

ACTA

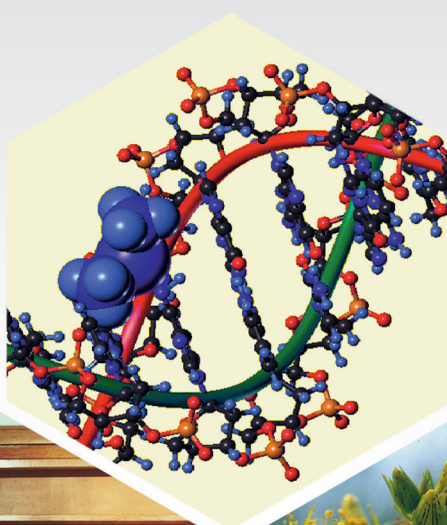
PHARMACEUTICA HUNGARICA

2.

2018

APHGAO 88, (043) 45–84. (2018)

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata



A C T A PHARMACEUTICA H U N G A R I C A

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

Főszerkesztő:

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.
Tel.: 217-0891;
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

Felelős szerkesztő:

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.
Tel.: 217-0927;
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

A szerkesztőbizottság tagjai:

Ambrus Rita, Báthori Mária, Borbás Anikó, Horváth Györgyi,
Perjési Pál, Tóthfalusi László

A szerkesztőség címe – Correspondence:

Acta Pharmaceutica Hungarica
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

A főszerkesztő munkatársa:

Hankó Zoltán MGYT,
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

TARTALOM

- Czudor Zsófia, Bánhegyi Péter, Boros Sándor, Breza Nóra, Fábíán Márk, Szántai-Kis Csaba, Markó Péter, Sipos Anna, Szokol Bálint, Őrfi László: Potenciális mielóma multiplex ellenes vegyületek szintézise és vizsgálata* 47
- Gajdács Mórió, Handzlik Jadwiga, Sanmartín Carmen, Domínguez-Álvarez Enrique, Spengler Gabriella: Szerves szelénvegyületek mint daganatellenes szerek: kísérleti eredmények in vitro vastagbél adenokarcinóma modellen* 59
- Gajdács Mórió, Handzlik Jadwiga, Sanmartín Carmen, Domínguez-Álvarez Enrique, Spengler Gabriella: Rákellenes és efflux pumpa gátló hatású szelénvegyületek ADME tulajdonságainak becslése számítógépes módszerrel* 67
- Tóth Anita, Riethmüller Eszter, Végh Krisztina, Alberti Ágnes, Béni Szabolcs, Kéry Ágnes: Lysimachia fajok flavonoid összetételének és antioxidáns aktivitásának összehasonlító vizsgálata* 75

CONTENTS

<i>Czudor, Zs., Bánhegyi, P., Boros, S., Breza, N., Fábrián, M., Szántai-Kis, Cs., Markó, P., Sipos, A., Szokol, B., Órfi, L.:</i> Synthesis and investigation of potent CDK9 inhibitors with antiproliferative effect in multiple myeloma cell lines.	47
<i>Gajdács, M., Handzlik, J., Sanmartín, C., Domínguez-Álvarez, E., Spengler, G.:</i> Organoselenium compounds as antitumor agents: in vitro evaluation on a colon cancer model system	59
<i>Gajdács, M., Handzlik, J., Sanmartín, C., Domínguez-Álvarez, E., Spengler, G.:</i> Prediction of ADME properties for selenocompounds with anticancer and efflux pump inhibitory activity using preliminary computational methods	67
<i>Tóth, A., Riethmüller, E., Végh, K., Alberti, Á., Béni, Sz., Kéry, Á.:</i> Comparative study of the flavonoid composition and antioxidant activity in <i>Lysimachia</i> species	75

Acta Pharmaceutica Hungarica: www.mgyt.hu

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata
Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: szerkesztoseg@mgyt.hu

Felelős kiadó: Prof. Dr. Szőkő Éva

Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással
az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.

MGYT elszámolási számla sz. 11708001-20530530

Adószám: 19000754-2-42

Előfizetési díj egész évre: 6000 Ft + 300 Ft áfa

Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 700 db

Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*

Sokszorosítás: ColorToys Bt.

Potenciális mielóma multiplex ellenes vegyületek szintézise és vizsgálata

CZUDOR ZSÓFIA^a, BÁNHEGYI PÉTER^b, BOROS SÁNDOR^b, BREZA NÓRA^b, FÁBIÁN MÁRK^a, SZÁNTAI-KIS CSABA^b, MARKÓ PÉTER^b, SIPOS ANNA^b, SZOKOL BÁLINT^b, *ÓRFI LÁSZLÓ^{a, b}

^aSemmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémia Intézet, Hőgyes E. u. 9., Budapest, H-1092

^bVichem Chemie Kutató Kft., Herman O. u. 15., Budapest, H-1022

* e-mail: orfi.laszlo@pharma.semmelweis-univ.hu

Summary

CZUDOR, Zs., BÁNHEGYI, P., BOROS, S., BREZA, N., FÁBIÁN, M., SZÁNTAI-KIS, Cs., MARKÓ, P., SIPOS, A., SZOKOL, B., ÓRFI, L.: **Synthesis and investigation of potent CDK9 inhibitors with antiproliferative effect in multiple myeloma cell lines.**

We have planned and synthesized a focused molecule library against myeloma multiplex. Their antiproliferative efficiency was tested on RPMI-8226 myeloma multiplex cell line. The most active compounds have micromolar IC₅₀ value. Based on literature data presumable the role of CDK9 enzyme in the development of myeloma multiplex, therefore we have examined the CDK9 inhibitory activity of our compounds. The nanomolar IC₅₀ values have confirmed our hypothesis. We determined our compounds inhibitory activity against other cyclin-dependent kinases (CDK2, CDK7) and we found the compounds selective on the CDK9 enzyme.

Key-words: multiple myeloma, cyclin-dependent kinase 9, pyrimidine derivatives

Összefoglalás

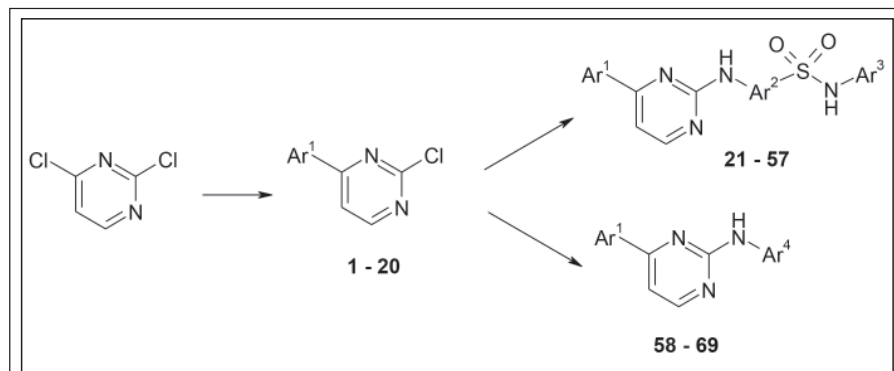
Munkánk során fókuszált vegyülettárat terveztünk és állítottunk elő, mielóma multiplex ellenes hatás vizsgálata céljából. Vegyületeink proliferáció gátló képességét fenotipikus screenben, RPMI-8226 mielóma multiplex sejtonalon, vizsgáltuk. A leghatékonyabb származékok IC₅₀ értéke a mikromólos koncentráció tartományba esett. Szakirodalomból ismert a ciklin-dependens kináz 9 (CDK9) szerepe a mielóma multiplex kialakulásában, ezért vizsgáltuk vegyületeink CDK9-gátló hatását is. A meghatározott nanomólos koncentrációjú CDK9 gátló IC₅₀ értékek alátámasztják az irodalomban leírtakat. A vegyületeink a CDK enzimek körében szelektívnek bizonyultak a CDK9 enzimre, ezt a legjobb vegyületek CDK2, és CDK7 enzimeken mért aktivitás gátlásának mérésével igazoltuk.

Kulcs-szavak: mielóma multiplex, ciklin-dependens kináz 9, pirimidin származékok

Bevezetés

A mielóma multiplex a második leggyakrabban előforduló hematológiai daganat. A plazmasejtek kóros felszaporodása a csontvelőben gátolja a normális vérképzést, belülről roncsolja a csontokat, valamint a nagy mennyiségben termelt immunglobulin védekezésre képtelen, így legyengíti a szervezetet a fertőzésekkel szemben [1]. Általában az idősebb korosztályt érintő rákos elváltozásról van szó (65-70 éves kor), és a relatív 10 éves várható túlélési rátája 15 % körüli [1]. Előfordulási gyakorisága mellett sajnos az is emeli a halálozási kockázatot, hogy a mai napig nincs igazán hatékony gyógymód a mielóma multiplex ellen [2]. Ezzel a daganattípussal küzdők a szövődményekbe halnak bele, melyek közül a legsúlyosabbak a vérzési rendellenességek, a csontvelő nem megfelelő működése, nem a csontvelőt érintő egyéb csont problémák, idegrendszeri szövődmények és a fertőzések, melyekre sajnos igen hajlamosá válnak a páciensek [3].

A mielóma multiplex biológiai hátteréről, a kialakulásáról a tudomány nem ismer még minden részletet, de bizonyos rizikófaktorok, mint például a radioaktív sugárzás nagyban hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához [4]. A betegség kialakulása a 13, vagy a 14. kromoszóma mutációjával kezdődik [5, 6]. Mindkettő esetében kromoszómaátrendeződés a jellemző elváltozás és körülbelül azonos gyakorisággal fordulnak elő. A különbség az, hogy a 13. kromoszóma esetében deléciót figyelhetünk meg, míg a 14.-nél transzlokációt egy immunglobulin gén és egy onkogén között [6]. Ha ez a genetikai elváltozás a B-típusú fehérvérsejtekben következik be, akkor ez plazma sejt klónok proliferációjához és további genetikai instabilitáshoz, mutációk sorozatához vezethet, és végül kialakul a mielóma multiplex betegség [5, 6]. Az egészséges B-sejtek miután megérttek (a csontvelőben termelődnek, majd átkerülnek a nyirokcsomókba és itt fejeződik be az érési folyamat) plazma sejtekké alakulhatnak, amiknek egy egészséges

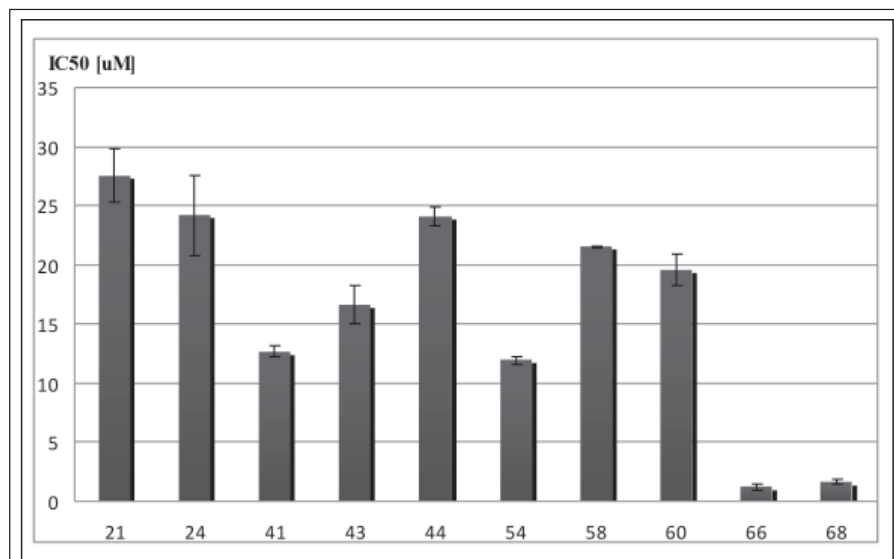


1. ábra: A 2,4-szubsztituált-pirimidin alapozú vegyületeink szintézisútja

eddig le nem írt, 2,4-szubsztituált-pirimidin alapozú vegyületeket állítottunk elő. A származékaink szintézise és általános szerkezeti képlete az **1. ábrán** látható

Összesen 49 anyagot állítottunk elő, ezek mielőtt multiplex (RPMI-8226) sejtvonalon kifejtett proliferáció gátló hatását vizsgáltuk. A **2. ábrán** látható oszlopdiagramon 30 μM alatti IC_{50} értéket mutató vegyületeket tüntetjük fel.

A 66-os és 68-as számú anyagaink a méréseink alapján kiemelkedően hatékonyan voltak képesek gátolni a proliferációt e sejtvonal esetében. A szakirodalomban több publikációban közölték, hogy ebben a mielőtt multiplex sejtvonalban (RPMI-8226) a CDK9 enzim túlzott kifejeződése figyelhető meg [10-12], ezért megvizsgáltuk az előállított anyagaink CDK9 gátló hatását. A **3. ábrán** lévő diagramon láthatóak leghatékonyabb kináz gátlóink IC_{50} értékei.



2. ábra: A sejtes esszében leghatékonyabb vegyületek ($\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{M}$) proliferáció gátlása RPMI-8226 mielőtt multiplex sejtvonalon (X-tengely: vegyületek sorszáma, Y-tengely: IC_{50}).

szervezetben az a szerepük, hogy megfelelő mennyiségű citokineket szekretáljanak, így hozzájárulnak az immunrendszer működéséhez a kórokozók legyőzése érdekében [7]. Mielóma multiplex betegség esetén a mutáns plazmasejtek túlzott mennyiségű citokint kezdenek el termelni és ezek fogják elősegíteni az első bekezdésben említett súlyos mellékhatások kialakulását, illetve angiogenezist is előidéznek a csontvelőben [5, 8].

A mielőtt multiplex elleni hatóanyagok kifejlesztésének fentiek miatt komoly terápiás jelentősége van.

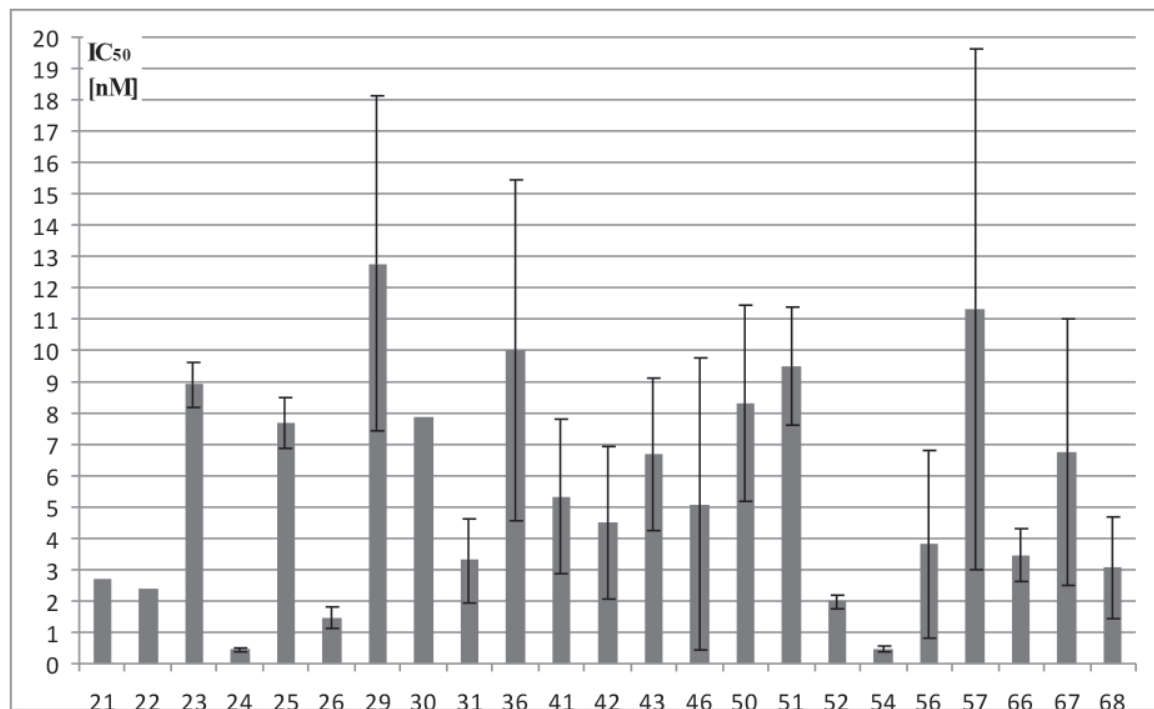
Eredmények

Kutatócsoportunk régóta foglalkozik mielőtt multiplex gátlókkal. Korábbi kutatási eredményeinkből és irodalomból ismert mielőtt ellenes hatású vegyületekből kiindulva, a szakirodalomban

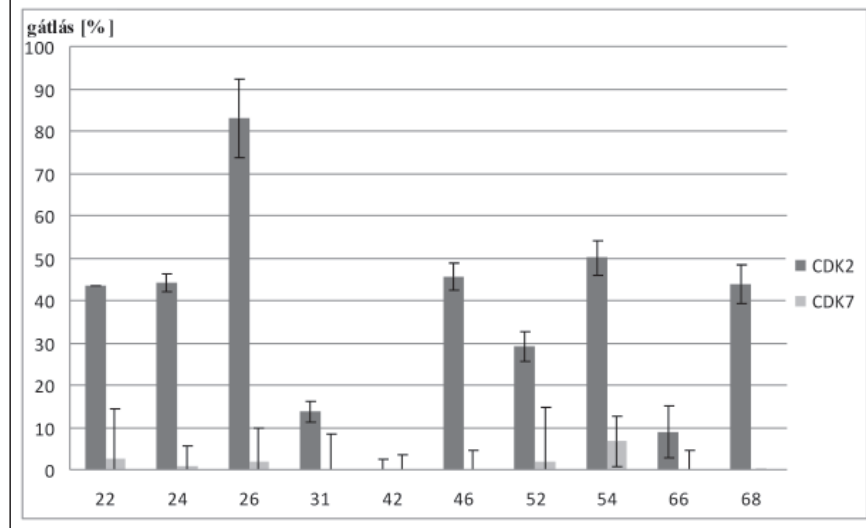
pott eredményeink igazolták vegyületeink kiemelkedő CDK9 inhibitor hatását.

A kináz gátlókkal kapcsolatban, a konzervatív szerkezetű ATP kötőhely folytán, mindig felmerül a vegyületek szelektivitásának kérdése, ezért megvizsgáltuk vegyületeink CDK kináz családon belüli szelektivitását. Biológiai jelentőségük alapján [13-15] a CDK2 és CDK7 enzimek relevánsak, ezért legjobb CDK9 gátló anyagaink inhibitor hatását megvizsgáltuk CDK2 és CDK7 biokémiai esszében. A kapott eredmények a **4. ábrán** láthatóak.

Megállapítható, hogy az általunk szintetizált 2,4-szubsztituált-pirimidin származékok szelektíven képesek gátolni a CDK9 enzim működését. Amint a **4. ábrán** látható, a másik két CDK enzim aktivitását (a 26-os vegyület CDK2 gátlása kivételével) gyakorlatilag csak 50% alatti mértékben képesek gátolni. A biokémiai mérésben alkalmazott



3. ábra: A vegyületek CDK9 gátló hatása. (X-tengely: vegyületek sorszáma, Y-tengely: IC₅₀ (nM))



4. ábra: A legjobb CDK9 gátló vegyületeink CDK2 és CDK7 enzimgátló hatása (gátlás %, a vegyületek 1 μM koncentrációjánál)

gátló hatással rendelkeznek mielóma multiplex sejtvonalon (RPMI-8226). A vegyületek igen erős és szelektív CDK9 inhibitor hatása alátámasztja azt a szakirodalomban közölt feltételezést, hogy a mielóma kialakulásának (egyik) lehetséges oka a CDK9 enzim túlzott kifejeződése [10-12].

Kísérleti rész

Analitikai jellemzés

Az előállított anyagokat két független analitikai módszerrel jellemeztünk.

koncentráció 1 μM volt, így az ennek alapján becsülhető IC₅₀ értékek jóval meghaladnák a CDK9 esetében mért IC₅₀ koncentrációkat. (A CDK2 és CDK7 gátlás IC₅₀ értékeit ezért nem határoztuk meg.)

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az általunk előállított vegyületek hatékony proliferáció

NMR

Az NMR spektrumokat TopSpin 1.3 programcsomaggal vezérelt, 7.05 Tesla mágneses térerejű Bruker Avance 300 spektrométeren vettük fel 30°C-on, DMSO-*d*₆ oldatban. A kémiai eltolódásokat (δ) ppm egységben adjuk meg, referenciának tetrametil-szilánt (TMS) használtunk (δ = 0,00

ppm). A kémiai szerkezeteket az $^1\text{H-NMR}$ spektrumokkal jellemezzük. A szerkezetek egyértelmű azonosítása végett szükség esetén zéró-quantum elnyomásos TOCSY, randomizált keverési idejű zéró-quantum elnyomásos ofset-kompenzált adiabatikus off-rezonancia ROESY, ^{13}C , multiplicitás-szerkesztett HSQC és HMBC spektrumokat is felvettünk [16, 17].

LCMS

Az LCMS spektrumok felvételét folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrométerrel végeztük, a következő paraméterekkel:

MS detektor: Waters SQD; UV detektor: Waters 996 DAD, Szeparációs modul: Waters Alliance 2795

HPLC

Oszlop: Waters XBridge C18, 50 mm x 4,6 mm, 3,5 μm ; Oldószer I: víz / 0,1 % HCOOH; Oldószer II: AcCN (acetonitril); Acetonitril: Riedel-deHaën; G Chromasolv (34998); Víz: Milli-Q Academic; Hanyagás: Riedel-deHaën; extra pure (27001); Áramlási térfogatáram: 2 ml/min; Injektált mennyiség: 5 μg

Gradiens:

Idő	Oldat I.	Oldat II.
0,00 min	95 %	5 %
0,50 min	95 %	5 %
5,50 min	5 %	95 %
6,00 min	5 %	95 %
6,50 min	95 %	5 %
7,00 min	95 %	5 %

MS:

Ionizáció: ES+/ES-; Ionforrás hőmérséklet: 110 °C; Deszolvatáló hőmérséklet: 250 °C; Száritógáz térfogatárama: 500 L/h; Kónusz gáz térfogatárama: 80 L/h; Kapilláris feszültség: 3000 V; Kónusz fe-

szültség: 30 V; Extraktor feszültség: 6 V; Rf lencse feszültség: 0,1 V; Pásztázás: 80-tól 1000 m/z másodpercenként; Pásztázások közötti késleltetés: 0,1 másodperc. A retenciós időket percben adtuk meg.

A vegyületek előállítása

Az intermedierek (**1-20**) előállítása és analitikai jellemzői:

1,50 g (10,00 mmol) 2,4-diklórpirimidint inert atmoszféra alatt feloldottunk 60 ml gáztalanított dimetoxi-etánban, és 10 percig kevertettük. 0,23 g (0,20 mmol) tetrakis(trifenilfoszfin)palládium(0)-t adtunk az oldathoz, majd argont buborékolattunk át rajta 30 percen keresztül. A megfelelő boronsav adott mennyiségét (11,00 mmol) (2-metoxifenilboronsav/ 4-fluor-2-metoxifenilboronsav/ 5-fluor-2-metoxifenilboronsav/ 2-fluor-6-metoxifenilboronsav/ 4,5-difluor-2-metoxifenilboronsav/ 2,3-difluor-6-metoxifenilboronsav/ 4-klór-2-metoxifenilboronsav/ 2-klór-6-metoxifenilboronsav/ 2,4-dimetoxifenilboronsav/ 2-etoxi-4-fluorfenilboronsav/ 2-etoxi-6-fluorfenilboronsav/ 2-etoxi-4-klórifenilboronsav/ 4-fluor-2-izopropoxifenilboronsav/ 2-fluor-3-izopropoxifenilboronsav/ 4-fluor-2-(metiltio)fenilboronsav/ 4-fluor-2-metilfenilboronsav/ 2,4-difluorfenilboronsav/ 2,6-difluor-4-metoxifenilboronsav/ 2-klór-4-fluorfenilboronsav/ 2,4-diklórfenilboronsav) és 3,18 g (30,00 mmol) nátrium-karbonát vizes oldatát (15 ml víz) adtunk a reakcióelegyhez, és reflux hőmérsékleten négy órán keresztül kevertettük argon gáz alatt. A reakció végbemenetele után szobahőmérsékletre hűtöttük az elegyet és 150 ml vízzel hígítottuk. A terméket háromszor 50 ml etil-acetáttal extraháltuk. A szerves fázisokat egyesítettük, majd telített NaCl oldattal mostuk, és MgSO_4 szárítószerrel vízmentesítettük. A szárítószer kiszűrése után az oldatot bepároltuk, majd acetonitrilből kristályosítottuk a terméket.

