

Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszerésztudományi Kar

Farmakognóziai Intézet



**Enon-típusú természetes vegyületek kémiai terének kiterjesztése:
ekdiszteroid és protoflavonoid oxim származékok előállítása és vizsgálata**

Ph.D. tézis összefoglaló

Vágvölgyi Máté

Szeged

2020

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Ph.D. program: Farmakognózia
Programvezető: Prof. Dr. Hohmann Judit

Intézet: Farmakognóziai Intézet
Témavezető: Dr. Hunyadi Attila Ph.D.

Vágvölgyi Máté

**Enon-típusú természetes vegyületek kémiai terének kiterjesztése:
ekdiszteroid és protoflavonoid oxim származékok előállítása és vizsgálata**

Szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Máthé Imre D.Sc.

Tagok: Prof. Dr. Péter Antal D.Sc.

Dr. Könczöl Árpád Ph.D.

Bíráló bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Dombi György D.Sc.

Opponensek:

Dr. Mernyák Erzsébet Ph.D.

Dr. London Gábor Ph.D.

Tag:

Dr. Balázs Árpád Ph.D.

Titkár:

Dr. Ambrus Rita Ph.D.

Bevezetés

Az oximok és származékaik mind a kémia, mind a biológia területén komoly jelentőséggel bírnak. Szerves szintézisek során értékes kiindulási anyagok más nitrogéntartalmú vegyületek előállításában, mely alapján ígéretes kutatási alanyok lehetnek új gyógyszerjelölt molekulák kifejlesztéséhez. Figyelembe véve mindezt, tudományos érdeklődésünk a közelmúltban az ilyen típusú vegyületek félszintetikus előállítása és vizsgálata felé fordult két különböző, természetben is előforduló, bioaktív vegyületcsoportból, az ekdiszteroidokból és a protoflavonoidokból.

Az ekdiszteroidok mind a növény-, mind az állatvilágban igen elterjedtek. Ezek az anyagok emlősökben számos előnyös, nem hormonális hatással rendelkeznek. Kutatócsoportunk fedezte fel a viszonylag kevésbé poláris ekdiszteroid származékok azon tulajdonságát, hogy többféle kemoterápiás szerrel kombinálva képesek mind multidrog-rezisztens (MDR), mind szenzitív rákos sejtvonalak gyógyszerrezisztenciáját csökkenteni (ún. „kemoszenzitizáló” hatást kiváltani). Úgy találtuk, hogy az ekdiszteroid alapvázon végzett félszintetikus módosítások (pl: a hidroxilcsoportok fluorral történő szubsztitúciója) jelentősen befolyásolhatják ezt a hatást, és tudomásunk szerint, ekdiszteroid oxim származékokat farmakológiai szempontból korábban még nem vizsgáltak. Általánosságban úgy tűnik azonban, hogy az ekdiszteroidok adjuváns tumorellenes hatásához szükséges a 2,3-hidroxilcsoportokon egy dioxolán gyűrű (pl. acetonid csoport) kialakítása, ezen funkció savérzékenysége ugyanakkor korlátozza az ilyen típusú anyagok lehetséges terápiás alkalmazhatóságát.

Egy egyszerű, de hatékony megoldásnak mutatkozik ezen akadály leküzdésére a tumorellenes hatású ekdiszteroidok nanoszerkezetekben való alkalmazása, önrendeződsre képes hatóanyag konjugátumaik előállításán keresztül. Ennek a módszernek az egyik különösen érdekes változata a szkvalént használja fel az önrendeződs konjugátumok előállítására. A szkvalén az önrendeződsi folyamatot indukáló molekula szerepét tölti be, melyet szintetikusán kapcsolnak hozzá a választott hatóanyaghoz biológiailag lebontható kovalens kötések létesítésén (pl: észterek) keresztül. Az ilyen konjugátumokból nyert nanorészecskék (NPk) jellemzően prodrug-ként viselkednek. Az élő szervezetbe való bejuttatásukat követően feloldódnak a lipoproteinekben (embereknél elsősorban az LDL-ben), melyek tovább szállítják őket a véráramban, mindez pedig lehetővé teszi a magas LDL-receptor expressziójú rákos sejtek közvetett targetálását.

A protoflavonoidok a flavonoidok egy bioaktív csoportját képviselik, amelyek nem-aromás B-gyűrűvel és egy hidroxilcsoporttal rendelkeznek a C-1'-helyzetben. Számos

protoflavonoid ismert ígéretes, tumorellenes bioaktivitásáról, és egyes származékok, mint például a protoapigenon, specifikus DNS sérülés válaszmechanizmusok gátlásával képesek fokozni pl. a ciszplatin hatását. Ezen kívül, többféle bizonyíték is utal arra, hogy a protoflavonoidok lehetséges hasznosíthatósága túlmutathat tumorellenes potenciáljukon; ilyen irányú, mélyreható farmakológiai vizsgálatainknak azonban jelentősen gátat szab a vegyületek citotoxicitása. Mivel ez utóbbiért a B-gyűrű szimmetrikus dienon funkciója döntő részben felelős, protoflavonoid 4'-oxim származékok regioszelektív szintézise egy ígéretes stratégia lehet új, nem citotoxikus, de potenciálisan bioaktív vegyületek előállítására. Ezen PhD-munkát megelőzően, ilyen típusú vegyületeket nem írtak le.

Célkitűzések

Új, bioaktív ekdiszteroid és protoflavonoid származékok előállítása, és ezen vegyület csoportok kémiai és farmakológiai terében az oxim funkció lehetséges szerepének vizsgálata céljából a következő kutatási feladatokat fogalmaztuk meg:

1. Oxim származékok előállítása tumorellenes ekdiszteroidokból. A tervezett átalakítások között szerepelt ekdiszteroid oximok és oxim-éterek szintézise, majd ezt követően laktám származékok előállítása Beckmann-átrendeződés útján.

2. Önrendeződött nanorészecskék előállítása egy választott ekdiszteroid oximból. Terveink közt szerepelt egy előnyös kémiai és/vagy biológiai tulajdonságokkal rendelkező ekdiszteroid származék szkvalén-alapú önrendeződött nanorészecskéinek az előállítása.

3. Az előállított ekdiszteroid származékok biológiai vizsgálata. A termékek *in vitro* tumorellenes tulajdonságait kutatási együttműködések keretében terveztük vizsgálni.

4. B-gyűrűn módosított protoflavonoidok, köztük oxim-származékok előállítása. A protoflavonoidok kémiai-farmakológiai terét nem citotoxikus származékokkal terveztük bővíteni, a protoapigenon félszintetikus módosításain keresztül. Célunk volt a B-gyűrű áramlásos kémiai hidrogénezése vagy deuterálása és/vagy 4'-oxim-származékok előállítása.

5. Az előállított protoflavonoidok biológiai vizsgálata. Az anyagok citotoxicitását, ATR-gátló, és vírusellenes hatásait kutatási együttműködések keretében terveztük vizsgálni.

Anyagok és módszerek

Kiindulási vegyületek: A 20-hidroxicedizont (20E, **1**) a Shaanxi KingSci Biotechnology Co., Ltd.-től (Sanghaj, Kína) vásároltuk 90%-os tisztaságban, majd átkristályosítással tovább tisztítottuk. Az apigenint (**27**) a Changsa Inner Natural Inc.-től (Hunan, Kína) vásároltuk 98%-os tisztaságban, és a tervezett átalakításokhoz további tisztítások nélkül használtuk fel.

Kromatográfiai tisztítási eljárások: A felszintetikus úton előállított vegyületeket normál vagy fordított fázisú flash kromatográfiai, vagy fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai (RP-HPLC) módszerekkel tisztítottuk meg.

A szerkezet-meghatározás módszerei: A kapott vegyületek kémiai szerkezetét többféle spektroszkópiás módszerrel (MS, HR-MS, 1D és 2D-NMR) derítettük fel.

Az önrendeződött nanorészecskék kolloid kémiai jellemzése: Az ekdiszteroid nanorészecskéket (NPk) és hetero-nanorészecskéket (H-NPk) kutatási együttműködések keretében állítottuk elő, majd jellemeztük. A vizsgálatok során dinamikus fényszórásos (DLS) módszerrel határoztuk meg a nanorészecskék átmérőjét és a minták polidiszperzitási indexét (PdI). A részecskék morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkópiás (TEM) úton vizsgáltuk.

Az ekdiszteroid származékok biológiai hatásainak vizsgálatai: A tesztelésre kiválasztott ekdiszteroid származékok antiproliferatív aktivitását négy különböző humán rákos sejtvonalon vizsgáltuk: MDA-MB-231, MCF-7 (emlőkarcinóma sejtek), HeLa és SiHa (méhnyakrák eredetű epiteliális sejtek). A méréseket a sorozatos hígítási módszerrel 96-lyukú sejttenyésztő mikrolemezekon végeztük, az MTT-eljárás alkalmazásával.

