



Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Farmaceutyczny

z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Szymon Ulenberg

Modelowanie chemometryczne parametrów metabolicznych pochodnych
arylopiperazyny i benzenosulfonamidu oznaczanych w warunkach *in vitro*

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:

Prof. dr hab. Tomasz Bączek

Gdańsk 2017

Panu prof. dr. hab. Tomaszowi Bączkowi pragnę gorąco podziękować za nieocenioną pomoc merytoryczną i motywację podczas wykonywania badań, oraz bezcenne wskazówki i uwagi na wszystkich etapach przygotowywania niniejszej rozprawy.

Dr. inż. Mariuszowi Belce szczególnie dziękuję za pomocną dłoń we wszystkich aspektach wiążących się z badaniami wchodzącymi w skład niniejszej rozprawy oraz fantastyczną, wieloletnią i bardzo owocną współpracę.

Dr hab. Lucynie Koniecznej serdecznie dziękuję za pomoc w laboratorium, szczególnie w tych najtrudniejszych chwilach, gdy zamiast sukcesów mnożyły się jedynie przeciwności losu.

Dziękuję również i dedykuję tą pracę Paulinie Roszak, za wytrwanie przy moim boku, wsparcie oraz pomoc, której nie da się opisać jako naukową – ale bez niej ta praca zdecydowanie by nie powstała.

Moim rodzicom – dziękuję za wsparcie, otuchę oraz cierpliwość, której pokłady wydają się być niewyczerpane.

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

- 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,
- grant dla Młodych Naukowców Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego realizowany w latach 2014-2015 (MN 01-204/08/506),
- grant „Preludium” Narodowego Centrum Nauki realizowany w latach 2016-2019 (UMO 2015/17/N/NZ7/04110).

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	7
Streszczenie	9
<i>Abstract</i>	10
I. Wstęp	11
1. Pochodne arylopiperazyny – opis działania, zastosowanie	13
2. Pochodne benzenosulfonamidu – opis działania, zastosowanie.....	15
3. Główne założenia badań stabilności metabolicznej	16
4. Wyznaczanie mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$).....	18
5. Wyjaśnienie idei integracji podejścia <i>in vitro</i> oraz <i>in silico</i>	20
II. Cel pracy	22
III. Wyniki	23
1. Porównanie metody regresji wielorakiej, metody ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów oraz metody wektorów nośnych podczas modelowania stabilności metabolicznej	23
2. Model predykcyjny mikrosomalnego czasu półtrwania <i>in vitro</i> wyprowadzony z użyciem metody wektorów nośnych oraz ocena ścieżek metabolicznych pochodnych arylopiperazyny .	27
3. Ocena zależności struktura-stabilność metaboliczna na przykładzie pochodnych benzenosulfonamidu.....	30
IV. Wnioski	32

Wykaz stosowanych skrótów

5-HT_{1A} – receptor serotoniny 1A

A – powierzchnia piku analitu

AIS – powierzchnia piku wzorca wewnętrznego

CL_H – klirens wątrobowy

Cl_{int} – klirens wewnętrzny wyznaczony w warunkach *in vitro*

K_m – stała Michaelisa-Menten

LC-Q-TOF-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas z analizatorami kwadropolowym i czasu przelotu (ang. *liquid chromatography coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry*)

MLR – regresja wieloraka (ang. *multiple linear regression*)

OPLS – metoda ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. *orthogonal partial least squares*)

QSMSR – ilościowe zależności struktura-stabilność metaboliczna (ang. *quantitative structure-metabolic stability relationships*)

R – współczynnik korelacji

RMSE – pierwiastek błędu średniokwadratowego (ang. *root mean square error*)

SSRI – selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (ang. *selective serotonin reuptake inhibitors*)

SVM – metoda wektorów nośnych (ang. *support vector machines*)

t_{1/2} – mikrosomalny czas półtrwania (wyznaczony w warunkach *in vitro*)

Deskryptory molekularne użyte w badaniu:

Eig01_AEA(ri) – *eigenvalue n. 1 from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral*

Eig10_EA(bo) – *eigenvalue n. 10 from edge adjacency matrix weighted by bond order*

Eig11_EA(bo) – *eigenvalue n. 11 from edge adjacency matrix weighted by bond order*

SpMax_EA – *leading eigenvalue from edge adjacency matrix*

SpMax_AEA(ri) – *leading eigenvalue from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral*

SpDiam_AEA(ri) – *spectral diameter from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral*

Publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej:

- P1. 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) 1-16.
- P2. S. Ulenberg, M. Belka, T. Bączek [Comparison of MLR, OPLS, and SVM as potent chemometric techniques used to estimate *in vitro* metabolic stability](#), *Journal of Chemometrics*, 30 (2016) 177-181.
- P3. B. Żołnowska, J. Sławiński, A. Pogorzelska, K. Szafrąński, A. Kawiak, G. Stasiłojć, M. Belka, S. Ulenberg, T. Bączek, J. Chojnacki, [Novel 5-substituted 2-\(arylmethylthio\)-4-chloro-N-\(5-aryl-1,2,4-triazin-3-yl\)benzenesulfonamides: synthesis, molecular structure, anticancer activity, apoptosis-inducing activity and metabolic stability](#), *Molecules*, 21 (2016) 1-27.

Streszczenie

Wprowadzenie nowego leku na rynek wiąże się nieustannie z badaniami przedklinicznymi, w trakcie których jednym z pierwszych etapów jest badanie stabilności metabolicznej potencjalnego kandydata na lek. Pomimo jednak przykładania dużej uwagi do parametru stabilności, wciąż nie można mówić o takiej dostępności narzędzi umożliwiających jego pomiar, jak np. w przypadku badań aktywności farmakologicznej.

Obszar tematyczny niniejszej pracy doktorskiej obejmuje w pierwszym rzędzie modelowanie parametrów stabilności metabolicznej dla pochodnych arylopiperazyny (będących kandydatami na nowe leki przeciwdepresyjne) z wykorzystaniem technik chemometrycznych. Rozprawa koncentruje się na dobraniu odpowiedniej techniki do modelowania parametrów stabilności metabolicznej oraz stworzeniu modelu przewidującego wartość mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$). Ponadto, praca prezentuje zastosowanie procedury inkubacji z ludzkimi mikrosomami w badaniu stabilności metabolicznej pochodnych benzenosulfonamidu, pozwalając na skonstruowanie wniosków służących do przyszłej syntezy związków o zwiększonej odporności na reakcje biotransformacji.

Porównanie trzech technik chemometrycznych jednoznacznie wskazało metodę wektorów nośnych (SVM) jako najbardziej optymalną w modelowaniu parametrów metabolicznych nowych kandydatów na leki. O przydatności metody SVM świadczą uzyskane wysokie współczynniki korelacji dla zbioru uczącego i walidacyjnego (odpowiednio $R = 0,9369$ i $R = 0,8440$). Uzyskane wyniki predykcji wartości $t_{1/2}$ są dobrze skorelowane z wartościami wyznaczonymi w warunkach *in vitro*.

Procedura wyznaczania $t_{1/2}$ została również wykorzystana podczas badań stabilności metabolicznej pochodnych benzenosulfonamidu. Porównanie wyznaczonych wartości $t_{1/2}$ ze strukturami chemicznymi pozwoliło na zaproponowanie zależności struktura-stabilność metaboliczna. Wśród badanych pochodnych zaobserwowano przy tym negatywny wpływ podstawnika 4-metoksy-fenylowego oraz 1-naftyłowego na stabilność metaboliczną badanej grupy pochodnych benzenosulfonamidu.

Ilościowe zależności struktura-stabilność metaboliczna (ang. *quantitative structure-metabolic stability relationships*, QSMSR) oraz zależności struktura-stabilność metaboliczna (SMSR) wraz z wypracowaną w przebiegu pracy doktorskiej procedurą wyznaczania mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$) jako miary stabilności metabolicznej mogą być uznane za racjonalne podejście usprawniające wybór i projektowanie nowych kandydatów na leki podczas badań przedklinicznych.

Abstract

Placing a new drug on the market is continually linked to pre-clinical studies, during which one of the first steps is to test the potential drug candidate's metabolic stability. However, in spite of paying great attention to the stability parameter, it is still not possible to talk about such an availability of tools as for example, for the study of pharmacological activity.

