



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Beata Donarska

**Projektowanie i synteza nowych inhibitorów elastazy
pochodnych talidomidu i ich aktywność
przeciwnowotworowa**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor:

dr hab. Krzysztof Z. Łączkowski, prof. UMK

Bydgoszcz 2024

Panu dr hab. Krzysztofowi Łączkowskiemu, prof. UMK
składam serdeczne podziękowania za opiekę merytoryczną, przekazaną wiedzę,
motywowanie w dążeniu do celu, cenne uwagi, poświęcony czas
i nieocenione wsparcie w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

Pracownikom Katedry Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
dziękuję za życzliwość i okazaną pomoc.

Współautorom artykułów naukowych,
dziękuję za owocną współpracę,
która nadała interdyscyplinarny charakter niniejszym badaniom.

Szczególne podziękowania składam **mojej Rodzinie**.
Rodzicom oraz **Teściom** dziękuję za pomoc w trudnych chwilach
i niezachwianą wiarę we mnie.
Mojemu Mężowi dziękuję za wyrozumiałość, miłość i nieustające wsparcie.
Niniejszą pracę dedykuję **mojej Córeczce**,
której uśmiech był najlepszą otuchą w trudnych chwilach.

Spis treści

PUBLIKACJE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	5
WYKAZ SKRÓTÓW	6
I. WPROWADZENIE	9
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	11
1. Talidomid.....	11
1.1. Historia.....	11
1.2. Nowe zastosowanie talidomidu w medycynie	11
1.3. Mechanizm działania	12
1.4. IMiDs (<i>ang. immunomodulatory imide drugs</i>)	14
2. Elastaza neutrofilowa	16
2.1. Rola elastazy neutrofilowej w homeostazie.....	17
2.2. Rola elastazy neutrofilowej w patomechanizmie chorób zapalnych	19
2.3. Inhibitory elastazy.....	22
2.3.1. Publikacja I: <i>Recent advances in the development of elastase inhibitors</i>	24
3. Hybrydyzacja molekularna w projektowaniu leków przeciwnowotworowych.....	29
4. Wybrane układy farmakoforowe wykazujące aktywność przeciwnowotworową i hamującą elastazę neutrofilową.....	31
4.1. Ftalimid	31
4.2. Tiazole.....	34
4.3. Zasady Schiffa	38
4.4. Układ azetydino-2,4-dionu.....	40
III. CEL PRACY	42
IV. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	44
1. Projektowanie i synteza chemiczna	44
2. Metody badawcze	45
2.1. Badanie aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych pochodnych	45

2.2. Badanie aktywacji kaspazy 3/7	46
2.3. Badanie aktywności hamującej kinazę tyrozynową EGFR	47
2.4. Badanie wpływu na apoptozę, nekrozę oraz progresję cyklu komórkowego	47
2.5. Badanie aktywności inhibującej elastazę	48
2.6. Badanie kinetyki reakcji inhibicji elastazy przez wybrane związki	49
2.7. Badanie stabilności chemicznej otrzymanych związków	50
2.8. Dokowanie molekularne	50
V. OPIS PRZEPROWADZONYCH BADAŃ I DYSKUSJA UZYSKANYCH WYNIKÓW – CYKL PUBLIKACJI	51
1. Publikacja II: <i>Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives. Rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study</i>	52
2. Publikacja III: <i>Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity</i>	70
3. Publikacja IV: <i>Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action</i> .	92
VI. WNIOSKI	110
VII. STRESZCZENIE.....	111
VIII. SUMMARY	113
IX. SPIS RYCIN	115
X. SPIS TABEL	117
XI. LITERATURA.....	118
XII. OŚWIADCZENIA AUTORA I WSPÓŁAUTORÓW.....	130
XIII. DROBEK NAUKOWY	148

PUBLIKACJE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych jest cykl czterech publikacji (3 oryginalnych i 1 publikacja przeglądowa) powiązanych tematycznie, opatrzone tytułem: **Projektowanie i synteza nowych inhibitorów elastazy pochodnych talidomidu i ich aktywność przeciwnowotworowa**, opublikowanych w latach 2020–2023 o łącznym współczynniku oddziaływania IF równym 18,515 (pkt MNiSW = 480).

PUBLIKACJA I

Donarska B, Łączkowski KZ. Recent advances in the development of elastase inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*. 2020;12:1809–1813. doi:10.4155/fmc-2020-0163.

Wskaźnik Impact Factor: 3,808, punktacja MNiSW: 100

PUBLIKACJA II

Donarska B, Świtalska M, Płaziński W, Wietrzyk J, Łączkowski KZ. Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives: rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study. *Bioorganic Chemistry*. 2021;110:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2021.104819.

Wskaźnik Impact Factor: 5,307, punktacja MNiSW: 100

PUBLIKACJA III

Donarska B, Świtalska M, Wietrzyk J, Płaziński W, Łączkowski KZ. Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24:1–17. doi:10.3390/ijms24010110.

Wskaźnik Impact Factor: 4,900, punktacja MNiSW: 140

PUBLIKACJA IV

Donarska B, Sławińska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Zdzisińska B, Płaziński W, Łączkowski KZ. Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action. *Bioorganic Chemistry*. 2023;138:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106608.

Wskaźnik Impact Factor: 4,500, punktacja MNiSW: 140

WYKAZ SKRÓTÓW

A	absorbancja (<i>ang. absorbance</i>)
A1AT	α -1-antytrypsyna (<i>ang. α-1-antitrypsin</i>)
Ac-DEVD-ACC	N-Acetylo-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometylokumaryna
AChE	acetylocholinoesteraza (<i>ang. acetylcholinesterase</i>)
AMC	7-amino-4-metylokumaryna (<i>ang. 7-amino-4-methylcoumarin</i>)
ARDS	ostra niewydolność oddechowa (<i>ang. acute respiratory distress syndrome</i>)
bFGF	czynnik wzrostu fibroblastów (<i>ang. basic fibroblast growth factor</i>)
BuChE	butyrylocholinoesteraza (<i>ang. butyrylcholinesterase</i>)
CatG	katepsyna G (<i>ang. cathepsin G</i>)
CD4	koreceptor na limfocytach T pomocniczych (<i>ang. cluster of differentiation 4</i>)
CD8	koreceptor na limfocytach T cytotoksycznych (<i>ang. cluster of differentiation 8</i>)
CELMoDs	modulatory ligazy E3 cereblonu (<i>ang. cereblon E3 ligase modulators</i>)
COX2	cyklooksygenaza 2 (<i>ang. cyclooxygenase-2</i>)
CRBN	cereblon
CRI	zapalenie związane z rakiem (<i>ang. cancer related inflammation</i>)
DDB1	białko wiążące uszkodzone DNA (<i>ang. DNA damage binding protein 1</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek (<i>ang. dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe (<i>ang. deoxyribonucleic acid</i>)
EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu (<i>ang. epidermal growth factor receptor</i>)
ENL	trądzik rumień guzowaty (<i>ang. erythema nodosum leprosum</i>)
FDA	Agencja Żywności i Leków (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
GABA	kwasy gamma-aminomasłowe (<i>ang. gamma-aminobutyric acid</i>)
HER-2	receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (<i>ang. human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HNE/NE	ludzka elastaza neutrofilowa (<i>ang. human neutrophil elastase</i>)
HRMS	spektrometria mas o wysokiej rozdzielczości (<i>ang. high resolution mass spectrometry</i>)

IARC	Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (<i>ang. International Agency for Research on Cancer</i>)
IC₅₀	połowa maksymalnego stężenia hamującego (<i>ang. half maximal inhibitory concentration</i>)
IFN-γ	interferon gamma (<i>ang. interferon gamma</i>)
IKZF1	białko palca cynkowego 1 z rodziny Ikaros (<i>ang. Ikaros family zinc finger 1</i>)
IKZF3	białko palca cynkowego 3 z rodziny Ikaros (<i>ang. Ikaros family zinc finger protein 3</i>)
IL	interleukina (<i>ang. interleukin</i>)
IMiDs	leki immunomodulujące zawierające grupę imidową (<i>ang. immunomodulatory imide drugs</i>)
IRS1	substrat receptora insuliny 1 (<i>ang. insulin receptor substrate 1</i>)
K_m	stała kinetyczna Michaelis-Menten
LPS	lipopolisacharyd (<i>ang. lipopolysaccharide</i>)
MAPK	kinaza białkowa aktywowana mitogenami (<i>ang. mitogen-activated protein kinase</i>)
MDSC	komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (<i>ang. myeloid derived suppressor cells</i>)
MNEI	inhibitor elastazy neutrofilowej monocytów (<i>ang. monocyte/neutrophil elastase inhibitor</i>)
MOSuc-AAPV-AMC	<i>N</i> -metoksylsukcinylo-Ala-Ala-Pro-Val-7-amido-4-metylo-kumaryna
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy (<i>ang. messenger ribonucleic acid</i>)
MyD88	białko pierwotnej odpowiedzi różnicowania mieloidalnego (<i>ang. myeloid differentiation primary response protein 88</i>)
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (<i>ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NETs	neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe (<i>ang. neutrophil extracellular traps</i>)
NF-κB	czynnik jądrowy kappa-wzmacniacz łańcucha lekkiego aktywowanych komórek B (<i>ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)

NK	naturalne komórki cytotoksyczne (<i>ang. natural killer</i>)
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (<i>ang. nuclear magnetic resonance</i>)
NSPs	neutrofilowe proteazy serynowe (<i>ang. neutrophil serine proteases</i>)
PDB	<i>ang. Protein Data Bank</i>
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu (<i>ang. platelet-derived growth factor</i>)
PI3K	kinaza fosfatydylo-3-inozytolu (<i>ang. phosphoinositide 3-kinase</i>)
PPE	świńska elastaza trzustkowa (<i>ang. porcine pancreatic elastase</i>)
PR3	proteinaza 3 (<i>ang. proteinase 3</i>)
RFT	reaktywne formy tlenu (<i>ang. reactive oxygen species</i>)
RFU	względne jednostki fluorescencji (<i>ang. relative fluorescence units</i>)
ROC1	regulator kulin-1 (<i>ang. regulator of cullins 1</i>)
S.T.E.P.S.	system edukacji i bezpieczeństwa przepisywania talidomidu (<i>ang. System for Thalidomide Education and Prescribing Safety</i>)
SARCOV-2	drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (<i>ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
SI	indeks selektywności (<i>ang. selectivity index</i>)
SLPI	wydzielniczy inhibitor proteazy leukocytów (<i>ang. secretory leukocyte protease inhibitor</i>)
$t_{1/2}$	czas połowicznego rozpadu (<i>ang. half-life</i>)
TANs	neutrofile związane z guzem (<i>ang. tumor associated neutrophils</i>)
TLC	chromatografia cienkowsarstwowa (<i>ang. thin layer-chromatography</i>)
TNF-α	czynnik martwicy nowotworów α (<i>ang. tumor necrosis factor α</i>)
VEGFR	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (<i>ang. vascular endothelial growth factor</i>)
V_{max}	szybkość maksymalna reakcji (<i>ang. maximal velocity</i>)

W niniejszej dysertacji w trakcie prezentowania związków pochodzących z cytowanych pozycji literaturowych zastosowano oznaczenia pochodzące z oryginalnych publikacji wprowadzonych przez Autorów badań.

I. WPROWADZENIE

Choroby nowotworowe stanowią poważny problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny XXI wieku. Według raportu Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC) w 2022 roku odnotowano około 20 milionów nowych przypadków, a liczba zgonów w wyniku tych chorób wyniosła prawie 10 milionów. Do najczęściej diagnozowanych typów nowotworów należą rak płuc, piersi, nowotwory jelita grubego oraz prostaty. Dodatkowo szacuje się, że do 2050 roku liczba nowych przypadków raka sięgnie ponad 35 milionów [1]. Dane te potwierdzają, że poszukiwanie nowych leków skierowanych wobec komórek nowotworowych jest nadal ważnym zagadnieniem chemii medycznej.

Wśród obecnie wykorzystywanych metod w projektowaniu nowych leków przeciwnowotworowych wyróżnić należy metodę hybrydyzacji molekularnej, pozwalającą na otrzymanie związków wykazujących aktywność wobec kilku celów molekularnych jednocześnie. Terapia wielocelowa wykazuje szereg korzyści w porównaniu z tradycyjną chemioterapią, opierającą się na lekach ukierunkowanych na pojedynczy cel molekularny, gdyż pozwala na zwiększenie skuteczności terapii oraz zmniejszenie ryzyka nawrotów choroby. Skutecznym sposobem projektowania nowych związków o potencjalnym działaniu biologicznym jest poszukiwanie wśród struktur obecnie stosowanych leków fragmentów farmakoforowych, determinujących ich wysoką aktywność biologiczną, których odpowiednie połączenie w cząsteczce umożliwi otrzymanie nowych, aktywniejszych i mniej toksycznych związków. Przykładem takiego podejścia jest optymalizacja cząsteczki talidomidu, który stanowi prekursor dla lenalidomidu, pomalidomidu oraz innych leków o silnych właściwościach immunomodulujących i przeciwzapalnych stosowanych w terapii szpiczaka mnogiego, zespołów mielodysplastycznych i innych chorób nowotworowych. Pierścień ftalimidowy obecny w strukturze talidomidu, stanowi ważny farmakofor występujący w związkach o szerokiej aktywności biologicznej, a w przypadku nowotworów o działaniu antyproliferacyjnym wobec linii komórek nowotworowych m.in. raka płuc, piersi i prostaty. Dodatkowo wykazano, że aktywność związków zawierających w strukturze układ ftalimidu związana jest z inhibicją kinazy tyrozynowej EGFR i VEGFR oraz aktywacją kaspazy 3 i 9 [2]. Kolejnym przykładem ważnego celu molekularnego dla związków przeciwnowotworowych jest elastaza neutrofilowa, enzym proteolityczny należący do neutrofilowych proteaz serynowych, uwalnianych w trakcie generowania pozakomórkowych pułapek neutrofilowych podczas odpowiedzi zapalnej organizmu.

Wykazano, że elastaza neutrofilowa odgrywa ważną rolę w rozwoju i progresji nowotworów, wpływając na namnażanie, migrację i inwazyjność komórek nowotworowych, poprzez modulowanie mikrośrodowiska guza i bezpośrednią stymulację kinaz tyrozynowych oraz indukcję uwalniania czynników wzrostu stymulujących angiogenezę. Aktywność przeciwnowotworową znanego inhibitora elastazy – sivelestatu potwierdzono w przypadku HER-2 pozytywnego raka piersi [3-5].

Tematyka niniejszej pracy obejmuje zaprojektowanie i syntezę nowych nieznanych w literaturze pochodnych talidomidu będących inhibitorami elastazy o aktywności przeciwnowotworowej. W badaniach wykorzystano metodę hybrydyzacji molekularnej w celu połączenia wybranych fragmentów farmakoforowych, determinujących aktywność biologiczną nowych związków. Oceniono aktywność antyproliferacyjną nowych pochodnych wobec 7 różnych linii komórek nowotworowych, a toksyczność określono wobec 2 linii komórek zdrowych. Zbadano również zdolność nowych pochodnych do inhibicji świńskiej elastazy trzustkowej oraz ludzkiej elastazy neutrofilowej i określono potencjalny mechanizm inhibicji. Dodatkowo w celu określenia sposobu wiązania badanych związków z miejscem aktywnym elastazy wykorzystano dokowanie molekularne. Dla wybranych związków przeprowadzono również badania inhibicji EGFR, aktywacji kaspaz, wpływu na procesy apoptozy, nekrozy i progresję cyklu komórkowego oraz określono stabilność chemiczną otrzymanych pochodnych.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Talidomid

1.1. Historia

Talidomid pierwszy raz został wprowadzony do leczenia w 1957 roku przez niemiecką firmę Chemie Grunenthal. Reklamowany jako skuteczny, niezależniący i bezpieczny środek uspokajający dostępny bez recepty, szybko zyskał popularność wśród pacjentów. Dodatkowo odkrycie jego działania przeciwwymiotnego, spowodowało, że był polecany kobietom w ciąży, którym doskwierał problem porannych mdłości. W latach 1957-1961 był już obecny pod różnymi nazwami handlowymi w ponad 46 krajach i powszechnie stosowany. Co ciekawe, talidomid nigdy nie został wprowadzony do obrotu w USA, z uwagi na sprzeciw dr Frances Kelsey, farmakolog współpracującej z FDA (ang. *Food and Drug Administration*), dotyczący przypadków neuropatii obwodowej u dorosłych przyjmujących talidomid oraz niedostatecznych wyników badań bezpieczeństwa dla tego związku. Okazało się to słusznym krokiem, gdyż w czasie popularności talidomidu zaczęto obserwować niepokojący, nagły wzrost urodzeń dzieci z nieprawidłowo rozwiniętymi kończynami. W 1961 roku raporty dwóch niezależnych klinicystów dostarczyły niezaprzeczalnych dowodów na związek między stosowaniem talidomidu w ciąży, a wadami wrodzonymi u potomstwa. Wśród najczęściej pojawiających się wad wyróżnić należy fokomelie, amelie, a także uszkodzenia uszu, oczu i narządów wewnętrznych. W listopadzie 1961 roku talidomid został ostatecznie wycofany z obrotu, jednak szacuje się, że w wyniku jego stosowania urodziło się ponad 10000 dzieci z wadami wrodzonymi, a ciężkie uszkodzenia narządów wewnętrznych doprowadziły do licznych poronień, których ilość trudno dziś oszacować [6].

1.2. Nowe zastosowanie talidomidu w medycynie

W 1965 roku Profesor Sheskin wykazał, że talidomid podawany w celach uspokajających pacjentom cierpiącym na trądowy rumień guzowaty (ang. *erythema nodosum leprosum*, ENL), prowadził do redukcji objawów zapalnych choroby i poprawy stanu klinicznego [7]. Obserwacja ta spowodowała, ponowny wzrost zainteresowania badaczy potencjalnymi właściwościami terapeutycznymi talidomidu. Wkrótce okazało się, że talidomid charakteryzuje się szerokim działaniem immunomodulującym, przeciwzapalnym

i antyangiogennym [8,9]. Wykazano jego działanie przeciwnowotworowe u pacjentów z zaawansowanym szpiczakiem mnogim [10]. Odkrycia te spowodowały, że w 1998 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków dopuściła stosowanie talidomidu w ostrej postaci ENL, a w 2006 roku wraz z deksametazonem w skojarzonej terapii nowo zdiagnozowanych przypadków szpiczaka mnogiego. Z uwagi na znane działanie teratogenne talidomidu oraz działania niepożądane ponowne zastosowanie talidomidu do leczenia zostało połączone z wprowadzeniem specjalnego programu kontrolującego ordynowanie i wydawanie tego leku o nazwie S.T.E.P.S. (System for Thalidomide Education and Prescribing Safety) [11]. Oprócz zarejestrowanych wskazań, talidomid posiada także szereg zastosowań *off label*. Stwierdzono skuteczność talidomidu w różnych chorobach o podłożu autoimmunologicznym i zapalnym (**Tabela 1**) [12-21].

Tabela 1. Potencjalne zastosowania terapeutyczne talidomidu

Zaburzenia autoimmunologiczne	Choroby przewodu pokarmowego	Choroby onkologiczne	Inne
układowy toczeń rumieniowaty, reumatoidalne zapalenie stawów, zespół Sjögrena /choroba Mikulicza-Radeckiego, sarkoidoza	nawracające aftowe zapalenie jamy ustnej, choroba Crohna	zespół mielodysplastyczny, mięsak Kaposiego, rak piersi, rak prostaty, glejak wielopostaciowy	choroba przeszczep przeciw gospodarzowi, anoreksja w przebiegu chorób nowotworowych, choroba Behçeta

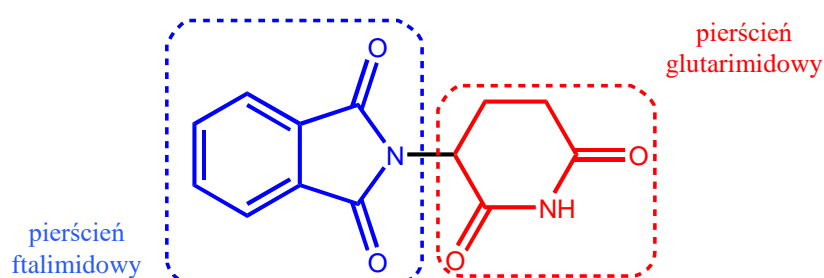
1.3. Mechanizm działania

W 1991 roku odkryto, że związek ten hamuje produkcję czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α) przez zaktywizowane monocyty [22]. Odkrycie to było pierwszym krokiem do wyjaśnienia podstaw silnie przeciwzapalnego działania talidomidu. TNF- α to plejotropowa cytokina stymulująca reakcję immunologiczną organizmu w odpowiedzi na zakażenie oraz indukująca reakcję zapalną. Produkowana jest głównie przez makrofagi, ale także przez komórki limfoidalne, miocyty serca oraz komórki śródbłonna i tkanki neuronalnej. Nadprodukcja TNF- α została zaznaczona w patogenezie licznych chorób charakteryzujących się przewlekłym stanem zapalnym, jak choroby nowotworowe i autoimmunologiczne. Talidomid hamuje produkcję TNF- α poprzez blokadę ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B oraz białka adaptorowego MyD88,

biorących udział w regulacji genów TNF- α oraz poprzez degradację jego mRNA [23]. W przeciwieństwie do kortykosteroidów, zahamowanie produkcji TNF- α po podaniu talidomidu nie wiąże się z obniżeniem poziomu innych cytokin, takich jak IL2, która uczestniczy w stymulacji odpowiedzi przeciwnowotworowej organizmu. Talidomid zwiększa produkcję IL4 i IL5, jest silnym kostymulatorem limfocytów T, zwiększając liczbę limfocytów CD4+ i CD8+ [24]. Dodatkowo wpływa także na produkcję IFN- γ , IL10 i IL12. Działanie antyangiogenne talidomidu związane jest z jego zdolnością do hamowania produkcji VEGF oraz bFGF. Mimo zidentyfikowania tak szerokiego spectrum cząsteczek, na które oddziałuje talidomid do 2010 roku badacze nie byli w stanie dokładnie wyjaśnić podstaw molekularnych mechanizmu działania tego związku. Uważano, że plejotropowe działanie talidomidu związane jest z istnieniem wielu celów molekularnych. Stanowisko to zmieniło się wraz z opublikowaniem pracy Ito i innych [25], w której badacze zidentyfikowali cereblon (CRBN), jako białko bezpośrednio wiążące talidomid, odpowiedzialne za efekty biologiczne tego związku. Cereblon wraz z białkiem wiążącym uszkodzone DNA (DDB1), regulatorem kulin-1 (ROC1) oraz białkiem CUL4A tworzy kompleks ligazy ubikwitynowej E3 (CRBN-CRL4). Struktura ta jest odpowiedzialna za regulację procesu degradacji białek na szlaku ubikwityna-proteasom. Talidomid reguluje specyficzność substratową kompleksu CRBN-CRL4. W jego obecności oraz innych związków z grupy IMiDs (*ang. immunomodulatory imide drugs*) cereblon przyłącza neosubstraty, które następnie podlegają szybkiej ubikwitacji i degradacji przez proteasom, co prowadzi do określonych efektów biologicznych w zależności od funkcji degradowanego białka. Pierwszymi odkrytymi neosubstratami były Ikaros (IKZF1) oraz Aiolos (IKZF3), których degradacja przez CRBN-CRL4 w obecności lenalidomidu odpowiada za przeciwszpiczakową aktywność tego związku [26,27]. Te dwa czynniki transkrypcyjne odgrywają kluczową rolę w rozwoju limfocytów B oraz wykazują wysoką ekspresję w nowotworach złośliwych pochodzących z tych komórek, także w szpiczaku mnogim. Degradacja tych białek prowadzi do zahamowania aktywności interferonowego czynnika regulacyjnego oraz c-MYC, powodując apoptozę komórek szpiczaka. Obniżenie stężenia IKZF1 i IKZF3 prowadzi również do zwiększonej produkcji IL2, aktywacji komórek T i NK, co może przyczyniać się do przeciwnowotworowego działania lenalidomidu i innych IMiDs [28].

