

**Az ösztrogén bioszintézis enzimrendszerének *in vitro* gátlása
új szteroid származékokkal**

A doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Zsigmondné Herman Bianka Edina

Témavezető:

Dr. Szécsi Mihály



Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

I. sz. Belgyógyászati Klinika

Általános Orvostudományi Kar

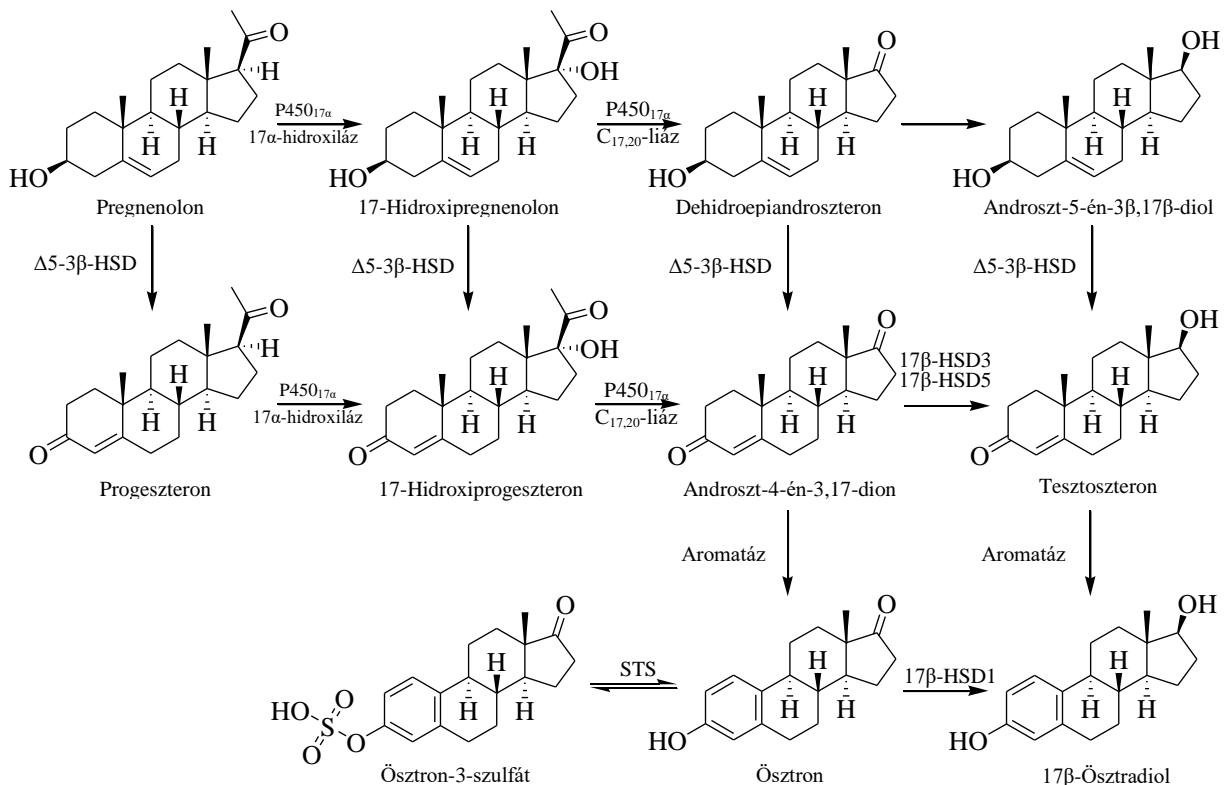
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2019

1 Bevezetés és célkitűzések

Az ösztrogének bioszintetikus kaszkádjának első lépéseiben a citokróm P450-függő 17 α -hidroxiláz-C_{17,20}-liáz enzim (P450_{17 α}) a C₂₁ prekursorokat, pregnenolont és progeszteront 17-hidroxipregnenolonná és 17-hidroxiprogeszteronná (17OHProg) alakítja át. A következőkben oldallánc hasítással (C_{17,20}-liáz aktivitás) keletkeznek a C₁₉ szteroidok, a dehidroepiandroszteron (DHEA) és androszténdion. Az androszténdion ezt követően részben tesztoszteronná alakul át.



1. Ábra Az ösztrogén bioszintézis fő útvonalai

Az ösztron és a 17 β -ösztradiol androszténionból és tesztoszteronból képződik a citokróm P450-függő aromatóz enzim (P450_{19A1}) hatására, a szteroid A-gyűrű aromatózációja mellett a C-19-metilcsoport hasítását is elvégzi. Az ösztron az 1-es típusú 17 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz által (17 β -HSD1) metabolizálódik tovább, amely az ösztrogén hatást a C-17-oxo funkciós csoport sztereospecifikus redukciójával aktiválja, és amelynek következtében a hormonálisan aktív 17 β -ösztradiol képződik. Az ösztrogének a vérben és a szövetekben ösztron-3-szulfát formájában szállíthatók és tárolhatók, amely ösztronból az ösztrogén-szulfotranszferáz hatására szintetizálódik. Az ösztron regenerálódhat az ösztron-3-szulfát hidrolízise során, mely folyamatot a szteroid-szulfatáz (STS) katalizál.

Az ösztrogének elsődleges bioszintézise a hypothalamo-hypophysealis tengely endokrin kontrollja alatt áll, és az főként az aktív petefészkekben zajlik. Jelentős ösztrogén

termelődés fordul elő továbbá gonádokon kívül (pl. mell- és zsírszövetben), amely intrakrin módon szabályozhatja az ösztrogén hatást.