Valamennyi előállított ekdiszteroid származéknak megvizsgáltuk az ABCB1-efflux transzporter gátló hatását (L5178_{MDR} sejteken) a rodamin 123 – egy ABCB1 szubsztrát fluoreszcens festék – sejten belüli felhalmozódását flow citometria segítségével mérve.

Az ekdiszteroid analógok *in vitro* citotoxikus aktivitását önmagukban vagy doxorubicinnel kombinálva vizsgáltuk két különböző egér limfóma sejtvonalon; egy gyógyszerre érzékeny egér T-sejt limfómán (L5178) és ennek multi-drog rezisztens párján (L5178_{MDR}). A kombinációs vizsgálatokat a checkerboard microplate módszerrel hajtottuk végre. Ahol lehetett, kombinációs index (CI) értékeket számítottunk Chou módszerét felhasználva, ahol a $CI < 1$, $CI = 1$ és $CI > 1$ rendre szinergizmust, additív hatást, illetve antagonista hatást jelöl.

Az NP-k és a doxorubicint tartalmazó H-NP-k *in vitro* antiproliferatív hatását A2780_{ADR} rákos sejteken (doxorubicin-rezisztens humán petefészekrák), trypan-kék festéses vizsgálattal teszteltük. Az eredményeket GI_{50} („growth inhibition”; növekedésgátlás) értékekben fejeztük ki, amely a tesztanyag azon koncentrációját jelöli, amelynél a sejtszám 50% -os csökkenését idézi elő a kontroll tenyészetekhez viszonyítva.

A protoflavonoid származékok biológiai hatásainak vizsgálatai: Egyes protoflavonoidok *in vitro* citotoxicitását MCF-7, HeLa és SiHa humán rákos sejtvonalakon teszteltük. A méréseket a sorozatos hígítási módszerrel 96-lyukú sejttenyésztő mikrolemezekon végeztük, az MTT-eljárás alkalmazásával. Megvizsgáltuk ugyanezen analógok ATR/ATM jelátviteli útvonalakra

gyakorolt zavaró hatását is. Az analízist úgy végeztük, hogy MCF-7 sejteket a tesztelt vegyületek 5, 10 vagy 20 μM -os részleteivel vagy anélkül előkezeltük 30 percen keresztül, majd DNS-károsodást indukáltunk úgy, hogy a sejteket 1 μm doxorubicines kezelésnek tettük ki 6 órán át. A DNS-sérülésre adott válasz gátlását Western blot módszerrel vizsgáltuk.

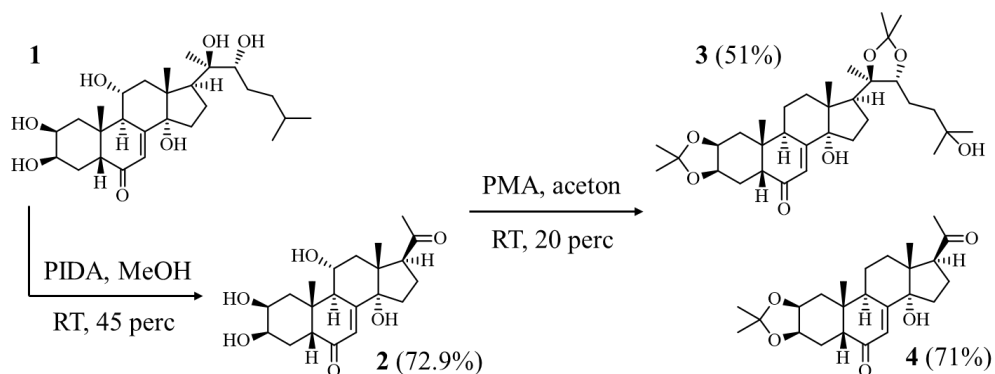
Egyes protoflavonoid származékok HIV-1 elleni hatását egy pseudotype vírus teszten vizsgáltuk meg, U373-CD4-CCR5 sejteken. Az anyagok citotoxicitását az MTT-eljárással állapítottuk meg. Továbbá, az előállított vegyületek egy részének a hatását megvizsgáltuk az Epstein-Barr Virus (EBV) Rta protein immunoblot-teszteken. Az itt aktívnak bizonyult anyagok citotoxicitását P3HR1 sejteken is megvizsgáltuk. A méréseket 96-lyukú sejttenyésztő mikrolemezeken végeztük, az MTT-próba alkalmazásával.

Eredmények és értékelésük

EKDISZTEROIDOK

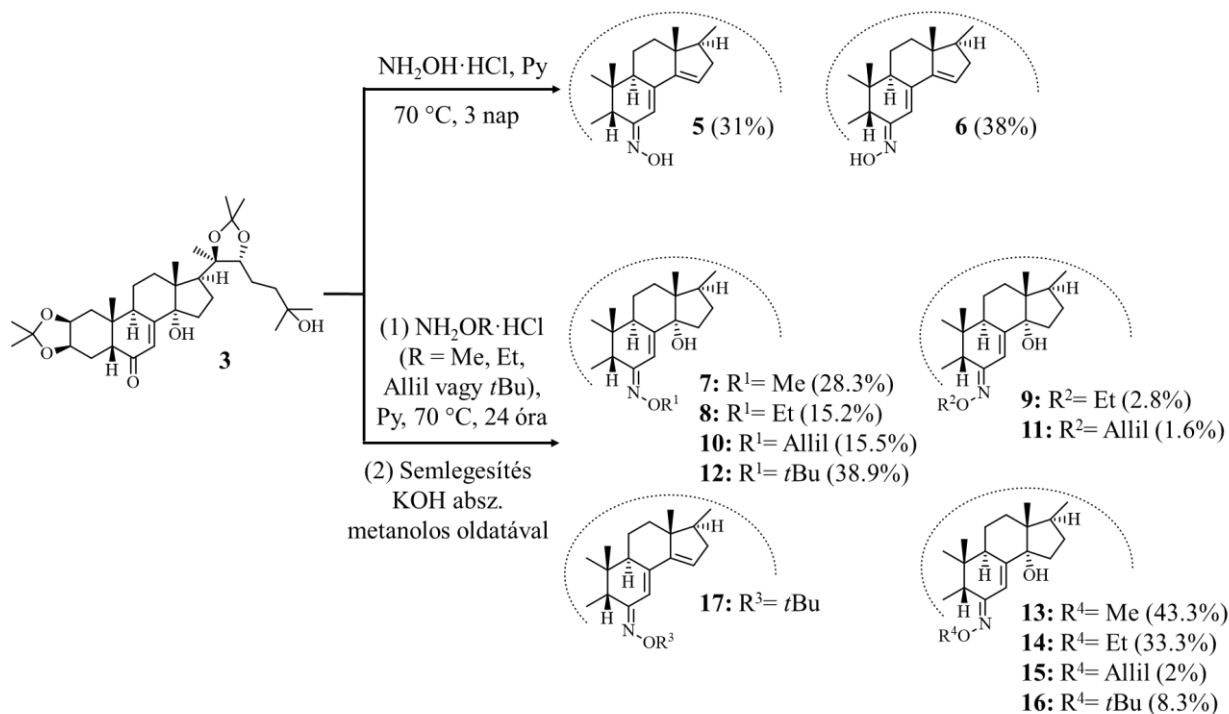
Az ekdiszteroid származékok félszintetikus előállítása

A 2,3-acetonid csoport jelenléte szükséges az ekdiszteroidok adjuváns daganatellenes aktivitásához, a szterol-oldallánc oxidatív hasításán keresztül pedig megszüntethetjük egy származék alap esetben enyhe, de adott esetben nemkívánt interakciókhoz vezető P-gp gátló aktivitását. Figyelembe véve mindezt, a célkitűzéseinknek megfelelő félszintetikus átalakításokat két különböző antitumor ekdiszteroidon terveztük végrehajtani: egy szterol-oldallánccal rendelkező ekdiszteroid diacetonidon, illetve e vegyület oldallánc-hasított analógján. A 20-hidroxi ekdizion (20E, **1**) szterol oldalláncának oxidatív hasítását a PIDA hipervalens jód reagenssel, metanolban végeztük el, amely így posztszteront (**2**) eredményezett. Az acetonid csoportok kialakítását az **1** és **2** jelzésű vegyületek vicinális dioljain foszformolibdén-sav katalizátor alkalmazásával végeztük acetoneban, amely a **3**-as és **4**-es vegyületeket eredményezte. Ezek kiindulási anyagokként szolgáltak a későbbi szintetikus átalakításokhoz. A reakciókat az **1. ábra** mutatja be.