1.4. IMiDs (*ang. immunomodulatory imide drugs*)

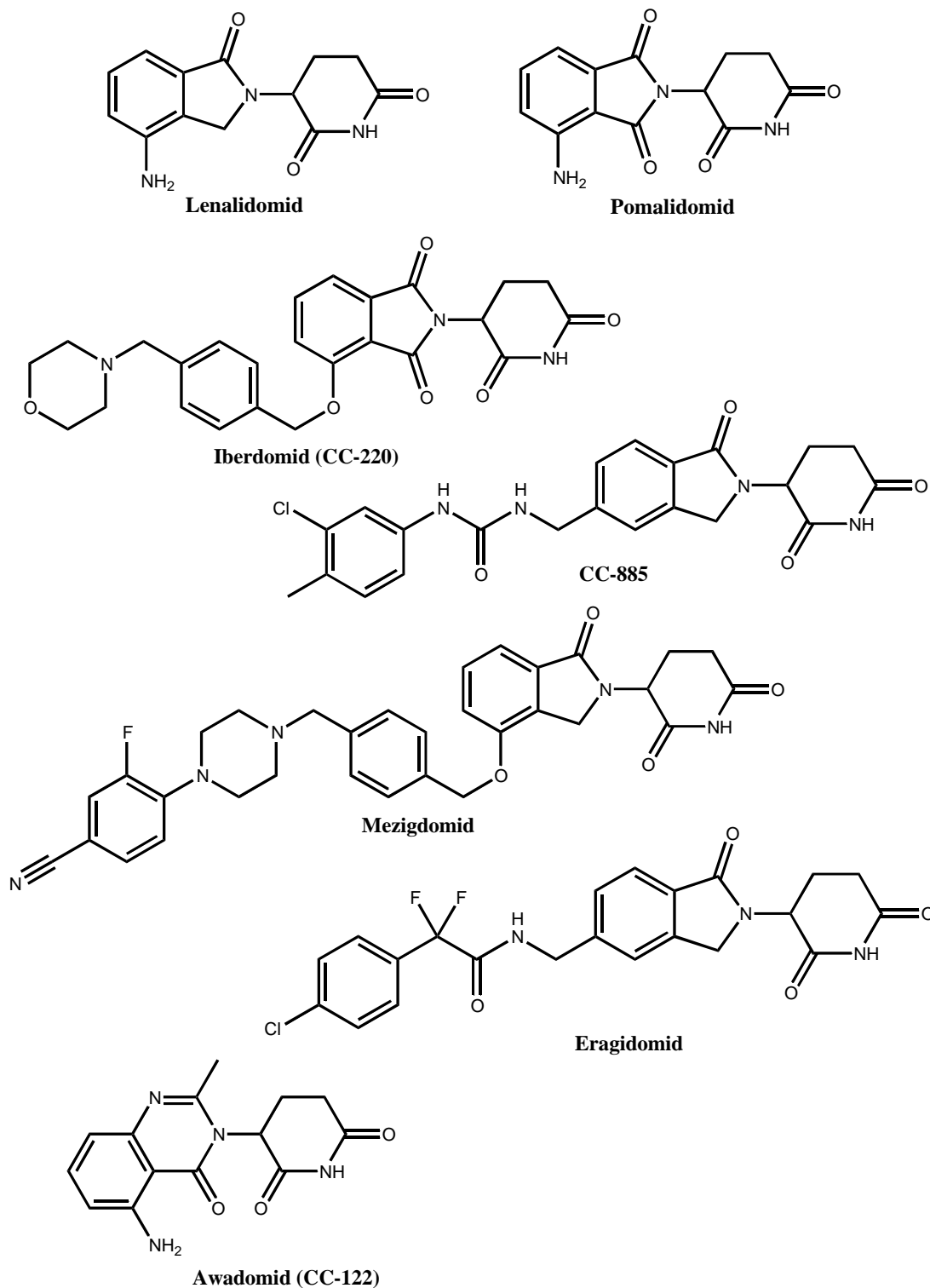
Sukcesy terapeutyczne użycia talidomidu w zaawansowanym szpiczaku mnogim i innych chorobach oraz odkrycie jego bezpośredniego celu molekularnego, spowodowały rozwój nowej grupy leków będących strukturalnymi analogami talidomidu, charakteryzujących się silniejszymi właściwościami przeciwzapalnymi i immunomodulującymi, z jednoczesną redukcją działań niepożądanych. Częsteczka talidomidu jest syntetyczną pochodną kwasu glutaminowego i składa się z pierścienia ftalimidowego oraz pierścienia ftalimidowego (**Rycina 1**).



Rycina 1. Struktura chemiczna talidomidu

Poprzez zastąpienie pierścienia ftalimidowego ugrupowaniem 4-amino-1-oksoizindolin-2-ylowym uzyskano pierwszy związek należący do leków z grupy IMiDs (immunomodulujące leki imidowe) [29]. Lenalidomid (Revlimid, CC-5013) w 2006 roku został zarejestrowany przez FDA w połączeniu z deksametazonem w terapii nawrotowego szpiczaka mnogiego, a w 2015 roku w terapii nowo zdiagnozowanych przypadków tej choroby. W odróżnieniu od związku macierzystego nie wykazuje on działania sedatywnego, a przypadki wystąpienia neuropatii czuciowej aksonalnej są rzadsze. Charakteryzuje się natomiast silniejszym działaniem kostymulującym komórki T, aktywującym komórki NK, a także silniejszym działaniem antyangiogennym i przeciwzapalnym [30]. Pomalidomid (Actimid, CC-4047) jest kolejnym analogiem talidomidu, powstałym poprzez wprowadzenie w pozycji 4 pierścienia ftalimidowego związku macierzystego grupy aminowej. Zarejestrowany jest w terapii pacjentów ze szpiczakiem mnogim, którzy zostali poddani wcześniejszym terapiom uwzględniającymi lenalidomid. Mechanizm działania nowych związków z grupy IMiDs, podobnie jak talidomidu, oparty jest na ich interakcji z cereblonem, dlatego nazywane są także modulatorami ligazy E3 cereblonu (*ang. cereblon E3 ligase modulators*,

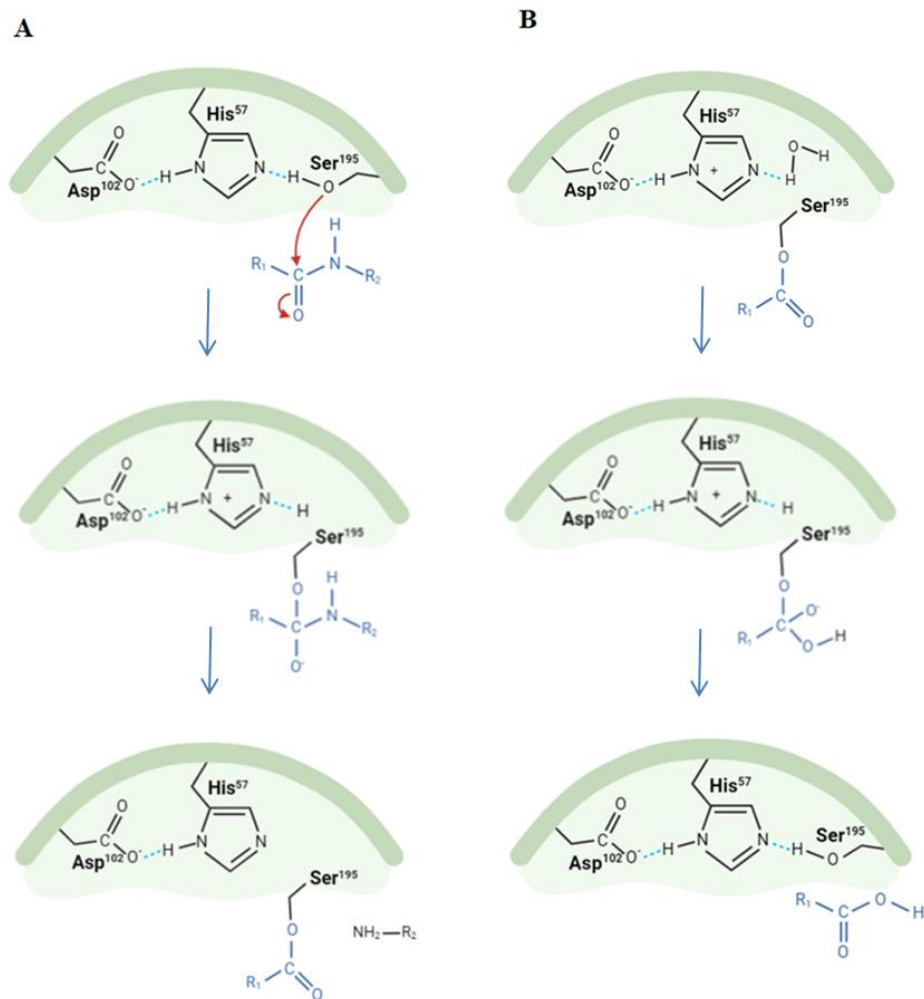
CELMoDs). Struktury nowych pochodnych talidomidu zarejestrowanych w lecznictwie oraz tych, które obecnie są w fazie badań przedklinicznych i klinicznych przedstawiono na **Rycinie 2** [31].



Rycina 2. Struktury chemiczne pochodnych talidomidu

2. Elastaza neutrofilowa

Ludzka elastaza neutrofilowa (HNE, elastaza leukocytowa, EC 3.4.21.37) jest enzymem proteolitycznym należącym do rodziny chymotrypsyn i razem z proteinazą 3 (PR3) oraz katepsyną G (CatG) tworzy grupę neutrofilowych proteaz serynowych (NSPs). Syntezowana jest w trakcie rozwoju granulocytów w szpiku kostnym na etapie promielocytów jako nieaktywna preproteina, która następnie ulega modyfikacji i jest przechowywana w granulkach azurofilnych leukocytów wielojądrzastych, jako aktywny enzym [32]. Wstępuje także w eozynofilach, komórkach tłuszcznych, monocytach, a także keratynocytach i fibroblastach. Dojrzała elastaza stanowi 218-aminokwasową proteazę o masie 29-33 kDa, zawierającą dwa łańcuchy boczne węglowodanów połączone asparaginą oraz cztery wewnątrz łańcuchowe mostki dwusiarczkowe. Aktywność elastazy neutrofilowej determinowana jest przez triadę katalityczną, znajdującą się w centrum aktywnym enzymu, która składa się z: His57, Asp102 oraz Ser195.



Rycina 3. Mechanizm aktywności elastazy neutrofilowej

Mechanizm hydrolityczny HNE obejmuje następujące po sobie procesy acylacji (**Rycina 3A**) i deacylacji (**Rycina 3B**). Po związaniu substratu peptydowego z powierzchnią enzymu, dochodzi do ataku nukleofilowego grupy hydroksylowej reszty seryny triady katalitycznej na węgiel karbonylowy wiązania peptydowego. Uwolniony wodór związany zostaje przez azot histydyny, a para elektronów z podwójnego wiązania karbonylu przemieszcza się do tlenu, co prowadzi do wygenerowania tetraedycznego związku pośredniego [33,34]. Następuje zerwanie wiązania łączącego azot i węgiel w wiązaniu peptydowym, a poprzez uwolnienie aminy dochodzi do wygenerowania acylo-enzymu. W drugim etapie w wyniku ataku cząsteczki wody na acylo-enzym, dochodzi do wygenerowania kolejnego tetraedycznego związku pośredniego, który rozpada się uwalniając produkt kwasu karboksylowego oraz aktywny enzym.

2.1. Rola elastazy neutrofilowej w homeostazie

W warunkach fizjologicznych elastaza neutrofilowa bierze udział we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej organizmu oraz w przebiegu reakcji zapalnej. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa elastazy przebiega zarówno w szlaku wewnątrz, jak i zewnątrzkomórkowym. W fagolizosomach współdziała ona razem z mieloperoksydazą i RFT generowanymi przez kompleks oksydazy NADPH w trawieniu fagocytowanych bakterii. Aktywność elastazy jest wymagana do degradacji bakterii gram-ujemnych, w przypadku *E. coli* HNE rozszczepia białko A błony zewnętrznej prowadząc do śmierci bakterii [35]. Wykazano także, że elastaza neutrofilowa jest kluczowym białkiem degradującym czynniki wirulencji *Shigella*, wywołującej czerwonkę bakteryjną, a neutrofile z inaktywowaną farmakologicznie lub genetycznie HNE sprzyjają przeżywalności bakterii [36]. Na drodze zewnątrzkomórkowej elastaza neutrofilowa degraduje drobnoustroje w trakcie generowania zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilii (NETs) - struktur zbudowanych z łańcuchów DNA, histonów i neutrofilowych proteaz serynowych, wydzielanych przez aktywowane neutrofile w procesie NETozy [37]. NSPs są obficie wydzielane w trakcie aktywacji neutrofilii w miejscach objętych procesem zapalnym. Z uwagi na fakt, że elastaza charakteryzuje się szerokim spektrum substratowym, bierze ona udział nie tylko w degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej objętych zapaleniem, a także moduluje odpowiedź immunologiczną, poprzez regulowanie aktywności chemokin, cytokin, czynników

wzrostu oraz receptorów na powierzchni komórek, prowadząc do aktywacji bądź utraty ich funkcji (**Tabela 2**) [38].

Tabela 2. Wybrane substraty elastazy neutrofilowej

Białka macierzy	Białka osocza	Immuno-globuliny	Proteazy	Inhibitory proteaz	Cytokiny
elastyna, kolagen (typ I-IV), proteoglikan, trombomodulina, kadheryny, fibronektyna	receptory dopełniacza, czynniki krzepnięcia (V, VIII, XI, XIII), fibrynogen, α -2-plazmina	IgG, IgM	kininogen, kolagenaza, żelatynaza	tkankowy inhibitor metaloproteazy, elafina	IL1, IL2, IL6, TNF- α

Aktywność proteolityczna elastazy neutrofilowej w warunkach fizjologicznych jest ściśle kontrolowana przez endogenne inhibitory należące do trzech głównych rodzin:

- serpin: inhibitor α -1-proteinazy (α -1-antytrypsyna, A1AT), inhibitor elastazy neutrofilowej monocytów (MNEI, Serpin B1);
- chelonianin: wydzielniczy inhibitor proteazy leukocytów (SLPI), elafina;
- makroglobulin: α -2-makroglobulina.

α -1-antytrypsyna stanowi główny ogólnoustrojowy inhibitor elastazy, wytwarzana jest w hepatocytach i wydzielana do osocza, gdzie pełni ochronną rolę dla tkanek przed proteolitycznym działaniem elastazy. Należy ona do klasy serpin, a jej działanie opiera się na tworzeniu stabilnego kompleksu acylo-enzym-inhibitor, prowadząc do dezaktywacji enzymu [39]. Innym ogólnoustrojowym inhibitorem elastazy jest α -2-makroglobulina, podobnie jak α -1-antyproteinaza, należy do wielkocząsteczkowych antyproteaz, jednak jej aktywność nie powoduje całkowitego hamowania właściwości proteolitycznych enzymu. Blokuję ona stereochemicznie dostęp do centrum aktywnego elastazy dla dużych molekularnie substratów, umożliwiając proteolizę substratów o małej masie cząsteczkowej. Aktywność ogólnoustrojowych endogennych inhibitorów uzupełniana jest przez działanie niskocząsteczkowych antyproteaz, wydzielanych lokalnie w obszarach infiltracji neutrofilów, w odpowiedzi na bodźce zapalne [40]. Wydzielniczy inhibitor proteazy leukocytów (SLPI) występuje we wszystkich płynach ustrojowych m.in. w ślinie, łzach, śluzie jelitowym oraz wydzielany jest obficie przez komórki nabłonkowe tchawicy, oskrzeli i komórki pęcherzyków płucnych, stanowiąc główny endogenne inhibitor elastazy

w górnych drogach oddechowych. Elafina, oprócz komórek nabłonka dróg oddechowych, obecna jest także w naskórku, komórkach jelita grubego oraz endometrium. W odróżnieniu od SLPI wydzielanie konstytutywne elafiny odbywa się na niskim poziomie i wzrasta w odpowiedzi na stymulację czynnikami zapalnymi tj. IL1, TNF- α oraz LPS [41].

Elastaza neutrofilowa jest zdolna do uniknięcia hamującego wpływu endogennych antyproteaz na kilka sposobów. Inhibitory proteaz o wysokiej masie cząsteczkowej mają ograniczone możliwości dyfuzji do miejsc infiltracji neutrofilii w tkankach objętych zapaleniem, z uwagi na ograniczenia stereochemiczne. α -1-antyproteaza, α -2-makroglobulina oraz SLPI mogą być inaktywowane przez utlenienie ich centrum katalitycznego w wyniku działania RFT pochodzących z aktywowanych neutrofilii. Dodatkowo wykazano ograniczony wpływ endogennych inhibitorów na elastazę neutrofilową związaną z tkanką, w porównaniu do aktywności wobec wolnego enzymu [42].

2.2. Rola elastazy neutrofilowej w patomechanizmie chorób zapalnych

Zaburzenie równowagi pomiędzy działaniem elastazy neutrofilowej oraz jej endogennych inhibitorów prowadzi do niekontrolowanej, destrukcyjnej aktywności enzymu, która bierze udział w patogenezie szerokiego zakresu zaburzeń charakteryzujących się przewlekłym stanem zapalnym (**Rycina 4**) [43-46].



Rycina 4. Stany chorobowe, w których patogenezie uczestniczy elastaza neutrofilowa

2.2.1. Udział elastazy neutrofilowej w rozwoju chorób nowotworowych

Cancer related inflammation (CRI), czyli zapalenie związane z rakiem, jest charakterystycznym zjawiskiem występującym w mikrośrodowisku guza i związane jest ze złym rokowaniem i zmniejszoną przeżywalnością w licznych chorobach nowotworowych [47]. Mikrośrodowisko guza stanowi złożoną sieć, którą oprócz proliferujących komórek nowotworowych, współtworzą komórki zrębu guza, naczyń krwionośnych, naciekające komórki zapalne oraz otaczające te środowisko komórki śródbłonna [48]. Komórki odpornościowe infiltrujące mikrośrodowisko guza, jako obrona immunologiczna organizmu, promują przewlekły stan zapalny, co w konsekwencji nie sprzyja eliminacji komórek nowotworowych, a promuje ich progresję oraz zdolność do przerzutowania. Także same komórki nowotworowe wytwarzają chemokiny i cytokiny przyciągające komórki układu odpornościowego, które nabywają pronowotworowe właściwości. Dlatego procesy zachodzące w mikrośrodowisku guza stanowią ostatnio ciekawy obszar badań w poszukiwaniu nowych punktów uchwytu dla leków przeciwnowotworowych.

Wykazano, że progresja komórek nowotworowych może być związana ze zwiększoną aktywnością neutrofilów, które jako pierwsze docierają do miejsc objętych stanem zapalnym. Komórki nowotworowe poprzez wydzielanie cytokin i chemokin rekrutują komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (MDSC), które wnikając do guza różnicują się w neutrofile związane z guzem (TAN), które mogą przyjmować dwa fenotypy: przeciwnowotworowy N1 oraz pronowotworowy N2 [49]. Neutrofile związane z guzem fenotypu N1 wywierają działanie przeciwnowotworowe poprzez pośrednią lub bezpośrednią cytotoksyczność. W miarę progresji nowotworu przeważają neutrofile o fenotypie N2, które poprzez aktywację cytokin, wiązanie integryn, wydzielanie RFT oraz neutrofilowych proteaz serynowych, stymulują wzrost i inwazyjność guza [50]. Neutrofile wywierają działanie pronowotworowe w procesie NETozy [51]. Utworzone z enzymów proteolitycznych i składników jądrowych zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe (NETs) powiązane są z progresją różnych typów nowotworów, wykazano między innymi, że poziom kompleksów NE-DNA wzrasta proporcjonalnie do zaawansowania stadium choroby w przebiegu raka piersi [52]. Główną proteazą wydzielaną w trakcie generowania NETs jest elastaza neutrofilowa. Jej udział zaznacza się na wszystkich etapach nowotworzenia, zarówno w trakcie inicjacji, progresji, jak i w procesie przerzutowania komórek nowotworowych [53]. Poziom NE stanowi

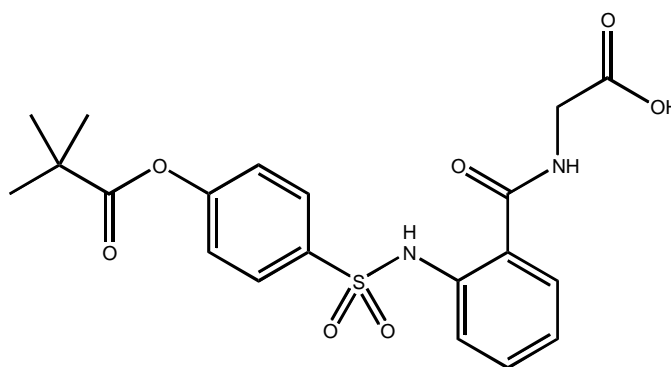
niezależny wskaźnik prognostyczny u pacjentów z rakiem piersi, płuc, prostaty i okrężnicy [3,54,55]. Pronowotworową aktywność elastazy oceniono w licznych modelach zwierzęcych. W modelu gruczolakoraka płuc wykazano, że myszy pozbawione genu elastazy neutrofilowej charakteryzują się większą przeżywalnością w porównaniu z grupą kontrolną [56]. W kilku modelach raka piersi wykazano, że obniżony poziom ekspresji elafiny w porównaniu z komórkami prawidłowymi nabłonka gruczołu sutkowego, promuje wzrost komórek nowotworowych poprzez zwiększoną, niekontrolowaną aktywność NE [57,58]. Ostatnie badania potwierdzają, że ablacja genetyczna i farmakologiczne hamowanie elastazy zmniejszają przerzuty i wydłużają przeżycie w mysich modelach raka piersi [4]. W przypadku raka jelita grubego wykazano, że NE pośredniczy w przerzutach komórek nowotworowych do wątroby, a wysoki poziom NETs koreluje ze złym rokowaniem przeżycia wśród pacjentów [59]. Badając potencjalne mechanizmy, w których elastaza uczestniczy w progresji nowotworu stwierdzono, że NE może bezpośrednio stymulować szlaki proliferacji poprzez zewnątrzkomórkową transaktywację receptorów błonowych tj. EGFR, prowadząc do indukcji sygnalizacji kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK). Dodatkowo elastaza może stymulować uwalnianie czynników wzrostu tj. PDGF i VEGF, które promują angiogenezę komórek nowotworowych [60,61]. W przypadku komórek raka płuc wykazano, że elastaza aktywuje szlak proliferacji kinazy fosfoinozytydowej 3 (PI3K) poprzez degradację receptora insuliny (IRS1) [56]. Dodatkowo wykazano, że elastaza jest zdolna do dezaktywacji białek supresorowych prowadząc od utraty ich funkcji przeciwnowotworowych [62]. Niedawno wykazano, że w przypadku ostrej białaczki promielocytowej NE przyczynia się do różnicowania i proliferacji komórek nowotworowych poprzez proteolityczne rozszczepienie supresora nowotworu p200 CUX1 [63].

2.3. Inhibitory elastazy

Szeroki wachlarz zaburzeń, w których patogenezie zaznacza się udział elastazy neutrofilowej oraz dowody na ograniczone działanie endogennych inhibitorów podkreślają znaczenie i potrzebę poszukiwania syntetycznych inhibitorów tej proteazy, charakteryzujących się brakiem ograniczeń wielkościowych, sterycznych i mechanistycznych, mogących skutecznie regulować aktywność elastazy w miejscach objętych stanem zapalnym.

Obecnie jako inhibitory elastazy zatwierdzone są dwa związki. Pierwszym z nich jest oczyszczona α -1-antytrypsyna, wprowadzona pod nazwą Prolastin, który stosowany jest we wrodzonym niedoborze α -1-antyproteinazy. Drugim związkiem jest sivelestat (ONO5046, **Rycina 5**), jedyny syntetyczny inhibitor elastazy, wprowadzony w Japonii i Korei pod nazwą Elaspol (Ono Pharmaceutical), stosowany w leczeniu zespołu ostrej niewydolności oddechowej i ostrego uszkodzenia płuc.

