalens jód(III) vegyület alkalmazásával és azt követő flash kromatográfiás tisztítással a posztiszteron (**21**) mintegy 81,3 %-os izolált kitermelését sikerült elérnünk. A korábbi növénykémiai munkák során előállított, ill. a *C. arachnoidea* kivonatából [S1,S2] rendelkezésünkre álló további ekdiszteroidok, így a 2-dezoxi-20-hidroxi-ekdizon (2d20E)¹⁰, ajugaszteron C (**3**), polipodin B (pB), dakrihainanszteron (**8**) és kaloniszteron (**13**) PIDA katalizált oxidációját is elvégeztük, így nyertük rendre a **22** (68,3 %), **23** (63,6 %), **24** (71,2 %), **25** (82,7) és **26** (51,8 %) ekdiszteroid származékokat. Az anyagok tisztításához fordított fázisú HPLC-t (**22**, **23**), rotációs rétegekromatográfiát (**24**, **25**), vagy CPC-t (**26**) alkalmaztunk. Utóbbi

¹⁰ A vegyületek számozásánál figyelmet fordítottam arra, hogy csak a jelen értekezésben bemutatott munka keretében általunk előállított anyagok kapjanak sorszámot; a korábban előállított, kiindulási, vagy referencia anyagként felhasznált vegyületeket triviális nevükből származtatott rövidítésekkel láttam el.

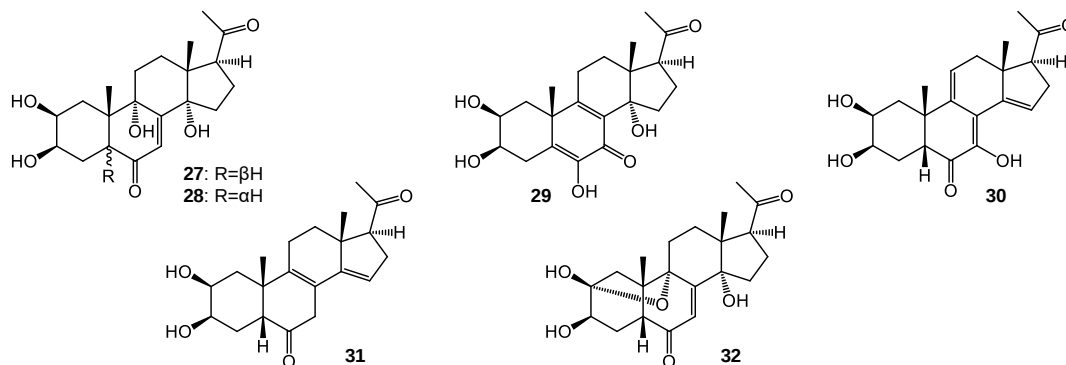
esetében az optimális CPC oldószer rendszer kiválasztása az 1. Tézisben részletezettekhez [S1] hasonló módon történt. Az így előállított C21 ekdiszteroidok szerkezetét a 9. ábra mutatja be.



9. Ábra. Oxidatív lánchasítással előállított C21 ekdiszteroidok. A posztszteron (**21**) igazoltan a 20E egyik fő *in vivo* metabolitja egérben, analógia alapján a **22-26** vegyületek rendre a 2-dezoxi-20-hidroxi-ekdizon, az ajugaszteron C, a polipodin B, a dakrihainanszteron és a kaloniszteron *in vivo* metabolitjaiként valószínűsíthetők.

A 20E auto-oxidált származékainak az Akt foszforiláción mutatott *in vitro* hatásossága arra inspirált minket, hogy ezek C21 analógjait is előállítsuk, amelyhez a legcélszerűbb kémiai megközelítésnek a posztszteron (**21**) hasonló módon elvégzett bázis-katalizált auto-oxidációja tűnt.

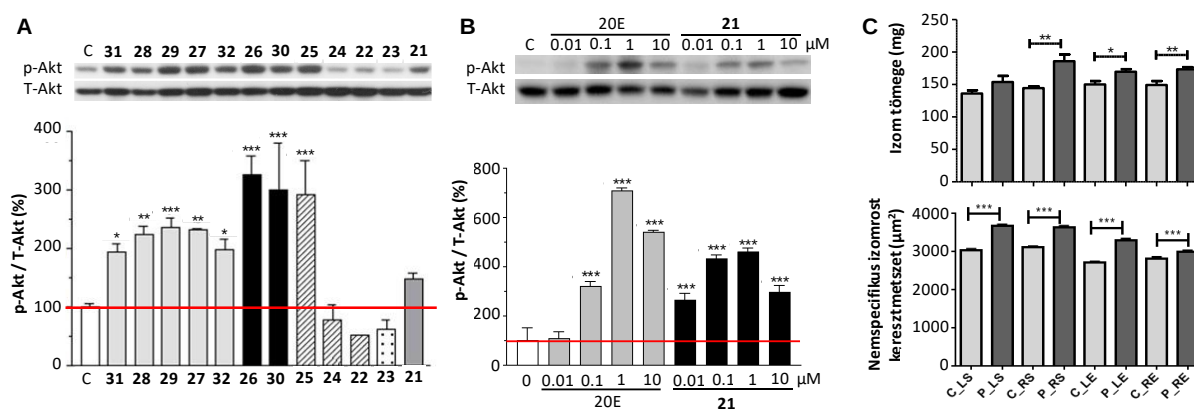
A 20E lánchasításával előállított posztszteront 90% vizes metanolban oldottuk, majd NaOH hozzáadását követően szobahőmérsékleten 4 órát kevertettük, híg ecetsav oldattal semlegesítettük, szilikán átszűrtük, CPC-vel frakcionáltuk, és az egyes termékeket fordított fázisú HPLC segítségével izoláltuk tiszta formában. Hét ekdiszteroidot nyertünk így, amelyek egyike a minor terméként jelen levő **26** anyag volt. Az így nyert további hat C21 ekdiszteroid szerkezetét a 10. ábra mutatja be.



10. Ábra. A posztszteron (**21**) bázis-katalizált auto-oxidációjával előállított C21 ekdiszteroidok.

A **26-29** származékok a 20E auto-oxidált termékeivel analóg C21 ekdiszteroidok. Mivel a **26** vegyületet sikeresen elő tudtuk állítani a *C. arachnoidea*-ból több grammos tételben rendelkezésünkre álló kaloniszteronból (lásd 1. Tézis), itt a reakciókörülményeket a korábbi tapasztalatok alapján úgy alakítottuk, hogy a **29** és **30** vegyület izolálására tudjunk koncentrálni; ilyen módon a kaloniszteron analóg **26** vegyület képződését szándékainknak megfelelően a posztszteron auto-oxidációja során csak nyomokban észleltük.

Az előállított C21 ekdiszteroidok bioaktivitását kutatási együttműködés keretében *in vitro* [S3], a posztszteronét (**21**) pedig *in vivo* is megvizsgáltuk [SR1]. *In vitro* a korábbiakhoz hasonlóan az anyagok Akt foszforilációra kifejtett hatását vizsgáltuk, *in vivo* pedig a több gramm tételben előállított posztszteront injektáltuk patkányok hátulsó végtagjaiba intramuszkulárisan, s az izomtömeg mellett az izomrostok átmérőinek változását vizsgáltuk. Az eredményeket röviden a 11. ábra foglalja össze.



11. Ábra. C21 ekdiszteroidok *in vitro* (A és B), és a posztszteron (**21**) *in vivo* farmakológiai vizsgálata. **A:** a **21-32** anyagok (10 µM) hatása C2C12 harántcsíkolt izomsejtek Akt foszforilációjára (p-Akt: foszforilált, T-Akt: teljes Akt, C: negatív kontroll). **B:** a 20E és a posztszteron (**21**) Akt-ra kifejtett hatásának dózisfüggése 10 nM és 10 µM között. **C:** a posztszteron (**21**) *in vivo* vizsgálatának nem rostspezifikus eredményei; kezelés: egy hétig napi 5 mg/kg hím Wistar patkányok jobb hátsó végtagjába subcutan injektálva, jelmagyarázat: C-kontroll, P-posztszteron kezelt, L-bal, R-jobb, S-soleus izom, E-EDL izom, i.e. P_RS=kezelt jobb oldali soleus.

10 µM dózisban a **22-24** anyagok kivételével valamennyi C21 ekdiszteroid képes volt fokozni az Akt foszforilációját harántcsíkolt izomsejtekben *in vitro*, és a B-gyűrű telítettségének növelése (**25**, **26** és **30** anyagok) előnyösnek tűnik a hatás szempontjából. Ezt a szerkezet-hatás összefüggést ugyanakkor árnyalja a 10B ábrán látható, harang-görbe szerű dózisfüggés, ami alapján mind a 20E, mind a posztszteron (**21**) hatása egy maximum elérése után nagyobb koncentrációk alkalmazásával csökkenni kezd. Ez alapján nem feltétlenül lehet egy adott dózisa adott válasz alapján megítélni egy-egy ekdiszteroid Akt foszforilációra kifejtett hatáserősségét: bár a 20E hatásmaximuma (1 µM) felülmúlja pl. a posztszteronét, utóbbi jóval alacsonyabb, 10 nM koncentrációban is jelentős hatást vált ki, ahol a 20E már inaktív. A posztszteron *in vivo* farmakológiai vizsgálata egyértelműen igazolta a kezdeti feltevésünket, miszerint ez az anyag a 20E aktív, anabolikus hatású metabolitja. A rostspezifikus hatások részletes értékelése nem képezi jelen értekezés tárgyát, annyit érdemes ugyanakkor megjegyezni, hogy bár a posztszteron hatáserőssége hasonló, mint a 20E kezelés kapcsán ugyanezen modellen korábban közöltek,^[79] hatásprofilja azonban néhány lényeges ponton eltér

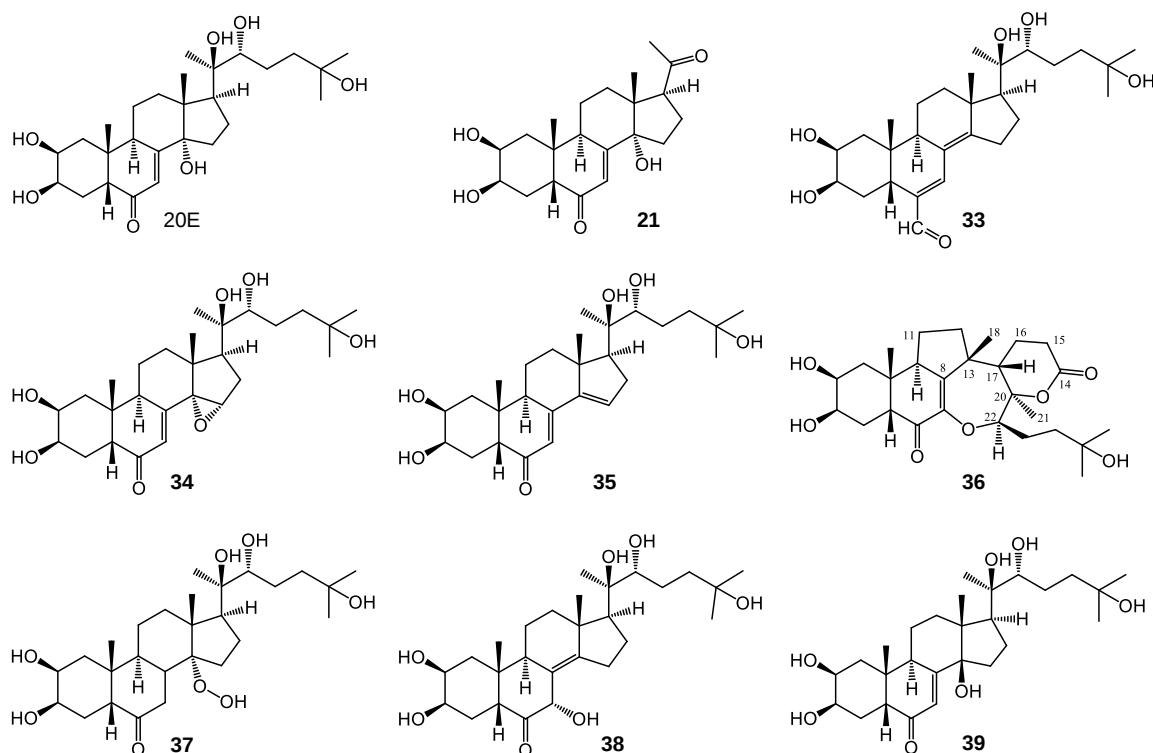
attól. Ez arra utal, hogy a posztsteron keletkezésétől függetlenül a 20E önállóan, vagy egyéb metabolitjai útján is kifejtethet anabolikus hatást.

A 20E UV lézer flash fotolízise [S7]

Legjobb tudomásunk szerint a 2. Tézis irodalmi áttekintésében említett, a 20E Hg UV lámpák által katalizált fotokémiai átalakításain^[74, 76] túl nem végeztek ekdiszteroidokkal ilyen jellegű vizsgálatokat. A klasszikus fotoreaktorokhoz képest a lézerek fotokémiai célú alkalmazása számos előnnyel bír, elsősorban nagy energiájuk, optikai tisztaságuk és könnyű miniaturizálhatóságuk révén, amely tulajdonságaik „lab-on-a-chip” típusú alkalmazásokat is lehetővé tesznek.^[80]

Egy kutatási együttműködés keretében (Prof. M. L. Pascu, National Institute for Laser, Plasma and Radiation Physics, Bukarest, Románia) 2012-ben lehetőségünk adódott a 20E UV lézerrel való besugárzására [SR6]; a keletkezett termékeket Szegeden izoláltuk és vizsgáltuk tovább [S7].

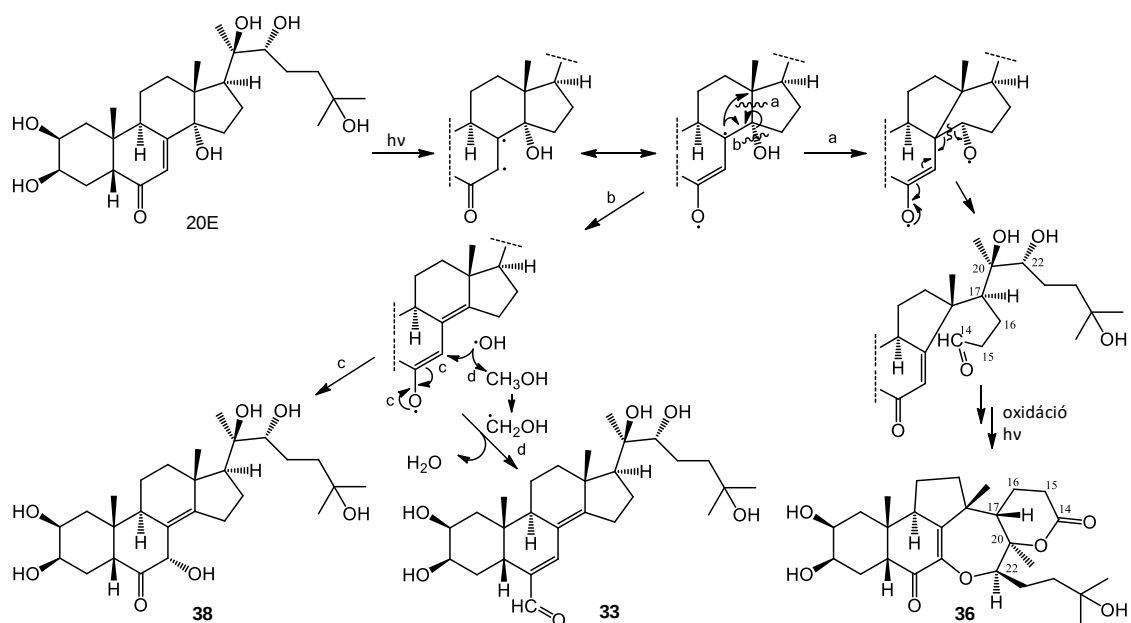
A besugárzásokat Nd:YAG impulzuslézer ($\lambda=266$ nm) segítségével, metanolos oldatban, küvettában végeztük több részletben. Mivel célunk a termékek széles palettájának izolálása volt, az egymást követő besugárzások során igyekeztünk a körülményeket rétegekromatográfiás ellenőrzés mellett úgy változtatni, hogy minél nagyobb mennyiségű 20E minél teljesebb átalakítása valósuljon meg. Ez a koncentrációk, a besugárzási idő és az impulzusenergia folyamatos növelését jelentette (rendre 2-10 mg/ml, 15-30 perc, és 6,5-15 mJ tartományok között). Az összesen 400 mg 20E besugárzásából nyert reakcióelegyeket egyesítve dolgoztuk fel, s az egyesített keverék kvantitatív vizsgálata alapján mintegy 15% visszamaradó 20E-t tartalmazott. Az elegyből többlépcsős, rotációs rétegekromatográfia, CPC, valamint RP-HPLC segítségével végzett kromatográfiás tisztítás során 7 terméket (**21**, **33-38**) izoláltunk, és korábbi munkánkból rendelkezésre álló referencia anyag segítségével egy további minor terméket, a 20E 14-epimerjét (**39**) azonosítottunk (ez utóbbi mennyiségét analitikai HPLC segítségével 20E ekvivalensben kifejezve kb. 0,3%-ban határoztuk meg). A termékek szerkezetét a 12. ábra mutatja be. A 20E fotokémiai átalakításával korábban publikált termékprofiltól ebben a vizsgálatban jelentősen eltérő szerkezeteket is nyertünk, amely a nagymértékben eltérő reakciókörülmények fényében nem meglepő.



12. Ábra. A 20E lézer flash fotolízisének termék-keverékéből izolált (**21**, **33-38**) vagy detektált (**39**) ekdiszteroid származékok. **33**, **36**, és **38** új anyagok

A posztszteron (**21**) a 20,22-szénatomok közötti oxidatív lánchasadás eredménye, amely a B-gyűrű kromofórjától való jelentős távolságának köszönhetően valószínűleg inkább inter-, mint intramolekuláris folyamatoknak köszönhető. Az alkalmazott hullámhosszon valószínűtlen a metanol direkt fotolízise, amely nagy mennyiségű reaktív gyök termelését eredményezhetné.^[81] Egyéb módon keletkező reaktív oxigén fajták, vagy más 20E molekulák által produkált szabadgyökök (pl. akár $\cdot\text{OH}$ gyök, lásd 13. ábra) ugyanakkor magyarázhatják a posztszteron (**21**) keletkezését. Az összes többi termék képződése levezethető az O-6, 8-C kettős gyök átrendeződéséből. Érdekes ilyen szempontból a **33** vegyület, ahol az oldószerként használt metanollal való reakció új szén-szén kötést alakított ki, feltehetően a 14-OH csoport homolitikus lehasadását követően. Az így keletkező $\cdot\text{OH}$ gyök közvetlenül kapcsolódhat ugyanazon 20E molekula megmaradt, a 6-karbonil és a 14-es szénatom között delokalizálódó^[74] szabad gyökéhez, így kialakítva a **38** vagy a 14-epimer **39** vegyületet, vagy reagálhat az oldószer metanollal. Ez utóbbi reakció elsődleges terméke a $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ gyök,^[81] s ez lehet a **33** vegyület kialakulásában kulcsszerepet játszó, a 6-os szénatomhoz kapcsolódó legvalószínűbb reakciópartner. Bár a **36** vegyület közeli szerkezeti rokonságban áll a Canonica et al által korábban leírt 13(14 $\rightarrow$ 8)-abeo szteroiddal,^[74] annak keletkezési mechanizmusát részletesen elemezték,^[74, 75] ez alapján pedig esetünkben a megőrzött $\Delta^{7,8}$ olefin egy eltérő reakcióutat

valószínűsít. Legvalószínűbb köztiterméként egy a 8-14 kötés homolitikus hasadása után keletkező aldehidet feltételezünk, amelyből aztán az oxidatív környezet magyarázhatja a laktongyűrű keletkezését. A tetrahidro-oxepin gyűrű kialakulása ugyanakkor valószínűleg egy másodlagos fotoreakció eredménye lehet. A 14-hidroperoxi származék **37** képződhet a korábban feltételezett 20E 14 α -oxil gyök és egy OH gyök reakciója során; ezt az is alátámaszthatja, hogy ez az anyag csekély mennyiségben mindkét korábbi munka során keletkezett, a légköri oxigén lehetőség szerinti alapos kizárása mellett is. A három új anyag (**33**, **36**, **38**) képződésének feltételezett mechanizmusát a 13. ábra mutatja be.



13. Ábra. A 20E lézer flash fotolízise során előállított új anyagok képződésének feltételezett mechanizmusa.

Az előállított anyagok közül a **33** vegyületet elhelyeztünk egy ekkor összegyűjtés alatt álló, a COST Action CM1106 (Chemical Approaches to Targeting Drug Resistance in Cancer Stem Cells) résztvevői által létrehozott vegyületkönyvtárban, amelyet számos európai kutatócsoport változatos farmakológiai szűrővizsgálataiban megvizsgáltak. Előzetes eredmények alapján ez az anyag 34 nM dózisban az ebből a szempontból inaktív 20E-vel ellentétben kb. 20%-al növelte a mitokondriális genom mennyiségét, amely fokozott metabolikus aktivitásra utal.^[82] A mitokondriális DNS minősége és mennyisége ugyanakkor valószínűleg az öregedéssel is szorosan összefügg.^[83] Ez alapján a **33** vegyület további vizsgálata érdekes lehet a metabolizmussal összefüggő, és/vagy az öregedéshez is köthető krónikus betegségek modelljein kifejtett hatások (pl. anabolikus / adaptogén / antidiabetikus hatás) szempontjából. A csekély rendelkezésre álló mennyiség miatt azonban lehetőségeink a továbblépésre erősen korlátozottak voltak, így erőforrásainkat végül más kutatási irányokra fordítottuk.

4.4. TUMOR REZISZTENCIA CSÖKKENTŐ HATÁSÚ EKDISZTEROID SZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA [S8-S18]

3. TÉZIS. Elsőként mutattuk ki, hogy a relatíve **apoláris ekdiszteroid** származékok, különösen az ekdiszteroid acetonidok, jelentős **rezisztencia-csökkentő** hatást fejtenek ki mind **multidrogr rezisztens**, mind **gyógyszer szenzitív tumorsejtvonalakban** számos kemoterápiás szerre. A hatás ABCB1 transzportert (P-gp) over-expresszáló sejtvonalban jóval erősebb, mint annak szenzitív párján, de **nem** a transzporter **efflux** funkciójának **gátlásán** alapul. A legdrámaibb szenzitizáló hatást egy P-gp negatív neuroblasztóma sejtvonalon tapasztaltuk. Az újonnan állított anyagok mellett meglévő ekdiszteroid könyvtárunk farmakológiai vizsgálatát is elvégeztük, így összesen **119 anyag** hatása **alapján** derítettünk fel **szerkezet-hatás összefüggéseket**. Vizsgáltuk a szterol oldallánc, a szteránváz szubsztitúciós mintázata, nitrogén, fluor és kén heteroatomok, valamint a diolok lipofil szubsztituenseinek szerepét. A legfontosabbnak felismert, a 2,3-diolon kialakított dioxolán gyűrű savérzékenysége, valamint oldékonysággal kapcsolatos problémák és a targetálás vonzó lehetősége indokolta, hogy nanorészecskéket állítsunk elő. Ezt **szkvalénnal funkcionalizált ekdiszteroid prodrug konjugátumok** segítségével értük el, amelyek vizes közegben való önrendeződése monodiszperz, stabil **nanorészecskéket** alakított ki. A 11 α -hidroxiekdiszteroid acetonid tartalmú nanorészecskék gyógyszerrezisztenciára kifejtett hatása alapján a 2,3-acetonid csoportot egy alkalmas savrezisztens csoporttal kell helyettesíteni ahhoz, hogy ezt a stratégiát hatékonyan lehessen tumorelles célal alkalmazni, citoprotektív származékok passzív targetálására ugyanakkor alkalmas lehet a módszer.

Ezen munka során összesen **89 ekdiszteroid** származék, köztük **58 új vegyület** előállítását és vizsgálatát végeztük el.

A tézishoz kapcsolódó közlemények:

S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18 (IF= 4,400 + 4,833 + 3,737 + 1,731 + 3,098 + 3,466 + 1,776 + 2,608 + 2,134 + 2,095 + 5,614 = 35,492)

Irodalmi áttekintés a 3. Tézishoz

A WHO legfrissebb adatai szerint a tumorbetegségeket világszerte a második vezető halálökként tarthatjuk számon; ezek 2018-ban kb. 9,6 millió életet követeltek, mintegy 70%-ban alacsony-közepes gazdasági teljesítményű országokban.^[84] A legújabb kutatások többnyire biztató jövőképet festenek az immun- és/vagy génterápia lehetséges alkalmazásairól,^[85] és már vannak is elérhető immunterápiás lehetőségek egyes tumor típusok hatékony kezelésére.^[86, 87]

Ezek ugyanakkor egyrészt rendkívül drágák (pl. a Novartis génmódosított T-sejteken alapuló CAR-T immunterápiás kezelése közel félmillió amerikai dollárba kerül), másrészt hatékonyságuk sem feltétlenül fordítható le egyértelműen a beteg túlélésére.^[88] A számos praktikus, pl. gyártási nehézséget is figyelembe véve összességében nehéz megjósolni, hogy világviszonylatban valóban képes lesz-e ez a terápiás megközelítés megoldani a tumorbetegségek problémáját, és ha igen, mikor. A kismolekulás antitumor anyagok felfedezésére irányuló kutatások ennél fogva továbbra is relevánsnak tekinthetők, s kiváltképp igaz ez a természetes anyagok és származékaik ilyen célú vizsgálatára.^[1]

A kemoterápiás kezelés egyik jelentős, és máig megoldatlan korlátja az intrinsic, vagy a terápia következtében kialakuló rezisztencia, elsősorban az úgynevezett multidrog rezisztencia (MDR). Ez azt jelenti, hogy a kezelésre akár kezdetben jól reagáló tumor a terápia hatására számos, egymástól kémiaiilag adott esetben jelentősen eltérő kemoterápiás szerre is rezisztenssé válik. Ez a jelenség számos mechanizmuson keresztül kialakulhat, amelyek közül az egyik leggyakrabban előforduló az ún. efflux pumpák által biztosított MDR: olyan ATP függő transzporter fehérjék over-expressziója, amelyek nagy transzport-kapacitással és kis szubsztrát-specifitással képesek toxikus anyagokat (pl. kemoterápiás szereket) kijuttatni a sejtől, ezáltal csökkentve hatékonyságukat.^[89, 90] Az MDR efflux pumpák specifikus gátlásával való visszaszorítása egy logikusnak tűnő stratégia a kemoterápia hatékonyságának visszaállítására, sajnos azonban az erre irányuló rendkívül intenzív, közel négy évtizedes kutatások mindmáig sikertelenek maradtak. A rendkívül hatékony, erre a célra kifejlesztett efflux pumpa gátlók (pl. Tariquidar, 3. generációs ABCB1 és ABCG2 gátló)^[91] rendre elbuktak legkésőbb a fejlesztés klinikai fázisán, terápiás előnyt (= a túlélés fokozását) nem sikerült ezekkel elérni. Ennek okai között fontos szerepe lehet annak, hogy a gátlószerekkel támadott efflux pumpák rendkívül fontos fiziológiás szerepet töltenek be.^[92] A rezisztencia kialakulásában a legnagyobb incidenciával részt vevő ABCB1 transzporter (P-glikoprotein, v. Pgp)^[93] például valamennyi biológiai barrier (vér-agy gát, vér-placenta, vér-here, stb.) működésében kulcsszerepet játszik, ezáltal a szubsztrát kemoterápiás szer farmakokinetikájában és toxicitásában is meghatározó tényező.^[92, 94, 95] Az ATP-függő, rendkívül energiaigényes efflux pumpák fokozott expressziója ugyanakkor érzékenyebbé is teszi ezeket a sejteket bizonyos szerekre („kollaterális szenzitivitás”), amely egyúttal új terápiás lehetőségeket is nyithat.^[96, 97]

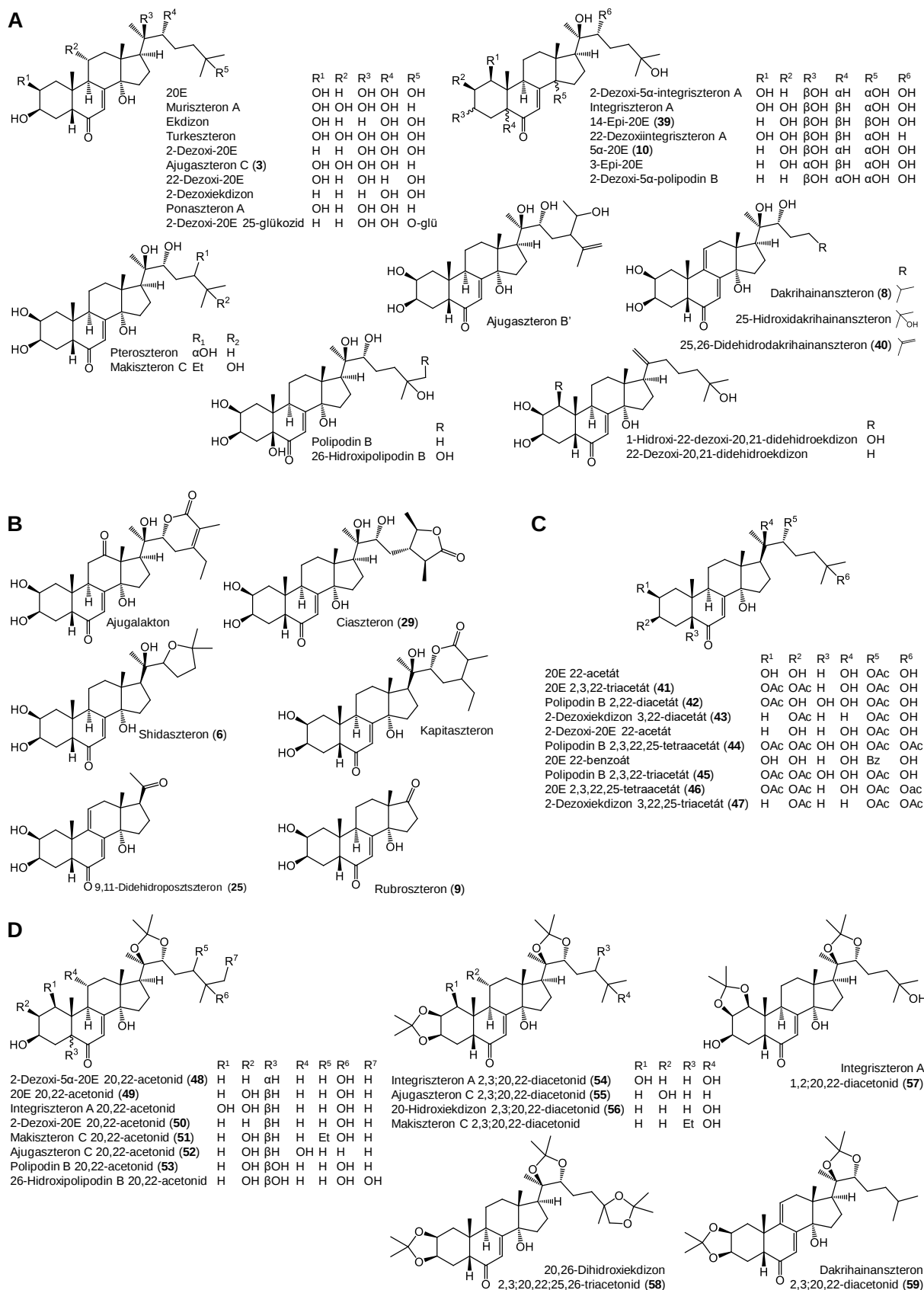
A fentieknek megfelelően vizsgálataink során érdeklődésünk elsősorban olyan anyagok előállítására és vizsgálatára irányult, amelyek funkcionális efflux pumpa gátló hatás nélkül képesek szelektíven elpusztítani az MDR tumorsejteket.

Az ekdiszteroidok tumorellenes hatásának irodalmi háttére viszonylag csekély. Leírták néhány ekdiszteroid gyenge *in vitro* antiproliferatív hatását L-1210 leukémia sejteken; a 20E IC₅₀ értéke pl. kb. 50 μ M volt.^[98] Kemopreventív hatást váltott ki a ciaszteron (lásd később; „cya” rövidítéssel), a polipodin B (pB) és a dekumbeszteron; ezek *in vitro* gátolták az Epstein-Barr vírus korai antigénjének indukcióját, és a ciaszteron *in vivo* is képes volt gátolni az egerek bőrén 7,12-dimetilbenz[a]antracén (DMBA) által kiváltott és forbol észterrel (TPA) fenntartott tumorképződést.^[99] Leírták továbbá, hogy a 20E 10 mg/kg dózisban kombinációs kezelés során képes volt előnyösen befolyásolni a ciszplatin leukémiára, ill. áttétképző melanomára kifejtett hatását egerekben *in vivo*, amely lehetővé tette hasonló hatásosság mellett a ciszplatin dózis felére csökkentését.^[100] Érdekes ugyanakkor, hogy a 20E két közeli szerkezeti analógja, a muriszteron A és ponaszteron A erős antiapoptotikus hatást váltott ki RKO vastagbél tumor sejteken.^[38]

A következő alfejezetekben természetes és félszintetikus ekdiszteroidok általunk felfedezett kemoszenzitizáló, tumorsejteken kifejtett gyógyszerrezisztencia csökkentő hatásának vizsgálatát és a kifejezetten a szerkezet-hatás összefüggések feltárásának céljából előállított anyagainkat mutatom be. Mivel az itt bemutatott, szoros kutatási együttműködésben végzett farmakológiai vizsgálatok nyers adatainak kiértékelése és értelmezése jelentős mértékben saját munkám, és sok esetben a kísérleti elrendezések megtervezésében is részt vettem, ezeket az eredményeket a korábbiaknál nagyobb részletességgel mutatom be.

Szűrővizsgálatok és a dioxolán funkciók szerepének feltérképezése [S12-S13, S16-S18]

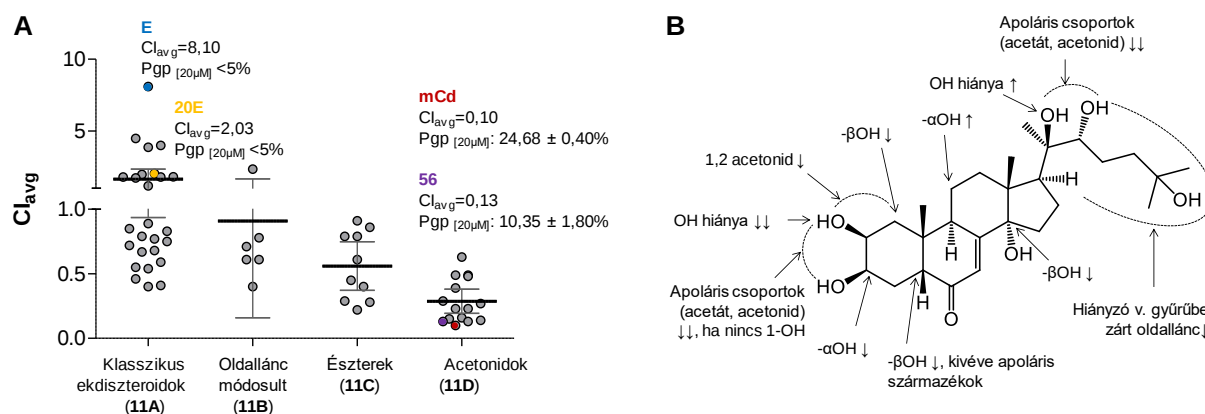
Az ekdiszteroidok tumorrezisztencia csökkentő hatását kutatócsoportunk ismerte fel először, a SZTE-ÁOK Orvosi Mikrobiológiai Intézetében Prof. Molnár József kutatócsoportjával együttműködve. A kezdeti néhány rendkívül biztató szűrővizsgálat után számos korábban előállított növényi ekdiszteroidot, és ezek egyes félszintetikusan előállított származékait is megvizsgáltuk. Mivel azt tapasztaltuk, hogy leginkább az apoláris származékoktól várhatunk erős hatást, néhány nagyobb mennyiségben rendelkezésünkre álló anyagból acetilezést és acetamidképzést is végeztünk. A munka ezen első fázisában összesen mintegy 58 anyagot vizsgáltunk, köztük „klasszikus” (i.e. teljes, nyílt szterol oldallánccal rendelkező, OH-csoportokon nem szubsztituált) fitoekdiszteroidokat, oldalláncon módosult (gyűrűzárt, vagy rövidült oldalláncot tartalmazó) származékokat, ekdiszteroid észtereket és ekdiszteroid acetamidokat [S18]. Az anyagok szerkezetét a 14. ábra mutatja be.