1	2-klór-4-(2-metoxifenil)-pirimidin M _r számított: 220,701; [M+H] ⁺ : 221,0; Rt: 3,74 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,76 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,07 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,93 (dd, <i>J</i> = 7,8 és 1,8 Hz, 1H); 7,56 (ddd, <i>J</i> = 8,3, 7,2 és 1,8 Hz, 1H); 7,24 (dd, <i>J</i> = 8,3 és 1,0 Hz, 1H); 7,13 (ddd, <i>J</i> = 7,8, 7,2 és 1,0 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H) hozam: 40 %
2	2-klór-4-(4-fluor-2-metoxifenil)-pirimidin M _r számított: 238,031; [M+H] ⁺ : 239,1; Rt: 3,91 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,76 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,05 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,02 (dd, <i>J</i> = 8,6 és 7,1 Hz, 1H); 7,16 (dd, <i>J</i> = 11,3 és 2,5 Hz, 1H); 6,98 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,2 és 2,5 Hz, 1H); 3,93 (s, 3H) hozam: 87 %
3	2-klór-4-(5-fluor-2-metoxifenil)-pirimidin M _r számított: 238,031; [M+H] ⁺ : 239,1; Rt: 3,92 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,81 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,11 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,71 (dd, <i>J</i> = 9,6 és 3,3 Hz, 1H); 7,42 (ddd, <i>J</i> = 9,2, 7,9 és 3,3 Hz, 1H); 7,27 (dd, <i>J</i> = 9,2 és 4,5 Hz, 1H); 3,90 (s, 3H) hozam: 34 %

4	2-klór-4-(2-fluor-6-metoxifenil)-pirimidin M _r számított: 238,031; [M+H] ⁺ : 239,1; Rt: 3,46 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,86 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,71 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,55 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 8,5 és 6,8 Hz, 1H); 7,06 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 0,6 és 0,6 Hz, 1H); 6,98 (ddd, <i>J</i> = 9,3, 8,5 és 0,6 Hz, 1H); 3,79 (s, 3H) hozam: 50 %
5	2-klór-4-(4,5-difluor-2-metoxifenil)-pirimidin M _r számított: 256,022; [M+H] ⁺ : 257,0; Rt: 3,85 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,80 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,09 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,96 (dd, <i>J</i> = 11,7 és 9,5 Hz, 1H); 7,44 (dd, <i>J</i> = 12,9 és 6,9 Hz, 1H); 3,92 (s, 3H) hozam: 62 %
6	2-klór-4-(2,3-difluor-6-metoxifenil)-pirimidin M _r számított: 256,022; [M+H] ⁺ : 257,1; Rt: 3,63 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,91 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,77 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,61 (ddd, <i>J</i> = 10,3, 9,4 és 9,4 Hz, 1H); 7,04 (ddd, <i>J</i> = 9,4, 3,6 és 2,0 Hz, 1H); 3,78 (s, 3H) hozam: 21 %
7	2-klór-4-(4-klór-2-metoxifenil)-pirimidin M _r számított: 254,001; [M+H] ⁺ : 255,0; Rt: 4,29 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,77 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,05 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,96 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H); 7,32 (d, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H); 7,19 (dd, <i>J</i> = 8,3 és 1,9 Hz, 1H); 3,94 (s, 3H) hozam: 38 %
8	2-klór-4-(2-klór-6-metoxifenil)-pirimidin M _r számított: 254,001; [M+H] ⁺ : 255,0; Rt: 3,72 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,89 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,65 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,51 (dd, <i>J</i> = 8,3 és 8,3 Hz, 1H); 7,20 (ddm, <i>J</i> = 8,3 és 0,9 Hz, 1H); 7,19 (ddm, <i>J</i> = 8,3 és 0,9 Hz, 1H); 3,75 (s, 3H) hozam: 30 %
9	2-klór-4-(2,4-dimetoxifenil)-pirimidin M _r számított: 250,051; [M+H] ⁺ : 251,1; Rt: 3,85 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,67 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,05 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,02 (dm, <i>J</i> ~ 7,0 Hz, 1H); 6,73 (dm, <i>J</i> ~ 2,0 Hz, 1H); 6,72 (ddm, <i>J</i> ~ 7,0 és 2,0 Hz, 1H); 3,93 (s, 3H); 3,86 (s, 3H) hozam: 83 %
10	2-klór-4-(2-etoxi-4-fluorfenil)-pirimidin M _r számított: 252,047; [M+H] ⁺ : 253,0; Rt: 4,28 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,76 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,09 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,03 (dd, <i>J</i> = 8,7 és 7,1 Hz, 1H); 7,13 (dd, <i>J</i> = 11,4 és 2,4 Hz, 1H); 6,96 (ddd, <i>J</i> = 8,7, 8,2 és 2,4 Hz, 1H); 4,20 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H); 1,40 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H) hozam: 49 %
11	2-klór-4-(2-etoxi-6-fluorfenil)-pirimidin M _r számított: 252,047; [M+H] ⁺ : 253,0; Rt: 3,79 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,86 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,72 (dd, <i>J</i> = 5,0 és 0,4 Hz, 1H); 7,51 (ddd, <i>J</i> = 8,4, 8,4 és 6,8 Hz, 1H); 7,03 (ddd, <i>J</i> = 8,4, 0,7 és 0,7 Hz, 1H); 6,95 (ddd, <i>J</i> = 9,6, 8,4 és 0,7 Hz, 1H); 4,08 (q, <i>J</i> = 7,0 Hz, 2H); 1,21 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H) hozam: 32 %
12	2-klór-4-(2-etoxi-4-klórfenil)-pirimidin M _r számított: 268,017; [M+H] ⁺ : 269,1; Rt: 4,23 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,79 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,10 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,98 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H); 7,30 (d, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H); 7,19 (dd, <i>J</i> = 8,4 és 1,9 Hz, 1H); 4,22 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H); 1,39 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H) hozam: 55 %
13	2-klór-4-(4-fluor-2-izopropoxifenil)-pirimidin M _r számított: 266,062; [M+H] ⁺ : 267,1; Rt: 4,52 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,76 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,07 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,01 (dd, <i>J</i> = 8,8 és 7,1 Hz, 1H); 7,17 (dd, <i>J</i> = 11,7 és 2,4 Hz, 1H); 6,94 (ddd, <i>J</i> = 8,8, 8,1 és 2,4 Hz, 1H); 4,84 (sp, <i>J</i> = 6,0 Hz, 1H); 1,34 (d, <i>J</i> = 6,0 Hz, 6H) hozam: 58 %
14	2-klór-4-(2-fluor-3-izopropoxifenil)-pirimidin M _r számított: 266,062; [M+H] ⁺ : 267,1; Rt: 4,34 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,86 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,93 (dd, <i>J</i> = 5,2 és 2,0 Hz, 1H); 7,52 (ddd, <i>J</i> = 8,1, 6,3 és 1,6 Hz, 1H); 7,41 (ddd, <i>J</i> = 8,1, 8,1 és 1,6 Hz, 1H); 7,30 (ddd, <i>J</i> = 8,1, 8,1 és 1,1 Hz, 1H); 4,70 (sp, <i>J</i> = 6,1 Hz, 1H); 1,32 (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 6H) hozam: 5 %
15	2-klór-4-[4-fluor-2-(metiltio)fenil]-pirimidin M _r számított: 254,008; [M+H] ⁺ : 255,0; Rt: 3,93 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,85 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,85 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,68 (dd, <i>J</i> = 8,5 és 6,1 Hz, 1H); 7,33 (dd, <i>J</i> = 10,4 és 2,4 Hz, 1H); 7,16 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,5 és 2,4 Hz, 1H); 2,48 (s, 3H) hozam: 41 %

16	2-klór-4-(4-fluor-2-metilfenil)-pirimidin M _r számított: 222,036; [M+H] ⁺ : 223,0; Rt: 3,87 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,83 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,77 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,61 (dd, <i>J</i> = 8,6 és 6,0 Hz, 1H); 7,26 (dd, <i>J</i> = 10,0 és 2,7 Hz, 1H); 7,21 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,6 és 2,7 Hz, 1H); 2,43 (s, 3H) hozam: 37 %
17	2-klór-4-(2,4-difluorfenil)-pirimidin M _r számított: 226,011; [M+H] ⁺ : 227,0; Rt: 3,91 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,87 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,13 (ddd, <i>J</i> = 9,1, 8,9 és 6,8 Hz, 1H); 7,92 (dd, <i>J</i> = 5,2 és 2,0 Hz, 1H); 7,51 (ddd, <i>J</i> = 11,8, 9,1 és 2,4 Hz, 1H); 7,32 (dddd, <i>J</i> ~ 8,9, 8,5, 2,4 és 1,0 Hz, 1H) hozam: 33 %
18	2-klór-4-(2,6-difluor-4-metoxifenil)-pirimidin M _r számított: 256,021; [M+H] ⁺ : 257,0; Rt: 3,71 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,88 (d, <i>J</i> = 5,1 Hz, 1H); 7,77 (dt, <i>J</i> = 5,1 és 1,5 Hz, 1H); 6,96 (dm, <i>J</i> = 10,7 Hz, 2H); 3,87 (s, 3H) hozam: 27 %
19	2-klór-4-(2-klór-4-fluorfenil)-pirimidin M _r számított: 241,981; [M+H] ⁺ : 243,0; Rt: 3,94 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,91 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,91 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,77 (dd, <i>J</i> = 8,7 és 6,2 Hz, 1H); 7,68 (dd, <i>J</i> = 8,9 és 2,5 Hz, 1H); 7,44 (ddd, <i>J</i> = 8,7, 8,4 és 2, Hz, 1H) hozam: 31 %
20	2-klór-4-(2,4-diklórfenil)-pirimidin M _r számított: 257,952; [M+H] ⁺ : 258,9; Rt: 4,35 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,92 (d, <i>J</i> = 5,1 Hz, 1H); 7,92 (d, <i>J</i> = 5,1 Hz, 1H); 7,85 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H); 7,73 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H); 7,63 (dd, <i>J</i> = 8,4 és 2,0 Hz, 1H) hozam: 17 %

A 21-69 vegyületek előállítására és analitikai jellemzőik:

Az adott intermedier 1 mmol mennyiségét (1-20 számú intermedierek), 0,50 ml sósavas dioxánt (4,0 M) és a megfelelő amin (4-amino-N-(3,4-dimetil-5-izoxazolil)-benzolszulfonamid/ 4-amino-N-(2-tiazolil)-benzolszulfonamid/ 4-amino-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-benzolszulfonamid/ 4-amino-N-(4,5-dimetilizoxazol-3-il)-benzolszulfonamid/ 4-amino-N-1,2-benzizoxazol-3-il-benzolszulfonamid/ 5-amino-4-fluor-2-metoxibenzoészav-amid/ 3-(1H benzimi-

dazol-1-ilmetil)anilin/ 4-(3,5-dimetilizoxazol-4-il)anilin) 1 mmol-ját feloldottuk 10 ml *tert*-butanolban, majd 130°C-on 5 órán keresztül kevertettük mikrohullámú reaktorban. A reakció végbe menetele után az elegyet szobahőmérsékletre hűtöttük és 20 ml 1M-os vizes NaH₂PO₄ oldattal hígítottuk. Háromszor extraháltuk 30-30 ml etil-acetáttal. A szerves fázisokat egyesítettük, majd mostuk telített NaCl oldattal és MgSO₄-tal vízmentesítettük. A szárítószer kiszűrése után az oldatot bepárooltuk és acetonitrilből kristályosítottuk.

21	N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-4-[[4-(2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-benzol-szulfonamid M _r számított: 451,131; [M+H] ⁺ : 452,1; [M-H] ⁻ : 450,1; Rt: 3,96 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,80 (br. s, 1H); 10,19 (s, 1H); 8,57 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,03 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,92 (dd, <i>J</i> = 7,7 és 1,4 Hz, 1H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,51 (ddd, <i>J</i> = 8,3, 7,3 és 1,4 Hz, 1H); 7,46 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,21 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H); 7,13 (dd, <i>J</i> = 7,7 és 7,3 Hz, 1H); 3,89 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 1,64 (s, 3H) hozam: 16 %
22	N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-4-[[4-(4-fluor-2-metoxifenil)-pirimidin-2-il]amino]-benzolszulfonamid M _r számított: 469,122; [M+H] ⁺ : 469,2; [M-H] ⁻ : 468,2; Rt: 4,06 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,80 (br. s, 1H); 10,20 (s, 1H); 8,57 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,01 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,98 (dd, <i>J</i> = 8,6 és 7,1 Hz, 1H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,45 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,12 (dd, <i>J</i> = 11,4 és 2,3 Hz, 1H); 6,98 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,3 és 2,3 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 1,65 (s, 3H) hozam: 21 %
23	N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-4-[[4-(5-fluor-2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-benzolszulfonamid M _r számított: 469,122; [M+H] ⁺ : 470,1; [M-H] ⁻ : 468,1; Rt: 4,04 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,80 (br. s, 1H); 10,22 (s, 1H); 8,61 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,00 (dm, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H); 7,75 (dd, <i>J</i> = 9,6 és 3,3 Hz, 1H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H); 7,51 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,36 (ddd, <i>J</i> = 9,2, 7,9 és 3,3 Hz, 1H); 7,24 (dd, <i>J</i> = 9,2 és 4,5 Hz, 1H); 3,89 (s, 3H); 2,07 (s, 3H); 1,64 (s, 3H) hozam: 8 %

24	N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-4-[[4-(2-fluor-6-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-benzolszulfonamid M _r számított: 469,122; [M+H] ⁺ : 470,2; [M-H] ⁻ : 468,2; Rt: 3,94 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,82 (br. s, 1H); 10,34 (s, 1H); 8,64 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,98 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,65 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,50 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 8,5 és 6,8 Hz, 1H); 7,06 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,04 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 0,6 és 0,6 Hz, 1H); 6,96 (ddd, <i>J</i> = 9,3, 8,5 és 0,6 Hz, 1H); 3,79 (s, 3H); 2,09 (s, 3H); 1,62 (s, 3H) hozam: 5 %
25	4-[[4-(4,5-difluor-2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 487,113; [M+H] ⁺ : 488,2; [M-H] ⁻ : 486,2; Rt: 4,15 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,80 (br. s, 1H); 10,18 (s, 1H); 8,61 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,99 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,55 (dd, <i>J</i> = 12,5 és 8,5 Hz, 1H); 7,68 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,50 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,39 (dd, <i>J</i> = 13,1 és 7,0 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 1,65 (s, 3H) hozam: 26 %
26	4-[[4-(2,3-difluor-6-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 487,113; [M+H] ⁺ : 488,1; [M-H] ⁻ : 486,2; Rt: 3,95 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,80 (br. s, 1H); 10,34 (s, 1H); 8,67 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,97 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,64 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,55 (ddd, <i>J</i> = 10,3, 9,4 és 9,4 Hz, 1H); 7,10 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,02 (ddd, <i>J</i> = 9,4, 3,6 és 2,0 Hz, 1H); 3,78 (s, 3H); 2,07 (s, 3H); 1,63 (s, 3H) hozam: 1 %
27	4-[[4-(4-klór-2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 485,092; [M+H] ⁺ : 486,1; [M-H] ⁻ : 484,1; Rt: 4,30 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,80 (br. s, 1H); 10,21 (s, 1H); 8,59 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,01 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,95 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,45 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,30 (d, <i>J</i> = 1,6 Hz, 1H); 7,21 (dd, <i>J</i> = 8,3 és 1,6 Hz, 1H); 3,92 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 1,65 (s, 3H) hozam: 28 %
28	4-[[4-(2-klór-6-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 485,092; [M+H] ⁺ : 486,0; [M-H] ⁻ : 483,9; Rt: 4,21 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,85 (br. s, 1H); 10,23 (s, 1H); 8,63 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,90 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,64 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,47 (dd, <i>J</i> = 8,3 és 8,3 Hz, 1H); 7,18 (ddm, <i>J</i> = 8,3 és 0,9 Hz, 1H); 7,16 (ddm, <i>J</i> = 8,3 és 0,9 Hz, 1H); 6,94 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 3,75 (s, 3H); 2,02 (s, 3H); 1,61 (s, 3H) hozam: 2 %
29	4-[[4-(2,4-dimetoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 481,142; [M+H] ⁺ : 482,3; [M-H] ⁻ : 480,3; Rt: 3,98 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,82 (br. s, 1H); 10,14 (s, 1H); 8,52 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,02 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 8,01 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,49 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 6,64 (dd, <i>J</i> = 8,4 és 2,2 Hz, 1H); 6,72 (d, <i>J</i> = 2,2 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 1,64 (s, 3H) hozam: 3 %
30	N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-4-[[4-(2-etoxi-4-fluorfenil)pirimidin-2-il]amino]-benzolszulfonamid M _r számított: 483,138; [M+H] ⁺ : 484,2; [M-H] ⁻ : 482,2; Rt: 4,31 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,80 (br. s, 1H); 10,18 (s, 1H); 8,58 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,03 (dd, <i>J</i> = 8,7 és 7,1 Hz, 1H); 8,01 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,51 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,12 (dd, <i>J</i> = 11,4 és 2,4 Hz, 1H); 6,98 (ddd, <i>J</i> = 8,7, 8,2 és 2,4 Hz, 1H); 4,19 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H); 2,08 (s, 3H); 1,65 (s, 3H); 1,38 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H) hozam: 18 %
31	N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-4-[[4-(2-etoxi-6-fluorfenil)pirimidin-2-il]amino]-benzolszulfonamid M _r számított: 483,138; [M+H] ⁺ : 484,1; [M-H] ⁻ : 482,2; Rt: 4,38 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,80 (br. s, 1H); 10,30 (s, 1H); 8,63 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,99 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,64 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,47 (ddd, <i>J</i> = 8,4, 8,4 és 6,8 Hz, 1H); 7,06 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,02 (ddd, <i>J</i> = 8,4, 0,7 és 0,7 Hz, 1H); 6,94 (ddd, <i>J</i> = 8,8, 8,4 és 0,7 Hz, 1H); 4,10 (q, <i>J</i> = 7,0 Hz, 2H); 2,07 (s, 3H); 1,63 (s, 3H); 1,22 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H) hozam: 6 %
32	4-[[4-(2-etoxifenil-4-klór)pirimidin-2-il]amino]-N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 499,108; [M+H] ⁺ : 500,2; [M-H] ⁻ : 498,3; Rt: 4,54 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,81 (br. s, 1H); 10,21 (s, 1H); 8,59 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,02 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,98 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,51 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,27 (d, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H); 7,20 (dd, <i>J</i> = 8,3 és 1,9 Hz, 1H); 4,2 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H); 2,08 (s, 3H); 1,64 (s, 3H); 1,38 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H) hozam: 18 %
33	N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-4-[[4-(4-fluor-2-izopropoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-benzolszulfonamid M _r számított: 497,153; [M+H] ⁺ : 498,2; [M-H] ⁻ : 496,2; Rt: 4,44 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,80 (br. s, 1H); 10,18 (s, 1H); 8,57 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,02 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 8,00 (dd, <i>J</i> = 8,8 és 7,1 Hz, 1H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,49 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,13 (dd, <i>J</i> = 11,7 és 2,4 Hz, 1H); 6,94 (ddd, <i>J</i> = 8,8, 8,1 és 2,4 Hz, 1H); 4,80 (sp, <i>J</i> = 6,0 Hz, 1H); 2,08 (s, 3H); 1,64 (s, 3H); 1,33 (d, <i>J</i> = 6,0 Hz, 6H) hozam: 7 %

34	N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-4-[[4-(2-fluor-3-izopropoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-benzolszulfonamid M _r számított: 497,153; [M+H] ⁺ : 498,2; [M-H] ⁻ : 496,2; Rt: 4,36 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,81 (br. s, 1H); 10,28 (s, 1H); 8,66 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,01 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,68 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,55 (ddd, <i>J</i> = 8,1, 6,3 és 1,6 Hz, 1H); 7,35 (ddd, <i>J</i> = 8,1, 8,1 és 1,6 Hz, 1H); 7,33 (dd, <i>J</i> = 5,2 és 2,1 Hz, 1H); 7,30 (ddd, <i>J</i> = 8,1, 8,1 és 1,1 Hz, 1H); 4,69 (sp, <i>J</i> = 6,1 Hz, 1H); 2,07 (s, 3H); 1,64 (s, 3H); 1,33 (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 6H) hozam: 9 %
35	N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-4-([4-(4-fluor-2-(metiltio)fenil]pirimidin-2-il]amino)-benzolszulfonamid M _r számított: 485,099; [M+H] ⁺ : 486,1; [M-H] ⁻ : 484,0; Rt: 4,13 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,80 (br. s, 1H); 10,26 (s, 1H); 8,64 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 8,03 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,65 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,59 (dd, <i>J</i> = 8,5 és 6,1 Hz, 1H); 7,29 (dd, <i>J</i> = 10,4 és 2,4 Hz, 1H); 7,17 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,13 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,5 és 2,4 Hz, 1H); 2,47 (s, 3H); 2,07 (s, 3H); 1,63 (s, 3H) hozam: 15 %
36	N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-4-[[4-(4-fluor-2-metilfenil]pirimidin-2-il]amino)-benzolszulfonamid M _r számított: 453,127; [M+H] ⁺ : 454,0; [M-H] ⁻ : 452,1; Rt: 4,45 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,81 (br. s, 1H); 10,26 (s, 1H); 8,63 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,99 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,57 (dd, <i>J</i> = 8,4 és 6,2 Hz, 1H); 7,27 (dd, <i>J</i> = 10,0 és 2,2 Hz, 1H); 7,18 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,4 és 2,3 Hz, 1H); 7,13 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 2,44 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 1,63 (s, 3H) hozam: 35 %
37	4-[[4-(2,4-difluorfenil]pirimidin-2-il]amino)-N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 457,102; [M+H] ⁺ : 458,2; [M-H] ⁻ : 456,2; Rt: 4,13 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,82 (br. s, 1H); 10,30 (s, 1H); 8,67 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,16 (ddd, <i>J</i> = 9,0, 8,8 és 6,8 Hz, 1H); 8,02 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,69 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,47 (ddd, <i>J</i> = 11,8, 9,0 és 2,6 Hz, 1H); 7,34 (dd, <i>J</i> = 5,3 és 2,3 Hz, 1H); 7,33 (ddd, <i>J</i> ~ 8,8, 8,5 és 2,6 Hz, 1H); 2,08 (s, 3H); 1,65 (s, 3H) hozam: 1 %
38	4-[[4-(2,6-difluor-4-metoxifenil]pirimidin-2-il]amino)-N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 487,113; [M+H] ⁺ : 488,1; [M-H] ⁻ : 486,0; Rt: 4,03 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,81 (br. s, 1H); 10,33 (s, 1H); 8,67 (d, <i>J</i> = 5,1 Hz, 1H); 7,99 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,65 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,13 (dt, <i>J</i> = 5,1 és 1,5 Hz, 1H); 6,96 (dm, <i>J</i> = 10,5 Hz, 2H); 3,86 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 1,64 (s, 3H) hozam: 23 %
39	4-[[4-(2-klór-4-fluorfenil]pirimidin-2-il]amino)-N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 473,072; [M+H] ⁺ : 474,0; [M-H] ⁻ : 472,0; Rt: 4,21 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,81 (br. s, 1H); 10,35 (s, 1H); 8,68 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 8,00 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,77 (dd, <i>J</i> = 8,7 és 6,2 Hz, 1H); 7,66 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,64 (dd, <i>J</i> = 8,9 és 2,5 Hz, 1H); 7,41 (ddd, <i>J</i> = 8,7, 8,4 és 2,5 Hz, 1H); 7,24 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 2,07 (s, 3H); 1,64 (s, 3H) hozam: 25 %
40	4-[[4-(2,4-diklórfenil]pirimidin-2-il]amino)-N-(3,4-dimetilizoxazol-5-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 489,043; [M+H] ⁺ : 490,0; [M-H] ⁻ : 488,0; Rt: 4,48 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,82 (br. s, 1H); 10,37 (s, 1H); 8,69 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 8,00 (dm, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H); 7,81 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H); 7,66 (dm, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H); 7,72 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H); 7,62 (dd, <i>J</i> = 8,4 és 2,0 Hz, 1H); 7,25 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 2,07 (s, 3H); 1,64 (s, 3H) hozam: 21 %
41	N-(4,5-dimetilizoxazol-3-il)-4-[[4-(2-metoxifenil]pirimidin-2-il]amino)-benzolszulfonamid M _r számított: 451,131; [M+H] ⁺ : 452,1; [M-H] ⁻ : 450,0; Rt: 4,05 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,43 (br. s, 1H); 10,12 (s, 1H); 8,56 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,47 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,92 (dd, <i>J</i> = 7,8 és 1,8 Hz, 1H); 7,76 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,51 (ddd, <i>J</i> = 8,3, 7,2 és 1,8 Hz, 1H); 7,45 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,21 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H); 7,14 (dd, <i>J</i> = 7,8 és 7,2 Hz, 1H); 3,89 (s, 3H); 2,21 (s, 3H); 1,78 (s, 3H) hozam: 6 %
42	N-(4,5-dimetilizoxazol-3-il)-4-[[4-(4-fluor-2-metoxifenil]pirimidin-2-il]amino)-benzolszulfonamid M _r számított: 469,122; [M+H] ⁺ : 470,0; [M-H] ⁻ : 468,0; Rt: 4,35 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,47 (br. s, 1H); 10,15 (s, 1H); 8,56 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,00 (dd, <i>J</i> = 8,6 és 7,1 Hz, 1H); 7,99 (dm, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H); 7,76 (dm, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H); 7,43 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,12 (dd, <i>J</i> = 11,3 és 2,5 Hz, 1H); 6,98 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,2 és 2,5 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 2,21 (s, 3H); 1,78 (s, 3H) hozam: 21 %
43	N-1,2-benzizoxazol-3-il-4-[[4-(4-fluor-2-metoxifenil]pirimidin-2-il]amino)-benzolszulfonamid M _r számított: 491,106; [M+H] ⁺ : 492,0; [M-H] ⁻ : 490,0; Rt: 4,37 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 11,77 (br. s, 1H); 10,17 (s, 1H); 8,55 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,00 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,99 (dd, <i>J</i> = 8,5 és 7,1 Hz, 1H); 7,97 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H); 7,87 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,59-7,65 (ovl. m, 2H); 7,43 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,36 (ddd, <i>J</i> = 8,0, 5,8 és 2,3 Hz, 1H); 7,12 (dd, <i>J</i> = 11,5 és 2,5 Hz, 1H); 6,97 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 8,2 és 2,5 Hz, 1H); 3,90 (s, 3H) hozam: 7 %