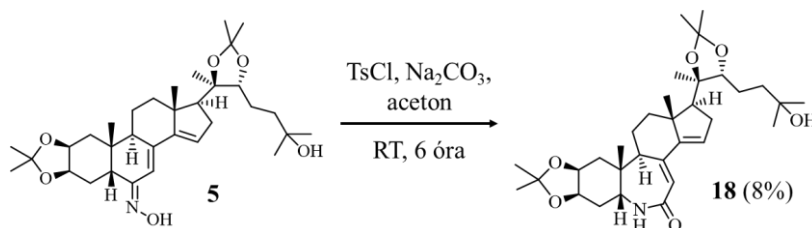
1. ábra: Ekdiszteroid acetonid analógok előállítása.

A 20E 2,3;20,22-diacetonid (**3**) 6-oxim- vagy oxim-éter-analógjait a kiindulási vegyület 6-karbonilcsoportjának hidroxil- vagy a megfelelő alkoxiamin-reagenssel való reakciójával kaptuk piridines közegben. Az ekdiszteroid 6-oxim-éterek előállítása során a reakcióelegyeket KOH metanolos oldatával semlegesítettük, amely több különböző, szerkezetében is változatos termék, köztük intakt és 14,15-anhidro-származékok felszintézését eredményezte (**2. ábra**).



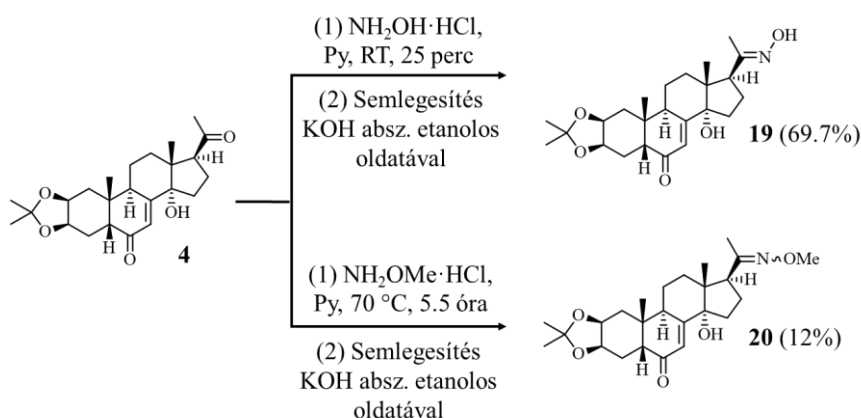
2. ábra: Az **5-17-es** termékek felszintézése a **3-as** vegyület átalakításával.

A Beckmann-átrendeződés egy sztereospecifikus reakció, amely magában foglalja egy oxim hidroxilcsoportjához képest anti-helyzetben lévő kémiai csoport vándorlását. Mivel az ekdiszteroid (6*Z*)-oxim **6** esetében ez a csoport az sp²-hibridizált szénatomot tartalmazó CH-7, ez az átrendeződés itt gátolt. Ennek megfelelően, a Beckmann-átrendeződést kizárólag a (6*E*)-oxim **5**-ből végeztük el. Úgy találtuk, hogy *p*-toluolszulfonil-klorid (TsCl) acetonos közegben való alkalmazása hat órán belül kialakítja az előállítani kívánt héttagú laktámgyűrűt. Mivel az alkalmazott kísérletes körülmények között az átalakulás során sósav szabadul fel, különösen fontos volt a Na₂CO₃ lúg használata, hogy megakadályozzuk az acetonid farmakofor savas közegben való lehasadását. Az átalakítást a **3. ábra** szemlélteti.



3. ábra: Az ekdiszteroid (6*E*)-oxim **5** Beckmann-átrendeződése.

A posztszteron 2,3-acetonid 20-oxim- és oxim-éter-analógjainak előállítását az ekdiszteroid 6-oxim származékok (**5-17**) szintézisekor alkalmazott kísérletes körülmények módosításával végeztük. Az előzetes teszt reakciók azt mutatták, hogy az alkalmazott szintetikus körülmények között az oxim képződés szignifikánsan gyorsabban megy végbe a 20-as karbonilcsoporton, mint a 6-ason, ami lehetővé tette a kívánt termékek regioszelektív előállítását a reakcióidő optimális megválasztásának függvényében. A **20**-as ekdiszteroid származékot két (*E/Z*)-izomer 20-*O*-metil-oxim-éter keverékének formájában izoláltuk, 95:5 (rendre *E/Z*) arányban. Az átalakításokat a **4. ábra** mutatja be.

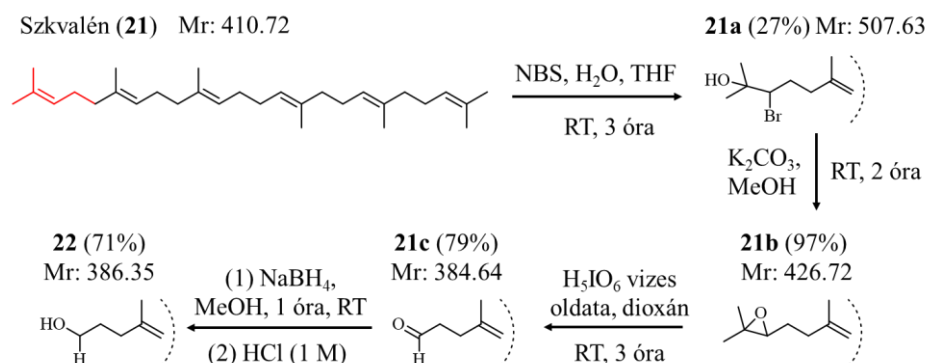


4. ábra: A **19-20**-as vegyületek előállítása posztszteron-2,3-acetonidból (**4**).

Tudomásunk szerint ekdiszteroidokból képzett önrendező hatóanyag konjugátumokat korábban még nem állítottak elő. Mivel az ekdiszteroidok többszörösen hidroxilált molekulák, logikusnak találtuk, hogy biokonjugátumaikat észterezéssel állítsuk elő. Ez az elgondolás a regioszelektivitás biztosítása érdekében szükségessé tette, hogy a tumorellenes ekdiszteroid lehetőleg egy, szterikusán elérhető, reaktív hidroxilcsoporttal rendelkezzen. Ezt figyelembe véve, a posztszteron-2,3-acetonid-20-oxim (**19**) több szempontból is vonzó szubsztrátnak mutatkozott a funkcionalizálásra: 1) adjuváns tumorellenes hatását nem kísérte efflux-pumpa gátló aktivitás (a későbbiekben bemutatva és tárgyalva); és 2) a 20-oxim-csoportján lévő hidroxil szabadnak és könnyen hozzáférhetőnek mutatkozott az átalakításra. A molekula nanoformulálását három főbb lépésben valósítottuk meg, az alábbiak szerint.

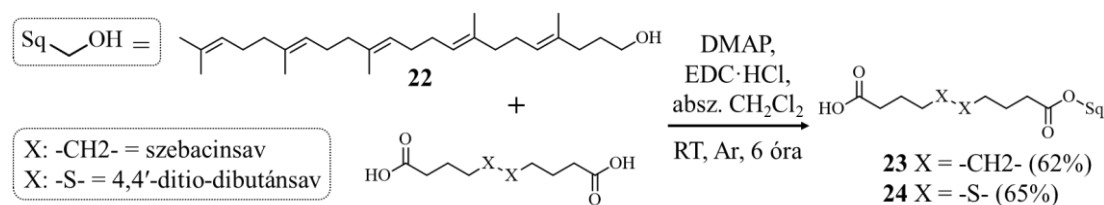
A kívánt konjugátumok előállításához szükséges volt, hogy a szkvalént (**21**) előzetesen módosítsuk a terminális kettős kötésénél. A tervezett kapcsolást figyelembe véve egy alkohol funkció kialakítása mellett döntöttünk. A szintetikus folyamat során első lépésben a szkvalént (**21**) 2-hidroxi-3-brom-szvalénné oxidáltuk (**21a**) NBS alkalmazásával, vizes-szerves közegben, majd a molekula terminális brómhidrin-részét epoxiddá alakítottuk K_2CO_3 bázist alkalmazva a szubsztrát metanolos oldatában, mely 2,3-oxidoszqualént (**21b**) eredményezett.

Ezután, a 2,3-epoxiszqualén epoxidgyűrűjének oxidatív felnyitását vizes perjódssavval végeztük dioxános közegben, mely egy aldehid származékot (**21c**) eredményezett. Végezetül, a **21c** származékot alkohollá redukáltuk NaBH₄ reagens felhasználásával, metanolos oldatban, mely a **22**-es vegyületet eredményezte. A reakciókat az **5. ábra** mutatja be.