14. Ábra. A multidrog rezisztencia csökkentő hatás szűrvizsgálata során vizsgált ekdiszteroidok. **A:** „klasszikus”, szterol oldalláncsal rendelkező, poláris karakterű fitoekdiszteroidok, **B:** oldalláncban módosult származékok, **C:** ekdiszteroid észterek, **D:** ekdiszteroid acetonidok. A sorszámozott anyagokat jelen munka során állítottuk elő, a nem számozottak pedig kutatócsoportunk korábbi fitokémiai munkájából álltak rendelkezésünkre.

A farmakológiai vizsgálatok során két tesztet használtunk két sejtvonalon, L5178 egér limfómán (szenzitív sejtvonal) és az ebből retrovírussal transzfektált, humán ABCB1 transzportert expresszáló L5178_{MDR} sejteken (multidrog rezisztens sejtvonal).^[101] Először a rodamin123 intracelluláris akkumulációjával mértük az anyagok közvetlen, funkcionális ABCB1 gátló hatását; ez egy fluoreszcens festék, amely az efflux pumpa szubsztrátja,^[102] így egy rövid inkubációs idejű teszttel a sejtek fluoreszcenciája az efflux aktivitás arányában csökken, s ez áramlásos citometriával mérhető. A másik módszer egy 96-lyukú plate-en ún. checkerboard elrendezésben végzett citotoxicitási vizsgálat, amely a vizsgált anyag egy kemoterápiás szerrel (esetünkben doxorubicinnel) való kombinációját teszteli. A plate átlóján, és ezzel párhuzamosan a két kombinált anyag konstans koncentráció-arányú kombinációinak sorozathígításai helyezkednek el, amelyekre Chou módszere szerint a CalcuSyn szoftver használatával ún. kombinációs index (CI) értékeket számolhatunk.^[103] A CI értékek a szinergizmus/antagonizmus kvantitatív jellemzését teszik lehetővé a következők szerint: $0 < CI < 1$, szinergizmus, $CI = 1$, nincs kölcsönhatás (additív hatás), és $CI > 1$, antagonizmus. A CI értékek kiszámíthatóak a hatás teljes skálájára; antitumor tesztelés során ugyanakkor (mivel ilyen esetekben a tumor teljes eradikálása a cél) a magasabb hatás szinteken, pl. 90%-os gátlásnál mért kombinált hatás fontosabb, mint az alacsonyabb gátlás % értékeknél. Ezért az irodalomban elfogadott módon egy adott anyag CI értékeinek magasabb hatások felé súlyozott átlagát tekintettük vizsgálataink során a hatásosság mérvadó jellemzőjének.^[103] Mivel tapasztalataink szerint a különböző ekdiszteroid-doxorubicin arányok esetén a szinergizmus-antagonizmus erőssége eltér, és az arányfüggés általában harang- (antagonizmus), vagy fordított harang (szinergizmus) görbével volt jellemezhető, a szerkezet-hatás összefüggések elemzéséhez valamennyi anyag esetében a legintenzívebb kiváltott hatást (szinergizmus vagy antagonizmus) vettük figyelembe, és nem az azonos arányok hatásait hasonlítottuk össze. Legfontosabb eredményeinket röviden a 15. ábrán foglalom össze.

Míg a vizsgált ekdiszteroidok az ABCB1 transzporter funkcióját gyengén vagy egyáltalán nem gátolták, sok közülük kifejezetten erős hatással bírt az ezzel összefüggő multidrog rezisztenciára, amely a doxorubicin citotoxicitásán keresztül jól jellemezhető. Érdekes, hogy az emlősökön anabolikus és citoprotektív hatásokról ismert klasszikus, poláris ekdiszteroidok (pl. ekdizon, turkeszteron, 20E) inkább antagonistaként, a doxorubicin citotoxikus hatásától védő anyagként viselkedett, a kisebb polaritású származékok ugyanakkor inkább szinergista, a doxorubicint potencírozó hatást váltottak ki. A vizsgált ekdiszteroidok szerkezeti változatossága lehetővé tette, hogy egymástól mindössze egy funkciós csoportban eltérő anyagok páronkénti összehasonlításával specifikus szerkezet-hatás összefüggéseket vonjunk le,

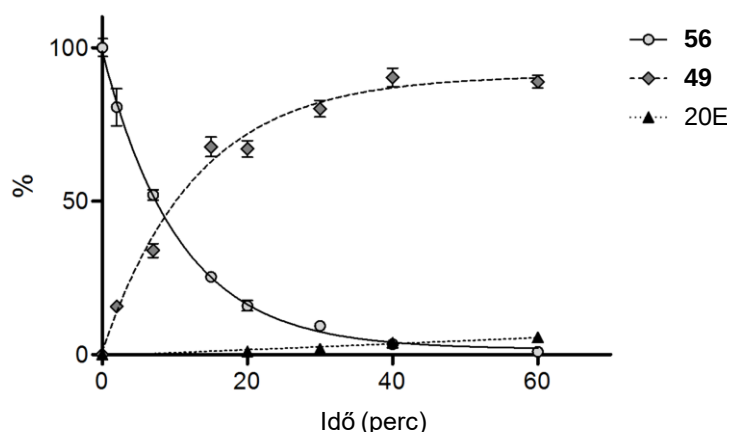


15. Ábra. Ekdiszteroidok interakciója a doxorubicin citotoxikus hatásával MDR limfóma sejteken. **A:** kombinációs indexek a magasabb szintű hatások felé súlyozva. $Cl_{avg} = (Cl_{50} + 2 \times Cl_{75} + 3 \times Cl_{90}) / 6$, ahol $0 < Cl < 1$: szinergizmus, $Cl = 1$: additív hatás, $1 < Cl$: antagonizmus. Minden pont egy anyagot jelképez, a csoportosítás a 11A-D ábrának megfelelő, csoporton belül azt átlagot és az ehhez tartozó 95% konfidencia intervallumot jeleztem. Kiemelt anyagok: ekdizon (**E**; legerősebb antagonizmus), makiszteron C 2,3;20,22-diacetonid (**mCd**; legerősebb szinergizmus), 20E, és 20E 2,3;20,22-diacetonid (**56**). $Pgp_{[20\mu M]}$: az adott koncentrációban mutatott ABCB1 gátlás a rodamin123 akkumulációja alapján számolva (%). **B:** a Cl értékekre vonatkozó szerkezet-hatás összefüggések, a fel-le nyilak az adott szerkezeti jellemző Cl értékre gyakorolt hatását mutatják.

ennek összegzését mutatja a 15B ábra. Az egyes (részben önkényesen csoportosított) ekdiszteroid családok hatását populáció szinten statisztikailag összehasonlítva egyedül az ekdiszteroid acetonidok és a „klasszikus” ekdiszteroidok Cl_{avg} értékei között találtunk szignifikáns eltérést ($p < 0,001$ egyutas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt alapján). Míg ez a fajta összehasonlítás a csoportosítás jellege miatt nyilvánvalóan összemosza az egyes anyag típusok között adott esetben meglévő különbségeket, azt mégis nyilvánvalóvá teszi, hogy az acetonid csoportok valamennyi egyéb funkciós csoportnál jelentősebbek a szerkezet-hatás összefüggések szempontjából.

Az alapvegyület, annak 20,22-acetonidja és a 2,3;20,22-diacetonid összehasonlítását több ekdiszteroidnál is lehetőségünk volt elvégezni, s ebből egyértelműen kiderült, hogy a doxorubicinnel kombinációban antagonistaként ható alapvegyület 20,22-monoacetonidja gyenge vagy közepes szinergizmust, diacetonidja pedig erős szinergizmust mutat. A 20E származékainak példáján ez rendre $Cl_{avg} = 2,03$ (20E), 0,49 (**49**) és 0,13 (**56**) értékekkel jelent meg. Az acetonid funkció egy a szerves kémiából jól ismert védőcsoport, amely savval viszonylag könnyedén eltávolítható.^[104] Fontos kihangsúlyozni azonban azt is, hogy az acetonid ugyanakkor egy biokompatibilis funkciós csoport, amely gyógyszervegyületekben is előfordul. Erre jó példa a triamcinolon acetonid, egy leginkább parenterálisan alkalmazott glükokortikoid gyógyszer, amely intakt, acetonid formájában, és nem pro-drugként fejti ki hatását,^[105] és amely szájon át való bevitel esetén is elfogadható, kb. 23%-os biohasznosulással rendelkezik.^[106] Mivel azonban az ekdiszteroid alapvegyület (pl. 20E) és annak diacetonidja

(pl. **56**) ellenkező irányú hatást is kiválthat, az acetonidok kémiai stabilitása esetünkben különösen fontos kérdés. Megvizsgáltuk ezért a 20E diacetonid (**56**) bomlásának időfüggését a gyomor savas pH-ját közelítőleg modellező (pH=1,48) körülmények között, az eredményeket a 16. ábra mutatja be.

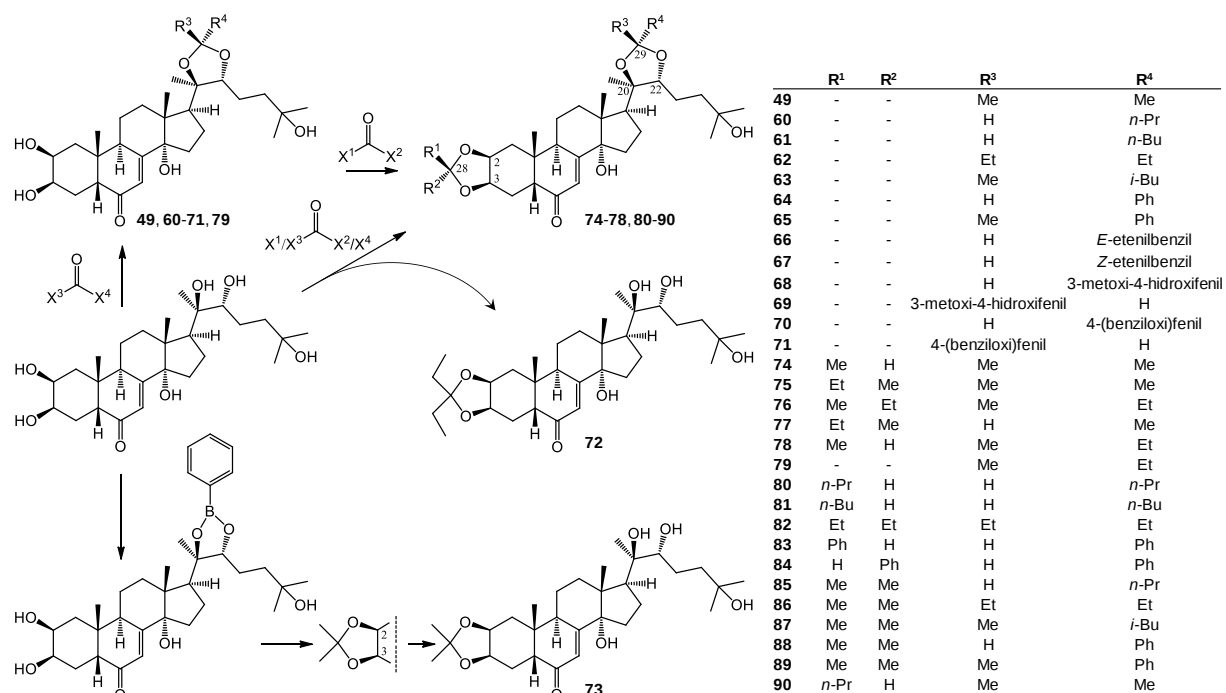


16. Ábra. 20E 2,3;20,22-diacetonid (**56**) kémiai stabilitásvizsgálata savas (pH=1,48) környezetben. A méréseket fordított fázisú HPLC-vel végeztük (víz-MeOH gradiens, Agilent Poroshell 120 EC C-8 oszlop, 3 mm × 50 mm, 2.7 μm; analízisidő: 4 perc), az eredményeket a kiindulási 20E ekvivalensében mutatom be, a méréseket 2, 7, 15, 20, 30, 40, és 60 percnél végeztük 3 párhuzamossal, a mérési pontok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve, a kinetikus görbeillesztéshez a GraphPad Prism „one-phase decay” exponenciális modelljét használtuk.

Eredményeink azt sugallják, hogy a 20E 2,3;20,22-diacetonid (és bizonyára a többi hasonló szerkezetű ekdiszteroid) alapvegyületére való bomlása szájon át való bevitel esetén is elenyésző. A 2,3-acetonid csoport viszonylag gyors, kb. 7,3 perces felezési idővel való elbomlása ugyanakkor a 20,22-monoacetonidot eredményezi, amely valamennyi vizsgált anyag esetében jóval gyengébb rezisztenciacsökkentő hatású a diacetonidnál. Ez alapján tehát ezek a vegyületek terápiás előny reményében vélhetőleg csak parenterálisan lennének alkalmazhatóak, szájon át pedig nem, vagy csak megfelelő formuláció segítségével lehetnek bevihetőek.

A 20E, a 20E 20,22-acetonid (**49**) és a 20E 2,3;20,22-diacetonid (**56**) esetében több sejtvonal és több kemoterápiás szer kapcsán is megvizsgáltuk a rezisztencia csökkentő hatást [S16]. A kezdeti vizsgálatok során használt MDR egér limfóma mellett annak szenzitív párját, valamint két, eltérő receptorális háttérű prosztata tumor sejtvonalat, egy emlőtumor sejtvonalat és annak doxorubicinhez adaptált MDR párját, valamint egy cervix karcinoma sejtvonalat és annak vinkrisztinhez adaptált MDR párját is felhasználtuk vizsgálataink során. Azt tapasztaltuk, hogy bár ezek közül a sejtvonalak közül a legerősebb rezisztenciacsökkentő hatás egyértelműen az ABCB1 transzfektált egér limfóma sejteken mutatkozik, a diacetonid (**56**) esetében ez a hatás észlelhető volt a többi, ezt az efflux transzportert nem kifejező (pl. MCF-7) sejtvonalon is a ciszplatín kivételével valamennyi kemoterápiás szerrel kombinációban.

A diacetonid származékok meggyőző rezisztenciacsökkentő hatása alapján következő célkitűzésünk az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen hatása van a bioaktivásra a dioxolán gyűrűk szubsztituenseinek. Ehhez a 20E származékait állítottuk elő oly módon, hogy azt az acetonidképzéshez hasonló körülmények között, foszformolibdénsavas katalízissel különböző aldehidekkel vagy ketonokkal reagáltattuk [S17]. Az anyagok előállításának sémáját és az így nyert származékok szerkezetét a 17. ábra mutatja be.



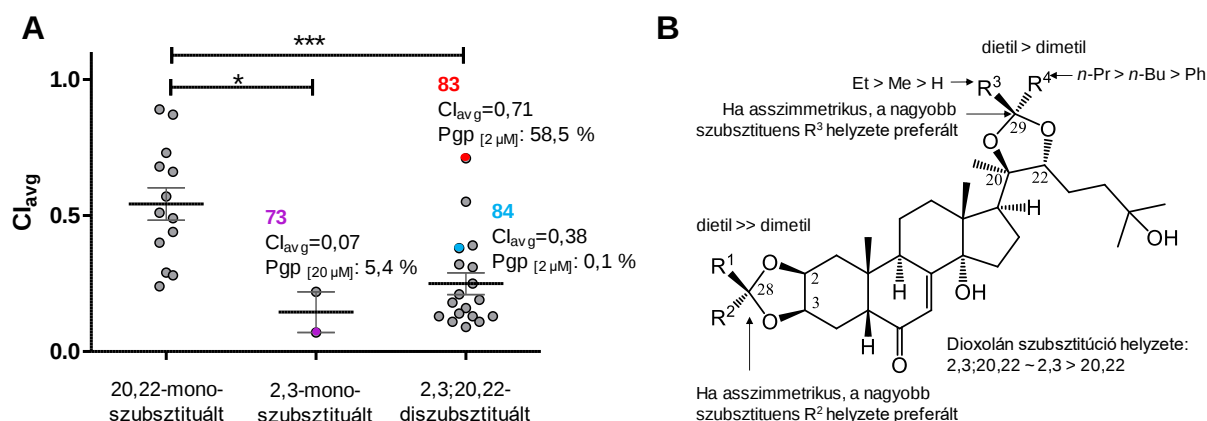
17. Ábra. A 20E 2,3- és/vagy 20,22-dioljának szubsztituált dioxolán gyűrűkkel való funkcionizálása során előállított anyagok. A reagensként használt oxovegyület szubsztituensei (X¹/X² és X³/X⁴) általában rendre megfeleltethetőek az R¹/R² és R³/R⁴ csoportoknak, kivéve a **77** és **78** anyagokat, ahol a reagens metil-etil keton volt; a **79** anyag ugyanennek a reakciónak egy mellékterméke. A **72** anyag a **82** anyag előállításánál izolált minor melléktermék.

Mivel a 20,22-diol (véltetőleg a C20-C22 kötés szabad rotációjának köszönhetően) oxovegyületekkel jóval könnyebben reagál, mint a rögzített 2,3-diol, előbbin könnyedén előállítható volt a mono-dioxolán származék (metanolban, 10 vagy 100 eq. reagensfelesleggel; **49**, **60-71**). A 20E 2,3;20,22-diacetonid (**56**) előállításával analóg módon, a reagensben oldva bisz-homo-dioxolán származékok keletkeztek (**76**, **80-84**). Néhány ilyen esetben bisz-hetero-dioxolánokat (is) nyertünk (**77**, **78**),¹¹ hetero-diszubsztituált ekdiszteroidokat ugyanakkor célzottan a 20,22-monoszubsztituált származékok ismételt, más aldehiddel vagy ketonnal való

¹¹ Mivel stratégiánk elsősorban a kémiai változatosság növelését szolgálta, a reakcióelegyek minél teljesebb feldolgozására, és a melléktermék(ek) lehetőség szerinti izolálására törekedtünk. Ez egyrészt sok esetben az új anyagok gyenge-közepes termeléseit (kb. 6-46 %) eredményezte, másrészt viszont így a termelés optimalizálás mellőzésével tudtuk erőforrásainkat a szerkezet-hatás összefüggések minél átfogóbb vizsgálatára fordítani.

reakciójával állítottunk elő (**85-90**). Ennél a lépésnél ugyanakkor a reagensként használt oxovegyület mérete korlátozó tényezőként jelent meg: nagyobb aldehideket vagy ketonokat (különösen szubsztituált aromás gyűrűt tartalmazókat, pl. a **66-71** anyagok 20,22-szubsztituensei) nem sikerült a 2,3-diolra kapcsolni. Két 2,3-monoszubsztituált származékot is előállítottunk. Ezek egyikét (**72**) a 20E dietil-ketonnal való oldószermentes reakciójának minor melléktermékeként izoláltuk. A másik ilyen típusú vegyületet, a 20E 2,3-acetonidot (**73**) háromlépéses one-pot módszerrel állítottuk elő: a 20,22-diolt fenilbórsavval védtük, ezután a 2,3-diolon acetonidot képeztünk, majd a fenilboronát védőcsoportot hidrogén-peroxiddal távolítottuk el.

Az előállított anyagok hatását a korábbi szűrővizsgálat során is alkalmazott egér limfóma sejtvonal páron vizsgáltuk, ennek legfontosabb eredményeit összegzi a 18. ábra. Ez a munka a korábbiakkal ellentétben számos erőteljes ABCB1 gátló hatású anyagot is eredményezett (pl. **83**); az efflux pumpán kiváltott közvetlen, funkcionális gátló hatás ugyanakkor látványosan nem korrelált a doxorubicin rezisztenciát csökkentő hatással. Ez utóbbi kapcsán számos új szerkezet-hatás összefüggést ismertünk fel. Talán a legjelentősebb ezek közül, hogy a 2,3-diolon kiépített dioxolán gyűrű jóval fontosabb szerepet játszik a kemoszenzitizáló hatásban, mint a 20,22-es pozíció hasonló szubsztitúciója: a két 2,3-monoszubsztituált anyag (**72**, **73**) hasonlóan erős szinergizmust mutatott doxorubicinnel, mint a megfelelő 2,3;20,22-diszubsztituált származékok, és utóbbiakhoz hasonlóan egyértelműen jóval erősebben hatottak 20,22-monoszubsztitált analógjaiknál. Érdekes a C-28 és C-29 szénatomok konfigurációjára vonatkozó felismerésünk is. A nagyobb szubsztituensek térállása elkülöníti egymástól az efflux pumpa gátló és a rezisztencia-csökkentő hatást, pl. a **83**, 28 β -fenil származék viszonylag erős (2 μ M koncentrációban 58,5%) ABCB1 gátlást és doxorubicinnel gyenge szinergizmust ($CI_{avg}=0,71$) mutatott, ennek 28-epimerje, a **84** anyag viszont 2 μ M koncentrációban nem gátolta az ABCB1 mediálta effluxot, ugyanakkor doxorubicinnel erősebb szinergizmusban ($CI_{avg}=0,38$) hatott (18A ábra).

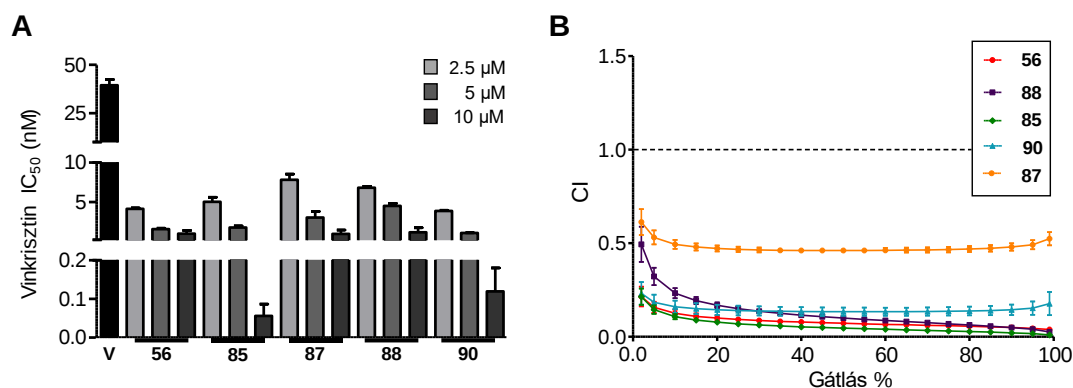


18. Ábra. Félszintetikus ekdiszteroid dioxolánok kölcsönhatása a doxorubicin citotoxikus hatásával MDR limfóma sejteken. **A:** kombinációs indexek a magasabb szintű hatások felé súlyozva, a 15. ábrához hasonlóan bemutatva. Kiemelt anyagok: 20E 2,3-monoacetamid (73) – a legerősebb szinergizmus, ABCB1 gátlás szempontjából 20 μ M koncentrációban inaktív; és két 28-fenil szubsztituált származék: 83 – 28 β -fenil, gyenge szinergizmus, 2 μ M koncentrációban közel 60% ABCB1 gátlás; 84 – 28 α -fenil, közepesen erős szinergizmus, 2 μ M koncentrációban ABCB1-en inaktív. **B:** a doxorubicinnel való szinergizmus erősségére vonatkozó szerkezet-hatás összefüggések.

Az előállított dioxolánok egy részét, valamint természetes ekdiszteroidok egy kiválasztott sorozatát (20E, 2-dezoxi-20E, ezek 22- β -D-glükopiranozidjai, 20E 22-acetát, polipodin B, ekdizon, 22-dezoxi-20E, integriszteron A, ajugalakton, 3, 6, 8, 21, 41-42, 46, 49, 56, 60-61, 63-66, 68-73, 79-82, 85-90) a központi idegrendszeri tumorok lehetséges kezelésének szempontjából is megvizsgáltuk [S13]. Ennek kapcsán Dr. Balogh György Tiborral (a munka elvégzésekor Richter Gedeon Nyrt, jelenleg BME Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék) való kutatási együttműködésben először egy *in-silico* és *in vitro* PAMPA¹² szűrővizsgálat keretében kiválasztottuk azokat az anyagokat, amelyek várhatóan képesek passzív diffúzióval átjutni a vér-agy gáton. A fent felsorolt ekdiszteroidok közül az 56, 85, 87-88 és 90 anyagok feleltek meg valamennyi kritériumrendszernek és mutattak jó BBB penetrációt. Ezeket az anyagokat ezután megvizsgáltuk egy központi idegrendszeri eredetű tumorsejtvonalon, az SH-SY5Y neuroblasztómán vinkrisztinnel való kombinációban; a vinkrisztin citotoxicitására kifejtett hatásukat a 19. ábra mutatja be.

A vizsgált neuroblasztóma sejtvonal nem multidrog rezisztens, ABCB1 transzportert nem fejez ki, amit az is jól mutat, hogy a vinkrisztin önmagában is erős citotoxikus hatást váltott ki 39,5 nM IC_{50} értékkel. A vizsgált ekdiszteroidok, különösen a 85 és 90, ugyanakkor drámai szenzitizáló hatást mutattak: a legerősebb hatású, 85 anyag (amelynek saját citotoxikus IC_{50} értéke 196 μ M volt) mindössze 10 μ M koncentrációban 3 nagyságrenddel fokozta a vinkrisztin hatását (IC_{50} =56 pM), amely a fenti ábrákon bemutatott súlyozott átlag kombinációs indexben

¹² PAMPA: parallel artificial membrane permeability assay; 96-lyukú ún. „szendvics” plate donor és akceptor oldalán méri egy szövetspecifikus (jelen esetben vér-agy gát) lipid-keverék segítségével előállított membránon keresztül történő passzív diffúziót.



19. Ábra. A vér-agy gáton passzív diffúzióval átjutni képes ekdiszteroid származékok kölcsönhatása a vinkrisztin citotoxikus hatásával SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalon. **A:** az ekdiszteroidok koncentrációfüggő hatása a vinkrisztin IC_{50} értékére (nM). **B:** a kölcsönhatásra jellemző, számolt kombinációs index (CI) értékek hatásfüggése (5-95% gátlás), $0 < CI < 1$: szinergizmus, $CI = 1$: additív hatás, $1 < CI$: antagonizmus.

kifejezve $CI_{avg} = 0,029$, extrém erős szinergizmust jelent. A vizsgált ekdiszteroidok rendkívül erős rezisztenciacsökkentő hatása miatt az SH-SY5Y sejtvonal különösen alkalmas lehet a hatásmechanizmus felderítését célzó vizsgálatok elvégzésére, ezt a közeljövőben kutatási együttműködés keretében tervezzük megvalósítani.

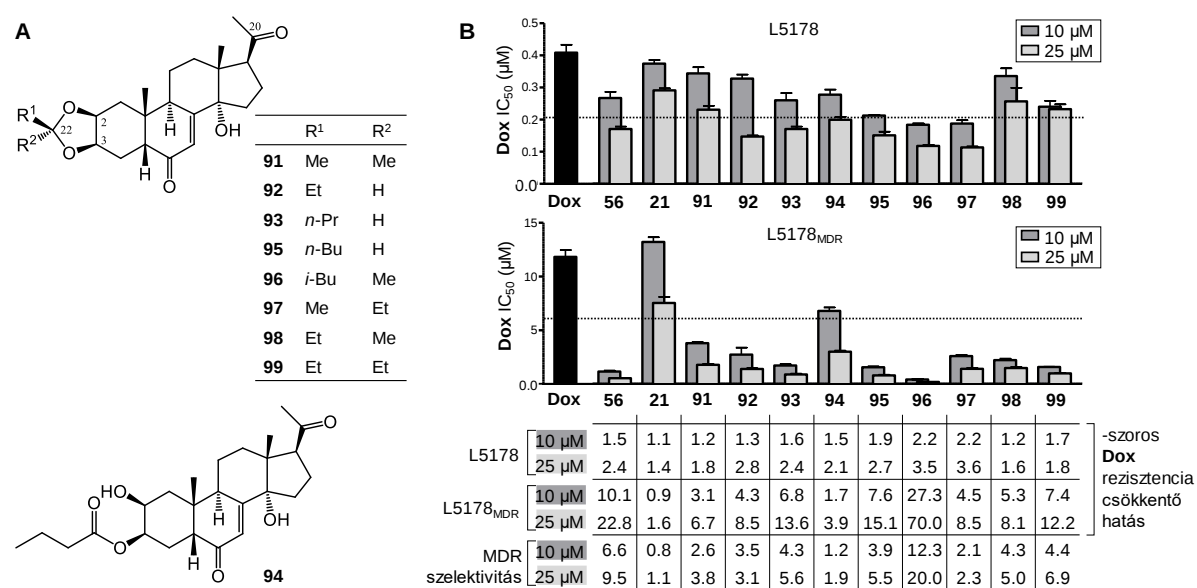
A posztsteron 2,3-diolján szubsztituált származékok előállítása és vizsgálata [S12]

Figyelembe véve azt, hogy a tumor-rezisztencia csökkentő hatás szempontjából az ekdiszteroidok 2,3-diolján kialakított dioxolán gyűrűk a legfontosabbak, célunk volt annak felderítése is, hogy a hatás mennyiben módosul a 20,22-diolon nem szubsztituált anyagok várható metabolitjai, tehát a posztsteron (**21**) megfelelő dioxolán analógjai esetében. Elvégeztük ezért a posztsteron reakcióját is különböző aldehidekkel és ketonokkal. A korábban tapasztalt meglehetősen gyenge termelések (lásd fentebb, 20E változatosan szubsztituált származékainak előállítása) miatt foszformolibdénsav helyett ezúttal *p*-toluolszulfonsavat használtunk, amely az acetonid védőcsoport beépítés egy másik, gyakran használt katalizátora.^[107] Az így nyert anyagok szerkezetét a 20A ábra mutatja be.

A **91-93** és **95-99** anyagok a várt dioxolán gyűrűket tartalmazó ekdiszteroid származékok. A reakciók során a nagyobb méretű szubsztituens preferáltan a 22 β pozícióba épült be, és mindössze a **97-98** anyagok esetén sikerült mindkét 22-epimert előállítanunk. Bár a reakciók során valamennyi esetben egy főtermék képződését tapasztaltuk, a termelések az acetonid származék **91** kivételével alacsonyak (általában <25%) maradtak. Ez több tényezőre is visszavezethető, egyrészt a kromatográfiás tisztítás során a kisebb tisztaságú frakciók feldolgozását mellőztük, másrészt számos minor szennyező és/vagy bomlástermék is

képződött. Erre egy példa a **94** anyag, amely a posztszteron butiraldehiddel végzett reakciójának egyik (feltehetően a köztitermék hemiacetál oxidációjával keletkező) mellékterméke. Tekintettel azonban arra, hogy a munka célja ezúttal is elsősorban a szerkezet-hatás összefüggések vizsgálata volt és valamennyi célvegyületből rendelkezésre állt elegendő mennyiség a farmakológiai vizsgálatok elvégzéséhez, további reakcióoptimalizálást nem végeztünk.

Az előállított anyagok hatását a korábban is használt egér limfóma sejtvonal páron vizsgáltuk. Az ABCB1 transzporter funkcióját egyedül a **96** anyag gátolta (20 μ M-ban 56,4% gátlás; 20E diacetonid (**56**) ugyanebben a dózisban kb. 10% gátlás), az összes többi anyag inaktív volt. Az anyagok doxorubicin-rezisztenciára kifejtett hatását az egér limfóma sejtvonal pár mindkét (gyógyszer-szenzitív és multidrog rezisztens) tagján teszteltük a 20E 2,3;20,22-diacetonid (**56**) hatásával összehasonlítva. A **91-99** anyagok citotoxicitása gyengébb volt az oldallánccal rendelkező származékokénál, így, mivel önálló gátló hatásukat nem tudtuk megbízhatóan mérni 150 μ M koncentrációjú maximális dózisú kezeléssel, citotoxikus hatásukat elhanyagolhatónak vettük, és szinergizmus számítása helyett a doxorubicin IC₅₀ értékeit hasonlítottuk össze az anyagok jelenlétében, ill. nélkülük. Ezeket az eredményeket a 20B ábra foglalja össze.



20. Ábra. A: A posztszteronból előállított apoláris ekdiszteroid származékok (**91-99**) szerkezete. A **94** anyag a **93** előállításának mellékterméke. **B:** az anyagok hatása a doxorubicin (**Dox**) citotoxikus IC₅₀ értékére szenzitív (L5178) és multidrog rezisztens (L5178_{MDR}) egér limfóma sejteken. Rezisztencia-csökkentő hatás: IC₅₀^{Dox}/IC₅₀^{ekdiszteroid + Dox}; MDR szelektivitás: a megfelelő értékekre IC₅₀^{szenzitív}/IC₅₀^{MDR}.

Korábbi hasonló, IC₅₀ értékeket kombinációs index számítása nélkül összehasonlító kísérleteinket [S16] alapul véve a doxorubicin citotoxicitásának legalább kétszeresére való fokozását tekintettük releváns rezisztenciacsökkentő hatásnak. A kontrollként vizsgált

posztiszteron (**21**) eszerint nem volt hatásosnak tekinthető, a melléktermékként nyert 3-acil származék (**94**) pedig viszonylag gyenge hatást fejtett ki. A legerősebb szenzitizáló hatást egyértelműen a nagy térkitöltésű 22 α -izobutil szubsztituenst tartalmazó **96** anyag váltotta ki, amely ugyanakkor 25 μ M koncentrációban már direkt (kb. 50%) ABCB1 efflux-pumpa gátló hatást is kifejtett. Figyelemre méltónak tartjuk az effluxot az alkalmazott dózisban közvetlenül nem befolyásoló **91-93**, **95**, és **96-99** anyagok MDR-szelektív rezisztencia csökkentő hatását. Ezeknél az anyagoknál megfigyelhető volt, hogy az MDR szelektivitás változatossága leginkább a gyógyszer-szenzitív sejtvonalon kifejtett hatások közötti eltérésekből adódik. Különösen érdekes ebből a szempontból a két 22-epimer esete: az MDR sejtek rezisztenciáját hasonló mértékben csökkentették, a **97** anyag (22 α -etil, 22 β -metil) azonban a gyógyszer-szenzitív sejtvonalon is hatásos volt, a **98** pedig nem.