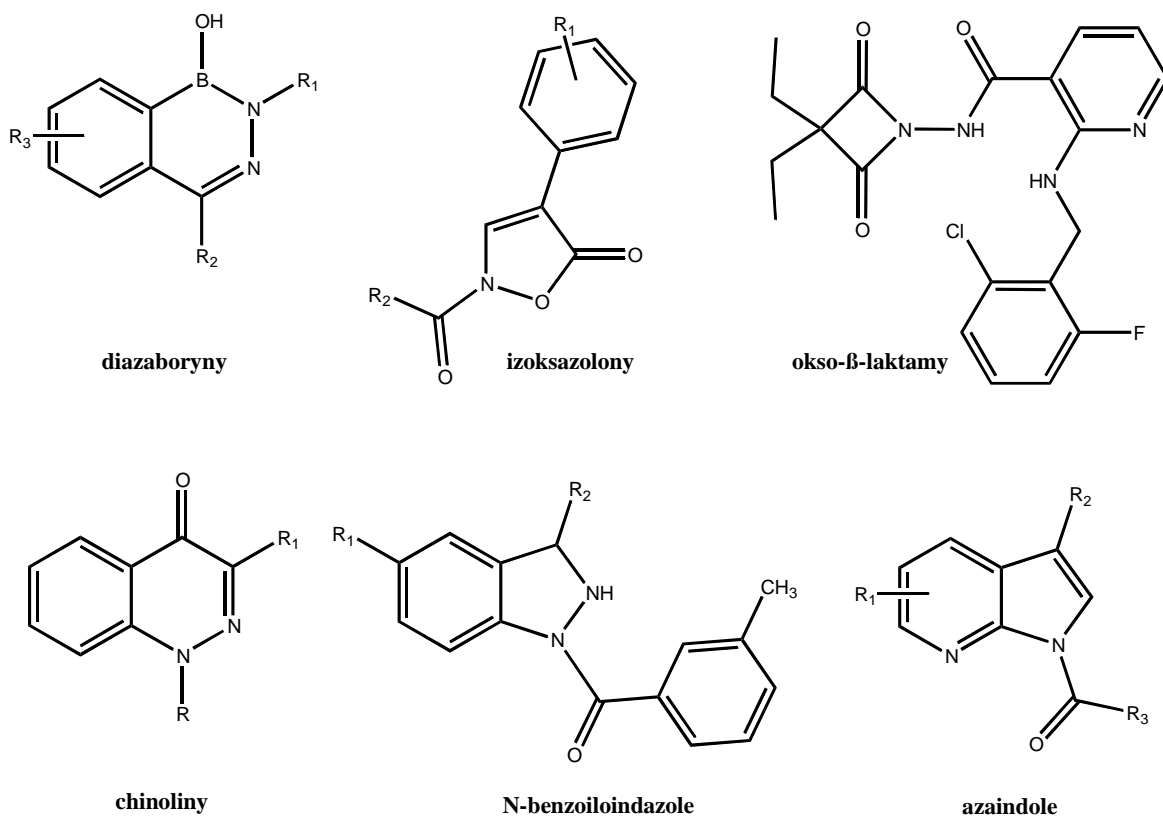
Stwierdzono, że sivelestat hamuje stymulowane przez elastazę procesy promujące rozwój komórek nowotworowych raka trzustki i płuc [64,65]. Dodatkowo, stwierdzono korzystny wpływ kombinatorycznego połączenia sivelestatu i trastazumabu, jako strategii terapeutycznej w HER-2 dodatnim raku piersi [5], co potwierdza potrzebę poszukiwania nowych inhibitorów elastazy ukierunkowanych na działanie przeciwnowotworowe.



Rycina 5. Sivelestat

W ostatnich latach otrzymano nowe inhibitory elastazy neutrofilowej zawierające różne układy chemiczne. W **publikacji I** pt. „Recent advances in the development of elastase inhibitors” omówiono struktury i aktywności wybranych, nowych inhibitorów elastazy neutrofilowej przedstawionych w literaturze w latach 2011-2020.

Wśród odkrytych związków (**Rycina 6** [66-71]) znaleźć można różne układy chemiczne m.in. pochodne aminoglikozydów, heteroarylowe estry oksymów, diazaboryny czy cykliczne depsipeptydy wyizolowane z sinic morskich. Ważną grupę inhibitorów elastazy stanowią pochodne okso- β -laktamów, które wykazują zdolność do łatwego acylowania enzymów zawierających w centrum aktywnym serynę. Szeroką gamę związków w tym przeglądzie stanowią heterocykliczne związki aromatyczne, wśród których wykazano *N*-podstawione benzoilopirazole, benzoilindazole oraz pochodne chinoliny i izoksazolu, jako silne inhibitory elastazy. Przedstawione struktury jednoznacznie wskazują, że heterocykliczne związki azotu stanowią dobre rusztowanie dla związków hamujących aktywność elastazy.



Rycina 6. Wybrane struktury nowych inhibitorów elastazy

2.3.1. Publikacja I: Recent advances in the development of elastase inhibitors

Commentary

For reprint orders, please contact: reprints@future-science.com

Future
Medicinal
Chemistry

Recent advances in the development of elastase inhibitors

Beata Donarska¹ & Krzysztof Z Łączkowski^{*1} 

¹Department of Chemical Technology & Pharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Jurasza 2, 85 089 Bydgoszcz, Poland

*Author for correspondence: Tel.: +48 52 585 3935; Fax: +48 52 585 3920; krzysztof.laczkowski@cm.umk.pl

“Recent findings provide extensive information about design and modern methods of synthesis, as well as the structure–activity relationship of new elastase inhibitors.”

First draft submitted: 16 May 2020; Accepted for publication: 23 July 2020; Published online: 5 October 2020

Keywords: cancer • COPD • human neutrophil elastase • inflammatory diseases

Human neutrophil elastase (HNE) is a serine proteinase of the chymotrypsin family, and together with Pr3 and CatG belongs to the main NSPs. Neutrophil elastase is a 218 amino acid glycoprotein, encoded as a zymogen on the short arm of chromosome 19. It is produced during the development of neutrophils in the bone marrow, mainly at the stage of promyelocytes, after which it is stored in azurophilic granules of mature neutrophils. Enzymatic activity of serine proteinases results from the presence of a catalytic triad formed by three amino acid residues, Asp102, His57 and Ser195. The appearance of a ligand at the active center causes proton transfer within the triad, leading to Ser195 becoming a highly reactive nucleophile, able to cleave the peptide bond.

The main function of neutrophil serine proteases is to participate in the innate immune response. Neutrophils release NSPs in response to bacterial or fungal infections. Along with other serine proteases, neutrophil elastase is an important component of extracellular neutrophil traps. Released neutrophil elastase and other proteases degrade pathogens by digesting them in phagolysosomes. Under physiological conditions, neutrophil elastase also modulates the inflammatory response, affecting proinflammatory cytokines and chemokines, and by degrading the inflammatory extracellular matrix. Elastase is found in large quantities in lung tissue, arteries, ligaments and skin. The activity of serine proteases is strictly controlled by endogenous inhibitors. Disturbance of the physiological balance between released serine proteases and the activity of endogenous inhibitors leads to numerous diseases and disorders. Due to the fact that a large amount of elastase is released during inflammation, it is involved in the pathogenesis of diseases such as emphysema, chronic obstructive pulmonary disease, acute respiratory failure, atherosclerosis, rheumatoid arthritis or cancer [1].

The commentary focuses on recent literature concerning the design of new HNE inhibitors and understanding the mechanism of their action.

Aminoglycosides

Many studies on neutrophil serine proteases inhibitors focus on finding analogs based on the structure of endogenous protease inhibitors. Heparan sulfate is a glycosaminoglycan present on the surface of cells, that during inflammation is cleaved by HNE. In the feedback mechanism, fragmented heparan sulfate proteoglycans interact with elastase, reducing its activity. Heparin, due to similarity in its structure to heparan sulfate, has been tested as an inhalation agent in the treatment of chronic inflammatory lung diseases in which excessive production of NSPs, such as HNE, Pr3 and CatG occurs, leading to destruction of the lung matrix. To counteract this effect, Craciun *et al.* investigated the – close in structure to heparin – *N*-arylacyl *O*-sulfonated aminoglycosides as nonpeptide inhibitors of the above three NSPs [2]. The authors used three aminoglycosides, namely neomycin, apramycin and kanamycin, which were *N*-substituted with three different arylacetyl groups and additionally per-*O*-sulfonated. Carbobenzyloxy derivatives with the phenyl ring located furthest from the aminoglycoside core proved to be the best neutrophil elastase inhibitors, as this particular phenyl ring location allowed the molecule to bind more strongly to the enzyme.

newlands
press

The flexible structure of neomycin, resulting in easier binding to protease, turned out to be the best core for HNE aminoglycoside inhibitors. In addition, at higher concentrations, carbobenzyloxy neomycin and kanamycin derivatives protected A549 lung epithelial cells from HNE-induced detachment.

Heteroaryl oxime esters

Another group of compounds that may be potential elastase inhibitors form aryl and heteroaryl oxime ester derivatives. Hasdemir *et al.* synthesized aryl and heteroaryl γ -hydroxy-, γ -methoxyimino- and γ -benzyloxyiminobutyric acid methyl esters and showed that only compounds containing phenyl and *p*-chlorophenyl group possessed higher activity against elastase than the standard ursolic acid [3].

Boron derivatives

Boronic acids are interesting systems for the design of biologically active compounds, also for enzyme inhibitors. Due to their unique properties, boronic acids are currently the subject of numerous studies as potential drugs for many diseases. António *et al.* presented very interesting research on the synthesis and activity of diazaborines in which boron atom is a part of heteroaromatic system [4]. Diazaborines containing thienyl ring showed HNE inhibitory activity in the micromolar range, and high specificity for elastase in comparison with other tested proteases. The accompanying molecular docking studies showed the formation of a reversible covalent bond between a boron atom and an oxygen of the Ser195 residue at the enzyme active site. Diazaborines appear to be excellent starting points to develop selective HNE inhibitors.

Aromatic heterocyclic compounds

Based on previous research showing that *N*-benzoylpyrazoles were potent inhibitors of HNE, Crocetti *et al.* received a wide range of *N*-benzoylindazole derivatives and showed that derivatives containing an unsubstituted benzoyl group exhibited micromolar and nanomolar inhibitory activities [5]. Replacing the phenyl ring with an alkyl or cycloalkyl fragment resulted in observation that the activity in this series decreased with shortening of the alkyl chain as well as with increasing steric bulk of the cycloalkyl system. The kinetic studies performed for the most active compounds showed a competitive, pseudoirreversible inhibition mechanism. Compounds were also characterized by good stability in aqueous buffers, and elastase selectivity compared with other serine proteases. Molecular docking showed that the carbonyl group of *N*-benzoylindazole derivatives interacted with the hydroxyl group of the Ser195 in the active enzyme site. In conclusion, the authors stated that the impact of the effects of distortion energy of docked molecules on the formation of the Michaelis complex may be the main factor determining the activity of compounds. These conclusions were used to develop fully optimized *N*-benzoylindazoles [6]. Knowing that the presence of a benzoyl group in position 1 and an ester group in position 3 is necessary to maintain high inhibitory activity against HNE, the authors modified position 5 in the phenyl ring of the indazole system using a wide range of substituents. Studies on HNE inhibitory activity showed that the compounds are active in the low nanomolar range, and the nitro, bromine and acylamino groups at position 5 and the cyano group at position 3, and *m*-methylbenzoyl group at position 1 are necessary for high activity. However, the compounds showed only moderate selectivity toward other proteases. Further studies conducted by the same research group showed that replacement of the indazole moiety with an indole scaffold, that does not contain a nitrogen atom in position 2, led to the formation of corresponding derivatives with little or no HNE inhibitory activity [7]. Importantly, indole derivatives contained the same substituents that showed the best inhibitory activity in the case of indazole derivatives. Molecular docking showed that the indole system has a different spatial orientation at the active center of the enzyme. The indazole system forms a hydrogen bond with Ser195 or Gly193, and the indole system due to the lack of a nitrogen atom in position 2 cannot form hydrogen bonds with HNE, which may be responsible for drastically different inhibitory activity. In another interesting study, the effect of the position of the nitrogen atom in a heterocyclic ring on elastase inhibitory activity was investigated [8]. For this purpose, 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives containing a nitrogen atom in position 7 and additionally modified in positions N1 and C3 were obtained [7]. However, the studies of HNE inhibitory activity showed that shifting the nitrogen atom from position 2 to position 7 did not increase the inhibitory activity of HNE compared with indazole derivatives. Developed 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridines also showed a competitive, pseudoirreversible inhibition mechanism in which the nitrogen atom in position 7 formed a hydrogen bond with Asp194. Another group of compounds proposed by Giovannoni *et al.* and studied as HNE inhibitors are cinnolin-4(1*H*)-one derivatives. The authors selected cinnoline system based on its structural similarity to indazole. However, compared with indazole, which contains a pyrazole ring,

cinnoline contains a pyridazine ring and an additional carbonyl group. The authors used substituents known for the best activities, such as nitro and bromo groups at position 6, ethyl ester at position 3 and *m*-methylbenzoyl group at position 1 [9]. Studies showed that removing the carbonyl group at position 1 led to complete loss of activity. Insertion of various substituents at position 6 did not lead to an increase in activity compared with other compounds. Only one compound containing a hydrogen atom at position 3, a hydrogen atom at position 6 and *m*-methylbenzoyl group at position 1 showed ability to inhibit HNE in nanomolar range. In addition, these compounds were characterized by a much higher stability in aqueous buffers compared with *N*-benzoylindazoles. To design a new class of HNE inhibitors Vergelli *et al.* used a relatively small, flexible isoxazol-5(2*H*)-one system. Such a system has two carbonyl groups (2-N-CO and 5-CO) that can form a bond with Ser195 at the active site of the enzyme [10]. A very interesting conclusion from the conducted research suggests that removal of the carbonyl group from the 2-*N*-aroyl substituent leads to a complete loss of inhibitory activities. In addition, transformation of the 5-CO group into a thio 5-CS analogue also leads to a loss of activity, while removal of the methyl substituent from position 4 can even lead to 42-fold increase in activity. To explain the structure–activity relationships, the authors carried out appropriate molecular docking. This study showed that the most active compound formed a hydrogen bond between the oxygen of the 5-CO group and the NH group of Ser195. In addition, the lack of activity of derivatives containing the 5-CS group was associated with a higher value of radius of the sulphur atom and the length of the C-S bond. Chemical stability of isoxazol-5(2*H*)-ones is much higher than of the compounds previously tested. Continuing research on isoxazol-5(2*H*)-ones derivatives Giovanni *et al.* proved that removal of the substituent from position 3 and insertion of a differently substituted phenyl group in position 4 did not increase the ability of newly obtained derivatives to inhibit HNE [11]. An interesting result of the research was that thiazol-2-(3*H*)-ones did not have the ability to inhibit HNE even at higher concentrations [12]. Molecular docking studies showed that the impaired interaction of the endocyclic CO group on Ser195 hinders the formation of the Michaelis complex, on which the inhibitory activity against serine proteases depends.

Lactams

Areias *et al.* developed an excellent pharmacophore model, which then was used to filter a huge library of oxo- β -lactams. The resulting new base of structures was docked into the active site of HNE. A compound that showed important π - π stacking interactions with Phe192 was synthesized and its HNE inhibitory activity was tested. The compound showed two-times higher inhibitory activity than the commercial sivelestat and additionally showed no toxicity toward mouse cell lines NIH3T3 and human cell lines HEK293T [13]. Several studies have shown that β -lactams easily acylate serine-containing enzymes due to their high chemical reactivity. Marto *et al.* proposed a new approach to the study of HNE inhibitors with a potential anti-inflammatory effect in the treatment of psoriasis and other inflammatory skin diseases [14]. The authors synthesized a 4-oxo- β -lactam derivative (ER143) which, during the inhibition of HNE, releases the fluorescent hydroxycoumarin acting as a probe that permits skin permeation studies. However, due to its poor solubility, the derivative has been successfully formulated in starch-based nanocapsules (StNC) to increase its bioavailability. Studies have shown that the designed ER143 has proved to be an excellent HNE inhibitor in the nanomolar range, and the incorporation of ER143 into StNC improved ER143 skin permeation and retention. In addition, StNC-ER143 strongly inhibited the acute inflammatory response. Next, to improve solubility and reduce toxicity, Nunes *et al.* received ER143 derivatives containing a benzoxazole ring and a carboxyl group. The compounds were very good HNE inhibitors with subnanomolar activity range [15]. Emulsion and microemulsion formulations were developed for the compound that showed cell viability profile comparable with the negative control. An important finding was that the emulsion released more drug than microemulsion, which is directly related to their internal molecular structure. However, the *in vivo* antipsoriasis studies results obtained for emulsion released drug did not differ significantly from the results obtained for placebo, showing that further studies on the mechanism of action of these compounds are needed.

Triazole derivatives

Butt *et al.* synthesized a number of thiazole-triazole acetamide hybrids as potential elastase inhibitors. Derivatives included a mono- or dimethyl-substituted phenyl group. All compounds showed very good elastase inhibition with micromolar activity range. The influence of the methyl group position at the phenyl ring on the activity was investigated. Compounds containing a single methyl group at position 2 or 3 in the phenyl ring showed the highest inhibitory activity. All compounds were characterized by a very similar skeleton, therefore the calculated docking energy values were very close to each other [16].

To design efficient HNE inhibitors, Dias *et al.* also used triazole scaffold combined with the dihydroxybenzophenone system [17]. The synthesis of new elastase inhibitors with potential anti-inflammatory effects was based on the copper (I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction. Four of the derivatives showed better HNE inhibitory activity than the positive control of epigallocatechin-3-gallate. Kinetic studies showed that the most active compound containing the iodo group in the *para*-position at the phenyl ring acted as a competitive inhibitor of elastase. Molecular docking confirmed the experimental results and showed that the iodo-derivative interacts with the amino acids His71, Asp119 and Ser214 at the active site of elastase.

Aurones

Lately, Lucas *et al.* discovered aurone derivatives with C-shape architecture for the noncovalent HNE inhibition [18]. A large library of aurones was obtained to determine the structure–activity relationship. It was proved that a 3-substitution pattern, providing more flexibility of the resulting molecule, may favor its C-shape conformation in the active site of HNE. Many promising compounds were identified, inhibiting HNE at micromolar concentration and possessing competitive mechanism of action. Using molecular docking, the authors showed that the aurone ring forms π – π stacking interactions with His57 in the S2 pocket of HNE. All aurones were also found to be nontoxic toward human cell lines HEK293T.

SuFEx-reactive compounds

In the last years sulfur (VI) fluoride exchange (SuFEx) has been identified as the next click chemistry reaction. Due to the fact that SuFEx enables the creation of strong intermolecular connections, it quickly found application in drug design. Zheng *et al.* have tested more than one hundred SuFEx-reactive compounds as HNE inhibitors [19]. Among them, benzene-1,2-disulfonyl fluoride showed the ability to inhibit HNE in micromolar range and was selected as the leading compound. Further structure modification including replacement of one sulfonyl fluoride group resulted in several more active compounds. All of them exhibited significant HNE selectivity over other proteases. In addition, molecular docking showed that benzene-1,2-disulfonyl fluoride formed a covalent bond with Ser195.

Depsipeptides

Lyngbyastatin 7 was first isolated from marine cyanobacteria. Its unique molecular architecture is characterized by a 19-membered cyclic depsipeptide core containing 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone (AHP). Luo *et al.* were the first to carry out total synthesis of lyngbyastatin 7 and investigated its effect on enzyme, cellular and transcriptional level [20]. Their studies have shown that lyngbyastatin 7 inhibits HNE with nanomolar range, mitigates the elastase-induced antiproliferative effect in normal BEAS-2B lung cells, as well as regulates the transcriptional level of IL-1 β , which can positively affect the control of inflammatory processes in various pulmonary diseases.

Conclusion

Neutrophil elastase is an enzyme involved in the pathogenesis of various inflammatory diseases. Recent findings provide extensive information about design and modern methods of synthesis, as well as the structure–activity relationship of new elastase inhibitors. Heterocyclic nitrogen compounds have proved to be a good scaffold for these compounds. In addition, molecular docking studies have shown that an amide or ester moiety facilitates interaction with the enzyme active site, significantly increasing drug activity. However, we still need to look for new solutions, which has already been partly achieved by designing boron-based drugs or sulfur-fluorine bond-containing compounds.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

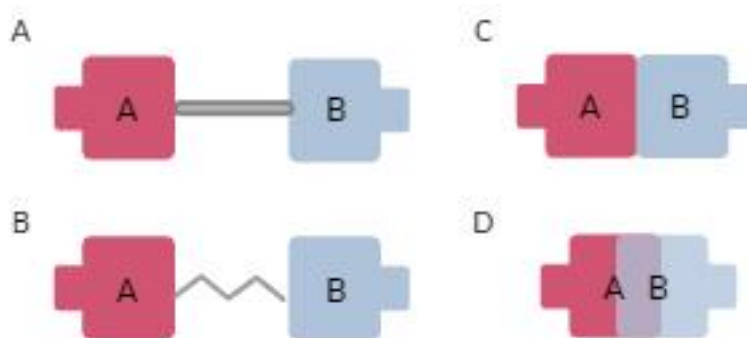
References

1. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 90(2), 227–242 (2008).
2. Craciun I, Fenner AM, Kerns RJ. *N*-Arylacetyl O-sulfonated aminoglycosides as novel inhibitors of human neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase 3. *Glycobiology* 26(7), 701–709 (2016).
3. Hasdemir B, Sacan O, Yasa H, Kucuk HB, Yusufoglu AS, Yanardag R. Synthesis and elastase inhibition activities of novel aryl, substituted aryl, and heteroaryl oxime ester derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 351(2), 1700269 (2018).
4. Ant6nio JPM, Gonçalves LM, Guedes RC, Moreira R, Gois PMP. Diazaborines as new inhibitors of human neutrophil elastase. *ACS Omega* 3(7), 7418–7423 (2018).
5. Crocetti L, Giovannoni MP, Schepetkin IA *et al.* Design, synthesis and evaluation of *N*-benzoylindazole derivatives and analogues as inhibitors of human neutrophil elastase. *Bioorg. Med. Chem.* 19(15), 4460–4472 (2011).
6. Crocetti L, Schepetkin IA, Cilibrizzi A *et al.* Optimization of *N*-benzoylindazole derivatives as inhibitors of human neutrophil elastase. *J. Med. Chem.* 56(15), 6259–6272 (2013).
7. Crocetti L, Schepetkin IA, Ciciani G *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of indole derivatives as deaza analogues of potent human neutrophil elastase inhibitors (HNE). *Drug Dev. Res.* 77(6), 285–299 (2016).
8. Crocetti L, Giovannoni MP, Schepetkin IA *et al.* 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine: a new scaffold for human neutrophil elastase (HNE) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 26(21), 5583–5595 (2018).
9. Giovannoni MP, Schepetkin IA, Crocetti L *et al.* Cinnoline derivatives as human neutrophil elastase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31(4), 628–639 (2016).
10. Vergelli C, Schepetkin IA, Crocetti L *et al.* Isoxazol-5(2*H*)-one: a new scaffold for potent human neutrophil elastase (HNE) inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32(1), 821–831 (2017).
11. Giovannoni MP, Crocetti L, Cantini N *et al.* New 3-unsubstituted isoxazolones as potent human neutrophil elastase inhibitors: synthesis and molecular dynamic simulation. *Drug Dev. Res.* 81(3), 338–349 (2020).
12. Crocetti L, Bartolucci G, Cilibrizzi A *et al.* Synthesis and analytical characterization of new thiazol-2-(3*H*)-ones as human neutrophil elastase (HNE) inhibitors. *Chem. Cent. J.* 11, 127 (2017).
13. Areias LRP, Ruivo EFP, Gonçalves LM *et al.* A unified approach toward the rational design of selective low nanomolar human neutrophil elastase inhibitors. *RSC Adv.* 5(64), 51717–51721 (2015).
14. Marto J, Ruvio E, Lucas SD *et al.* Starch nanocapsules containing a novel neutrophil elastase inhibitor with improved pharmaceutical performance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 127, 1–11 (2018).
15. Nunes A, Marto J, Gonçalves LM *et al.* Novel and modified neutrophil elastase inhibitor loaded in topical formulations for psoriasis management. *Pharmaceutics* 12(4), 358 (2020).
16. Butt ARS, Abbasi MA, Rehman A *et al.* Synthesis and structure-activity relationship of elastase inhibiting novel ethylated thiazole-triazole acetamide hybrids: mechanistic insights through kinetics and computational contemplations. *Bioorg. Chem.* 86, 197–209 (2019).
17. Dias MCF, Gularte TQ, Teixeira RR *et al.* Synthesis of 1,2,3-triazole derivatives of 4,4'-dihydroxybenzophenone and evaluation of their elastase inhibitory activity. *J. Braz. Chem. Soc.* 30(1), 97–107 (2019).
18. Lucas SD, Carrasco MP, Gonçalves LM *et al.* Discovery of C-shaped aurone human neutrophil elastase inhibitors. *Med. Chem. Commun.* 6(8), 1508–1512 (2015).
19. Zheng Q, Woehl JL, Kitamura S *et al.* SuFEx-enabled, agnostic discovery of covalent inhibitors of human neutrophil elastase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 116(38), 18808–18814 (2019).
20. Luo D, Chen Q-Y, Luesch H. Total synthesis of the potent marine-derived elastase inhibitor lyngbyastatin 7 and *in vitro* biological evaluation in model systems for pulmonary diseases. *J. Org. Chem.* 81(2), 532–544 (2016).