44	4-[[4-(2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-1,3-tiazol-2-il-benzolszulfonamid M _r számított: 439,077; [M+H] ⁺ : 440,2; [M-H] ⁻ : 438,2; Rt: 3,47 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 12,55 (br. s, 1H); 10,04 (s, 1H); 8,54 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,96 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,91 (dd, <i>J</i> = 7,7 és 1,5 Hz, 1H); 7,71 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,50 (ddd, <i>J</i> = 8,3, 7,3 és 1,5 Hz, 1H); 7,42 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,22 (d, <i>J</i> = 4,6 Hz, 1H); 7,20 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H); 7,13 (dd, <i>J</i> = 7,7 és 7,3 Hz, 1H); 6,79 (d, <i>J</i> = 4,6 Hz, 1H); 3,88 (s, 3H) hozam: 43 %
45	4-[[4-(4-fluor-2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-1,3-tiazol-2-il-benzolszulfonamid M _r számított: 457,068; [M+H] ⁺ : 458,2; [M-H] ⁻ : 456,2; Rt: 3,59 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 10,03 (s, 1H); 8,54 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,00 (dd, <i>J</i> = 8,6 és 7,2 Hz, 1H); 7,93 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,71 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,41 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,20 (d, <i>J</i> = 4,5 Hz, 1H); 7,10 (dd, <i>J</i> = 11,5 és 2,4 Hz, 1H); 6,97 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,3 és 2,4 Hz, 1H); 6,77 (d, <i>J</i> = 4,5 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H) hozam: 5 %
46	4-[[4-(2-fluor-6-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-1,3-tiazol-2-il-benzolszulfonamid M _r számított: 457,069; [M+H] ⁺ : 458,0; [M-H] ⁻ : 456,0; Rt: 3,71 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 12,55 (br. s, 1H); 10,13 (s, 1H); 8,59 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,88 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,69 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,49 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 8,5 és 6,8 Hz, 1H); 7,19 (d, <i>J</i> = 4,5 Hz, 1H); 7,03 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1H); 7,00 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 6,95 (ddd, <i>J</i> = 9,3 és 8,5 Hz, 1H); 6,76 (d, <i>J</i> = 4,5 Hz, 1H); 3,79 (s, 3H) hozam: 2 %
47	4-[[4-(2-etoxi-4-fluorfenil)pirimidin-2-il]amino]-N-1,3-tiazol-2-il-benzolszulfonamid M _r számított: 471,083; [M+H] ⁺ : 472,0; [M-H] ⁻ : 470,0; Rt: 3,80 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 12,60 (br. s, 1H); 10,05 (s, 1H); 8,54 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,02 (dd, <i>J</i> = 8,7 és 7,1 Hz, 1H); 7,94 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,72 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,49 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,22 (d, <i>J</i> = 4,5 Hz, 1H); 7,09 (dd, <i>J</i> = 11,4 és 2,4 Hz, 1H); 6,96 (ddd, <i>J</i> = 8,7, 8,2 és 2,4 Hz, 1H); 6,79 (d, <i>J</i> = 4,5 Hz, 1H); 4,18 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H); 1,38 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H) hozam: 39 %
48	4-[[4-(2-etoxifenil-4-klór)pirimidin-2-il]amino]-N-1,3-tiazol-2-il-benzolszulfonamid M _r számított: 487,054; [M+H] ⁺ : 488,2; [M-H] ⁻ : 486,2; Rt: 4,05 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 12,60 (br. s, 1H); 10,07 (s, 1H); 8,56 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,97 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1H); 7,94 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,72 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,47 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,46 (d, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H); 7,22 (d, <i>J</i> = 4,6 Hz, 1H); 7,20 (dd, <i>J</i> = 8,5 és 1,9 Hz, 1H); 6,79 (d, <i>J</i> = 4,6 Hz, 1H); 4,20 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H); 1,37 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H) hozam: 56 %
49	4-[[4-(2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 454,088; [M+H] ⁺ : 455,0; [M-H] ⁻ : 453,0; Rt: 3,88 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 13,80 (br. s, 1H); 10,08 (s, 1H); 8,55 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,98 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,91 (dd, <i>J</i> = 7,7 és 1,8 Hz, 1H); 7,70 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,51 (ddd, <i>J</i> = 8,3, 7,3 és 1,8 Hz, 1H); 7,43 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,20 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H); 7,13 (dd, <i>J</i> = 7,7 és 7,3 Hz, 1H); 3,88 (s, 3H); 2,46 (s, 3H) hozam: 11 %
50	4-[[4-(4-fluor-2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 472,079; [M+H] ⁺ : 473,2; [M-H] ⁻ : 471,2; Rt: 3,77 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 13,80 (br. s, 1H); 10,09 (s, 1H); 8,55 (d, <i>J</i> = 5,1 Hz, 1H); 7,98 (dd, <i>J</i> = 8,6 és 7,1 Hz, 1H); 7,96 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,70 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,42 (d, <i>J</i> = 5,1 Hz, 1H); 7,12 (dd, <i>J</i> = 11,3 és 2,3 Hz, 1H); 6,98 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,3 és 2,3 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 2,46 (s, 3H) hozam: 27 %
51	4-[[4-(5-fluor-2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 472,079; [M+H] ⁺ : 473,0; [M-H] ⁻ : 471,0; Rt: 3,72 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 13,81 (br. s, 1H); 10,11 (s, 1H); 8,59 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,96 (dm, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H); 7,74 (dd, <i>J</i> = 9,6 és 3,3 Hz, 1H); 7,71 (dm, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H); 7,48 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,36 (ddd, <i>J</i> = 9,2, 7,9 és 3,3 Hz, 1H); 7,23 (dd, <i>J</i> = 9,2 és 4,5 Hz, 1H); 3,88 (s, 3H); 2,46 (s, 3H) hozam: 15 %
52	4-[[4-(2-fluor-6-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 472,079; [M+H] ⁺ : 473,0; [M-H] ⁻ : 471,1; Rt: 3,58 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 13,81 (br. s, 1H); 10,19 (s, 1H); 8,60 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,92 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,68 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,50 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 8,5 és 6,8 Hz, 1H); 7,03 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 0,6 és 0,6 Hz, 1H); 7,01 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 6,95 (ddd, <i>J</i> = 9,3, 8,5 és 0,6 Hz, 1H); 3,79 (s, 3H); 2,45 (s, 3H) hozam: 5 %
53	4-[[4-(4,5-difluor-2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 490,069; [M+H] ⁺ : 491,0; [M-H] ⁻ : 489,1; Rt: 3,86 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 13,50 (br. s, 1H); 10,10 (s, 1H); 8,58 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,98 (dd, <i>J</i> = 11,7 és 9,5 Hz, 1H); 7,94 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,70 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,47 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,38 (dd, <i>J</i> = 12,9 és 6,9 Hz, 1H); 3,90 (s, 3H); 2,45 (s, 3H) hozam: 39 %

54	4-[[4-(2,3-difluor-6-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 490,069; [M+H] ⁺ : 491,0; [M-H] ⁻ : 488,9; Rt: 3,98 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 13,80 (br. s, 1H); 10,23 (s, 1H); 8,64 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,92 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,69 (dm, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H); 7,55 (ddd, <i>J</i> = 10,3, 9,4 és 9,4 Hz, 1H); 7,07 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,01 (ddd, <i>J</i> = 9,4, 3,6 és 2,0 Hz, 1H); 3,78 (s, 3H); 2,45 (s, 3H) hozam: 7 %
55	4-[[4-(2,4-dimetoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 484,099; [M+H] ⁺ : 485,1; [M-H] ⁻ : 483,1; Rt: 3,69 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 13,80 (br. s, 1H); 10,00 (s, 1H); 8,49 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,01 (dm, <i>J</i> ~ 8,5 Hz, 1H); 7,97 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,70 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,45 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 6,74 (ddm, <i>J</i> ~ 8,5 és 2,0 Hz, 1H); 6,72 (dm, <i>J</i> ~ 2,0 Hz, 1H); 3,90 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 2,46 (s, 3H) hozam: 12 %
56	4-[[4-(2-etoxi-4-fluorfenil)pirimidin-2-il]amino]-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 486,094; [M+H] ⁺ : 487,0; [M-H] ⁻ : 485,0; Rt: 4,21 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 13,80 (br. s, 1H); 10,06 (s, 1H); 8,55 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,02 (dd, <i>J</i> = 8,7 és 7,1 Hz, 1H); 7,97 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,70 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,48 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,09 (dd, <i>J</i> = 11,4 és 2,4 Hz, 1H); 6,96 (ddd, <i>J</i> = 8,7, 8,2 és 2,4 Hz, 1H); 4,18 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H); 2,46 (s, 3H); 1,38 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H) hozam: 26 %
57	4-[[4-(2-etoxifenil-4-klór)pirimidin-2-il]amino]-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-benzolszulfonamid M _r számított: 502,065; [M+H] ⁺ : 503,0; [M-H] ⁻ : 501,0; Rt: 4,53 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 13,70 (br. s, 1H); 10,02 (s, 1H); 8,55 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,98 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H); 7,91 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H); 7,47 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,26 (d, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H); 7,20 (dd, <i>J</i> = 8,4 és 1,9 Hz, 1H); 4,20 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H); 2,42 (s, 3H); 1,37 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H) hozam: 5 %
58	4-fluor-2-metoxi-5-[[4-(2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-benzamid M _r számított: 368,129; [M+H] ⁺ : 369,2; [M-H] ⁻ : 367,4; Rt: 3,24 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,98 (s, 1H); 8,38 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,12 (d, <i>J</i> = 9,4 Hz, 1H); 7,86 (dd, <i>J</i> = 7,7 és 1,8 Hz, 1H); 7,53 (br. s, 1H); 7,39 (br. s, 1H); 7,45 (ddd, <i>J</i> = 8,3, 7,3 és 1,8 Hz, 1H); 7,31 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,17 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H); 7,12 (d, <i>J</i> = 13,0 Hz, 1H); 7,04 (dd, <i>J</i> = 7,7 és 7,3 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 3,86 (s, 3H) hozam: 7 %
59	4-fluor-5-[[4-(4-fluor-2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-2-metoxi-benzamid M _r számított: 386,119; [M+H] ⁺ : 387,1; [M-H] ⁻ : 385,3; Rt: 3,40 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 9,00 (s, 1H); 8,38 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,12 (d, <i>J</i> = 9,5 Hz, 1H); 7,94 (dd, <i>J</i> = 8,6 és 7,3 Hz, 1H); 7,60 (br. s, 1H); 7,54 (br. s, 1H); 7,30 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,12 (d, <i>J</i> = 12,7 Hz, 1H); 7,07 (dd, <i>J</i> = 11,5 és 2,3 Hz, 1H); 6,87 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,2 és 2,3 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 3,89 (s, 3H) hozam: 32 %
60	4-fluor-5-[[4-(2-fluor-6-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-2-metoxi-benzamid M _r számított: 386,119; [M+H] ⁺ : 387,2; [M-H] ⁻ : 385,3; Rt: 3,18 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 9,09 (s, 1H); 8,40 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 7,97 (d, <i>J</i> = 9,3 Hz, 1H); 7,58 (br. s, 1H); 7,52 (br. s, 1H); 7,45 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 8,5 és 6,8 Hz, 1H); 7,10 (d, <i>J</i> = 12,4 Hz, 1H); 6,98 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 0,6 és 0,6 Hz, 1H); 6,90 (ddd, <i>J</i> = 9,3, 8,5 és 0,6 Hz, 1H); 6,82 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 3,90 (s, 3H); 3,76 (s, 3H) hozam: 13 %
61	5-[[4-(4,5-difluor-2-metoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-4-fluor-2-metoxi-benzamid M _r számított: 404,110; [M+H] ⁺ : 405,2; [M-H] ⁻ : 403,2; Rt: 3,55 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 9,07 (s, 1H); 8,43 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,13 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H); 7,91 (dd, <i>J</i> = 11,6 és 9,5 Hz, 1H); 7,60 (br. s, 1H); 7,55 (br. s, 1H); 7,38 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,35 (dd, <i>J</i> = 12,9 és 6,9 Hz, 1H); 7,14 (d, <i>J</i> = 12,6 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 3,89 (s, 3H) hozam: 23 %
62	5-[[4-(2-etoxi-4-fluorfenil)pirimidin-2-il]amino]-4-fluor-2-metoxi-benzamid M _r számított: 400,135; [M+H] ⁺ : 401,2; [M-H] ⁻ : 399,2; Rt: 3,68 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,99 (s, 1H); 8,39 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,12 (d, <i>J</i> = 9,5 Hz, 1H); 7,97 (dd, <i>J</i> = 8,7 és 7,1 Hz, 1H); 7,60 (br. s, 1H); 7,54 (br. s, 1H); 7,38 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,12 (d, <i>J</i> = 12,5 Hz, 1H); 7,05 (dd, <i>J</i> = 11,4 és 2,4 Hz, 1H); 6,86 (ddd, <i>J</i> = 8,7, 8,2 és 2,4 Hz, 1H); 4,16 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H); 3,91 (s, 3H); 1,38 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H) hozam: 21 %
63	5-[[4-(2-etoxi-4-klór)fenil]pirimidin-2-il]amino]-4-fluor-2-metoxi-benzamid M _r számított: 416,105; [M+H] ⁺ : 417,2; [M-H] ⁻ : 415,2; Rt: 3,95 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 9,02 (s, 1H); 8,40 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,13 (d, <i>J</i> = 9,5 Hz, 1H); 7,93 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H); 7,60 (br. s, 1H); 7,54 (br. s, 1H); 7,38 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,22 (d, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H); 7,12 (d, <i>J</i> = 12,5 Hz, 1H); 7,09 (dd, <i>J</i> = 8,4 és 1,9 Hz, 1H); 4,18 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H); 3,91 (s, 3H); 1,37 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H) hozam: 10 %

64	4-fluor-5-[[4-(4-fluor-2-izopropoxifenil)pirimidin-2-il]amino]-2-metoxi-benzamid M. számított: 414,150; [M+H] ⁺ : 415,2; [M-H] ⁻ : 413,3; Rt: 3,83 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 8,97 (s, 1H); 8,38 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 8,12 (d, <i>J</i> = 9,5 Hz, 1H); 7,95 (dd, <i>J</i> = 8,8 és 7,1 Hz, 1H); 7,60 (br. s, 1H); 7,54 (br. s, 1H); 7,36 (d, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H); 7,12 (d, <i>J</i> = 12,8 Hz, 1H); 7,07 (dd, <i>J</i> = 11,5 és 2,3 Hz, 1H); 6,84 (ddd, <i>J</i> = 8,8, 8,2 és 2,3 Hz, 1H); 4,77 (sp, <i>J</i> = 6,0 Hz, 1H); 3,90 (s, 3H); 1,31 (d, <i>J</i> = 6,0 Hz, 6H) hozam: 10 %
65	5-[[4-(2,4-difluorfenil)pirimidin-2-il]amino]-4-fluor-2-metoxi-benzamid M. számított: 374,099; [M+H] ⁺ : 375,1; [M-H] ⁻ : 373,2; Rt: 3,53 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 9,18 (s, 1H); 8,48 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,11 (d, <i>J</i> = 9,4 Hz, 1H); 8,08 (ddd, <i>J</i> = 9,0, 8,8 és 6,8 Hz, 1H); 7,61 (br. s, 1H); 7,56 (br. s, 1H); 7,41 (ddd, <i>J</i> = 11,7, 9,2 és 2,5 Hz, 1H); 7,23 (ddd, <i>J</i> ~ 8,8, 8,5 és 2,5 Hz, 1H); 7,17 (dd, <i>J</i> = 5,2 és 2,3 Hz, 1H); 7,14 (d, <i>J</i> = 12,8 Hz, 1H); 3,92 (s, 3H) hozam: 24 %
66	N-[3-(1H-benzimidazol-1-ilmetil)fenil]-4-(2-metoxifenil)-pirimidin-2-amin M. számított: 407,175; [M+H] ⁺ : 408,1; [M-H] ⁻ : 406,1; Rt: 3,52 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 9,63 (s, 1H); 8,45 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,36 (s, 1H); 7,88 (dd, <i>J</i> = 7,7 és 1,8 Hz, 1H); 7,84 (dd, <i>J</i> ~ 1,5 és 1,5 Hz, 1H); 7,71 (dm, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H); 7,65 (m, 1H); 7,50 (ddd, <i>J</i> = 8,3, 7,2 és 1,8 Hz, 1H); 7,48 (m, 1H); 7,33 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,25 (dd, <i>J</i> = 8,1 és 7,6 Hz, 1H); 7,19 (dd, <i>J</i> = 8,3 és 1,0 Hz, 1H); 7,15-7,22 (ovl. m, 2H); 7,14 (ddd, <i>J</i> = 7,7, 7,2 és 1,0 Hz, 1H); 6,87 (dm, <i>J</i> = 7,6 Hz, 1H); 5,47 (s, 2H); 3,87 (s, 3H) hozam: 12 %
67	N-[3-(1H-benzimidazol-1-ilmetil)fenil]-4-(4-fluor-2-metoxifenil)-pirimidin-2-amin M. számított: 425,165; [M+H] ⁺ : 426,1; [M-H] ⁻ : 424,1; Rt: 3,56 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 9,63 (s, 1H); 8,44 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 8,36 (s, 1H); 7,93 (dd, <i>J</i> = 8,7 és 7,2 Hz, 1H); 7,82 (dd, <i>J</i> = 1,7 és 1,7 Hz, 1H); 7,67 (dm, <i>J</i> = 7,9 Hz, 1H); 7,65 (m, 1H); 7,48 (m, 1H); 7,25 (dd, <i>J</i> = 7,9 és 7,9 Hz, 1H); 7,14-7,21 (ovl. m, 2H); 7,32 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,10 (dd, <i>J</i> = 11,4 és 2,5 Hz, 1H); 6,98 (ddd, <i>J</i> = 8,7, 8,1 és 2,5 Hz, 1H); 6,88 (dm, <i>J</i> = 7,9 Hz, 1H); 5,48 (s, 2H); 3,90 (s, 3H) hozam: 14 %
68	N-[3-(1H-benzimidazol-1-ilmetil)fenil]-4-(2-fluor-6-metoxifenil)-pirimidin-2-amin M. számított: 425,165; [M+H] ⁺ : 426,1; [M-H] ⁻ : 424,1; Rt: 3,17 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 9,74 (s, 1H); 8,49 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 8,33 (s, 1H); 7,77 (dd, <i>J</i> = 1,6 és 1,6 Hz, 1H); 7,68 (dm, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H); 7,64 (m, 1H); 7,48 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 8,5 és 6,7 Hz, 1H); 7,47 (m, 1H); 7,22 (dd, <i>J</i> = 8,0 és 7,5 Hz, 1H); 7,12-7,21 (ovl. m, 2H); 7,02 (ddd, <i>J</i> = 8,5, 0,6 és 0,6 Hz, 1H); 6,94 (ddd, <i>J</i> = 9,3, 8,5 és 0,6 Hz, 1H); 6,89 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H); 6,83 (dm, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1H); 5,44 (s, 2H); 3,78 (s, 3H) hozam: 7 %
69	N-[4-(3,5-dimetilizoxazol-4-il)fenil]-4-(4-fluor-2-metoxifenil)-pirimidin-2-amin M. számított: 390,149; [M+H] ⁺ : 391,3; [M-H] ⁻ : 389,2; Rt: 4,45 ¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 9,76 (s, 1H); 8,50 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,98 (dd, <i>J</i> = 8,6 és 7,1 Hz, 1H); 7,91 (dm, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H); 7,33 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H); 7,30 (dm, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H); 7,12 (dd, <i>J</i> = 11,4 és 2,4 Hz, 1H); 6,96 (ddd, <i>J</i> = 8,6, 8,2 és 2,4 Hz, 1H); 3,91 (s, 3H); 2,40 (s, 3H); 2,22 (s, 3H) hozam: 7 %

IRODALOM

- Smith, L., et al.: *BMJ Open*. doi: 10,1136/bmjopen-2015-009576 (2015).
- Gozetti, A., et al.: *Oncol*. 4, 1-5 (2014).
- Bladé, J., et al.: *Oncol. Clin. N. Am.* 21, 1231-1246 (2007).
- Greenberg, A. J., et al.: *Blood*. 119, 5359-5366 (2018).
- Bianchi, G., et al.: *CA-Cancer J. Clin.* 64, 423-444 (2014).
- Morgan, G. J., et al.: *Nat. Rev. Cancer*. 12, 335-348 (2012).
- Pieper, K., et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.-Pract.* 131, 959-971 (2013).
- Vacca, A., et al.: *Chem.Immunol.* 99, 180-196 (2014).
- Chang, X., et al.: *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 46, 240-253 (2013).
- Manohar, S. M., et al.: *Leuk. Res.* 35, 821-830 (2011).
- Álvarez-Fernández, S., et al.: *Clin. Cancer Res.* 19, 2677-2687 (2013).
- Natoni, A., et al.: *Cancers*. 5, 901-918 (2013).
- Chohan, T. A., et al.: *Curr. Med. Chem.* 22, 237-263 (2015).
- Kelso, T. W. R., et al.: *Mol. Cell. Biol.* 34, 3675-3688 (2014).
- Chipumuro, E., et al.: *Cell*. 159, 1126-1139 (2014).
- Thrippeton, M. J., et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3938-3941 (2003).
- Boros, S., et al.: *Magn. Reson. Chem.* 54, 947-952 (2016).

Érkezett: 2018. február 27.

