

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A KÉMIAI TÉR TERMÉSZETES ANYAGOKON ALAPULÓ  
BŐVÍTÉSE ÚJ BIOAKTÍV ANYAGOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

**Hunyadi Attila**

Készült a SZTE-GYTK Farmakognóziai Intézetében

Szeged

2021



## I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

A természetes anyagok, és ezen belül is elsősorban a növényi másodlagos anyagcseretermékek egy a kismolekulás felfedező gyógyszerkutatás szempontjából különösen értékesnek tekinthető kémiai teret jelölnek ki. 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 található a természetből izolált tumorellenes gyógyszervegyületeket, mint a paklitaxel (Taxol), doxorubicin, Vinca alkaloidok (vinblasztin, vinkrisztin), és az ipari forrásnövényének felfedezése révén a szegedi Farmakognóziai Intézethez is kötődő ingenol 3-angelát. A tradicionális kínai medicina eszköztáraként legalább 1700 éve lázcsillapítóként használt egynyári ürömből (*Artemisia annua*) az antimaláriás hatású artemizinin felfedezését, és az annak köszönhető terápiás paradigmaváltást 2015-ben orvosi-életteni Nobel-díjjal ismerték el.

A természetes anyagok gyógyszerkutatási potenciálját jól illusztrálja a Newman és Cragg nevével fémjelzett összefoglaló cikkek sorozata. Ennek hatodik, legújabb kiadása szerint az 1981. január 1. és 2019. szept. 30. között világszerte (elsőként) törzskönyvezett, összesen 1881 originális gyógyszervegyületből a tisztán természetes anyagok részaránya 5,1% (+1% standardizált növényi kivonat), kismolekulás gyógyszereink ugyanakkor több, mint fele természetes eredetű vagy természetes farmakofórt tartalmaz, és közel 70%-ban természetes anyagokkal hozhatók kapcsolatba.

Ez azt is jól mutatja, hogy míg a természetes 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.

Az értekezésben bemutatott munka célja ennek megfelelően bioaktív természetes és/vagy félszintetikus 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.

Ehhez a munkához az alábbi három természetes anyagcsoportot vettük alapul: 1) egy királis információban gazdag, merev alapvázú, 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 gyógyszerkutatói 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, félszintetikus átalakításokat, és totálszintetikus megközelítést is igénybe vettünk, és az alábbi specifikus célokat tűztük ki.

- **Növényi és félszintetikus 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. Célunk volt továbbá a farmakológiai eredményeik komplex kiértékelésében való aktív részvétel, és a szerkezet-hatás összefüggések feltérképezése is.
- **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 gyógyszerkutatói 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 a kémiai átalakítások elsődleges célja a kémiai tér bővítése, a változatosság növelése volt, amely a termékek izolálását követően változatos farmakológiai információ kinyerését tették lehetővé.

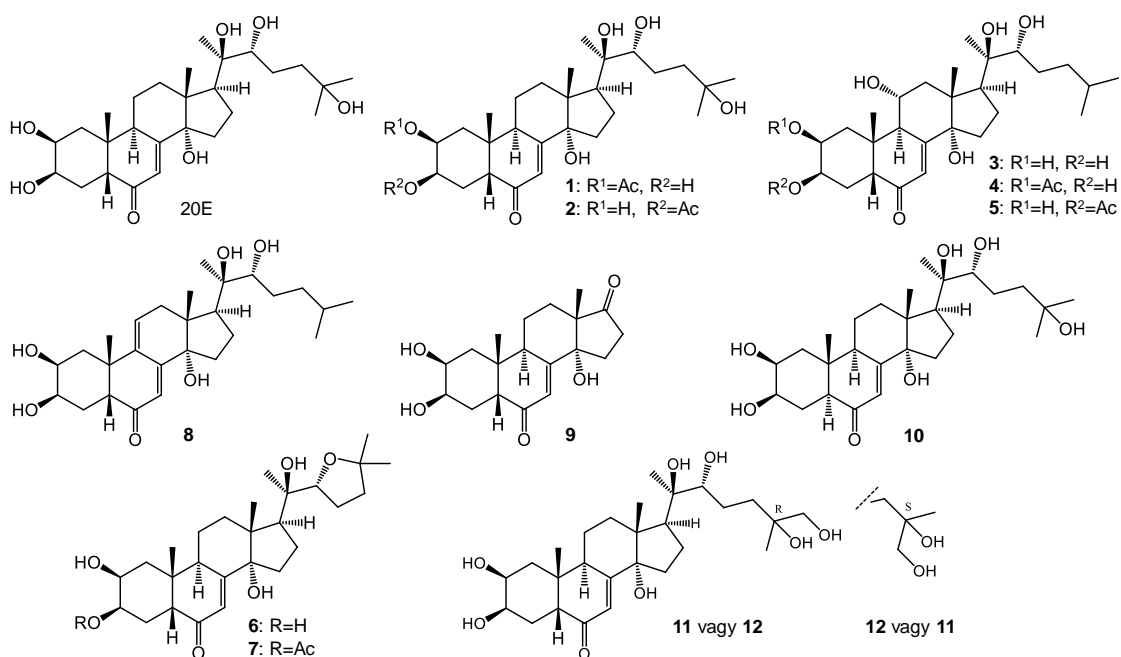
## II. ÚJ EREDMÉNYEINK TÉZISPONTOK SZERINTI ÖSSZEFOGLALÁSA

### 1. TÉZIS. KERESKEDELMI FORGALOMBAN ELÉRHETŐ EKDISZTEROID-TARTALMÚ KIVONATOK VIZSGÁLATA [S1, S2]

Ezen munka során 13 ekdiszteroid származékot, köztük 2 új vegyületet állítottunk elő, és az alábbi új eredményeket értük el.

1) Ekdiszteroid tartalmú étrend-kiegészítők vizsgálatával egy szokatlan termékhamisítást mutattunk ki: a deklarált spenót tartalom helyett *C. arachnoidea* kivonatot tartalmazó termékeket azonosítottunk, ami azt valószínűsíti, hogy ez a piac jelentős mértékben a távolkeleti *Cyanotis* kivonatok felhasználásán alapul.