3. Hybrydyzacja molekularna w projektowaniu leków przeciwnowotworowych

Choroby nowotworowe stanowią globalny problem opieki zdrowotnej, pomimo znacznego postępu w terapiach onkologicznych, nadal są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Terapia z zastosowaniem tradycyjnych cytostatyków, z uwagi na brak selektywności leków ogranicza ich potencjał terapeutyczny. Coraz głębsze poznanie mechanizmów uczestniczących w patomechanizmie chorób nowotworowych pozwoliło na opracowanie związków zorientowanych na dany cel molekularny. Jednak w przypadku tak złożonych i wieloczynnikowych zaburzeń jak nowotwory, podejście zorientowane na pojedynczy cel molekularny jest niewystarczające. Wprowadzono skojarzoną terapię z wykorzystaniem kilku leków jednocześnie, co pozwoliło na uzyskanie lepszych efektów terapeutycznych w porównaniu z monoterapią [72]. Niestety zastosowanie terapii skojarzonej stwarza większe ryzyko działań niepożądanych, interakcji leków oraz zwiększonej lekooporności [73,74]. Dodatkowo należy zaznaczyć, że stosowanie kilku leków jednocześnie zwiększa znacząco koszty leczenia [75].

W tym aspekcie hybrydyzacja molekularna jest obiecującą strategią w poszukiwaniu nowych metod leczenia chorób nowotworowych. Koncepcja hybrydyzacji molekularnej zakłada racjonalne zaprojektowanie nowych cząsteczek hybrydowych składających się z dwóch lub więcej jednostek farmakoforowych lub związków działających na różne cele farmakologiczne [76]. W celu zaprojektowania nowych leków wykorzystać można cztery podstawowe techniki hybrydyzacji (**Rycina 7**).



Rycina 7. Techniki hybrydyzacji molekularnej

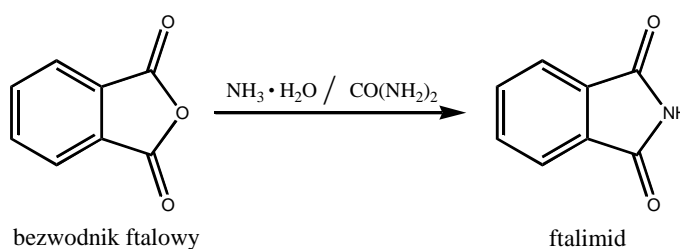
Połączenie jednostek farmakoforowych można przeprowadzić za pomocą linkera, w zależności od jego właściwości skutkuje to otrzymaniem nierozszczepialnych (**Rycina 7A**), bądź rozszczepialnych (**Rycina 7B**) leków hybrydowych. Nierozszczepialne

związki hybrydowe połączone są trwałymi wiązaniami, które umożliwiają utworzenie stabilnych chemicznie cząsteczek z zachowaniem ich aktywności biologicznej. W przypadku rozszczepialnych hybryd stosuje się linkery ulegające rozszczepieniu w warunkach fizjologicznych (np. wiązania estrowe), uwalniając dwa oddzielne związki o niezależnym działaniu. Kolejną techniką hybrydyzacji jest fuzja cząsteczek (**Rycina 7C**) poprzez kowalencyjne łączenie ich struktur. W reakcji kondensacji muszą uczestniczyć grupy funkcyjne z cząsteczek wyjściowych. Ostatnią techniką hybrydyzacji jest otrzymywanie nowych hybryd poprzez nakładanie się struktur farmakoforowych (**Rycina 7D**), docelowe hybrydy różnią się znacznie pod względem struktury w porównaniu z lekami, z których zostały zaprojektowane [77].

4. Wybrane układy farmakoforowe wykazujące aktywność przeciwnowotworową i hamującą elastazę neutrofilową

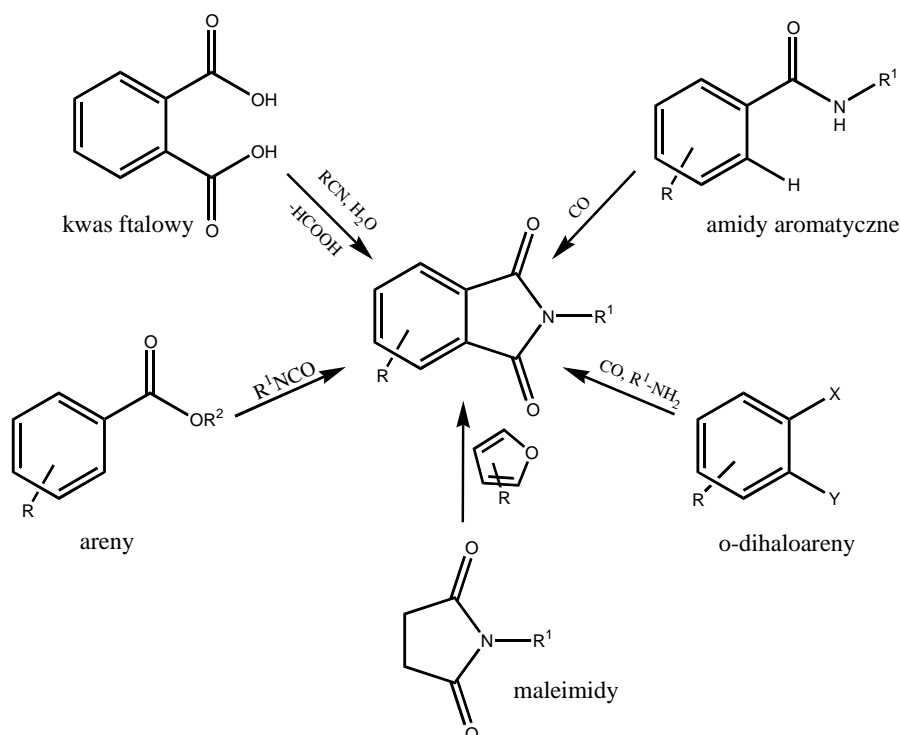
4.1. Ftalimid

Ftalimid jest pochodną kwasu ftalowego, należąca do grupy cyklicznych imidów czyli związków zawierających w strukturze dwie grupy karbonylowe połączone atomem azotu. Ugrupowanie to nadaje ftalimidowi kwasowy charakter, dzięki czemu łatwo oddaje proton i tworzy w środowisku wodnym rozpuszczalne sole z silnymi zasadami. Hydrofobowe właściwości pierścienia ftalimidowego umożliwiają łatwą penetrację błon biologicznych, co zapewnia większą biodostępność związków zawierających ten układ w strukturze. Tradycyjna synteza ftalimidu obejmuje reakcję bezwodnika ftalowego z wodnym roztworem amoniaku, bądź mocznika. (**Rycina 8**) [78].



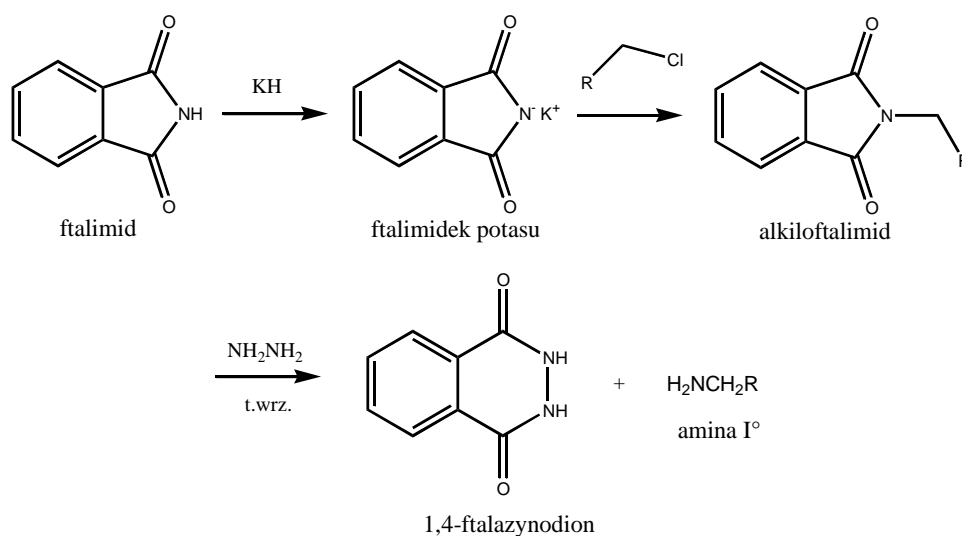
Rycina 8. Reakcja otrzymywania ftalimidu z bezwodnika ftalowego

Kolejnym przykładem metody otrzymywania ftalimidu jest reakcja Mathewsa, polegająca na hydrolizie nitryli przez kwas ftalowy lub amidów przez bezwodnik ftalowy, w rezultacie prowadząc do wydzielenia odpowiedniego kwasu karboksylowego i ftalimidu. Do innych reakcji umożliwiających otrzymanie pochodnych ftalimidu należą różne reakcje cyklizacji z udziałem pochodnych amidów aromatycznych lub o-dihaloarenów, izocyjanianu i arenów oraz maleimidów (**Rycina 9**) [78,79].



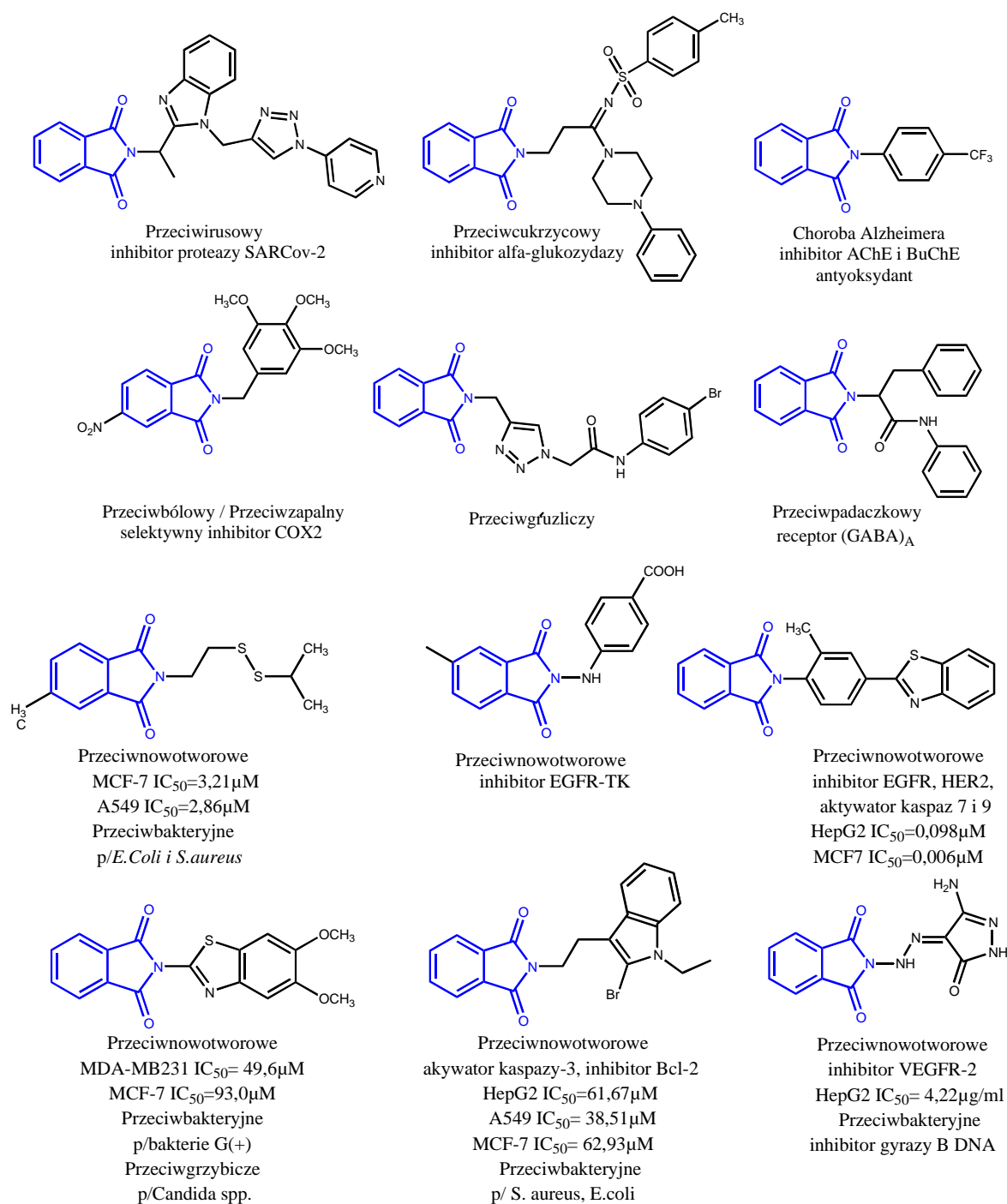
Rycina 9. Różne metody otrzymywania pochodnych ftalimidu

Charakterystyczną reakcją, w której uczestniczy ftalimid jest reakcja Gabriela (**Rycina 10**) [80], która jest wydajną metodą otrzymywania amin pierwszorzędowych. Reakcja przebiega w trzech etapach. Ftalimid poddaje się działaniu silnej zasady otrzymując ftalimidek potasu, który następnie ulega substytucji nukleofilowej z udziałem halogenku alkilowego. W wyniku tej reakcji otrzymuje się alkiloftalimid, poddając go reakcji z hydrazyną następuje wydzielenie aminy pierwszorzędowej.



Rycina 10. Reakcja Gabriela

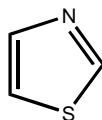
Ftalimid jest cennym farmakologicznie farmakoforem, a jego pochodne wykazują różnorodną aktywność biologiczną. Najbardziej znaną cząsteczką zawierającą w strukturze pierścień ftalimidowy jest talidomid. Jednak ugrupowanie to występuje także w związkach o działaniu przeciwdrgawkowym [81], przeciwbakteryjnym [82], przeciwwirusowym [83], przeciwgruźliczym [84], hipoglikemizującym [85], przeciwotępiennym [86], przeciwzapalnym [87] i przeciwnowotworowych [82,88-91] (**Rycina 11**).



Rycina 11. Pochodne ftalimidu o aktywności biologicznej

4.2. Tiazole

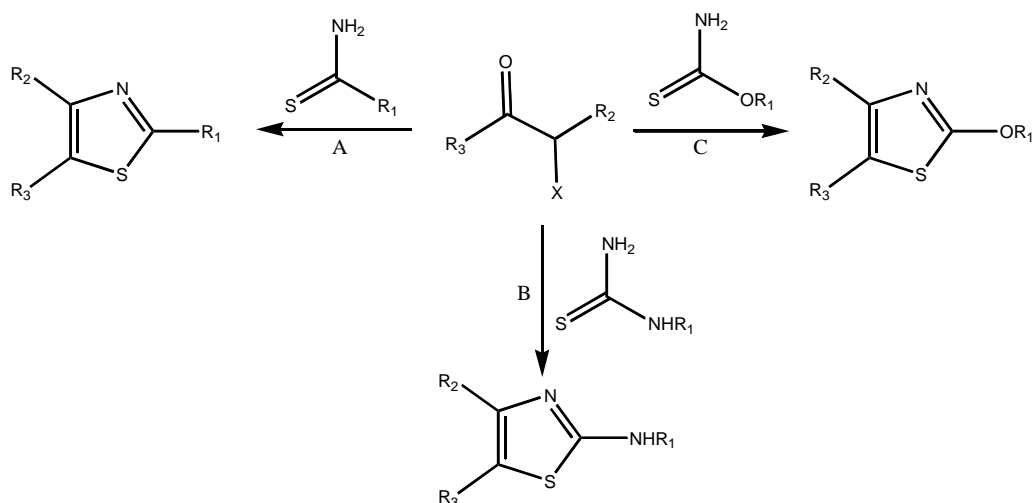
Tiazol (**Rycina 12**) jest pięciocłonowym, związkem organicznym zawierającym w pozycjach 1,3 pierścienia heterocyklicznego atomy azotu i siarki.



Rycina 12. Pierścień tiazolu

Pierścień tiazolu zawiera 6π elektronów ze zdelokalizowaną samotną parą elektronów na atomie siarki, co spełnia regułę Hückla. Dodatkowo heterocykliczny charakter układu tiazolu został potwierdzony spektroskopią ^1H NMR, gdzie przesunięcie chemiczne protonów znajduje się między 7,27 a 8,77 ppm. Wykazano, że podstawienie elektrofilowe w pierścieniu tiazolu zachodzi preferencyjnie w pozycji C5, a atak nukleofilowy w pozycji C2. Na reaktywność układu tiazolu wpływają wprowadzone podstawniki w pozycje C2, C4 i C5. Stwierdzono, że zasadowość cząsteczki silnie wzrasta gdy w pozycji C2 wprowadzona zostanie grupa elektro-donorowa (np. grupa metylowa). Odwrotny efekt daje wprowadzenie grupy odciągającej elektrony. Najsilniejszy spadek zasadowości i nukleofilowości obserwuje się poprzez wprowadzenie grupy nitrowej w pozycję 4 pierścienia tiazolu [92,93].

Zaprezentowano wiele metod syntezy tiazolu i jego pochodnych. Najbardziej popularną metodą jest synteza Hantzsch (**Rycina 13**) polegająca na reakcji związków α -halokarbonylowych z tioamidami, tiomocznikiem lub pochodnymi tiokarbaminianu. Mechanizm reakcji obejmuje nukleofilowy atak atomu siarki tioamidu na węgiel α -halokarbonyłu, co prowadzi do utworzenia związku pośredniego, ulegającego dehydratacji do odpowiedniego tiazolu [94].



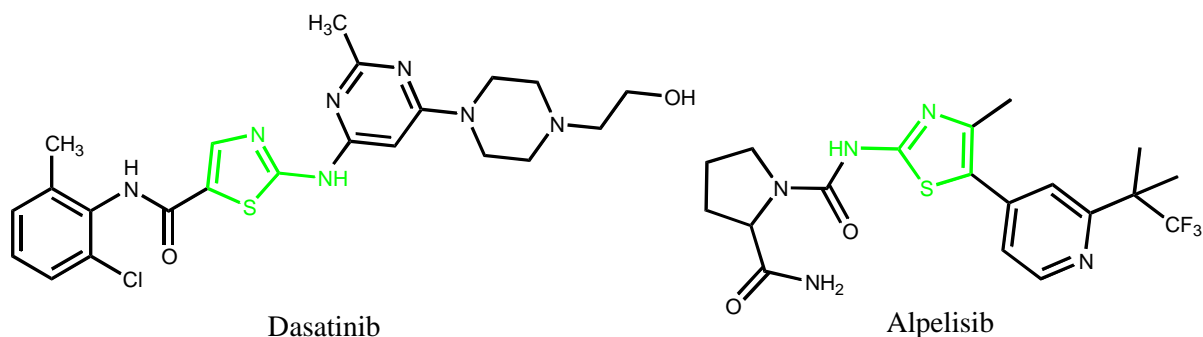
Rycina 13. Reakcja Hantzsch z użyciem tioamidu (A), *N*-podstawionej pochodnej mocznika (B), estru kwasu tiokarbaminowego (C)

Innymi przykładami powszechnie stosowanych syntez tiazolu są: reakcja Cooka-Heilbrona i Robinsona-Gabriela. Metoda odkryta przez Cooka i Heilbrona pozwala na otrzymanie 5-aminotiazoli poprzez reakcję α -aminonitryli lub α -aminoamidów z disiarczkiem węgla. Synteza Gabriela jest reakcją prowadzącą do utworzeniu pierścienia tiazolu poprzez reakcję acyloaminoketonu z pentasiarczkiem fosforu z wytworzeniem 2,5-dipodstawionych pochodnych [92,93].

Tiazol jest ważnym farmakoforem o wszechstronnym działaniu biologicznym. Ugrupowanie to występuje w ponad dwudziestu lekach zatwierdzonych przez FDA [95]. Należą do nich związki o działaniu przeciwbakteryjnym (cefotaxim, sulfatiazol), przeciwzapalnym (meloksikam), przeciwkrzepliwym (edoksaban), przeciwwirusowym (ritonavir), przeciw pasożytniczym (nitazoksanid), hipotensyjnym (timolol) oraz przeciw parkinsonowskim (pramipeksol). Tiazol stanowi także rusztowanie wielu cząsteczek o działaniu przeciwnowotworowym i antyangiogennym [96].

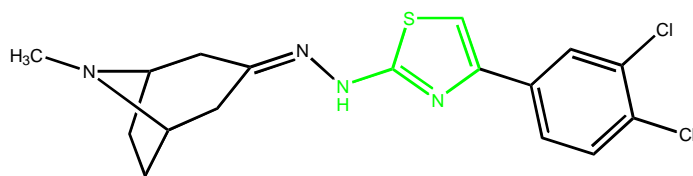
Szczególnie cennym ugrupowaniem o silnych właściwościach przeciwnowotworowych wśród pochodnych tiazolu jest struktura 2-aminotiazolu. Ugrupowanie to występuje w związkach przeciwnowotworowych zorientowanych na różne cele biologiczne tj. białko tubuliny, kinazę fosfatydyloinozytoli 3 (PI3K), kinazę Src/Abl czy kinazę receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Przykładami, związków ze strukturą 2-aminotiazolu zarejestrowanych przez FDA w terapiach onkologicznych (**Rycina 14**) są dasatinib [97] – wielocelowy inhibitor kinaz tyrozynowych z rodziny BCR-ABL i SRC, zaprojektowany do leczenia przewlekłej białaczki szpikowej oraz alpelisib [98] - inhibitor

kinazy PI3K, wykorzystywany w terapii zaawansowanego lub rozsialego raka piersi wykazującym ekspresję receptora hormonalnego i niewykazującym ekspresji ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 [99].



Rycina 14. Wybrane związki zatwierdzone przez FDA w terapii przeciwnowotworowej zawierające pierścień tiazolu

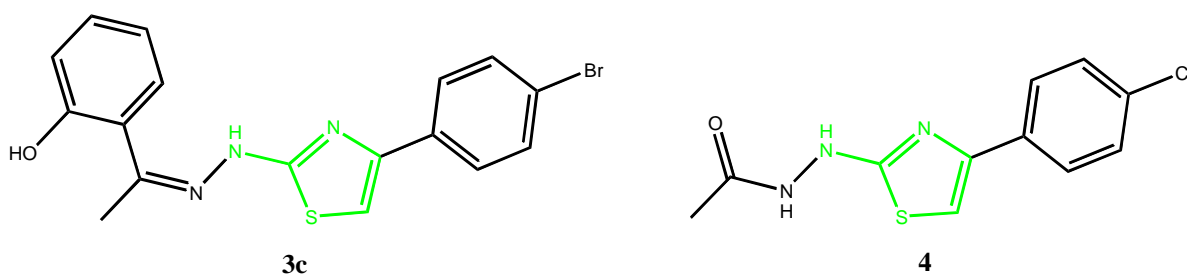
Piechowska i inni [100] zaprojektowali nowe pochodne 2-aminotiazolu z pierścieniem tropinonu wykazujące silną aktywność antyproliferacyjną wobec linii komórek nowotworowych raka płuc (A549), piersi (MCF-7), białaczki (MV4-11) oraz czerniaka (B16F10) z wartościami IC_{50} w zakresie 5,43-19,16 μ M. Pochodna **3g**, zawierająca podstawnik 3,4-dichlorofenyłowy (**Rycina 15**), dwukrotnie silniej niż referencyjna kamptotecyna aktywowała kaspazę 3/7 w komórkach A549, dodatkowo 22-krotnie silniej hamowała aktywność tyrozynazy w porównaniu do kwasu kojowego. Wyniki te sugerują, że ugrupowanie 2-aminotiazolu może stanowić cenne rusztowanie dla związków wykorzystywanych w terapii czerniaka.