Szerves szelénvegyületek mint daganatellenes szerek: kísérleti eredmények *in vitro* vastagbél adenokarcinóma modellen

GAJDÁCS MÁRIÓ^{1*}, HANDZLIK JADWIGA², SANMARTÍN CARMEN³, DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ ENRIQUE⁴, SPENGLER GABRIELLA¹

¹SZTE ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, 6720 Szeged, Dóm tér 10.

²Jagelló Egyetem Orvostudományi Kar, Gyógyszertechnológiai és Biotechnológiai Tanszék, 30-688 Kraków, Medyczna 9.

³Navarrai Egyetem Gyógyszerkémiai Intézet, 31010 Pamplona, Irunlarrea 1.

⁴Spanyol Nemzeti Kutatási Tanács, Szerves Kémiai Intézet, 28006 Madrid, Juan de la Cierva 3.

*Levelező szerző: gajdacs.mario@med.u-szeged.hu

Summary

GAJDÁCS, M., HANDZLIK, J., SANMARTÍN, C., DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, E., SPENGLER, G.: **Organoselenium compounds as anti-tumor agents: *in vitro* evaluation on a colon cancer model system**

Introduction: The overexpression of efflux pumps on cancer cells is one of the hallmarks of multidrug resistance (MDR). Selenium (both as a trace element and its derivatives) has important roles in various biological processes. Selenium-based compounds as anticancer agents have attracted reasonable attention. It has been described that they possess cytotoxic properties and they can influence inflammatory processes, oxidative stress, and immune response.

Aims: The aim of our study was the biological evaluation of novel organoselenium compounds using human colonic adenocarcinoma cell lines as an *in vitro* model system.

Methods: Cytotoxicity of the tested compounds was assessed with MTT method, and the effect of verapamil on the cytotoxicity of these compounds was also evaluated. The efficacy of the compounds to inhibit the ABCB1 efflux pump was measured using rhodamine 123 accumulation assay using flow cytometry.

Results: The tested seleno compounds showed potent cytotoxic activity and were able to inhibit the activity of the ABCB1 transporter by increasing the amount of rhodamine 123 accumulated inside of the cells. The cytotoxicity of the tested compounds was not considerably altered after treatment with verapamil.

Conclusion: Since the compounds 1 and 9-11 showed promising anticancer and efflux pump inhibitory activities, they could be of future interest in synthesizing additional antitumor derivatives or adjuvants in experimental oncopharmacology.

Keywords: seleno compounds, colon adenocarcinoma, antitumor, efflux pump, verapamil

Összefoglalás

Bevezetés: A különböző efflux pumpa fehérjék túlzott kifejeződését a daganatsejtekben a multidrog rezisztencia (MDR) egyik legfontosabb mechanizmusának tekinthetjük. A szelén mint nyomelem, valamint szerves és szervetlen vegyületei formájában egyaránt fontos szerepet játszik különböző biológiai folyamatokban. Számos kutatási eredmény áll rendelkezésre a szelén alapú vegyületek hatékonyságára vonatkozóan: lehetnek citotoxikus hatású szerek, befolyásolhatják a gyulladást és immunválaszt, illetve modulálhatják az oxidatív stresszt.

Célkitűzés: Alábbi munkánk célja újszerű szerkezeti tulajdonságokkal rendelkező szerves szelénvegyületek biológiai hatásának vizsgálata *in vitro* humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonal, mint modellrendszer felhasználásával.

Módszerek: A szelénvegyületek citotoxikus hatását MTT módszerrel határoztuk meg, illetve vizsgáltuk, hogyan változik a vegyületek daganatellenes hatása verapamil hatására. Az ABCB1 multidrog efflux pumpa gátlás hatékonyságát rhodamin 123 akkumuláción alapuló áramlási citometriás módszerrel mértük.

Eredmények: A vizsgált vegyületek erős citotoxikus hatással rendelkeztek, és képesek voltak gátolni az ABCB1 pumpa működését, megnövelve a rhodamin 123 intracelluláris mennyiségét. Verapamil hatására nem változtak számottevően a vegyületek IC₅₀ értékei a citotoxicitási vizsgálatban.

Következtetések: Mivel az 1 és 9-11 származékok ígéretes daganatellenes és efflux pumpa gátló hatással rendelkeznek, a jövőben vezérmolekulák lehetnek daganatellenes hatású vagy adjuváns származékok szintéziséhez és további kísérletek tervezéséhez.

Kulcsszavak: szelénvegyületek, vastagbél adenokarcinóma, antitumor, efflux pumpa, verapamil

1. Bevezetés

A szelén a periódusos rendszer VI.A főcsoportjában (oxigéncsoport, kalkogének) található, elemi állapotban sötétvörös színű nemfém. A 20. század közepéig csupán potenciálisan toxikus anyagként

tartották számon, csak később ismerték fel, hogy a szelén, illetve szerves és szervetlen származékai szerepet játszanak több, létfontosságú biológiai folyamatban. A szelénnel kapcsolatos érdeklődés akkor vált kifejezetté, mikor kimutatták, hogy hiányában különböző patológiás folyamatok mennek

végbe az emberi szervezetben (Keshan-kór, Kashin-Beck-kór) [1]. Több olyan növényfaj (például *Brassicaceae*, *Alliaceae* család tagjai) tartalmaz nagy mennyiségben szerves szelénvegyületeket, amely közismerten jótékony hatással bírnak különböző betegségek (szív- és érrendszeri kórképek, ízületi gyulladás) megelőzésében, ezen felül epidemiológiai vizsgálatok bizonyították az elemi szelén jelentőségét a prosztatata-, nyelőcső- és a tüdőrák incidenciájának csökkentésében [2]. Az emlős szervezetek is tartalmazzák a szelén származékait, legnagyobb mennyiségben szelenoproteinek (szelenocisztein, szelenometionin) formájában. A szelénvegyületek különböző inkorporációs mechanizmusokon (szelént tartalmazó fehérjék) és metabolikus-exkréciós utakon (többek között tüdön keresztül kilélegezve, kiválasztva a vizelettel) keresztül fontos részét képezik szervezetünk biokémiai homeosztázisának [3]. A szelénvegyületek idővel a tudományos szakirodalom érdeklődési körébe kerültek sokoldalú biológiai tulajdonságaik miatt. Számos kutatási eredmény áll rendelkezésre az elemi szelén és a szelénvegyületek hatékonyságára vonatkozóan, mint sejtosztódást gátló, citotoxikus, apoptózist indukáló vegyületek, emellett a reaktív oxigén intermedierek (ROS) szintjének modulálása, gyulladáshoz vezető mediátorok és immunválasz befolyásolása, illetve a gyógyszerrezisztencia csökkentése területén is ígéretes anyagoknak bizonyultak [4-7]. A reumatoid arthritis kezelésében jól ismert, hogy adjuvánsként gyakran ajánlják a szelén bevitelét, kutatják továbbá szerepét a Hashimoto-thyreoiditis kezelésében, mivel egyesek szerint kedvező mellékhatás profilal rendelkező hatékony terápiás szer lehetne [8]. A szakirodalom leírja továbbá, hogy szelénvegyületek hatását sok tényező befolyásolja. Függ a vegyületek koncentrációjától (hatékonyságuk gyakran U-alakú görbét vesz fel), kémiai formájától (szervetlen vagy szerves származék, a molekula a szelénatomot milyen funkciócsoportok kíséretében tartalmazza) és a szervezet vagy vizsgálati modell metabolikus aktivitásától is [3, 4].

Az ATP-kötő kazetta (ABC; ATP-binding cassette) transzporter család rendkívül jelentős és elterjedt csoportja a transzportfunkciót ellátó fehérjéknek. Integrális membránproteinek, működésük során az ATP hidrolíziséből felszabaduló energiát használják fel arra, hogy a szállítófehérjét kifejező sejtből eltávolítsanak különböző anyagcsere termékeket és xenobiotikumokat, így töltik be fiziológiai szerepüket. Ezek a sejtek számára idegen, mesterséges anyagok lehetnek különböző vegyi anyagok,

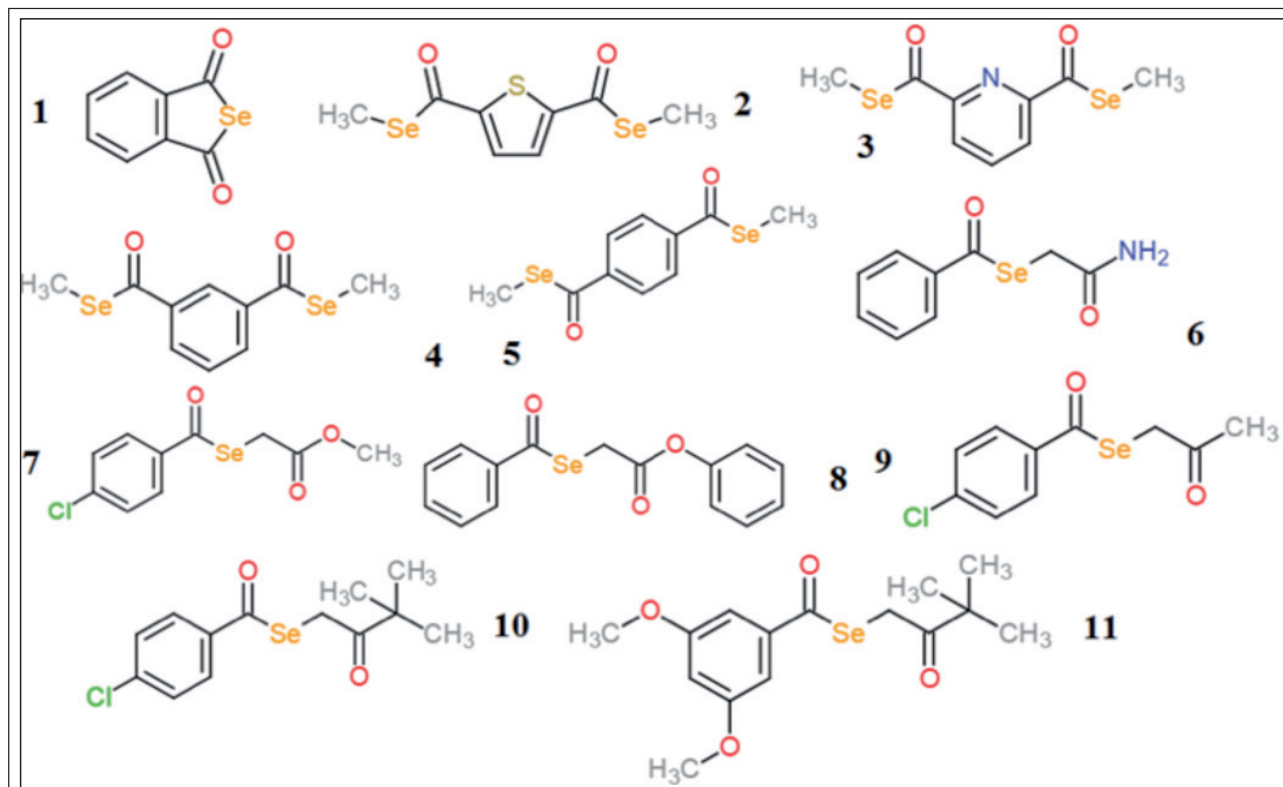
élelmiszer-adalékok és gyógyszerek [9]. Felépítésüket tekintve két legfontosabb szerkezeti elemüknek az ATP megkötésére szolgáló nukleotid kötő és a transzlokációs utat biztosító transzmembrán doméneket tekinthetjük. Májig közel 50 különböző fajta humán ABCB1 transzportert írtak le, rendkívüli jelentőséggel bírnak különböző fiziológiai folyamatok és barrier rendszerek fenntartásában, egyes betegségek (pl. cisztás fibrózis) patomechanizmusában és a daganatsejtek terápia rezisztenciájában egyaránt [10]. Az ABC transzporterek egyik legfontosabb és legszélesebb körben tanulmányozott tagja az ABCB1 (P-glikoprotein, Pgp-170). Az ATP hidrolízise által szolgáltatott energia segítségével endogén és exogén (a rezisztencia szempontjából jelentős) szubsztrátokat pumpál ki a sejtéből. Rákos sejtek esetén flexibilis szubsztrátkötő helyének köszönhetően többféle, különböző kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú kemoterápiás szer kipumpálására képes (szubsztrátjai közé tartoznak pl. a vinka alkaloidok, antraciklinek, taxánok, topotekán, doxorubicin stb.) [11]. Működése során konformáció változáson megy keresztül, a fehérje kifelé nyitott állapotba kerül, és megtörténik a szubsztrát eltávolítása [12]. Klinikai szempontból kiemelt jelentőséggel rendelkezik továbbá az MRP1 (multidrug resistance-associated protein), melynek jelenléte prognosztikai jelentőségű tüdő-, vastagbél- és mellrákban [13]. Azokat a vegyületeket, amelyek képesek gátolni ezen transzporterek funkcióját, efflux pumpa gátlóknak (efflux pump inhibitor, EPI) nevezzük. Feltörekvő kutatási irányvonalnak tekinthető és terápiás stratégia lehet az efflux pumpa gátlók adjuvánsként történő alkalmazása, a daganatterápia hatékonyságának növelése érdekében [14, 15].

Kutatásunk célja újonnan szintetizált, különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező szelénvegyületek (egy ciklikus szelenoanhidrid és tíz szelenoészter származék) biológiai aktivitásának feltárása. Vizsgálatunk során célul tűztük ki, hogy meghatározzuk, milyen hatással bírnak ezek a vegyületek humán eredetű daganatsejtek osztódására, illetve mekkora hatékonysággal rendelkeznek az efflux pumpa eredetű rezisztencia mechanizmus visszafordításában.

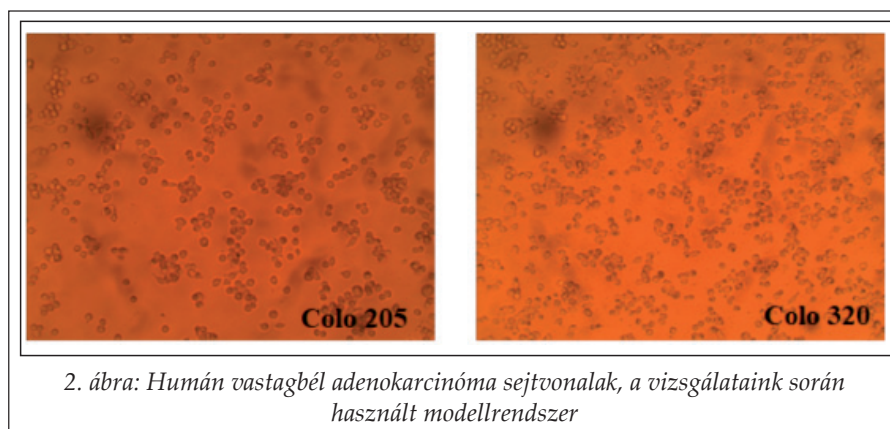
2. Alkalmazott anyagok

2.1. Vizsgált vegyületek

Ciklikus szelenoanhidrid (**1**) és szelenoészter származékok (**2-11**) (**1. ábra**). A vizsgált vegyületeket



1. ábra: A vizsgált szelénvegyületek (1-11) szerkezeti képletei



2. ábra: Humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalak, a vizsgálataink során használt modellrendszer

dikarboszelenolát; 5: dimetil-benzén-1,4-dikarboszelenolát; 6: karbamoil-benzoszelenolát; 7: metoxikarbonil-metil-2-kloro-benzoszelenolát; 8: fenoxikarbonil-metil-benzoszelenolát; 9: metoxikarbonil-metil-4-kloro-benzoszelenolát; 10: 3,3-dimetil-2-oxobutil-4-kloro-benzoszelenolát; 11: 3,3-dimetil-2-oxobutil-3,5-dimetoxi-benzoszelenolát.

2.2. Sejtvonalak

prof. dr. Juan Antonio Palop, prof. dr. Carmen Sanmartín és dr. Enrique Domínguez-Álvarez (Navarrai Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Szerves- és Gyógyszerkémiai Intézet, Pamplona, Spanyolország) kutatócsoportja szintetizálta és bocsátotta rendelkezésünkre. A vegyületek stabilnak bizonyultak levegőn, vízben kevéssé, dimetil-szulfidban jól oldódnak. A vegyületek szintézisét és szerkezetük igazolását, valamint több bioaktív tulajdonságukat már leírták [16, 17].

A vegyületek neve az IUPAC nevezéktana alapján: 1: benzo[c]szelenofén-1,3-dion; 2: dimetil-tiofén-2,5-dikarboszelenolát; 3: metoxikarbonil-metil-4-kloro-benzoszelenolát; 4: dimetil-benzén-1,3-

Humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalak (2. ábra) doxorubicin érzékeny Colo 205 és multidrog rezisztens Colo 320/MDR-LRP sejtvonal, amely túltermeli az ABCB1 fehérjét), ATCC-CCL-220.1 (Colo 320) és CCL-222 (Colo 205) katalógus számmal az LGC Promochem cégtől (Teddington, Egyesült Királyság) kerültek megvásárlásra. A sejtek RPMI-1640 tápfolyadékban, 5%-os szén-dioxid tenzió mellett kerültek tenyésztésre CO₂ termosztátban. A kitapadt sejtek leválasztását 5 perces Trypsin-Versen oldattal történő kezeléssel végeztük 37 °C-on.

3. Vizsgálati módszerek

3.1. Citotoxicitási vizsgálat

A különböző szerkezetű szelénvegyületek sejt-osztódásra gyakorolt hatását felező hígítással határoztuk meg 96-lyukú mikrotiter lemezekben. A lemezek elrendezése a következő volt: az első oszlopba 200 µl tápfolyadék került (tápfolyadék kontroll), a második oszlopba a 100 µl tápfolyadék mellé 100 µl térfogatban kezeletlen sejteket adtunk (sejtkontroll). A sejtszám a vizsgálat-hoz 2×10^4 sejt/ml-re volt beállítva. A humán vastagbél adenokarcinóma sejtek lemezekre mérését megelőzte a Trypsin-Versen-oldattal való kezelés és a kitapadt sejtek leválasztása. A harmadik oszlopba 196 µl tápfolyadékhoz 4 µl-t adtunk a szelénvegyületek 10 mM-os koncentrációjú törzsoldataiból. Az így elért 200 µM-os kezdeti koncentrációt hígítottuk tovább felező hígítási módszerrel. A dimetil-szulfid kezdeti koncentrációja 2 V/V%-os volt. Ezután a 2-12. számú oszlophoz hozzáértük a sejteket 100-100 µl térfogatban. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk 24 órán át, CO₂ termosztátban. Az inkubáció után 20 µl MTT-festéket mértünk a lemezekre, majd további 4 óra múlva 100 µl 10% SDS (nátrium-dodecil-szulfát)-HCl elegyet mértük a mintákhoz, a formazán kristályok szolubilizálása céljából. A módszer során azt a tulajdonságát használjuk ki a tetrazóliumsónak, hogy metabolikusan aktív, életképes sejtekben a mitokondriális dehidrogenáz enzim hatására kék színű formazán kristályokká alakul [7]. A színváltozás miatt a módszer kolorimetriás meghatározással kvantitatívvá tehető. Egy-egy lemezen kontroll kísérletet is végeztünk sejtek nélkül, hogy meghatározzuk, történtek-e oxidoredukciós (azaz a sejtek növekedésétől független, színváltozást okozó) reakciók a vizsgált vegyületek és az MTT között. Ez utóbbi vizsgálatok eredménye negatív volt. A lemezek optikai denzitását (OD) Multiscan EX ELISA mikrotiter lemez leolvasóval (Thermo LabSystem, Cheshire, Egyesült Államok) mértük 540 és 630 nm-en. A mérések során az IC₅₀ értéket határoztuk meg, amely azt a koncentrációt jelenti, ahol a vizsgált sejtek 50%-a elpusztult a kontrollhoz képest, az alábbi képlet alapján:

$$IC_{50} = 100 - \left[\frac{OD_{kezelt} - OD_{mediumkontroll}}{OD_{kezeletlen} - OD_{mediumkontroll}} \right] \times 100$$

3.2. ABCB1 efflux pumpa gátlás vizsgálata áramlási citometriával

A vizsgálat során a humán vastagbél adenokarcinóma sejtek számát 2×10^6 sejt/ml-re állítottuk be, a sejteket centrifugálás után reszuszpendáltuk szérumentes tápfolyadékban, majd 0,5 ml térfogatonként Eppendorf-csövekbe osztottuk szét őket. A vizsgált vegyületeket 2 és 20 µM-os végkoncentrációkban adtuk a mintákhoz, 1 és 10 mM-os koncentrációjú törzsoldatokból, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. A vizsgálat során pozitív kontrollként verapamilt használtunk (20 µM koncentrációban), amely hatásos gátlószere a P-glikoproteinek, magas terápiás koncentrációkban alkalmazva képes visszafordítani az efflux pumpák által kialakított MDR fenotípust rákos sejtekben, azonban ilyen dózisban már kardiotoxikus mellékhatásai miatt *in vivo* alkalmazása nem lehetséges. Ezt követően valamennyi mintához 10-10 µl rhodamin 123 (R123) festéket mérünk [18]. A R123 egy nem toxikus, lipofil, kationos fluoreszcens festék ($\lambda_{ex/em} = 505/534$ nm), amely az ABCB1 pumpa szubsztrátja. Mivel membránpermeábilis, az élő sejtek gyorsan felveszik, így MDR gátlószerekkel együtt az ABCB1 pumpa funkciójának mérésére használható [19]. A kezelt mintákat 20 percig 37 °C-os vízfürdőben tartottuk, és miután kétszer mostuk őket foszfát sóoldat pufferrel (PBS), 0,5-0,5 ml PBS-ben vettük fel a mintákat. A vizsgált sejtpopulációk fluoreszcenciáját Partec CyFlow áramlási citométerrel (Partec, Németország) detektáltuk, a mérési eredményeket FlowJoe szoftverrel értékeltük ki. Vizsgálatunk eredményeképpen fluoreszcencia aktivitási hányados (FAR) értékeket kapunk, amelyek az alábbi összefüggés alapján határozhatóak meg, a kezelt és kezeletlen, érzékeny PAR és MDR sejtvonalak fluoreszcenciájának függvényében:

$$FAR = \frac{MDR_{kezelt} / MDR_{kontroll}}{\dot{E}rzékeny_{kezelt} / \dot{E}rzékeny_{kontroll}}$$

3.3. Verapamil hatásának vizsgálata a szelénvegyületek citotoxicitására

Egy további kísérlet került elvégzésre, hogy megállapíthassuk, a verapamil képes-e fokozni a szelénvegyületek citotoxicitását humán vastagbél adenokarcinóma sejteken. A verapamil koncentrációja 20 µM-ra volt beállítva a 96-lyukú mikrotiter lemezen (a 3.-12. sorban, kivéve a medium kontroll

I. táblázat

Szelénvegyületek citotoxikus hatása Colo 205 és Colo 320 humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon

Minta	Colo 205		Colo 320		SI
	IC ₅₀ (μM)	SD ±	IC ₅₀ (μM)	SD ±	
1	>100	-	63,88	2,12	≥1,57
2	>100	-	>100	-	-
3	>100	-	>100	-	-
4	>100	-	12,45	1,76	≥8,03
5	>100	-	>100	-	
6	>100	-	>100	-	
7	>100	-	>100	-	
8	>100	-	53,68	0,91	≥1,86
9	5,48	0,75	0,55	0,11	9,96
10	1,63	0,55	0,96	0,15	1,69
11	1,19	0,21	0,35	0,09	3,40

Colo 205: szülői sejtvonal; Colo 320: multidrog rezisztens sejtvonal; IC₅₀: a sejtek 50%-nál pusztulást okozó koncentráció μM-ban, SD: sztenderd deviáció (szórás); SI: szelektivitási index

és sejtkontroll sorokat). Ezt leszámítva, a vizsgálat további menete megegyezik az előzőekben leírt citotoxicitási vizsgálatával (lásd 3.1.). Egy előzetes kontrollvizsgálatban megállapítottuk, hogy a verapamil ilyen koncentrációban nem rendelkezik citotoxikus hatással, így az IC₅₀ értékben (azaz a szelénvegyületek citotoxicitásában) bekövetkező változás a verapamil hatásának tudható be [20]. Az IC₅₀ értékben bekövetkező változást a verapamillal kezelt és a kezeletlen citotoxicitási vizsgálatok eredményei között az alábbi képlettel fejeztük ki:

$$\% = 100 - \left(\frac{IC_{50}(\text{verapamil})}{IC_{50}(\text{kezeletlen})} \right) * 100$$

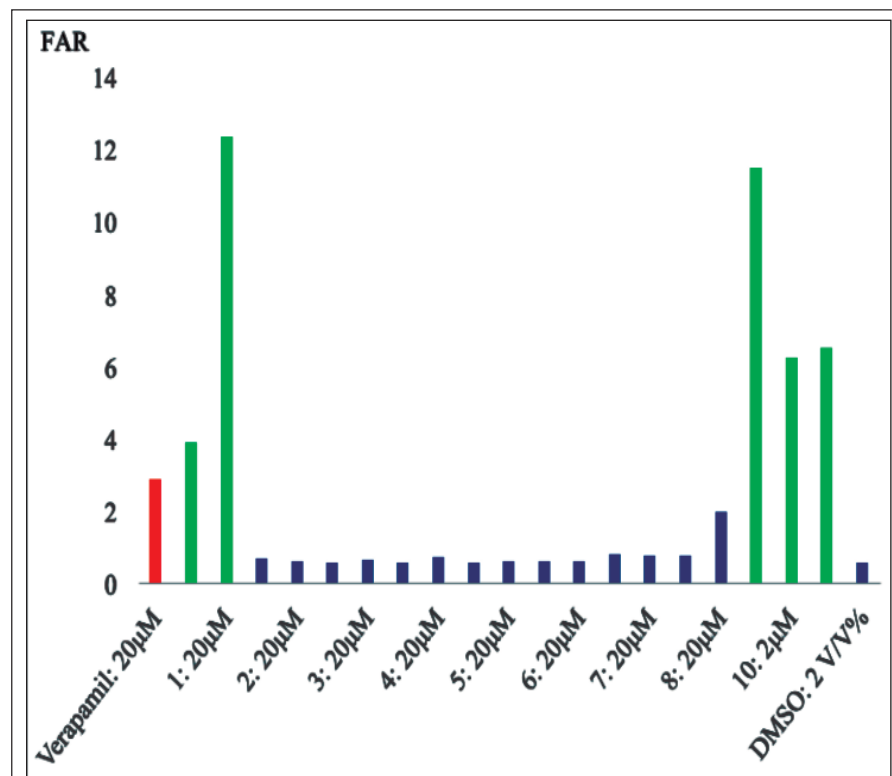
4. Eredmények értékelése

4.1. Citotoxicitási vizsgálat

A vizsgálat célja annak meghatározása volt, hogy a szelénvegyületekkel kezelt humán vastagbél adenokarcinóma (Colo 205 doxorubicin-érzékeny szülői és Colo320/MDR-LRP multidrog rezisztens) sejtvonalakon mekkora volt a sejtpusztulás mértéke, amelyet az IC₅₀ érték szemléltet. A kísérletek eredményei három, egymástól független, azonos körülmények között végrehajtott kísérlet átlagából származnak. Az oldószernek (dimetil-szulfoxid) nem volt citotoxikus hatása. Azokat a származékokat, ahol a számított IC₅₀ érték nagyobb volt, mint 100 μM, nem tekintettük hatékonynak, itt a szórás és szelektivitási index sem került meghatározásra [7].