The subject area of this PhD thesis covers in the first place the modeling of metabolic stability parameters for arylpiperazine derivatives, that are candidates for new antidepressants, using chemometric techniques. The dissertation concentrates on selection of the right technique for modeling the metabolic stability parameters and creating a model that predicts the value of *in vitro* microsomal half-life ($t_{1/2}$). Moreover, the work presents the application of incubation with human liver microsomes procedures in the metabolic stability study of benzenesulfonamide derivatives, allowing to draw conclusions for the future synthesis of compounds with increased resistance to biotransformation reactions.

The comparison of three chemometric techniques unequivocally pointed out the support vector machine (SVM) method as the most optimal in modeling of the metabolic parameters of new drug candidates. The usefulness of the SVM method is demonstrated by the high correlation coefficients obtained for the learning and validation sets ($R = 0.9369$ and $R = 0.8440$, respectively). The results of predicting the values of $t_{1/2}$ are well correlated with the values determined *in vitro*.

The procedure for the determination of the $t_{1/2}$ has also been used during studies regarding the metabolic stability of benzenesulfonamide derivatives. Comparison of the determined $t_{1/2}$ values with chemical structures allowed us to propose the structural-metabolic stability relationships. Among the investigated derivatives, the negative effect of the 4-methoxy-phenyl and 1-naphthyl substituents on the metabolic stability of the set of benzenesulfonamide derivatives was observed.

Quantitative structure-metabolic stability relationships (QSMSR) and structure-metabolic stability relationships (SMSR), along with the procedure of determining microsomal half-life ($t_{1/2}$) as a measure of metabolic stability, can finally be considered as a rational approach to streamlining the selection and design of new drug candidates in preclinical research.

I. Wstęp

Metabolizm jest jedną z głównych dróg ekskrecji leków z ludzkiego organizmu. Około 75% znanych leków stanowi substrat dla metabolicznych biotransformacji, co czyni je głównym sposobem obrony organizmu przed ksenobiotykami [1,2]. Z tego powodu metabolizm może stanowić przyczynę problemów z biodostępnością, interakcji między lekami a także zmienności osobniczej [3,4], co czyni go jednym z głównych czynników decydujących o dopuszczeniu leku do użytku [5]. Jednym z parametrów opisujących podatność związku na metabolizm jest stabilność metaboliczna. Wyrażana w różnych wartościach (takich jak wartość czasu półtrwania bądź klirens wewnętrzny) [6], stabilność metaboliczna pozwala oszacować okres czasu, przez jaki lek będzie obecny w aktywnej postaci w organizmie. Pozwala to na przeprowadzanie badań stabilności metabolicznej zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*.

Badania nad stabilnością metaboliczną stanowią również istotny krok w procesie projektowania leków. Od lat 90-tych stabilność metaboliczna była równie ważnym czynnikiem jak aktywność, decydując o dopuszczeniu leku do terapii bądź jego odrzuceniu [7]. Z tego powodu, niezwykle istotnym jest nie tylko zidentyfikowanie produktów metabolizmu potencjalnego kandydata na lek (badając ich toksyczność lub aktywność farmakologiczną), ale też oszacowanie stabilności metabolicznej. Jak pokazują badania z 2012 roku [8], wpływ stabilności metabolicznej na dopuszczenie leków do obrotu został zmniejszony, jednak głównie dzięki dużej ilości badań dedykowanych zwiększeniu stabilności metabolicznej leków [9].

Przeprowadzenie wielu badań umożliwiło powstanie szerokiej gamy procedur, poświęconych wyłącznie badaniu stabilności metabolicznej w warunkach *in vitro*, począwszy od prostych w wykonaniu eksperymentów, a kończąc na wysokoprzepustowych analizach sprzężonych z zaawansowanymi technikami rozdzielania złożonych mieszanin związków [10-13]. Wśród wymienionych procedur na szczególną uwagę zasługuje podejście integrujące badania w warunkach *in vitro* z warunkami *in silico* [14-15]. Głównym założeniem takich badań jest stworzenie modeli (klasyfikacyjnych lub regresyjnych) celujących w przewidywanie wartości (np. metabolicznego czasu półtrwania $t_{1/2}$ w warunkach *in vitro* lub wartości klirensu wewnętrznego wyznaczonego w warunkach *in vitro*), bądź wyznaczenie izoenzymu odpowiedzialnego w największym stopniu za metabolizm badanych pochodnych. Wymienione modele dostarczają istotnych wskazówek na temat zwiększania stabilności

metabolicznej badanych substancji (zmniejszając podatność na biotransformację kolejnych serii syntezowanych pochodnych), oraz umożliwiając oszacowanie stabilności metabolicznej (z danym statystycznym prawdopodobieństwem) jeszcze nie syntezowanych pochodnych.

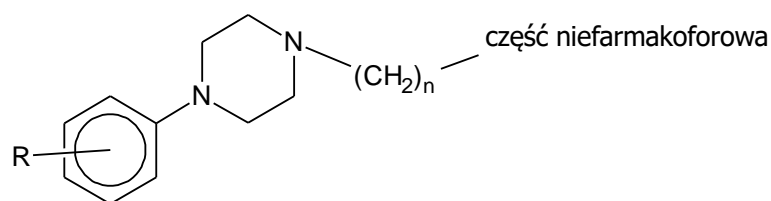
Temat niniejszej rozprawy doktorskiej obejmuje zaprezentowanie wykorzystania technik chemometrycznych w modelowaniu stabilności metabolicznej pochodnych arylopiperazyny, a także wykorzystanie zaprezentowanego podejścia do oceny stabilności metabolicznej pochodnych benzenosulfonamidu, wraz z oceną wpływu struktury badanych związków na ich parametry metaboliczne.

1. Pochodne arylopiperazyny – opis działania, zastosowanie

Depresja jest powszechną chorobą, dotykającą ponad 300 milionów ludzi na całym świecie, stanowiąc około 5-6% populacji całego świata. Zarówno w przypadku epizodów depresyjnych, jak i chronicznych zaburzeń, osoby zmagające się z depresją zmagają się z problemami w funkcjonowaniu w pracy, szkole, rodzinie. W najgorszym przypadku depresja może prowadzić do samobójstwa. Rocznie około 800 000 ludzi umiera w wyniku samobójstwa. Wśród ludzi w przedziale wiekowym 15-29 lat, samobójstwo jest drugą wiodącą przyczyną śmierci. Pomimo znanych, efektywnych metod leczenia depresji, mniej niż połowa osób dotkniętych zaburzeniami otrzymuje takie leczenie. Przyczyną takiego stanu rzeczy są m.in. brak funduszy, brak dobrze wyszkolonego personelu oraz piętno społeczne związane z zaburzeniami psychicznymi [16]. Leczenie farmakologiczne depresji obejmuje używanie leków z grupy antydepresantów. Do głównych celów terapii przeciwdepresyjnej zalicza się poprawę nastroju, funkcjonowania w społeczeństwie oraz ogólne polepszenie jakości życia [17].

Wysokie rozpowszechnienie oraz różnorodność zaburzeń depresyjnych doprowadziły do wprowadzenia na rynek wielu leków stosowanych w terapii wymienionych zaburzeń. Do jednych z najpopularniejszych grup zaliczyć można selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (ang. *selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRI). Ich główną wadą jest długi okres oczekiwania na wystąpienie pożądaných efektów klinicznych, wynoszący około 3-4 tygodni. Próba wytłumaczenia owego opóźnienia bazuje m.in. na hipotezie o konkurencyjnej inhibicji autoreceptorów 5-HT_{1A} i inhibicji wychwytu zwrotnego serotoniny [18]. Ponadto, wyniki dodatkowych badań wykazały skrócenie początku wystąpienia efektu terapeutycznego z 2-3 tygodni nawet do 3-7 dni w przypadku np. podania paroksetyny (częściowego antagonisty receptorów 5-HT_{1A}) łącznie z pindololem (antagonistą receptorów β -adrenergicznych) [19].