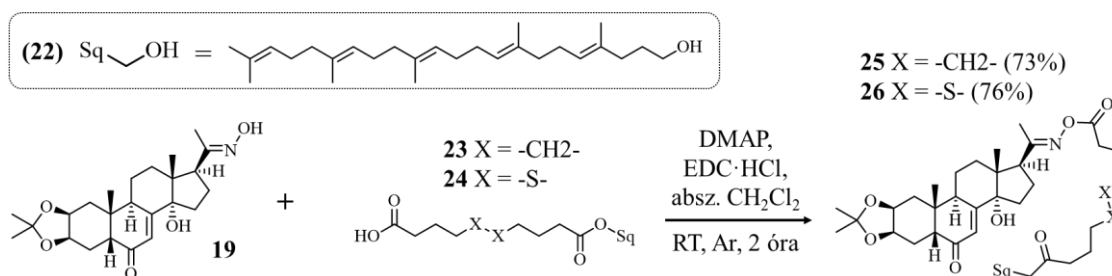
5. ábra: A szqualén (**21**) alkohol származékká való alakítása négy szintetikus lépésben.

Bizonyos esetekben, az összeépítendő molekulákat úgynevezett „linker” vegyületek segítségével is összekapcsolhatjuk, melyek jelenléte tovább javíthatja a hatóanyag aktív formájának *in vivo* felszabadulását. Ezt figyelembe véve, a korábban előállított alkohol származékot (**22**) két különböző linker egységgel kondenzáltuk: szebacinsavval vagy a diszulfid-hidat tartalmazó 4,4'-ditio-dibutánsavval. A reakciókat a **6. ábra** szemlélteti.



6. ábra: A **23**-as és **24**-es vegyületek előállítása.

Ezt követően, a fentiekhez hasonló reakciós körülmények között, a hatóanyag szerepére kiválasztott ekdiszteroidot (**19**) a kapott két oldallánc-egységgel (**23**-as és **24**-es vegyületek) kondenzáltuk, amely a **25**-ös, illetve **26**-os konjugátumokat eredményezte (**7. ábra**).



7. ábra: Az ekdiszteroid konjugátumok előállítása.

Az önrendeződött ekdiszteroid nanorészecskék előállítása és vizsgálata

Tudományos kutatási együttműködés keretén belül megvizsgáltuk a **25**-ös és **26**-os ekdiszteroid konjugátumok nanorészecskékké (NP) történő önrendeződésének a képességét és az NP-k tumorellenes hatásait. Az NP-eket nanoprecipitációval állítottuk elő. A művelet során a vonatkozó ekdiszteroid konjugátum (**25** vagy **26**) 250 µg-os részletét 125 µl THF-ben (2 mg / ml) oldottuk fel, és enyhe kevertetés közben (400 fordulat/perc) a kapott oldatot cseppenként adtuk hozzá kétszeres térfogatú ultratiszta vízhez. A konjugátumok önrendeződése spontán módon történt a hidrofób molekulák közötti másodlagos kölcsönhatások következményeként. Ezt követően a szerves oldószert elpároltuk, melynek végeztével a **25**_{NP} vagy **26**_{NP} jelű nanoszuszpenziót kaptuk meg.

Ezen kívül, a **25** és a **26** jelzésű vegyületek részleteit (250 µg anyag 125 µl THF-ben; 2 mg/ml) szkvalén-funkcionalizált doxorubicin THF-s oldatával (2 mg/ml) kevertük össze ekdiszteroid/doxorubicin 1:50 molarányban úgy, hogy végezetül egy 2 mg/ml koncentrációjú többkomponensű oldatot kaptunk. A minták önrendeződését a fentebb leírtakhoz hasonlóan hajtottuk végre. Az elvégzett műveletek **25**_{NP-DOX} vagy **26**_{NP-DOX} H-NPk vizes nanoszuszpenzióit eredményezték.

A négy különböző nanoszuszpenziót DLS és TEM technikákkal jellemeztük, amelyek igazolták a nanorészecskék előállítását a vizes közegben. A minták jellemzően monodiszperzek voltak (elméleti optimum: PDI <0,2) és elfogadható kolloid kémiai stabilitást mutattak. A hidrodinamikai átmérők a következők szerint alakultak: **25**_{NP} (366.3 ± 20.17 nm), **26**_{NP} (221.8 ± 4.879 nm), **25**_{NP-DOX} (187.7 ± 14.48 nm), **26**_{NP-DOX} (298.7 ± 11.43 nm).

Az előállított ekdiszteroid származékok hatástani vizsgálatai

Antiproliferatív hatások humán nőgyógyászati rákos sejtvonalakon

Az **5-18** jelzésű anyagok antiproliferatív hatását HeLa, SiHa, MDA-MB-231 és MCF7 humán rákos sejtvonalakon vizsgáltuk. Az anyagok gyenge vagy közepes hatásokat mutattak a vizsgált sejtvonalakon 8-30 µM, vagy esetenként ennél magasabb IC₅₀ értékekkel. A pozitív kontroll ciszplatin aktivitását csak egy vegyület (**12**) haladta meg a HeLa és MDA-MB-231 modelleken (rendre 8,4 és 12,4 µM-os IC₅₀ értékekkel).

Citotoxikus aktivitás, ABCB1-gátlás és kölcsönhatás a doxorubicinnel

Az **5-19** jelzésű vegyületeket citotoxikus aktivitásuk és az ABCB1 efflux-transzporter aktivitását gátló képességük szempontjából vizsgáltuk meg két egér T-sejt limfóma sejtvonalon: egy gyógyszer-szenzitív (L5178) és annak transzfektált, multi-drog rezisztens (L5178_{MDR}) párján. A vizsgálatok során kapott eredményeket az **1. táblázat** összegzi.

1. táblázat: A **3-19**-es vegyületek citotoxicitása L5178 és L5178_{MDR} sejteken, valamint a származékok ABCB1-transzportert gátló aktivitása. Dox = doxorubicin; az ABCB1-gátlás során: (+) kontroll: 100 nM tariquidar (112.4%-os gátlás), (-) kontroll: 2% DMSO (-0.07%-os gátlás).

Vegyület	Változtatás a 3 ^a B-gyűrűjén	14-OH vagy $\Delta^{14,15}$	IC ₅₀ (μ M) [95%-os konfidencia intervallum] ^b		ABCB1-gátlás (%)	
			L5178	L5178 _{MDR}	2 μ M	20 μ M
3	-	14-OH	110.3 [77.50-157.1]	97.69 [71.07-134.3]	2.54	20.91
4	-	14-OH	>75	>75	0.08	0.64
5	(E)-oxim	$\Delta^{14,15}$	20.91 [17.68-24.74]	24.63 [19.82-30.63]	10.57	82.95
6	(Z)-oxim	$\Delta^{14,15}$	34.22 [28.21-41.51]	28.35 [21.97-36.58]	7.15	81.09
7	(E); R=Me	14-OH	40.92 [35.66-46.97]	55.05 [41.53-72.98]	2.25	25.05
8	(E); R=Et	14-OH	35.02 [25.35-48.38]	47.00 [31.14-70.93]	17.54	78.79
9	(Z); R=Et	14-OH	37.26 [25.65-54.11]	42.16 [41.24-43.10]	18.96	75.03
10	(E); R=Allil	14-OH	31.48 [23.71-41.80]	51.91 [42.69-63.13]	20.98	89.39
11	(Z); R=Allil	14-OH	36.66 [28.32-47.44]	49.29 [43.07-56.40]	24.17	81.80
12	(E); R= <i>t</i> -But	14-OH	28.06 [21.30-36.98]	29.12 [25.12-33.76]	38.75	112.4
13	(Z); R=Me	$\Delta^{14,15}$	45.95 [36.97-57.11]	53.14 [43.54-64.86]	33.36	106.2
14	(Z); R=Et	$\Delta^{14,15}$	53.20 [38.64-73.26]	58.94 [45.86-75.74]	56.41	107.7
15	(Z); R=Allil	$\Delta^{14,15}$	55.28 [46.21-66.13]	52.72 [39.97-65.53]	61.13	102.7
16	(Z); R= <i>t</i> -But	$\Delta^{14,15}$	63.23 [58.57-68.26]	51.22 [39.13-67.04]	58.99	78.76
17	(E); R= <i>t</i> -But	$\Delta^{14,15}$	63.84 [45.70-89.19]	65.44 [55.66-76.94]	67.46	93.95
18	δ -laktám	$\Delta^{14,15}$	63.42 [47.51-84.65]	72.35 [64.39-81.29]	1.16	4.27
19	-	14-OH	162.3 [82.41-319.7]	142.1 [77.47-260.5]	0.68	1.53
Dox	-	-	0.080 [0.053-0.12]	4.49 [3.43-5.89]	-	-

^a Az R csoportok a **7-17**-es számú ekdiszteroid-6-oxim-éterek alkil szubsztituenseire vonatkoznak.

^b Az IC₅₀ értékeket a meditális citotoxikus aktivitásból (Dm) a CompuSyn szoftver segítségével számítottuk ki a kombinációs checkerboard plate-ek kontroll sávjai alapján.