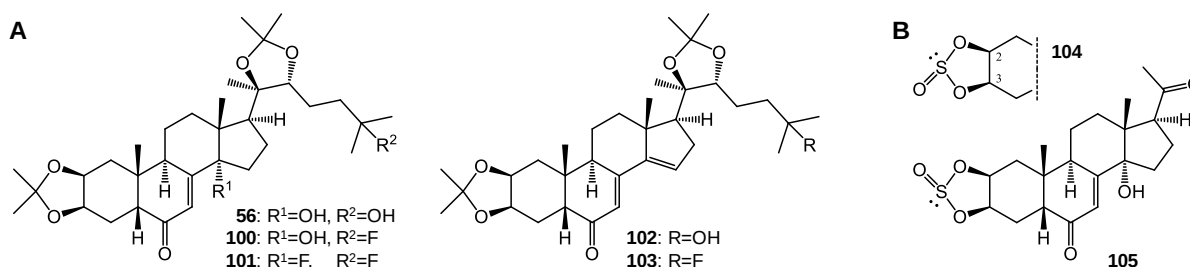
Összességében kijelenthető, hogy az ekdiszteroid dioxolánok szterol oldalláncának eltávolítása a citotoxicitás csökkenését és a direkt efflux pumpa gátló hatás csökkenését / megszűnését eredményezi, amely ugyanakkor (**56** és **91** összehasonlítása alapján) valamelyest csökkenti, de nem szünteti meg az MDR specifikus rezisztencia csökkentő hatást. Jelenlegi eredményeink alapján (és kiváltképp az ismeretlen hatásmechanizmus fényében) nem egyértelmű, hogy az ABCB1 efflux pumpát nem kifejező sejteken kifejtett szenzitizáló hatás is előnyös lehet-e. Ennek tisztázására számos további vizsgálatot tervezünk, ideértve a hatás tumor szelektivitásának primer, normál sejteken való vizsgálatát is.

F-, S-, vagy N-tartalmú származékok előállítása és vizsgálata [S8, S11, S14-S15]

Az ekdiszteroid dioxolán származékok tumor-rezisztencia csökkentő hatása a továbbiakban arra inspirált minket, hogy megvizsgáljuk különböző heteroatomok beépítésének a hatásban játszott esetleges szerepét. Ehhez két fő irányban indítottunk vizsgálatokat, fluor és nitrogén tartalmú származékok előállítására.

A rendelkezésre álló gyógyszerkincsben kiemelt szerep jut a fluornak, mint alkotóelemnek: a kis méretű, ugyanakkor rendkívül nagy elektronegativitású fluor atom a legsikeresebb, ún. „blockbuster” gyógyszerek kb. felében jelen van, és az FDA csak pl. 2018-ban 17 fluortartalmú gyógyszert törzskönyvezett.^[108] Ennek alapján egyik célunk ilyen ekdiszteroidok előállítása volt. Másrésről ismert, hogy az ABCB1 efflux transzporter szubsztrátjai és gátlószerei között leginkább lipofil, nitrogén tartalmú anyagok találhatók, ezért kíváncsiak voltunk az ilyen irányú módosítások bioaktivásra kifejtett hatására is. Ennek vizsgálatára az oxim funkciót választottuk ki, amely egy sokoldalú kémiai építőelem,^[109] és amelyet korábban orosz kutatók már sikeresen alakítottak ki ekdiszteroidok 6-os szénatomján.^[110, 111]

Fluorozott származékok előállításához a 20E 2,3;20,22-diacetonidot (**56**), ill. a a három hidroxilcsoportot tartalmazó posztszteront (**21**) választottuk. Mindkét kiindulási anyagot dietilamino-szulfur-trifluoriddal (DAST) reagáltattuk vízmentes diklórmétánban. Mint korábban, a kémiai változatosság növelése érdekében a reakció optimalizálás helyett a kromatográfiás tisztításra, és minél több termék preparatív előállítására fordítottunk nagyobb figyelmet. Az **56** anyagból négy (**100-103**) [S15], a posztszteronból két (**104-105**) [S14] terméket nyertünk; az anyagok szerkezetét a 21. ábra mutatja be.

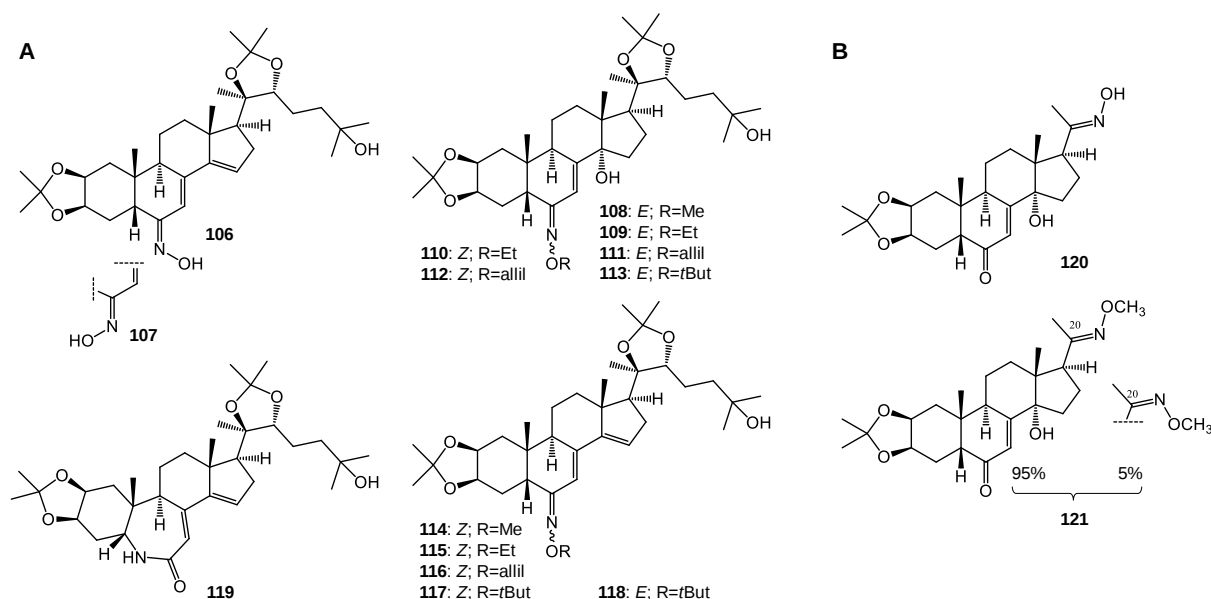


21. Ábra. Ekdiszteroidok DAST-tal nyert reakcióelegyeiből izolált termékek. **A:** a 20E diacetonid (**56**) termékei (**100-103**), **B:** a posztszteron (**90**) termékei (**104-105**).

A fluorozás mellett a DAST egyéb reakciókat is képes katalizálni, így a vízkilépésre (**102-103**) és a ciklikus szulfít észter (**104-105**) képzésre is találunk irodalmi példákat.^[112, 113] A DAST által katalizált fluorozás mind S_N1, mind S_N2 mechanizmussal megtörténhet.^[114] A 14-es helyzetben fluorozott **101** anyag esetén a fluor térállása a ¹³C NMR eltolódások alapján megtartotta az alfa pozíciót, amely arra utal, hogy (merev gyűrűrendszer esetén nem meglepő módon)^[114] a hidroxilcsoport lecserélődése S_N1 reakciómechanizmussal történt. Ez a karbokation köztitermék miatt kedvez a Δ¹⁴⁻¹⁵ kettőskötés kialakulásának; ez lehet az oka annak, hogy a **101** anyag esetén tapasztaltuk a legkisebb (3,3%) termelést, szemben a **100**, **102** és **103** anyagok rendre 16,6%, 35,3%, és 17,2% értékeivel.

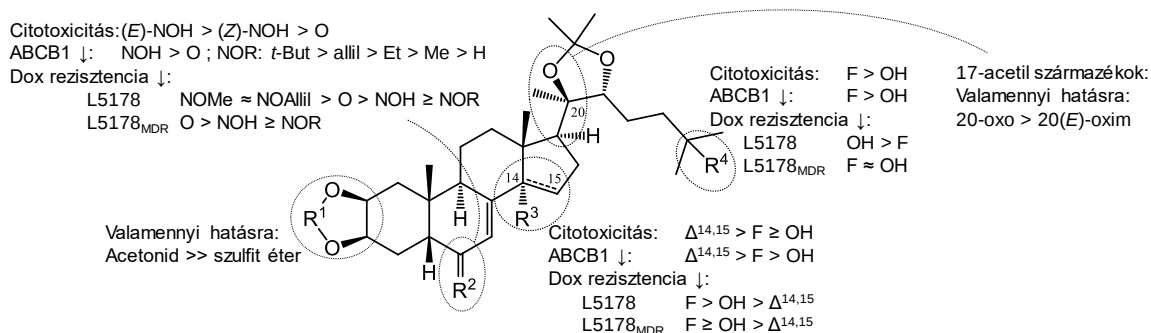
Nitrogéntartalmú ekdiszteroid származékok előállításához is egyrészt az **56**, másrészt pedig (a 17-acetilcsoport átalakítása céljából) a **91** anyagot vettük kiindulási alapnak. Az **56** anyagból hidroxilamin ill. alkoxi-amin hidroklorid sók felhasználásával *E*- és *Z*-oximot (rendre **106** és **107**), ill. oxim étereket (**108-118**), a **106** anyag *p*-toluolszulfonsav katalizált Beckmann átrendeződésével pedig laktámot (**119**) nyertünk. Ezek az anyagok a feldolgozás közben hajlamosak voltak savkatalizált vízeliminációval elveszíteni a 14-OH csoportot (**106-113**), amely azonban a reakcióelegy semlegesítésével megelőzhető volt (**114-118**) [S8]. A **91** anyag esetén a 20-oxo csoport jóval reaktívabbnak bizonyult oximképzés szempontjából, mint a 6-enon, így nyertük a posztszteron 2,3-acetonid 20-oximot (**120**). Mivel ez utóbbi egyetlen izolálható terméként keletkezett, a 20-oxim térállásának NMR segítségével való egyértelmű

eldöntéséhez állítottuk elő a **121** keveréket, amely 95:5 arányban tartalmazta az *E/Z* izomereket, ezáltal referenciaként lehetővé tette a **120** anyag 20*E*-oximként való egyértelmű asszignálását [S11]. Az előállított N-tartalmú ekdiszteroidok szerkezetét a 22. ábra mutatja be.



22. Ábra. N-tartalmú ekdiszteroid származékok. **A:** a 20*E* diacetonid (**56**) termékei (**106-119**); a **119** laktámot a **106** anyag Beckmann átrendeződésével állítottuk elő. **B:** a posztszteron 2,3-acetonid (**91**) termékei (**120-121**). A **121** anyag az *E*- és *Z*-oxim 95:5 arányú keveréke.

A **100-120** anyagok antitumor hatását a korábbi vizsgálatoknak megfelelően teszteltük az egér limfóma sejtvonal páron, és a **100-103**, valamint a **106-120** anyagok önálló citotoxikus hatását egy humán nőgyógyászati tumor panelen is megvizsgáltuk. Az észlelt szerkezet-hatás összefüggések tömör összefoglalását a 23. Ábrán mutatom be.



23. Ábra. Fluor, kén vagy nitrogén heteroatomot tartalmazó ekdiszteroid származékok szerkezet-hatás összefüggései citotoxikus, funkcionális ABCB1 gátlás, és doxorubicin (Dox) rezisztencia csökkentő hatásra nézve. Az oxim éter származékok citotoxikus hatása erősen sejtvonal függő, de alapvegyületüknél erősebb volt.

A szerkezeti módosítások közül a legfontosabbakat kiemelve elmondható, hogy 1) a 14-fluorsubsztitúció valamennyi vizsgált hatást fokozza, s ez különösen igaz a szenzitív sejtek doxorubicin rezisztenciájának további csökkentésére (ezáltal az MDR szelektivitás is csökken, ami érdekes annak fényében, hogy a **101** vegyület az **56**-nál egy nagyságrenddel erősebb

ABCB1 gátló); 2) az oxim-éter funkció, különösen Δ^{14-15} kettőskötéssel együtt jóval erősebb ABCB1 gátlás mellett valamelyest gyengébb (de továbbra is erős) rezisztencia-csökkentő hatást eredményez, és 3) a **119** laktám nem citotoxikus, nem ABCB1 gátló, mégis valamennyi fenti anyag közül a legerősebb rezisztencia csökkentő hatást váltja ki. A jelenleg rendelkezésünkre álló adatok alapján így összességében ezt a laktámot (**119**) tartjuk a legígéretesebb rezisztencia csökkentő vegyületünknek.

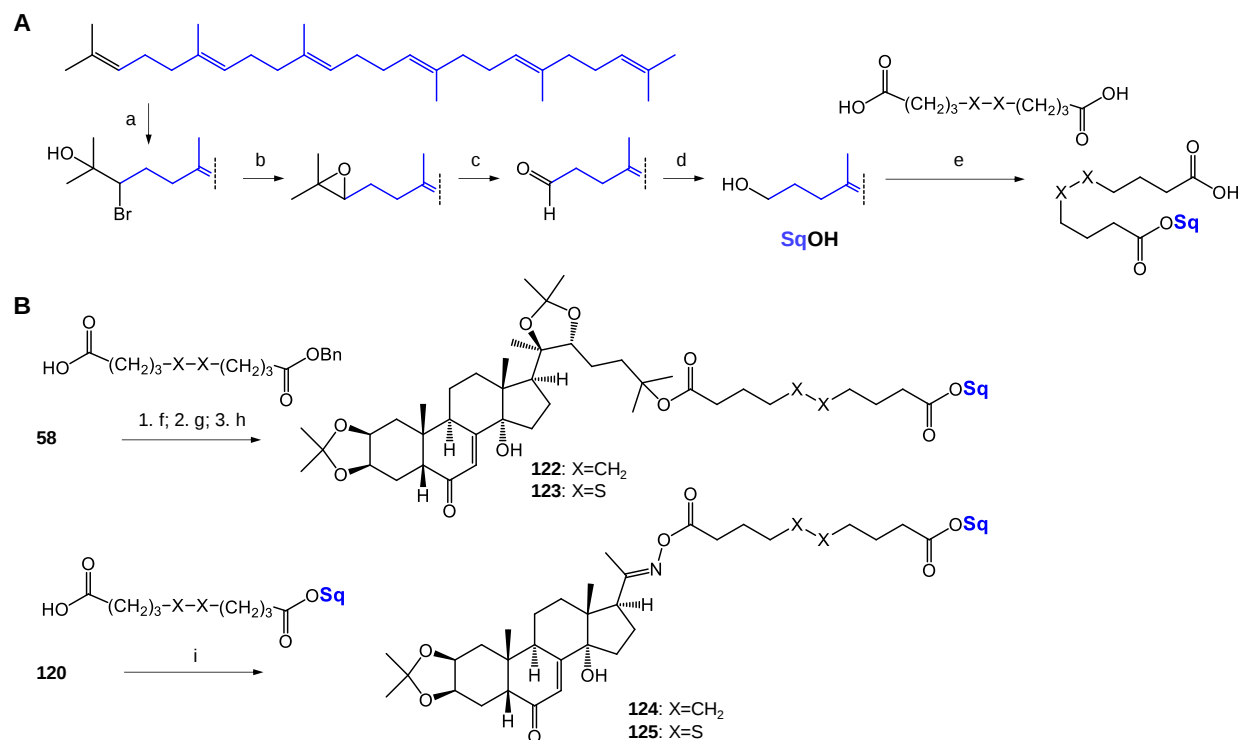
Önrendeződő, ekdiszteroid-tartalmú nanorészecskék előállítása és vizsgálata [S8, S10, S11]

Az apoláris ekdiszteroid származékoknak az előzőekben bemutatott, adjuváns antitumor céllal történő alkalmazása felvet néhány gyakorlati problémát. Ezek közül talán a legfontosabb a 2,3-acetonid csoporthoz kötődik, amely egyrészt a hatás szempontjából látványosan legfontosabb szerkezeti elem [S17], másrészt pedig a kémiai leginkább érzékeny is: a 2,3-acetonid csoport savra sokkal érzékenyebb, mint a 20,22-acetonid [S18]. Bár a gyomorsav hatása megfelelő formulálással és/vagy parenterális alkalmazással természetesen kivédhető, ill. megkerülhető, érdemes megjegyezni, hogy a szolid tumorszövet és mikrokörnyezete jellemzően metabolikus acidózis állapotában van,^[115] így tehát antitumor alkalmazásra szánt anyagok savérzékenysége semmiképpen sem egy előnyös tulajdonság. Emellett az ekdiszteroid diacetonidok viszonylag apoláris karaktere miatt vizes közegben nem könnyű dolgozni velük, hajlamosak kicsapódni, s ez jelentősen megnehezítette kezdeti próbálkozásainkat *in vivo* kísérletek elvégzésére (ezeket jelen munkában nem tárgyalom).

A Milánói Egyetem egyik kutatócsoportjával való együttműködésünk keretében ugyanakkor a közelmúltban lehetőségünk nyílt eszköztárunkban meghonosítani egy olyan módszert, amelytől mindezen nehézségek egyszerű és frappáns áthidalását várhattuk: hidrolizálható kötéseket tartalmazó linkerrel keresztül olyan pro-drug konjugátumokat állítottunk elő, amelyek hosszú lipofil oldalláncuk miatt vízben önrendeződve nanorészecskéket képeznek.

Az önrendeződést szkvalén eredetű oldallánc beépítésével értük el az eredetileg Couvreur (Paris-Saclay University, Párizs, Franciaország) kutatócsoportja által kidolgozott,^[116-118] és Passarella (University of Milan, Milánó, Olaszország) kutatócsoportja által kémiai átdolgozott^[119-121] módszer szerint. Az így előállított nanorészecskék különleges viselkedést mutatnak: a véráramba jutva nem maradnak meg nanorészecske formában, hanem feloldódnak a vér lipoproteinjeiben, elsősorban az LDL-ben, s ez fogja szállítani a konjugátumokat.^[122] Ezáltal a szkvalénnel konjugált pro-drug elsődleges célpontjai LDL receptort over-expresszáló szövetek lesznek, pl. a rendkívül nagy tápanyag igényű tumorszövet. Az LDL receptorcsaládot

változatos tumor típusok kapcsán javasolták lehetséges terápiás célpontként.^[123-126] Az olasz kutatócsoporttal együttműködésben végzett munka számos anyag előállításához vezetett, amelyek közül saját hozzájárulásunk a 20E 2,3;20,22-diacetonid és a posztszteron 2,3-acetonid 20(*E*)-oxim néhány származékának előállítására vonatkozott [S10, S11]; jelen dolgozatban ezeket tárgyalom. Az anyagok előállítását és szerkezetüket a 24. ábrán mutatom be.

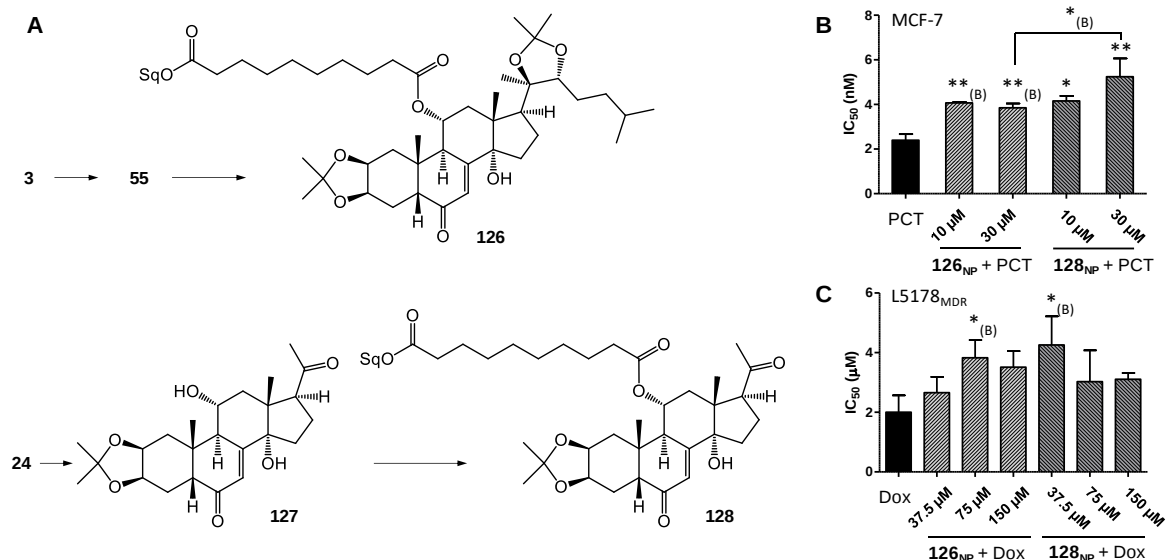


24. Ábra. Vizes közegben önrendeződő, hosszú szénláncú pro-drug konjugátumok előállítása a 20E 2,3;20,22-diacetonidból (**58**) és a posztszteron 2,3-acetonid 20(*E*)-oximból (**120**). **A:** Az oldallánc előállítása. **B:** Az ekdiszteroidok funkcionálisizálása. Az előállítás körülményei: a) NBS / THF_(aq), RT, 30 min; b) K₂CO₃/MeOH, RT, 3 h; c) H₅IO₆ / H₂O:dioxán (7:3); d) NaBH₄/EtOH, AcOH, RT, 10 h; e) EDC + DMAP/CH₂Cl₂, Ar atmoszféra, RT, 6 h; f) DCC + DMAP / CH₂Cl₂(anh), 0°C; g) Pd(OH)₂ + H₂ / EtOAc; h) EDC + DMAP + SqOH / CH₂Cl₂

Az előállított konjugátumok acetonos oldatának lassan vízbe csepegtetésével, majd az aceton vákuum alatti elpárolásával végzett, ún. nanoprecipitáció segítségével alakítottuk ki a nanorészecskék vizes oldatát. Az együttműködő kutatócsoport korábban a doxorubicin szkvalénnel konjugált származékát is előállította, s ennek az ekdiszteroid konjugátumokkal együtt történő vizes fázisba átvitelével heteronanorészecskéket is előállított. Partnereink kimutatták, hogy ezek a heteronanorészecskék (amelyek 1:50 arányban tartalmazták a doxorubicin, és az arra szenzitizáló ekdiszteroid megfelelő pro-drugjait) jóval hatékonyabbak doxorubicinhez adaptált A2780_{Adr} MDR ovárium carcinoma sejtek ellen, mint akár alapvegyületeik, akár a külön-külön képzett nanorészecskék, s igazolták a nanorészecskék sejtek által való felvételét is [S10].

Vizsgálataink ezután további ekdiszteroid acetonidok nanokonjugátumainak előállítására irányultak [S8], amelyre két 11 α -hidroxiekdiszteroid, az ajugaszteron C (**3**) és ennek 20,22-

láncasítással előállított metabolitjának (11 α -hidroxiposztszteron; **24**) származékait választottuk ki; az ezekből a fentiek szerint előállított anyagok (**126-128**) szerkezetét a 25. ábra mutatja be. Ezeket az ekdiszteroid konjugátumokat és a belőlük előállított nanorészecskéket hazai együttműködések keretében vizsgáltuk tovább; a nanorészecskék jellemzését Prof. Kónya Zoltán (SZTE-TTIK Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék) kutatócsoportával együttműködésben végeztük. Az előállított anyagok és nanoszuszpenzióik hatását több tumor sejtvonalon teszteltük, s számos váratlan megfigyelést tettünk.



25. Ábra. A: További pro-drug konjugátumok előállítása ajugaszteron C 2,3;20,22-diacetonidból (**55**) és 11 α -hidroxiposztszteron 2,3-acetonidból (**120**). A reakciókörülmények a korábbiak szerintiék; Sq: lásd 20A ábra. **B:** A **126** és **128** anyag önrendeződésével előállított nanoszuszpenziók (rendre **126_{NP}** és **128_{NP}**) hatása paklitaxel (PCT) citotoxicitására MCF-7 sejteken; **C:** lószérumban előzetesen 24 óráig inkubált **126_{NP}** és **128_{NP}** hatása doxorubicin (Dox) citotoxicitására L5178_{MDR} sejteken.

Az tapasztaltuk, hogy (korábbi munkánk során a 20E 2,3;20,22-diacetonid (**56**) rezisztenciacsökkentő hatásával szemben [S16]) az ajugaszteron C 2,3;20,22-diacetonid (**55**) kismértékben, a láncrövidült **127** anyag pedig jelentősen fokozta az MCF-7 sejtek paklitaxel rezisztenciáját, és ennek megfelelően hatott a **128** konjugátumból nyert nanoszuszpenzió (**128_{NP}**) is. Ez aláhúzza a 11 α -hidroxilcsoport fontosságát a szerkezet-hatás összefüggések szempontjából. Várakozásainkkal ellentétben ugyanakkor hiába hatott az ajugaszteron C 2,3;20,22-diacetonid (**55**) doxorubicinnel erős szinergizmusban L5178_{MDR} sejteken (CI₅₀ 0,09-0,13), az **55** pro-drugjának szánt **126** anyagból nyert nanoszuszpenzió (**126_{NP}**) hatása inkább gyenge antagonizmus volt. Ez alapján újra terveztük a kísérleti elrendezést. Elgondolásunk azon alapult, hogy mivel *in vivo* a szkvalén-konjugált nanorészecskék lipoproteinekbe beoldódva működnek, relevánsabb eredményeket várhatunk akkor, ha a nanoszuszpenziót kezelés előtt felvesszük a médiumban is használt szérum szupplementumban (lószérum). Az

ilyen módon előkezelt nanorészecskéket dinamikus fényszórás (DLS) segítségével vizsgáltuk, és azt találtuk, hogy 24 órás szérumban való inkubálás hatására a részecskék mérete várakozásainknak megfelelően jelentősen csökken, s a nanorészecskéket gömb alakúnak feltételezve a **126_{NP}** nanoszuszpenzió **126**-tartalmának kb. 68%-át, ill. a **128_{NP}** **128**-tartalmának kb. 58%-át lipoproteinekben oldottnak tekinthetjük. Meglepetésünkre az így előkezelt nanoszuszpenziók is szignifikáns mértékben fokozták az L5178_{MDR} sejtek doxorubicin rezisztenciáját. Ennek az lehet a logikus magyarázata, hogy (a feltehetően szabad diffúzióval a sejtbe jutó ekdiszteroid acetamidokkal szemben) a konjugátumok a lipoproteinek endocitózisával jutnak be sejtekbe,^[127] így az endoszómák lizoszómává alakulása során végeredményben egy savas környezetbe (pH kb. 4,5) kerülnek.^[128] Ez alapján (és figyelembe véve a klasszikus, nem-acetamid típusú ekdiszteroidok rezisztencia fokozó hatását) nagyon valószínű, hogy az ekdiszteroid 2,3-acetamidok szkevalén konjugátumainak nanoszuszpenziói nem a megfelelő acetamid, hanem a 2,3-diolt szabad formában tartalmazó anyag pro-drugjaiként működnek. Ez két fontos tanulsággal is szolgál. Egyrészt, a 20E 2,3;20,22-diacetamid konjugátumaival tapasztalt doxorubicin rezisztencia-csökkentő hatás [S10] nagy valószínűséggel nem a diacetamid (**56**), hanem a 20,22-monoacetamid származék (**49**) felszabadulásának volt köszönhető; ez utóbbi szintén aktív, bár a diacetamidnál jóval gyengébb hatású [S18]. Ez azt is jelentené, hogy a korábban már ígéretesnek talált doxorubicin-ekdiszteroid heteronanorészecskék hatása jelentős mértékben tovább fokozható lehet egy a 2,3-acetamid csoport helyett egy megfelelő savrezisztens apoláris szubsztituenst tartalmazó ekdiszteroid származék alkalmazásával. Másrészt, a **126** és **128** anyagok, és a belőlük keletkező nanoszuszpenziók rezisztenciafokozó hatása miatt ezek nyilvánvalóan alkalmatlanok bármilyen tumorellenes felhasználásra. Érdekes megjegyezni azonban, hogy a „klasszikus” (nem acetamid) ekdiszteroidok antiapoptotikus, sejtek túlélését fokozó hatását^[38] is figyelembe véve ilyen nanorészecskék különösen érdekesek lehetnek olyan egészséges szövetek protektív céllal való targetálására, amelyek nagy mennyiségben fejeznek ki lipoprotein receptorokat, és amelyek pusztulása egyéb krónikus megbetegedések kialakulásában / progressziójában játszik fontos szerepet. Ilyen szövetek pl. a máj,^[129] és a vér-agy gát.^[130, 131] Utóbbi sérülése változatos akut és krónikus központi idegrendszeri betegségek patomechanizmusában játszik kulcsszerepet.^[132-134] Ez alapján, és különösen a 20E *in vivo* neuroprotektív tulajdonságainak ismeretében,^[39] a vér-agy gát egy különösen vonzó célszövet lehet új bioaktív ekdiszteroidok és konjugátumaik farmakológiai vizsgálatára. Releváns modelleken megkezdjük néhány ilyen származék változatos stresszorokkal szembeni védő hatásának vizsgálatát, és előzetes eredményeink rendkívül ígéretesek.

5. BIOAKTÍV PROTOFLAVONOID ANALÓGOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA

4. TÉZIS. Kidolgoztunk egy léptéknövelhető, egy lépéses, gazdaságos felszintetikus eljárást a **protoapigenon** apigeninből való **előállítására**. Kimutattuk, hogy a **protoapigenon** antitumor hatása egy nem elágazó, alifás 1'-O-alkil éter oldallánccal sejtvonaltól függően tovább fokozható. Kimutattuk, hogy a **protoapigenon** egy **ABCG2 szubsztrát**, szintetikus **analógjai** ugyanakkor képesek **áthidalni** az **ABCB1** és **ABCG2** efflux transzporterekhez köthető **multidrog rezisztenciát**, és **szelektíven elpusztítani** egyes kemoterápiás szerekhez **adaptált rezisztens tumorsejteket**. A protoapigenon 1'-O-propargil étert a köszvényben és oxidatív stressz-szel összefüggő kórképekben fontos szerepet játszó **xantin oxidáz** enzim **első nem planáris flavonoid** típusú **gátlószereként** azonosítottuk. A *p*-kinol B-gyűrű módosításával számos nem, vagy csak gyengén citotoxikus protoflavon származékot is előállítottunk. Ezek közül a **protoapigenon 1'-O-izopropil éter** erős **Epstein-Barr vírus ellenes** hatást, a **tetrahidroprotoapigenon** pedig gyenge **HIV-ellenes** hatást váltott ki. Eredményeink arra utalnak, hogy a protoflavonoidok klasszikus flavonoidoktól jelentősen eltérő térszerkezetüknek köszönhetően egy farmakológiai szempontból sokoldalú új kémiai teret jelölnek ki.

Ezen munka során összesen **72 protoflavon** származék, köztük **69 új vegyület** előállítását és vizsgálatát végeztük el.

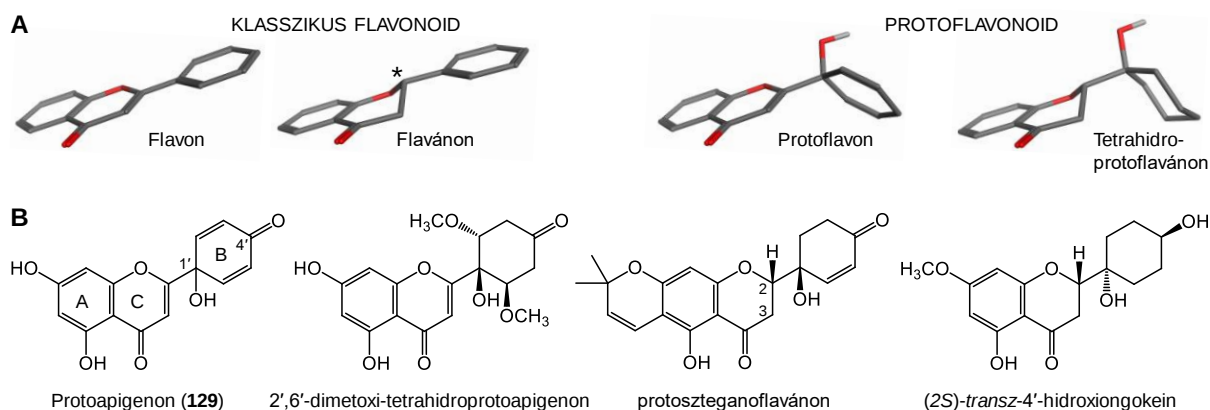
A tézishoz kapcsolódó közlemények:

S19, S20, S21, S22, S23, S24 (IF=4,183 + 3,009 + 2,824 + 2,391 + 1,713 + 4,092 = 18,712)

Irodalmi áttekintés a 4. Tézishez

A protoflavonoidok szokatlan, B-gyűrűjükön nem aromás flavonoidok, amelyek az 1' pozícióban rendszerint hidroxilcsoportot, 4' helyzetben pedig oxo-, vagy hidroxilcsoportot tartalmaznak. Jelen tudásunk szerint ezek az anyagok a természetben ritkák, leginkább páfrány fajokból írták le őket. Felfedezésük ugyanakkor viszonylag újkeletű, 1980-ban írták le első ilyen képviselőjüket, a protogenkvanin 4'-O-β-D-glükozidot a mezei zsurló (*Equisetum arvense*) hajtásából.^[135] Előfordulnak zárvatermőkben is: eddig három ilyen fajból, a zellerből (*Apium graveolens*)^[136] egy dél-amerikai bors fajból, a *Piper carniconnectivum*-ból,^[137] és egy nyugat-afrikai örökzöld fa (*Ongokea gore*)^[138] kérgéből írtak le ilyen anyagokat. A protoflavonoidokat kémiai szempontból az 1'-szénatom *sp*³ hibridállapota és a B-gyűrű esetleges (részleges vagy teljes) telítettsége teszi különlegessé. Térszerkezetük ezáltal

markánsan különbözik a 2,1'-kötés forgásától eltekintve planáris (flavon, flavonol), vagy a csak a 2,3-telített kötés miatt megtört síkú (flavánon, flavánonol, stb.), leggyakoribb flavonoid alapvázakétól, és azoktól ezáltal jóval nagyobb szerkezeti változatosságot is kialakíthatnak. Az alapvázakban megjelenő térszerkezeti különbségeket, és a természetes protoflavonoidok néhány jellegzetes képviselőjét a 26. ábra mutatja be.



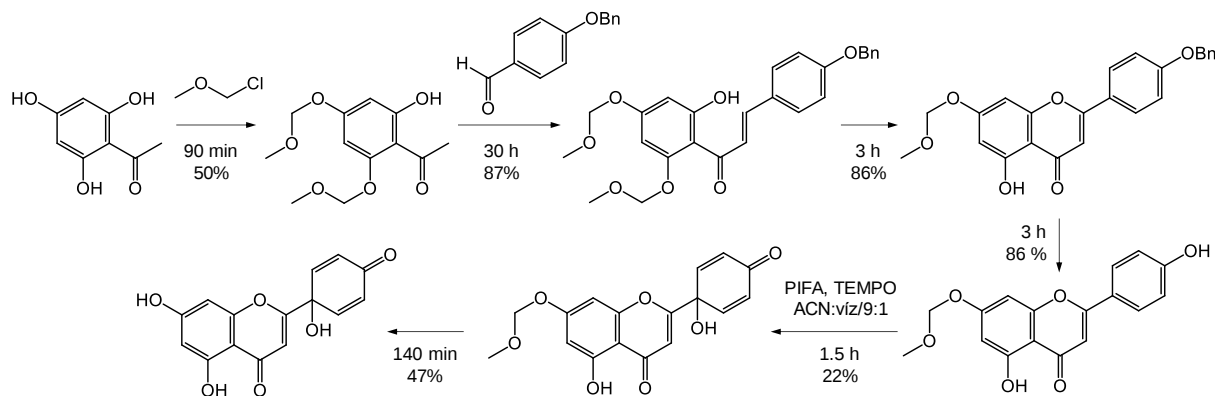
26. Ábra. A: Klasszikus flavonoid (flavon, flavánon) és két ritka protoflavonoid (protoflavon, tetrahidroprotoflavánon) alapváz térszerkezetének összehasonlítása. A nem aromás B-gyűrű részben, vagy teljesen telített lehet, s ez társulhat flavánon típusú, 2,3-helyzetben telített szerkezettel is. Ez a klasszikus flavonoid alapvázakhoz képest jóval nagyobb térszerkezetbeli változatosságot tesz lehetővé. A 3D struktúrák felépítése a CCG MOE 2009.10 szoftverrel történt, MMFF94x energiaminimalizálást követően a jobb vizualizálhatóság érdekében a 2,1' kötés manuális elforgatásával. *: flavánonok vizes közegben gyűrűelfnyíláson keresztül képesek racemizálódni^[139] és ez valószínűleg a protoflavánonokra is igaz; az egyszerűség kedvéért csak az egyik lehetséges sztereoizomert tüntettem fel. **B:** Néhány jellegzetes természetes protoflavonoid kémiai szerkezete.