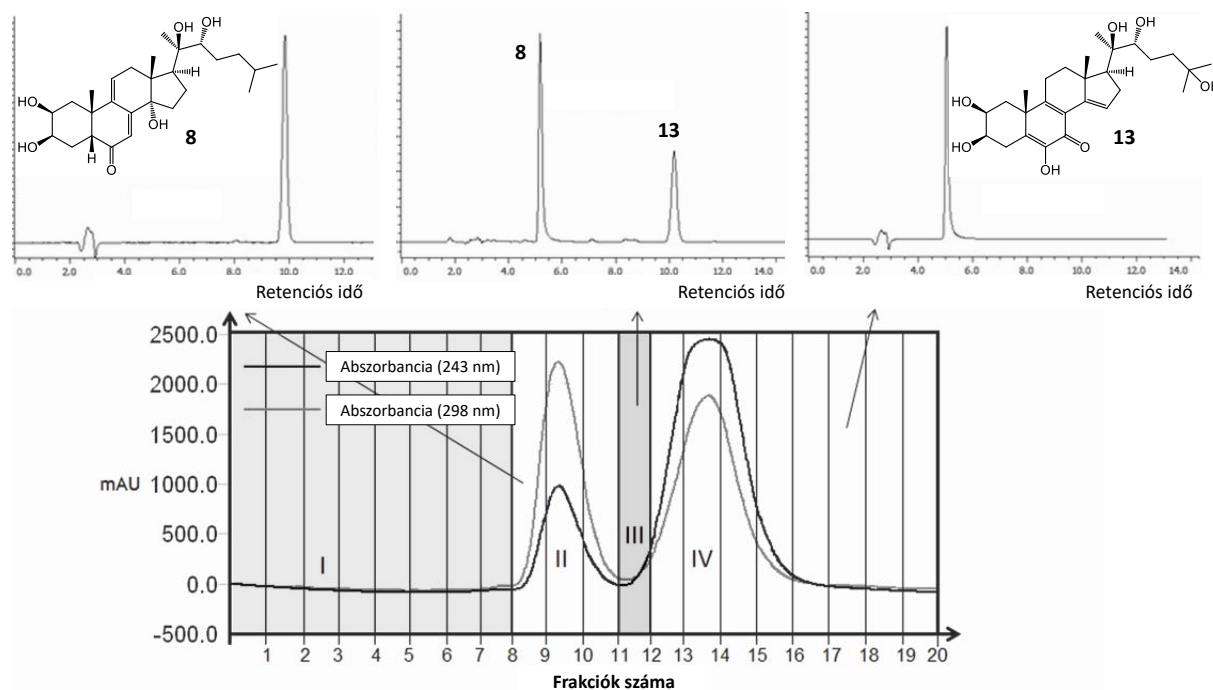
2) Kimutattuk, hogy a *Cyanotis arachnoidea* kereskedelmi forgalomban ipari léptékben is gazdaságosan elérhető kivonatai kiaknázhatóak különleges ekdiszteroidok gazdag forrásaiként, és/vagy ezek nagy mennyiségben való félszintetikus előállítására alkalmas nyersanyagforrásként. Bár számos ekdiszteroidot izoláltak *Cyanotis* fajokból, a feldolgozott kivonatok gazdag ekdiszteroid összetételüknek köszönhetően új anyagok izolálására is messzemenően alkalmas nyersanyagforrások (1. Ábra).



**1. Ábra.** *Cyanotis arachnoidea* gyökérvonatot tartalmazó, de félvezetően spenót kivonatként értékesített étrend-kiegészítő termékből izolált ekdiszteroidok. A 11 és 12 epimereket tisztán előállítottuk, a 25-ös szénatom konfigurációját azonban nem határoztuk meg.

3) Az ilyen, kereskedelmi forgalomban lévő növényi kivonatokból előállított új vegyületek természetes (bioszintetikus) eredete sok esetben, így a fenti anyagok esetében sem igazolható, ezek az ipari előállítás műtermékei is lehetnek. Kémiai/farmakológiai vizsgálatuk ugyanakkor a humán felhasználásra szánt étrend-kiegészítőkben való jelenlétük miatt kiemelten fontos.

4) Folyadék-folyadék kromatográfias módszert dolgoztunk ki két minor ekdiszteroid (dakrihainanszteron, **8**, és kaloniszteron, **13**) grammos léptékű preparatív elválasztására (2. Ábra).



**2. 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 (**8** és **13**) szerkezete.

## 2. TÉZIS. OXIDÁLT ÉS FOTO-TRANSZFORMÁLT EKDISZTEROID SZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA [S3-S7]

Ezen munka során összesen 27 ekdiszteroid származék, köztük 15 új vegyület előállítását és vizsgálatát végeztük el, és az alábbi új eredményeket értük el.

5) Sikeresen állítottunk elő egy oldatban pH-függően stabil ekdiszteroid dezmotróp párt (**13** és **20**), amelyek bioaktivitása is eltérőnek mutatkozott. Az autooxidáció időbeli lefutását HPLC és CE segítségével is vizsgáltuk, és azt találtuk, hogy a dezmotróp pár keletkezéséhez vezető köztitermék (**19**) elméletileg akár 80% körüli termeléssel is előállítható lehet.

