



 Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
Ministry of Science and Higher Education
Republic of Poland

KNO

Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący

2012-2017

Leading National Research Centre

Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Mariusz Belka

**Chemometrycznie wspomagana, oparta na badaniach
metabolicznych, strategia projektowania nowych leków**

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:

prof. dr hab. Tomasz Bączek

Gdańsk 2015

Badania będące podstawą niniejszej pracy doktorskiej były finansowane z następujących źródeł:

- grant Preludium Narodowego Centrum Nauki realizowany w latach 2011-2014 (UMO-2011/01/N/NZ1/00214, kierownik grantu),
- grant Opus Narodowego Centrum Nauki realizowany w latach 2012-2015 (UMO-2011/03/B/NZ1/03113, główny wykonawca),
- grant dla młodych naukowców Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego realizowany w latach 2014-2015 (MN 04-0151/08, kierownik grantu),
- środki Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) przyznanego na podstawie decyzji nr MNiSW-DS-6002-4693-23/WA/12 z dnia 12 lipca 2012 r. na lata 2012-2017 Gdańskiemu Uniwersytetowi Medycznemu.

Doktorant otrzymał także finansowanie w formie:

- stypendium „Innodoktorant” przyznanego w roku 2013 w ramach Priorytetu VIII Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2, Poddziałanie 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz budżetów samorządów województw,
- stypendium Etiuda Narodowego Centrum Nauki otrzymywane w latach 2013-2014 (UMO-2013/08/T/NZ1/00764, laureat stypendium).

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania Panu Profesorowi Tomaszowi Bączkowi za okazane zaufanie i wsparcie oraz wyrozumiałość i nieocenioną pomoc na wszystkich etapach powstawania niniejszej pracy doktorskiej

Dziękuję również i dedykuję niniejszą pracę mojej żonie Weronice za wsparcie i za to że jest ze mną już od siedmiu lat

Spis treści

Spis publikacji, w których wykorzystano wyniki pracy doktorskiej	8
Streszczenie	9
Abstract	11
1 Wstęp teoretyczny.....	13
1.1 Skuteczne opracowywanie nowych leków jako wyzwanie nauk farmaceutycznych XXI wieku	13
1.2 Zróżnicowane zastosowanie farmakologiczne substancji zawierających pierwszorzędową grupę sulfonamidową	14
1.3 Pochodne arylopiiperazyny jako grupa leków o działaniu anksjolitycznym.....	18
1.4 Badanie metabolizmu ksenobiotyków w warunkach <i>in vitro</i>	20
1.5 Rola spektrometrii mas w badaniach metabolicznych.....	23
1.6 Techniki <i>in silico</i> wspomagające badania metabolizmu leków.....	27
2 Cel i założenia pracy	29
3 Materiały i metody	31
3.1 <i>Obiekt badań – potencjalne nowe leki</i>	31
3.1.1 Pochodne benzenosulfonamidu	31
3.1.2 Analogi arylopiiperazyny.....	33
3.2 <i>Oprogramowanie</i>	36
3.3 <i>Odczynniki chemiczne</i>	36
3.4 <i>Aparatura</i>	38
3.5 <i>Analiza głównych składowych (PCA) jako narzędzie poszukiwania zależności struktura-aktywność na przykładzie 14 nowych pochodnych benzenosulfonamidu (procedura 1)</i>	39
3.6 <i>Analiza QSAR dla pochodnych benzenosulfonamidu (procedura 2)</i>	42
3.6.1 <i>Zmienna zależna</i>	42
3.6.2 <i>Zmienne niezależne</i>	44
3.6.3 <i>Opracowanie modelu QSAR – regresja wieloraka z algorytmem krokowym</i>	44

3.7	<i>Wyznaczanie chromatograficznych parametrów lipofilowości technikami chromatografii ciekowej w odwróconym układzie faz (RP-LC) oraz micelarnej chromatografii ciekowej (MLC)</i>	45
3.7.1	Wyznaczenie $\log k_{w(RP-LC)}$ techniką chromatografii ciekowej w odwróconym układzie faz (RP-LC)	45
3.7.2	Wyznaczenie $\log k_{(MLC)}$ techniką micelarnej chromatografii ciekowej (MLC)	46
3.8	<i>Wspomaganie procesu identyfikacji izomerów geometrycznych pochodnych benzenosulfonamidu – model QSRR (procedura 3)</i>	46
3.8.1	Modelowanie trójwymiarowej struktury i deskryptory	48
3.8.2	Wyznaczenie chromatograficznych parametrów lipofilowości.....	49
3.8.3	Opracowanie modelu QSRR	50
3.9	<i>Biotransformacja pochodnych benzenosulfonamidu – procedura inkubacji in vitro w obecności ludzkiej frakcji mikrosomalnej</i>	50
3.10	<i>Ocena stabilności metabolicznej pochodnych benzenosulfonamidu z użyciem techniki LC-MS51</i>	
3.11	<i>Zebranie widm fragmentacyjnych (LC-Q-TOF-MS) pochodnych benzenosulfonamidu oraz produktów ich biotransformacji. Badanie produktów biotransformacji pochodnych benzenosulfonamidu</i>	52
3.12	<i>Biotransformacja analogów arylopipezyny – procedura inkubacji in vitro w obecności ludzkiej frakcji mikrosomalnej</i>	53
3.13	<i>Ocena stabilności metabolicznej analogów arylopipezyny z użyciem techniki LC-MS.....</i>	53
3.14	<i>Poszukiwanie zależności pomiędzy wartościami deskryptorów molekularnych a stabilnością metaboliczną pochodnych arylopipezyny z wykorzystaniem analizy cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS, procedura 4).....</i>	55
4	Wyniki i dyskusja wyników	58
4.1	<i>Analiza głównych składowych (PCA) jako narzędzie poszukiwania zależności struktura-aktywność na przykładzie 14 nowych pochodnych benzenosulfonamidu (procedura 1).....</i>	58
4.2	<i>Analiza QSAR dla pochodnych benzenosulfonamidu (procedura 2)</i>	66
4.2.1	Lipofilowość	66
4.2.2	Analiza głównych składowych z wykorzystaniem danych aktywności biologicznej.....	67
4.2.3	Analiza głównych składowych danych deskryptorów molekularnych	70
4.2.4	Model QSAR dla pochodnych benzenosulfonamidu.....	73
4.3	<i>Wspomaganie procesu identyfikacji izomerów geometrycznych pochodnych benzenosulfonamidu – model QSRR (procedura 3)</i>	75

4.4	<i>Biotransformacja in vitro pochodnych benzenosulfonamidu</i>	81
4.5	<i>Badanie produktów biotransformacji pochodnej benzotiohydrazonianu o kodzie SLB-14 z zastosowaniem spektrometrii mas</i>	84
4.5.1	Hydroksylacja (M1)	88
4.5.2	Debrominacja (M2)	89
4.5.3	Debrominacja i hydroksylacja (M3).....	90
4.6	<i>Ocena stabilności metabolicznej pochodnych arylopiiperazyny</i>	91
4.7	<i>Poszukiwanie zależności pomiędzy wartościami deskryptorów molekularnych a stabilnością metaboliczną pochodnych arylopiiperazyny z wykorzystaniem analizy cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS, procedura 4)</i>	92
5	Podsumowanie wyników i wnioski	96
	Spis rycin	100
	Spis tabel	102
	Literatura	104

Spis publikacji, w których wykorzystano wyniki pracy doktorskiej

[1] **Mariusz Belka**, Lucyna Konieczna, Piotr Kawczak, Tomasz Ciesielski, Jarosław Sławiński, Tomasz Bączek; The Chemometric Evaluation of Antitumor Activity of Novel Benzensulfonamide Derivatives Based on their Physiochemical Properties; Letters in Drug Design & Discovery; 9(3); 288-294; 2012

[2] **Mariusz Belka**, Jarosław Sławiński, Lucyna Konieczna, Piotr Kawczak, Tomasz Ciesielski, Tomasz Bączek; Antitumor Activity of Novel Benzensulfonamide Derivatives in View of their Physiochemical Properties Searched by Principal Component Analysis; Medicinal Chemistry; 9(4); 517-525; 2013

[3] **Mariusz Belka**, Weronika Hewelt-Belka, Jarosław Sławiński, Tomasz Bączek; Mass Spectrometry Based Identification of Geometric Isomers during Metabolic Stability Study of a New Cytotoxic Sulfonamide Derivatives Supported by Quantitative Structure-Retention Relationships; PloS one, 9(6); e98096; 2014,

[4] Andrzej Chodkowski, Martyna Wróbel, Jadwiga Turło, Jerzy Kleps, Agata Siwek, Gabriel Nowak, **Mariusz Belka**, Tomasz Bączek, Aleksander Mazurek, Franciszek Herold; Novel 4-aryl-pyrido [1, 2-c] pyrimidines with dual SSRI and 5-HT 1A activity. Part 4; European Journal of Medicinal Chemistry; 90; 21-32; 2015

[5] Anna Gomółka, Agnieszka Ciesielska, Martyna Wróbel, Andrzej Chodkowski, Jerzy Kleps, Maciej Dawidowski, Agata Siwek, Małgorzata Wolak, Katarzyna Stachowicz, Anna Sławińska, Gabriel Nowak, Grzegorz Satała, Andrzej Bojarski, **Mariusz Belka**, Szymon Ulenberg, Tomasz Bączek, Paweł Skowronek, Jadwiga Turło, Franciszek Herold; Novel 4-aryl-pyrido[1,2-c]pyrimidines with dual SSRI and 5-HT1A activity. Part 5; European Journal of Medicinal Chemistry; 98; 221-236; 2015

Praca przeglądowa tematyką obejmująca zagadnienia rozprawy doktorskiej:

[6] **Mariusz Belka**, Tomasz Bączek; Metabolism of anticancer drugs – current approaches in the drug development process; Current Drug Metabolism (w druku, DOI: 10.2174/1389200216666150831130234)

Streszczenie

Metabolizm ksenobiotyków to zjawisko biochemiczne występujące w przyrodzie w tym także w organizmie człowieka. Szczególnym rodzajem ksenobiotyków są leki, a ich metabolizm może prowadzić do skutków o istotnym znaczeniu klinicznym, takich jak wzrost lub spadek aktywności leku, wywołanie działań niepożądanych czy interakcji międzylekowych. Dostępne dane statystyczne świadczą o tym, że postęp w dziedzinie badań metabolizmu potencjalnych leków znacząco zmniejszył prawdopodobieństwo konieczności wycofania leku z powodów związanych z tym zjawiskiem. Z drugiej strony rośnie zainteresowanie technikami obliczeniowymi *in silico* przewidywania właściwości metabolicznych kandydatów na leki, które w porównaniu z badaniami *in vitro* i *in vivo* cechują się zazwyczaj niższym kosztem wykonania oraz krótszym czasem uzyskania wyników.

Przedłożona rozprawa doktorska, skupiając się na przykładzie dwóch odrębnych grup: pochodnych benzenosulfonamidu o aktywności cytotoksycznej oraz analogów arylopiiperazyny o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu depresji i stanów lękowych, proponuje kilka schematów postępowania, które z pomocą technik chemometrycznych wspomagają, bądź ułatwiają podejmowanie decyzji o wyborze kandydata na lek, o korzystnych właściwościach już na wczesnym etapie badań przedklinicznych. W toku prowadzonych badań uzyskano szereg oryginalnych wyników, które zaliczyć można do dziedziny nauk podstawowych w zakresie biochemii, w szczególności zaproponowano kierunki biotransformacji w grupie badanych pochodnych benzenosulfonamidu zawierających ugrupowanie tiohydrazonu. Opisano również występowanie izomeryzacji geometrycznej w tej grupie związków. W grupie pochodnych arylopiiperazyny oznaczono ilościowo stabilność metaboliczną, a uzyskany metaboliczny czas półtrwania porównano z wartością uzyskaną dla związku referencyjnego – buspironu. Część z badanych związków odznaczała się stabilnością kilkukrotnie wyższą od buspironu.

W poszczególnych etapach badań zaproponowano schematy kilku interdyscyplinarnych procedur badawczych, obejmujących modelowanie molekularne, eksperymenty biochemiczne i chromatograficzne (także z wykorzystaniem spektrometrii mas) oraz kompleksową analizę danych z wykorzystaniem technik chemometrycznych. Zaproponowane procedury obejmują: wykorzystanie analizy głównych składowych do wielowymiarowej analizy macierzy danych aktywności i macierzy deskryptorów

molekularnych w celu poszukiwania zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością; wykorzystanie regresji wielorakiej w celu opracowania modelu QSAR – ilościowej zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną; wykorzystanie metodologii badania zależności pomiędzy strukturą chemiczną a zachowaniem substancji w układzie chromatograficznym (QSRR) do wspierania identyfikacji izomerów geometrycznych. W ostatnim etapie wykorzystano także technikę regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów do ilościowego opisu stabilności metabolicznej w grupie analogów arylopipezyny.

Uzyskane wyniki stanowią oryginalny wkład w stan wiedzy z zakresu metabolizmu dwóch badanych grup chemicznych. Natomiast opisane procedury badawcze zostały skonstruowane w sposób umożliwiający ich zastosowanie do badania właściwości innych grup związków, co nadaje pracy możliwość praktycznego wykorzystania jej wyników w innych projektach z dziedziny chemii leków.

Abstract

The metabolism of xenobiotics is a biochemical phenomenon occurring naturally in the human body. Drugs are a special type of xenobiotics, and their metabolism may lead to the clinically significant effects, such as an increase or decrease in the activity of the drug, the induction of adverse effects or drug interactions. Available statistics indicate that progress in the field of metabolic studies of potential drug significantly reduced the probability of a withdrawal of the drug for reasons connected with this phenomenon. Moreover, there is a growing interest in developing computational techniques of *in silico* prediction of metabolic properties of drug candidates. Those techniques are, in comparison to *in vitro* and *in vivo* studies, usually characterized by a lower cost of implementation and reduced time to obtain results.

The submitted doctoral dissertation is focused on the case of two distinct chemical groups: cytotoxic benzenesulfonamide derivatives and arylpiperazine analogs designed for potential use in the treatment of depression and anxiety. The dissertation proposes several workflows that with the help of chemometric techniques support, or assist decision making process on the selection of a drug candidate for beneficial properties at an early stage of preclinical studies. The study produced a series of original results in the field of biochemistry, and proposes types of biotransformation in the studied group of benzenesulfonamide derivatives. The dissertation also describes the occurrence of geometric isomerization in this group of compounds. In the arylpiperazines derivatives group of compounds, metabolic stability was assessed quantitatively and the resulting metabolic half-life was compared with that obtained for the reference compound - buspirone. Some of the tested compounds was characterized by stability several times higher than obtained for buspirone.

In the consecutive stages of the doctoral dissertation several schemes of interdisciplinary research workflows were proposed. The workflows include molecular modeling, biochemical and chromatographic experiments (including the use of mass spectrometry) and comprehensive data analysis using chemometric techniques. Proposed procedures include: the use of principal component analysis (PCA) to multivariate analysis of the activity and molecular descriptor data matrixes to search for relationships between chemical structure and biological activity; the use of multiple stepwise regression model to develop QSAR – quantitative relationship between the structure and biological activity; the

application of methodology of constructing models of relationship between chemical structure and chromatographic retention (QSRR) to support the identification of geometric isomers. In the last step partial least squares regression was used to quantitatively describe the metabolic stability of a group arylpiperazine analogues.

Firstly, the obtained results are an original contribution to the state of knowledge of the metabolism of the two group of drug candidates. On the other hand, the described research workflows have been designed in a way, so that they can be further applied to study the properties of other classes of compounds. This gives the opportunity of the practical implementation of the results in other projects in the field of medicinal chemistry.

1 Wstęp teoretyczny

1.1 Skuteczne opracowywanie nowych leków jako wyzwanie nauk farmaceutycznych XXI wieku

Jednym z wyzwań XXI wieku, zarówno dla przemysłu farmaceutycznego, jak i środowiska uniwersyteckiego, jest potrzeba ciągłego opracowywania nowych, udoskonalonych leków. Konieczność ta jest związana z dwoma głównymi czynnikami: wciąż wydłużającą się długością życia [1] oraz wyzwaniami związanymi ze zmianami stylu życia, postępowaniem technologicznym i intensywnym eksploatowaniem środowiska naturalnego, a co za tym idzie zwiększającym się zagrożeniem ze strony tzw. chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów [2]. Ostatnie doniesienia wskazują, że samo tylko wyeliminowanie braku aktywności fizycznej zwiększyłoby przewidywaną długość życia w Polsce średnio o 0,6 roku poprzez uniknięcie chorób, takich jak nowotwory, cukrzyca typu drugiego, czy choroby niedokrwiennej serca [3]. W ciągu ostatnich dziesięciu lat liczba nowych kandydatów na leki wzrosła o 62%, co pociągnęło za sobą podwojenie kosztów związanych z działalnością typu badań naukowych i rozwoju (ang. *research and development, R&D*) [4]. Często podawany koszt opracowania i wprowadzenia leku na rynek, wynoszący 800 mln dolarów amerykańskich wynika z podzielenia całkowitych kosztów *R&D* przez liczbę leków zaaprobowanych do leczenia [5]. Wiele wskazuje jednak na to, że wartość ta jest mocno przeszacowana poprzez uwzględnienie kosztów pozanaukowych [5]. Niemniej jednak, istnieje potrzeba wprowadzenia wysokich standardów prowadzenia badań przedklinicznych, szczególnie w dziedzinie onkologii, gdzie znaczące osiągnięcia w dziedzinie zrozumienia biologicznego funkcjonowania komórek rakowych, nie przekładają się na sukcesy kliniczne, a wskaźnik niepowodzeń nowych leków jest najwyższy w porównaniu z innymi dziedzinami medycyny [6]. Przyczyny niepowodzeń we wprowadzaniu nowych leków do leczenia zmieniały się na przestrzeni ostatnich lat [7,8]. Dostępne dane porównujące przyczyny niepowodzeń badań klinicznych z roku 1991 i 2000 wskazują, że w ciągu opisywanego dziesięciolecia znacząco spadł niekorzystny udział właściwości metabolicznych i farmakokinetycznych potencjalnych kandydatów na leki, z 40% do 11% (Tabela 1). Jest to wynikiem rosnącej świadomości znaczenia tych właściwości już na wczesnych etapach badań przedklinicznych, jak również dzięki postępowi naukowemu.

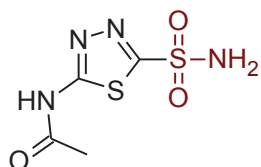
Tabela 1. Porównanie przyczyn niepowodzeń badań klinicznych leków w latach 1991 i 2000 [7].

Przyczyna	Rok	
	1991	2000
metabolizm leków i farmakokinetyka	40%	11%
bezpieczeństwo kliniczne	10%	13%
skuteczność	30%	28%
przyczyny biznesowe	5%	22%
toksyczność	11%	22%
inne	4%	4%

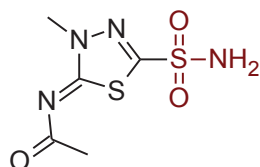
Powyższe dane świadczą o dużym znaczeniu metabolizmu leków i innych właściwości farmakokinetycznych dla sukcesu w opracowaniu nowego leku. Wszelkie działania mające usprawnić badania metaboliczne ksenobiotyków, posiadają szczególny aspekt praktyczny. Szczególną uwagę w ostatnich latach zwrócono na techniki *in silico*, umożliwiające przewidywanie miejsc metabolizmu w cząsteczce, struktury metabolitów, możliwości inhibicji i indukcji enzymów metabolizujących ksenobiotyki [9].

1.2 Zróżnicowane zastosowanie farmakologiczne substancji zawierających pierwszorzędową grupę sulfonamidową

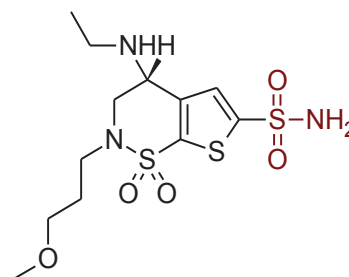
Pierwszorzędowe ugrupowanie sulfonamidowe jest obecne w wielu istotnych grupach leków, takich jak diuretyki (furosemid, indapamid), inhibitory anhidrazy węglanowej (acetazolamid, dichlorotiazyd), leki przeciwpadaczkowe (zonisamid, sultiam), czy niesteroidowe leki przeciwzapalne (celekoksyb, waldekoksyb) [10]. Przegląd wybranych substancji leczniczych zawierających pierwszorzędową grupę sulfonamidową oraz ich zastosowanie zawiera Rycina 1.



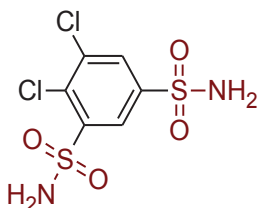
acetazolamid; inhibitor anhidrazy węglanowej, jaskra



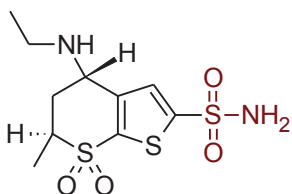
metazolamid; inhibitor anhidrazy węglanowej, jaskra



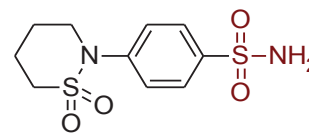
brynzolamid; inhibitor anhidrazy węglanowej, jaskra



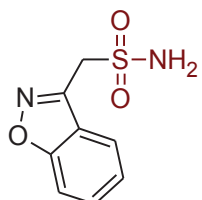
diklofenamid; inhibitor anhidrazy węglanowej, jaskra



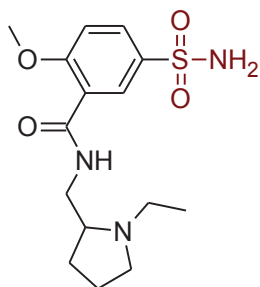
dorzolamid; inhibitor anhidrazy węglanowej, jaskra



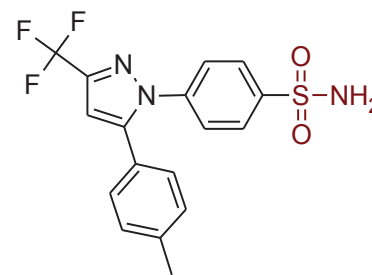
sultiam; inhibitor anhidrazy węglanowej, padaczka



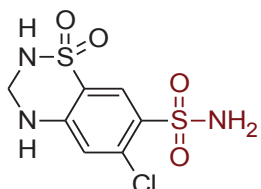
zonisamid; padaczka



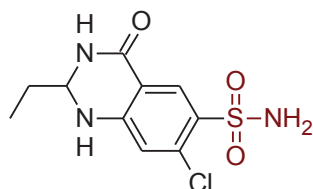
sulpiryd; benzamidy, leki przeciwpsychotyczne



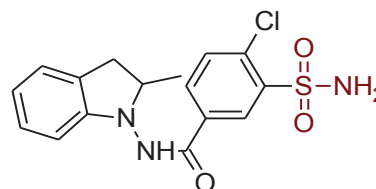
celekoksyb; niesteroidowy lek przeciwzapalny, inhibitor COX-2



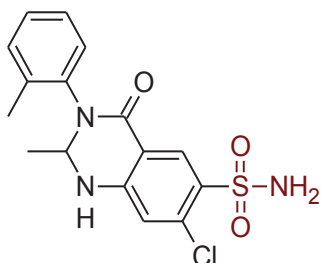
Hydrochlorotiazyd; tiazdy, leki moczopędne



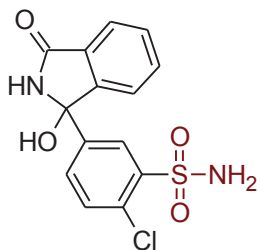
kwinetazon; leki moczopędne



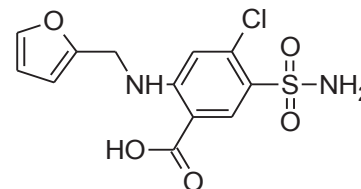
indapamid; leki moczopędne



metolazon; leki moczopędne



chlortalidon; leki moczopędne



furosemid; leki moczopędne

Rycina 1. Zestawienie struktury chemicznej i zastosowanie wybranych substancji leczniczych zawierających pierwszorzędowną grupę sulfonamidową.

Acetazolamid, metazolamid i diklofenamid (Rycina 1) są stosowane w leczeniu jaskry. Działają jako inhibitory anhidrazy węglanowej, szczególnie izoenzymów CAII, CAIV i CAXII, co prowadzi do zmniejszenia stężenia wodorowęglanów, a w związku z tym obniżenia ciśnienia wewnątrz gałki ocznej. Izoenzymy te niestety występują również w wielu innych tkankach organizmu, co prowadzi do działań niepożądanych, takich jak metaliczny posmak w ustach, utrata wagi, kwasica metaboliczna lub zmęczenie [11]. W tej grupie leków dalsze poszukiwania nowych substancji aktywnych dotyczyły wprowadzenia leków działających miejscowo [10], z których dwa są dostępne w lecznictwie: dorzolamid [12] i brynzolamid [13] (Rycina 1). Najnowsze badania koncentrują się na opracowaniu cząsteczek, które oprócz funkcji inhibicji anhidrazy węglanowej uwalniają tlenek azotu (NO), co dodatkowo wzmacnia działanie terapeutyczne w jaskrze [14].

Sultiam jest substancją o działaniu przeciwpadaczkowym (Rycina 1). Sugerowany mechanizm działania jest powiązany z występowaniem zakwaszania tkanki mózgu, poprzez inhibicję anhidrazy węglanowej, co wywołuje efekt przeciwdrgawkowy [15]. Zonisamid z kolei po raz pierwszy został wprowadzony do lecznictwa w Japonii w 1989. Jego działanie opiera się na dwóch prawdopodobnych mechanizmach: stabilizacji błon neuronów poprzez blokowanie kanałów sodowych i wapniowych oraz wpływaniu na syntezę, uwalnianie i degradację neuroprzekaźników (w tym GABA, serotoniny, dopaminy i acetylocholino) [16]. Lek ten był również obiektem badań klinicznych w kierunku jego zastosowania w leczeniu otyłości u dorosłych [17].

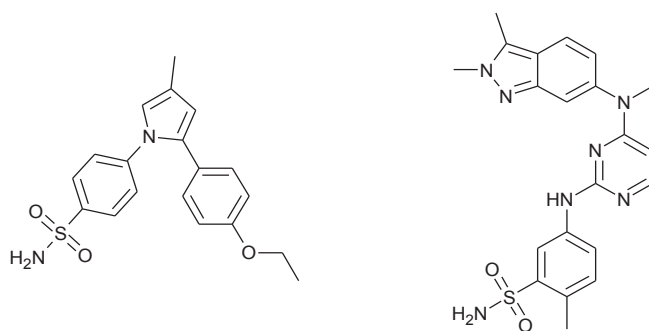
Sulpiryd jest przedstawicielem sulfonamidów przeciwpsychotycznych o działaniu antagonistycznym wobec receptorów dopaminergicznych [18]. Pomimo braku jednoznacznych dowodów na jego skuteczność w porównaniu do placebo, jest to lek często stosowany i rekomendowany szczególnie dla pacjentów w krajach rozwijających się, ze względu na niski koszt leczenia [19].

Wśród leków o budowie sulfonamidowej znajdziemy również diuretyki, w szczególności tiazydy i ich analogi, takie jak indapamid, chlortalidon i metolazon (Rycina 1). Związki te hamują kanał Na^+/Cl^- w cewce dalszej nefronu, co prowadzi do zwiększonego wydalania kationów sodu, a wraz nim nadmiaru wody zgromadzonej w organizmie [20]. Stosowane są również w nadciśnieniu, przy czym tiazydy, (np. hydrochlorotiazyd) wywołują podwyższenie poziomu cholesterolu, a indapamid pozbawiony jest tej niekorzystnej cechy

[21]. Do popularnych leków moczopędnych należy również furosemid, który działa w pętli Henlego na zasadzie hamowania reabsorpcji kationów sodu i potasu oraz chlorków.

W latach 90-tych dwudziestego wieku opracowano serię selektywnych inhibitorów cykloksygenazy COX-2, w tym rofekoksyb, celekoksyb i waldekoksyb, z czego tylko celekoksyb nie został wycofany ze względu na liczne działania niepożądane ze strony układu sercowo-naczyniowego, które występowały u pozostałych przedstawicieli tej grupy [10,22]. Z tego powodu postęp w dziedzinie nowych selektywnych inhibitorów COX2 został spowolniony, aż do odkrycia aprikoksybu (Rycina 2) [23]. Co ciekawe, związek ten swoje główne zastosowanie znalazł w terapii raka trzustki, a nie jako lek przeciwzapalny.

Mechanizm działania przeciwnowotworowego sulfonamidów opiera się na hamowaniu izoenzymów anhidrazy węglanowej, które ulegają nadekspresji w przypadku wielu typów nowotworów [24]. Wciąż poszukiwane są nowe substancje selektywnie hamujące aktywność izoenzymów IX i XII [25,26]. Wśród chemoterapeutyków o budowie sulfonamidowej znajdziemy również pazopanib (Rycina 2) – inhibitor kinazy tyrozynowej blokujący wzrost guza i angiogenezę, szczególnie przydatny w leczeniu nowotworów nerki [27,28].



Rycina 2. Struktura chemiczna przeciwnowotworowych sulfonamidów: aprikoksybu [23] (z lewej) i pazopanibu [28] (z prawej).

Ciekawym, nowym zastosowaniem sulfonamidów jest również możliwość ich zastosowania w leczeniu łupieżu. Działanie przeciwłupieżowe opiera się na hamowaniu odkrytej niedawno β -anhydrazy węglanowej grzyba gatunku *Candida glabrata* [29].

Poszukiwania nowych, aktywnych biologicznie sulfonamidów są również prowadzone w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, przez grupę badawczą kierowaną przez dr. hab. Jarosława Sławińskiego, prof. nadzw. GUMed. Wśród prac z ostatnich lat wymienić należy serie związków o budowie sulfonamidowej, o aktywności cytostatycznej i potwierdzonej inhibicji izoenzymów anhidrazy węglanowej [30,31] oraz aktywności przeciwgrzybiczej [32].

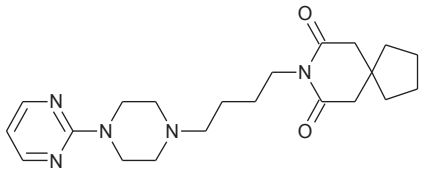
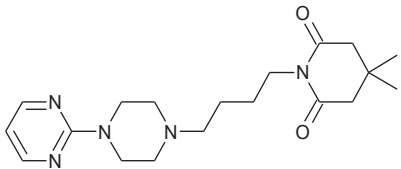
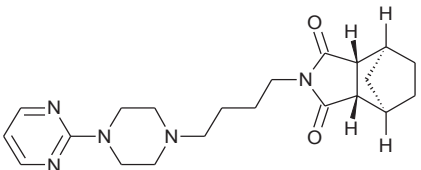
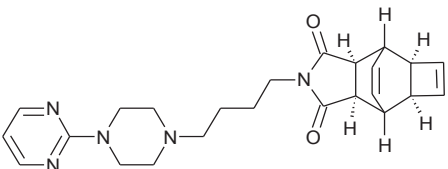
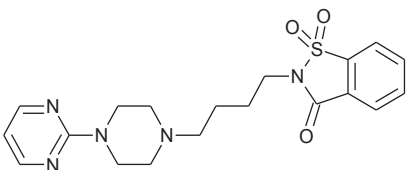
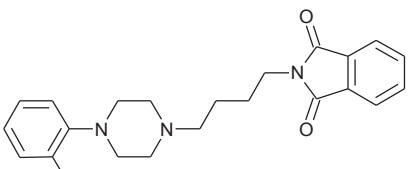
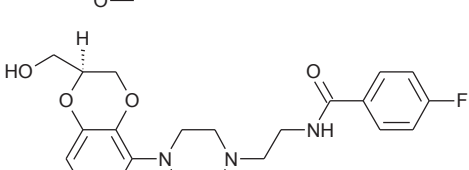
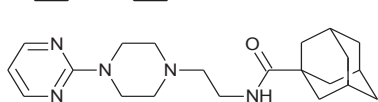
Pochodne benzenosulfonamidu zawierające ugrupowanie tiohydrazonu są również przedmiotem zainteresowania opisanym w niniejszej pracy doktorskiej [33–36].

1.3 Pochodne arylopiperazyny jako grupa leków o działaniu anksjolitycznym

Długołańcuchowe pochodne arylopiperazyny, wraz z najważniejszym przedstawicielem tej grupy leków – buspironem, są lekami stosowanymi w leczeniu zaburzeń lękowych [37] i depresji [38]. Buspiron na poziomie molekularnym działa jako częściowy agonista receptora serotoninowego (5-HT) oraz jako antagonist receptoru dopaminergicznego (D_2) i α_1 - i α_2 -adrenergicznego [39]. Możliwość selektywnego oddziaływania z podtypem receptora serotoninowego 5-HT_{1A} jest szczególnie intensywnie badana, ponieważ oprócz działania przeciwłękowego i przeciwdepresyjnego wskazuje się, że jego agoniści, pochodne arylopiperazyny, mogą pełnić funkcje neuroprotektcyjne [40,41]. N₁-podstawione pochodne N₄-arylopiperazyny można podzielić na kilka głównych grup pod względem chemicznym, w tym: pochodne imidowe, amidowe, alkilowe, aryloalkilowe oraz tetralinowe. Strukturę chemiczną wybranych pochodnych arylopiperazyny przedstawia Tabela 2.

Gepiron [42], znany od 1986 roku, charakteryzuje się mniejszą wiązalnością z receptorami dopaminergicznymi w stosunku do buspironu. Podobne właściwości charakteryzują tandospiron [43]. Związek ten, oprócz typowego w tej grupie działania anksjolitycznego, może być również stosowany w terapii schizofrenii. U pacjentów, którym podawano tandospiron zaobserwowano poprawę funkcji poznawczych, w tym pamięci, a co za tym idzie możliwość lepszego funkcjonowania w społeczeństwie i środowisku pracy [44,45]. Z kolei badania kliniczne zalospironu wykazały wysoką efektywność w znoszeniu depresji, ale jednocześnie u ponad połowy pacjentów lek wywoływał zawroty głowy i nudności [46,47]. Badania nad ipsapironem natomiast nie wykazały jego klinicznej przewagi nad diazepamem [48].

Tabela 2. Struktura chemiczna wybranych pochodnych arylopiperazyny.

Struktura chemiczna	Nazwa i piśmiennictwo
	buspiron [39]
	gepiron [42,43]
	tandospiron [43–45]
	zalospiron [46,47]
	ipsapiron [48]
	NAN-190 [49,50]
	flezinoxan [51,52]
	adatseryna [53]

Wśród pochodnych o budowie amidowej znajduje się również związek oznaczony kodem NAN-190, który znalazł szerokie zastosowanie w badaniach naukowych jako selektywny agonista receptora 5-HT_{1A} [49,50]. Wśród wymienionych powyżej substancji

aktywnych, w Polsce dostępny jest jedynie buspiron (w preparacie Spamilan[®], Egis Polska oraz preparacie Mabuson[®], Pabianickie Zakłady Farmaceutyczne POLFA SA).

Do pochodnych arylopiiperazyny zaliczamy również flezinoksan [52] oraz adatanserynę [53] o budowie amidowej. Flezinoksan był opracowany jako lek obniżający ciśnienie, później potwierdzono także działanie przeciwdepresyjne i anksjolityczne. Adatanseryna, opracowana pod koniec XX wieku jako lek przeciwdepresyjny i anksjolityczny, nie weszła do lecznictwa, jednakże w 2008 r. opatentowane zostało jej działanie m. in., w leczeniu dysfunkcji seksualnych, ADHD i zachowań agresywnych [54].