A protoflavonoidok farmakológiai szempontból egyes képviselőik tumorellenes hatása miatt váltottak ki tudományos érdeklődést. Ezek közül a leginkább vizsgált származék az elsőként a *Thelypteris torresiana* (Gaudich.) Alston páfrányfajból izolált protoapigenon (129).^[140] Ez az anyag változatos (pl. emlő, ovárium, cervix, prosztata, tüdő, máj, stb.) eredetű tumor sejtvonalakon váltott ki citotoxikus, valamint apoptózist indukáló hatást,^[140-143] és *in vivo* állatkísérletes tumor modelleken is hatékonynak bizonyult viszonylag csekély toxicitás mellett.^[144, 145]

Külföldi posztdoktori kutatómunkám során a protoapigenont elsőként leíró tajvani kutatócsoport munkájába kapcsolódtam be, s hazatérésem után a téma kutatását Szegeden is folytattam. A protoflavonok kémiájával és farmakológiájával kapcsolatos ismereteinket egy közelmúltbeli összefoglaló közleményben összegeztük [SR14]. Hatásmechanizmusaik közül kiemelkedően fontosnak tűnik az ataxia teleangiectázia és Rad3 fehérje (ATR)-függő jelátvitel, amely a DNS sérülésre adott egyik kulcsfontosságú válaszmechanizmus. Az ATR és az általa foszforilált ún. checkpoint kináz 1 (Chk-1) fehérje jelenleg intenzív klinikai kutatások tárgya,

mint vonzó, tumor szelektív új terápiás célpont;^[146] gátlószereinek vizsgálatára a clinicaltrials.gov adatbázisban jelenleg (2021.04.01) 30 folyamatban levő, induló, vagy a közeljövőben induló klinikai vizsgálatot regisztráltak.^[147] Kutatási együttműködésben elért eredményeink alapján a protoapigenon, és annak β -naftoflavon vázas analógja az ATR kináz hatékony gátlószerei, s közvetlenül nem, az ATR gátlásán keresztül azonban kiváltanak tumorsejtekben DNS károsító hatást. Ennek megfelelően képesek ciszplatinnal szinergizmusban hatni, mind *in vitro*, mind *in vivo* [SR16].

A protoapigenon első totálszintézisét a posztdoktori kutatómunkámnak otthont adó kutatócsoport dolgozta ki. Miután az apigeninből való közvetlen oxidatív dearomatizációval történő előállítás sikertelen volt, egy hat lépéses szintézisutat dolgoztak ki. A totálszintézis során 7-metoximetil védőcsoporttal ellátott apigenin előállításán keresztül igyekeztek megelőzni a 7-OH csoport oxidációját, és biztosítani a *p*-fenol B-gyűrű szelektív oxidatív dearomatizációját. Ehhez a reakciólépéshez katalitikus (0,2 ekv.) mennyiségű 2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxil (TEMPO) hozzáadása mellett bisz-trifluoroacetoxy-jód(III)-benzolt (PIFA) használtak, 18 mg/ml kiindulási anyag koncentrációval szobahőn történő 90 perces intenzív kevertetéssel. A hosszadalmas, számos kromatográfiás tisztítási lépést igénylő munka teljes izolált kitermelése mintegy 3,3% volt; a teljes reakcióutat a 27. ábra mutatja be.^[142]



27. Ábra. A protoapigenon korábban publikált, a 7-OH oxidációjának megelőzése céljából védőcsoport stratégiát alkalmazó totálszintézise. A nyílakon a reakcióidők és a kromatográfiás tisztítást követő izolált termeléseket tüntettem fel; a kulcslépést jelentő, protoflavon B-gyűrűt kialakító oxidatív dearomatizáció reakciókörülményei: TEMPO (0,2 ekv.), PIFA (2 ekv.), ACN:víz/9:1, 18 mg/ml, 25°C, 1,5h.

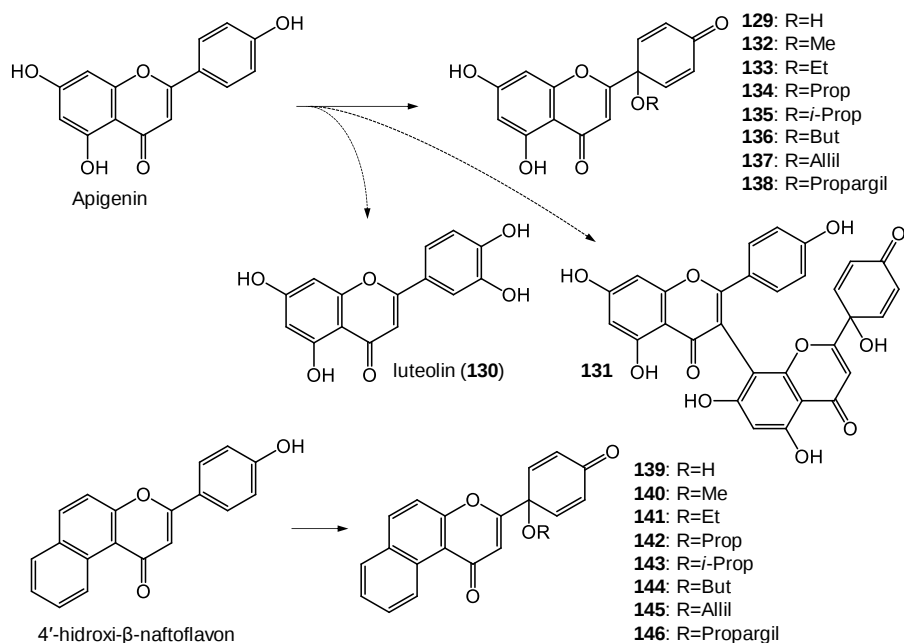
Antitumor hatású protoflavon származékok előállítása és vizsgálata [S20-S24]

Protoflavonoidokkal kapcsolatos munkám első kihívása a protoapigenon gazdaságos előállítása volt. A totálszintézis leggyengébb termelést (22%) adó lépése a 7-metoximetil-apigenin oxidatív dearomatizációja volt, ezért először ennek a lépésnek az optimalizálásán kezdtem dolgozni. A termékprofil vizsgálata során derült fény arra, hogy a PIFA-val végzett oxidatív dearomatizáció során (véltetőleg a felszabaduló trifluoroecetsav miatt) a metoximetil csoport

részleges hidrolízise is végbemegy, tehát nem csak 7-metoximetil-protoapigenon keletkezik, hanem a következő lépésben várt végtermék protoapigenon is. Ezt felismerve a kutatócsoport által korábban félretett apigenin-protoapigenon átalakítás lehetőségével kezdtem behatóbban foglalkozni, és a reakciókörülmények megfelelő optimalizálásával (1 mg/ml apigenin ACN:víz/9:1 elegyben oldva, 2 ekviv. PIFA TEMPO nélkül, mikrohullámú reaktorban, 500 W, 70 °C-on, 1 perc alatt) sikerült 100 mg apigeninből egy lépésben, 31,2% izolált termeléssel előállítani a kívánt protoflavon célvegyületet (**129**). Két mellékterméket is izoláltunk, luteolint (**130**; 6%) és egy apigenin-protoapigenon dimert (**131**; 4%). A 4'-OH oxidációja viszonylag szelektív volt, további főterméket nem észleltünk, feltételezésünk szerint a **131** anyag mintájára többszörös konjugátumok keletkezhetnek további melléktermékekként, amelyek nagy molekulatömegük és polifenolos természetük miatt a tisztítás során irreverzibilisen kötődhetnek az állófázison. A szelektivitásra az 5-OH intramolekuláris H-hídja, és a 7-OH és 4'-OH eltérő savassága adhat magyarázatot (MeOH:víz/1:2 elegyben pKa rendre 6,9 és 8,6).^[148] Ez alapján a korábbi sikertelenség oka nem a 7-OH oxidációja lehetett, hanem a jóval nagyobb (18 mg/ml) apigenin koncentráció (amely esetben a PIFA C-C kapcsolással képződő dimerek/oligomerek felé tolhatja el a termékprofilt) és a TEMPO jelenléte (amely csapdázhatta a reakcióban valószínűleg köztiterméként szerepet játszó apigenin fenoxil gyökök egy részét).

Ezt követően a reakció léptéknövelését is elvégeztük, s azt tapasztaltuk, hogy a kiindulási anyag mennyiségének növelésével a termelés valamelyest csökken, így 800 mg, 2 g, és 5 g apigeninből rendre 29,6%, 25,8%, és 22,3% izolált termelést sikerült elérni. Ettől eltekintve munkánk eredményeként egy hét alatt sikerült előállítani 5 g protoapigenont, amely laboratóriumi léptékben korábban elérhetetlen mennyiség volt [S24].

Az 1'-OH és az 1'-OCH₃ származékok hatásának korábban elvégzett összehasonlítása arra utalt, hogy a szubsztituátlan 1'-OH csoport jelenléte elengedhetetlen az erős antitumor hatáshoz. Ennek további vizsgálata céljából a reakciót apigeninből és egyéb, kereskedelmi forgalomban elérhető 4'-hidroxiflavonokból, acetonitril és víz helyett különböző alkoholok elegyében is elvégeztük, és így további, az alkoholnak megfelelő 1'-O-alkil szubsztituált termékeket nyertünk. A reakciót és az így előállított anyagok szerkezetét a 28. ábra mutatja be.

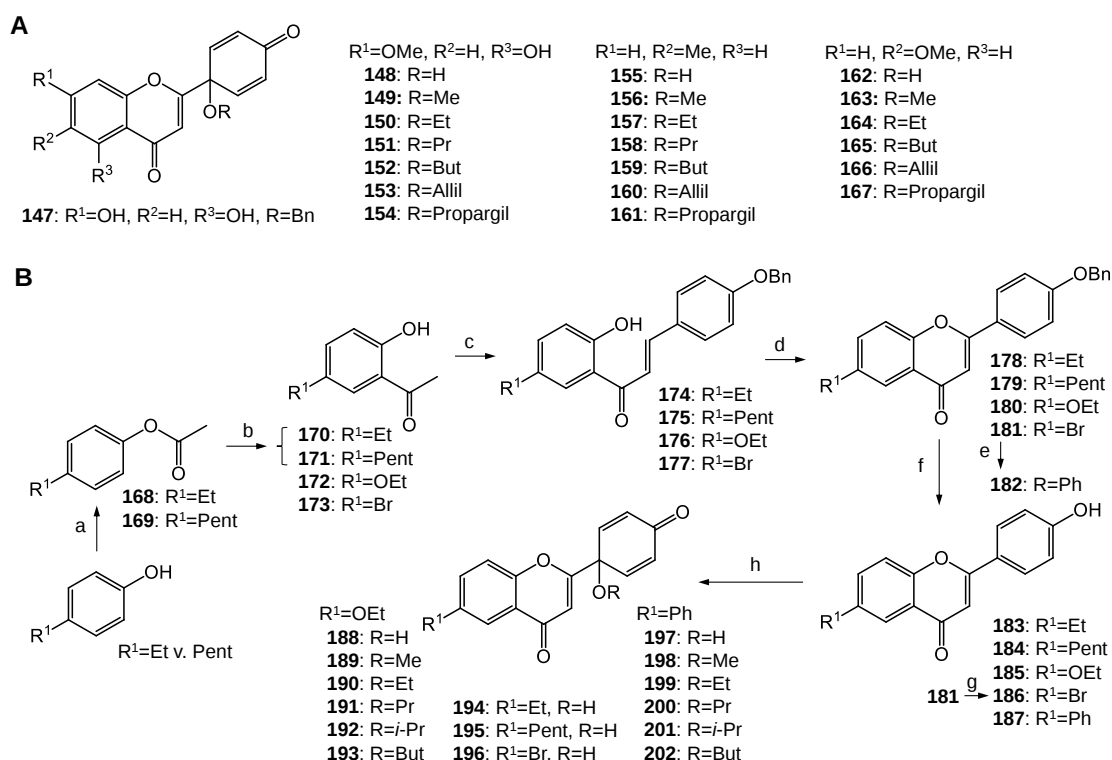


28. Ábra. Az apigeninből (**129**, **132-138**) és a 4'-hidroxi- β -naftoflavonból (**139-146**) egy lépésben előállított protoflavon analógok, és az apigenin-protoapigenon átalakítás két izolált mellékterméke (**130-131**). Reakciókörülmények: PIFA (2 eq.), ACN:ROH/9:1, v/v, 1 mg/ml, 70 °C mikrohullámú melegítés, 1 perc.

Az előállított anyagok citotoxikus hatását máj (HepG2 és Hep3B), szájüregi (Ca9-22), tüdő (A549) és emlő (MCF-7 és MDA-MB-231) tumor sejtvonalakon teszteltük. A protoapigenon sorozat (**129**, **132-138**) esetében azt tapasztaltuk, hogy míg az 1'-metoxi szubsztitúció valóban csökkent az 1'-OH származékokhoz képest az antitumor hatást, a szénlánc hosszának növelésével ez az effektus eltűnik, a butil származék (**133**) pedig sejtvonaltól függően a nem szubsztituált protoapigenonhoz képest (**129**) akár több, mint kétszer erősebb hatást is kiváltott. Ez a trend ugyanakkor nem volt igaz a naftoflavon sorozatra (**139-146**), amelyek valamennyi 1'-O-alkil szubsztituenst tartalmazó tagja jóval gyengébb citotoxikus hatást váltott ki, mint a megfelelő 1'-OH származék (**139**). Mindkét sorozatra igaz volt, hogy a legkevésbé citotoxikus származék valamennyi sejtvonalon az 1'-O-izopropil szubsztituenst tartalmazó vegyület (**135**, ill. **143**) volt.

Hazatérésemet követően az anyagok változatosságának további gazdagítása céljából egyéb, kereskedelmi forgalomban hozzáférhető 4'-hidroxiflavonok hasonló átalakításait is elvégeztük. Az anyagok tesztelésébe bevontuk a 3. Tézisben ismertetett szenzitív / multi-drog rezisztens sejtvonal párt, és új kutatási együttműködések keretében számos további, efflux transzporterekkel transzfektált, vagy kemoterápiás szerekhez adaptált multidrog rezisztens sejtvonalat is [S20,S21,S23]. Az első szűrővizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a 6-metil származékok statisztikailag szignifikáns módon, kb. másfélszer erősebb hatást váltottak ki az L5178^{MDR} egér limfómán, mint annak gyógyszer-szenzitív, ABCB1 transzporterrel nem

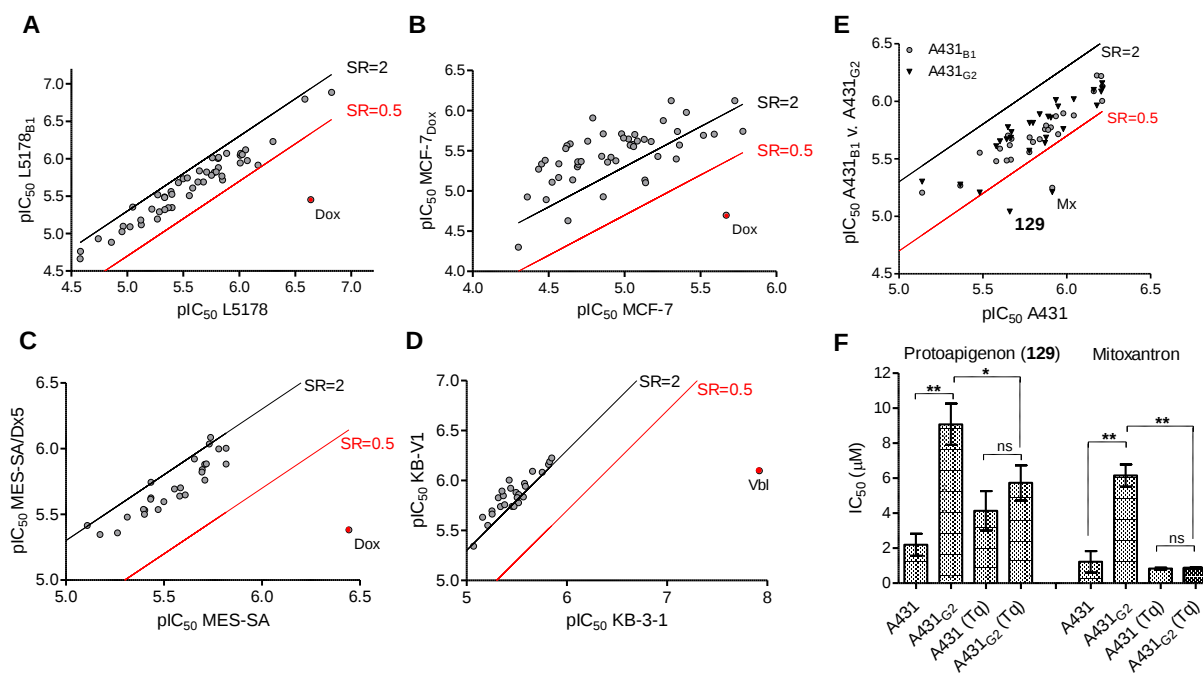
transzfektált sejtvonal párján [S23]. Bár ekkora különbség a biológiai rendszerek komplexitása miatt nem feltétlenül tekinthető relevánsnak, ahhoz elegendőnek ítéltük, hogy érdemes legyen a 6-os helyzetben eltérő szubsztituenseket tartalmazó további protoflavonoidok előállítását és vizsgálatát is elvégezni. Az apigeninből (**147**), genkvaninból (**148-154**), 6-metoxi-4'-hidroxiflavonból (**155-161**) és 6-metil-4'-hidroxiflavonból (**162-167**) egy lépésben előállított további új protoflavonok szerkezetét, és a 6-os szubsztituens további változtatását célzó totálszintézis folyamatát, valamint az így nyert protoflavonok (**188-202**) szerkezetét a 29. ábra mutatja be [S20,S21,S23].



29. Ábra. A: További 4'-hidroxiflavonokból egy lépésben (**147-167**) előállított protoflavonoidok szerkezete. **B:** a 6-os helyzetben eltérő szubsztituenseket tartalmazó további protoflavonoidok (**188-202**) totálszintézise. Reakciókörülmények: a) $(CH_3CO)_2O$, cc. H_2SO_4 ; b) $AlCl_3$; c) EtOH, 4-benziloxibenzaldehid, 50% KOH/ H_2O ; d) I_2 , DMSO; e) fenilbórsav, K_2CO_3 , tetrakis(trifenilfoszfin)palládium(0); f) 10% Pd/C, H_2 ; g) TFA/ CH_2Cl_2 , reflux; h) CH_3CN/ROH 9:1, PIFA (2 ekv.)

Az előállított összesen 52 protoflavon származékot (**129, 132-167, és 188-202**) Prof. Molnár József (SZTE-ÁOK Orvosi Mikrobiológiai Intézet), valamint Dr. Szakács Gergely (MTA-TTK Enzimológiai Intézet) kutatócsoportjával együttműködésben hat szenzitív / rezisztens tumor sejtvonal páron vizsgáltuk meg annak felderítésére, hogy ezek az anyagok alkalmasak lehetnek-e a kollaterális szenzitivitás terápiás célú kihasználására. A lehetséges terápiás célnak megfelelően a rezisztens tumorsejteken kiváltott szelektív toxicitást vagy keresztrezisztenciát ezekben a vizsgálatokban nem statisztikai szignifikancia vizsgálatával értékeltük, hanem a

kétszeres eltérést szabtuk meg, mint relevánsnak tekintett legkisebb különbséget [S20]. A vizsgált sejtvonalak az alábbiak voltak: L5178 / L5178_{B1} (humán ABCB1 transzporterrel transzfektált egér limfóma, lásd 3. Tézis), MCF-7 / MCF-7_{Dox} (doxorubicinhez adaptált humán emlőtumor),^[149] MES-SA / MES-SA/Dx5 (doxorubicinhez adaptált humán uterus sarcoma), KB-3-1 / KB-V1 (vinblasztinhoz adaptált humán cervix carcinoma), és A431 / A431_{B1} ill. A431_{G2} (ABCB1 ill. ABCG2 transzporterrel transzfektált humán bőr tumor). Vizsgálataink eredményeit a 30. ábra összegzi.



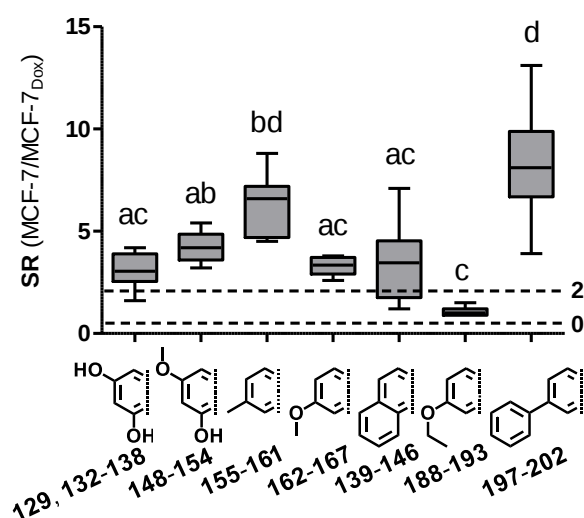
30. Ábra. Az előállított protoflavonoidok szenzitív / rezisztens tumor sejtvonal párokon kifejtett szelektív citotoxikus hatása. **A-E:** a molaritásban kifejezett IC_{50} értékek negatív logaritmusai a sejtvonal páron; x tengely: szenzitív sejtvonal, y tengely: annak rezisztens párja; $SR = pIC_{50}^{rezisztens} / pIC_{50}^{szenzitív}$, $SR \geq 2$: kollaterális szenzitivitás, $SR < 0,5$: keresztrezisztencia; Dox: doxorubicin, Vbl: vinblasztin, Mx: mitoxantron; **F:** a protoapigenon (**129**) A431_{G2} sejteken mutatott keresztrezisztenciájának efflux függésének vizsgálata; tariquidar (Tq) jelenlétében a keresztrezisztencia eltűnik, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ egyutas variancia-analízis és Bonferroni teszt alapján, ns: nem szignifikáns.

Az előállított anyagok szerkezet-hatás összefüggései sejtvonal függő eltéréseket mutattak. Többnyire az 1'-OH csoportot tartalmazó anyagok voltak a legerősebben citotoxikusak. Korábbi eredményeinket megerősítve ugyanakkor a 3-4 szénatomos nem elágazó 1'-O-alkil oldalláncot tartalmazó származékok sejtvonaltól függően citotoxikusabbak voltak: az A431_{B1} MDR sejtvonalon pl. a protoapigenon (**129**) és annak 1'-O-propil étere (**134**) rendre 2,41 és 0,60 μM IC_{50} értéket mutatott (4-szeres különbség). Ugyanez a két anyag azonban a szintén ABCB1 transzporterrel transzfektált L5178_{B1} sejteken egymáshoz viszonyítva fordítva viselkedett: 0,76 (**129**) és 4,70 μM (**134**) IC_{50} értékekkel (ellenkező irányú, 6,2-szeres különbség). Az 1'-O-izopropil származékok mutatták valamennyi esetben a leggyengébb

citotoxikus hatást, s a megfelelő 1'-OH származékhoz képest a különbség akár a két nagyságrendet is megközelíthette (pl. L5178_{B1}, **139**: IC₅₀=0,13 µM, **143**: 9,44 µM).

Az MDR szelektív toxicitás transzfektált sejtvonalakon való vizsgálata során azt figyeltük meg, hogy az előállított anyagok egy kivétellel (**166**, L5178 / L5178_{B1} SR=2,0) nem érték el az általunk releváns szelektivitási határértékként meghatározott kritériumot. Ez az anyagcsoport tehát összességében nem képes tisztán az ABCB1 vagy ABCG2 expressziójától függő módon szelektív citotoxikus hatást kiváltani. Egy esetben, az archetípusnak is tekinthető protoapigenon (**129**) esetében ugyanakkor valószínűsíthetően ABCG2 által mediált, kb. négyszeres keresztrezisztenciát tapasztaltunk. Mivel ez a rezisztencia tariquidar (klinikai III. fázisban elbukott, erős duális ABCB1 és ABCG2 gátló)^[150] hatására eltűnt, nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy a protoapigenon (**129**) egy ABCG2 szubsztrát. Ennek az egy anyagnak a kivételével valamennyi újonnan előállított protoflavon megkerülte a két vizsgált efflux transzporter által mediált rezisztenciát, tehát a rezisztens sejteket azonos hatékonysággal pusztították el, mint szenzitív párjukat. Ez alapján a szelektivitás hiánya ellenére is ígéretes anyagok lehetnek a multidrog rezisztencia elleni küzdelemben.

Rendkívül érdekes ugyanakkor, hogy az anyagok többsége szelektív toxicitást mutatott a vinblasztinhoz adaptált KB-V1 sejteken, és még inkább a doxorubicinhez adaptált MCF-7_{Dox} sejteken: ez utóbbin jelentős, akár több, mint tízszeres szelektivitással. Ez legerősebben a 6-fenil származékok (**197-202**) esetében jelent meg, a 6-etoxi származékok ugyanakkor nem voltak szelektívek. Az eltérő A-gyűrűt tartalmazó protoflavon-csoportok emlőtumor sejteken mért szelektivitásának összehasonlítását a 31. ábra mutatja be.



31. Ábra. Az A-gyűrűre vonatkozó szerkezet-hatás összefüggések elemzése a protoflavonok MCF-7/MCF-7_{Dox} sejtvonal páron mutatott szelektív toxicitása szempontjából. $0,5 \leq SR < 2,0$: nincs releváns szelektivitás, $2 \leq SR$: kollaterális szenzitivitás. Az a-d jelzések a statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatják, az átfedő jelzésekkel ellátott csoportok között nincsen szignifikáns különbség, $p < 0,05$ egyutas varianciaanalízis és Bonferroni teszt alapján.

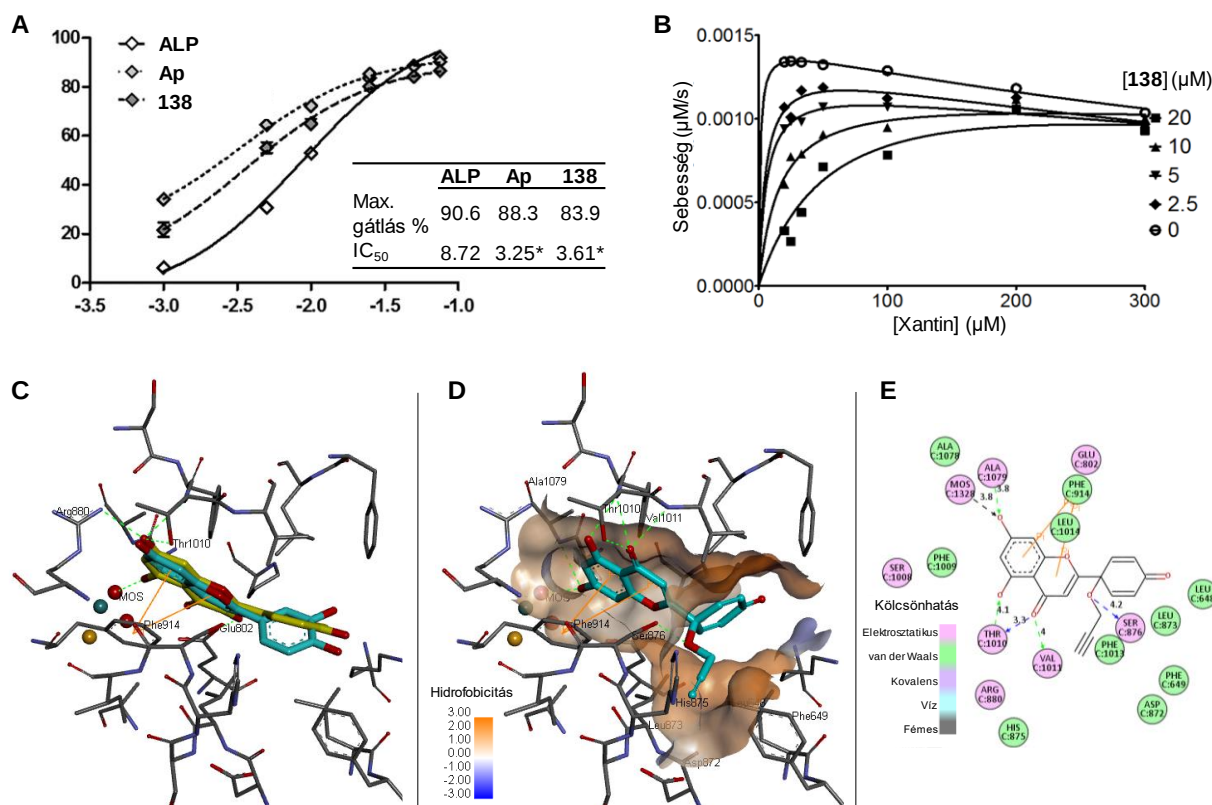
Az MDR tumorsejteken mutatott szelektivitás lehetséges okait nemzetközi együttműködésben vizsgáltuk (Dr. Milica Pešić, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrád,

Szerbia), s néhány kiválasztott anyag (**129**, **136**, **138**, **139**, **155**, **196**) citotoxikus hatását további, kemoterápiás szerekhez adaptált MDR tumor sejtvonalakon is teszteltük [S21]. A sejtvonal párok az NCI-H460 és NCI-H460/R (doxorubicinhez adaptált humán nem kissejtes tüdő carcinoma),^[151] DLD1 és DLD1-TxR (paklitaxelhez adaptált humán vastagbél carcinoma),^[152] U87 és U87-TxR (paklitaxelhez adaptált humán glioma),^[152] C6 és RC6 (karmusztinhez adaptált patkány glioma).^[153] Kollaterális szenzitivitást tapasztaltunk a legtöbb humán sejtvonalon, legerősebben (de 2,75 legmagasabb SR érték mellett) a 6-metil (**155**) és a 6-bromo (**196**) származék esetében. A C6/RC6 sejtvonal páron mért eredmények ugyanakkor (0,2-0,4 közötti SR értékekkel) keresztrezisztenciát mutattak valamennyi vizsgált anyagra. A további vizsgálatok arra utaltak, hogy a kemoterápiás szerhez való adaptáció során megváltozott a sejtek antioxidáns védelme, s az oxidatív stresszt indukálni képes protoflavonokra mutatott fokozott érzékenységük vagy rezisztenciájuk korrelál ezekkel a változásokkal [S21]. Ez ugyanakkor nem magyarázza az MCF-7/MCF-7_{Dox} sejtvonal páron észlelt jelentős MDR szelektív toxicitást, saját kísérleteink alapján ugyanis az MCF-7_{Dox} sejtek enyhén rezisztensek az oxidatív stresszre. Jelenleg is folyamatban levő vizsgálataink az ATR-függő jelátvitel adaptáció hatására kialakuló változását valószínűsítik ennek hátterében.

Protoflavonok xantin-oxidáz gátló hatásának vizsgálata [S22]

A protoflavon származékok klasszikus flavonoidokhoz képest jelentősen eltérő térszerkezete érdekes lehetőségeket nyújt egyéb, citotoxicitásukkal nem, vagy nem közvetlenül összefüggő farmakológiai hasznosításukra is. Ezen elgondolás mentén megvizsgáltuk néhány kiválasztott származék (**129**, **132-146**, **148-154**) esetleges gátló hatását a xantin-oxidáz (XO) enzimre. Ez a molibdén-tartalmú metalloprotein a purin metabolizmus kulcsfontosságú enzime amely a xantin/hipoxantin húgysavvá alakulását katalizálja. Túlműködése így egyrészt a köszvény egyik lehetséges oka, másrészt viszont ez az enzim egy jelentős szuperoxid anion gyök forrás, így számos, az oxidatív stresszel összefüggő egyéb krónikus betegség patomechanizmusában is fontos szerepet játszik.^[154-156] Számos flavonoidról leírtak XO gátló hatást, amely ezek *in vivo* antioxidáns hatásával is összefügg.^[157] A flavonoidok által kifejtett XO gátlásra vonatkozó egyik fontos szerkezet-hatás összefüggés szerint ugyanakkor általánosan elfogadott volt, hogy ehhez a hatáshoz alapvető fontosságú az anyag sík térszerkezet kialakítására való képessége: csak flavonok és flavonolok lehetnek hatásosak, a 2-es helyzetben sp^3 hibridállapotú szénatomot tartalmazó, megtört síkú flavánok minden esetben hatástalanok.^[158-161]

Az első, 100 μM koncentrációban végzett enzimgátlási szűrővizsgálatok alapján valamennyi genkvanin származék (**148-154**) inaktív volt, a naftoflavon és protoapigenon származékok pedig többségében 50% alatti gátlást mutattak egy kiugró kivétellel: a protoapigenon 1'-O-propargil éter (**138**) közel teljesen gátolta az enzimet. További vizsgálatok alapján ez az anyag 3,25 μM IC_{50} értékkel a klinikailag alkalmazott XO gátló köszvényellenes allopurinolhoz képest 2,7-szer erősebb hatású volt. A kötődést enzimkinetikai megközelítéssel, az enzim aktivitását a xantin és a **138** anyag eltérő mennyiségeinek jelenlétében vizsgáltuk, s ennek eredményeként ezt a protoflavont az XO kompetitív gátlószereként azonosítottuk. Tekintettel arra, hogy ez a flavonoid nem tesz eleget a korábban alapvetőnek gondolt planáris szerkezet feltételének, az enzimhez való kötődés módját is megvizsgáltuk. Ehhez *in silico* dokkolást végeztünk a **138** anyaggal, annak előzetes együttműködésben (Prof. Patrick Trouillas, Université de Limoge, Limoge, Franciaország), kvantumkémiai számításokkal (DFT, 6-31+G(d,p) báziskészlet) optimált térszerkezetét felhasználva. A kompetitív gátlásnak megfelelően a szubsztrát kötőhelyhez való dokkolást végeztük el, amelyhez az enzimnek ezen a kötőhelyén a flavonol kvercetin tartalmazó, online elérhető röntgendiffrakciós szerkezetét (pdb ID: 3NVY) használtuk módosítás nélkül. A dokkoláshoz az iGEMDOCK 2.1 szoftvert használtuk, annak pontos dokkolásra („accurate docking”) vonatkozó alapbeállításával, a hidrofób és elektrosztatikus interakciók azonos súlyozásával, és az aktív centrumot kijelölő kvercetin kötőhely körüli 15 Å távolságot kötőhelyként figyelembe véve. Kontrollként az experimentális kötőhelyből kinyert térszerkezetű kvercetin visszadokkolását végeztük el. Az *in vitro* és *in silico* vizsgálatok eredményeit a 32. ábra összegzi.