Biorąc pod uwagę inne ligandy receptora 5-HT, pochodne arylopiperazyny są grupą związków z potwierdzonym powinowactwem do receptora 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}. Ogólną strukturę chemiczną pochodnych arylopiperazyny przedstawia Rycina 1. Grupa aryłowa bądź heteroaryłowa podłączona bezpośrednio do atomu azotu piperazyny oznaczona została literą R, łańcuch alkilowy (CH₂)_n nosi nazwę tzw. łącznika (ang. *linker*) i służy do rozdzielenia arylopiperazynowej od części niefarmakoforowej. Część niefarmakoforowa charakteryzuje się najczęściej obecnością grupy imidowej bądź amidowej.

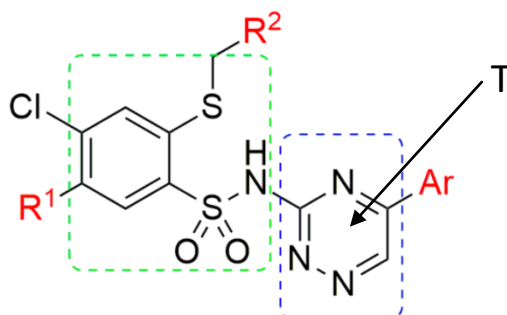


Rycina 1. Struktura ogólna pochodnych arylopiperyliny.

Jako względnie nowa klasa leków oraz kandydatów na leki stosowane w schorzeniach psychicznych, pochodne arylopiperyliny wykazują wysokie powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}, ale niską selektywność wobec poszczególnych podtypów receptorów [20]. Modelowy lek z tej grupy, buspiron, wraz z jego pochodnymi – etoperidonem oraz trazodonem zyskał szeroką akceptację w leczeniu zaburzeń psychicznych z współwystępującym niepokojem [21]. Wyżej wymienione właściwości czynią pochodne arylopiperyliny cennymi kandydatami do stosowania w leczeniu łącznie z selektywnymi inhibitorami wychwytu zwrotnego serotoniny. Poza skróceniem czasu wystąpienia efektu terapeutycznego, pochodne arylopiperyliny mogą pomóc również w zmniejszeniu stresu występującego nie tylko podczas terapii, ale też w codziennym życiu osób dotkniętych zaburzeniami depresyjnymi.

2. Pochodne benzenosulfonamidu – opis działania, zastosowanie

Wśród związków heterocyklicznych pochodnych triazyny pochodne benzenosulfonamidu zajmują istotną pozycję, głównie ze względu na swoje szerokie spektrum aktywności biologicznej. Pierścień 1,2,4-triazynowy jest jednym z najpowszechniej występujących podstawników heterocyklicznych w naturze. Przypisuje się mu działanie przeciwdrgawkowe, neuroprotecyjne, usypiające, anksjolityczne, działanie inhibicyjne na receptor benzodiazepinowy oraz cały szereg innych działań [22-27]. Pochodne benzenosulfonamidu, które są przedmiotem niniejszej rozprawy, charakteryzują się obiecującymi właściwościami przeciwnowotworowymi, szczególnie przeciwko liniom komórkowym nowotworu okrężnicy, ośrodkowego układu nerwowego, czerniaka, jajników, piersi, nerek oraz liniom komórkowym białaczki [28]. W toku poszukiwań nowych, małowzrostkowych chemioterapeutyków zsyntezowano serię nowych pochodnych 4-chloro-2-merkapto-*N*-(5-arylo-1,2,3-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu, składających się z obecnej w strukturze podwójnie podstawionej 1,2,4-triazyny oraz podstawnika 2-merkaptobenzenosulfonamidowego (Rycina 2).



Rycina 2. Struktura ogólna pochodnych benzenosulfonamidu. Strzałka z symbolem T wskazuje pierścień 1,2,4-triazynowy.

3. Główne założenia badań stabilności metabolicznej

Główny cel badań stabilności metabolicznej polega na określeniu podatności badanych związków na reakcje biotransformacji. Badania stabilności metabolicznej należy poprzedzić innymi badaniami: określeniem czystości związku (preferowana powyżej 90%), stabilności chemicznej związku, rozpuszczalności (preferowana powyżej 10 μM). Sama stabilność metaboliczna określana jest w oparciu o wyniki inkubacji z ludzkimi lub zwierzęcymi frakcjami wątrobowymi (określa się spadek stężenia substancji w trakcie trwania inkubacji). Ilościowo stabilność metaboliczna wyrażana jest jako wartość mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$) i klirensu wewnętrznego (CL_{int}) *in vitro*. Wartości te mogą posłużyć do obliczenia drugorzędowych parametrów farmakokinetycznych, m.in. klirensu wątrobowego (CL_{H}), czasu półtrwania *in vivo* lub biodostępności. Niska stabilność metaboliczna z reguły oznacza niską biodostępność *in vivo*, stąd do dalszych badań wybierane są jedynie związki z korzystnymi właściwościami farmakokinetycznymi [29,30].

Prawidłowa interpretacja wyników badań stabilności metabolicznej wymaga spełnienia sześciu poniżej przedstawionych założeń [31].

1. Szybkość metabolizmu oraz aktywność enzymów *in vitro* odpowiadają tym parametrom w warunkach *in vivo*.

2. Enzymy wątrobowe są głównym szlakiem metabolicznym badanych związków, a wątroba głównym organem, w którym zachodzi ich metabolizm.

3. Główną drogą eliminacji badanych związków jest metabolizm tlenowy.

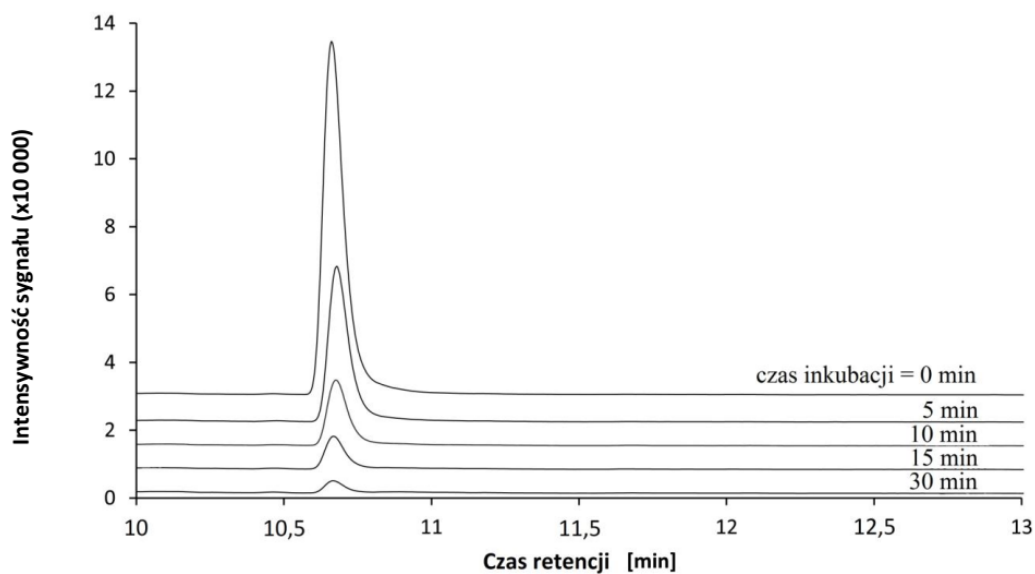
4. Stężenie badanych związków podczas inkubacji jest niższe niż wartość stałej Michaelisa-Menten (K_m). Jedynie w przypadku niższego stężenia od wartości K_m szybkość metabolizmu będzie liniowa w trakcie inkubacji. Ze względu na częsty brak informacji o wartości stałej Michaelisa-Menten na początku badań, stężenia powinny być jak najniższe. Z reguły stężenie to jest ograniczone oznaczalnością używanej metody analitycznej. W przypadku używanej w badaniach stabilności chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, używane stężenia nie wykraczają poza zakres 1-3 μM , które są najczęściej niższe niż wartość K_m większości związków.

5. Brak obecności niespecyficycznych białek, które mogłyby wiązać badane substancje. Zminimalizowanie obecności białek w próbce wymaga przeprowadzenia inkubacji przy stężeniu białek mikrosomalnych w zakresie 0,1-0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, bądź 1×10^6 komórek/mL w przypadku używania hepatocytów.

