

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Farmakognóziai Intézet



α,β -Telítetlen oxo-terpének félszintetikus módosítása, bioaktivitásuk és katalitikus aktivitásuk vizsgálata

Ph.D. Tézis összefoglaló

Háznagy Márton Benedek, PharmD

Szeged

2025

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Ph.D. program: Farmakognózia

Programvezető: Prof. Dr. Hohmann Judit D.Sc.

Farmakognóziai Intézet

Témavezető: Prof. Dr. Hunyadi Attila D.Sc.

Témavezető: Prof. Dr. Szakonyi Zsolt D.Sc.

Háznagy Márton Benedek, Pharm D.

**α,β -Telítetlen oxo-terpének félszintetikus módosítása,
bioaktivitásuk és katalitikus aktivitásuk vizsgálata**

Komplex Vizsga Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Hohmann Judit D.Sc.

Tagok: Prof. Dr. Ilisz István D.Sc., Prof. Dr. Csupor Dezső D.Sc.,

Bíráló bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Ilisz István D.Sc.

Opponensek: Dr. London Gábor Ph.D., Prof. Dr. Perjési Pál DSc.

Tag: Kanizsainé Dr. Minorics Renáta Ph.D.

Titkár: Dr. Jójátrné Dr. Laczkovich Orsolya Ph.D

Szeged

2025

Bevezetés

Az α,β -telítetlen karbonilvegyületek a természetes anyagok egy különleges csoportja. Egyedi, konjugált szerkezetüknek köszönhetően változatos kémiai transzformációkban vehetnek részt, gyakori példa erre a nukleofil addíció. Kutatásunk célja ilyen szerkezeti egységet tartalmazó természetes vegyületek, úgymint a monoterpenoid perillaldehid, az ekdiszteroid 20-hidroxiiekdizon, és a fenolos karbonsavak közé tartozó fahéjsav kémiai módosítása volt.

A monoterpenoidok C_{10} -es terpén származékok, melyek biogenetikailag két izoprén-egységből épülnek fel, és több mint ezer természetes képviselőjük ismert. Két fő csoportjuk az illékony illóolaj komponensek és a nem illékony iridoidok. Az illóolajok egyik kinyerési módja a vízgőzdesztilláció, mely eljárással pl. a perillaldehid, dolgozatunk egyik kiindulási anyaga kivonható a *Perilla frutescens* föld feletti részéből. Kutatócsoportunk széleskörű tapasztalattal rendelkezik a monoterpenoidok és azok származékainak enantioszelektív katalizátorként való alkalmazásában aromás aldehideken végzett reakciókban. Könnyű hozzáférhetőségük és természetes kiralitásuk miatt a monoterpenoidok kiváló kiindulási anyagok az aszimmetrikus szintézisekhez. Ezek alapján célunk volt új, monoterpenoid-vázas királis katalizátorok előállítása. A kutatócsoport korábbi munkájában a limonénváz perillaldehiddből és pulegonból kiindulva királis 3-amino-1,2-dioloikat állított elő. Ezek az anyagok katalizátorként alkalmazva a benzaldehid és dietil-cink reakciójában különböző enantiomer felesleggel (*ee*) szolgáltatott termékeket, s ez a szubsztituens minőségétől függött, ami hozzájárul a reakciómechanizmus jobb megértéséhez. Az aminodiol funkciós csoport emellett több fontos gyógyszerben, vagy gyógyszerjelöltben is megtalálható. Előállításuk többféle szintetikus úton keresztül valósítható meg, jelen munkában az allilaminok dihidroxilálását alkalmaztuk.

Az ekdiszteroidok triterpenoid eredetű szteroidok, melyek természetes képviselői számos hidroxilcsoportot tartalmazó poláris anyagok. Legjellemzőbb szerkezeti elemeik közé tartozik a kromofórként szolgáló B-gyűrűn lévő α,β -telítetlen (7-én-6-on) keto csoport. Ezen vegyületek emlősökön számos hatást fejtenek ki, többek között anabolikus, adaptogén, antidiabetikus és sebgyógyulást serkentő hatást. Természetes képviselőik kémiai és biológiai információi az *Ecdybase* nevű online adatbázisban megtalálhatók, amely jelenleg (2025 áprilisi frissítés alapján) 590 ekdiszteroid adatait tartalmazza. Az utóbbi években jelentősen növekedett az érdeklődés ezen vegyületcsoport iránt, amit jól mutat, hogy a 20-hidroxiiekdizon (20E) már 2020 óta szerepel a nemzetközi dopping ügynökség (WADA) megfigyelési listáján.

Előrehaladott klinikai vizsgálatok is folynak, amelyek szerint a 20E hatásos és biztonságos időskori szarkopénia kezelésében, valamint súlyos állapotú SARS-CoV-2 fertőzött betegeken életmentő tüdőprotektív szer.

A természetes és félszintetikus ekdiszteroidok antibakteriális és gombaellenes aktivitását eddig kevés vizsgálat tárgyalta, és a rendelkezésre álló adatok mérsékelt hatást mutattak. Munkánkban a 20E és néhány nitrogéntartalmú származék gombaellenes potenciálját értékeltük. Emellett egyes természetes szteroid származékok protozoon ellenes aktivitásából kiindulva, az ekdiszteroidok aktivitást mutathatnak a *Trypanosoma cruzi* ellen is. Korábbi eredmények szerint az ekdizon befolyásolja a Chagas-kór vektorának, a *Rhodnius prolixus*nak szaporodását és a parazita fejlődését. E megfigyelések alapján indokoltnak tartottuk egy szerkezetileg változatos ekdiszteroid könyvtár *T. cruzi* elleni szűrését.

Célkitűzések

Kibővíteni terveztük a limonénvázas királis monoterpenoidok kémiai terét, valamint terveztük vizsgálni az ekdiszteroidok *Cryptococcus* és *T. cruzi* ellenes aktivitását új, hatékonyabb származékok előállítása céljából. Ennek megfelelően munkánk célkitűzései az alábbiak voltak:

- 1. Aminodiol származékok sztereoszelektív szintézise perillaldehidből.** Diasztereo- és regioizomer 3-amino-1,2-diolkönyvtárának előállítása perillaldehidből redukzív aminálással és Overman átrendeződéssel, majd az így kapott köztitermékek dihidroxilációjával.
- 2. Katalitikus aktivitás vizsgálata dietil-cink addíciójában aromás aldehideken.** A szintetizált aminodiolkönyvtár katalitikus aktivitásának értékelése benzaldehid enantioszelektív dietil-cink addíciójában, valamint néhány esetben további aromás aldehideken.
- 3. Iminek és fahéjsavészter származékok félszintézise 20-hidroiekdizonból.** 20-hidroiekdizonból fahéjsavészterek, oximok és oxim-éterek, továbbá a B-gyűrű bővítésével egy laktám előállítása.
- 4. Ekdiszteroidok bioaktív vegyületekként: természetes és félszintetikus származékok értékelése.** Szerkezetileg sokszínű természetes és félszintetikus ekdiszteroid mintacsoport *in vitro* anticryptococcális és trypanocid aktivitásának vizsgálata együttműködésben külső laboratóriumokkal.

Anyagok és módszerek

Kiindulási anyagok: A (–)-(S)-perillaldehidet a Merck Co. (Merck Co., Darmstadt, Németország) cégtől vásároltuk. A 20-hidroxiiekdizon (20E) a Shaanxi KingSci Biotechnology-től (Xi'an, Kína) került beszerzésre 90%-os tisztasággal, és EtOAc/MeOH:2/1 (v/v) elegyben átkristályosítottuk, így RP-HPLC alapján 97% feletti tisztaságot értünk el.

Kromatográfiás tisztítási eljárások: Az előállított monoterpenoidokat normál fázisú oszlopkromatográfiával tisztítottuk szilikagélén. A félszintetikus ekdiszteroid származékokat normál fázisú flash kromatográfiával és fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) tisztítottuk.

Szerkezet-meghatározás módszerei: Az előállított termékek szerkezetének meghatározását különböző spektroszkópai technikával végeztük el, úgymint HR-MS, 1D- és 2D- NMR segítségével, a **7a** vegyület esetében pedig röntgenkristallográfiát is alkalmaztunk.

Számítógépes elemzés DFT módszerekkel: A DFT (sűrűségfunkcionál-elmélet) számításokat kutatási együttműködés keretében végeztük el. Az elemzésekhez együttműködő partnereink a Gaussian 09 Revision A 02 szoftvert használták.

Aromás aldehidek és dietil-cink reakciója királis katalizátorok jelenlétében: Az aminodiolok katalitikus aktivitását a dietil-cink és a benzaldehid, valamint további aromás aldehidek reakciójában vizsgáltuk. Az enantiomer felesleg meghatározásához a kapott termékeket acetileztük, majd a képződött termékek kiértékelése királis oszlopon GC vagy HPLC segítségével történt.

Ekdiszteroid származékok gombaellenes vizsgálata: A bioaktivitási vizsgálatot kutatási együttműködés keretében végeztük. Az interakció módját az Abbot-képlet segítségével értékelték. Néhány kiválasztott ekdiszteroid *Cryptococcus neoformans* elleni gátló hatását 96-lyukú microtiter lemezen vizsgálták. A *C. neoformans* IFM 5844 sejtek életképességét calcein-AM vizsgálattal értékelték és áramlási citometriával elemezték. Az ekdiszteroid származékok hatását efflux pumpa gátlókkal való kombinációban is vizsgálták checkerboard titrálási módszert alkalmazva.