Bár a vizsgált anyagok jellemzően gyenge vagy közepes citotoxikus hatást mutattak az egér limfómákon, valamennyi származék, melyet a 20E 2,3;20,22-diacetonid (**4**) átalakításával kaptunk (**5-18**-as anyagok), erősebbnek bizonyult, mint anyavegyületük. Ezzel szemben, elhanyagolható citotoxikus aktivitást figyeltünk meg a posztszteron-2,3-acetonid-20-oxim (**19**) esetében; ennél a vegyületnél a C-20 oxim funkció kialakítása csaknem a felére csökkentette a citotoxicitást a **4**-es vegyülethez képest.

A vegyületek citotoxikus tulajdonságait doxorubicinnel kombinálva is megvizsgáltuk, hogy így tanulmányozhassuk a hatóanyagok közötti lehetséges kölcsönhatásokat. A kombinációs vizsgálatok eredményeit a **2. táblázat** foglalja össze.

Amint az a táblázatban látható, az összes vizsgált vegyület szinergizmust mutatott a doxorubicinnel, azaz kemoszenzitizáló hatást fejtettek ki, csökkentették a sejtek doxorubicin rezisztenciáját. A legígéretesebb származékként az ekdiszteroid laktámot (**18**) azonosítottuk, amely valamelyest erősebb kemoszenzitizáló hatást mutatott, mint a korábbi ekdiszteroid lead (**3**-as vegyület) mind az MDR, mind a nem-MDR sejtvonalakon. További vizsgálatokat alapozhat meg az, hogy a **18**-as anyag a posztszteron-2,3-acetonid-20-oximmal (**19**) együtt lényegében inaktívnak bizonyult az ABCB1 efflux-transzporter funkcionális inhibitoraként, ellentétben a **3**-as vegyülettel, melyet korábban gyenge inhibitoraként azonosítottunk.

2 táblázat. A **3, 5-19** vegyületek doxorubicinnel való interakciója a leghatásosabb hatóanyag-arányok bemutatásával 50-, 75- és 90%-os növekedés gátlás (ED₅₀, ED₇₅ és ED₉₀) esetén az L5178_{MDR} sejtvonalon és annak szenzitív párján (L5178). CI: kombinációs index; CI_{avg}: a CI értékek súlyozott átlaga; CI_{avg} = (CI₅₀ + 2CI₇₅ + 3CI₉₀)/6. CI < 1, CI = 1, és CI > 1, melyek rendre szinergizmust, additív hatást, illetve antagonistá hatást jelölnek. D_m, m és r jelentik a mediánhatás görbe x-metszéspontjának, meredekségének és lineáris korrelációs együtthatójának az antilogaritmusát.

Vegyület	Sejtvonal	Hatóanyagok aránya	CI értéke			D _m	m	r	CI _{avg}
			ED ₅₀	ED ₇₅	ED ₉₀				
3 ⁹¹	L5178 _{MDR}	20.4 : 1	0.27	0.14	0.07	11.678	3.246	0.964	0.13
	L5178	163 : 1	0.67	0.55	0.46	11.236	2.103	0.942	0.53
5	L5178 _{MDR}	15 : 1	0.26	0.16	0.12	4.454	6.638	1.000	0.16
	L5178	150 : 1	0.80	0.79	0.78	10.748	2.572	0.997	0.78
6	L5178 _{MDR}	30 : 1	0.32	0.25	0.20	7.595	3.981	0.994	0.24
	L5178	150 : 1	0.98	0.76	0.61	16.049	3.239	0.986	0.72
7	L5178 _{MDR}	15 : 1	0.17	0.16	0.16	6.605	3.721	0.978	0.16
	L5178	150 : 1	1.06	0.79	0.62	14.306	2.947	0.971	0.75
8	L5178 _{MDR}	7.5 : 1	0.18	0.14	0.12	5.001	5.858	1.000	0.14
	L5178	37.5 : 1	0.55	0.58	0.60	8.598	2.495	0.972	0.59
9	L5178 _{MDR}	3.75 : 1	0.27	0.16	0.13	3.030	3.329	0.993	0.16
	L5178	37.5 : 1	0.63	0.52	0.45	8.078	3.858	0.952	0.50
10	L5178 _{MDR}	15 : 1	0.17	0.13	0.13	4.939	3.193	0.955	0.14
	L5178	150 : 1	1.03	0.81	0.69	8.970	2.178	0.991	0.79
11	L5178 _{MDR}	15 : 1	0.17	0.16	0.17	7.338	3.771	0.947	0.17
	L5178	75 : 1	0.70	0.83	1.03	8.202	1.722	0.956	0.91
12	L5178 _{MDR}	7.5 : 1	0.30	0.20	0.17	3.928	4.610	1.000	0.20
	L5178	37.5 : 1	0.58	0.63	0.70	7.606	2.502	0.966	0.66
13	L5178 _{MDR}	7.5 : 1	0.17	0.16	0.15	5.224	3.722	0.971	0.16
	L5178	37.5 : 1	0.77	0.47	0.31	8.165	3.044	0.982	0.44
14	L5178 _{MDR}	7.5 : 1	0.21	0.14	0.11	6.133	4.890	0.992	0.14
	L5178	75 : 1	0.49	0.50	0.52	7.864	2.094	0.961	0.51
15	L5178 _{MDR}	3.75 : 1	0.25	0.15	0.11	5.614	5.805	1.000	0.15
	L5178	37.5 : 1	0.46	0.47	0.47	8.295	2.882	0.981	0.47
16	L5178 _{MDR}	7.5 : 1	0.34	0.26	0.23	8.365	3.378	0.939	0.26
	L5178	37.5 : 1	0.53	0.59	0.66	9.652	2.400	0.961	0.62
17	L5178 _{MDR}	7.5 : 1	0.27	0.24	0.23	8.739	3.813	0.960	0.24
	L5178	37.5 : 1	1.16	0.85	0.64	7.199	3.273	0.977	0.80
18	L5178 _{MDR}	15 : 1	0.20	0.12	0.09	6.419	4.953	0.970	0.12
	L5178	150 : 1	0.40	0.42	0.46	10.477	2.033	0.966	0.44
19	L5178 _{MDR}	30 : 1	0.34	0.20	0.13	30.423	2.306	0.968	0.22
	L5178	300 : 1	0.56	0.45	0.40	84.393	1.665	0.995	0.47

Az önrendeződött ekdiszteroid NPK antiproliferatív hatása A2780_{ADR} sejteken

Vizsgáltuk a **25_{NP}**, **26_{NP}**, **25_{NP}-DOX** és **26_{NP}-DOX** ekdiszteroid NPK és H-NPK sejtnövekedést gátló képességét A2780_{ADR} sejtvonalon, mely egy doxorubicin-rezisztens humán petefészek karcinóma sejtvonal. Az eredményeket a **3. táblázat** részletezi.

Az eredmények jelentős különbségekre mutattak rá a **25-ös** és **26-os** ekdiszteroid konjugátumok nanorészecskéinek és hetero-nanorészecskéinek antitumor hatása között. Míg a **25_{NP}** és **26_{NP}** ekdiszteroid NPK mérhető, de csekély antiproliferatív hatást fejtettek ki, addig **25_{NP}-DOX** és **26_{NP}-DOX** már a mikromoláris tartomány alatt is hatásos volt, és ezen H-NPK-ben az ekdiszteroid jelenléte az aktivitás közel négyszeres növekedését eredményezte a szkvalénhoz kapcsolt doxorubicin NPK-hez viszonyítva. A kapott eredmények ígéretes alapot nyújthatnak

az ekdiszteroid-acetonidok hasonló vagy más típusú daganatellenes nanoszerkezetekben való alkalmazásának további vizsgálataihoz.

3. táblázat: A **25**-ös és **26**-os vegyületek nanorészecskéinek (X_{NP}) és hetero-nanorészecskéinek (X_{H-NP}) A2780_{ADR} sejtek növekedését gátló aktivitása. Dox-Sq: szkvalén-funkcionalizált doxorubicin, GI: növekedésgátlás, GI₅₀: a tesztanyag azon koncentrációja, amely a sejtszám 50%-os csökkenését idézi elő a kontroll tenyészetekhez viszonyítva. Az \pm SD értékek a legalább négy független kísérlet átlagától való szórást jelölik.

Vegyület (X)	A2780 _{ADR} sejtek (GI ₅₀ , μ M)	
	X_{NP}	X_{NP-DOX}
25	19 \pm 3	0.34 \pm 0.08
26	39 \pm 4	0.26 \pm 0.03
Dox-Sq	1.17 \pm 0.06	----

PROTOFLAVONOIDOK

Protoflavonoid származékok félszintetikus előállítása

A protoflavonoidokat elsősorban az ígéretes tumorellenes aktivitásuk miatt vizsgálják, egyes kísérletes bizonyítékok azonban azt sugallják, hogy a vegyületcsoportnak egyéb, a tumorellenes hatással nem összefüggő farmakológiai potenciálja is lehet. Ennek a Ph.D. munkának az egyik célja volt, hogy a protoflavonoidok kémiai és farmakológiai terét kevésbé citotoxikus származékokkal bővítsük, és hogy megkezdjük farmakológiai tulajdonságaik új irányokban történő felderítését. Vizsgálatainkhoz a protoapigenont (**28**) és annak 1'-O-alkil-analógjait (**29-34**) választottuk ki kiindulási anyagokként, mivel ezeknek a származékoknak egy részéről korábban már írtak le érdekes, nem-daganatellenes jellegű aktivitásokat.