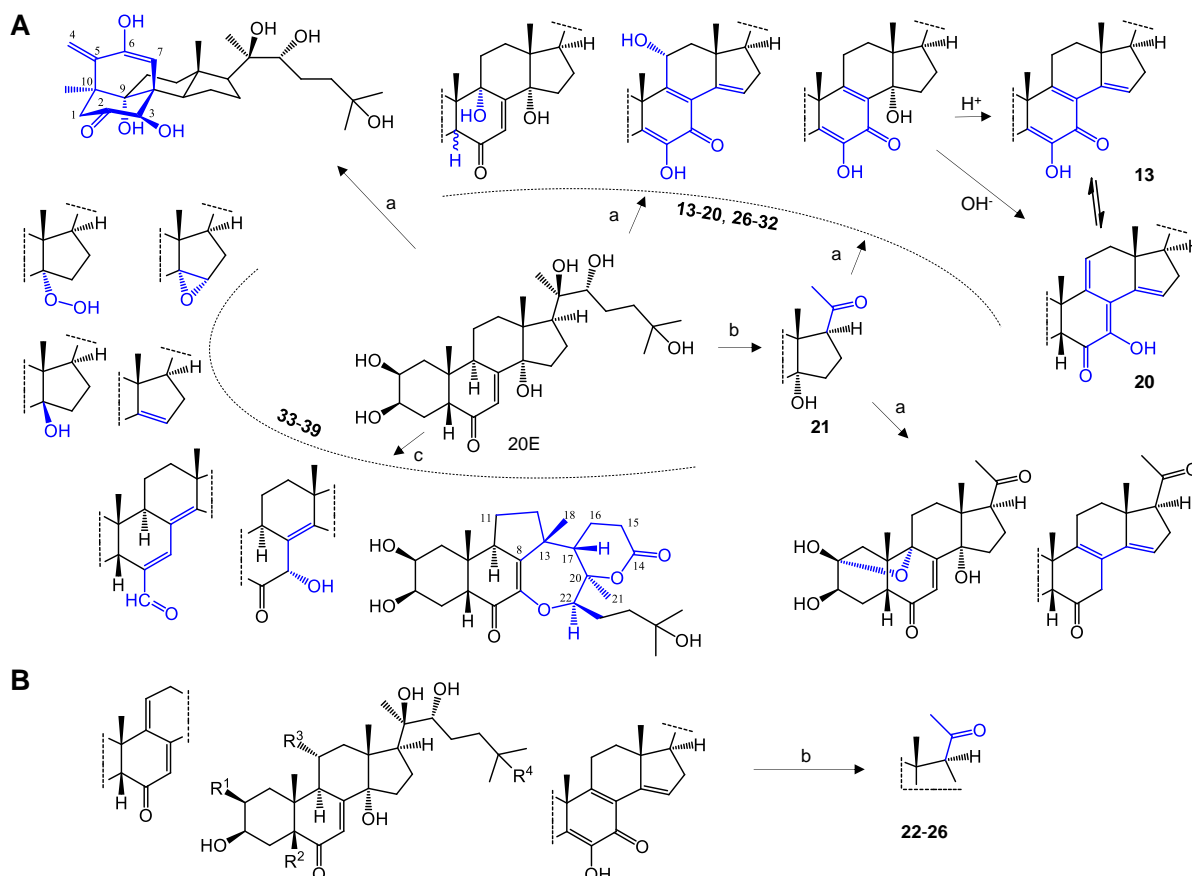
6) Mintegy 20 oxidált származék *in vitro* vizsgálata alapján kimutattuk, hogy az ekdiszteroid B-gyűrű telítettségének növelése fokozza az anyagok serkentő hatását a sejtek életképességét alapvetően befolyásoló protein kináz-B (Akt) foszforilációjára. Ennek alapján az így előállított anyagok anabolikus / adaptogén / sejtvédő / antidiabetikus hatások szempontjából különösen ígéretesek.

7) Módszert dolgoztunk ki a 20E láncrövidült metabolitja, a posztszteron (**21**) gazdaságos előállítására, amely lehetővé tette hatásának kutatási együttműködés keretében való *in vivo*

vizsgálatát. Ennek során elsőként mutattuk ki egy metabolit szerepét az ekdiszteroidok anabolikus hatásában.

8) 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.

A 2. Tézishez kapcsolódó munka során elért szerkezeti változatosságot a 3. Ábra mutatja be.



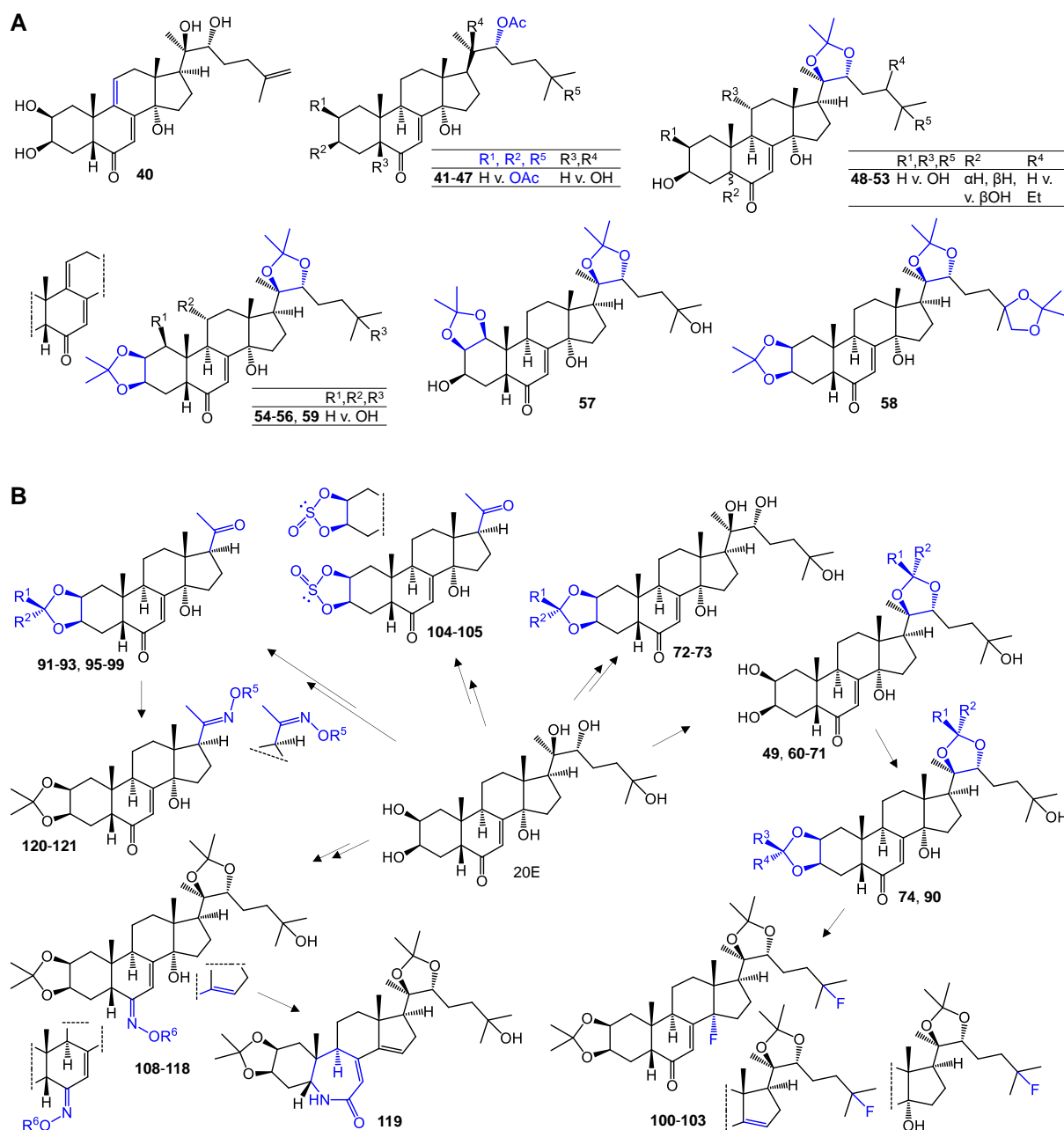
**3. Ábra. A:** A 20-hidroxi-ekdizon (20E) oxidatív, ill. fotokémiai átalakításával nyert ekdiszteroid származékok. Az bázis-katalizált autooxidációval (a; **13-20, 26-32**), PIFA-katalizálta oxidatív oldallánc hasítással (b; **21**), ill. lézeres flash fotolízissel (c; **33-39**) állítottuk elő. **B:** Egyéb természetes ekdiszteroidokból (2-dezoxi-20E, polipodin B, ajugaszteron C, dakrihainanszteron, kaloniszteron) végzett oxidatív lánchasítással nyert anyagok (**22-25**); R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>: H vagy OH. A kiindulási anyaghoz viszonyított szerkezeti változást kék szín jelzi.