1.4 Badanie metabolizmu ksenobiotyków w warunkach *in vitro*

Metabolizm ksenobiotyków, w tym leków, jest procesem skomplikowanym, a więc trudnym to symulowania lub przewidywania za pomocą technik *in silico*, *in vitro*, czy nawet przy pomocy modeli zwierzęcych *in vivo*. Upraszczając, proces ten polega na biotransformacji (chemicznej modyfikacji, przy udziale enzymów jako katalizatorów) cząsteczki leku, do bardziej polarnych metabolitów, które z kolei są łatwiej eliminowane z organizmu. Powstanie mechanizmów metabolizmu ksenobiotyków uzasadnia się ukształtowaną w procesie ewolucji potrzebą organizmów żywych do usunięcia z własnego ciała obcych substancji, które mogą mieć wpływ na ich procesy życiowe. Z punktu widzenia nauk farmaceutycznych na uwagę zasługuje natomiast fakt, że metabolity leku, jako cząsteczki o zmienionej strukturze chemicznej należy traktować jako odrębne indywidua chemiczne o zmienionych (względem macierzystej cząsteczki) właściwościach farmakokinetycznych, jak również farmakodynamicznych.

Na etapie badań przedklinicznych, gdy mamy często do czynienia z setkami potencjalnych substancji leczniczych, kluczową kwestią wydaje się dobór odpowiedniego modelu enzymatycznego, który umożliwi porównanie badanych substancji pod względem ich właściwości metabolicznych. Opracowana została szeroka paleta dostępnych modeli, począwszy od preparatów otrzymywanych z narządów ludzkich, czy zwierzęcych, rekombinowanych enzymów, linii komórkowych, kończąc na modelach zwierzęcych, w tym rekombinowanych. W zależności od wybranego modelu otrzymamy informacje przydatne na innym etapie procesu opracowania nowego leku. Część z tych modeli charakteryzuje się

większa uniwersalnością, a inna część pozwala uzyskać dane specyficzne dla konkretnego enzymu metabolizującego.

Na wczesnych etapach badań przedklinicznych jedną z pożądanych cech modelu będzie prostota jego wykorzystania, niskie nakłady w przeliczeniu na testowany związek, przy zachowaniu możliwie dużej istotności uzyskanych wyników. Zalety te spełniają frakcje mikrosomalne otrzymywane z narządów ludzkich i zwierzęcych [55].

Mikrosomy to subkomórkowa frakcja, otrzymywana w procesie wirowania homogenatów komórkowych. W celu ich otrzymania najczęściej wykorzystuje się homogenat wątroby, ze względu na jej kluczowe znaczenie dla metabolizmu ksenobiotyków, ale także homogenaty innych narządów, takich jak jelito, płuca, czy nerka [56]. Oprócz preparatów ludzkich wykorzystuje się porównawczo mikrosomy odzwierzęce, co pozwala dobrać odpowiedni model zwierzęcy *in vivo* przed pierwszym podaniem potencjalnego leku zdrowym ochotnikom w badaniach klinicznych. Wśród dostępnych komercyjnie mikrosomów można znaleźć mikrosomy szczurze, mysie, królicze, pochodzące od ssaków naczelnych, świnki morskiej, czy psa rasy beagle. Podczas korzystania z tego rodzaju modeli, należy zwrócić uwagę na konieczność otrzymywania preparatu za pomocą narządów pochodzących od wielu dawców, tak aby różnice osobnicze nie wpływały istotnie na uzyskane wyniki.

Mikrosomy otrzymane z wątroby są bogatym źródłem enzymów metabolizujących ksenobiotyki, w tym enzymów z rodziny cytochromu P-450 (CYP) [57], monoooksygenaz flawinowych (FMO) [58] i glukuronylotransferaz (UGT) [59]. Zbadanie ich aktywności wobec potencjalnego leku wymaga obecności odpowiedniego kofaktora, jakim dla cytochromu i FMO jest NADPH (zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego), natomiast dla UGT jest to aktywowany kwas glukuronowy w postaci UDPGA (kwas urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowy).

Mikrosomy występują w postaci pęcherzyków błon retikulum endoplazmatycznego i z tego faktu wynika jedna z ich głównych wad. Modelowanie metabolizmu przy pomocy tylko mikrosomów nie odzwierciedla w pełni etapów procesu związanych z budową komórek i narządów, takich jak dyfuzja, bądź transport do wnętrza tkanki lub komórki [60,61]. Inną, istotną kwestią jest nieobecność pewnych enzymów metabolizujących, takich jak N-acetylotransferaza (NAT), S-transferaza glutationowa (GST), metylotransferaza tiopurynowa (TPMT) oraz sulfotransferaza (ST). Enzymy te przeprowadzają ważne dla drugiej fazy

metabolizmu reakcje sprzęgania z cząsteczkami, takimi jak glutation czy jon siarczanowy. Aby uzyskać pełen obraz drugiej fazy, należy, oprócz frakcji mikrosomalnej, zastosować fazę cytozolową zawierającą wymienione wyżej enzymy.

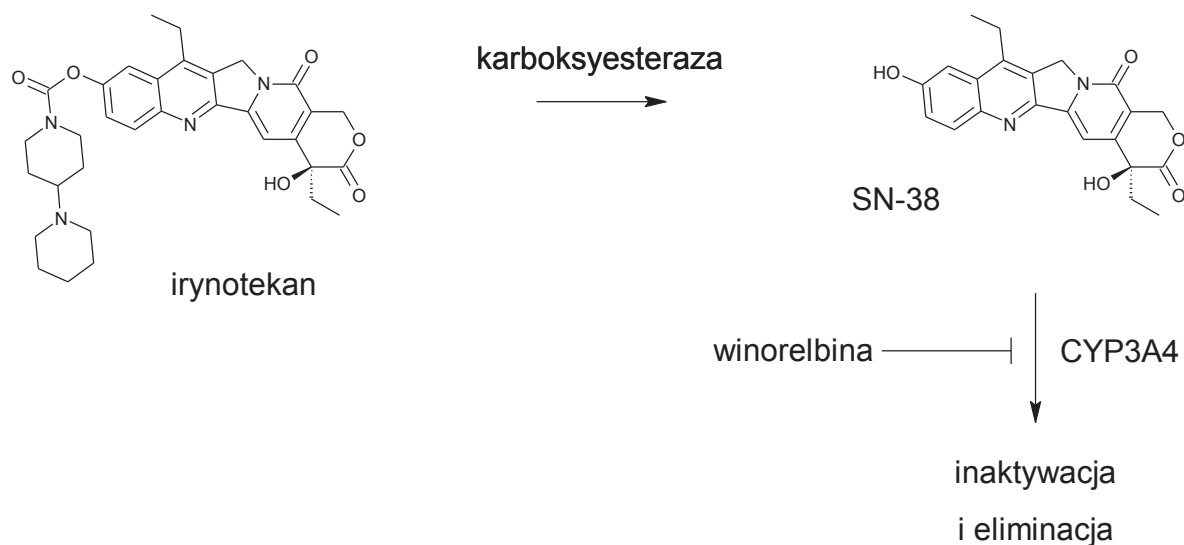
Metodologia wykorzystania mikrosomów i innych frakcji komórkowych jest zasadniczo mało skomplikowana i nie wymaga wysokospecjalistycznego sprzętu i aparatury. Inkubacje *in vitro* wykonuje się w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, tj., utrzymując temperaturę na poziomie fizjologicznym, mieszając i kontrolując czas reakcji. Uzyskane mieszaniny poinkubacyjne są następnie analizowane jakościowo i ilościowo, najczęściej z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas [55].

Drugim często stosowanym układem modelowym w badaniach metabolizmu leków są rekombinowane enzymy produkowane w owadach [62], drożdżowych [63] i bakteryjnych [64] systemach ekspresji. Ich unikalną cechą jest możliwość badania aktywności tylko jednego enzymu, co pozwala m.in., dokładnie określić, które izoenzymy cytochromu P-450 są odpowiedzialne za metabolizm potencjalnego leku. Umożliwia to również przewidywanie występowania interakcji pomiędzy lekami [65,66]. Komercyjnie dostępne są praktycznie wszystkie izoenzymy CYP, jak również FMO i UGT i inne.

Bardziej zaawansowane modele metaboliczne opierają się na kulturach linii komórkowych, hepatocytach izolowanych z wątroby, czy precyzyjnie wycinanych plastrach wątroby (ang. *liver slices*) [67]. Te modele wymagają znacznie bardziej zaawansowanej technologii prowadzenia eksperymentu; hepatocyty i wycinki wątroby charakteryzują się ograniczonym czasem przydatności, doświadczenia są przeprowadzane sterylnie. Niezaprzeczną zaletą tych modeli jest jednak zachowanie struktury komórek, czy nawet tkanek, co skutkuje warunkami biotransformacji bardziej odzwierciedlającymi warunki fizjologiczne.

Wśród leków przeciwnowotworowych dobrym przykładem ilustrującym różnorodność procesów, na które ma wpływ zjawisko metabolizmu leków jest irynotekan. Irynotekan, inhibitor topoizomerazy I z grupy półsyntetycznych pochodnych kamptotecyny, jest prolekiem aktywowanym przez karboksyesterazę do metabolitu SN-38, który odpowiada za aktywność biologiczną. Jedną z dróg eliminacji irynotekanu, jak i SN-38 jest ścieżka metaboliczna katalizowana przez izoenzym cytochromu P-450 CYP3A4. Jednoczesne podanie winorelbiny (cytostatyk z grupy alkaloidów barwinka), która jest inhibitorem CYP3A4

powoduje zmniejszenie eliminacji irynotekanu, nasilając jego działanie toksyczne (Rycina 3) [68,69]. Wpływ na farmakokinetykę irynotekanu ma również ziele dziurawca, powoduje ono zmniejszenie AUC, a także C_{max} [70].



Rycina 3. Schemat wybranych reakcji metabolicznych irynotekanu. Na podstawie [5-7].

Przykładem irynotekanu można również zobrazować wpływ międzyosobniczych różnic genetycznych na występowanie działań niepożądanych spowodowanych metabolizmem leków. Poza CYP3A4 kluczową rolę w eliminacji tego leku pełni UDP-glukuronylotransferaza UGT1A1. Jedną z mutacji genu kodującego to białko jest przyczyną zwiększonego prawdopodobieństwa wystąpienia mielosupresji i biegunki u pacjentów leczonych irynotekaniem. Występowanie tego zjawiska jest silną przesłanką do rozwoju medycyny spersonalizowanej z uwzględnieniem osobniczych możliwości pacjenta do metabolizowania leków [71].

1.5 Rola spektrometrii mas w badaniach metabolicznych

Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) jest obecnie powszechnie używaną techniką w badaniach metabolizmu leków, które wymagają izolacji, identyfikacji oraz oznaczania metabolitów [72–74]. Technika LC-MS charakteryzuje się wysoką czułością oraz selektywnością, krótkim czasem analizy, a także łatwością w obsłudze, co sprawia, że jest niezwykle cennym narzędziem w analizie metabolitów. Nowe rozwiązania instrumentalne oraz metodologiczne w obszarze techniki LC-MS okazały się kamieniem

milowym w procesie opracowywania nowych leków, szczególnie w zakresie badań stabilności metabolicznej. Tabela 3 zawiera przegląd analizatorów mas stosowanych w badaniach metabolicznych, ponieważ zastosowany analizator w głównej mierze decyduje o rodzaju i jakości otrzymanej informacji analitycznej.

Spektrometria mas jest nieocenionym narzędziem w badaniach metabolizmu leków, w szczególności na etapie:

- ilościowego wyznaczania stabilności metabolicznej *in vitro* [75,76],
- ustalania struktur metabolitów [36,77].

Podstawową informacją, możliwą do uzyskania z zastosowaniem spektrometru mas jest masa cząsteczkowa metabolitu, wyznaczona zależnie od wykorzystanego analizatora z różną dokładnością. Na podstawie porównania masy nieznanego metabolitu z masą badanego kandydata na lek, możliwe jest wskazanie typu reakcji metabolicznej [78]. Typowe reakcje metaboliczne wraz z odpowiadającymi im zmianami masy cząsteczkowej zestawiono w Tabeli 4 [79]. W kolejnych etapach badań nad strukturą powstających metabolitów wykorzystywana jest tandemowa spektrometria mas, która umożliwia zarejestrowanie widma fragmentacyjnego określonego jonu, odpowiadającemu potencjalnemu metabolitowi [80]. Widmo takie porównywane jest z widmem cząsteczki związku macierzystego, co prowadzi do przyporządkowania zmiany struktury chemicznej do określonego rejonu cząsteczki.

Poza wyżej wymienionymi sposobami identyfikacji stosowane są także różnorodne filtry wspomagające wykorzystujące np.: defekt (deficyt) masy pomiędzy nominalną, a mierzoną masą; wzór izotopowy; wspólny jon następczy, i inne [81].

Tabela 3. Rodzaje analizatorów mas stosowane w badaniach metabolizmu leków [82].

Analizator	Typowe zastosowanie	Czułość przy skanowaniu	Dokładność pomiaru masy	Szybkość zbierania danych przy sprzężeniu z chromatografią cieczową	Linowość odpowiedzi (badania ilościowe)
analizator czasu przelotu (ang. <i>time-of-flight</i> , TOF)	badanie przesiewowe metabolitów; identyfikacja rodzaju biotransformacji	wysoka	dobra	wysoka	dobra
analizator czasu przelotu sprzężony z kwadrupolem (ang. <i>quadrupole-TOF</i> , Q-TOF)	badanie przesiewowe metabolitów, identyfikacja rodzaju biotransformacji, identyfikacja miejsca biotransformacji	wysoka	dobra	wysoka	dobra
pułapka jonowa (ang. <i>ion trap</i> , IT)	badanie przesiewowe metabolitów, identyfikacja miejsca biotransformacji	umiarkowana	staba	niska do umiarkowanej	dobra
potrójny kwadrupol (ang. <i>triple quadrupole</i> , QqQ)	pomocniczo w badaniach fragmentacji, analiza ilościowa	niska	staba	niska/wysoka zależnie od trybu pracy	bardzo dobra
potrójny kwadrupol z liniową pułapką jonową (ang. <i>linear ion trap-triple quadrupole</i> , LIT-QqQ)	badanie przesiewowe metabolitów, identyfikacja miejsca biotransformacji	umiarkowana	staba	umiarkowana/bardzo wysoka zależnie od trybu pracy	bardzo dobra
orbitrap (ang. <i>orbitrap</i>)	badanie przesiewowe metabolitów, identyfikacja rodzaju biotransformacji, identyfikacja miejsca biotransformacji	umiarkowana	dobra	niska/umiarkowana	umiarkowana

Tabela 4. Zestawienie często występujących reakcji biotransformacji wraz z odpowiadającymi im zmianami we wzorze sumarycznym i zmianą masy cząsteczkowej [79].

Reakcja biotransformacji	Zmiana we wzorze sumarycznym	Zmiana masy (Da)
Faza I		
utrata grupy nitrowej	$-\text{NO}_2 + \text{H}$	-44,9851
dekarboksylacja	$-\text{CO}_2$	-43,9898
depropylacja	$-\text{C}_3\text{H}_6$	-42,0468
utrata atomu chloru	$-\text{Cl} + \text{H}$	-33,9611
redukcja grupy nitrowej	$+\text{H}_2 - \text{O}_2$	-29,9742
deetylowanie	$-\text{C}_2\text{H}_4$	-28,0312
utrata cząsteczki wody	$-\text{H}_2\text{O}$	-18,0106
utrata atomu fluoru	$-\text{F} + \text{H}$	-17,9906
utlenienie + utrata atomu chloru	$-\text{Cl} + \text{OH}$	-17,9662
demetylowanie	$-\text{CH}_2$	-14,0157
utlenienie wiązania podwójnego	$-\text{H}_2$	-2,0157
utlenienie + utrata atomu fluoru	$-\text{F} + \text{OH}$	-1,9957
utleniająca deaminacja	$-\text{NH} + \text{O}$	0,984
redukcja wiązania podwójnego	$+\text{H}_2$	2,0157
metylacja	$+\text{CH}_2$	14,0157
utlenienie alkoholu do kwasu karboksylowego	$-2\text{H} + \text{O}$	13,9792
utworzenie ketonu	$-2\text{H} + \text{O}$	13,9792
hydroksylacja	$+\text{O}$	15,9949
utlenienie N/S	$+\text{O}$	15,9949
epoksydacja	$+\text{O}$	15,9949
hydratacja	$+\text{H}_2\text{O}$	18,0106
utlenienie grupy metylowej do kwasu karboksylowego	$-2\text{H} + \text{O}_2$	29,9741
podwójna hydroksylacja	$+\text{O}_2$	31,9898
Faza II		
acetylowanie	$+\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$	42,0106
sprzężenie z glicyną	$+\text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$	57,0215
sprzężenie z siarczanem	$+\text{SO}_3$	79,9568
sprzężenie z cysteiną	$+\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}_2\text{S}$	119,0041
sprzężenie z N-acetylocysteiną	$+\text{C}_6\text{H}_8\text{NO}_3\text{S}$	161,0147
sprzężenie z kwasem glukuronowym	$+\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	176,0321
sprzężenie z glutationem	$+\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$	305,0682

Pomimo niezwyklej popularności technika tandemowej spektrometrii mas posiada także pewne ograniczenia, w tym brak możliwości rozróżnienia geometrii cząsteczek oraz często brak możliwości ustalenia dokładnego położenia zmiany w strukturze chemicznej

metabolitu, np. miejsca hydroksylacji [36]. W takim przypadku właściwą techniką uzupełniającą będzie spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [83,84].

1.6 Techniki *in silico* wspomagające badania metabolizmu leków

Ze względu na relatywnie wysoki koszt badań biologicznych od dawna podejmowane są próby umożliwienia, przynajmniej w części, zastąpienia ich narzędziami *in silico* w postaci modeli predykcyjnych.

Wspomniane narzędzia mogą w głównej mierze uwzględniać:

- strukturę leku/potencjalnego leku (ligandu),
- strukturę enzymu metabolizującego ksenobiotyki [9].

Techniki oparte na strukturze ligandu nie uwzględniają zmian kształtu tej cząsteczki podczas interakcji z enzymem metabolizującym, co jest ich istotną wadą. Głównym ograniczeniem modelowania w oparciu o strukturę i właściwości enzymu są znaczące wymagania co do mocy obliczeniowej komputerów, i w związku z tym czasochłonność [9].

W oparciu o rodzaj modelowanej właściwości, modele wykorzystywane w badaniach metabolicznych można podzielić na: umożliwiające rozpoznanie miejsca w cząsteczce podlegającej metabolizmowi; ustalenie struktury powstającego metabolitu; określenie możliwości inhibicji (głównie izoenzymów CYP); określenie możliwości indukcji (głównie izoenzymów CYP).

W Tabeli 5 umieszczono krótki przegląd dostępnych narzędzi z dwóch pierwszych grup, z zaznaczeniem, czy jest to narzędzie komercyjne, czy też dostępne darmowo. Dla narzędzi darmowych podano także adres strony internetowej, umożliwiającej skorzystanie z narzędzia.

Tabela 5. Zestawienie wybranych narzędzi *in silico* stosowanych w badaniach metabolicznych.

Nazwa	Sposób dostępu	Piśmiennictwo
Narzędzia umożliwiające określenie miejsca zachodzenia reakcji metabolicznej		
Metaprint2D	darmowy www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/	[85,86]
MetaSite	komercyjny	[87]
SMARTCyp	darmowy http://www.farma.ku.dk/smartcyp/	[88,89]
IDSite	komercyjny	[90]
StarDrop	komercyjny	[91]
Xenosite	darmowy http://swami.wustl.edu/xenosite/	[92]
Narzędzia umożliwiające przewidywanie struktury powstającego metabolitu		
MetaSite	komercyjny	[87]
Metaprint2D-React	darmowy www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/metaprint2d-react	[85,86]

Na uwagę zasługuje fakt braku doniesień literaturowych dotyczących narzędzi pozwalających w ilościowy sposób ocenić stabilność metaboliczną, umożliwiających porównanie poszczególnych pochodnych w jednej serii związków. Model o takich cechach, oparty na metodzie wektorów nośnych został jednakże ostatnio opracowany w zespole, którego członkiem jest autor rozprawy doktorskiej [77].

2 Cel i założenia pracy

Nadrzędnym celem pracy było opracowanie modeli matematycznych opartych na technikach chemometrycznych i statystycznych, które usprawnią proces podejmowania decyzji o preselekcji wybranych grup nowosyntezowanych cząsteczek, na wczesnych, przedklinicznych etapach opracowania nowych, potencjalnych leków. Podstawową innowacją zaproponowanych narzędzi jest wykorzystanie ilościowych danych związanych z metabolizmem badanych związków.

Badania zawarte w rozprawie doktorskiej obejmują dwukierunkowo rozważania dotyczące pochodnych benzenosulfonamidu o potencjale przeciwnowotworowym oraz analogów arylopiiperazyny o przypuszczalnej aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwłękowej. Obejmują one kluczowe dla przedklinicznych rozważań techniki wiązania aktywności ze strukturą, eksperymentalne wyznaczenie parametrów metabolicznych oraz ostatecznie, wykorzystanie tych danych do opracowania modeli matematycznych opisujących ilościowo zależności pomiędzy strukturą chemiczną, a jej właściwościami metabolicznymi.

Postawiony w pracy cel realizowano poprzez następujące cele cząstkowe:

- otrzymanie trójwymiarowych modeli cząsteczek o geometrii charakteryzującej się niską energią,
- zaproponowanie sposobu wyznaczania i wyboru deskryptorów molekularnych wykorzystywanych następnie podczas budowania modeli chemometrycznych,
- opracowanie procedury wykonywania inkubacji badanych związków chemicznych w obecności mikrosomów wątroby i NADPH w celu wyznaczenia parametrów metabolicznych,
- opracowanie metodyki LC-MS wykorzystywanej do jakościowych i ilościowych analiz mieszanin poinkubacyjnych, podczas badań stabilności metabolicznej,
- zaproponowanie modelu wspierającego hipotezę występowania izomeryzacji geometrycznej w obrębie pochodnych benzenosulfonamidu,
- ocena zależności pomiędzy strukturą chemiczną, a aktywnością, właściwościami chromatograficznymi i metabolicznymi dla badanych

po pochodnych benzenosulfonamidu i arylopiperazyny z wykorzystaniem technik statystycznych i chemometrycznych.

3 Materiały i metody

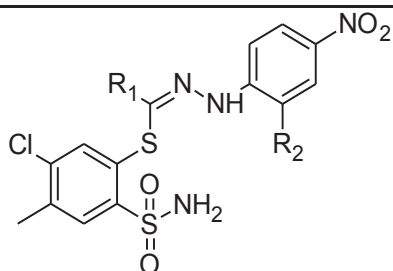
3.1 Obiekt badań – potencjalne nowe leki

Realizacja pracy doktorskiej była możliwa dzięki współpracy z dwiema grupami badawczymi, zajmującymi się syntezą nowych substancji o potencjalnym znaczeniu w leczeniu. Pierwszą z nich jest zespół kierowany przez dr. hab. Jarosława Sławińskiego prof. nadzw. GUMed, kierownika Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Na podstawie tej współpracy otrzymano do badań 23 pochodne benzenosulfonamidu posiadających w swojej strukturze ugrupowanie tiohydrazonianu o potencjalnym zastosowaniu przeciwnowotworowym. Drugim ośrodkiem współpracującym w ramach pracy doktorskiej była Katedra i Zakład Technologii Środków Leczniczych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego i zespół naukowy kierowany przez prof. dr. hab. Franciszka Herolda. Z ośrodka warszawskiego pochodzą badane pochodne arylopiiperazyny o potencjalnym zastosowaniu anksjolitycznym i przeciwdepresyjnym.

3.1.1 Pochodne benzenosulfonamidu

Sposób otrzymywania oraz aktywność biologiczna pierwszej (I) z badanych grup pochodnych benzenosulfonamidu została opisana w artykule [33]. Poniżej, w Tabeli 6 przedstawiono struktury chemiczne tej grupy związków. Oznaczono tutaj również, w których, z opisanych w kolejnych podrozdziałach procedurach zostały wykorzystane poszczególne związki.

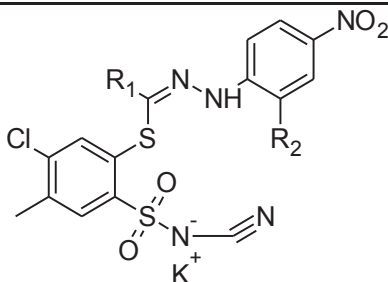
Tabela 6. Struktura chemiczna pierwszej (I) badanej grupy pochodnych benzenosulfonamidu.



Kod	R ₁	R ₂	Procedura
SLB-1	C ₂ H ₅	H	3
SLB-2	C ₃ H ₇	H	3
SLB-3	<i>i</i> -C ₃ H ₇	H	3
SLB-4	<i>i</i> -C ₃ H ₇	NO ₂	3
SLB-5	<i>i</i> -C ₄ H ₉	H	1, 2, 3
SLB-6	<i>t</i> -C ₄ H ₉	H	3
SLB-7	C ₅ H ₁₁	H	3
SLB-8	CH ₂ CH ₂ Ph	H	3
SLB-9	Ph	H	3
SLB-10	4-Cl-Ph	H	1, 2, 3
SLB-11	4-NO ₂ -Ph	H	3
SLB-12	4-CH ₃ -Ph	H	1, 2, 3
SLB-13	4-CH ₃ O-Ph	H	1, 2, 3
SLB-14	3-Br,4-OH-Ph	H	1, 2, 3
SLB-15	2-naftyl	H	1, 2, 3

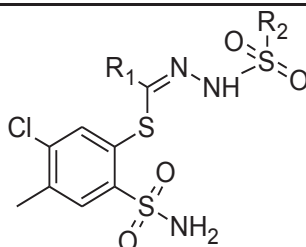
Synteza i aktywność pozostałych dwóch grup pochodnych benzenosulfonamidu będących obiektem badań w pracy doktorskiej została opisana w artykule [93]. W Tabeli 7 i w Tabeli 8 umieszczono ich strukturę chemiczną oraz przyporządkowanie do procedur opisanych w pracy doktorskiej.

Tabela 7. Struktura chemiczna drugiej (II) z badanych grup pochodnych benzenosulfonamidu.



Kod	R1	R2	Procedura
SLB-19	Ph	H	1, 2
SLB-20	4-Cl-Ph	H	1, 2

Tabela 8. Struktura chemiczna trzeciej (III) z badanych grup pochodnych benzenosulfonamidu.

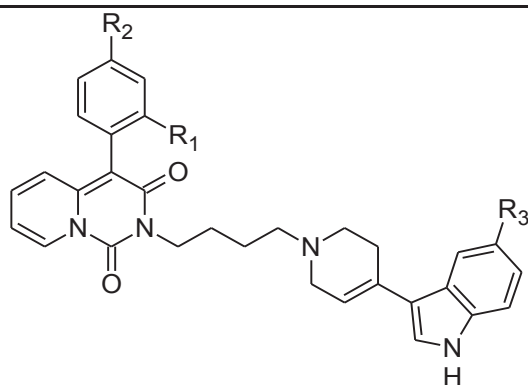


Kod	R1	R2	Procedura
SLB-25	4-Cl-Ph	Ph	1, 2
SLB-26	3,4-di-Cl-Ph	Ph	1, 2
SLB-27	4-Cl-Ph	4-Cl-Ph	1, 2
SLB-28	4-CH3-Ph	4-NO2-Ph	1, 2
SLB-32	4-Cl-Ph	2,4-di-Cl,5-CH3-Ph	1, 2
SLB-33	4-CH3-Ph	2,4-di-Cl,5-CH3-Ph	1, 2

3.1.2 Analogi arylopiperyzy

W grupie analogów arylopiperyzy do badań stabilności metabolicznej przeznaczono w pierwszym etapie 8 pochodnych, posiadających podstawnik indolo-tetrahydropirydy. W grupie tej pierścień piperazy zastąpiono częściowo uwodornionym pierścieniem pirydyny. Ze względu jednak na podobieństwo strukturalne oraz wykazaną aktywność biologiczną związki te traktowano łącznie z arylopiperyzynami, chronologicznie zbadanymi w etapie drugim. Sposób syntezy oraz aktywność biologiczna została opisana w publikacji [75]. W Tabeli 9 przedstawiono strukturę chemiczną tych pochodnych.

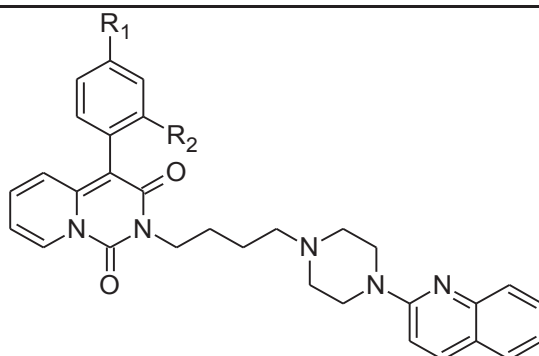
Tabela 9. Struktura chemiczna pierwszej z badanych grup analogów arylopiperazyny z podstawnikiem indolo-tetrahydropirydyny.



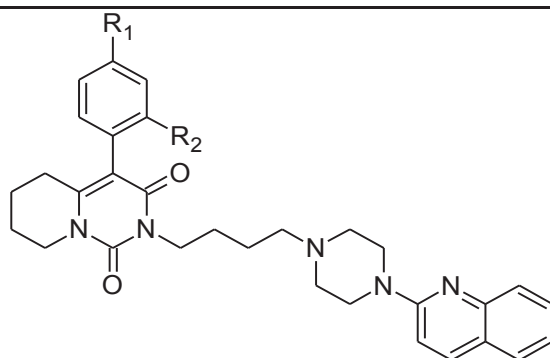
KOD	R ₁	R ₂	R ₃
I41	H	H	F
I44	H	Cl	F
I48	CH ₃	H	F
I49	OCH ₃	H	F
I52	H	CH ₃	Cl
I59	OCH ₃	H	Cl
I61	H	H	Br
I65	H	F	Br

W badaniach wykorzystano również 8 pochodnych arylopiperazyny z podstawnikiem piperazyno-chinolinowym. Sposób syntezy oraz aktywność biologiczna została opisana w publikacji [76]. Ich struktury chemiczne zamieszczono w Tabeli 10.

Tabela 10. Struktura chemiczna drugiej z badanych grup pochodnych arylopiperazyny z podstawnikiem piperazyno-chinolinowym.



KOD	R ₁	R ₂
C7	H	OCH ₃
C2	OCH ₃	H
C1	Cl	H
C4	H	Cl
C9	H	H



KOD	R ₁	R ₂
C10	H	F
C16	CH ₃	H
C17	H	CH ₃

3.2 Oprogramowanie

Poniżej zamieszczono listę oprogramowania naukowego zastosowanego w pracy doktorskiej, wraz z dokładnym określeniem wersji oraz producenta. Oprócz tego zaznaczono podstawowe zastosowania wymienionego oprogramowania:

- **Statistica** (v. 10, Statsoft, Tulsa, OK, USA) – statystyka, chemometria, przygotowanie danych do analiz,
- **Dragon** (v. 6.0, Talete srl, Mediolan, Włochy) – obliczanie deskryptorów molekularnych, analiza korelacji, analiza głównych składowych (PCA),
- **HyperChem** (v. 7.5, Hypercube Inc, Gainesville, FL, USA) – modelowanie molekularne, obliczanie deskryptorów molekularnych,
- **DryLab** (v. 2000 Plus, LC Resources, Walnut Creek, CA, USA) – wyznaczenie chromatograficznych parametrów lipofilowości,
- **SIMCA** (v. 13.0.3, Umetrix AB, Umeå, Szwecja) – wielowymiarowa analiza danych, w tym analiza głównych składowych (PCA) i cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS).

Lista ta została ograniczona do oprogramowania o zastosowaniu typowo naukowym. W przygotowaniu pracy, szczególnie jej ostatecznego kształtu, w tym rycin, zastosowano typowe dla tych celów oprogramowanie, takie jak pakiet Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA), a także IrfanView (Irfan Skiljan, Jajce, Bośnia i Hercegowina) – grafika rastrowa i Inkscape (wolne i otwarte oprogramowanie, rozwijane przez społeczność internetową poprzez inkscape.org) – grafika wektorowa. Oprogramowanie sterujące aparaturą naukowo-badawczą zostało wymienione przy opisach poszczególnych doświadczeń.

3.3 Odczynniki chemiczne

Poniżej zamieszczono listę odczynników chemicznych wykorzystywanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Konkretnie zastosowanie każdego z odczynników opisano w podrozdziałach dotyczących poszczególnych procedur i eksperymentów.

Odczynniki wykorzystywane w chromatografii cieczowej:

- metanol, klasa czystości LC-MS (J.T. Baker, Avantor Performance Materials Center Valley, PA, USA),
- acetonitryl, klasa czystości LC-MS (J.T. Baker, Avantor Performance Materials Center Valley, PA, USA),
- izopropanol klasy czystości LC-MS (Witko, Łódź, Polska) oraz izopropanol klasy czystości LC (POCH, Gliwice, Polska),
- kwas mrówkowy, klasa czystości LC-MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- mrówczan amonu, klasa czystości LC-MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- dodecylosiarczan sodu (SDS) Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- woda, dejonizowana otrzymywana z zastosowaniem aparatury Merck-Milipore UV3-R, (Merck, Darmstadt, Niemcy).

Odczynniki wykorzystywane w przygotowaniu i przeprowadzeniu inkubacji enzymatycznych:

- dimetylosulfotlenek, klasa czystości cz.d.a. (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA),
- metanol, klasa czystości LC-MS (J.T. Baker, Avantor Performance Materials Center Valley, PA, USA),
- acetonitryl, klasa czystości LC-MS (J.T. Baker, Avantor Performance Materials Center Valley, PA, USA),
- fosforan i wodorofosforan potasu, cz.d.a (POCH, Gliwice, Polska),
- woda, dejonizowana otrzymywana z zastosowaniem aparatury Merck-Milipore UV3-R (Merck, Darmstadt, Niemcy),
- sól sodowa zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, NADPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- preparat mikrosomów wątroby ludzkiej, HLM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- chlorowodorek buspironu, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.4 Aparatura

- Chromatograf cieczowy Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), wyposażony w pompę binarną, degazer, termostat do kolumn, automatyczny podajnik próbek, detektor UV oraz sprzężony z chromatografem spektrometr mas typu pojedynczy kwadrupol (Agilent 6200) z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (ang. *electrospray ionisation*, ESI),
- Chromatograf cieczowy ACME 9000 (Younglin Lin Instrument, Kyounggi-do, Korea Południowa) wyposażony w detektor UV, automatyczny podajnik próbek oraz termostat do kolumn,
- Chromatograf cieczowy Agilent 1100 sprzężony ze spektrometrem mas firmy ABSciex (QSTAR XL Q-TOF, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), wyposażony w analizatory kwadrupolowy i czasu przelotu oraz jonizację przez rozpylanie w polu elektrycznym,
- Myjka ultradźwiękowa T460 H (Elma Schmidbauer, Singen, Niemcy),
- Waga analityczna WAX 60/160 (Radwag, Radom, Polska),
- Termoblok AccuBlock (Labnet International, Edison, NJ, USA),
- Zamrażarka Bosch (Bosch, Stuttgart, Niemcy),
- Pipety automatyczne Biohit (Biohit Oyj, Helsinki, Finlandia).