Ekdiszteroid származékok trypanosma ellenes hatásának vizsgálata: Az antitrypanosomális aktivitás mérése kutatási együttműködés keretében történt. Az ekdiszteroidok emlős sejtekre gyakorolt citotoxikus vagy antiproliferatív hatását CHO és RAW264.7 sejtvonalakokkal végzett MTT-teszt segítségével értékelték 96-lyukú lemezekben. Az epimastigoták elleni trypanocidális

aktivitást XTT-teszttel értékelték 96-lyukú lemezeken. Pozitív kontrollként benznidazolt alkalmaztak. XTT- és PMS-oldatot adtak hozzá, majd a lemezeket inkubálták. A paraziták rögzítése után az abszorpciót lemezolvasóval mérték. Az IC₅₀ értékeket a GraphPad Prism 8.0 verzióval számították ki. A fertőzött sejtekből felszabadult paraziták fluoreszcencia-aktivált sejtválogatáson (FACS) alapuló kvantitatív meghatározását 24-lyukú lemezeken végezték a RAW264.7 gazdasejtekkel. A mikroszkópos mérésekhez CCL39 gazdasejtek 24-lyukú lemezekbe ültetették és négy napig kezelték. Ezt követően a sejteket paraformaldehiddel rögzítették és mikroszkóppal vizsgálták.

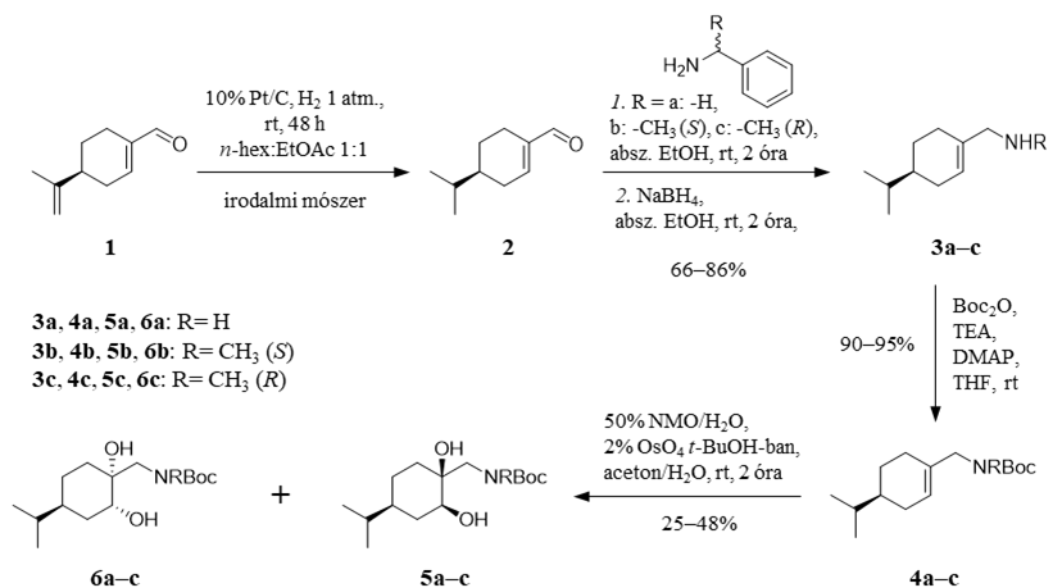
Eredmények és értékelésük

Monoterpenoidok

Aminodiolok előállítása perillaldehiddből kiindulva

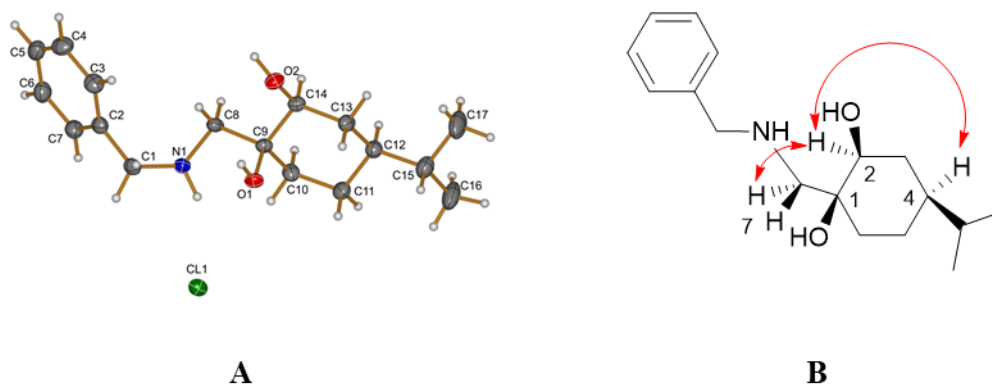
A tervezett aminodiolok előállításához kiindulási anyagként a kereskedelmi forgalomban kapható (–)-(S)-perillaldehidet választottuk, amely egy limonénvázas vegyület, és amelynek katalitikus alkalmazását eddig csak korlátozott mértékben vizsgálták. Mivel célunk volt a katalitikus potenciál átfogó vizsgálata, két szintetikus megközelítést dolgoztunk ki, hogy a perillaldehiddből különböző 3-amino-1,2-diol-származékokat nyerjünk. Mindkét szintetikus módszer fontos lépése volt a dihidroperillaldehid előállítása. Erre azért volt szükség, mivel a kiindulási anyagban található *exo* helyzetű kettős kötés jelenléte várhatóan nem kívánt melléktermékek kialakulásához vezetett volna a későbbi dihidroxilezési lépés során. Ezért először szakirodalmi példák alapján, Pt/C katalizátor alkalmazásával meghatároztuk az *exociklikus* kettős kötés szelektív hidrogénezésének optimális körülményeit. A reakció előrehaladását és a **2-es** vegyület képződését ¹H NMR spektroszkópiával követtük nyomon. Az első szintetikus megközelítésben aromás allil-aminokat szintetizáltunk Schiff-bázis köztiterméken keresztül, benzil-amint, valamint (*R*)- és (*S*)-fenil-etil-aminokat használva. A kapott termékeket (**3a–c**) ezután Boc-csoporttal védtük, majd OsO₄ és NMO oxidáló rendszerrel dihidroxileztük. Ez a transzformáció két diasztereomer Boc-védett aminodiol sorozatot eredményezett (**5a–c** és **6a–c**). Ezeket a kémiai átalakításokat az **1. ábra** szemlélteti.

A dihidroxilezési lépést követően a Boc-védőcsoportot sósavval eltávolítottuk, így kapva a **7a–c** aminodiolokat. A vegyületek szerkezeti azonosítását HR-MS, valamint 1- és 2D-s NMR spektroszkópiával végeztük.



1. **ábra:** Védett aminodiolok előállítása redukatív amináláson keresztül

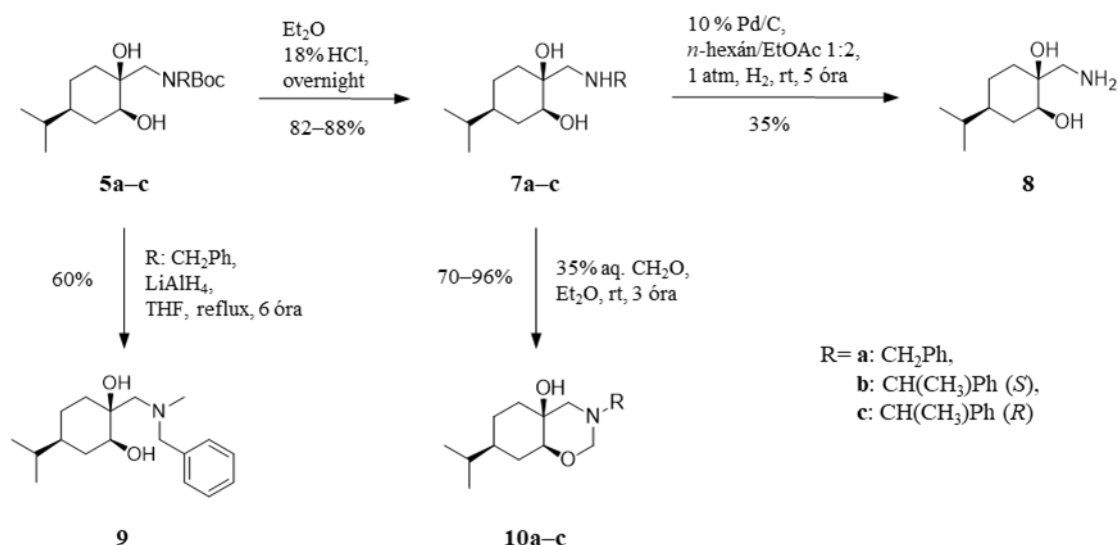
A **7a** vegyület abszolút konfigurációját NOESY NMR spektroszkópiával és egykristály röntgendiffrakciós méréssel határoztuk meg, amint azt a mellékelt **2. ábra** szemlélteti. A röntgendiffrakciós mérést kutatási együttműködés keretében a Jyväskylä-i Egyetemen *Prof. Dr. Matti Haukka* végezte.