A humán vastagbél adenokarcinóma sejteken végzett vizsgálatok során a 9-11 számú szelénvegyületek erős citotoxikus hatással rendelkeztek az érzékeny és a multidrog rezisztens sejtvonalon egyaránt (I. táblázat). Megfigyelhető emellett, hogy a 9-es és 11-es számú szelénvegyületek erős szelektivitást mutatnak a multidrog rezisztenciával rendelkező sejtvonal irányába (SI<3) [21]. Hasonlóan ígéretes a ciklikus

A humán vastagbél adenokarcinóma sejteken végzett vizsgálatok során a 9-11 számú szelénvegyületek erős citotoxikus hatással rendelkeztek az érzékeny és a multidrog rezisztens sejtvonalon egyaránt (I. táblázat). Megfigyelhető emellett, hogy a 9-es és 11-es számú szelénvegyületek erős szelektivitást mutatnak a multidrog rezisztenciával rendelkező sejtvonal irányába (SI<3) [21]. Hasonlóan ígéretes a ciklikus



3. ábra: Szelénvegyületek ABCB1 multidrog efflux pumpát gátló hatása 2 és 20 μM koncentráció mellett humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon.

FAR: fluoreszcencia aktivitási hányados

szelénanhidrid (1), és két további szelenoészter (4 és 8), melyek az érzékeny sejtvonalon 100 μM -os koncentrációig nem mutattak citotoxikus hatást, viszont a rezisztens sejtvonalon igen. Megjegyzendő azonban, hogy ezen tulajdonságaikat magasabb koncentrációtartományban fejtik ki, mint amit ilyen vegyületeknél elvárnánk (<10 μM).

4.2. ABCB1 pumpa gátlás vizsgálata

A humán vastagbél adenokarcinómán végzett efflux pumpa gátlási vizsgálatok során a vizsgált tizenegy vegyület közül négy (1, illetve 9-11) mutatott jelentős ABCB1 pumpa gátló hatást (3. *ábra*) Ezek a vegyületek a pozitív kontrollhoz képest tízszer kisebb koncentrációban (2 μM) is hatékonyabb efflux pumpa gátló hatással rendelkezett, mint a használt referencia vegyület (20 μM -os koncentrációban) (verapamil_{20 μM} : FAR=2,85; 1_{2 μM} =3,86; 9_{2 μM} =11,43), ezekben a vizsgálatokban volt a legnagyobb a rhodamin 123 intracelluláris koncentrációja. Más szelenoészterek nem mutattak a pozitív kontrollhoz mérhető hatást.

4.3. Verapamil hatása a szelénvegyületek citotoxicitására

Kísérleti eredményeink (II. *táblázat*) függvényében elmondható, hogy a verapamil hatására ará-

II. táblázat

Szelénvegyületek citotoxikus hatása Colo 205 és Colo 320 humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon

Minta	Colo 205		$\Delta\%$	Colo 320		$\Delta\%$
	IC ₅₀ (μM)	SD \pm		IC ₅₀ (μM)	SD \pm	
1	>100	-	-	62,69	1,46	-1,9%
2	>100	-	-	>100	-	-
3	>100	-	-	>100	-	-
4	>100	-	-	12,02	0,97	-3,6%
5	>100	-	-	>100	-	-
6	>100	-	-	>100	-	-
7	>100	-	-	>100	-	-
8	>100	-	-	51,99	2,94	-3,3%
9	5,36	0,84	-2,2%	0,41	0,18	-34,1%
10	1,59	0,36	-4,0%	0,91	0,21	-5,5%
11	0,98	0,33	-18,6%	0,31	0,10	-12,9%

Colo 205: szülői sejtvonala; Colo 320: multidrog rezisztens sejtvonala; IC₅₀: a sejtek 50%-nál pusztulást okozó koncentráció μM -ban, SD: sztenderd deviáció (szórás); $\Delta\%$: változás %-ban kifejezve

nyaiban minden esetben csökkent a szelénvegyületek IC₅₀ értéke, mind az érzékeny (2,2-18,6%) mind a rezisztens (1,9-34,1%) sejtvonalon (ahol ez értelmezhető), azonban abszolút értékben ezeket a különbségeket nem tekinthetjük klinikai-terápiás szempontból szignifikánsnak. Az IC₅₀ érték csökkenésében valószínűleg más mechanizmus játszik szerepet, mint a verapamil által közvetített efflux pumpa gátlás, hisz nem látható eltérés az érzékeny és rezisztens sejtvonalon megfigyelt változás mértékében.

5. Összegzés

A szelénvegyületekkel humán eredetű daganatos sejteken végzett citotoxicitási és ABCB1 efflux pumpa gátlási, vizsgálatok során megfigyelhető volt, hogy bizonyos vegyületek minden vizsgálat során figyelemre méltó aktivitással rendelkeztek, míg mások nem voltak hatékonyak egyik kísérletben sem. Eredményeink tükrében elmondható, hogy adott szerkezettel (alapvázal és funkció csoporttal) rendelkező vegyületek mutattak jelentős aktivitást. Összességében a leghatékonyabb molekuláknak a ciklikus szelénanhidridet (1; benzo[c]szelenofén-1,3-dion) és a 9-11 számú szelenoésztereket tekinthetjük. Vizsgálataink eredményei alapján a hatékonysághoz szükséges feltételek akkor teljesülnek, ha a származék *alkil-keton* csoporttal rendelkezik azon a központi alkiláncon, amely a központi szelénatomot tartalmazza (*metil-keton-szelenoészterek*). Ezzel szemben, ha ez a feltétel nem teljesül, vagy az *alkil-keton* csoport cseréje, amid, észter, vagy szubsztituátlan metilcsoportra történik, megszűnik a vegyületek erős citotoxikus, ABCB1 transzportert gátló hatása.

A ciklikus szelénanhidrid nem mutatott toxicitást az érzékeny humán vastagbél adenokarcinóma sejteken, hasonló szelektivitással rendelkeztek a 4 és 8 számú szelenoészterek is. A 9-11 számú szelenoészterek multidrog rezisztencia visszafordító hatásuk mellett citotoxicitási vizsgálatainkban erősen toxikusnak bizonyultak, ezen erős sejtpusztító hatásukat közel nanomólos tartományban fejtették ki. A szelénanhidrid és az aktív szelenoészterek efflux pumpa gátlási vizsgálatunkban mutatott hatékonyságuk, valamint a szelénanhidrid figyelemre méltó szelektivitása miatt ígéretes kiindulópontok lehetnek további kísérletek tervezésénél, és új származékok szintézisének. Érdekes lenne megvizsgálni, hogy a hatékony szelénvegyületek milyen kölcsönhatást mu-

tatnak referencia kemoterápiás szerekekkel, így meghatározható lenne, hogy melyek azok az ágensek, amelyek hatását erősíthetik a szelénvegyületek, emellett ezen információval felvértezve egy lépéssel közelebb kerülhetünk hatásmechanizmusuk megfejtéséhez.

6. Köszönetnyilvánítás

A közlemény szerzői szeretnénk köszönetet mondani *Vigyikánné Váradi Anikónak*, a kísérletek elvégzésében és a laboratóriumi előkészítésben nyújtott segítségével. Köszönjük *Dr. Ocsóvszki Imre* segítségét az áramlási citometriás vizsgálatok elvégzésénél és az eredmények kiértékelésénél. Köszönjük *prof. dr. Juan Antonio Palop*-nak a vegyületek szintézise és szerkezetigazolása során nyújtott segítségét. A kutatás az Emberi Erőforrások Minisztériuma UNKP-17-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült. Spengler Gabriella Bolyai János Ösztöndíjban részesül. A kutatásunkat a TÁMOP-4.2.2.A-11/1KONV-2012-0035 és TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1/2012-0001 pályázatok és a Balassi Intézet Kutatói Program támogatta.

IRODALOM

1. Rikiishi, H.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 91-98 (2007).
2. Abdulah, R., Miyazaki, K., Nakazawa, M., Koyama, H.: *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 19, 141-150 (2005).
3. Letavayova, L., Vlckova, V., Brozmanova, J.: *Toxicology* 227, 1-14 (2006).
4. Fernandes, A.P., Gandin, V.: *Biochim. Biophys. Acta.* 8, 1642-1660 (2014).
5. Song, H., Kim, J., Lee, H.K., Park, H., Nam, J., Park, G.B., Kim, Y.S., Cho, D.H., Hur, D.Y.: *Int. Immunopharm.* 11, 2208-2213 (2011).
6. Jamier, V., Ba, L.A., Jacob, C.: *Chem. Eur. J.* 36, 10920-10928 (2010).
7. Domínguez-Álvarez, E., Gajdács, M., Spengler, G., Palop, J.A., Marc, M.A., Kieć-Kononowicz, K., Amaral, L., Molnár, J., Jacob, C., Handzlik, J., Sanmartín, C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 2821-2824 (2016).
8. van Zuuren, E.J., Albusta, A.Y., Fedorowucz, Z., Carter, B., Piji, H.: Selenium supplementation for Hashimoto's thyroiditis. *Cochrane Database. Syst. Rev.* DOI: 10.1002/14651858.CD010223.pub2 (2013).
9. Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E.: *Nat. Rev. Cancer* 2, 48-58 (2002).
10. Gottesman, M.M., Ambudkar, S.V.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 33, 453-458 (2001).
11. Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., Chang, G.: *Science* 323, 1718-1722 (2009).
12. Lee, J.Y., Urbatsch, I.L., Senior, A.E., Wilkens, S.: *J. Biol. Chem.* 283, 5769-5779 (2008).
13. Fillpits, M., Suchomel, R.W., Dekan, G., Stiglibauer, W., Haider, K., Depisch, D., Pirker, R.: *Br. J. Cancer* 75, 208-212 (1997).
14. Thomas, H., Coley, H.M.: *Cancer Control* 10, 159-165 (2003).
15. Callaghan, R., Luk, F., Bebawy, M.: *Drug. Metab. Dispos.* 42, 623-631 (2014).
16. Domínguez-Álvarez, E., Plano, D., Font, M., Calvo, A., Prior, C., Jacob, C., Palop, J.A., Sanmartín, C.: *Eur. J. Med. Chem.* 73, 153-166 (2014).
17. Gajdács, M., Spengler, G., Sanmartín, C., Marc, M.A., Handzlik, J., Domínguez-Álvarez, E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27, 797-802 (2017).
18. Forster, S., Thumser, A.E., Hood, S.R., Plant, N.: Characterization of Rhodamine-123 as a tracer dye for use in vitro drug transport assays. *Plos One.* DOI: 10.1371/journal.pone.0033253 (2012).
19. Gillet, J.P., Gottesman, M.M.: *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 686-692 (2011).
20. Teicher, B.A., Herman, T.S., Holden, S.A., Wang, Y.Y., Pfeiffer, M.R., Crawford, J.W., Frei, E.: *Science* 247, 1457-61 (1990).
21. Acton, E.M., Narayanan, V.L., Risbood, P.A., Shoemaker, R.H., Vistica, D.T., Boyd, M.R.: *J. Med. Chem.* 37(14), 2185-2189 (1994).

Érkezett: 2017. november 14.

Rákellenes és efflux pumpa gátló hatású szelénvegyületek ADME tulajdonságainak becslése számítógépes módszerrel

GAJDÁCS MÁRIÓ^{1*}, HANDZLIK JADWIGA², SANMARTÍN CARMEN³,
DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ ENRIQUE⁴, SPENGLER GABRIELLA¹

¹SZTE ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, 6720 Szeged, Dóm tér 10.

²Jagelló Egyetem Orvostudományi Kar, Gyógyszertechnológiai és Biotechnológiai Tanszék, 30-688 Krakko, Medyczna 9.

³Navarrai Egyetem Gyógyszerkémiai Intézet, 31010 Pamplona, Irunlarrea 1.

⁴Spanyol Nemzeti Kutatási Tanács, Szerves Kémiai Intézet, 28006 Madrid, Juan de la Cierva 3.

*Levelező szerző: gajdacs.mario@med.u-szeged.hu

Summary

GAJDÁCS, M., HANDZLIK, J., SANMARTÍN, C., DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, E., SPENGLER, G.: **Prediction of ADME properties for selenocompounds with anticancer and efflux pump inhibitory activity using preliminary computational methods**

Introduction: The loss of efficacy related to cytotoxic agents is one of the most important concerns of modern oncopharmacology, the development of efflux pump inhibitors is a current research trend. The promising biological properties of chalcogens have been demonstrated by numerous reports in experimental chemotherapy, but due to the inadequate properties of many compounds, the majority of them are discarded in preclinical or clinical research.

Aims: The aim of our present study was the evaluation of physico-chemical and pharmacokinetic properties of organoselenium compounds with anticancer and efflux pump inhibitory properties, using preliminary computational methods.

Methods: To evaluate the physico-chemical and pharmacokinetic properties of the selenocompounds, OSIRIS Molecular Property Explorer and PreADMET 2.0 software were used. The relationship between the estimated parameters and the efflux pump inhibitory activities of the tested compounds in previous studies was investigated by correlation-regression analysis, using Past 3.16 statistical program.

Results: Based on the estimated values, each and every selenocompound complies with Lipinsky's Rule of Five and these compounds are expected to have excellent oral bioavailability, while several of the reference compounds did not meet these conditions. The efflux pump inhibitory activity of the compounds correlated with the octanol/water coefficients (cLogP; $p < 0.05$).

Conclusion: The tested compounds showed promising predicted ADME properties, therefore they could be of substantial interest in the future synthesis or derivatization of additional selenium-based antitumor agents and efflux pump inhibitors.

Keywords: selenocompounds, anticancer, efflux pump, ADME, Lipinsky's Rule of Five, cLogP

Összefoglalás

Bevezetés: A citotoxikus szerek egyre csökkenő hatékonysága a modern onkoterápia egyik legfontosabb megoldandó problémája, az efflux pumpa gátló vegyületek fejlesztése jelentős kutatási irányzatnak tekinthető. A kalkogének ígéretes biológiai tulajdonságait a kísérletes kemoterápiában számos közlemény bizonyítja, azonban sok vegyületet a nem megfelelő tulajdonságai miatt a preklinikai vagy klinikai kutatási fázisban elvetnek.

Célkritizés: Munkánk célja rákellenes- és efflux pumpa gátló hatással rendelkező szerves szelénvegyületek fizikai-kémiai és farmakokinetikai tulajdonságainak becslése számítógépes módszerekkel.

Módszerek: A szelénvegyületek fizikai-kémiai és farmakokinetikai tulajdonságainak becslésére OSIRIS Molecular Property Explorer és PreADMET 2.0 szoftvereket használtunk. A becsült paraméterek és az előző kísérletekben mért efflux pumpa gátló hatás összefüggésének vizsgálatára korreláció-regresszió analízis történt Past 3.16 statisztikai program felhasználásával.

Eredmények: A becsült értékek alapján valamennyi szelénvegyület megfelel a Lipinsky-féle szabálynak és előreláthatólag kiváló orális biohasznosulással rendelkeznek, míg a referencia vegyületek közül több nem felelt meg ezeknek a feltételeknek. A vegyületek efflux pumpa gátló hatása összefüggést mutatott azok oktanolvíz koefficiensével (cLogP; $p < 0,05$).

Következtetések: A becsült értékek alapján a vizsgált szelénvegyületek ígéretes ADME tulajdonságokkal rendelkeznek, ennél fogva jelentőségük lehet származékok előállítás szempontjából, illetve további szelén-alapú daganatellenes- és efflux pumpa gátló vegyületek szintézisében.

Kulcsszavak: szelénvegyület, daganatellenes, efflux pumpa, ADME, Lipinsky-féle „ötös” szabályok, cLogP

1. Bevezetés

A rosszindulatú tumorokban megfigyelhető a klasszikus (citotoxikus) kemoterápiás szerekkel szemben progresszíven kialakuló rezisztencia, amely a malignus kórképek terápiájának egyik legfontosabb megoldatlan problémáját jelenti [1]. A kemoterápiás szerekkel szemben ellenálló-rezisztens fenotípus számos mechanizmuson keresztül létrejöhethet a daganatsejtekben, multidrog rezisztencia (MDR) esetén pedig több, különböző kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú szer terápiás alkalmazása válik sikertelenné. A MDR lehetséges kiváló mechanizmusai közé tartozik az energiatülszóró efflux pumpát kódoló gének fokozott kifejeződése [2]. A P-glikoprotein (ABCB1) az egyik leggyakrabban tanulmányozott multidrog efflux pumpa, amely egy 170 kDa molekulatömegű transzporter fehérje, a nagymértékben konzervált ATP-kötő kazettát tartalmazó fehérjék szupercsaládjába tartozik [3]. Jelen fehérjecsalád tagjai fontos élettani funkciókat látnak el számos szövetben (csontvelő, vese, epehólyag, tüdő) és különböző fiziológiás barrierek (pl. vér-agy-gát) fenntartásában. A daganatsejtben ezeknek a fehérjéknek a túlermelése meggátolja a terápiás koncentráció elérését intracellulárisan, míg a teljes testre vonatkozóan nagymértékben befolyásolhatják a gyógyszer-molekulák felszívódását, eloszlását és clearance-ét [4]. Azon molekulákat, amelyek képtelenek gátolni ezen transzporterek funkcióját, efflux pumpa gátlóknak nevezzük (pl. verapamil, valspodar, tariquidar stb.) [5]. Számos kutatás támasztja alá hatékonyságukat kombinációs kemoterápiában, adjuvánsként történő alkalmazásukat *in vitro* körülmények között, azonban az eddigi klinikai vizsgálatok nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket [6].

A kalkogéneket (S, Se, Te) tartalmazó szerves vegyületek az utóbbi két évtizedben a szintetikus kémiai és a biológiai vizsgálatok középpontjába kerültek, mivel sokoldalúan tudják befolyásolni a baktérium- és emlősejtek életfolyamatait, emellett kémiai szerkezetüknél fogva redox-moduláló (pro- vagy antioxidáns) hatással is rendelkeznek [7-10]. Előző kutatásaink során 11 szerves szelénvegyület daganatellenes és efflux pumpa gátló hatását vizsgáltuk állati és humán modellrendszerekben *in vitro* [11,12]. Habár a vizsgált vegyületek farmakológiai tulajdonságai elsődlegesen azok redox-moduláló (illetve efflux pumpa gátló és citotoxikus) hatásuknak köszönhetőek, a származékok további tulajdonságai, így

az oldhatóságuk, stabilitásuk, illetve abszorpciójuk szintén befolyásolhatják biológiai hatékonyságukat. Köztudott, hogy a legtöbb farmakon-jelölt azért nem jut túl a preklinikai, illetve klinikai kutatási fázisokon, mert nem rendelkezik kielégítő ADME (*absorption*–abszorpció, *distribution*–megoszlás, *metabolism*–metabolizmus, *excretion*–kiválasztás) tulajdonságokkal [13].

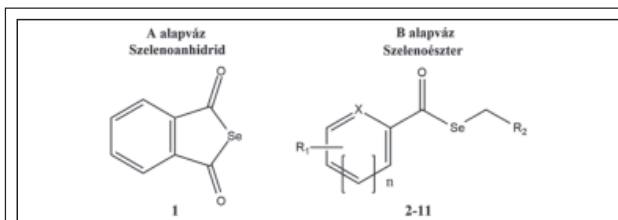
Kutatásunk célja ezen definiált biológiai hatással rendelkező szerves szelénvegyületek (egy ciklikus szelenoanhidrid és tíz különböző szerkezetű szelenoészter) fizikai-kémiai és farmakokinetikai tulajdonságainak becslése számítógépes módszerekkel. Vizsgálatunk során célul tűztük ki, hogy a becsült adatok alapján előzetes képet adjunk a származékok várható farmakokinetikai tulajdonságairól és biohasznosulásáról az emberi szervezetben, illetve, hogy megvizsgáljuk, van-e kölcsönhatás ezen prediktált paraméterek és az előzőekben kísérletes úton szerzett, efflux pumpa gátlásra vonatkozó eredmények között.

2. Alkalmazott anyagok

2.1. Vizsgált vegyületek

Ciklikus szelenoanhidrid (1) és szelenoészter származékok (2-11) (1. ábra; I. táblázat). A vizsgált vegyületeket *prof. dr. Juan Antonio Palop*, *prof. dr. Carmen Sanmartín* és *dr. Enrique Domínguez-Álvarez* (Navarrai Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Szerves- és Gyógyszerkémiai Intézet, Pamplona, Spanyolország) kutatócsoportja bocsátotta rendelkezésünkre. A vegyületek szintézisét és szerkezetük igazolását leírták [14, 15], valamint daganatellenes és az ABCB1 efflux pumpa gátló hatásukat is tanulmányozták *in vitro*, egér- és humán modellrendszerekben [11, 12].