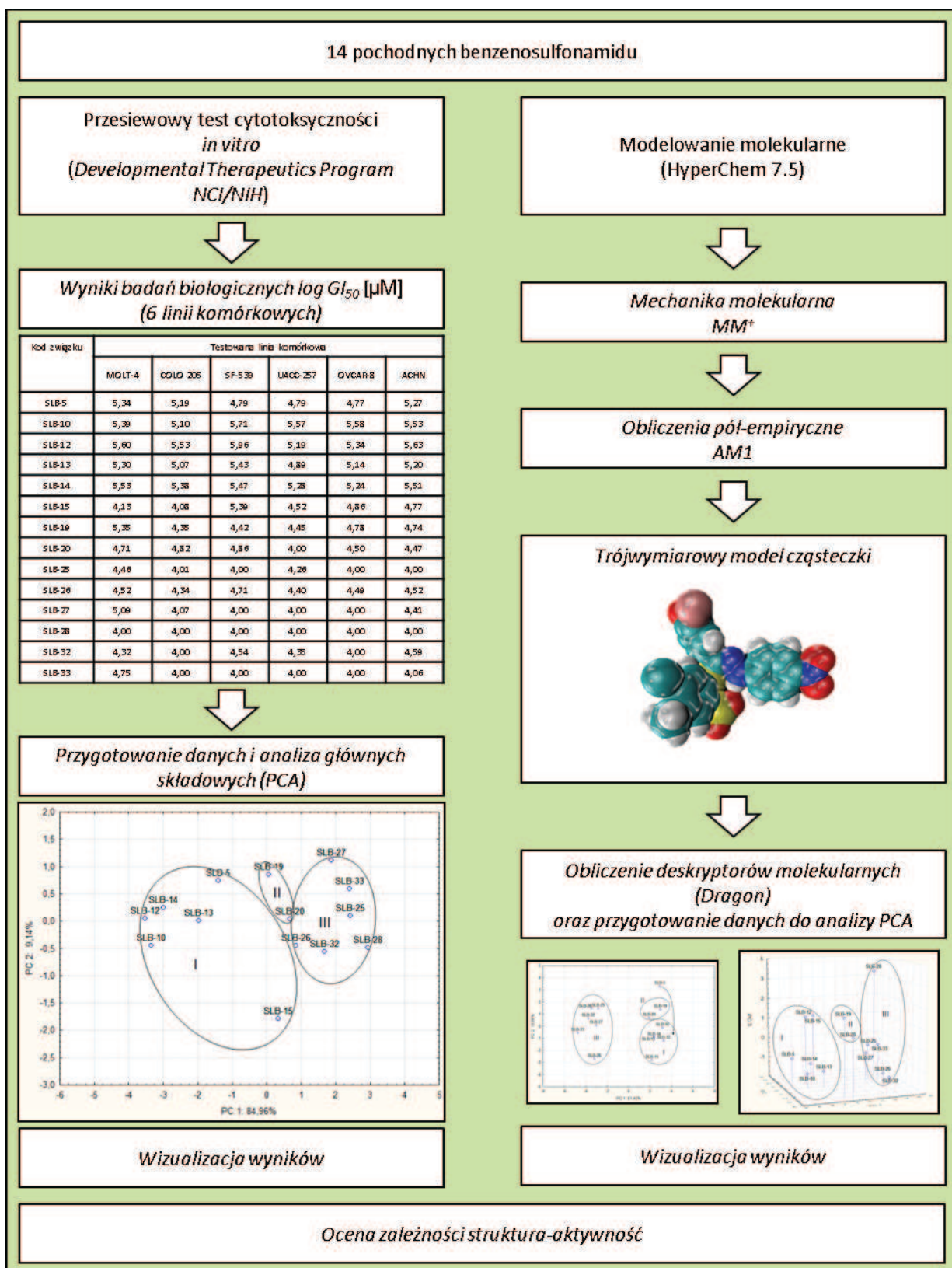
W kolejnych podrozdziałach przedstawiono wszystkie procedury wykonywania doświadczeń i analiz chemicznych, jak i wszelkich procedur modelowania molekularnego, analizy danych i wykorzystywanych technikach chemometrycznych. Kolejność opisu wynika z kolejności ich wykonywania, ale także z logicznego podziału na procedury laboratoryjne oraz obliczeniowe.

3.5 Analiza głównych składowych (PCA) jako narzędzie poszukiwania zależności struktura-aktywność na przykładzie 14 nowych pochodnych benzenosulfonamidu (procedura 1)

Schemat procedury obejmujący poszczególne etapy obliczeń oraz interpretację wyników doświadczalnych zaprezentowano na Rycinie 4.

Opisana procedura, wraz z jej wynikami została opublikowana w artykule [34]. Celem badań tego etapu była ocena zależności struktura-aktywność dla pochodnych benzenosulfonamidu z wykorzystaniem analizy głównych składowych (PCA). Analizę PCA wykonano równolegle z użyciem danych eksperymentalnych uzyskanych w testach cytotoksyczności oraz wykorzystując wartości deskryptorów molekularnych uzyskane w oparciu o trójwymiarowy model cząsteczki.

W procedurze wykorzystano 14 pochodnych benzenosulfonamidu, oznaczonych kolejno kodem: **SLB-5, SLB-10, SLB-12, SLB-13, SLB-14, SLB-15, SLB-19, SLB-20, SLB-25, SLB-26, SLB-27, SLB-28, SLB-32** oraz **SLB-33** (struktury chemiczne zamieszczono w Tabelach 6-8). Wykorzystano wszystkie związki z grupy benzenosulfonamidu, dla których były dostępne dane aktywności.



Rycina 4. Schemat procedury 1.

Źródłem wyników oznaczeń biologicznych był amerykański program Developmental Therapeutics Program (DTP) prowadzony wspólnie przez dwie amerykańskie agencje rządowe NCI (*National Cancer Institute*) i NIH (*National Institute of Health*). Ze względu na dostępność danych, z panelu 60 dostępnych linii komórkowych, wybrano 6 linii, wobec których została oznaczona cytotoksyczność dla wszystkich 14 ujętych w tej procedurze pochodnych benzenosulfonamidu. Do dalszych obliczeń wykorzystane zostały wartości logarytmów dziesiętnych z GI_{50} (stężenie powodujące zahamowanie wzrostu komórek w 50%, przedstawione w μM), $\log GI_{50}$. Dokładną procedurę wykonania badań cytotoksyczności, jak i sposób wyliczenia wartości GI_{50} umieszczono na stronach internetowych programu DTP (<https://dtp.nci.nih.gov/>). Uzyskane dane były podstawą analizy głównych składowych wykonaną za pomocą oprogramowania Statistica (v. 10 Statsoft, Tulsa, OK, USA). Przed analizą PCA dane podlegały standaryzacji poprzez odjęcie od każdej wartości średniej wartości $\log GI_{50}$ dla danej zmiennej (danej linii komórkowej) oraz podzieleniu jej przez odchylenie standardowe tej zmiennej.

Do zbudowania trójwymiarowych modeli badanych cząsteczek wykorzystano oprogramowanie HyperChem (v. 7.5 Hypercube Inc, Gainesville, FL, USA), za pomocą którego wykonano dwuetapową procedurę obejmującą mechanikę molekularną w oparciu o pole siłowe MM⁺ oraz, końcowo, obliczenia pół-empiryczne oparte na polu siłowym AM1. Uzyskane pliki modeli cząsteczek zostały poddane algorytmom obliczeniowym w oprogramowaniu Dragon (v. 6.0 Talete srl, Mediolan, Włochy). Oprogramowanie to jest zdolne do wyznaczenia blisko pięć tysięcy deskryptorów molekularnych. Spośród nich odrzucono te o stałych wartościach i o odchyleniu standardowym mniejszym niż 0,0001 tak, aby w dalszych obliczeniach nie korzystać z wartości nieróżnicujących badanych pochodnych benzenosulfonamidu. Dodatkowo, wykonano analizę korelacji liniowej pomiędzy deskryptorami i odrzucono także te deskryptory, dla których wartość bezwzględna współczynnika korelacji była większa lub równa 0,9. Za pomocą tych dwóch etapów filtracji danych liczba deskryptorów została ograniczona do 640 z początkowej liczby 4885. Następnie, wykorzystując algorytm doboru zmiennych w oprogramowaniu Statistica (v. 10 Statsoft, Tulsa, OK, USA) dokonano wyboru 20 predyktorów (deskryptorów), charakteryzujących się najwyższą wartością statystyki F w analizie wariancji. Jako zmienną zależną stosowano kolejno wartości aktywności zmierzonej z użyciem linii komórkowej

nowotworu nerki (ACHN) i nowotworu jajnika (OVCAR-8). Analizę głównych składowych (PCA), również w tym przypadku, poprzedził proces standaryzacji danych poprzez odjęcie od każdej wartości średniej wartości danej zmiennej oraz podzieleniu jej przez odchylenie standardowe tej zmiennej.

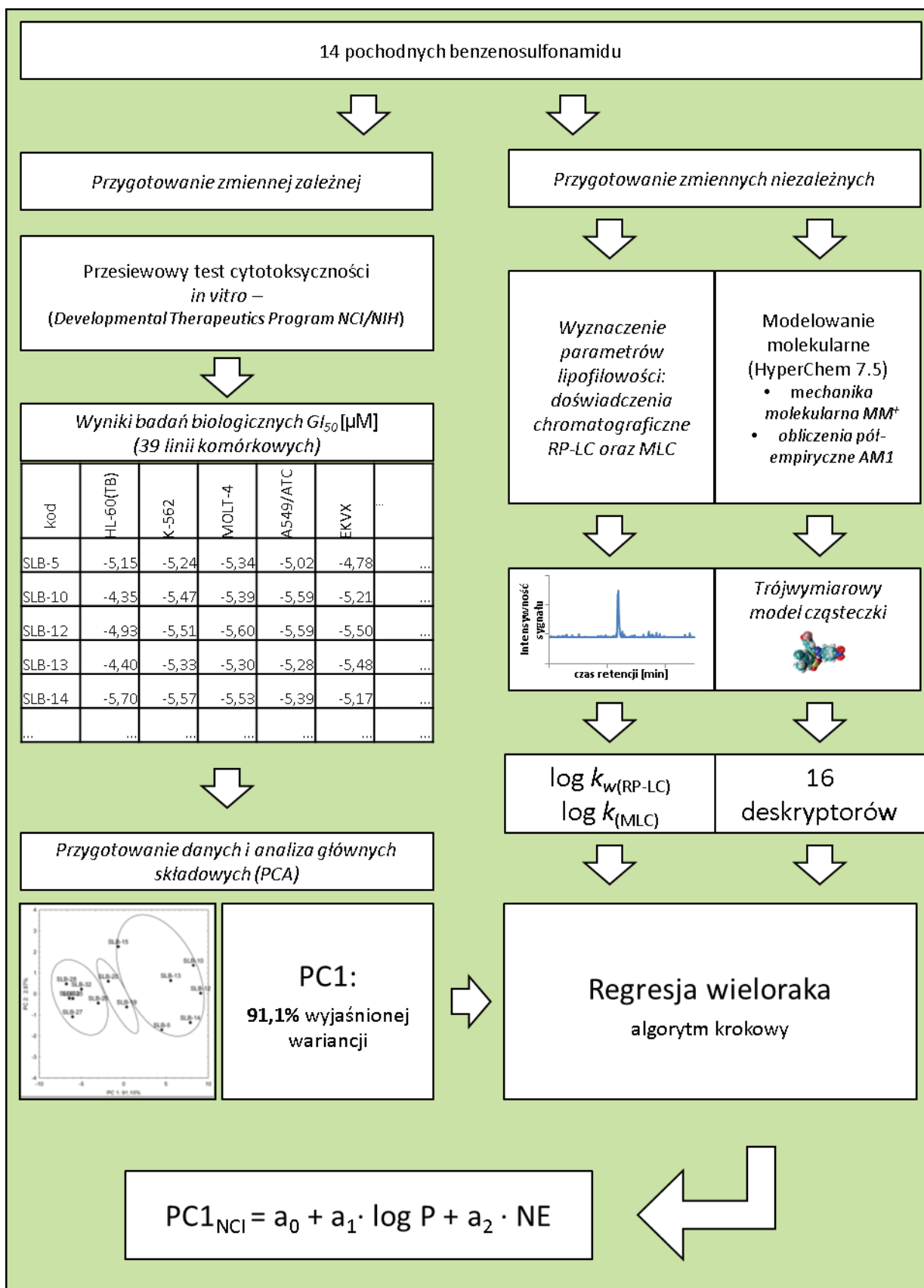
3.6 Analiza QSAR dla pochodnych benzenosulfonamidu (procedura 2)

Schemat procedury obejmujący poszczególne etapy obliczeń oraz interpretację uzyskanych wyników doświadczalnych zaprezentowano na Rycinie 5.

Celem drugiej zaproponowanej procedury badawczej było opracowanie ilościowego modelu obrazującego zależność pomiędzy strukturą a aktywnością badanej serii pochodnych benzenosulfonamidu (QSAR). Założono, że model powinien opisywać aktywność związku biorąc pod uwagę całość dostępnych danych wyznaczonych uprzednio przez NCI i NIH. W ten sposób podjęto próbę uzyskania modelu, który umożliwi łatwiejszą identyfikację związków o największej aktywności, bez koncertowania się na aktywności wobec poszczególnych linii komórkowych. Podejście takie ma na celu uzyskanie związków o dużej aktywności cytotoksycznej, gdy celem potencjalnego leku nie jest konkretny rodzaj nowotworu.

3.6.1 Zmienna zależna

W metodologii QSAR jako zmienną zależną wykorzystuje się jeden z parametrów wyznaczonej eksperymentalnie aktywności badanych związków. Dla 14 badanych związków dostępne były eksperymentalnie wyznaczone wartości GI_{50} z wykorzystaniem 39 linii komórkowych. Dane te zostały transformowane z wykorzystaniem logarytmu dziesiętnego, aby uzyskać rozkład zmiennych zbliżony do normalnego. Dane po transformacji (14 związków x 39 zmiennych $\log GI_{50}$) zostały poddane analizie głównych składowych, po uprzedniej standaryzacji z wykorzystaniem wartości średniej i odchylenia standardowego (tak, jak opisano w procedurze 1). Ostatecznie, w modelu QSAR zastosowano współrzędną czynnikową badanych pochodnych (ang. *score*) dla pierwszej głównej składowej jako zmienną zależną w modelu QSAR



Rycina 5. Schemat procedury 2.

3.6.2 Zmienne niezależne

W przypadku Procedury 2, jako wstępny zestaw zmiennych niezależnych zastosowano 16 deskryptorów molekularnych, możliwych do uzyskania w oprogramowaniu HyperChem na podstawie zoptymalizowanej struktury 3D badanych pochodnych benzenosulfonamidu, a także wyznaczone eksperymentalnie dwa parametry lipofilowości wyznaczone technikami chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-LC) oraz micelarnej chromatografii cieczowej (ang. *micellar liquid chromatography*, MLC) – procedura wyznaczania chromatograficznych parametrów lipofilowości została opisana w kolejnych podrozdziałach. Poniższa lista obejmuje deskryptory, których wartości otrzymano z użyciem oprogramowania HyperChem: VdWS – powierzchnia Van der Waals’a cząsteczki, SAS – powierzchnia dostępna dla rozpuszczalnika, V – objętość cząsteczki, HE – energia hydratacji, log P – logarytm współczynnika podziału *n*-oktanol/woda, REF – refrakcyjność, POL – polaryzowalność, DIP – moment dipolowy, TE – energia całkowita, BE – energia wiążąca, HoF – ciepło tworzenia; EE – energia elektronowa, NE – energia jądra, E_HOMO – energia orbitalu HOMO, E_LUMO – energia orbitalu LUMO, Mw – masa molowa. Wartości deskryptorów przed analizą regresji podlegały standaryzacji. Wartości tych deskryptorów zostały wyznaczone opierając się na trójwymiarowych modelach cząsteczek otrzymanych zgodnie z metodą opisaną w procedurze 1.

3.6.3 Opracowanie modelu QSAR – regresja wieloraka z algorytmem krokowym

W celu wyznaczenia współczynników równania QSAR posłużono się oprogramowaniem Statistica (StatSoft, Tulsa, OK, USA) i zaimplementowanym w nim algorytmem krokowej regresji wielorakiej. Algorytm ten umożliwia dobór kolejnych zmiennych niezależnych, tak aby uzyskać maksymalne dopasowanie danych. Badacz ma możliwość zatrzymania obliczeń na każdym kolejnym kroku włączania kolejnych zmiennych. Kryterium włączenia kolejnych zmiennych było oparte na wartości istotności statystycznej. Zdolność prognostyczną modelu zweryfikowano za pomocą walidacji krzyżowej typu LOO (ang. *leave-one-out*).

3.7 Wyznaczanie chromatograficznych parametrów lipofilowości technikami chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-LC) oraz micelarnej chromatografii cieczowej (MLC)

Oba wymienione poniżej parametry zostały uwzględnione w zestawie zmiennych niezależnych w procedurze opracowania modelu QSAR dla pochodnych benzenosulfonamidu (procedura 2).

3.7.1 Wyznaczenie $\log k_{w(RP-LC)}$ techniką chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-LC)

Podczas wyznaczania parametru lipofilowości techniką RP-LC posłużono się aparatem ACME 9000 (Younglin Lin Instrument, Kyounggi-do, Korea Południowa) wyposażonym w detektor UV, automatyczny podajnik próbek oraz termostat do kolumn. Zastosowano kolumnę XTerra C-18 150 x 4,6 mm, ze średnicą ziaren wypełnienia 5 μm (Waters, Milword, MA, USA). Faza ruchoma składała się z części A: woda z dodatkiem buforu fosforanowego o stężeniu 0,01 M i pH 3, oraz części B: metanol. Analizę prowadzono w temperaturze 40°C, a objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1 mL/min. Dla każdego związku przeprowadzono dwie analizy różniące się programem elucji gradientowej, (według Tabeli 11).

Tabela 11. Przebieg zmian składu eluentu w dwóch programach elucji gradientowej wykorzystanych podczas wyznaczania chromatograficznych parametrów lipofilowości techniką chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-LC).

Program 1		Program 2	
t [min]	%B	t [min]	%B
0	5	0	5
20	100	60	100
22	100	62	100
24	5	64	5
34	5	74	5

Wartość $\log k_{w(RP-LC)}$ została wyznaczona z użyciem algorytmu wbudowanego w oprogramowanie DryLab (v. 2000 Plus LC Resources, Walnut Creek, CA, USA) na podstawie eksperymentalnie otrzymanych czasów retencji oraz parametrów procesu chromatograficznego i danych technicznych chromatografu, w tym objętości zatrzymania (ang. *dwel volume*, V_D). Czas martwy wyznaczono stosując roztwór 1% (w/v) tiomocznika.

Detektor UV rejestrował absorbancję przy długości fali równej 254 nm. Do kolumny wprowadzono 10 μL metanolowego roztworu badanego związku o stężeniu 100 μM . Każdy z badanych związków analizowano trzykrotnie.

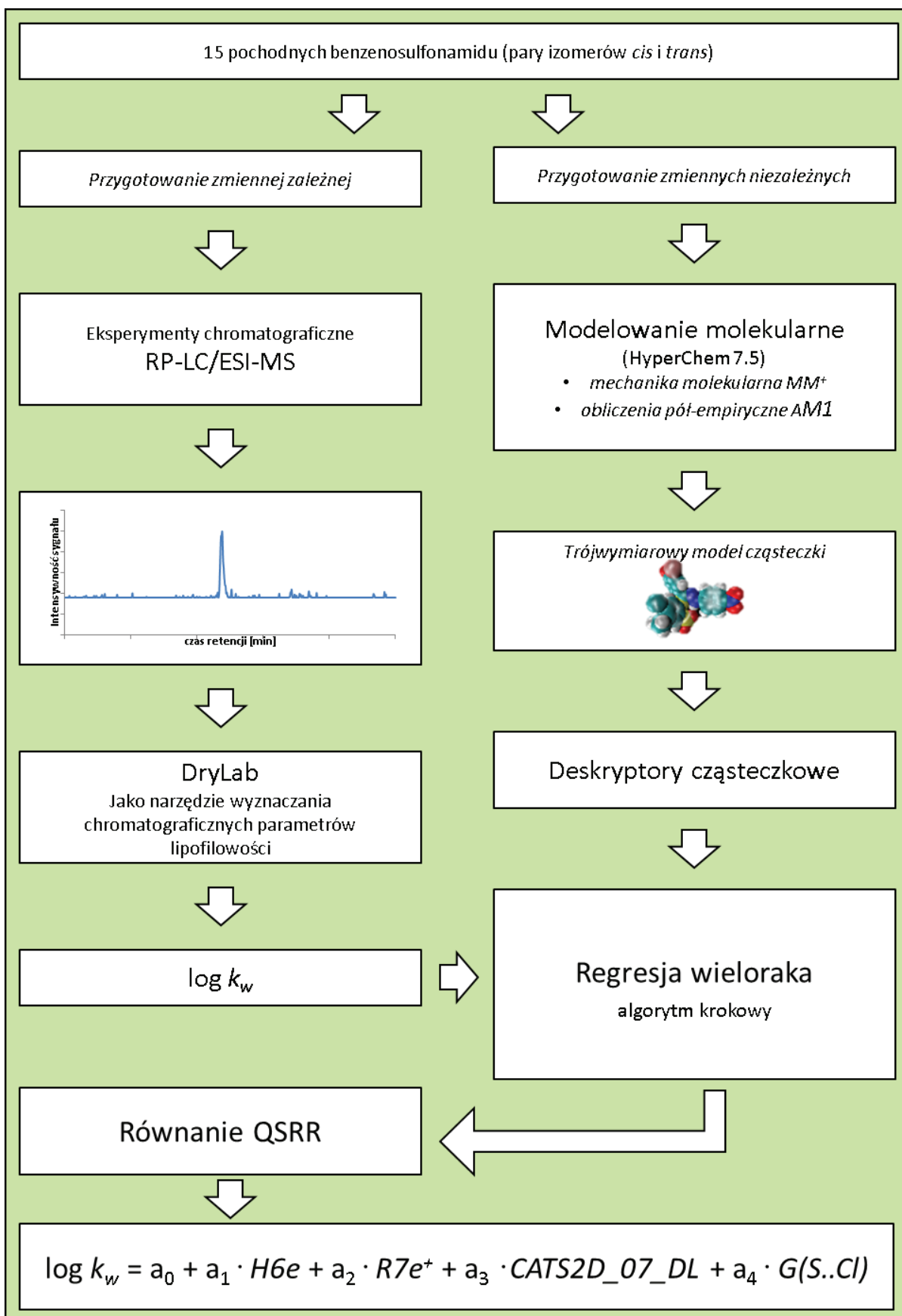
3.7.2 Wyznaczenie $\log k_{(\text{MLC})}$ techniką micelarnej chromatografii cieczowej (MLC)

Parametr charakteryzujący lipofilowość związku chemicznego – współczynnik retencji, wyznaczono również alternatywną wobec RP-LC techniką micelarnej chromatografii cieczowej (MLC). Zastosowano ten sam chromatograf i kolumnę chromatograficzną, jak w przypadku techniki RP-LC. Parametr ten wyznaczono w warunkach elucji izokratycznej, natomiast faza ruchoma zawierała 15% (v/v) 2-propanolu oraz 85% (v/v) 10 mM buforu fosforanowego o pH 3. Końcowe stężenie dodecylosiarczanu sodu wynosiło 75 mM – przekraczało stężenie krytyczne micelaryzacji. Również w tym przypadku 1% roztwór tiomocznika został zastosowany do wyznaczenia czasu martwego. Detektor UV rejestrował absorbancję przy długości fali równej 254 nm. Do kolumny wprowadzono 10 μL metanolowego roztworu badanego związku o stężeniu 100 μM . Każdy z badanych związków analizowano trzykrotnie.

3.8 Wspomaganie procesu identyfikacji izomerów geometrycznych pochodnych benzenosulfonamidu – model QSRR (procedura 3)

Schemat procedury został przedstawiony na Rycinie 6. Całą procedurę można podzielić na kilka etapów:

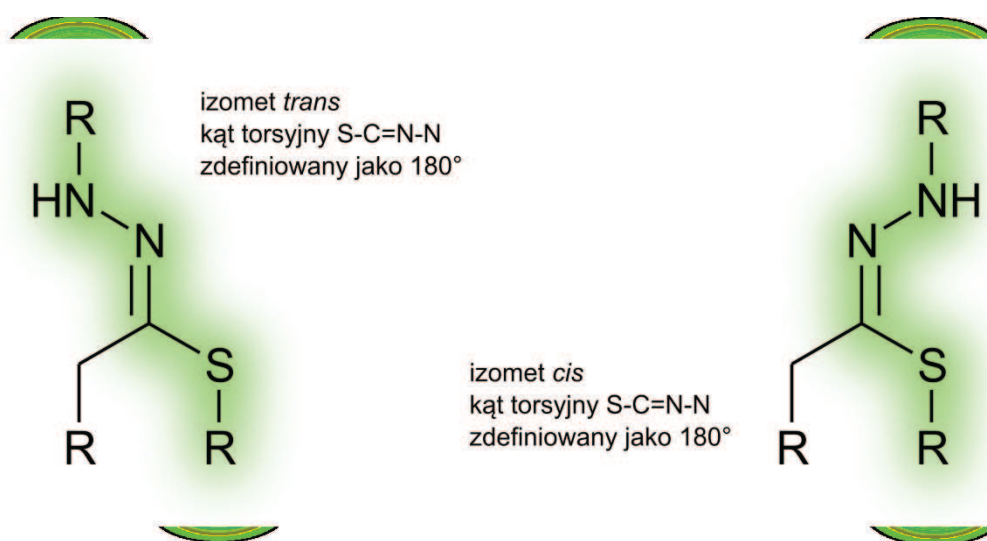
- modelowanie molekularne wraz z obliczeniem deskryptorów molekularnych,
- doświadczenia chromatograficzne służące wyznaczeniu parametrów lipofilowości,
- opracowanie i walidacja otrzymanego modelu QSRR.



Rycina 6. Schemat ogólny procedury 3.

3.8.1 Modelowanie trójwymiarowej struktury i deskryptory

Trójwymiarowe modele 15 badanych pochodnych benzenosulfonamidu (izomerów *cis* i *trans*) zostały skonstruowane z zastosowaniem oprogramowania HyperChem (v. 8.0.3, HyperCube, Gainesville, USA) według założeń analogicznych, jak w procedurze 1 i 2. Konieczność zachowania zdefiniowanej geometrii układu tiohydrazonu (Rycina 7) wymusiła arbitralne zdefiniowanie kąta torsyjnego pomiędzy atomami S-C=N-N dla izomerów *cis* i *trans*.



Rycina 7. Zastosowana definicja kąta torsyjnego dla izomerów *cis* i *trans* badanych pochodnych benzenosulfonamidu.

Protokół otrzymania trójwymiarowego modelu obejmował obliczenia mechaniki molekularnej MM+, oraz dalszą optymalizację pół-empiryczną techniką AM1. Deskryptory molekularne zostały otrzymane przy pomocy oprogramowania Dragon (v. 6.0, Talete srl, Mediolan, Włochy). Jak wspomniano wyżej, oprogramowanie to umożliwia wyznaczenia 4885 wartości deskryptorów cząsteczkowych. Spośród nich wybrano wyłącznie te bloki deskryptorów, które różnicowały izomery *cis* i *trans*. Zastosowano deskryptory z następujących bloków: deskryptory wywodzące się z trójwymiarowej macierzy położenia atomów (ang. *3D matrix-based descriptors*), trójwymiarowe autokorelacje (ang. *3D autocorrelations*), deskryptory wywodzące się z radialnej funkcji dystrybucji (ang. *RDF descriptors*), deskryptory reprezentujące strukturę trójwymiarową na podstawie dyfrakcji elektronowej (ang. *3D-MoRSE descriptors*), deskryptory WHIM (ang. *Weighted Holistic*

Invariant Molecular descriptors), deskryptory GETAWAY (ang. *GEometry, Topology, and Atom-Weights Assembly*), profile cząsteczkowe Randica, dwuwymiarowe deskryptory CATS (ang. *Chemically Advanced Template Search*), deskryptory odległości atomów w przestrzeni trójwymiarowej. Analiza regresji została wykonana w programie Statistica (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

3.8.2 Wyznaczenie chromatograficznych parametrów lipofilowości

Doświadczenia chromatograficzne zostały wykonane w sposób analogiczny jak opisano w podrozdziale 3.7.1 z uwzględnieniem jednak konieczności zastosowania w tym przypadku innego układu chromatograficznego wraz z detekcją mas, pomocną w identyfikacji pików postulowanych izomerów geometrycznych.

Wykorzystano chromatograf Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) wyposażony w automatyczny podajnik próbek, termostat do kolumn, detektor UV oraz analizator pojedynczy kwadrupol z jonizacją ESI. Zastosowano kolumnę chromatograficzną Poroshell EC18 150 mm × 3 mm i średnicą ziaren wypełnienia 2,7 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Proces rozdzielania przeprowadzono w temperaturze 30°C i z objętościowym natężeniem przepływu fazy ruchomej 0,25 mL/min. Celem wyznaczenia parametru $\log k_w$ konieczne było wykonanie dwóch analiz różniących się programem elucji. W Tabeli 12 zamieszczono szczegółowy program zmian składu fazy ruchomej w czasie analizy. Składnikiem A fazy ruchomej była woda dejonizowana z 0,1% dodatkiem kwasu mrówkowego, natomiast składnikiem B był acetonitryl z taką samą zawartością kwasu mrówkowego.

Tabela 12. Przebieg zmian składu eluentu w dwóch programach elucji gradientowej wykorzystanych podczas wyznaczania chromatograficznych parametrów lipofilowości techniką chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz.

Program 1		Program 2	
t [min]	%B	t [min]	%B
0	5	0	5
20	100	60	100
22	100	62	100
24	5	64	5
34	5	74	5

Zmierzone czasy retencji (t_R) zostały, wraz z innymi parametrami procesu chromatograficznego, wprowadzone do oprogramowania DryLab 2000 Plus (LC Resources,

Walnut Creek, CA, USA). Oprogramowanie to umożliwia wyznaczenie $\log k_w$ opierając się na równaniu Soczewińskiego-Snydera [94]: $\log k = \log k_w + S\varphi$ [k – współczynnik retencji, S – współczynnik kierunkowy krzywej (charakterystyczny dla substancji), φ – ułamek objętościowy rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej, k_w – współczynnik retencji ekstrapolowany do 100% wodnej fazy ruchomej].

3.8.3 Opracowanie modelu QSRR

Opisane wyżej deskryptory oraz wartości $\log k_w$ posłużyły jako podstawa modelu QSRR. Analizowane 29 substancji podzielono na zbiór uczący ($n = 24$, ok. 85% związków) i zbiór testowy ($n = 5$, ok. 15% związków). Współczynniki modelu zostały oszacowane za pomocą zbioru uczącego, z wykorzystaniem algorytmu krokowej regresji wielorakiej i użyciu oprogramowania Statistica (v. 10 Statsoft, Tulsa, OK, USA). Liczba deskryptorów została ograniczona poprzez odrzucenie tych o stałych wartościach i o odchyleniu standardowym mniejszym niż 0,0001. Dodatkowo, wykonano analizę korelacji liniowej pomiędzy deskryptorami i odrzucono także te deskryptory, dla których wartość bezwzględna współczynnika korelacji była większa lub równa 0,9.

3.9 Biotransformacja pochodnych benzenosulfonamidu – procedura inkubacji *in vitro* w obecności ludzkiej frakcji mikrosomalnej

Roztwory podstawowe 15 badanych pochodnych benzenosulfonamidu przygotowano za pomocą mieszaniny DMSO:metanol (1:9, v/v) w stężeniu 1 mM. Taki skład rozpuszczalnika umożliwił uniknięcie niekorzystnego zjawiska strącania. Mieszanina inkubacyjna zawierała ostatecznie 10 μM badanego związku, 1 mM NADPH (roztwór w buforze reakcyjnym) i 0,53 mg/mL frakcji mikrosomalnej wątroby ludzkiej. Całość uzupełniono buforem reakcyjnym: 100 mM bufor fosforanowo-potasowy o pH 7,4. Inkubacje były przeprowadzane w termobloku (Labnet International, Edison, NJ, USA) w temperaturze 37°C. Bezpośrednio po rozpoczęciu reakcji oraz po 120 min z mieszaniny inkubacyjnej pobierana była próbka do analizy. Reakcja była zatrzymywana poprzez dodanie równej objętości metanolu z 0,1% dodatkiem kwasu mrówkowego. Tak otrzymane próbki wirowano (11700 g, 10 min), a otrzymany supernatant był bezpośrednio przekazywany do analizy LC-MS. Dodatkowo, wykonano kontrole negatywne, pomijając dodatek NADPH oraz mikrosomów, aby ocenić

wpływ procesów chemicznych (przebiegających bez udziału enzymów), które zachodzą w warunkach inkubacji (bufor, temperatura, czas inkubacji).

3.10 Ocena stabilności metabolicznej pochodnych benzenosulfonamidu z użyciem techniki LC-MS

Ocena stabilności metabolicznej badanych pochodnych benzenosulfonamidu z użyciem techniki LC-MS wykonywano z wykorzystaniem chromatografu Agilent 1260 sprzężonego ze spektrometrem mas, pojedynczym kwadrupolem z jonizacją ESI (SingleQuad 6120, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Wykorzystano kolumnę Poroshell C18 EC120 3,0 mm x 100 mm, ze średnicą ziaren wypełnienia 2,7 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Składnikiem fazy ruchomej A była woda dejonizowana (Merck-Millipore) z 0,1% dodatkiem kwasu mrówkowego, natomiast składnikiem B był acetonitryl z takim samym dodatkiem kwasu mrówkowego. Program elucji gradientowej został przedstawiony w Tabeli 13. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 0,25 mL/min. Do kolumny wprowadzano 20 μL supernatantu.

Tabela 13. Przebieg zmiany składu eluentu w elucji gradientowej wykorzystanej podczas oceny stabilności metabolicznej pochodnych benzenosulfonamidu.

t [min]	%B
0	5
30	100
32	100
32,1	5
42	5

Spektrometr mas był wyposażony w źródło jonów z jonizacją ESI. Zastosowano dodatni tryb jonizacji. Monitorowano jony pseudomolekularne $[M+H]^+$ badanych analitów, w trybie SIM (ang. *single ion monitoring*). Parametry jonizacji przedstawiały się następująco: ciśnienie rozpylacza 40 psig (azot), objętościowe natężenie przepływu gazu suszącego 10 mL/min (azot), temperatura gazu suszącego 300°C, napięcie na kapilarze 3 kV.

W Tabeli 14 zebrano wartości stosunków m/z charakterystycznych dla 15 pochodnych benzenosulfonamidu.

Tabela 14. Zestawienie wartości mas molowych oraz wartości m/z 15 pochodnych benzenosulfonamidu.

Kod	Masa molowa [g/mol]	m/z [M+H] ⁺
SLB-1	428,92	429
SLB-2	442,95	443
SLB-3	442,95	443
SLB-4	485,93	488
SLB-5	455,97	457
SLB-6	455,97	457
SLB-7	471,00	471
SLB-8	505,02	505
SLB-9	476,97	477
SLB-10	511,41	511
SLB-11	521,96	522
SLB-12	490,99	491
SLB-13	506,99	507
SLB-14	571,86	571
SLB-15	527,03	527

3.11 Zebranie widm fragmentacyjnych (LC-Q-TOF-MS) pochodnych benzenosulfonamidu oraz produktów ich biotransformacji. Badanie produktów biotransformacji pochodnych benzenosulfonamidu

Opisane w podrozdziale 3.10 parametry chromatograficzne użyte zostały także podczas kolekcjonowania widm fragmentacyjnych (MS/MS) badanych pochodnych benzenosulfonamidu i produktów ich biotransformacji. W tym celu wykorzystano chromatograf cieczowy Agilent 1100 sprzężony ze spektrometrem mas firmy ABSciex (QSTAR XL Q-TOF, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), wyposażony w analizatory kwadrupolowy i analizator czasu przelotu oraz jonizację ESI, z użyciem następujących warunków: dodatni tryb jonizacji, napięcie na kapilarze 5.5 kV, ciśnienie gazu rozpylającego 20 psig, objętościowe natężenie przepływu gazu suszącego 10 L/min. Analizator czasu przelotu kalibrowano bezpośrednio przed wykonaniem analiz. Średnia wyznaczona dokładność pomiaru masy wynosiła 0,05 Da. Szybkość zbierania widm wynosiła: 1 widmo/s. Dane były zbierane i analizowane przy pomocy oprogramowania Analyst QS 1.1 (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA). Analiza została wykonana we współpracy z Laboratorium Pomorskiego Parku Naukowo-Technologicznego w Gdyni.