Az ösztrogének jelentős szerepet játszanak nőgyógyászati betegségek kialakulásában és előrehaladásában, köztük az emlőrák hormonfüggő formáiban, petefészek tumorokban, méh karcinómákban, valamint az endometrium daganataiban. Kimutatták, hogy a rákos mellszövetekben fokozott mértékben fejeződnek ki az ösztrogén termelő rendszer enzimei, ez a lokális 17β -ösztradiol koncentráció emelkedését eredményezi, amely pedig feltételezhetően elősegíti a kóros sejtproliferációt. A hormonfüggő daganatok progresszióját az ösztrogének képződésének visszafogásával lehet szabályozni. A hatékony és teljes ösztrogén megvonás érdekében szükség lehet a kaskád kulcsenzimeinek egyidejű gátlására. A $P450_{17\alpha}$, az aromataáz, a STS és a 17β -HSD1 elleni specifikus vagy többszörös gátló hatású vegyületek a gyógyszerfejlesztés érdeklődésére tartanak számot.

Kutatómunkánk célja új szteroid származékoknak az ösztrogén bioszintézis kulcsfontosságú enzimeire gyakorolt gátló hatásának vizsgálata volt: $P450_{17\alpha}$ $C_{17,20}$ -liáz aktivitás, aromataáz, STS és 17β -HSD1. Az újonnan szintetizált vegyületek az együttműködő kutatócsoportok eredményei. A tesztvegyületek olyan különböző szerkezeti módosításokkal rendelkeztek, amelyeket rendszeresen alkalmaznak a farmakológiai kutatásban a biológiai hatás modulálására.

Célul tűztük ki *in vitro* radioszubsztrát inkubációs módszerek kifejlesztését az aromataáz, a STS és a 17β -HSD1 aktivitásának és gátlásának mérésére. Célunk volt, hogy adatokat gyűjtsünk az új tesztvegyületek gátlási potenciáljairól (IC_{50}) és molekulaszervezet-hatás összefüggéseiről. Terveink között szerepelt az inhibitorok enzim-specifitásának és a lehetséges többszörös gátló hatásának vizsgálata. Vizsgáltuk az inhibitorok kinetikai és mechanizmus tulajdonságait. Munkánk további célja, hogy új információkkal szolgáljon az enzimek ligandumkötő mechanizmusainak jobb megértéséhez. Eredményeink az ösztrogén-bioszintézis új inhibitorainak kifejlesztésében alkalmazhatók, és hozzájárulhatnak új gyógyszerjelölt vegyületek felkutatásához.

2 Kísérleti módszerek

2.1 Inkubációs eljárások

Az enzim inkubációkat HEPES puffer közegben végeztük 200 µl végtérfogatban. A szubsztrátumot 20 µl térfogatban, 25 v/v%-os propilénglikol (aromatáz esetén acetonitril) tartamú HEPES puffer oldat formájában adtuk az inkubátumhoz. A tesztvegyületek 10 µl dimetil-szulfidos oldatban kerültek hozzáadásra. Az enzimgátlási vizsgálatok során a szubsztrátkoncentráció 1.0 µM volt. Az inkubációkat 37 °C-on, folyamatos rázás mellett (200 fordulat/perc) végeztük, majd hűtéssel és a megfelelő szerves oldószerek hozzáadásával állítottuk le. Az izolált termék és a maradék szubsztrát radioaktivitását folyadékszintillációs számlálóval (Packard Tri-Carb 2200CA) mértük. Az enzimaktivitást a keletkezett produktum mennyiségéből határoztuk meg, a háttér és visszanyerés korrekciójával. A tesztvegyületekkel egyidejűleg háttér és inhibitor nélküli kontroll mintákat is inkubáltunk. Az inkubációs módszerek technikai részleteit az 1. táblázat tartalmazza.

1. Táblázat A gátlási vizsgálatokhoz használt radioszubsztrát inkubációs módszerek összefoglalása

Enzim	C _{17,20} -liáz	Aromatáz	STS	17β-HSD1
Enzimforrás	Patkány here homogenizátum	Humán placenta mikroszóma	Humán placenta mikroszóma	Humán placenta citoszol
Szubsztrátum	17OHProg	Tesztoszteron	Öszttron-3-szulfát	Öszttron
Produktum	Androszt-4-én-3,17-dion	17β-Ösztradiol	Öszttron	17β-Ösztradiol
Koenzim	NADPH	NADPH	-	NADPH/NADH
Inkubációs idő	20 perc	40 perc	20 perc	2.5 perc
Enzim mennyiség szövet ekvivalens mg-ban	3.2 mg	20 mg	0.2 mg	0.4 mg
A nyomjelző radioaktivitása (dpm/inkubátum)	170000	250000	30000	250000
Termék izolálási technika	Vékonyréteg kromatográfia	Extrakció	Extrakció	Vékonyréteg kromatográfia

2.2 Gátlási vizsgálatok

Meghatároztuk a nem gátolt kontrollokhöz (100%) viszonyított relatív konverziókat. Gyenge inhibitorok esetén 10 vagy 50 µM végső inhibitor koncentrációnál határoztuk meg a gátolt relatív konverziók százalékos arányát. Ezt követően kiszámítottuk a gátolt relatív konverziók átlagát és a standard eltéréseket (SD-k). A leghatékonyabb vegyületek esetén IC₅₀-értékeket (az inhibitor koncentráció, amely 50%-ra csökkenti az enzimaktivitást) határoztunk meg. A jelöletlen szubsztrátumok és referencia vegyületek IC₅₀-értékeit viszonyítási alapnak határoztuk meg. A vizsgált vegyületek relatív gátlási potenciáljait (RIP) a megfelelő kofaktoral

mért referencia IC_{50} adatok alapján számítottuk ki: $RIP = a \text{ tesztszubsztrát } IC_{50} \text{ értéke} / a \text{ jelöletlen szubsztrát } IC_{50} \text{ értéke}$.