A vizsgálatok során referencia vegyületekként az irinotekán (*topoizomeráz-I-gátló*), doxorubicin (*topoizomeráz-II-gátló*), methotrexát (*folát-antagonista*), gemcitabin (*nukleozid-analóg*) és két szerves szelénvegyület (Ebselen: *gyulladáscsökkentő, antioxidáns és citoprotektív hatás*; Ethaselen: *daganatellenes*

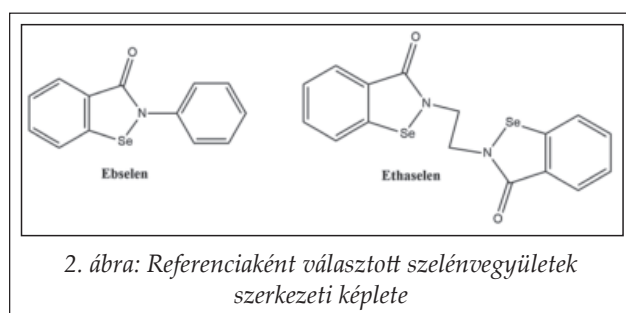


1. ábra: A vizsgált szelénvegyületek reprezentatív alapvázai

I. táblázat

A vizsgált szelénvegyületek különböző szubsztituensei

Vegyület	Alapváz	n	X	R ₁	R ₂
1	A	-	-	-	-
2	B	0	S	5-COSeCH ₃	-H
3	B	1	N	6-COSeCH ₃	-H
4	B	1	C	3-COSeCH ₃	-H
5	B	1	C	4-COSeCH ₃	-H
6	B	1	C	-H	-CONH ₂
7	B	1	C	4-Cl	-COOCH ₃
8	B	1	C	-H	-COOPh
9	B	1	C	4-Cl	-COCH ₃
10	B	1	C	4-Cl	-COC(CH ₃) ₃
11	B	1	C	3,5-diOCH ₃	-COC(CH ₃) ₃



hatás) került kiválasztásra, melyek jelenleg humán klinikai vizsgálati fázisban vannak (2. ábra) [16, 17].

Fizikai-kémiai és ADME tulajdonságok becslése számítógépes módszerrel, becsült tulajdonságok értékelése

A vizsgált szelénvegyületek fizikai-kémiai és *in vivo* abszorpciós tulajdonságainak becslésére prediktív *in silico* vizsgálatot végeztünk OSIRIS Molecular Property Explorer (Actelion Pharmaceuticals, Allschwil, Svájc) és PreADMET 2.0 (Yonsei Egyetem, Seoul, Koreai Köztársaság), interneten ingyenesen elérhető szoftverek felhasználásával, hogy közelítő képet kaphassunk a szelénvegyületek várható tulajdonságairól mint potenciális farmakon-jelöltek [18, 19]. Az OSIRIS (a szóban forgó modelltől függően) 2000–5000 gyógyszermolekulát tartalmazó adatbázissal dolgozik, míg a PreADMET több mint 1 millió molekula kísérletesen mért tulajdonságait tartalmazza [20, 21]. A vizsgálat során a vegyületek alábbi tulajdonságait vizsgáltuk és értékeltük:

I. Fizikai-kémiai paraméterek

– Molekulatömeg (M); a szakirodalmi adatok arra engednek következtetni, hogy minél nagyobb egy

adott farmakonjelölt molekulatömege, annál nagyobb az esély arra, hogy a klinikai vizsgálatok során sikertelenül szerepelnek, vagy fejlesztésük még a preklinikai szakaszban megáll [22]. A jelenleg forgalomban lévő gyógyszermolekulák több, mint 80%-a esetén a molekulatömeg $M < 450$, ezért elemzésünk során mi is ezt vettük határértéknek.

- Oktanol/víz megoszlási koefficiens tizes alapú logaritmus ($c\text{LogP} = \log_{10} \frac{[c]_{\text{oktanol}}}{[c]_{\text{víz}}}$); a hatóanyag molekulák nem megfelelő hidrophil jellege jellemzően rossz membrán penetrációs és abszorpciós tulajdonságokat, ennek következtében pedig nem megfelelő biohasznosíthatóságot feltételez [23]. Elemzésünk során $c\text{LogP} < 5,0$ értéket vettük határértéknek.
- Vízben való oldhatóság (mol/l alapú koncentráció) tizes alapú logaritmus ($\log S$); a gyógyszerpiacon jelenleg forgalomban lévő farmakonok több, mint 80%-nál ez az érték nagyobb, mint $\log S > -4$, ezért ezt határoztuk meg referenciának [24].
- A molekula topológiai poláris felülete (topological polar surface area; TPSA); a molekula össz poláris felülete (polar surface area, PSA) alatt a molekulában található összes poláris atom felületét értjük (gyógyszermolekulákban ez többnyire O és N atomokat, illetve a hozzájuk tartozó H atomokat jelenti). A PSA pontos meghatározásához 3D molekulavetület-képzésre van szükség, amely bonyolult, időigényes és költséges módszer, míg a TPSA egy becsült érték, amely jól közelíti a vetületképzéssel nyert PSA értékeket. A molekula poláris felületének a sejtmembrán permeabilitás mértékében van szerepe; azon a molekulák, melyeknek TPSA értéke nagyobb mint 140 \AA^2 (10^{-10} m^2), általában nem megfelelő membrán permeációs tulajdonságokkal rendelkeznek. A vér-agygáton való átjutáshoz és a központi idegrendszeri molekuláris célpontokhoz való kapcsolódáshoz a TPSA $< 90 \text{ \AA}^2$ kell, hogy legyen [25, 26].

- Megfelelés a Lipinski-féle „ötös” szabálynak; a szabályok leírják, hogy egy adott vegyület, mely bizonyos biológiai aktivitással rendelkezik (Rule of Five, RO5), előreláthatólag akkor lesz megfelelő orális biohasznosíthatóságú az emberi szervezetben, ha nem szegi meg (vagy legfeljebb csak egy pontban) az alábbi kritériumokat: *I)* a molekulatömeg $M < 500$ legyen, *II)* a $cLogP$ értéke $< 5,0$ legyen, *III)* a hidrogénkötésdonorok száma (leggyakrabban -OH vagy -NH csoportok) < 5 legyen, *IV)* a hidrogénkötés-akceptorok száma (akceptor lehet O vagy N atom, amely tartalmazza a donor csoportokat is) < 10 legyen. Az RO5 megfogalmazása *Christopher A. Lipinsky* nevéhez fűződik (1997), arra a megfigyelésére alapozva, hogy a legtöbb orálisan jól felhasználódó farmakon relatíve kicsi és mérsékelten lipofil molekula [27, 28].
- Humán intesztinális abszorpció (HIA%) mértéke; a vizsgált molekulákat a becsült értékeik alapján az alábbi csoportokba soroltuk: rosszul abszorbeálódó vegyületek 0-20%, közepesen abszorbeálódó vegyületek 20-70%, jól abszorbeálódó vegyületek 70-100%.
- Interakciók a CYP450 enzimrendszerrel; a szoftver segítségével meghatározható a vegyületek CYP2D6, CYP2C9 és CYP3A4 enzim szubsztrát/gátlószer státusza. A CYP2D6 (induktora pl. dexamethazon, rifamicin; gátlószere pl. klorokvin, cimetidin, diltiazem, doxorubicin, moklobemid, vinkrisztin), a CYP2C9 (induktora pl. barbiturátok, rifampicin; gátlószere pl. apigenin, flukonazol, valproesav) és a CYP3A4 (induktora pl. karbamazepin, fenitoin, rifamicin, fenilbutazon, orbáncfű; gátlószere pl. amiodaron, ciklosporin A, erythromycin, flukonazol, grapefruitlé, ritonavir, valproesav) enzimek kiemelt jelentőséggel bírnak számos farmakon gyógyszer-molekula metabolizmusában [31].

II. Becsült farmakokinetikai tulajdonságok

- Plazmafehérje-kötődés (PPB%); a gyógyszer-molekulák plazmafehérjékhez (szérum albumin, lipo- és glikoproteinek, α -, β - és γ -globulinok) való kötődése alapvetően befolyásolja biológiai felezési idejüket a szervezetben. A fehérjék által kötött frakció viselkedhet depóként, amelyből a kérdéses anyag lassan szabadul fel, így a szabad gyógyszerfrakció metabolizmusával és kiválasztásával egyidőben a kötött frakcióból szabadul fel a hatóanyag, a biológiai egyensúly fenntartásához. A plazmafehérje kötődésnek szerepe lehet in vivo gyógyszerinterakciókban is, mivel a különböző affinitással kötődő farmakonok leszoríthatják egymást, így befolyásolva a szabad/kötött koncentrációkat [29].
- Permeabilitás mértéke Caco-2 humán vastagbél adenokarcinóma és MDCK (Madin Darby) kutya vese epitél sejtvonal egysejtrétegén (monolayer); számos in vitro modell került kifejlesztésre különböző gyógyszer-molekulák intesztinális abszorpciójának kvantitatívra tételére. Ezen modellek közül a Caco-2 sejt (magas metabolikus aktivitású és többféle, különböző drogtranszportterrel rendelkező sejtvonal) és MDCK sejt (alacsony metabolikus aktivitással és transzport fehérje expresszióval rendelkezik) modellrendszerek bizonyultak a legmegbízhatóbbnak, a felhasznált számítógépes módszerrel becsülhető a vizsgált vegyületek permeabilitása [nm/s] [30]. Eredményeinket az alábbiak alapján értékeltük: alacsony permeabilitás < 4 nm/s, közepes permeabilitás 4-70 nm/s, erős permeabilitás > 70 nm/s.

Korreláció-regresszió analízis előző kísérleti eredményekkel

A korábbi kísérleteinkben vizsgált szelénvegyületek (1-11) ABCB1 efflux pumpa gátló hatásának mértéke rhodamin 123 fluoreszcens szubsztrát mérésén alapuló áramlási citometriás vizsgálattal, multidrog rezisztens (MDR) egér T-sejtes limfóma, és MDR humán vastagbél adenokarcinóma modellrendszerek felhasználásával került meghatározásra [14-15]. Ezen kísérletek során fluoreszcencia aktivitás hányados (FAR) értékeket kaptunk mérőszámként, melynek segítségével összehasonlíthattuk eredményeinket a pozitív kontroll (verapamil) gátló hatásához képest [32]. Ahhoz, hogy a vegyületek efflux pumpa gátló hatásának ($\log FAR$ értékben kifejezve, lásd [14-15]) függését a becsült fizikai-kémiai paraméterektől ($cLogP$, $\log S$, $\log TPSA$, M) meghatározzuk, korreláció-regresszió analízist hajtottunk végre Past 3.16 statisztikai program felhasználásával (szignifikánsnak $p < 0,05$ alatt tekintettük, emellett kiszámítottuk a determináció együtthatót $/R^2/$ is, amely a kölcsönhatás százalékos függését fejezi ki) [33].

4. Eredmények értékelése

Fizikai-kémiai paraméterek

A vizsgált vegyületek becsült fizikai-kémiai paraméterei a **II. táblázatban** láthatóak. A szelénve-

II. táblázat

Szelénvegyületek és referencia vegyületek becsült fizikai-kémiai tulajdonságai

Vegyület	cLogP	logS	M	TPSA	n-OHNH donorok	n-ON akceptorok	Megfelel a Lipinsky-féle szabályoknak?
1	2,51	-3,35	211	34,1	0	2	+
2	0,68	-3,77	326	62,4	0	2	+
3	-0,16	-2,90	321	47,0	0	3	+
4	0,73	-3,65	320	34,1	0	2	+
5	0,73	-3,65	320	34,1	0	2	+
6	0,02	-2,41	242	60,1	2	3	+
7	1,45	-3,20	292	34,1	0	3	+
8	2,36	-3,80	319	43,4	0	3	+
9	1,7	-3,52	276	34,1	0	2	+
10	2,94	-4,13	318	34,1	0	2	+
11	2,19	-3,43	343	52,6	0	4	+
doxorubicin	0,17	-1,23	543	206,0	7	12	-
gemcitabin	-2,04	-2,04	263	108,3	4	7	+
irinotekán	3,56	-4,50	586	112,5	2	7	-
methotrexát	-1,23	-3,77	454	210,5	7	13	+
Ebselen	2,66	-4,85	275	20,31	0	1	+
Ethaselen	2,74	-4,71	424	40,62	0	2	+

gyületek fizikai-kémiai tulajdonságaik tekintetében döntően megfelelnek a *Vizsgálati módszerek* c. részben leírt értékelési feltételeknek, emellett kivétel nélkül megfelelnek a Lipinsky-féle ötös szabálynak, szemben egyes (doxorubicin, methotrexát) referenciaként választott vegyülettel.

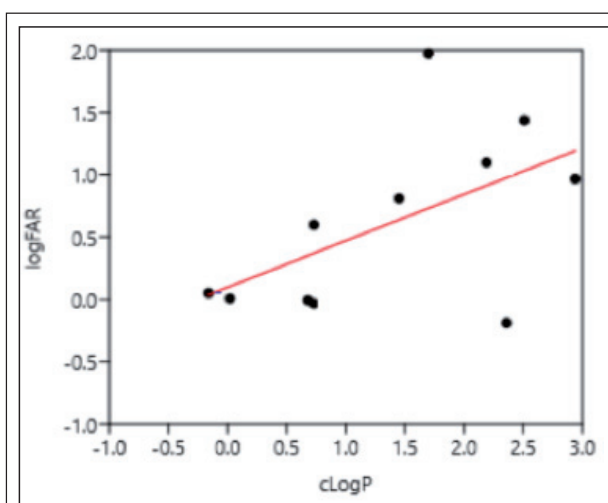
Becsült ADME tulajdonságok

A számítógépes elemzés által becsült adatok alapján a szerves szelénvegyületek várhatóan kiváló orális biohasznosulással (96,74-99,10%) rendelkeznek, emellett a Caco-2 egysejtrétegen való penetrációs adatok vizsgálata alapján arra következtethetünk, hogy közepes permeációs tulajdonságokkal bírnak. A predikált plazma fehérjekötés közel 100%-os volt az összes kérdéses vegyületre vonatkoztatva, amely valószínűsíthetően a szelénatom jelenlétének köszönhető a biológiai hatású molekulákban (*III. táblázat*).

A prediktált adatok alapján a vizsgált szelénvegyületek a CYP2C9 enzim inhibitorai, emellett a 6-os származék kivételével a CYP3A4 szubsztrátjai és gátolják is az enzimet. A molekulák CYP2D6 enzimmel várhatóan nem kerülnek interakcióba.

Korreláció-regresszió analízis

A szerves szelénvegyületek efflux pumpa gátló hatása vizsgálatunk eredményei alapján szignifikáns összefüggést mutatott a vegyületek oktanol/víz-partíciós koefficiensével (*cLogP*), mind a multidrog rezisztens egér T-limfóma (*3. ábra*; $p=0,0034$), mind a rezisztens vastagbél adeno-

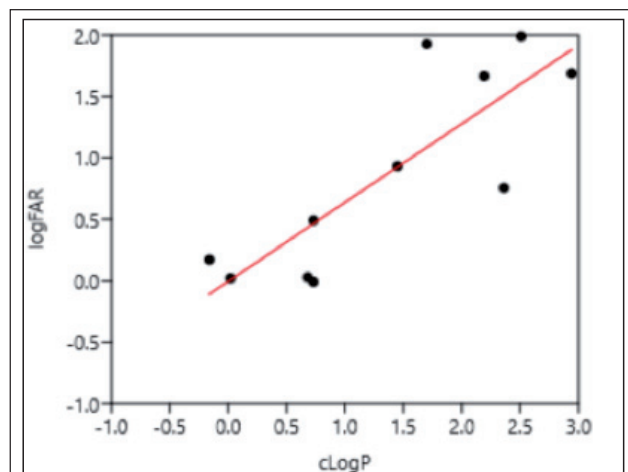


3. ábra: Korreláció-regresszió analízis ($\log FAR_{limfóma}$: $cLogP_{sc}$); $y=0,6413x-0,005$; $p=0,0034$; $R^2=0,6934$ (69,34 %)

III. táblázat

Szelénvegyületek és referencia vegyületek prediktált ADME tulajdonságai

Vegyület	PPB [%]	Permeabilitás Caco-2 monolayeren [nm/s]	Permeabilitás MDCK monolayeren [nm/s]	HIA [%]
1	~ 100	11,83	0,35	99,33
2	~ 100	34,66	0,33	98,55
3	~ 100	24,29	0,51	98,10
4	~ 100	30,22	0,33	99,10
5	~ 100	22,86	0,33	99,10
6	~ 100	10,46	0,43	96,74
7	~ 100	47,51	0,26	97,96
8	~ 100	53,01	0,14	97,66
9	~ 100	46,01	0,27	99,09
10	~ 100	54,52	0,08	99,01
11	~ 100	54,32	0,15	98,18
doxorubicin	31,16	17,73	1,02	56,84
gemcitabin	14,94	6,90	0,59	79,19
irinotekán	57,56	28,17	0,05	96,87
methotrexát	57,42	18,93	0,34	86,16
Ebselen	~ 100	31,33	0,35	99,10
Ethaselen	~ 100	45,94	0,17	97,95



4. ábra: Korreláció-regresszió analízis ($\log FAR_{\text{castagból}}$; $cLogP_{se}$); $y=0,3576x-0,325$; $p=0,0198$; $R^2=0,5117$ (51,17 %)

karcinóma sejteken (4. ábra; $p=0,00198$). A vizsgált vegyületek molekulatömege $/M/$ ($R^2=0,027-0,1247$), topológiai poláris felülete $/\log TPSA/$ ($R^2=0,081-0,237$), és a vízben való oldhatósága $/\log S/$ ($R^2=0,024-0,1229$) nem mutatott szignifikáns összefüggést a mért fluoreszcencia ($\log FAR$) adatokkal.

5. Összegzés

Kutatásunk során olyan szerves szelénvegyületek (11 vegyület) fizikai-kémiai tulajdonságaira és farmakokinetikai jellemzőire végeztünk becslése-

ket *in silico* szoftveres módszerrel, melyeknek da-ganatellenes (citotoxikus, illetve apoptózist indukáló) és efflux pumpa gátló hatását már kísérletes körülmények között igazoltuk. A becslés értékek alapján elmondható, hogy a vizsgált szelénvegyületek ígéretes ADME tulajdonságokkal rendelkeznek (megfeleltek az irodalmi adatokat figyelembe véve kialakított követelményrendszerünknek és a Lipinsky-féle „ötös” szabálynak is), előreláthatólag közepes permeációval és kiváló orális biobioszorbálhatósággal rendelkeznek. A molekulák valószínűleg erősen kötődnek a plazmafehérjékhez, emellett kölcsönhatásba léphetnek a CYP3A4 és CYP2C9 enzimrendszerekkel. A mért és prediktált adatok összefüggésének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a vegyületek hidrofíll/lipofíll karaktere alapvetően meghatározza az efflux pumpa gátló hatást, azaz minél lipofíllabb karakterű az adott vegyület, annál hatékonyabb ($\log FAR$). Természetesen számolnunk kell azzal, hogy a prediktív, számítógépes módszerek soha nem fogják helyettesíteni az *in vitro* kísérletes mérési módszereket, és a gyógyszer sorsát az emberi szervezetben vizsgáló, humán I. fázisú klinikai vizsgálatokat, azonban a szakirodalmi adatok arra engednek következtetni, hogy a bioaktív molekulák előzetes szűrése ADME tulajdonságaikra gyors és költséghatékony módja a potenciális farmakonjelöltek (ún. *lead compounds*) kivá-

lasztására. A szelénvegyületek ígéretes tulajdonságaikra való tekintettel jelentőségük lehet új származékok előállítása szempontjából, illetve további szelénalapú daganatellenes és efflux pumpa gátló anyagok szintézisében.

6. Köszönetnyilvánítás

A kutatás az Emberi Erőforrások Minisztériuma UNKP-17-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült. Spengler Gabriella Bolyai János Ösztöndíjban részesül. A kutatásunkat a TÁMOP-4.2.2.A-11/ 1KONV-2012-0035 és TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1/2012-0001 pályázatok és a Balassi Intézet Kutatói Program (2017/18) támogatta.

IRODALOM

- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S.: *Cancers (Basel)* 6, 1769-1792 (2014).
- Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E.: *Nat. Rev. Cancer* 2, 48-58 (2002).
- Gottesman, M.M., Ambudkar, S.V.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 33, 453-458 (2001).
- Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., Chang, G.: *Science* 323, 1718-1722 (2009).
- Thomas, H., Coley, H.M.: *Cancer Control* 10, 159-165 (2003).
- Callaghan, R., Luk, F., Bebwaw, M.: *Drug. Metab. Dispos.* 42, 623-631 (2014).
- Letavayova, L., Vlckova, V., Brozmanova, J.: *Toxicology* 227, 1-14 (2006).
- Fernandes, A.P., Gandin, V.: *Biochim. Biophys. Acta.* 8, 1642-1660 (2014).
- Jamier, V., Ba, L.A., Jacob, C.: *Chem. Eur. J.* 36, 10920-10928 (2010).
- Rikiishi, H.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 91-98 (2007).
- Domínguez-Álvarez, E., Gajdács, M., Spengler, G., Palop, J.A., Marć, M.A., Kiec-Kononowicz, K., Amaral, L., Molnár, J., Jacob, C., Handzlik, J., Sanmartín, C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 2821-2824 (2016).
- Gajdács, M., Spengler, G., Sanmartín, C., Marć, M.A., Handzlik, J., Domínguez-Álvarez, E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 797-802 (2017).
- Beaumont, C., Young, G.C., Cavalier, T., Young, M.A.: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 78, 1185-1200 (2014).
- Sanmartín, C., Plano, D., Domínguez-Álvarez, E., Font, M., Calvo, A., Prior, C., Encío, I., Palop, J.A.: *Molecules* 14, 3313-3338 (2009).
- Domínguez-Álvarez, E., Plano, D., Font, M., Calvo, A., Prior, C., Jacob, C., Palop, J.A.: *Eur. J. Med. Chem.* 73, 153-166 (2014).
- Azad, G.K., Tomar, R.S.: *Mol. Biol. Rep.* 41, 4865-79 (2014).
- Ye, S.F., Yang, Y., Wu, L., Ma, W.W., Zeng, H.H.: *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 18, 373-382 (2017).
- PreADMET 2.0: <https://preadmet.bmdrc.kr>
- OSIRIS Molecular Property Explorer: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>
- Lee, S.K., Lee, I.H., Kim, H.J., Chang, G.S., Chung, G.S., No, K.T.: The PreADME Approach: Web-based program for rapid prediction of physico-chemical, drug absorption and drug-like properties. *EuroQSAR 2002 Designing Drugs and Crop Protectants: processes, problems and solutions*, 418-420 (2003). Blackwell Publishing, Massachusetts, Egyesült Államok
- OSIRIS Molecular Property Explorer: <http://www.rdc-chemicals.com/property-explorer-tutorial.html>
- Zhao, Y.H., Le, J., Abraham, M.H., Hersey, A., Eddershaw, P.J., Luscombe, C.N., Boutina, D., Beck, B., Sherborne, B., Cooper, I., Platts, J.A.: *J Pharm Sci* 90, 749-784 (2001).
- Lu, D., Chambers, P., Wipf, P., Xie, X.Q., Englert, D., Weber, S.: *J. Chromatogr. A* 1258, 161-167 (2013).
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V.: *Sci. Rep.* 7, 42717 (2017).
- Lu, J.J., Crimin, K., Goodwin, J.T., Crivori, P., Orrenius, C., Xing, L., Tandler J.P., Vidmar, B.M., Amore, B.M., Wilson, A.G.E., Stouten, P.F.W., Burton, P.S.: *J. Med. Chem.* 47, 6104-6107 (2004).
- Clark, D.E.: *Future Med. Chem.* 3, 469-484 (2011).
- Lipinsky, C.A.: *J. Pharm. Tox. Methods* 44, 235-249 (2000).
- Lipinsky, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J.: *Adv. Drug. Del. Rev.* 46, 3-26 (2001).
- Bohnert, T., Gan, L.S.: *J. Pharm. Sci.* 102, 2953-2994 (2013).
- Artursson, P., Palm, K., Luthman, K.: *Adv. Drug. Del. Rev.* 46, 27-43 (2001).
- Nettleton, D.O., Einhorn, H.J.: *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 382-403 (2011).
- Amaral, L., Spengler, G., Martins, A., Armada, A., Handzlik, J., Kiec-Kononowicz, K., Molnár, J.: *Anticancer Res.* 7, 2947-2957 (2012).

