Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

NOWE *N*-PODSTAWIONE BENZENOSULFONAMIDY – SYNTEZA, STRUKTURA I AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA

Beata Żołnowska

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2018

SPIS TREŚCI

1. IMIĘ i NAZWISKO 3
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE 3
3. DOTYCHCZASOWE ZATRUDNIENIE W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH 3
4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311) 3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego 3
4.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji 3
4.3. Opis badań i wyników stanowiących podstawę habilitacji 5
4.3.1. Wprowadzenie 5
4.3.2. Założenia i cel badań 10
4.3.3. Wyniki badań nad *N*-heterocyklicznymi oraz *N*-acylowymi pochodnymi benzenosulfonamidu 13
4.3.3.1. Synteza i struktura 13
4.3.3.2. Aktywność przeciwnowotworowa 21
4.3.3.3. Ilościowe zależności struktura-aktywność (QSAR) 24
4.3.3.4. Badanie apoptozy 28
4.3.3.5. Stabilność metaboliczna 30
4.3.4. Wyniki badań nad *N*-podstawionymi benzenosulfonamidami - potencjalnymi inhibitorami izoform IX i XII anhydrazy węglanowej 32
4.3.4.1. Synteza i struktura 32
4.3.4.2. Aktywność inhibicyjna wobec wybranych izoform hCA 34
4.3.4.3. Modelowanie molekularne 36
4.3.4.4. Aktywność przeciwnowotworowa 36
4.3.5. Podsumowanie 38
4.3.6. Piśmiennictwo 42
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH 46
5.1. Wykaz pozostałych publikacji w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (nie wchodzących w skład osiągnięcia wymienionego w pkt. 4.2.) 46
5.2. Badania naukowe realizowane przed uzyskaniem stopnia doktora 48
5.3. Badania naukowe realizowane po uzyskaniu stopnia doktora – współpraca naukowa 49
5.4. Liczbowe zestawienie dorobku 52
5.5. Udział w projektach badawczych 52
5.6. Nagrody i wyróżnienia 53
5.7. Komunikaty konferencyjne 53
5.8. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych posiadających „impact factor” 54
5.9. Członkostwo w krajowych organizacjach naukowych 54
5.10. Współpraca naukowa z innymi ośrodkami w Polsce i zagranicą 54
5.11. Inna działalność związana z pracą organizacyjną i naukowo-dydaktyczną 55

1. IMIĘ i NAZWISKO

Beata Żołnowska (nazwisko rodowe Szydłowska)

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

15.06.2004 **Magister chemii**
Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii
Specjalność: chemia organiczna
Tytuł pracy magisterskiej: „*Synteza potencjalnych inhibitorów katepsyny B zawierających ugrupowanie (E)-3-benzylosulfonyloakryloilowe*"
Promotor: dr Regina Kasprzykowska

02.12.2009 **Doktor nauk chemicznych**
Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii
Specjalność: chemia organiczna
Tytuł pracy doktorskiej: „*Synteza związków hamujących proces osteoklastogenezy*"
Promotor: prof. dr hab. Franciszek Kasprzykowski

3. DOTYCHCZASOWE ZATRUDNIENIE W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

2.08.2010 – 31.10.2012 **Asystent**
Katedra i Zakład Chemii Organicznej,
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,
Gdański Uniwersytet Medyczny

Od 01.11.2012 **Adiunkt**
Katedra i Zakład Chemii Organicznej,
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,
Gdański Uniwersytet Medyczny

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Nowe *N*-podstawione benzenosulfonamidy – synteza, struktura i aktywność przeciwnowotworowa

4.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji

Przedstawionym do oceny osiągnięciem jest cykl publikacji składający się z 7 prac opublikowanych w latach 2012–2018, o sumarycznych wskaźnikach oddziaływania: IF = 21,233, KBN/MNiSW = 220.

A1. Jarosław Sławiński, **Beata Żołnowska**, Czesława Orlewska, Jarosław Chojnacki. Synthesis, and molecular structure of novel 2-alkylthio-4-chloro-5-methyl-*N*-(5-oxo-4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenesulfonamides with potential anticancer activity. *Monatsh. Chem*. 143 (2012) 1705–1718
(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 1,629**, *punktacja* ***MNiSW*: 25**)

A2. **Beata Żołnowska**, Jarosław Sławiński, Aneta Pogorzelska, Jarosław Chojnacki, Daniela Vullo, Claudiu 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) 135-147

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 3,447**, *punktacja* ***MNiSW*: 40**)

A3. **Beata Żołnowska**, Jarosław Sławiński, Mariusz Belka, Tomasz Bączek, Anna Kawiak, Jarosław Chojnacki, Aneta Pogorzelska, Krzysztof Szafrański. Synthesis, molecular structure, metabolic stability and QSAR studies of a novel series of anticancer *N*-acylbenzenesulfonamides. *Molecules* 20 (2015) 19101-19129

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 2,465**, *punktacja* ***MNiSW*: 30**)

A4. **Beata Żołnowska**, Jarosław Sławiński, Aneta Pogorzelska, Krzysztof Szafrański, Anna Kawiak, Grzegorz Stasiłojć, Mariusz Belka, Szymon Ulenberg, Tomasz Bączek, Jarosław 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) 808

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 2,861**, *punktacja* ***MNiSW*: 30**)

A5. **Beata Żołnowska**, Jarosław Sławiński, Aneta Pogorzelska, Krzysztof Szafrański, Anna Kawiak, Grzegorz Stasiłojć, Mariusz Belka, Joanna Zielińska, Tomasz Bączek. Synthesis, QSAR studies, and metabolic stability of novel 2-alkylthio-4-chloro-*N*-(5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl)benzenesulfonamide derivatives as potential anticancer and apoptosis-inducing agents. *Chem. Biol. Drug Des.* 90 (2017) 380-396

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 2,328**, *punktacja* ***MNiSW*: 25**)

A6. **Beata Żołnowska**, Jarosław Sławiński, Krzysztof Szafrański, Andrea Angeli, Claudiu T. Supuran, Anna Kawiak, Miłosz Wieczór, Joanna Zielińska, Tomasz Bączek, Sylwia Bartoszewska. Novel 2-(2-arylmethylthio-4-chloro-5-methylbenzenesulfonyl)-1-(1,3,5-triazin-2-ylamino)guanidine derivatives: inhibition of human carbonic anhydrase cytosolic isozymes i and II and the transmembrane tumor-associated isozymes IX and XII, anticancer activity, and molecular modeling studies. *Eur. J. Med. Chem.* 143 (2018) 1931-1941

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 4,816**, *punktacja* ***MNiSW*: 40**)

A7. **Beata Żołnowska**, Jarosław Sławiński, Zdzisław Brzozowski, Anna Kawiak, Mariusz Belka, Joanna Zielińska, Tomasz Bączek, Jarosław Chojnacki. Synthesis, molecular structure, anticancer activity, and QSAR study of *N*-(aryl/heteroaryl)-4-(1*H*-pyrrol-1-yl)-benzenesulfonamide derivatives. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1482

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 3,687**, *punktacja* ***MNiSW*: 30**)

Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku nr 4 (*Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac*

zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki). Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku nr 7.

4.3. Opis badań i wyników stanowiących podstawę habilitacji

4.3.1. Wprowadzenie

Obecnie choroby nowotworowe są przyczyną co siódmego zgonu i stanowią większe zagrożenie dla życia niż AIDS, gruźlica i malaria łącznie. Według ustaleń Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem, w roku 2012 liczba zgonów spowodowanych nowotworami osiągnęła 8,2 miliona i przypuszcza się, że w 2030 roku liczba ta wzrośnie do 13 milionów w wyniku wzrostu i starzenia się ludności. Dane statystyczne dotyczące umieralności na nowotwory za 2012 rok wskazują, że główną przyczyną śmierci wśród mężczyzn są rak płuc (1 098 700 zgonów), wątroby (521 000), żołądka (469 000) i okrężnicy (373 600), natomiast wśród żeńskiej populacji rak piersi (521 900), płuc (491 200), szyjki macicy (320 300) i okrężnicy (265 700) [1].

Jedną z podstawowych metod leczenia nowotworów jest chemioterapia wykorzystująca leki cytotoksyczne o ogólnoustrojowym działaniu. To ogólnoustrojowe działanie leków cytotoksycznych obarczone jest jednak wadą z uwagi na uszkadzanie szybko dzielących się komórek zdrowych, np. szpiku kostnego, gamet czy komórek nabłonkowych. Konsekwencją takiej terapii są liczne działania niepożądane takie jak zmniejszenie odporności, mielosupresja, utrata owłosienia, nudności, wymioty, biegunki, jak również przerzuty i rozwój oporności komórek nowotworowych już po kilku cyklach terapeutycznych. Pomimo tego korzyści wynikające z chemioterapii są niezaprzeczalne i dają szansę na wyleczenie raka od kilku do nawet dziewięćdziesięciu procent, w zależności o typu nowotworu [2].

Głównym zadaniem chemioterapeutyku, jako środka przeciwnowotworowego jest indukowanie apoptozy lub pobudzanie funkcji apoptotycznych określonych białek. Apoptoza jest zaprogramowaną śmiercią komórki i umożliwia wyeliminowanie komórek uszkodzonych bądź nie funkcjonujących prawidłowo. W wielu typach nowotworów proces apopotozy jest zakłócony w wyniku mutacji genów kodujących białka pro-apoptotyczne lub promowania syntezy białek anty-apoptotycznych, prowadzących do niekontrolowanego wzrostu guza [3,4].

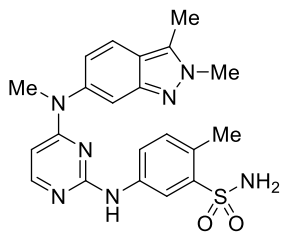
Pomimo wieloletnich wysiłków w obszarze projektowania zróżnicowanych molekuł nadal niewiele jest selektywnych cytostatyków, które mogą być stosowane klinicznie w sposób bezpieczny dla pacjenta. Opracowanie nowych, syntetycznych i aktywnych środków antyproliferacyjnych, które są bardziej selektywne pod względem cytotoksyczności wobec

komórek rakowych niż zdrowych jest niewątpliwie konieczne dla efektywnego leczenia ciężkich chorób nowotworowych.

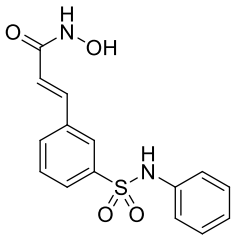
Poszukiwanie leków w oparciu o określony cel molekularny jest jedną z najbardziej popularnych strategii poszukiwań nowych chemioterapeutyków. W przypadku, kiedy znana jest struktura liganda endogennego dokonuje się jego modyfikacji strukturalnych w celu uzyskania selektywnego i silnego oddziaływania z celem molekularnym. Modyfikacje strukturalne często wspomagane są metodami dokowania molekularnego, które pozwalają na przewidywanie potencjalnych miejsc wiążących liganda do białka z uwzględnieniem struktury 3D [5]. Nie mniej ważną strategią w poszukiwaniu chemioterapeutyków jest podejście oparte na łączeniu w jednej cząsteczce bloków budulcowych, fragmentów znanych leków, struktur wiodących czy struktur typu „hit". Połączenie co najmniej dwóch ugrupowań farmakoforowych związków przeciwnowotworowych w pojedynczą substancję chemiczną zwaną hybrydą ma na celu uzyskanie synergistycznego działania o zwiększonej skuteczności w porównaniu do wyjściowych związków [6,7]. Wśród zalet hybrydy molekularnej należy wymienić wyższą aktywność ze względu na działanie na wiele celów molekularnych, minimalizację lekooporności i skutków ubocznych oraz poprawę właściwości farmakokinetycznych [7].

Sulfonamidy stanowią klasyczną grupę leków chemioterapeutycznych o szerokim spektrum działania farmakologicznego [8]. Historycznie klasa tych związków wywodzi się z sulfanilamidu, będącego strukturą wiodącą dla ważnych leków, takich jak przeciwbakteryjny sulfatiazol [9], przeciwjaskrowy acetazolamid [10], diuretyczny furosemid [11], hipoglikemiczny glibenklamid [12] czy przeciwwirusowy amprenawir [13]. Doniesienia literaturowe ostatnich lat pokazują, że pochodne sulfonamidów posiadają aktywność przeciwnowotworową *in vitro* i *in vivo* o różnych mechanizmach działania, włączając inhibicję anhydrazy węglanowej, hamowanie cyklu komórkowego w fazie G1, inhibicję polimeryzacji tubuliny czy hamowanie angiogenezy (inhibicja metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej) [14].

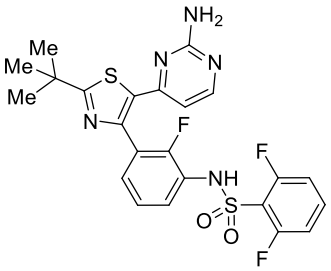
Wśród arylosulfonamidów o istotnym znaczeniu klinicznym w leczeniu nowotworów należy wymienić pazopanib, belinostat i dabrafenib. Pazopanib będący silnym i selektywnym inhibitorem kinazy tyrozynowej został dopuszczony do leczenia nowotworów złośliwych nerek i mięsaka tkanek miękkich [15,16]. Belinostat, jako inhibitor deacetylazy histonowej, został włączony do leczenia chłoniaka z obwodowych komórek T [17]. Natomiast inhibitor BRAF, dabrafenib, stosowany jest w leczeniu nieoperacyjnego i złośliwego czerniaka [18].



Pazopanib



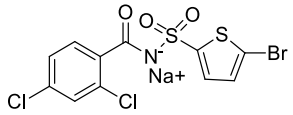
Belinostat



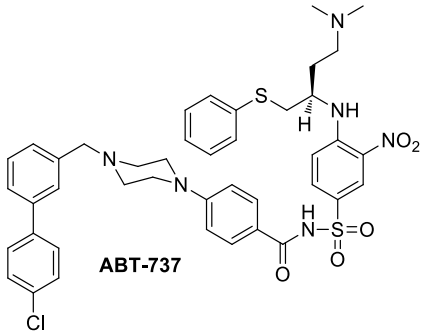
Dabrafenib

Ważną grupę sulfonamidów o aktywności przeciwnowotworowej stanowią *N*-acylosulfonamidy. Ogromny potencjał *N*-acylosulfonamidów wynika z obecności ugrupowania N-H i jego właściwości chemicznych. Forma sprotonowana posiada kwasowy atom wodoru, który może być donorem w wiązaniu wodorowym. Tego typu pochodne mogą być użyteczne jako związki wiążące aniony czy też inne akceptory wiązań wodorowych. Natomiast forma zdeprotonowana *N*-acylosulfonamidu, stanowiąca sprzężoną zasadę może potencjalnie wiązać kationy [19]. *N*-Acylosulfonamidy z powodzeniem znalazły zastosowanie we współczesnych środkach leczniczych m.in. jako bioizostery kwasów karboksylowych [20]. W porównaniu do kwasów karboksylowych, związki zawierające acylowane ugrupowanie sulfonamidowe wykazują często zwiększoną doustną biodostępność i stabilność metaboliczną czy też wyższą aktywność biologiczną. Ponadto *N*-acylowane sulfonamidy wykazują odporność zarówno wobec hydrolizy chemicznej jak i enzymatycznej.

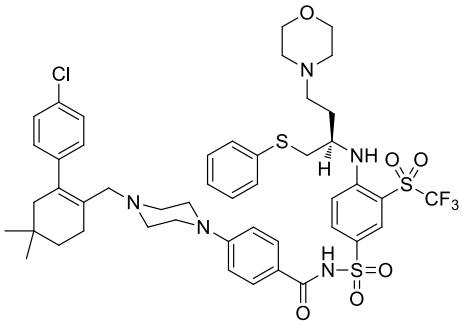
Wśród opisywanych dotychczas w literaturze *N*-acylosulfonamidów, co najmniej cztery znalazły się w badaniach klinicznych jako leki cytostatyczne w chorobach nowotworowych: LY573636-sól sodowa (Tasisulam) [21,22], ABT-737 [23], ABT-263 (Navitoclax) [24,25] i ABT-199 [26]. Tasisulam indukuje wewnątrzpochodny szlak apoptotyczny oraz wykazuje działanie antyangiogenetyczne. Lek ten dotarł do III fazy badań klinicznych w leczeniu czerniaka złośliwego, jednakże z powodu toksyczności badania zostały zakończone [27]. Natomiast leki ABT-737, ABT-263 i ABT-199, stanowiące grupę wzajemnych analogów, wykazują aktywność inhibicyjną wobec antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 i znalazły zastosowanie w leczeniu białaczki i raka płuc [23-26].



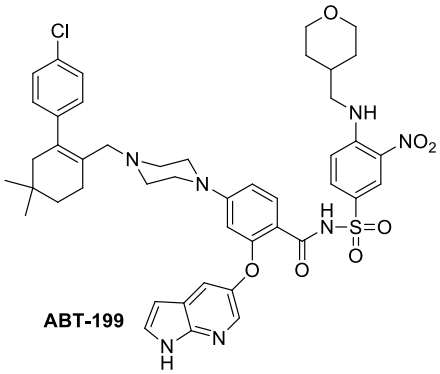
LY573636-sól sodowa



ABT-737



ABT-263

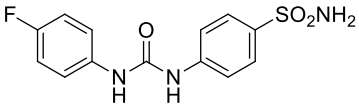


ABT-199

Sulfonamidy to także największa klasa inhibitorów anhydrazy węglanowej (CA), metaloenzymu katalizującego hydratację CO_2 do HCO_3^- i H^+ [28]. Mechanizm inhibicji CA przez sulfonamidy polega na wiązaniu się grupy sulfonamidowej z jonem Zn^{2+} znajdującym się w centrum aktywnym enzymu. Reszta sulfonamidowa najczęściej przyłączona jest do pierścienia benzenowego [29].

W ostatnich latach udowodniono, że ekspresja CA IX i XII w nowotworach złośliwych odgrywa kluczową rolę dla przetrwania komórek nowotworowych, ich proliferacji, migracji, adhezji i wzrostu [30-32]. Ta specyficzna ekspresja obserwowana jest w nowotworach złośliwych piersi, płuc, nerki, okrężnicy, szyjki macicy, jamy ustnej, wątroby, mózgu, trzustki i nabłonka żołądka [33-35]. Rolą CA IX w nowotworach jest zmniejszenie kwasicy wewnątrzkomórkowej, będącej wynikiem zwiększonej glikolizy i produkcji mleczanu w warunkach niedotlenienia komórek nowotworowych. Dzięki regulacji pH mikrośrodowiska tych komórek możliwe jest ich przeżycie i wzrost w warunkach hipoksji.

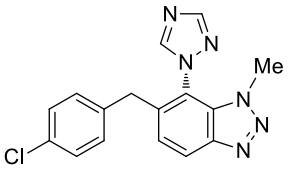
Wykazano, że inhibicja CA IX powoduje śmierć komórek nowotworowych, w związku z tym zahamowanie jej aktywności stanowi dogodny cel terapii przeciwnowotworowej [29,36]. Atrakcyjność takiego celu molekularnego podkreśla minimalna ekspresja CA IX w komórkach zdrowych oraz lokalizacja enzymu na zewnętrznej powierzchni komórki, umożliwiająca projektowanie selektywnych inhibitorów CA IX. Z kolei selektywna inhibicja izoform IX i XII pozwala na zminimalizowanie ryzyka wystąpienia efektów ubocznych wynikających z niepożądanej inhibicji innych powszechnie występujących izoform cytozolowych CA I i II. Dotychczas poznano niewiele specyficznych inhibitorów CA IX i XII o skutecznym działaniu przeciwnowotworowym, a najbardziej znanym inhibitorem CA IX jest SLC-0111, który po pozytywnych badaniach I fazy w leczeniu zaawansowanych guzów litych [https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02215850] obecne znajduje się w badaniach klinicznych pacjentów z rakiem trzustki [https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03450018].



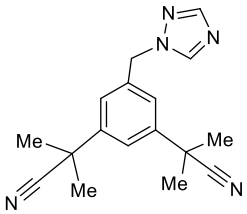
SLC-0111

Związki heterocykliczne, a zwłaszcza związki zawierające atomy azotu, odgrywają podstawową rolę w projektowaniu leków przeciwnowotworowych z uwagi na ich szerokie rozpowszechnienie w przyrodzie i uczestniczenie w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych. Potwierdzeniem tego kluczowego znaczenia może być fakt, iż około 75% wszystkich leków heterocyklicznych, zatwierdzonych przez FDA do obrotu w latach 2010–2015, stanowią związki heterocykliczne zawierające atom/y azotu [37]. Ogromny potencjał biologiczny związków heterocyklicznych wiąże się z właściwościami fizykochemicznymi heteroatomu, który w zależności od warunków pH środowiska może wykazywać właściwości kwasowe lub zasadowe [38]. Takie właściwości mają olbrzymie znaczenie dla oddziaływań układu heterocyklicznego z miejscami wiążącymi enzymów, przez co pozwalają na projektowanie inhibitorów enzymów uczestniczących w rozwoju nowotworu.

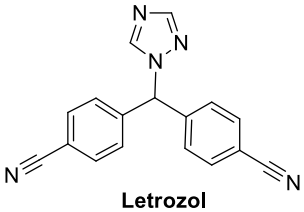
Wśród azotowych związków heterocyklicznych interesującą grupę stanowią 1,2,4-triazole, 1,2,4-triazyny i 1*H*-pirole ze względu na wykorzystanie tych elementów strukturalnych w szeregu preparatów przeciwnowotworowych. Doniesienia literaturowe utrzymują, że chemioterapeutyki zawierające pierścień 1,2,4-triazolu tj. worozol, letrozol i anastrozol z powodzeniem stosowane są w terapiach raka piersi jako inhibitory aromatazy [39]. Potencjał terapeutyczny wykazuje także analogiczny 5-okso-1,2,4-triazol – ganetespib, będący inhibitorem białka opiekuńczego Hsp90. Ganetespib znajduje się obecnie w badaniach klinicznych I i II fazy na szerokim spektrum różnych typów nowotworów m.in. raka jelita grubego, jajnika, płuc, piersi, szyi i głowy oraz czerniaka [40].