6. Brak czynników powodujących inaktywację enzymów metabolicznych, np. nadmiaru rozpuszczalników organicznych [31].

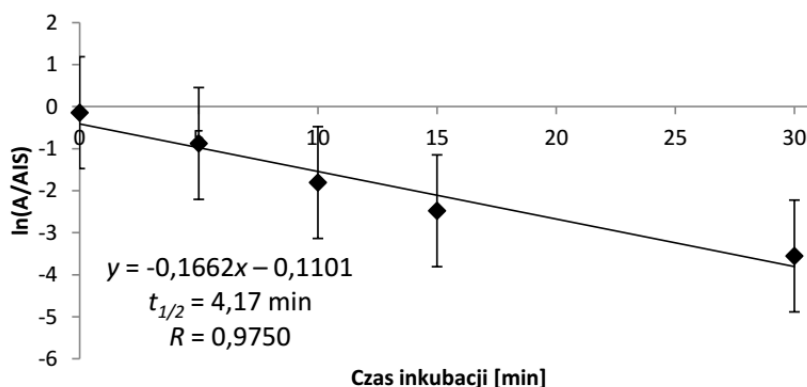
4. Wyznaczanie mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$)

Jednym z wymogów stworzenia modelu służącego do przewidywania stabilności metabolicznej jest jej przedstawienie w postaci wartości liczbowej. Parametrem opisującym stabilność metaboliczną jest mikrosomalny czas półtrwania ($t_{1/2}$). W celu wyznaczenia jego wartości, w trakcie prowadzenia inkubacji w buforze fosforanowym w obecności mikrosomów wątrobowych, w określonych odstępach czasowych pobierana jest próbka mieszaniny inkubacyjnej. Reakcja zatrzymywana jest poprzez dodanie pobranej próbki do roztworu acetonitrylu zawierającego wzorec wewnętrzny (chlorowoderek buspironu o stężeniu $5 \mu\text{M}$). Tak przygotowana próbka jest odwirowywana, a roztwór nad osadu analizowany przy pomocy chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Zmniejszenie stężenia związku w trakcie trwania reakcji jest obserwowane w czasie (w przypadku badanej grupy pochodnych arylopiiperazyny przez 30 min inkubacji). Przykładowy wykres (Rycina 3) przedstawia zmniejszenie stężenia badanego związku chemicznego w trakcie trwania inkubacji.



Rycina 3. Wykres przedstawiający zmniejszenie stężenia badanego związku chemicznego pod wpływem reakcji biotransformacji z udziałem enzymów mikrosomalnych wątroby ludzkiej.

Aby oszacować wartość $t_{1/2}$, niezbędny jest wykres przedstawiający zależność wyrażonego logarytmicznie stosunku powierzchni piku związku (A) do powierzchni piku wzorca wewnętrznego (AIS) w funkcji czasu inkubacji. Wartością krytyczną do oszacowania wartości $t_{1/2}$ jest nachylenie powstałej krzywej. Rycina 4 na przykładzie związku DEP 3 przedstawia gotowy wykres służący do obliczenia wartości $t_{1/2}$.



Rycina 4. Wykres pozwalający na obliczenie wartości mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$) wyznaczonego w warunkach *in vitro* (na przykładzie związku DEP 3).

Model regresji przyjmuje postać równania liniowego ($y = ax + b$). Dla związku DEP 3 wyraża się on następująco:

$$y = -0,1662x - 0,1101$$

gdzie a (nachylenie krzywej) jest wartością gradientu używaną do dalszych obliczeń według zależności:

$$\text{stała szybkości eliminacji } (k) = -\text{gradient}$$

Stąd, dla związku DEP 3: $k = 0,1662$

Wzór na obliczenie wartości mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$) to:

$$(t_{1/2}) = \ln(2) / k = 0,693 / k = 0,693 / 0,1662 = 4,17 \text{ [min]}$$

Przedstawiony eksperyment musi zostać powtórzony przynajmniej dwa razy w celu uzyskania średniej wartości mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$) o możliwie niskich wartościach odchylenia standardowego [P1].

5. Wyjaśnienie idei integracji podejścia *in vitro* oraz *in silico*

W celu dokładnego przedstawienia roli, jaką odgrywa analiza chemometryczna, należy zrozumieć założenia kryjące się za tworzeniem modeli służących do przewidywania stabilności metabolicznej. Badania będące tematem pracy doktorskiej są podzielone na trzy etapy. Pierwszy etap to oszacowanie stabilności metabolicznej w warunkach *in vitro* oraz identyfikacja powstałych produktów metabolizmu. Najbardziej popularna procedura laboratoryjna zakłada inkubację badanych pochodnych z enzymami (np. mikrosomami z ludzkiej wątroby lub hepatocytami) [32]. Związki po inkubacji poddawane są analizie ilościowej (dla oszacowania wartości $t_{1/2}$ opisującej stabilność metaboliczną). Analiza ta umożliwia ocenę, w jakim stopniu stężenie leku zmniejsza się w mieszaninie inkubacyjnej przez czas trwania inkubacji. Najczęściej wybieraną techniką analityczną przy tego typu analizach służących ocenie stężenia leku jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas.

Kolejnym etapem po oszacowaniu stabilności metabolicznej lub identyfikacji powstałych produktów metabolizmu jest podejście *in silico*. Badane związki muszą zostać przedstawione w postaci modeli trójwymiarowych, które są optymalizowane geometrycznie przy pomocy oprogramowania do modelowania molekularnego, takiego jak np. HyperChem lub Gaussian. Tak zoptymalizowane, trójwymiarowe struktury z dużym prawdopodobieństwem oddają konformację cząsteczki obecną w naturze, umożliwiając dalszą analizę przy pomocy technik chemometrycznych. Stworzone struktury zostają poddane wyliczeniu deskryptorów molekularnych przez służące temu oprogramowanie, np. Dragon. Wartości deskryptorów molekularnych umożliwiają przedstawienie właściwości fizykochemicznych badanych cząsteczek w postaci liczbowej, przez co są niezbędnym elementem składowym tworzenia ilościowego modelu stabilności metabolicznej.

Trzeci etap zakłada właściwą integrację obu podejść (*in vitro* oraz *in silico*) i zasadnicze tworzenie modelu. Aby stworzyć model, wyniki z etapu *in vitro* (wartości stabilności metabolicznej wyrażone w postaci mikrosomalnego czasu półtrwania wyznaczonego w warunkach *in vitro*) są integrowane z wartościami deskryptorów molekularnych pochodzącymi z etapu *in silico*. To skutkuje stworzeniem zbioru danych umożliwiającego stworzenie modelu z użyciem odpowiednich technik chemometrycznych. Zbiór danych zostaje poddany analizie chemometrycznej mającej na celu znalezienie zależności pomiędzy wartościami $t_{1/2}$ wyznaczonego w warunkach *in vitro* (miara stabilności metabolicznej) oraz

wartościami deskryptorów molekularnych (będących liczbową reprezentacją właściwości fizykochemicznych cząsteczki). Opisane podejście skutkuje stworzeniem modelu zdolnego do przewidywania wartości opisujących stabilność metaboliczną.

II. Cel pracy

Celem badań będących przedmiotem prezentowanej rozprawy doktorskiej było opracowanie procedury wyznaczania stabilności metabolicznej włączającej analizę chemometryczną dla pochodnych arylopiperazyny, umożliwiającą ustalenie ilościowych zależności struktura-stabilność metaboliczna (ang. *quantitative structure-metabolic stability relationships*, QSMSR). Ponadto, dodatkowym celem badań było modelowanie zależności struktura-stabilność metaboliczna w sposób nie ilościowy, porównując struktury oraz wyznaczone wartości stabilności dla pochodnych benzenosulfonamidu.