### 3. TÉZIS. TUMOR REZISZTENCIA CSÖKKENTŐ HATÁSÚ EKDISZTEROID SZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA [S8-S18]

Ezen munka során összesen 89 ekdiszteroid, köztük 58 új vegyület előállítását és vizsgálatát végeztük el, és az alábbi új eredményeket értük el.

9) Elsőként mutattuk ki, hogy a relatíve apoláris ekdiszteroid származékok, különösen az ekdiszteroid acetonidok, jelentős rezisztencia-csökkentő hatást fejtenek ki mind multidrog rezisztens, mind gyógyszer szenzitív tumorsejtvonalakban számos kemoterápiás szerre. Ezen

felismerést követően változatos apoláris ekdiszteroid származékokat állítottunk elő a szerkezet-hatás összefüggések minél jobb megértése érdekében; az így elért kémiai változatosságot a 4. Ábra mutatja be.



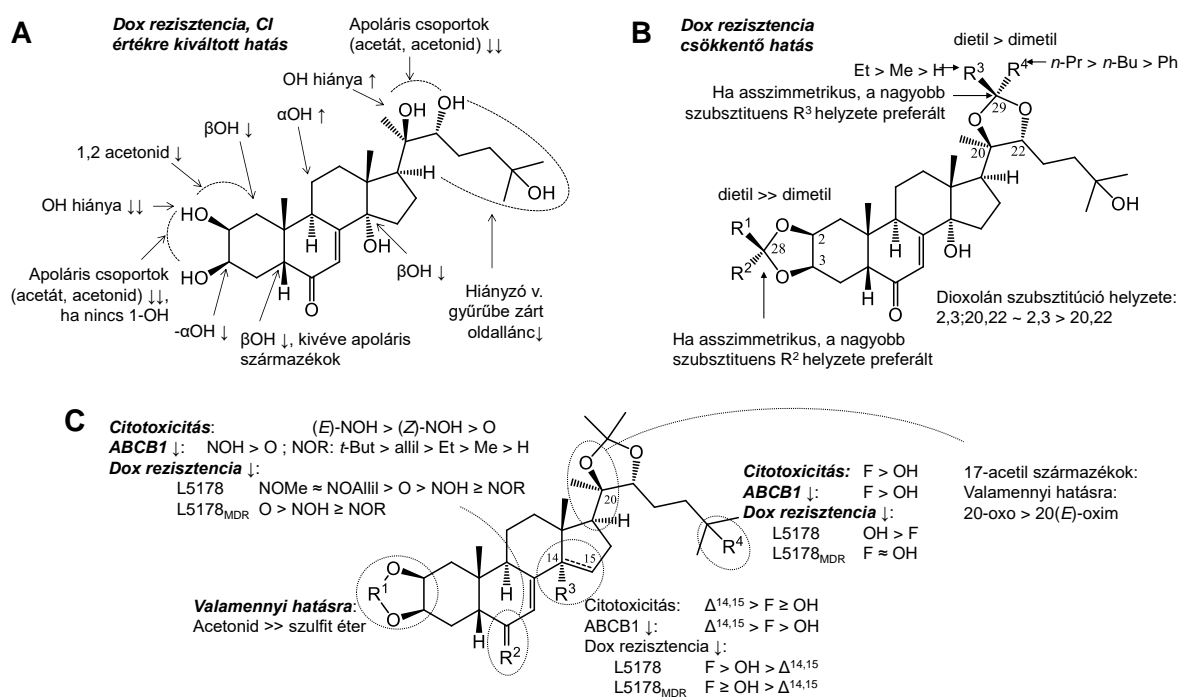
**4. Ábra. A:** természetes ekdiszteroidokból előállított apoláris ekdiszteroid származékok. **B:** A 20-hidroxiiekdizonból a tumor rezisztencia csökkentő hatás szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálatára előállított apoláris ekdiszteroid származékok.  $R^1, R^2, R^3, R^4$ : H, Me, Et, *n*-Pr, *n*-Bu, *i*-Bu, Ph, *E*-etenilbenzil, *Z*-etenilbenzil, 3-metoxi-4-hidroxi-fenil, vagy 4-(benziloxi)fenil;  $R^5$ : H vagy Me;  $R^6$ : H, Me, Et, allil vagy *t*-But.