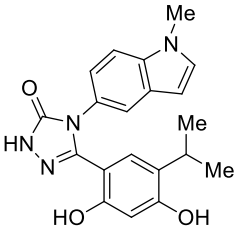
Worozol



Anastrozol



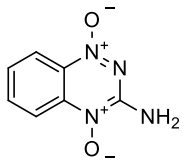
Letrozol



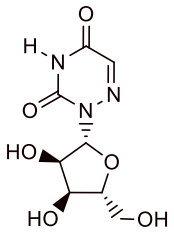
Ganetespib

Z kolei sześcioczłonowy pierścień 1,2,4-triazyny stanowi kluczowy element struktury dla tirapazaminy, proleku ulegającego w warunkach niedotlenienia aktywacji do postaci cytotoksycznej uszkadzającej DNA [41]. Tirazapamina znalazła się w III fazie badań jako lek w terapiach nowotworów głowy i szyi [https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00174837] oraz

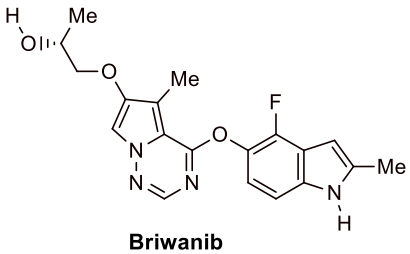
płuc [https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00006484]. Innym ważnym lekiem o strukturze 1,2,4-triazyny jest 6-azaurydyna. Udokumentowano szereg działań przeciwnowotworowych 6-azaurydyny i jej analogów wobec białaczki [42], raka piersi (MCF-7), raka okrężnicy (HCT-116) i raka wątrobowokomórkowego (Hep-G2) [43]. Wśród pochodnych 1,2,4-triazyny o skondensowanych pierścieniach należy wymienić briwanib (BMS-690514), selektywny inhibitor receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR) i receptora czynnika wzrostu śródbłonka (VEGRF) stosowany w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuc [44]. Briwanib przeszedł ponadto badania kliniczne III fazy jako lek podawany doustnie w terapii raka wątrobowokomórkowego [45].



Tirazapamina

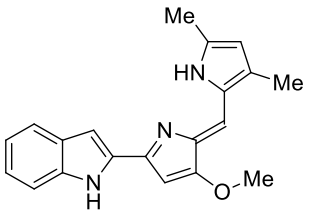


6-Azaurydyna

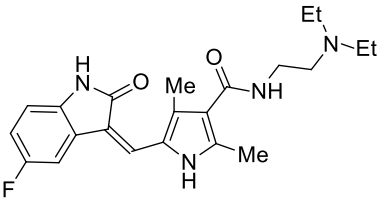


Briwanib

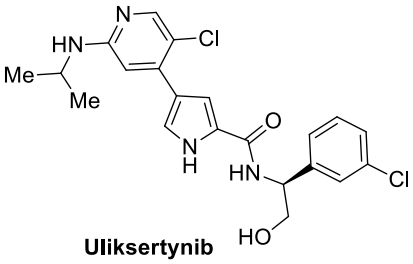
1*H*-Pirole stanowią także ważną klasę leków przeciwnowotworowych, a wśród nich uwagę zwracają obatoklaks, sunitynib i uliksertynib. Obatoklaks jako inhibitor białek z rodziny Bcl-2, przeszedł badania drugiej fazy w leczeniu nowotworów hematologicznych [46]. Z kolei sunitinib, doustny inhibitor licznych receptorów kinazy tyrozynowej, został dopuszczony jako lek pierwszego rzutu w terapii metastatycznego nowotworu nerki [47]. Uliksertynib znalazł zastosowanie w leczeniu pacjentów z guzami litymi wykazującymi aberracje genetyczne *BRAF*, *NRAS* i *MEK* [48].



Obatoklaks



Sunitynib



Uliksertynib

4.3.2. Założenia i cel badań

Wobec nasilającej się wciąż tendencji wzrostu zachorowań na choroby nowotworowe i oporności nowotworów na obecnie stosowane leki istnieje ciągła potrzeba poszukiwania nowych chemioterapeutyków skutecznych w leczeniu chorób nowotworowych.

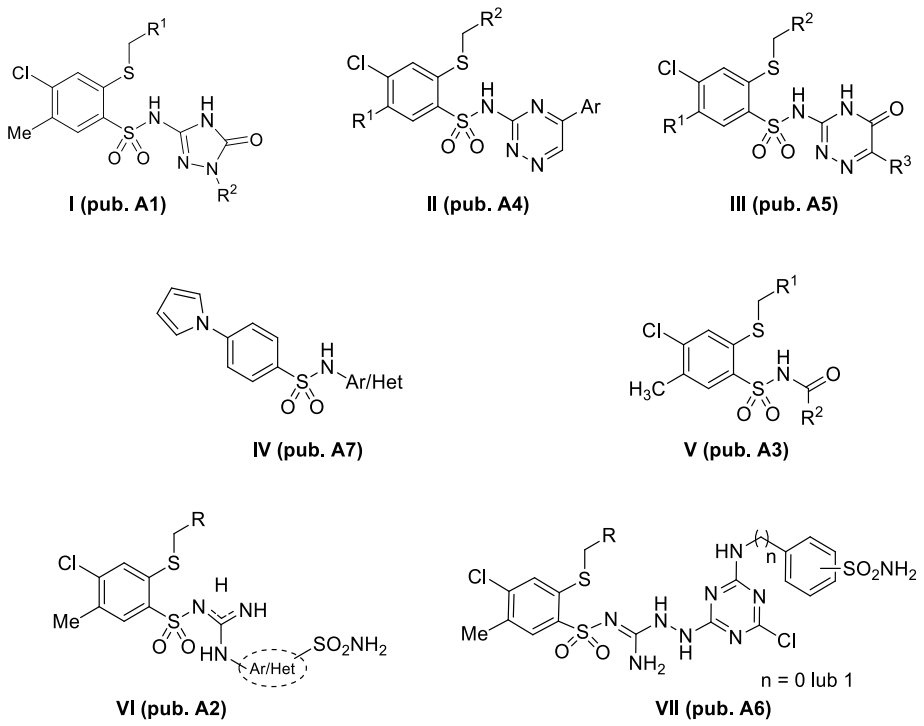
Celem podjętych badań naukowych, których efekty przedstawia cykl 7 publikacji (**A1**–**A7**), była synteza i struktura nowych *N*-podstawionych pochodnych benzenosufonamidu

o spodziewanej aktywności przeciwnowotworowej. Zaplanowane badania miały ponadto na celu ustalenie wpływu modyfikacji strukturalnych na aktywność przeciwnowotworową *N*-podstawionych benzenosulfonamidów.

Osiągnięcie celu badawczego wymagało racjonalnego zaprojektowania nowych związków prowadzących do śmierci komórek nowotworowych lub hamujących ich namnażanie. Krytyczna analiza aktualnego stanu wiedzy na temat aktywności przeciwnowotworowej pochodnych 1,2,4-triazolu, 1,2,4-triazyny, 1*H*-pirolu i sulfonamidów, jak również poznanych mechanizmów ich działania, pozwoliła na postawienie hipotezy, iż związki zwierające wspominane pierścienie heterocykliczne i/lub fragmenty arylosulfonamidu mogą wykazywać aktywność przeciwnowotworową.

Struktury zaplanowanych związków stanowiły hybrydy molekularne otrzymane w wyniku połączenia fragmentu benzenosulfonamidowego z ugrupowaniami farmakoforowymi występującymi w znanych i klinicznie stosowanych lekach przeciwnowotworowych, jak również ugrupowaniami uczestniczącymi w oddziaływaniach z ludzką anhydrazą węglanową - celem molekularnym w terapiach przeciwnowotworowych. Zaplanowane *N*-podstawione benzenosulfonamidy stanowiły poniższe szeregi pochodnych:

- 4-chloro-2-merkapto-5-metylo-*N*-(5-okso-4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)-benzenosulfonamidy, **I** (publikacja **A1**)
- *N*-(5-arylo-1,2,4-triazyn-3-ylo)-4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidy, **II** (publikacja **A4**)
- 4-chloro-2-merkapto-*N*-(5-okso-4,5-dihydro-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidy, **III** (publikacja **A5**)
- *N*-(arylo/heteroarylo)-4-(1*H*-pirol-1-ylo)benzenosulfonamidy, **IV** (publikacja **A7**)
- *N*-acylo-4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonamidy, **V** (publikacja **A3**)
- *N*-podstawione *N′*-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)guanidyny, **VI** (publikacja **A2**)
- 2-(4-chloro-5-metylo-2-merkaptobenzenosulfonylo)-1-(1,3,5-triazyn-2-yloamino)-guanidyny, **VII** (publikacja **A6**) (*Rycina 1*).



Rycina 1. *Struktury ogólne N-podsatwionych benzenosulfonamidów serii* ***I–VII****.*

Serie *N*-heterocyklicznych pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu opisane w pracach **A1**, **A4** i **A5** zaprojektowano w oparciu o pierścienie heterocykliczne 1,2,4-triazolu (**I**) (**A1**), 1,2,4-triazyny (**II**) (**A4**) i 5-okso-1,2,4-triazyny (**III**) (**A5**) oraz farmakoforowe ugrupowanie 2-merkaptobenzenosulfonamidu, którego aktywność biologiczna jest dokumentowana od kilkunastu lat w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej przez zespół prof. Jarosława Sławińskiego. Do badań włączono także szereg *N*-arylo/heteroarylo podstawionych pochodnych benzenosulfonamidu zawierających pierścień 1*H*-pirolu w pozycji 4 pierścienia benzenowego (**IV**) (**A7**), a także serię pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu zawierających na atomie azotu ugrupowanie acylowe (**V**) (**A3**). Z kolei w strukturze docelowych związków serii **VI** (**A2**) i **VII** (**A6**) uwzględniono farmakoforowe ugrupowanie pierwszorzędowego sulfonamidu, którego obecność w cząsteczce jest niezbędna dla wiązania się inhibitora z centrum katalitycznym anhydrazy węglanowej.

Podjęta metodyka badawcza zakładała dwutorowość poszukiwań aktywnych przeciwnowotworowo związków, to jest:

- ✓ badania przesiewowe na liniach nowotworowych mające na celu wytypowanie struktur wiodących wśród związków hybrydowych oraz
- ✓ badania aktywności inhibicyjnej wobec wybranych izoform hCA oraz aktywności przeciwnowotworowej mające na celu wytypowanie struktur wiodących wśród zmodyfikowanych strukturalnie ligandów anhydrazy węglanowej.

Do badań przesiewowych włączono związki z szeregu **I**, **II**, **III**, **IV** będące *N*-heterocyklicznymi lub *N*-arylowymi pochodnymi benzenosulfonamidu oraz *N*-acylowe pochodne benzenosulfonamidu reprezentowane przez szereg **V** (*pkt. 4.3.3*). Natomiast pochodne benzenosulfonyloguanidyny (szeregi **VI** i **VII**), zaprojektowane jako inhibitory powiązanych z procesami nowotworowymi izoform ludzkiej anhydrazy węglanowej, poddano ocenie funkcjonalnej w testach aktywności inhibicyjnej jak i przeciwnowotworowej (*pkt. 4.3.4*). Obydwa nurty badań wpisują się we współczesne strategie poszukiwań chemioterapeutyków w walce z chorobami nowotworowymi.

Badania nad syntezą związków o aktywności przeciwnowotworowej poszerzono o badania mechanizmu działania tych związków na komórki nowotworowe oraz ocenę ich stabilności metabolicznej *in vitro* z wykorzystaniem enzymów mikrosomalnych wątroby i NADPH w układach imitujących warunki fizjologiczne. Ponadto wpływ modyfikacji strukturalnych na aktywność biologiczną otrzymanych benzenosulfonamidów poddano analizie jakościowej (SAR) oraz ilościowej (QSAR).

4.3.3. Wyniki badań nad *N*-heterocyklicznymi oraz *N*-acylowymi pochodnymi benzenosulfonamidu

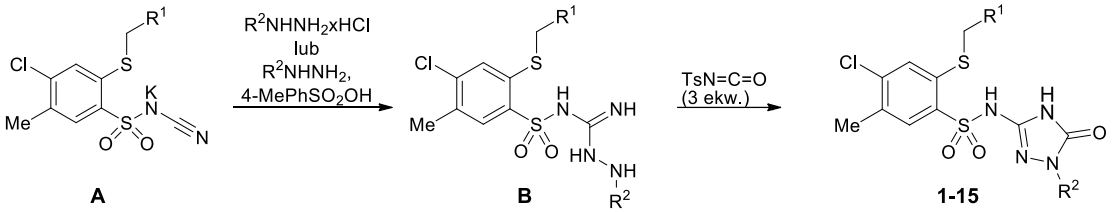
4.3.3.1. Synteza i struktura

Zastosowanie w syntezie pochodnych soli monopotasowych *N*-(2-merkaptobenzenosulfonylo)cyjanamidu pozwoliło na dogodne otrzymanie zaplanowanych związków docelowych (**I**–**III**, **V**) w jednym (**V**) bądź w dwóch (**I**–**III**) etapach. Przydatność wyżej wymienionych soli w syntezie sulfonamidów dokumentowana jest w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej od 2002 roku, a efektem tych prac jest olbrzymia biblioteka pochodnych sulfonamidu o zweryfikowanej aktywności biologicznej.

Związkami wyjściowymi w celu otrzymania pochodnych 4-chloro-2-merkapto-5-metylo-*N*-(5-okso-4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamidu serii **I** (publikacja **A1**) były odpowiednie sole monopotasowe *N*-(2-merkaptobenzenosulfonylo)cyjanamidu (**A**), które poddane reakcji z chlorowodorkiem fenylohydrazyny, metylohydrazyny czy *p*-toluenosulfonylohydrazydem prowadziły do produktów pośrednich 3-R^2-amino-1-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)guanidyn (**B**) (*Schemat 1*). Reakcje addycji nukleofilowej do grupy nitrylowej prowadzono w bezwodnym toluenie w temp. wrzenia, w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego w przypadku zastosowania *p*-toluenosulfonylohydrazydu jako nukleofilowego reagenta.

Syntezę docelowych pochodnych *N*-(5-okso-4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamidu **1**–**15** zaplanowano z wykorzystaniem izocyjanianu

p-toluenosulfonylu jako prekursora gruby karbonylowej. W piśmiennictwie chemicznym izocyjaniany opisywane są jako czynniki elektrofilowe, które reagując z hydrazynami prowadzą do cyklizacji pięcioczłonowych pierścieni heterocyklicznych [49]. W wyniku przeprowadzonych optymalizacji warunków reakcji opracowano finalną metodę syntezy triazolonów (**1-15**) z zastosowaniem trzykrotnego nadmiaru molowego izocyjanianu *p*-toluenosulfonylu w stosunku do odpowiedniej 3-amino-1-(4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonylo)guanidyny (**B**), w środowisku bezwodnego tetrahydrofuranu we wrzeniu (w czasie 8–36 h). Należy podkreślić, że zmniejszenie nadmiaru molowego izocyjanianu prowadziło do mieszaniny produktów trudnej do rozdziału.

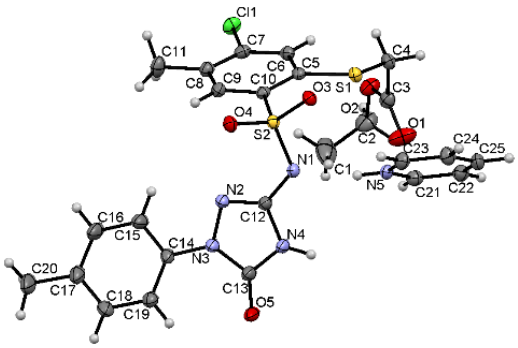


Związek	R^1	R^2
1	Ph	H
2	Ph	Me
3	Ph	Ph
4	Ph	4-O_2NPhSO_2
5	Ph	4-$MePhSO_2$
6	COOEt	4-MePh
7		Ph
8	3-CF_3Ph	Ph

Związek	R^1	R^2
9	3-CF_3Ph	4-$MePhSO_2$
10	4-CF_3Ph	Ph
11	1-naftyl	Ph
12	1-naftyl	4-ClPh
13	1-naftyl	4-$MePhSO_2$
14		Ph
15		Ph

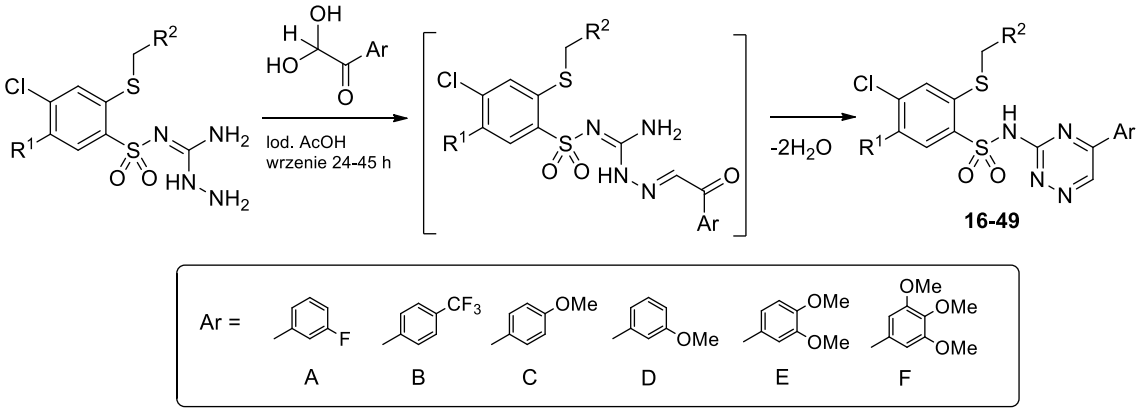
Schemat 1. *Synteza pochodnych 4-chloro-2-merkapto-5-metylo-N-(5-okso-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamidu typu* ***I****.*

Strukturę otrzymanych pochodnych scharakteryzowano w oparciu o szczegółową analizę spektroskopową (^{1}H NMR, ^{13}C NMR, MS) i analizę elementarną (C, H, N). Przeprowadzone dla reprezentatywnego związku **6** badania rentgenokrystalograficzne potwierdziły obecność pięcioczłonowego pierścienia 5-okso-4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazolu (*Rycina 2*). W prezentowanej na *Rycinie 2* strukturze zdeprotonowana grupa sulfonamidowa zaangażowana jest w tworzenie pary jonowej z kationem pirydyniowym, a wiązanie N(4)–H(4) wykazuje zdolność do tworzenia międzycząsteczkowego wiązania wodorowego NH···O z atomem tlenu O5 grupy karbonylowej sąsiedniej cząsteczki.



Rycina 2. *Projekcja ORTEP monokryształu związku* ***6.***

Kontynuując badania nad syntezą benzenosulfonamidów podstawionych układem heterocyklicznym na atomie azotu opracowano dogodne metody syntezy pochodnych *N*-(5-arylo-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu serii **II** (publikacja **A4**) oraz *N*-(5-okso-4,5-dihydro-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu serii **III** (publikacja **A5**) stosując jako związek wyjściowy 3-amino-2-(4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonylo)guanidynę. Pochodne typu **II** (**16–49**) otrzymano w reakcji odpowiednich aminoguanidyn z hydratem fenylogliokszalu w środowisku lodowatego kwasu octowego w temperaturze wrzenia przez 24–45 h (*Schemat 2*).

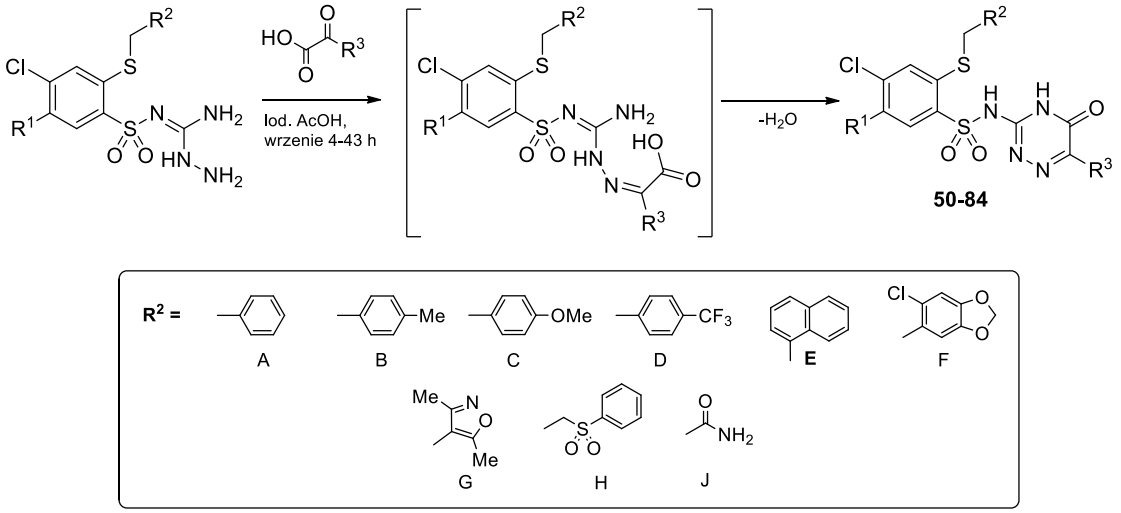


Związek	R^1	R^2	Ar
16	Me	Ph	A
17	Me	Ph	B
18	Me	Ph	C
19	Me	Ph	D
20	Me	Ph	E
21	Me	Ph	F
22	Me	4-CF_3-C_6H_4	A
23	Me	4-CF_3-C_6H_4	B
24	Me	4-CF_3-C_6H_4	C
25	Me	1-naftyl	A
26	Me	1-naftyl	B
27	Me	1-naftyl	C
28	Me	3,5-dimetyloizoksazol-4-yl	A
29	Me	3,5-dimetyloizoksazol-4-yl	B
30	Me	3,5-dimetyloizoksazol-4-yl	C

Związek	R^1	R^2	Ar
31	PhNHCO	Ph	C
32	PhNHCO	Ph	D
33	PhNHCO	Ph	E
34	4-Cl-C_6H_4NHCO	Ph	A
35	4-Cl-C_6H_4NHCO	Ph	B
36	4-Cl-C_6H_4NHCO	Ph	C
37	4-Cl-C_6H_4NHCO	Ph	D
38	4-Cl-C_6H_4NHCO	Ph	E
39	4-Cl-C_6H_4NHCO	Ph	F
40	4-Me-C_6H_4NHCO	Ph	A
41	4-Me-C_6H_4NHCO	Ph	B
42	4-Me-C_6H_4NHCO	Ph	C
43	4-Me-C_6H_4NHCO	Ph	D
44	4-Me-C_6H_4NHCO	Ph	E
45	4-Me-C_6H_4NHCO	Ph	F
46	4-MeO-C_6H_4NHCO	Ph	C
47	4-MeO-C_6H_4NHCO	Ph	D
48	4-MeO-C_6H_4NHCO	Ph	E
49	4-MeO-C_6H_4NHCO	Ph	F

Schemat 2. *Synteza pochodnych N-(5-arylo-1,2,4-triazyn-3-ylo)-4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu typu* ***II****.*

Kolejnym etapem prac była synteza serii związków typu **III** (**50–84**), które zsyntetyzowano w reakcji aminoguanidyn z odpowiednimi α-oksokwasami w środowisku lodowatego kwasu octowego w temperaturze wrzenia w czasie 4–43 h (*Schemat 3*).