Cel podstawowy pracy został osiągnięty poprzez realizację następujących zadań:

1. wyznaczenie mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$) w warunkach *in vitro* dla 30 pochodnych arylopiperazyny, pozyskanych w wyniku współpracy z Katedrą i Zakładem Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,
 - a) stworzenie oraz optymalizacja geometryczna komputerowych modeli badanych związków wraz z wyliczeniem ich deskryptorów molekularnych,
 - b) stworzenie macierzy integrujących wartości mikrosomalnego czasu półtrwania i deskryptorów molekularnych
2. analiza porównawcza trzech technik chemometrycznych używanych do tworzenia modeli predykcyjnych: regresji wielorakiej (ang. *multiple linear regression*, MLR), ortogonalnych częściowych najmniejszych kwadratów (ang. *orthogonal partial least squares*, OPLS) oraz metody wektorów nośnych (ang. *support vector machines*, SVM),
 - a) stworzenie modelu predykcyjnego przy użyciu techniki, która wykazywała najwyższą zdolność prognostyczną podczas analizy porównawczej,
 - b) porównanie wartości przewidywanych przez model oraz wartości uzyskanych podczas eksperymentów *in vitro*,
3. Wyznaczenie wartości mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$) dla 10 pochodnych benzenosulfonamidu (pozyskanych w wyniku współpracy z Katedrą i Zakładem Chemii Organicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)
 - a) wykonanie analizy zależności między strukturą chemiczną związków a oszacowaną stabilnością metaboliczną.

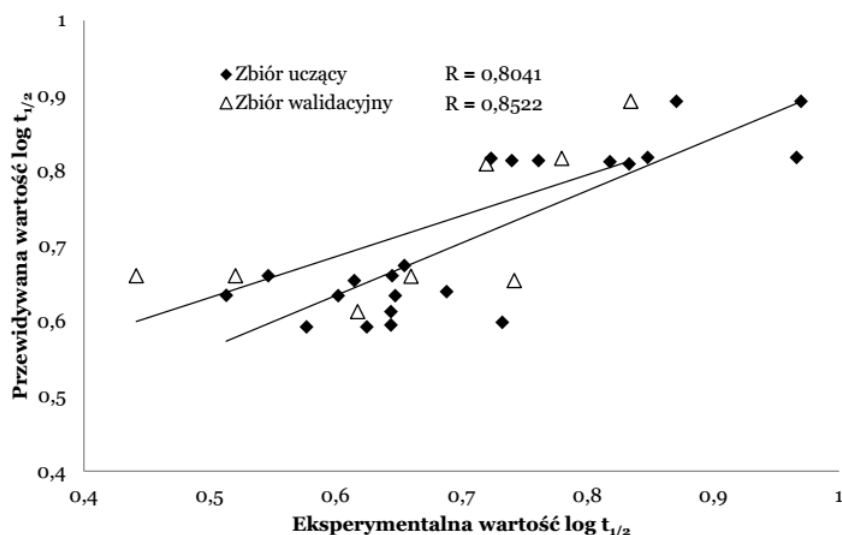
III. Wyniki

1. Porównanie metody regresji wielorakiej, metody ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów oraz metody wektorów nośnych podczas modelowania stabilności metabolicznej

W celu wybrania najbardziej optymalnej techniki chemometrycznej do modelowania stabilności metabolicznej zdecydowano się na porównanie trzech metod używanych do tworzenia modeli predykcyjnych: metody regresji wielorakiej (MLR), metody ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów (OPLS) oraz metody wektorów nośnych (SVM). Do analizy przystąpiono po wyznaczeniu mikrosomalnych czasów półtrwania *in vitro* dla 30 pochodnych arylopiperazyny, oraz po stworzeniu i optymalizacji trójwymiarowych modeli badanych cząsteczek.

Do przeprowadzenia porównania technik, wartości mikrosomalnego czasu półtrwania winny spełniać warunek normalnego rozkładu. Po przetransformowaniu wartości przy pomocy funkcji $y = \log(x)$, normalność rozkładu potwierdzono testem Shapiro-Wilka ($p > 0,05$).

Gotowa do analizy macierz danych (powstała z połączenia wartości mikrosomalnego czasu półtrwania oraz wartości deskryptorów strukturalnych) poddano procedurze doboru zmiennych z pakietu Data Mining oprogramowania Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Dobór zmiennych pozwolił na ograniczenie ilości deskryptorów wchodzących w skład modelu z 2787 do 4, wybranych pod kątem istotności statystycznej. Kolejnym etapem było właściwe tworzenie modeli oraz ocena zdolności predykcyjnej uwzględniając współczynnik korelacji dla zbioru walidacyjnego oraz wartości błędu średniokwadratowego. Walidację stworzonych modeli oparto na zewnętrznym zbiorze, składającym się z 8 tych samych związków dla wszystkich 3 modeli.



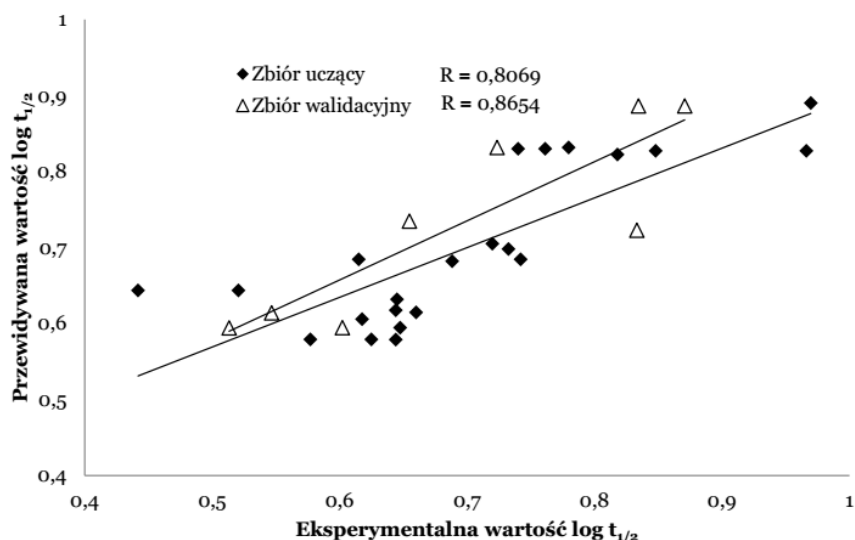
Rycina 5. Korelacja pomiędzy wartościami eksperymentalnymi $\log t_{1/2}$ i przewidywanymi przy użyciu modelu stworzonego metodą regresji wielorakiej.

$$\log t_{1/2} = 0,99 \cdot 0,0178 + (0,0807 \cdot \text{Eig Ea}(\text{bo})) - (0,1257 \cdot \text{Eig10 EA}(\text{bo}))$$

$$n = 30 \quad R = 0,8041 \quad R^2 = 0,6466 \quad F = 10,97 \quad p = 2,5 \cdot 10^{-4} \quad s = 0,225$$

Równanie 1. Równanie regresji stworzone przy użyciu metody MLR.

Model stworzony techniką regresji wielorakiej charakteryzował się najmniej satysfakcjonującymi parametrami spośród wszystkich trzech stworzonych modeli. Współczynniki korelacji wynosiły odpowiednio: $R = 0,8041$ dla zbioru uczącego oraz $R = 0,8522$ dla zbioru walidacyjnego. Wartości pierwiastka błędu średniokwadratowego dla zbioru uczącego wyniosły odpowiednio: $\text{RMSE} = 0,0748$ dla zbioru uczącego oraz $\text{RMSE} = 0,0654$ dla zbioru walidacyjnego. Pomimo zalet, jakie niesie użycie regresji wielorakiej (obecność równania pozwalającego na ocenę stopnia, w jakim poszczególne deskryptory wpływają na stabilność metaboliczną), wyniki predykcji wartości mikrosomalnego czasu półtrwania nie są zadowalające.