2. **ábra.** **7a** vegyület abszolút konfigurációja (A) egykristály röntgendiffrakcióval való meghatározása NOESY interakcióval való megerősítése (B)

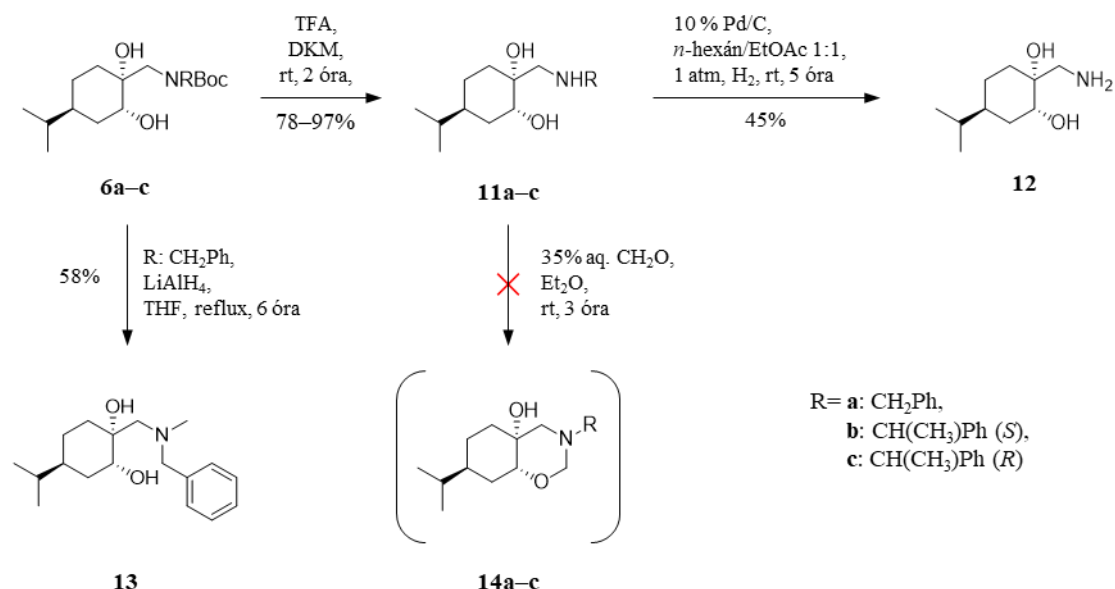
Ezen eredmények alapján a **6a–c** vegyületek relatív konfigurációja is közvetetten meghatározhatóvá vált, mivel ezen anyagok a szelektív Upjohn-dihidroxilezéssel kerültek előállításra. A **7a** vegyületből a primer aminodiol **8**-at debenzilezéssel állítottuk elő. További származékok szintézisét is megvalósítottuk: az **5a** vegyületet LiAlH₄ segítségével redukáltuk, így *N*-metil-*N*-benzil-származékot nyertünk. Ezenkívül formaldehid-mediált ciklizációs reakciókat hajtottunk végre a **7a–c** aminodiol sorozaton, gyűrűzáródási készségük megvizsgálása céljából. Ezek az átalakulások kizárólag a hattagú biciklusos oxazin-

származékok (**10a–c**) képződéséhez vezettek, ami ennek a gyűrű méretnek az erős preferenciáját jelzi. Az előbb felsorolt szintetikus lépéseket a **3. ábra** foglalja össze.



3. ábra: aminodiol származékok szintézise **5a–c**-ből

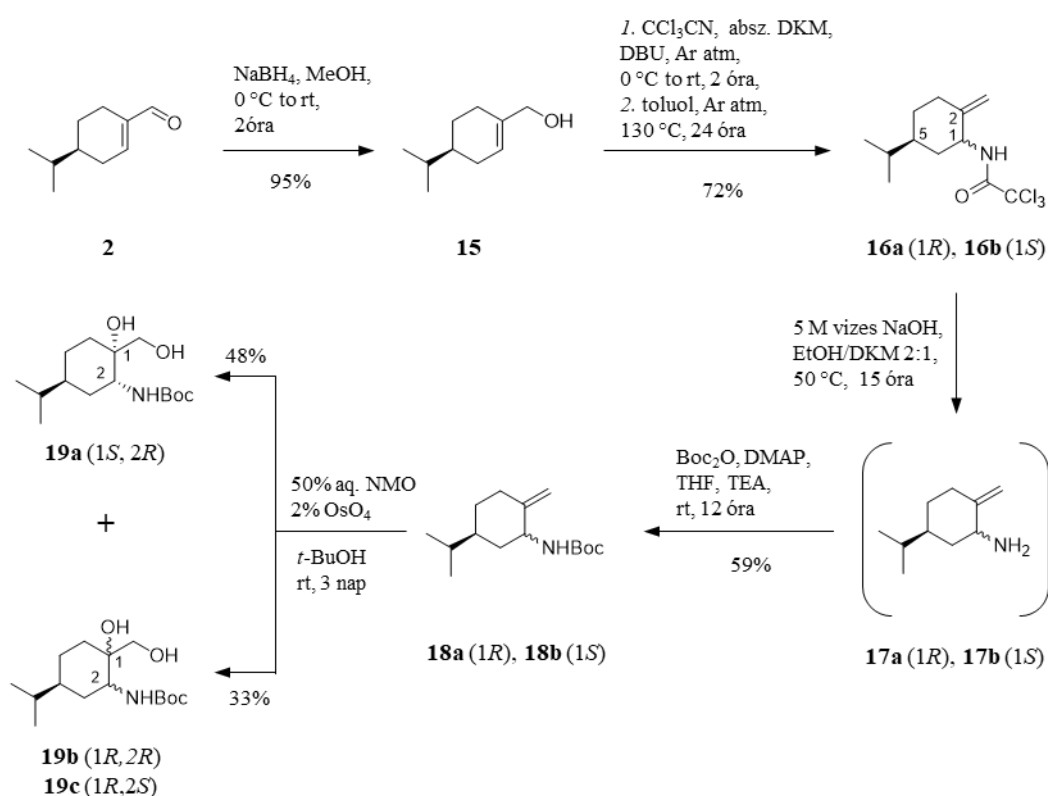
Hasonló átalakításokat hajtottunk végre a diasztereomer **6a–c** vegyületekkel. A Boc-védőcsoport eltávolításával a **11a–c** vegyületeket kaptuk. Képeztük a **12**-es vegyületet is mint primer aminodiol. A **6a** vegyületből a **13**-as származék is előállításra került. Az alkalmazott reakciókörülmények között azonban a **11a–c**-ből történő gyűrűzárási kísérlet nem eredményezte a megfelelő biciklusos termékek képződését **14a–c** (lásd a **4. ábrát**).



4. ábra: Aminodiol származékok előállítása **6a–c** vegyületekből

Ennek a jelenségnek a vizsgálatára *in silico* DFT számítások kerültek elvégzésre az Eötvös Loránd Tudományegyetemen Prof. Dr. Csámpai Antallal együttműködve. A számítási

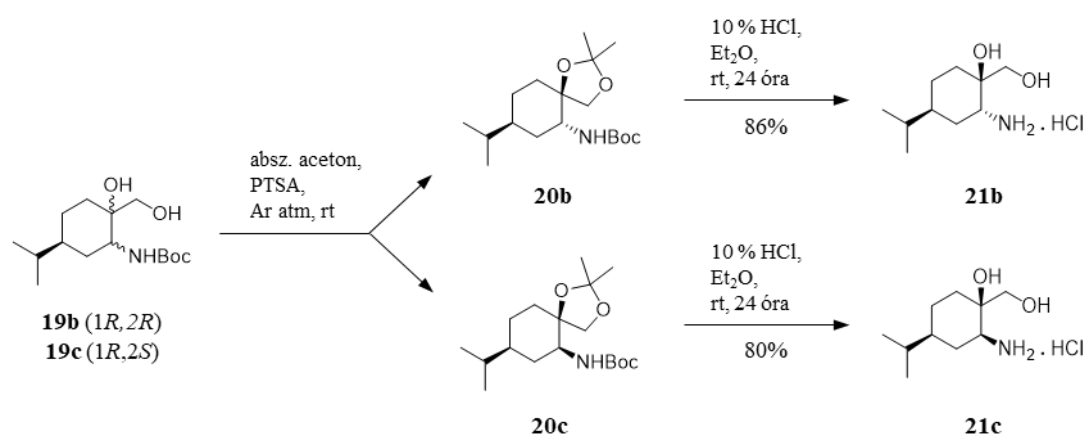
eredmények azt mutatták, hogy a gyűrűképződés termodinamikailag megvalósítható mindkét diasztereomer sorozat esetében, azaz a **7a** vegyület **10a**-vá és a **11a** vegyület hipotetikus **14a**-vá történő átalakulása. Bár a cél **14a–c** vegyületeket nem sikerült izolálni, a **11a**-val való reakció rétegekromatográfiás követése során a valószínűsíthető termék keletkezésével halvány folt volt megfigyelhető, ami a kívánt gyűrűzárt vegyület átmeneti képződésére utal. Számos tényező magyarázhatja a **14a–c** vegyületek izolálásának sikertelenségét. Ezek közé tartozik a termékek potenciális savkatalizált elbomlása szilikagélen, valamint a **11a–c** sorozat ciklizációjához szükséges szterikusan gátolt gyűrűinverzió. Mindkét tényező jelentősen korlátozhatta a biciklusos termékek képződését és stabilitását az alkalmazott kísérleti körülmények között.



5. ábra: Az aminodiolok előállítása Overmann-átrendeződéssel

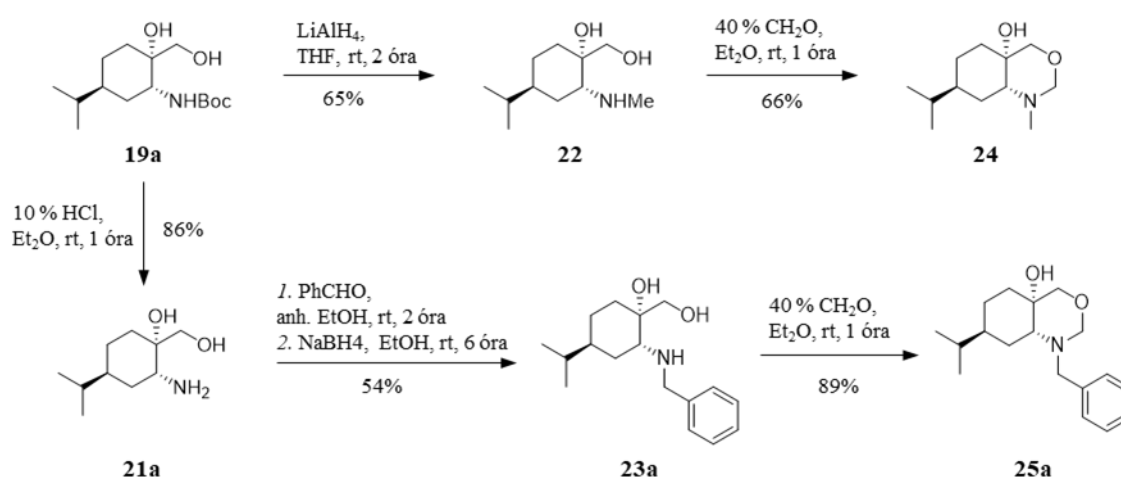
A regioizomer 3-amino-1,2-diolok szintéziséhez szintén dihidroperillaldehidből (**2**) indultunk ki. Az első lépésben a megfelelő allyl-alkoholt NaBH₄-del redukálva állítottuk elő (**15**). Ezt követte egy kétlépéses reakció, amelyben a köztitermék Overman-átrendeződésen ment keresztül, így **16a:16b** = 85:15 arányú, triklór-acetillel védett allyl-amin keverék keletkezett. Mivel a kapott diasztereomerek normál fázisú kromatográfiával nem voltak elválaszthatók, a triklór-acetil-csoportot Boc-védőcsoporttal helyettesítettük. Azonban még ezután a lépés után is a diasztereomer keverék elválaszthatatlan maradt (**18a** és **18b**). Így a

végző lépést, az aminodiolok előállításához szükséges dihidroxilezést, a korábban ismertett módszer szerint végeztük el ezen a keveréken, ami a következő arányú termékek képződéséhez vezetett: **19a:19b:19c** = 71:16:13. A kromatográfiás tisztítás eredményeként a **19a** aminodiolot izoláltuk tiszta formában, míg a **19b** és **19c** vegyületek keveréket képeztek, amint az **5. ábrán** látható. Az elválasztás megkönnyítése érdekében a **19b** és **19c** szomszédos diol szubsztituenseit a megfelelő acetál származékokká alakítottuk át. Ez a folyamat lehetővé tette a védett aminodiolok kromatográfiás elválasztását, amelyek sósavval végzett hidrolízist követően a megfelelő primer aminodiolokat adták. Ezeket az átalakulásokat az **6. ábra** szemlélteti.