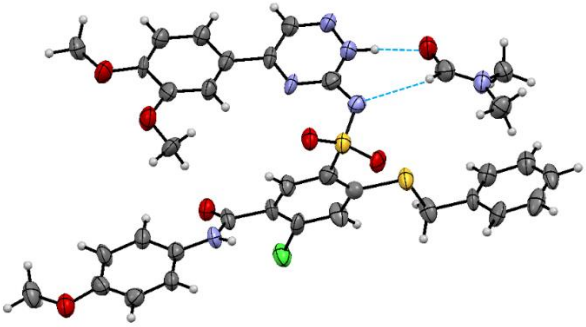


Związek	R^1	R^2	R^3
50	Me	A	Me
51	Me	B	Me
52	Me	D	Me
53	Me	E	Me
54	Me	F	Me
55	Me	G	Me
56	Me	H	Me
57	Me	B	i-Bu
58	Me	C	i-Bu
59	Me	F	i-Bu
60	Me	H	i-Bu
61	Me	A	Ph
62	Me	B	Ph
63	Me	C	Ph
64	Me	D	Ph
65	Me	E	Ph
66	Me	F	Ph
67	Me	G	Ph
68	Me	H	Ph

Związek	R^1	R^2	R^3
69	Me	A	Bn
70	Me	B	Bn
71	Me	C	Bn
72	Me	F	Bn
73	Me	H	Bn
74	Me	B	4-HO-$C_6H_4CH_2$
75	Me	C	4-HO-$C_6H_4CH_2$
76	Me	F	4-HO-$C_6H_4CH_2$
77	Me	A	2-NO_2-$C_6H_4CH_2$
78	Me	B	2-NO_2-$C_6H_4CH_2$
79	Me	C	2-NO_2-$C_6H_4CH_2$
80	Me	F	2-NO_2-$C_6H_4CH_2$
81	Me	H	2-NO_2-$C_6H_4CH_2$
82	PhNHCO	A	Ph
83	4-Cl-C_6H_4NHCO	A	Ph
84	4-Cl-C_6H_4NHCO	J	Ph

Schemat 3. *Synteza pochodnych 4-chloro-2-merkapto-N-(5-okso-4,5-dihydro-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu typu **III**.*

Strukturę pochodnych benzenosulfonamidu typu **II** potwierdzono metodami spektroskopowymi (^{1}H i ^{13}C NMR, IR, MS) i analizą elementarną (C, H, N). Znamiennym dla tego typu związków był singlet przy ok. 9,00 ppm pochodzący od protonów H-6 pierścienia 1,2,4-triazyny. Dla reprezentatywnej pochodnej **48** dokonano analizy rentgenostrukturalnej (*Rycina 3*). Badania krystalograficzne wykazały, że w fazie stałej związku ugrupowanie sulfonamidowe jest zdeprotonowane, natomiast atom azotu w pozycji 2 pierścienia 1,2,4-triazyny przyjmuje atom wodoru. Taka lokalizacja przeciwnych ładunków umożliwiła wytworzenie dwóch wiązań wodorowych wspomaganych ładunkiem: C–H···N(–)–S i (+)N–H···O, pomiędzy sulfonamidem, a cząsteczką rozpuszczalnika dimetyloformamidu.



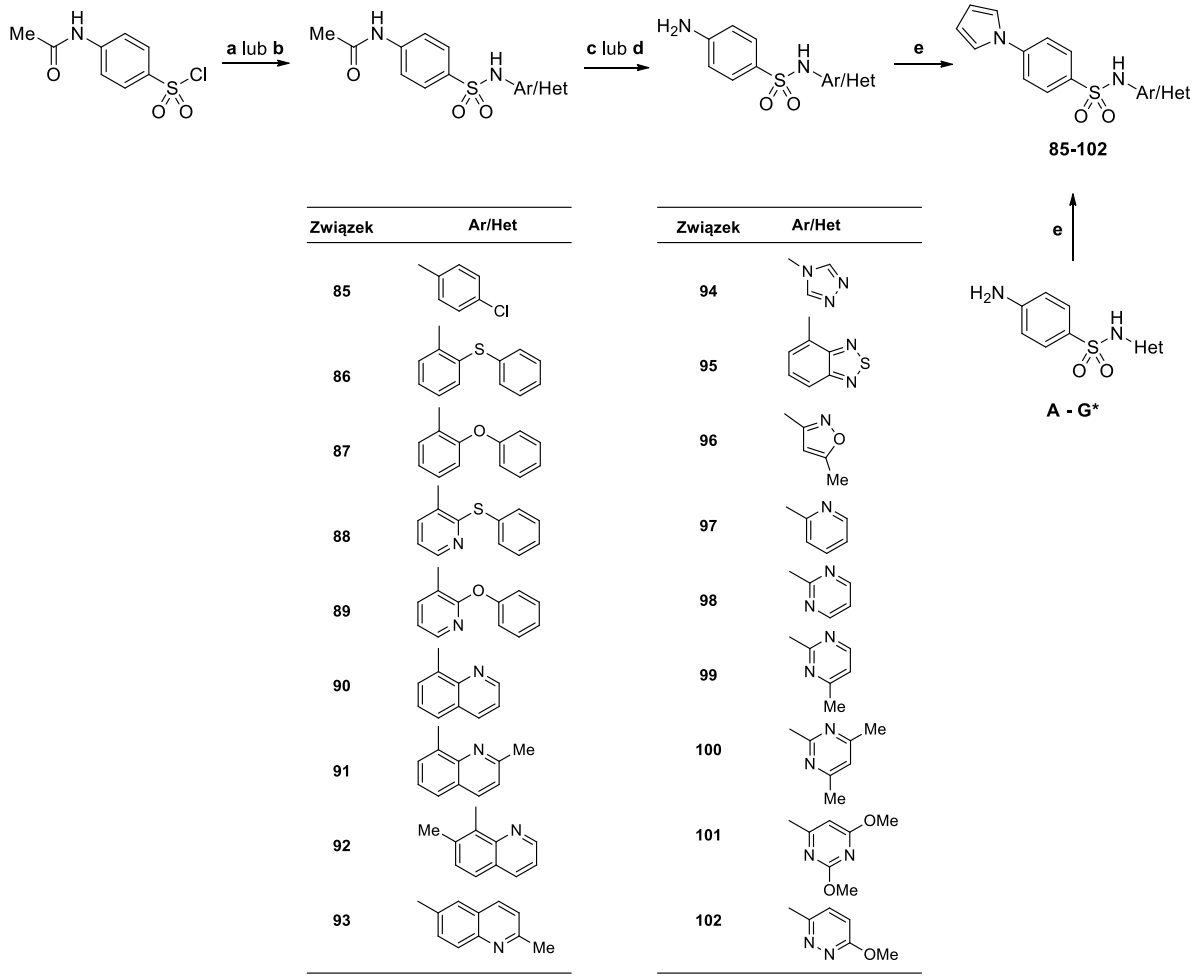
Rycina 3. *Projekcja ORTEP monokryształu związku* ***48****.*

Analiza widm IR, ^{1}H NMR i ^{13}C NMR pochodnych typu **III** potwierdziła obecność fragmentu 5-okso-4,5-dihydro-1,2,4-triazyny. Ugrupowanie C=O obserwowane w widmach IR przy ok. 1700 cm^{-1} widoczne było również w widmach ^{13}C NMR przy 154 ppm. Natomiast singlet pochodzący od protonu grupy NH fragmentu triazynonu obserwowano przy ok. 12 ppm.

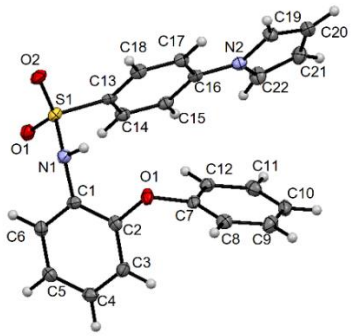
Serię pochodnych *N*-(arylo/heteroarylo)-4-(1*H*-pirol-1-ylo)benzenosulfonamidu typu **IV** (**85–102**) (publikacja **A7**) otrzymano wykorzystując opisaną w piśmiennictwie chemicznym reakcję inkorporacji atomu azotu grupy aminowej do pierścienia pirolu [50,51]. Opracowana metoda syntezy polegała na reakcji odpowiedniego 4-amino-*N*-(arylo/heteroarylo)benzenosulfonamidu z 2,5-dimetoksytetrahydrofuranem w mieszaninie *p*-dioksanu i lodowatego kwasu octowego w czasie 24–26 h (*Schemat 4*). Wyjściowe pochodne 4-amino-*N*-(arylo/heteroarylo)benzenosulfonamidu otrzymano na drodze *N*-sulfonylowania arylo- lub heteroaryloamin, a następnie hydrolizy uzyskanych 4-acetamidobenzenosulfonamidów. Jako aminokomponenty w finalnej reakcji zastosowano również komercyjnie dostępne leki przeciwbakteryjne takie jak: sulfapirydyna, sulfadiazyna, sulfamerazyna, sulfametazyna, sulfadimetoksyna, sulfametoksypirydazyna oraz sulfametoksazol.

Strukturę finalnych związków (**85–102**) potwierdzono w oparciu o analizę spektroskopową i rentgenograficzną. W widmach IR odnotowano intensywne pasma absorpcji wiązań C=N przy 1516–1506 cm^{-1}, natomiast sygnały rezonansowe protonów H-3,4 oraz H-2,5 pierścienia pirolowego obserwowano w postaci dwóch poszerzonych singletów przy przesunięciach chemicznych 6,26–6,35 ppm i 7,41–7,68 ppm. Analiza rentgenokrystalograficzna zw. **87** (*Rycina 4*) wykazała, że fragment ugrupowania S(1)-N(1)-C(1) oraz pierścień aromatyczny C1-C6 nie znajdują się w tej samej płaszczyźnie, co prawdopodobnie uniemożliwia sprzężenie wolnej pary elektronowej atomu azotu z elektronami π pierścienia benzenowego. Ponadto atom wodoru grupy NH tworzy międzycząsteczkowe wiązanie wodorowe z atomem tlenu ugrupowania sulfonylowego drugiej cząsteczki. Ustalono także, iż

odległość między pierścieniami C7-C12 i C13-C18 jest na tyle duża, że nie pozwala na występowanie typowego oddziaływania typu π-π płaskich układów aromatycznych.

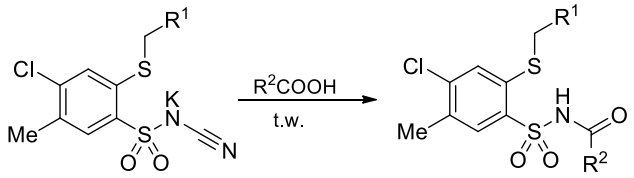


Schemat 4. *Synteza pochodnych N-(arylo/heteroarylo)-4-(1H-pirol-1-ylo)benzenosulfonamidu serii* ***IV****. Reagenty i warunki syntezy:* ***a)*** *Ar/Het-NH₂, pirydyna, t.p. lub 105 °C, 2-20 h;* ***b)*** *Ar/Het-NH₂, aceton, pirydyna, t.p., 18-48 h;* ***c)*** *8% NaOH w H₂O, etanol, 100 °C, 1 h;* ***d)*** *kwas solny, etanol, 100 °C, 1 h;* ***e)*** *2,5-dimetoksytetrahydrofuran, p-dioksan, lodowaty kwas octowy, t.w., 24-26 h;* ***Ar*** *= aryl,* ***Het*** *= heteroaryl,* ******* *sulfametoksazol (A), sulfapirydyna (B), sulfadiazyna (C), sulfamerazyna (D), sulfametazyna (E), sulfadimetoksyna (F), sulfametoksypirydazyna (G).*



Rycina 4. *Projekcja ORTEP monokryształu związku* ***87****.*

W kolejnym etapie zadań badawczych opracowano dogodną metodę syntezy pochodnych *N*-acylobenzenosulfonamidu typu **V** (publikacja **A3**) w bezpośredniej reakcji soli potasowej *N*-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)cyjanamidu z kwasem karboksylowym prowadzonej we wrzeniu (*Schemat 5*). Interesujący i nieoczekiwany mechanizm tej reakcji przedstawia *Schemat 6*. W pierwszym etapie proponowanego mechanizmu następuje jednoczesne protonowanie nitrylowego atomu azotu i atak niewiążącej pary elektronowej karboksylowego atomu tlenu na nitrylowy atom węgla (*Etap 1*). W kolejnym etapie dochodzi do wewnątrzcząsteczkowego ataku nukleofilowego atomu azotu, bezpośrednio przyłączonego do grupy sulfonylowej, na karbonylowy atom węgla i jednoczesnego rozerwania wiązania C-O fragmentu karboksylowego (*Etap 2*). W ostatnim etapie następuje odłączenie cząsteczki izocyjanianu potasu i utworzenie acylowanego sulfonamidu (*Etap 3*).



103-132

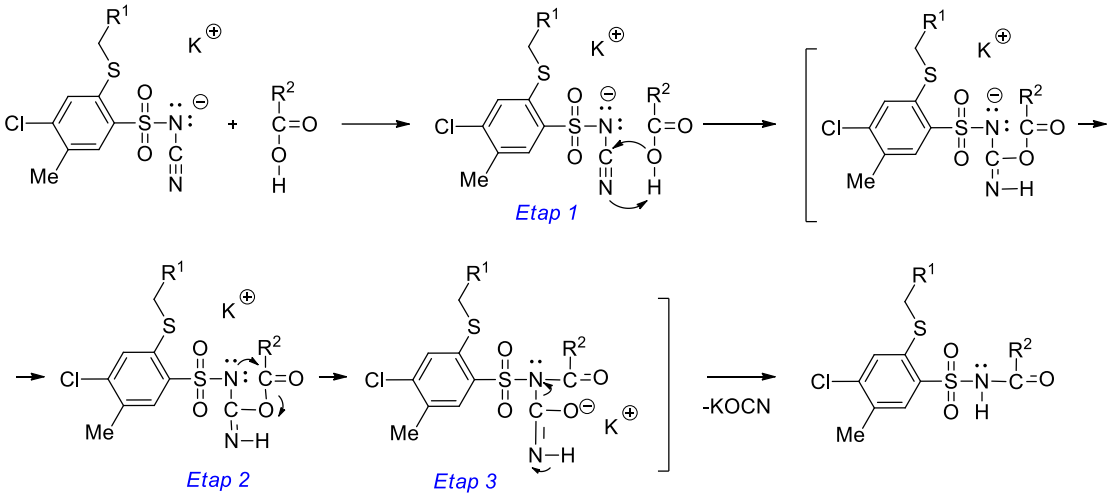
Związek	R^1	R^2
103	$CH=CH_2$	Me
104	C≡CH	Me
105	$CONH_2$	Me
106	Ph	Me
107	$3\text{-}F_3CC_6H_5$	Me
108	$4\text{-}F_3CC_6H_5$	Me
109	$4\text{-}ClC_6H_5$	Me
110	$4\text{-}MeOC_6H_5$	Me
111	4-pirydyl	Me
112	1-naftyl	Me
113	2-naftyl	Me
114	2-chinolinyl	Me
115		Me
116		Me
117		Me

Związek	R^1	R^2
118	Ph	Et
119	$3\text{-}F_3CC_6H_5$	Et
120	$4\text{-}F_3CC_6H_5$	Et
121	$4\text{-}ClC_6H_5$	Et
122	$4\text{-}MeOC_6H_5$	Et
123	4-pirydyl	Et
124	2-naftyl	Et
125		Et
126		Et
127		Et
128	Ph	$(CH_3)_2CH$
129	Ph	$(c\text{-}C_6H_{11})\text{-}CH_2CH_2$
130	Ph	Ph
131	Ph	PhCH=CH
132	1-naftyl	PhCH=CH

Schemat 5. *Synteza pochodnych N-acylo-4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonamidu typu* ***V****.*

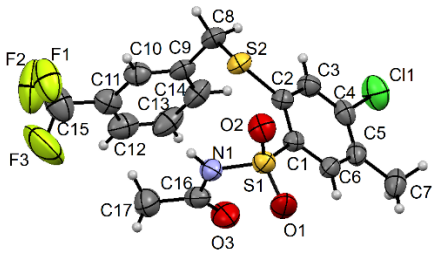
Warto podkreślić, że niewątpliwą zaletą opracowanej metody była możliwość stosowania ciekłych kwasów: octowego, propanowego, izobutanowego i cykloheksylopropanowego bez zastosowania rozpuszczalnika. Reakcje ze stałymi kwasami karboksylowymi: benzoesowym i cynamonowym przebiegały korzystnie w wodzie lub toluenie. Opisana metoda może być dobrą alternatywą dla syntezy *N*-acylosulfonamidów otrzymywanych dotychczas w reakcjach z zastosowaniem konwencjonalnych odczynników sprzęgających [52,53], chlorków acylowych [54] czy bezwodników [55], które obarczone są

pewnymi niedogodnościami, takimi jak konieczność usunięcia produktów ubocznych z mieszaniny reakcyjnej, wysoki koszt odczynników oraz ich wpływ na środowisko i zdrowie człowieka. Bez wątpienia zaletami opracowanej syntezy są niskie koszty, brak konieczności zastosowania szkodliwych dla zdrowia odczynników sprzęgających i łatwa izolacja produktu.



Schemat 6. *Proponowany mechanizm reakcji N-acylowania pochodnych N-(benzenosulfonylo)cyjanamidu.*

Analiza spektroskopowa pozwoliła na potwierdzenie struktury otrzymanych *N*-acylosulfonamidów. Obecność grupy karbonylowej zidentyfikowano na podstawie charakterystycznego pasma absorpcji wiązania C=O przy 1638–1734 cm^{-1} w widmach IR oraz sygnału atomu węgla w zakresie 163,4–180,9 ppm w widmach ^{13}C NMR. Natomist pojawienie się sygnału w widmach ^{1}H NMR przy 12,20–12,82 ppm wskazywało na obecność protonu ugrupowania SO_2NHCO. Analiza rentgenokrystalograficzna monokryształu reprezentatywnego związku **107** (*Rycina 5*) potwierdziła proponowaną sytrukturę *N*-acylosulfonamidu. Otrzymane dane wskazywały na wygięcie cząsteczki **107** w miejscu wiązania CH_2–S, w wyniku czego ugrupowanie acylowe i fragment trifluorometylofenylowy usytuowane były naprzeciw siebie.

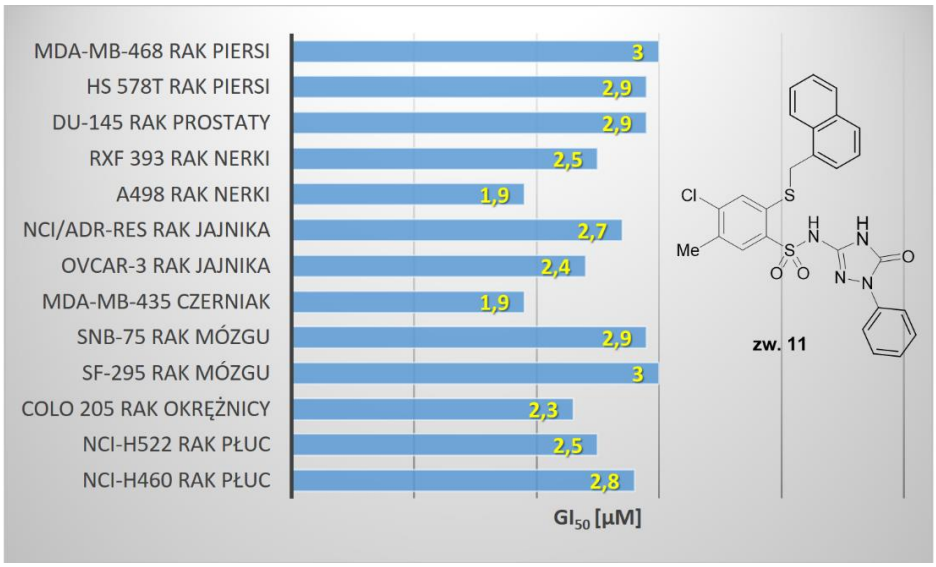


Rycina 5. *Projekcja ORTEP monokryształu związku **107**.*

4.3.3.2. Aktywność przeciwnowotworowa

Aktywność przeciwnowotworową związków z serii 4-chloro-*N*-(4,5-dihydro-5-okso-1*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonamidu **1–15** (**I**) oceniono w badaniach przesiewowych *in vitro* na panelu 60 linii komórkowych 9 typów nowotworów ludzkich w National Cancer Institute (Bethesda, USA). Testy wykonano w stężeniu 10 μM, a wyniki przedstawiono w postaci IP (procent zahamowania wzrostu komórek nowotworowych).