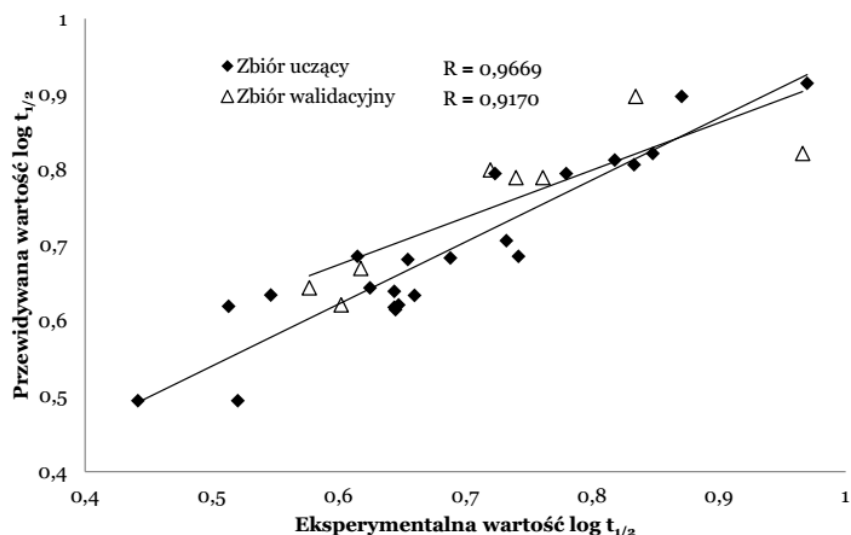
Rycina 6. Korelacja pomiędzy wartościami eksperymentalnymi $\log t_{1/2}$ i przewidywanymi z użyciem modelu stworzonego metodą ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów.

$$\log t_{1/2} = 0,6993 - (0,0213 \text{ SpMax AEA(ri)} - (0,1213 \text{ Eig10 EA(bo)}) - (0,0773 \text{ Eig11 EA(bo)} - 0,0213 \text{ Eig01 AEA(ri)})$$

$$n = 30 \quad R = 0,8069 \quad R^2 = 0,6510 \quad p = 0,05$$

Równanie 2. Równanie regresji stworzone przy użyciu techniki OPLS.

Dla modelu stworzonego metodą ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów (przy pomocy oprogramowania SIMCA 13.0.3) parametry statystyczne okazały się lepsze niż w przypadku modelu stworzonego przy pomocy regresji wielorakiej. Współczynnik korelacji dla zbioru uczącego i walidacyjnego wyniósł odpowiednio: $R = 0,8069$ oraz $R = 0,8654$. Pierwiastek błędu średniokwadratowego dla zbioru uczącego przyjął wartość $RMSE = 0,0730$, a dla zbioru walidacyjnego $RMSE = 0,0740$. Główną różnicą przemawiającą na korzyść modelu wykonanego przy pomocy techniki OPLS jest bardziej kompletne równanie, w skład którego wchodzi wszystkie 4 deskryptory. W przypadku równania dla modelu wykonanego techniką MLR, równanie składało się jedynie z 2 z 4 wybranych deskryptorów (przy 3 i więcej zastosowanych deskryptorach równanie było nieistotne statystycznie).



Rycina 7. Korelacja pomiędzy wartościami $\log t_{1/2}$ eksperymentalnymi i przewidywanymi przy użyciu modelu stworzonego metodą wektorów nośnych.

Model stworzony przy wykorzystaniu metody wektorów nośnych wykazał się najlepszymi parametrami spośród porównywanych technik. Współczynnik korelacji dla zbioru uczącego wyniósł $R = 0,9669$, zaś dla zbioru walidacyjnego $R = 0,9170$. Pierwiastek błędu średniokwadratowego przyjął wartość $RMSE = 0,0456$ dla zbioru uczącego oraz $RMSE = 0,0724$ dla zbioru walidacyjnego. Porównując z pozostałymi modelami, model wykonany przy pomocy metody SVM charakteryzuje się lepszym dopasowaniem danych do modelu oraz mniejszymi wartościami pierwiastka błędu średniokwadratowego (ukazującymi mniejszą różnicę między wartościami przewidywanymi przez model, a wartościami wyznaczonymi eksperymentalnie). Jest on najbardziej satysfakcjonujący.

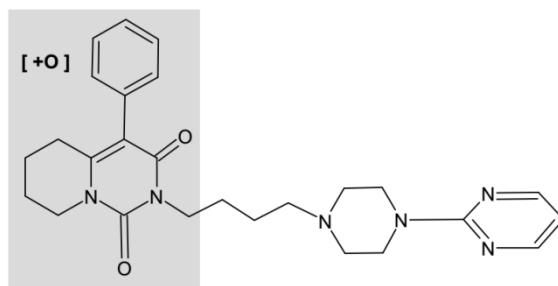
Wyniki tych badań zostały opisane w publikacji: S. Ulenberg, M. Belka, T. Bączek Comparison of MLR, OPLS, and SVM as potent chemometric techniques used to estimate *in vitro* metabolic stability, *Journal of Chemometrics*, 30 (2016) 177-181.

2. Model predykcyjny mikrosomalnego czasu półtrwania *in vitro* wyprowadzony z użyciem metody wektorów nośnych oraz ocena ścieżek metabolicznych pochodnych arylopieryzyny

Przeprowadzona wcześniej analiza porównawcza udowodniła, że metoda wektorów nośnych może być rozważona jako technika wiodąca w przypadku przewidywania wartości mikrosomalnego czasu półtrwania dla pochodnych arylopieryzyny. W skład ostatecznego modelu weszło 6 deskryptorów z grupy *edge adjacency indices*, mianowicie Eig11_EA(bo), Eig10_EA(bo), SpMax_AEA(ri), Eig01_AEA(ri), SpDiam AEA (ri), SpMax EA , będące deskryptorami opisującymi topologię cząsteczki. Współczynniki korelacji gotowego modelu wyniosły $R = 0,9369$ dla zbioru uczącego oraz $R = 0,8440$ dla zbioru walidacyjnego.

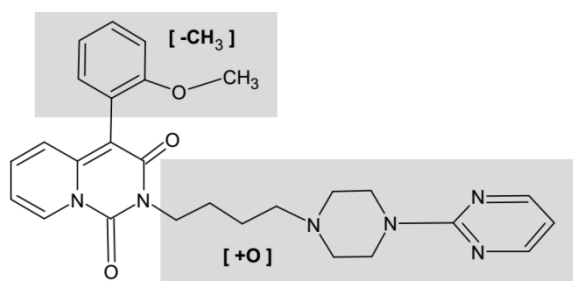
Oprócz analizy ilościowej, umożliwiającej wyznaczenie mikrosomalnych czasów półtrwania, zdecydowano się również na wykonanie analizy jakościowej przy użyciu techniki LC-Q-TOF-MS/MS. Analiza jakościowa pozwoliła na zidentyfikowanie powstających metabolitów (co umożliwiło ustalenie typów reakcji biotransformacji jakim ulegają badane pochodne), oraz wskazanie w strukturach badanych pochodnych fragmentów najbardziej podatnych na reakcje metaboliczne.

Najpopularniejszym typem reakcji biotransformacji, zaobserwowanym w każdym z badanych związków była reakcja hydroksylacji w części farmakoforowej. Analiza uzyskanych widm ujawniła fragmenty części farmakoforowej z masą cząsteczkową zwiększoną o 16 Da, wskazując na utlenienie. Drugim najbardziej popularnym typem reakcji biotransformacji była addycja wody połączona z redukcją nienasyconego pierścienia w niefarmakoforowej części cząsteczki, skutkująca zwiększeniem masy fragmentu o 34 Da. Mniej popularna reakcja biotransformacji, mianowicie hydroksylacja części niefarmakoforowej została zaobserwowana w przypadku metabolitów M1 i M2 związku DEP30.



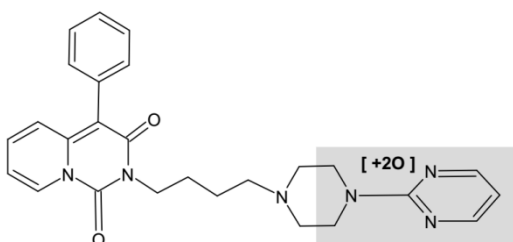
Rycina 8. Struktura związku DEP30. Szary prostokąt ukazuje obszar cząsteczki, który podlega reakcji hydroksylacji.

Analiza widm dla metabolitu M3 związku DEP11 wskazuje na reakcję *O*-demetylacji zachodzącą wspólnie z hydroksylacją w części farmakoforowej.



Rycina 9. Struktura związku DEP11. Szary prostokąt ukazuje obszary cząsteczki, które podlegają reakcji *O*-demetylacji oraz hydroksylacji.

Najbardziej obserwowaną reakcją biotransformacji była podwójna hydroksylacja w części niefarmakoforowej cząsteczki, obserwowana dla metabolitu M3 związku DEP6.