Lysimachia fajok flavonoid összetételének és antioxidáns aktivitásának összehasonlító vizsgálata

TÓTH ANITA*, RIETHMÜLLER ESZTER, VÉGH KRISZTINA,
ALBERTI ÁGNES, BÉNI SZABOLCS, KÉRY ÁGNES

Farmakognóziái Intézet, Semmelweis Egyetem, 1085 Budapest Üllői út 26.

*Levelező szerző: email: toth.anita@gmail.com

Summary

TÓTH, A. *, RIETHMÜLLER, E., Végh, K., Alberti, Á., Béni, Sz., KÉRY, Á.: **Comparative study of the flavonoid composition and antioxidant activity in *Lysimachia* species**

Lysimachia species (Myrsinaceae) are perennial herbaceous plants and distributed widespread in the temperate climates in Eurasia and North America. Members of the genus are widely known as traditional herbal remedies in Hungary as well as in the Far East. These are used to treat gastrointestinal and renal complaints and skin infections. The phytochemistry of *Lysimachia* species are poorly investigated despite their extensive application.

This study was undertaken to develop comparative phytochemical investigation in particular view of phenolic compounds and their antioxidant activities of six *Lysimachia* species: the *L. nummularia* L. (creeping jenny) *L. vulgaris* L. (yellow loosestrife), *L. punctata* L. (dotted loosestrife) are native to Hungary, *L. christinae* Hance (gold coin grass) and *L. clethroides* Duby (goose-neck loosestrife) are native to China, and *L. ciliata* L. var. *firecracker* (fringed loosestrife) is endemic in North America forests.

According to our preliminary studies and literature data the presence of numerous and various flavonoid-O-glycosides are characteristic of the genus. For facilitate the comparison of the species, hydrolysis step was used and after that validated UPLC-DAD method was developed to quantify the main flavonoid aglycones: myricetin, quercetin and kaempferol. Furthermore, the free radical scavenging activity of the samples was measured in in vitro DPPH assay. To investigate the contribution of the individual flavonoids to the total antioxidant activity HPLC coupled with DPPH assay was developed.

The *L. clethroides* sample was found to be the richest in kaempferol and quercetin while the *L. nummularia* sample contained the highest amount of myricetin. The participation of the three investigated flavonoids to the radical quenching activity was the highest (91%) in *L. vulgaris* sample, the lowest in *L. christinae* sample with 30%.

Keywords: *Lysimachia*, HPLC-DPPH, flavonoid, antioxidant

Összefoglalás

A *Lysimachia* nemzetség képviselői (Myrsinaceae) Eurázsia és Észak-Amerika mérsékelt övi területein előforduló évelő, lágy szárú növények. A lizinka fajok mind az európai és magyar, mind a hagyományos keleti orvoslás fontos gyógynövényei, melyek emésztőrendszeri és vesepanaszok, valamint bőrfertőzések kezelésében nyernek felhasználást. Fitokémiájuk széleskörű alkalmazásuk ellenére kevésbé feltárt.

Célul tűztük ki a hazánkban is előforduló három lizinka faj, a *L. nummularia* L. (pénzlevelű lizinka) *L. vulgaris* L. (közönséges lizinka), *L. punctata* L. (pettyegetett lizinka), a Kínában őshonos *L. christinae* Hance (kínai lizinka) és *L. clethroides* Duby (hattyúnyakú lizinka), valamint az Észak-Amerika erdeiben endemikus *L. ciliata* L. var. *firecracker* (vöröslevelű lizinka) összehasonlító fitokémiai vizsgálatát, különös tekintettel fenolos anyagcseretermékeikre és antioxidáns aktivitásukra.

Előzetes vizsgálataink és szakirodalmi adatok alapján a *Lysimachia* generumra jellemző a nagyszámú és változatos összetételű flavonoid-O-glikozidok jelenléte. Az egyes fajok összehasonlításának egyszerűsítése céljából hidrolízist követően validált UPLC-DAD módszerrel határoztuk meg a három legjelentősebb flavonoid aglikon, a miricetin, quercetin és kaempferol mennyiségét, valamint in vitro DPPH rendszerben mértük szabadgyök-fogó hatásvukat. Az egyes komponensek összes antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásának vizsgálatára HPLC-vel kapcsolt DPPH módszert fejlesztettünk.

Legmagasabb quercetin és kaempferol tartalmat a hattyúnyakú lizinkában mértünk, míg miricetinben a pénzlevelű lizinka volt a leggazdagabb. A vizsgált három flavonoid aglikon antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulása a közönséges lizinkában volt a legmagasabb (91%) míg a kínai lizinkában a legalacsonyabb (30%).

Kulcs-szavak: *Lysimachia*, HPLC-DPPH, flavonoid, antioxidáns

Bevezetés

Az utóbbi évek kutatásainak egyik meghatározó iránya az antioxidáns hatású természetes vegyületek vizsgálata. A szervezet redox-homeosztázisát bonyolult, érzékeny rendszer biztosítja, amelyben endogén és exogén tényezők egyaránt szerepet kapnak. A szervezet működésének feltétele a szabad gyök - antioxidáns egyensúly megléte. A védekezésben különböző antioxidáns hatású vegyületek játszanak szerepet, melyek molekulaszervezetük révén képesek a szabad gyökök semlegesítésére [1]. Ezek között fontos szerepet kapnak a táplálékkal szervezetünkbe jutó polifenolok, köztük a flavonoidok. Utóbbiak a szabad és konjugált hidroxil csoportok, valamint a cukorkomponensek számában és helyzetében mutatnak nagy variabilitást. Antioxidáns aktivitásuk elsősorban elektron donor aktivitásuknak és fémkompleképző hatásuknak tulajdonítható [2].

A flavonoidokban gazdag növényi kivonatok antioxidáns aktivitásának meghatározására számos *in vitro* módszert fejlesztettek. A leggyakrabban alkalmazott eljárás a DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) szabadgyök elektrontranszfer során bekövetkező semlegesítési reakcióján alapul [3]. A komplex összetételű, fenoloidokban gazdag növényi kivonatok oxidatív stresszt kivédő hatásának értékelésében mindig visszatérő kérdés, hogy az egyes komponensek milyen mértékben járulnak hozzá a szabadgyökfogó kapacitáshoz. Az elválasztás-technikai módszerek és *in vitro* antioxidáns aktivitást meghatározó eljárások kapcsolásával lehetőség nyílik az egyes komponensek antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásának vizsgálatára is.

A fentebb említettek tükrében a *Lysimachia* genus fenoloidokban gazdag fajai megfelelő példaként szolgálhatnak az egyes flavonoid komponensek összes antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásának vizsgálatához. A Myrsinaceae családba tartozó, mintegy 200 fajt számláló *Lysimachia*, lizinka genus fajai többnyire lápos, erdős területeken előforduló évelő lágyszárú növények, ritkán cserjék. A Kárpát-medencében honos fajok közül a *Lysimachia vulgaris* L. - közönséges lizinka, a *Lysimachia nummularia* L. - pénzlevelű lizinka, valamint a *Lysimachia punctata* L. - pettyegetett lizinka található meg a legnagyobb gyakorisággal. Ázsiában őshonos a *Lysimachia christinae* Hance vagy kínai lizinka, valamint a *Lysimachia clethroides* Duby vagy hattyúnyakú lizinka. A vöröslevelű lizinka, *Lysimachia ciliata* L. Észak-Amerika erdei-

ben endémiás. A közönséges és pénzlevelű lizinkát széleskörűen alkalmazzák a tradicionális gyógyászatban. A herbák főzetét külsőleg reumás fájdalmak, bőrfertőzések kezelésére, tinktúráit illetve a levelek kinyomott levét belsőleg hasmenésses panaszok enyhítésére alkalmazták. A hagyományos kínai gyógyászat a *Lysimachia christinae* herbát alkalmazza, mely szerepel a Kínai Gyógyszerkönyvben is. Belsőleg vizelethajtó, gyulladáscsökkentő, májvédő tulajdonságú, de a magyarországi fajokhoz hasonlóan emésztőrendszeri panaszok, égési sebek, fekélyek kezelésében is felhasználást nyer [4, 5]. Az említett fajok fenoloid összetételét és antioxidáns aktivitását illetően szakirodalmi adatok csak hiányosan állnak rendelkezésre, így ez irányú vizsgálatuk indokolt.

A nemzetség alaposabb fitokémiai megismerésére célul tűztük ki a fent említett hat *Lysimachia* faj összehasonlító vizsgálatát. Összehasonlításuk könnyebb áttekinthetősége miatt vezető flavonoid aglikonjaik felhalmozódási sajátosságait hidrolízist követően validált UPLC-DAD módszer kifejlesztésével vizsgáltuk. A fajok fenolos anyagcseretermékeinek mennyisége és antioxidáns aktivitása közötti kapcsolat feltárására DPPH-val kapcsolt HPLC módszert fejlesztettünk.

Anyagok és módszerek

Növényminta

A *Lysimachia vulgaris* L., *Lysimachia punctata* L., *Lysimachia nummularia* L. herba minták több egyedről virágzási idő alatt 2011 júliusában kerültek begyűjtésre a Bükk Nemzeti Park területén. A növények azonosítása a Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézetében történt. A *Lysimachia clethroides* Duby és *Lysimachia ciliata* L. herba mintákat a lengyelországi Jagellonian Egyetem Gyógynövénykertjének 2014 júliusában virágzás alatt begyűjtött kultivált egyedei szolgáltatták. *Lysimachia christinae* Hance herba vizsgálati anyagot Sanghaji kereskedelmi minta szolgáltatta.

Oldószerek, reagensek

A kempferol, kvercetin, miricetin referencia vegyületeket, a DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) szabadgyököt, a HPLC minőségű trifluoecetsavat, metanolt és acetonitrilt a Sigma-Aldrich Kft.-től (St. Luis, USA). A reagens minőségű kloroformot, metanolt, acetont, etil-acetátot, sósavat, ecetsavat, hexametilén-tetraamint, vízmentes nátriumszul-

fátot a Reanal-Ker Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A HPLC minőségű ioncserélt vizet Milli-Q Direct 8 Millipore (Bedford, USA) víztisztító rendszerrel állítottuk elő. Minden víztartalmú HPLC eluent közvetlenül felhasználás előtt MF-Millipore membránszűrőkön (0,45 µm, kevert cellulóz észterek) (Billerica, USA) szűrtünk, majd ultrahangos fürdőben gáztalanítottunk.

Extrakció, minta előkészítés

7-7 g herba mintából Soxhlet készülékben készítettünk kivonatokat egymást követő extrakcióval (250 ml kloroform 6 órán át 60°C-on; 250 ml metanol 6 órán keresztül 90 °C-on). A kivonatokat csökkentett nyomáson 50 °C-on szárazra pároltuk, majd metanolban (3-4 ml) visszaoldottuk. A hidrolízist minimális módosítással a 8.6 Európai Gyógyszerkönyv 01/2011:1828 (Ginkgo folium) cikkelyében leírtak szerint végeztük [6].

0,1 ml (megközelítőleg 0,02 g száraz kivonat) oldathoz 2,0 ml 25%-os sósavat és 10 ml metanolt adtunk. A mintákat vízfürdőn visszafolyó hűtő alkalmazásával 85 °C-on 1 órán át melegítettük. A mintákat szobahőmérsékletre történő hűtés után választótölcsérben 20 ml víz hozzáadása után háromszor 15 ml vízzel telített etil-acetáttal extraháltuk. Az egyesített etil-acetátos frakciókat vízmentes nátriumszulfáton szűrtük, majd 40 °C-on csökkentett nyomáson szárazra pároltuk. A maradékot HPLC minőségű metanolban (1-2 ml) oldottuk, majd Phenex-RC 15 mm, 20 µm fecskendőszűrőn (Gen-lab Ltd, Budapest, Magyarország) szűrtük.

UPLC-DAD és a kvantitatív módszer validálási körülményei

Készülék: Waters Acquity UPLC-DAD (Waters Corporation, Milford, USA). A *Lysimachia* minták kromatográfiás elválasztását 40°C-ra termosztált Acquity UPLC HSS C18 oszlopon (10 cm x 2,1 mm, 1,8 µm) végeztük 3 µl-es injektálási térfogattal. A következő gradiens elúciós programot alkalmaztuk 0,65 ml/perces áramlási sebesség mellett, ahol az A eluens 0,2 % (v/v) ecetsav, a B eluens acetonitril volt: 0 perc 22% B, 3 perc 40% B, 3,5 perc 100% B, 4 perc 22% B. A kromatogramokat 254 nm-en regisztráltuk.

A flavonol aglikonok mennyiségét külső standard módszerével határoztuk meg. A kalibrációhoz 1,0; 10,0; 50,0; 100,0; 300,0 és 500,0 µg/ml koncentrációjú oldatokat készítettünk a kempferol, kvercetin, miricetin sztenderdekből HPLC minő-

ségű metanolt használva. Minden sztenderd oldatból 3 párhuzamos mintát készítettünk, melyeket egyszer injektáltunk. Ábrázoltuk a csúcs alatti területeket a hozzájuk tartozó koncentráció függvényében. Regresszió analízist végeztük a legkisebb négyzetek módszerével, így meghatároztuk az egyenes egyenletét és determinációs együtthatóját. A kimutatási (LOD) és meghatározási (LOQ) határokat 3:1 és 10:1 jel/zaj aránynál határoztuk meg. 1,0; 50,0 és 500,0 µl/ml koncentrációjú kontrollmintákat alkalmaztunk a napon belüli és napok közötti pontosság megállapítására (alacsony, közepes és magas koncentrációjú standard oldat három párhuzamos mérése egy napon belül, és egymást követő három nap folyamán). A retenció idő ismételtetését a hat *Lysimachia* faj hidrolizált kivonatának hat egymást követő futásából állapítottuk meg [7].

Antioxidáns aktivitás vizsgálata

A *Lysimachia* kivonatok és referenciavegyületek antioxidáns aktivitását DPPH szabadgyököt tartalmazó *in vitro* tesztben határoztuk meg. A törzsoldat 10,00 mg DPPH 25 ml HPLC minőségű metanolban való oldásával készült. A törzsoldatot közvetlenül mérés előtt úgy hígítottuk, hogy abszorbanciája 0,900 (±0,015) legyen. A mérés során a vizsgálandó mintákat öt különböző térfogatban (10-100 µl) adagoltuk a szabadgyök törzsoldatának 2,5 ml-éhez (három párhuzamos mérést végeztünk). Összehasonlító oldatként HPLC minőségű metanolt alkalmaztunk. Az abszorbancia csökkenésének mértékét 360 másodperc elteltével regisztráltuk. A méréseket Hitachi U-2000 spektrofotométerrel (Hitachi Ltd., Tokio, Japan) végeztük 515 nm-en. A gátlási százalékot az abszorbancia csökkenésből számítottuk az alábbi módon: Gátlási % = $(A_0 - A_v) / A_0$. A_v = Végtelen időpontban (6 perc után) mért abszorbancia, A_0 = Kezdeti időpontban mért abszorbancia. Ábrázoltuk a gátlási %-ot a koncentráció függvényében, majd regressziós egyenest illesztettünk. Az 50%-os gátlási értékhez tartozó koncentrációt (IC_{50}) az egyenes egyenletéből számítottuk. Az antioxidáns aktivitást az 50%-os gátlási értékhez tartozó koncentráció értékével jellemeztük [7].

HPLC-DAD- QMS vizsgálatok

Készülék: Agilent 6120 kvadrupól tömegspektrométer elektropray ionforrással (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) Agilent 1100 HPLC rendszer-

hez kapcsolva (G1379A degasser, G1312A bináris gradiens pumpa, G1329A automata mintaadagoló, G1316A oszlop termosztát és G1315C diode diódasoros detektor). A *Lysimachia* minták kromatográfiás elválasztását 40°C-ra termosztált Kinetex-XB C18 oszlopon (15 cm x 4,6 mm, 2,6 µm; Phenomenex, Torrance, USA) végeztük 10 µl-es injektálási térfogattal. A következő gradiens elúciós programot alkalmaztuk 0,5 ml/perces áramlási sebesség mellett: 0 perc 0% B, 20 perc 35% B, 40 perc 100% B, 45 perc 100% B, ahol az A eluens 0,1%-os (v/v) TFA vizes oldata, a B eluens 0,1% (v/v) TFA acetonitril:víz 95:5 elegyében oldva. A kromatogramokat 254 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat 200 és 400 nm közötti tartományban vettük fel. Tömegspektrometriás körülmények: ionforrás: ESI, pozitív ion mód, a szárító gáz (N₂) hőmérséklete 350°C, áramlási sebessége 12 l/perc, a porlasztó gáz (N₂) nyomása 10 psi, fragmentor feszültség 120 V, kapilláris feszültség 4000 V [8].

HPLC-vel kapcsolt DPPH módszer

Az egyes komponensek antioxidáns aktivitásának meghatározásához *Riethmüller* és *mtsai* (2016) módszerét alkalmaztuk kis módosítással [9]. Ennek során a hidrolizált *Lysimachia* kivonatok 100 µl-ét 100 µl DPPH oldattal (1,5 mg/ml koncentrációjú, HPLC minőségű metanolos oldat) elegyítettük. A mintákat 30 perces szobahőmérsékleten fénytől védve történő inkubálás után HPLC-DAD-QMS módszerrel vizsgáltuk az előzőekben leírt paraméterek mellett.

Az analízishez használt mintakonzentrációt a DPPH tesztoldatát 0,5-5 mg/ml-es koncentrációjú oldatainak a kivonatokhoz való hozzáadásával kapott kromatogramok értékelése alapján határoztuk meg. Azt a koncentrációt választottuk, ahol a miricetin vagy ha az kis mennyiségben volt jelen, a kvercetin csúcsterület csökkenése a legnagyobb bizonyult. A kontrollminták esetében 100 µl kivonathoz 100 µl HPLC minőségű metanolt adtunk. A kivonatok DPPH-val kezelt kromatogramját a kontroll minták kromatogramjával hasonlítottuk össze, és a három flavonoid aglikon: miricetin, kvercetin és kempferol csúcsterület változását vizsgáltuk.

A területcsökkenést, és a területváltozás arányát az alábbi egyenletekkel számítottuk:

$$\Delta T = T_1 - T_2,$$

ahol ΔT az integrált területek különbsége, T_1 a DPPH oldattal kezelt minta adott komponenséhez tartozó kromatográfiás csúcsának integrált területe (mAu*s), T_2 a kontroll oldat adott komponenséhez tartozó kromatográfiás csúcsának integrált területe (mAu*s). $Tcs(\%) = (\Delta T / T_1) * 100\%$, Tcs a területcsökkenés százalékos formában, és $\Delta T_R = (\Delta T / \Sigma \Delta T) * 100\%$, ahol ΔT_R pedig a területcsökkenési arány százalékos formában kifejezve [8].

Eredmények

Korábbi vizsgálatainkban a Magyarországon fellelhető fajok metanolos kivonataiban 13 flavonoid származékot detektáltunk [12]. Eredményeink és szakirodalmi adatok alapján a lizinka fajokra jellemző aglikonok a kempferol, kvercetin és a miricetin, melyek szabadon és konjugált formában fordulnak elő. Nagy számuk és az összehasonlító anyagok korlátozott fellelhetősége miatt a teljes flavonoid profil kvantitatív mérése szinte mindig nehézségbe ütközik. Ezért a genuin flavonoid vegyületek számának csökkentése céljából a növényi kivonatok minőségvizsgálatában gyakran alkalmazott savas hidrolízis módszerét alkalmaztuk az Európai Gyógyszerkönyv (8.6) gyógynövénycikelyeiben hivatalos enyhe hidrolízis körülményeit adaptálva. 25 v/v% sósav jelenlétében 85 °C-on 1 órán át hidrolizáltuk a mintákat [6]. Ilyen körülmények között az O-glikozidos kötésben lévő cukormolekulák hidrolizálnak, míg a flavonoid-C-glikozidok nem bomlanak.

Flavonoid aglikonok mennyiségi meghatározására fejlesztett UPLC-DAD kvantitatív módszer validálása

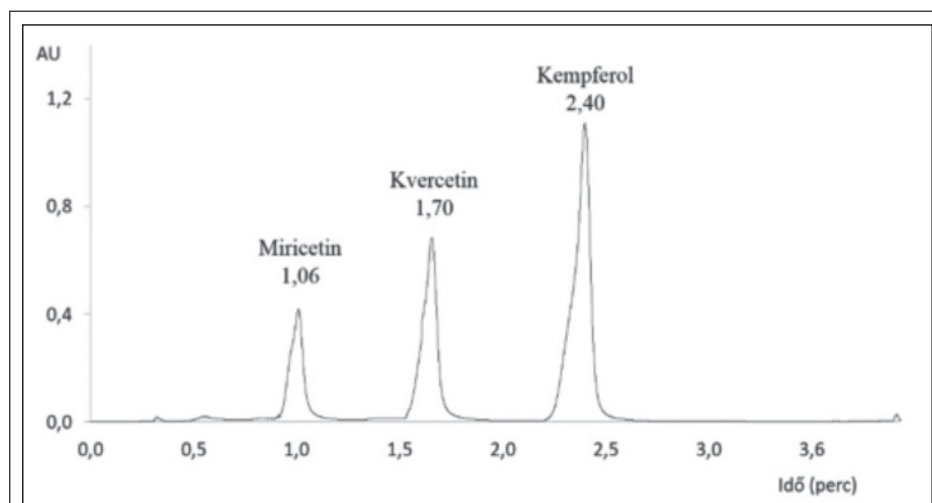
Az egyre gyorsabb elválasztás igényének növekedésével a flavonoidok meghatározására leggyakrabban alkalmazott HPLC mellett előtérbe kerültek újabb technikák, így az ultra-nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (UPLC) módszerek alkalmazása. A HPLC mechanizmusával megegyező UPLC alkalmazásánál a sebesség, érzékenység és felbontás jelentősen nagyobb. A csökkent analízisidővel párhuzamosan csökken a felhasznált oldószer mennyisége mely költségsökkentő és nem utolsósorban környezetkímélő hatású [10]. A fenolos anyagcseretermékek kvalitatív vizsgálatában egyre szélesebb körben alkalmazták az UPLC-t, azonban természetes vegyületek mennyiségi meghatározásához való alkalmazásáról kevés közlemény számol be.

A megbízható kvantitatív UPLC módszer fejlesztés-

I. táblázat

A kvantitatív UPLC-DAD módszer validálási adatai (r^2 =determinációs együttható, LOD: kimutathatósági határ, LOQ: meghatározási hatás)

Sztenderd	Regressziós egyenes egyenlete	r^2	Regressziós tartomány ($\mu\text{g/ml}$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
kempferol	$y=14403x-4380,2$	0,9999	1-500	0,10	0,31
kvercetin	$y=13710x-2568$	1,0000	1-500	0,13	0,42
miricetin	$y=9994,4x-9143$	0,9999	1-500	0,15	0,50



1. ábra: A standard keverék (kempferol, kvercetin, miricetin) 254 nm-en rögzített UPLC-DAD kromatogramja

téséhez optimalizáltuk a kromatográfiai paramétereiket. Metanol és 0,2 %-os ecetsav oldatot alkalmazva eluensként, az anyagok és módszerek fejezetben leírt gradiens mellett 40 fokra temperált fordított fázisú oszlop használatával a vizsgált 3 flavonoid aglikon alapvonalon történő elválasztását értük el három perces analízis időn belül (1. ábra).

Az optimalizált UPLC-DAD módszer validálása során vizsgáltuk a linearitást, kimutatási és meghatározási határokat, ismételhetőséget és pontosságot. A mennyiségi meghatározások külső standard módszerrel történtek.

Igazoltuk, hogy a vizsgált koncentrációtartományban (1-500 μl) a három flavonoid aglikon, a kempferol, kvercetin és miricetin sztenderd detektorjele és anyagmennyisége között lineáris összefüggés áll fenn. Az alkalmazott koncentráció tartományban a determinációs együttható minden esetben elérte a 0,9999 értéket. Alsó kimutatási határnak (LOD) és meghatározási határnak (LOQ) tekintettük a vizsgált flavonoid aglikonok azon koncentrációját, ahol az alkotó csúcsterülete az alapvonalai zajszint háromszorosa, illetve tízszerese volt. Az alacsony LOD és LOQ értékek, valamint a széles linearitási tartomány megfelelő r^2 értékkel lehetővé tették a flavonoid aglikonok mennyiségi meghatározását a

növényi kivonatokban (I. táblázat).