2.2.1 Kinetikai vizsgálatok

A szubsztrátok Michaelis-állandóját (K_M) a jelöletlen szubsztrátum növekvő koncentrációi mellett határoztuk meg. A K_M -értéket a Michaelis-Menten analízisből (reakciósebesség vs. szubsztrátumkoncentráció) számítottuk ki a GraphPad Prism 4.0 szoftver alkalmazásával. Az inhibitor állandót (K_i) az enzimátikus transzformációnak különböző rögzített szubsztrátumkoncentrációk és változó inhibitor koncentrációk melletti mérésével határoztuk meg. A kiértékeléshez a Dixon-féle lineáris transzformációt (1/reakciósebesség vs. inhibitor koncentráció) alkalmaztuk. A K_i értéket a különböző szubsztrátumkoncentrációk egyenesi metszéspontjának abszcisszájából határoztuk meg. A kötési mechanizmust a Dixon-egyenesek adatainak másodlagos illesztéséből állapítottuk meg.

2.2.2 Reverzibilitási vizsgálatok

2.2.2.1 Aktívszén adszorpciós módszer

A hatásos $C_{17,20}$ -liáz inhibitorok reverzibilitását előinkubációt követő aktívszén adszorpciós módszerrel vizsgáltuk. Az inkubációs elegyhez (200 μ l) nagy koncentrációban adtuk hozzá a vizsgált vegyületeket (10 μ M és 50 μ M), a patkány here homogenizátumot és a NADPH kofaktort. Az inkubátumokat 37 °C-on 10 percig, illetve 40 percig előinkubáltuk. 50 μ l dextránnal bevont szénből készült 3%-os szuszpenzió hozzáadása után (0,6%-os végkoncentráció) az előinkubált mintákat 15 percig jégen tartottuk, majd 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszókat használtuk a további gátlási vizsgálatokhoz.

2.2.2.2 Hígítási módszer

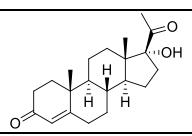
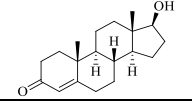
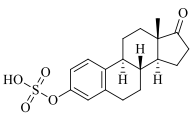
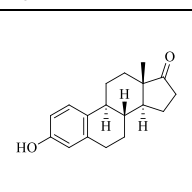
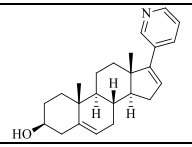
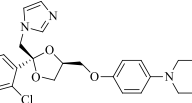
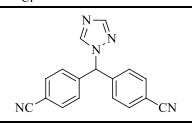
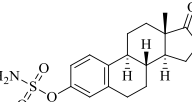
A STS és a 17β -HSD1 inhibitorok reverzibilitás vizsgálatait hígítási előinkubációs módszerrel végeztük. Az inhibitor vegyületeket a megfelelő placenta frakcióval 4.0 μ l térfogatban, 37 °C-on, különböző időtartamokig (2,5–20 perc) előinkubáltuk. Ezt követően a mintákat az inkubációs közeggel 50-szeresre hígítottuk. Az enzimaktivitás méréseit a 17β -HSD1 esetén azonnal megkezdtük. STS esetén az előinkubációt követő 20 perces másodlagos inkubációs idő után folytattuk a vizsgálatokat annak érdekében, hogy lehetővé tegyünk a az inhibitorok esetleges disszociációját. Az enzimátikus reakciókat a szubsztrátum hozzáadásával indítottuk el, majd ezt követően inkubációs eljárásokat a szokásos módon végeztük. A kapott konverziós adatokat a hasonló módon kezelt, inhibitorok nélküli kontrollok értékeivel hasonlítottuk össze.

3 Kísérleti eredmények

3.1 Módszertani eredmények

A módszertani fejlesztések során *in vitro* radioszubstrát inkubációs módszereket dolgoztunk ki az aromataz, a STS és a 17 β -HSD1 aktivitásának és gátlásának mérésére [II.; III.; VII.; IX.]. Az aromataz és a STS enzimtermékeinek izolálására extrakciós technikákat adaptáltunk és fejlesztettünk tovább, a 17 β -HSD1 esetén a termék és szubsztrát elválasztására vékonyréteg kromatográfias eljárást dolgoztunk ki. Módszerek jól reprodukálhatónak bizonyultak, jó visszanyerésekkel és alacsony háttér értékekkel működtek. A jól felépített inkubációs protokollok lehetővé tették nagyszámú vegyület rövid idő alatt történő vizsgálatát. Meghatároztuk a szubsztrátum affinitást jellemző paramétereket (K_M és IC_{50}) és a referencia inhibitorok gátlási potenciálját. A vizsgált enzimek referencia paramétereit a 2. táblázat mutatja.

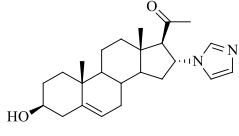
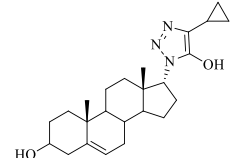
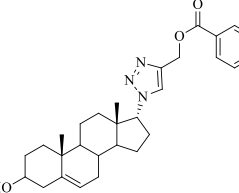
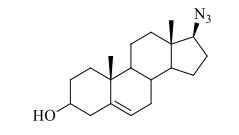
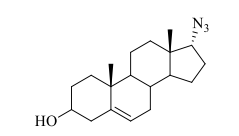
2. Táblázat A vizsgált enzimek referenciavegyületeinek paramétereit (*Szabó et al. *Acta Biol Hung*, 2015, 66, 274–281)