6. ábra: Aminodiol diasztereomerek izolálása acetamid képzése révén

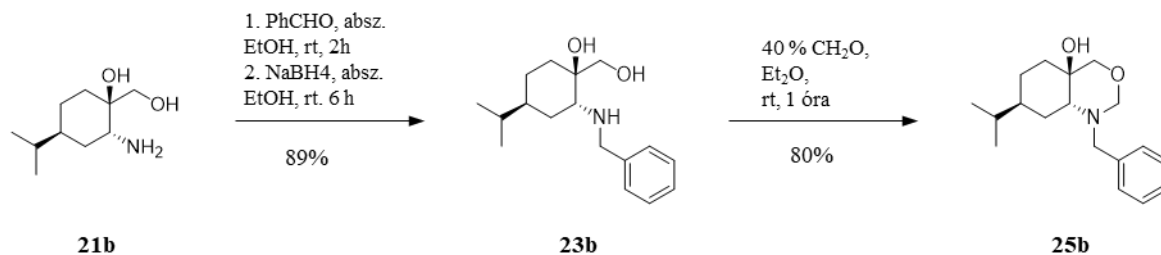
A **19a** aminodiolot LiAlH₄-del reagáltattuk, így képezve a **22**-es *N*-metil-származékot. A **21a** primer aminodiol a **19a** savas hidrolízisével keletkezett. Előállítottuk az *N*-benzil (**23a**) és a biciklusos származékokat is (**24**, **25a**) (lásd a **7. ábrát**).



7. ábra: További aminodiol származékok szintézise

A **23b** *N*-benzil-származékot a **21b** primer aminból állítottuk elő, majd formaldehid alkalmazásával gyűrűzárási reakciót hajtottunk végre, amelynek eredményeként a **25b** vegyület

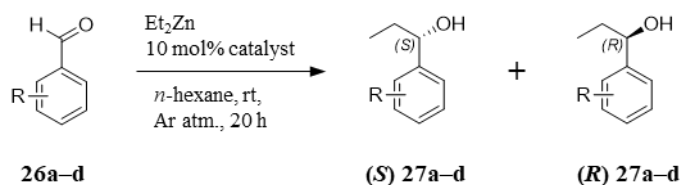
keletkezett (lásd a **8. ábrát**). Érdekes módon minden ciklizáció a hattagú 1,3-oxazin gyűrűrendszer kialakulásához vezetett.



8. ábra: *N*-benzil és gyűrűzárt származékok előállítása

Aminodiolok alkalmazása aromás aldehidek enantioszelektív reakciójában

Huszonkét 3-amino-1,2-diolt teszteltünk királis katalizátorként dietil-cink és aromás aldehidek modellreakciójában. Benzaldehidet használtunk elsődleges szubsztrátként, azonban a **10a**-t (a legaktívabb vegyületet) és összehasonlítás céljából a **7a**-t más aromás aldehidekre (4-metilbenzaldehyd, 4-metoxibenzaldehid és 3-metoxibenzaldehid) is alkalmaztuk. A kapott (*R*)- és (*S*)-1-aryl-1-propanolokat királis GC vagy HPLC segítségével határoztuk meg. A reakció menete a **9. ábrán** látható.



R = **a**: H, **b**: CH₃ (C'-4), **c**: OCH₃ (C'-4), **d**: OCH₃ (C'-3)

9. ábra: Dietil-cink enantioszelektív addíciója aromás aldehidekre; kitermelések: 51–92%

A katalitikus aktivitások az **1. táblázatban** láthatók. Az eredmények alacsony és kiváló értékek között mozgott. Ezekből arra lehet következtetni, hogy a szabad dihidroxil csoportokat tartalmazó (1*S*,2*S*,4*S*) konfigurációjú aminodiolok elsősorban az *S* enantiomer képződését segítik elő. Érdekes módon a kondenzált biciklusos származékok (**10a–c**) kiváló, de ellentétes (*R*) szelektivitást mutattak. A kiterjesztett reakciók (**2–4.** és **11–13. vizsgálat**) megerősítik, hogy ugyanazok a diasztereomerek elősegíthetik az *R* vagy az *S* enantiomer kialakulását. A kondenzált 1,3-oxazin gyűrűt tartalmazó **7a–c** és **10a–c** vegyületek magas katalitikus szelektivitást mutattak, ami valószínűleg merev konformációs szerkezetük következménye. Érdekes azonban megjegyezni, hogy a kondenzált gyűrűt tartalmazó regioizomer származékok csak mérsékelt aktivitást mutattak, bár megőrizték az *R*-szelektivitást. Az eredmények az **1. táblázatban** láthatók.

1. táblázat: Dietil-cink addíciója aromás aldehidekre a szintetizált aminodiolok katalizátorként való felhasználásával

Vizsgálat	Katalizátor ^I	Az aromás aldehid R csoportja	Izolált termelés ^{II} (%)	Enantiomer felesleg ^{III} (%)	A fő izomer konfigurációja ^{IV}
1	7a	H	87	68	<i>S</i>
2	7a	4-Me	80	89	<i>R</i>
3	7a	4-MeO	85	52	<i>S</i>
4	7a	3-MeO	87	42	<i>S</i>
5	7b	H	80	60	<i>S</i>
6	7c	H	80	35	<i>S</i>
7	8	H	90	70	<i>S</i>
8	9	H	89	60	<i>R</i>
9	10a	H	85	94	<i>R</i>
10	10a	4-Me	90	95.5	<i>R</i>
11	10a	4-MeO	89	95	<i>R</i>
12	10a	3-MeO	86	99	<i>R</i>
13	10b	H	88	81	<i>R</i>
14	10c	H	84	86	<i>R</i>
15	11a	H	77	26	<i>R</i>
16	11b	H	85	68	<i>R</i>
17	11c	H	86	42	<i>S</i>
18	12	H	88	10	<i>S</i>
19	13	H	89	28	<i>S</i>
20	21a	H	92	4	<i>S</i>
21	21b	H	91	54	<i>S</i>
22	21c	H	67	12	<i>S</i>
23	22	H	75	20	<i>R</i>
24	23a	H	51	0	-
25	23b	H	71	18	<i>R</i>
26	24	H	82	20	<i>R</i>
27	25a	H	78	62	<i>R</i>
28	25b	H	89	8	<i>R</i>

^I 10 mol%.^{II} A hozamokat a kromatográfiás tisztítás után számítottuk ki.^{III} A nyers termék értékelése GC vagy HPLC segítségével történt.^{IV} A GC elemzés t_R -értékének és az optikai forgatóképességnek a szakirodalomban szereplő adatokkal való összehasonlításával határoztuk meg

Jelenlegi munkánk jól kiegészíti kutatócsoportunk tematikus erőfeszítéseit. Korábbiakban vizsgáltunk egy sor monoterpén származék aminodiolt, mint királis katalizátorokat a dietil-cink aromás aldehidekhez való aszimmetrikus addíciójához. A miretenolból származó pinánvázas aminodiolok alacsony vagy közepes enantioszelektivitású katalizátorokat eredményeztek. Ezzel szemben a karánvázas származékok közepes vagy kiváló enantioszelektivitással rendelkeztek. Pulegonból kiindulva olyan katalizátorokat tudtunk előállítani, amelyek akár 90 %-os enantiomer felesleget eredményeztek. Az izopulególól származó aminodiolok alacsony vagy közepes katalitikus szelektivitást mutattak, míg a szabinolból és a β -pinénből származók csak közepes, illetve alacsonytól közepes szelektivitást mutattak.