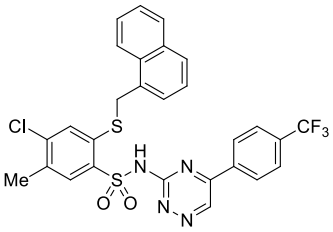
Największą wrażliwość na badane związki wykazały linie: NCI-H522 niedrobnokomórkowego raka płuc (46%<IP<84%, zw. **2**, **3**, **6**, **13**), RPMI-8226 białaczki (36%<IP<45%, zw. **2**, **3**, **5**, **6**), HL-60(TB) białaczki (22%<IP<91%, zw. **5**, **6**, **11**, **14**), K-562 białaczki (37%<IP<66%, zw. **5**, **6**, **13**) oraz MCF7 raka piersi (38%<IP<83%, zw. **5**, **11**, **13**). Wśród zbadanych pochodnych najbardziej obiecującą okazała się pochodna **11** zawierająca w pozycji 2 fragmentu benzenosulfonamidowego podstawnik 1-naftylometylotiolowy, a w pozycji 1 pierścienia 1,2,4-triazolu ugrupowanie fenylowe. Związek **11** wytypowano do dalszych badań w 5 dawkach (0,01 – 100 μM), w których wyznaczono parametry GI_{50} (stężenie molowe badanego związku powodujące zahamowanie wzrostu kolonii komórkowej o 50% względem kontroli), TGI (stężenie molowe związku powodujące całkowite zahamowanie wzrostu) i LC_{50} (stężenie molowe związku powodujące zmniejszenie początkowej populacji kolonii komórkowej o 50%). Wyniki badań wykazały, że związek **11** charakteryzował się efektywnym działaniem antyproliferacyjnym wobec całego panelu 60 linii komórkowych w zakresie wartości parametru GI_{50} poniżej 11,2 μM. Na uwagę zasługuje wysoka aktywność związku w zakresie GI_{50}: 1,9–3,0 μM wobec 13 linii komórkowych w skład, których wchodziły linie NCI-H460 oraz NCI-H522 (niedrobnokórkowy rak płuc), COLO 205 (rak okrężnicy), SF-295 oraz SNB-75 (rak mózgu), MDA-MB-435 (czerniak), OVCAR-3 oraz NCI/ADR-RES (rak jajnika), A498 oraz RXF393 (rak nerki), DU-145 (rak prostaty), HS 578T oraz MDA-MB-468 (rak piersi) (*Rycina 6*). Spośród wymienionych nowotworów, największą wrażliwość wykazały komórki linii MDA-MB-435 (GI_{50} = 1,9 μM, TGI = 5,5) oraz A498 (GI_{50} = 1,9 μM, TGI = 10,5). Warto podkreślić, że w przeprowadzonych badaniach linie HL-60(TB), NCI-H522, COLO 205, SF-539, MDA-MB-435, OVCAR-3, A498, RXF 393, DU-145, MDA-MB-468 charakteryzowały się relatywnie niskimi parametrami zarówno GI_{50} (1,9–3,2 μM), TGI (4,9–12,3 μM) oraz LC_{50} poniżej 58,7 μM.



Rycina 6. *Wartości GI_{50} wyznaczone dla związku* ***11****.*

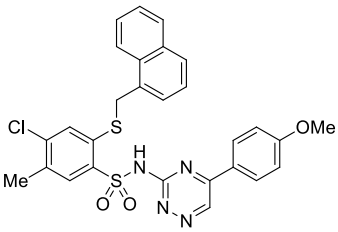
Związki serii **II–V** poddano ocenie aktywności cytotoksycznej *in vitro* na trzech liniach komórkowych nowotworów ludzkich, to jest raka szyjki macicy HeLa, raka piersi MCF-7 oraz raka okrężnicy HCT-116. Analizy wykonano przy pomocy testu MTT, a wyniki zaprezentowano jako wartości IC_{50} (stężenie wymagane dla zahamowania żywotności 50% komórek).

Wśród pochodnych *N*-(5-arylo-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu **16–49** (seria **II**) najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec linii HeLa i HCT-116 prezentowały związki **26** (IC_{50}: 34–36 µM) i **27** (IC_{50}: 38–42 µM) zawierające w swej strukturze podstawnik naftylowy (R^2 = 1-naftyl). Natomiast największą wrażliwość linii MCF-7 odnotowano dla związku **35**, którego wartość IC_{50} wyniosła 59 µM.



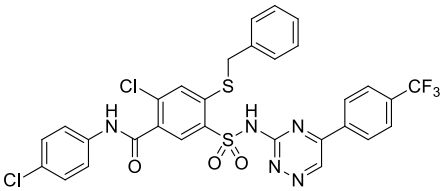
26

IC_{50}: 34 µM *HeLa*
36 µM *HCT-116*
70 µM *MCF-7*



27

IC_{50}: 42 µM *HeLa*
38 µM *HCT-116*
69 µM *MCF-7*



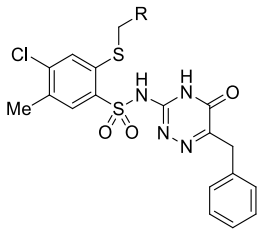
35

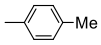
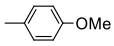
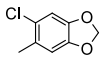
IC_{50}: 80 µM *HeLa*
64 µM *HCT-116*
59 µM *MCF-7*

Zaobserwowane zależności struktura-aktywność wskazały, iż podstawnik naftylowy jest istotny dla aktywności związku **26**, a jego zamiana na stosunkowo mniejsze ugrupowanie 4-trifluorometylofenylowe (**23**) lub 3,5-dimetoksyizoksazolowe (**29**) obniżała aktywność związku wobec trzech badanych linii do IC_{50}: 51–85 µM, natomiast wprowadzenie podstawnika fenylowego (**17**) prowadziło do całkowitej utraty aktywności (100–200 µM). Zaobserwowano także, że zamiana podstawnika 4-trifluorometylofenylowego w pierścieniu

triazyny związku **26** na 4-metoksyfenylowy (**27**) nie wpływała znacząco na jego aktywność przeciwnowotworową.

Wyniki testów skriningowych dla pochodnych *N*-(5-okso-4,5-dihydro-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu **50–84** (typu **III**) wykazały, że najbardziej wrażliwa na działanie związków tej serii jest linia HeLa. Najwyższą aktywność wobec tej linii odnotowano dla grupy *N*-(6-benzylo-5-okso-4,5-dihydro-1,2,4-triazyn-3-ylo)-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidów (**69**–**73**), których wartości IC_{50} mieściły się w zakresie 19–40 µM. Biorąc pod uwagę zależności SAR, zauważono, że aktywność przeciwnowotworowa wobec komórek HeLa była uwarunkowana obecnością podstawnika benzylowego (R^3 = Bn) w pozycji 6 pierścienia 5-okso-1,2,4-triazyny. Zamiana tego podstawnika na ugrupowanie fenylowe (**61**–**63**, **66**, **68**), bądź benzylowe podstawione grupami OH czy NO_2 (**74**–**81**), znacząco obniżało aktywność związków ($IC_{50} \geq 76$ µM), natomiast wprowadzenie małej grupy alkilowej (R^3 = Me; **50**, **51**, **54**, **56**) całkowicie dezaktywowało badane pochodne ($IC_{50} \geq 140$ µM).

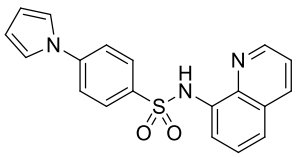


Zw.	R	HeLa IC_{50} [µM]
69		29
70		40
71		19
72		19
73		24

Najbardziej aktywne przeciwnowotworowo związki **71** i **72** poddano ocenie aktywności cytotoksycznej wobec komórek nienowotworowych HaCaT (zdrowe ludzkie keratynocyty) w celu określenia czy efekt działania związków wynika z działania ogólnie toksycznego, czy też jest działaniem selektywnym wobec komórek HeLa. Wyniki testów wykazały, że efekt cytotoksyczny wybranych sulfonamidów wobec komórek zdrowych był znacznie słabszy niż w stosunku do komórek HeLa. Wartości IC_{50} wobec linii HaCaT wyniosły 195 µM i 125 µM, odpowiednio dla związku **71** i **72**.

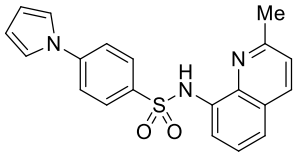
Analizując wyniki badań dla serii *N*-podstawionych pochodnych 4-(1*H*-pirol-1-ylo)benzenosulfonamidu **85**–**102**, wyróżniającą aktywnością cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych charakteryzowały się pochodne zawierające podstawnik 8-chinolinylowy na atomie azotu grupy sulfonamidowej (**90**–**92**). Wśród nich 4-(1*H*-pirol-1-ylo)-*N*-(chinolin-8-ylo)benzenosulfonamid (**90**) wykazał wysoką aktywność przeciwnowotworową w zakresie IC_{50}: 3–7 µM wobec linii HCT-116, HeLa i MCF-7. Obecność podstawnika metylowego w pozycji 7 chinoliny (**92**) spowodowała umiarkowane obniżenie aktywności cytotoksycznej

wobec trzech badanych linii komórkowych do wartości IC_{50}: 19–50 μM. Natomiast wprowadzenie grupy metylowej w pozycję 2 chinoliny (**91**) zdecydowanie obniżyło aktywność związku wobec linii MCF-7, zachowując jednocześnie wysoką aktywność wobec komórek HCT-116 (IC_{50} = 9 μM) i umiarkowanie dobrą wobec linii HeLa (IC_{50} = 25 μM). Warto zauważyć ponadto, że obecność podstawnika benzo-2,1,3-tiadiazolowego jako skondensowanego układu heterocyklicznego skutkowała dobrą aktywnością zw. **95** wobec linii HCT-116 i MCF-7 (IC_{50} = 23 μM).



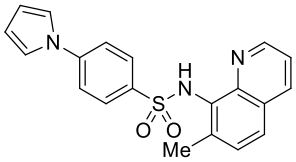
90

IC_{50}: 7 μM *HeLa*
3 μM *HCT-116*
5 μM *MCF-7*



91

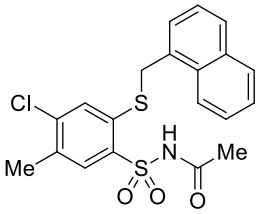
IC_{50}: 25 μM *HeLa*
9 μM *HCT-116*
93 μM *MCF-7*



92

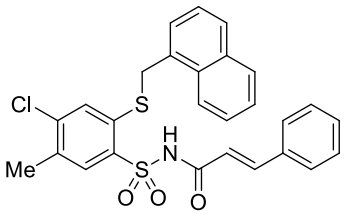
IC_{50}: 20 μM *HeLa*
19 μM *HCT-116*
50 μM *MCF-7*

Pochodne *N*-acylobenzenosulfonamidu **103–132** (**V**) wykazały zależną od struktury zróżnicowaną aktywność przeciwnowotworową w zakresie badanych stężeń 1–100 μM. Najbardziej obiecujące związki zawierały w pozycji 2 pierścienia benzenowego podstawnik 1-naftylometylotiolowy, a przy atomie azotu grupy sulfonamidowej resztę kwasu octowego (**112**) lub cynamonowego (**132**). Najwyższą aktywność wobec trzech linii prezentowała pochodna **112**, dla której wartości IC_{50} mieściły się w zakresie 6–30 μM. Natomiast pochodna **132** wykazywała aktywność tylko wobec linii HeLa z wartością IC_{50} = 43 μM.



112

IC_{50}: 6 μM *HeLa*
14 μM *HCT-116*
30 μM *MCF-7*



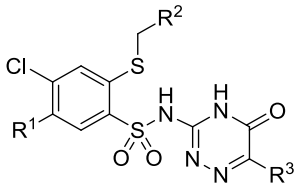
132

IC_{50}: 43 μM *HeLa*
77 μM *HCT-116*
96 μM *MCF-7*

4.3.3.3. Ilościowe zależności struktura-aktywność (QSAR)

Analiza ilościowych zależności struktura-aktywność QSAR opierała się na korelacji deskryptorów molekularnych, użytych jako zmienne niezależne, z wynikami eksperymentalnymi testów biologicznych, traktowanych jako zmienne zależne. Struktury dwuwymiarowe związków serii **III** obliczono z wykorzystaniem programu Gaussian, a następnie poddano optymalizacji z wykorzystaniem teorii funkcjonałów gęstości (DFT).

Uzyskane modele trójwymiarowych cząsteczek pozwoliły na wyznaczenie w programie Dragon deskryptorów molekularnych, wykorzystanych następnie do analizy statystycznej w programie Statistica.



III

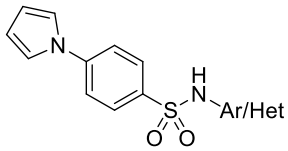
W wyniku przeprowadzenia analizy regresji wielorakiej z algorytmem krokowym postępującym wyznaczono równanie QSAR, korelujące aktywność cytotoksyczną (IC_{50}) z wybranymi deskryptorami molekularnymi badanych związków serii **III** w modelu raka szyjki macicy HeLa:

IC_{50} = 57,13 HATS6s + 163,69 Hy – 10,69 RDF125m – 389,12 SpMax5_Bh(p) + 73,74 SM3_G

(R^2 = 0,85; Q^2 = 0,76; F = 22,84; p = 1,23 x 10^{-7})

Otrzymane równanie było istotne statystycznie, wyjaśniało 85% zmienności współczynnika IC_{50} oraz charakteryzowało się wysoką przydatnością otrzymanego modelu do przewidywania aktywności przeciwnowotworowej sulfonamidów szeregu **III**, na co wskazywała wartość Q^2 = 0,76. Znak dodatni współczynnika regresji dla deskryptora Hy wskazywał, że wzrost parametru Hy skutkuje wyższą wartością IC_{50}. Można zatem wnioskować, że dla wysokiej aktywności związku pożądana była niska hydrofilowość. Pozostałe deskryptory zawarte w równaniu tj. HATS6s (*ang*. leverage-weighted autocorrelation of lag 6/weighted by I-state), RDF125m (*ang.* Radial Distribution Function - 125/weighted by mass), SpMax7_Bh(p) (*ang.* largest eigenvalue n. 7 of Burden matrix weighted by polarizability), SM3_G (*ang.* spectral moment of order 3 from geometrical matrix) należały do deskryptorów opisujących skomplikowane trójwymiarowe cechy molekuł. Wyższe parametry deskryptorów RDF125m i SpMax5_Bh(p) związane były z wyższą aktywnością przeciwnowotworową molekuły, natomiast wzrost parametrów HATS6s i SM3_G odpowiadał obniżeniu tej aktywności.

Ustalenie zależności między strukturą i aktywnością biologiczną związków serii **IV** metodą QSAR, podobnie jak dla serii **III**, wymagała optymalizacji struktur cząsteczek przy użyciu programu Gaussian, stosując teorię funkcjonałów gęstości (DFT). Analizę ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów (OPLS) jak i walidacje modeli przeprowadzono za pomocą programu SIMCA.



IV

Analiza OPLS wyłoniła trzy modele, w których wpływ poszczególnych deskryptorów na aktywność biologiczną określono za pomocą wartości VIP (*ang.* variable influence on projection). Wygenerowane modele OPLS wskazały na preferencję podstawników o skondensowanych pierścieniach i pozbawionych połączeń mostkowych, tj. podstawników o strukturze sztywnej i pozbawionej możliwości swobodnej rotacji.

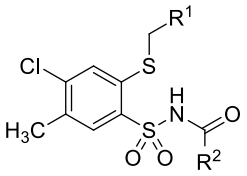
W modelu HCT-116 duże znaczenie dla aktywności prezentował deskryptor F08[C-O] opisujący sumę występowania w cząsteczce par atomów C i O w odległości topologicznej 8 wiązań. Częstość występowania wymienionej pary atomów była mniejsza dla związków o wyższej aktywności. Istotny wpływ wykazały również parametry B09[C-O], F09[C-O], przy czym pożądaną była wartość 0. Preferowane niskie wartości deskryptorów RBN (liczba wiązań o swobodnej rotacji) i RBF (ułamek wiązań rotujących w stosunku do wszystkich wiązań), a także NRS (liczba układów pierścieniowych) także wpływały korzystnie na aktywność cząsteczek.

Aktywność *N*-(arylo/heteroarylo)-4-(1*H*-pirol-1-ylo)benzenosulfonamidów (seria **IV**) wobec linii komórkowej HeLa w wyznaczonym modelu była powiązana z deskryptorem CATS2D_07_DL, który określał sumę występowania w cząsteczce donora wiązania wodorowego w odległości topologicznej 7 od lipofilowego atomu cząsteczki oraz deskryptorami B09[C-O] i F09[C-O], których wartości zależały od obecności pary atomów C i O w odległości topologicznej 9 wiązań. Wartości wymienionych deskryptorów równe 0 sprzyjały wysokiej aktywności cytotoksycznej. Istotne znaczenie dla aktywnych struktur wykazywały również deskryptory F08[C-O], RBN oraz NRS, dla których preferowane były niskie wartości.

W modelu MCF-7 najistotniejszymi okazały się deskryptory wskazujące na destabilizujący wpływ atomów tlenu na aktywność cytotoksyczną. Należy tu wymienić nO – opisujący liczbę atomów O; O-060 – wskazujący liczbę atomów tlenu związanych z podstawnikami typu alkil, aromat, wiązanie podwójne; T(O..O) – odnoszący się do sumy odległości topologicznych pomiędzy atomami O oraz deskryptory B01[C-O], B04[O-S], B05[O-O], B09[N-O], B10[C-O], F04[O-S], F05[O-O], F09[N-O], F10[C-O] związane z obecnością atomu O. Zaobserwowano, że niższe wartości wymienionych deskryptorów warunkują wyższą aktywność cząsteczek.

W oparciu o metodę wielorakiej regresji liniowej (Multiple Linear Regression, MLR) wyznaczono dla związków serii **V** modele QSAR w postaci równań 1–3, w których jako

zmienną zależną wykorzystano wartość eksperymentalną GP (procent wzrostu komórek nowotworowych przy stężeniu związku 100 μM). Optymalizacji struktur dokonano metodą półempiryczną opartą na polu siłowym AM1.



V

1. **Model MCF-7**

GP = 89,07±6,24 + 36,51±6,05 NRS – 7,88±2,51 CATS2D_06_DL – 4,81±0,63 F07[C-C]
R^2 = 0,77; Q^2 = 0,59; F = 19,77; p = 6,3x10^{-6}

2. **Model HeLa**

GP = 11409,30±3252,32 – 24,10±4,46 F08[C-S] – 3993,18±1140,25 qpmax + 18,60±5,92 CATS2D_07_DA + 0,24±0.09 ECC
R^2 = 0,76; Q^2 = 0,81; F = 13,77; p = 3,5 10^{-5}

3. **Model HCT-116**

GP = 146,53±7,22 – 4,32 ± 0,76 CATS2D_03_LL – 15,90 ±2,51 F05[C-S] + 5,98 ±1,20 C-024 + 9,59±3,72 B10[C-S]
R^2 = 0,89; Q^2 = 0,83; F = 36,89; p = 6,08x10^{-8}

Dla modelu MCF-7 (***równanie 1***), aktywność przeciwnowotworowa związków opisana jako GP, uzależniona była od trzech deskryptorów. Pierwszy z nich opisujący liczbę pierścieni (NRS) przyjmował współczynnik dodatni, co wskazywało na obniżenie aktywności przeciwnowotworowej przy dodatkowej liczbie pierścieni. Natomiast podwyższenie aktywności korelowało z wyższymi wartościami deskryptora CATS2D_06_DL, opisującego odległość topologiczną (6 wiązań) pomiędzy donorem wiązania wodorowego i lipofilowym atomem cząsteczki oraz deskryptora F07[C-C], określającego obecność par atomów C-C w odległości topologicznej 9 wiązań.

Deskryptory występujące w równaniu dla modelu HeLa (***równanie 2***) wskazywały na korzystny dla aktywności wpływ cech cząsteczek, takich jak częstość występowania pary atomów C-S w odległości 8 wiązań (F08[C-S]) i dodatni ładunek na atomie siarki grupy sulfonamidowej (qpmax). Pozostałe dwa deskryptory, to jest suma występowania w cząsteczce donora wiązania wodorowego w odległości topologicznej 7 od akceptora wiązania wodorowego (CATS2D_07_DA) oraz największa odległość geometryczna między atomami cząsteczki (ECC) to właściwości, które obniżały aktywność molekuł.

Model wyznaczony dla linii HCT-116 (***równanie 3***) pokazał, że na wzrost aktywności wpływa liczba centrów lipofilowych oddalonych od siebie o 3 wiązania (CATS2D_03_LL)

oraz częstość występowania par atomów C-S w odległości topologicznej 5 (F05[C-S]). Natomiast występowanie w cząsteczce fragmentów $C_{(Ar)}$-CH-$C_{(Ar)}$, jak również obecność par atomów C-S w odległości 10 wiązań wskazywały na niepożądane cechy.

4.3.3.4. Badanie apoptozy

Zdolność indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych przez chemioterapeutyki jest cechą wielce pożądaną, dlatego w prowadzonych badaniach podjęto się zbadania mechanizmu działania otrzymanych pochodnych benzenosulfonamidu. Aktywność indukująca apoptozę została oceniona na podstawie: fragmentacji DNA, utraty potencjału błony mitochondrialnej, translokacji fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej i aktywacji kaspaz. Zbadano ponadto zmiany morfologiczne komórek nowotworowych pod wpływem testowanych benzenosulfonamidów.

Morfologia komórek

Wyniki obserwacji mikroskopowych komórek linii HeLa i HCT-116 traktowanych pochodną *N*-(1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu **26** wykazały, że związek ten wywołuje charakterystyczne dla apoptozy zmiany morfologiczne tj. obkurczenie i odklejenie komórek od podłoża w zakresie stężeń 50–100 µM. Natomiast w przypadku pochodnych *N*-(5-okso-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu **71** i **72** inkubowanych z komórkami HeLa zmiany takie jak zaokrąglanie i odrywanie komórek od podłoża zaobserwowano już przy stężeniu 25 µM. Przy wzroście stężenia związków **71** i **72** do 50 µM komórki nowotworowe przybierały wrzecionowaty kształt i charakteryzowały się zredukowaną cytoplazmą.

Analiza cyklu komórkowego

Zaburzenie cyklu komórkowego jest jednym z najbardziej charakterystycznych mechanizmów działania leków przeciwnowotworowych. Badania zatrzymania cyklu polegają na cytometrycznym pomiarze dystrybucji komórek w fazach G1, S i G2/M. Ponadto w metodzie tej identyfikuje się fazę sub-G1, odpowiadającą populacji komórek o zmniejszonej ilości DNA, co świadczy o degradacji DNA w wyniku uruchomienia procesu apoptozy.

Inkubacja komórek HCT-116 i HeLa ze związkiem **26**, jak również komórek linii MCF-7 ze związkiem **35** (pochodna *N*-(1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu) spowodowała zwiększenie populacji komórek w fazie sub-G1 w sposób zależny od dawki. Dla linii HCT-116 odnotowano wzrost populacji komórek w tej fazie o 48,6%, komórek HeLa o 21%, natomiast komórek MCF-7 o 20% (przy stężeniu 100 µM i po 24 h traktowania).