3.12 Biotransformacja analogów arylopipezyny – procedura inkubacji *in vitro* w obecności ludzkiej frakcji mikrosomalnej

Roztwory podstawowe badanych substancji zostały przygotowane w stężeniu 1 mM z zastosowaniem acetonitrylu jako rozpuszczalnika. W mieszaninach inkubacyjnych zastosowano 10 μ M stężenie związków w obecności 1 mM NADPH w buforze fosforanowym (0,1 M, pH 7,4). Inkubacje były prowadzone w termobloku w temperaturze 37°C. Po 5-min preinkubacji, reakcja biotransformacji była rozpoczynana poprzez dodanie preparatu mikrosomów ludzkiej wątroby w stężeniu końcowym 1 mg/mL (w przeliczeniu na całkowitą ilość białka). Bezpośrednio po dodaniu mikrosomów, a także po 5, 10, 15 i 30 min inkubacji część mieszaniny inkubacyjnej pobierano, a następnie zatrzymywano reakcję enzymatyczną poprzez zmieszanie jej z równą objętością schłodzonego w łaźni lodowej acetonitrylu, zawierającego wzorzec wewnętrzny. Jako wzorzec wewnętrzny dla wszystkich badanych pochodnych arylopipezyny zastosowano chlorowoderek buspironu w stężeniu 10 μ M. Inkubacje kontrolne zostały przeprowadzone z pominięciem NADPH, w celu wykluczenia niestabilności chemicznej pochodnych. Każda z próbek była niezwłocznie odwirowana przez 10 min, przy prędkości 11700 *g*, a powstały supernatant był analizowany za pomocą techniki LC-MS. W opisany sposób wykonano inkubacje dla 16 pochodnych, których struktury zebrano w Tabelach 9 i 10.

3.13 Ocena stabilności metabolicznej analogów arylopipezyny z użyciem techniki LC-MS

Ocenę stabilności metabolicznej pochodnych arylopipezyny z wykorzystaniem techniki LC-MS wykonywano z wykorzystaniem chromatografu Agilent 1260 sprzężonego ze spektrometrem mas, pojedynczym kwadropolem z jonizacją ESI (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Jako fazę stacjonarną wykorzystano kolumnę Poroshell C18 EC120 3,0 x 100 mm i średnicą ziaren wypełnienia 2,7 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Składnikiem fazy ruchomej A była woda dejonizowana (Merck-Millipore) z dodatkiem 10 mM mrówczanu amonu, natomiast składnikiem B był acetonitryl z takim samym dodatkiem buforu mrówczanowego. Program elucji gradientowej został przedstawiony w Tabeli 15. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 0,25 mL/min. Do kolumny wprowadzono 10 µL supernatantu.

Tabela 15. Przebieg zmiany składu eluentu elucji gradientowej wykorzystanej podczas oceny stabilności metabolicznej analogów arylopiiperazyny.

t [min]	%B
0	5
15	100
17	100
17,1	5
21	5

Zastosowano dodatni tryb jonizacji. Monitorowano jony pseudomolekularne $[M+H]^+$ badanych analitów, w trybie SIM (ang. *single ion monitoring*). Parametry jonizacji przedstawiały się następująco: ciśnienie rozpylacza 40 psig (azot), objętościowe natężenie przepływu gazu suszącego 10 mL/min (azot), temperatura gazu suszącego 300°C, napięcie na kapilarze 3 kV. Wzorcem wewnętrznym dla 16 badanych pochodnych był buspiron.

W Tabeli 16 przedstawiono wartości m/z monitorowanych jonów dla każdej z badanych pochodnych arylopiiperazyny.

Metaboliczny czas półtrwania, $t_{1/2}$ wyznaczano rozpoczynając od wyznaczenia współczynników równania regresji w układzie $y=f(x)$:

$$\ln \frac{\text{pole powierzchni piku badanego związku}}{\text{pole powierzchni buspironu}} = f(\text{czas inkubacji}),$$

Przy czym wyznaczony współczynnik kierunkowy prostej $y = ax + b$, posłużył do wyznaczenia czasu półtrwania z równania:

$$t_{1/2} = \frac{-0,693}{a}.$$

Opisany powyżej sposób wyznaczenia metabolicznego czasu półtrwania przy pomocy mikrosomalnych preparatów wątroby ludzkiej został opisany przez Obacha [55].

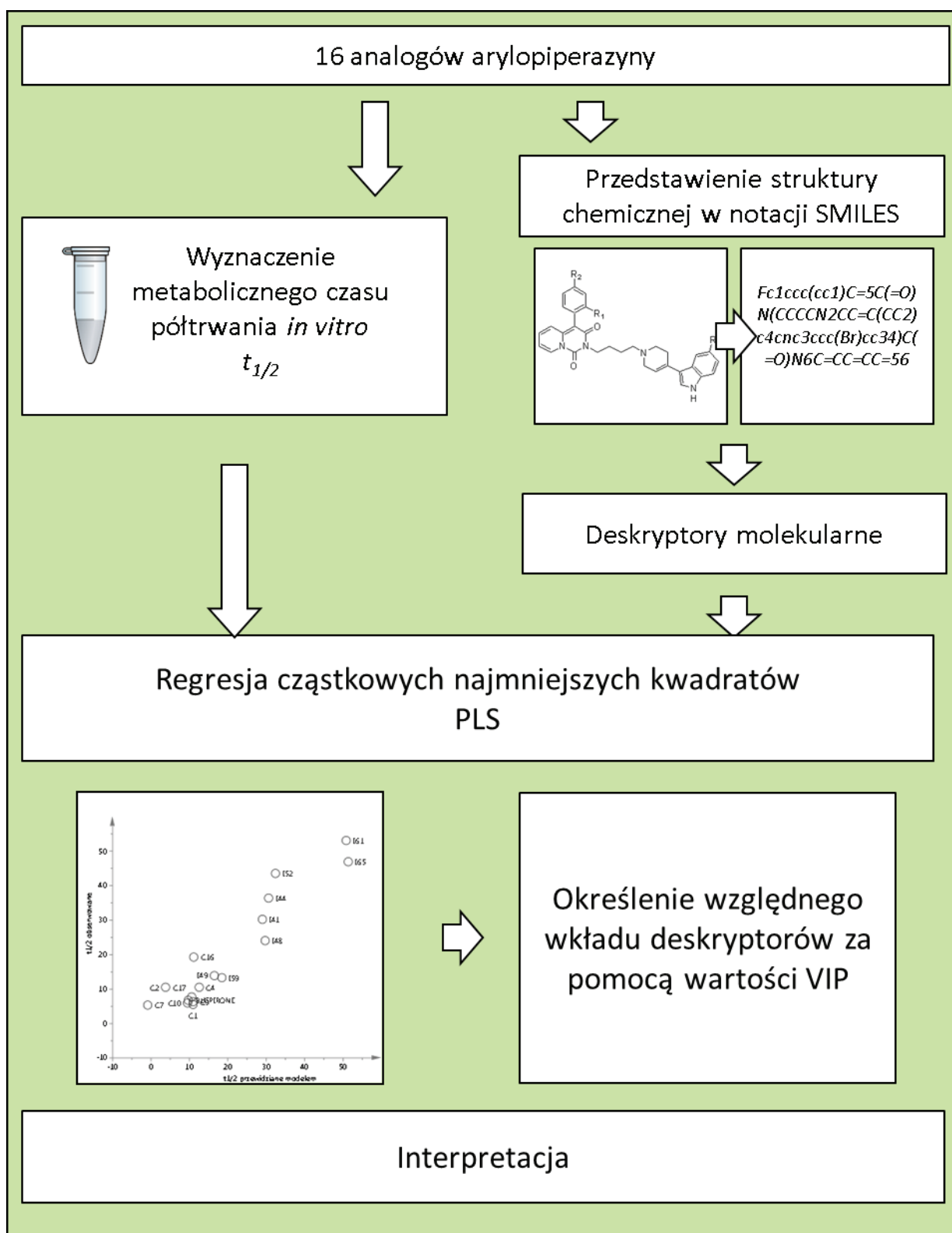
Tabela 16. Zestawienie wartości mas molowych oraz wartości m/z jonów wykorzystanych w analizie ilościowej pochodnych arylopiiperazyny.

Kod	Masa monoizotopowa [g/mol]	m/z [M+H] ⁺
Pochodne arylopiiperazyny z podstawnikiem indolo-tetrahydropirydyny		
I41	508,23	509,2
I44	542,19	543,2
I48	522,24	523,3
I49	538,24	539,3
I52	538,21	539,2
I59	554,21	555,2
I61	568,15	569,2
I65	586,14	587,1
Pochodne arylopiiperazyny z podstawnikiem piperazyno-chinolinowym		
C10	509,28	509,3
C9	505,25	506,3
C17	523,29	524,3
C16	523,29	524,3
C7	535,26	236,3
C2	535,26	236,3
C1	539,21	540,2
C4	539,21	540,2
bupiron	385,25	386,2

3.14 Poszukiwanie zależności pomiędzy wartościami deskryptorów molekularnych a stabilnością metaboliczną pochodnych arylopiiperazyny z wykorzystaniem analizy cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS, procedura 4)

Trudności w opisanu zależności pomiędzy strukturą chemiczną a metabolicznym czasem półtrwania wyznaczonym *in vitro* dla analogów arylopiiperazyn skłoniła do wykorzystania narzędzi chemometrycznych. W celu zidentyfikowania elementów struktury chemicznej, które w znacząco wpływają na uzyskaną eksperymentalnie wartość czasu półtrwania zastosowano regresję metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. *partial least squares regression*, PLS lub PLS-R). Technika ta jest szczególnie użyteczna, gdy możliwe jest zdefiniowanie liczby zmiennych, opisujących określony związek chemiczny, która znacznie przekracza liczbę zbadanych związków. Istnieje wiele sposobów selekcji zmiennych ze względu na jej wpływ na model PLS [95]. Należy nadmienić, że kwestią nadrzędną proponowanej procedury nie jest możliwość przewidywania czasu półtrwania,

lecz możliwość określenia wpływu poszczególnych cech tego związku na obserwowane eksperymentalnie wartości tego parametru. Ogólny schemat proponowanej procedury zamieszczono na Rycinie 8.



Rycina 8. Schemat procedury 4.

Szczególnym elementem procedury był dobór deskryptorów molekularnych. W zamyśle proponowany model powinien wskazywać elementy struktury chemicznej, które mają największy wpływ na stabilność metaboliczną. Dobrano więc deskryptory, które zawierają informację dotyczącą składu atomowego cząsteczki, jej grup funkcyjnych, czy też elementów, które można zakwalifikować jako donory i akceptory wiązań wodorowych, czy centra lipofilowe. Celowo zrezygnowano więc z etapu modelowania molekularnego, gdyż trójwymiarowa struktura badanego związku nie jest konieczna do obliczenia wyżej wymienionych deskryptorów.

Dwuwymiarowe struktury 16 badanych analogów arylopiiperazyny przedstawiono w notacji SMILES [96] z wykorzystaniem narzędzia dostępnego w oprogramowaniu ACD/ChemSketch (v. 12.01 Advanced Chemistry Development, Toronto, Kanada). Następnie, za pomocą oprogramowania Dragon obliczono deskryptory z następujących bloków: deskryptory konstytucyjne (ang. *constitutional descriptors*), deskryptory liczności grup funkcyjnych (ang. *functional group counts*), deskryptory elementów cząsteczki o zdefiniowanym atomie centralnym (ang. *atom-centered fragments*), deskryptory CATS2D (ang. *Chemically Advanced Template Search* [97]) oraz deskryptory par atomów w przestrzeni dwuwymiarowej (ang. *2D atom pairs*). Uzyskane wartości wraz z otrzymanymi eksperymentalnie czasami półtrwania przeniesiono do oprogramowania SIMCA. Za pomocą oprogramowania SIMCA zbudowano cztery modele: pierwszy, z wykorzystaniem wszystkich pięciu wymienionych powyżej bloków, oraz następne, z wykorzystaniem bloku deskryptorów CATS2D, z wykorzystaniem bloku deskryptorów liczności grup funkcyjnych oraz z wykorzystaniem deskryptorów par atomów w przestrzeni dwuwymiarowej. Wartości VIP opisujące istotność zmiennych dla modelu (ang. *Variable Importance for the Projection*, VIP [95,98]) również uzyskano z zastosowaniem oprogramowania SIMCA. Walidację modeli wykonano metodą walidacji krzyżowej. Obliczono pierwiastki błędu średniokwadratowego RMSEE (dla estymacji) i RMSECV (dla walidacji krzyżowej).

4 Wyniki i dyskusja wyników

4.1 Analiza głównych składowych (PCA) jako narzędzie poszukiwania zależności struktura-aktywność na przykładzie 14 nowych pochodnych benzenosulfonamidu (procedura 1)

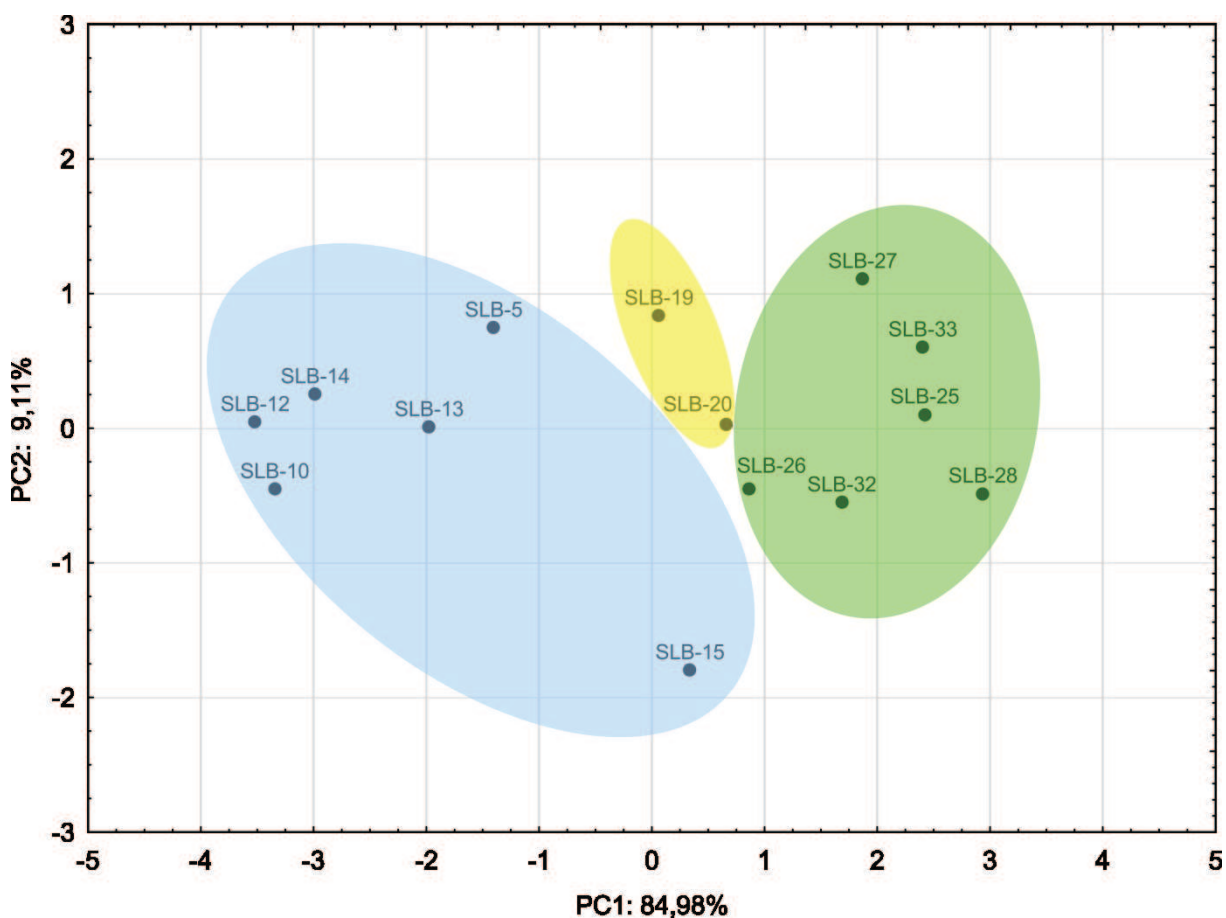
W badaniu wykorzystano 14 pochodnych 4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonamidu, zawierających w swojej strukturze chemicznej podstawnik tiohydrazonu. Podczas analizy wykorzystano również dane dotyczące aktywności cytotoksycznej, zmierzone z użyciem sześciu linii komórkowych nowotworów ludzkich (Tabela 17).

Tabela 17. Dane aktywności cytotoksycznej zmierzone przez *National Cancer Institute* dla czternastu pochodnych benzenosulfonamidu.

Kod	log GI_{50}					
	MOLT-4	COLO 205	SF-539	UACC-257	OVCAR-8	ACHN
SLB-5	5,34	5,19	4,79	4,79	4,77	5,27
SLB-10	5,39	5,10	5,71	5,57	5,58	5,53
SLB-12	5,60	5,53	5,96	5,19	5,34	5,63
SLB-13	5,30	5,07	5,43	4,89	5,14	5,20
SLB-14	5,53	5,38	5,47	5,28	5,24	5,51
SLB-15	4,13	4,08	5,39	4,52	4,86	4,77
SLB-19	5,35	4,35	4,42	4,45	4,78	4,74
SLB-20	4,71	4,82	4,86	4,00	4,50	4,47
SLB-25	4,46	4,01	4,00	4,26	4,00	4,00
SLB-26	4,52	4,34	4,71	4,40	4,49	4,52
SLB-27	5,09	4,07	4,00	4,00	4,00	4,41
SLB-28	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
SLB-32	4,32	4,00	4,54	4,35	4,00	4,59
SLB-33	4,75	4,00	4,00	4,00	4,00	4,06

MOLT-4 – ostra białaczka limfoblastyczna, COLO 205 – nowotwór okrężnicy, SF-539 – nowotwór mózgu, UACC-257 – nowotwór skóry, OVCAR-8 – nowotwór jajnika, ACHN – nowotwór nerki.

Z wykorzystaniem danych w Tabeli 17 została wykonana analiza głównych składowych (PCA). Jednym z zasadniczych zastosowań PCA jest wyodrębnienie praktycznie użytecznej informacji zawartej w wielowymiarowych macierzach danych, trudnych do jednoznacznej interpretacji z powodu dużej liczby analizowanych próbek (obiektów) i wielu zmiennych opisujących ich cechy. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe jest wówczas porównanie podobieństw i różnic oraz ocena zależności, zarówno pomiędzy badanymi próbkami (w tym przypadku pochodnymi benzenosulfonamidu), jak i zmiennymi (w tym przypadku danymi aktywności). Jednym ze sposobów wizualnego zobrazowania tych zależności jest rzut przypadków na płaszczyznę wybranych głównych składowych. Najczęściej wykorzystuje się pierwszą i drugą główną składową, ze względu na największą ilość informacji jakie zawierają dwie pierwsze składowe. Rycina 9 przedstawia rzut 14 badanych próbek (z trzech różniących się strukturą chemiczną grup benzenosulfonamidów) na płaszczyznę dwóch pierwszych głównych składowych uzyskany z danych zawartych w Tabeli 17 (14 przypadków x 6 zmiennych).



Rycina 9. Rzut przypadków na płaszczyznę pierwszych dwóch głównych składowych. Otrzymano z wykorzystaniem danych zawartych w Tabeli 17. Za pomocą elips zaznaczono trzy grupy badanych benzenosulfonamidów.

Pierwsza główna składowa wyjaśnia prawie 85% wariacji zestawu danych wejściowych, a druga ponad 9% tej wariacji. Za pomocą wykresu przedstawionego na Rycinie 9 możliwe jest zobrazowanie ponad 94% informacji dotyczącej aktywności badanych pochodnych (Tabela 17). Uzyskane wyniki wskazują, że na podstawie danych aktywności wyznaczonej z użyciem 6 wybranych linii komórkowych możliwe jest zatem zróżnicowanie 14 badanych pochodnych benzenosulfonamidu pod względem ich potencjalnej aktywności biologicznej. Na Rycinie 9 za pomocą elipsy zaznaczono trzy główne grupy badanych związków różniące się głównymi elementami struktury (Tabela 6-8). Pierwszy klaster (I) wyróżnia grupę związków (oznaczonych kodami **SLB-5**, **SLB-10**, **SLB-12**, **SLB-13**, **SLB-14**, **SLB-15**) o największej aktywności w badanym zestawie pochodnych benzenosulfonamidu wobec analizowanych linii komórkowych. Związek **SLB-15** znajduje się w obrębie klastera I, jednak jest wyraźnie dalej umiejscowiony w porównaniu do pozostałych pochodnych benzenosulfonamidu. Odzwierciedla to jego względnie mniejszą aktywność biologiczną. Drugi klaster (II) to mała grupa dwóch związków (**SLB-19** i **SLB-20**), posiadających strukturalnie niewielką modyfikację chemiczną w porównaniu do grupy pierwszej, ale charakteryzującą się natomiast mniejszą aktywnością biologiczną. Z kolei trzeci klaster (III) to grupa związków o najmniejszej aktywności biologicznej w porównaniu z pozostałymi pochodnymi benzenosulfonamidu. Pierwsza główna składowa, wyjaśniająca blisko 86% zmienności zawartej w wykorzystanej tabeli danych (Tabela 17), może być zatem uważana za miarę aktywności, a uzyskany wykres PCA przedstawia badane pochodne w kolejności (od lewej do prawej strony wykresu): od bardziej aktywnych do mniej aktywnych spośród badanych związków. Wyniki PCA wskazują również na istnienie zależności struktura chemiczna-aktywność cytotoksyczna. Próbę przedstawienia ilościowego tej zależności podjęto się w dalszym etapie badań.

W ramach pierwszego etapu badań (procedury 1) wykonano również analizę głównych składowych wykorzystując wartości deskryptorów molekularnych uzyskanych z trójwymiarowych modeli badanych cząsteczek. Nowoczesne oprogramowanie do obliczania wartości deskryptorów umożliwia obliczenie kilku tysięcy wartości opisujących strukturę chemiczną. Dlatego też zastosowano kilkietapowy algorytm ograniczenia ich ilości, usuwając deskryptory powielające informację oraz te, które zawierają informację nieróżnicującą badane związki. Ostatecznie, uzyskano po 20 deskryptorów dla każdej z dwóch badanych na

tym etapie zmiennych aktywności cytotoksycznej. Wartości deskryptorów przedstawiono w Tabeli 18, zastosowane deskryptory opisano natomiast w Tabeli 19.

Tabela 18. Wartości deskryptorów molekularnych dla badanych pochodnych benzenozulfonamidu.

Kod	Deskryptor molekularny													
	SLB-5	SLB-10	SLB-12	SLB-13	SLB-14	SLB-15	SLB-19	SLB-20	SLB-25	SLB-26	SLB-27	SLB-28	SLB-32	SLB-33
AT57s	5,991	6,072	6,085	6,100	6,118	6,136	6,131	6,155	6,189	6,210	6,213	6,590	6,256	6,266
AT58s	6,011	6,106	6,104	6,147	6,155	6,163	6,209	6,241	6,242	6,346	6,250	6,347	6,289	6,291
CATS2D_09_DA	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
E2e	0,431	0,537	0,530	0,557	0,492	0,441	0,496	0,444	0,422	0,418	0,413	0,473	0,389	0,403
Eig05_AEA(ed)	2,422	2,679	2,679	2,660	2,677	2,688	2,381	2,629	2,394	2,556	2,713	2,714	2,713	2,713
F08[C-O]	8	8	8	11	11	8	8	8	10	10	10	10	10	10
F10[C-S]	1	1	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2
GATS1i	1,047	0,895	0,922	0,973	0,866	0,860	0,972	0,969	1,002	1,000	1,000	1,001	1,014	1,032
GATS7p	0,997	1,017	1,158	1,065	1,021	1,096	1,070	1,055	1,039	0,987	1,064	1,138	0,952	1,056
H3s	11,633	13,834	14,677	13,341	16,265	13,186	14,270	15,684	12,561	15,375	14,147	15,520	14,523	14,330
H6m	0,205	0,565	0,181	0,337	0,140	0,243	0,246	0,410	0,322	0,283	0,307	0,275	0,355	0,315
HATS5s	1,129	0,882	0,851	0,901	0,778	0,732	1,040	0,943	1,354	1,665	1,262	1,194	1,284	1,238
JGI6	0,019	0,018	0,018	0,018	0,018	0,016	0,018	0,019	0,022	0,022	0,021	0,024	0,021	0,021
LOC	1,198	0,906	0,906	0,963	0,909	0,847	1,178	1,181	0,813	0,817	0,817	0,899	0,818	0,818

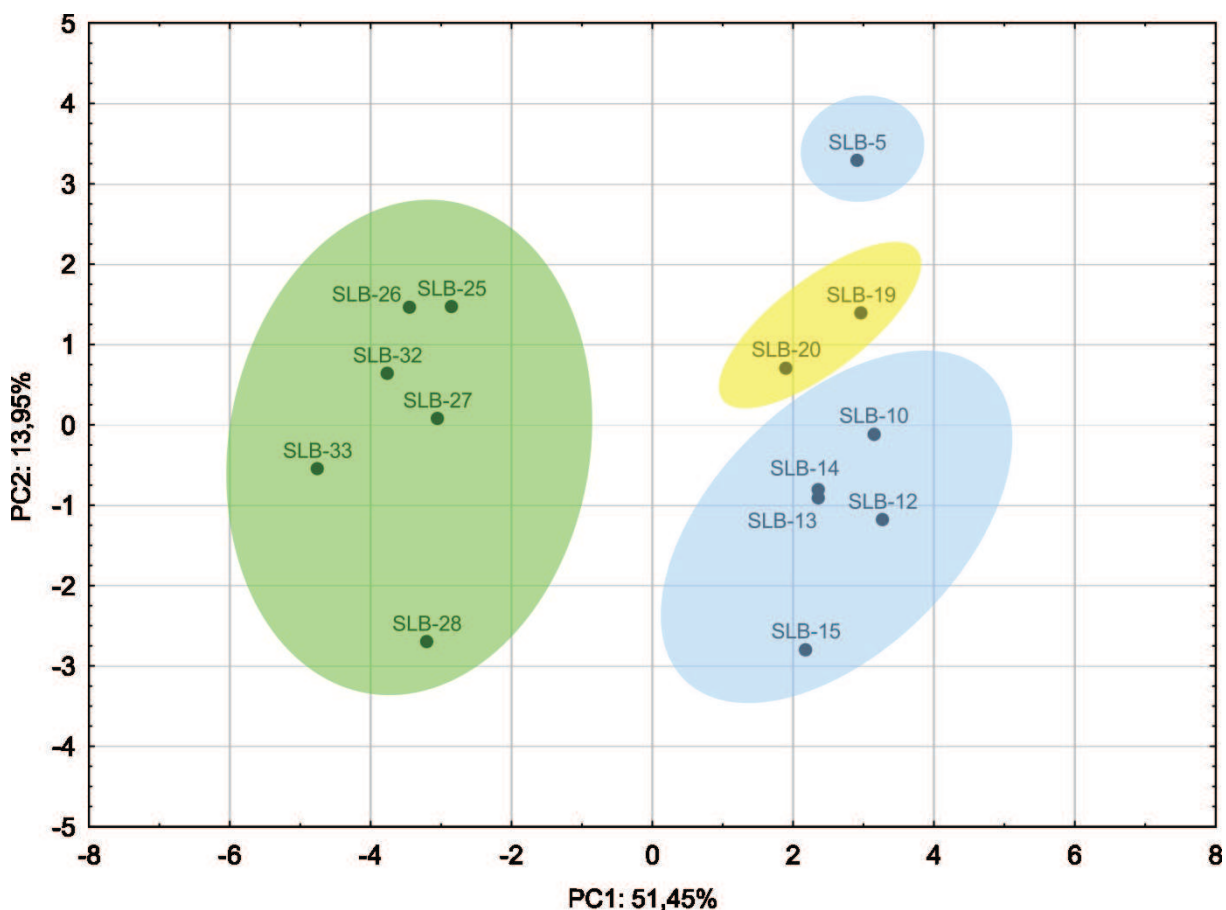
Kontynuacja Tabeli 18

Kod	Deskryptor molekularny													
	SpMin3_Bh(s)	SpMax2_Bh(m)	SpMax1_Bh(v)	SpMax_EA(dm)	SM1_Dz(v)	SHP2	RDF050m	RDF025s	nS	Mor27u	Mor10p	MAXDP	MATS2e	MATS1i
SLB-5	1,077	4,047	3,997	5,397	-1,245	0,311	21,246	187,466	2	-0,179	-0,363	4,998	0,285	0,195
SLB-10	1,068	4,085	4,003	5,136	-1,221	0,291	26,565	189,487	2	-0,177	-0,403	5,140	0,227	0,242
SLB-12	1,076	4,067	4,005	5,136	-1,245	0,293	21,270	194,967	2	-0,294	-0,424	5,157	0,272	0,225
SLB-13	1,069	4,066	4,003	5,136	-1,354	0,281	24,077	198,417	2	-0,172	-1,072	5,179	0,159	0,184
SLB-14	1,067	4,736	4,004	5,136	-1,295	0,294	20,157	197,700	2	-0,210	-0,246	5,171	0,201	0,267
SLB-15	1,077	4,101	4,059	5,136	-1,245	0,279	22,569	224,477	2	-0,201	-0,287	5,287	0,258	0,236
SLB-19	1,069	4,063	4,000	5,136	-1,333	0,265	20,796	161,067	2	-0,157	-0,897	5,545	0,280	0,107
SLB-20	1,068	4,084	4,001	5,136	-1,311	0,271	22,702	159,600	2	-0,455	-0,807	5,572	0,246	0,110
SLB-25	1,078	4,724	4,012	5,467	-1,070	0,267	36,704	239,469	3	-0,418	-0,490	5,614	0,306	0,116
SLB-26	1,076	4,724	4,013	5,467	-1,041	0,277	34,518	164,044	3	-0,333	-1,159	5,655	0,268	0,118
SLB-27	1,078	4,725	4,013	5,900	-1,041	0,267	29,472	228,448	3	-0,431	-0,772	5,682	0,268	0,118
SLB-28	1,139	4,724	4,018	5,467	-1,415	0,259	29,040	258,356	3	-0,362	-0,736	5,746	0,322	0,170
SLB-32	1,078	4,728	4,022	5,467	-1,011	0,270	28,106	229,888	3	-0,707	-0,913	5,971	0,252	0,114
SLB-33	1,140	4,728	4,023	5,900	-1,041	0,284	34,852	173,425	3	-0,671	-0,741	5,992	0,296	0,106

Tabela 19. Skrócone nazwy deskryptorów molekularnych zastosowanych w analizie PCA, wraz z anglojęzycznymi rozszerzeniami ich nazw. Kolejność alfabetyczna.

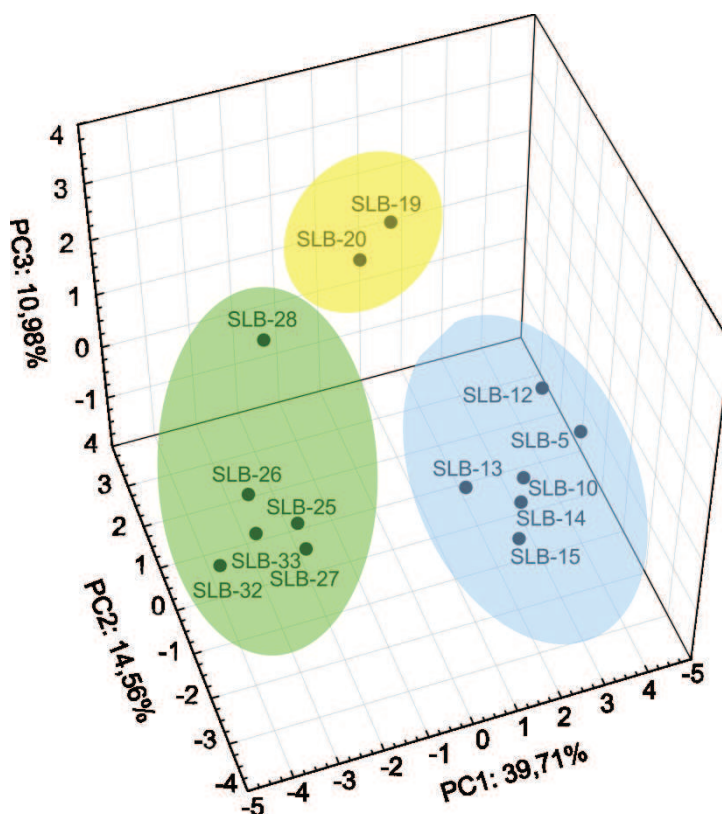
Nr	Deskryptor molekularny	Rozwinięcie skrótu nazwy deskryptora
1	ATS7s	<i>Broto-Moreau autocorrelation of lag 7 (log function) weighted by I-state</i>
2	ATS8s	<i>Broto-Moreau autocorrelation of lag 8 (log function) weighted by I-state</i>
3	CATS2D_09_DA	<i>CATS2D Donor-Acceptor at lag 09</i>
4	E2e	<i>2nd component accessibility directional WHIM index / weighted by Sanderson electronegativity</i>
5	Eig05_AEA(ed)	<i>eigenvalue n. 5 from augmented edge adjacency mat. weighted by edge degree</i>
6	F08[C-O]	<i>frequency of C - O at topological distance 8</i>
7	F10[C-S]	<i>frequency of C - S at topological distance 10</i>
8	GATS1i	<i>Geary autocorrelation of lag 1 weighted by ionization potential</i>
9	GATS7p	<i>Geary autocorrelation of lag 7 weighted by polarizability</i>
10	H3s	<i>H autocorrelation of lag 3 / weighted by I-state</i>
11	H6m	<i>H autocorrelation of lag 6 / weighted by mass</i>
12	HATS5s	<i>leverage-weighted autocorrelation of lag 5 / weighted by I-state</i>
13	JGI6	<i>mean topological charge index of order 6</i>
14	LOC	<i>lopping centric index</i>
15	MATS1i	<i>Moran autocorrelation of lag 1 weighted by ionization potential</i>
16	MATS2e	<i>Moran autocorrelation of lag 2 weighted by Sanderson electronegativity</i>
17	MAXDP	<i>maximal electrotopological positive variation</i>
18	Mor10p	<i>3D MoRSE signal 10 / weighted by polarizability</i>
19	Mor27u	<i>3D MoRSE signal 27 / unweighted</i>
20	nS	<i>number of Sulfur atoms</i>
21	RDF025s	<i>radial Distribution Function - 025 / weighted by I-state</i>
22	RDF050m	<i>radial Distribution Function - 050 / weighted by mass</i>
23	SHP2	<i>average shape profile index of order 2</i>
24	SM1_Dz(v)	<i>spectral moment of order 1 from Barysz matrix weighted by van der Waals volume</i>
25	SpMax_EA(dm)	<i>leading eigenvalue from edge adjacency mat. weighted by dipole moment</i>
26	SpMax1_Bh(v)	<i>largest eigenvalue n. 1 of Burden matrix weighted by van der Waals volume</i>
27	SpMax2_Bh(m)	<i>largest eigenvalue n. 2 of Burden matrix weighted by mass</i>
28	SpMin3_Bh(s)	<i>smallest eigenvalue n. 3 of Burden matrix weighted by I-state</i>

Macierz danych (14 związków x 20 deskryptorów) poddano analizie głównych składowych. Wyniki przedstawiono podobnie, jak w przypadku pierwszej, opisaną wcześniej, analizy PCA. Na Rycinie 10 przedstawiono rzut punktów reprezentujących 14 pochodnych benzenosulfonamidu na płaszczyznę wyznaczoną przez dwie pierwsze składowe, w przypadku analizy z użyciem linii komórkowej raka jajnika (OVCAR-8). Jak można zauważyć dwie pierwsze główne składowe wyjaśniają około 65% wariacji zmiennych. Wyodrębniono trzy podstawowe grupy – trzy klaster. Trzeci klaster (III) zawiera związki mniej aktywne biologicznie. Pierwszy (I) i drugi (II) klaster zawiera natomiast związki o większej aktywności. Związek **SLB-5** usytuowany jest poza klasterami, prawdopodobnie ze względu na brak podstawnika aromatycznego, charakterystycznego dla pozostałych pochodnych benzenosulfonamidu.