Ekdiszteroidok

A tárgyalt vegyületek kémiai változatossága

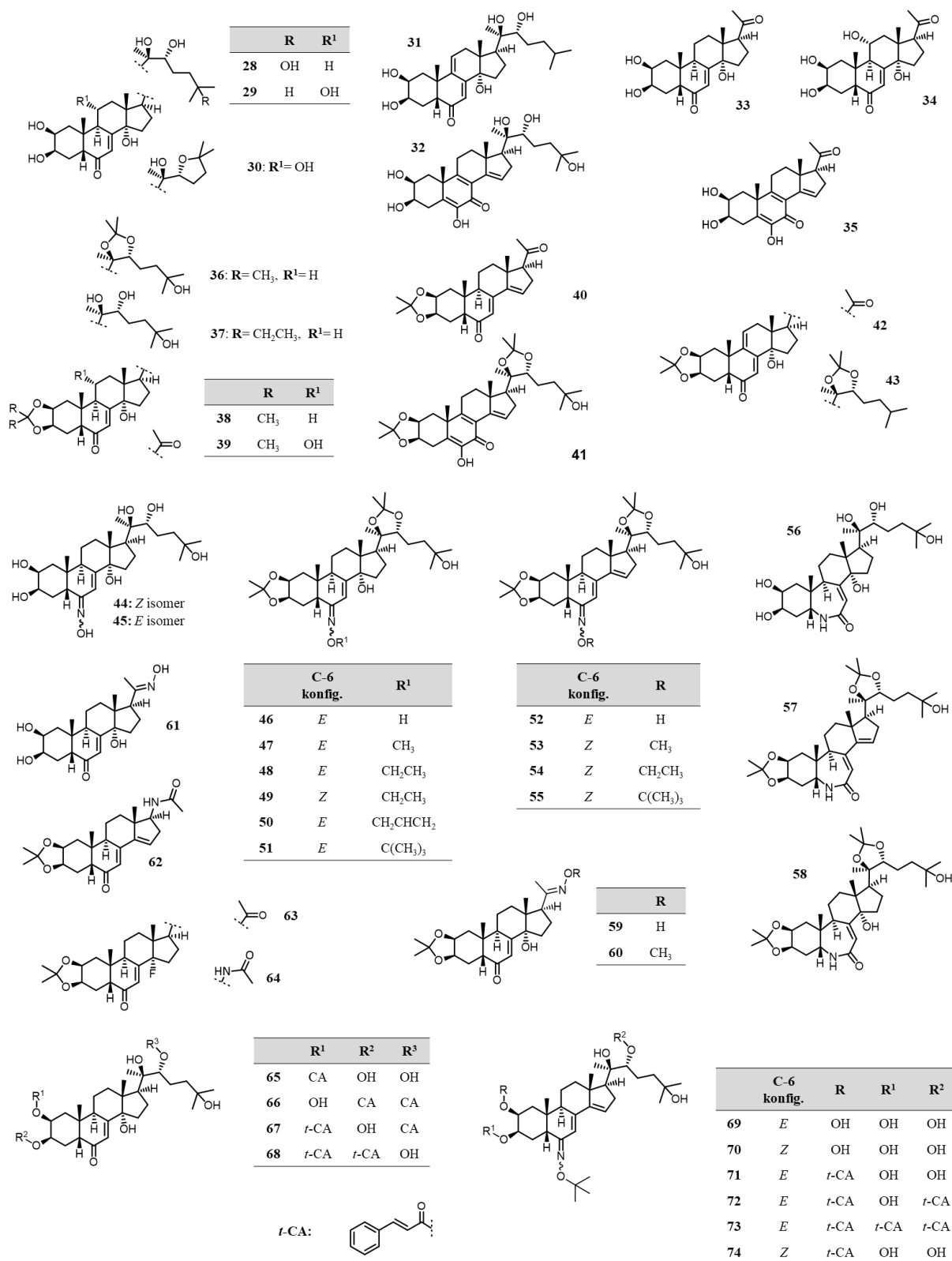
Legjobb tudomásunk szerint az ekdiszteroidok *T. cruzi* ellenes aktivitását eddig még nem vizsgálták, és gombaellenes hatásukról is csak korlátozott információk állnak rendelkezésre. Ezért első lépésben összeállítottunk egy szerkezetileg változatos ekdiszteroid könyvtárat, hogy átfogóan értékelhessük az említett biológiai aktivitásukat. A vizsgált ekdiszteroidok szerkezetét a **10. ábra** mutatja be.

A válogatás a következőket tartalmazza:

- Természetes származékok: 20-hidroxi ekdizon (**28**), ajugaszteron C (**29**), shidaszteron (**30**), dakrihainanszteron (**31**) és kaloniszteron (**32**)
- Félszintetikus származékok:
 - Oldallánc hasított származékok (**33–35**)
 - Dioxolán származékok: 2,3-monoacetamidok (**37–40**, **42**) és 2,3;20,22-diacetamidok (**36**, **41**, **43**)
 - Nitrogéntartalmú ekdiszteroidok: C-6 oximok (**44–46**, **52**), egy C-20 oxim (**61**), C-6 oxim-éterek (**47–51**, **53–55**, **69**, **70**), laktámok (**56–58**) és egy amid (**62**)
 - Fluorozott analógok (**63**, **64**)
 - Ekdiszteroidok fahéjsav észterei (**65–68**) és fahéjsav észter csoportokat tartalmazó oxim-éterek (**71–74**)

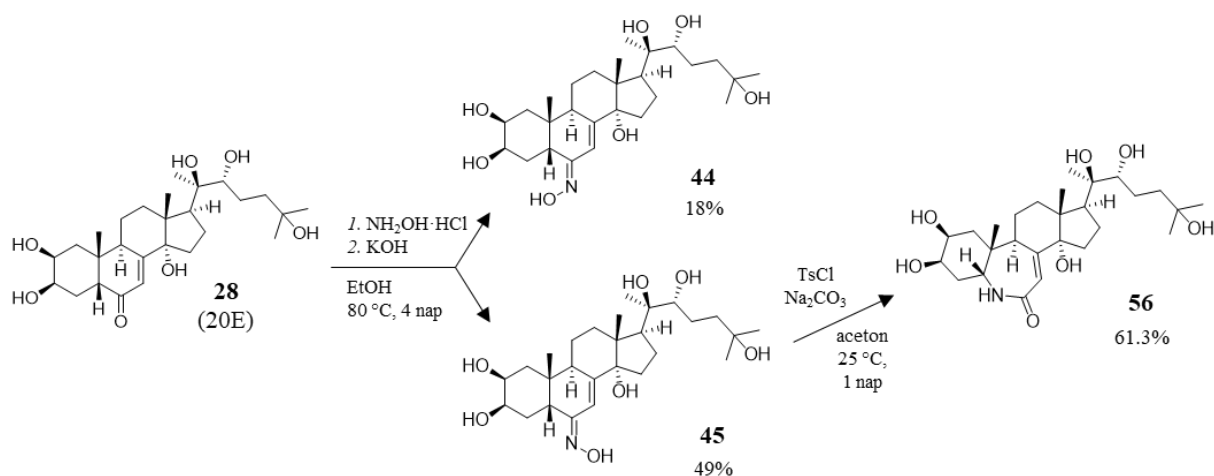
Jelen munkában a **28** vegyületből kiindulva a **44**, **45**, **56** és **65–74** vegyületek szintézisét mutatjuk le. A C-6 oxim-származékokat (**44** és **45**) a 20-hidroxi ekdizon (**28**) és hidroxilamin-hidrokloridból felszabadított bázis reakciójával állítottuk elő, és a kapott *E* és *Z* izomereket

flash kromatográfiával, majd RP-HPLC-vel izoláltuk. Az **56** laktámot Beckmann-átrendeződéssel nyertük az *E* oxim-éter izomerből (lásd a **11. ábrát**), amely átalakulás kizárólag



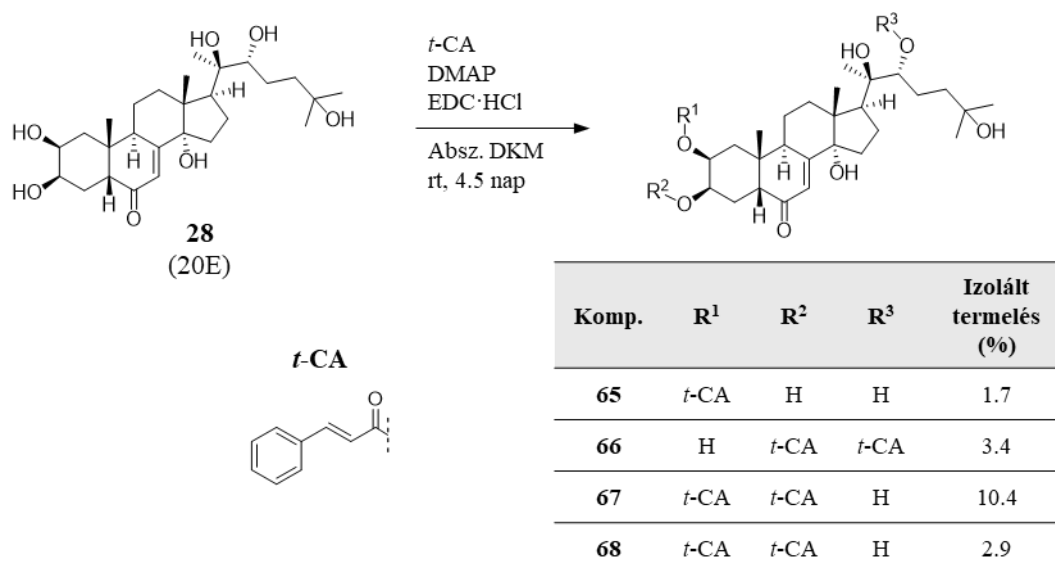
10. ábra: A tesztelt ekdiszteroidok szerkezeti változatossága

a *transz*-konfigurációjú oximból indul ki, mivel a reakcióhoz az *anti*-orientációra van szükség. A fahéjsav észtereket (**65–68**) a **28**-as vegyület *transz*-fahéjsavval való kapcsolásával nyertük EDC·HCl és DMAP felhasználásával (lásd a **12. ábrát**).