Dla związków **71** i **72** przeprowadzone badania również wykazały zależny od stężenia wzrost populacji komórek HeLa w fazie sub-G1 (po 24 h traktowania), potwierdzając tym

samym postępującą fragmentację DNA i zaprogramowaną śmierć komórki. Ponadto analiza cytometryczna dokonana dla związku **72** przy stężeniu 25 i 50 μM wskazała na wzrost populacji komórek w fazie G2, co świadczy o zatrzymaniu cyklu życiowego komórek HeLa w tej fazie.

W dalszych badaniach wykazano, że 4-(1*H*-pirol-1-ylo)-*N*-(chinolin-8-ylo)benzenosulfonamid (**90**) promuje zahamowanie cyklu podziału komórek nowotworowych w fazie G2/M. Związek **90** w zakresie badanych stężeń 2,5–10 μM powodował wzrost populacji komórek HCT-116 (48 h traktowania), HeLa i MCF-7 (72 h traktowania) w tej fazie średnio do 50%. Wzrostowi populacji komórek w fazie G2/M towarzyszył jednoczesny spadek populacji w fazie G0/G1.

Analiza potencjału błony mitochondrialnej

Kolejnym krokiem potwierdzającym właściwości proapoptotyczne otrzymanych sulfonamidów było zbadanie ich wpływu na potencjał błony mitochondrialnej ($\Delta\psi_m$) komórek nowotworowych. Spadek potencjału jest jednym z wczesnych objawów apoptozy. Wyniki badań wykazały, że już niskie stężenia (25 μM) związków **26** i **35** powodowały znaczący spadek potencjału błony mitochondrialnej w komórkach HeLa, HCT-116 i MCF-7 (populacja komórek o wysokim $\Delta\psi_m$ wynosiła poniżej 10%). Spadek $\Delta\psi_m$ odnotowano także w przypadku działania związków **71** i **72** na komórki HeLa, aczkolwiek o efekcie słabszym niż dla wyżej opisanych pochodnych (populacja komórek HeLa o wysokim $\Delta\psi_m$ wyniosła ok. 40% przy stężeniu 100 μM).

Translokacja fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej

W procesie apoptozy cząsteczki fosfolipidu - fosfatydyloseryny, które w komórce prawidłowej zlokalizowane są w wewnętrznej warstwie błony komórkowej ulegają przemieszczeniu do warstwy zewnętrznej. W celu ilościowego oszacowania apoptotycznych komórek, przeprowadzono pomiar ekspozycji fosfatydyloseryny na zewnętrznej warstwie błony komórkowej przy zastosowaniu Aneksyny V. Subpopulacje komórkowe znakowane Aneksyną V zidentyfikowano na podstawie ich fluorescencji i podzielono na komórki żywe, nekrotyczne, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne. Do znakowania późnych komórek apoptycznych użyto jodku propidyny (PI) lub 7-aminoaktynomycyny (7-AAD).

Wykazano, że koinkubacja komórek HCT-116 i HeLa ze związkiem **26** w badanym zakresie stężeń (25–100 μM) spowodowała wzrost populacji komórek wczesno- i późnoapoptotycznych. Traktowanie komórek HeLa związkami **71** i **72** w tym samym zakresie stężeń również prowadziło do wzrostu populacji komórek wczesno- i późnoapoptotycznych. Podobnie w przypadku zastosowania 4-(1*H*-pirol-1-ylo)-*N*-(chinolin-8-ylo)benzenosulfonamidu (**90**) w stężeniach 2,5; 5 i 10 μM, potwierdzono zwiększenie populacji komórek wczesno-

i późnoapoptotycznych dla linii komórkowych HeLa i HCT-116, natomiast dla linii MCF-7 odnotowano wzrost tylko populacji późnoapoptotycznej.

Aktywacja kaspaz

Aktywacja kaspaz odgrywa kluczową rolę w procesie apoptozy, jest wymagana aby zaszły biochemiczne i morfologiczne zmiany apoptotyczne, takie jak fragmentacja DNA, tworzenie ciał apoptotycznych czy kondensacja chromatyny. Oceny zdolności związku do aktywacji kaspaz dokonano z zastosowaniem znakowanego fluoresencyjnie inhibitora kaspaz FAM-VAD-FMK (karboksyfluoresceina (FAM) sprzężona z syntetycznym inhibitorem kaspaz VAD-FMK). Inhibitor ten zawiera sekwencję aminokwasową rozpoznawaną przez kaspazy (kaspazy 1–9), dzięki czemu może związać się kowalencyjnie z centrum aktywnym enzymu. Wzrost aktywacji kaspaz przekłada się bezpośrednio na wzrost intensywności fluorescencji kompleksu kaspaza-inhibitor w komórkach.

Wyniki badań przeprowadzonych dla związków **26** i **35** w zakresie stężeń 25–100 µM jednoznacznie wykazały wzrost aktywacji kaspaz w badanych komórkach (HeLa, HCT-116 i MCF-7). Największy wpływ na aktywację kaspaz zaobserwowano w przypadku komórek HeLa, których populacja o zwiększonej fluorescencji wzrosła o 31% w obecności związku **26** w stężeniu 100 µM. Aktywację kaspaz w liniach HeLa, HCT-116 i MCF-7 wywoływał także związek **90** w zakresie stężeń 2,5–10 µM. Przy najwyższym stężeniu tego związku populacja komórek HCT-116 wykazujących fluorescencję wzrosła średnio o 20%, komórek HeLa o 16%, a komórek MCF-7 o 14%.

4.3.3.5. Stabilność metaboliczna

Stabilność metaboliczna jest jedną z ważnych właściwości farmakokinetycznych, która opisuje podatność ksenobiotyku bądź leku na chemiczną modyfikację struktury w wyniku działania enzymów w organizmie. Biotransformacja zachodzi najczęściej w wątrobie i ma na celu przekształcenie substancji w hydrofilowe metabolity, które mogą zostać wydalone z moczem lub żółcią. Niska stabilność metaboliczna wiąże się z krótszym czasem działania leku.

Badania stabilności metabolicznej *in vitro* w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (37 °C, pH 7) przeprowadzono z zastosowaniem enzymów mikrosomalnych wątroby i NADPH. Wyniki stabilności metabolicznej przedstawiono w postaci mikrosomalnego czasu półtrwania ($t_{1/2}$). Testom poddano związki o wyróżniającej się aktywności i zróżnicowanych podstawnikach.

Wyniki testów przeprowadzonych dla pochodnych *N*-(5-arylo-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu (seria **II**) wykazały, że największa stabilność metaboliczna związku

23 ($t_{1/2}$ > 60 min) była uwarunkowana obecnością grupy 4-trifluorometylofenylowej w miejscu podstawników R^2 i Ar. Zamiana ugrupowania Ar = 4-CF_3-C_6H_4 na podstawnik 4-metoksyfenylowy (**24**) skutkowała spadkiem czasu półtrwania z >60 min do 42,4 min. Analogiczną zależność zaobserwowano także dla pary związków **26** (Ar = 4-CF_3-C_6H_4, $t_{1/2}$ = 32,8 min) i **27** (Ar = 4-MeO-C_6H_4, $t_{1/2}$ < 5 min) zawierających grupę 1-naftylową jako podstawnik R^2. Wyniki badań dla związków **19** (Ar = 3-MeO-C_6H_4, $t_{1/2}$ = 24,9 min) i **20** (Ar = 3,4-diMeO-C_6H_3, $t_{1/2}$ = 17,6 min) pokazały, że dodatkowa grupa metoksylowa w podstawniku Ar także powoduje obniżenie stabilności metabolicznej cząsteczki. Na podstawie dokonanych obserwacji można wnioskować, że podstawnik metoksylowy jest miejscem podatnym na działanie enzymów mikrosomalnych, a jego niepożądany wpływ można obniżyć poprzez zastąpienie go podstawnikiem trifluorometylowym. Biorąc pod uwagę korzystny wpływ grupy trifluorometylowej na stabilność metaboliczną, jak i najkorzystniejsze wyniki aktywności przeciwnowotworowej, wytypowano zw. **26** ($t_{1/2}$ = 32,8 min, IC_{50} = 36 μM (HCT-116), 34 μM (HeLa)) jako potencjalnego kandydata na strukturę wiodącą.

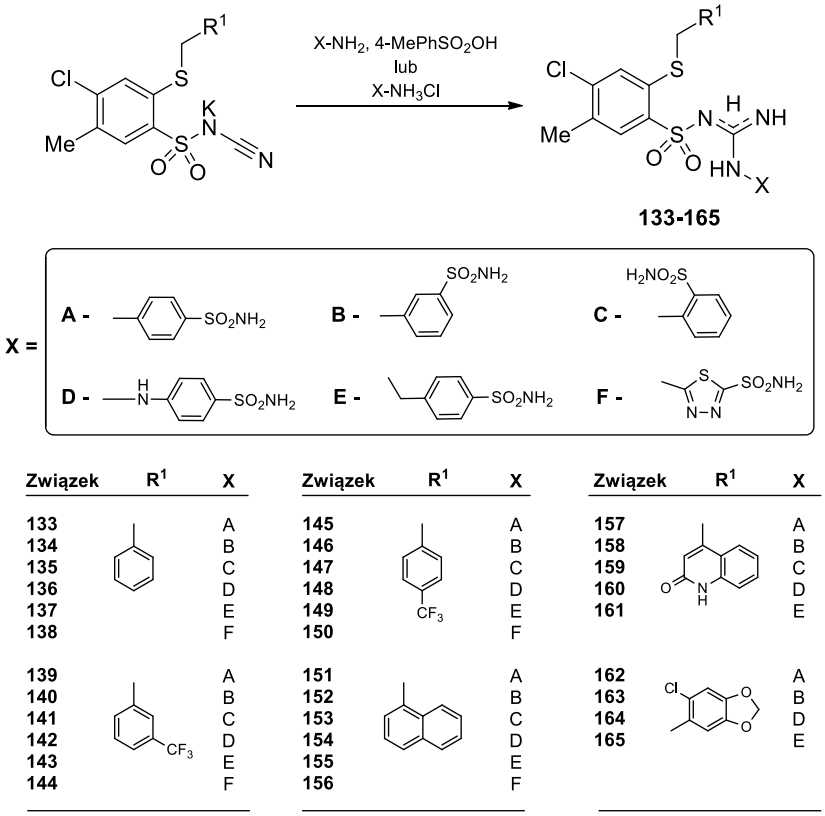
Przeprowadzone badania stabilności metabolicznej dla *N*-(6-R^3-5-okso-4,5-dihydro-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidów (seria **III**) wykazały, że pochodne *N*-(6-benzylo-5-okso-4,5-dihydro-1,2,4-triazyn-3-ylo)-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (**69–73**) o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej wobec linii HeLa charakteryzowała stosunkowo dobra stabilność metaboliczna reprezentowana czasem półtrwania w przedziale 20,0–38,5 min. Spośród nich, związek **72** zawierający jako R^1 6-chlorobenzo[*d*][1,3]dioksolyl wykazał się najmniejszą podatnością na działanie enzymów wątrobowych (**72**, $t_{1/2}$ = 38,5 min), co przy wysokiej aktywności przeciwnowotworowej (IC_{50} = 19 μM (HeLa)) czyni tę pochodną interesującą strukturą wiodącą.

W wyniku testów przeprowadzonych dla *N*-acylobenzenosulfonamidów (seria **V**) stwierdzono, że stabilność metaboliczna uzależniona jest od natury chemicznej podstawników pierścienia benzenowego w pozycji 2 i atomu azotu ugrupowania sulfonamidowego. Najwyższą stabilność wykazał związek **113** ($t_{1/2}$ = 68,61 min), zawierający grupę 2-naftylową jako podstawnik R^1 i grupę metylową jako podstawnik R^2. Zaobserwowano, że zmiana podstawnika 2-naftylowego (**113**) na 1-naftylowy (**112**) obniżyła czas półtrwania z 68,61 min do 24,23 min. Pomimo tego można uznać, że związek **112**, wykazujący aktywność cytotoksyczną wobec linii HeLa, MCF-7 i HCT-116 (IC_{50}: 6–30 μM), charakteryzował umiarkowanie długi czas metabolicznego rozpadu $t_{½}$ = 24,23 min, co jest cechą pożądaną dla przyszłych optymalizacji.

4.3.4. Wyniki badań nad *N*-podstawionymi benzenosulfonamidami - potencjalnymi inhibitorami izoform IX i XII anhydrazy węglanowej

4.3.4.1. Synteza i struktura

Nowe oryginalne *N*-podstawione pochodne *N'*-(4-chloro-2-merkapto-5-metylo-benzenosulfonylo)guanidyny serii **VI** (publikacja **A2**) otrzymano na drodze jednoetapowej syntezy z wykorzystaniem kluczowych soli potasowych *N*-(benzenosulfonylo)cyjanamidu oraz amino- i hydrazynylo-komponentów (*Schemat 7*). Reakcje prowadzono we wrzeniu (2–28 h) z zastosowaniem rozpuszczalników, takich jak toluen, *p*-dioksan lub acetonitryl.

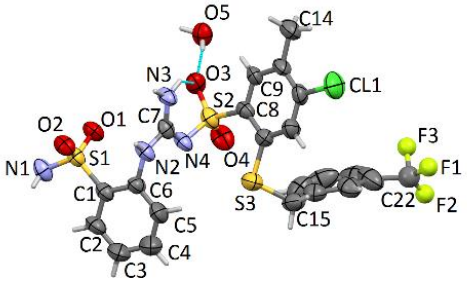


Schemat 7. *Synteza N-podstawionych pochodnych N'-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)guanidyn serii* ***VI****.*

Strukturę chemiczną pochodnych guanidyny potwierdziły, w widmach IR, pasma absorpcyjne grup NH i NH_2 w zakresie 3552–3176 cm^{-1} oraz pasma drgań rozciągających C=N w zakresie 1656–1619 cm^{-1}. W widmach ^1H NMR, dla serii związków zawierających podstawniki A–D i F, obserwowane przy 6,92–7,05 ppm singlety pochodzące od dwóch grup NH guanidyny wskazywały na podstawienie guanidyny w pozycjach 1 i 3 (-NHC(=NH)NH-). Natomiast widma związków posiadających podstawnik 4-sulfoamoilobenzylowy (X = E) prezentowały poszerzony singlet przy wartościach 6,70–6,85 ppm odpowiadający niepodstawionej grupie NH_2 guanidyny. Ponadto brak singletu pochodzącego od protonu grupy

SO_2NH dodatkowo potwierdził, iż guanidyna w tych pochodnych (X = E) została podstawiona w pozycjach 2 i 3 (-N=C(NH_2)NH-).

Struktura rentgenokrystalograficzna monokryształu reprezentatywnego związku **141** (*Rycina 7*) ukazała, że w ciele stałym fragment guanidyny przyjął formę tautomeryczną z zdeprotonownym atomem azotu N4. Taka forma tautomeryczna umożliwiała utworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego między atomem wodoru grupy N3-H i atomem tlenu O3 grupy SO_2. Zaobserwowano ponadto, że reszta guanidyny nie znajdowała się w jednej płaszczyźnie z pierścieniem aromatycznym podstawnika 2-sulfoamoilofenylowego, a długości wiązań C7-N3 i C7-N4 wynoszące odpowiednio 1,340 i 1,348 Å wskazywały na ich częściowo podwójny charakter.

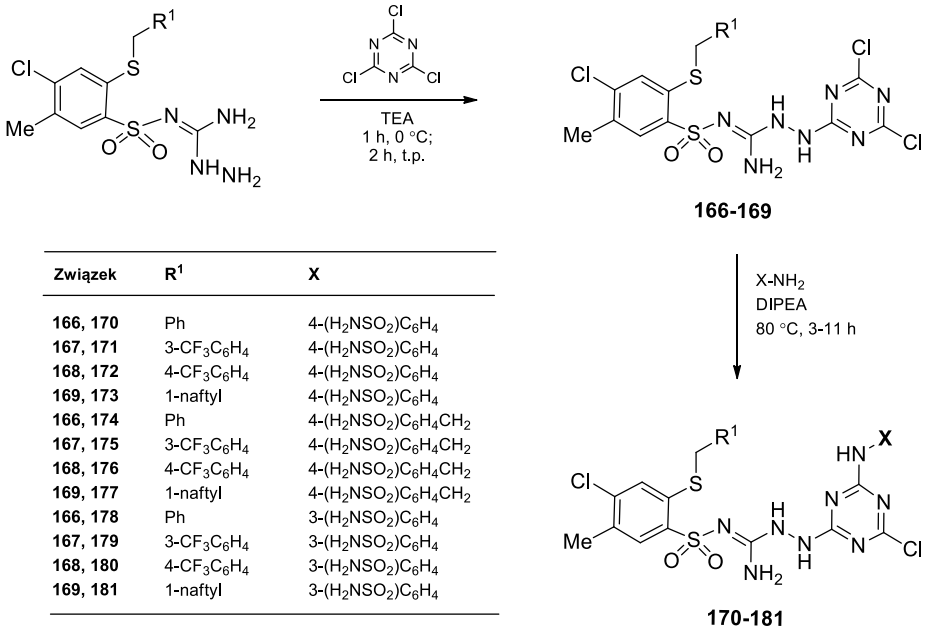


Rycina 7. *Projekcja ORTEP monokryształu związku* ***141****.*

Syntezę pochodnych 2-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)-1-(1,3,5-triazyn-2-yloamino)guanidyny serii **VII** (publikacja **A6**) zaplanowno w dwóch etapach (*Schemat 8*). W pierwszym kroku otrzymano nowe 2-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)-1-(4,6-dichloro-1,3,5-triazyn-2-yloamino)guanidyny (**166–169**) w reakcji odpowiednich 1-amino-2-(2-arylometylotio-4-chloro-5-metylobenzenosulfonylo)-guanidyn z 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyną w obecności trietyloaminy, w środowisku bezwodnego tetrahydrofuranu i w obniżonej temperaturze 0 °C. Następnie otrzymane pochodne **166–169** poddano reakcji z 3- lub 4-aminobenzenosulfonamidem oraz chlorowodorkiem 4-(aminometylo)benzenosulfonamidu, w której nukleofilowe podstawienie drugiego atomu chloru 4,6-dichloro-1,3,5-triazyny zachodziło w obecności diizopropyloetyloaminy (DIPEA), w środowisku bezwodnego DMF i w atmosferze gazu obojętnego - argonu, w podwyższonej temp. 65–80 °C przez okres 3–11 h.

Analiza spektroskopowa ^{1}H NMR związków finalnych wykazała obecność dwóch singletów pochodzących od protonów grup NH_2 guanidyny i pierwszorzędowego sulfonamidu w zakresie 6,94–7,26 ppm, a także 3 singletów odpowiadających protonom trzech grup NH

(8,01–10,54 ppm). Ponadto struktury wszystkich pochodnych scharakteryzowane zostały za pomocą spektrometrii mas, ^{13}C NMR oraz IR.



Związek	R^1	X
166, 170	Ph	4-$(H_2NSO_2)C_6H_4$
167, 171	3-$CF_3C_6H_4$	4-$(H_2NSO_2)C_6H_4$
168, 172	4-$CF_3C_6H_4$	4-$(H_2NSO_2)C_6H_4$
169, 173	1-naftyl	4-$(H_2NSO_2)C_6H_4$
166, 174	Ph	4-$(H_2NSO_2)C_6H_4CH_2$
167, 175	3-$CF_3C_6H_4$	4-$(H_2NSO_2)C_6H_4CH_2$
168, 176	4-$CF_3C_6H_4$	4-$(H_2NSO_2)C_6H_4CH_2$
169, 177	1-naftyl	4-$(H_2NSO_2)C_6H_4CH_2$
166, 178	Ph	3-$(H_2NSO_2)C_6H_4$
167, 179	3-$CF_3C_6H_4$	3-$(H_2NSO_2)C_6H_4$
168, 180	4-$CF_3C_6H_4$	3-$(H_2NSO_2)C_6H_4$
169, 181	1-naftyl	3-$(H_2NSO_2)C_6H_4$

Schemat 8. *Synteza pochodnych 2-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)-1-(1,3,5-triazyn-2-yloamino)guanidyny typu* ***VII****.*

4.3.4.2. Aktywność inhibicyjna wobec wybranych izoform hCA

Otrzymane *N*-podstawione pochodne *N'*-(2-merkaptobenzenosulfonylo)guanidyn serii **VI** (**133–165**) zostały poddane ocenie aktywności inhibicyjnej wobec izoform ludzkiej anhydrazy węglanowej (hCA) tj. cytozolowych izoform I i II oraz izoform transbłonowych IX i XII związanych z procesem nowotworowym. Do badań włączono związki referencyjne – klinicznie stosowane leki – tj. acetazolamid, metazolamid, etoksyzolamid, dichlorofenamid oraz indisulam.

Aktywność inhibicyjna badanych związków wobec hCA I mieściła się w przedziale stałej inhibicji K_I od 87 nM do 6506 nM i była niższa niż dla leków referencyjnych. W przypadku hamowania aktywności izoformy hCA II wartości K_I dla wszystkich badanych związków mieściły się w zakresie 7,8–4500 nM, przy czym wyższą aktywność prezentowały pochodne zawierające jako R^1 podstawiony bądź nie podstawiony podstawnik fenylowy (**133–150**, K_I: 7,8–156 nM). Z kolei skondensowane dwupierścieniowe podstawniki R^1 znacząco obniżały powinowactwo do izoformy hCA II (**151–165**, K_I: 249–4500 nM).

Wśród zbadanych związków aż 40% wykazało wyższą aktywność inhibicyjną wobec izoformy hCA IX (K_I: 4,7–21 nM), w porównaniu z sulfonamidami referencyjnymi (K_I: 24–50 nM). Najwyższą aktywność wobec hCA IX odnotowano dla zw. **138** (K_I = 4,7 nM), którego siła inhibicyjna była 5-krotnie wyższa niż referencyjnego indisulamu (K_I = 24 nM). W przypadku

izoformy XII najwyższe powinowactwo prezentowały związki zawierające ugrupowanie 2-sulfoamoilo-1,3,4-tiadiazolowe ($K_I \leq 11$ nM), wśród których związek **138** posiadał stałą dysocjacji $K_I = 0{,}96$ nM.