Rycina 15. Związek **3g** przedstawiony przez Piechowską i innych [100]

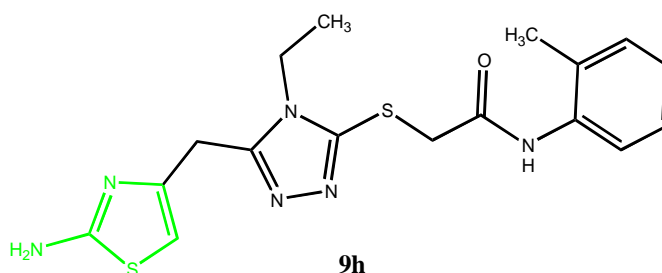
Salem i inni [101] przedstawili 4-podstawione pochodne 2-hydrazynylotiazolu o działaniu przeciwnowotworowym wobec komórek raka piersi. Zaprojektowane związki otrzymano w wyniku kilku etapowej reakcji, rozpoczynając od reakcji kondensacji odpowiedniego

acetofenonu z tiosemikarbazydem w obecności kwasowego katalizatora. Następnie otrzymane tiosemikarbazony poddano cyklizacji z 4-podstawionym bromkiem fenacylu uzyskując 4-podstawione-2-hydrazynylo-1,3-tiazole (**Rycina 16, związek 3c**). Wybrany związek poddano reakcji acetylowania bezwodnikiem octowym co spowodowało odłączenie grupy 1-(4-bromofenylo)etyloaminowej z wydzieleniem 2-[5-(4-chlorofenylo)-1,3-tiazolo-2-ylo]-1-acetohydrazyny (**Rycina 16, związek 4**). Spośród uzyskanych pochodnych najaktywniejszymi okazały się związki **3c** oraz **4** z IC_{50} wynoszącymi odpowiednio 13,66 μM i 5,73 μM wobec komórek raka piersi MCF-7 oraz 17,08 μM i 12,15 μM wobec komórek linii MDA-MB-231. Dodatkowo przedstawione pochodne wykazywały zdolność do inhibicji receptora czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego-2 (VEGFR-2), a związek **4** indukował zaprogramowaną śmierć komórki poprzez wywołanie apoptozy i nekrozy w komórkach MCF-7.



Rycina 16. Struktury najaktywniejszych związków **3c** i **4** otrzymanych przez Salema i innych [101]

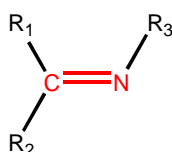
Niedawno przedstawiono nowe bi-heterocykliczne hybrydy acetamidowe zawierające w układzie pierścieni 2-aminotiazolu i 1,2,4-triazolu o działaniu inhibującym elastazę neutrofilową. Spośród otrzymanych związków kompetywnym inhibitorem elastazy okazał się związek **9h** (**Rycina 17**) zawierający w układzie pierścieni 2-metylofenylowy z IC_{50} wynoszącym 0,0094 μM [102].



Rycina 17. Związek **9h** otrzymany przez Butta i innych [102]

4.3. Zasady Schiffa

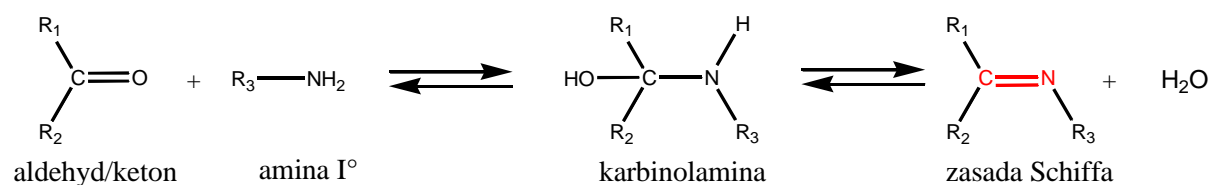
Zasady Schiffa powstają w wyniku kondensacji pierwszorzędowych amin ze związkami karbonylowymi i pierwszy raz zostały opisane przez niemieckiego naukowca Hugo Schiffa w 1864 roku. Obejmują one szeroką grupę związków, które strukturalnie należą do azotowych analogów aldehydów lub ketonów gdzie grupa karbonylowa została zastąpiona grupą iminową lub azometinową (**Rycina 18**) [103].



R₁,R₂ i/lub R₃=akryl/aryl

Rycina 18. Wzór ogólny zasad Schiffa

Mechanizm tworzenia zasad Schiffa (**Rycina 19**) opiera się na następujących po sobie reakcjach addycji i eliminacji. W pierwszym etapie azot aminowy z pierwszorzędowej aminy działa jak nukleofil, atakując elektrofilowy węgiel karbonylowy aldehydu lub ketonu, tworząc związek przejściowy – karbinolaminę. W kolejnym etapie następuje dehydratacja karbinolaminy, w wyniku której uwolniona zostaje cząsteczka wody i związek z podwójnym wiązaniem C=N [104,105].

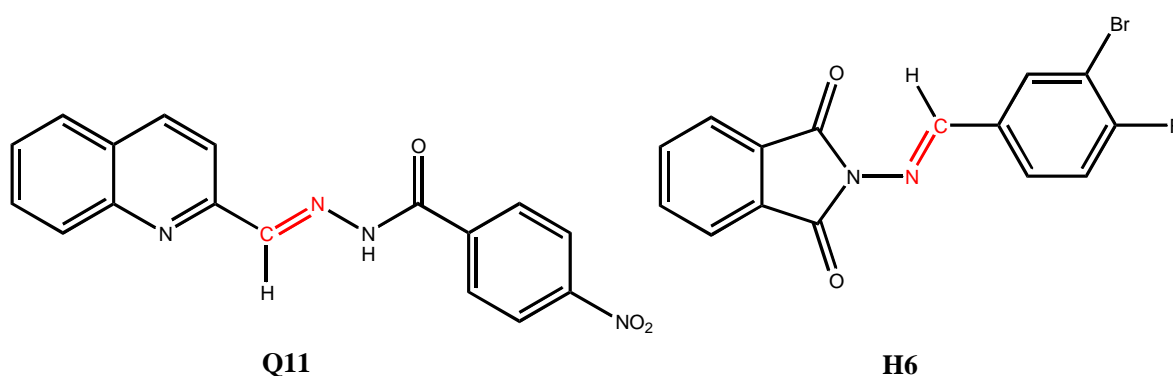


Rycina 19. Mechanizm tworzenia zasad Schiffa

Zasady Schiffa stanowią szeroką gamę związków o znaczeniu biologicznym. Układ ten występuje w substancjach o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym, przeciwdrobnoustrojowym, a także przeciwnowotworowym. Ostatnio Vanjare i inni [106] przedstawili pochodne chinoliny będące zasadami Schiffa, które wykazywały aktywność inhibującą elastazę neutrofilową. Najbardziej aktywna pochodna **Q11** (**Rycina 20**) zawierająca w strukturze podstawnik 4-aminofenyłowy (IC₅₀= 0,89 μM) hamowała

aktywność elastazy prawie 15-krotnie silniej niż związek referencyjny – kwas oleanolowy ($IC_{50} = 13,43 \mu M$).

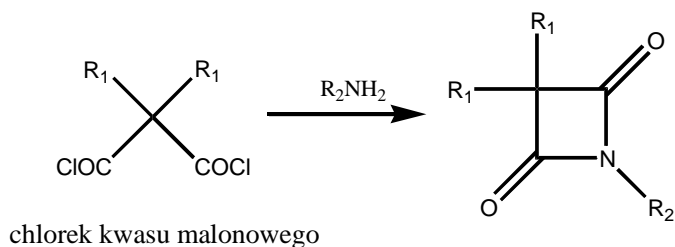
Nowe pochodne ftaimidu będące zasadami Schiffa zaprezentowali w swojej pracy Abdulrahman i inni [107]. Przedstawili oni syntezę nowych *N*-aminoftalimidów o aktywności antyoksydacyjnej i przeciwnowotworowej. Najaktywniejszą pochodną okazała się zasada Schiffa **H6 (Rycina 20)** zawierająca w układzie oprócz pierścienia ftalimidowego podstawnik 3-bromo-4-fluorofenyłowy. Pochodna ta wykazywała wysoką aktywność antyproliferacyjną wobec komórek raka jelita grubego (HT-29) i raka piersi (MCF-7) z IC_{50} odpowiednio $253,6 \mu M$ i $293 \mu M$.



Rycina 20. Związki zaprezentowane przez Vanjarea [106] i innych oraz przez Abdulragmana i innych [107]

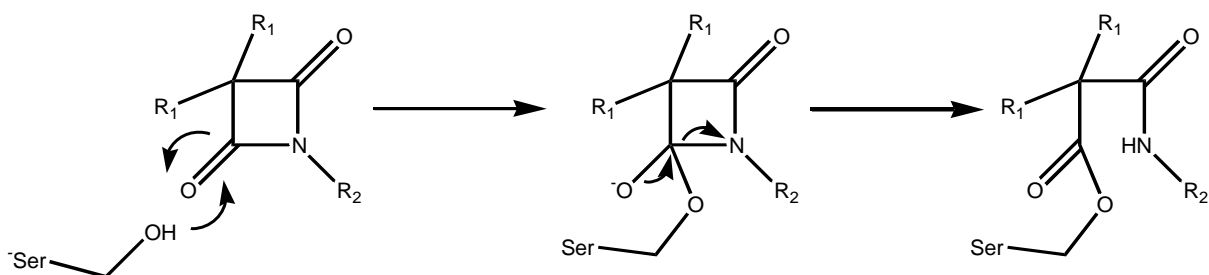
4.4. Układ azetydino-2,4-dionu

β -Laktamy, jako znane związki zdolne do acylacji enzymów zawierających w centrum katalicznym serynę, posłużyły jako układ bazowy dla związków wpływających na aktywność elastazy neutrofilowej. Uproszczenie struktury β -laktamów doprowadziło do uzyskania układu azetydino-2,4-dionu, którego pochodne okazały się silnymi inhibitorami HNE. W wyniku reakcji 2,2-dipodstawionych chlorków kwasu malonowego i amin Mulchande i inni [108,109] otrzymali serię pochodnych 4-okso- β -laktamów (**Rycina 21**) i wykazali, że na reaktywność pochodnych znaczący wpływ ma rodzaj podstawników wprowadzonych do układu.



Rycina 21. Reakcja otrzymywania pierścienia 4-okso- β -laktamu

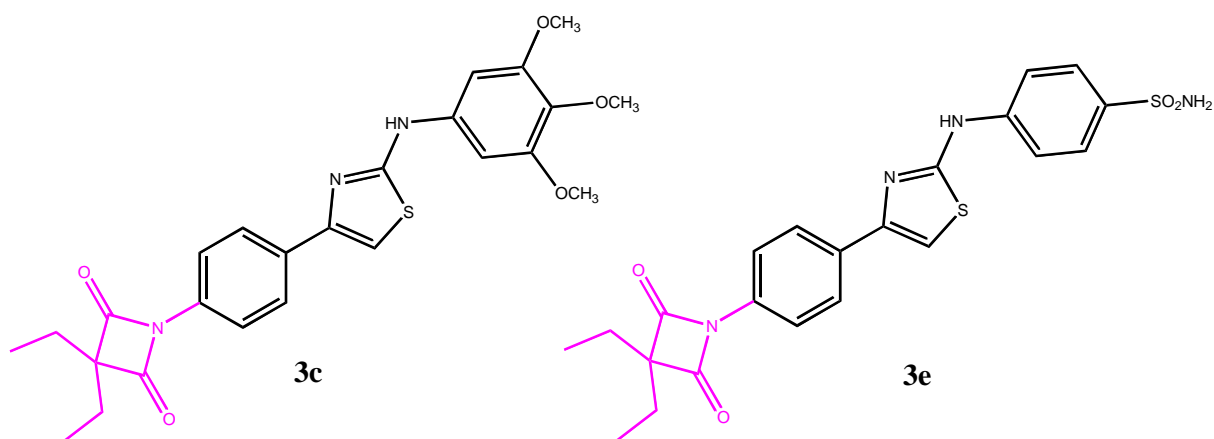
Najwyższą aktywność inhibującą elastazę uzyskały pochodne zawierające w pozycji C3 dwie grupy etylowe, które wiążą się z kieszeniami rozpoznającymi S1 PPE oraz HNE oraz w pozycji N1 pierścienie aromatyczne z podstawnikami odciągającymi elektrony, które zwiększają reaktywność węgla karbonylowego ukierunkowując go na atak nukleofilowy grupy hydroksylowej Ser-195 (**Rycina 22**).



Rycina 22. Mechanizm wiązania z miejscem aktywnym HNE układu 4-okso- β -laktamu

Ostatnio przedstawiliśmy nowe pochodne 2-aminotiazolu z ugrupowaniem 3,3-dietylazetydino-2,4-dionu o działaniu przeciwnowotworowym oraz inhibującym

elastazę neutrofilową. Najsilniejszymi inhibitorami elastazy okazały się pochodne **3c** i **3e** (Rycina 23) zawierające w układzie odpowiednio grupy trimetoksyfenylową i benzenosulfonamidową z wartościami IC_{50} odpowiednio 38,25 nM i 35,02 nM. Dodatkowo pochodne wykazywały silne działanie antyproliferacyjne wobec 4 linii komórek nowotworowych tj. MV-4-11, A549, MDA-MB-231 i UMUC-3 z wartościami IC_{50} w zakresie 4,59-7,49 μ M. Związki **3c** i **3e** indukowały również zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M oraz proces apoptozy poprzez aktywację kaspazy 3 w komórkach linii nowotworowej A549 [110].



Rycina 23. Struktury pochodnych **3c** i **3e** otrzymanych przez Donarską i innych [110]

III. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było zaprojektowanie i synteza nowych nieznanych dotąd w literaturze pochodnych talidomidu, potwierdzenie ich struktury chemicznej za pomocą metod spektroskopowych, ocena ich aktywności antyproliferacyjnej oraz zbadanie zdolności do hamowania elastazy i określenie mechanizmu inhibicji.

Powyższy cel zrealizowano w następujących etapach:

Projektowanie i synteza chemiczna

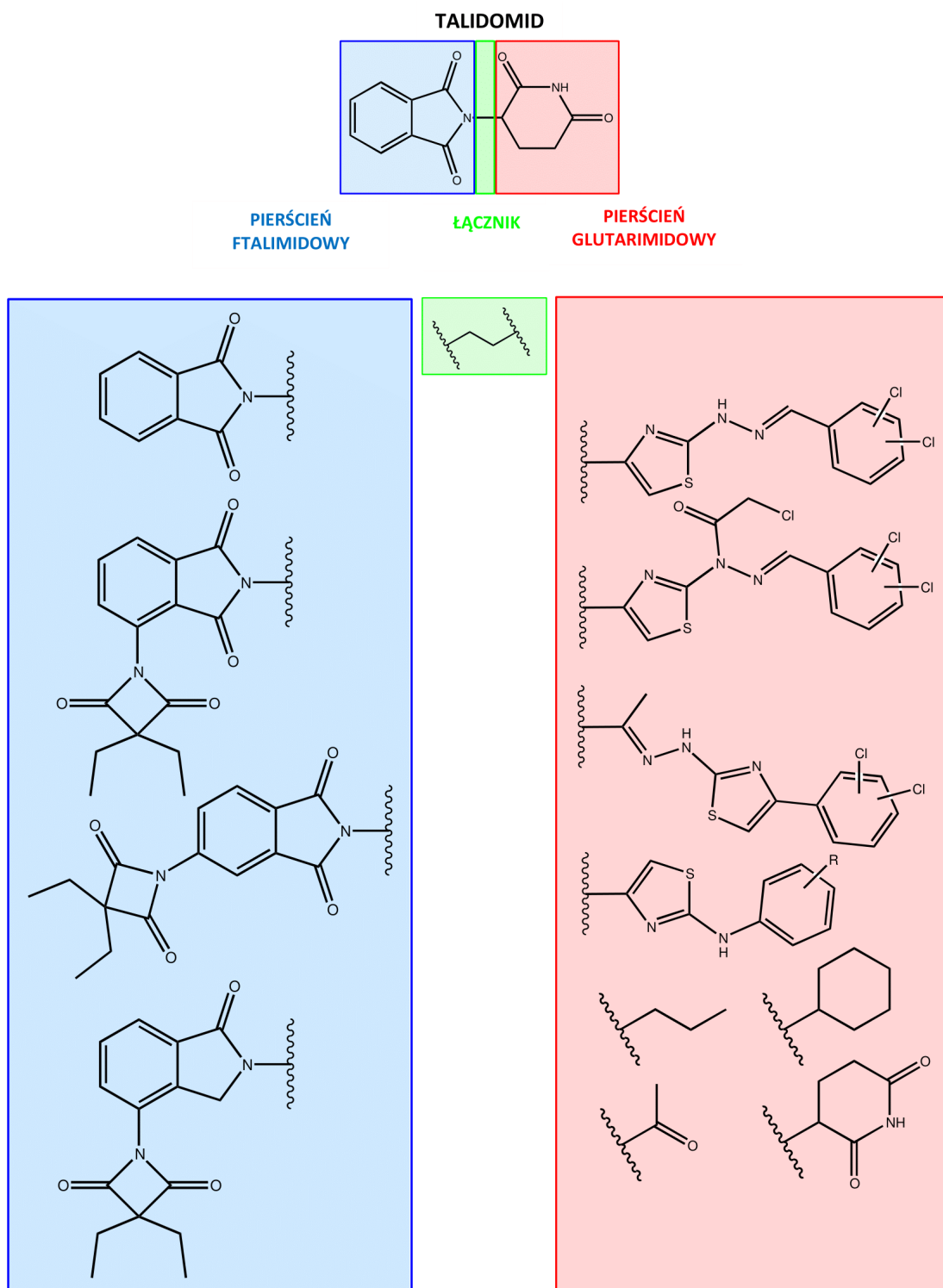
1. Korzystając z metody hybrydyzacji molekularnej zaprojektowano szereg nowych pochodnych talidomidu (**Rycina 24**) zawierających w swojej strukturze znane farmakofory, takie jak: pierścień ftalimidu i 2-aminotiazolu, wiązanie iminowe oraz ugrupowanie 3,3-dietyloazetydino-2,4-dionu. Obecny w większości cząsteczek podstawiony grupami elektrono-donorowymi i elektrono-akceptorowymi pierścień fenyłowy miał za zadanie modyfikowanie właściwości fizykochemicznych otrzymanych pochodnych.
2. Opracowanie wydajnej metody syntezy wyżej zaprojektowanych pochodnych oraz sposobu ich wydzielenia i oczyszczania.
3. Ocena czystości otrzymanych związków metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i potwierdzenie struktury otrzymanych związków za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości (HRMS).

Badania biologiczne

1. Ocena aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych związków wobec wybranych linii komórek nowotworowych.
2. Ocena toksyczności otrzymanych związków na prawidłowych liniach komórkowych.
3. Ocena aktywności inhibującej elastazę otrzymanych związków z użyciem metod spektroskopowych i fluorymetrycznych oraz określenie mechanizmu inhibicji elastazy przez badane związki.
4. Ocena stabilności chemicznej wybranych związków.

Obliczenia teoretyczne

1. Przy użyciu technik modelowania molekularnego ocena mechanizmu interakcji wybranych pochodnych z elastazą.
2. Zbadanie korelacji między obliczonymi energiami wiązania z elastazą, a eksperymentalnymi wartościami inhibicji.

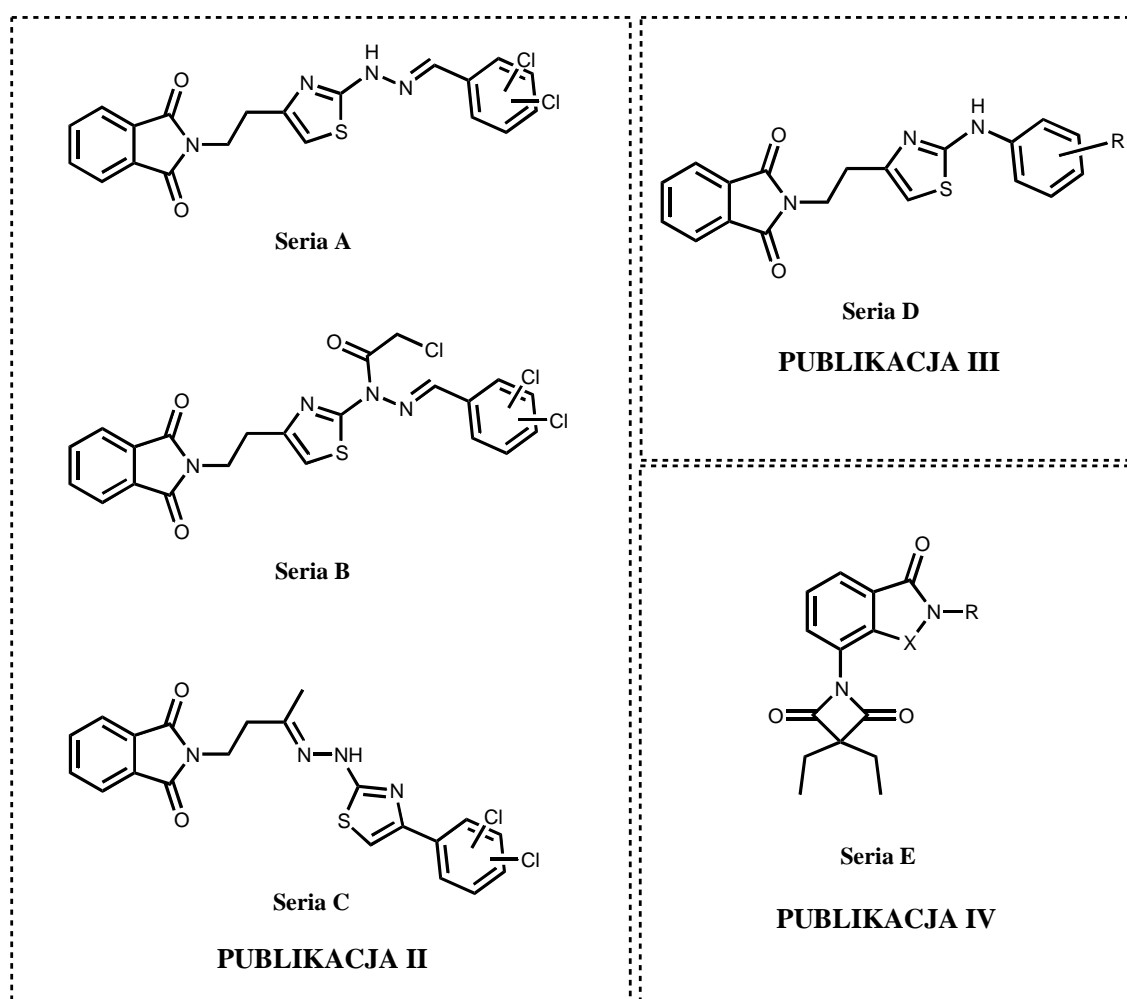


Rycina 24. Modyfikacja układu talidomidu

IV. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Projektowanie i synteza chemiczna

Badania rozpoczęto od dokładnego przeglądu literatury i wyboru potencjalnych farmakoforów, które należy wybrać aby cząsteczka wykazywała zarówno zdolność do inhibicji elastazy, jak i możliwie wysoką aktywność przeciwnowotworową. W tym celu postanowiono wybrać pierścień ftalimidu pochodzący ze struktury talidomidu, pierścień 2-aminotiazolu, ugrupowanie iminowe oraz układ azetydno-2,4-dionu, które znajdują się w lekach posiadających wymienione aktywności. Następnie korzystając z metody hybrydyzacji molekularnej zaprojektowano łącznie **5 serii (A-E)** nowych pochodnych talidomidu, których struktury przedstawia **Rycina 25**.



Rycina 25. Wzory ogólne związków przedstawionych w publikacjach II-IV

W celu modyfikacji właściwości elektronowych i geometrii cząsteczek rdzeń nowo zaprojektowanych związków modyfikowano za pomocą pierścienia fenyłowego, podstawionego różnymi grupami elektrono-donorowymi lub elektrono-akceptorowymi, pierścienia cykloheksyłowego, glutarimidowego, łańcucha *n*-propyłowego i oksobutyłowego oraz grupy acetamidowej. Jako linker łączący wybrane grupy farmakoforowe wykorzystano łańcuch etylenowy.

W celu otrzymania zaprojektowanych związków użyto znane w literaturze metody syntezy związków organicznych. Na szczególną uwagę zasługuje tutaj reakcja Hantzcha, która ze związków acyklicznych pozwala otrzymać podstawiony pierścień tiazolu. W celu otrzymania jak najlepszych wydajności badano również różne rozpuszczalniki, temperaturę oraz czas ogrzewania. Dokładna metodologia syntezy przedstawiona jest w cyklu trzech publikacji (**publikacje II-IV**) stanowiących podstawę niniejszej dysertacji. Czystość nowo zsyntezowanych związków oceniono za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), a struktury otrzymanych związków potwierdzono za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H i ¹³C NMR) oraz spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości (ESI-HRMS).

2. Metody badawcze

2.1. Badanie aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych pochodnych

Do oceny aktywności antyproliferacyjnej potencjalnych chemioterapeutyków stosuje się liczne testy *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich lub zwierzęcych linii komórkowych. Badania te stanowią ważny etap badań przedklinicznych w trakcie poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych. W celu oznaczenia aktywności antyproliferacyjnej stosuje się różne techniki pozwalające na pomiar zmian związanych z zaburzeniem procesów fizjologicznych badanych komórek w odpowiedzi na działanie danej substancji. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się techniki kolorymetryczne, fluorymetryczne czy bioluminescencyjne. Aktywność antyproliferacyjną danej substancji określa się poprzez wyznaczenie stężenia hamującego IC₅₀, przy którym wzrost i proliferacja komórek w hodowli zostają zahamowane w 50% w porównaniu z komórkami kontrolnymi [111].