11. ábra: A **44**, **45**-s oxim és az **56**-s laktám félszintézise

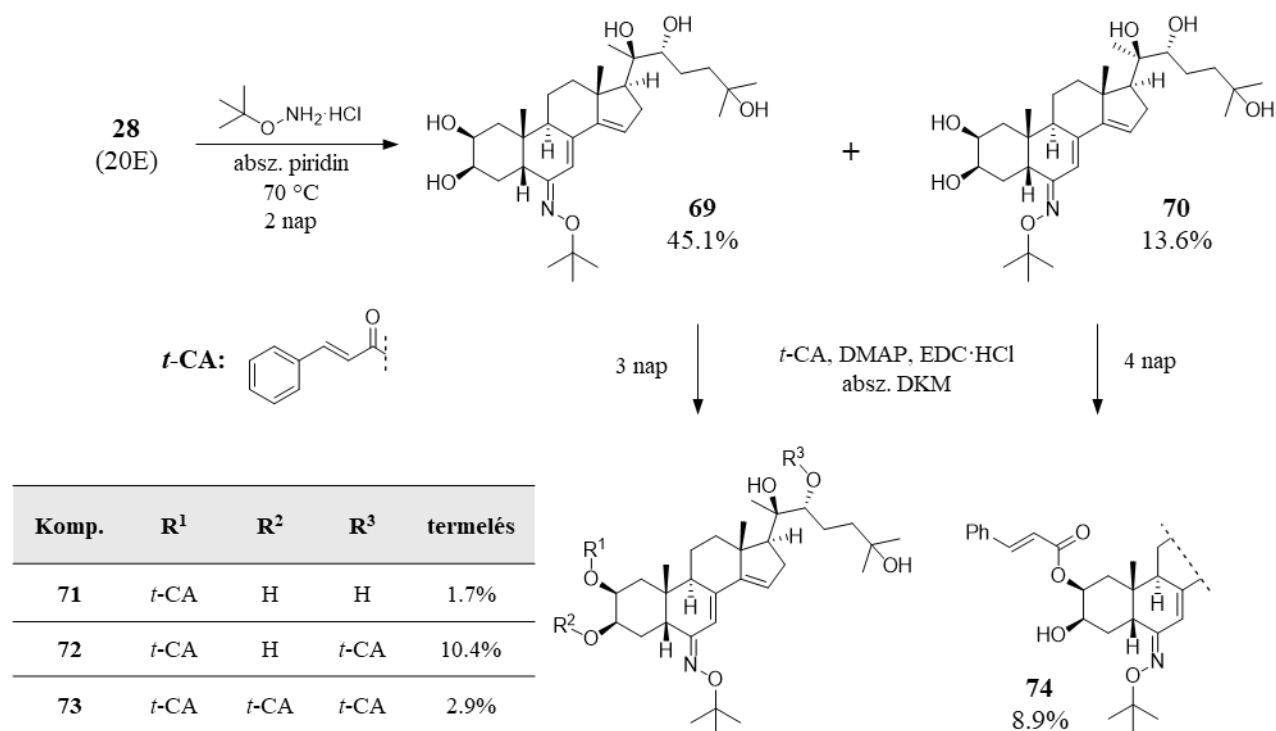
Az előzetes biológiai szűrés eredményei alapján a fahéjsav észter szubsztituens mellett *tert*-butil-oxim-éter funkciót is beépítettük: a **28**-ból C-6 *tert*-butil-oxim-éterek **69** (*E*) és **70** (*Z*) keletkeztek, melyeket ezután fahéjsavval észterezve, mono-(**71**, **72**), di- (**73**) és triészterek (**74**) keletkeztek (lásd a **13. ábrát**).



12. ábra: Fahéjsav észterek előállítása **28**-ból

Az oxim-éter képződése során, valószínűleg a feldolgozási eljárás közben, a C-14-es hidroxilcsoport eliminációja történt, ami sztachiszteron B származékokat eredményezett. Az észterezési reakciókban megfigyelt alacsony hozamok a számos hidroxilcsoport jelenlétének tulajdoníthatók. Az észterezés minden származék esetén elsőként a C-2-nél történt, ami azt

jelzi, hogy ez a pozíció a legreaktívabb és sztérikusan legkönnyebben hozzáférhető. A kapott mono-, di- és triészterek sorozata értékes alapot nyújt a szerkezet-aktivitás összefüggések elemzéséhez.



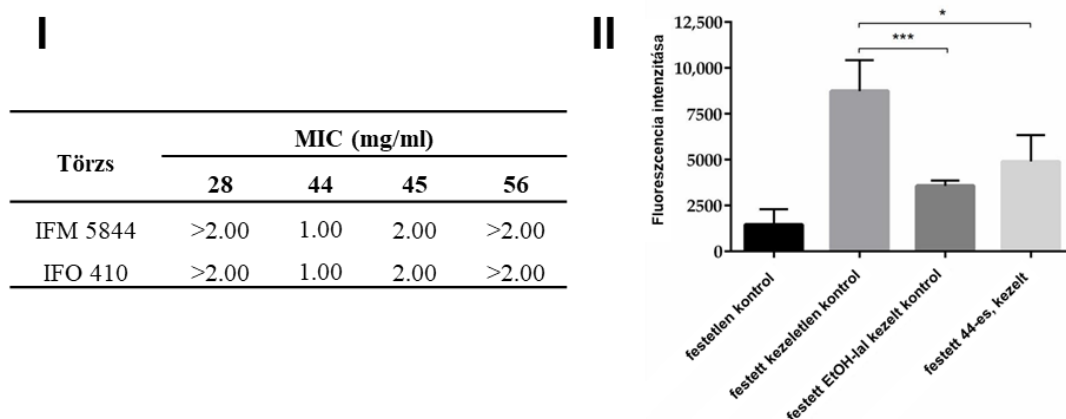
13. ábra: Sztachiszteron B 6 *terc*-butil-oxim-étereinek és fahéjsav észtereinek szintézise

Ekdiszteroidok biológiai aktivitásának vizsgálata

Ekdiszteroidok *Cryptococcus* ellenes aktivitása

A terápiában alkalmazott antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztencia kialakulása egyre sürgetőbb kihívássá válik. Az ekdiszteroidok antimikrobiális tulajdonságait eddig alig vizsgálták, és a rendelkezésre álló publikációk csak gyenge vagy közepes aktivitást írnak le patogén gombák és baktériumok ellen. A Szegedi Tudományegyetem Biológiai Intézetében Vágvolgyi Csaba professzor kutatócsoportjával együttműködve értékeltük a természetes ekdiszteroid **28** és annak félszintetikus származékainak (**44**, **45** és **56**) gombaellenes hatását *Cryptococcus neoformans* ellen, mikrotitrálási módszerrel. A **28** vegyület a tesztelt koncentrációkban nem mutatott gátló hatást. A C-6-os ketocsoport oximmá történő alakítása (**44** és **45** vegyületek) kissé potensebb származékokat eredményezett, amelyek közül a *Z* oxim, a **44** vegyület bizonyult a legaktívabbnak; az **56** laktám, azonban nem mutatott jelentős aktivitást, ami arra utal, hogy a B-gyűrű kibővítése nem növeli a gombaellenes hatást. A **44** és **45** vegyületek minimális gátló koncentrációját (MIC) a 14. ábrán ábrázoltuk. Mindkét oxim-származék fungicid hatással bír, nem pedig pusztán fungisztatikus aktivitású. Az efflux pumpa

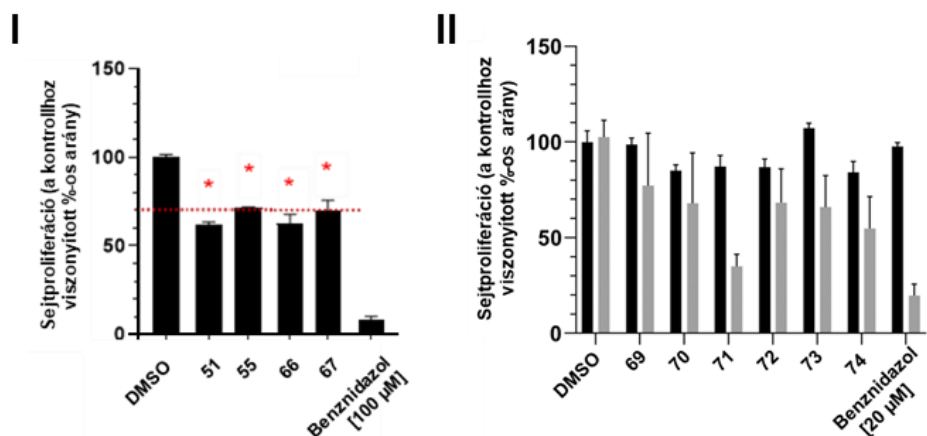
gátlókkal történő együttes kezelés csak additív hatást eredményezett. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szerkezeti módosítás ellenére az ekdiszteroidok valószínűleg nem alkalmasak hatékony antimikrobiális szerként alkalmazásra. A kalcein-AM áramlási citometriás vizsgálat kimutatta, hogy a *C. neoformans* IFM 5844 sejtek, amelyeket három órán át a MIC-értékkel kezeltünk, alacsonyabb fluoreszcenciát mutattak, mint a kezeletlen kontroll (14. ábra), ami rövid expozíció után csökkent életképességet jelez.



14. ábra: A: A vizsgált ekdiszteroidok MIC-értéke. B: A 44 hatása a *C. neoformans* IFM 5844 sejtek életképességére. Az értékek négy független kísérletből számított átlagot $\pm$ szórásként jelennek meg (*, $p \leq 0,05$, ***, $p \leq 0,001$, párosítatlan *t*-próba).

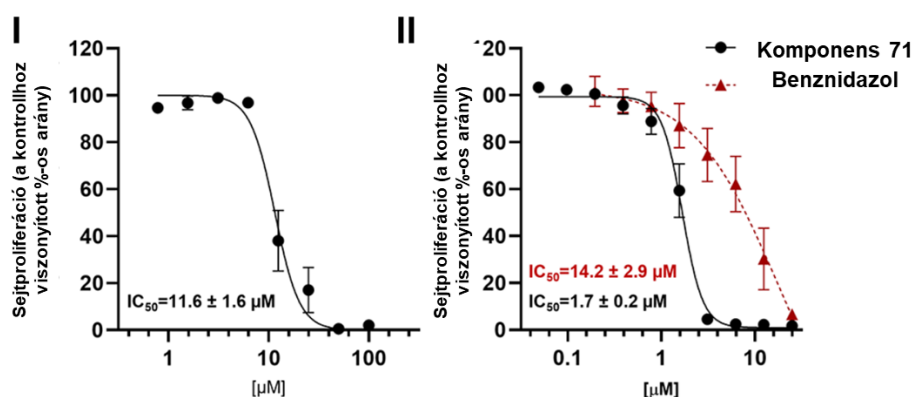
Ekdiszteroidok *trypanosoma* ellenes aktivitása

A Berni Egyetemen Prof. Dr. Jürg Gertsch kutatócsoportjával együttműködve a 28–74 ekdiszteroidok 5 μ M koncentrációban vizsgálták *Trypanosoma cruzi* epimastigoták ellen benznidazolt alkalmazva pozitív kontrollként.