32. Ábra. A protoapigenon 1'-O-propargil éter (**138**) xantin oxidáz gátló hatásának vizsgálata. **A:** dózis-hatás görbék és a számított farmakodinámiai paraméterek, **ALP:** allopurinol, **Ap:** apigenin, *: $p < 0.001$ egyutas varianciaanalízis és Bonferroni teszt alapján. **B:** enzimkinetikai vizsgálat a GraphPad Prism 5.0 beépített szubsztrát gátlás modell görbeillesztésével; kompetitív gátlás: globális modell illeszthető valamennyi görbére azonos $V_{max}=1,376 \text{ nM/s}$ értékkel ($p < 0,05$), azonos K_m érték nem található. **C:** *in silico* kontroll kísérlet, experimentális kvercetin ligandum (sárga) visszadokkolása (türkiz), RMSD=0,9149 Å. **D:** a **138** anyag legelőnyösebb dokkolt pozíciója a 3NVY fehérje kvercetin kötőhelyén, grafikusán ábrázolt hidrofobicitási felülettel. **E:** a **138** anyag interakciói a 3NVY fehérje aminosav reziduumaival, és a H-kötések távolsága (Å).

Az *in silico* dokkolási vizsgálatok alapján a **138** anyag a kvercetinhez képest nagyjából fordított pozícióban képes a legstabilabban (-126.88 kcal/mol) elfoglalni az enzim szubsztrát kötőhelyét. Ebben a helyzetben a 7-OH képez hidrogén hidat a molibdopterin reziduum oxigénjével, ami magyarázatot adhat a genkvanin származékok teljes hatástalanságára is. A kvercetinhez hasonlóan az A és B-gyűrűk $\pi-\pi$ kölcsönhatással rögzülnek a 914-fenilalanin reziduumhoz. Az anyag XO gátló hatására vonatkozó kulcsfontosságú térszerkezeti tulajdonság ugyanakkor a propargil éter oldallánc tökéletes illeszkedése a Leu648, Phe649, Asp872, Leu873 és His875 reziduumok által kialakított hidrofób zsebbe, amely mintegy rögzíti a molekulát. Ez a helyzet mind a négy legelőnyösebb kötési energiával rendelkező dokkolt pozícióra jellemző volt. Az oldallánc fontosságát mutatja az is, hogy $100 \text{ } \mu\text{M}$ koncentrációban az 1'-OH csoportot tartalmazó protoapigenon (**129**) inaktív volt, az 1'-O-metil (**132**) és etil (**133**) származékok kb. 50%, az *i*-propil (**135**) közel 60%, az *n*-propil (**134**) kb. 30%, az *n*-butil (**136**)

pedig mindössze 8% gátlást mutatott. Az oldallánc tehát drámaian befolyásolja az XO gátló hatást. Fontos megemlíteni, hogy maga a **138** vegyület inkább ötletadó molekulának alkalmas és semmi esetre sem változatlan formában való XO gátlószerként való alkalmazásra, mivel az enzim gátlás IC_{50} értéke ($3,61 \mu M$) ugyanabban a koncentrációtartományban van, ahol ez az anyag sejtes modelleken már citotoxikus [S24]. Ettől függetlenül eredményeink több szempontból is értékesek lehetnek. Egyrészt átírják a flavonoidok XO gátló hatására vonatkozó egyik alapvetőnek tekintett szerkezet-hatás összefüggést, mivel a sík szerkezetnek a 2-es helyett az 1'-pozícióban található sp^3 szénatom általi megtörése esetén kiváltható erős hatás. Másrészt, a Phe649-Asp872-Leu873-His875 hidrofób zseb szerepének felismerése új lehetőségeket nyithat új, hatékony XO gátló szerek racionális tervezésére.^[156]

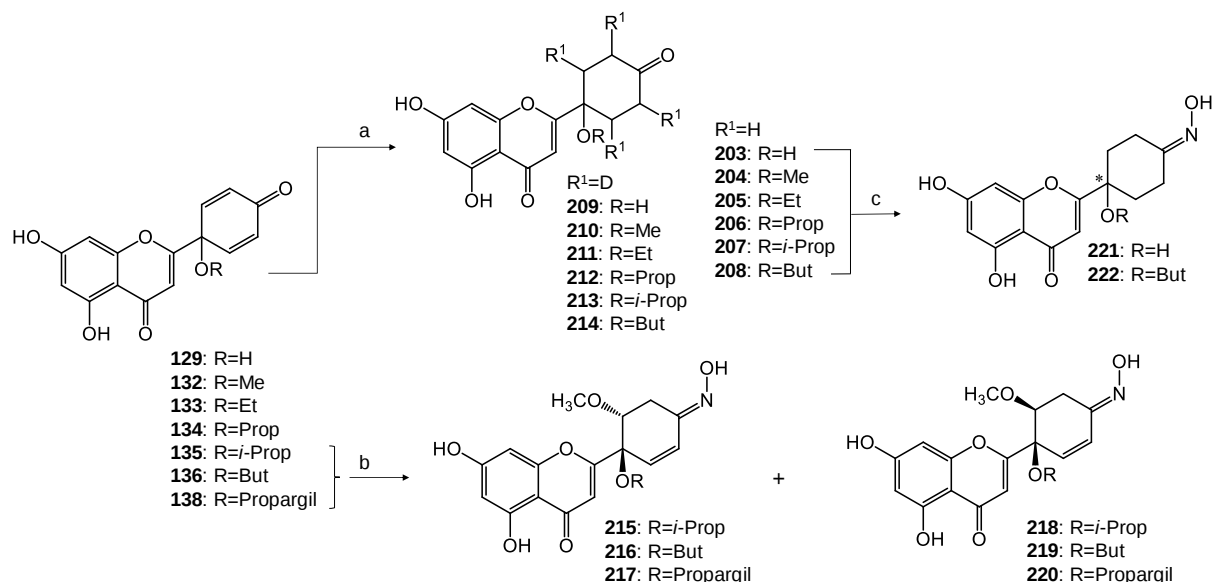
Antivirális hatású, nem citotoxikus protoflavon származékok előállítása és vizsgálata [S19]

A fenti vizsgálat eredményei jól illusztrálják azt, hogy a protoflavonoidok jellegzetes, a klasszikus flavonoidoktól jelentősen eltérően 3D szerkezete (és ezzel összefüggő, 1'-helyzetben való szubsztituálhatósága) ezen anyagok változatos, antitumor hatásukon túlmutató farmakológiai alkalmazására is lehetőséget teremthet. Az anyagok citotoxicitása azonban (mint pl. a **138** anyag XO gátló hatása esetében is) jelentősen gátolhatja az ilyen irányú kutatásokat és/vagy azok közvetlen hasznosítását.

A posztdoktori munkámnak otthont adó tajvani kutatócsoport egy kutatási együttműködés keretében felismerte, hogy a protoapigenon (**129**) jóval citotoxikus dózisa alatt hatékonyan képes gátolni az Epstein-Barr vírus (EBV) ún. lítikus ciklusát, ezáltal vírusellenes hatást fejt ki [SR17]. Ez inspirálta azt a munkánkat, amely nem citotoxikus, vírusellenes hatású származékok előállítását célozta.

Antitumor hatású protoflavonoidok előállítását célzó vizsgálataink alapján [S20, S21, S23, S24, SR15] az erős citotoxicitáshoz a B-gyűrűn szükség van i) a 2',3',5',6' szénatomokon nem szubsztituált szimmetrikus dienon, és ii) az 1'-helyzetben OH, vagy egyes származékok esetén 3-4 szénatomos, nem elágazó alkil éter oldallánc együttes jelenlétére. A citotoxicitás megszüntetésére a dienon átalakítása volt a kézenfekvő megoldás; ehhez két megközelítést és ezek kombinációját alkalmaztuk: a B-gyűrű olefinjeinek szelektív telítését, és a 4'-oxocsoport oxim funkcióvá alakítását. Ehhez először az SZTE Gyógyszerkémiai Intézetében Prof. Fülöp Ferenc kutatócsoportjával együttműködésben kidolgoztunk egy folyamatos áramú kémiai módszert a protoflavon B-gyűrű szelektív telítésére [SR12], majd ezt használtuk a B-gyűrűn hidrogénezett vagy deuterált származékok előállítására. Az így nyert anyagok közül a

tetrahidroprotoapigenon (**203**) és 1'-*O*-butilétere (**208**) 4'-oxim származékait is előállítottuk. Másodsorban a protoapigenon 1'-*O*-izopropil-, -butil-, és -propargil étert (rendre **135**, **136** és **138**) is oxim képzésnek vetettük alá. A későbbi vizsgálatok szempontjából kiemelt figyelmet fordítottunk a protoapigenon 1'-*O*-izopropil éterre (**135**) is, amely bár szimmetrikus dienon B-gyűrűt tartalmaz, elágazó oldallánca miatt citotoxikus hatása a többi származéknál 1-2 nagyságrenddel gyengébb [S24]. Az anyagok előállítását és szerkezetét a 33. ábra mutatja be.



33. Ábra. Protoflavonok B-gyűrűn módosított származékainak előállítása folyamatos áramú deuterálással, hidrogénezéssel, és/vagy regioszelektív oximképzéssel. A **215-222** anyagok racémátok, az egyszerűség kedvéért csak az egyik enantiomert tüntettem fel. Reakciókörülmények: (a) H-Cube®, H₂, 5% Pd/BaSO₄ (**201-206**) vagy D₂, 5% Pd/BaSO₄ (**207-212**); (b) NH₂OH·HCl (3 ekv.), MeOH, reflux, 24 h; (c) NH₂OH·HCl (4 ekv.), MeOH, reflux, 3 h.

Az H-Cube® folyamatos áramú hidrogénező rendszer alkalmazásával enyhe körülmények között, szelektíven nyertük a B-gyűrűn hidrogénezett (víz *in situ* hidrolíziséből nyert H₂ gáz alkalmazásával; **203-208**) vagy deuterált (víz helyett D₂O-t használva; **209-214**) származékokat. A 4'-oxocsoporton való oximképzés kettős célt szolgált: egyrészt a szimmetrikus dienon citotoxikus farmakofór eliminálását, másrészt egy gyógyszerkémiai szempontból releváns, változatos további szintetikus átalakításokra alkalmas sokoldalú kémiai építőelem beépítését.^[162-164] Figyelembe vettük azt is, hogy számos olyan flavonoid (tipikusan flavánon 4-oxocsoportján képzett) oxim ismert, amely anyavegyületénél erősebb antimikrobiális,^[165] antioxidáns,^[166] vagy antitumor [SR9] hatást képes kiváltani.

Első, kisléptékű kísérleteink alapján a protoflavonok oxim képzése a 4' helyzetben regioszelektív; 4-oxim vagy 4,4'-dioxim származékok képződését nem tapasztaltuk. Az oximok előállításához az irodalomban leggyakrabban használt oldószerekkel (piridin, etanol, acetonitril) ugyanakkor esetünkben nem működött a reakció: jellemzően a B-gyűrű

rearomatizációjára utaló, jellegzetes flavon-típusú UV spektrummal rendelkező termék(ek) képződését tapasztaltuk. Végül metanolban sikerült rétegekromatográfiás vizsgálatok alapján a **135**, **136**, és **138** anyagok teljes konverzióját, és mindhárom kiindulási vegyület esetében két elfogadható mennyiségű főtermék képződését detektálni. A B-gyűrűn telített **203** és **208** anyagok átalakítása a megfelelő 4'-oxim származékokká (rendre **221** és **222**) metanolban egyszerűnek bizonyult, s egy-egy főtermék elfogadható, rendre 48 és 42% izolált termelést értünk el. A B-gyűrűn szimmetrikus dienont tartalmazó **135**, **136** és **138** anyagok termékeinek izolálását követően ugyanakkor a tömeg- és NMR spektrumok elemzése nyilvánvalóvá tette, hogy a 4'-oxim képzés mellett az oldószerként használt metanol regioszelektív Michael addíciója is lezajlott, s így 2'-metoxi-2',3'-dihidroprotoapigenon 4'-oximok keletkeztek. A 1',2'-cisz és 1',2'-transz relatív konfigurációjú termékek keletkezését körülbelül 1:1 arányban tapasztaltuk. Az anyagok szerkezetének kétdimenziós NMR spektroszkópiás vizsgálata során egyik esetben sem tudtunk diagnosztikus NOESY keresztcsúcsokat detektálni az 1'-O-alkil szubsztituens és a 2'-metoxicsoport hidrogénjei között. A relatív konfigurációkat ezért a karakterisztikus ^1H - ^1H csatolási mintázatok alapján asszignáltuk. A cisz és a transz izomerek térszerkezetét MMFF94x erőter alkalmazásával MOE szoftverrel optimáltuk, majd a H2'-C2'-C3'-H3'a és H2'-C2'-C3'-H3'b dihedrális szögeket megmérve a Bothner-By egyenlettel^[167] elméleti H2'-H3'a és H2'-H3'b csatolási állandókat számoltunk. Az így nyert értékekkel az experimentális csatolási állandók jó egyezést mutattak, ezáltal egyértelműen kijelölve a **215-217** anyagokat, mint az 1',2'-transz, és a **218-220** anyagokat, mint az 1',2'-cisz relatív konfigurációjú termékeket. Érdekes módon az oxim funkció esetén nem tapasztaltuk mindkét térállás jelenlétét, ami azt valószínűsíti, hogy a metanol addíció a reakció egy közttermékén ment végbe olyan módon, hogy ez azután determinálta az oxim végleges térállását. Ennek asszignálásához a ^{13}C NMR eltolódásokat használtuk fel, s mivel a megfelelő $\Delta\delta$ syn-anti paraméterek nem álltak rendelkezésünkre, a **221** és **222** anyagok oxim melletti syn (kb. 18,8 ppm) és anti (kb. 26,2 ppm) metilén szén ^{13}C eltolódás értékeit használtuk referenciaként. Mivel a **215-220** anyagok 3'-CH₂ szénatomjainak eltolódás értékei a 22,7-23,7 ppm tartományba estek, az elektrongazdag metoxicsoport jelenlétét is figyelembe véve valamennyi esetben az oxim *E*-orientációját tudtuk valószínűsíteni.

Az előállított anyagok vírusellenes hatását nemzetközi kutatási együttműködések keretében vizsgáltuk.

A **129**, **135**, **136**, **138**, **203-208**, és **215-222** anyagok HIV-1 ellenes hatását egy pszeidotípus vírus teszten vizsgáltuk (Dr. Carole Devaux, Luxembourg Institute of Health, Luxemburg), amely egy replikációs ciklus mérését teszi lehetővé és leginkább olyan anyagokra érzékeny,

amelyek a HIV replikációjának korai lépéseit gátolják (reverz transzkripció, integráció).^[168] A tetrahidroprotoapigenon (**221**) gyenge HIV ellenes hatást mutatott, s bár ez 100 µM koncentrációban mindössze kb. 50% gátlást jelentett, ez a hatás mégis érdekes lehet annak fényében, hogy az anyag 500 µM koncentrációban sem volt citotoxikus a gazdasejteken.

A **135**, **136**, **138** és **203-222** anyagok EBV ellenes hatását az Rta fehérje expresszióján keresztül vizsgáltuk P3HR1 sejtek lítikus indukcióját követően (Dr. Li-Kwan Chang, National Taiwan University, Tajpei, Tajvan); ez a teszt alkalmas volt arra, hogy reprodukálja a pozitív kontrollként használt protoapigenon (**129**) EBV ellenes hatásával kapcsolatban korábban közölt legfontosabb eredményeket [SR17]. Az első szűrővizsgálat 250 nM dózisban történt, amely a protoapigenon (**129**) esetében már erős hatást váltott ki. Három anyag, a **135**, **136** és **138** volt hatásos ebben a koncentrációban, s az ezt követő hígítási vizsgálat alapján meghatározott IC₅₀ értékeik rendre 467, 208 és 285 nM voltak. Annak ellenére, hogy a protoapigenon (**129**) IC₅₀ értéke alacsonyabb, 127 nM volt, a protoapigenon 1'-O-izopropil éter (**135**) jóval gyengébb citotoxicitása miatt kedvezőbb toxicitás/EBV-ellenes hatás szelektivitást mutatott: **129**: IC₅₀^{MTT}/IC₅₀^{EBV}=30,1; **135**: IC₅₀^{MTT}/IC₅₀^{EBV}=73,0. Ez egy relevánsnak tekinthető, kb. 2,6-szoros antivirális szelektivitás növekedést jelent. A butil oldalláncot tartalmazó **136** anyagnak a **135** anyaghoz képest kb. kétszer erősebb antivirális hatása miatt ugyanakkor érdekes lehet a jövőben hosszabb, elágazó (pl. *i*-butil, *i*-pentil, prenil, stb.) oldalláncot tartalmazó származékok EBV ellenes hatását is megvizsgálni.

Azt is érdemes megjegyezni, hogy a két hatás erőssége közötti arányt a citotoxicitás felé is el lehetett tolni, így a **136** anyag citotoxikusabb, és gyengébb EBV gátló volt, mint a protoapigenon (**129**), ezáltal a fentiek szerinti szelektivitása is kb. háromszor alacsonyabb. Ez arra utal, hogy a protoflavonok szerkezet-hatás összefüggéseit ki lehet úgy használni, hogy eltérő farmakológiai célpontok befolyásolására alkalmas származékokat nyerjünk, s ez szükséges is lesz a jövőben ahhoz, hogy tényleges gyógyszerkutatási potenciáljukat értékelni lehessen.

6. A KÉMIAI TÉR ANTIOXIDÁNS INSPIRÁLTA KITERJESZTÉSE

5. TÉZIS. Megfogalmaztuk egy új diverzitás-orientált gyógyszerkutatási stratégia alapjait. Ezt az az elgondolás ihlette, hogy i) természetes, kismolekulás **antioxidánsok reaktív oxigén és/vagy nitrogén fajták** befogásával **kémiaailag stabil, bioaktív metabolitokká** alakulhatnak, és ii) ezek az anyagok anyavegyületeiknél sokszor komplexebb szerkezetüknek köszönhetően azoktól specifikusabb bioaktivitás profillal rendelkezhetnek. Ezt a jelenséget és új, bioaktív anyagok felfedezésére való esetleges felhasználhatóságát hidroxifahéjsav származékok példáján vizsgáltuk. A **p-kumársav oxidált keverékeinek** vizsgálata során egy **p-kinol** szerkezetű **antitumor** hatású vezérmolekulát fedeztünk fel, a **gravikinont**. A gravikinin erős hatású, **jó tumor szelektivitással** bír, és hatékonyan **gátolja** az **ATR** függő jelátvitelt. Közvetett bizonyítékok alapján valószínűsítettük, hogy a gravikinin biológiai környezetben az oxidatív stressz szintjétől függően **szabadgyökfogással keletkezik** anyavegyületéből, a metil-*p*-kumarátból. A **metil kaffeát** bioreleveáns, **peroxinitrittel** vagy **AAPH** reagenssel való oxidációjával egy erős **antitumor hatású dimer** keletkezik, amely a szakirodalom szerint a tumor mikrokörnyezetén hatva erős antimetasztatikus hatást vált ki *in vivo*. Eredményeink arra utalnak, hogy **antioxidánsokból reaktív oxigén és/vagy nitrogén fajták segítségével** végzett **diverzitás-orientált szintézis** egy olyan **kémiai metabolit-teret** tár fel, amely méltó a **gyógyszerkutatás** kiemelt figyelmére.

Kutatócsoportunk **10 oxidált antioxidáns metabolit** előállítását, és vizsgálatát végezte el.

A tézishoz kapcsolódó közlemények: S25, S26^m, S27 (IF = 4,082 + 9,300 + 6,205 = 19,587)

Irodalmi áttekintés az 5. Tézishez [S26]

A természetes, kismolekulás antioxidánsok egészségvédő, ill. terápiás alkalmazása rendkívüli tudományos és populáris érdeklődést váltott ki az elmúlt néhány évtizedben, amit jól mutat az, hogy például a PubMed adatbázisban az „antioxidant” keresőszó több, mint 34 000 találatot ad csak a 2020. évre. Ez nyilvánvalóan visszavezethető arra, hogy az oxidatív stressz számtalan nehezen, vagy sokszor csak tünetileg kezelhető krónikus betegség patomechanizmusában, kialakulásában, ill. progressziójában kulcsszerepet játszik, mint például a diabétesz, tumorbetegségek, és degeneratív központi idegrendszeri kórképek.^[169]

^m Az S26 sorszámú saját közlemény egy összefoglaló cikk, az ebben közöltek ugyanakkor jelentős mértékben hozzájárulnak az itt összefoglalt munka újdonságtartalmához egy új, antioxidáns inspirált szisztematikus gyógyszerkutatási stratégia első megfogalmazásával, amely egyúttal az 5. Tézisben bemutatott kísérletes munka kiindulási hipotézisét jeleníti meg.

A 80-as évek közepén Helmut Sies által alkotott „oxidatív stressz” kifejezést^[170] a közelmúltban Jones definiálta újra a redox jelátvitel és kontrollja megbomlásaként.^[171] Ez kihangsúlyozza, hogy a redox folyamatok fontos fiziológias szerepet töltenek be a sejt homeosztázisában, és stresszt ezen folyamatok dinamikus, jól kontrollált egyensúlyának megbomlása okoz.^[172-175] Ehhez kapcsolódóan az egész tudományterület alapkoncepcióját, és ezzel együtt az antioxidáns hatáshoz kapcsolódó aspektusokat is jelentős mértékben újra értelmezték, s ez a folyamat jelenleg is tart.^[176-178]

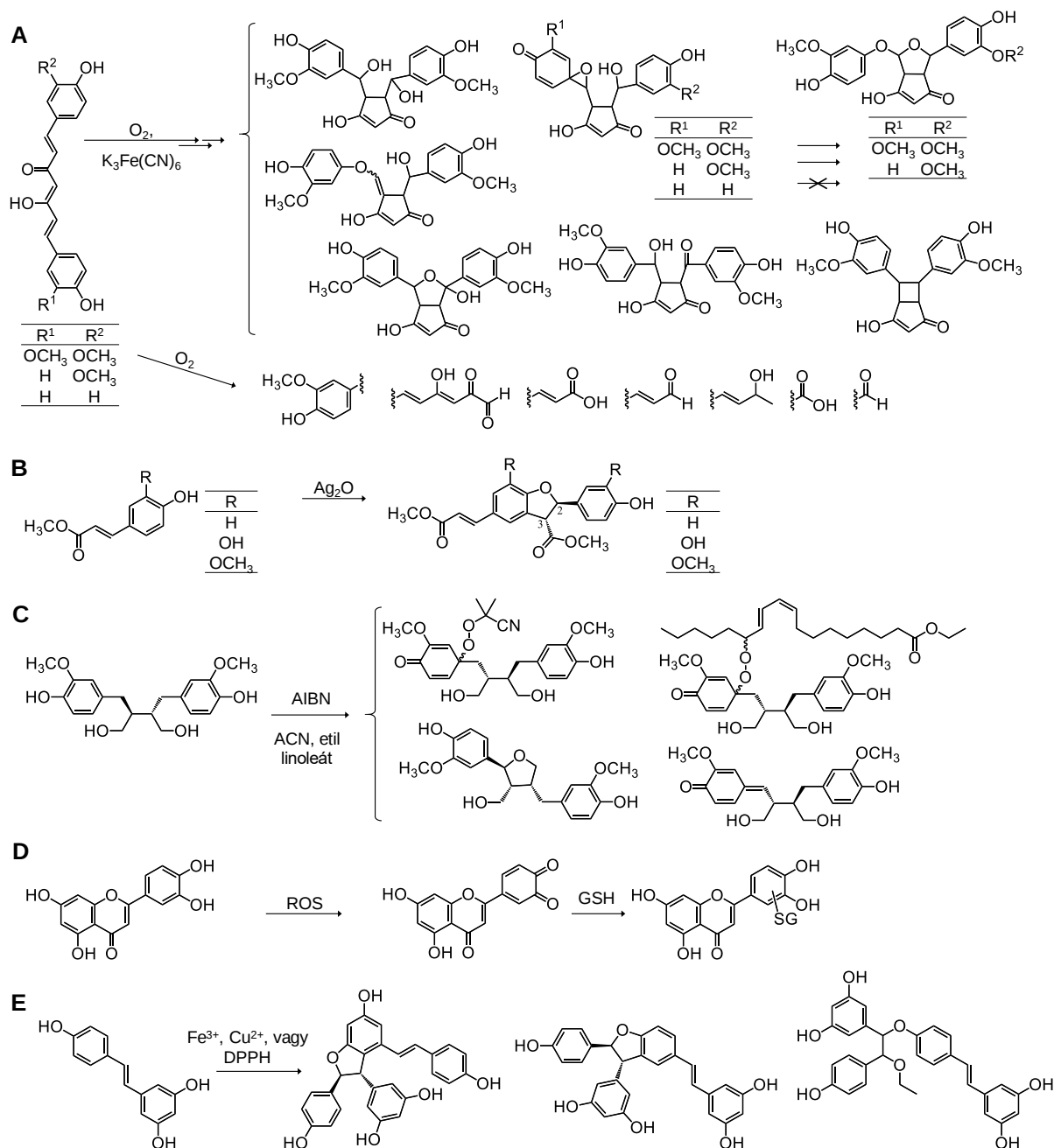
Az élő szervezetben keletkező legfontosabb reaktív oxigén fajták (ROS) a hidrogén peroxid (H_2O_2)^[179], a szuperoxid anion gyök ($\text{O}_2^{\cdot-}$)^[180], a hipoklórossav (HOCl)^[181], a szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$)^[182], a hidroxilgyök ($^{\cdot}\text{OH}$), valamint az alkoxil ($\text{RO}^{\cdot}$) és peroxil gyökök ($\text{ROO}^{\cdot}$)^[183]. A fő reaktív nitrogén fajták (RNS) a nitrogén oxid ($^{\cdot}\text{NO}$), nitrogén dioxid ($^{\cdot}\text{NO}_2$), és a peroxinitrit (ONOO^-)^[184]. A fent említett ROS és RNS rövidítéseket gyakran összevont formában, RONS-ként említik. Az elsődleges RONS, mint például a H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, és $^{\cdot}\text{NO}$ sérülést okozó potenciálja csekély, és szintjeik specifikus enzimatisz kontroll alatt állnak.^[183, 185] A makromolekulák irreverzibilis oxidációját, és így az oxidatív stresszel összefüggésbe hozott kórképekben tapasztalható funkcionális sérüléseket a jóval reaktívabb és kevésbé hatékonyan szabályozott mennyiségű, toxikus, ún. másodlagos RONS, leginkább a hidroxilgyök, a peroxinitrit és a hipoklórossav okozza.^[185]

A kismolekulás antioxidánsok oxidatív stresszre kifejtett hatásával kapcsolatban hosszú ideig tartotta magát (és a szakirodalomban mindmáig jelen van) az a véletlen leegyszerűsítés, amely ezen anyagok hatását azzal magyarázza, hogy szabadgyökfogóként hatnak a reaktív oxigén és nitrogén fajtákkal szemben, és ezáltal közvetlen kémiai reakciók során csökkentik azok mennyiségét. Ezt a közvetlen védő hatást rendkívül egyszerű *in vitro*, kémiai módszerekkel jellemezni, s ennek köszönhetően extrém nagy számban találhatók a szakirodalomban ilyen modellek (pl. DPPH, ABTS, ORAC tesztek) alkalmazásával nyert antioxidáns hatást leíró közlemények.^[184, 186-188] Ezen modellek ugyanakkor népszerűségük ellenére sajnos csekély *in vivo* relevanciával bírnak a RONS szintek csökkentése szempontjából. Ma már elfogadott tény, hogy az étrendi antioxidánsok döntő többsége *in vivo* nem képes áttörni azt a kinetikus gátat, amit a toxikus RONS reaktivitása és rövid félideje jelent, ezáltal közvetlen szabadgyökfogással nem képesek releváns RONS szint csökkentő hatást kifejteni.^[177] Talán az egyetlen kivétel ez alól az E-vitamin, amely elegendő mennyiségben van jelen biológiai membránokban ahhoz, hogy hatékonyan védje azokat a hidroxilgyökök által okozott sérülések ellen.^[189] Ennek kapcsán az is általánosan elfogadott, hogy nem csak a RONS termelődést határozzák meg enzimatisz folyamatok (mitokondriális ETC komplex I. és II., lipoxigenázok,

ciklooxigenázok, XO, citokróm P monoxigenázok),^[183, 185] de az élő szervezet ezekkel szembeni elsődleges védelmét is megfelelő enzimek (szuperoxid dizmutázok, glutation peroxidáz, kataláz, glutation-S-transzferázok, UDP-glükuronil transzferáz, NADP kinon oxidoreduktáz, stb.)^[190-192] látják el, és nem kismolekulás szabadgyökfogók.^[190] Ennek megfelelően az oxidatív stressz egyes antioxidánsok által való tényleges *in vivo* csökkentése leginkább ezeknek az enzimrendszereknek, és az ezek által regulált redox jelátviteli utak modulálásán keresztül valósul meg.

Fontos leszögezni ugyanakkor, hogy míg a kismolekulás (étrendi) antioxidánsok direkt szabadgyökfogó tulajdonsága nem elegendő ahhoz, hogy az érintett szabadgyökök szintjét *in vivo* releváns mértékben csökkentse, ezen anyagok érzékeny kémiai szerkezetéből kifolyólag ilyen reakciók szükségképpen lezajlanak amikor egy oxidatív stressz alatt álló biológiai környezetbe kerülnek. Ezt figyelembe véve nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt, hogy bármely RONS-antioxidáns kölcsönhatásban az antioxidáns kémiai szerkezete is nyilvánvalóan megváltozik, s egy biológiai környezetben a keletkezett termék(ek) hatásával is számolni kell. Ez jelentheti egyrészt az antioxidánsból keletkező, annál természetsszerűleg reaktívabb primer termék makromolekulákhoz való irreverzibilis kötődését; ez (a termék nagyobb szerkezeti komplexitásából fakadóan) a befogott RONS-hoz képest már jóval specifikusabb kötődés lehet, így az ilyen jellegű „sérülés” nem csak toxicitásra, de adott esetben farmakológiai aktivitásra is lefordítható. Jó példa erre a fenolos anyagok oxidációjával keletkező kinon termékek cisztein reziduumok tiol csoportjaihoz való kovalens kötődése, amely komplex jelátviteli következményeken (pl. a Keap1/Nrf2 jelátvitel aktivációján) keresztül adaptív antioxidáns választ, és végeredményben jótékony hatást is kiválthat.^[193, 194] Másrészt, és ez egy gyógyszerkutatási szempontból különösen inspiráló gondolat, RONS befogást követően az antioxidáns kémiaiilag stabil metabolittá is alakulhat, akár másodlagos reakció(k), akár belső átrendeződés(ek) során. Az így keletkezett metabolitok nem feltétlenül viselkednek kovalens gátlószerekként: immár nem reaktív ágensként reverzibilis módon is befolyásolhatnak változatos biokémiai mechanizmusokat, jelátviteli utakat, receptorokat, enzimeket. Érdekes módon az antioxidánsok biológiai hatásának ezen magától értetődőnek tűnő aspektusa meglepően alulreprezentált a vonatkozó szakirodalomban. Termékprofil és farmakológiai vizsgálattal egybekötött biomimetikus oxidatív átalakításokat (ált. átmeneti fém-katalizált reakció, amely felfogható ROS, vagy RNS által kiváltott oxidáció modelljeként is) csak sporadikusan, és leginkább élelmiszerkémiai célkitűzések mentén végeztek.^[195-197] A 34. ábrán az általam fellelt olyan példákat foglaltam össze, amelyek esetében elérhető volt a relevánsnak tekinthető (ugyanazon modellben végzett) farmakológiai összehasonlítás az antioxidáns, és

annak oxidált, igazoltan vagy valószínűsíthetően RONS befogással keletkező terméke(i) között. Az egyes antioxidánsok és oxidált termékprofiljuk farmakológiájának részletes összehasonlítását a vonatkozó saját közlemény tartalmazza [S26], itt, terjedelmi okokból, csak egy rövid áttekintést mutatok be.



34. Ábra. Irodalmi példák antioxidánsok biomimetikus oxidációval nyert termékeire, amelyek anyavegyületeiktől igazoltan jelentősen eltérő farmakológiai tulajdonságokkal bírnak azonos kísérletes modellen. Oxidációtól függően megjelenő, vagy jelentősen fokozódó hatások: **A** (kurkumin): topoizomeráz,^[198, 199] XO,^[200] és NF-κB gátlás;^[201] **B** (metil kaffeát, metil-*p*-kumarát, és metil ferulát): citotoxicitás, antiangiogén és antimetasztatikus hatás;^[202-204] **C** (szezoizolaricrezinol): zsírszövetek differenciálódásának és zsírfelhalmozásának gátlása;^[205] **D** (luteolin): glutation-S-transzferáz π gátlás;^[206] **E** (rezveratrol): lipoxigenáz hidroperoxidáz aktivitásának gátlása^[196] [S25].

A fentiek alapján az antioxidánsokra általánosságban is igaz lehet az, hogy biológiai környezetben a mikrokörnyezettől és az abban jelen levő oxidatív stressz mértékétől függő, RONS befogás következtében végbemenő irreverzibilis kémiai átalakulásokat szenvednek, s az így keletkező oxidált metabolitok jelentősen eltérő farmakológiai hatása befolyásolhatja a teljes hatásprofil. Ennek egyrészt az antioxidánsok hatásának, és gyakran tapasztalt polifarmakológiájának kémiai-biológiai értékelésében és értelmezésében lehet fontos szerepe. Másrészt a keletkezett termékek véleményem szerint egy gyógyszerkutatási szempontból különösen értékes kémiai teret jelölnek ki, az alábbi megfontolások alapján.

- 1) Antioxidánsok RONS befogása következtében végbemenő, kémiai oxidációja során a keletkező termékprofil a befogott reaktív ágens, és így az oxidatív stressz alatt álló biológiai mikrokörnyezet determinálja.
- 2) Egyes antioxidánsok lehetséges fragmentálódásától eltekintve ezen anyagok egy jelentős részének szerkezete változatos szabadgyökös (intra-, és/vagy intermolekuláris) keresztkapcsolások során stabilizálódik, különleges új gyűrűket, heterociklusokat, stb. hozva létre, ezáltal anyavegyületeiknél jóval komplexebb kémiai szerkezetűek, és azoknál óhatatlanul specifikusabb hatásúak is lesznek.
- 3) A fentieknek megfelelően az így keletkező termékek gazdag, az adott mikrokörnyezet oxidatív stressz viszonyaiból közvetlenül lefordított kémiai információt hordoznak.

Ezen megfontolások már önmagukban is egy különösen érdekes, várhatóan bioaktív anyagokban gazdag kémiai teret valószínűsítene. Érdekesnek tartom ugyanakkor azt is hozzátenni, hogy az élővilág rendkívül összetett evolúciós viszonyait (pl. az érendben is bőséggel megtalálható növényi antioxidánsok és az oxidatív stressz-szel összefüggő biokémiai jelátviteli utak párhuzamos evolúcióját) is figyelembe véve ez a kémiai információ jó eséllyel az oxidatív stressz-szel valamilyen módon összefüggő, releváns farmakológiai információt is hordoz.