W grupie związków serii **VI** udało się wyselekcjonować sulfonamidy o stosunkowo wysokiej selektywności wobec hCA IX, w porównaniu do fizjologicznie ważnych izoform (hCA I, hCA II), co jest szczególnie istotne w projektowaniu nowych związków przeciwnowotworowych, ukierunkowanych na hamowanie aktywności enzymatycznej hCA IX. Najbardziej obiecującym okazał się związek **156** o najwyższym indeksie selektywności wobec izoformy IX (hCA I/hCA IX = 261, hCA II/hCA IX = 26), jak również wobec izoformy XII (hCA I/hCA XII = 223, hCA II/hCA XII = 23). Na uwagę zasługiwał również związek **155**, którego selektywność wobec hCA IX i XII była zadowalająca, a indeksy selektywności mieściły się w przedziale 13–210 (hCA I/hCA IX = 210, hCA II/hCA IX = 20, hCA I/hCA XII = 135, hCA II/hCA XII = 13).

Przeprowadzone testy dla pochodnych 2-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzeno-sulfonylo)-1-(1,3,5-triazyn-2-yloamino)guanidyny serii **VII** (**170–181**) pokazały, że związki te są słabymi inhibitorami izoformy hCA I (K_I: 66–3341 nM). Podobnie niskie powinowactwo związków odnotowano dla izoformy hCA II, z wyjątkiem pochodnych zawierających podstawnik 3-trifluorometylofenylowy jako R^1 (**171**, **175**, **179**), których wartości K_I zawierały się w zakresie 5,4–9,3 nM i były niższe bądź porównywalne z wartościami uzyskanymi dla etoksyzolamidu ($K_I = 8$ nM).

Aktywność pochodnych **170–181** wobec izoformy hCA IX ściśle korelowała ze strukturą podstawnika X zajmującego pozycję 6 pierścienia 1,3,5-triazyny. Wśród przebadanych pochodnych, związki zawierające podstawnik 4-sulfoamoilofenylowy (**170–173**) wykazywały najsilniejsze właściwości inhibitorowe (K_I: 37,1–42,9 nM), natomiast obecność podstawnika 3-sulfoamoilofenylowego powodowała dezaktywację inhibitorów (K_I: 421,1–3968,7 nM). W przypadku izoformy hCA XII, najwyższą aktywność inhibicyjną wykazały również pochodne prezentujące jako X resztę 4-sulfoamoilofenylową (**170–173**, K_I: 31–91,9 nM).

Wyniki przeprowadzonych testów pozwoliły wyłonić najbardziej obiecującą strukturę **173** jako selektywnego inhibitora transbłonowej izoformy hCA IX, którego powinowactwo do hCA IX było większe niż dla powszechnie występujących izoform cytozolowych hCA I i II (hCA I/hCA IX = 18, hCA II/hCA IX = 4).

4.3.4.3. Modelowanie molekularne

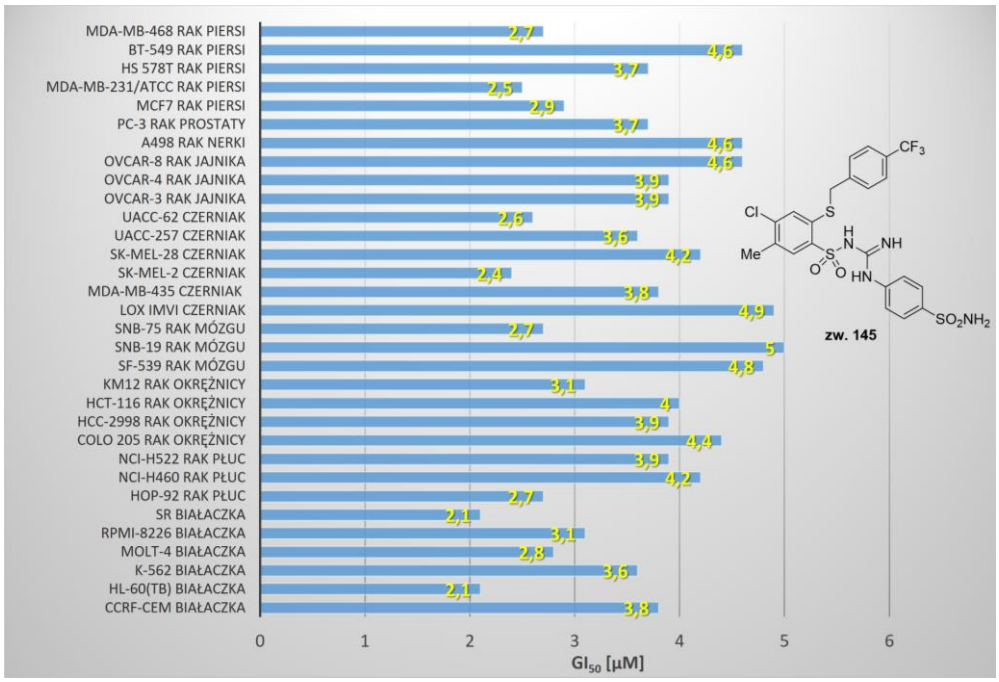
W celu wyjaśnienia selektywnego działania związku **173** wobec hCA IX na poziomie molekularnym przeprowadzono symulacje dynamiki molekularnej (MD) dla niskoenergetycznych modeli kompleksów białko-ligand. Do obliczeń komputerowych wybrano związki **173** i **181**, których różnice powinowactwa do hCA IX były duże (K_I = 41,1 nM (**173**); K_I = 3403,2 nM (**181**)), przy niewielkiej różnicy w budowie chemicznej (różnica w strukturze izomerycznych podstawników 3- i 4-H_2NSO_2-C_6H_4-). Wyniki symulacji MD wykazały, że selektywność zw. **173** wobec hCA IX można częściowo tłumaczyć stosunkowo niewielką liczbą póz wiążących (4 pozy wiążące) wyznaczonych dla kompleksu **173**-hCA IX. Stabilność zidentyfikowanych póz wiążących potwierdzono w symulacjach równowagowych o czasie trwania 250 ns. W przypadku hCA II nie udało się ustalić określonej liczby klastrów dla kompleksów **173**-hCA II i **181**-hCA II, co wskazywało na konformacyjną swobodę tych kompleksów bez wyraźnych póz wiążących.

Znaczącym rezultatem przeprowadzonego modelowania molekularnego było zidentyfikowanie regionów anhydrazy węglanowej odpowiedzialnych za selektywne hamowanie aktywności enzymatycznej hCA IX przez związek **173**. Główną rolę przypisano oddziaływaniom π-π podstawnika naftylowego i/lub fenylowego inhibitora z płaskim fragmentem guanidyny Arg64 znajdującej się regionie β-kartki hCA IX. Tego typu oddziaływań nie obserwowano dla hCA II, gdzie w miejscu Arg64 znajduje się reszta Leu57.

4.3.4.4. Aktywność przeciwnowotworowa

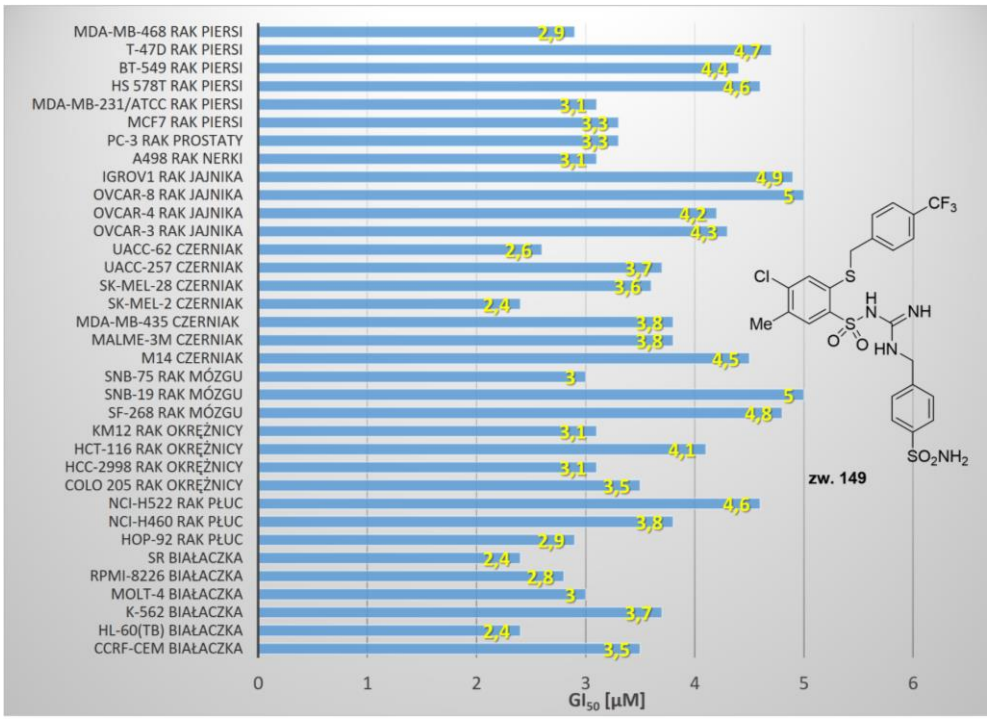
Przeprowadzone dla serii **VI** (publikacja **A2**) badania aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* w NCI (Bethesda, USA) pokazały, iż otrzymane związki posiadają zróżnicowaną aktywność wobec sześćdziesięciu linii komórkowych nowotworów ludzkich. W testach jednodawkowych w stężeniu związku 10 μM na 60 liniach komórek nowotworowych 9 typów nowotworów ludzkich, najwyższą wrażliwość na badane związki wykazała linia białaczki HL-60(TB) (związki **145**, **149**, **165**; 58% ≤ IP ≤ 83%), niedrobnokomórkowego raka płuc HOP-92 (**137**, **145**, **149**, **165**; 57% ≤ IP ≤ 89%), raka okrężnicy KM12 (**145**, **149**; 50% ≤ IP ≤ 89%), raka mózgu SNB-75 (**145**, **146**, **149**; 53% ≤ IP ≤ 71%), raka prostaty PC-3 (**145**, **146**, **149**, **165**; 54% ≤ IP ≤ 83%) i raka nerki A498 (**149**, **156**; 48% ≤ IP ≤ 63%).

Do rozszerzonych testów w 5 dawkach (0,01–100 μM) zakwalifikowano związki **145** i **149**. Aktywność przeciwnowotworową scharakteryzowano parametrami ilościowymi: GI_{50}, TGI, LC_{50}. Wyniki testów wykazały, że związek **145** prezentował znaczącą aktywność wobec 32 ludzkich linii komórek nowotworowych w zakresie niskich mikromolowych stężeń parametru GI_{50}: 2,1–5,0 μM i charakteryzował się selektywnością względem linii białaczki HL-60(TB) (GI_{50} = 2,1 μM, TGI = 5,5 μM, LC_{50} = 34,5 μM) i SR (GI_{50} = 2,1 μM, TGI = 5,9 μM, LC_{50} > 100 μM) (*Rycina 8*).



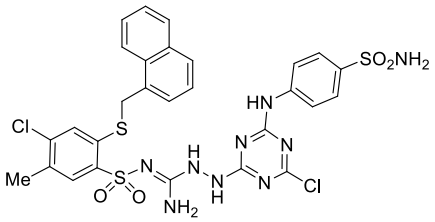
***Rycina 8**. Wartości GI_{50} wyznaczone dla związku **145**.*

Podobnie pochodna **149** posiadała wysoką aktywność wobec 35 linii w zakresie stężeń parametru GI_{50}: 2,4–5,0 µM i selektywność wobec linii białaczki HL-60(TB) (GI_{50} = 2,4 µM, TGI = 6,4 µM, LC_{50} = 54,4 µM) oraz SR (GI_{50} = 2,4 µM, TGI = 6,8 µM, LC_{50} > 100 µM) (*Rycina 9*). Należy podkreślić, że wysokiej aktywności przeciwnowotworowej związków **145** i **149** towarzyszyła stosunkowo wysoka aktywność inhibicyjna wobec izoform powiązanych z procesem nowotworowym hCA IX i hCA XII (K_I w zakresie 18–40 nM).



***Rycina 9.** Wartości GI_{50} wyznaczone dla związku **149**.*

Oceny aktywności cytotoksycznej pochodnych serii **VII** (**170–181**) (publikacja **A6**) dokonano z zastosowaniem testu MTT na liniach nowotworowych HCT-116, MCF-7, HeLa i linii zdrowych komórek ludzkich keratynocytów (HaCaT). Spośród zbadanych związków tylko pochodna **173** wykazała znaczącą aktywność przeciwnowotworową jedynie wobec linii HeLa (IC_{50} = 17 μM), a przy tym charakteryzowała się niską toksycznością wobec komórek HaCaT, co jest pożądaną cechą związku dla potencjalnego zastosowania w terapii nowotworów.



173

IC_{50}: 17 μM *HeLa*
61 μM *HaCaT*

4.3.5. Podsumowanie

1. W toku przeprowadzonych badań opracowano warunki syntezy i w pełni scharakteryzowano siedem serii nowych benzenosulfonamidów zmodyfikowanych na atomie azotu (łącznie 177 finalnych związków). Serie *N*-heterocyklicznych pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu **I–III** otrzymano z użyciem szeregu *N*-amino-*N'*-(benzenosulfonylo)guanidyn, które poddane cyklizacji w odpowiednich warunkach prowadziły do utworzenia heterocyklicznych pierścieni 1,2,4-triazolu **I** (**1–15**), 1,2,4-triazyny **II** (**16–49**), 5-okso-1,2,4-triazyny **III** (**50–84**) na atomie azotu grupy sulfonamidowej. W syntezie *N*-podstawionych 4-(1*H*-pirol-1-ylo)benzenosulfonamidów **IV** (**85–102**) wykorzystano reakcję inkorporacji atomu azotu grupy aminowej 4-amino-*N*-(arylo/heteroarylo)benzenosulfonamidu do pierścienia 1*H*-pirolu. Opierając się o unikatową reaktywność ugrupowania cyjanamidowego soli monopotasowej *N*-(benzenosulfonylo)cyjanamidu opracowano łatwą metodę acylowania sulfonamidów bez konieczności stosowania odczynników sprzęgających czy reaktywnych pochodnych acylujących (seria **V**, **103–132**). Zaproponowano nowy mechanizm reakcji acylowania sulfonamidu, który nie został wcześniej opisany w literaturze. Ugrupowanie cyjanamidowe posłużyło także jako prekursor fragmentu guanidynowego dla serii **VI** (**133–165**) w reakcji z amino-i hydrazynylo-komponentami. Do syntezy serii **VII** (**170–181**) wykorzystano reaktywną cząsteczkę 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny, która po podstawieniu 1-amino-2-(benzenosulfonylo)guanidyną, a następnie aminobenzeno-sulfonamidem stała się dogodnym łącznikiem dwóch ugrupowań farmakoforowych.

2. Wszystkie nowo otrzymane związki (łącznie 219 związków finalnych i pośrednich) scharakteryzowano w oparciu o szczegółową analizę spektroskopową (^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HRMS) oraz analizę elementarną (C, H, N). Badania rentgenokrystalograficzne pozwoliły określić budowę strukturalną związków w stanie stałym oraz dostarczyły informacji o występujących w cząsteczkach wiązaniach wodorowych wewnątrz- i międzycząsteczkowych, odpowiedzialnych za przyjmowanie określonych konformacji.

3. Testy *in vitro* przeprowadzone na liniach komórkowych nowotworów ludzkich potwierdziły potencjał przeciwnowotworowy zaprojektowanych w badaniach hybryd molekularnych, a tym samym potwierdziły słuszność postawionej hipotezy badawczej. Badania aktywności przeciwnowotworowej *N*-(5-okso-4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)-2-merkaptobenzenosulfonamidów wobec 60 linii komórkowych 9 typów nowotworów ludzkich pozwoliły wyłonić związek **11**, który może posłużyć jako struktura wiodąca do dalszych badań. Związek **11** prezentował wysoką aktywność wobec całego panelu linii nowotworowych w zakresie niskich wartości parametru GI_{50} ($GI_{50} \leq 11{,}2$ μM) ze szczególnym uwzględnieniem linii czerniaka MDA-MB-435 ($GI_{50} = 1{,}9$ μM) oraz raka nerki A498 ($GI_{50} = 1{,}9$ μM). Natomiast wyniki testów skriningowych przeprowadzonych na trzech liniach komórkowych nowotworów ludzkich: raka szyjki macicy HeLa, raka piersi MCF-7 oraz raka okrężnicy HCT-116 wykazały, że obecność farmakoforowego ugrupowania 1,2,4-triazyny w strukturze *N*-(5-arylo-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidów prowadziła do umiarkowanej aktywności przeciwnowotworowej związków **26** i **27**, scharakteryzowanej wartościami IC_{50} w zakresach 34–42 μM (HeLa) i 36–38 μM (HCT-116). Natomiast wprowadzenie pierścienia 5-okso-1,2,4-triazyny na atom azotu benzenosulfonamidu skutkowało zwiększeniem aktywności pochodnych wobec linii HeLa i wytypowaniem najbardziej aktywnych pochodnych **71** i **72** ($IC_{50} = 19$ μM). Potencjał przeciwnowotworowy wykazały również *N*-acylowane sulfonamidy, a wśród nich zw. **112** prezentujący wartości IC_{50} w zakresie 6–30 μM wobec trzech testowanych linii (HeLa, HCT-116, MCF-7). Najkorzystniejsze właściwości przeciwnowotworowe prezentowały 4-(1*H*-pirol-1-ylo)benzenosulfonamidy zawierające podstawnik *N*-(8-chinolinylowy), a w szczególności związek **90** wykazujący IC_{50}: 3–7 μM wobec komórek HeLa, HCT-116 i MCF-7.

4. W grupie *N*-podstawionych *N′*-(2-merkaptobenzenosulfonylo)guanidyn, zaprojektowanych jako inhibitory izoform hCA IX i XII, uzyskano kluczowe związki **145** i **149** hamujące wzrost komórek nowotworowych ponad 50% linii z panelu NCI-60 w zakresie GI_{50}: 2,1–5,0 μM. Należy podkreślić wysoką aktywność tych związków względem linii białaczki HL-60(TB) i SR (GI_{50}: 2,1–2,4 μM). Wśród 2-(4-chloro-2-merkapto-

5-metylobenzenosulfonylo)-1-(1,3,5-triazyn-2-yloamino)guanidyn jako potencjalnych inhibitorów hCA IX tylko pochodna **173** wykazała aktywność wobec komórek linii HeLa (IC_{50} = 17 μM), a jej selektywność wobec komórek nowotworowych potwierdziły testy cytotoksyczności przeprowadzone na zdrowych komórkach HaCaT.

5. Na podstawie testów aktywności inhibicyjnej udało się wyłonić szereg inhibitorów hCA IX i XII związanych z procesem nowotworowym. W serii trzydziestu trzech *N*-podstawionych *N′*-(2-merkaptobenzenosulfonylo)guanidyn (**I**) trzynaście pochodnych cechowała wyższa aktywność inhibicyjna wobec hCA IX (K_I: 4,7–21 nM) w porównaniu z klinicznie stosowanymi sulfonamidami referencyjnymi (K_I: 24–50 nM), zaś najwyższą aktywność względem hCA XII odnotowano dla związków zawierających ugrupowanie 2-sulfoamoilo-1,3,4-tiadiazolowe (K_I: 0,96–11 nM). Z szeregu 2-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)-1-(1,3,5-triazyn-2-yloamino)guanidyn, związki zawierające podstawnik 4-sulfoamoilofenylowy w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazyny (**VII**) wykazały najwyższą zdolność do inhibicji izoform hCA IX (K_I: 37,1–42,9 nM) i hCA XII (K_I: 31–91,9 nM).

6. Stosując modelowanie molekularne wyjaśniono selektywne działanie związku **173** wobec izoformy hCA IX i zidentyfikowano regiony anhydrazy węglanowej uczestniczące w wiązaniu tego liganda.

7. W odniesieniu do niektórych związków wykazano korelację aktywności przeciwnowotworowej z aktywnością inhibicyjną izoenzymów hCA związanych z procesem nowotworowym. Związki **145** i **149** tj. *N*-podstawione pochodne *N′*-(2-merkapto-benzenosulfonylo)guanidyny o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej efektywnie hamowały aktywność enzymatyczną izoform hCA IX i XII (K_I w zakresie 18–40 nM). Natomiast pochodna 2-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)-1-(1,3,5-triazyn-2-yloamino)guanidyny **173** jako selektywny inhibitor hCA IX i XII wykazywała znaczącą aktywność przeciwnowotworową wobec linii HeLa (IC_{50} = 17 μM).

8. Udało się dowieść, że w wyniku działania związków **26**, **71**, **72** i **90**, reprezentujących szeregi pochodnych *N*-(1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu, *N*-(5-okso-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu i *N*-(heteroarylo)-4-(1*H*-pirol-1-ylo)benzenosulfonamidu, śmierć komórek nowotworowych następuje na drodze apoptozy. Apoptozę potwierdziły zmiany morfologiczne komórek, fragmentacja DNA, utrata potencjału błony mitochondrialnej, translokacja fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej i aktywacja kaspaz (1–9).

9. Wykorzystując analizę statystyczną wyznaczono kilka modeli QSAR korelujących deskryptory molekularne z wynikami testów aktywności przeciwnowotworowej. Siedem

otrzymanych modeli dla serii *N*-(5-okso-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidów (**III**), *N*-(arylo/heteroarylo)-4-(1*H*-pirol-1-ylo)benzenosulfonamidów (**IV**) i *N*-acylobenzeno-sulfonamidów (**V**) może zostać wykorzystanych do optymalizacji struktur wiodących jak i do racjonalnego projektowania kolejnych nowych związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej.

10. Badania aktywności przeciwnowotworowej pochodnych *N*-(1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu, *N*-(5-okso-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu i *N*-acylo-benzenosulfonamidu uzupełniono o analizę stabilności metabolicznej *in vitro* z wykorzystaniem enzymów wątrobowych. Wymiernym wynikiem tych badań było wytypowanie pochodnych **26**, **72** i **112** charakteryzujących się korzystnymi parametrami stabilności metabolicznej ($t_{1/2}$: 24,2–32,8 min) oraz aktywności przeciwnowotworowej wobec linii HeLa, HCT-116 i MCF-7 (IC_{50}: 6–36 μM).

Przeprowadzone prace badawcze, stanowiące podstawę habilitacji, były finansowane przez Gdański Uniwersytet Medyczny w ramach badań własnych Młodych Naukowców i badań statutowych Katedry i Zakładu Chemii Organicznej oraz przez Narodowe Centrum Nauki (Grant NCN 2013/09/B/NZ7/00048) – główny wykonawca. Osiągnięcia naukowe wynikające ze wspominanych badań zostały nagrodzone czterema zespołowymi nagrodami naukowymi Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2013–2015, 2017.