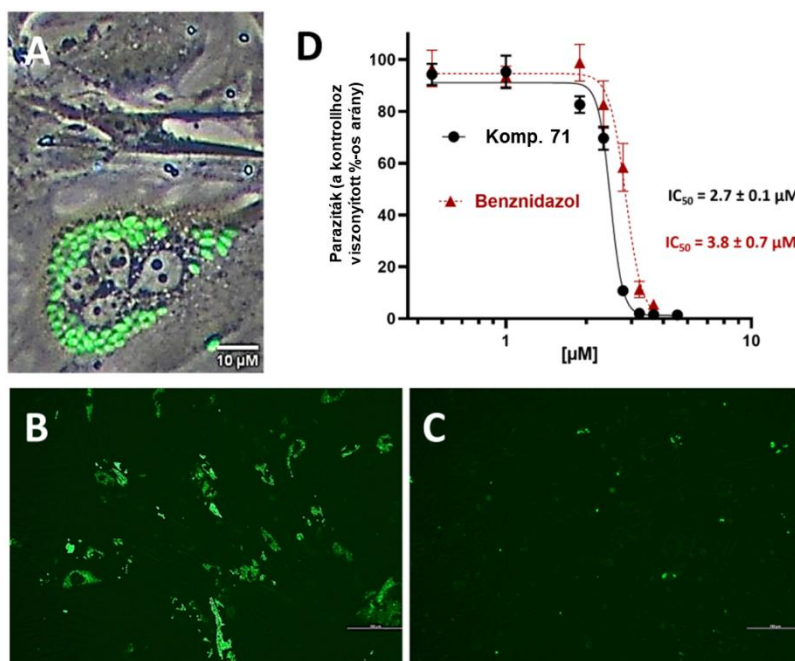
15. ábra: I: Ekdiszteroidok szűrése *T. cruzi* epimastigoták ellen 5 μ M koncentrációban. A benznidazol (100 μ M) maximális *T. cruzi* epimastigota proliferációt gátló hatása pozitív kontrollként szerepel. A DMSO volt a hordozó kontroll. * Az epimastigota proliferáció $\geq 30\%$ -os gátlását pozitív trypanocid hatású volt. II: A 69–74 vegyületek (5 μ M) antitypanosomális és citotoxikus hatása *T. cruzi* epimastigoták és kínai hörcsög petefészek (CHO) sejtek ellen, amelyet XTT-vel, illetve MTT-vel mértek, miután a vegyületeket 72 órán át inkubálták a logaritmusos proliferációs fázisban. Pozitív kontrollként benznidazol (20 μ M) használtak

Két *terc*-butil-oxim-éter (**51**, **55**) és két 20E fahéjsav észter (**66**, **67**) több mint 30%-kal gátolta a parazita szaporodását, miközben a CHO-sejtekre gyakorolt citotoxicitásuk minimális vagy egyáltalán nem volt kimutatható (**15. ábra**). A fahéjsav észter és oxim-éter potenciális farmakofórok és a fahéjsav észterek irodalmi előzményeire támaszkodva mindkettőt beépítettük a 20E-be. Így kaptuk meg az oxim-éter **69** és **70**-et, valamint ezek fahéjsav észtereit (**71–74**).



16. ábra: A **71** szelektív trypanocidális hatása. **I:** A sejtek proliferációjára gyakorolt hatást (MTT-teszt) 72 órás inkubáció után RAW264.7 sejtekben értékelték, **II:** XTT-teszt az epimastigota proliferációra benznidazzal pozitív kontrollként. Az adatok legalább 3 független kísérlet átlagértékeit ± SD-t mutatják, amelyek mindegyikét háromszor megismételték.

Mindkét szubsztituenst hordozó hibrid vegyületek szelektív antitrypanosomális aktivitást mutattak, a **71** vegyület volt a leghatásosabb: Az MTT és XTT esszé vizsgálatok IC₅₀ értéke 1,7 ± 0,2 µM volt, és a **71** 95%-kal gátolta a trypomastigota felszabadulását (IC₅₀ 2,7 ± 0,1 µM), ami közel megegyezik a benznidazol (IC₅₀ 3,8 ± 0,7 µM) mért értékével.



17. ábra: **A:** A *T. cruzi*-val fertőzött CCL39 fibroblasztok reprezentatív fénymikroszkópos/fluoreszcens mikroszkópos képe, amelyen az amastigoták (zöld) láthatók. **B:** A fertőzött sejtek reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képei, amelyek a *T. cruzi* amastigoták GFPY fluoreszcens jelét mutatják (hordozó kontroll). **C:** Az amastigoták replikációjának (zöld) gátlása **71**-el (5 µM) 6 napos fertőzés után. **D:** A **71** és a pozitív kontroll benznidazol gátlási görbéi a GFPY paraziták felszabadulásánál trypomastigotával fertőzött RAW264.7 sejtekben, FACS-szel mérve 6 nap után. Az adatok három független kísérlet átlagértékeit ± SD-t mutatják, mindegyik háromszoros ismétléssel.

A következő szerkezet-aktivitás összefüggések állapíthatók meg:

- **A- és B-gyűrűk szubsztituensei**
 - Az A-gyűrűn lévő apoláris csoport (pl. C-2 fahéjsav észter) és a terjedelmes nitrogéntartalmú csoport a B-gyűrűn (pl. 6-*terc*-butil-oxim-éter) elengedhetetlen. Az *E* oxim (**71**) aktívabb, mint a *Z* izomer (**74**), ami hangsúlyozza a sztereokémia szerepét.
- **Az oldallánc érintetlensége**
 - A módosítatlan oldallánccal rendelkező vegyületek (**71**, **74**) hatékonyabbak, mint amelyek fahéjsav észtert tartalmaznak (C-22 fahéjsav észterek – **72**, **73**).
- **14 α -OH vs. $\Delta^{14,15}$**
 - A 14 α -OH $\Delta^{14,15}$ olefinné történő átalakulása (50 $\rightarrow$ 55) elhanyagolható hatással van a trypanocid aktivitásra, tehát ez a pozíció kevésbé kritikus.

Eredményeink jelentőségét hangsúlyozza, hogy elsőként írtuk le az ekdiszteroidok ígéretes *T. cruzi* ellenes hatását.

Összefoglalás

A doktori értekezés célja a monoterpenoid aminodiolok és az ekdiszteroidok kémiai sokféleségének bővítése volt. A monoterpenoidok esetében célunk volt, hogy megvizsgáljuk azok katalizátorkénti potenciálját a dietil-cink és aromás aldehidek enantioszelektív addíciós reakciójában. Az ekdiszteroidok tekintetében pedig az volt a célunk, hogy értékeljük azok antimikrobiális hatékonyságát. Kutatásaink főbb eredményei a következőképpen foglalhatók össze.

Monoterpenoidok

1. Aminodiol könyvtár szintézise perillaldehid redukzív alkilezésével

A perillaldehid *exo* helyzetű kettős kötésének redukcióját követően Boc-védett allil-amint állítottunk elő, amely dihidroxilezés után két diasztereomer 3-amino-1,2-diol sorozatot eredményezett. A védőcsoport eltávolítása után primer és különböző szekunder aminodiol származékokat képeztünk, és egyes esetekben a megfelelő gyűrűs származékokat is előállítottuk. Ennek eredményeként összesen huszonhat vegyületet kaptunk, amelyek közül huszonöt új.

2. A 10a és 14 vegyületeken végzett számítógépes elemzés

A DFT vizsgálatok kimutatták a **7a** és **11a** diasztereomerek közötti szerkezeti különbségeket, amelyek jelentősen befolyásolják gyűrűzárási reakcióikat. A **11a** vegyületben a ciklohexán gyűrű inverziója és az izopropil csoport ezt követő reorientációja inkább a hidrolízist, mint a recirkulációt segíti elő. Ezzel szemben a **7a** vegyület esetén a recirkuláció előnyösebb, amelyet *O*-deprotonálás kísér, és végső soron elősegíti a kondenzált oxazin képződését. A folyamat megkerüli az iminium köztitermékeket, és helyette egy *N*-hidroximetilált köztiterméken keresztül zajlik, amelyet négy hidrogén híd kötással egy vízmolekulával képzett hálózat stabilizál. Ez a javasolt mechanizmus, amelyet elméleti modellezés is alátámaszt, magyarázatot ad a megfigyelt kondenzált oxazin képződésre.

3. Regioizomer aminodiol könyvtár előállítás Overman-átrendeződés segítségével

Az aminodiolok előállítására korábban leírt szintetikus módszer szerint három regioizomer aminodiol sorozatot állítottunk elő perillaldehiddől kiindulva. A perillaldehid *exo* kettős kötésének redukciója után egy alkohol köztiterméket állítottak elő, amelyet az Overman-átrendeződés révén allil-aminná alakítottunk. A kapott amin védelme után különböző kromatográfiás eluens rendszerek alkalmazásával megkíséreltük a diasztereomerek elválasztását, de ez nem járt sikerrel. Ezért a diasztereomer keveréken dihidroxilezést hajtottunk végre, ami a megfelelő védett aminodiolokhoz vezetett. Bizonyos esetekben acetálokat állítottunk elő az aminodiolok elválasztásának megkönnyítése érdekében. A védőcsoportok eltávolítása után primer és szekunder aminodiolokat, *N*-metil-*N*-benzil-származékokat és azok megfelelő ciklikus analógjait képeztük.