Rycina 10. Struktura związku DEP6. Szary prostokąt ukazuje obszar cząsteczki, które podlegają reakcji podwójnej hydroksylacji.

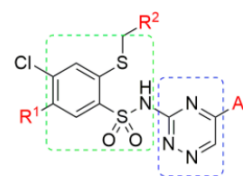
Wyniki tych badań zostały opisane w publikacji: S. Ulenberg, M. Belka, M. Król, F. Herold, W. Hewelt-Belka, A. Kot-Wasik, T. Bączek, Prediction of overall *in vitro* microsomal stability of drug candidates based on molecular modeling and support vector machines. Case study of novel arylpiperazines derivatives, *PLOS ONE*, 10 (2015) 1-16.

3. Ocena zależności struktura-stabilność metaboliczna na przykładzie pochodnych benzenosulfonamidu

Ocena zależności między stabilnością metaboliczną a strukturą chemiczną związków nie zawsze wymaga stworzenia modelu ilościowego. W przypadku małych grup związków, dla których wyznaczono wartość mikrosomalnego czasu półtrwania w warunkach *in vitro*, stworzenie rzetelnego i istotnego modelu jest trudne ze względu na zbyt małą ilość przypadków. W takich grupach związków możliwe jest wykonanie klasycznego, bezpośredniego porównania wartości mikrosomalnego czasu półtrwania ze strukturami chemicznymi badanych pochodnych, bez użycia technik chemometrycznych. Przykładem takiego podejścia jest ocena zależności między strukturą chemiczną a stabilnością metaboliczną (ang. *structure-metabolic stability relationships*, SMSR) pochodnych benzenosulfonamidu, będących kandydatami na nowe leki przeciwnowotworowe.

Porównaniu poddano grupę 10 najbardziej aktywnych pochodnych, spośród wszystkich trzydziestu trzech pochodnych benzenosulfonamidu biorących udział w badaniu. Substancje poddano procedurze wyznaczenia wartości mikrosomalnego czasu półtrwania w warunkach *in vitro*. Struktury związków oraz wartości mikrosomalnych okresów biologicznego półtrwania przedstawia rycina 11.

Związek	R ¹	R ²	Ar	Mikrosomalny czas półtrwania w warunkach <i>in vitro</i> (min)
30	Me	Ph		24,9
31	Me	Ph		17,6
34	Me	4-CF ₃ -C ₆ H ₄		> 60 (154)
35	Me	4-CF ₃ -C ₆ H ₄		42,4
36	Me	1-naftyl		13,9
37	Me	1-naftyl		32,8
38	Me	1-naftyl		< 5
46	4-Cl-C ₆ H ₄ -NHCO	Ph		> 60 (78,1)
47	4-Cl-C ₆ H ₄ -NHCO	Ph		17,5
52	4-Me-C ₆ H ₄ -NHCO	Ph		26,5



Rycina 11. Struktura badanych pochodnych benzenosulfonamidu wraz z wyznaczonymi w warunkach *in vitro* biologicznymi czasami półtrwania.

Porównanie wartości obrazujących stabilność metaboliczną ze strukturami chemicznymi pochodnych benzenosulfonamidu biorących udział w badaniu pozwoliło na sformułowanie następujących wniosków.

Najbardziej stabilna pochodna (związek nr 34) posiada podstawnik 4-tri-fluoro-metylo-fenyloyowy zarówno w pozycji R¹ jak i Ar. Wymiana podstawnika 4-tri-fluoro-metylo-fenyloyowego na 4-metoksy-fenyloyowy w pozycji Ar (związek nr 35) zaowocowało skróceniem t_{1/2} z ponad 60 min do średniej wartości 42,4 min. Analogiczna wymiana podstawników w związkach 46 i 47 spowodowała zmniejszenie wartości t_{1/2} z powyżej 60 min do 17,5 min. Biorąc pod uwagę kolejne związki (związek 30) z podstawnikiem 3-metoksy-fenyloyowym w pozycji Ar, oraz 31 (podstawnik 3,4-di-metoksy-fenyloyowy w pozycji Ar) zauważono wpływ dodatkowej grupy metoksyloyowej na skrócenie mikrosomalnego czasu połtrwania. Opisanie obserwacje sugerują, że obecność grupy metoksyloyowej w określonych pozycjach wywiera niekorzystny wpływ na stabilność metaboliczną badanych substancji i może być zmniejszony poprzez wymianę grupy metoksyloyowej na tri-fluoro-metylową.

Porównanie wartości t_{1/2} dla związków 34 (podstawnik 4-tri-fluoro-metylowo-fenyloyowy w pozycji R¹) i 37 (podstawnik 1-naftyloyowy w pozycji R¹) wykazało negatywny wpływ grupy 1-naftyloyowej na stabilność metaboliczną badanych pochodnych. Zaobserwowano również kumulację wpływów podstawnika 1-naftyloyowego w pozycji R¹ oraz 4-metoksy-fenyloyowego w pozycji Ar w przypadku związku 38, który charakteryzował się najmniejszą wartością t_{1/2} wśród badanych pochodnych.

Wyniki tych badań zostały opisane w publikacji: B. Żołnowska, J. Sławiński, A. Pogorzelska, K. Szafranski, A. Kawiak, G. Stasiłojć, M. Belka, S. Ulenberg, T. Bączek, J. Chojnacki. Novel 5-substituted 2-(arylmethylthio)-4-chloro-N-(5-aryl-1,2,4-triazin-3-yl) benzenesulfonamides: synthesis, molecular structure, anticancer activity, apoptosis-inducing activity and metabolic stability, *Molecules*, 21 (2016) 1-27.

IV. Wnioski

Podczas realizacji zadań badawczych wchodzących w tok przedstawionej pracy stworzono model matematyczny zdolny do przewidywania wartości mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$) wyznaczonego w warunkach *in vitro*, opisujących stabilność metaboliczną badanych pochodnych arylopiiperazyny.

Wybór najbardziej optymalnej techniki chemometrycznej, mającej posłużyć w dalszym etapie do stworzenia właściwego modelu, opierał się na wykonaniu analizy porównawczej dla trzech technik chemometrycznych. Analiza obejmowała modele wyprowadzane z użyciem metody regresji wielorakiej (MLR), metody ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów (OPLS) oraz metody wektorów nośnych (SVM). Wartościami użytymi do porównania były współczynniki korelacji dla zbioru uczącego i walidacyjnego oraz wartości pierwiastka błędu średniokwadratowego. Wśród trzech porównywanych technik, najlepszymi parametrami predykcyjnymi jednoznacznie wyróżniała się metoda wektorów nośnych (SVM) [P2].

Metoda wektorów nośnych (SVM) została następnie użyta do wyprowadzenia modelu matematycznego. Model został stworzony w oparciu o sześć najbardziej istotnych statystycznie deskryptorów molekularnych. Walidację wykonano w oparciu o zbiór walidacyjny, składający się z ośmiu losowo wybranych związków. Współczynniki korelacji wyniosły $R = 0,9369$ dla zbioru uczącego oraz $R = 0,8440$ dla zbioru walidacyjnego. Wymienione wartości współczynnika korelacji świadczą o dobrej jakości modelu oraz jego wysokiej zdolności prognostycznej. Pozwala to wnioskować o użyteczności metody wektorów nośnych w modelowaniu zależności struktura-stabilność metaboliczna oraz tworzeniu regresyjnych modeli prognostycznych pozwalających na przewidywanie wartości mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$) [P1].

Opisana procedura badania stabilności metabolicznej została również wykorzystana w wyznaczeniu mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$) dla wybranych pochodnych benzenosulfonamidu. Wyznaczone wartości $t_{1/2}$ dla zestawu dziesięciu najbardziej aktywnych pochodnych zostały porównane ze strukturami badanych substancji. Zestawienie stabilności metabolicznej oraz struktur chemicznych pozwoliło na wytypowanie podstawników chemicznych mających negatywny wpływ na stabilność metaboliczną. Wnioski te pozwalają na uzyskanie w przyszłości pochodnych o zmniejszonej podatności na reakcje biotransformacji [P3].