Współpraca z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi, m.in. Uniwersytetem we Florecji, National Cancer Institute w USA, Międzyuczelnianym Wydziałem Biotechnologii UG i GUMed, Politechniką Gdańską oraz jednostkami Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego sprawiła, że podjęte badania zyskały charakter interdyscyplinarny.

Wyniki przeprowadzonych badań poszerzyły stan wiedzy w zakresie poszukiwania leków przeciwnowotworowych o strukturze benzenosulfonamidu. Uzyskane informacje dotyczące pożądanych cech strukturalnych aktywnych związków mogą zostać wykorzystane do racjonalnego projektowania kolejnych struktur o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. Obiecujące właściwości proapoptotyczne uzyskanych benzenosulfonamidów mogą być przyczynkiem do dalszych badań w kierunku określenia mechanizmu działania tych związków w komórkach nowotworowych.

Realizacja badań stanowiących podstawę habilitacji była możliwa dzięki życzliwości i owocnej współpracy z następującymi ośrodkami nauko-badawczymi:

Prof. Claudiu T. Supuran, Daniela Vullo, Andrea Angeli - NEUROFARBA Department, Section of Pharmaceutical and Nutriceutical Sciences, University of Florence, Italy - badanie inhibicji anhydrazy węglanowej

NCI Bethesda, USA - badanie aktywności przeciwnowotworowej na panelu 60 linii komórkowych nowotworów ludzkich

Prof. Tomasz Bączek, dr Mariusz Belka, dr Szymon Ulenberg, mgr Joanna Zielińska - Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny - modelowanie molekularne, analiza QSAR i stabilność metaboliczna

Dr Anna Kawiak - Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed - badanie aktywności cytotoksycznej *in vitro* na liniach komórek nowotworowych i zdrowych, badanie apoptozy

Dr Grzegorz Stasiłojć - Katedra Biotechnologii Medycznej, Zakład Biologii Komórki, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed - badanie apoptozy

Prof. Jarosław Chojnacki - Katedra Chemii Nieorganicznej, Politechnika Gdańska - analiza rentgenokrystalograficzna

Mgr inż. Miłosz Wieczór - Katedra Chemii Fizycznej, Politechnika Gdańska - modelowanie molekularne

Prof. dr hab. Jarosław Sławiński (współtworzenie koncepcji badawczej, dyskusja wyników i współredakcja publikacji), dr Aneta Pogorzelska, dr Krzysztof Szafrański (synteza substratów niezbędnych do realizacji badań), dr Czesława Orlewska (hodowla monokryształu) – Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

4.3.6. Piśmiennictwo

[1] American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. American Cancer Society, Atlanta, 2015.
[2] American Cancer Society. Cancer Treatment & Survivorship Facts & Figures 2016-2017. American Cancer Society, Atlanta, 2016.
[3] Fulda, S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. Semin. Cancer Biol. 2015, 31, 84–88.
[4] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011, 144, 646–674.
[5] Brooijmans N, Kuntz ID. Molecular Recognition and Docking Algorithms. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2003, 32, 335–373.
[6] Fortin S, Bérubé G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. Expert Opin. Drug. Discov. 2013, 8, 1029–47.
[7] Nepali K, Sharma S, Sharma M, Bedi PM, Dhar KL. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. Eur. J. Med. Chem. 2014, 77, 422–87.
[8] Negwer, M. Organic-Chemical Drugs and Treir Synonyms, 7th ed.; Akademie Verlag, Berlin, 1994
[9] Drew J. Drug discovery: a historical perspective. Science 2000, 287, 1960–1964.
[10] Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. Int. J. Pharm. 2002, 248, 1–14.
[11] Supuran CT, Conroy CW, Maren TH. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibitory properties of 1,3,4-thiadiazole-2,5-bissulfonamide. Eur. J. Med. Chem. 1996, 31, 843–846.

[12] Wouters J, Michaux C, Durant F, Dogné JM, Delarge J, Masereel B. Isosterism among analogues of torasemide: conformational, electronic and lipophilicity properties. Eur. J. Med. Chem. 2000, 35, 923–929.

[13] Noble S, Goa KL. Amprenavir: a review of its clinical potential in patients with HIV infection, Drugs 2000, 60, 1383–1410.

[14] Scozzafava A, Owa T, Mastrolorenzo A, Supuran CT. Anticancer and antiviral sulfonamides. Curr. Med. Chem. 2003, 10, 925–953.

[15] Pick AM, Nystrom KK. Pazopanib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. Clin. Ther. 2012, 34, 511–520.

[16] Nguyen DT, Shayahi S. Pazopanib: Approval for Soft-Tissue Sarcoma. J. Adv. Pract. Oncol. 2013, 4, 53–57.

[17] Lee HZ, Kwitkowski VE, Del Valle PL, Ricci MS, Saber H, Habtemariam BA, Bullock J, Bloomquist E, Li Shen Y, Chen XH, Brown J, Mehrotra N, Dorff S, Charlab R, Kane RC, Kaminskas E, Justice R, Farrell AT, Pazdur R. FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma. Clin. Cancer Res. 2015, 21, 2666–2670.

[18] Medina T, Amaria MN, Jimeno A. Dabrafenib in the treatment of advanced melanoma. Drugs Today 2013, 49, 377–385.

[19] Lassalas P, Gay B, Lasfargeas C, James MJ, Tran V, Vijayendran KG, Brunden KR, Kozlowski MC, Thomas CJ, Smith AB 3rd, Huryn DM, Ballatore C. Structure Property Relationships of Carboxylic Acid Isosteres. J. Med. Chem. 2016, 59, 3183-203.

[20] Ballatore C, Huryn DM, Smith AB 3rd. Carboxylic acid (bio)isosteres in drug design. Chem. Med. Chem. 2013, 8, 385–95.

[21] Meier T, Uhlik M, Chintharlapalli S, Dowless M, Van Horn R, Stewart J, Blosser W, Cook J, Young D, Ye X, Evans G, Credille K, Ballard D, Huber L, Capen A, Chedid M, Jr Ilaria R, Smith MC, Stancato L. Tasisulam sodium, an antitumor agent that inhibits mitotic progression and induces vascular normalization. Mol. Cancer Ther. 2011, 10, 2168–2178.

[22] Scagliotti GV, Jr Ilaria R, Novello S, von Pawel J, Fischer JR, Ermisch S, de Alwis DP, Andrews J, Reck M, Crino L, Eschbach C, Manegold C. Tasisulam sodium (LY573636 sodium) as third-line treatment in patients with unresectable, metastatic non-small-cell lung cancer: a phase-II study. J. Thorac. Oncol. 2012, 7, 1053–1057.

[23] Konopleva M, Contractor R, Tsao T, Samudio I, Ruvolo PP, Kitada S, Deng X, Zhai D, Shi YX, Sneed T, Verhaegen M, Soengas M, Ruvolo VR, McQueen T, Schober WD, Watt JC, Jiffar T, Ling Marini FC, Harris D, Dietrich M, Estrov Z, McCubrey J, May WS, Reed JC, Andreeff M. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. Cancer Cell. 2006, 10, 375–388.

[24] Rudin CM, Hann CL, Garon EB, Ribeiro de Oliveira M, Bonomi PD, Camidge DR, Chu Q, Giaccone G, Khaira D, Ramalingam SS, Ranson MR, Dive C, McKeegan EM, Chyla BJ, Dowell BL, Chakravartty A, Nolan CE, Rudersdorf N, Busman TA, Mabry MH, Krivoshik AP, Humerickhouse RA, Shapiro GI, Gandhi L. Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. Clin. Cancer Res. 2012, 18, 3163–3169.

[25] Kipps TJ, Eradat H, Grosicki S, Catalano J, Cosolo W, Dyagil IS, Yalamanchili S, Chai A, Sahasranaman S, Punnoose E, Hurs D, Pylypenko H. a phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk. Lymphoma. 2015, 12, 1–8.

[26] Souers A.J, Leverson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, Huang DC, Hymowitz SG, Jin S, Khaw SL, Kovar PJ, Lam LT,

Lee J, Maecker HL, Marsh KC, Mason KD, Mitten MJ, Nimmer PM, Oleksijew A, Park CH, Park CM, Phillips DC, Roberts AW, Sampath D, Seymour JF, Smith ML, Sullivan GM, Tahir SK, Tse C, Wendt MD, Xiao Y, Xue JC, Zhang H, Humerickhouse RA, Rosenberg SH, Elmore SW. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. Nat. Med. 2013, 19, 202–208.

[27] Hamid O, Ilaria R, Jr., Garbe C, et al. a randomized, open-label clinical trial of tasisulam sodium versus paclitaxel as second-line treatment in patients with metastatic melanoma. Cancer 2014, 120, 2016–2024.

[28] Supuran CT, Scozzafava A, Casini A. Carbonic anhydrase inhibitors, Med. Res. Rev. 2003, 23, 146–189.

[29] Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy, Nat. Rev. Drug Discov. 2011, 10, 767–777.

[30] Türeci O, Sahin U, Vollmar E, Siemer S, Göttert E, Seitz G, Parkkila AK, Shah GN, Grubb JH, Pfreundschuh M, Sly WS. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 7608–7613.

[31] Ilie MI, Hofman V, Ortholan C, Ammadi RE, Bonnetaud C, Havet K, Venissac N, Mouroux J, Mazure NM, Pouysségur J, Hofman P. Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis. Int. J. Cancer 2011, 128, 1614–1623.

[32] Liao SY, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development. BMC Dev. Biol. 2009, 9, 22.

[33] Benej M, Pastorekova S, Pastorek J. Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer. In Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications; Frost SC, McKenna R, Eds.; Subcellular Biochemistry: Springer, The Netherlands, 2014; pp. 199–219.

[34] Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Cheville JC, Zavada J, Kwon ED. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. J. Clin. Oncol. 2007, 25, 4757–4764.

[35] Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. Am. J. Pathol. 2001, 158, 905–919.

[36] Lou Y, McDonald PC, Oloumi A, Chia S, Ostlund C, Ahmadi A, Kyle A, Auf dem Keller U, Leung S, Huntsman D, Clarke B, Sutherland BW, Waterhouse D, Bally M, Roskelley C, Overall CM, Minchinton A, Pacchiano F, Carta F, Scozzafava A, Touisni N, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors, Cancer Res. 2011, 71, 3364–3376.

[37] Pearce S. The importance of heterocyclic compounds in anti-cancer drug design, Drug Discovery World 2017, 18, 66–70.

[38] Pozharskii AF, Soldatenkov AT, Katritzky AR. Why Nature Prefers Heterocycles, in: Heterocycles in Life and Society: An Introduction to Heterocyclic Chemistry, Biochemistry and Applications, Second Edition, 2011, John Wiley & Sons, Ltd, pp.11–33.

[39] Clemons M, Coleman RE, Verma S. Aromatase inhibitors in the adjuvant setting: bringing the gold to a standard? Cancer Treat Rev. 2004, 30, 325–32.

[40] Jhaveri K, Modi S. Ganetespib: research and clinical development, Onco. Targets Ther. 2015, 1849–1858.

[41] Hay MP, Pruijn FB, Gamage SA, Liyanage HD, Kovacs MS, Patterson AV, Wilson WR, Brown JM, Denny WA. DNA-targeted 1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxide: potent analogues of the hypoxia selective cytotoxin tirapazamine. J. Med. Chem. 2004, 47, 475–488.

[42] Walters TR, Aur RJ, Hernandez K, Vietti T, Pinkel D. 6-Azauridine in combination chemotherapy of childhood acute myelocytic leukemia, Cancer 1972, 29, 1057–1060.

[43] Saad HA, Moustafa AH. Synthesis and anticancer activity of some new S-glycosyl and S-alkyl 1,2,4-triazinone derivatives, Molecules 2011, 16, 5682–5700.

[44] Wong TW, Lee FY, Emanuel S, Fairchild C, Fargnoli J, Fink B, Gavai A, Hammell A, Henley B, Hilt C, Hunt JT, Krishnan B, Kukral D, Lewin A, Malone H, Norris D, Oppenheimer S, Vite G, Yu C., Antitumor and antiangiogenic activities of BMS-690514, an inhibitor of human EGF and VEGF receptor kinase families. Clin. Cancer Res. 2011, 17, 4031–4041.

[45] Llovet JM, Decaens T, Raoul JL, Boucher E, Kudo M, Chang C, Kang YK, Assenat E, Lim HY, Boige V, Mathurin P, Fartoux L, Lin DY, Bruix J, Poon RT, Sherman M, Blanc JF, Finn RS, Tak WY, Chao Y, Ezzeddine R, Liu D, Walters I, Park JW. Brivanib in patients with advanced hepatocellular carcinoma who were intolerant to sorafenib or for whom sorafenib failed: results from the randomized phase III BRISK-PS study. J. Clin. Oncol. 2013, 31, 3509–3516.

[46] Joudeh J, Claxton D. Obatoclax mesylate: pharmacology and potential for therapy of hematological neoplasms, Expert Opin. Investig. Drugs 2012, 21, 363–373.

[47] Schmid AT, Gore ME. Sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma, Ther. Adv. Urol. 2016, 8, 348–371.

[48] Sullivan RJ, Infante JR, Janku F, Wong DJL, Sosman JA, Keedy V, Patel MR, Shapiro GI, Mier JW, Tolcher AW, Wang-Gillam A, Sznol M, Flaherty K, Buchbinder E, Carvajal RD, Varghese AM, Lacouture ME, Ribas A, Patel SP, DeCrescenzo GA, Emery CM, Groover AL, Saha S, Varterasian M, Welsch DJ, Hyman DM, Li BT. First-in-Class ERK1/2 Inhibitor Ulixertinib (BVD-523) in Patients with MAPK Mutant Advanced Solid Tumors: Results of a Phase I Dose-Escalation and Expansion Study, Cancer Discov. 2018, 8, 184–195.

[49] Tsuge O, Kanemasa S, Tashiro M, Studies of acyl isocyanate—IV: Synthesis of dioyl diisocyanates. Tetrahedron 1968, 24, 5205.

[50] Clauson-Kaas N, Tyle Z. Preparation of Cis- and Trans 2,5-Dimethoxy-2-(acetamidomethyl)-2,5-dihydrofuran, of Cis- and Trans 2,5-Dimethoxy-2-(acetamidomethyl)-tetrahydrofuran and of 1-Phenyl-2-(acetamidomethyl)-pyrrole. Acta Chem. Scand. 1952, 6, 667.

[51] Elming N, Clauson-Kaas N. The Preparation of Pyrroles from Furans. Acta Chem. Scand. 1952, 6, 867.

[52] Lu X, Zhang H, Li X, Chen G, Li QS, Luo Y, Ruan BF, Chen XW, Zhu HL. Design, synthesis and biological evaluation of pyridine acyl sulfonamide derivatives as novel COX-2 inhibitors. Bioorg. Med. Chem. 2011, 19, 6827–6832.

[53] Luo Y, Qiu KM, Lu X, Liu K, Fu J, Zhu HL. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of cinnamic acyl sulfonamide derivatives as novel antitubulin agents. Bioorg. Med. Chem. 2011, 19, 4730–4738.

[54] Haung S, Connolly PJ, Lin R, Emanuel S, Middleton SA. Synthesis and evaluation of *N*-acyl sulfonamides as potential prodrugs of cyclin-dependent kinase inhibitor JNJ-7706621. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 3639–3641.

[55] Pinter T, Jana S, Courtemanche RJ, Hof F. Recognition properties of carboxylic acid bioisosteres: anion binding by tetrazoles, aryl sulfonamides, and acyl sulfonamides on a calix[4]arene scaffold. J. Org. Chem. 2011, 76, 3733–3741.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

5.1. Wykaz pozostałych publikacji w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (nie wchodzących w skład osiągnięcia wymienionego w pkt. 4.2.)

B1. Jarosław Sławiński, **Beata Żołnowska**, Danuta Pirska, Anna Kędzia, Ewa Kwapisz. Synthesis and antibacterial activity of novel 4-chloro-2-mercaptobenzenesulfonamide derivatives. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 28 (2013) 41–51

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 2,383**, *punktacja* ***MNiSW*: 20**)

B2. Zdzisław Brzozowski, **Beata Żołnowska**, Jarosław Sławiński, Synthesis of a new series of biologically interesting 6′-chloro-1′,1′-dioxospiro[4*H*-benzo[*d*][1,3,7]oxadiazocine-4,3′(2′*H*)-[1,4,2]benzodithiazine]-2,6(1*H*,5*H*)dione derivatives. Monatsh. Chem. 144 (2013) 1397–1405

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 1,347**, *punktacja* ***MNiSW*: 25**)

B3. Jarosław Sławiński, Aneta Pogorzelska, **Beata Żołnowska**, Tomasz Laskowski, Paweł Sowiński, Synthesis and structure determination of 2,3-diaryl-9,9-dioxo-1*H*-9-thia-1,4,4*a*,7,10-pentaazaphenanthrene-2-ols. Tetrahedron 69 (2013) 8675–8679

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 2,817**, *punktacja* ***MNiSW*: 30**)

B4. Jarosław Sławiński, Aneta Pogorzelska, **Beata Żołnowska**, Anna Kędzia, Marta Ziółkowska-Klinkosz, Ewa Kwapisz. Synthesis and anti-yeast evaluation of novel 2-alkylthio-4-chloro-5-methyl-*N*-[imino-(1-oxo-(1*H*)-phthalazin-2-yl)methyl]benzenesulfonamide derivatives. Molecules 19 (2014) 13704–13723

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 2,416**, *punktacja* ***MNiSW*: 30**)

B5. Jarosław Sławiński, Zdzisław Brzozowski, **Beata Żołnowska**, Krzysztof Szafrański, Aneta Pogorzelska, Daniela Vullo, Claudiu T. Supuran. Synthesis of a new series of N^4-substituted 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonamides and their inhibitory effect on human carbonic anhydrase cytosolic isozymes i and II and transmembrane tumor-associated isozymes IX and XII. Eur. J. Med. Chem. 84 (2014) 59–67

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 3,447**, *punktacja* ***MNiSW*: 40**)

B6. Jarosław Sławiński, Aneta Pogorzelska, **Beata Żołnowska**, Kamil Brożewicz, Daniela Vullo, Claudiu 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

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 3,447**, *punktacja* ***MNiSW*: 40**)

B7. Jarosław Sławiński, **Beata Żołnowska**, Zdzisław Brzozowski, Anna Kawiak, Mariusz Belka, Tomasz Bączek. Synthesis and QSAR study of novel 6-chloro-3-(2-arylmethylene-1-methylhydrazino)-1,4,2-benzodithiazine 1,1-dioxide derivatives with anticancer activity. Molecules 20 (2015) 5754–5770

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 2,465**, *punktacja* ***MNiSW*: 30**)

B8. **Beata Żołnowska**, Jarosław Sławiński, Aleksandra Grzonek, Anna Kędzia, Ewa Kwapisz, Anna Kawiak. *N*-Substituted *N'*-(2-alkylthio-4-chloro-5-methylbenzenesulfonyl)guanidines: antibacterial, cytoxic activites and some structure-activity relationships. Pol. J. Microbiol. 64 (2015) 299–305

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 0,750**, *punktacja* ***MNiSW*: 15**)

B9. Jarosław Sławiński, Aleksandra Grzonek, **Beata Żołnowska**, Anna Kawiak. Synthesis of novel pyrido[4,3-*e*][1,2,4]triazino[3,2-*c*][1,2,4]thiadiazine 6,6-dioxide derivatives with potential anticancer activity. Molecules 21 (2016) 41

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 2,861**, *punktacja* ***MNiSW*: 30**)

B10. Jarosław Sławiński, Krzysztof Szafrański, Aneta Pogorzelska, **Beata Żołnowska**, Anna Kawiak, Katarzyna Macur, Mariusz Belka, Tomasz Bączek. Novel 2-benzylthio-5-(1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzenesulfonamides with anticancer activity: synthesis, QSAR study, and metabolic stability. Eur. J. Med. Chem. 132 (2017) 236–248

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 4,519**, *punktacja* ***MNiSW*: 40**)

B11. Aneta Pogorzelska, Jarosław Sławiński, **Beata Żołnowska**, Krzysztof Szafrański, Anna Kawiak, Jarosław Chojnacki, Szymon Ulenberg, Joanna Zielińska, Tomasz Bączek. Novel 2-(2-alkylthiobenzenesulfonyl)-3-(phenylprop-2-ynylideneamino)guanidine derivatives as potent anticancer agents – synthesis, molecular structure, QSAR studies and metabolic stability. Eur. J. Med. Chem. 138 (2017) 357–370

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 4,519**, *punktacja* ***MNiSW*: 40**)

B12. Aneta Pogorzelska, **Beata Żołnowska**, Rafał Bartoszewski. Cysteine cathepsins as a prospective target for anticancer therapies: current progress and prospects. Biochimie 151 (2018) 85–106

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 3,112**, *punktacja* ***MNiSW*: 25**)

B13. Aneta Pogorzelska, Jarosław Sławiński, Anna Kawiak, **Beata Żołnowska**, Jarosław Chojnacki, Grzegorz Stasiłojć, Szymon Ulenberg, Krzysztof Szafrański, Tomasz Bączek. Synthesis, molecular structure, and metabolic stability of new series of *N'*-(2-alkylthio-4-chloro-5-methylbenzenesulfonyl)-1-(5-phenyl-1*H*-pyrazol-1-yl)amidine as potential anti-cancer agents. Eur. J. Med. Chem. 155 (2018) 670–680

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 4,519**, *punktacja* ***MNiSW*: 40**)

B14. Aneta Pogorzelska, **Beata Żołnowska**, Jarosław Sławiński, Anna Kawiak, Krzysztof Szafrański, Mariusz Belka, Tomasz Bączek. Synthesis of 2-alkylthio-*N*-(quinazolin-2-yl)benzenesulfonamide derivatives: anticancer activity, QSAR studies, and metabolic stability. Mon. Chem. 149 (2018) 1885–1898

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 1,285**, *punktacja* ***MNiSW*: 20**)

B15. Petar Zuvela, J. Jay Liu, Yi Myunggi, Paweł P. Pomastowski, Gulyaim Sagandykova, Mariusz Belka, Jonathan David, Tomasz Bączek, Krzysztof Szafrański, **Beata Żołnowska**,

Jarosław Sławiński, Claudiu T. Supuran, Ming Wah Wong, Bogusław Buszewski. Target-based drug discovery through inversion of quantitative structure-drug property relationships and molecular simulation: CA IX-sulphonamide complexes. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 33 (2018) 1430–1443

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 3,638**, *punktacja* ***MNiSW*: 25**)