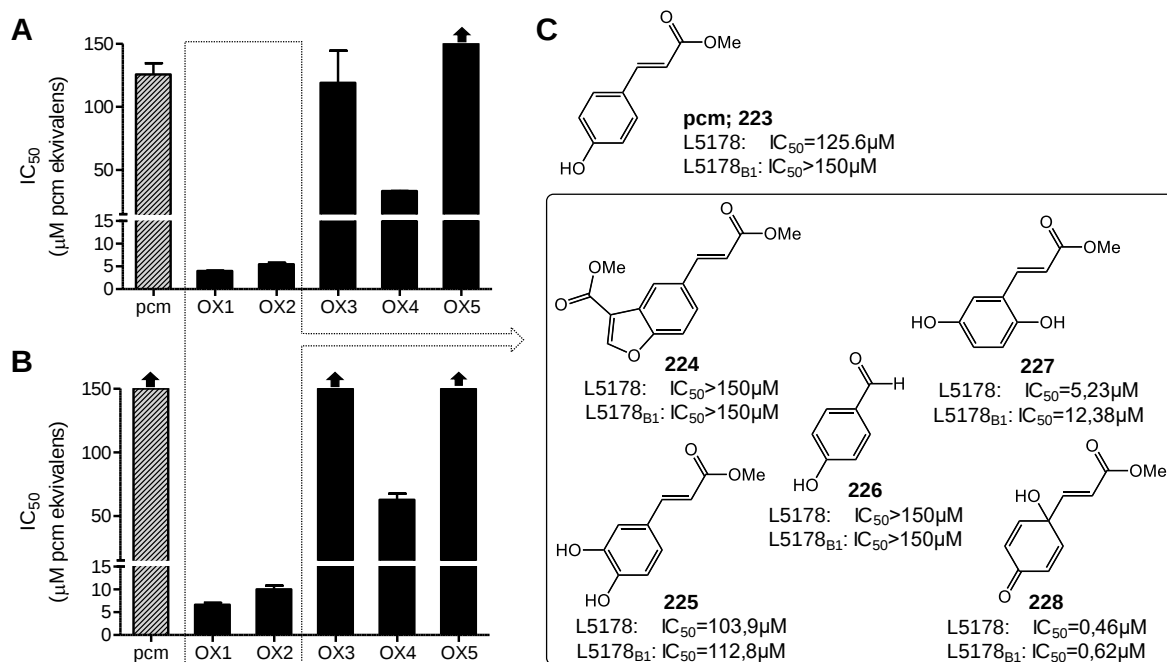
A diverzitás-orientált szintézis a kismolekulás gyógyszerkutatás egyik nagy jelentőségű kémiai megközelítése.^[207-209] Ennek kapcsán egyre inkább megfigyelhető az a paradigmaváltás, amely a tisztán kémiai diverzitás helyett az úgynevezett biológiai teljesítmény diverzitást helyezi előtérbe.^[210] A fent részletezett gondolatok alapján antioxidánsok RONS-mediált oxidációja, mint vezérelv alkalmazása a biológiailag releváns kémiai diverzitás fokozására is ígéretes lehetőségnek tűnik, ezáltal ilyen irányú szisztematikus vizsgálatok egy hatékony új gyógyszerkutatási stratégia alapját képezhetik.

A következő két alfejezetben a fenti megfontolások alapján végzett „proof-of-concept” jellegű vizsgálataink eredményeit mutatom be. Erre két hidroxifahéjsav származékot, a metil-*p*-kumarátot és a metil-kaffeátot választottuk kiindulási vegyületekként.

A hidroxifahéjsavak az étrendi antioxidánsok egyik leginkább elterjedt csoportját képezik, megtalálhatóak az olívában, számos zöldségfélében (pl. burgonya, fejjessaláta, brokkoli, karfiol, cikória, káposzta), gyümölcsökben (pl. változatos bogyók, szőlő, datolya, alma), búzában, kenyérben, olajos magvakban (pl. földimogyoró), étcsokoládében, növényi olajokban és italokban (pl. sörök, borok, gyümölcslevek, tea, kávé).^[211] A hidroxifahéjsavak antioxidáns hatását,^[212-214] és változatos, ezzel összefüggésbe hozható (pl. kemopreventív)^[215, 216] farmakológiai tulajdonságaikat nagyszámú közlemény tárgyalja. A hidroxifahéjsavak kiválasztását mindezek mellett az inspirálta, hogy korábban a metil kaffeátból ezüst-oxid katalizált biomimetikus oxidáció során egy rendkívül erős antitumor és antiangiogén hatású dimert (29B ábra) állítottak elő,^[202, 203] amely különleges, a tumor mikrokörnyezetén keresztül kiváltott antimetasztatikus hatása révén a közelmúltban nagy tudományos érdeklődést váltott ki.^[204]

A metil-*p*-kumarát ROS befogással összefüggő metabolit terének vizsgálata [S27]

Munkánkat a metil-*p*-kumarát (pcm, 223) oxidatív átalakítása során nyert termék-elegyeinek vizsgálatával, ill. citotoxikus hatásuk L5178 és L5178_{B1} sejteken való szűrővizsgálatával indítottuk. Az első próbakísérletek során oxidálószerként a hipervalens jódivegyület PIFA-t (acetonitril, acetonitril – víz / 9:1, metanol, metanol – víz / 9:1 oldószerekben), ill. piridinium klorokromátot (diklórmétánban) választottuk, így nyertük rendre az OX1-OX5 jelzésű keverékeket. A PIFA, mint eredendően nem egy klasszikus biomimetikus reagens alkalmazását két indok támasztotta alá. Egyrészt, *p*-fenolos anyagok oxidációja során ez a reagens egyelektron-transzferrel (SET) képes kation gyök képződését indukálni.^[217] Másrészt protikus oldószerben ez a kation gyök deprotonálódhat, ami ugyanahhoz a fenoxil gyökhöz vezet, amely hidrogén atom transzfer (HAT) során képződne. Mivel a *p*-kumársavról leírták, hogy SET vagy HAT mechanizmuson keresztül képes ROS-t befogni,^[218] feltételeztük, hogy a PIFA alkalmas lehet az ilyen események során keletkező metabolit mintázatok valamilyen szintű modellezésére. Az OX1 és OX2 oxidált elegyek citotoxicitása jelentősen fokozódott a kiindulási anyaghoz képest, így ezekből léptéknövelést követően igyekeztünk előállítani a hatásnövekedésért vélhetően felelős tartalomanyagokat. Ezeket az eredményeket a 35. ábra foglalja össze.



35. Ábra. A metil-*p*-kumarát (pcm; **223**) oxidációjával nyert elegyek (OX1-OX5) citotoxikus hatása L5178 (**A**) és multidrog rezisztens L5178_{B1} (**B**) limfóma sejteken, és az OX1 és OX2 elegyekből előállított tartalomanyagok (**224-228**) szerkezete és hatása anyavegyületükével összehasonlítva (**C**). A pozitív kontroll doxorubicin IC₅₀ értéke rendre 0,41 és 11,83 μM volt (L5178_{B1}: kb. 30-szoros rezisztencia).

A **224** anyag keletkezése valószínűleg a korábban publikált dihidrobenzofurán lignánokhoz hasonló mechanizmussal indult (lásd 29B ábra), s szerkezete a dimer egyik tagjának aromás gyűrűjének eliminációjával stabilizálódott. A **225** és **228** anyagok keletkezése a PIFA vizes közegben való alkalmazásával, a **226** pedig az oldallánc olefinjének oxidációjával intuitív módon magyarázható. A **227** anyag szerkezete ugyanakkor egy váratlan hidroxilcsoport vándorlás eredménye; fenoxil gyök köztitermék feltételezésével a *p*-OH csoport *meta* helyzetbe vándorlása mögött egy epoxid gyűrű keletkezését és felnyílását gyaníthatjuk. Ezt az anyagot (metil grevillát) korábban a narancsjázmin nevű örökzöld mirtuszféléből (*Murraya paniculata* L.) izolálták.^[219] A **228** anyag (gravikinin) szintén egy természetes anyag, korábban az ausztrál selyemtölgyből (*Grevillea robusta* A. Cunn) izolálták.^[220] Ez az anyag *p*-kinol szerkezete alapján a 4. Tézis-ben tárgyalt protoflavonok szerkezeti analógjaként is felfogható.

Az anyagok citotoxicitását megvizsgálva a **227**, és kiváltképp a **228** anyagot találtuk anyavegyületüknél jóval erősebb hatásúnak. A **227** anyag a szenzitív/multidrog rezisztens sejteken mutatott hatása alapján enyhe, kb. 2,4-szeres keresztrezisztenciát mutatott a doxorubicinnel, így feltehető, hogy ABCB1 szubsztrát. A **228** anyag ugyanakkor mindkét vizsgált sejtvonalon bő két nagyságrenddel erősebb, citotoxikus hatást váltott ki, mint a metil-*p*-kumarát (**223**), és képes volt áthidalni az ABCB1-mediált multidrog rezisztenciát. Ígéretes hatása alapján ezt az anyagot nemzetközi kutatási együttműködések segítségével (Dr. Milica

Pešić, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrád, Szerbia; és Dr. Hui-Chun Wang, Graduate Institute of Natural Products, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Tajvan) számos további sejtvonalon teszteltük, és azt is megvizsgáltuk, képes-e (a szerkezetileg közeli rokon protoflavonokhoz hasonlóan) az ATR/Chk-1 függő jelátvitelt is gátolni. Vizsgálataink alapján a gravikinin (228) egy kifejezetten ígéretes bioaktív anyag, amely vezérmolekulaként akár komolyabb preklinikai fejlesztés kiindulópontja is lehet. Tumor sejtvonalakon (NCI-H460 és doxorubicinhez adaptált NCI-H460/R) DNS károsító hatást fejtett ki, normál sejttes modellként használt HaCaT keratinocitákon ugyanakkor DNS protektív hatása volt. Várakozásunknak megfelelően ez az anyag az ATR/Chk-1 jelátvitel erős gátlószerének bizonyult. Egy érdekes különbséget is tapasztaltunk ugyanakkor az ebben a vizsgálatban pozitív kontrollként használt protoapigenonhoz (129) képest: attól eltérően a 228 anyag az ATM/Chk-2 aktiválódását váltotta ki, amely feltehetően az általa indukált kétszálú DNS törések eredménye lehet.

A kiindulási hipotézisünk vizsgálatához, tehát annak eldöntéséhez, hogy lehetséges-e biológiai környezetben ennek az anyagnak anyavegyületéből az oxidatív stressztől függő *in situ* keletkezése, *in vitro* és *in silico* megközelítéseket alkalmaztunk. Először azt vizsgáltuk meg, oxidatív stressznek kitett sejteken megváltozik-e a pcm hatása a stressz alatt nem álló sejteken tapasztalathoz képest. Ehhez MCF-7 emlőtumor sejteken végeztünk kombinációs vizsgálatokat a 3. Tézisben leírtakhoz hasonló, checkerboard kísérletes elrendezésben, és a pcm (223) és a hidrogén peroxid, mint külső oxidatív stresszor interakcióját vizsgáltuk citotoxikus hatás szempontjából. Ezen vizsgálatok eredményeit a 4. táblázat mutatja be.

4. Táblázat. A pcm (223) interakciója H₂O₂ által indukált oxidatív stressz-szel MCF-7 sejteken kiváltott citotoxikus hatás szempontjából. Kombinációs index (CI) értékeket ED₅₀, ED₇₅ és ED₉₀ hatás szintjén adtam meg. $CI_{avg} = (CI_{50} + 2 \cdot CI_{75} + 3 \cdot CI_{90}) / 6$; $0 < CI < 1$, $CI = 1$ és $CI > 1$ rendre szinergizmust, additivitást (interakció hiányát), és antagonizmust jelez. D_m, m és r rendre a „median-effect” görbe x tengelymetszetének inverz logaritmusát, alaktényezője és lineáris korrelációs együtthatója.^[103]

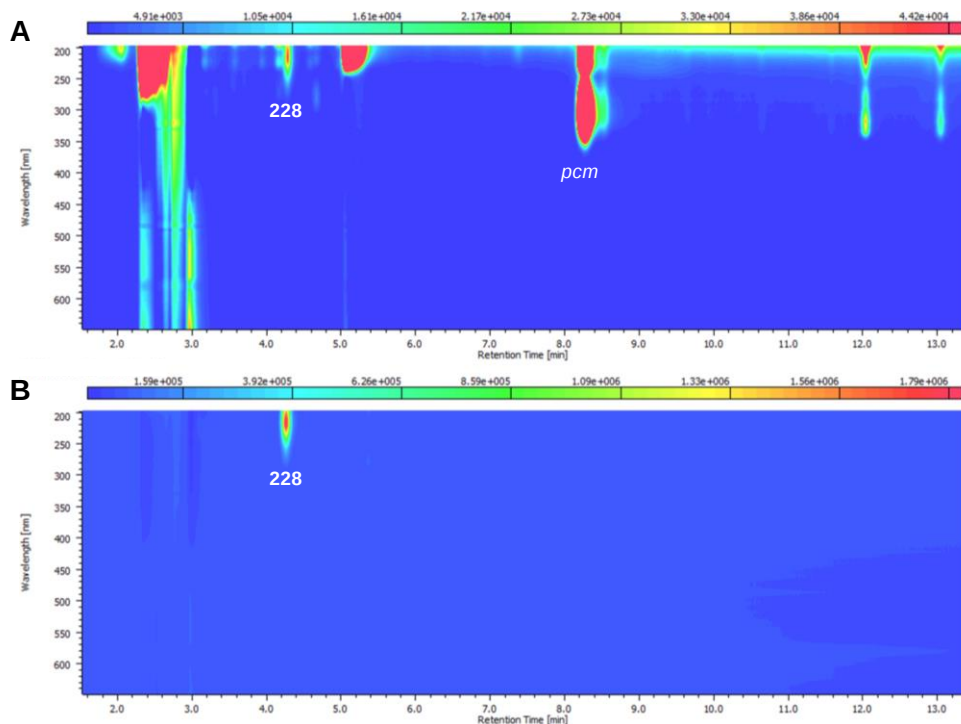
H ₂ O ₂ : pcm arány	Kombinációs index (CI)			D _m	m	r	CI _{avg}
	CI ₅₀	CI ₇₅	CI ₉₀				
2.5:1	0.79	0.60	0.45	247.66	2.109	0.985	0.556
1.25:1	0.93	0.60	0.39	250.18	3.197	0.988	0.550
0.625:1	1.06	0.68	0.44	222.79	3.610	0.974	0.623

Egyértelműen kimutatható volt a szinergizmus, kiváltképp a magasabb szintű hatás esetén, amely antitumor (citotoxikus) hatás szempontjából nagyobb jelentőségű.^[103] Az is megfigyelhető volt, hogy a szinergizmus tendenciózan erősebbnek tűnt a magasabb H₂O₂/pcm aránynál, tovább erősítve azt a feltevést, hogy az oxidatív stressztől függő mértékben

keletkező metabolitok (is) lehetnek a jelenség hátterében. Fontos megjegyezni, hogy vizsgálataink szerint a pcm metanolos oldatban és kb. 20% H₂O₂ jelenlétében legalább 92 órán át stabil, tehát kicsi az esélye annak, hogy a pcm és a H₂O₂ közvetlen reakciója vezetett volna az eredményeket meghamisító oxidációhoz.

A pcm hidroxilgyök fogó képességét együttműködésben (Dr. Balogh György Tibor, Richter Gedeon Nyrt, jelenleg BME Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék) vizsgáltuk a Fenton reakció 2-deoxi-D-ribózon kifejtett oxidatív károsodás mértékén keresztül. A pozitív kontroll az NXY-059 (diszulfenton-Na; Cerovive) volt, amely neuroprotektív antioxidánsként klinikai 3. fázisú vizsgálatokig jutott.^[221] Azt tapasztaltuk, hogy ebben a modellben a pcm erősebb hidroxilgyökfogó (IC₅₀=0.345 [95% C.I. 0.313–0.380] mM) volt, mint az NXY-059 (IC₅₀=1.826 [95% C.I. 1.501–2.220] mM), amely utóbbi hatása jó egyezést mutatott a korábban nyert adatokkal.^[222]

Ezt követően elvégeztük a pcm (223) Fenton reakcióját annak vizsgálatára, hogy kimutatható-e a gravikinin keletkezése ilyen körülmények között. A reakcióelegyben RP-HPLC-PDA (36. ábra), valamint ezzel párhuzamosan együttműködésben végzett LC-MS/MS mérések segítségével egyértelműen igazolni tudtuk a gravikinin jelenlétét. Ez alapján tehát a pcm hidroxilgyökök, vagy a Fenton reakció során keletkező valamely egyéb ágens^[223-225] által kiváltott oxidáció során valóban képes gravikinonná (228) alakulni.

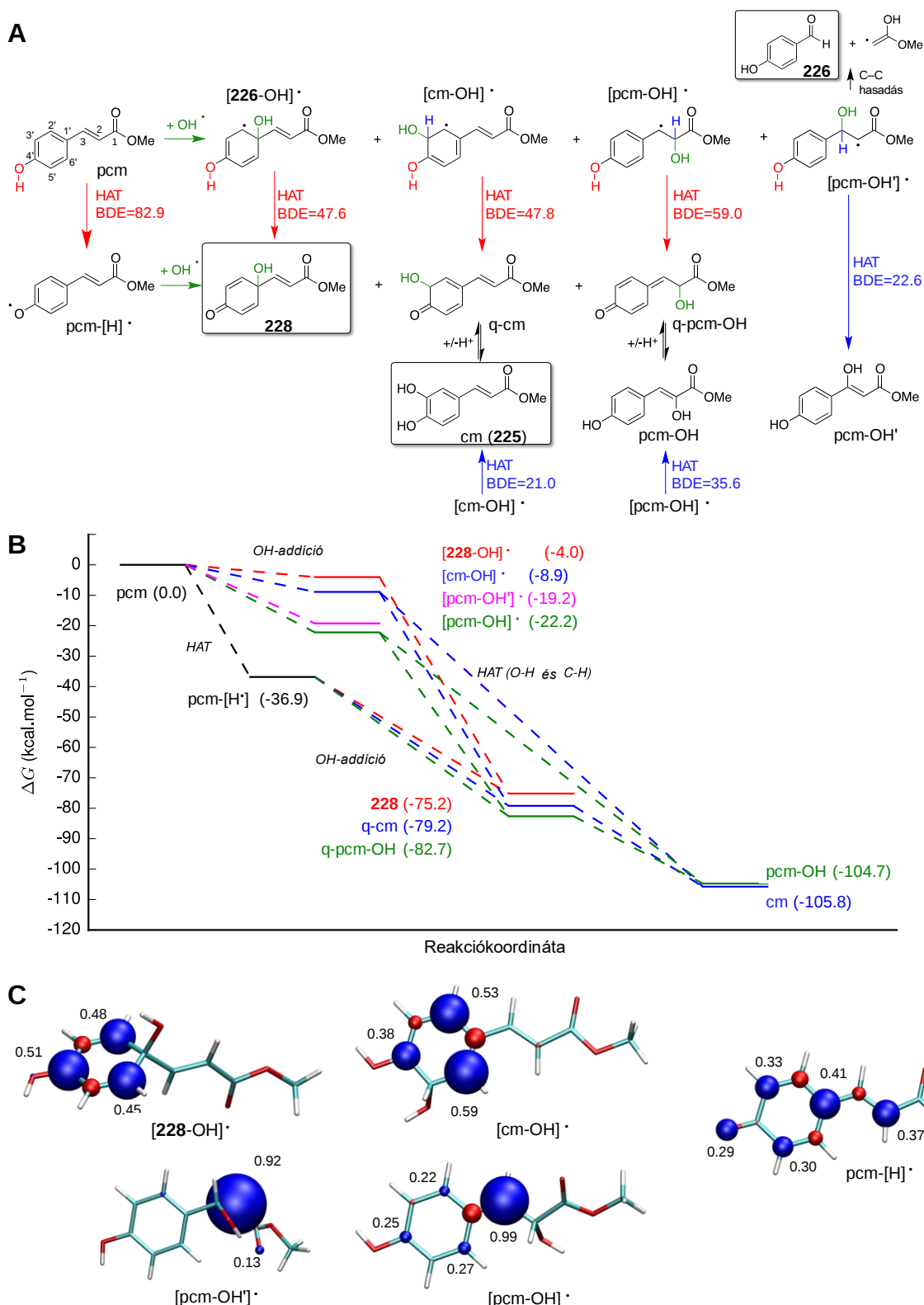


36. Ábra. A pcm (223) Fenton reakciója során nyert reakcióelegy RP-HPLC-PDA ujjlenyomat kromatogramja (A), a gravikinin (228) standarddal (B) való összehasonlításban. A gravikinin egyértelmű jelenlétét LC-MS/MS vizsgálatok is megerősítették.

A hidroxilgyökök hatására végbemenő pcm-gravikinin átalakulást ezután *in silico* módszerekkel, nemzetközi együttműködés keretében vizsgáltuk (Prof. Patrick Trouillas, Université de Limoges, Limoges, Franciaország), amely munkába egy rövid tudományos kiküldetés kapcsán személyesen is lehetőségem volt bekapcsolódni. Sűrűségfunkcionál elmélet (DFT) alkalmazásával vizsgáltuk mind a hidroxilgyök addíciójával, mind a H-atom absztrakcióval kezdődő reakcióutak lehetséges termékeit B3P86/6-31+G(d,p) elméleti szinten; a reakcióutakat és a képződő közti- és végtermékek termodinamikai analízisét, valamint a szabad gyökös köztitermékek számított spinsűrűség-eloszlását a 37. ábra mutatja be.

A termékek képződését a termodinamika és kinetika együttesen határozza meg. Nagy valószínűséggel a termodinamikailag kedvezőbb hidrogénatom transzferen keresztül induló reakcióút a domináns, majd a keletkező fenoxil gyök spinsűrűség eloszlása alapján a gravikinit (228) eredményező para-helyzetű OH addíció lesz gyorsabb, így a 228 kinetikai termékként keletkezik, míg a q-cm és q-pcm-OH, majd a belőlük tautomer átalakulással keletkező pcm-OH és metil kaffeát (cm, 225) lesznek a termodinamikai termékek, utóbbi a globális termodinamikai termék. Annak ellenére, hogy ez alapján utóbbi egy főtermék, ez mindössze a PIFA-mediált oxidáció során volt kimutatható, a Fenton-reakcióban nem. Ez feltehetőleg a katekol-gyűrű további oxidációra való érzékenysége miatt volt így, a keletkező cm (225) a Fenton-reakció körülményei között emiatt valószínűleg azonnal el is bomlott, ill. másodlagos, harmadlagos stb. termékekké alakult.

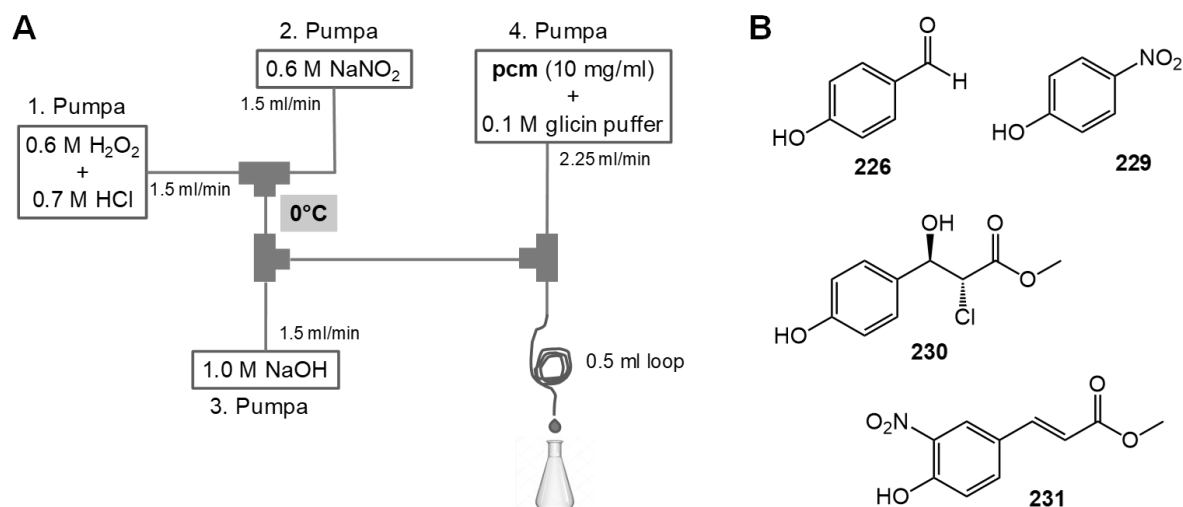
A fenti indirekt bizonyítékok összességében tehát arra utalnak, hogy az étrendi antioxidáns pcm-ből ROS befogással (tehát lényegében az oxidatív stressz szintje által determinált módon) legalább egy hatásos antitumor anyag keletkezhet.



37. Ábra. A pcm (223) hidroxilgyökökkel való reaktivitása (A), az egyes reakciólépések termodinamikai elemzése (B), és a szabadgyökös köztitermékek spinsűrűség-eloszlása (C). A bekeretezett szerkezetek a pcm oxidációjából experimentálisan detektált termékeket jelzik. HAT: hidrogén atom transzfer, cm: metil kaffeát (225); a kötés disszociációs entalpia (BDE) az X-H kötés homolitikus hasadásához szükséges entalpia a következők szerint: $BDE(R-H) = H(R^{\bullet}, 298\text{ K}) + H(H^{\bullet}, 298\text{ K}) - H(R-H, 298\text{ K})$, ahol H az entalpia; a HAT O-H és C-H BDE értékek ábrázolása rendre piros és kék; valamennyi reakciólépés Gibbs energiája (ΔG , kcal·mol⁻¹) a pcm-hez képest értendő. C: a kék és vörös gömbfelületek rendre az adott atomra számolt pozitív és negatív spinsűrűséget jelzik.

A metil-*p*-kumarát és metil-kaffeát RONS mediált bioreleváns oxidációja [S25]

Munkánk következő lépése a pcm és a cm biomimetikus, ill. bioreleváns oxidációjával összefüggő metabolit-terének további vizsgálata volt. Ehhez egy jól ismert szabadgyök-generáló azo-vegyületet, az ún. AAPH (2,2'-azobisz(2-amidinopropán) dihidroklorid) reagenst választottuk biomimetikus ROS modellként,ⁿ és az élő szervezetben szuperoxid és nitrogén-monoxid reakciójával keletkező peroxinitritet (ONOO⁻) egy teljes mértékben bioreleváns RNS modellként. Annak ellenére, hogy a peroxinitrit félideje viszonylag rövid (kb. 10-20 ms), képes a biológiai membránokon való átjutásra, és keletkezési helyétől diffúzióval akár két sejt-átmérő távolságra is eljutni.^[227] Dr. Balogh György Tiborral (a munka elvégzésekor Richter Gedeon Nyrt, jelenleg BME Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék) együttműködésben kidolgoztunk egy a peroxinitrit előállítását, majd a hidroxifahéjavak azzal való reakcióját folyamatos áramban, jól reprodukálható módon lehetővé tevő kísérletes elrendezést. A módszer hasonló a korábban Robinson és Beckman által leírthoz.^[228] Ezt preparatív céllal először a pcm átalakítására teszteltük, s az így nyert reakcióelegy fordított fázisú preparatív HPLC-s tisztításával négy terméket nyertünk, amelyeket (a termékek vizes közegből való vákuumbepárlás közbeni esetleges bomlását megelőzendő) liofilezéssel szárítottunk be (38. ábra).



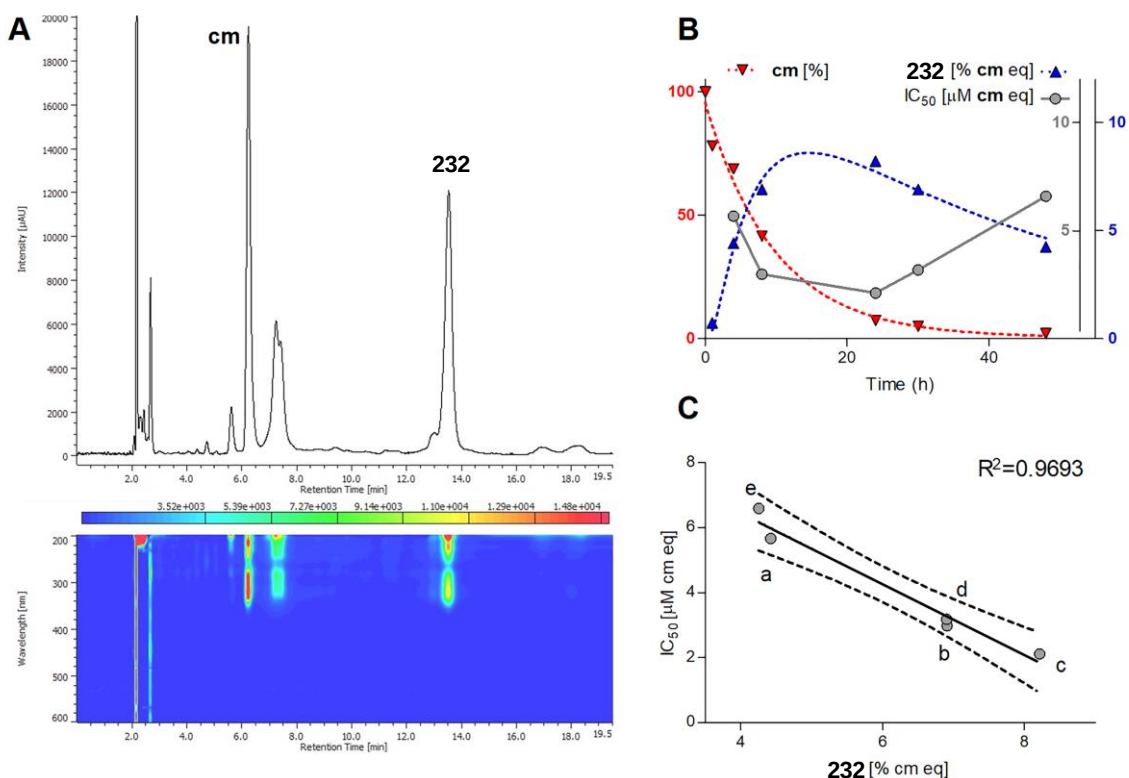
38. Ábra. A peroxinitrittel végzett folyamatos áramú reakcióhoz használt kísérletes elrendezés sematikus ábrája (**A**), és a pcm-ből ilyen módon előállított metabolitok szerkezete (**B**). Minden cső és a termékek gyűjtésére szolgáló lombik is jégfürdőben volt elhelyezve. A **230** vegyület új anyag.

Az előállított anyagok közül a **226** és **229** anyagok képződése az előző munkánk során is tapasztalt, oxidatív fragmentálódással (**226**), ill. az ezt követő nitrálódással (**229**) intuitív

ⁿ Az AAPH reagens az ún. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity = oxigéngyök elnyelő kapacitás), egy széles körben alkalmazott *in vitro* antioxidáns teszt reagense, amely alkil gyökké bomlása után vizes közegben oxigénnel alkil peroxil gyököket képez [226] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. L. Prior, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *Journal of agricultural and food chemistry* **2001**, 49, 4619-4626.

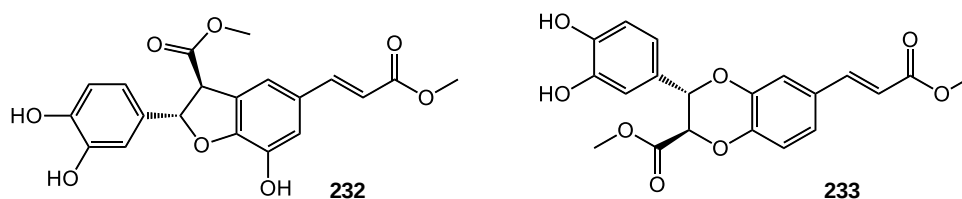
módon értelmezhető; utóbbi pedig, a **231** anyaggal együtt egy jó példája annak, hogy a peroxinitrit oxidálni és nitrálni is képes. A peroxinitritnek ezen kémiai tulajdonsága biológiai környezetben nagy jelentőségű mind a redox jelátvitel (elsősorban nitrolipidek képződésén keresztül), mind az oxidatív sérülés (elsősorban nitroproteinek kialakulásával) szempontjából.^[229] A **230** anyag egy érdekes, váratlan termék, amely az előállításához használt kísérletes elrendezés átlúgosító lépése során keletkező konyhasónak a reakcióban való részvételét mutatja. Érdekes megjegyezni, hogy az intra- és extracelluláris folyadék viszonylag magas kloridion tartalmú, így tehát a közeget „szennyező” kloridionok ezáltal a rendszerünk bioreleváns jellegét erősítik. A **226**, és **229-231** anyagok nem mutattak *in vitro* antitumor hatást, egyéb biológiai aktivitásukat azonban nem vizsgáltuk.

A fenti anyagok izolálása közben tudtuk megkezdni a pcm és cm peroxinitrittel és AAPH-val nyert reakcióelegyeinek *in vitro* citotoxikus hatásának szűrővizsgálatát, amelynek során a cm + AAPH reakció termékkeveréke kiemelkedő hatást mutatott HeLa méhnyak tumorsejteken. Az izolálás optimalizálása érdekében elvégeztük a reakció időfüggésének vizsgálatát, amelynek során a reakcióelegy összetételét és a HeLa sejteken mutatott hatást is monitoroztuk egy összesen 48 órás reakció során (39. ábra).



39. Ábra. A cm és az AAPH reakciójának longitudinális vizsgálata. **A:** a HeLa sejteken legerősebb citotoxicitást mutató, 24 óra után vett minta SFC-PDA ujjlenyomat kromatogramja (max. abszorbancia, $\lambda=350-600\text{nm}$). **B:** a cm kiindulásihoz képesti relatív mennyisége (piros), a HeLa sejteken mért IC₅₀ értékek (szürke), és a 232 anyag cm csúcsterület-ekvivalensben kifejezett relatív mennyisége (kék). **C:** a különböző időpillanatokban (a: 4h, b: 8h, c: 24h, d: 30h, e: 48h) vett minták **232**-tartalma és ezen minták IC₅₀ értékeinek korrelációja.

A 39C ábrán jól látható, hogy a citotoxikus hatás egyértelmű korrelációt mutatott a mintákban levő **232** anyag mennyiségével, így ezt követően ezt az anyagot célzottan izoláltuk. Ehhez 100 mg cm AAPH-val való reakcióját végeztük el acetonitril-víz (9:1) elegyben 60°C-on 24 óráss kevertetéssel, majd a nitrogénáram alatt bepárolt reakcióelegyet folyadék-folyadék extrakció után CPC-vel frakcionáltuk, s ezt követően preparatív HPLC segítségével nyertünk 9,3 mg (16%) **232** anyagot. Az egyik, citotoxikus hatást nem mutató CPC frakciót a hatás hiánya ellenére is érdemesnek ítéltük arra, hogy az egyetlen főanyagot preparatív SFC segítségével izoláljuk, így nyertük a **233** anyagot (2,2 mg, 4,4%); ezek szerkezetét a 40. ábra mutatja be.



40. Ábra. A metil kaffeát (cm) AAPH-val végzett reakciójából nyert termékek szerkezete. Mindkét termék szükségképpen racemát; az egyszerűség kedvéért csak az egyik enantiomert mutatom be.

A **232** anyag kiindulási vegyületéhez képest több nagyságrenddel erősebb citotoxikus hatást fejtett ki, különösen HeLa sejteken (5. Táblázat).

5. Táblázat. A **232** anyag citotoxikus hatása nőgyógyászati tumorsejteken, a cm hatásával összehasonlítva. C.I.: a görbeillesztéssel nyert IC₅₀ értékek 95% konfidencia intervalluma, ciszplatin: pozitív kontroll.