Rycina 10. Rzut przypadków na płaszczyznę dwóch pierwszych składowych. Analiza wykonana na podstawie wartości deskryptorów molekularnych wybranych dla linii komórkowej OVCAR-8.

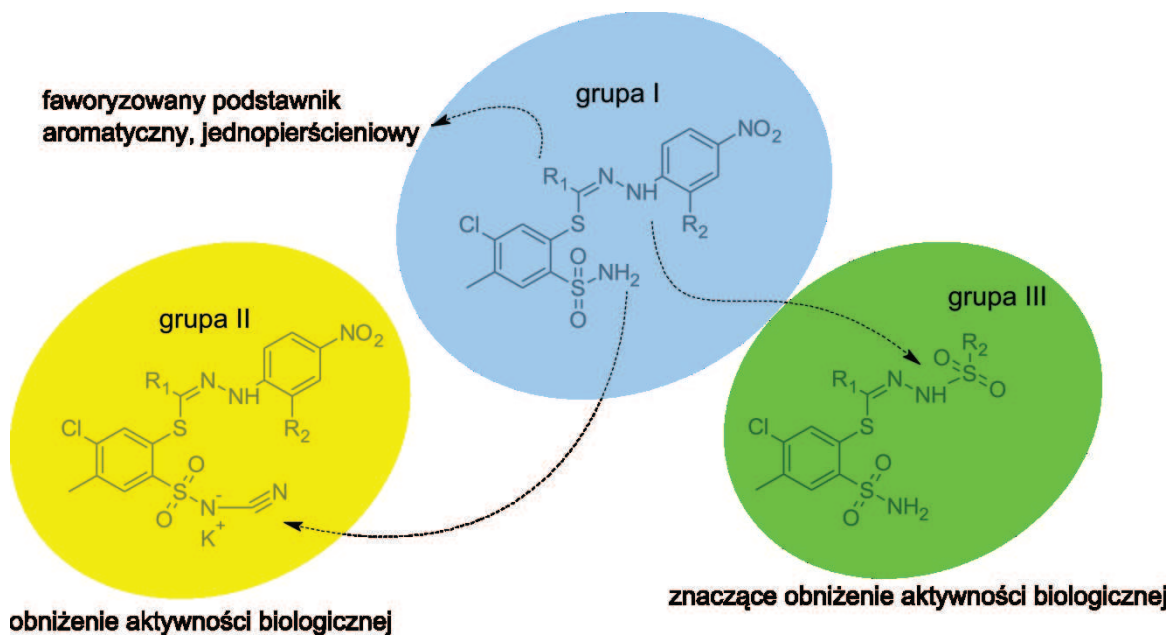
Podobną analizę wykonano używając deskryptorów molekularnych rozważanych dla linii komórkowej raka nerki (ACHN). W tym przypadku wyniki analizy zostały przedstawione w postaci wykresu przestrzennego, który przedstawia wzajemne położenie badanych pochodnych benzenosulfonamidu w przestrzeni trzech pierwszych głównych składowych. Wymienione wyżej składowe zawierają łącznie ok. 65% wariacji (Rycina 11). Uzyskano trzy klasterki oznaczone kolejno I, II i III, w sposób analogiczny, jak dla analizy PCA dla nowotworu jajnika. Także i w tym przypadku klaster pierwszy (I) i drugi (II) zawiera związki bardziej aktywne biologicznie, trzeci (III) zaś, te pochodne benzenosulfonamidu o mniejszej aktywności.



Rycina 11. Rzut przypadków na przestrzeń trzech pierwszych głównych składowych. Analiza wykonana na podstawie wartości deskryptorów molekularnych wybranych dla linii komórkowej ACHN.

Podsumowując, wyniki uzyskane za pomocą procedury badawczej nr 1, należy wskazać na wysoką użyteczność analizy głównych składowych podczas interpretacji uzyskanych danych aktywności. W badanej grupie 14 pochodnych benzenosulfonamidu można z całą pewnością wskazać, że ich aktywność biologiczna zależy w głównej mierze od przynależności do jednej w trzech głównych grup (klasterów), a mniejszy wpływ mają poszczególne podstawniki w pozycji R_1 (Tabela 6-8). Na podstawie wyników można wskazać, że grupa

związków pozbawiona modyfikacji w postaci podstawienia azotu grupy sulfonamidowej grupą cyjanową oraz modyfikacji polegającej na umieszczeniu sulfonowego atomu siarki pomiędzy atom azotu hydrazonu a podstawnik aromatyczny, wykazuje lepsze właściwości biologiczne, niż pochodne zawierające wymienione modyfikacje. Wnioski te przedstawiono schematycznie za pomocą Ryciny 12.



Rycina 12. Podsumowanie wyników procedury 1 w ujęciu chemicznym.

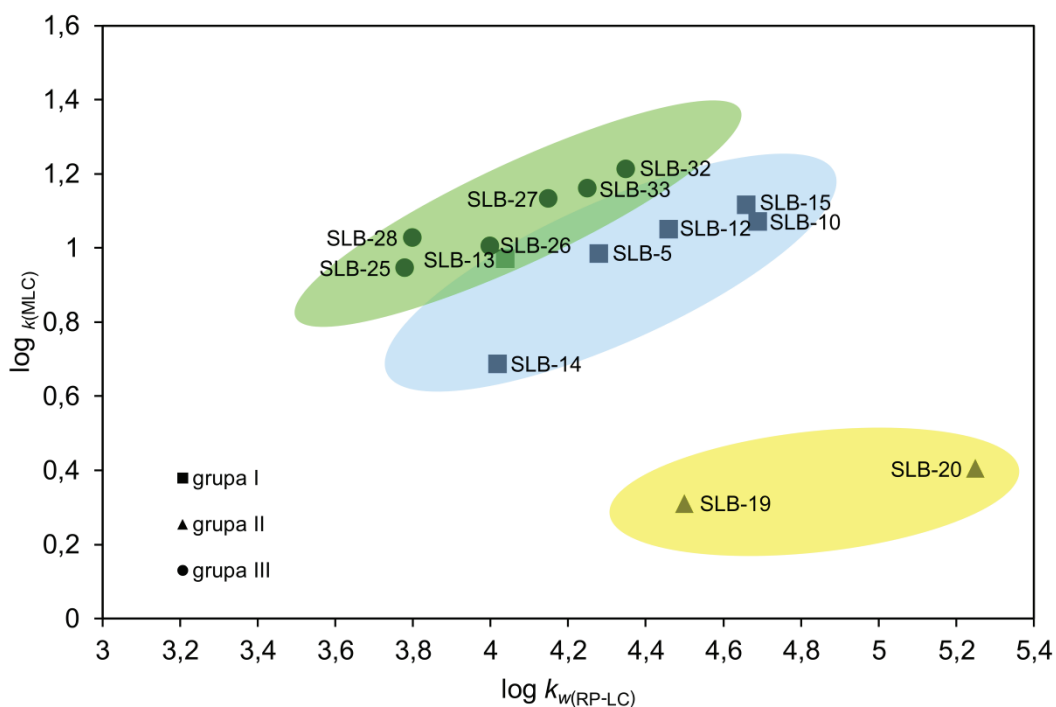
4.2 Analiza QSAR dla pochodnych benzenosulfonamidu (procedura 2)

4.2.1 Lipofilowość

Lipofilowość substancji leczniczych niejednokrotnie ma znaczący, często najistotniejszy wpływ na ich aktywność biologiczną. Dlatego też podjęto próbę wykorzystania dwóch eksperymentalnych parametrów lipofilowości wyznaczonych chromatograficznie podczas projektowania i optymalizacji modelu QSAR dla pochodnych benzenosulfonamidu.

Posłużono się dwoma technikami chromatograficznymi – chromatografią w odwróconym układzie faz (RP-LC) oraz micelarną chromatografią cieczą (MLC). Wyznaczono ekstrapolowany do sytuacji stuprocentowo wodnej fazy ruchomej współczynnik retencji w RP-LC, przedstawiony jako $\log k_{w(RP-LC)}$ oraz współczynnik retencji w MLC, przedstawiony jako $\log k_{(MLC)}$. Porównanie uzyskanych wyników przedstawiono na Rycinie 13. Można zauważyć, że oba parametry lipofilowości nie korelują ze sobą, gdy rozpatrywane są

wspólnie wszystkie badane pochodne benzenosulfonamidu. Współczynnik korelacji pomiędzy wartościami $\log k_{w(RP-LC)}$ i $\log k_{(MLC)}$ w grupie pierwszej związków wynosi natomiast 0,80, zaś w trzeciej 0,95. Zdecydowanie odbiegające od reszty pochodnych są dwa związki należące do drugiej grupy pochodnych benzenosulfonamidu (**SLB-19** i **SLB-20**). Charakteryzują się one zdecydowanie niższym współczynnikiem retencji wyznaczonym z użyciem techniki MLC. Prawdopodobną przyczyną tych niskich wartości jest zjonizowany charakter obu związków, co mogło mieć większy wpływ na retencję w technice MLC, niż RP-LC. Brak wysokiej korelacji pomiędzy dwoma zmierzonymi chromatograficznymi parametrami lipofilowości oznacza, że oba parametry wnoszą inną informację na temat badanych struktur i ich oddziaływania z zastosowanymi układami faz chromatograficznych. Dlatego też zdecydowano się zastosować oba zmierzone eksperymentalnie parametry jako zmienne niezależne (predyktory) podczas konstruowania równania QSAR.



Rycina 13. Porównanie otrzymanych eksperymentalnie wartości parametrów lipofilowości otrzymanych technikami micelarnej chromatografii cieczowej ($\log k_{(MLC)}$) oraz chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz ($\log k_{w(RP-LC)}$). Znacznikami oznaczono przynależność związku do jednej z trzech grup pochodnych benzenosulfonamidu: kwadrat – grupa I, trójkąt – grupa II, koło – grupa III.

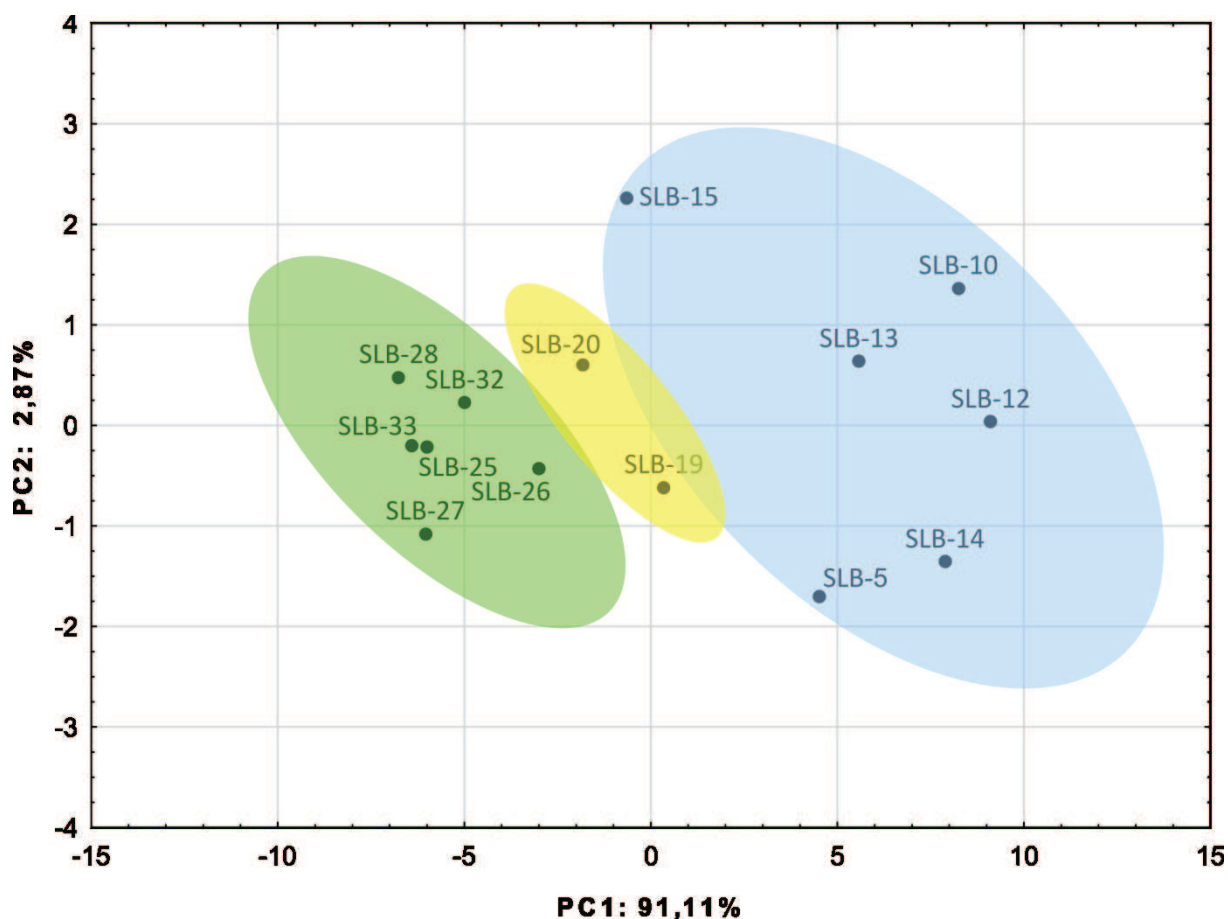
4.2.2 Analiza głównych składowych z wykorzystaniem danych aktywności biologicznej

W Tabeli 20 umieszczono dane aktywności wykorzystane w analizie głównych składowych. Wykorzystano 39 linii komórkowych (z panelu 60 linii, opisanego w rozdziale 3.5), ze względu na dostępność danych aktywności.

Tabela 20. Zestawienie danych aktywności dla pochodnych benzenosulfonamidu wykorzystanych w procedurze 2.

Linia komórkowa	Kod związku													
	SLB-5	SLB-10	SLB-12	SLB-13	SLB-14	SLB-15	SLB-19	SLB-20	SLB-25	SLB-26	SLB-27	SLB-28	SLB-32	SLB-33
HL-60(TB)	5,15	4,35	4,93	4,40	5,70	4,00	4,67	4,44	4,30	4,66	4,39	4,00	4,12	4,16
K-562	5,24	5,47	5,51	5,33	5,57	4,55	4,82	4,45	4,23	4,48	4,34	4,00	4,17	4,15
MOLT-4	5,34	5,39	5,60	5,30	5,53	4,13	5,35	4,71	4,46	4,52	5,09	4,00	4,32	4,75
A549/ATC	5,02	5,59	5,59	5,28	5,39	4,27	4,73	4,28	4,00	4,49	4,31	4,00	4,44	4,00
EKVX	4,78	5,21	5,50	5,48	5,17	4,75	4,77	4,70	4,00	4,32	4,00	4,00	4,00	4,15
HOP-62	4,87	5,50	5,63	5,23	5,30	4,64	4,77	4,38	4,00	4,20	4,00	4,00	4,00	4,00
NCI-H226	5,55	5,65	5,78	5,45	5,57	4,74	4,79	4,73	4,00	4,35	4,03	4,00	4,23	4,00
NCI-H23	5,43	5,65	5,79	5,33	5,62	4,79	4,81	4,11	4,06	4,69	4,36	4,00	4,57	4,00
NCI-H460	5,39	5,66	5,59	5,26	5,53	4,73	4,73	4,57	4,18	4,53	4,00	4,00	4,00	4,00
NCI-H522	4,73	5,49	5,31	4,88	5,22	4,64	4,84	4,66	4,64	4,05	4,00	4,00	4,14	4,00
COLO 205	5,19	5,10	5,53	5,07	5,38	4,08	4,35	4,82	4,01	4,34	4,07	4,00	4,00	4,00
KM12	5,48	5,71	5,86	5,49	5,71	4,60	4,78	4,61	4,00	4,38	4,15	4,00	4,00	4,00
SW-620	5,06	5,49	5,59	5,23	5,45	4,48	4,77	4,68	4,00	4,43	4,00	4,00	4,39	4,00
SF-268	5,14	5,64	5,72	5,18	5,66	5,00	4,72	4,59	4,00	4,47	4,00	4,00	4,00	4,00
SF-295	5,64	5,68	5,76	5,48	5,68	4,70	4,80	4,64	4,65	4,44	4,00	4,00	4,00	4,00
SF-539	4,79	5,71	5,96	5,43	5,47	5,39	4,42	4,86	4,00	4,71	4,00	4,00	4,54	4,00
U251	4,97	5,65	5,58	5,15	5,54	4,71	4,83	4,32	4,00	4,54	4,20	4,00	4,28	4,00
LOX IMVI	5,24	5,68	5,83	5,44	5,67	4,69	4,81	4,52	4,00	4,44	4,00	4,00	4,51	4,00
M14	5,30	5,39	5,75	5,24	5,58	4,36	4,74	4,26	4,06	4,04	4,00	4,00	4,00	4,00
MDA-MB-435	5,53	5,64	5,76	5,33	5,74	4,65	4,49	4,19	4,00	4,37	4,00	4,00	4,00	4,00
SK-MEL-28	4,86	6,24	5,52	5,18	5,58	4,46	4,76	4,51	4,00	4,08	4,00	4,00	4,00	4,00
SK-MEL-5	4,96	5,46	5,75	6,15	5,73	4,78	4,71	4,73	4,17	4,39	4,00	4,00	4,00	4,00
UACC-257	4,79	5,57	5,19	4,89	5,28	4,52	4,45	4,00	4,26	4,40	4,00	4,00	4,35	4,00
UACC-62	5,50	5,34	5,76	5,52	5,75	4,81	4,67	4,00	4,00	4,46	4,00	4,00	4,00	4,00
IGROV1	5,17	5,46	5,56	5,02	5,34	4,27	4,75	4,00	4,00	4,36	4,00	4,00	4,15	4,00
OVCAR-3	5,50	5,76	5,92	5,60	5,69	4,76	4,85	4,67	4,32	4,59	4,00	4,00	4,51	4,23
OVCAR-4	5,30	5,77	5,89	5,58	5,47	4,21	4,86	4,68	4,00	4,39	4,00	4,00	4,20	4,00
OVCAR-5	4,83	5,58	5,61	5,12	5,68	4,83	4,80	4,36	4,00	4,28	4,00	4,00	4,00	4,00
OVCAR-8	4,77	5,58	5,34	5,14	5,24	4,86	4,78	4,50	4,00	4,49	4,00	4,00	4,00	4,00
SK-OV-3	4,87	5,71	5,71	5,23	5,36	4,69	4,00	4,75	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
786-0	5,15	5,58	5,74	5,38	5,42	4,73	4,47	4,40	4,00	4,26	4,00	4,00	4,38	4,00
ACHN	5,27	5,53	5,63	5,20	5,51	4,77	4,74	4,47	4,00	4,52	4,41	4,00	4,59	4,06
CAKI-1	5,65	5,47	5,79	5,35	5,64	4,76	4,68	4,44	4,00	4,44	4,00	4,00	4,21	4,00
TK-10	5,53	5,75	5,79	5,61	5,70	5,13	4,80	4,60	4,00	4,28	4,00	4,00	4,00	4,00
UO-31	4,96	5,36	5,62	5,07	5,25	4,25	4,81	4,47	4,00	4,26	4,00	4,00	4,24	4,00
DU-145	4,84	5,66	5,76	5,42	5,28	4,88	4,93	4,75	4,00	4,27	4,00	4,00	4,00	4,30
MCF7	5,63	5,70	5,59	5,32	5,66	4,70	4,83	4,80	4,12	4,52	4,00	4,00	4,37	4,00
MDA-MB	5,56	5,53	6,10	5,52	5,75	4,87	4,79	4,77	4,00	4,54	4,00	4,56	4,47	4,00
BT-549	4,75	5,33	4,98	4,65	5,12	4,69	4,81	4,69	4,00	4,41	4,00	4,00	4,21	4,08

W przeciwieństwie do procedury 1, w procedurze 2, wykorzystano większą liczbę linii komórkowych i w związku z tym większą ilość danych aktywności. W ten sposób pierwsza główna składowa (PC1) w większym stopniu odzwierciedla aktywność badanych pochodnych benzenosulfonamidu. Analiza PCA wykonana z wykorzystaniem macierzy danych zawierającej 14 przypadków (pochodnych) i 39 zmiennych (danych aktywności) wykazała, że pierwsza główna składowa zawierała 91,10% wariancji tabeli danych (Tabela 20). Oznacza to, że PC1, że w znaczącym stopniu może zastąpić kilkadziesiąt zmiennych aktywności i może być wykorzystana jako zmienna do modelowania ogólnej aktywności w grupie pochodnych benzenosulfonamidu. Rzut przypadków na płaszczyznę dwóch pierwszych składowych przedstawiono na Rycinie 14. Widoczne jest rozmieszczenie związków wzdłuż osi poziomej (PC1) odzwierciedlające ich ogólną aktywność. Możliwe jest również wydzielenie trzech klastrów z trzema głównymi grupami pochodnych benzenosulfonamidu.



Rycina 14. Rzut przypadków na płaszczyznę dwóch pierwszych głównych składowych. Analiza wykonana na podstawie danych aktywności zmierzonej wobec 39 linii komórkowych. Zaznaczono przynależność pochodnych benzenosulfonamidu do trzech głównych grup chemicznych.

4.2.3 Analiza głównych składowych danych deskryptorów molekularnych

W Tabeli 21 zaprezentowano uzyskane wartości deskryptorów molekularnych obliczonych za pomocą oprogramowania HyperChem. W Tabelę 21 włączono również eksperymentalnie wyznaczone chromatograficzne parametry lipofilowości. Podobnie jak w poprzednich etapach badań wykonano analizę głównych składowych, aby wykazać, że proponowany zestaw deskryptorów umożliwia uzyskanie rozmieszczenia przypadków na płaszczyźnie kilku pierwszych składowych odzwierciedlającego aktywność związków. Macierz danych zawierała 14 przypadków i 18 zmiennych (Tabela 21). Uzyskane rozmieszczenie przypadków, zarówno w postaci rzutu na płaszczyznę dwóch pierwszych składowych, jak i rzutu na przestrzeń trzech głównych składowych przedstawiono na Rycinie 15. Zestaw deskryptorów zawierał typowe w analizie QSAR parametry, takie jak masa cząsteczkowa, powierzchnia i objętość cząsteczki, jej polaryzowalność, moment dipolowy i refrakcyjność. Dodatkowo wykorzystano obliczone właściwości związane z energią cząsteczki, tj. energię jąder atomowych cząsteczki, energię elektronów cząsteczki, energię całkowitą, a także energię orbitali HOMO i LUMO. W uzyskanym rzucie obiektów na płaszczyznę głównych składowych (Rycina 15) możliwe jest wyróżnienie trzech wymienionych wcześniej grup chemicznych pochodnych benzenosulfonamidów. Zachowane jest również rozmieszczenie związków bardziej aktywnych (grupa I) od mniej aktywnych (grupa III). Podobnie jak w przypadku analizy wyników wyznaczania lipofilowości, wyraźnie odrębne są dwa związki grupy II (**SLB-19** i **SLB-20**). Odrębność ta jest szczególnie widoczna w rzucie na przestrzeń trzech pierwszych głównych składowych (Rycina 15B).

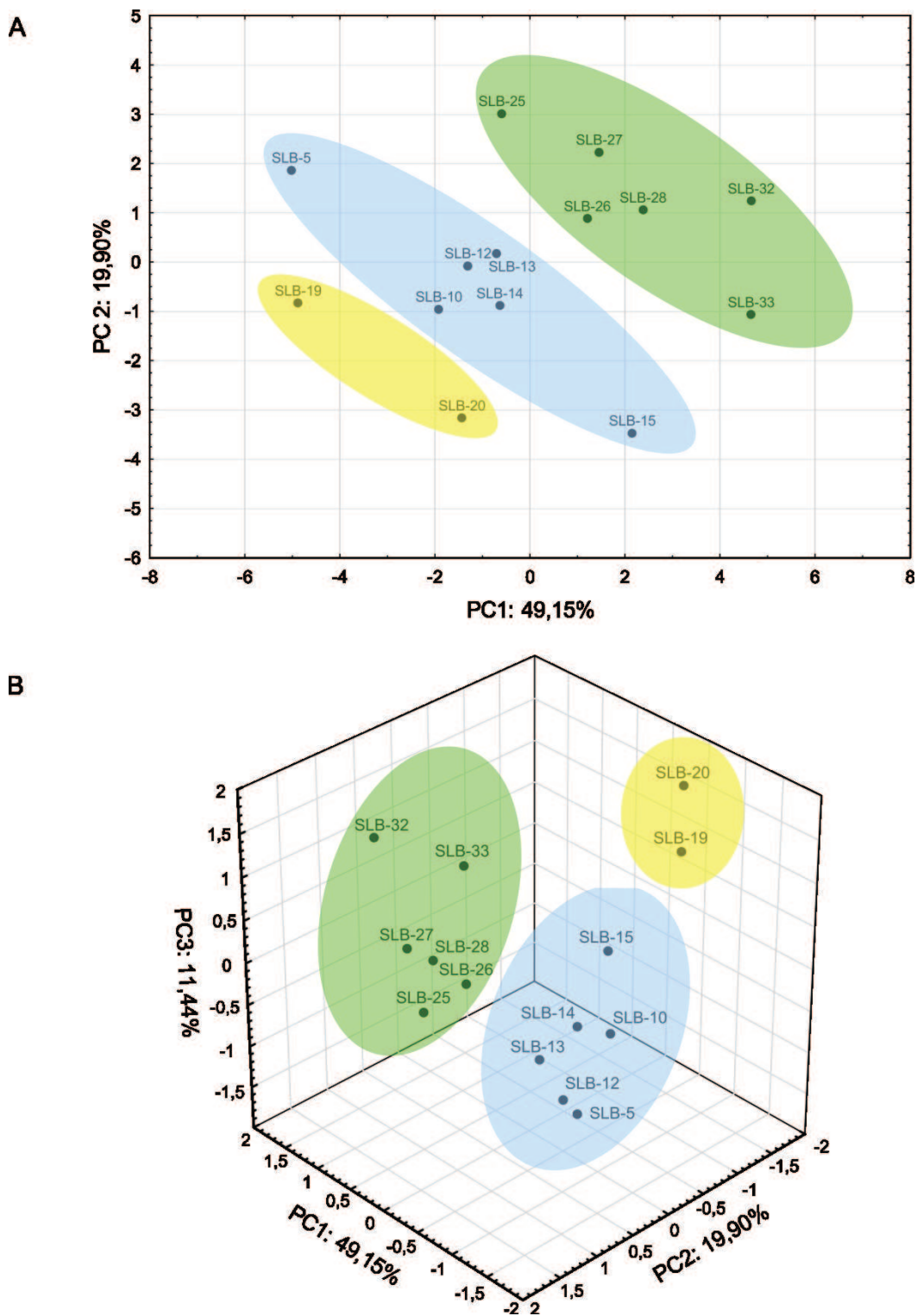
Tabela 21. Wartości deskryptorów molekularnych uzyskane za pomocą oprogramowania HyperChem oraz wyznaczone eksperymentalnie chromatograficzne parametry lipofilowości.

Kod związku	log $k_{w(RP-LC)}$	log $k_{(MLC)}$	VdWS	SAS	V	HE	log P	REF	POL
SLB-5	4,28	0,98	433,85	639,30	1115,75	-11,93	-3,69	124,53	42,65
SLB-10	4,69	1,07	451,50	697,05	1197,92	-14,75	-4,11	139,78	46,90
SLB-12	4,46	1,05	454,61	710,30	1214,01	-13,68	-3,74	139,34	46,80
SLB-13	4,04	0,97	466,31	704,44	1227,09	-16,14	-4,88	141,44	47,44
SLB-14	4,02	0,69	467,92	723,41	1235,34	-19,97	-4,86	144,20	48,23
SLB-15	4,66	1,12	483,01	756,99	1293,43	-15,81	-3,82	153,26	51,15
SLB-19	4,40	0,31	431,57	626,33	1124,05	-11,92	-3,69	124,53	42,65
SLB-20	4,73	0,41	476,34	726,61	1259,65	-15,94	-3,56	140,69	48,43
SLB-25	3,78	0,95	466,39	656,67	1181,49	-10,29	0,23	143,20	46,19
SLB-26	4,00	1,00	486,86	703,06	1248,46	-13,31	0,01	147,92	48,12
SLB-27	4,15	1,13	483,49	680,59	1216,44	-9,41	0,01	147,92	48,12
SLB-28	3,80	1,03	493,56	687,84	1241,80	-13,97	-4,07	147,98	47,94
SLB-32	4,35	1,21	515,43	706,95	1294,21	-8,40	-0,06	156,92	51,88
SLB-33	4,25	1,16	526,94	786,89	1373,75	-11,6	0,32	156,48	51,79

Kontynuacja Tabeli 21

Kod związku	DIP	TE	BE	HoF	EE	NE	E_HOMO	E_LUMO	Mw
SLB-5	7,759	-125950	-5025,28	-3,090704	-973027	847076,5	-8,759	-1,185	456,97
SLB-10	9,128	-138851	-5084,08	48,36412	-1065822	926971,6	-8,601	-1,148	511,40
SLB-12	2,978	-134145	-5386,86	43,79388	-1055057	920912,9	-9,025	-1,375	490,98
SLB-13	3,685	-141524	-5477,15	13,06159	-1129366	987841,4	-8,781	-1,376	506,98
SLB-14	10,14	-145779	-5181,25	8,503638	-1120554	972775,5	-8,972	-1,325	571,85
SLB-15	7,38	-142990	-5873,85	69,47157	-1154516	1011526	-8,373	-1,135	682,01
SLB-19	11,79	-137676	-5301,5	33,74717	-1072526	934850,3	-5,924	0,876	501,97
SLB-20	12,11	-145981	-5286,26	25,87295	-1128943	982961,8	-6,021	0,826	536,41
SLB-25	3,624	-138943	-5159,55	-21,60200	-1150996	1012053	-9,062	-1,187	530,47
SLB-26	2,972	-147180	-5076,74	38,09481	-1184573	1037393	-8,616	-1,184	564,91
SLB-27	4,519	-147247	-5143,58	-28,74040	-1221890	1074643	-9,118	-1,267	564,91
SLB-28	6,441	-153389	-5630,61	-14,43990	-1339774	1186385	-9,280	-1,576	555,05
SLB-32	4,433	-159141	-5405,06	-38,24320	-1360903	1201762	-9,109	-1,274	613,38
SLB-33	4,106	-154368	-5641,39	23,63719	-1271977	1117609	-8,561	-0,906	592,97

log $k_{w(RP-LC)}$ – chromatograficzny parameter lipofilowości wyznaczony techniką RP-LC, log $k_{(MLC)}$ – chromatograficzny parametr lipofilowości wyznaczony techniką MLC, VdWS – powierzchnia Van der Waals'a cząsteczki, SAS – powierzchnia dostępna dla rozpuszczalnika, V – objętość cząsteczki, HE – energia hydratacji, log P – logarytm współczynnika podziału n-oktanol/woda, REF – refrakcyjność, POL – polaryzowalność, DIP – moment dipolowy, TE – energia całkowita, BE – energia wiążąca, HoF – ciepło tworzenia; EE – energia elektronowa, NE – energia jądra, E_HOMO – energia orbitalu HOMO, E_LUMO – energia orbitalu LUMO, Mw – masa molowa.



Rycina 15. Rzut przypadków na płaszczyznę dwóch pierwszych składowych (A) i przestrzeń trzech pierwszych składowych (B). Analiza wykonana na wartościach deskryptorów molekularnych i eksperymentalnych parametrach lipofilowości. Zaznaczono przynależność pochodnych do trzech głównych grup chemicznych.

Interpretacja wykresów na Rycinie 15 opiera się na wartościach współrzędnych czynnikowych deskryptorów wnoszonych do poszczególnych głównych składowych. Dwa

wspomniane związki (**SLB-19** i **SLB-20**) charakteryzują się np. niższą wartością współrzędnej czynnikowej dla drugiej głównej składowej (Rycina 15A). Analizując Tabelę 22 zawierającą współrzędne czynnikowe zmiennych można zauważyć, że na drugą główną składową największy wpływ miały wartości ciepła tworzenia, energii orbitalu HOMO oraz $\log k_{w(RP-LC)}$, tak więc w dużej mierze odbiegające wartości tych deskryptorów mają wpływ na położenie obu pochodnych na wykresie (Rycina 15). Najwyższe wartości współrzędnych czynnikowych zmiennych dla PC2 otrzymano dla deskryptorów E_HOMO, E_LUMO oraz HE.

Tabela 22. Wartości współrzędnych czynnikowych zmiennych dla analizy PCA wykonanej z wykorzystaniem wartości deskryptorów cząsteczkowych i wyznaczonych eksperymentalnie chromatograficznych parametrów lipofilowości.

Deskryptor molekularny	Współrzędne czynnikowe zmiennych		
	PC1	PC2	PC3
$\log k_{w(RP-LC)}$	-0,23	-0,67	0,05
$\log k_{(MLC)}$	0,65	0,43	0,49
VdVS	0,96	-0,11	-0,16
SAS	0,67	-0,58	0,33
V	0,87	-0,42	0,06
HE	0,24	0,57	-0,50
$\log P$	0,55	0,41	-0,42
REF	0,97	-0,13	0,07
POL	0,91	-0,34	0,08
DIP	-0,56	-0,59	-0,30
TE	-0,86	0,17	0,37
BE	-0,53	0,49	-0,16
HoF	-0,27	-0,68	0,45
EE	-0,89	-0,06	0,36
NE	0,88	0,08	-0,36
E_HOMO	-0,50	-0,63	-0,56
E_LUMO	-0,46	-0,55	-0,66
Mw	0,77	-0,40	0,00

4.2.4 Model QSAR dla pochodnych benzenosulfonamidu

Wyniki dwóch uprzednio opisanych procedur upoważniły do próby uzyskania równania QSAR o pożądanej mocy predykcyjnej. Równanie to wyznaczono z pomocą oprogramowania Statistica (v. 10, Statsoft, Tulsa, OK, USA), ze szczególnym uwzględnieniem algorytmu regresji wielorakiej z krokowym doбором deskryptorów. Jako zmienną zależną wykorzystano wartości współrzędnej czynnikowej pochodnych benzenosulfonamidu dla pierwszej głównej składowej otrzymane w analizie PCA z wykorzystaniem danych aktywności (PC1_{NCI}),

natomiast potencjalnymi zmiennymi niezależnymi były proponowane deskryptory molekularne oraz chromatograficznie wyznaczone parametry lipofilowości.

Otrzymane równanie przedstawiono poniżej:

$$\text{PC1}_{\text{NCI}} = 27,85 \pm 11,78 - (1,29 \pm 0,52) \cdot \log P - (0,00003 \pm 0,00001) \cdot NE,$$

$$p < 3 \cdot 10^{-3}$$

$$p < 2 \cdot 10^{-2}$$

$$n = 14, R^2 = 0,72, R = 0,85, F = 14,62, p < 8 \cdot 10^{-4}, s = 0,036, \text{RMSECV} = 0,685$$

gdzie: $\log P$ – współczynnik podziału *n*-oktanol-woda szacowany przez oprogramowanie HyperChem; *NE* – energia jąder atomowych cząsteczki.

Uzyskane parametry pozwalają stwierdzić, że model ten jest istotny statystycznie oraz posiada moc predykcyjną. Algorytm krokowej regresji wielorakiej doprowadził do wprowadzenia do równania dwóch deskryptorów: obliczonej lipofilowości związku ($\log P$) oraz energii jąder atomowych cząsteczki (*NE*). Współczynniki regresji obu tych deskryptorów są mniejsze od zera, co oznacza, że im większą wartość przyjmuje deskryptor, tym mniejsza będzie ogólna aktywność danego związku (PC1_{NCI}). Znajduje to wyraźne potwierdzenie w Tabeli 21 w postaci niższych wartości obu deskryptorów dla pierwszej grupy pochodnych benzenosulfonanidu w porównaniu z trzecią grupą tych związków. W Tabeli 23 porównano wartości współrzędnej czynnikowej pochodnych dla PC1 otrzymane w procedurze PCA oraz otrzymane za pomocą modelu QSAR. Podsumowując, uzyskane równanie QSAR, może być wykorzystywane do zgrubnego szacowania aktywności w badanej grupie związków, na podstawie wartości wymienionych wyżej deskryptorów.