W niniejszej pracy do oceny aktywności antyproliferacyjnej nowo zsyntezowanych związków zastosowano dwie kolorymetryczne metody. Pierwszą z nich jest test MTT,

w którym wykorzystuje się aktywność enzymu mitochondrialnego obecnego w żywych komórkach. Dehydrogenaza bursztynianowa przekształca rozpuszczalną sól tetrazolową (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy) w nierozpuszczalne kryształy formazanu, które następnie rozpuszczane są w roztworze DMSO, tworząc barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia mierzona jest metodą spektrofotometryczną przy długości fal w zakresie 490-570 nm. Stężenie formazanu jest wprost proporcjonalne do liczby żywych komórek obecnych w hodowli [112]. Drugim testem zastosowanym w niniejszej pracy jest test SRB, wykorzystujący zdolność anionowego barwnika - sulforodaminy B (SRB), do wiązania z zasadowymi aminokwasami białek komórkowych, które są utrwalane za pomocą kwasu trichlorooctowego. Następnie barwnik związany z białkami jest rozpuszczany w roztworze tris(hydroksymetylo)aminometanu (zasady Tris) i mierzony spektrofotometrycznie przy długości fal w zakresie 490-550 nm. Stężenie SRB jest wprost proporcjonalne do liczby żywych komórek [111]. Do oceny działania antyproliferacyjnego nowo otrzymanych pochodnych talidomidu wybrano następujące linie komórek nowotworowych:

- MV4-11 (ludzka bifenotypowa białaczka mielomonocytoza B),
- A549 (ludzki rak płuc),
- MCF-7 (ludzki rak piersi),
- MDA-MB-231 (ludzki gruczolakorak piersi),
- T47D (ludzki rak piersi),
- UMUC-3 (rak pęcherza moczowego),
- RPMI 8226 (szpiczak mnogi).

Toksyczność oceniono wobec normalnych ludzkich fibroblastów skóry (HSF) oraz mysich fibroblastów (BALB/3T3).

Dokładny opis przeprowadzonych eksperymentów zamieszczony jest w **publikacjach II-IV**.

2.2. Badanie aktywacji kaspazy 3/7

Kaspazy 3 i 7 należą do rodziny proteaz cysteinowo-asparaginianowych, które inicjują proces apoptozy w komórkach ssaków, prowadząc do degradacji białek komórkowych, poprzez przecinanie wiązań peptydowych na drodze nukleofilowego ataku cysteiny miejsca aktywnego enzymu na wiązanie peptydowe występujące po reszcie kwasu

asparaginowego. Wykazano, że niska aktywność kaspaz jest związana z rozwojem i progresją chorób nowotworowych [113].

W niniejszej pracy oceniono zdolność wybranych nowo zsyntezowanych związków do aktywacji kaspazy 3/7 w komórkach linii A549. Wykorzystano w tym celu metodę polegającą na zastosowaniu specyficznego substratu *N*-Acetylo-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometylokumaryny (Ac-DEVD-ACC) do reakcji enzymatycznej, w której niniejszy substrat ulega hydrolizie przez aktywną kaspazę 3/7, co powoduje uwolnienie fluorescencyjnej 7-amino-4-metylokumaryny (AMC), której poziom oznaczono metodą kolorymetryczną przy długości fal wzbudzenia i emisji wynoszących odpowiednio 360 nm i 460 nm.

Dokładny opis wykonania eksperymentu znajduje się w **publikacji II**.

2.3. Badanie aktywności hamującej kinazę tyrozynową EGFR

Receptory naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) to klasa receptorów kinaz tyrozynowych, których aktywność jest kluczowym mediatorem w szlakach sygnalizacji komórek. Nadekspresja EGFR związana jest z nadmierną proliferacją, różnicowaniem oraz inwazyjnością komórek nowotworowych. Hamowanie aktywności kinazy tyrozynowej EGFR jest obiecującą strategią terapeutyczną w leczeniu chorób nowotworowych, obecnie w terapii anti-EGFR stosuje się przeciwciała monoklonalne oraz drobnocząsteczkowe inhibitory kinazy tyrozynowej [114].

W niniejszej pracy aktywność inhibującą EGFR wybranych, nowo zsyntezowanych pochodnych talidomidu oceniono za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA), z wykorzystaniem zestawu Human EGFR (Full length) ELISA Kit (Invitrogen). Jako źródło enzymu posłużyła linia komórkowa raka płuc (A549).

Dokładny opis przeprowadzonego eksperymentu przedstawiono w **publikacji II**.

2.4. Badanie wpływu na apoptozę, nekrozę oraz progresję cyklu komórkowego

W odpowiedzi na działanie substancji cytotoksycznych/cytostatycznych komórki mogą zatrzymywać cykl życiowy bądź wchodzić na drogę programowanej śmierci komórki w procesie apoptozy, bądź ulegać śmierci poprzez nekrozę. Proces apoptozy jest zaprogramowany genetycznie i służy do eliminacji komórek zbędnych, bądź uszkodzonych. Cechą charakterystyczną komórek nowotworowych oprócz

niekontrolowanego wzrostu i angiogenezy jest zdolność do uniknięcia procesu apoptozy. Utrata kontroli apoptotycznej nad komórkami nowotworowymi pozwala zwiększyć ich inwazyjność, stymulować progresję i zdolność do przerzutów. Dlatego celowanie w procesy apoptozy, nekrozy i kontrola cyklu komórkowego są ważnymi cechami związków o działaniu przeciwnowotworowym [115].

Ocenę wpływu badanych związków na procesy apoptozy, nekrozy i progresję cyklu komórkowego przeprowadzono dla linii komórek nowotworowych ludzkiego raka piersi (T47D). W tym celu wykorzystano metodę sortowania komórek aktywowanego fluorescencją (FASC). Analizę ilościową apoptozy oraz nekrozy przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do apoptozy aneksyny V-fluoresceiny izotiocyjanianu (FITC)/jodu propidium (PI) (BD Biosciences, BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA). Analizę cyklu komórkowego przeprowadzono poprzez określenie zawartości DNA metodą barwienia PI.

Dokładny opis przeprowadzonego eksperymentu przedstawiono w **publikacji IV**.

2.5. Badanie aktywności inhibującej elastazę

Jak wynika ze wstępu elastaza neutrofilowa, enzym należący do grupy serynoproteaz, uczestniczący w warunkach fizjologicznych w odpowiedzi wrodzonej układu odpornościowego oraz w przebiegu reakcji zapalnej, bierze także udział w patogenezie licznych chorób charakteryzujących się przewlekłym stanem zapalnym. Wykazano, udział elastazy w patogenezie takich chorób nowotworowych, jak rak piersi czy płuc. Dlatego aktywność inhibująca elastazę neutrofilową stanowi ważną cechę związków o aktywności przeciwnowotworowej. W niniejszej pracy w celu określenia aktywności inhibującej elastazę, wykorzystano techniki spektrofotometryczne i fluorymetryczne, z wykorzystaniem świńskiej elastazy trzustkowej (PPE) i ludzkiej neutrofilowej elastazy (HNE).

2.5.1. Badanie aktywności inhibującej elastazę trzustkową z zastosowaniem metody UV-Vis

W celu określenia zdolności nowo zsyntezowanych związków do hamowania aktywności świńskiej elastazy trzustkowej zastosowano metodę wykorzystującą reakcję, w której elastaza rozszczepia specyficzny substrat *N*-succinylo-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilid, w wyniku czego uwolniony zostaje barwny związek *p*-nitroanilid, którego stężenie można

monitorować spektrofotometrycznie przy długości fali 410 nm [116]. Aktywność badanych związków oceniono w odniesieniu do aktywności inhibitora referencyjnego – kwasu oleanolowego, poprzez porównanie wyznaczonych wartości IC_{50} – czyli stężenia badanego związku niezbędnego do 50 % inhibicji aktywności enzymu. Badanie przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla każdego związku. Na podstawie uzyskanych średnich wartości absorbancji próby badanej i próby kontrolnej wyznaczono odpowiednie procenty inhibicji, które następnie posłużyły do wyznaczenia wartości IC_{50} badanych związków.

Dokładny opis przeprowadzonego eksperymentu przedstawiono w **publikacji II**.

2.5.2. Badanie aktywności inhibującej ludzką elastazę neutrofilową z zastosowaniem metody fluorescencyjnej

W celu określenia zdolności nowo zsyntezowanych związków do hamowania aktywności ludzkiej neutrofilowej elastazy (HNE) zastosowano metodę spektrofluorymetrycznego pomiaru z wykorzystaniem *N*-metoksysukcinylo-Ala-Ala-Pro-Val-7-amido-4-metylokumaryny (MOSuc-AAPV-AMC), jako specyficznego substratu elastazy [117]. W wyniku aktywności enzymu następuje uwolnienie 7-amino-4-metylokumaryny (AMC) - fluoroforu, który może zostać oznaczony z wykorzystaniem fluorescencji w zakresie długości fal wzbudzenia i emisji odpowiednio 380nm i 440nm. Pomiar intensywności fluorescencji, oznaczone jako jednostki względnej fluorescencji (RFU), wykonano w minimum trzech powtórzeniach dla każdego stężenia związku. Za 100% intensywności fluorescencji przyjęto intensywność fluorescencji zmierzoną dla próby kontrolnej, którą następnie wykorzystano do wyznaczenia procentu inhibicji aktywności HNE przez badane związki. Wyniki przedstawiono jako wartość IC_{50} .

Dokładny opis przeprowadzonego eksperymentu przedstawiono w **publikacjach III i IV**.

2.6. Badanie kinetyki reakcji inhibicji elastazy przez wybrane związki

Dla wybranych pochodnych, charakteryzujących się wysoką aktywnością wobec elastazy trzustkowej i neutrofilowej scharakteryzowano kinetykę reakcji inhibicji. W tym celu wykorzystano metody spektrofotometryczne i spektrofluorymetryczne z użyciem substratów przywołanych w punkcie 2.5. Otrzymane wyniki wykorzystano do utworzenia wykresów Lineweaver'a-Burk'a – zależności odwrotności szybkości reakcji do odwrotności stężenia substratu ($1/V$ vs $1/[S]$). Uzyskane wyniki umożliwiły wyznaczenie wartości K_m i V_{max} oraz określenia mechanizmu inhibicji [102,118].

Dokładny opis przeprowadzonego eksperymentu przedstawiono w **publikacjach II-IV**.

2.7. Badanie stabilności chemicznej otrzymanych związków

Stabilność chemiczna nowych substancji jest kluczowym parametrem decydującym o skuteczności i bezpieczeństwie potencjalnych leków. Dlatego dla wybranych pochodnych przeprowadzono badania stabilności chemicznej w wodnym buforze fosforanowym o pH 7.3, symulującym warunki fizjologiczne. Badanie przeprowadzono zgodnie z wcześniej przedstawioną metodą [119] z zastosowaniem pomiaru spektrofotometrycznego. Pomiary absorbancji (A_t) przy wyznaczonych, charakterystycznych maksimach absorpcji dla badanych związków posłużyły do sporządzenia wykresu zależności $\log(A_t - A_{\infty})$ od czasu, który posłużył do wyznaczenia wartości stałej k' , co pozwoliło na obliczenie czasu połowicznego rozkładu ($t_{1/2}$) badanych substancji.

Dokładny opis przeprowadzonego badania przedstawiono w **publikacjach III i IV**.

2.8. Dokowanie molekularne

W celu przeprowadzenia dokowania molekularnego wykorzystano oprogramowanie Avogadro do przygotowania cząsteczek ligandów, które zoptymalizowano w polu siłowy UFF. Zoptymalizowane ligandy zadokowano w kieszeniach wiążących 5 różnych struktur białkowych elastazy z zastosowaniem programu Autodock.

Dokładny opis przeprowadzonego badania przedstawiono w **publikacjach II-IV**.

V. OPIS PRZEPROWADZONYCH BADAŃ I DYSKUSJA UZYSKANYCH WYNIKÓW – CYKL PUBLIKACJI

Przed rozpoczęciem badań eksperymentalnych dokonano przeglądu aktualnej literatury dotyczącej nowych inhibitorów elastazy i ich aktywności biologicznej. Efektem tego było przygotowanie artykułu przeglądowego w recenzowanym czasopiśmie naukowym, który stanowi pierwszą z cyklu publikacji wchodzących w skład niniejszej dysertacji, stanowiąc teoretyczne uzupełnienie przeprowadzonych badań. **Publikacja I** pt. „*Recent advances in the development of elastase inhibitors*” została zaprezentowana w rozdziale 2.3.

Badania eksperymentalne będące tematem niniejszej pracy doktorskiej zostały przedstawione i omówione w **cyklu trzech publikacji II-IV** opublikowanych w latach 2021-2023.

1. Publikacja II: Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives. Rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study

Bioorganic Chemistry 110 (2021) 104819



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioorg



Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives. Rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study

Beata Donarska^a, Marta Świtalska^b, Wojciech Płaziński^c, Joanna Wietrzyk^b, Krzysztof Z. Łączkowski^{a,*}

^a Department of Chemical Technology and Pharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Juraska 2, 85-089 Bydgoszcz, Poland

^b Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, Poland

^c Jerzy Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry, Polish Academy of Sciences, Niezapominajek 8, 30-239 Cracow, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Antiproliferative activity
Caspase
Elastase
Epidermal growth factor receptor
Molecular modeling
Phthalimide
Thiazole

ABSTRACT

Phthalimide derivatives are a promising group of anticancer drugs, while aminothiazoles have great potential as elastase inhibitors. In these context fourteen phthalimido-thiazoles containing a dichloro-substituted phenyl ring with high antiproliferative activity against various cancer cell lines were designed and synthesized. Among the screened derivatives, compounds **5a-5e** and **6a-6f** showed high activity against human leukemia (MV4-11) cells with IC₅₀ values in the range of 5.56–16.10 μM. The phthalimide-thiazoles **5a**, **5b** and **5d** showed the highest selectivity index (SI) relative to MV4-11 with 11.92, 10.80 and 8.21 values, respectively. The antiproliferative activity of compounds **5e**, **5f** and **6e**, **6f** against human lung carcinoma (A549) cells is also very high, with IC₅₀ values in the range of 6.69–10.41 μM. Lead compounds **6e** and **6f** showed elastase inhibition effect, with IC₅₀ values about 32 μM with mixed mechanism of action. The molecular modeling studies showed that the binding energies calculated for all set of compounds are strongly correlated with the experimentally determined values of IC₅₀. The lead compound **6e** also increases almost 16 times caspase 3/7 activity in A549 cells compared to control. We have also demonstrated that compound **6f** reduced EGFR tyrosine kinase levels in A549 cells by approximately 31%. These results clearly suggest that 3,4-dichloro-derivative **6e** and 3,5-dichloro-derivative **6f** could constitute lead dual-targeted anticancer drug candidates.

1. Introduction

Among the many diseases that plague humanity, cancer causes the greatest anxiety in humans. Unfortunately, this is a fully justified concern because the incidence of cancer increased to 18.1 million, and the number of deaths reached 9.6 million in 2019. It is estimated that currently the number of people living within 5 years of being diagnosed with cancer, known as the five-year prevalence, is 43.8 million. Lung, female breast and colorectal cancers are the three most common types of cancer and also have the highest mortality: lung cancer ranks first in terms of mortality in both men and women (18.4%) followed by colorectal cancer (9.2%), and breast cancer ranks fifth (6.6%) [1]. Development of targeted cancer therapies requires identification of potential

targets that play a key role in cancer cell growth and survival [2]. Currently, the concept of anticancer drugs based on a single molecular target is increasingly being abandoned due to the complexity of these diseases. Interestingly, drugs acting on multiple molecular targets may have a safer profile and better pharmacokinetics compared to drugs acting on one molecular target [3–7]. One of such molecular targets may be neutrophil elastase, which is secreted by a cancer cell to disintegrate the matrix protein, facilitating the breast cancer cells invasion and metastasis [8]. In addition, increased levels of elastase in patients with breast cancer have been shown to cause disease recurrence and also lead to death [9]. Recently, neutrophil elastase has been shown to directly induce cancer cell proliferation in A549 human lung adenocarcinoma cells, while increased activity of neutrophil elastase in leukemia MV4-11

* Corresponding author.

E-mail address: krzysztof.laczkowski@cm.umk.pl (K.Z. Łączkowski).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104819>

Received 3 July 2020; Received in revised form 20 February 2021; Accepted 6 March 2021

Available online 10 March 2021

0045-2068/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

cancer cells enhances their proliferation potential [10,11]. Several mechanisms have now been proposed that explain the pro-carcinogenic activity of neutrophil elastase. It has been found that neutrophil elastase can directly stimulate proliferative pathways by extracellular trans-activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) [12]. EGFR is associated with the pathogenesis of many types of cancers including lung, breast, and colorectal cancers. Overexpression of EGFR is associated with excessive proliferation, differentiation, invasiveness or reduced survival in a variety of cancers. It has also been shown that EGFR is a direct substrate for active caspase-3, and that EGFR down-regulation by caspase leads to cell death [13,14].

Taking advantage of the fact that the elastase, caspase and EGFR pathways can be interrelated, and bearing in mind that these enzymes are potential molecular targets in the treatment of cancer, we decided to design multi-targeted anticancer drugs that will interact at least with two enzymes simultaneously. To the best of our knowledge, this approach is not known in the literature.

In order to achieve this, we decided to use appropriate structural elements responsible for the required properties and combine them into hybrids [15–21], and next modulate them appropriately to create multi-targeted molecules with expected biological properties. Thiazole scaffold is currently a widely studied system used in the design of multi-targeted anticancer drugs [22]. Our previous research revealed that the presence of thiazole ring combined with 3,4-dichlorophenyl group in drug molecule results in high activity against leukemia MV4-11 and human breast carcinoma MCF-7 cells, with IC_{50} 3.56 and 7.59 μ M, respectively [23]. Our other studies have shown that thiazole derivative (I) containing 2,4-dichlorophenyl substituent also possessed high activity towards human breast carcinoma MCF-7, and mouse skin melanoma B16-F10 cells with IC_{50} 7.05 and 5.48 μ M, respectively [24]. Another study has also shown that the combination of a thiazole ring with 2,4-dichlorophenyl moiety resulted in molecule with high activity against K562 cancer cell line with IC_{50} 5.48 μ M [25]. Also thiazole-based chalcones (II) containing a 2,4-dichlorophenyl group were also active against A549 and MCF-7 cancer cells with IC_{50} 17.29 and 26.34 μ M, respectively [26].

Another system that we decided to use in the design of our drugs is phthalimide moiety. One of the best known drugs containing the phthalimide system is Thalidomide, which was used in pregnant women to relieve the symptoms of morning sickness, but after discovering its teratogenic properties, it was immediately withdrawn from the market [27,28]. However, further clinical studies have shown that thalidomide shows anti-angiogenic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties, which have been successfully used in the treatment of multiple myeloma (MM) [29]. Recent studies show that phthalimide derivatives are a promising group of anticancer drugs [30,31], and can also be used as proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) as a strategy for the degradation instead of inhibition of the anticancer targets, for example oncogenic PI3K [32]. Recently has been shown that phthalimide derivatives (III) containing 4-chlorophenyl ring have promising activity against the aggressive human glioblastoma SF295 cell line with IC_{50} 58.7 μ M [33]. Chloroacetamides, otherwise known as the warhead, are a very important class of drugs that by forming a permanent covalent bond mainly with cysteine, improve the drug's binding ability as well as its selectivity [34]. In cancer therapies, covalent inhibitors are much better than reversible inhibitors due to the high probability of cancer cell resistance to the latter [35]. Recently, have been developed a chloroacetamide derivatives (IV) containing a 4-chlorophenyl ring which proved to be very active against colon HCT116 cancer cell with GI_{50} 1.2 μ M, and highly selective EGFR inhibitors containing both chloroacetamide and 3,4-dichlorophenyl groups (V) with IC_{50} 0.07 nM [36,37]. Particularly noteworthy here are the received cyclic chloroacetamide derivatives (chloro- β -lactams) containing the 3-chlorophenyl group (VI), with very high activity against human breast carcinoma MCF-7 with IC_{50} 0.091 μ M [38].

Considering the above-mentioned findings, we decided to receive

three series of compounds containing the thiazole system, phthalimide ring and chloroacetamide group, respectively. Additionally, we decided to thoroughly investigate the effect of dichloro-substitution on anti-proliferative activity, as well as the ability to inhibit specific molecular targets. To the best of our knowledge, no such comprehensive research has been carried out so far (Fig. 1).

In our investigations, phthalimide-thiazoles were tested for their antiproliferative activity against three human cancer cells lines (biphenotypic B myelomonocytic leukemia MV4-11, human lung carcinoma A549, and human breast carcinoma MCF-7), while their cytotoxicity was tested using normal mouse fibroblast (BALB/3T3). To carry out these tests, the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) or sulforhodamine B (SRB) assays were used. To verify our hypothesis and recognize the possible mechanism of action of these drugs as accurately as possible, we tested elastase inhibitory potential using *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide as substrate, then activation of caspase 3/7 in A549 cancer cells using Ac-DEVD-ACC as substrate, and consequently the inhibition of EGFR tyrosine kinase in A549 cancer cells. Finally, in order to carry out comprehensive studies, we determined the energy of binding of our compounds to the active site of five different elastase structures by using molecular docking study.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

For more details, see Supplementary material.

2.1.1. 2-(3-Oxobutyl)phthalimide (2)

3-Buten-2-one (7.0 gm, 100.0 mmol) was added to a stirred solution of phthalimide (1) (14.70 gm, 100.0 mmol) in ethyl acetate (100 ml) and then sodium ethoxide (0.27 gm) in absolute ethyl alcohol (25 ml) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hrs, and next under reflux until a clear solution was obtained. Heating was continued for additional 2 hrs, next solvent was evaporated and the crude product was crystallized from ethyl alcohol to yield (18.0 gm, 83%); m.p. 108–110 °C [39,40]; eluent: dichloromethane/methanol (95:5); R_f = 0.55. 1H NMR (700 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 2.12 (s, 3H, CH₃); 2.84 (t, 2H, CH₂, J = 7.2 Hz); 3.76 (t, 2H, CH₂, J = 7.4 Hz); 7.81–7.87 (m, 4H, 4Ar-H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 30.11 (C–H); 33.04 (C–H); 41.29 (C–H); 123.35 (2C); 132.02 (2C); 134.74 (2C); 168.05 (2C = O); 206.77 (C=O).

2.1.2. 2-(4-Bromo-3-oxobutyl)phthalimide (3)

4-*N*-Phthalimido-2-butanone (2) (7.0 gm, 32.23 mmol) was dissolved in methanol (100 ml). A solution of bromine (1.65 ml, 32.23 mmol) was added dropwise over 30 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 hrs. The separate precipitate was collected by filtration and dried in vacuum to yield (8.33 gm, 87%); m.p. 115–116 °C [39,40]; eluent: dichloromethane/methanol (95:5); R_f = 0.84. 1H NMR (700 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 3.00 (t, 2H, CH₂, J = 7.1 Hz); 3.82 (t, 2H, CH₂, J = 7.1 Hz); 4.37 (s, 2H, CH₂); 7.81–7.89 (m, 4H, 4Ar-H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 33.06 (C–H); 37.09 (C–H); 37.88 (C–H); 123.38 (2C); 132.04 (2C); 134.75 (2C); 168.04 (2C = O); 200.09 (C=O).

2.1.3. 2-(4-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)butan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide (4)

4-*N*-Phthalimido-2-butanone (2) (0.434 gm, 2.0 mmol) was added to stirred solution of thiosemicarbazide (0.182 gm, 2.0 mmol) in absolute ethyl alcohol (15 ml). Then five drops of glacial acetic acid were added. The reaction mixture was stirred under reflux for 20 hrs. The separate precipitate was collected by filtration, recrystallized from ethyl alcohol and dried in vacuum to yield (0.53 gm, 92%); m.p. 205–206 °C; eluent: dichloromethane/methanol (95:5); R_f = 0.41. 1H NMR (700 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.92 (s, 3H, CH₃); 2.59 (t, 2H, CH₂, J = 7.0 Hz); 3.84

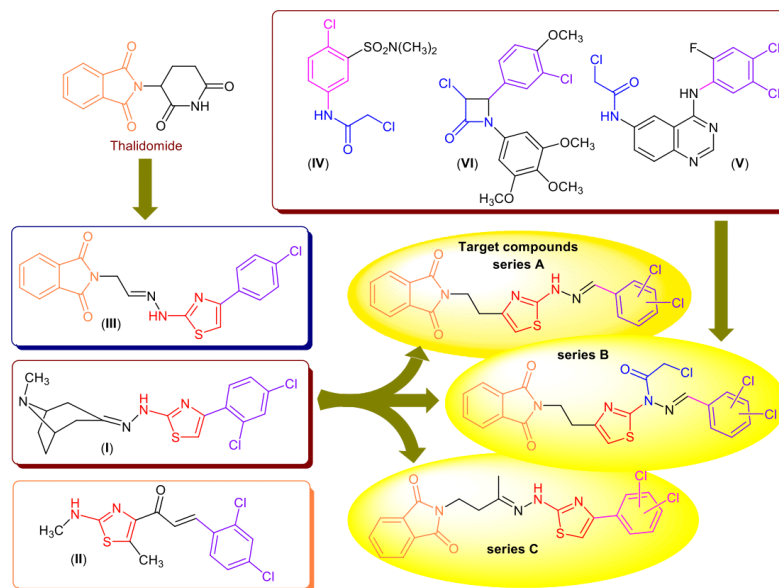


Fig. 1. General strategy for the design of the phthalimide-thiazoles.