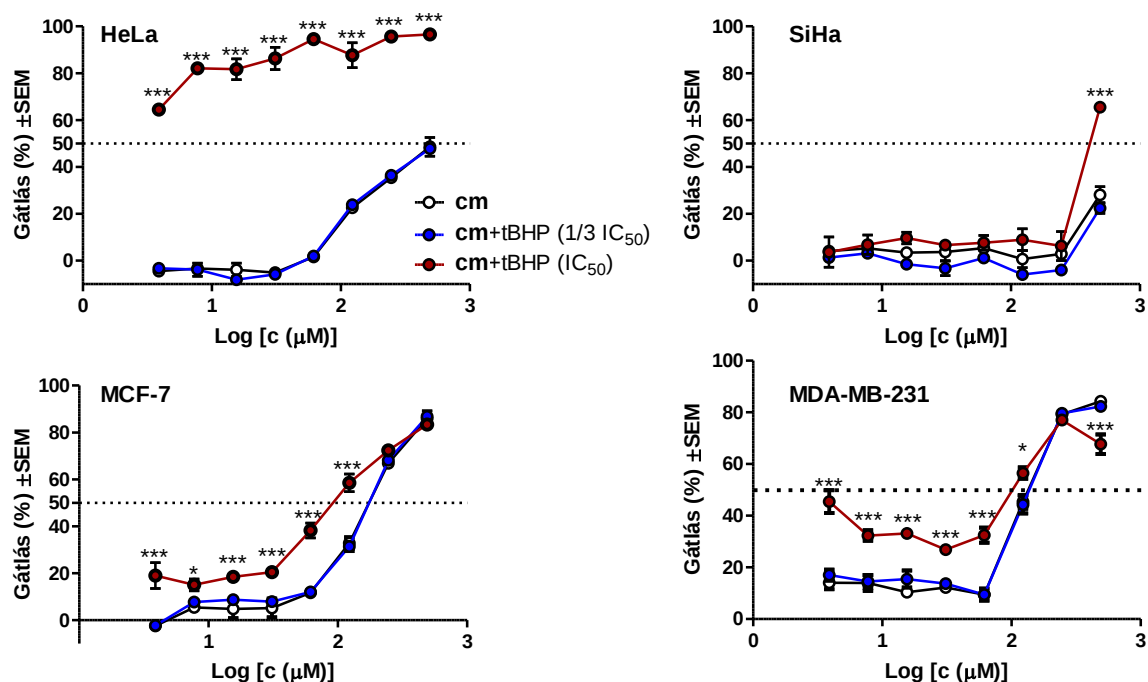
Anyag	IC ₅₀ [95% C.I.] (μM)			
	HeLa	SiHa	MCF-7	MDA-MB-231
cm	450 [396.7–551.2]	> 500	175.4 [162.3–189.7]	139.3 [116.5–166.6]
232	1.1 [1.0–1.2]	> 30	1.1 [0.9–1.4]	3.9 [3.1–4.9]
ciszplatin	11.7 [10.3–13.1]	13.6 [12.6–14.7]	5.2 [4.6–5.8]	25.8 [24.4–27.4]

A szakirodalom alapján ismert, hogy fenolos antioxidánsok sejt kultúrán kifejtett citotoxicitásának vizsgálatakor hamis pozitív eredményt adhat a vegyületeknek a sejt kultúra médium egyes komponenseivel való redox reakciója, amely hidrogén-peroxid, és egyéb reaktív oxigén fajták képződésével járhat.^[230] Annak ellenére, hogy a **232** anyag egy ilyen reakciókban részt venni képes katekol csoportot tartalmaz (éppúgy, mint a citotoxicitás szempontjából lényegében inaktívnak tekinthető cm), az emiatt tapasztalt fals pozitív hatás lehetősége gyakorlatilag kizárható. Ez az anyag azonos ugyanis az 5. Tézis irodalmi áttekintésében említett, korábban a cm ezüst-oxid által katalizált reakciójával nyert dihidrobenzofurán dimerrel (34B ábra), amelynek 2*R*,3*R* enantiomerje potens antitubulin és antiangiogén hatású

anyag, míg a másik enantiomer inaktív.^[202, 203] Az általunk is előállított racém **232** anyagot pedig a közelmúltban egy erős, már 20–100 µg/kg koncentrációban hatásos tumor áttétképződés gátló anyagként azonosították, amely hatását a tumor mikrokörnyezetén fejt ki az ún. tumor-asszociált fibroblasztok interleukin 25 (IL-25) termelésének indukálásán keresztül.^[204]

Az izolálást követően a **232** anyagot kisebb mennyiségben ugyan, de a cm peroxinitrittel képzett reakcióelegyből is kimutattuk, ez alapján tehát egyértelműen kijelenthető, hogy ez az erős hatású tumorelles anyag a metil-kaffeát bioreleváns reaktív oxigén és nitrogén fajtákkal való reakciójának egyik terméke.

Annak vizsgálatát is megkíséreltük, hogy mi lehet ennek a reakciónak a relevanciája a metil-kaffeát oxidatív stressz alatt álló biológiai rendszerekben kiváltott farmakológiai hatásával kapcsolatban, másként szólva lehetséges-e az, hogy az oxidatív stressz ennek a bioaktív metabolitnak a képződésén keresztül észlelhetően is modulálja / fokozza a cm antitumor hatását. Ehhez két különböző kísérletes elrendezésben vizsgáltuk a cm hatását tercier-butil hidroperoxid (tBHP) jelenlétében az 5. táblázatban bemutatott sejtvonalakon. A tBHP egy jól ismert, lipofil peroxid, amelyet széles körben használnak intracelluláris oxidatív stressz indukálására, és amelynek az intracelluláris ROS szintekre kifejtett hatásának dinamikáját MCF-7 sejteken a közelmúltban mélyrehatóan vizsgálták.^[231] Először meghatároztuk a tBHP citotoxikus hatását valamennyi sejtvonalon, és a cm és tBHP együttes kezelésének hatását checkerboard elrendezésű kombinációs plate-eken vizsgáltuk, hasonlóan, mint a 3.4. fejezet ekdiszteroid-doxorubicin kölcsönhatásait. Ezen mérések során közepes-erős antagonizmust tapasztaltunk (pl. HeLa sejteken a korábban is használt Chou-módszer szerinti CI=4,5, amely erős antagonizmust jelent),^[103] tehát a cm ilyen elrendezésben „klasszikus” antioxidánsként viselkedett és jelentősen csökkentette az oxidatív károsodásból eredő citotoxicitást. Másrészt elvégeztük a cm hatásának vizsgálatát olyan módon is, hogy (az MCF-7 sejtekben kiváltott oxidatív stressz ismert időbeli kialakulását alapul véve)^[231] 24 órás tBHP-vel való előkezelés után a médiumot lecseréltük, a sejteket fiziológiás sóoldattal mostuk, és friss, tBHP-t így már nem, esetleg csak nyomokban tartalmazó médiumban teszteltük a cm citotoxikus hatását egy 72 órás inkubációs idejű kísérletben. Az előkezelés során két tBHP koncentrációt vizsgáltunk, ezek az adott sejtvonalon a 72 órás tBHP kezelés után mért IC₅₀ és IC₅₀/3 értékek voltak. Több sejtvonal esetében is a magasabb indukált oxidatív stressz alatt álló sejtekben a cm jelentős hatásérősödését tapasztaltunk a tBHP-vel nem előkezelt sejtekhez képest, a kisebb dózisú tBHP előkezelés ugyanakkor lényegében nem változtatta meg a cm citotoxicitását (41. ábra).



41. Ábra. A metil kaffeát nőgyógyászati tumorsejteken mutatott citotoxicitása tBHP előkezeléssel kiváltott oxidatív stressz jelenlétében, vagy anélkül. Az eredmények statisztikai szignifikanciáját kétutas variancia-analízis (ANOVA) és Bonferroni post-hoc teszt segítségével értékeltük, *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ a tBHP-vel nem előkezelt sejtekhez képest (üres karika, fekete összekötő), $n=3$.

Jól látható, hogy a **232** anyagra viszonylag rezisztens SiHa sejtek kivételével a nagyobb dózisú tBHP előkezelés által indukált oxidatív stressz valamennyi sejtvonalon jelentősen fokozta a cm citotoxicitását. Az is egy érdekes megfigyelés, hogy a hatás fokozódásának mértéke korrelálni látszik az adott sejtvonalon korábban mért cm/**232** hatáskülönbséggel (5. táblázat), és az ilyen szempontból kiemelkedő HeLa sejteken a leginkább drámai. A checkerboard eredményeket (antagonizmus) is figyelembe véve kizárható az, hogy a hatásfokozódás a cm és a tBHP reakciójának eredménye. Ez alátámasztja azt a hipotézisünket, hogy a sejtek intracelluláris ROS szintjének növekedése vezetett a cm citotoxikus hatásának fokozódásához. Természetesen ennek a hatásfokozódásnak, biológiai rendszerről lévén szó, nagyon sok háttérmechanizmusa lehet, amely lehetőségek közül a ROS befogással képződő metabolitok (mint pl. a **232**) hatásának ilyen erőteljes megjelenése csak egy lehetőség. A jelenség összetettségét jól mutatja pl. a cm indukálta oxidatív stressz alatt álló MDA-MB-231 sejteken tapasztalt hatása, amely láthatóan nem írható le egy klasszikus szigmoid dózis-hatás görbével, így vélhetően a hatásfokozódás több, egymásnak akár ellenható tényező eredőjeként jelenik meg. A helyzet tisztázása érdekében kísérletet tettünk a **232** anyag sejtlizátumokban való LC-HRMS módszerrel való azonosítására, ezen próbálkozásaink ugyanakkor egyelőre nem vezettek sikerre. Ez alapján tehát jelenleg arra vannak közvetlen és egyértelmű bizonyítékaink, hogy a

tumorelleses hatású 232 anyag keletkezik, amikor a cm bioreleváns szabadgyököket (peroxilgyök vagy peroxinitrit) fog be, arra pedig egyelőre csak indirekt eredményekből levezethető feltételezéseink vannak, hogy ez a jelenség egy oxidatív stressz alatt álló biológiai környezetben milyen mértékű lehet.

Azt ennek ellenére kijelenthetjük, hogy hidroxifahéjsav származékok (pl. pcm és cm) ROS vagy RNS segítségével végrehajtott diverzitás orientált félszintetikus átalakítása egy farmakológiai szempontból egyértelműen értékes kémiai teret tár fel. Ez nagymértékben alátámasztja az 5. Tézis bevezetőjében részletezett megfontolásokat, és azt sugallja, hogy érdemes lehet ezt a megközelítést további növényi antioxidánsok oxidált metabolit-terének gyógyszerkutatási célú, szisztematikus vizsgálatára is kiterjeszteni.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az értekezésben bemutatott munka elsődleges célja a kémiai tér olyan, várhatóan bioaktív anyagokkal való bővítése volt, amelyek közvetlenül, vagy közvetve természetes eredetűek: természetes anyagok, azok félszintetikus származékai, vagy egy ötletadó anyagcsoport természetes farmakofóráját tartalmazó szintetikus analógok. Ehhez változatos kémiai megközelítéseket alkalmaztunk, s ezeket rendszerint hasonlóan változatos, modern elválasztástechnikai módszerek alkalmazásával ötvöztük annak érdekében, hogy minél nagyobb kémiai / farmakológiai változatosságot érjünk el. Ezen munka során – elsősorban az általunk előállított anyagok minél átfogóbb farmakológiai vizsgálata érdekében – kiterjedt nemzetközi együttműködési hálózatban dolgoztunk együtt számos hazai, európai (szerb, román, francia, osztrák, portugál, olasz), amerikai és tajvani kutatócsoporttal. Fontosnak érzem megjegyezni, hogy az értekezésben bemutatott valamennyi főbb kutatási irány jelenleg is aktuális, és az egyes tézisekben megfogalmazott eredmények és következtetések számos további, megoldandó kérdést és izgalmas lehetőséget vetettek fel. Eredményeinket és az azokhoz kapcsolódó jövőképünket röviden az alábbiakban foglalom össze.

Ekdiszteroidok:

Jelen munka során 128 természetes vagy félszintetikus ekdiszteroidot állítottunk elő, és a farmakológiai vizsgálatokba 29 korábbi munkánk során előállított, rendelkezésünkre álló anyagot is bevontunk (1-3. Tézis). Sikerral hasznosítottunk távol-keleti eredetű, ipari léptékben előállított növénykivonatokat, amelyeket tipikusan étrend-kiegészítőkben való alkalmazásra világszerte nagy mennyiségben terjesztenek és árusítanak, és amelyek ugyanakkor különleges, minor ekdiszteroidok kimagaslóan gazdag forrásai (1. Tézis).

Ilyen, kereskedelmi forgalomban elérhető kivonatokból az itt bemutatott munkán túl nagyszámú további ekdiszteroidot is előállítottunk, és jelenleg is dolgozunk ilyen kivonatok nagy mennyiségeinek feldolgozásán. Ez egyrészt hosszú távra biztosítja a félszintetikus jellegű ekdiszteroid kutatásaink nyersanyag igényét, és a munka léptékéből adódóan az újonnan előállított anyagok ipari hasznosíthatóságának lehetőségét is folyamatosan fenntartja, másrészt az ezen kivonatok emberi fogyasztásához kapcsolódóan kulcsfontosságú kémiai-farmakológiai-toxikológiai jellegű információkat fog szolgáltatni.

Egy ilyen, kb. 93% 20-hidroxiekdizont tartalmazó, tisztított kivonat kilogrammos nagyságrendű beszerzése tette lehetővé ennek az anyagnak a 2. Tézisben bemutatott, diverzitás-orientált félszintetikus átalakításait, amelyek során oxidatív lánchasítást, bázis katalizált auto-

oxidációt, és UV lézer által katalizált fotolízist is alkalmaztunk a szerkezeti változatosság növelésére.

Az ennek során előállított anyagok közül az *in vivo* is jelentős hatású posztszteront, valamint az auto-oxidációval nyert kaloniszteront tartom a jövőre nézve kiemelkedő fontosságúnak. Előbbi a 20E aktív *in vivo* metabolitjaként nagy jelentőségű, mind farmakológiai, mind pl. bioanalitikai (pl. a jelenleg elindult, lehetséges szabályozást előrevetítő folyamatokat tekintve doppinganalitikai) szempontból. A 20E-ből közel 80% izolált termelésű fél szintetikus előállítás lehetősége az ilyen láncrövidült ekdiszteroidok kiterjedt családjának létrehozását és vizsgálatát is lehetővé teszi. A kaloniszteront az értekezésben bemutatott, Akt foszforilációra kifejtett erős hatásával összefüggésben több jelenleg folyamatban lévő vizsgálatunk is kimagasló sejt-protektív hatásúnak találta. Az auto-oxidáció időbeliségéről kapilláris elektroforézissel nyert eredményeink szerint elméletileg ezt az anyagot is közel 80%-os termeléssel lehetne 20E-ből előállítani; a reakcióelegy feldolgozási módszerének optimalizálása jelenleg is folyamatban van, és előzetes eredményeink biztatóak.

A 3. Tézisben egy az ekdiszteroidok általunk felfedezett, új biológiai hatását, a tumor rezisztenciára kifejtett erőteljes hatást jártuk körül. Ehhez nagy számban állítottunk elő fél szintetikus ekdiszteroid származékokat, ideértve számos új, fluor, nitrogén vagy kén heteroatomot tartalmazó analógot, s összesen 119 anyag farmakológiai vizsgálata alapján állítottunk fel szerkezet-hatás összefüggéseket. Egy különleges, új formulációs eljárást, az önrendeződő pro-drug nanorészecskék előállítását is meghonosítottuk kutatócsoportunkban, amely a jövőben több bioaktív anyagunk *in vivo* alkalmazását is elősegítheti.

Ezen munka tanulságait levonva jelenleg két fő irányban folytatunk további vizsgálatokat. Egyrészt a 2,3-diolon képzett, a hatás szempontjából kulcsfontosságú ketált igyekszünk egy megfelelő, savrezisztens lipofil szubsztituensre cserélni. Ez kiváltképp az antitumor alkalmazásra szánt ekdiszteroid-tartalmú önrendeződő nanorészecskékkal kapcsolatos munka továbbviteléhez lenne feltétlenül szükséges. Másrészt pedig a hatásmechanizmus feltérképezése az a terület, ahol adósságunk van: jelenleg is folyamatban van az a projekt, amely a nem efflux pumpa gátló ekdiszteroidok ABCB1 transzporterrel transzfektált MDR sejteken mutatott szelektív hatásának okait igyekszik feltárni.

Protoflavonoidok:

A protoflavonoidok és szintetikus analógjaik előállítása és vizsgálata (4. Tézis) összesen 69 származékra terjedt ki. Ennek során elsőként oldottuk meg a protoapigenon apigeninből való

egylépeses szintézisét, és állítottunk elő az 1'-helyzetben különböző alkoxi csoportokkal szubsztituált származékokat. Mivel ez utóbbiak között fokozott hatású és stabilitású anyagokat is találtunk, nagy számban állítottuk elő ezek további fél- és totálszintetikus analógjait. Ezeket változatos tumor sejtvonalakon vizsgáltunk, ideértve a protoflavonoidok rezisztens tumorsejteken való hatékonyságának elsőként általunk végzett vizsgálatát is. Fontos, és előremutató munkának vélem a kevésbé citotoxikus protoflavon származékok előállítására és vizsgálatára irányuló törekvéseinket is, amely úton legjobb tudomásunk szerint elsőként indultunk el. Ez az ilyen típusú flavonoidok különleges térszerkezetének és gazdag funkcionalizálhatóságának köszönhetően a jövőben számos értékes, új bioaktív anyag felfedezéséhez vezethet, s ezt a perspektívát jól mutatja a jelen munka során együttműködésben azonosított két antivirális hatású származék.

A kapcsolódó kutatásainkat jelenleg két fő irányban igyekszünk tovább folytatni: ez egyrészt a szimmetrikus dienon szerkezettel nem rendelkező, nem citotoxikus protoflavon származékok kémiai-farmakológiai potenciáljának feltérképezése, másrészt pedig a protoflavonoidokra visszavezethető farmakofórt tartalmazó, de már nem flavonoid alapvázú szintetikus vagy félszintetikus anyagok előállítása és vizsgálata. Utóbbi anyagcsoport lehetséges antitumor alkalmazása kapcsán az ATR gátló hatásra fókuszálunk, és mivel az ilyen céllal jelenleg klinikai vizsgálatok alatt álló gyógyszerjelöltek nitrogénben gazdag heterociklusok, olyan anyagok előállítását tervezzük, amelyek a dienon szerkezetet nitrogéntartalmú alapvázakhoz kapcsolódóan tartalmazzák.

Antioxidáns inspirálta diverzitás orientált szintézis:

Végül, de nem utolsósorban, megfogalmaztuk egy olyan lehetséges gyógyszerkutatási stratégia alapvetését (5. *Tézis*), amely egy ilyen szempontból új szemléletmóddal növelné a diverzitás orientált szintézis által előállítható vegyületkönyvtárak biológiai teljesítményét. Ennek alapja az a megfontolás, hogy egy antioxidáns – szabadgyök kölcsönhatás (i.e. „szabadgyök-fogás”) során az előbbi egyrészt változatos, sok esetben a kémiai komplexitás jelentős növekedésével járó, irreverzibilis átalakulásokat képes szenvedni, másrészt pedig ez a komplexitás az adott antioxidánsra vonatkoztatva az oxidatív stressz viszonyaiból közvetlenül lefordított kémiai információt hordoz. A természetes antioxidánsok biológiai szervezetekkel való sokrétű kölcsönhatása alapján az ilyen típusú kémiai információhoz vélhetőleg releváns biológiai információtartalom is társul. Ezen gondolatok értékét jelenleg két „proof-of-concept” jellegű munkával tudjuk alátámasztani: hidroxifahéjsav származékok biomimetikus, ill. bioreleváns (i.e. reaktív oxigén és nitrogén fajták segítségével végzett) preparatív kémiai oxidációja során

nyert keverékekből két jelentős antitumor hatású anyagot azonosítottunk. Ezek az anyagok kiindulási antioxidánsaiból oxidatív stressz alatt álló biológiai környezetben is nagy valószínűséggel keletkezhetnek, de ennek mértékéről, és így kémiai-biológiai relevanciájáról jelenleg csak indirekt eredményekre alapuló sejtéseink vannak. Ettől függetlenül eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy kismolekulás antioxidánsokból szabadgyökfogást modellezni képes oxidatív átalakítások segítségével nyerhető, nagy kémiai változatosságot megtestesítő metabolit-keverékek farmakológiai szempontból értékesek.

A fentieknek megfelelően különösen érdemesnek tartom az ilyen jellegű kutatások továbbvitelét, és jelenleg is több fenolos antioxidáns (rezveratrol, tetrahidrokurkumin, 6-gingerol, 6-shogaol) változatos biomimetikus reagensek segítségével oxidált metabolit-keverékein dolgozunk. Ezek farmakológiai szűrővizsgálatainak eredményei egyértelműen biztatóak. Annak érdekében, hogy ez a munka a lehető leghatékonyabban működhessen, természetesen számos szempontot figyelembe kell venni. Egyrészt érdemes olyan biológiai célpontokat kiválasztani a keverékek tesztelésére, amelyeken a kiindulási antioxidáns hatásos, és/vagy a hatásosságával kapcsolatban ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. Különösen fontos, hogy a biológiai szűrővizsgálatok által ígéretesnek talált komplex keverékeket nagyfelbontású, hatékony analitikai és preparatív elválasztástechnikai módszerek alkalmazásával vizsgáljuk. Ennek jegyében pl. a rezveratrol jelenleg rendelkezésünkre álló 25 összetett metabolit-elegyének analíziséhez kutatási együttműködésben metabolomikai megközelítést is alkalmazunk, amit terveink szerint a közeljövőben további anyagokra is ki fogunk terjeszteni.

Összességében kijelenthető, hogy a kutatócsoportunk által változatos kémiai megközelítések alkalmazásával újonnan előállított anyagok biológiai aktivitása számos további, az esetleges gyakorlati hasznosíthatóság szempontjából is érdekes megválaszolandó kérdést vetett fel. Ennek köszönhetően úgy vélem, az értekezésben bemutatott munka messze nem lezárt, sokkal inkább egy több lábon álló, előremutató és hosszú távú kutatási program megalapozásának tekinthető.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] D. J. Newman, G. M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019, *J Nat Prod* **2020**, *83*, 770-803.
- [2] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *J Am Chem Soc* **1971**, *93*, 2325-2327.
- [3] F. Arcamone, G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, C. Spalla, Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*, *Biotechnol Bioeng* **1969**, *11*, 1101-1110.
- [4] N. Neuss, M. Gorman, W. Hargrove, N. J. Cone, K. Biemann, G. Buchi, R. E. Manning, Vinca Alkaloids. XXI.1 The Structures of the Oncolytic Alkaloids Vinblastine (VLB) and Vincristine (VCR)², *J Am Chem Soc* **1964**, *86*, 1440-1442.
- [5] J. Hohmann, F. Evanics, L. Berta, T. Bartók, Diterpenoids from *Euphorbia peplus*, *Planta Med* **2000**, *66*, 291-294.
- [6] D. A. Dias, S. Urban, U. Roessner, A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites* **2012**, *2*, 303-336.
- [7] Y. Tu, The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine, *Nat Med* **2011**, *17*, 1217-1220.
- [8] X.-Z. Su, L. H. Miller, The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine, *Sci China Life Sci* **2015**, *58*, 1175-1179.
- [9] P. S. Baran, Natural Product Total Synthesis: As Exciting as Ever and Here To Stay, *J Am Chem Soc* **2018**, *140*, 4751-4755.
- [10] J. Larsson, J. Gottfries, S. Muresan, A. Backlund, ChemGPS-NP: tuned for navigation in biologically relevant chemical space, *J Nat Prod* **2007**, *70*, 789-794.
- [11] P. Muigg, J. Rosén, L. Bohlin, A. Backlund, In silico comparison of marine, terrestrial and synthetic compounds using ChemGPS-NP for navigating chemical space, *Phytochem Rev* **2013**, *12*, 449-457.
- [12] F. L. Stahura, J. W. Godden, L. Xue, J. Bajorath, Distinguishing between Natural Products and Synthetic Molecules by Descriptor Shannon Entropy Analysis and Binary QSAR Calculations, *J Chem Inform Comput Sci* **2000**, *40*, 1245-1252.
- [13] A. Hunyadi, A. Gergely, A. Simon, G. Tóth, G. Veress, M. Báthori, Preparative-Scale Chromatography of Ecdysteroids of *Serratula wolffii* Andrae, *J Chromatogr Sci* **2007**, *45*, 76-86.
- [14] D. Rudel, M. Báthori, J. Gharbi, J.-P. Girault, I. Rácz, K. Melis, K. Szendrei, R. Lafont, New ecdysteroids from *Serratula tinctoria*, *Planta Med* **1992**, *58*, 358-364.
- [15] A. Ványolós, A. Simon, G. Tóth, L. Polgár, Z. Kele, A. Ilku, P. Mátyus, M. Báthori, C-29 Ecdysteroids from *Ajuga reptans* var. *reptans*, *J Nat Prod* **2009**, *72*, 929-932.
- [16] A. Simon, Z. Pongrácz, G. Tóth, M. Mák, I. Máthé, M. Báthori, A new ecdysteroid with unique 9 β -OH and four other ecdysteroids from *Silene italica* ssp. *nemoralis*, *Steroids* **2004**, *69*, 389-394.
- [17] N. Tóth, A. Simon, G. Tóth, Z. Kele, A. Hunyadi, M. Báthori, 26-Hydroxylated Ecdysteroids from *Silene viridiflora*, *J Nat Prod* **2008**, *71*, 1461-1463.
- [18] A. Simon, N. Tóth, G. Tóth, Z. Kele, J. Groska, M. Báthori, Ecdysteroids from *Silene viridiflora*, *Helv Chim Acta* **2009**, *92*, 753-761.
- [19] P. A. Turhanen, J. Leppänen, J. J. Vepsäläinen, Green and Efficient Esterification Method Using Dried Dowex H⁺/NaI Approach, *ACS Omega* **2019**, *4*, 8974-8984.
- [20] A. Butenandt, P. Karlson, Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form, *Z Naturforsch B*, **1954**, *9*, 389-391.

- [21] K. Nakanishi, M. Koreeda, S. Sasaki, M. L. Chang, H. Y. Hsu, Insect hormones. The structure of ponasterone A, insect-moulting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii* Hay, *Chemical Commun* **1966**, 915-917.
- [22] V. N. Odinokov, I. V. Galyautdinov, D. V. Nedopekin, L. M. Khalilov, A. S. Shashkov, V. V. Kachala, L. Dinan, R. Lafont, Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L.(Asteraceae), *Insect Biochem Mol Biol* **2002**, 32, 161-165.
- [23] K. Vokáč, M. Buděšínský, J. Harmatha, Minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides*, *Collect Czech Chem Commun* **2002**, 67, 124-139.
- [24] M. Buděšínský, K. Vokáč, J. Harmatha, J. Cvačka, Additional minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides*, *Steroids* **2008**, 73, 502-514.
- [25] A. Bakrim, J. Ngunjiri, S. Crouzet, L. Guibout, C. Balducci, J.-P. Girault, R. Lafont, Ecdysteroid Profiles of Two *Ajuga* species, *A. iva* and *A. remota*, *Nat Prod Commun* **2014**, 9, 1069-1074.
- [26] L. Guibout, N. Mamadalieva, C. Balducci, J.-P. Girault, R. Lafont, The minor ecdysteroids from *Ajuga turkestanica*, *Phytochem Anal* **2015**, 26, 293-300.
- [27] J.-P. Girault, M. Bathori, E. Varga, K. Szendrei, R. LaFont, Isolation and identification of new ecdysteroids from the Caryophyllaceae, *J Nat Prod* **1990**, 53, 279-293.
- [28] S. Nien, H. Hsu, M. Ho, Y. Yo, Isolation and identification of phytoecdysone from *Cyanotis arachnoidea*, *Huaxue Xuebao* **1978**, 36, 137-141.
- [29] S. Crouzet, A. Maria, L. Dinan, R. Lafont, J. P. Girault, Ecdysteroids from *Cyanotis longifolia* Benth.(Commelinaceae), *Arch Insect Biochem Physiol* **2009**, 72, 194-209.
- [30] L. Dinan, T. Savchenko, P. Whiting, On the distribution of phytoecdysteroids in plants, *Cell Mol Life Sci* **2001**, 58, 1121-1132.
- [31] <http://ecdybase.org/> (2021.03.30.)
- [32] M. Báthori, Z. Pongrácz, Phytoecdysteroids--from isolation to their effects on humans, *Curr Med Chem* **2005**, 12, 153-172.
- [33] A. Retnakaran, P. Krell, Q. Feng, B. Arif, Ecdysone agonists: mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry, *Arch Insect Biochem Physiol* **2003**, 54, 187-199.
- [34] R. Lafont, L. Dinan, Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update, *J Insect Sci* **2003**, 3, 7-7.
- [35] L. Dinan, The Karlson Lecture. Phytoecdysteroids: What use are they?, *Arch Insect Biochem Physiol* **2009**, 72, 126-141.
- [36] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04472728> (2021.03.30.)
- [37] https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2020_english_monitoring_program_.pdf (2020.09.28.)
- [38] I. Oehme, S. Bosser, M. Zornig, Agonists of an ecdysone-inducible mammalian expression system inhibit Fas Ligand- and TRAIL-induced apoptosis in the human colon carcinoma cell line RKO, *Cell Death Differ* **2006**, 13, 189-201.
- [39] J. Hu, C. X. Luo, W. H. Chu, Y. A. Shan, Z. M. Qian, G. Zhu, Y. B. Yu, H. Feng, 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF- κ B and JNK pathways, *PloS ONE* **2012**, 7, e50764.
- [40] P. Kizelsztejn, D. Govorko, S. Komarnytsky, A. Evans, Z. Wang, W. T. Cefalu, I. Raskin, 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model, *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2009**, 296, E433-E439.
- [41] J. Buniam, N. Chukijrunroat, Y. Rattanavichit, J. Surapongchai, J. Weerachayaphorn, T. Bupha-Intr, V. Saengsirisuwan, 20-Hydroxyecdysone ameliorates metabolic and

- cardiovascular dysfunction in high-fat-high-fructose-fed ovariectomized rats, *BMC Complement Med Ther* **2020**, *20*, 140.
- [42] J. Gorelick-Feldman, W. Cohick, I. Raskin, Ecdysteroids elicit a rapid Ca^{2+} flux leading to Akt activation and increased protein synthesis in skeletal muscle cells, *Steroids* **2010**, *75*, 632-637.
- [43] M. K. Parr, P. Zhao, O. Haupt, S. T. Ngueu, J. Hengevoss, K. H. Fritzemeier, M. Piechotta, N. Schlörer, P. Muhn, W. Y. Zheng, M. Y. Xie, P. Diel, Estrogen receptor beta is involved in skeletal muscle hypertrophy induced by the phytoecdysteroid ecdysterone, *Mol Nutr Food Res* **2014**, *58*, 1861-1872.
- [44] M. K. Parr, A. Müller-Schöll, Pharmacology of doping agents—mechanisms promoting muscle hypertrophy, *AIMS Mol Sci* **2018**, *5*, 131-159.
- [45] S. Lapenna, R. Gemen, J. Wollgast, A. Worth, P. Maragkoudakis, S. Caldeira, Assessing herbal products with health claims, *Crit Rev Food Sci Nutr* **2015**, *55*, 1918-1928.
- [46] R. Lafont, S. Raynal, M. Serova, B. Didry-Barca, L. Guibout, M. Latil, P. J. Dilda, W. Dioh, S. Veillet, 20-Hydroxyecdysone activates the protective arm of the renin angiotensin system via Mas receptor, *bioRxiv* **2020**, 2020.2004.2008.032607.
- [47] A. Shete, Urgent need for evaluating agonists of angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis for treating patients with COVID-19, *Int J Infect Dis* **2020**, *96*, 348-351.
- [48] M. Latil, S. Camelo, S. Veillet, R. Lafont, P. J. Dilda, Developing new drugs that activate the protective arm of the renin–angiotensin system as a potential treatment for respiratory failure in COVID-19 patients, *Drug Discov Today* **2021**.
- [49] W. Dioh, M. Chabane, C. Tourette, A. Azbekyan, C. Morelot-Panzini, L. A. Hajjar, M. Lins, G. B. Nair, T. Whitehouse, J. Mariani, M. Latil, S. Camelo, R. Lafont, P. J. Dilda, S. Veillet, S. Agus, Testing the efficacy and safety of BIO101, for the prevention of respiratory deterioration, in patients with COVID-19 pneumonia (COVA study): a structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial, *Trials* **2021**, *22*, 42.
- [50] J. P. Girault, R. Lafont, U. Kerb, Ecdysone catabolism in the white mouse, *Drug Metab Dispos* **1988**, *16*, 716-720.
- [51] N. S. Ramazanov, Z. Saatov, B. Syrov, Study of ecdysterone metabolites isolated from rat urine, *Chem Natural Compd* **1996**, *32*, 545-549.
- [52] C. Tsitsimpikou, G. D. Tsamis, P. A. Siskos, M. H. Spyridaki, C. G. Georgakopoulos, Study of excretion of ecdysterone in human urine, *Rapid Commun Mass Spectrom* **2001**, *15*, 1796-1801.
- [53] S. Kumpun, J. P. Girault, L. Dinan, C. Blais, A. Maria, C. Dauphin-Villemant, B. Yingyongnarongkul, A. Suksamrarn, R. Lafont, The metabolism of 20-hydroxyecdysone in mice: Relevance to pharmacological effects and gene switch applications of ecdysteroids, *J Steroid Biochem Mol Biol* **2011**, *126*, 1-9.
- [54] R. Lafont, Phytoecdysteroids in world flora: diversity, distribution, biosynthesis and evolution, *Russ J Plant Physiol* **1998**, *45*, 276-295.
- [55] M. Báthori, Fitoekdiszteroidok izolálása, analízise és szerkezetvizsgálata, MTA Doktori Értekezés, **2006**.
- [56] J. Wang, D. Ruan, Z. Chen, C. Yang, The dynamic variation of 20-hydroxyecdysone in *Cyanotis arachnoidea*, *Acta Bot Yunnanica* **1996**, *18*, 459-464.
- [57] C. Tan, L. Kong, X. Li, W. Li, N. Li, Isolation and analysis of a new phytoecdysteroid from *Cyanotis arachnoidea* CB Clarke, *Se pu* **2011**, *29*, 937-941.
- [58] C. Tan, J. Wang, X. Li, Y. Du, X. Bai, Study on chemical constituents of *Cyanotis arachnoidea*, *Zhongguo Yaoxue Zazhi* **2005**, *40*, 1537-1538.