A protoflavonok citotoxicitásáért döntően felelős szerkezeti elem a *p*-kinol B-gyűrű szimmetrikus dienon csoportja, amely pro-oxidáns és Michael-akceptor tulajdonságokat kölcsönöz a vegyületeknek. Ebből adódóan ezt a molekularészt választottuk a tervezett félszintetikus átalakításaink célpontjául, hogy ily módon kevésbé citotoxikus, de potenciálisan bioaktív származékokat állítsunk elő. Célunk eléréséhez két különböző szintetikus stratégiát alkalmaztunk: 1) a B-gyűrű szelektív telítését olyan protoflavon analógok előállítása céljából, amelyek a ritka, természetben is előforduló dihidro- vagy tetrahidroprotoflavon szerkezeti elemmel rendelkeznek, és 2) a protoflavon 4'-oxo-csoport oxim funkcióval való helyettesítését.

Preparatív stratégiánk első lépése az apigenin (**27**) oxidatív dearomatizálása volt, amit a PIFA hipervalens jódreagenssel, acetonitriles közegben végeztünk víz, vagy a C-1' helyen kapcsolni kívánt alkil-szubsztituensnek megfelelő alkohol jelenlétében. A reakciós elegyek egy óra refluxátatást követően protoapigenont (**28**) vagy annak 1'-O-alkil-éter analógjait (**29-34**) eredményezték. A **28-34**-es vegyületek kiindulási anyagokként szolgáltak a további transzformációkhoz, ugyanakkor a **32**-es vegyület, a többiekhez képesti alacsony citotoxicitása

miatt, már eleve az egyik célvegyületünk volt, amelynek hatástani vizsgálata további szerkezeti módosítások nélkül is érdekes lehetett (13. oldal, **9. ábra**).

A **28-33**-as kiindulási anyagok B-gyűrűjének szelektív hidrogénezését a H-cube[®] folyamatos áramú hidrogénező reaktor szerkezeti módosított változatával végeztük. A tervezett felszintetikus feladat elvégzéséhez először egy általános módszert dolgoztunk ki, melynek keretében egy sor kisebb léptékű teszt reakciót végeztünk az optimális szintetikus körülmények azonosítása céljából a **28**-as és **33**-as vegyületekkel. A vizsgálatok eredményeit a **8. ábra** foglalja össze.

Sorszám	Kiindulási anyag ^a	Katalizátor	Oldószer	<i>p</i> (bar)	<i>T</i> (°C)	Áraml. s. (ml/min)	Konv. ^b (%)	Szelektivitás ^b (%)		
								28a / 33a	35 / 40	27
1	33	Lindlar katalizátor	EtOAc	20	25	1	19	nem detektálva		
2	33	Lindlar katalizátor	EtOAc	40	25	1	43	0	88	12
3	33	Lindlar katalizátor	EtOAc	80	25	1	99	0	92	8
4	33	Lindlar katalizátor	EtOAc	80	25	1.5	38	0	n. d.	
5	33	Lindlar katalizátor	EtOAc	40	50	1	78	0	66	34
6	33	Lindlar katalizátor	MeOH	80	25	1	97	0	81	19
7	33	5% Pd/C	EtOAc	20	25	1	71	0	82	18
8	33	5% Pd/C	EtOAc	40	25	1	100	0	84	16
9	28	5% Pd/C	EtOAc	40	25	1	99	nyomokban	77	23
10	28	5% Pd/C	MeOH	40	25	1	99	nyomokban	80	20

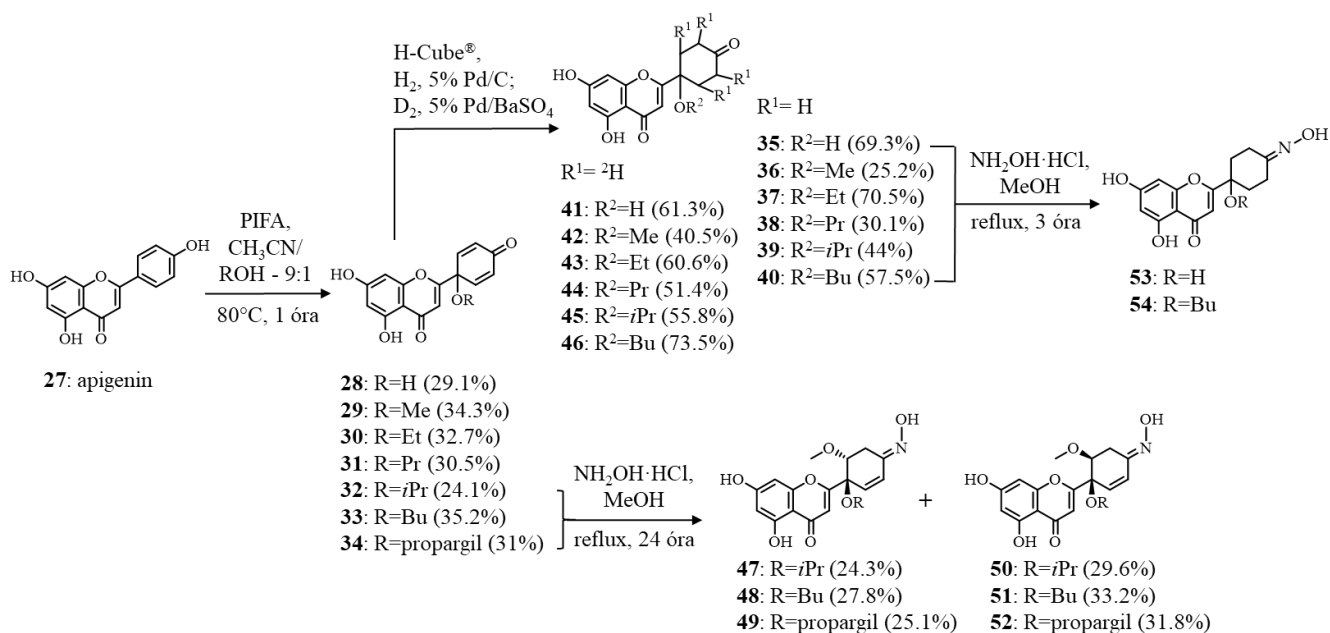
8 ábra: A **28** és **33**-as jelzésű vegyületek folyamatos áramú hidrogénezési körülményeinek optimalizálása. ^a: C_{kiindulási anyag}=1 mg/ml; ^b: A nyers termékkeverék ¹H NMR spektroszkópiás vizsgálatával meghatározva.

A B-gyűrű szelektív telítésére a legjobb eredményeinket 5% Pd/C-katalizátor, 1 ml/perc mintaoldat áramlási sebesség és 40 bar háttérnyomás alkalmazásával értük el (**8. ábra**, 9. és 10. sorok) szobahőmérsékleten. A kapott kísérletes körülmények alkalmazásával további B-gyűrűn redukált származékokat állítottunk elő. A szubsztrátokat etil-acetátban (**29-33**-as vegyületek) vagy metanolban (**28**-as vegyület) oldottuk fel, figyelembe véve a vegyületek relatív polaritását. Az átalakítások elfogadható kitermeléssel eredményezték a **35-40**-es tetrahidroprotoapigenon-származékokat (**9. ábra**).

Abból a célból, hogy tovább növeljük a rendelkezésre álló érdekes, potenciálisan bioaktív protoflavon származékaink számát, a **28-33** szubsztrátumok B-gyűrűinek szelektív deuterálását is elvégeztük. Ehhez kissé módosítottuk a hidrogénezés során alkalmazott eljárásunkat, és katalizátorként 5% Pd/BaSO₄-et, oldószerként pedig etil-acetátot használva sikeresen előállítottuk a kívánt **41-46**-os tetra-deuteroprotoapigenon analógokat (**9. ábra**).

Ezen túlmenően, a **32-34** protoapigenon analógok, valamint a **35**-ös és **40**-es

tetrahidroprotoapigenon származékok 4'-keto-csoportját sikeresen alakítottuk tovább oxim funkciókká hidroxil-amin hidroklorid reagens metanolban történő alkalmazásával. Valamennyi átalakítás regioszelektíven ment végbe a 4'-ketocsoporton, ugyanakkor a **32-34** szubsztrátumok esetében a reakciót az oldószer savkatalizált Michael-addíciója kísérte a C-2'-helyzetben, ami a *p*-kinol dienon egyik kettős kötésének telítését eredményezte. Az előállított **47-52** 2-metoxi-2'3'-dihidroprotoapigenon 4'-oxim-analógokat és az **53-54** tetrahidroprotoapigenon-4-oximokat racemátokként azonosítottuk. A reakciókat a **9. ábra** szemlélteti.