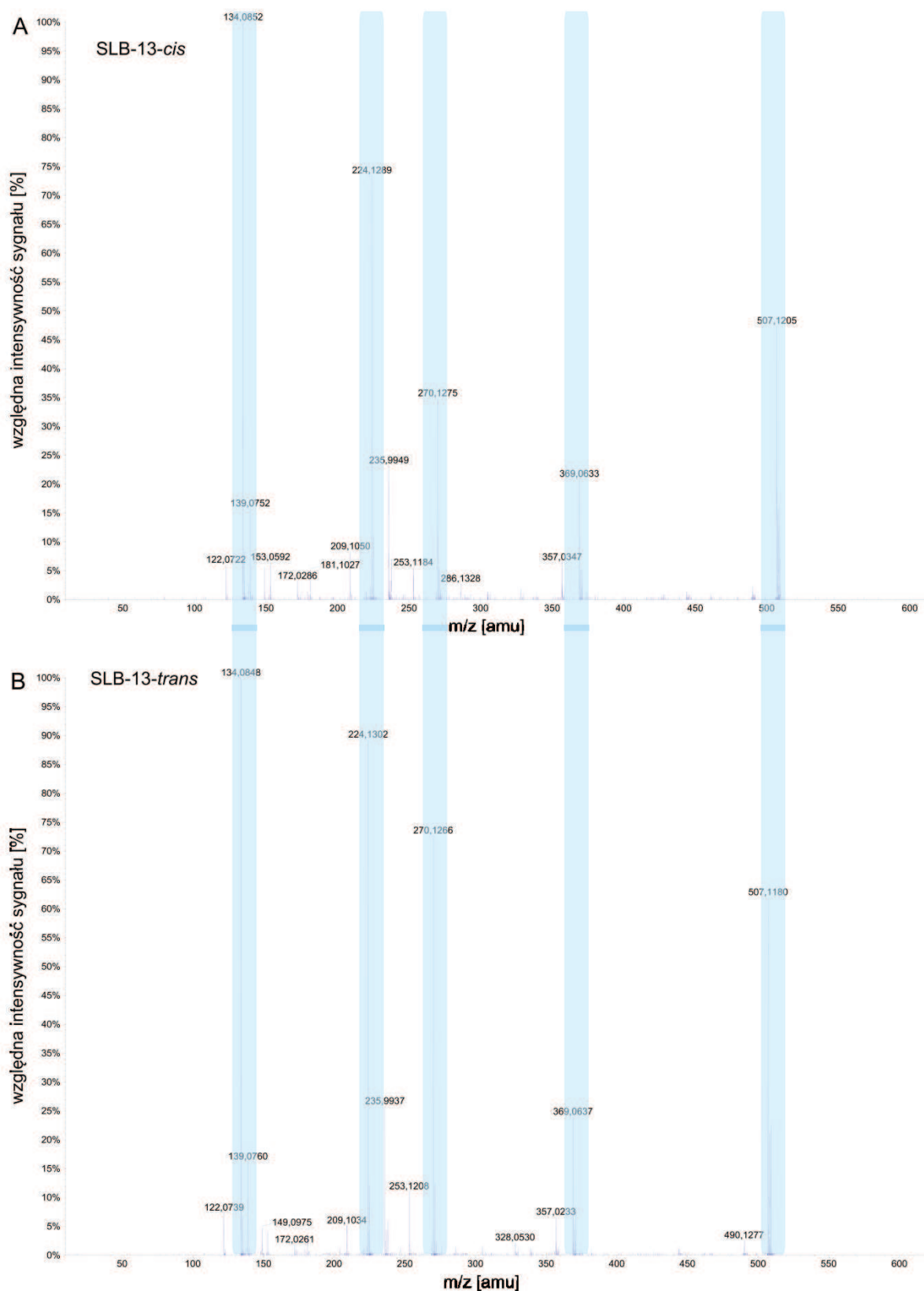
Tabela 23. Porównanie współczynnika czynnikowego pierwszej głównej składowej obliczonej w analizie PCA oraz przewidzianej proponowanym modelem QSAR

Kod związku	PC1 _{NCI} uzyskane w analizie PCA	PC1 _{NCI} przewidziane modelem QSAR
SLB-5	0,75961	1,11056
SLB-10	1,37885	0,79035
SLB-12	1,52971	0,74124
SLB-13	0,93681	0,64407
SLB-14	1,32409	0,71730
SLB-15	-0,10849	0,29204
SLB-19	0,05713	0,65862
SLB-20	-0,30493	0,38268
SLB-25	-1,00838	-0,58975
SLB-26	-0,50359	-0,67247
SLB-27	-1,01294	-0,86426
SLB-28	-1,13493	-0,55402
SLB-32	-0,83666	-1,50359
SLB-33	-1,07628	-1,15278

4.3 Wspomaganie procesu identyfikacji izomerów geometrycznych pochodnych benzenosulfonamidu – model QSRR (procedura 3)

Zaproponowanie i wykonanie trzeciej części badań (procedury 3) podyktowanej było wstępnymi wynikami uzyskanymi z doświadczeń nad stabilnością metaboliczną w grupie pochodnych benzenosulfonamidu. Mianowicie, na chromatogramach uzyskanych w wyniku dozowania mieszanin poinkubacyjnych oprócz pików macierzystego związku obserwowano dodatkowe pikiny o mniejszej intensywności, ale takim samym widmie mas.

Przykładowa para widm fragmentacyjnych uzyskanych techniką LC-Q-TOF-MS dla związku oznaczonego kodem **SLB-13** przedstawiono na Rycinie 16. Próba wyjaśnienia tego zjawiska powinna poprzedzić rozważania dotyczące biotransformacji, ponieważ opisane powyżej zjawisko jest przykładem niestabilności chemicznej związków, tzn. występowanie tych pików było niezależne od dodatku mikrosomów i NADPH do mieszaniny inkubacyjnej.



Rycina 16. Porównanie widm fragmentacyjnych pary izomerów związku SLB-13. A: związek główny (postulowany izomer *trans*); B: związek dodatkowy (postulowany izomer *cis*). Kolorem oznaczono odpowiadające sobie jony na obu widmach.

Podstawową przesłanką będącą potwierdzeniem występowania izomeryzacji geometrycznej badanych pochodnych w roztworach wodnych jest identyczne widmo fragmentacyjne Q-TOF-MS/MS obu izomerów (Rycina 16). Tożsamość widm fragmentacyjnych potwierdza tę samą konstytucję atomów, natomiast na tej podstawie nie jest możliwe określenie jej geometrii. Dostępne widma wykonane techniką NMR nie potwierdzają istnienia dwóch izomerów, ani nie dają jednoznacznej odpowiedzi, co do geometrii cząsteczki. W tej sytuacji, dodatkowym narzędziem potwierdzającym występowanie izomeryzacji może być model QSRR, opisujący ilościowo zależność pomiędzy strukturą benzenosulfonamidów, w tym geometrią ich cząsteczki, a ich zachowaniem w procesie chromatograficznym.

Tabela 24 przedstawia wartości uzyskanych czasów retencji oraz współczynników równania Soczewińskiego-Snydera ($\log k = \log k_w + S\varphi$ [k – współczynnik retencji, S – współczynnik kierunkowy krzywej (charakterystyczny dla substancji), φ – ułamek objętościowy rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej, k_w – współczynnik retencji ekstrapolowany do 100% wodnej fazy ruchomej]) dla wszystkich izomerów będących obiektem badań. Dla czternastu z piętnastu badanych związków wykryto dodatkowy pik o zdecydowanie niższej intensywności w stosunku do pików związku macierzystego. Dla związku oznaczonego kodem **SLB-4** nie wykazano występowania dodatkowego pików. Opierając się na danych literaturowych założono, że izomerem dominującym jest izomer *trans*, natomiast izomer reprezentowany przez pik o mniejszej intensywności to izomer *cis* [99–101]. We wszystkich opisanych w Tabeli 24 przypadkach pary izomerów różniły się znacząco, porównując czas retencji. W każdym z przypadków potwierdzono również tę samą masę cząsteczkową (wyrażoną jako stosunek m/z) obu izomerów na chromatogramie.

Tabela 24. Podsumowanie uzyskanych eksperymentalnie wartości czasów retencji chromatograficznej oraz wyznaczonych parametrów równania Soczewińskiego-Snydera.

Kod związku oraz postulowana identyfikacja izomeru geometrycznego	Czas retencji w elucji gradientowej 30-minutowej [min]	Czas retencji w elucji gradientowej 60-minutowej [min]	S	log k_w
SLB-1- <i>trans</i>	27,97	45,94	4,64	3,60
SLB-1- <i>cis</i>	26,03	42,34	5,00	3,52
SLB-2- <i>trans</i>	29,45	48,28	4,04	3,39
SLB-2- <i>cis</i>	27,54	44,88	4,43	3,40
SLB-3- <i>trans</i>	29,35	48,37	4,30	3,56
SLB-3- <i>cis</i>	27,00	43,98	4,62	3,44
SLB-4- <i>trans</i> ^a	29,37	48,51	4,41	3,64
SLB-5- <i>trans</i>	30,36	50,32	4,22	3,64
SLB-5- <i>cis</i>	28,50	46,83	4,47	3,56
SLB-6- <i>trans</i>	30,52	50,56	4,16	3,62
SLB-6- <i>cis</i>	28,06	45,89	4,40	3,45
SLB-7- <i>trans</i>	31,83	53,19	4,17	3,80
SLB-7- <i>cis</i>	29,97	49,67	4,37	3,69
SLB-8- <i>trans</i>	30,32	50,30	4,28	3,68
SLB-8- <i>cis</i>	29,10	47,99	4,41	3,60
SLB-9- <i>trans</i>	29,80	49,14	4,18	3,54
SLB-9- <i>cis</i>	27,75	45,36	4,49	3,46
SLB-10- <i>trans</i>	31,60	52,64	4,08	3,70
SLB-10- <i>cis</i>	28,95	47,73	4,46	3,62
SLB-11- <i>trans</i>	29,18	48,14	4,41	3,61
SLB-11- <i>cis</i>	27,52	45,08	4,70	3,57
SLB-12- <i>trans</i>	31,11	51,63	4,05	3,62
SLB-12- <i>cis</i>	28,80	47,32	4,35	3,52
SLB-13- <i>trans</i>	29,41	48,44	4,25	3,54
SLB-13- <i>cis</i>	27,91	45,69	4,51	3,50
SLB-14- <i>trans</i>	26,77	43,63	4,76	3,49
SLB-14- <i>cis</i>	25,34	40,95	4,99	3,41
SLB-15- <i>trans</i>	32,03	53,49	4,07	3,75
SLB-15- <i>cis</i>	29,67	49,09	4,37	3,66

^a dla związku **SLB-4** nie zaobserwowano powstawania drugiego izomeru

W procesie tworzenia modeli QSRR kluczowym elementem był odpowiedni dobór deskryptorów cząsteczkowych. Na tym etapie badań użyto oprogramowania Dragon jako źródła deskryptorów. Oprogramowanie to ma możliwość wyznaczenia ponad czterech tysięcy deskryptorów, lecz w rozpatrywanym przypadku większość wyliczonych deskryptorów nie różnicowała pary izomerów *cis* i *trans*, ponieważ ich wartości zależały od struktury dwuwymiarowej związku (sposobu połączenia atomów na płaszczyźnie), a nie od jej kształtu w przestrzeni trójwymiarowej. Dlatego też wyselekcjonowano wyłącznie te

deskrytory i ich grupy, które różnicują izomery w parach *cis/trans*: deskrytory geometryczne (ang. *geometrical descriptors*), deskrytory oparte na macierzy 3D (ang. *3D matrix-based descriptors*), autokorelacje 3D (ang. *3D autocorrelations*), deskrytory radialnej funkcji dystrybucji (ang. *RDF descriptors*), deskrytory 3D-MoRSE (ang. *3D-Molecule Representation of Structures based on Electron diffraction*), deskrytory WHIM (ang. *Weighted Holistic Invariant Molecular descriptors*), deskrytory GETAWAY (ang. *GEometry, Topology, and Atom-Weights Assembly*), deskrytory CATS 2D (ang. *Chemically Advanced Template Search*), pary atomów 3D (ang. *3D atom pairs*). W ten sposób ograniczono całkowitą liczbę deskrytorów do 1121.

Analiza regresji wielorakiej z algorytmem krokowym postępującym pozwoliła uzyskać następujące równanie:

$$\log k_w = 2,66 + 0,41 \cdot H6e + 17,69 \cdot R7e^+ + 0,10 \cdot CATS2D_07_DL + 0,01 \cdot G(S..Cl)$$

$$p < 1 \cdot 10^{-9} \quad p < 2 \cdot 10^{-5} \quad p < 4 \cdot 10^{-9} \quad p < 4 \cdot 10^{-4}$$

$$n = 24, R^2 = 0,90, R = 0,81, F = 52,43, p < 1 \cdot 10^{-4}, s = 0,036, Q^2 = 0,895$$

gdzie: *H6e* – *H autocorrelation of lag 6 / weighted by Sanderson electronegativity* (deskrytor z grupy *GETAWAY descriptors*),

R7e⁺ – *R maximal autocorrelation of lag 7 / weighted by Sanderson electronegativity* (deskrytor z grupy *GETAWAY descriptors*),

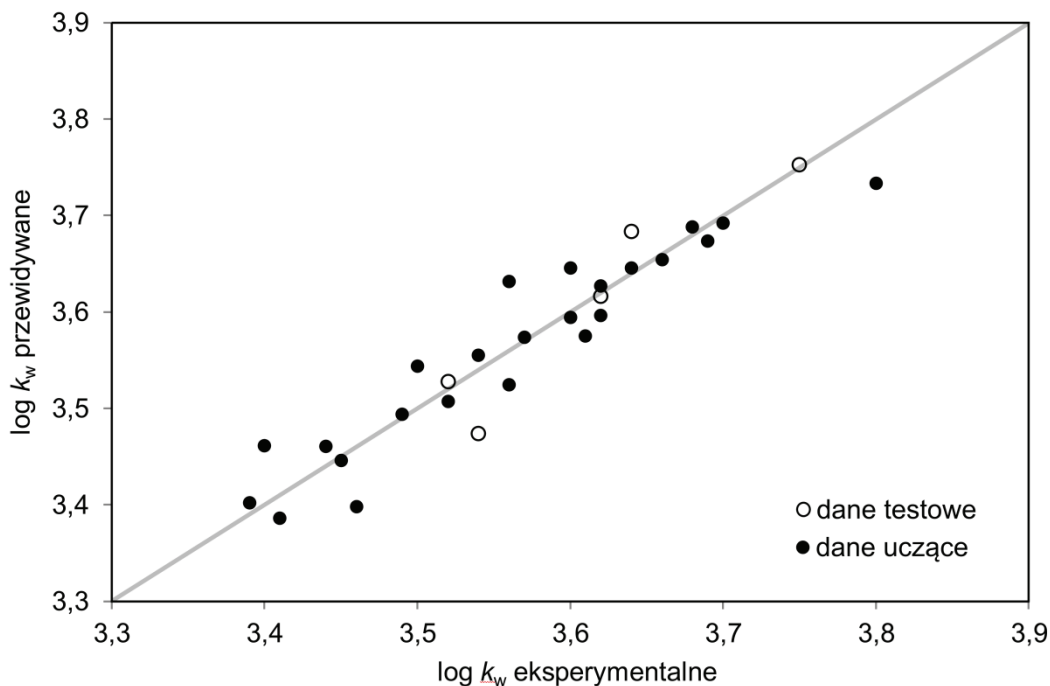
CATS2D_07_DL – *CATS2D Donor-Lipophilic at lag 07* (deskrytor z grupy *CATS2D descriptors*),

G(S..Cl) – *sum of geometrical distances between S..Cl*, (deskrytor z grupy *3D atom pairs*).

Uzyskane równanie jest statystycznie istotne, wyjaśnia 90% zmienności współczynnika retencji $\log k_w$ oraz charakteryzuje się niskim standardowym błędem estymacji. Zależność pomiędzy eksperymentalnymi a przewidzianymi współczynnikami retencji $\log k_w$ zobrazowano również graficznie na Rycinie 17.

Deskryptory GETAWAY ($H6e$, $R7e^+$) zostały zaproponowane przez Consonni'ego i współpracowników w 2002 roku. Są one liczbowym odwzorowaniem geometrii cząsteczki. Obliczone wartości mogą być matematycznie ważone, poprzez uwzględnienie różnorodnych właściwości atomów, takich jak masa atomowa, objętość van der Waalsa czy elektroujemność. W wymienionym powyżej modelu oba zastosowane deskryptory GETAWAY są ważone poprzez elektroujemność. Z dużym prawdopodobieństwem ważenie przez elektroujemność odzwierciedla wpływ polarności i momentu dipolowego na retencję badanych związków. Wpływ tych dwóch deskryptorów jest bardzo istotny dla chromatograficznego odróżnienia dwóch izomerów.

Deskryptor CATS2D opisujący odległość topologiczną występującą pomiędzy centrum lipofilowym a donorami wiązania wodorowego także wpływa na retencję, co wydaje się w pełni racjonalne z punktu widzenia mechanizmu retencji chromatograficznej w układzie faz odwróconych. Nieoczekiwanie istotny okazał się również deskryptor $G(S..Cl)$, obliczony jako suma odległości pomiędzy atomami siarki i chloru. Sugeruje to, że wymieniona para atomów jest za szczególny rodzaj oddziaływania retencyjnego, wpływając na rozdzielenie pary izomerów geometrycznych *cis/trans*. Na uwagę zasługuje również fakt, że dla związku o kodzie **SLB-10**, który w swojej strukturze posiada dodatkowy atom chloru, odnotowano największą różnicę pomiędzy czasami retencji dla pary izomerów geometrycznych *cis* i *trans* (Tabela 24).

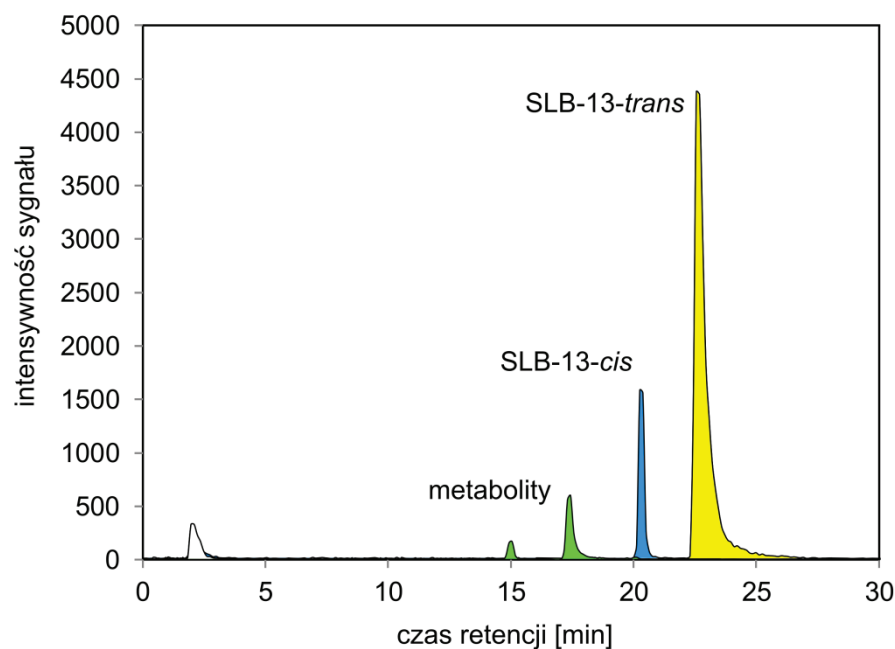


Rycina 17. Korelacja pomiędzy eksperymentalnymi a przewidywanymi wartościami logarytmu współczynnika retencji $\log k_w$. Szary odcinek reprezentuje prostą $\log k_w$ eksperymentalne = $\log k_w$ przewidywane.

Opracowany model QSRR, jak i przytoczona interpretacja potwierdzają hipotezę o identyfikacji dodatkowego pików jako izomeru geometrycznego. Pełna identyfikacja wymagałaby syntezy obu izomerów i ich porównania, np. pod względem, zachowania w zastosowanym układzie chromatograficznym.

4.4 Biotransformacja *in vitro* pochodnych benzenosulfonamidu

Dla 15 badanych pochodnych benzenosulfonamidu opracowano metodę oceny stabilności metabolicznej z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Chromatograficzne fazy ruchoma i stacjonarna zostały dobrane w taki sposób, aby zapewnić retencję wszystkich 15 związków oraz ich rozdzielenie z produktami biotransformacji (Rycina 18).



Rycina 18. Przykładowy chromatogram mieszaniny poinkubacyjnej dla biotransformacji związku SLB-13. Zaznaczono izomery związku macierzystego wraz z postulowaną identyfikacją oraz piki produktów biotransformacji M1, przy czym dla metabolitu M1 nie ustalono struktury geometrycznej.

W sytuacji, w której jedynym zachodzącym procesem prowadzącym do zmiany struktury badanego związku jest biotransformacja katalizowana przez enzymy zawarte w mikrosomach, możliwe jest wyznaczenie biologicznego czasu półtrwania *in vitro*. W sytuacji występowania postulowanej izomeryzacji jest to niestety trudne do realizacji, ponieważ oba procesy zachodzą równocześnie. Ilościowy pomiar procesu biotransformacji jest także utrudniony. Dlatego też, w tej grupie związków określono procent zmniejszenia powierzchni piku głównego izomeru po 2 godz inkubacji obliczony według następującego wzoru:

$$\% \text{ niezmiennego związku po 120 min} = \frac{\text{pole powierzchni piku dominującego izomeru w czasie 120 min}}{\text{pole powierzchni piku dominującego izomeru w czasie 0 min}}$$

Obliczono również procent piku dominującego izomeru w stosunku do piku drugiego izomeru według następującego wzoru:

$$\% \text{ izomeryzacji w czasie 0 min} = \frac{\text{pole powierzchni piku pobocznego izomeru w czasie 0 min}}{\text{pole powierzchni piku dominującego izomeru w czasie 0 min}}$$

Wyniki te zestawiono w Tabeli 25.

Tabela 25. Zestawienie wyników badania stabilności metabolicznej pochodnych benzenosulfonamidu.

KOD	% niezmienionego związku w czasie 120 min	% izomeryzacji w czasie 0 min
SLB-1	53,51	5,84
SLB-2	75,13	6,52
SLB-3	76,13	7,76
SLB-4	62,86	0,00 ^a
SLB-5	79,95	5,84
SLB-6	83,88	3,50
SLB-7	60,90	5,53
SLB-8	58,23	5,25
SLB-9	96,03	9,28
SLB-10	90,80	7,79
SLB-11	98,97	1,50
SLB-12	95,11	5,41
SLB-13	95,33	2,66
SLB-14	74,88	0,00 ^b
SLB-15	99,40	4,93

^a – związek **SLB-4** nie wykazywał izomeryzacji *cis/trans*

^b – związek **SLB-14** nie wykazywał izomeryzacji w czasie 0 min

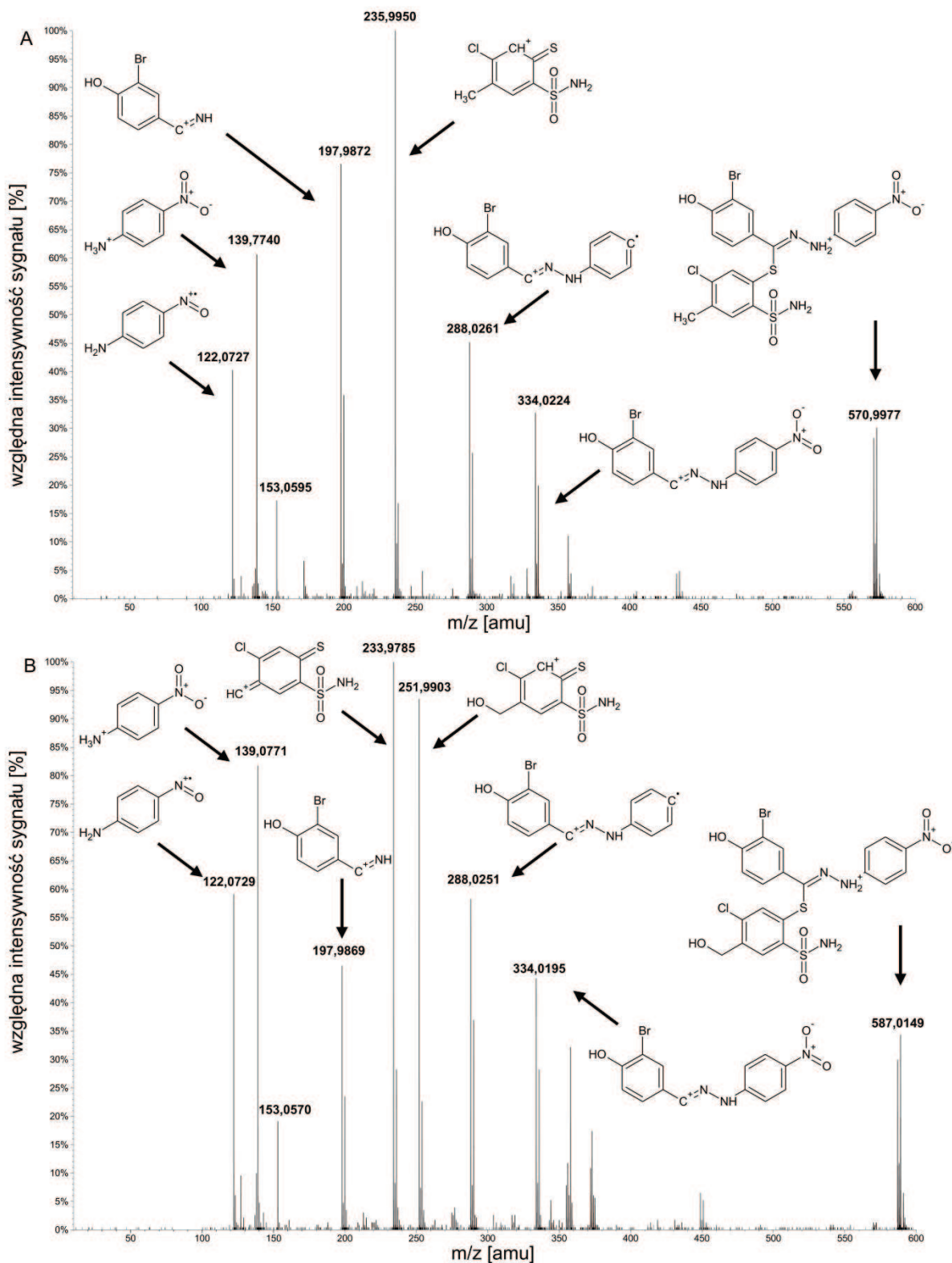
Podsumowując wyniki zawarte w Tabeli 25 należy zauważyć, że dla związku oznaczonego kodem **SLB-4** nie było możliwe zaobserwowanie izomeryzacji *cis/trans*. Dla pozostałych związków udział pobocznego izomeru (prawdopodobnie formy *cis*-) wynosił od 1,5 do 9,28% w momencie rozpoczęcia inkubacji. Analizując procentowe zmniejszenie pików badanych związków można zaobserwować, że większość badanych pochodnych charakteryzowała się dużą stabilnością, z niewielkim udziałem pików produktów biotransformacji potencjalnych metabolitów. Największą stabilnością odznaczały się pochodne z podstawnikiem aromatycznym, tzn. **SLB-15** (99,4%) oraz **SLB-9** (96,03%) do **SLB-13** (95,33%), a nieco mniejszą stabilność miały pochodne z podstawnikami alifatycznym, jak **SLB-1** (53,51%), **SLB-2** (75,13%), **SLB-3** (76,13%), **SLB-4** (62,86%), **SLB-5** (79,95%). W wyniku zaproponowanych reakcji enzymatycznych powstawały jedynie niewielkie ilości potencjalnych metabolitów, a pomiar ich mas cząsteczkowych wykonany techniką LC-Q-TOF-MS wskazywał, że są to produkty hydroksylacji związku macierzystego. Szczególnie wyróżniał się związek **SLB-14**, który pomimo podstawnika aromatycznego cechował się względnie niższą stabilnością (74,88%). Dodatkowo, intensywność pików produktów biotransformacji,

umożliwiła ich identyfikację za pomocą analizy fragmentacyjnych widm mas, co przedyskutowano w następnym podrozdziale.

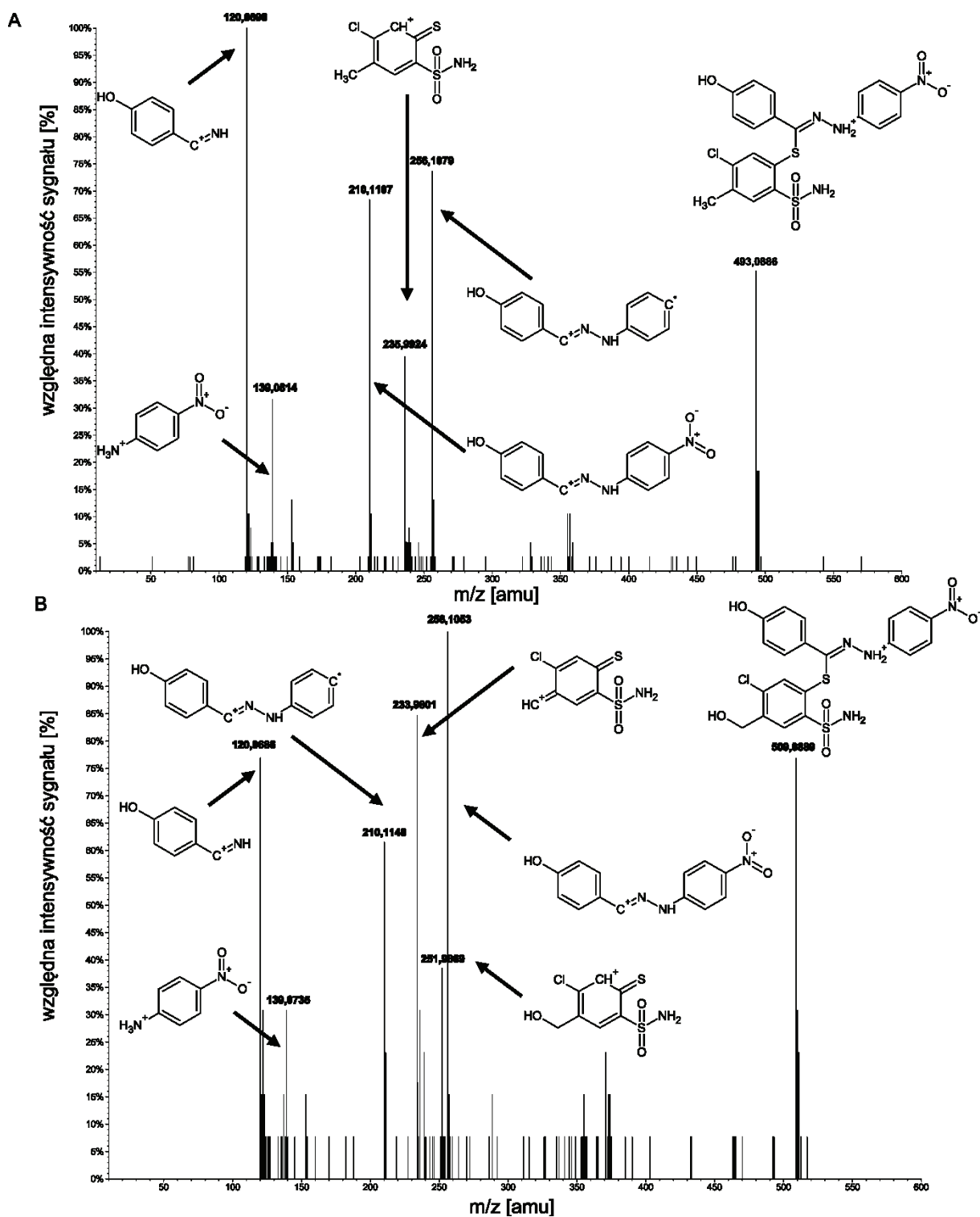
4.5 Badanie produktów biotransformacji pochodnej benzotiohydrazonianu o kodzie SLB-14 z zastosowaniem spektrometrii mas

Identyfikację produktów biotransformacji (potencjalnych metabolitów), wykonano poprzez porównanie ścieżek fragmentacji produktów i związku macierzystego. Wykorzystano widma mas wykonane techniką Q-TOF-MS zaprezentowane na Rycinach 19 i 20. Tabela 26 zawiera charakterystykę jonów fragmentacyjnych występujących w widmach **SLB-14** i jego głównych metabolitów, oznaczonych jako M1, M2 i M3.

Jony F3 i F4 w większości widm występowały jako jony główne, o największej intensywności. Rycina 21 przedstawiająca proponowaną ścieżkę fragmentacji związku **SLB-14** ułatwia prześledzenie sposobu identyfikacji poszczególnych metabolitów. Jony F4 i F5 powstają poprzez rozerwanie wiązania S-C w ugrupowaniu tiohydrazonu, jednak powstawanie jonu F4 nie jest typową reakcją fragmentacji. Jego powstawanie można wytłumaczyć tworzeniem stabilnej, obojętnej cząsteczki 3-bromo-4-hydroksybenzenonitrylu (nie widocznego na widmie). Jony F1 i F3 powstają poprzez rozerwanie wiązania N-N. Jon F6 powstaje z jonu F5 po utracie rodnika NO₂. Uwolnienie rodnika OH może natomiast tłumaczyć przekształcenie jonu F2 w F1. Opisany wzór fragmentacji jest charakterystyczny dla wszystkich badanych pochodnych benzenosulfonamidu. Opisane poniżej postulowane struktury produktów biotransformacji odnoszą się do przedstawionego ogólnego schematu fragmentacji.

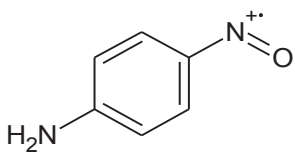
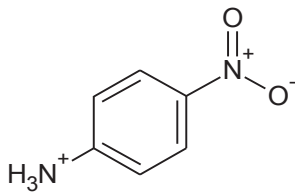
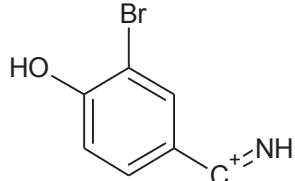
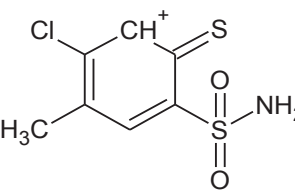
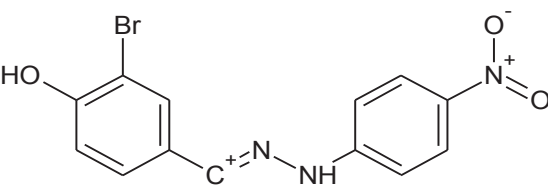
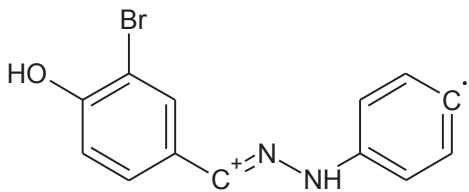
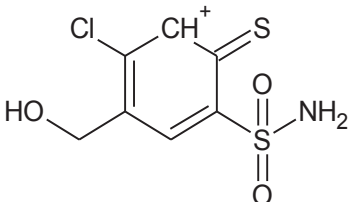


Rycina 19. Widma fragmentacyjne wykonane techniką LC-Q-TOF-MS. A: SLB-14, B: produkt biotransformacji M1. Naniesiono proponowane struktury chemiczne powstających jonów.