10) Kimutattuk, hogy a hatás ABCB1 transzportert (P-gp) over-expresszáló, multidrog rezisztens sejtvonalban jóval erősebb, mint annak gyógyszerszenzitív párján, de nem a transzporter efflux funkciójának gátlásán alapul. A legrámaibb szenzitizáló hatást egy P-gp negatív neuroblasztóma sejtvonalon tapasztaltuk; ezen a sejtvonalon a legerősebb hatású **85**



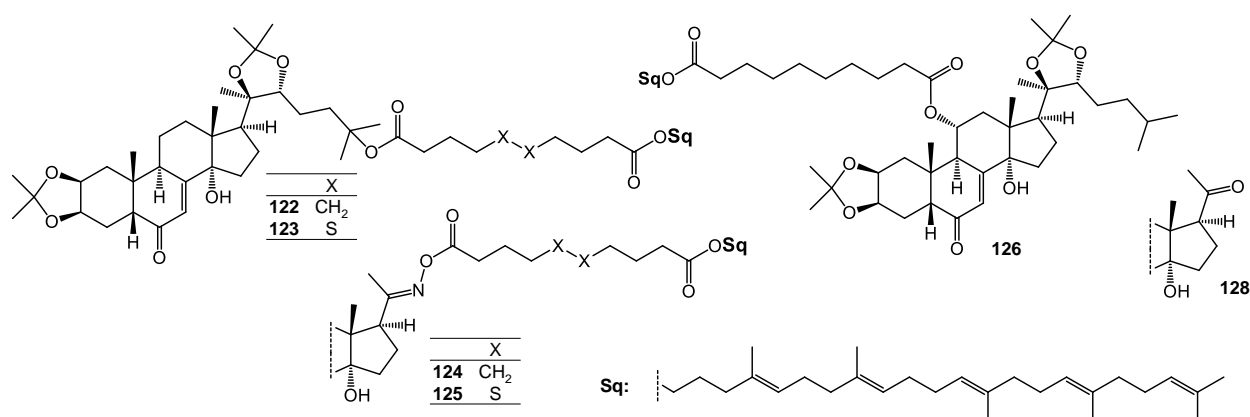
anyag 10  $\mu\text{M}$  koncentrációban a vinkrisztin 39,5 nM  $\text{IC}_{50}$  értékét három nagyságrenddel, 56 pM értékre csökkentette.

11) Az újonnan állított anyagok mellett meglévő ekdiszteroid könyvtárunk *in vitro* 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 rezisztencia csökkentő hatás szempontjából legfontosabbnak felismert szerkezeti elem a 2,3-diolon kialakított dioxolán gyűrű volt. Az L5178 és L5178<sub>MDR</sub> sejtvonal páron végzett vizsgálatok alapján felismert szerkezet-hatás összefüggéseket az 5. ábra összegzi.



**5. Ábra.** Az ekdiszteroidok tumor rezisztenciára kifejtett hatásainak összegzett szerkezet-hatás összefüggései. **A:** 38 természetes és 20 félszintetikus (40-59) anyag interakciója doxorubicinnel (Dox) L5178<sub>MDR</sub> sejteken; az interakció jellegét és erősségét az egyes funkciók kombinációs indexre (CI) gyakorolt hatásával adom meg, CI: kombinációs index,  $0 < \text{CI} \leq 1$ : szinergizmus,  $\text{CI} = 1$ : additív hatás,  $\text{CI} > 1$ : antagonizmus; **B:** ekdiszteroid dioxolánok (60-90) Dox rezisztencia csökkentő hatása – valamennyi ilyen anyag szinergizmusban hatott a doxorubicinnel, a kisebb-nagyobb jelek a szinergizmus erősségét jelzik; **C:** S, F és N heteroatomok hatása az ekdiszteroid acetonidok L5178 és L5178<sub>MDR</sub> sejteken kifejtett citotoxicitására, ABCB1 gátló hatására, és Dox rezisztencia csökkentő hatására.

12) A 2,3-diolon kialakított dioxolán gyűrű savérzékenysége, valamint oldékonysággal kapcsolatos problémák és a targetálás vonzó lehetősége indokolta, hogy nanorészecskéket állítsunk elő; ezt szkvalénnal funkcionizált ekdiszteroid prodrug konjugátumok segítségével értük el (6. Ábra)



**6. Ábra.** Szkvalénnel funkcionizált, vizes közegben spontán nanorészecskékké önrendeződő ekdiszteroid prodrugok.

Az ekdiszteroid-szkvalén konjugátumok vizes közegben való önrendeződése monodiszperz, stabil nanorészecskéket alakított ki. A **122-124** anyagokból kutatási együttműködésben szkvalénnal funkcionizált doxorubicinnel kombinált heteronanorészecskéket állítottunk elő, amelyek hatékonynak bizonyultak doxorubicin-rezisztens tumorsejtek ellen.

13) A  $11\alpha$ -hidroxiekdiszteroid 2,3-acetonidok szkvalén konjugátumaiból (**126**, **128**) előállított önrendeződő nanorészecskék gyógyszerrezisztenciára kifejtett hatása alapján valószínűsítettük, hogy ezek a konjugátumok a 2,3-acetonid nélküli ekdiszteroid pro-drugjaiként viselkednek. Ezt vélhetően a szérum lipoproteinekben oldott konjugátumok endocitózist követő lizoszomális emésztés savas közege okozza. A 2,3-acetonidot így a jövőben egy alkalmas savrezisztens csoporttal kell helyettesíteni ahhoz, hogy ezt a stratégiát hatékonyan lehessen tumorellenes céllal alkalmazni.