9. ábra. A protoapigenon és 1'-*O*-alkil- vagy propargil-éter-származékainak tetrahidro-, tetradeutero- vagy 4'-oxim-analógjainak a szintézise. A **47-54** oximok racemátokat jelölnek, azonban az egyszerűség kedvéért csak az egyik enantiomert ábrázoltuk.

Az előállított protoflavonoid származékok hatástani vizsgálatai

Citotoxikus hatás rákos sejtvonalakon és a DNS-sérülésre adott válaszméchanizmusok gátlása

A **35**-ös és **40**-es vegyületek *in vitro* citotoxikus aktivitását MCF-7, HeLa és SiHa humán rákos sejtvonalakon teszteltük. Amint az várható volt, a protoflavon B-gyűrű szelektív telítése a vegyületek citotoxicitásának határozott csökkenését eredményezte. Következésképpen, csak HeLa sejteken tudtuk meghatározni a **40**-es vegyület IC₅₀-értékét (55,12 ± 1,11 μM), minden más esetben az 50%-os gátlás koncentrációja szisztematikusan meghaladta a 100 μM-t.

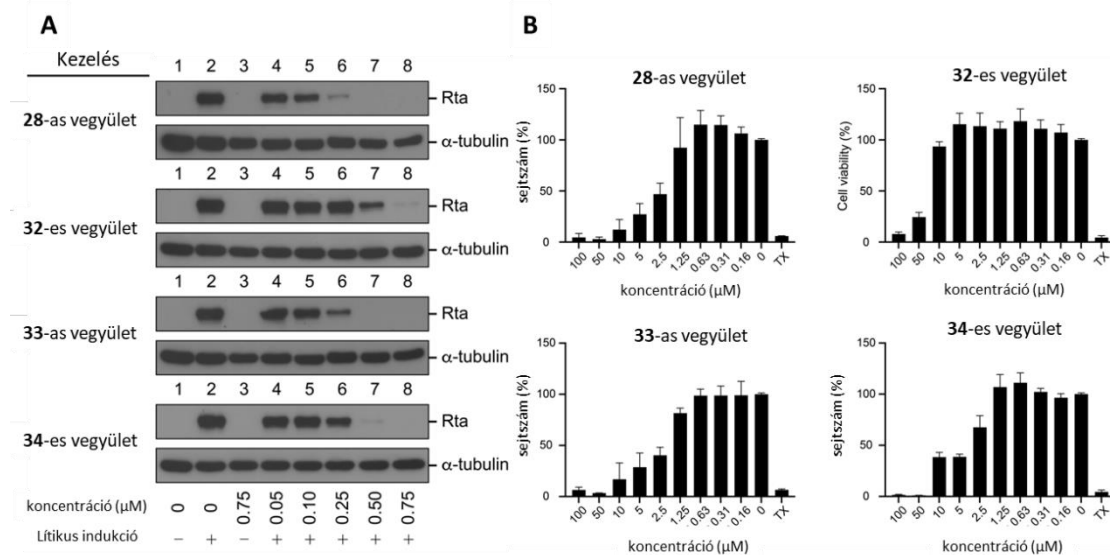
Ezen felül vizsgáltuk a két vegyület DNS-sérülésre adott válaszméchanizmust gátló potenciálját az ATR/ATM jelátviteli útvonalakra gyakorolt hatásuk vizsgálatán keresztül. A teszteken a **35**-ös származék nem gátolta a Chk1 és Chk2 („checkpoint” kináz 1 és 2) foszforilációját, és a **40**-es 1'-*O*-butil-éter analógja is csak a legmagasabb vizsgált dózisonál (20 μM) gyakorolt mérhető gátló hatást a Chk1-en. A vegyületek esetleges kemoszenzitizáló

hatását doxorubicinnel kombinálva is megvizsgáltuk, de az elvégzett vizsgálatok során egyik származék sem mutatott kölcsönhatást a kemoterápiás szerrel.

A protoflavonoid származékok vírusellenes hatásai

A **28**, **32-40** és **47-54** származékokat egy pszeidotípusú vírusvizsgálattal teszteltük HIV-1 ellen. A vegyületek közül a tetrahidroprotoapigenon (**35**) kb. 50%-osan gátolta a vírusfertőzés kezdeti szakaszát 100 µM koncentrációnál, és egészen 500 µM koncentrációig nem bizonyult citotoxikusnak.

Vizsgáltuk a **28** és **32-54** vegyületeknek az EBV lítikus ciklusára gyakorolt aktivitását is. Ennek keretében az Rta EBV lítikus protein expresszióját mértük P3HR1 gazdasejtekben. Az első szűrővizsgálatot 0,25 µM koncentrációban hajtottuk végre, melynek során három aktív vegyületet (**32-34**) azonosítottunk. Ezt követően, meghatároztuk az aktivitások dózisfüggését, valamint a vegyületek citotoxicitását P3HR1 sejteken. Az eredményeket a **10. ábra** mutatja be.



10. ábra. A A protoapigenon (**28**) és analógjainak (**32-34**) az Epstein–Barr vírus (EBV) Rta lítikus proteinjének expressziójára gyakorolt gátlása. A P3HR1 sejteket a lítikus indukció idején kezeltük a vegyületekkel, valamint nátrium-butiráttal és tetradekanoil forbol-acetáttal. A sejtlizátumokat 24 órával a lítikus indukció után gyűjtöttük be. **B** A vegyületek citotoxicitása P3HR1 sejteken. A sejteket 24 órán át kultiváltuk protoapigenont (**28**) vagy a **32-34** származékokat tartalmazó közegben. A sejtek életképességét az MTT-eljárással vizsgáltuk. Pozitív kontrollként 1% Triton X-100-al (TX) kezelt sejteket használtunk. A hibásávok a szórás jelölik.

Az anti-EBV tesztek során (**10. ábra-A**) mindhárom vizsgált vegyület (**32-34**) hatékonyan csökkentette az Rta szintjét 0,50, 0,25 és 0,50 µM koncentrációknál. A pozitív kontroll protoapigenon (**28**) és a tesztelt protoflavonoidok (**32-34**) IC₅₀-értékei rendre 0,127, 0,467, 0,208 és 0,285 µM voltak. A citotoxicitási vizsgálatokban (**10. ábra-B**) a **33**-as és **34**-es vegyületek hasonló aktivitást mutattak, mint a protoapigenon (**28**), míg a **32**-es izopropil-éter származék a többiekhez képest gyengébbnek bizonyult. Eredményeink alapján meghatároztuk

a vegyületek anti-EBV-hatásának a citotoxicitásukkal szembeni szelektivitását a megfelelő IC₅₀-értékek arányaiból (**28**: 30,1; **32**: 73,0; **33**: 9,80; **34**: 17,3) kifejezve. Ennek eredményeként 73-szoros szelektivitást állapítottunk meg a protoapigenon-1'-*O*-izopropil-éter (**32**) vírusellenes aktivitásának a javára a vegyület citotoxicitásával szemben, mely kb. 2,5-szeres szelektivitás növekedést jelent a kissé erősebb antivirális hatású, de lényegesen citotoxikusabb protoapigenonhoz képest (**28**).

Összefoglalás

EKDISZTEROIDOK

- Összesen 20 ekdiszteroidot, köztük 18 nitrogéntartalmú származékot állítottunk elő felszintetikus átalakítások során. A kapott vegyületek közül 14 új vegyület.
- Két önrendeződő ekdiszteroid hatóanyag konjugátumot állítottunk elő a posztszteron 2,3-acetonid 20-oximból (**19**). Kutatási együttműködésben a konjugátumokat sikeresen alakítottuk át nano- és doxorubicint tartalmazó hetero-nanorészecskékké, majd ezeket jellemeztük kolloid kémiai tulajdonságaik szempontjából.
- Az **5-18** vegyületeket humán nőgyógyászati rákos sejtvonalakon teszteltük. Általánosságban mérsékelt antiproliferatív hatásokat figyeltünk meg.
- Vizsgáltuk az **5-19** vegyületek ABCB1 efflux transzportert gátló képességét. Számos szerkezet-hatás összefüggést derítettünk fel; két származék, a **18**-as ekdiszteroid laktám és a posztszteron 2,3-acetonid 20-oxim (**19**) inaktívnak bizonyult ebből a szempontból.
- Vizsgáltuk az **5-19** vegyületek doxorubicinnel mutatott interakcióját. Bár mindegyik származék jelentős érzékenyítő hatást mutatott a kemoterápiás szerre mind az MDR, mind a nem-MDR rákos sejtvonalon, a legérdekesebb anyagnak a **18**-os ekdiszteroid laktám bizonyult; kemo-szenzitizáló hatása meghaladta a korábbi ekdiszteroid lead molekula (**3**-as vegyület) aktivitását, miközben nem gátolta a P-gp efflux funkcióját.
- Vizsgáltuk az ekdiszteroid nanorészecskék és hetero-nanorészecskék sejtnövekedést gátló hatását A2780_{ADR} sejteken. A szkvalénnal funkcionalizált **19**-es ekdiszteroid-oximot, mint rezisztencia csökkentőt, és funkcionalizált doxorubicint tartalmazó hetero-nanorészecskék mikromól alatti koncentrációban voltak hatásosak a doxorubicin rezisztens tumorsejtek ellen.