Vegyület	Szerkezeti képlet	C _{17,20} -liáz* IC ₅₀ and/or K _M ±SD (μM) or RC at 10 μM±SD (%)	Aromataz	STS	17 β -HSD1
17OHProg		IC ₅₀ = 1.6±0.35			
Tesztoszteron			IC ₅₀ = 0.52±0.14 K _M = 0.60±0.18		
Ösztron-3-szulfát			87±4	IC ₅₀ = 5.2±1.2 K _M = 8.5±2.9	80±5
Ösztron			78±7	63±2 IC ₅₀ = 24.1±10.2	IC ₅₀ = 0.63±0.11 (NADPH) K _M = 0.17±0.040 (NADPH) IC ₅₀ = 2.0±0.18 (NADH)
Abirateron		IC ₅₀ = 0.0125±0.0015			
Ketokonazol		IC ₅₀ = 0.32±0.02	IC ₅₀ = 14.2±0.40		
Letrozol			IC ₅₀ = 0.0038±0.0010		
EMATE			95±8	IC ₅₀ = 0.0098±0.0038 K _i = 0.0044±0.0005	IC ₅₀ = 4.6±2.9

3.2 A P450_{17α} enzim C_{17,20}-liáz aktivitásának gátlása D-gyűrűben szubsztituált szteroid származékokkal

Munkánk során új 16 α -amino-pregnenolon és a 17-triazolil-androst-5-én-3 β -ol vegyületek C_{17,20}-liáz gátló hatását vizsgáltuk [IV.; VI.]. Számos hatásos inhibitorot azonosítottunk, és az eredmények azt mutatták, hogy a C-17-es pozícióban található szubsztituens sztereoisomériája jelentősen befolyásolta a C_{17,20}-liáz gátló hatást. Az eredmények azt is igazolták, hogy a C-16 és C-17 helyzetű oldalláncok kiterjesztése javíthatja a gátlási potenciált. A 17 β -azido-androst-5-én-3 β -ol alapvegyületet hatásos irreverzibilis C_{17,20}-liáz inhibitornak találtuk, míg az aromázra (egy másik P450 citokróm-függő kulcsenzimre az ösztrogén bioszintézisben) ez a vegyület nem fejtett ki gátló hatást. Ezen új eredmények azt mutatják, hogy a szteroidok C-17-es helyzetében lévő azido-csoport további vizsgálatokra érdemes farmakofór lehet a P450_{17α} enzim gátlására. A C_{17,20}-liáz leghatásosabb inhibitorai és gátlási potenciáljai a 3. táblázatban szerepelnek.

3. Táblázat A leghatékonyabb C_{17,20}-liáz inhibitorok és gátlási potenciáljai

Vegyület	Szerkezeti képlet	IC ₅₀ ±SD (μM)	RC at 10 μM±SD (%)	RC at 50 μM±SD (%)
ML-AD-46		1.8±0.36	21±1	19±2
GT-166		3.1±1.4	28±3	15±2
GT-70		3.5±0.8	32±5	6±1
GT-101		0.60±0.18	15±2	17±3
SCH-1737		21.2±6.8	64±9	42±4

3.3 A 17β-HSD1 kofaktorfüggő gátlásának összehasonlító vizsgálata

Munkánk során több vegyületcsoporthoz tartozó számos különböző új szteroid vegyület 17β-HSD1-re gyakorolt gátlási potenciálját vizsgáltuk, különös figyelemmel a feltételezett gátló hatás kofaktorfüggésére [II.; III.; VIII.]. Számos hatékony inhibitorot azonosítottunk, emellett eredményeink azt mutatták, hogy a NADPH vagy NADH kofaktorokkal kapott látszólagos *in vitro* potenciálok jelentősen eltérhetnek egymástól. Ez az eredmény arra utal, hogy a foszforilált és a nemfoszforilált kofaktor kötődése különböző hatással lehet a szubsztrátum kötőhely inhibitor kötődésében részt vevő szerkezeti elemeire. A NADH jelenlétében mért eredmények kevésbé relevánsak a potenciális *in vivo* hatás szempontjából, ezért ezeket az adatokat fenntartással kell kezelni vezérmolekulák kiválasztásában és az inhibitor molekulák optimalizálása során. A kofaktorfüggő gátlás összehasonlító vizsgálata alkalmas kísérleti eszközt kínál a mechanizmus vizsgálatokhoz, valamint elméleti módszerekkel párosítva a 17β-HSD1 inhibitorok kötési mechanizmusainak jobb megértését segítheti elő. A 17β-HSD1 kofaktorfüggő gátló hatására vizsgált vegyületek példáit a 4. táblázatban mutatjuk be.

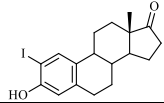
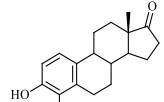
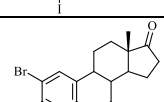
4. Táblázat A 17β-HSD1 kofaktorfüggő gátló hatására vizsgált vegyületek példái

Vegyület	Szerkezeti képlet	NADPH			NADH		
		IC ₅₀ ± SD (μM)	RC at 10μM ± SD (%)	RIP	IC ₅₀ ± SD (μM)	RC at 10μM ± SD (%)	RIP
BI-28		> 10	99±1	> 15	1.3±0.4	25±2	0.65
PZ-8		7.8±1.4		13.4	9.7±2.8		4.85
MS/AN-3		> 10	79±16	> 15	2.6±1.0		1.3
FG-7		0.070±0.027		0.11	0.077±0.036		0.039
FG-4		30±7		48	0.058±0.044		0.029
SCH-1478		0.78 ± 0.30		1.2	> 10	76 ± 7	> 5
SZE-5012		> 10	87 ± 4	> 15	3.5 ± 1.0		1.8