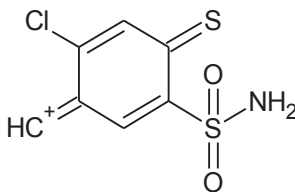
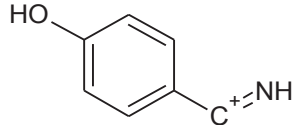
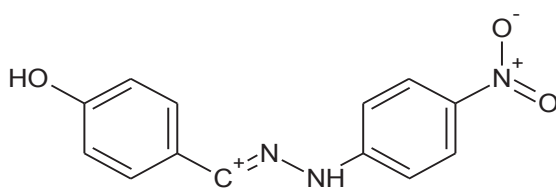
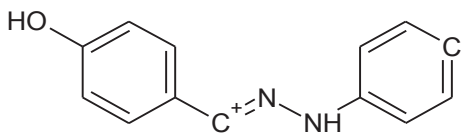


Rycina 20. Widma fragmentacyjne wykonane techniką LC-Q-TOF-MS. A: produkt biotransformacji M2, B: produkt biotransformacji M3. Naniesiono proponowane struktury chemiczne powstających jonów.

Tabela 26. Charakterystyka najczęściej występujących jonów fragmentacyjnych w widmach związku SLB-14 i jego głównych produktów biotransformacji oznaczonych M1, M2 i M3.

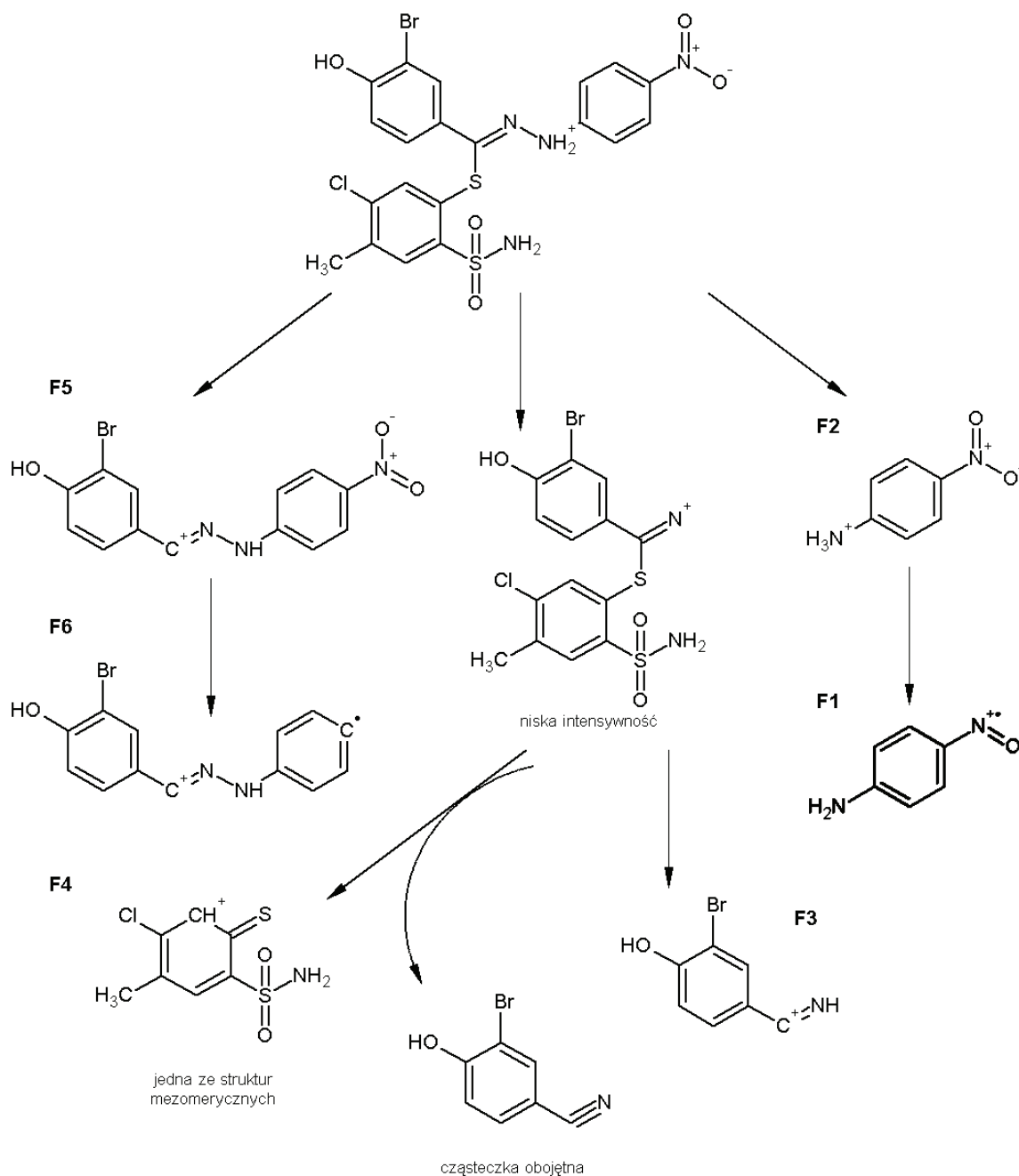
L.p.	Proponowana struktura chemiczna	m/z (teoretyczne)	m/z (doświadczalne)	$\Delta m/z$ [Da]	obecność w widmach fragmentacyjnych
F1		122,02	122,07	0,05	SLB-14, M1, M2, M3
F2		139,05	139,08	0,03	SLB-14, M1, M2, M3
F3		197,95	197,98	0,03	SLB-14, M1
F4		235,96	235,99	0,04	SLB-14, M2
F5		333,98	334,02	0,04	SLB-14, M1
F6		287,99	288,03	0,04	SLB-14, M1
F7		251,96	251,99	0,03	SLB-M1, M3

Kontynuacja Tabeli 26

F8		233,94	233,98	0,04	M1, M3
F9		120,04	120,07	0,03	M2, M3
F10		256,07	256,11	0,04	M2, M3
F11		210,08	210,11	0,03	M2, M3

4.5.1 Hydroksylacja (M1)

Utlenianie atomu węgla jest jedną z najczęstszych reakcji katalizowanych przez enzymy z grupy cytochromu P-450. Dla metabolitu M1 proponowana jest struktura hydroksylowanej cząsteczki. Otrzymane widmo nie pozwala jednak dokładnie określić miejsca podstawienia grupy OH, a jedynie fragment cząsteczki, w którym prawdopodobnie zaszła ta reakcja. Widmo produktu M1 znajduje się na Rycinie 19B, oznaczenia jonów fragmentacyjnych są konsekwentne i zgodne z Tabelą 26. Metabolit M1 charakteryzuje się jodem pseudomolekularnym o wartości m/z 587,0149 ($[M+H]^+$). W widmie fragmentacyjnym występują jony F1, F2, F3, F5 i F6, co sugeruje, że ugrupowanie hydrazonu nie zostało zmienione w procesie biotransformacji. Potwierdzeniem przyłączenia się atomu tlenu są jony F7 i F8. F8 tworzy się po utracie cząsteczki wody z jonu F7, co jest zjawiskiem typowym dla ugrupowania typu C-OH. Ze względów sterycznych najbardziej prawdopodobna wydaje się hydroksylacja grupy metylowej, chociaż nie można wykluczyć również bezpośredniej hydroksylacji pierścienia benzenu.



Rycina 21. Proponowana ścieżka fragmentacji związku SLB-14.

4.5.2 Debrominacja (M2)

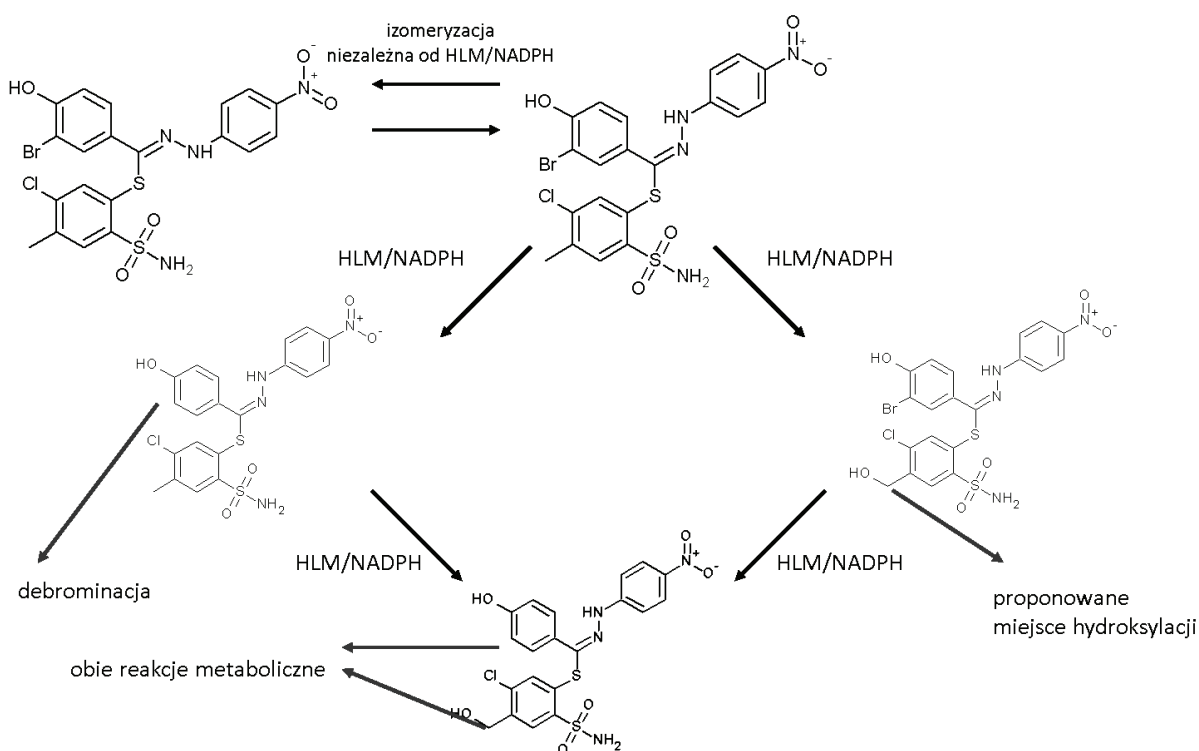
Reakcja metaboliczna polegająca na powstawaniu metabolitu pozbawionego atomu chlorowca nazywana jest dehalogenizacją. Zachodzić może z zastąpieniem chlorowca grupą OH (oksydatywna debrominacja), bądź też z zastąpieniem chlorowca atomem wodoru (reduktywna debrominacja). Na podstawie uzyskanych wyników postulowane jest zachodzenie reduktywnej debrominacji w przypadku **SLB-14**. Widmo metabolitu powstałego w tej reakcji (M2) znajduje się na Rycinie 20A. Wartość m/z dla jonu pseudomolekularnego

wynosi 493,0886. Główne jony wykorzystane w identyfikacji to jon F3 pozbawiony bromu (m/z 197,9872) oraz F6 również pozbawiony atomu bromu (m/z 288,0261). Dodatkowo także jon F5 występuje w wersji pozbawionej atomu bromu, a pozostałe jony występują w postaci niezmienionej w stosunku do macierzystego związku **SLB-14**.

4.5.3 Debrominacja i hydroksylacja (M3)

W wyniku analizy chromatogramów uzyskano również widmo fragmentacyjne kolejnego produktu oznaczonego jako M3 (Rycina 20B). Widmo fragmentacyjne związku świadczy o tym, że metabolit ten powstał jako wynik dwóch opisanych wcześniej reakcji: hydroksylacji i debromizacji. Wartość m/z dla jonu pseudomolekularnego wynosi 509,0889. W widmie fragmentacyjnym można zauważyć jony charakterystyczne zarówno dla M1 (np. F8), jak i dla M2 (np. F9, F10, F11). Proponowaną w tym przypadku strukturą produktu jest metabolit pozbawiony atomu bromu i jednocześnie hydroksylowany w obszarze pierścienia połączanego bezpośrednio z grupą sulfonamidową.

Na Rycinie 23 przedstawiono podsumowanie opisanych zjawisk zachodzących w warunkach *in vitro*.



Rycina 22. Podsumowanie procesów zachodzących w czasie inkubacji związku **SLB-14**.

4.6 Ocena stabilności metabolicznej pochodnych arylopiperazyny

Zestawienie wyników z doświadczeń *in vitro* badania stabilności metabolicznej arylopiperazyny przedstawiono w Tabeli 27. Wyniki wyrażono w postaci metabolicznego czasu półtrwania, $t_{1/2}$. Dla porównania w Tabeli 27 umieszczono także wartość $t_{1/2}$ uzyskaną dla buspironu, wyznaczoną eksperymentalnie w taki sam sposób, jak dla 16 pozostałych pochodnych.

Tabela 27. Zestawienie metabolicznych czasów półtrwania otrzymanych w warunkach *in vitro* dla 16 pochodnych arylopiperazyny.

Kod związku	pomiar 1	pomiar 2	średnia (n = 2)
I41	32,24	28,18	30,21
I44	40,07	32,39	36,23
I48	23,03	25,07	24,05
I49	14,47	13,23	13,85
I52	42,27	44,72	43,49
I59	12,31	14,12	13,21
I61	42,01	64,18	53,09
I65	37,47	56,35	46,91
C9	6,12	6,52	6,32
C10	5,98	5,55	5,77
C17	7,43	7,72	7,58
C16	15,61	22,65	19,13
C7	5,66	5,01	5,34
C2	10,25	10,78	10,52
C1	5,48	5,27	5,38
C4	9,82	10,98	10,40
buspiron	6,64	6,54	6,59

Z porównania średnich wartości $t_{1/2}$ wynika, że wśród badanych pochodnych znalazły się związki o stabilności zarówno mniejszej, jak i większej od związku referencyjnego jakim był buspiron. Wszystkie związki z grupy pochodnych z podstawnikiem tetrahydropirydyny (oznaczone kodem **I**) wykazywały stabilność większą niż buspiron, natomiast tylko część związków z podstawnikiem chinolino-piperazyny (kod **C**) była od niego bardziej stabilna. Najmniej stabilne okazały się związki **C7**, **C1** i **C8** o czasach półtrwania odpowiednio 5,34 min, 5,38 min i 5,77 min. Związki **I61** i **I65** o czasach półtrwania 53,09 min i 46,91 min wykazywały natomiast największą w badanej grupie stabilność wobec mikrosomów ludzkich i NADPH. Wysoka stabilność jest cechą pożądaną wśród nowosyntezowanych potencjalnych leków.

Analizując wyniki zawarte w Tabeli 27 w kontekście zależności pomiędzy strukturą chemiczną a wyznaczonym parametrem stabilności metabolicznej $t_{1/2}$ trudno jest wyciągnąć jednoznaczne reguły dotyczące stabilności dla całego zestawu badanych pochodnych. Z całą pewnością pochodne chinolino-tetrahydropirydyny cechuje stabilność wyższa niż pochodne indolo-piperazyny. Bezpośredni wpływ poszczególnych podstawników jest natomiast trudny do oceny w badanym zestawie pochodnych. Zauważyć można, że w parach związków, które różnią się wyłącznie położeniem podstawnika w pierścieniu fenylowym, np. **17** w porównaniu z **12** oraz **11** w porównaniu z **14**, związkiem stabilniejszym jest ten podstawiony w pozycji *para*. Podobną ogólną zależność można odnaleźć w grupie chinolino-tetrahydropirydyny.

4.7 Poszukiwanie zależności pomiędzy wartościami deskryptorów molekularnych a stabilnością metaboliczną pochodnych arylopiiperazyny z wykorzystaniem analizy cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS, procedura 4)

Do procedury czwartej włączono 16 badanych analogów arylopiiperazyny oraz buspiron. Porównanie wartości eksperymentalnego metabolicznego czasu półtrwania z wartościami uzyskanymi za pomocą modelu dla czterech opracowanych modeli PLS przedstawiono na Rycinie 23. Uzyskane modele można także porównać na podstawie wartości zebranych w Tabeli 28.

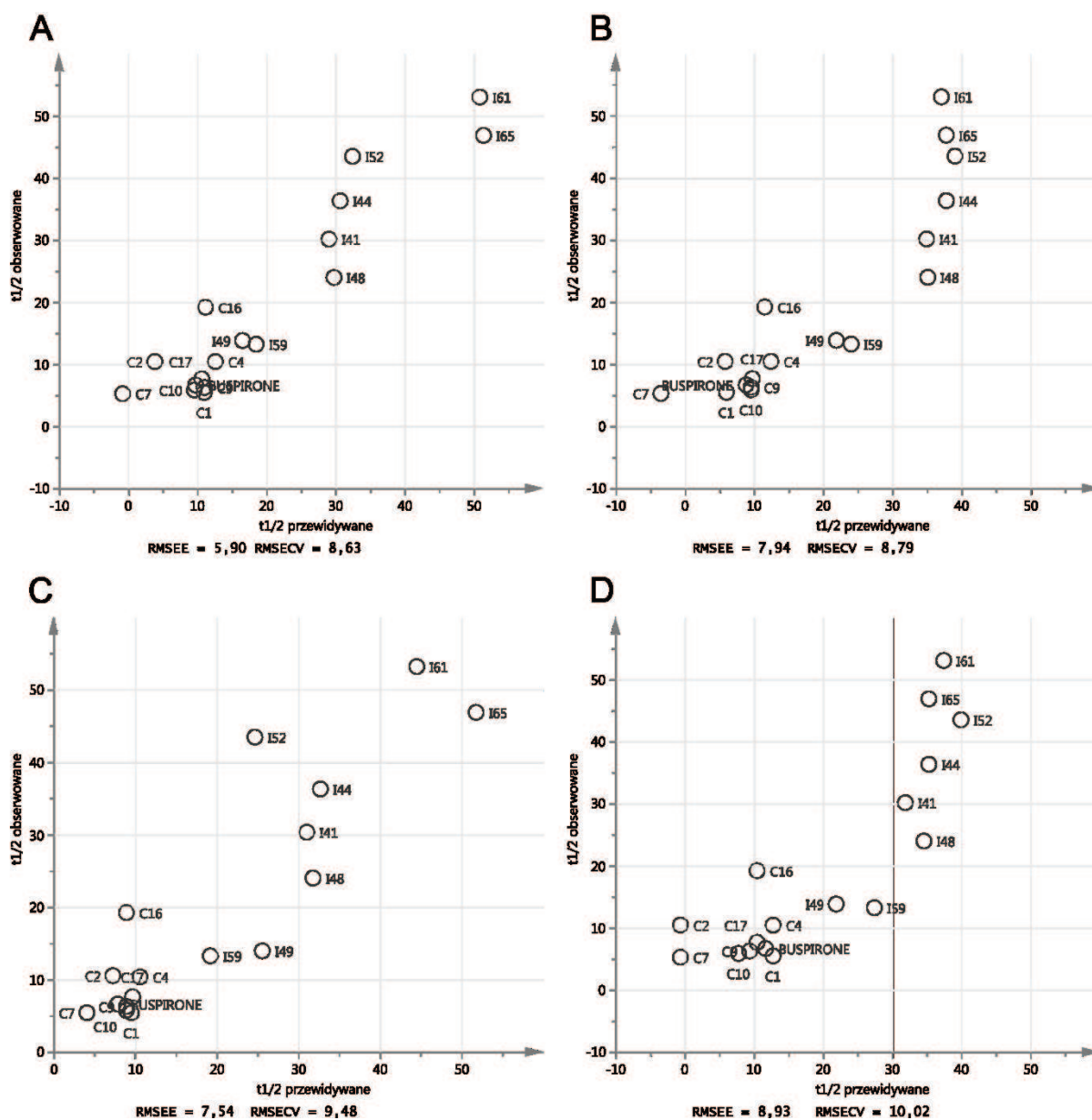
Tabela 28. Parametry statystyczne modeli PLS.

nr modelu	zastosowane deskryptory molekularne	R2Y	Q2	RMSEE [min]	RMSECV [min]
1	modele 2-4 plus deskryptory konstytucyjne i fragmenty o zdefiniowanym atomie centralnym	0,883	0,683	5,89	8,63
2	CATS2D	0,788	0,705	7,94	8,79
3	pary atomów w przestrzeni dwuwymiarowej	0,800	0,634	7,55	9,48
4	liczności grup funkcyjnych	0,732	0,607	8,93	10,02

R2Y – ułamek zmienności zmiennej y ($t_{1/2}$) zawarty w modelu; Q2 – współczynnik determinacji modelu otrzymany w procedurze walidacji krzyżowej; RMSEE – średniokwadratowy błąd dopasowania modelu; RMSECV – średniokwadratowy błąd modelu otrzymany w procedurze walidacji krzyżowej

Pod względem wartości wariancji opisywanej przez model, najbardziej satysfakcjonujący był model 1 z $R2Y = 0,883$, co odzwierciedlone jest również najmniejszym średnim błędem dopasowania (RMSEE) równym 5,89 min, jak i średnim błędem przewidywania uzyskanym w procedurze walidacji krzyżowej (RMSECV) równym 8,63 min.

Wśród modeli zbudowanych z użyciem pojedynczych bloków deskryptorów najkorzystniejszym był model 2, który wykorzystuje wartości deskryptorów CATS2D. Parametry dwóch pozostałych modeli (model 3 i 4) nie różniły się znacząco – średni błąd przewidywania czasu półtrwania waha się pomiędzy 8,8 a 10 min, dla modeli 2 i 4.



Rycina 23. Porównanie otrzymanych eksperymentalnie wartości metabolicznych czasów półtrwania 16 analogów arylopiperazyny i buspironu z wartościami uzyskanymi za pomocą modelu PLS zbudowanego z wykorzystaniem deskryptorów: A) pięciu bloków opisanych w rozdziale 3.14; B) deskryptorów CATS2D; C) deskryptorów par atomów w przestrzeni dwuwymiarowej; D) deskryptorów liczności grup funkcyjnych.

Najistotniejsze dla interpretacji modeli wnioski zebrano w Tabeli 29. Zawiera ona wartości VIP dla deskryptorów, dla których parametr ten przyjął wartość większą niż 1. Jeśli

takich deskryptorów było więcej niż 20, przedstawiono listę 20 deskryptorów o najwyższej wartości VIP.

Tabela 29. Zestawienie wartości VIP deskryptorów molekularnych w czterech otrzymanych modelach PLS.

model 1		model 2		model 3		model 4	
B10[N-O]	1,78	CATS2D_09_AL	1,39	B10[N-O]	1,89	nRC=N	1,39
F10[N-O]	1,67	CATS2D_05_LL	1,37	F10[N-O]	1,82	nArNR2	1,39
CATS2D_09_AL	1,57	CATS2D_06_LL	1,33	B03[N-N]	1,61	nR=Ct	1,37
CATS2D_05_LL	1,54	CATS2D_02_AA	1,31	B06[N-N]	1,61	nHAcc	1,28
CATS2D_06_LL	1,50	CATS2D_03_AA	1,31	B08[N-N]	1,61	nArX	1,24
c	1,49	CATS2D_06_AA	1,31	B10[N-N]	1,61	nPyridines	1,21
nRC=N	1,49	CATS2D_08_AA	1,31	F03[N-N]	1,61	nCconj	1,19
nArNR2	1,49	CATS2D_04_LL	1,19	F06[N-N]	1,61		
C-036	1,49	CATS2D_05_AA	1,16	F08[N-N]	1,61		
N-071	1,49	CATS2D_02_LL	1,09	F10[N-N]	1,61		
N-074	1,49			F06[C-N]	1,59		
CATS2D_02_AA	1,49			F01[C-N]	1,58		
CATS2D_03_AA	1,49			F02[N-N]	1,52		
CATS2D_06_AA	1,49			F05[N-N]	1,52		
CATS2D_08_AA	1,49			T(N,,N)	1,48		
B03[N-N]	1,49			T(N,,Br)	1,47		
B06[N-N]	1,49			T(O,,Br)	1,47		
B08[N-N]	1,49			B01[C-Br]	1,47		
B10[N-N]	1,49			B02[C-Br]	1,47		

Oznaczenia deskryptorów:

B – deskryptor przyjmujący wartość 0 lub 1 w zależności od obecności w cząsteczce pary atomów we wskazanej odległości topologicznej

F – suma wystąpień w cząsteczce wskazanej pary atomów, we wskazanej odległości topologicznej

T – suma odległości topologicznych pomiędzy wskazanymi atomami

CATS – liczba wystąpień wskazanych typów atomów, we wskazanej odległości topologicznej, przy czym: A: akceptor wiązania wodorowego, L – atom lipofilowy,

C-036 – Al-CH=X – węgiel z podstawnikiem alifatycznym i wiązaniem podwójnym

N-071 – Ar-NAI2 – amina z dwoma podstawnikami alifatycznymi i jednym aromatycznym

N-074 – R#N / R=N- stosunek amin czwartorzędowych do trzeciorzędowych

nN – liczba atomów azotu; nRC=N

nArNR2 – liczba amin trzeciorzędowych, aromatycznych

nR=Ct – liczba trzeciorzędowych alifatycznych atomów węgla sp²

nHAcc – liczba akceptorów wiązań wodorowych na atomach F, O i N

nArX – liczba atomów chlorowca przyłączonego do układu aromatycznego

nPyridines – liczba pirydyn

nCconj – liczba niearomatycznych sprzężonych atomów węgla

W modelu 1 dwoma deskryptorami o największej wartości parametru VIP okazały się deskryptory B10[N-O] i F10[N-O], których wartość jest zależna od obecności pary atomów N i O w odległości topologicznej (liczbie wiązań chemicznych pomiędzy atomami) równej 10.

Wymieniona para atomów występuje częściej w grupie związków oznaczonej kodem C, a nie występuje w związkach takich jak **I61** i **I65**, stąd wyższa wartość tego deskryptora jest niekorzystna dla stabilności metabolicznej. Kolejnym istotnym deskryptorem jest CATS2D_09_AL, którego wartość jest sumą wystąpień w cząsteczce akceptora wiązania wodorowego w odległości topologicznej równej 9 od lipofilowego atomu cząsteczki. Związki oznaczone kodem I charakteryzują się wartością tego parametru rzędu 11-13, natomiast te o kodzie C rzędu 4-7. Dla buspironu CATS2D_09_AL = 2. Dla stabilności metabolicznej więc korzystnym jest, aby wartość tego deskryptora była jak najwyższa. Wartości CATS2D_05_LL i CATS2D_06_LL reprezentują faworyzowaną odległość pomiędzy lipofilowymi atomami. Deskryptory te przyjmują wyższą niższą dla analogów arylopiiperazyny zawierających podstawnik chinoliny, co potwierdza niekorzystny wpływ tego podstawnika na stabilność metaboliczną w porównaniu z podstawnikiem indolowym. Podobny wniosek można zaproponować na podstawie wartości deskryptorów, które informują o liczbie i odległości pomiędzy atomami azotu, np. nN, B03[N-N].

Dodatkowo w modelu 3 obecne są deskryptory takie jak: T(N,,Br), T(O,,Br), B01[C-Br], B02[C-Br], które potwierdzają stabilizujący wpływ atomu bromu. W modelu 4 natomiast zaznaczył się stabilizujący udział pirydyny, z deskryptorem rozpoznającym ją wewnątrz układu chinoliny.

Interesujące, że żaden z deskryptorów w Tabeli 29 nie wskazuje bezpośrednio na wiązanie podwójne C=C w ugrupowaniu tetrahydropirydyny, które zastąpiło piperazynę w związkach oznaczonych kodem I. Z tego powodu, za źródło niestabilności związków z grupy C można uważać bardziej atom azotu piperazyny, niż nasycenie tego pierścienia.

Podsumowując, uzyskane w tym rozdziale wyniki mogą wskazywać następujące najważniejsze cechy badanych analogów arylopiiperazyny, podwyższające stabilność metaboliczną:

- podstawnik indolowy podstawiony atomem bromu
- zastąpienie atomu azotu atomem węgla w pierścieniu piperazyny

5 Podsumowanie wyników i wnioski

Wyniki zostały podsumowane z wyszczególnieniem następujących po sobie etapów prowadzonych badań, z uwzględnieniem podziału na zaproponowane procedury badawcze.

Wyniki uzyskane poprzez zastosowanie procedury 1 (Rozdział 4.1) wskazują, że analiza głównych składowych (PCA), będąca techniką wykorzystywaną w analizie dużych zestawów danych i redukcji ich wielowymiarowości może być użyteczna w dziedzinie selekcji nowosyntezowanych pochodnych o potencjalnych właściwościach leczniczych. Poziom automatyzacji testów przesiewowych, np. cytotoksyczności, pozwala zbadać w krótkim czasie dużą liczbę nowych związków chemicznych, i to z wykorzystaniem wielu testów biologicznych. Ten podstawowy etap biologicznej oceny może doprowadzić do wybrania z całego zbioru kandydatów na leki, tych o najbardziej korzystnych właściwościach. Ocena taka może być trudna w przypadku jednoczesnego analizowania danych aktywności dla wielu linii komórkowych. Analiza głównych składowych może służyć do przedstawienia tych danych w stosunkowo prosty do interpretacji wykres, przedstawiający współzależności pomiędzy badanymi związkami. Dodatkowo, zastosowanie deskryptorów cząsteczkowych pozwala wykazać, że różnice te wynikają ze struktury chemicznej.

Procedura druga (Rozdział 4.2) jest propozycją wykorzystania analizy głównych składowych (PCA) do uzyskania nowej zmiennej, przedstawiającej ilościowo ogólną aktywność w badanej grupie kandydatów na leki. Zaproponowana procedura, jest szczególnie przydatna, gdy do opisu aktywności konieczne jest wykorzystanie kilku zmiennych, a pożądanym kierunkiem zmian aktywności zakłada uzyskanie korzystnych wartości wszystkich tych zmiennych. W tym przypadku metoda kompresji danych jaką jest PCA, pozwoliła na znaczące zredukowanie wielowymiarowości informacji zawartej w tabeli aktywności i przedstawienie jej jako jednej zmiennej ilościowej, przedstawiającej ogólną aktywność związku. Natomiast proponowane deskryptory, uwzględnione w równaniu QSAR opisują ilościowo i w sposób statystycznie istotny, związek pomiędzy strukturą chemiczną a tą ogólną aktywnością. Uzyskane równanie może być wykorzystane do szacowania aktywności kolejnych pochodnych w grupie pochodnych benzenosulfonamidu.

W kontekście procedury trzeciej, która doprowadziła do opracowania modelu QSRR, opisującego zjawisko izomeryzacji geometrycznej pochodnych benzenosulfonamidu

(Rozdział 4.3) oraz części, w której zbadano ich stabilność metaboliczną (Rozdział 4.4), także można wyciągnąć interesujące wnioski oraz wskazać zastosowanie praktyczne tego etapu badań. Opisane wyżej wyniki, to według wiedzy autora rozprawy doktorskiej, pierwsza próba opisanie zachowania związków z grupy benzenosulfonamidów zawierających ugrupowanie tiohydrazonu w obecności enzymów metabolizujących ksenobiotyki. Badane pochodne benzenosulfonamidu, zawierające ugrupowanie tiohydrazonu wykazały wysoką stabilność, pomimo zastosowania maksymalnego czasu inkubacji. Oznacza to, że wymieniona wyżej struktura może być także stabilna wobec mechanizmów eliminacji ksenobiotyków zachodzących w organizmie ludzkim. Zjawiskiem niekorzystnym jest natomiast postulowana izomeryzacja, która wnosi swój wkład w zjawisko niestabilności związku. Możliwe różnice pomiędzy izomerami w aktywności biologicznej, włączając właściwości farmakokinetyczne, pozostają nieznane i mogą stanowić wyzwanie badawcze ze względu na brak możliwości zablokowania procesu izomeryzacji i analizy jedynie jednego z postulowanych izomerów. Z tego względu, interesujący wydaje się związek o kodzie **SLB-4**, który charakteryzował się dobrą stabilnością metaboliczną, a w szczególności nie zaobserwowano dla niego dodatkowego piku izomeru *cis/trans* podczas analizy chromatograficznej. Cechy te można próbować tłumaczyć obecnością dodatkowej grupy nitrowej w jego strukturze. Dalsze poszukiwanie związków w grupie pochodnych benzenosulfonamidu o korzystnych właściwościach może uwzględnić uzyskane wyniki.

Do osiągnięć przedłożonej pracy doktorskiej należy również opisanie przemian metabolicznych związków z grupy pochodnych benzenosulfonamidu, ze szczególnym uwzględnieniem pochodnej oznaczonej kodem **SLB-14** (Rozdział 4.5). Związek oznaczony kodem **SLB-14** ulega, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (bufor fosforanowy, pH 7,4, 37°C), przemianom zależnym i niezależnym od obecności mikrosomów i NADPH. Elementem braku stabilności chemicznej jest postulowane zachodzenie izomeryzacji geometrycznej z utworzeniem izomeru *cis*. Związek **SLB-14** ulega również katalizowanej przez mikrosomy biotransformacji do typowego w tej serii związków metabolitu hydroksylovanego oraz reakcji debrominacji, charakterystycznej jednak tylko i wyłącznie dla tej pochodnej. Reakcja taka, polegająca na zastąpieniu podstawnika bromowego w pierścieniu aromatycznym benzenu atomem wodoru została tylko kilkakrotnie opisana w literaturze dotyczącej przemian metabolicznych.

W Rozdziale 4.6 dokonano natomiast analizy wyników badań ilościowej oceny stabilności metabolicznej 16 analogów arylopiiperazyny oraz porównano ich stabilność ze związkiem referencyjnym dla tej grupy, jakim jest buspiron. Wśród badanych związków, znajdowały się pochodne o kilkukrotnie wyższej wartości wyznaczonego w warunkach *in vitro* metabolicznego czasu półtrwania, $t_{1/2}$ w porównaniu ze związkiem referencyjnym. Jest to właściwość szczególnie korzystna, co prowadzi do wniosku, że w kontekście właściwości metabolicznych, związki oznaczone kodem **I61** i **I65** są szczególnie atrakcyjne jako kandydaci na leki przeciwdepresyjne. Z otrzymanych wyników można również wyciągnąć wniosek, że dla stabilności metabolicznej korzystne jest zastąpienie podstawnika indolo-piperazyny podstawnikiem chinolino-tetrahydropirydyny. Zagadnienie to było kontynuowane w badaniach opisanych w Rozdziale 4.7, w którym zastosowano regresję cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS) do wyselekcjonowania cech korzystnych dla stabilności metabolicznej. Zaproponowana procedura 4, która jest szybka w realizacji dzięki pominięciu etapu modelowania molekularnego, prawidłowo zidentyfikowała cechy badanych analogów arylopiiperazyny, których wpływ zaobserwowano już w analizie opisanej w Rozdziale 4.6. Procedura ta umożliwiła również przewidywanie stabilności nowych analogów o podobnej strukturze na podstawie zdefiniowanych deskryptorów molekularnych. Pomimo znaczących wartości RMSEE i RMSECV, model ten może być stosowany do oceny stabilności metabolicznej.

Najważniejsze, uzyskane w toku prowadzonych badań osiągnięcia można przedstawić w postaci poniższego podsumowania pracy zawartej w rozprawie doktorskiej. W ramach prowadzonych badań:

- zaproponowano trzy interdyscyplinarne procedury badawcze, których celem jest wykorzystanie wielowymiarowych zestawów danych biologicznych i deskryptorów molekularnych uzyskanych technikami modelowania molekularnego do opisu zjawiska izomeryzacji geometrycznej i aktywności biologicznej oraz wskazania ich zależności od struktury chemicznej,
- opisano kierunki biotransformacji w grupie pochodnych benzenosulfonamidu, a także potwierdzono występowanie izomeryzacji geometrycznej, niezależnej od zastosowanego układu enzymatycznego,

- w grupie pochodnych benzenosulfonamidu, ze względu na stabilność metaboliczną i fizykochemiczną, związkiem dedykowanym do dalszych rozważań jest związek oznaczony kodem **SLB-4**,
- oznaczono ilościowo stabilność metaboliczną 16 analogów arylopiperazyny oraz buspironu wyrażoną w postaci metabolicznego czasu półtrwania $t_{1/2}$, a także przedyskutowano wpływ struktury chemicznej na uzyskane wartości $t_{1/2}$;
- w grupie analogów arylopiperazyny szczególnie korzystnymi właściwościami charakteryzowały się związki oznaczone kodami **I65** oraz **I61**, odpowiednio 7- i 8-krotnie bardziej stabilne od buspironu
- zaproponowany model PLS pozwala numerycznie identyfikować elementy struktury chemicznej odpowiedzialne za małą/dużą stabilność metaboliczną.