#### **4. TÉZIS. BIOAKTÍV PROTOFLAVONOID ANALÓGOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA [S19-S24]**

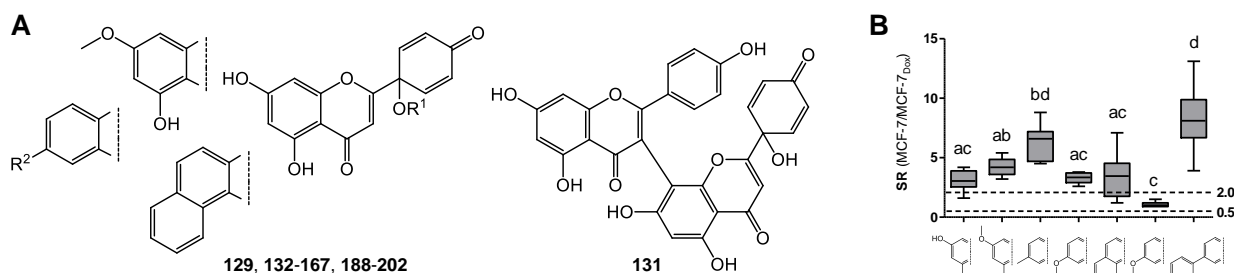
Ezen munka során összesen 72 protoflavon származék, köztük 69 új vegyület előállítását és vizsgálatát végeztük el, és az alábbi új eredményeket értük el.

14) Kidolgoztunk egy léptéknövelhető, egy lépéses, gazdaságos félszintetikus eljárást az antitumor hatású, ritka természetes protoflavonoid, a protoapigenon apigeninből való előállítására.

15) Kimutattuk, hogy a protoapigenon antitumor hatása egy nem elágazó, alifás 1'-O-alkil éter oldallánccal sejtvonaltól függően tovább fokozható.

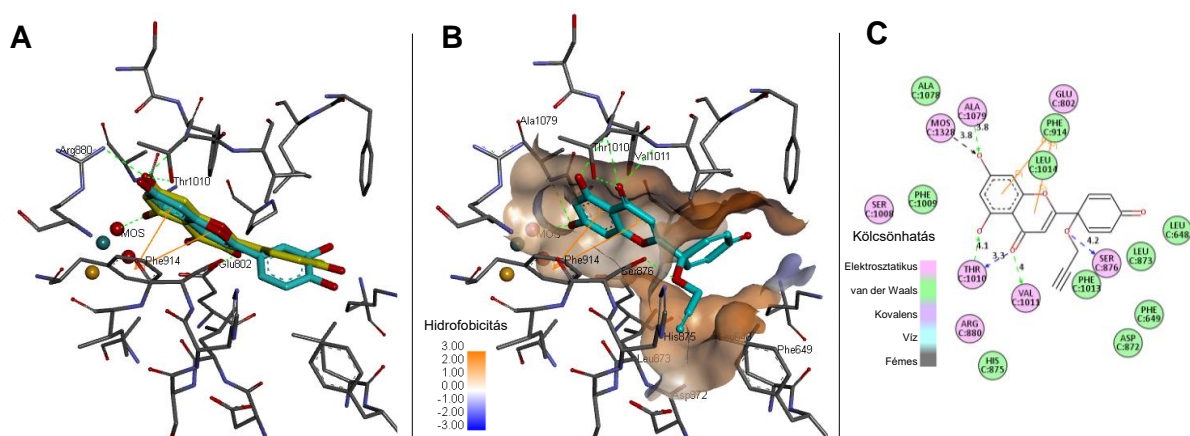
16) Kimutattuk, hogy a protoapigenon egy ABCG2 szubsztrát, szintetikus analógjai ugyanakkor képesek áthidalni az ABCB1 és ABCG2 efflux transzporterekhez köthető multidrog rezisztenciát, és szelektíven elpusztítani egyes kemoterápiás szerekhez adaptált

rezisztens tumorsejteket. Felismertük, hogy a szelektivitás összefüggésben áll a rezisztens sejtek antioxidáns védelmének az adaptáció során kialakuló változásaival. Doxorubicinhez adaptált MCF-7 emlőkarcinoma sejteken a szelektív toxicitás szempontjából a 6-fenil szubsztitúció volt a leghatékonyabb. A tumorellenes hatás vizsgálata céljából előállított protoflavonokat, és a doxorubicin-rezisztens MCF-7/MCF-7<sub>Dox</sub> emlőkarcinoma sejteken mutatott szelektivitásuk C-6 szubsztitúcióra vonatkozó szerkezet-hatás összefüggéseit a 8. Ábra mutatja be.



**7. Ábra. A:** Tumorellenes hatás vizsgálatára előállított fél- és totálszintetikus protoflavon származékok; R<sup>1</sup>: H, Me, Et, Prop, i-Prop, But, allil, propargil vagy Bn, R<sup>2</sup>: Me, OMe, OEt, Pent, Br, vagy Ph. **B:** Doxorubicinhez adaptált MCF-7 sejtek (MCF-7<sub>Dox</sub>) elleni szelektív toxicitás A-gyűrűre vonatkoztatott szerkezet hatás összefüggéseinek elemzése, szelektivitás (SR)=IC<sub>50</sub>(MCF-7)/IC<sub>50</sub>(MCF-7<sub>Dox</sub>). Az eltérő kisbetűk az egyutas varianciaanalízis és Bonferroni post-hoc teszt alapján statisztikailag szignifikáns különbséget mutató anyagcsoportokat jelzik.

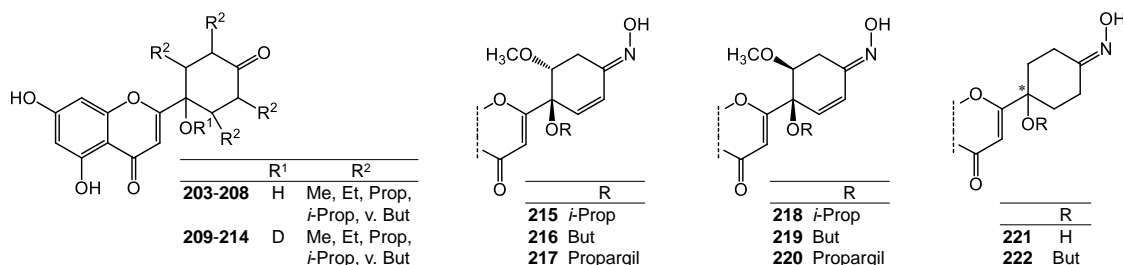
17) A protoflavonok nem tumorellenes célú alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata kapcsán a protoapigenon 1'-O-propargil étert (**138**) a köszvényben és számos oxidatív stressz-szel összefüggő kórképben fontos szerepet játszó xantin oxidáz enzim első nem planáris flavonoid típusú hatékony gátlószereként azonosítottuk. Enzimkinetikai vizsgálataink alapján a gátlás kompetitív típusú. *In silico* dokkolásos vizsgálataink feltárták a propargil oldallánc kitüntetett szerepének okát: ez az enzim egy szűk lipofil zsebébe illeszkedve rögzíti a molekulát, amely más 1'-O-alkil oldalláncok esetében nem volt lehetséges (8. Ábra).