V. Bibliografia

1. L. Di, The role of drug metabolizing enzymes in clearance, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 10 (2014) 379-393.
2. L. Wienkers, T. Heath, Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data, *Nat Rev Drug Discov*, 4 (2005) 825-833.
3. O. Pelkonen, M. Turpeinen, J. Uusitalo, A. Rautio, H. Raunio, Prediction of drug metabolism and interactions on the basis of *in vitro* investigations, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 96 (2005) 167-175.
4. S. Coecke, H. Ahr, B. Blaauboer, S. Bremer, S. Casati, J. Castell, R. Combes, R. Corvi, C. Crespi, M. Cunningham, G. Elaut, B. Eletti, A. Freidig, A. Gennari, J. Ghersi-Egea, A. Guillouzo, T. Hartung, P. Hoet, M. Ingelman-Sundberg, S. Munn, W. Janssens, B. Ladstetter, D. Leahy, A. Lon, A. Meneguz, M. Monshouwer, S. Morath, F. Nagelwerke, O. Pelkonen, J. Ponti, P. Prieto, L. Richert, E. Sabbioni, B. Schaack, W. Steiling, E. Testai, J. Vericat, A. Worth, Metabolism: A bottleneck in *in vitro* toxicological test development – The report and recommendations of ECVAM workshop 54, *Altern Lab Anim*, 34 (2006) 49-84
5. P. Eddershaw, A. Beresfords, M. Bayliss, ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery, *Drug Discov. Today*, 5 (2000) 409-414.
6. C. Masimirembwa, U. Bredberg, T. Andersson, Metabolic stability for drug discovery and development: pharmacokinetic and biochemical challenges, *Clin Pharmacokinet*, 42 (2003) 515-528.
7. I. Kola, J. Landis, Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?, *Nat Rev Drug Discov*, 3 (2004) 711-715.
8. I. Khanna, Drug discovery in pharmaceutical industry: Productivity challenges and trends, *Drug Discov. Today*, 17 (2012) 1088-1102.
9. T. Thompson, Optimization of metabolic stability as a goal of modern drug design, *Med Res Rev*, 21 (2001) 412-449.
10. K. Jenkins, R. Angeles, M. Quintos, R. Xu, D. Kassel, R. Rourick, Automated high throughput ADME assays for metabolic stability and cytochrome P450 inhibition profiling of combinatorial libraries, *J Pharm Biomed Anal*, 34 (2004) 989-1004.
11. D. O'Connor, R. Mortishire-Smith, D. Morrison, A. Davies, M. Dominguez, Ultra-performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for robust, high-throughput quantitative analysis of an automated metabolic stability

- assay, with simultaneous determination of metabolic data, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20 (2006) 851-857.
12. J. Ansele, D. Thakker, High-throughput screening for stability and inhibitory activity of compounds toward cytochrome P450-mediated metabolism, *J Pharm Sci*, 93 (2004) 239-255.
 13. M. Peach, A. Zakharov, R. Liu, A. Pugliese, G. Tawa, A. Wallqvist, M. Nicklaus, Computational tools and resources for metabolism-related property predictions. 1. Overview of publicly available (free and commercial) databases and software. *Future Med Chem*, 4 (2012) 1907-1932.
 14. Y. Sakiyama, H. Yuki, T. Moriya, K. Hattori, M. Suzuki, K. Shimada, T. Honma, Predicting human liver microsomal stability with machine learning techniques, *J. Mol. Graph. Model.*, 26 (2008) 907-915.
 15. E. Carosati, Modelling cytochromes P450 binding modes to predict P450 inhibition, metabolic stability and isoform selectivity, *Drug Discov Today Technol*, 10 (2013) 167-175.
 16. World Health Organization. Depression: Fact sheet, European Brain Council, 2017, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/> dostę: 27.06.2017
 17. R. Perry, M. Cassagnol, Desvenlafaxine: A new serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor for the treatment of adults with major depressive disorder, *Clin Ther*, 31 (2009) 1374-1404.
 18. K. Starr, G. Price, J. Watson, P. Atkinson, R. Arban, S. Melotto, L. Dawson, J. Hagan, N. Upton, M. Duxon, SB-649915-B, a novel 5-HT_{1A/B} autoreceptor antagonist and serotonin reuptake inhibitor, is anxiolytic and displays fast onset activity in the rat high light social interaction test, *Neuropsychopharmacology*, 32 (2007) 2163-2172.
 19. F. Artigas, V. Perez, E. Alvarez, Pindolol induces a rapid improvement of depressed patients treated with serotonin reuptake inhibitors, *Arch. Gen. Psychiatry*, 51 (1994) 548-251.
 20. R. Glennon, M. Dukat, R. Westkaemper, Serotonin receptors and ligands, *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*, Raven Press, New York, 2000.
 21. R. Howland, Buspirone: back to the future, *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*, 53 (2015) 21-24.

22. H. Irannejad, M. Amini, F. Khodaghi, N. Ansari, S. Tusi, M. Sharifzadeh, A. Shafiee, Synthesis and *in vitro* evaluation of novel 1,2,4-triazine derivatives as neuroprotective agents, *Bioorg. Med. Chem.*, 18 (2010) 4224-4230.
23. G. Guerrini, G. Ciciani, G. Cambi, F. Bruni, S. Selleri, F. Melani, M. Montali, C. Martini, C. Ghelardini, M. Norcini, A. Constanzo, Novel 3-arylopyrazolo[5,1-c][1,2,4]benzotriazine 5-oxides 8-substituted, ligands at GABAA/benzodiazepine receptor complex: Synthesis, pharmacological and molecular modeling studies. *Bioorg. Med. Chem.*, 16 (2008) 4471-4489.
24. É. Szarics, Z. Riedl, L. Nyikos, G. Hajós, J. Kardos, Interaction of novel condensed triazine derivatives with central and peripheral type benzodiazepine receptors: synthesis, *in vitro* pharmacology and modelling, *Eur J Med Chem*, 41 (2006) 445-456.
25. M. Congreve, S. Andrews, A. Doré, K. Hollenstein, E. Hurrell, C. Langmead, J. Mason, I. Ng, B. Tehan, A. Zhukov, M. Weir, F. Marshall, Discovery of 1,2,4-triazine derivatives as adenosine A(2A) antagonists using structure based drug design, *J. Med. Chem.*, 55 (2012) 1898-903.
26. C. Liu, J. Lin, S. Wroblewski, S. Lin, J. Hynes, H. Wu, A. Dyckman, T. Li, J. Wityak, K. Gillooly, S. Pitt, D. Shen, R. Zhang, K. McIntyre, L. Salter-Cid, D. Shuster, H. Zhang, P. Marathe, A. Doweyko, J. Sack, S. Kiefer, K. Kish, J. Newitt, M. McKinnon, J. Dodd, J. Barrish, G. Schieven, K. Leftheris, Discovery of 4-(5-(cyclopropylcarbamoyl)-2-methylphenylamino)-5-methyl-N-propylpyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazine-6-carboxamide (BMS-582949), a clinical p38 α MAP kinase inhibitor for the treatment of inflammatory diseases, *J. Med. Chem.*, 53 (2010) 6629-6639.
27. K. Sztanke, K. Pasternak, B. Rajtar, M. Sztanke, M. Majek, M. Polz-Dacewicz, Identification of antibacterial and antiviral activities of novel fused 1,2,4-triazine esters, *Bioorg. Med. Chem.*, 15 (2007) 5480-5486.
28. J. Sławiński, M. Gdaniec, Synthesis, molecular structure, and *in vitro* antitumor activity of new 4-chloro-2-mercaptobenzenesulfonamide derivatives, *Eur J Med Chem*, 40 (2005) 377-389.
29. R. Riley, K. Grime, Metabolic screening *in vitro*: metabolic stability, CYP inhibition and induction, *Drug Discov Today Technol*, 4 (2004) 365-372.
30. K. Venkatakrisnan, L. von Moltke, R. Obach, D. Greenblatt, Drug metabolism and drug interactions: Application and clinical value of *in vitro* models, *Curr. Drug Metab.*, 4 (2003) 423-459.

31. P. Baranczewski, A. Stanczak, K. Sundberg, R. Svensson, A. Wallin, J. Jansson, P. Garberg, H. Postlind, Introduction to *in vitro* estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development, *Pharmacol Rep*, 58 (2006) 453-472.
32. R. 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.