(t, 2H, CH₂, *J* = 6.8 Hz); 7.47 (s, 1H, NH); 7.79–7.87 (m, 4H, 4Ar-H); 8.02 (s, 1H, NH₂); 9.93 (s, 1H, NH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 17.24 (C–H); 34.61 (C–H); 36.69 (C–H); 123.41 (2C); 131.93 (2C); 134.84 (2C); 151.59 (C); 168.34 (2C=O); 178.97 (C=S).

2.1.4. 2-(2-(2-(2-(2,3-Dichlorobenzylidene)hydrazinyl)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (5a). Typical procedure

2-(4-Bromo-3-oxobutyl)phthalimide (**3**) (0.296 gm, 1.0 mmol) was added to stirred solution of 2-(2,3-dichlorobenzylidene)-hydrazine-1-carbothioamide (0.248 gm, 1.0 mmol) in absolute ethyl alcohol (25 ml). The reaction mixture was stirred under reflux for 20 hrs. The separate precipitate was collected by filtration, recrystallized from ethyl alcohol and dried in vacuum to yield (0.32 gm, 71%); m.p. 224–226 °C; eluent: dichloromethane/methanol (95:5); *R*_f = 0.60. ¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 2.89 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.2 Hz); 3.87 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.2 Hz); 6.65 (s, 1H, CH_{thiazole}); 7.44 (t, 1H, Ar-H, *J* = 8.0 Hz); 7.67 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.0 Hz); 7.81–7.89 (m, 5H, 5Ar-H); 8.41 (s, 1H, CH=N); 12.23 (bs, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 29.21 (C–H); 37.16 (C–H); 106.07 (C_{thiazole}); 123.51 (2C); 125.66 (C); 128.90 (C); 131.04 (C); 131.78 (C); 132.03 (2C); 132.91 (C); 133.95 (C); 134.87 (2C); 140.69 (C); 145.11 (C); 168.03 (C); 168.13 (2C=O). LC-ESI-HRMS (*m/z*) calculated for C₂₀H₁₅Cl₂N₄O₂S: 445.0293 [M+H]⁺. Found: 445.0287 [M+H]⁺.

2.1.5. 2-(2-(2-(2-(2,4-Dichlorobenzylidene)hydrazinyl)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (5b)

Yield: (0.37 gm, 83%), (dichloromethane/methanol (95:5), *R*_f = 0.48); m.p. 223–225 °C. ¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 2.87 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.0 Hz); 3.86 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.0 Hz); 6.65 (s, 1H, CH_{thiazole}); 7.49 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.5 Hz); 7.69 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2.1 Hz); 7.81–7.84 (m, 2H, 2Ar-H); 7.84–7.87 (m, 2H, 2Ar-H); 7.88 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8.5 Hz); 8.35 (s, 1H, CH=N); 12.48 (bs, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 29.00 (C–H); 37.10 (C–H); 106.12 (C_{thiazole}); 123.52 (2C); 128.31 (C); 128.47 (C); 129.91 (C); 130.49 (C);

132.02 (2C); 133.97 (C); 134.89 (2C); 135.49 (C); 140.44 (C); 144.41 (C); 168.04 (C); 168.13 (2C=O). LC-ESI-HRMS (*m/z*) calculated for C₂₀H₁₅Cl₂N₄O₂S: 445.0293 [M+H]⁺. Found: 445.0300 [M+H]⁺.

2.1.6. 2-(2-(2-(2-(2,5-Dichlorobenzylidene)hydrazinyl)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (5c)

Yield: (0.30 gm, 67%), (dichloromethane/methanol (95:5), *R*_f = 0.54); m.p. 226–227 °C. ¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 2.84 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.0 Hz); 3.84 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.0 Hz); 6.59 (s, 1H, CH_{thiazole}); 7.43 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 2.5 Hz, *J* = 8.3 Hz); 7.54 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8.3 Hz); 7.79 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2.5 Hz); 7.82–7.84 (m, 2H, 2Ar-H); 7.84–7.87 (m, 2H, 2Ar-H); 8.24 (s, 1H, CH=N); 12.36 (bs, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 30.33 (C–H); 37.48 (C–H); 105.25 (C_{thiazole}); 123.50 (2C); 125.57 (C); 130.39 (C); 131.05 (C); 132.08 (2C); 132.19 (C); 132.71 (C); 133.94 (C); 134.86 (2C); 135.94 (C); 135.96 (C); 168.13 (2C=O); 168.20 (C). LC-ESI-HRMS (*m/z*) calculated for C₂₀H₁₅Cl₂N₄O₂S: 445.0293 [M+H]⁺. Found: 445.0285 [M+H]⁺.

2.1.7. 2-(2-(2-(2-(2,6-Dichlorobenzylidene)hydrazinyl)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (5d)

Yield: (0.41 gm, 92%), (dichloromethane/methanol (95:5), *R*_f = 0.46); m.p. 102–104 °C. ¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 2.84 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.0 Hz); 3.85 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.0 Hz); 6.52 (s, 1H, CH_{thiazole}); 7.37 (t, 1H, Ar-H, *J* = 8.4 Hz); 7.53 (d, 2H, 2Ar-H, *J* = 8.4 Hz); 7.80–7.84 (m, 2H, 2Ar-H); 7.84–7.87 (m, 2H, 2Ar-H); 8.19 (s, 1H, CH=N); 12.25 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 30.49 (C–H); 37.53 (C–H); 105.06 (C_{thiazole}); 123.49 (2C); 129.85 (2C); 130.26 (C); 130.74 (C); 132.08 (2C); 133.95 (C); 134.84 (C); 135.99 (C); 149.50 (C); 168.14 (2C); 168.46 (2C=O). LC-ESI-HRMS (*m/z*) calculated for C₂₀H₁₅Cl₂N₄O₂S: 445.0293 [M+H]⁺. Found: 445.0300 [M+H]⁺.

2.1.8. 2-(2-(2-(2-(3,4-Dichlorobenzylidene)hydrazinyl)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (5e)

Yield: (0.33 gm, 75%), (dichloromethane/methanol (95:5), $R_f = 0.54$); m.p. 233–235 °C. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 2.87 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz); 3.87 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz); 6.59 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.62–7.70 (m, 2H, 2Ar-H); 7.82–7.88 (m, 5H, 5Ar-H); 7.98 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$); 12.38 (bs, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 28.82 (C–H); 37.10 (C–H); 106.04 ($\text{C}_{\text{thiazole}}$); 123.52 (2C); 127.29 (C); 128.85 (C); 131.54 (2C); 132.02 (2C); 132.22 (C); 132.78 (C); 134.88 (2C); 143.60 (C); 168.00 (C); 168.14 (2C=O). LC-ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: 445.0293 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Found: 445.0285 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.9. 2-(2-(2-(2-(3,5-Dichlorobenzylidene)hydrazinyl)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (5f)

Yield: (0.34 gm, 76%), (dichloromethane/methanol (95:5), $R_f = 0.70$); m.p. 219–221 °C. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 2.88 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.0$ Hz); 3.88 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.0$ Hz); 6.63 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.58–7.62 (m, 1H, Ar-H); 7.68 (s, 2H, 2Ar-H); 7.79–7.91 (m, 4H, 4Ar-H); 8.00 (s, 1H, $\text{CH} = \text{N}$); 12.20 (bs, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 29.26 (C–H); 37.19 (C–H); 105.80 ($\text{C}_{\text{thiazole}}$); 123.51 (2C); 125.44 (2C); 129.17 (2C); 132.04 (2C); 134.89 (2C); 135.09 (2C); 138.05 (C); 168.15 (2C=O); 168.21 (C). LC-ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: 445.0293 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Found: 445.0296 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.10. 2-Chloro-N'-(2,3-dichlorobenzylidene)-N-(4-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethyl)thiazol-2-yl)acetohydrazide (6a). Typical procedure

2-(2-(2-(2-(3,4-Dichlorobenzylidene)hydrazinyl)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (5a) (0.245 gm, 0.55 mmol) was added to stirred solution of chloroacetyl chloride (0.045 ml, 0.55 mmol) and triethylamine (0.08 ml, 0.55 mmol) in dioxane (20 ml). The reaction mixture was stirred under reflux for 20 hrs. Then solvent was evaporated and water (50 ml) was added. The separate precipitate was collected by filtration, washed with water and recrystallized from ethyl alcohol to afford the desired product to yield (0.23 g, 79%); m.p. 201–202 °C; eluent: dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.87$. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 3.06 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.9$ Hz); 3.92 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.9$ Hz); 5.12 (s, 2H, CH_2); 7.47–7.5 (m, 2H, Ar-H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.71–7.74 (m, 2H, 2Ar-H); 7.74–7.76 (m, 2H, 2Ar-H); 7.79 (dd, 1H, Ar-H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.8$ Hz); 8.03 (dd, 1H, Ar-H, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.8$ Hz); 9.34 (s, 1H, $\text{CH} = \text{N}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 30.19 (C–H); 37.70 (C–H); 44.84 (C–H); 116.70 (C); 123.31 (2C); 126.89 (C); 129.02 (C); 131.92 (2C); 132.36 (C); 132.85 (C); 132.87 (C); 133.73 (C); 134.63 (2C); 145.24 (C); 149.78 (C); 154.93 (C); 168.07 (2C=O); 168.33 (C). LC-ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 521.0009 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Found: 521.0009 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.11. 2-Chloro-N'-(2,4-dichlorobenzylidene)-N-(4-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethyl)thiazol-2-yl)acetohydrazide (6b)

Yield: (0.13 gm, 44%), (dichloromethane/methanol (95:5), $R_f = 0.88$); m.p. 168–169 °C. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 3.08 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.9$ Hz); 3.94 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.9$ Hz); 5.15 (s, 2H, CH_2); 7.51 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.59 (dd, 1H, Ar-H, $J = 1.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz); 7.74–7.82 (m, 5H, 5Ar-H); 8.09 (d, 1H, Ar-H, $J = 8.4$ Hz); 9.31 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 30.18 (C–H); 37.66 (C–H); 44.83 (C–H); 116.66 (C); 123.37 (2C); 128.48 (C); 129.48 (C); 129.91 (C); 130.37 (C); 131.92 (2C); 134.65 (2C); 135.30 (C); 136.55 (C); 144.60 (C); 149.72 (C); 154.91 (C); 168.07 (2C=O); 168.27 (C). LC-ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 521.0009 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Found: 521.0004 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.12. 2-Chloro-N'-(2,5-dichlorobenzylidene)-N-(4-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethyl)thiazol-2-yl)acetohydrazide (6c)

Yield: (0.18 gm, 61%), (dichloromethane/methanol (95:5), $R_f =$

0.85); m.p. 198–199 °C. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 3.05 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.0$ Hz); 3.91 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.0$ Hz); 5.18 (s, 2H, CH_2); 7.49 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.59 (m, 2H, 2Ar-H); 7.71–7.78 (m, 4H, 4Ar-H); 8.05 (s, 1H, Ar-H); 9.21 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 30.23 (C–H); 37.73 (C–H); 44.58 (C–H); 118.89 (C); 123.34 (2C); 126.60 (2C); 130.37 (C); 131.89 (2C); 134.81 (2C); 135.14 (2C); 137.36 (C); 145.08 (C); 151.10 (C); 168.02 (C); 168.23 (2C=O); 168.28 (C). LC-ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 521.0009 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Found: 521.0009 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.13. 2-Chloro-N'-(2,6-dichlorobenzylidene)-N-(4-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethyl)thiazol-2-yl)acetohydrazide (6d)

Yield: (0.24 gm, 85%), (dichloromethane/methanol (95:5), $R_f = 0.63$); m.p. 159–160 °C. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 3.08 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.9$ Hz); 3.90 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.9$ Hz); 4.95 (s, 2H, CH_2); 7.49 (t, 1H, Ar-H, $J = 7.7$ Hz); 7.58 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.59 (d, 2H, 2Ar-H, $J = 6.1$ Hz); 7.68–7.71 (m, 4H, Ar-H); 8.69 (s, 1H, $\text{CH} = \text{N}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 30.14 (C–H); 37.66 (C–H); 44.95 (C–H); 116.86 (C); 123.36 (2C); 127.48 (C); 131.90 (C); 132.11 (C); 132.34 (C); 132.96 (2C); 133.10 (C); 134.61 (2C); 134.81 (C); 144.20 (C); 149.84 (C); 154.82 (C); 168.04 (2C=O); 168.37 (C). LC-ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 521.0009 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Found: 520.9997 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.14. 2-Chloro-N'-(3,4-dichlorobenzylidene)-N-(4-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethyl)thiazol-2-yl)acetohydrazide (6e)

Yield: (0.18 gm, 63%), (dichloromethane/methanol (95:5), $R_f = 0.88$); m.p. 130–131 °C. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 3.07 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.5$ Hz); 3.93 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.5$ Hz); 5.10 (s, 2H, CH_2); 7.54 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.76–7.83 (m, 6H, 6Ar-H); 8.09 (s, 1H, Ar-H); 8.32 (s, 1H, $\text{CH} = \text{N}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 30.05 (C–H); 37.84 (C–H); 44.44 (C–H); 118.21 (C); 123.24 (2C); 129.56 (C); 129.80 (2C); 131.78 (C); 132.27 (C); 134.60 (4C); 139.72 (C); 143.58 (C); 150.74 (C); 154.50 (C); 168.05 (2C=O); 168.24 (C). LC-ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 521.0009 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Found: 521.0004 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.15. 2-Chloro-N'-(3,5-dichlorobenzylidene)-N-(4-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethyl)thiazol-2-yl)acetohydrazide (6f)

Yield: (0.23 gm, 81%), (dichloromethane/methanol (95:5), $R_f = 0.80$); m.p. 162–163 °C. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 3.07 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.5$ Hz); 3.93 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.5$ Hz); 5.13 (s, 2H, CH_2); 7.56 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.74–7.75 (m, 1H, Ar-H); 7.79 (m, 4H, 4Ar-H); 7.88 (s, 1H, CH); 7.89 (s, 1H, CH); 8.27 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 30.23 (C–H); 37.73 (C–H); 44.49 (C–H); 118.73 (C); 123.41 (2C); 128.09 (C); 129.66 (C); 131.64 (C); 131.89 (2C); 132.28 (C); 133.66 (C); 134.53 (C); 134.81 (2C); 145.73 (C); 151.01 (C); 154.66 (C); 168.09 (2C=O); 168.28 (C). LC-ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 521.0009 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Found: 521.0002 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.16. 2-(3-(2-(4-(2,4-Dichlorophenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)butyl)isoindoline-1,3-dione (7a)

2-(4-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)butan-2-ylidene)hydrazinocarbothioamide (4) (0.290 gm, 1.0 mmol) was added to stirred solution of 2,2,4'-trichloroacetophenone (0.233 gm, 1.0 mmol) in absolute ethyl alcohol (20 ml). The reaction mixture was stirred under reflux for 20 hrs. The separate precipitate was collected by filtration and dried in vacuum to yield (0.25 gm, 55%); m.p. 167–168 °C; eluent: dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.77$. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 1.96 (s, 3H, CH_3); 2.56 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.8$ Hz); 3.83 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.8$ Hz); 7.19 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.47 (dd, 1H, Ar-H, $J = 1.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz); 7.65 (d, 1H, Ar-H, $J = 2.1$ Hz); 7.79–7.81 (m, 2H, 2Ar-H); 7.82–7.87 (m, 3H, 3Ar-H); 10.81 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 17.22 (C–H); 35.14 (C–H); 36.78 (C–H); 109.42 (C); 123.42 (2C); 127.84 (C); 130.05 (C); 131.93 (C); 132.02 (C); 132.09 (2C); 132.64 (C);

133.07 (C); 134.80 (2C); 144.71 (C); 151.22 (C); 168.20 (2C=O); 169.20 (C). LC-ESI-HRMS (m/z) calculated for $C_{21}H_{17}Cl_2N_4O_2S$: 459.0449 $[M+H]^+$. Found: 459.0453 $[M+H]^+$.

2.1.17. 2-(3-(2-(4-(3,4-Dichlorophenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)butyl)isoindoline-1,3-dione (7b)

Yield: (0.29 gm, 63%), (dichloromethane/methanol (95:5), R_f = 0.90); m.p. 213–214 °C. 1H NMR (700 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.97 (s, 3H, CH₃); 2.54 (t, 2H, CH₂, J = 6.8 Hz); 3.83 (t, 2H, CH₂, J = 6.9 Hz); 7.33 (s, 1H, CH_{thiazole}); 7.63 (d, 1H, Ar-H, J = 8.1 Hz); 7.76–7.80 (m, 3H, 3Ar-H); 7.81–7.84 (m, 2H, 2Ar-H); 8.03 (d, 1H, Ar-H, J = 1.7 Hz); 10.78 (s, 1H, NH). LC-ESI-HRMS (m/z) calculated for $C_{21}H_{17}Cl_2N_4O_2S$: 459.0449 $[M+H]^+$. Found: 459.0456 $[M+H]^+$.

2.2. Biological activity

Cell preparation, *in vitro* antiproliferative assay, MTT and SRB cytotoxic tests were performed according to literature [24,41,42,43,44]. For more details, see Supplementary material.

2.2.1. Elastase inhibition assay

The porcine pancreatic elastase inhibition assay was performed according to the previously presented methods with some modifications [45]. Porcine pancreatic elastase and its substrate *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide (Sigma Aldrich) were dissolved in assay buffer (1 mM Tris-HCl, pH 8) to give a concentration of 150 μ g/ml and 3 mM respectively. Test compounds (**6a–6f**) were dissolved in DMSO as stock solution with concentration 2 mM. The reaction mixtures contained assay buffer, different volumes of solutions of the tested compounds (to give finally concentration in the range of 12.5–100 μ M) and 50 μ l of substrate solution, were incubated with 50 μ l of enzyme solution at room temperature for 30 mins. Following, release of *p*-nitroaniline was determined by measuring the absorbance at 410 nm using a T60U spectrophotometer (PG Instruments) equipped with quartz cells of 1 cm path length. Oleonic acid was used as reference inhibitor. The IC_{50} values were calculated from the equation generated by exponential or linear fit of the experimental data. The effectiveness of inhibition was expressed for the investigated compounds as the percentage of concentration necessary to achieve 50% inhibition (IC_{50}), calculated using the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (A - B)/(C - D)] \times 100,$$

where: A = absorbance of reaction mixture, B = absorbance of reaction mixture without enzyme, C = absorbance of reaction mixture without test compound and D = absorbance of reaction mixture without enzyme and test compound.

2.2.2. Kinetic analysis of the inhibition of elastase

To better understand the inhibitory mode of new synthetic compounds (**6a–6f**) against elastase, kinetic studies were performed, using the previously presented method with some modifications [46]. Kinetic studies were carried out using different concentrations of *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide (0.045–0.090 mM) in the presence of selected concentrations of test compounds (50 μ M and 100 μ M). Maximal initial velocity was determined from the initial linear portion of absorbance up to 15 mins after addition of enzyme. The inhibition type of the enzyme, Michaelis-Menten constant (K_m) and maximal velocity (V_{max}) were determined by Lineweaver-Burk plots of inverse of velocities ($1/V$) versus inverse of substrate concentration $1/[N\text{-succinyl-3(Ala)-pNA}]$ mM^{-1} .

2.2.3. Analysis of active caspase 3/7

The analysis was carried out in accordance with the literature [24,47]. For more details, see Supplementary material.

2.2.4. EGFR assessment by Enzyme-link immunosorbent assay (ELISA)

The 2.5×10^5 of A549 cells were seeded at the culture dishes in culture medium to the final volume of 8 ml. The cells were exposed to the tested compounds (**6a–6f**) at concentrations 10 μ g/ml for 72 hrs. After 72 hrs of the incubation, the cultured medium was removed and the cells were collected (by using non-enzymatic Accutase solution, Sigma-Aldrich) and washed twice with PBS. Then the cells were suspended in Cell Extraction Buffer (Invitrogen) and lysed on ice by 40 mins. Lysed cells were centrifuged by 10 min (4 °C, 13 000 rpm). Supernatants were collected and frozen at –80 °C. The concentration of EGFR in each lysate was determined by Human EGFR (Full length) ELISA Kit (Invitrogen) according to the instruction of the manufacturer. Results were normalized to protein concentration in each lysate. Protein concentration in lysates was determined by using DC Protein Assay (BIO-RAD). Absorbances (at 450 nm for EGFR ELISA, and at 650 nm for protein assay) were recorded using a Biotek Synergy H4 (Biokom, Warsaw, Poland). Cell lysates were tested in duplicates in single ELISA experiment and each experiment was repeated at least 3 times independently.

2.3. Molecular modeling study

The ligand molecules were prepared by using the Avogadro 1.1.1 software [48] and optimized within the UFF force field [49] (2000 steps, steepest descent algorithm). The flexible, optimized ligands were docked into the binding pockets of the high-resolution protein structures found in the following five PDB entries: 1bma (X-ray resolution: 0.192 nm), 1hv7 (X-ray resolution: 0.17 nm), 1qnj (X-ray resolution: 0.11 nm), 2de9 (X-ray resolution: 0.13 nm) and 2h1u (X-ray resolution: 0.16 nm). Due to the fact that some of the ligands that can be found in the crystal structures of elastase are covalently bound to protein, we have considered both standard and covalent docking procedures. In the case of standard docking, the AutoDock Vina software [50] was applied. The procedure of docking was carried out within the cuboid region which covered the whole co-crystallized ligand present in the 2h1u PDB structure as well as the closest amino-acid residues that exhibit contact with that ligand. All the default procedures and algorithms implemented in AutoDock Vina were applied during docking procedure. The predicted binding energies were averaged over all protein structures applied for docking whereas only the ligand poses exhibiting the same structural features and ligand–protein contact patterns were subjected to calculations of such average energy. The more favorable binding mode is associated with the lower binding energy value; only the lowest energy values corresponding to the given ligand were accounted for during subsequent analysis. Averaging was accompanied by visual inspection of the location and orientation of the docked ligands, in order to control the uniformity of the binding pattern. The calculations of the RMSD value for each pose of the docked ligand (after aligning with respect to the given structure) were carried out as well in order to assure that the partial energies contributing to the final, averaged, binding energy value, correspond to the structurally analogous orientations. The docking methodology was initially validated by docking simulation of the ligand molecule originally included in one of the studied protein structures (i.e. 2h1u). Note that in spite that the majority of the elastase structures available in the PDB database contains the co-crystallized ligands, the 2h1u structure is one of very few examples when the ligand is bound to the protein in a non-covalent manner; this is an essential condition to perform the validation procedure and the main reason to select this system for that purpose. Graphical illustration of the validation results is given in Fig. S1. The accepted procedure appeared to be accurate enough to recover the original position of the ligand with the corresponding RMSD value equal to ~0.14 nm. In the case of covalent docking, the AutoDock code was applied [51] and the docking methodology was analogous to that described in [52]. The inspection of the PDB records (e.g.: 1btu, 2e36, 1eas, 1eat, 1fzz, 1hv7, 1inc, 1qgf, 8est, 9est) revealed that the ligand–elastase covalent binding always involves

Ser195 and the topological pattern in the ligand molecule that is essential for such binding is: C—C—O (where C's are non-aromatic). The only moiety fulfilling this condition is the carbonyl group, present in all studied ligands. Additionally, the results of the standard docking simulations reveal that this group is in relatively close proximity to Ser195 (i. e. $\sim 0.42\text{--}0.45$ nm) which further speaks for selecting such location of the potential covalent bond. In analogy to the standard docking, also in this case all five protein structures were considered. The alignment of covalent bonds was performed separately for each individual protein structure-ligand pair. The binding energies were averaged over the structural cluster corresponding to each ligand.