B16. Paulina Cieślik, Monika Woźniak, Krzysztof Tokarski, Magdalena Kusek, Andrzej Pilca, Agata Płoska, Adrianna Radulska, Iwona Pelikant-Małecka, **Beata Żołnowska**, Jarosław Sławiński, Leszek Kalinowski, Joanna M Wierońska. Simultaneous activation of muscarinic and GABAB receptors as a bidirectional target for novel antipsychotic. Behav. Brain Res. (2018) Doi: 10.1016/j.bbr.2018.09.019

(*wskaźnik* ***Impact Factor*: 3,173**, *punktacja* ***MNiSW*: 30**)

5.2. Badania naukowe realizowane przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja działalność naukowo-badawcza rozpoczęła się w roku 2003 wraz z pracą magisterską p.t. *„Synteza potencjalnych inhibitorów katepsyny B zawierających ugrupowanie (E)-3-benzylosulfonyloakryloilowe”* wykonaną pod opieką dr Reginy Kasprzykowskiej w Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Podczas realizacji tej pracy prowadziłam syntezę peptydomimetyków z zastosowaniem metod wykorzystywanych do syntezy wiązania peptydowego w roztworze. Zdobyłam doświadczenie w izolacji i oczyszczaniu związków organicznych różnymi metodami, w tym techniką RP-HPLC. Doskonaliłam umiejętności wykorzystywania analizy spektroskopowej IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, spekterometrii mas (MALDI-TOF) i analizy elementarnej w ustalaniu struktury chemicznej związków organicznych. Rezultaty uzyskane w pracy magisterskiej przedstawiłam na dwóch konferencjach (XLVII Zjazd PTChem i SITPChem we Wrocławiu, 2004 rok oraz XXXII Winter School of Faculty of Biotechnology: From Molecular Biology to Biotechnology, Zakopane, 2005 rok) w postaci prezentacji posterowych. W 2004 roku otrzymałam wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Chemicznego za najlepszą pracę magisterską obronioną na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Od roku 2004 dalszą pracę naukową kontynuowałam na studiach doktoranckich na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracę doktorską zatytułowaną *„Synteza związków hamujących proces osteoklastogenezy”* realizowałam w Katedrze Chemii Medycznej na Wydziale Chemii UG pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Franciszka Kasprzykowskiego. W ramach pracy doktorskiej zajmowałam się poszukiwaniem nowych potencjalnych inhibitorów procesu osteoklastogenezy, których struktury opierały się m.in. o wybrane elementy budowy *N*-terminalnego fragmentu ludzkiej cystatyny C (hCC) i naturalnego inhibitora proteaz cysteinowych, E-64. Zarówno ludzka cystatyna C, jak i E-64 hamują

tworzenie wielojądrzastych osteoklastów. Syntezy zaprojektowanych peptydomimetyków prowadziłam w roztworze, stosując klasyczne metody sprzęgania i ochrony grup bocznych aminokwasów. Poszukiwanie potencjalnych inhibitorów osteoklastogenezy oparłam także o wybrane fragmenty hCC zawierające reszty argininy, której łańcuch boczny jest istotnym elementem budowy związków hamujących osteoklastogenezę. Docelowe hepta- i oktapeptydy otrzymałam przy zastosowaniu standardowej metodologii Fmoc i automatycznego syntezatora peptydów. Badania wpływu otrzymanych związków na hamowanie procesu osteoklastogenezy przeprowadziłam we współpracy z prof. Ulfem Lernerem z Uniwersytetu w Umeå (Szwecja). Otrzymane peptydomimetyki i peptydy wykazały aktywność inhibicyjną wobec procesu tworzenia wielojądrzastych osteoklastów na poziomie, który pozwalał kontynuować badania nad zastosowaniem tych związków w leczeniu osteoporozy. Zsyntetyzowane w mojej pracy doktorskiej nowe związki chemiczne zostały objęte ochroną patentową (WO 2010/147547 A1 oraz US 08748370).

Efekty moich prac naukowo-badawczych prezentowałam w postaci posterów na 18-tym i 20-tym Polskim Sympozjum Peptydowym we Wrocławiu (2005) i Władysławowie (2009), a także w postaci prezentacji ustnej na „Polish-Swedish meeting on human cystatines" w Lund (Szwecja, 2009). Przedstawiając wyniki pracy doktorskiej na VIII Sesji Sprawozdawczej Uczestników Studiów Doktoranckich w 2008 roku zdobyłam Pierwszą Nagrodę za najlepszą wygłoszoną prezentację.

5.3. Badania naukowe realizowane po uzyskaniu stopnia doktora – współpraca naukowa

Moja działalność badawcza od roku 2010 związana jest z Katedrą i Zakładem Chemii Organicznej na Wydziale Farmaceutycznym GUMed i koncentruje się w następujących trzech obszarach:

- **Poszukiwanie związków o aktywności przeciwnowotworowej.** Prowadząc badania nad syntezą pochodnych benzenosulfonamidu o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej byłam współwykonawcą zadań statutowych Katedry i Zakładu Chemii Organicznej prowadzonych pod kierunkiem prof. dr hab. Jarosława Sławińskiego. W ramach tych zadań współtworzyłam koncepcję badań związanych z oceną aktywności cytotoksycznej pochodnych 1,1-ditlenku 6-chloro-3-(2-arylometyleno-1-metylohydrazyno)-1,4,2-benzoditiazyny i ustaleniem ilościowych zależności struktura-aktywność tych pochodnych [**B7**]. W wyniku badań wykazano aktywność przeciwnowotworową pochodnych zawierających podstawnik 5-nitrotiofenowy lub 2,5-dihydroksyfenylowy wobec linii HeLa, HCT-116 i MCF-7. Ponadto przeprowadzona przeze mnie analiza statystyczna pozwoliła wyznaczyć dla

linii MCF-7 i HCT-116 modele QSAR, opisujące wpływ właściwości elektronowych, sterycznych, hydrofilowych oraz hydrofobowych na aktywność biologiczną związków. W kolejnym zadaniu statutowym dotyczącym pochodnych 6,6-ditlenku 2-R^2-3-hydroksypirydo[4,3-*e*][1,2,4]triazyno[3,2-*c*][1,2,4]tiadiazyny i oceny ich aktywności wobec linii HeLa, HCT-116 i MCF-7 byłam zaangażowana w analizę i interpretację wyników oraz tworzenie manuskryptu [**B9**]. W efekcie wspólnych działań opracowano dogodną metodę syntezy nowego układu skondensowanych pierścieni aromatycznych pirydo[4,3-*e*][1,2,4]triazyno[3,2-*c*][1,2,4]tiadiazyny, jak również opisano wpływ podstawników R^2 członu triazynowego na umiarkowaną aktywność cytotoksyczną względem linii MCF-7 oraz HeLa i dobrą aktywność w odniesieniu do linii HCT-116.

Zdobyte doświadczenie w zakresie syntezy organicznej pozwoliło mi na udział w charakterze głównego wykonawcy w grancie NCN OPUS (2013/09/B/NZ7/00048) (w latach 2014–2018) dotyczącym syntezy i oceny aktywności przeciwnowotworowej nowych poliazotowych pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu (kierownik prof. dr hab. Jarosław Sławiński). W projekcie tym byłam odpowiedzialna za opracowanie koncepcji badań, wykonanie prac syntetycznych i interpretację wyników badań biologicznych trzech szeregów pochodnych benzenosulfonamidu [**A3–A5**]. Ponadto do moich zadań należało wykonanie syntez substratów, niezbędnych do otrzymania pochodnych 2-benzylotio-5-(1,3,4-oksadiazol-2-ylo)benzenosulfonamidu [**B10**], 2-(2-alkilotiobenzenosulfonylo)-3-(fenylprop-2-ynylidenoamino)guanidyny [**B11**], *N'*-(2-alkilotio-4-chloro-5-metylobenzenosulfonylo)-1-(5-fenylo-1*H*-pirazol-1-ylo)amidyny [**B13**] i 2-alkilotio-*N*-(chinazolin-2-ylo)benzenosulfonamidu [**B14**], jak również koordynowanie współpracy w zakresie badań biologicznych (badanie aktywności cytotoksycznej *in vitro*, badanie apoptozy, stabilność metaboliczna), sporządzanie umów dla wykonawców projektu oraz raportowanie roczne i końcowe w systemie ZSUN/OSF.

➢ **Poszukiwanie związków o aktywności mikrobiologicznej, w tym przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej.** W ramach realizacji tego kierunku badawczego, we współpracy z zespołem Zakładu Mikrobiologii Jamy Ustnej GUMed, uczestniczyłam w otrzymywaniu nowych pochodnych 2-alkilotio-*N*-(1,3,4-tiadiazol-2-ylo)benzenosulfonamidu [**B1**], 2-alkilotio-*N*-(3,4-dihydro-4-oksotieno[2,3-*e*]pirymidyn-2-ylo]benzenosulfonamidu [**B1**], 2-alkilotio-*N*-(3,4-dihydro-4-oksochinazolin-2-ylo)benzenosulfonamidu [**B1**] oraz *N*-podstawionych pochodnych *N'*-(2-alkilotio-4-chloro-5-metylobenzenosulfonylo)guanidyny [**B8**] wykazujących aktywność przeciwbakteryjną wobec licznych szczepów bakterii beztlenowych oraz tlenowych z rodzaju *Propionibacterium acnes, Propionibacterium granulosum, Actinomyces viscosus, Parvimonas micra, Finegoldia magna, Peptostreptococcus*

anaerobius oraz *Staphylococcus aureus,* metycylinooporny *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis* i *Corynebacterium spp.* Uczestniczyłam ponadto w projekcie dotyczącym syntezy i oceny aktywności przeciwgrzybowej pochodnych 2-alkilotio-*N*-[imino-(1-okso-(1*H*)-ftalazyn-2-ylo)metylo]benzenosulfonamidu [**B4**]. Kontynuując współpracę z zespołem mikrobiologów aktualnie prowadzę badania nad nowymi szeregami *N*-podstawionych benzenosulfonamidów o potencjalnej aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej.

- **Poszukiwanie związków hamujących aktywność enzymatyczną izoform anhydrazy węglanowej powiązanych z procesem nowotworowym**. W konsekwencji trwających poszukiwań selektywnych inhibitorów hCA IX i XII jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych uczestniczyłam w badaniach nad szeregami N^4-podstawionych pochodnych 4-(2-aminoetylo)benzenosulfonamidu [**B5**] oraz 5-podstawionych pochodnych 2,4-dichlorobenzenosulfonamidu [**B6**]. Pierwsza z prac wskazywała, iż największą siłę inhibicji wobec hCA IX i XII (K_I: 4,0–6,2 nM) przy równoczesnej wysokiej selektywności prezentowały pochodne o charakterze jonowym tj. jodek 3-sulfoamoilo-4-[2-(4-sulfoamoilofenylo)etyloamino]-1-metylopirydyniowy i odpowiadająca mu betaina [**B5**]. Wymiernym wynikiem drugiej z prac było wyłonienie pochodnych 2-chlorobenzenosulfonamidu podstawionych w pozycji 5 podstawnikiem hydrazynokarbonylowym bądź heterocyklicznymi pierścieniami 1,3,4-oksa- lub 1,3,4-tiadiazolu, jako silnych i selektywnych inhibitorów izoform transbłonowych hCA IX i XII [**B6**].

Istotny wątek w mojej pracy naukowej, dotyczący poznawania reaktywności i właściwości chemicznych pochodnych benzenosulfonamidu, stanowiły badania nad otrzymaniem nowych układów heterocyklicznych 2,3-diarylo-9,9-diokso-1*H*-9-tia-1,4,4*a*,7,10-pentaazafenantren-2-olu [**B3**] i 6′-chloro-1′,1′-dioksospiro[4*H*-benzo[*d*][1,3,7]oksadiazocyno-4,3'(2'*H*)-[1,4,2-benzoditiazyno]-2,6(1*H*,5*H*)dionu [**B2**].

W ramach współpracy z Instytutem Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie brałam udział w badaniach dotyczących znaczenia modulacji systemów cholinergicznych i GABAergicznych w leczeniu pozytywnych i poznawczych objawów schizofrenii, których wynikiem jest praca pt. *„Simultaneous activation of muscarinic and $GABA_B$ receptors as a bidirectional target for novel antipsychotic”* opublikowana w *Behavioural Brain Research* [**B16**].

Jestem współautorem pracy opisującej nowe podejście w poszukiwaniu leków w oparciu o znane cele, w którym synergistycznie wykorzystano oznaczone eksperymentalnie właściwości fizykochemiczne aktywnych związków oraz techniki obliczeniowe *in silico*

(QSPR, MD). Opracowana metodologia powstała przy współudziale zespołów badawczych z National University of Singapore (Department of Chemistry), Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki oraz Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii), Pukyong National University (Department of Chemical Engineering, Department of Biomedical Engineering), Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Katedra i Zakład Chemii Organicznej oraz Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej) oraz Università degli Studi di Firenze (NEUROFARBA Dept.). Praca zatytułowana *„Target-based drug discovery through inversion of quantitative structure-drug-property relationships and molecular simulation: CA IX-sulphonamide complexes”* została opublikowana w *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [**B15**].

Jestem współautorem artykułu przeglądowego w czasopiśmie *Biochimie* na temat katepsyn cysteinowych jako potencjalnego celu w terapiach przeciwnowotworowych [**B12**]. Artykuł ten omawia rolę katepsyn cysteinowych w procesach fizjologicznych i progresji nowotworów. Opisuje również znaczenie endogennych i egzogennych inhibitorów tych proteaz w leczeniu nowotworów.

5.4. Liczbowe zestawienie dorobku

Prace oryginalne: **23** publikacje

Sumaryczny ***Impact Factor*** wszystkich prac: **68,898**
Suma punktów **MNiSW: 700**

Sumaryczny ***Impact Factor*** prac stanowiących podstawę habilitacji: **21,233**
Suma punktów **MNiSW** prac stanowiących podstawę habilitacji: **220**

Sumaryczny ***Impact Factor*** prac z pierwszym autorstwem: **20,354**
Suma punktów **MNiSW** prac z pierwszym autorstwem: **210**

Całkowita liczba cytowań (wg bazy ISI Web of Science): **114** (15.10.2018)
Całkowita liczba cytowań (wg bazy Scopus): **146** (15.10.2018)

Indeks Hirscha (wg ISI Web of Science): **6** (15.10.2018)
Indeks Hirscha (wg Scopus): **7** (15.10.2018)

5.5. Udział w projektach badawczych

1. Synteza i struktura nowych arylosulfonamidów o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej i/lub przeciwbakteryjnej, 2012–2014, Badania statutowe (ST-02-0016/07) finansowane przez Gdański Uniwersytet Medyczny, **Wykonawca**

2. Synteza nowych pochodnych 2-alkilotiobenzenosulfonamidu o potencjalnej aktywności biologicznej, 2013–2014, Badania własne (MN 01-0079/80) finansowane przez Gdański Uniwersytet Medyczny, **Kierownik**

3. Synteza i aktywność przeciwnowotworowa nowych pochodnych 2-merkapto-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu zawierających liniowe i cykliczne układy azotowe, 2015, Badania własnych finansowane przez Gdański Uniwersytet Medyczny ze środków KNOW przyznanych na lata 2012–2017, **Kierownik**

4. Synteza i struktura nowych arylo/heteroarylosulfonamidów o spodziewanej aktywności cytotoksycznej, inhibitorów anhydrazy węglanowej i/lub związków przeciwdrobnoustrojowych, 2015–2017, Badania statutowe (ST-02-0016/07) finansowane przez Gdański Uniwersytet Medyczny, **Wykonawca**

5. Nowe pochodne 4-(1*H*-pirol-1-ylo)-*N*-(arylo/heteroarylo)benzenosulfonamidu - synteza i aktywność przeciwnowotworowa, 2016–2017, Badania własne (MN 01-0213/08) finansowane przez Gdański Uniwersytet Medyczny, **Kierownik**

6. Nowe poliazotowe pochodne 2-merkaptobenzenosulfonamidu o właściwościach przeciwnowotworowych - synteza, ocena aktywności oraz projektowanie wspomagane technikami chemometrycznymi i metodami QSAR, 2014–2018, Grant (2013/09/B/NZ7/00048) finansowany przez NCN, **Główny wykonawca**

7. Nowe arylosulfonamidy – synteza i ocena aktywności przeciwnowotworowej oraz przeciwdrobnoustrojowej w warunkach *in vitro*, 2018, Badania statutowe (ST-02-0016/07) finansowane przez Gdański Uniwersytet Medyczny, **Wykonawca**

5.6. Nagrody i wyróżnienia

1. Naukowa Nagroda Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – **Trzy Nagrody Zespołowe I-go stopnia: 2014, 2015, 2017**

2. Naukowa Nagroda Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – **Nagroda Zespołowa II-go stopnia: 2013**

3. Nagroda Dydaktyczna Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego - **Nagroda Zespołowa II-go stopnia**, **2016**

4. **Nagroda III° za najlepszy komunikat posterowy** na VII Konwersatorium Chemii Medycznej „*N*-acylbenzenesulfonamides – anticancer activity, metabolic stability and QSAR studies”, Lublin, 2015

5. **Wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Chemicznego za najlepszą pracę magisterską** obronioną na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w 2004 roku

6. **Nagroda I° za najlepszą prezentację** wygłoszoną podczas VIII Sesji Sprawozdawczej Uczestników Studiów Doktoranckich, 2008, Wydział Chemii Uniwersytet Gdański

5.7. Komunikaty konferencyjne

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk chemicznych:

6 komunikatów posterowych prezentowanych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

1 komunikat ustny prezentowany na Polsko-Szwedzkiej konferencji

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych:

35 komunikatów posterowych prezentowanych na krajowych konferencjach naukowych

3 komunikaty ustne prezentowane na krajowych konferencjach naukowych

5.8. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych posiadających „impact factor"

Sporządziłam **29 recenzji** prac naukowych nadesłanych z 13 redakcji czasopism z listy Filadelfijskiej.

ACS Medicinal Chemistry Letters (IF =3,746) – 3 recenzje
Arabian Journal of Chemistry (IF = 4,553) –1 recenzja
Bioorganic Chemistry (IF=2,05) –1 recenzja
Bioorganic and Medicinal Chemistry (IF = 2,793) – 1 recenzja
Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (IF = 2,454) – 2 recenzje
Chemistry and Biodiversity (IF = 1,44) –2 recenzje
Current Organic Synthesis (IF = 1,917) –1 recenzja
Current topics in Medicinal Chemistry (IF = 3,374) – 1 recenzja
Heterocyclic Communications (IF = 0,542) – 2 recenzje
International Journal of Molecular Sciences (IF = 3,226) –1 recenzja
Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry (IF = 4,293) –2 recenzje
Molecules (IF = 3,098) –11 recenzji
Tetrahedron (IF = 2,651) – 1 recenzja

5.9. Członkostwo w krajowych organizacjach naukowych

Członek Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego

Członek Polskiego Towarzystwa Chemii Medycznej

5.10. Współpraca naukowa z innymi ośrodkami w Polsce i zagranicą

- NEUROFARBA Department, Section of Pharmaceutical and Nutriceutical Sciences, University of Florence, Italy
- National Cancer Institute, Bethesda, USA
- Department of Chemistry, National University of Singapore, Singapore
- Katedra Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny
- Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed, Uniwersytet Gdański
- Katedra Biotechnologii Medycznej, Zakład Biologii Komórki, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed, Gdański Uniwersytet Medyczny
- Katedra Mikrobiologii, Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny
- Katedra Chemii Nieorganicznej, Politechnika Gdańska
- Katedra Chemii Fizycznej, Politechnika Gdańska
- Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

- Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
- Laboratorium Magnetycznego Rezonansu Jądrowego, Politechnika Gdańska
- Zespół Laboratoriów Specjalistycznych MWB UG i GUMed, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed, Uniwersytet Gdański

5.11. Inna działalność związana z pracą organizacyjną i naukowo-dydaktyczną

- Od roku 2010 prowadzę zajęcia laboratoryjne z chemii organicznej dla studentów drugiego roku studiów na kierunku Farmacja oraz Analityka Medyczna oraz dla studentów pierwszego roku na kierunku Przemysł Farmaceutyczny i Kosmetyczny.
- Od roku 2010 prowadzę zajęcia seminaryjne z chemii organicznej dla studentów drugiego roku studiów na kierunku Farmacja.
- Od roku 2017 prowadzę wykład z analizy elementarnej związku organicznego i identyfikacji grup funkcyjnych w związku organicznym dla studentów pierwszego roku na kierunku Przemysł Farmaceutyczny i Kosmetyczny.
- Od 2010 roku jestem opiekunem 8 magistrantów z kierunku Farmacja, którzy wykonywali prace magisterskie w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego z OML, GUMed. Jedna praca magisterska (A. Marzejon w 2016 roku) zdobyła uznanie podczas Wydziałowego Konkursu Prac Magisterskich uzyskując nagrodę publiczności.
- Jestem współautorką dwóch skryptów z przedmiotu Chemia Organiczna:
  1. *Analiza jakościowa związków organicznych z elementami spektroskopii i chromatografii cieczowej: dla studentów Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej*, pod red. Jarosława Sławińskiego. Gdański Uniwersytet Medyczny, 2015.
  2. *Kompendium z chemii organicznej: dla studentów Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej*, Beata Żołnowska, Aneta Pogorzelska, Jarosław Sławiński. Gdański Uniwersytet Medyczny, 2017.
- Zajmuję się redagowaniem strony internetowej dotyczącej przedmiotu Chemia Organiczna dla studentów II roku Analityki Medycznej w uczelnianym serwisie internetowym EXTRANET.
- Zajmuję się sprawami organizacyjnymi i administracyjnymi dotyczącymi przedmiotu Chemia Organiczna na II roku kierunku Analityka Medyczna.
- Od 2011 roku, jako operator programu ePensum, zajmuję się planowaniem, potwierdzaniem i rozliczaniem godzin pensum przedmiotów realizowanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej.
- Od 2014 roku jestem członkiem Rady Wydziału, jako przedstawiciel nauczycieli akademickich.
- Byłam organizatorem warsztatów chemicznych dla dzieci z SP 8 w Gdańsku, które odbyły się 6.06.2016 r. w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej i miały na celu poznanie miejsca pracy rodzica, a także propagowanie działalności naukowej na Wydziale Farmaceutycznym GUMed oraz zainteresowanie dzieci naukami ścisłymi.

Beata Żołnowska