3.4 Az aromatóz, a STS és a 17 β -HSD1 gátlása halogénezett ösztrozon analógokkal

Az A-gyűrűben halogénezett ösztrozon, 13 α -ösztrozon és 17-dezoxi-13 α -ösztrozon származékok aromatóz, STS és 17 β -HSD1 gátló hatását vizsgáltuk [I.; VII.]. Számos hatásos inhibitorvegyületet azonosítottunk, melyek specifikus vagy kettős gátló hatást fejtenek ki a vizsgált enzimekre. A 2-jódösztrotront specifikus és erős 17 β -HSD1 inhibitornak találtuk, míg a 4-jód származék kettős gátlónak bizonyult a STS és a 17 β -HSD1 ellen. Mérési eredményeink azt mutatják, hogy a 2- és 4-brómösztrozon vegyületek szintén kettős inhibitornak tekinthetők az STS és a 17 β -HSD1 ellen. A 13-as metilcsoport konfigurációjának inverziója, valamint a 17-oxo funkciós csoport hiánya a halogénezett vegyületek többségénél csökkentette az aromatóz, a STS és a 17 β -HSD1 gátló potenciált, hatásuk azonban továbbra is jelentős maradt. A halogénezett ösztrozon analógok aromatóz, STS és 17 β -HSD1 gátló hatására kapott eredmények azt mutatták, hogy a C-2 és/vagy C-4 pozícióban lévő szubsztituensek, és az A-gyűrű 3-as helyzetében található fenolos OH polarizációja, valamint a D-gyűrű szerkezeti jellemzői együttesen határozzák meg az enzimekkel szemben mutatott kötési affinitást. Ez a komplex kötődési mechanizmus érvényesnek látszik a vizsgált, meglehetősen eltérő szerkezeti és katalitikus sajátosságokkal bíró mindhárom enzim esetében, illetve alkalmazható a szubsztrátum vagy termék típusú inhibitor vegyületekre is. A vizsgált bróm- és jód-szubsztituált ösztrozon származékok szubmikromoláris IC₅₀-paraméterei, valamint korábbi irodalmi adatok szerinti csökkent ösztrogenitásuk azt mutatja, hogy ezek a származékok alkalmasak lehetnek a gyógyszerfejlesztés vezérmolekuláinak tervezéséhez. Eredményeink a halogénezett ösztrozon származékoknak az ösztrogén bioszintézisre gyakorolt kumulatív xenobiotikus hatása és potenciális endokrin diszruptor hatása miatt fellépő lehetséges veszélyekre is figyelmeztetnek. A vegyület család leghatékonyabb inhibitor vegyületeinek eredményei az 5. táblázatban találhatóak.

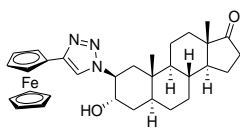
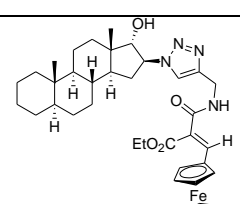
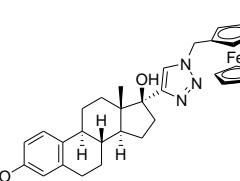
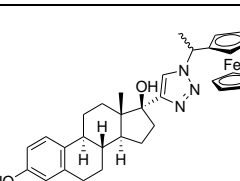
5. Táblázat A leghatékonyabb A-gyűrűben halogénezett ösztrozon származékok enzimaktivitás gátlási eredményei

Vegyület	Szerkezeti képlet	Enzimaktivitás gátlás		
		RC \pm SD (%)	IC ₅₀ \pm SD (μ M)	K _i \pm SD (μ M)
		Aromatóz	STS	17 β -HSD1
EM-1048V		62 \pm 1	64 \pm 3	IC ₅₀ = 0.064 \pm 0.034
EM-1048III		88 \pm 2	IC ₅₀ = 0.23 \pm 0.09 K _i = 0.36 \pm 0.05	IC ₅₀ = 0.36 \pm 0.25
EM-1049I		IC ₅₀ = 8.7 \pm 2.8	IC ₅₀ = 2.0 \pm 0.4	IC ₅₀ = 0.095 \pm 0.031

3.5 Az aromatóz, a STS és a 17 β -HSD1 gátlása szteroid ferrocénekkel

Vizsgáltuk különböző szteroid ferrocén származékoknak aromatózra, STS-re és a 17 β -HSD1-re kifejtett gátló hatását [IX.]. A tesztvegyületeket az aromatóz és a 17 β -HSD1 ellen gyengén hatásosnak találtuk, egyes triazolil-ferrocén származékok azonban hatásosan gátolták az STS-t, az ösztron-3-szulfát szubsztrátumnál is nagyobb affinitást mutatva az enzimhez. A kinetikai és mechanizmus vizsgálataink azt mutatták, hogy a C-2 pozícióban lévő triazolil-ferrocén szubsztituenst hordozó vegyület reverzibilisen kötődik, míg a C-16 és C-17 származékok irreverzibilis inhibitorok. A kísérletek kimutatták, hogy a ferrocenil csoport kulcsszerepet játszik az inhibitorok fokozott kötési affinitásában. A leghatékonyabb STS inhibitorok, a 17 β -ösztradiol 17 α -triazolil-ferrocén származékai és gátlási potenciáljaik alapján az eddig közölt leghatékonyabb STS inhibitorok csoportjába tartoznak. Az STS gátlással elfojtható ösztrogénfüggő sejtproliferáció és a hormonfüggetlen citotoxicitás feltételezhető szinergizmusa az ilyen típusú vegyületeket különösen ígéretes gyógyszerjelöltekké teheti a hormonfüggő nőgyógyászati ráktípusok gyógyszeres terápiájában. A leghatékonyabb szteroid ferrocén származékokat a 6. táblázat mutatja be.