A retenciós idő ismételhetőségének vizsgálatához hidrolizált lizinka kivonatot alkalmaztunk, melyet az adatokból származó relatív sztenderd deviációval jellemeztünk. Mind a három vizsgált aglikon esetében megfelelőnek bizonyult a retenciós idők ismételhetősége, a kempferol, kvercetin és miricetin esetén 0,022%, 0,021% illetve 0,024% RSD értékeket kaptunk $n = 6$ minta esetén. A csúcsterü-

letek ismételhetősége a mennyiségi meghatározás precizitását jelzi, melyhez a flavonoid aglikon sztenderd oldatokat három koncentrációban (alacsony, közepes, és magas; 1, 50 és 500 $\mu\text{g/l}$) használtuk fel. A napon belüli vizsgálat során egyazon napon történő mérési eredményeket dolgoztuk fel, míg a napok közötti vizsgálat a hosszú távú vizsgálatot jelöli, melyben három egymást követő napon végzett analízisek eredményeit értékeltük.

Az analitikai módszer pontosságát és torzítatlanságát három koncentráció tartományban vizsgáltuk és az eltérést a valódi értékben kifejezett százalékban adtuk meg. Az ismételhetőség és pontosság meghatározásához három párhuzamos mérést végeztünk (II. táblázat). Ennek alapján a vizsgált flavonoid aglikonok csúcsterület adatainak napon belüli és napok közötti ismételhetősége és pontossága sem haladta meg a 4% illetve 10%-ot, ezzel bizonyítva, hogy az általunk fejlesztett módszer stabil és pontos [7].

Hidrolizált *Lysimachia* kivonatok flavonoidjainak kvantitatív meghatározása

A *L. vulgaris*, *L. nummularia*, *L. punctata*, *L. christinae*, *L. ciliata*, *L. clethroides* hidrolizált kivona-

II. táblázat

Az UPLC-DAD kvantitatív módszer validálási adatai: ismételtetőség, pontosság

Névleges koncentráció ($\mu\text{g/ml}$)	Ismételtetőség (RSD%)		Pontosság (%)	
	Napon belüli	Napok közötti	Napon belüli	Napok közötti
<i>Kempferol</i>				
1	2,60	1,88	93,7	93,1
50	1,31	3,69	99,6	95,7
500	1,24	3,28	100,2	96,7
<i>Kvercetin</i>				
1	3,44	2,86	107,6	107,8
50	3,58	2,29	101,7	100,9
500	1,19	1,37	100,7	99,6
<i>Miricetin</i>				
1	0,71	0,67	102,2	102,1
50	1,34	3,75	105,3	104,2
100	0,27	1,00	100,0	100,1

tainak kvantitatív mérésére UPLC-DAD módszert fejlesztettünk és validáltunk. Eredményeinket a 2. ábrán összegeztük.

A kempferol, kvercetin, miricetin tartalom a hatyúnyakú lizinkában volt a legmagasabb, míg a kínai lizinkában a legalacsonyabb. Emellett a *Lysimachia clethroides*-ben mértük a legmagasabb kvercetin ($97,67 \pm 4,61 \mu\text{g/mg}$ száraz kivonat) és kempferol ($25,77 \pm 1,29 \mu\text{g/mg}$ száraz kivonat) tartalmat, mely jó egyezést mutat szakirodalmi adatokkal [11]. A miricetint a pénzlevelű lizinka mintában mértük legmagasabb mennyiségben ($20,79 \pm 1,00 \mu\text{g/mg}$ száraz kivonat), ami megerősíti korábbi HPLC eredményeinket, miszerint a faj metanolos kivonatának főkomponense a miricitrin (miricetin-3-O-ramnozid) [12].

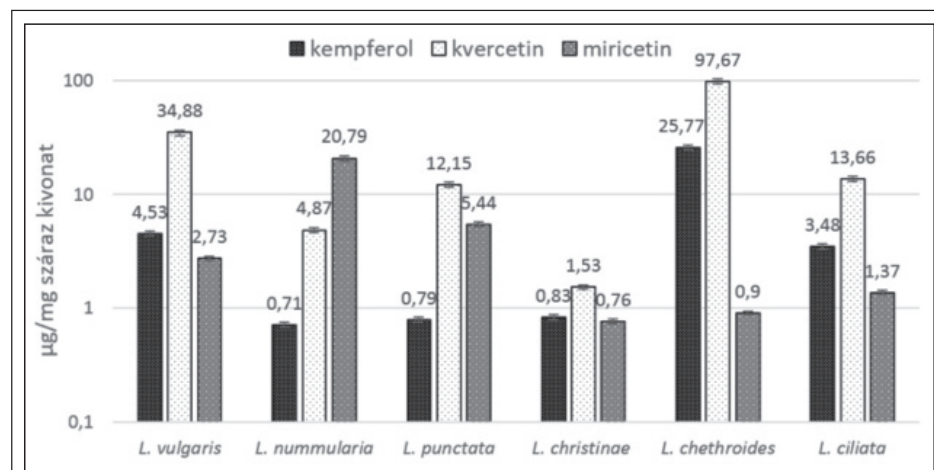
A közönséges lizinka vizsgált minták közötti második legmagasabb kvercetin tartalma ($34,88 \pm 1,67 \mu\text{g/mg}$ száraz kivonat) szintén alátámasztja korábbi méréseinket [9]. A *L. ciliata* hason-

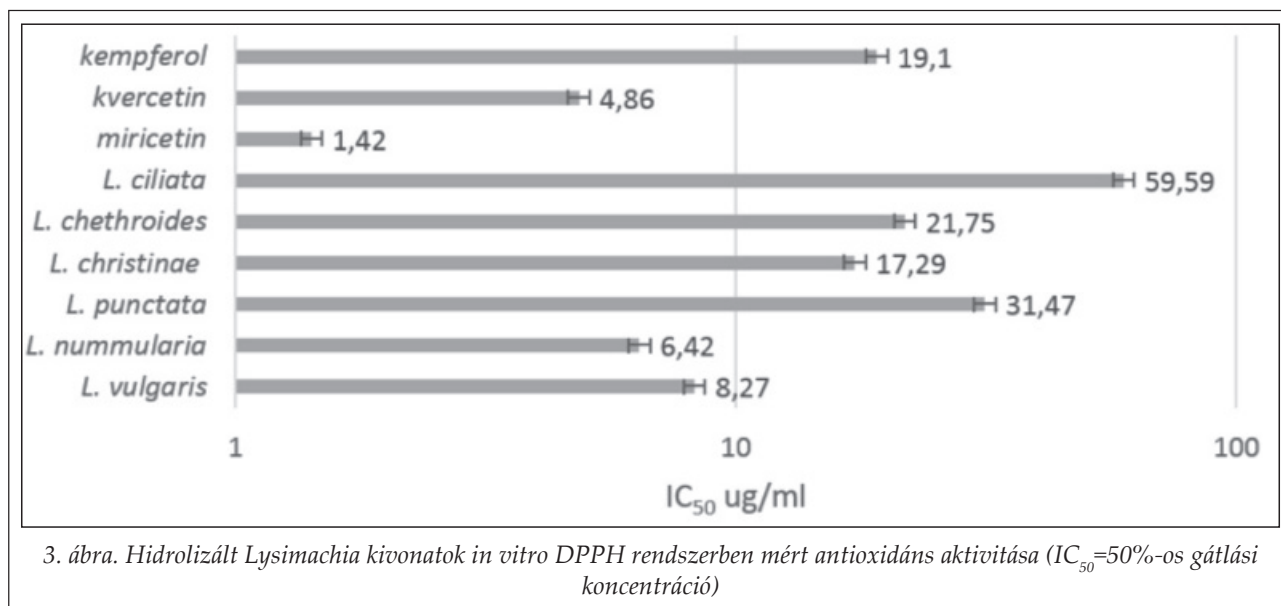
lóan a *L. vulgari*hoz döntően kvercetint ($13,66 \pm 0,65 \mu\text{g/mg}$ száraz kivonat) és kempferolt ($3,48 \pm 0,17 \mu\text{g/mg}$ száraz kivonat) halmoz fel alacsonyabb miricetin tartalom mellett ($1,37 \pm 0,06 \mu\text{g/mg}$ száraz kivonat). Vizsgálataink alapján elsőként írtuk le az említett három flavonol aglikon jelenlétét és mennyiségét vöröslevelű lizinkában [7].

A hidrolizált *Lysimachia* kivonatok antioxidáns aktivitásának vizsgálata

A növényi eredetű flavonoidok ismert antioxidáns tulajdonságú vegyületek. Hatásukat a hidrogén atom donálása révén létrejövő direkt szabadgyök semlegesítéssel, vagy elektronátadást követő protonátadással fejtik ki, miközben a párosítatlan elektronjaik delokalizációja révén stabil fenoxil gyökké alakulnak [13]. Emellett a nehézfém ionok kelálásával és a szingulett oxigének semlegesítésével is hozzájárulnak a lipidperoxidáció gátlásához és a szervezet redox-homeosztázisának fenntartásához [2, 14].

Az antioxidáns aktivitás meghatározására számos *in vitro* módszert fejlesztettek, melyek közül a növényi kivonatok elemzéséhez leggyakrabban alkalmazott a DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) semlegesítési reakcióján alapuló eljárás [3]. A 3. ábra a hidrolizált *Lysimachia* kivonatok és sztenderd flavonolok an-

2. ábra: Hidrolizált *Lysimachia* kivonatok kempferol, kvercetin és miricetin tartalma



tioxidáns aktivitás értékeit összegzi, melyet az 50%-os gátlási értékhez tartozó koncentráció értékével (IC₅₀) jellemeztünk.

Az antioxidáns flavonoidok szerkezeti sajátosságai a következőekben összegezhető [15]. A fenolos hidroxil csoport, mint H-donor és akceptor is funkcionálhat, ezért a B gyűrű orto-dihidroxil csoportja (catechol vagy galloil funkció) részt vesz az elektron delokalizációban. A 2-es és 3-as szénatom közötti kettőskötés a C gyűrű 4-es pozíciójában lévő oxo csoporttal konjugációban hozzájárul a delokalizáció kiterjesztéséhez. További hidroxil csoportok a 3-as és 5-ös helyzetben képesek H-kötés kialakítására a 4-es helyzetben lévő oxo csoporttal, ezáltal növelik a vegyület szabadgyökfogó potenciálját. Ezek a tulajdonságok stabilizálják a H-atom elvonása után kialakuló fenoxil gyököt [15]. A hidroxilcsoport glikozilációja és/vagy metilációja, különös tekintettel C3-as helyzetben csökkenthetik a szabadgyökfogó képességet. Ezek alapján a flavonoidok *in vitro* antioxidáns aktivitása függ a szabad hidroxil csoportok számától és elhelyezkedésétől [3, 16, 17]. Eredményeink jó összhangban vannak a fenti megállapításokkal. A kvercetin és miricetin, melyek 2 illetve 3 szabad fenolos hidroxil csoporttal rendelkeznek a B gyűrűn, erősebb szabadgyök semlegesítő tulajdonságúak, mint a kempferol (1 szabad fenolos hidroxilcsoport) (3. ábra).

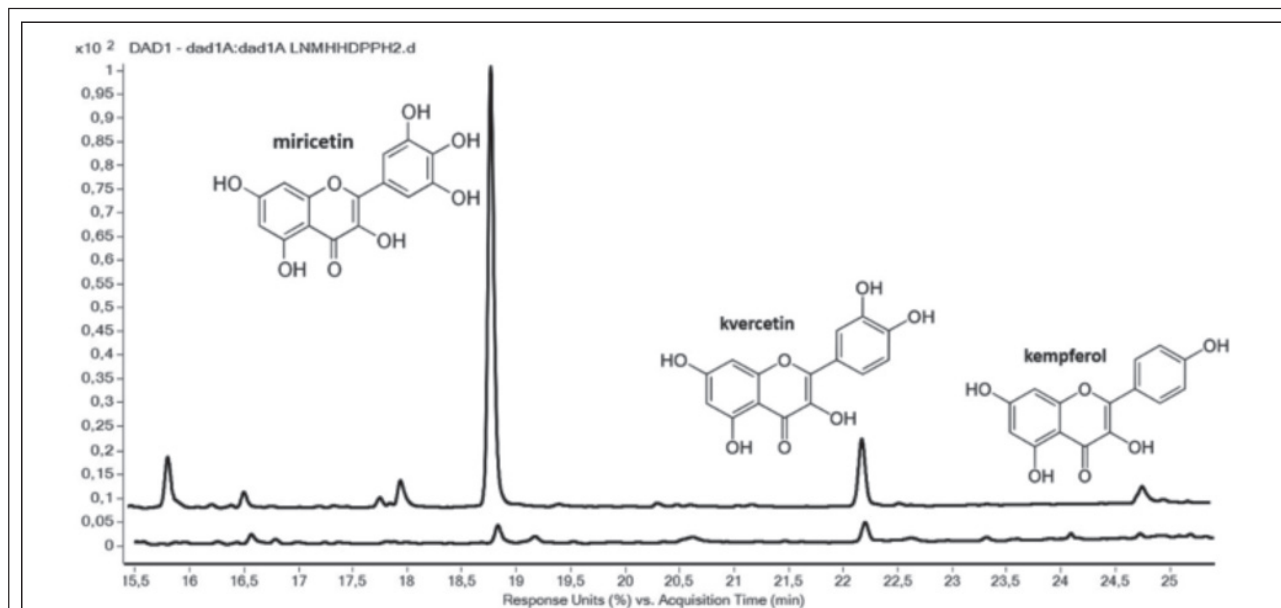
Méréseinkben mind a hat faj kivonata koncentráció függő módon csökkentette a szabadgyökök számát. A pénzlevelű lizinka rendelkezett a legerősebb antioxidáns hatással (IC₅₀=6,42±0,30 µg/ml), mely jól magyarázható a minta magas miricetin tartalmá-

val. A *L. nummularia* mellett a *L. vulgaris* (IC₅₀=8,27±0,39 µg/ml) és *L. christinae* (IC₅₀=17,29±0,81 µg/ml) is erősebb antioxidánsnak bizonyult, mint a kempferol (IC₅₀=19,10±0,90 µg/ml). Mindhárom lizinka kivonata kisebb koncentrációban semlegesítette a szabadgyökök 50%-át, mint a kempferol. Ezek a fajok a kvantitatív vizsgálatok alapján magas mennyiségben tartalmazzák a miricetin mellett a kvercint is. Ugyanakkor a *L. clethroides* hidrolizált kivonata a magas flavonoid tartalom ellenére alacsonyabb antioxidáns értékkel rendelkezik (IC₅₀=21.75±1.02 µg/ml) [7].

Lysimachia flavonoidok antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásának vizsgálata HPLC-vel kapcsolt DPPH módszerrel

A fent bemutatott eredményeink jelentős különbségeket tártak fel a vizsgált fajok antioxidáns aktivitás értékei között. Emellett az egyes komponensek mennyiségi felhalmozódása is meglehetősen eltért és fajra jellemző mintázatot mutatott. A komplex összetételű, fenoloidokban gazdag kivonatok oxidatív stresszt kivédő hatásának értékelésében mindig visszatérő kérdés, hogy az egyes jellemző komponensek milyen mértékben járulnak hozzá a szabadgyökfogó kapacitáshoz. A kérdés megválaszolásához HPLC-vel kapcsolt DPPH módszer fejlesztettünk. A minta és vak oldatokat inkubálás után vizsgáltuk. A *L. nummularia* példáján (4. ábrán) jól követhető hogy a vizsgált flavonoid aglikonok csúcsintenzitásai DPPH-val történő kezelés után jelentősen csökkennek.

Legnagyobb mértékben a miricetin míg legki-



4. ábra: A *Lysimachia nummularia* hidrolizált kivonatának és DPPH-val együtt kromatografált kivonatának 254 nm-en detektált kinagyított kromatogramja

sebb mértékben a kempferol csúcsterülete csökkent, alátámasztva azt a megállapítást, hogy az antioxidáns aktivitás függ a szabad fenolos hidroxil csoportok számától [3, 16, 17]. A területcsökkenést az integrált területek különbségéből számítottuk, melyet megadhatunk százalékos formában, de kifejezhetjük az egyes komponensek %-os hozzájárulását is. Eredményeinket a **III. táblázat** foglalja össze.

A pettyegetett lizinka hidrolizált metanolos kivonata nagy mennyiségben tartalmazott kvercetin és miricetint (**III. táblázat**), melyek közel 75% százalékban járultak hozzá a minta közepesen alacsony DPPH-semlegesítő hatásához. Hasonló eredményeket kaptunk a vöröslevelű lizinka kivonatát vizsgálva is. A közepesen magas kempferol és kvercetin tartalom (**2. ábra**) 60%-ban határozta meg a minta antioxidáns hatását, mely a legalacsonyabbnak bizonyult a vizsgált kivonatok között. Ez arra enged következtetni, hogy a semlegesítési reakció végbemenetelét más, jelen

vizsgálatban nem azonosított vegyületek, illetve prooxidáns hatás akadályozhatják. A pénzlevelű lizinka kivonatának szabadgyökfogó aktivitásáért főleg a legmagasabb mennyiségben felhalmozott miricetin felelős. Szabadgyökfogó aktivitáshoz való hozzájárulása kiemelkedően magas, 73,5%.

A közönséges lizinka a fentebb említett fajokhoz képest magasabb mennyiségben tartalmazott kvercetin és kempferolt (**2. ábra**). Bár a miricetin tartalma alacsonynak bizonyult (2.73 ± 0.13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ száraz kivonat), a *L. vulgaris* kivonata rendelkezett a második legmagasabb DPPH semlegesítő aktivitással (**3. ábra**), melyhez a kvercetin és kempferol együttesen 87%-ban járult hozzá. A kvercetin önmagában 76%-ban határozta meg az antioxidáns aktivitást, mely a legnagyobb területcsökkenési arány a minták között. Emellett a három vizsgált flavonoid részvétele (91%) a semlegesítési reakcióban szintén a legmagasabbnak bizonyult.

A vizsgált három flavonoid aglikon mennyisége illetve antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárú-

III. táblázat

Lysimachia kivonatokban detektált flavonol aglikonok antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulása %-ban kifejezve

kempferol (%)	kvercetin (%)	miricetin (%)	egyéb (%)		
10,4	76,3	4,5	8,8	<i>Lysimachia vulgaris</i>	közönséges lizinka
2,9	10,2	73,5	13,4	<i>Lysimachia nummularia</i>	pénzlevelű lizinka
5,9	44,9	29,7	19,5	<i>Lysimachia punctata</i>	pettyegetett lizinka
3,3	23,0	3,3	70,4	<i>Lysimachia christinae</i>	kínai lizinka
18,8	68,0	3,2	10,0	<i>Lysimachia chletroides</i>	hattyúnyakú lizinka
17,6	41,9	2,8	37,7	<i>Lysimachia ciliata</i>	vöröslevelű lizinka

lása a *L. chrisritinae* mintában volt a legalacsonyabb. Ennek ellenére a minta össz-antioxidáns aktivitása közepesen magasnak bizonyult (3. *ábra*), mely a komponensek közötti szinergista kölcsönhatást tételezhet fel [18]. Továbbá, szakirodalmi adatok alapján a fajra a flavonol-O-glikozidok mellett a C-glikozidok és metilált származékok jelenléte is jellemző [19]. Az utóbbiak az általunk alkalmazott hidrolízis során módosítatlan formában maradnak a kivonatokban, de hozzájárulhatnak a szabadgyökfogyó kapacitáshoz.

A hatyúnyakú lizinka hidrolizált kivonata tartalmazta legmagasabb mennyiségben a kvercetin és kempferol aglikonokat (2. *ábra*), és bár ezeknek a hozzájárulása az antioxidáns aktivitáshoz kiemelkedően magas volt (87%), az össz-kivonat szabadgyök-semlegesítő kapacitása csak közepesen bizonyult, nem érte el a kempferol sztenderd értékét (3. *ábra*). Ezért a komponensek közötti antagonisták kölcsönhatások meglétét feltételezhetjük annak ellenére, hogy a számított össz-aglikon tartalom (kempferol, kvercetin és miricetin tartalom összege) és a vizsgált vegyületek antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulása is a legmagasabbnak bizonyult a kivonatokot illetően. A kempferol a *L. clethroides* faj esetében járult hozzá legmagasabb százalékban (18,8%) az aktivitáshoz (III. táblázat) [8].

Összefoglalás

HPLC-DAD-MS és UPLC-DAD módszerekkel elsőként vizsgáltuk a Kárpát-medencében előforduló lizinka fajok közül a *Lysimachia vulgaris*, *Lysimachia nummularia*, *Lysimachia punctata*, a Kínában őshonos *Lysimachia christinae* és *Lysimachia clethroides*, valamint az É-Amerikában elterjedt *Lysimachia ciliata* flavonol összetételét. *In vitro* DPPH szabadgyök tesztrendszerben mértük a kivonatok antioxidáns aktivitását. Validált kvantitatív UPLC-DAD módszert fejlesztettünk ki a három vezető aglikon, a kempferol, kvercetin és miricetin meghatározására. A fajok hidrolizált kivonatai között jelentős különbségeket tártunk fel antioxidáns aktivitásukban, valamint az egyes aglikonok mennyiségi felhalmozódásában. Az egyes komponensek antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásának vizsgálatára HPLC-vel

kapcsolt DPPH módszert fejlesztettük, mellyel rámutattunk az egyes fajok kivonatában előforduló aglikonok mennyisége és antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásuk közötti kapcsolatra. A vizsgált fajokot tekintve a pénzlevelű lizinka kivonata bizonyult legerősebb antioxidánsnak, szabadgyökfogyó kapacitását magas miricetin tartalmával magyarázzuk. Eredményeink mind fitokémiai mind fitoterápiás szempontból is újak, további vizsgálatok kiindulópontjának számíthatnak, és hozzájárulnak a genus kemotaxonomiai megismeréséhez is.

IRODALOM

1. Ray, P.D., Huang, B-W., Tsuji, Y.: Cell. Signal. 24, 981-990 (2012).
2. Procházková D., Boušová, I., Wilhelmová, N.: Fitoterapia 82, 513-523 (2011).
3. Blois, M.S.: Nature 181, 1199-1200 (1958).
4. Zelenyák J.: A gyógynövények használata, Stephaneum, Budapest, (1908), 108. old.
5. Hempen, C-H., Fischer, T.: A materia medica for chinese medicine plants, minerals and animal products. Churchill Livingstone Elsevier, Oxford, (2009), 322. old.
6. <http://online6.edqm.eu/ep806/> [2016. 02. 01.] [EDQM] The European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, European Pharmacopoeia edition 8.6. Monograph 01/2011:1828 (Ginkgo leaf).
7. Toth, A., Vegh, K., Alberti, A., Beni, Sz., Kery, A.: Nat. Prod. Res. 30, 2372-2377 (2016).
8. Toth, A., Riethmuller, R., Vegh, K., Alberti, A., Beni, Sz., Kery, A. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1359176> (2017).
9. Riethmuller, E., Konczol, A., Szakal, D., Vegh, K., Balogh, Gy., Kery, A.: Nat. Prod. Commun. 11, 641-644 (2016).
10. Novakova, L., Matysova, L., Solich P.: Talanta 68, 908-918 (2006).
11. Liu, Y.L., Tang, L.H., Liang, Z.Q., You, B.G., Yang, S.L.: J Ethnopharmacol. 131, 1-9 (2010).
12. Toth, A., Toth, G., Kery, A.: Nat. Prod. Commun. 9, 1473-1478 (2014).
13. Gülcin, I.: Arch. Toxicol. 86, 345-391 (2012).
14. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya J.B.: J. Nutr. Biochem. 13, 572-584 (2002).
15. Bors, W., Michel, C., Schikora, S.: Free. Radic. Biol. Med. 19, 45-52 (1995).
16. Burda, S., Oleszek, W.: J. Agr. Food. Chem. 49, 2774-2779 (2001).
17. Choe, E., Min, D.B.: Compr. Rev. Food. Sci. F. 8, 345-358 (2009).
18. Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., de Pascual-Teresa, S.: Food. Chem. 121, 691-696 (2010).
19. Sun, D., Dong, L., Guo, P., Shi, X., Gao, J., Ren, Y., Jiang, X., Li, W., Wang, C., Wang, Q.: Food. Chem. 138, 139-147 (2013).