**8. Ábra.** A protoapigenon 1'-O-propargil éter (**138**) xantin oxidáz enzimhez (3NVY) való *in silico* dokkolásának eredményei. **A:** kontroll kísérlet, experimentális kvercetin ligandum (sárga) visszadokkolása (türkiz), RMSD=0,9149 Å. **B:** a **138** anyag legelőnyösebb dokkolt pozíciója a fehérje kvercetin kötőhelyén, grafikusán ábrázolt hidrofobicitási felülettel. **C:** a **138** anyag interakciói a 3NVY fehérje aminosav reziduumaival, és a H-kötések távolsága (Å).

A **138** anyag citotoxikus hatása miatt köszvényellenes szerként nem alkalmazható, ugyanakkor új, nem purin típusú xantin oxidáz gátlók racionális tervezésének modellvegyületeként értékes.

18) A *p*-kinol B-gyűrű módosításával számos nem citotoxikus protoflavon származékot állítottunk elő (9. Ábra) annak érdekében, hogy ezen anyagok várható antivirális hatását sejtes rendszerekben is behatóbban vizsgálhassuk.



**9. Ábra.** Az antivirális hatás vizsgálata céljából előállított, nem citotoxikus hatású protoflavon származékok (**203-222**). Ebbe a munkába az analógjainál jóval gyengébben citotoxikus **135** anyagot is bevontuk, amely a protoapigenonnál előnyösebb szelektivitással váltott ki erős Epstein-Barr vírus ellenes hatást.

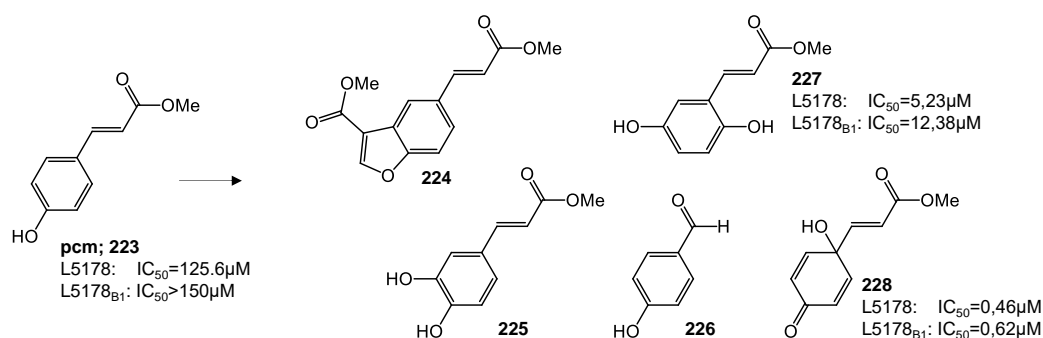
A protoapigenon 1'-*O*-izopropil éter (**135**) erős, a protoapigenonnál jóval szelektívebb Epstein-Barr vírus ellenes hatást, a tetrahidroprotoapigenon (**221**) pedig gyenge HIV-ellenes hatást váltott ki. Eredményeink arra utalnak, hogy a protoflavonoidok klasszikus flavonoidoktól jelentősen eltérő térszerkezetüknek köszönhetően egy farmakológiai szempontból sokoldalú új kémiai teret jelölnek ki.

## 5. TÉZIS. A KÉMIAI TÉR ANTIOXIDÁNS INSPIRÁLTA KITERJESZTÉSE [S25-S27]

Ezen munka során 10 antioxidáns metabolit előállítását és vizsgálatát végeztük el, és az alábbi új eredményeket értük el.

19) Megfogalmaztuk egy új, bioaktív anyagok felfedezésére alkalmas kémiai stratégia alapjait: ennek lényege kismolekulás antioxidánsok diverzitás-orientált biomimetikus oxidációjával nyert metabolit-keverékek, mint értékes új kémiai tér szisztematikus vizsgálata. Elgondolásunk alapja az volt, hogy a természetes, kismolekulás antioxidánsok reaktív oxigén és/vagy nitrogén fajták befogásával kémiaiailag stabil metabolitokká alakulhatnak, amelyeket nem csak az antioxidáns hatás komplex értékeléséhez kell figyelembe venni, hanem abból a szempontból is, hogy ezek anyavegyületeiknél sokszor összetettebb szerkezetüknek köszönhetően azoktól specifikusabb bioaktivitás profillal is rendelkezhetnek. Ezt a jelenséget és új, bioaktív anyagok felfedezésére való esetleges felhasználhatóságát hidroxifahéjsav származékok, mint modellvegyületek példáján vizsgáltuk.

20) A *p*-kumársav oxidált keverékeinek vizsgálata során öt terméket izoláltunk, amelyek közül kettő mutatott anyavegyületüknél jelentősen erősebb citotoxikus hatást (10. Ábra).