6. Táblázat A leghatékonyabb szteroid ferrocén származékok és gátlási potenciáljaik

Vegyület	Szerkezeti képlet	Enzimaktivitás gátlás		
		RC \pm SD (%) Aromatóz	IC ₅₀ \pm SD (μ M) and K _i \pm SD (μ M) STS	17 β -HSD1
KL-105		100 \pm 11	41 \pm 5 IC ₅₀ = 4.6 \pm 1.5	81 \pm 8
KL-114		89 \pm 2	42 \pm 3 IC ₅₀ = 2.4 \pm 1.1	91 \pm 10
E-IL-249/5		89 \pm 8	8 \pm 2 IC ₅₀ = 0.084 \pm 0.043 K _i = 0.066 \pm 0.009	98 \pm 10
EV-95/3		117 \pm 15	1.0 \pm 0.5 IC ₅₀ = 0.035 \pm 0.006 K _i = 0.021 \pm 0.005	76 \pm 6

4 Összefoglalás

Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk új szteroid származékoknak az ösztrogén bioszintézis legfontosabb enzimeire, a C_{17,20}-liázra, az aromatazra, a STS-ra és a 17 β -HSD1-ra gyakorolt gátló hatását.

1. A módszertani fejlesztések során *in vitro* radiosubstrát inkubációs módszereket fejlesztettünk ki az aromataz, a STS és a 17 β -HSD1 aktivitásának és gátlásának mérésére. Az enzimtermékek izolálására új technikát adaptáltuk és fejlesztettünk tovább. Az új módszerek lehetővé tették nagyszámúmeglehetősen vegyület gyors tesztelését.

2. A P450_{17 α} enzim C_{17,20}-liáz aktivitásának hatásos inhibitorait azonosítottuk a 16 α -amino-pregnenolon és a 17-triazolil-androst-5-én-3 β -ol vegyületek sorában. Az eredmények azt mutatták, hogy a C-16 és C-17 helyzetű oldalláncok kiterjesztése javíthatja a gátló potenciált, valamint a C-17 szubsztituens sztereoizomériája jelentősen befolyásolja ezen vegyületek a C_{17,20}-liáz gátló hatást.

3. Megállapítottuk, hogy a 17 β -azido-androszt-5-én-3 β -ol hatásos irreverzibilis C_{17,20}-liáz inhibitor, míg az aromatazt (egy másik P450 citokróm-függő enzim az ösztrogén bioszintézisében) nem gátolta. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a szteroidok C-17 helyzetű azidocsoportja megfelelő farmakofór lehet P450_{17 α} inhibitorok fejlesztésében.

4. Számos hatékony 17 β -HSD1 inhibitort azonosítottunk különböző vegyületcsoportokban (triazol és tetrazol ösztron származékok, D-szekoösztron vegyületek és C-15 szubsztituált ösztron származékok), és az eredmények azt is megmutatták, hogy a NADPH vagy NADH kofaktorról kapott látszólagos *in vitro* potenciálok jelentősen eltérhetnek egymástól. Ez az eredmény arra utal, hogy a foszforilált és a nemfoszforilált kofaktor kötődése különböző hatással lehet a szubsztrátum kötőhely inhibitor kötődésében részt vevő szerkezeti elemeire.

5. Megállapítottuk, hogy a kofaktorfüggő gátlás összehasonlító vizsgálata alkalmas kísérleti eszközt kínál a mechanizmus vizsgálatokhoz, valamint elméleti módszerekkel párosítva a 17 β -HSD1 inhibitorok kötési mechanizmusainak jobb megértését segítheti elő.

6. Számos hatásos inhibitort azonosítottunk az A-gyűrűben halogénezett ösztron, 13 α -ösztron és 17-deoxi-13 α -ösztron-származékok sorában, amelyek specifikus vagy duális gátló hatást fejtenek ki az aromataz, a STS, illetve a 17 β -HSD1 ellen. A 2-jódösztron specifikus és erősen 17 β -HSD1 inhibitor, míg a 2- és 4-brómösztron és a 4-jódösztron kettős gátlást mutat az STS és a 17 β -HSD1 ellen. A 13-as metilcsoport konfigurációjának inverziója, valamint a 17-oxo funkciós csoport hiánya a halogénezett vegyületek többségénél csökkentette az

aromatáz, a STS és a 17β -HSD1 gátló potenciált, azonban inhibitor hatásuk továbbra is jelentős maradt.

7. A halogénezett ösztromon analógok aromatáz, STS és 17β -HSD1 gátló hatására kapott eredmények azt mutatták, hogy a C-2 és /vagy C-4 helyzetben lévő szubsztituensek és a fenolos OH polarizációja az A gyűrű C-3 helyzetében, valamint a D gyűrű szerkezeti jellemzői együtt határozzák meg az enzimekhez való kötési affinitást. Ez a komplex kötődési mechanizmus érvényesnek látszik a vizsgált, meglehetősen eltérő szerkezeti és katalitikus sajátosságokkal bíró mindhárom enzim esetében, illetve alkalmazható a szubsztrátum vagy termék típusú inhibitor vegyületekre is.

8. Megállapítottuk, hogy a 2-jódösztromon az egyik leghatékonyabb 17β -HSD1 inhibitorok, míg a 4-jódösztromon az eddig közölt leghatékonyabb szteroid típusú STS inhibitorok csoportjába tartoznak. A vizsgált bróm- és jód-szubsztituált ösztromon származékok a szubmikromoláris IC_{50} -paramétereik, valamint az irodalomból ismert csökkent ösztrogenitásuk alapján alkalmas jelöltek lehetnek az gyógyszerfejlesztés vezérmolekuláinak tervezéséhez. Eredményeink a halogénezett ösztromonszármazékoknak ösztrogén bioszintézisre gyakorolt kumulatív xenobiotikus hatására és az ebből fakadó endokrin diszruptor veszélyre is figyelmeztetnek.