PROTOFLAVONOIDOK

- Összesen 27 protoflavonoidot, köztük 19 új vegyületet állítottunk elő felszintetikus úton az apigeninből. A kifejlesztett áramlásos kémiai módszer lehetővé tette a ritka, természetben is előforduló tetrahidroprotoflavon molekularészt tartalmazó származékok előállítását.

- Vizsgáltuk a **35-ös** és **40-es** tetrahidroprotoflavon-származékok rákos sejtvonalakkal szembeni citotoxikus hatásait, illetve DNS-károsodásra adott válaszmechanizmusokat gátló képességüket. A *p*-kinol B-gyűrű kettős kötéseinek redukciója a vizsgált bioaktivitások markáns csökkenését eredményezték. Ennek megfelelően, a vegyületek előállítására alkalmazott szintetikus stratégia hatékony eszköz lehet a jövőben a protoflavonoidok esetlegesen toxikus-mellékhatással járó bioaktivitásainak megszüntetésére.
- Teszteltük a **28**, **32-40** és **47-54** vegyületek HIV-1 elleni aktivitását egy pszeudotípusú vírusvizsgálattal. A tetrahidroprotoapigenon (**35**) 100 μ M koncentrációban kb. 50%-ban gátolta a vírusfertőzést, míg citotoxikus hatást ötszörös koncentrációban sem mutatott.
- Teszteltük a **28** és **32-54** vegyületek Epstein-Barr vírus ellenes aktivitását; a protoapigenon-1'-*O*-izopropil-éter (**32**) erős vírusellenes hatást fejtett ki ($IC_{50}=463$ nM), amely kb. 73-szoros szelektivitást jelent az anyag citotoxikus hatásával szemben.

Publikációs lista

Az értekezés alapját képező közlemények:

I. 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, *International Journal of Molecular Sciences* (2019) **20** 24; 6269

IF: **4.183** (2018) / Organic Chemistry, Inorganic Chemistry, Medicine (misc.): **Q1**

II. Fumagalli G, Giorgi G, Vágvölgyi M, Colombo E, Christodoulou MS, Collico V, Prosperi D, Dosio F, Hunyadi A, Montopoli M, Hyeraci M, Silvani A, Lesma G, Dalla Via L, Passarella D, Heteronanoparticles by Self-Assembly of Ecdysteroid and Doxorubicin Conjugates To Overcome Cancer Resistance, *ACS Medicinal Chemistry Letters*; (2018) **9** 5; 468-471.

IF: **3.737** (2018) / Drug discovery, organic chemistry: **Q1**

III. Bogdán D, Haessner R, Vágvölgyi M, Passarella D, Hunyadi A, 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, *Magnetic Resonance in Chemistry*; (2018) **56**; 859–866.

IF: **1.731** (2018) / Chemistry (miscellaneous): **Q2**

IV. Ötvös SB, Vágvölgyi M, Girst G, Kuo CY, Wang HC, Fülöp F, Hunyadi A, Synthesis of Nontoxic Protoflavone Derivatives through Selective Continuous-Flow Hydrogenation of the Flavonoid B-Ring, *ChemPlusChem* (2018) **83**; 72-76.

IF: **3.441** (2018) / Chemistry (miscellaneous): **Q1**

V. 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, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2018) **144**; 730-739.

IF: **4.833** (2018) / Drug discovery, organic chemistry, pharmacology: **Q1**

Előadások az értekezés témájában:

I. Vágvölgyi M, Girst G, Zomborszki ZP, Fülöp F, Ötvös SB, Hunyadi A, Preparation of B-ring saturated nontoxic protoflavones as novel xanthine oxidase inhibitors *66th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA)*, Sanghaj, Kína (2018) (Előadás)

II. Vágvölgyi M, Girst G, Zomborszki ZP, Fülöp F, Ötvös SB, Hunyadi A, Nontoxic protoflavone derivatives as potential inhibitors of xanthine oxidase *Phytochemical Society of Europe (PSE) - Young Scientists' Meeting on Advances in Phytochemical Analysis*, Liverpool, Egyesült Királyság (2018) (Poszter)

III. Vágvölgyi M, Girst G, Zomborszki ZP, Fülöp F, Ötvös SB, Hunyadi A, B-gyűrűn telített, nem citotoxikus protoflavon származékok előállítása és vizsgálata *MTA Alkaloid- és Flavonoidkémiai Munkabizottságának 2018-as ülése*, Mátrafüred, Magyarország (2018) (Előadás)

IV. Vágvölgyi M, Tamborini L, De Micheli C, Passarella D, Hunyadi A, Flow chemical investigation of a new ecdysteroid lactam through Beckmann rearrangement *COST Action CM1407 Joint MC/WG Meeting*, Lisszabon, Portugália, (2017) (Előadás)

V. Vágvölgyi M, Martins A, Kulmány Á, Zupkó I, Tóth G, Hunyadi A,

Preparation and chemo-sensitizing activity of nitrogen-containing ecdysteroid derivatives: 6-oximes, oxime ethers, and a lactam

65th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Bázél, Svájc (2017) (Poszter)

VI. Vágvölgyi M, Martins A, Tóth G, Kúsz N, Giorgi G, Passarella D, Hunyadi A, Semi-synthetic preparation of self-assembling drug conjugates from potentially bioactive ecdysteroid derivative

COST Action CM1407 Joint MC/WG Meeting, Krakkó, Lengyelország (2017) (Előadás)

VII. Vágvölgyi M, Martins A, Csorba A, Kulmány Á, Zupkó I, Tóth G, Hunyadi A, Ekdiszteroid oximok és oxim éterek előállítása és vizsgálata

MTA Szteroid- és Terpenoidkémiai Munkabizottságának 2016-os előadóülése, Szeged, Magyarország (2016) (Előadás)

VIII. Vágvölgyi M, Ötvös SB, Kúsz N, Orbán-Gyapai O, Fülöp F, Hunyadi A, Új protoflavon származékok előállítása

MTA Alkaloid- és Flavonoidkémiai Munkabizottságának 2016-os ülése, Mátrafüred, Magyarország (2016) (Előadás)

IX. Hunyadi A, Dankó B, Csábi J, Vágvölgyi M, Issaadi M, Fási L, Zoofishan Z, A brief overview of our compound library available for collaborative studies

4th Workshop of COST Action CM1106, Chemical Approaches to Targeting Drug Resistance in Cancer Stem Cells, Chioggia, Olaszország (2016) (Poszter)

X. Hunyadi A, Dankó B, Csábi J, Vágvölgyi M, Issaadi M, Fási L, Zoofishan Z, What we can provide for collaboration: an overview of our available compound library

4th Workshop of COST Action CM1106, Chemical Approaches to Targeting Drug Resistance in Cancer Stem Cells, Chioggia, Olaszország (2016) (Poszter)

XI. Vágvölgyi M, Martins A, Csábi J, Dankó B, Molnár J, Tóth G, Hunyadi A,

Semi-synthetic preparation, structural elucidation and pharmacological study of nitrogen-containing ecdysteroid analogs

63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Budapest, Magyarország (2015) (Előadás)

Egyéb közlemények:

I. Latif AD, Gonda T, **Vágvölgyi 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, *International Journal of Molecular Sciences*, (2019) **20** 9 2184

IF: **4.183** (2018/19) / Organic Chemistry, Inorganic Chemistry, Medicine (miscellaneous): **Q1**

II. 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 ABCB1 and ABCG2 Multidrug Efflux Transporters, *ChemMedChem* (2017) **12** 11 850-859.

IF: **3.009** (2017) / Drug Discovery, Organic Chemistry: **Q1**

III. Marik T, Urbán P, Tyagi C, Szekeres A, Leitgeb B, **Vágvölgyi M**, Manczinger L, Druzhinina IS, Vágvölgyi Cs, Kredics L: Diversity Profile and Dynamics of Peptaibols Produced by Green Mould *Trichoderma* Species in Interactions with Their Hosts *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*, *Chemistry and Biodiversity* (2017) **14** e1700033

IF: **1.440** (2017) / Bioengineering, Chemistry (miscellaneous), Medicine (miscellaneous): **Q2**