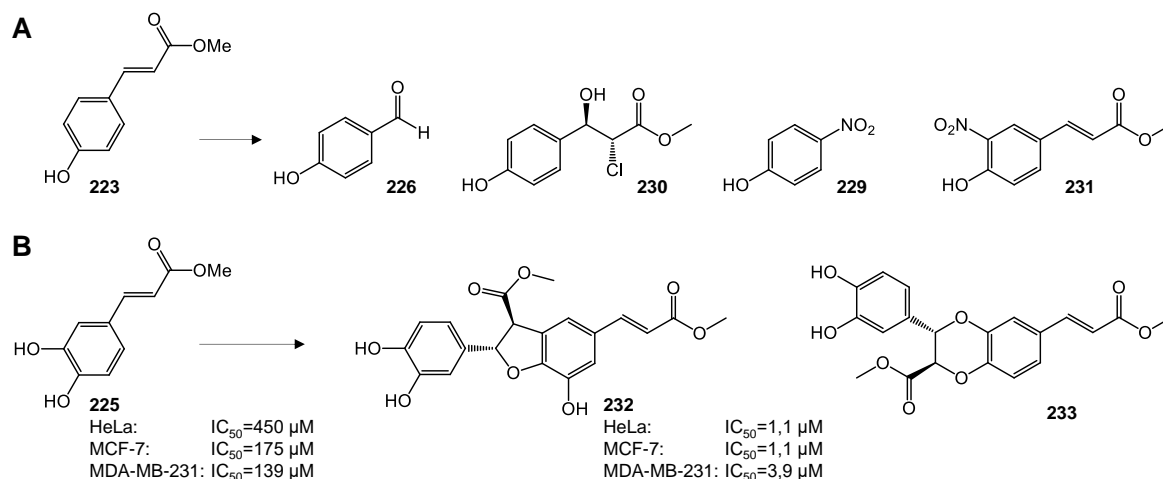


**10. Ábra.** A metil-*p*-kumarát (**223**) hipervalens jódvegyülettel (PIFA) végzett oxidációjának termékei. Az erős citotoxikus hatású gravikinont (**228**) ezt követően a **223** Fenton reakciójából is egyértelműen azonosítani tudtuk.

A gravikinon farmakológiáját kutatási együttműködés keretében behatóan vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy ez az anyag változatos gyógyszer-szenzitív és rezisztens tumor sejtvonalak ellen hatékony, jó tumor szelektivitással bír, és az ATR függő jelátvitel hatékony gátlószere.

21) Közvetett bizonyítékok, így a **223** anyag MCF-7 sejteken hidrogén peroxiddal mutatott szinergizmusa, Fenton-reakciójának termék-analízise és *in silico* kvantumkémiai számítások alapján valószínűsítettük, hogy a gravikinon biológiai környezetben az oxidatív stressz szintjétől függően szabadgyökfogással keletkezhet anyavegyületéből, a metil-*p*-kumarátból.

22) A metil-*p*-kumarát (**223**) és a metil kaffeát (**225**) bioreleváns, peroxinitrittel, ill. peroxilgyököket termelő AAPH reagenssel való oxidációjából hat terméket állítottunk elő (11. Ábra).



**11. Ábra.** Hidroxifahéjsav származékok biomimetikus, ill. bioreleváns oxidációjával nyert anyagok. **A:** A metil-*p*-kumarát (**223**) folyamatos áramú, *in situ* előállított peroxinitrittel végzett oxidációjával nyert, nem citotoxikus anyagok. **B:** a metil kaffeát AAPH reagenssel végzett oxidációjából izolált termékek, amelyek közül a **232** anyag peroxinitrittel végzett oxidáció során is kimutatható volt. A **232** anyag 35-400-szor erősebb citotoxikus hatású volt egyes nőgyógyászati tumorsejtek ellen, mint anyavegyülete.

A metil kaffeát oxidált metabolitjai között egy erős antitumor hatású dimert (**232**) azonosítottunk, amely a szakirodalom szerint a tumor mikrokörnyezetén hatva erős

antimetasztatikus hatást vált ki *in vivo*. Az AAPH egy peroxilgyököket termelő, biomimetikusnak tekinthető reagens, a peroxinitrit pedig egy teljes mértékben bioreleváns, az élő szövetek oxidatív stressz viszonyait tekintve nagy jelentőségű reaktív nitrogén fajta. Ez alapján valamennyi így előállított metabolit jó eséllyel keletkezhet biológiai környezetben is.

23) Kimutattuk, hogy az általunk vizsgált sejtvonalak terc-butil hidroperoxiddal (*t*-BHP) való előkezelést (és így oxidatív stressz kiváltását) követően a **225** anyag citotoxicitása olyan módon változott, amely párhuzamot mutatott az adott sejtvonalak **225** / **232** anyagokra mutatott érzékenység különbségével. Mivel a sejtek **225** anyaggal és *t*-BHP-vel való egyidejű kezelése során ezek kölcsönhatásaként egyértelműen antagonizmust mértünk, a hatásfokozódást nem okozhatta a két kezelő ágens egyszerű kémiai reakciója. Ez, bár egyelőre csak indirekt módon, de azt a feltevést erősíti, hogy a **232** anyag keletkezése a **225** anyagból biológiai környezetben az intracelluláris oxidatív stressz függvényében való keletkezése nem csak lehetséges, de farmakológiai szempontból is releváns lehet.

24) Hidroxifahéjsav származékokon végzett munkánk eredményei összességében 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.

### III. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

#### 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.
- 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.

#### 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.

### Apoláris ekdiszteroid származékok előállítás és vizsgálata (3. TÉZIS)

- S8.** Vágvölgyi M, Bélteky 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 $\alpha$ -Hydroxyecdysteroid 2,3-Acetonides Act as Cytoprotective Agents Against Doxorubicin and Paclitaxel. *Frontiers Pharmacol*, **2020**, 11, 552088.
- 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*, **2018**, 144, 730-739.
- 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.
- S11.** Bogdán D, Haessner R, Vágvölgyi M, Passarella D, **Hunyadi A**, Gáti T, Tóth G.\* Stereochemistry, and complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signal assignment of C-20-oxime derivatives of posterone 2,3-acetonide in solution state. *Magn Reson Chem*, **2018**, 56, 859-866.
- 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.
- 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.
- S14.** Balázs A, **Hunyadi A**, Csábi J, Tillekeratne LMV, Martins A, Tóth G.\* New cyclic 2,3-sulfite ester derivatives of posterone – Discriminating diastereomers and probing spatial proximities by NMR and DFT. *Magn Reson Chem*, **2017**, 55, 1102-1107.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.

#### **Protoflavon származékok előállítás 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

#### **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 Caffate Yields Potent Antitumor Metabolite. *Biomolecules*, **2020**, 10, 1537.
- 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.
- 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.