9. Meghatároztuk, hogy a szteroid ferrocén vegyületek hatásos STS inhibitorok, és hogy a ferrocenilcsoportnak kulcsszerepe van a megnövekedett kötési affinitásban. A 17β -ösztradiol 17α -triazolil-ferrocén származékai az eddig közölt leghatékonyabb STS inhibitorok csoportjába tartoznak. A STS-gátló hatást specifikusnak találtuk az ösztrogén-bioszintézis másik két fő enzimére, az aromatázra és a 17β -HSD1-re vonatkozóan.

10. Kinetikai és mechanizmus vizsgálatok azt mutatták, hogy a triazolil-ferrocén szubsztituenst C-2 pozícióban hordozó vegyület reverzibilisen kötődik, míg a C-16 és C-17 származékok irreverzibilis inhibitorai a STS-nak.

Munkánk során számos olyan vegyületet azonosítottunk, amelyek hatásos gátlást fejtenek ki az ösztrogén bioszintézisében szerepet játszó legfontosabb enzimekkel szemben. Molekulaszerkezet-hatás összefüggéseket határoztunk meg, és az inhibitorok kötési mechanizmusára vonatkozó javaslatokat tettünk. Új eredményeink hozzájárulhatnak az ösztrogén bioszintézis befolyásolására alkalmas új gyógyszerjelöltek kifejlesztéséhez.

5 A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények (IF= 26.142)

- I. Bacsa I, Jójárt R, Schneider G, Wölfling J, Maróti P, **Herman BE**, Szécsi M, Mernyák E: Synthesis of A-ring halogenated 13 α -estrone derivatives as potential 17 β -HSD1 inhibitors, *Steroids*, **2015**, *104*, 230–236. **IF: 2.513**
- II. Szabó J, Bacsa I, Wölfling J, Schneider Gy, Zupkó I, Varga M, **Herman BE**, Kalmár L, Szécsi M, Mernyák E: Synthesis and *in vitro* pharmacological evaluation of *N*-[(1-benzyl-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-carboxamides on d-secoestrone scaffolds, *J Enzym Inhib Med C*, **2016**, *31*, 574–579. **IF: 4.293**
- III. **Herman BE**, Szabó J, Bacsa I, Wölfling J, Schneider G, Bálint M, Hetényi C, Mernyák E, Szécsi M: Comparative investigation of the *in vitro* inhibitory potencies of 13-epimeric estrones and D-secoestrone towards 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *J Enzym Inhib Med C*, **2016**, *31*, 61–69. **IF: 4.293**
- IV. Szánti-Pintér E, Maksó L, Gömörý Á, Wouters J, **Herman BE**, Szécsi M, Mikle G, Kollár L, Skoda-Földes R: Synthesis of 16 α -amino-pregnenolone derivatives *via* ionic liquid-catalyzed aza-Michael addition and their evaluation as C_{17,20}-lyase inhibitors, *Steroids*, **2017**, *123*, 61–66. **IF: 2.523**
- V. Bacsa I, Jójárt R, Wölfling J, Schneider Gy, **Herman BE**, Szécsi M, Mernyák E: Synthesis of novel 13 α -estrone derivatives by Sonogashira coupling as potential 17 β -HSD1 inhibitors, *Beilstein J Org Chem*, **2017**, *13*, 1303–1309. **IF: 2.330**
- VI. Kiss A, **Herman BE**, Görbe T, Mernyák E, Molnár B, Wölfling J, Szécsi M, Schneider G: Synthesis of novel 17-triazolyl-androst-5-en-3-ol epimers *via* Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition and their inhibitory effect on 17 α -hydroxylase/C_{17,20}-lyase, *Steroids*, **2018**, *135*, 79–91. **IF: 2.136**
- VII. Bacsa I*, **Herman BE***, Jójárt R, Herman KS, Wölfling J, Schneider Gy, Varga M, Tömböly Cs, Lanišnik Rižner T, Szécsi M, Mernyák E: Synthesis and structure–activity relationships of 2- and/or 4-halogenated 13 β - and 13 α -estrone derivatives as enzyme inhibitors of estrogen biosynthesis, *J Enzyme Inhib Med C*, **2018**, *33*, 1271–1282. **IF: 4.027**
- VIII. **Herman BE**, Kiss A, Wölfling J, Mernyák E, Szécsi M, Schneider Gy: Synthesis of substituted 15 β -alkoxy estrone derivatives and their cofactor-dependent inhibitory effect on 17 β -HSD1, *J Enzym Inhib Med C*, **2019**, DOI: 10.1080/14756366.2019.1634064 (elfogadva) **IF: 4.027 (2018)**
- IX. **Herman BE**, Gardi J, Julesz J, Tömböly Cs, Szánti-Pintér E, Fehér K, Skoda-Földes R, Szécsi M: Steroidal ferrocenes as potential enzyme inhibitors of the estrogen biosynthesis, *Biol Fut*, **2019** (közlésre beküldve)

6 A doktori értekezéshez nem kapcsolódó közlemények (IF= 4.443)

1. Klisurić OR, Szécsi M, Djurendić EA, Szabó N, **Herman BE**, Jovanović-Šanta SS, Dojčinović-Vujašković SV, Nikolić AR, Pavlović KJ, Ajduković JJ, Oklješa AM, Petri ET, Kojić VV, Sakač MN, Penov Gaši KM: Structural analysis and biomedical potential of novel salicyloyloxy estrane derivatives synthesized by microwave irradiation, *Struct Chem*, **2016**, 27, 947–960. **IF: 1.582**
2. Bodnár B, Mernyák E, Wölfling J, Schneider G, **Herman BE**, Szécsi M, Sinka I, Zupkó I, Kupihár Z, Kovács L: Synthesis and biological evaluation of triazolyl 13 α -estrone–nucleoside bioconjugates, *Molecules*, **2016**, 21, 1212–1228. **IF: 2.861**