- [59] C.-Y. Tan, J.-H. Wang, X. Li, Phytoecdysteroid constituents from *Cyanotis arachnoidea*, *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2003**, 5, 237-240.
- [60] C. Y. Tan, J. H. Wang, W. Xiao, X. Li, A new phytosterone from *Cyanotis arachnoidea*, *Chin. Chem. Lett.* **2002**, 13, 245-246.
- [61] C. Tan, J. Wang, X. Li, D. Meng, X. Li, Phytosteroides from *Cyanotis arachnoidea*, *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao* **2001**, 18, 263-265.
- [62] R. Nie, M. Qiu, Phytoecdysones in liquid waste during molting hormone production with *Cyanotis arachnoidea*, *Yunnan Zhiwu Yanjiu* **1987**, 9, 253-256.
- [63] C. Tan, J. Wang, X. Li, Y. Du, X. Bai, Chemical constituents of *Cyanotis arachnoidea*, *Yaoxue Xuebao* **2003**, 38, 760-762.
- [64] M. Báthory, I. Tóth, K. Szendrei, J. Reisch, *Ecdysteroids in Spinaciaoleraceae and Chenopodium bonus*, Vol. 21, **1982**.
- [65] R. J. Grebenok, P. V. Ripa, J. H. Adler, Occurrence and levels of ecdysteroids in spinach, *Lipids* **1991**, 26, 666-668.
- [66] M. Bojczuk, D. Żyżelewicz, P. Hodurek, Centrifugal partition chromatography—A review of recent applications and some classic references, *J Sep Sci* **2017**, 40, 1597-1609.
- [67] A. Marston, K. Hostettmann, Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis, *J Chromatogr A* **2006**, 1112, 181-194.
- [68] N. el Tayar, R.-S. Tsai, B. Testa, P.-A. Carrupt, A. Leo, Partitioning of solutes in different solvent systems: the contribution of hydrogen-bonding capacity and polarity. *J Pharm Sci* **1991**, 80, 590-598.
- [69] Y. Ito, Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography, *J Chromatogr A* **2005**, 1065, 145-168.
- [70] A. Suksamrarn, P. Ganpinoy, C. Sommechai, Base-catalyzed autoxidation of 20-hydroxyecdysone: Synthesis of calonysterone and 920-dihydroxyecdysone, *Tetrahedron Lett* **1994**, 35, 4445-4448.
- [71] R. G. Savchenko, S. A. Kostyleva, V. V. Kachala, L. M. Khalilov, V. N. Odinkov, Hydroxylation and epimerization of ecdysteroids in alkaline media: Stereoselective synthesis of 9 α -hydroxy-5 α -ecdysteroids, *Steroids* **2014**, 88, 101-105.
- [72] J. B. Siddall, D. H. S. Horn, E. J. Middleton, Synthetic studies on insect hormones. The synthesis of a possible metabolite of crustecdysone (20-hydroxyecdysone), *Chem Commun* **1967**, 899-900.
- [73] Q. Petersen, R. Cambie, G. Russell, Jones Oxidation of 20-Hydroxyecdysone (Crustecdysone), *Aust J Chem* **1993**, 46, 1961-1964.
- [74] L. Canonica, B. Danieli, G. Lesma, G. Palmisano, Unusual photochemical behaviour of the enone chromophore of the insect moulting hormone 20 α -hydroxyecdysone, *J Chem Soc Chem Commun* **1985**, 1321-1322.
- [75] L. Canonica†, B. Danieli, G. Lesma, G. Palmisano, A. Mugnoli, Fe(II)-Induced Fragmentation Reaction of γ -Hydroperoxy- α,β -enones. Part 1. Synthesis of 13(14 $\rightarrow$ 8)-abeo-Steroids, *Helv Chim Acta* **1987**, 70, 701-716.
- [76] J. Harmatha, M. Budesinsky, K. Vokac, Photochemical transformation of 20-hydroxyecdysone: production of monomeric and dimeric ecdysteroid analogues, *Steroids* **2002**, 67, 127-135.
- [77] W. Holzer, R. M. Claramunt, C. López, I. Alkorta, J. Elguero, A study in desmotropy, *Solid State Nucl. Magn. Reson* **2008**, 34, 68-76.
- [78] H. Zhou, X. M. Li, J. Meinkoth, R. N. Pittman, Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level, *J Cell Biol* **2000**, 151, 483-494.
- [79] N. Tóth, A. Szabó, P. Kacsala, J. Héger, E. Zádor, 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat, *Phytomedicine* **2008**, 15, 691-698.

- [80] E. Bremus-Köbberling, A. Gillner, F. Avemaria, C. Réthoré, S. Bräse, Photochemistry with laser radiation in condensed phase using miniaturized photoreactors, *Beilstein J Org Chem* **2012**, *8*, 1213-1218.
- [81] R. J. Buenker, G. Olbrich, H. P. Schuchmann, B. L. Schuermann, C. Von Sonntag, Photolysis of methanol at 185 nm. Quantum-mechanical calculations and product study, *J Am Chem Soc* **1984**, *106*, 4362-4368.
- [82] G. J. Tranah, T. M. Manini, K. K. Lohman, M. A. Nalls, S. Kritchevsky, A. B. Newman, T. B. Harris, I. Miljkovic, A. Biffi, S. R. Cummings, Y. Liu, Mitochondrial DNA variation in human metabolic rate and energy expenditure, *Mitochondrion* **2011**, *11*, 855-861.
- [83] R. Zhang, Y. Wang, K. Ye, M. Picard, Z. Gu, Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans, *BMC Genomics* **2017**, *18*, 890.
- [84] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (2020.10.01.)
- [85] E. G. Feigal, N. D. DeWitt, C. Cantilena, C. Peck, D. Stroncek, At the end of the beginning: immunotherapies as living drugs, *Nat Immunol* **2019**, *20*, 955-962.
- [86] J. Tang, L. Pearce, J. O'Donnell-Tormey, V. M. Hubbard-Lucey, Trends in the global immuno-oncology landscape, *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17*, 783.
- [87] A. J. Alencar, C. H. Moskowitz, Immune-checkpoint inhibition as first-line therapy for Hodgkin lymphoma, *Nat Rev Clin Oncol* **2019**.
- [88] J. C. Del Paggio, Cancer immunotherapy and the value of cure, *Nat Rev Clin Oncol* **2018**, *15*, 268.
- [89] J. P. Gillet, M. M. Gottesman, Mechanisms of multidrug resistance in cancer, *Methods Mol Biol* **2010**, *596*, 47-76.
- [90] B. Mansoori, A. Mohammadi, S. Davudian, S. Shirjang, B. Baradaran, The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review, *Adv Pharm Bull* **2017**, *7*, 339-348.
- [91] R. J. Kelly, D. Draper, C. C. Chen, R. W. Robey, W. D. Figg, R. L. Piekarz, X. Chen, E. R. Gardner, F. M. Balis, A. M. Venkatesan, S. M. Steinberg, T. Fojo, S. E. Bates, A pharmacodynamic study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist tariquidar (XR9576) in patients with lung, ovarian, and cervical cancer, *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 569-580.
- [92] Y. Tanigawara, Role of P-glycoprotein in drug disposition, *Ther Drug Monitor* **2000**, *22*, 137-140.
- [93] F. J. Sharom, ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance, *Pharmacogenomics* **2008**, *9*, 105-127.
- [94] S. Shen, W. Zhang, ABC transporters and drug efflux at the blood-brain barrier, *Rev Neurosci* **2010**, *21*, 29-53.
- [95] S. Marchetti, R. Mazzanti, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, Concise review: Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein), *Oncologist* **2007**, *12*, 927-941.
- [96] K. M. Pluchino, M. D. Hall, A. S. Goldsborough, R. Callaghan, M. M. Gottesman, Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance, *Drug Resist Updat* **2012**, *15*, 98-105.
- [97] G. Szakács, M. D. Hall, M. M. Gottesman, A. Boumendjel, R. Kachadourian, B. J. Day, H. Baubichon-Cortay, A. Di Pietro, Targeting the Achilles Heel of Multidrug-Resistant Cancer by Exploiting the Fitness Cost of Resistance, *Chem Rev* **2014**, *114*, 5753-5774.
- [98] T. Ohsawa, M. Yukawa, C. Takao, M. Murayama, H. Bando, Studies on Constituents of Fruit Body of *Polyporus umbellatus* and Their Cytotoxic Activity, *Chem Pharm Bull* **1992**, *40*, 143-147.

- [99] M. Takasaki, H. Tokuda, H. Nishino, T. Konoshima, Cancer Chemopreventive Agents (Antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*, *J Nat Prod* **1999**, 62, 972-975.
- [100] N. P. Konovalova, I. Mitrokhin Iu, L. M. Volkova, L. I. Sidorenko, I. N. Todorov, [Ecdysterone modulates antitumor activity of cytostatics and biosynthesis of macromolecules in tumor-bearing animals], *Izv Akad Nauk. Ser Biol* **2002**, 650-658.
- [101] I. Pastan, M. M. Gottesman, K. Ueda, E. Lovelace, A. V. Rutherford, M. C. Willingham, A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells, *Proc Natl Acad Sci* **1988**, 85, 4486-4490.
- [102] Y. Wang, D. Hao, W. D. Stein, L. Yang, A kinetic study of Rhodamine123 pumping by P-glycoprotein, *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1758, 1671-1676.
- [103] T. C. Chou, Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacolog Rev* **2006**, 58, 621-681.
- [104] P. G. M. W. T.W. Greene, in *Protective Groups in Organic Synthesis* (Ed.: P. G. M. W. T.W. Greene), **1999**, pp. 17-245.
- [105] H. Mollmann, P. Rohdewald, E. W. Schmidt, V. Salomon, H. Derendorf, Pharmacokinetics of triamcinolone acetonide and its phosphate ester, *Eur J Clin Pharmacol* **1985**, 29, 85-89.
- [106] H. Derendorf, G. Hochhaus, S. Rohatagi, H. Mollmann, J. Barth, H. Sourgens, M. Erdmann, Pharmacokinetics of triamcinolone acetonide after intravenous, oral, and inhaled administration, *J Clin Pharmacol* **1995**, 35, 302-305.
- [107] Z. Liu, B.-H. Hu, P. B. Messersmith, Convenient Synthesis of Acetonide Protected 3,4-Dihydroxyphenylalanine (DOPA) for Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis, *Tetrahedron Lett* **2008**, 49, 5519-5521.
- [108] H. Mei, J. Han, S. Fustero, M. Medio-Simon, D. M. Sedgwick, C. Santi, (...), V. A. Soloshonok, Fluorine-Containing Drugs Approved by the FDA in 2018, *Chem Eur J* **2019**, 25, 11797-11819.
- [109] Z. Rappoport, J. F. Liebman, *The Chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids*, Wiley, **2008**.
- [110] I. V. Galyautdinov, N. A. Ves'kina, S. R. Afon'kina, L. M. Khalilov, V. N. Odinokov, Synthesis of 20-hydroxyecdysone oxime, its diacetone, and their 14,15-anhydro derivatives, *Russ J Org Chem* **2006**, 42, 1333-1339.
- [111] R. V. Shafikov, Y. R. Urazaeva, S. R. Afon'kina, R. G. Savchenko, L. M. Khalilov, V. N. Odinokov, 20-hydroxyecdysone oximes and their rearrangement into lactams, *Russ J Org Chem* **2009**, 45, 1456.
- [112] D. F. Shellhamer, D. T. Anstine, K. M. Gallego, B. R. Ganesh, A. A. Hanson, K. A. Hanson, R. D. Henderson, J. M. Prince, V. L. Heasley, Reaction of diethylaminosulfur trifluoride with diols, *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1995**, 861-866.
- [113] H. G. Bonaccorso, L. M. F. Porte, G. R. Paim, F. M. Luz, M. A. P. Martins, N. Zanatta, General method for dehydration, intramolecular cyclization, and fluorination of trifluoromethyl-1H-pyrazoles using DAST, *Tetrahedron Lett* **2010**, 51, 3759-3761.
- [114] D. F. Shellhamer, A. A. Briggs, B. M. Miller, J. M. Prince, D. H. Scott, V. L. Heasley, Reaction of aminosulfur trifluorides with alcohols: inversion vs. retention, *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1996**, 973-977.
- [115] E. Boedtker, S. F. Pedersen, The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer, *Annu Rev Physiol* **2020**, 82, 103-126.
- [116] J. L. Arias, L. H. Reddy, M. Othman, B. Gillet, D. Desmaële, F. Zouhiri, F. Dosio, R. Gref, P. Couvreur, Squalene Based Nanocomposites: A New Platform for the Design of Multifunctional Pharmaceutical Theragnostics, *ACS Nano* **2011**, 5, 1513-1521.

- [117] L. Bildstein, C. Dubernet, P. Couvreur, Prodrug-based intracellular delivery of anticancer agents, *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, 63, 3-23.
- [118] D. Desmaele, R. Gref, P. Couvreur, Squalenoylation: a generic platform for nanoparticulate drug delivery, *J Control Release* **2012**, 161, 609-618.
- [119] S. Borrelli, M. S. Christodoulou, I. Ficarra, A. Silvani, G. Cappelletti, D. Cartelli, G. Damia, F. Ricci, M. Zucchetti, F. Dosio, D. Passarella, New class of squalene-based releasable nanoassemblies of paclitaxel, podophyllotoxin, camptothecin and epothilone A, *Eur J Med Chem* **2014**, 85, 179-190.
- [120] G. Fumagalli, M. S. Christodoulou, B. Riva, I. Revuelta, C. Marucci, V. Collico, D. Prosperi, S. Riva, D. Perdicchia, I. Bassanini, A. García-Argáez, L. Dalla Via, D. Passarella, Self-assembled 4-(1,2-diphenylbut-1-en-1-yl)aniline based nanoparticles: podophyllotoxin and aloin as building blocks, *Org Biomol Chem* **2017**, 15, 1106-1109.
- [121] G. Fumagalli, C. Marucci, M. S. Christodoulou, B. Stella, F. Dosio, D. Passarella, Self-assembly drug conjugates for anticancer treatment, *Drug Discov Today* **2016**, 21, 1321-1329.
- [122] D. Sobot, S. Mura, S. O. Yesylevskyy, L. Dalbin, F. Cayre, G. Bort, J. Mouglin, D. Desmaele, S. Lepetre-Mouelhi, G. Pieters, B. Andreiuk, A. S. Klymchenko, J. L. Paul, C. Ramseyer, P. Couvreur, Conjugation of squalene to gemcitabine as unique approach exploiting endogenous lipoproteins for drug delivery, *Nat Commun* **2017**, 8, 15678.
- [123] S. Vasseur, F. Guillaumond, LDL Receptor: An open route to feed pancreatic tumor cells, *Mol Cell Oncol* **2015**, 3, e1033586-e1033586.
- [124] X. Guan, Z. Liu, Z. Zhao, X. Zhang, S. Tao, B. Yuan, J. Zhang, D. Wang, Q. Liu, Y. Ding, Emerging roles of low-density lipoprotein in the development and treatment of breast cancer, *Lipids in Health and Disease* **2019**, 18, 137.
- [125] O. Campion, T. Al Khalifa, B. Langlois, J. Thevenard-Devy, S. Salesse, K. Savary, C. Schneider, N. Etique, S. Dedieu, J. Devy, Contribution of the Low-Density Lipoprotein Receptor Family to Breast Cancer Progression, *Front Oncol* **2020**, 10, 882-882.
- [126] S. Pawar, T. Koneru, E. McCord, K. Tatiparti, S. Sau, A. K. Iyer, LDL receptors and their role in targeted therapy for glioma: a review, *Drug Discov Today* **2021**.
- [127] P. Zanoni, S. Velagapudi, M. Yalcinkaya, L. Rohrer, A. von Eckardstein, Endocytosis of lipoproteins, *Atherosclerosis* **2018**, 275, 273-295.
- [128] Y.-B. Hu, E. B. Dammer, R.-J. Ren, G. Wang, The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration, *Transl Neurodegener* **2015**, 4, 18.
- [129] B. van de Sluis, M. Wijers, J. Herz, News on the molecular regulation and function of hepatic low-density lipoprotein receptor and LDLR-related protein 1, *Curr Opin Lipidol* **2017**, 28, 241-247.
- [130] B. Dehouck, M. P. Dehouck, J. C. Fruchart, R. Cecchelli, Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes, *J Cell Biol* **1994**, 126, 465-473.
- [131] Y. Molino, M. David, K. Varini, F. Jabès, N. Gaudin, A. Fortoul, K. Bakloul, M. Masse, A. Bernard, L. Drobecq, P. Lécorché, J. Temsamani, G. Jacquot, M. Khrestchatisky, Use of LDL receptor-targeting peptide vectors for *in vitro* and *in vivo* cargo transport across the blood-brain barrier, *FASEB J* **2017**, 31, 1807-1827.
- [132] M. D. Sweeney, A. P. Sagare, B. V. Zlokovic, Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders, *Nat Rev Neurol* **2018**, 14, 133-150.
- [133] D. A. Nation, M. D. Sweeney, A. Montagne, A. P. Sagare, L. M. D'Orazio, M. Pachicano, F. Seppehrband, A. R. Nelson, D. P. Buennagel, M. G. Harrington, T. L. S. Benzinger, A. M. Fagan, J. M. Ringman, L. S. Schneider, J. C. Morris, H. C. Chui, M.

- Law, A. W. Toga, B. V. Zlokovic, Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction, *Nat Med* **2019**, 25, 270-276.
- [134] M. D. Sweeney, Z. Zhao, A. Montagne, A. R. Nelson, B. V. Zlokovic, Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back, *Physiol Rev* **2018**, 99, 21-78.
- [135] M. Hauteville, J. Chopin, H. Geiger, L. Schöler, Protogenkwanin 4'-glucoside, a new type of natural flavonoid with a non aromatic B-ring, *Tetrahedron Lett* **1980**, 21, 1227-1230.
- [136] N. C. Nikolic, M. M. Lazic, I. T. Karabegovic, G. S. Stojanovic, Z. B. Todorovic, A characterization of content, composition and scavenging capacity of phenolic compounds in parsnip roots of various weight, *Nat Prod Commun* **2014**, 9, 811-814.
- [137] G. C. Freitas, J. M. Batista, Jr., G. C. Franchi, Jr., A. E. Nowill, L. F. Yamaguchi, J. D. Vilcachagua, D. Favaro, M. Furlan, E. F. Guimarães, C. S. Jeffrey, M. J. Kato, Cytotoxic non-aromatic B-ring flavanones from *Piper carniconectivum* C. DC, *Phytochemistry* **2014**, 97, 81-87.
- [138] G. Jerz, R. Waibel, H. Achenbach, Cyclohexanoid protoflavanones from the stem-bark and roots of *Ongokea gore*, *Phytochemistry* **2005**, 66, 1698-1706.
- [139] S. Caccamese, S. Bianca, D. Santo, Racemization at C-2 of Naringin in Sour Oranges with Increasing Maturity Determined by Chiral High-Performance Liquid Chromatography, *J Agric Food Chem* **2007**, 55, 3816-3822.
- [140] A. S. Lin, F. R. Chang, C. C. Wu, C. C. Liaw, Y. C. Wu, New cytotoxic flavonoids from *Thelypteris torresiana*, *Planta Med* **2005**, 71, 867-870.
- [141] A. S. Lin, F. R. Chang, H. F. Yen, H. Bjorkeborn, P. Norlen, Y. C. Wu, Novel flavonoids of *Thelypteris torresiana*, *Chem Pharm Bull* **2007**, 55, 635-637.
- [142] A. S. Lin, K. Nakagawa-Goto, F. R. Chang, D. Yu, S. L. Morris-Natschke, C. C. Wu, S. L. Chen, Y. C. Wu, K. H. Lee, First total synthesis of protoapigenone and its analogues as potent cytotoxic agents, *J Med Chem* **2007**, 50, 3921-3927.
- [143] C. C. Chiu, H. W. Chang, D. W. Chuang, F. R. Chang, Y. C. Chang, Y. S. Cheng, M. T. Tsai, W. Y. Chen, S. S. Lee, C. K. Wang, J. Y. F. Chen, H. M. Wang, C. C. Chen, Y. C. Liu, Y. C. Wu, Fern plant-derived protoapigenone leads to DNA damage, apoptosis, and G(2)/m arrest in lung cancer cell line H1299, *DNA Cell Biol* **2009**, 28, 501-506.
- [144] H. L. Chang, J. H. Su, Y. T. Yeh, Y. C. Lee, H. M. Chen, Y. C. Wu, S. S. Yuan, Protoapigenone, a novel flavonoid, inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo, *Cancer Lett* **2008**, 267, 85-95.
- [145] H. L. Chang, Y. C. Wu, J. H. Su, Y. T. Yeh, S. S. Yuan, Protoapigenone, a novel flavonoid, induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase 1/2, *J Pharmacol Exp Ther* **2008**, 325, 841-849.
- [146] E. Lecona, O. Fernandez-Capetillo, Targeting ATR in cancer, *Nat Rev Cancer* **2018**, 18, 586-595.
- [147] https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ATR+kinase+inhibitor&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt= (2021.04.01)
- [148] G. Favaro, C. Clementi, A. Romani, V. Vickackaite, Acidichromism and ionochromism of luteolin and apigenin, the main components of the naturally occurring yellow weld: a spectrophotometric and fluorimetric study, *Journal Fluores* **2007**, 17, 707-714.
- [149] M. D. Kars, O. D. Iseri, U. Gunduz, A. U. Ural, F. Arpaci, J. Molnar, Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds, *Anticancer Res* **2006**, 26, 4559-4568.
- [150] E. Fox, S. E. Bates, Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor, *Expert Rev Anticancer Ther* **2007**, 7, 447-459.

- [151] M. Pesic, J. Z. Markovic, D. Jankovic, S. Kanazir, I. D. Markovic, L. Rakic, S. Ruzdijic, Induced Resistance in the Human Non Small Cell Lung Carcinoma (NCI-H460) Cell Line *In Vitro* by Anticancer Drugs, *J Chemother* **2006**, *18*, 66-73.
- [152] A. Podolski-Renić, T. Anđelković, J. Banković, N. Tanić, S. Ruždijić, M. Pešić, The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines, *Biomed Pharmacother* **2011**, *65*, 345-353.
- [153] S. Stojković, A. Podolski-Renić, J. Dinić, T. Stanković, J. Banković, S. Hadžić, V. Paunović, A. Isaković, N. Tanić, M. Pešić, Development of resistance to antiglioma agents in rat C6 cells caused collateral sensitivity to doxorubicin, *Exp Cell Res* **2015**, *335*, 248-257.
- [154] P. Pacher, A. Nivorozhkin, C. Szabó, Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol, *Pharmacol Rev* **2006**, *58*, 87-114.
- [155] P. Higgins, J. Dawson, M. Walters, The potential for xanthine oxidase inhibition in the prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular disease, *Cardiovasc Psychiatry Neurol* **2009**, *2009*, 282059.
- [156] R. Kumar, G. Joshi, H. Kler, S. Kalra, M. Kaur, R. Arya, Toward an Understanding of Structural Insights of Xanthine and Aldehyde Oxidases: An Overview of their Inhibitors and Role in Various Diseases, *Med Res Rev* **2018**, *38*, 1073-1125.
- [157] A. Nagao, M. Seki, H. Kobayashi, Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids, *Biosci Biotechnol Biochem* **1999**, *63*, 1787-1790.
- [158] T. Hayashi, K. Sawa, M. Kawasaki, M. Arisawa, M. Shimizu, N. Morita, Inhibition of Cow's Milk Xanthine Oxidase by Flavonoids, *J Nat Prod* **1988**, *51*, 345-348.
- [159] W. S. Chang, Y. J. Lee, F. J. Lu, H. C. Chiang, Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase, *Anticancer Res* **1993**, *13*, 2165-2170.
- [160] P. Cos, L. Ying, M. Calomme, J. P. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, (...), D. V. Berghe, Structure–Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers, *J Nat Prod* **1998**, *61*, 71-76.
- [161] A. Nagao, M. Seki, H. Kobayashi, Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **1999**, *63*, 1787-1790.
- [162] Z. Mirjafary, M. Abdoli, H. Saeidian, S. Boroon, A. Kakanejadifard, Oxime ethers as versatile precursors in organic synthesis: a review, *RSC Adv* **2015**, *5*, 79361-79384.
- [163] C. J. Walton, Functionalised Oximes: Emergent Precursors for Carbon-, Nitrogen- and Oxygen-Centred Radicals, *Molecules* **2016**, *21*.
- [164] D. S. Bolotin, N. A. Bokach, M. Y. Demakova, V. Y. Kukushkin, Metal-Involving Synthesis and Reactions of Oximes, *Chem Rev* **2017**, *117*, 13039-13122.
- [165] J. Kozłowska, E. Grela, D. Baczynska, A. Grabowiecka, M. Aniol, Novel O-alkyl Derivatives of Naringenin and Their Oximes with Antimicrobial and Anticancer Activity, *Molecules* **2019**, *24*.
- [166] B. Turkkan, M. Ozyurek, M. Bener, K. Guclu, R. Apak, Synthesis, characterization and antioxidant capacity of naringenin-oxime, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2012**, *85*, 235-240.
- [167] A. A. Bothner-By, in *Advances in Magnetic and Optical Resonance*, Vol. 1 (Ed.: J. S. Waugh), Academic Press, New York, **1965**, pp. 195-316.
- [168] V. Arendt, M. Amand, G. Iserentant, M. Lemaire, C. Masquelier, G. F. Ndayisaba, (...), C. Seguin-Devaux, Predominance of the heterozygous CCR5 delta-24 deletion in African individuals resistant to HIV infection might be related to a defect in CCR5 addressing at the cell surface, *J Int AIDS Soc* **2019**, *22*, e25384.

- [169] J. Egea, I. Fabregat, Y. M. Frapart, P. Ghezzi, A. Görlach, T. Kietzmann, (...), A. Daiber, European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS), *Redox Biol* **2017**, *13*, 94-162.
- [170] H. Sies, in *Oxidative Stress*, Academic Press, London, **1985**, pp. 1-8.
- [171] D. P. Jones, Redefining Oxidative Stress, *Antioxid Redox Signal* **2006**, *8*, 1865-1879.
- [172] S. G. Rhee, Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling, *Science (New York, N.Y.)* **2006**, *312*, 1882-1883.
- [173] T. Finkel, Signal transduction by reactive oxygen species, *J Cell Biol* **2011**, *194*, 7-15.
- [174] M. Schieber, N. S. Chandel, ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Curr Biol* **2014**, *24*, R453-462.
- [175] N. T. Moldogazieva, I. M. Mokhosoev, N. B. Feldman, S. V. Lutsenko, ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications, *Free Rad Res* **2018**, *52*, 507-543.
- [176] E. Niki, Antioxidants: basic principles, emerging concepts, and problems, *Biomed J* **2014**, *37*, 106-111.
- [177] H. J. Forman, K. J. Davies, F. Ursini, How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo, *Free Rad Biol Med* **2014**, *66*, 24-35.
- [178] H. Sies, Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox Biol* **2015**, *4*, 180-183.
- [179] D. R. Gough, T. G. Cotter, Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule, *Cell Death Dis* **2011**, *2*, e213.
- [180] M. Hayyan, M. A. Hashim, I. M. AlNashef, Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications, *Chem Rev* **2016**, *116*, 3029-3085.
- [181] G. Bauer, HOCl and the control of oncogenesis, *J Inorg Biochem* **2018**, *179*, 10-23.
- [182] G. Bauer, The Antitumor Effect of Singlet Oxygen, *Anticancer Res* **2016**, *36*, 5649-5663.
- [183] B. C. Dickinson, C. J. Chang, Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses, *Nat Chem Biol* **2011**, *7*, 504-511.
- [184] S. B. Nimse, D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *RSC Adv* **2015**, *5*, 27986-28006.
- [185] A. Weidinger, A. V. Kozlov, Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction, *Biomolecules* **2015**, *5*, 472-484.
- [186] T. Ak, I. Gulcin, Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin, *Chem Biol Interact* **2008**, *174*, 27-37.
- [187] I. C. Vlachogianni, E. Fragopoulou, I. K. Kostakis, S. Antonopoulou, In vitro assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives, *Food Chem* **2015**, *177*, 165-173.
- [188] D. Amic, D. Davidovic-Amic, D. Beslo, V. Rastija, B. Lucic, N. Trinajstic, SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids, *Curr Med Chem* **2007**, *14*, 827-845.
- [189] E. Niki, Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence, *Free Rad Biol Med* **2014**, *66*, 3-12.
- [190] H. Sies, Strategies of antioxidant defense, *Eur J Biochem* **1993**, *215*, 213-219.
- [191] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, Oxidative Stress and Antioxidant Defense, *World Allergy Organ J* **2012**, *5*, 9-19.
- [192] S. Y. Shim, H. S. Kim, Oxidative stress and the antioxidant enzyme system in the developing brain, *Korean J Pediatr* **2013**, *56*, 107-111.
- [193] A. Kerimi, G. Williamson, Differential Impact of Flavonoids on Redox Modulation, Bioenergetics, and Cell Signaling in Normal and Tumor Cells: A Comprehensive Review, *Antioxid Redox Signal* **2018**, *29*, 1633-1659.

- [194] Y. Kato, N. Suga, Covalent adduction of endogenous and food-derived quinones to a protein: its biological significance, *J Clin Biochem Nutr* **2018**, 62, 213-220.
- [195] T. Masuda, J. Akiyama, A. Fujimoto, S. Yamauchi, T. Maekawa, Y. Sone, Antioxidation reaction mechanism studies of phenolic lignans, identification of antioxidation products of secoisolariciresinol from lipid oxidation, *Food Chem* **2010**, 123, 442-450.
- [196] Y. Shingai, A. Fujimoto, M. Nakamura, T. Masuda, Structure and function of the oxidation products of polyphenols and identification of potent lipoxygenase inhibitors from Fe-catalyzed oxidation of resveratrol, *J Agric Food Chem* **2011**, 59, 8180-8186.
- [197] C. Schneider, O. N. Gordon, R. L. Edwards, P. B. Luis, Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications, *J Agric Food Chem* **2015**, 63, 7606-7614.
- [198] A. C. Ketron, O. N. Gordon, C. Schneider, N. Osheroff, Oxidative metabolites of curcumin poison human type II topoisomerases, *Biochemistry* **2013**, 52, 221-227.
- [199] O. N. Gordon, P. B. Luis, R. E. Ashley, N. Osheroff, C. Schneider, Oxidative Transformation of Demethoxy- and Bisdemethoxycurcumin: Products, Mechanism of Formation, and Poisoning of Human Topoisomerase II α , *Chem Res Toxicol* **2015**, 28, 989-996.
- [200] L. Shen, H. F. Ji, The pharmacology of curcumin: is it the degradation products?, *Trends Mol Med* **2012**, 18, 138-144.
- [201] R. L. Edwards, P. B. Luis, P. V. Varuzza, A. I. Joseph, S. H. Presley, R. Chaturvedi, C. Schneider, The anti-inflammatory activity of curcumin is mediated by its oxidative metabolites, *J Biol Chem* **2017**, 292, 21243-21252.
- [202] S. Apers, D. Paper, J. Burgermeister, S. Baronikova, S. Van Dyck, G. Lemiere, (...), L. Pieters, Antiangiogenic activity of synthetic dihydrobenzofuran lignans, *J Nat Prod* **2002**, 65, 718-720.
- [203] L. Pieters, S. Van Dyck, M. Gao, R. Bai, E. Hamel, A. Vlietinck, G. Lemiere, Synthesis and biological evaluation of dihydrobenzofuran lignans and related compounds as potential antitumor agents that inhibit tubulin polymerization, *J Med Chem* **1999**, 42, 5475-5481.
- [204] S. Y. Yin, F. Y. Jian, Y. H. Chen, S. C. Chien, M. C. Hsieh, P. W. Hsiao, (...), N. S. Yang, Induction of IL-25 secretion from tumour-associated fibroblasts suppresses mammary tumour metastasis, *Nat Commun* **2016**, 7, 11311.
- [205] G. Biasiotto, M. Penza, I. Zanella, M. Cadei, L. Caimi, C. Rossini, (...), D. Di Lorenzo, Oilseeds ameliorate metabolic parameters in male mice, while contained lignans inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation in vitro, *Eur J Nutr* **2014**, 53, 1685-1697.
- [206] R. Balyan, S. K. Kudugunti, H. A. Hamad, M. S. Yousef, M. Y. Moridani, Bioactivation of luteolin by tyrosinase selectively inhibits glutathione S-transferase, *Chem Biol Interact* **2015**, 240, 208-218.
- [207] W. R. J. D. Galloway, A. Isidro-Llobet, D. R. Spring, Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules, *Nat Commun* **2010**, 1, 80.
- [208] S. L. Kidd, T. J. Osberger, N. Mateu, H. F. Sore, D. R. Spring, Recent Applications of Diversity-Oriented Synthesis Toward Novel, 3-Dimensional Fragment Collections, *Frontiers Chem* **2018**, 6.
- [209] S. Yi, B. V. Varun, Y. Choi, S. B. Park, A Brief Overview of Two Major Strategies in Diversity-Oriented Synthesis: Build/Couple/Pair and Ring-Distortion, *Frontiers Chem* **2018**, 6, 507-507.
- [210] I. Pavlinov, E. M. Gerlach, L. N. Aldrich, Next generation diversity-oriented synthesis: a paradigm shift from chemical diversity to biological diversity, *Org Biomol Chem* **2019**, 17, 1608-1623.

- [211] H. R. El-Seedi, A. M. El-Said, S. A. Khalifa, U. Goransson, L. Bohlin, A. K. Borg-Karlson, R. Verpoorte, Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids, *J Agric Food Chem* **2012**, *60*, 10877-10895.
- [212] J. H. Chen, C.-T. Ho, Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds, *J Agric Food Chem* **1997**, *45*, 2374-2378.
- [213] N. Razzaghi-Asl, J. Garrido, H. Khazraei, F. Borges, O. Firuzi, Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships, *Curr Med Chem* **2013**, *20*, 4436-4450.
- [214] J. Teixeira, A. Gaspar, E. M. Garrido, J. Garrido, F. Borges, Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview, *BioMed Res Int* **2013**, *2013*, 251754.
- [215] C. V. Rao, D. Desai, B. Simi, N. Kulkarni, S. Amin, B. S. Reddy, Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon, *Cancer Res* **1993**, *53*, 4182-4188.
- [216] H. Xiao, K. L. Parkin, Isolation and identification of potential cancer chemopreventive agents from methanolic extracts of green onion (*Allium cepa*), *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1059-1067.
- [217] Y. Kita, H. Tohma, K. Hatanaka, T. Takada, S. Fujita, S. Mitoh, (...), S. Oka, Hypervalent Iodine-Induced Nucleophilic Substitution of para-Substituted Phenol Ethers. Generation of Cation Radicals as Reactive Intermediates, *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 3684-3691.
- [218] A. Urbaniak, M. Molski, M. Szelag, Quantum-chemical Calculations of the Antioxidant Properties of trans-*p*-coumaric Acid and trans-sinapinic Acid, *Comput Methods Sci Technol* **2012**, *18*.
- [219] R. Atta ur, M. Shabbir, S. Ziauddin Sultani, A. Jabbar, M. Iqbal Choudhary, Cinnamates and coumarins from the leaves of *Murraya paniculata*, *Phytochemistry* **1997**, *44*, 683-685.
- [220] T. H. Chuang, H. H. Chan, T. S. Wu, C. F. Li, Chemical constituents and biological studies of the leaves of *Grevillea robusta*, *Molecules* **2011**, *16*, 9331-9339.
- [221] A. Shuaib, K. R. Lees, P. Lyden, J. Grotta, A. Davalos, S. M. Davis, (...), U. Emeribe, NXY-059 for the Treatment of Acute Ischemic Stroke, *N Engl J Med* **2007**, *357*, 562-571.
- [222] G. T. Balogh, K. Vukics, A. Könczöl, A. Kis-Varga, A. Gere, J. Fischer, Nitron derivatives of trolox as neuroprotective agents, *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 3012-3015.
- [223] D. T. Sawyer, A. Sobkowiak, T. Matsushita, Metal [ML_x; M = Fe, Cu, Co, Mn]/Hydroperoxide-Induced Activation of Dioxygen for the Oxygenation of Hydrocarbons: Oxygenated Fenton Chemistry, *Acc Chem Res* **1996**, *29*, 409-416.
- [224] S. Goldstein, D. Meyerstein, Comments on the Mechanism of the "Fenton-Like" Reaction, *Acc Chem Res* **1999**, *32*, 547-550.
- [225] H.-Y. Chen, Why the Reactive Oxygen Species of the Fenton Reaction Switches from Oxoiron(IV) Species to Hydroxyl Radical in Phosphate Buffer Solutions? A Computational Rationale, *ACS Omega* **2019**, *4*, 14105-14113.
- [226] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. L. Prior, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J Agric Food Chem* **2001**, *49*, 4619-4626.
- [227] A. Denicola, J. M. Souza, R. Radi, Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes, *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**, *95*, 3566-3571.
- [228] K. M. Robinson, J. S. Beckman, in *Methods in Enzymology*, Vol. 396, Academic Press, **2005**, pp. 207-214.

- [229] H. Rubbo, R. Radi, Protein and lipid nitration: Role in redox signaling and injury, *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1780, 1318-1324.
- [230] B. Halliwell, Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls, *Biomed J* **2014**, 37, 99-105.
- [231] D. Figueroa, M. Asaduzzaman, F. Young, Real time monitoring and quantification of reactive oxygen species in breast cancer cell line MCF-7 by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay, *J Pharmacol Toxicol Methods* **2018**, 94, 26-33.