Spis rycin

Rycina 1. Zestawienie struktury chemicznej i zastosowanie wybranych substancji leczniczych zawierających pierwszorzędową grupę sulfonamidową.	s.15
Rycina 2. Struktura chemiczna przeciwnowotworowych sulfonamidów: aprikoksybu [23] (z lewej) i pazopanibu [28] (z prawej).	s.17
Rycina 3. Schemat wybranych reakcji metabolicznych irynotekanu. Na podstawie [5-7].	s.23
Rycina 4. Schemat procedury 1.	s.40
Rycina 5. Schemat procedury 2.	s.43
Rycina 6. Schemat ogólny procedury 3.	s.47
Rycina 7. Zastosowana definicja kąta torsyjnego dla izomerów cis i trans badanych pochodnych benzenosulfonamidu.	s.48
Rycina 8. Schemat procedury 4.	s.56
Rycina 9. Rzut przypadków na płaszczyznę pierwszych dwóch głównych składowych. Otrzymano z wykorzystaniem danych zawartych w Tabeli 17. Za pomocą elips zaznaczono trzy grupy badanych benzenosulfonamidów.	s.59
Rycina 10. Rzut przypadków na płaszczyznę dwóch pierwszych składowych. Analiza wykonana na podstawie wartości deskryptorów molekularnych wybranych dla linii komórkowej OVCAR-8.	s.64
Rycina 11. Rzut przypadków na przestrzeń trzech pierwszych głównych składowych. Analiza wykonana na podstawie wartości deskryptorów molekularnych wybranych dla linii komórkowej ACHN.	s.65
Rycina 12. Podsumowanie wyników procedury 1 w ujęciu chemicznym.	s.66
Rycina 13. Porównanie otrzymanych eksperymentalnie wartości parametrów lipofilowości otrzymanych technikami micelarnej chromatografii cieczowej ($\log k(\text{MLC})$) oraz chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz ($\log k_w(\text{RP-LC})$). Znacznikami oznaczono przynależność związku do jednej z trzech grup pochodnych benzenosulfonamidu: kwadrat – grupa I, trójkąt – grupa II, koło – grupa III.	s.67
Rycina 14. Rzut przypadków na płaszczyznę dwóch pierwszych głównych składowych. Analiza wykonana na podstawie danych	

- aktywności zmierzonej wobec 39 linii komórkowych. Zaznaczono przynależność pochodnych benzenosulfonamidu do trzech głównych grup chemicznych. s.69
- Rycina 15. Rzut przypadków na płaszczyznę dwóch pierwszych składowych (A) i przestrzeń trzech pierwszych składowych (B). Analiza wykonana na wartościach deskryptorów molekularnych i eksperymentalnych parametrach lipofilowości. Zaznaczono przynależność pochodnych do trzech głównych grup chemicznych. s.72
- Rycina 16. Porównanie widm fragmentacyjnych pary izomerów związku SLB-13. A: związek główny (postulowany izomer trans); B: związek dodatkowy (postulowany izomer cis). Kolorem oznaczono odpowiadające sobie jony na obu widmach. s.77
- Rycina 17. Korelacja pomiędzy eksperymentalnymi a przewidzianymi wartościami logarytmu współczynnika retencji log kw. Szary odcinek reprezentuje prostą log kw ekperymentalne = log kw przewidziane. s.81
- Rycina 18. Przykładowy chromatogram mieszaniny poinkubacyjnej dla biotransformacji związku SLB-13. Zaznaczono izomery związku macierzystego wraz z postulowaną identyfikacją oraz piki produktów biotransformacji M1, przy czym dla metabolitu M1 nie ustalono struktury geometrycznej. s.82
- Rycina 19. Widma fragmentacyjne wykonane techniką LC-Q-TOF-MS. A: SLB-14, B: produkt biotransformacji M1. Naniesiono proponowane struktury chemiczne powstających jonów. s.85
- Rycina 20. Widma fragmentacyjne wykonane techniką LC-Q-TOF-MS. A: produkt biotransformacji M2, B: produkt biotransformacji M3. Naniesiono proponowane struktury chemiczne powstających jonów. s.86
- Rycina 21. Proponowana ścieżka fragmentacji związku SLB-14. s.89
- Rycina 22. Podsumowanie procesów zachodzących w czasie inkubacji związku SLB-14. s.90
- Rycina 23. Porównanie otrzymanych eksperymentalnie wartości metabolicznych czasów półtrwania 16 analogów arylopiiperazyny i buspironu z wartościami uzyskanymi za pomocą modelu PLS zbudowanego z wykorzystaniem deskryptorów: A) pięciu bloków opisanych w rozdziale 3.14; B) deskryptorów CATS2D; C) deskryptorów par atomów w przestrzeni dwuwymiarowej; D) deskryptorów licznosci grup funkcyjnych. s.93

Spis tabel

Tabela 1. Porównanie przyczyn niepowodzeń badań klinicznych leków w latach 1991 i 2000 [7].	s.14
Tabela 2. Struktura chemiczna wybranych pochodnych arylopiiperazyny.	s. 19
Tabela 3. Rodzaje analizatorów mas stosowane w badaniach metabolizmu leków [82].	s.25
Tabela 4. Zestawienie często występujących reakcji biotransformacji wraz z odpowiadającymi im zmianami we wzorze sumarycznym i zmianą masy cząsteczkowej [79].	s.26
Tabela 5. Zestawienie wybranych narzędzi in silico stosowanych w badaniach metabolicznych.	s.28
Tabela 6. Struktura chemiczna pierwszej (I) badanej grupy pochodnych benzenosulfonamidu.	s.32
Tabela 7. Struktura chemiczna drugiej (II) z badanych grup pochodnych benzenosulfonamidu.	s.33
Tabela 8. Struktura chemiczna trzeciej (III) z badanych grup pochodnych benzenosulfonamidu.	s.33
Tabela 9. Struktura chemiczna pierwszej z badanych grup analogów arylopiiperazyny z podstawnikiem indolo-tetrahydropirydyny.	s.34
Tabela 10. Struktura chemiczna drugiej z badanych grup pochodnych arylopiiperazyny z podstawnikiem piperazyno-chinolinowym.	s.35
Tabela 11. Przebieg zmian składu eluentu w dwóch programach elucji gradientowej wykorzystanych podczas wyznaczania chromatograficznych parametrów lipofilowości techniką chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-LC).	s.45
Tabela 12. Przebieg zmian składu eluentu w dwóch programach elucji gradientowej wykorzystanych podczas wyznaczania chromatograficznych parametrów lipofilowości techniką chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz.	s.49
Tabela 13. Przebieg zmiany składu eluentu w elucji gradientowej wykorzystanej podczas oceny stabilności metabolicznej pochodnych benzenosulfonamidu.	s.51
Tabela 14. Zestawienie wartości mas molowych oraz wartości m/z 15 pochodnych benzenosulfonamidu.	s.52
Tabela 15. Przebieg zmiany składu eluentu elucji gradientowej wykorzystanej podczas oceny stabilności metabolicznej pochodnych arylopiiperazyny.	s.54
Tabela 16. Zestawienie wartości mas molowych oraz wartości m/z jonów wykorzystanych w analizie ilościowej pochodnych arylopiiperazyny.	s.55

Tabela 17. Dane aktywności cytotoksycznej zmierzone przez National Cancer Institute dla czternastu pochodnych benzenosulfonamidu.	s.58
Tabela 18. Wartości deskryptorów molekularnych dla badanych pochodnych benzenozulfonamidu.	s.69
Tabela 19. Skrócone nazwy deskryptorów molekularnych zastosowanych w analizie PCA, wraz z ich anglojęzycznymi rozszerzeniami ich nazw. Kolejność alfabetyczna.	s.63
Tabela 20. Zestawienie danych aktywności dla pochodnych benzenosulfonamidu wykorzystanych w procedurze 2.	s.68
Tabela 21. Wartości deskryptorów molekularnych uzyskane za pomocą oprogramowania HyperChem oraz wyznaczone eksperymentalnie chromatograficzne parametry lipofilowości.	s.71
Tabela 22. Wartości współrzędnych czynnikowych zmiennych dla analizy PCA wykonanej z wykorzystaniem wartości deskryptorów cząsteczkowych i wyznaczonych eksperymentalnie chromatograficznych parametrów lipofilowości.	s.73
Tabela 23. Porównanie współczynnika czynnikowego pierwszej głównej składowej obliczonej w analizie PCA oraz przewidzianej proponowanym modelem QSAR	s.75
Tabela 24. Podsumowanie uzyskanych eksperymentalnie wartości czasów retencji chromatograficznej oraz wyznaczonych parametrów równania Soczewińskiego-Snydera.	s.78
Tabela 25. Zestawienie wyników badania stabilności metabolicznej pochodnych benzenosulfonamidu.	s.83
Tabela 26. Charakterystyka najczęściej występujących jonów fragmentacyjnych w widmach związku SLB-14 i jego głównych produktów biotransformacji oznaczonych M1, M2 i M3.	s.87
Tabela 27. Zestawienie metabolicznych czasów półtrwania otrzymanych w warunkach <i>in vitro</i> dla 16 pochodnych arylopiperyzyny.	s.91
Tabela 28. Parametry statystyczne modeli PLS.	s.92
Tabela 29. Zestawienie wartości VIP deskryptorów molekularnych w czterech otrzymanych modelach PLS.	s.94

Literatura

- [1] J.A. Salomon, H. Wang, M.K. Freeman, T. Vos, A.D. Flaxman, A.D. Lopez, C. J. L. Murray, Healthy life expectancy for 187 countries, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden Disease Study 2010, *Lancet*, 380 (2012) 2144–2162.
- [2] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA. Cancer J. Clin.*, 61 (2011) 69–90.
- [3] I.-M. Lee, E.J. Shiroma, F. Lobelo, P. Puska, S.N. Blair, P.T. Katzmarzyk, Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy, *Lancet*, 380 (2012) 219–229.
- [4] M. Hay, D.W. Thomas, J.L. Craighead, C. Economides, J. Rosenthal, Clinical development success rates for investigational drugs, *Nat. Biotechnol.*, 32 (2014) 40–51.
- [5] H.M. Kantarjian, T. Fojo, M. Mathisen, L.A. Zwelling, Cancer drugs in the United States: Justum Pretium--the just price, *J. Clin. Oncol.*, 31 (2013) 3600–3604.
- [6] C.G. Begley, L.M. Ellis, Drug development: Raise standards for preclinical cancer research, *Nature*, 483 (2012) 531–533.
- [7] I. Khanna, Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends, *Drug Discov. Today*, 17 (2012) 1088–1102.
- [8] I. Kola, J. Landis, Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3 (2004) 711–715.
- [9] J. Kirchmair, M.J. Williamson, J.D. Tyzack, L. Tan, P.J. Bond, A. Bender, R. C. Glen, Computational prediction of metabolism: sites, products, SAR, P450 enzyme dynamics, and mechanisms, *J. Chem. Inf. Model.*, 52 (2012) 617–648.
- [10] F. Carta, A. Scozzafava, C.T. Supuran, Sulfonamides: a patent review (2008 - 2012), *Expert Opin. Ther. Pat.*, 22 (2012) 747–758.
- [11] D.L. Epstein, Carbonic Anhydrase Inhibitor Side Effects, *Arch. Ophthalmol.*, 95 (1977) 1378–1382..
- [12] A. Martinez, F. Gonzalez, C. Capeans, R. Perez, M. Sanchez-Salorio, Dorzolamide effect on ocular blood flow, *Invest. Ophthalmol., Vis. Sci.* 40 (1999) 1270–1275.
- [13] L. Desantis, Preclinical Overview of Brinzolamide, *Surv. Ophthalmol.*, 44 (2000) S119–S129.
- [14] R.M. Steele, F. Benedini, S. Biondi, V. Borghi, L. Carzaniga, F. Impagnatiello, D. Miglietta, W. K. M. Chong, R. Rajapakse, A. Cecchi, C. Temperini, C. T. Supuran, Nitric oxide-donating carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of open-angle glaucoma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19 (2009) 6565–6570.

- [15] T. Leniger, M. Wiemann, D. Bingmann, G. Widman, A. Hufnagel, U. Bonnet, Carbonic Anhydrase Inhibitor Sulthiame Reduces Intracellular pH and Epileptiform Activity of Hippocampal CA3 Neurons, *Epilepsia*, 43 (2002) 469–474.
- [16] V. Biton, Clinical pharmacology and mechanism of action of zonisamide, *Clin. Neuropharmacol.*, 30 (2007) 230–40.
- [17] K.M. Gadde, D.M. Franciscy, H.R. Wagner, K.R.R. Krishnan, Zonisamide for weight loss in obese adults: a randomized controlled trial, *JAMA*, 289 (2003) 1820–1825.
- [18] C. Bell, S. Bhikha, H. Colhoun, F. Carter, C. Frampton, R. Porter, The response to sulpiride in social anxiety disorder: D2 receptor function, *J. Psychopharmacol.*, 27 (2013) 146–151.
- [19] J. Wang, S. Sampson, Sulpiride versus placebo for schizophrenia, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 4 (2014) CD007811.
- [20] F.J. Al Badarin, M.A. Abuannadi, C.J. Lavie, J.H. O’Keefe, Evidence-based diuretic therapy for improving cardiovascular prognosis in systemic hypertension, *Am. J. Cardiol.*, 107 (2011) 1178–1184.
- [21] R.P. Ames, A comparison of blood lipid and blood pressure responses during the treatment of systemic hypertension with indapamide and with thiazides, *Am. J. Cardiol.*, 77 (1996) B12–B16.
- [22] P. Sooriakumaran, COX-2 inhibitors and the heart: are all coxibs the same?, *Postgrad. Med. J.*, 82 (2006) 242–245.
- [23] A. Kirane, J.E. Toombs, K. Ostapoff, J.G. Carbon, S. Zaknoen, J. Braunfeld, R. E. Schwarz, F. J. Burrows, R. A. Brekken, Apricoxib, a novel inhibitor of COX-2, markedly improves standard therapy response in molecularly defined models of pancreatic cancer, *Clin. Cancer Res.*, 18 (2012) 5031–5042.
- [24] A. Thiry, J.-M. Dogné, B. Masereel, C.T. Supuran, Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy, *Trends Pharmacol. Sci.*, 27 (2006) 566–573.
- [25] P.C. McDonald, J. Sanghera, M. Singh, Y. Lou, M. Vallejo, C.T. Supuran, S. Dedhar, Abstract 841: Therapeutic targeting of cancer cells in the hypoxic microenvironment using an orally bioavailable small molecule inhibitor of carbonic anhydrase IX, *Cancer Res.*, 74 (2014) 841–841.
- [26] L. Dubois, S.G.J.A. Peeters, S.J.A. van Kuijk, A. Yaromina, N.G. Lieuwes, R. Saraya, R. Biemans, M. Rami, N. K. Parvathaneni, D. Vullo, M. Vooijs, C. T. Supuran, J.-Y. Winum, P. Lambin, Targeting carbonic anhydrase IX by nitroimidazole based sulfamides enhances the therapeutic effect of tumor irradiation: A new concept of dual targeting drugs, *Radiother. Oncol.*, 108 (2013) 523–528.
- [27] S. V Keisner, S.R. Shah, Pazopanib: the newest tyrosine kinase inhibitor for the treatment of advanced or metastatic renal cell carcinoma, *Drugs*, 71 (2011) 443–454.

- [28] C.N. Sternberg, I.D. Davis, J. Mardiak, C. Szczylik, E. Lee, J. Wagstaff, C. H. Barrios, P. Salman, O. A. Gladkov, A. Kavina, J. J. Zarbá, M. Chen, L. McCann, L. Pandite, D. F. Roychowdhury, R. E. Hawkins, Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial, *J. Clin. Oncol.*, 28 (2010) 1061–1068.
- [29] D. Vullo, W. Leewattanapasuk, F.A. Mühlischlegel, A. Mastrolorenzo, C. Capasso, C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the β -class enzyme from the pathogenic yeast *Candida glabrata* with sulfonamides, sulfamates and sulfamides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23 (2013) 2647–2652.
- [30] J. Sławiński, A. Pogorzelska, B. Żołnowska, K. Brożewicz, D. Vullo, C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of a novel series of 5-substituted 2,4-dichlorobenzenesulfonamides and their inhibition of human cytosolic isozymes I and II and the transmembrane tumor-associated isozymes IX and XII, *Eur. J. Med. Chem.*, 82 (2014) 47–55.
- [31] B. Żołnowska, J. Sławiński, A. Pogorzelska, J. Chojnacki, D. Vullo, C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis, and molecular structure of novel series N-substituted N'-(2-arylmethylthio-4-chloro-5-methylbenzenesulfonyl)guanidines and their inhibition of human cytosolic isozymes I and II and the transmembrane tumor-associated isozymes IX and XII., *Eur. J. Med. Chem.* 71 (2014) 135–47.
- [32] J. Sławiński, A. Pogorzelska, B. Żołnowska, A. Kędzia, M. Ziółkowska-Klinkosz, E. Kwapisz, Synthesis and anti-yeast evaluation of novel 2-alkylthio-4-chloro-5-methyl-N-[imino-(1-oxo-(1H)-phthalazin-2-yl)methyl]benzenesulfonamide derivatives, *Molecules*, 19 (2014) 13704–13723.
- [33] J. Sławiński, Synthesis of a new series of 4-chloro-2-mercapto-5-methylbenzenesulfonamide derivatives with potential antitumor activity, *Eur. J. Med. Chem.*, 39 (2004) 179–188.
- [34] M. Belka, L. Konieczna, P. Kawczak, T. Ciesielski, J. Sławiński, T. Bączek, The Chemometric Evaluation of Antitumor Activity of Novel Benzensulfonamide Derivatives Based on their Physicochemical Properties, *Lett. Drug Des. Discov.*, 9 (2012) 288–294.
- [35] M. Belka, J. Sławinski, L. Konieczna, P. Kawczak, T. Ciesielski, T. Bączek, Antitumor activity of novel benzensulfonamide derivatives in view of their physicochemical properties searched by principal component analysis, *Med. Chem.*, 9 (2013) 517–525.
- [36] M. Belka, W. Hewelt-Belka, J. Sławiński, T. Bączek, Mass Spectrometry Based Identification of Geometric Isomers during Metabolic Stability Study of a New Cytotoxic Sulfonamide Derivatives Supported by Quantitative Structure-Retention Relationships, *PLoS One*, 9 (2014) e98096.
- [37] H.L. Goldberg, R.J. Finnerty, The comparative efficacy of buspirone and diazepam in the treatment of anxiety, *Am J Psychiatry*, 136 (1979) 1184–1987.

- [38] M. Landén, G. Björling, H. Agren, T. Fahlén, A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of buspirone in combination with an SSRI in patients with treatment-refractory depression, *J. Clin. Psychiatry*, 59 (1998) 664–668.
- [39] L.A. Riblet, D.P. Taylor, M.S. Eison, H.C. Stanton, Pharmacology and neurochemistry of buspirone, *J Clin Psychiatry*, 43 (1982) 11–18.
- [40] Đ. Ignjatović, D. Vojnović Milutinović, A. Nikolić-Kokić, M. Slavić, D. Andrić, M. Tomić, S. Kostić-Rajačić, The mechanisms responsible for neuroprotective capacity of arylpiperazine dopaminergic ligands against cell death induced by sodium nitroprusside, *Eur. J. Pharmacol.*, 683 (2012) 93–100.
- [41] M. Popovic, Z. Stanojevic, J. Tosic, A. Isakovic, V. Paunovic, S. Petricevic, T. Martinovic, D. Ciric, T. Kravic-Stevovic, V. Soskic, S. Kostic-Rajacic, K. Shakib, V. Bumbasirevic, V. Trajkovic, Neuroprotective arylpiperazine dopaminergic/serotonergic ligands suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in rats., *J. Neurochem.*, (2015).
- [42] A.S. Eison, M.S. Eison, M. Stanley, L.A. Riblet, Serotonergic mechanisms in the behavioral effects of buspirone and gepirone, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24 (1986) 701–707.
- [43] A. Hamik, D. Oksenberg, C. Fischette, S.J. Peroutka, Analysis of tandospirone (SM-3997) interactions with neurotransmitter receptor binding sites, *Biol. Psychiatry*, 28 (1990) 99–109.
- [44] T. Sumiyoshi, M. Matsui, I. Yamashita, S. Nohara, M. Kurachi, T. Uehara, S. Sumiyoshi, C. Sumiyoshi, H. Y. Meltzer, The effect of tandospirone, a serotonin1A agonist, on memory function in schizophrenia, *Biol. Psychiatry*, 49 (2001) 861–868.
- [45] T. Sumiyoshi, M. Matsui, S. Nohara, I. Yamashita, M. Kurachi, C. Sumiyoshi, K. Jayathilake, H. Y. Meltzer, Enhancement of Cognitive Performance in Schizophrenia by Addition of Tandospirone to Neuroleptic Treatment, *Am. J. Psychiatry*, 158 (2001) 1722–1725.
- [46] E. Muth, J. Moyer, J. Haskins, M. Abou-Gharbia, R. Stephens, T. Ward, Zalospiroone, Wy-50,324, and WAY-100,289: new serotonergic agents with psychotherapeutic potential, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 1 (1991) 207–209.
- [47] K. Rickels, A. Derivan, N. Kunz, A. Pallay, E. Schweizer, Zalospiroone in major depression: a placebo-controlled multicenter study, *J. Clin. Psychopharmacol.*, 16 (1996) 212–217.
- [48] W.F. Boyer, J.P. Feighner, A placebo-controlled double-blind multicenter trial of two doses of ipsapirone versus diazepam in generalized anxiety disorder, *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 8 (1993) 173–176.
- [49] R.A. Glennon, N.A. Naiman, M.E. Pierson, M. Titeler, R.A. Lyon, E. Weisberg, NAN-190: an arylpiperazine analog that antagonizes the stimulus effects of the 5-HT1A agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT), *Eur. J. Pharmacol.*, 154 (1988) 339–341.

- [50] L. Rydelek-Fitzgerald, M. Tietler, P.W. Fletcher, A.M. Ismaiel, R.A. Glennon, NAN-190: agonist and antagonist interactions with brain 5-HT_{1A} receptors, *Brain Res.*, 532 (1990) 191–196.
- [51] W. Wouters, M. Tulp, P. Bevan, Flesinoxan lowers blood pressure and heart rate in cats via 5-HT_{1A} receptors, *Eur. J. Pharmacol.*, 149 (1988) 213–223.
- [52] B. Seletti, C. Benkelfat, P. Blier, L. Annable, F. Gilbert, C. de Montigny, Serotonin_{1A} receptor activation by flesinoxan in humans. Body temperature and neuroendocrine responses, *Neuropsychopharmacology*, 13 (1995) 93–104.
- [53] M.A. Abou-Gharbia, W.E. Childers, H. Fletcher, G. McGaughey, U. Patel, M.B. Webb, J. Yardley, T. Andree, C. Boast, R. J. Kucharik, K. Marquis, H. Morris, R. Scerni, J. A. Moyer, Synthesis and SAR of Adatanserin: Novel Adamantyl Aryl- and Heteroarylpiperazines with Dual Serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₂ Activity as Potential Anxiolytic and Antidepressant Agents, *J. Med. Chem.*, 42 (1999) 5077–5094.
- [54] J.M. M. Abou-Gharbia, J. Barrett, W. Childers, Methods for the treatment and prevention of neurodegenerative conditions, 2008.(patent nr US 20030092753 A1).
- [55] R.S. Obach, Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes, *Drug Metab. Dispos.*, 27 (1999) 1350–1359.
- [56] S. Asha, M. Vidyavathi, Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-a review, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160 (2010) 1699–1722.
- [57] S. Rendic, Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data, *Drug Metab Rev.*, 34 (2001) 83–448.
- [58] S.K. Krueger, D.E. Williams, Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism, *Pharmacol. Ther.*, 106 (2005) 357–387.
- [59] R.H. Tukey, C.P. Strassburg, Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40 (2000) 581–616.
- [60] T. Iwatsubo, N. Hirota, T. Ooie, H. Suzuki, N. Shimada, K. Chiba, T. Ishizaki, C. E. Green, C. A. Tyson, Y. Sugiyama, Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data, *Pharmacol. Ther.*, 73 (1997) 147–171.
- [61] J. Brian Houston, Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance, *Biochem. Pharmacol.*, 47 (1994) 1469–1479.
- [62] J. Buters, M. Shou, J. Hardwick, K. Korzekwa, F. Gonzalez, cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP1A1 using baculovirus. Purification, dependency on NADPH-P450 oxidoreductase, and reconstitution of catalytic properties without purification, *Drug Metab. Dispos.*, 23 (1995) 696–701.

- [63] C.M. Masimirembwa, C. Otter, M. Berg, M. Jonsson, B. Leidvik, E. Jonsson, T. Johansson, A. Backman, A. Edlund, T. B. Andersson, Heterologous Expression and Kinetic Characterization of Human Cytochromes P-450: Validation of a Pharmaceutical Tool for Drug Metabolism Research, *Drug Metab. Dispos.*, 27 (1999) 1117–1122.
- [64] D.F. McGinnity, S.J. Griffin, G.C. Moody, M. Voice, S. Hanlon, T. Friedberg, R. J. Riley, Rapid Characterization of the Major Drug-Metabolizing Human Hepatic Cytochrome P-450 Enzymes Expressed in *Escherichia coli*, *Drug Metab. Dispos.*, 27 (1999) 1017–1023.
- [65] S. Preissner, K. Kroll, M. Dunkel, C. Senger, G. Goldsobel, D. Kuzman, S. Guenther, R. Winnenburg, M. Schroeder, and R. Preissner, SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions., *Nucleic Acids Res.*, 38 (2010) D237–243.
- [66] S.-M. Huang, J.M. Strong, L. Zhang, K.S. Reynolds, S. Nallani, R. Temple, S. Abraham, S. Al Habet, R. K. Baweja, G. J. Burckart, S. Chung, P. Colangelo, D. Frucht, M. D. Green, P. Hepp, E. Karnaukhova, H.-S. Ko, J.-I. Lee, P. J. Marroum, J. M. Norden, W. Qiu, A. Rahman, S. Sobel, T. Stifano, K. Thummel, X.-X. Wei, S. Yasuda, J. H. Zheng, H. Zhao, L. J. Lesko, New era in drug interaction evaluation: US Food and Drug Administration update on CYP enzymes, transporters, and the guidance process, *J. Clin. Pharmacol.*, 48 (2008) 662–670.
- [67] P. Dogterom, Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices, *Drug Metab. Dispos.*, 21 (1993) 699–704.
- [68] N.F. Smith, W.D. Figg, A. Sparreboom, Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update, *Toxicol. In Vitro.*, 20 (2006) 163–175.
- [69] L. Iyer, C.D. King, P.F. Whittington, M.D. Green, S.K. Roy, T.R. Tephly, B. L. Coffman, M. J. Ratain, Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes, *J. Clin. Invest.*, 101 (1998) 847–854.
- [70] R. J. Mathijssen, J. Verweij, P. de Bruijn, W. J. Loos, A. Sparreboom, Effects of St. John's Wort on Irinotecan Metabolism, *JNCI J Natl Cancer Ins.t.*, 94 (2002) 1247-1249.
- [71] J.-F. Gagne, Common Human UGT1A Polymorphisms and the Altered Metabolism of Irinotecan Active Metabolite 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), *Mol. Pharmacol.*, 62 (2002) 608–617.
- [72] A.-E.F. Nassar, R.E. Talaat, Strategies for dealing with metabolite elucidation in drug discovery and development, *Drug Discov. Today*, 9 (2004) 317–327.
- [73] N.J. Clarke, D. Rindgen, W.A. Korfmacher, K.A. Cox, Peer Reviewed: Systematic LC/MS Metabolite Identification in Drug Discovery, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 430 A–439 A.

- [74] Z. Tozuka, H. Kaneko, T. Shiraga, Y. Mitani, M. Beppu, S. Terashita, A. Kawamura, A. Kagayama, Strategy for structural elucidation of drugs and drug metabolites using (MS)ⁿ fragmentation in an electrospray ion trap, *J. Mass Spectrom.*, 38 (2003) 793–808.
- [75] A. Gomółka, A. Ciesielska, M.Z. Wróbel, A. Chodkowski, J. Kleps, M. Dawidowski, M. Wolak, K. Stachowicz, A. Sławińska, G. Nowak, G. Satała, A. J. Bojarski, M. Belka, S. Ulenberg, T. Bączek, P. Skowronek, J. Turło, and F. Herold, Novel 4-aryl-pyrido[1,2-c]pyrimidines with dual SSRI and 5-HT_{1A} activity. Part 5, *Eur. J. Med. Chem.*, 98 (2015) 221–236.
- [76] A. Chodkowski, M.Z. Wróbel, J. Turło, J. Kleps, A. Siwek, G. Nowak, M. Belka, T. Bączek, A. P. Mazurek, and F. Herold, Novel 4-aryl-pyrido[1,2-c]pyrimidines with dual SSRI and 5-HT_{1A} activity. Part 4, *Eur. J. Med. Chem.*, 90 (2015) 21–32.
- [77] S. Ulenberg, M. Belka, M. Król, F. Herold, W. Hewelt-Belka, A. Kot-Wasik, T. Bączek, Prediction of overall in vitro microsomal stability of drug candidates based on molecular modeling and support vector machines. Case study of novel arylpiperazines derivatives, *PLoS One*, 10 (2015) e0122772.
- [78] P.R. Tiller, S. Yu, J. Castro-Perez, K.L. Fillgrove, T.A. Baillie, High-throughput, accurate mass liquid chromatography/tandem mass spectrometry on a quadrupole time-of-flight system as a “first-line” approach for metabolite identification studies, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22 (2008) 1053–1061.
- [79] A. Tolonen, M. Turpeinen, O. Pelkonen, Liquid chromatography-mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening, *Drug Discov. Today*, 14 (2009) 120–133.
- [80] K. Levsen, H.-M. Schiebel, B. Behnke, R. Dötzer, W. Dreher, M. Elend, H. Thiele, Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview, *J. Chromatogr. A*, 1067 (2005) 55–72.
- [81] M. Zhu, H. Zhang, W.G. Humphreys, Drug metabolite profiling and identification by high-resolution mass spectrometry, *J. Biol. Chem.*, 286 (2011) 25419–25425.
- [82] K.A. Youdim, K.C. Saunders, A review of LC-MS techniques and high-throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s, *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 1326–1336.
- [83] J.P. Shockcor, S.E. Unger, P. Savina, J.K. Nicholson, J.C. Lindon, Application of directly coupled LC-NMR-MS to the structural elucidation of metabolites of the HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor BW935U83, *J. Chromatogr. B*, 748 (2000) 269–279.
- [84] K.I. Burton, J.R. Everett, M.J. Newman, F.S. Pullen, D.S. Richards, A.G. Swanson, On-line liquid chromatography coupled with high field NMR and mass spectrometry (LC-NMR-MS): a new technique for drug metabolite structure elucidation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15 (1997) 1903–1912.

- [85] A. Bender, H.Y. Mussa, R.C. Glen, S. Reiling, Similarity searching of chemical databases using atom environment descriptors (MOLPRINT 2D): evaluation of performance, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 44 (2004) 1708–1718.
- [86] S. Boyer, C.H. Arnby, L. Carlsson, J. Smith, V. Stein, R.C. Glen, Reaction site mapping of xenobiotic biotransformations, *J. Chem. Inf. Model.*, 47 (2007) 583–590.
- [87] G. Cruciani, E. Carosati, B. De Boeck, K. Ethirajulu, C. Mackie, T. Howe, H. Thiele, MetaSite: understanding metabolism in human cytochromes from the perspective of the chemist, *J. Med. Chem.*, 48 (2005) 6970–6979.
- [88] P. Rydberg, D.E. Gloriam, J. Zaretski, C. Breneman, L. Olsen, SMARTCyp: A 2D Method for Prediction of Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism, *ACS Med. Chem. Lett.*, 1 (2010) 96–100.
- [89] P. Rydberg, D.E. Gloriam, L. Olsen, The SMARTCyp cytochrome P450 metabolism prediction server., *Bioinformatics*, 26 (2010) 2988–2989.
- [90] J. Li, S.T. Schneebeli, J. Bylund, R. Farid, R.A. Friesner, IDSite: An accurate approach to predict P450-mediated drug metabolism, *J. Chem. Theory Comput.*, 7 (2011) 3829–3845.
- [91] H. T’jollyn, K. Boussery, R.J. Mortishire-Smith, K. Coe, B. De Boeck, J.F. Van Bocxlaer, G. Mannens, Evaluation of three state-of-the-art metabolite prediction software packages (Meteor, MetaSite, and StarDrop) through independent and synergistic use, *Drug Metab. Dispos.*, 39 (2011) 2066–2075.
- [92] J. Zaretski, M. Matlock, S.J. Swamidass, XenoSite: accurately predicting CYP-mediated sites of metabolism with neural networks, *J. Chem. Inf. Model.*, 53 (2013) 3373–3383.
- [93] J. Sławiński, Z. Brzozowski, Synthesis, and In Vitro Antitumor Activity of a New Series of 4-Chloro-2-mercapto-5-methylbenzenesulfonamide Derivatives, *Polish J. Chem.*, 81, (2007) 1433–1440.
- [94] E. Soczewiński, Mechanistic molecular model of liquid–solid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 965 (2002) 109–116.
- [95] T. Mehmood, K.H. Liland, L. Snipen, S. Sæbø, A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 118 (2012) 62–69.
- [96] D. Weininger, SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules, *J. Chem. Inf. Model.*, 28 (1988) 31–36.
- [97] M. Reutlinger, C.P. Koch, D. Reker, N. Todoroff, P. Schneider, T. Rodrigues, G. Schneider, Chemically Advanced Template Search (CATS) for Scaffold-Hopping and Prospective Target Prediction for “Orphan” Molecules, *Mol. Inform.*, 32 (2013) 133–138.

[98] T.N. Tran, N.L. Afanador, L.M.C. Buydens, L. Blanchet, Interpretation of variable importance in Partial Least Squares with Significance Multivariate Correlation (sMC), *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 138 (2014) 153–160.

[99] P. Kovaríková, K. Vávrová, K. Tomalová, M. Schöngut, K. Hrusková, P. Hasková, J. Klimes, HPLC-DAD and MS/MS analysis of novel drug candidates from the group of aromatic hydrazones revealing the presence of geometric isomers, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 48 (2008) 295–302.

[100] C. Dugave, L. Demange, Cis-trans isomerization of organic molecules and biomolecules: implications and applications, *Chem. Rev.*, 103 (2003) 2475–2532.

[101] J.P. Terhorst, W.L. Jorgensen, E/Z Energetics for Molecular Modeling and Design, *J. Chem. Theory Comput.*, 6 (2010) 2762–2769.

Podziękowania

Przedstawiona rozprawa doktorska powstała w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ale również dzięki współpracy z kilkoma krajowymi ośrodkami naukowymi i laboratoriami. Jej powstanie nie byłoby możliwe dzięki życzliwej pomocy wielu osób. Szczególnie pragnąłbym podziękować:

prof. dr. Tomaszowi Bączkowi, mojemu promotorowi oraz Kierownikowi Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej;

wszystkim współpracownikom z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej, szczególnie dr. Lucynie Koniecznej i dr. Piotrowi Kawczakowi;

doktorantom Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej, w szczególności mgr. Szymonowi Ulenbergowi, dr. inż. Szymonowi Dziombie i mgr. Natalii Miękus oraz innym studentom, z którymi miałem przyjemność współpracować;

dr. hab. Jarosławowi Sławińskiemu, prof. nadzw. GUMed wraz z zespołem Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;

prof. dr. hab. Franciszkowi Heroldowi wraz z zespołem Katedry i Zakładu Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, szczególnie dr. Markowi Królowi;