7 A doktori értekezéshez kapcsolódó előadások és poszterek

1. Jovanović-Šanta SS, **Herman BE**, Zupko I, Kulmány Á, Ocsovszki I, Nikolić AR, Savić M, Oklješa A, Szécsi M: Screening of Antihormonal and Anticancer Potential of Heterocyclic Estrane Steroids, *FEBS3+ Meeting: From molecules to living systems*, Siófok, **2018**.
2. Bacsa I, Jójárt R, Wölfling J, Schneider Gy, **Herman BE**, Szécsi M, Mernyák E: Synthesis of novel 13 α -estrone derivatives as potential 17 β -HSD1 inhibitors, *10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry*, Dubrovnik (Srebreno), Horvátország, **2017**.
3. Bacsa I, Herman KS, Jójárt R, Wölfling J, Schneider Gy, **Herman BE**, Szécsi M, Mernyák E: 13 α -ösztrom származékok szintézise és 17 β -HSD1 enzim gátlása, *Vegyészkonferencia*, Hajdúszoboszló, **2017**.
4. **Herman BE**, Jovanovic-Santa SS, Bjedov S, Szécsi M: 17 β -HSD1 inhibition by 3,17-substituted-16,17-seco-estratriene derivatives, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Bioscience Conference – IBSC 2016*, Újvidék, Szerbia, **2016**.
5. Jójárt R, Bacsa I, Wölfling J, Schneider Gy, **Herman BE**, Szécsi M, Mernyák E: Synthesis and 17 β -HSD1 inhibition of novel 2- or 4-substituted 13 α -estrone derivatives, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Bioscience Conference – IBSC 2016*, Újvidék, Szerbia, **2016**.
6. Bacsa I, Herman KS, Jójárt R, Wölfling J, Schneider Gy, **Herman BE**, Szécsi M, Mernyák E: Synthesis and 17 β -HSD1 inhibition of halogenated 13 α -estrone derivatives, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Bioscience Conference – IBSC 2016*, Újvidék, Szerbia, **2016**.
7. Szánti-Pintér E, Maksó L, Wouters J, **Herman BE**, Szécsi M, Skoda-Földes R: Synthesis and C17,20-lyase inhibition of 16-amino-pregnanes, *8th Central European Conference „Chemistry towards Biology”*, Brno, Csehország, **2016**.
8. **Herman BE**, Szabó J, Bacsa I, Wölfling J, Schneider Gy, Gardi J, Valkusz Zs, Mernyák E, Szécsi M: A 17 β -HSD1 enzimaktivitás in vitro gátlása ösztrom és 13 α -ösztrom

származékokkal, *Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XXVI. Jubileumi Kongresszusa*, Szeged, **2016**.

- 9. Herman BE**, Szabó J, Wölfling J, Schneider Gy, Kalmár L, Valkusz Zs, Mernyák E, Szécsi M: A 17 β -HSD1 enzimaktivitás in vitro vizsgálata és gátlása D-szekoösztrom származékokkal, *Innováció a Természettudományban – Doktorandusz Konferencia*, Szeged, **2015**.
- 10. Bacsa I, Jójárt R, Herman BE**, Schneider Gy, Wölfling J, Szécsi M, Mernyák E: Agyűrűben szubsztituált ösztrom származékok, mint potenciális 17 β -HSD1 inhibitorok szintézise, *Innováció a Természettudományban – Doktorandusz Konferencia*, Szeged, **2015**.
- 11. Herman BE**, Szécsi M, Kiss A, Mernyák E, Schneider Gy: 17 β -HSD1 in vitro aktivitásának gátlása ösztrom 15-O-alkil-karbonsav származékokkal, *MTA Szteroid és Terpenoidkémiái Munkabizottság előadói ülése*, Szeged, **2015**.
- 12. Szánti-Pintér E, Herman BE**, Szécsi M, Skoda-Földes R: Synthesis and pharmacological evaluation of steroid-ferrocene derivatives, *International Symposium on Synthesis and Catalysis*, Évora, Portugália, **2015**.
- 13. Herman BE**, Szabó J, Pataki Z, Wölfling J, Schneider Gy, Szécsi M, Mernyák E: 13 α -Ösztrom triazolok szintézise és 17 β -HSD1 gátlásának in vitro vizsgálata, *MKE 2. Nemzeti Konferencia*, Hajdúszoboszló, **2015**.
- 14. Bacsa I, Jójárt R, Herman BE**, Schneider Gy, Wölfling J, Szécsi M, Mernyák E: Synthesis of novel 13 α -estrone derivatives as 17 β -HSD1 inhibitors, *IXth Joint Meeting in Medicinal Chemistry*, Athén, Görögország, **2015**.
- 15. Szabó J, Herman BE**, Wölfling J, Schneider Gy, Szécsi M, Mernyák E: Synthesis of D-secoalcohols and D-secooximes in the 13 α - and 13 β -estrone series as potential 17 β -HSD type 1 inhibitors, *V. Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network*, Krakó, Lengyelország, **2015**.
- 16. Herman BE**, Szabó J, Kalmár L, Wölfling J, Schneider Gy, Julesz J, Valkusz Zs, Mernyák E, Szécsi M: In vitro investigation of 17 β -HSD1 enzyme activity and its inhibition with 13 α -estrone derivatives (A 17 β -HSD1 enzimaktivitás in vitro vizsgálata és gátlása 13 α -ösztrom származékokkal), *XX. Nemzetközi Vegyészkonferencia*, Kolozsvár, Románia, **2014**.
- 17. Herman BE**, Szabó J, Szabó N, Pataki Z, Wölfling J, Schneider Gy, Valkusz Zs, Mernyák E, Szécsi M: 13 α -Ösztrom származékok 17 β -HSD1 gátlásának vizsgálata in vitro radiosubsztrát inkubációs módszerrel, *MTA Szteroid és Terpenoidkémiái Munkabizottság előadói ülése*, Szeged, **2014**.