4. Monoterpén alapú aminodiol-származékok használata katalizátorként a dietil-cink aromás aldehidekre történő addíciós reakciójában

Az előállított aminodiolokat királis katalizátorokként vizsgáltuk a dietil-cink és a benzaldehid reakciójában; a **7a** és **10a** katalizátorokat 4-metil-, 3-metoxi- és 4-metoxibenzaldehiddel is teszteltük. A kizárólag *S*-konfigurációjú sztereocentrumokkal rendelkező aminodiolok *S*-szelektivitást mutattak. Ezzel szemben a biciklusos 1,3-oxazin-származékok (**10a–c**) *R*-szelektivitást mutattak. Az 1,3-oxazinok kiváló katalitikus aktivitása merev molekulaszervezetüknek tulajdonítható. Az Overman-átrendeződés útján kapott aminodiol-regioizomerek alacsonyabb katalitikus hatékonysággal rendelkeznek.

1. Ecdiszteroidok kiválasztása bioaktivitás szűréshez és új félszintetikus származékok képzése

Összesen negyvenhét ecdiszteroidot vizsgáltunk ebben a disszertációban. Ezen vegyületek közül öt természetes, míg a többi félszintetikusan módosított származék. Az első szűrővizsgálatok eredménye alapján új vegyületeket terveztünk és állítottunk elő; jelen PhD munka során félszintetikus ecdiszteroidokat képeztünk. Ezek két oxim-származék (**44**, **45**), egy laktám származék (**56**), négy fahéjsav-észter (**65–68**), két *terc*-butil-oxim-éter (**69**, **70**) és négy ecdiszteroid *terc*-butil-oxim-éter fahéjsavval képzett észterei (**71–74**). Ezen ecdiszteroidok közül kilenc új vegyület.

2. Ecdiszteroidok gombaellenes hatása

Ebben a tanulmányban a 20E (**28**), két oxim-származékának (**44**, **45**) és egy laktám származékának (**56**) gombaellenes aktivitását vizsgáltuk. A **44** és **45** vegyületek fungicid hatást mutattak *C. neoformans* ellen, a **44** vegyület szignifikánsan erősebb aktivitással bírt. A **44** és **45** vegyületek efflux pumpa gátlókkal való kölcsönhatásának vizsgálata során additív hatás volt megfigyelhető a verapamil esetében, míg az indometacin vagy a kinidin esetében nem volt kimutatható kölcsönhatás.

3. Ecdiszteroidok antitrypanosomális vizsgálata

A disszertációban vizsgált negyvenhét ecdiszteroid protozoon ellenes aktivitását *Trypanosoma cruzi* ellen vizsgáltuk külföldi együttműködés keretében. Az előzetes szűrés alapján két ígéretes farmakofórt azonosítottunk: a *terc*-butil-oxim-étert és a fahéjsav észter csoportokat. Ezen szubsztituensek beépítésével hat új származékot állítottunk elő, melyek közül három jelentős parazitaellenes hatást mutatott. A legjobb eredményt a **71**-es számú vegyület érte el, amelynek meghatározott IC₅₀ értéke a vizsgálatban használt pozitív kontrollként alkalmazott benznidazol hatékonyságával összehasonlítható értéket mutatott.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném kifejezni legmélyebb hálámat témavezetőimnek, *Prof. Dr. Hunyadi Attilának* és *Prof. Dr. Szakonyi Zsoltnak* a doktori tanulmányaim során nyújtott kitartó támogatásukért, motiválásukért és útmutatásukért.

Hálás vagyok *Prof. Dr. Hohmann Juditnak*, a Farmakognóziai Intézet korábbi intézetvezetőjének, hogy lehetőséget biztosított kutatásom elvégzésére az intézetében.

Köszönöm minden társszerző munkáját, akik hozzájárultak közös publikációinkhoz, amelyek a disszertáció alapját képezik. Hálás vagyok *Dr. Girst Gábornak* és *Dr. Kúsz Norbertnek* az NMR-mérésekért, *Dr. Berkecz Róbertnek* a HRMS-mérésekért. Köszönöm *Prof. Dr. Csámpai Antalnak* a DFT számítások elvégzését és *Prof. Dr. Matti Haukkának* a röntgendiffrakciós mérést.

Szeretném megköszönni *Prof. Dr. Jürg Gertschnek* és kutatócsoportjának az antitrypanosomális méréseket, különösen *Kaushavi Cholke-nak* és *Dr. Sandhya R. Krishnamnak*.

Hálás vagyok *Prof. Dr. Csaba Vágvölgyi* professzornak és kutatócsoportjának az anticryptococcus mérések elvégzéséért, beleértve *Dr. Bettina Szerencsés*, *Mónika Vörös*, *Dr. Kristóf Bagi* és *Dr. Ilona Pfeiffer* munkatársakat.

Köszönetet mondok laboratóriumunk munkatársainak, technikusainknak, *Heverné Herke Ibolyának*, *Kurunczi-Papp Konrádnak* és *Ugrai Imrének* a mindennapi segítségüket.

Hálás vagyok családomnak, különösen édesanyámnak és barátaimnak a folyamatos bátorításukért és támogatásukért.

Ezt a munkát a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal támogatta NKFIH; K134704, valamint a Magyar Innovációs és Technológiai Minisztérium (TKP2021-EGA-32) és a Kulturális és Innovációs Minisztérium Új Nemzeti Kiválósági Programja ÚNKP-22-3-SZTE-151.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

- I. Szerencsés, B.; Vörös, M.; Bagi, K.; **Háznagy, M. B.**; Hunyadi, A.; Vágvolgyi, Cs.; Pfeiffer, I.; Vágvolgyi, M. Semi-Synthetic Ecdysteroid 6-Oxime Derivatives of 20-Hydroxyecdysone Possess Anti-Cryptococcal Activity. *Microbiology Research* **2022**, 13 (4), 985–994.

IF: 1.5 (2022); Q3

- II. **Háznagy, M. B.**; Csámpai, A.; Ugrai, I.; Molnár, B.; Haukka, M.; Szakonyi, Zs. Stereoselective Synthesis and Catalytical Application of Perillaldehyde-based 3-Amino-1,2-diol Regioisomers. *International Journal of Molecular Sciences* **2024**, 25 (8), 4345.

IF: 4.9 (2024); D1

- III. **Háznagy, M. B.**; Girst, G.; Vágvolgyi, M.; Cholke, K.; Krishnan, S. R.; Gertsch, J.; Hunyadi, A. Semi-synthetic Ecdysteroid Cinnamate Esters and *tert*-Butyl Oxime Ether Derivatives with Trypanocidal Activity. *Journal of Natural Products* **2024**, 87 (10), 2478–2486.

IF: 3.6 (2024); Q1

Előadások az értekezés témájában:

- I. **Háznagy, M. B.**; Vágvolgyi, M.; Girst, G.; Krishnan, S. R.; Cholke, K; Gertsch, J.; Hunyadi, A.

Design and optimisation of ecdysteroid ester and oxime ether derivatives as potential trypanocidal agents

Nordic Natural Products Conference 2025, Tjärnö Marine Laboratory, Svédország, (2025) (Szóbeli előadás)

- II. **Háznagy, M. B.**; Vágvolgyi, M.; Girst, G.; Krishnan, S. R.; Cholke, K; Gertsch, J.; Hunyadi, A.

Bioactive ecdysteroid analogues: cinnamate esters and *tert*-butyl oxime ethers with antitrypanosomal properties

TwiNSol-CECs International Conference on Environmental and Sustainable Research Solutions, Újvidék, Szerbia, (2025) (Szóbeli előadás)

- III. Háznagy, M. B.;** Vágvölgyi, M.; Krishnan, S. R.; Cholke, K; Gertsch, J.; Hunyadi, A.
Semi-synthetic ecdysteroids as promising new antichagasic agents
International Congress on Natural Products Research, Kraków, Poland, (2024) (Poszter előadás)
- IV. Háznagy, M. B.;** Vágvölgyi, M.; Krishnan, S. R.; Cholke, K; Gertsch, J.; Hunyadi, A.
Application of high-performance separation techniques to the isolation of natural and semisynthetic antitrypanosomal ecdysteroids
METT 13th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, Magyarország (2023) (Szóbeli előadás)
- V. Háznagy, M. B.;** Vágvölgyi, M.; Krishnan, S. R, Gertsch, J.; Hunyadi, A.
Antitrypanosomal activity of natural and semi-synthetic ecdysteroids
EUGLOH 4th International Symposium of Young Researchers on Medicinal Plants and Natural Product Research, Szeged, Magyarország (2023) (Szóbeli előadás)
- VI. Háznagy, M. B.;** Vágvölgyi, M.; Krishnan, S. R.; Gertsch, J.; Graikioti, D.; Athanassopoulos, C. M.; Hunyadi, A.
Természetes és félszintetikus ecdiszteroid származékok antitripanoszóma aktivitása
MTA Committee on Chemical Biology László Zechmeister Presenter's Competition, Budapest, Magyarország (2022) (Szóbeli előadás)
- VII. Háznagy, M. B.;** Vágvölgyi, M.; Krishnan, S. R, Gertsch, J.; Hunyadi, A.
Antitrypanosomal activity of semisynthetic enone-type derivatives
70th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Thessaloniki, Görögország, (2022) (Poszter előadás)
- VIII. Háznagy, M. B.**
Ecdysteroid ester derivatives
3rd Symposium of Young Researchers on Pharmacognosy, Szeged, Magyarország (2022) (Szóbeli előadás)
- IX. Háznagy, M. B.;** Vágvölgyi, M.; Krishnan, S. R, Gertsch, J.; Hunyadi, A.
Semisynthetic ecdysteroid-cinnamic derivatives against *Trypanosoma cruzi*
69th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), online, (2021) (Poszter előadás)
- X. Háznagy, M. B.**
Preparation and investigation of ecdysteroid–cinnamic acid hybrid compounds
2nd Symposium of Young Researchers on Pharmacognosy, online, (2021) (Szóbeli előadás)
- XI. Háznagy, M. B.**
Preparation of nitrogen-containing ecdysteroids
1st Symposium of Young Researchers on Pharmacognosy, Szeged, Magyarország (2019) (Szóbeli előadás)