3. Results and discussion

3.1. Chemistry

In order to obtain the designed phthalimide-thiazole derivatives, we decided to use phthalimide (1) as starting material. To obtain the compounds (5a-5f) (series A), phthalimide (1) was reacted with methyl vinyl ketone in the presence of sodium ethoxide as a catalyst. The 2-(3-oxobutyl)phthalimide (2) obtained in good yield 83% was then brominated with bromine in methyl alcohol to give the corresponding 2-(4-bromo-3-oxobutyl)phthalimide (3) in good yield 87% and high purity [39,40]. Consequently using the Hantzsch reaction involving the condensation of the resulting bromoketone 3 with six different dichloro-substituted benzaldehyde thiosemicarbazones, the six target products (5a-5f) from the series A were obtained with 67–92% yields. The reaction of products (5a-5f) with chloroacetyl chloride in the presence of triethylamine with heating for 4 hrs in dioxane led to derivatives (6a-6f) (series B) containing chloroacetamide group with a yield of up to 85% [53]. The compounds (7a) and (7b) (series C) were obtained as a result of a two-step reaction.

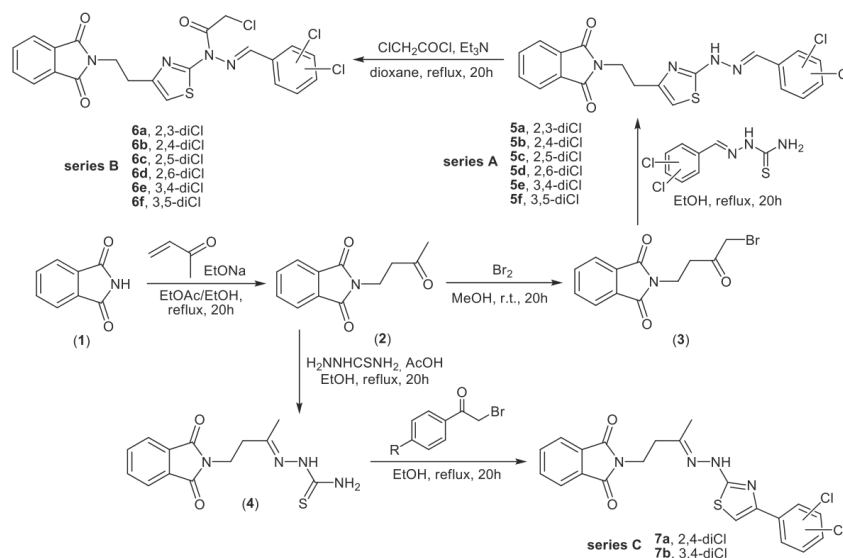
In the first step, the corresponding hydrazinecarbothioamide (4) was synthesized with 92% yield through condensation of 2-(3-oxobutyl)phthalimide (2) with thiosemicarbazide in absolute ethyl alcohol containing catalytic amount of glacial acetic acid. In the next step,

cyclization of hydrazinecarbothioamide (4) with 2,4-dichloro- and 3,4-dichloro-substituted bromoacetophenones in ethanolic solution and under reflux produced compounds (7a) and (7b) with high yield (55 and 63%) and with high chemical purity. The required pure compounds were obtained by recrystallization from ethyl alcohol.

The reaction pathways have been summarized in Scheme 1. The isolated products (5a-5f), (6a-6f), and (7a), (7b) were characterized on the basis of spectroscopic methods, ^1H NMR (700 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) and LC-ESI-HRMS analysis. The ^1H NMR spectra of the newly synthesized compounds (5a-5f) contain the two characteristic triplets derived from two methylene groups at about 2.90 and 3.90 ppm, the thiazole-5H proton singlet at 6.52–6.65 ppm, the proton singlet of the CH = N bond at 7.98–8.41 ppm, and the broadened singlet of the NH group at 12.18–12.48 ppm. In compounds (6a-6f) a shift of thiazole-5H proton signals by about 1 ppm towards higher chemical shifts values can be observed. The characteristic singlet of the COCH₂Cl group can also be observed at 4.95–5.18 ppm. In the ^{13}C NMR spectra of compounds (6a-6f), the most characteristic observations include the carbon atom signal of the CH₂Cl group at about 37.8 ppm, the very characteristic signal of CH of the thiazole ring at 116.66–118.89 ppm, and the signal of the C=O carbon atom of the phthalimide ring at about 168 ppm.

3.2. Biological evaluation

To study the effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives, three series of compounds A (5a-5f), B (6a-6f), and C (7a, 7b) were tested against a panel of three cancer cell lines, representing cancers types that are diagnosed with the greatest frequency in 2019, namely human biphenotypic B myelomonocytic leukemia (MV4-11), human lung carcinoma (A549), and human breast carcinoma (MCF-7) [1]. Results of the *in vitro* studies on antiproliferative activity of compounds (5a-5f), (6a-6f) and (7a, 7b) against cancer cell lines and normal mouse fibroblast (BALB/3T3), are summarized in Table 1. As a positive control, we decided to choose cisplatin, because similarly to chloroacetamides, cisplatin forms stable bonds with cysteine-containing proteins [54,55]. As shown in Table 1, phthalimide-



Scheme 1. Synthesis of the target phthalimide-thiazoles series A (5a-5f), B (6a-6f), C (7a, 7b).

Table 1

In vitro inhibitory effects of compounds series A (5a–5f), B (6a–6f), C (7a, 7b) and reference compound cisplatin against the proliferation of human biphenotypic B myelomonocytic leukemia (MV4-11), lung carcinoma (A549), breast carcinoma (MCF-7), and normal mouse fibroblast BALB/3T3 cells.

Phthalimide derivatives	IC ₅₀ ± SD [μM]				SI		
	MV4-11	A549	MCF-7	BALB/3T3	BALB/3T3/MV4-11	BALB/3T3/A549	BALB/3T3/MCF-7
5a	9.30 ± 0.93	13.86 ± 4.57	33.39 ± 12.38	110.86 ± 25.56	11.92	8.00	3.32
5b	9.00 ± 1.09	14.17 ± 5.25	42.42 ± 16.41	97.21 ± 10.53	10.80	6.86	2.29
5c	10.60 ± 1.93	11.99 ± 3.88	20.08 ± 6.96	16.12 ± 2.83	1.52	1.34	0.80
5d	16.10 ± 3.71	23.38 ± 7.85	23.22 ± 7.03	132.20 ± 70.84	8.21	5.65	5.69
5e	8.98 ± 5.21	6.94 ± 1.25	13.14 ± 4.78	7.86 ± 0.20	0.87	1.13	0.60
5f	38.69 ± 6.30	6.69 ± 1.39	28.59 ± 12.30	7.14 ± 1.14	0.18	1.07	0.25
6a	5.56 ± 2.01	47.74 ± 13.93	62.48 ± 8.18	19.70 ± 5.55	3.54	0.41	0.32
6b	5.75 ± 2.30	53.31 ± 10.69	59.74 ± 9.04	34.13 ± 6.66	5.94	0.64	0.57
6c	8.82 ± 3.92	36.03 ± 6.07	28.98 ± 4.53	34.74 ± 16.05	3.94	0.96	1.20
6d	6.61 ± 1.91	31.22 ± 9.07	22.94 ± 5.69	25.34 ± 1.68	3.83	0.81	1.10
6e	8.66 ± 1.83	10.41 ± 1.05	18.69 ± 6.67	8.07 ± 0.76	0.93	0.78	0.43
6f	5.81 ± 0.58	9.41 ± 1.02	9.06 ± 1.42	6.57 ± 0.25	1.13	0.70	0.73
7a	115.42 ± 23.65	–	–	–	–	–	–
7b	66.72 ± 3.35	–	–	–	–	–	–
cisplatin	1.97 ± 0.23	3.17 ± 0.59	5.70 ± 0.63	7.00 ± 2.27	3.55	2.21	1.23

Selectivity index (SI) = IC₅₀ of compound in a normal cell line / IC₅₀ of the compound in cancer cell line.

thiazole derivatives (5a–5e) belonging to the series A showed high activity against human leukemia (MV4-11) cells with IC₅₀ 8.98–16.10 μM. Among all tested compounds, derivatives (5a), (5b) and (5d) showed the highest selectivity index (SI) relative to MV4-11 with 11.92, 10.80 and 8.21 values, respectively. According to the literature data, compounds showing SI ≥ 10 were considered as highly selective drugs [56]. The introduction of COCH₂Cl group in place of the hydrogen atom in the NH group in the series A has further improved antiproliferative activity. Compounds (6a–6f) belonging to the series B turned out to be even more active than the series A against MV4-11 cells, with IC₅₀ 5.56–9.03 μM. The resulting activities seem very good compared to the highly active inorganic cisplatin (IC₅₀ 1.97 μM). Also derivatives (6a–6d) showed a good selectivity index of about 3 to 6. The research shows that the dichloro-substituted derivatives (7a) and (7b) showed the lowest activity against MV4-11 cells with IC₅₀ 115.42 and 66.72 μM, respectively. Antiproliferative activity of compounds (5e), (5f) and (6e), (6f) against human lung carcinoma (A549) cells is also very high, with IC₅₀ values in the range of 6.69–10.41 μM. According to our results, compounds (5a) and (5b) have high activity against A549 cells, with IC₅₀ values between 13.86 and 14.17 μM, and they show high selectivity index values, ranging from 7 to 8. Our data indicate also that compounds (5e) and (6f) have high activity against human breast carcinoma (MCF-7) with IC₅₀ values 13.14 and 9.06 μM, respectively.

Analysing the effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives, it can generally be stated that for the series A and the MV4-11 cancer cell line, compounds with 2,3-dichloro, 2,4-dichloro and 3,4-dichloro substituents were the most active. For the series B and the same cancer cell line, 2,3-dichloro, 2,4-dichloro and 3,5-dichloro turned out to be the most active substituents. It should be noted that the differences in activity between individual compounds were small and were around 3 μM. However, for the other types of cancer, i.e. A549 and MCF-7, the 2,3-dichloro- and 2,4-dichloro-substituents significantly reduce antiproliferative activity, and 3,4-dichloro and 3,5-dichloro substituents were the most active.

3.2.1. Elastase inhibitory activity

Earlier studies suggest that aminothiazole derivatives and other heterocyclic compounds have great potential as elastase inhibitors, this finding was used by us to design our compounds [46,57]. In order to determine potential molecular targets and thus the mechanism of action of compounds (6a–6f), first of all, their abilities to inhibit elastase were evaluated and compared to oleonic acid, which is pentacyclic triterpenoid HNE inhibitor [58]. The method involves using the specific *N*-succinyl-Ala-Ala-*p*-nitroanilide substrate for the enzymatic reaction, which hydrolysed by the elastase gives a colored *p*-nitroaniline whose

level is determined by spectrophotometric methods [45,46]. The results were summarized in Table 2. Among the investigated compounds, the best inhibition effect was demonstrated by compounds (6e) and (6f) containing two chlorine atoms in the 3,4- and 3,5-positions in the phenyl ring with IC₅₀ values 32.1 and 32.9 μM, respectively. These values are only two times lower than the inhibition values for standard oleonic acid. In *in vitro* studies compounds (6e) and (6f) showed the best antiproliferative activity against all cancer cell lines tested. Compound 6c, which is a 2,5-dichloro derivative with IC₅₀ 35.3 μM, also achieved very good results in the studies. The smallest effect of elastase inhibition was demonstrated by compounds (6b) and (6d), with IC₅₀ values 93.9 and 71.7 μM, respectively.

Next, kinetic analysis of the mechanism of inhibition of elastase by compounds (6a–6f) was determined using Lineweaver-Burk double reciprocal plots, which represent useful graphical method for analysis of the Michaelis-Menten equations used to determine the inhibition constant *K_m* for possible competitive, uncompetitive, noncompetitive and mixed mechanisms of inhibitions. The plots for the two the most active inhibitors (6e) and (6f) are presented in Fig. 2.

In our research, we showed that all derivatives (6a–6f) showed a mixed mechanism of inhibition of elastase, which means that inhibitors can bind to the enzyme whether or not the enzyme has already bound the substrate. We have found that the location of two chlorine atoms in the phenyl ring plays a significant role in the ability to inhibit elastase. The measured IC₅₀ values for elastase inhibition are several times weaker than the antiproliferative activities and therefore it can be concluded that elastase inhibition is not the main mechanism of activity, however for compounds (6e) and (6f) it may be an important component in the complex mechanism of high cytotoxic activity of the derivatives.

Table 2

Elastase inhibitory activity of phthalimide-thiazoles (6a–6f) compared to standard inhibitors. Mechanism of inhibition, maximum velocity (*V_{max}*) and inhibition constant (*K_m*) in the elastase-catalyzed *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide hydrolysis.

Compounds at 0.1 mM	IC ₅₀ ± SD [μM]	Inhibitory mechanism	<i>V_{max}</i>	<i>K_m</i>
6a	48.5 ± 0.53	mixed	0.7050	0.1196
6b	93.9 ± 4.08	mixed	0.4906	0.0748
6c	35.3 ± 0.32	mixed	2.1277	0.8040
6d	71.1 ± 0.38	mixed	0.3192	0.0223
6e	32.9 ± 1.28	mixed	0.2610	0.0972
6f	32.1 ± 1.66	mixed	0.4535	0.1928
Oleonic acid	14.25 ± 1.28	–	–	–

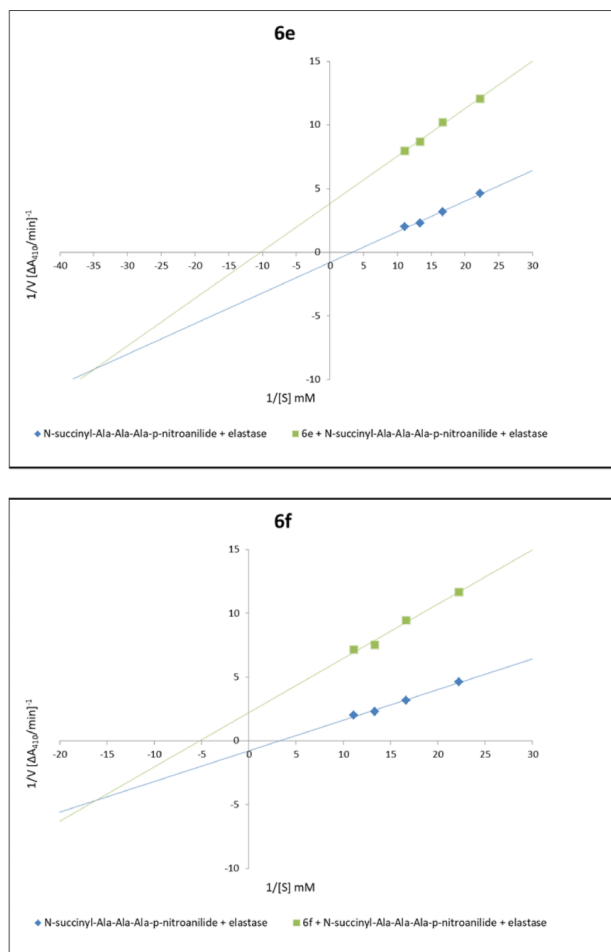


Fig. 2. Lineweaver-Burk plots for elastase inhibition for compounds **6e** and **6f** at concentration 0.1 mM using *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide as substrate at concentrations 0.045, 0.060, 0.075 and 0.090 mM.

3.2.2. Analysis of caspase 3/7 activation

To investigate whether compounds (**6a-6f**) cause cell death in lung cancer cell lines through the process of apoptosis, we decided to measure caspase 3/7 activation [59,60]. Degree of apoptosis depends on the level of active effector caspase 3/7 which degrades intercellular proteins. After incubation of A549 human lung cancer cells with test compounds (**6a-6f**) using a specific substrate for caspase-3/7, namely Ac-Asp-Ph (F5)-Val-Asp-7-amino-4-carbamoylmethylcoumarin (Ac-DEVD-ACC), the degree of caspase 3/7 activation was measured [61].

Our research has shown that the effect of the dichloro-substitution plays a significant role in the activation of caspase 3/7. Compound (**6e**) containing the 3,4-dichloro-substituent increases almost 16 times caspase 3/7 activity in A549 cells compared to control. In addition, compounds (**6a**) and (**6b**) containing 2,3-dichloro- and 2,4-dichloro-substituents increase caspase activity in A549 cells about 3 to 4 times. It is interesting that other derivatives (**6c**), (**6d**), and (**6f**) at a

concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ did not increase the caspase 3/7 activity in A549 cells. The results are summarized in Fig. 3.

Also in this case, the obtained results indicate that caspase activation in most cases is not the main mechanism of action, however our studies have shown that compound (**6e**), in addition to its ability to inhibit elastase, can also lead to cell death as a result of apoptosis through the activation of caspase 3/7. The combination of these two mechanisms can lead to the synergy effect and consequently to the high antiproliferative activity of the (**6e**) derivative. An interesting observation is that compound **6f**, which showed similar activity against the cancer cells, did not increase caspase 3/7 activity, suggesting a very large dichloro-substituent effect on the ability to caspase activation.

3.2.3. EGFR tyrosine kinase inhibitory activity

Keeping in mind the purpose of our research, the inhibitory activity of compounds (**6a-6f**) against EGFR was tested using enzyme-link

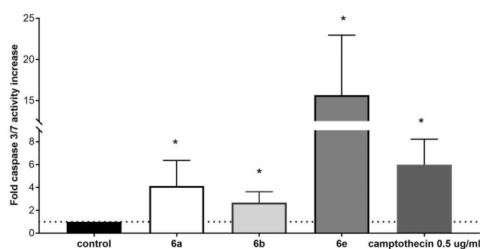


Fig. 3. Caspase 3/7 activation in A549 cells induced by compounds **6a**, **6b** and **6e** at concentrations 20 $\mu\text{g/ml}$. Statistical significance vs. control ($*p < 0.05$; Statistica 10.0, Mann-Whitney *U* test).

immunosorbent assay (ELISA), and A549 cell nuclear extract as enzyme source (Fig. 4). Our studies have shown that the dichloro-substitution effect also plays a significant role in the EGFR inhibitory activity. Among the investigated compounds, the best inhibition effect was demonstrated by compound (**6f**) containing 3,5-dichloro-substituent, which reduced EGFR levels in A549 cells by approximately 31%. It can also be stated that this compound is selective for EGFR, because it showed no activation of caspase 3/7. It is worth mentioning that phthalimide-thiazole (**6f**) was the most active in this series against A549 cancer cell lines with IC_{50} 9.41 μM , as well as against other cancer cell lines, with IC_{50} 5.81 and 9.06 μM . Also derivatives (**6c–6e**) showed some ability to inhibit EGFR tyrosine kinase by reducing its level from 13 to 16%, respectively. This group contains compound (**6e**), which also has the ability to activate caspase 3/7. The low inhibition of EGFR in most cases does not explain the high cytotoxicity of the resulting derivatives, however our studies have shown that compound (**6f**), has a dual ability to inhibit elastase and EGFR tyrosine kinase. The combination of these two mechanisms can lead to the synergy effect and consequently to the high antiproliferative activity of the (**6f**) derivative.

3.3. Molecular modeling study

Consequently, the molecular docking study was used to analyse the influence of pharmacophore groups on the activity of the compounds. The binding energies found during standard docking simulations are given in Table 3 and graphically illustrated in Fig. 5. Each of the final energy values was averaged over the set of poses exhibiting the same structural orientation in the binding cavity, as confirmed by separate RMSD calculations. All the obtained binding energies exhibit similar magnitude, varying in the range of ~ -7.1 – 8.1 kcal/mol. The strongest binding is exhibited by compound (**6f**) whereas the weakest by (**6b**) which is in line with the experimental results. Moreover, the binding

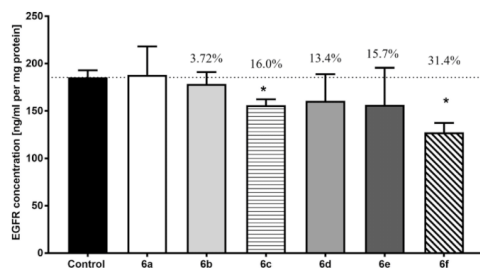


Fig. 4. EGFR concentration (mean \pm SD) in human lung cancer cells A549 after 72 h treatment by tested compounds. $*p < 0.05$ vs control.

Table 3

The docking results with respect to the studied ligands. The calculations were averaged over the five structures (1bma, 1hv7, 1qnj, 2de9 and 2h1u) available in the PDB database; the corresponding standard deviations are given as well.

Phthalimide derivatives	Standard docking Binding energy \pm SD [kcal/mol]	Covalent docking Binding energy \pm SD [kcal/mol]
6a	-7.64 ± 0.26	-8.71 ± 0.22
6b	-7.08 ± 0.12	-8.65 ± 0.20
6c	-7.64 ± 0.12	-8.12 ± 0.31
6d	-7.28 ± 0.27	-8.81 ± 0.26
6e	-7.94 ± 0.36	-7.95 ± 0.25
6f	-8.12 ± 0.37	-8.63 ± 0.18

energies calculated for all set of compounds are strongly correlated with the experimentally determined values of IC_{50} (Fig. 6). Thus, one can conclude that a good agreement between the theoretical and experimental results exists. The relatively small divergences between binding energies determined for particular ligands may be explained in terms of their high structural similarity (they differ only by the position of some small substituents and are structural isomers) combined by extremely close locations and orientations exhibited by them when interacting with binding cavity. The latter issue is discussed below.

The results of the docking studies were also analysed with respect to the mechanistic interaction pattern that may be significant in the context of interpretation of the obtained binding energy values. The summary given below relies on analysing the ligand–protein contacts that take place if the distance between any corresponding atom pair is smaller than the arbitrarily accepted value of 0.4 nm. The description provided below concerns collectively all the studied compounds due to their nearly identical orientations in the binding cavity (Fig. 5). Thus, the found interaction pattern is common for all studied compounds, within the accuracy limits resulting mainly from the molecular topology of the ligand (in practice, this factor is restricted to single moiety). The graphical illustration of the docking results (on example of **6f**) is given in Fig. 5.

When considering the ligand–protein interactions, the main anchoring site seems to be the phthalimide ring which maintains close contacts (distances ~ 0.34 – 0.38 nm) with Thr175, Trp172 and Phe215. The two latter residues contain aromatic side chains and their arrangement with respect to the phthalimide ring of the ligand molecule suggests the occurrence of the attractive π – π and H – π interactions. The hypothesis about the main anchoring site is supported by extremely low spatial fluctuations of this moiety across the set of studied ligands (Fig. 5).

The pattern of interactions involving the dichlorophenyl moiety (i.e. the group that differentiate between considered ligands) is more complex and engage much larger number of amino acid residues in comparison to the phthalimide ring, discussed above. In particular, the contacts (distances ~ 0.34 – 0.38 nm) with the following amino acids were observed: Thr147, Cys220, Gln192, Ser217, Arg217 and Val216. None of these contacts is associated with the strong, specific and attractive interaction types (e.g. hydrogen bonding or π – π interactions). Thus, it can be concluded that the substituent-dependent discrimination of the ligand–protein affinities is driven by a collective influence of various interactions, with a contribution of several different amino acid residues. This finding is also in line with a relatively low scatter of determined ligand–protein binding energies (they differ from each other by no more than ~ 1 kcal/mol). Moreover, the relative spatial fluctuations of the dichlorophenyl moiety are much stronger across the whole set of ligands which is understandable when realizing that this part of the molecule differs from one ligand to another; the mentioned fluctuations reflect the energetically optimal arrangements exhibited by groups with diverse molecular topologies.

The central parts of the ligand molecule (including the thiazole ring and the aliphatic ‘linkers’) interact with Val99, Ser214, Val216 and

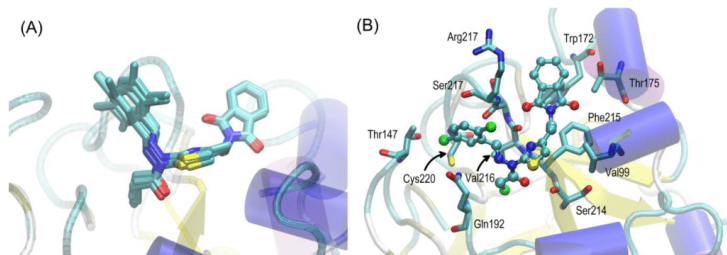


Fig. 5. (A) The superposed positions of all studied ligands (stick representation) in the binding cavity of the 1bma structure of elastase. All these positions were identified as the optimal ones during the standard (non-covalent) docking procedure. (B) The location of the **6f** ligand molecule bound to the 1bma structure of elastase and found in the docking procedure. The ligand molecule is shown in ball-and-stick representation whereas all the closest amino-acid residues are represented by sticks. The description of the interaction types is given in the text.

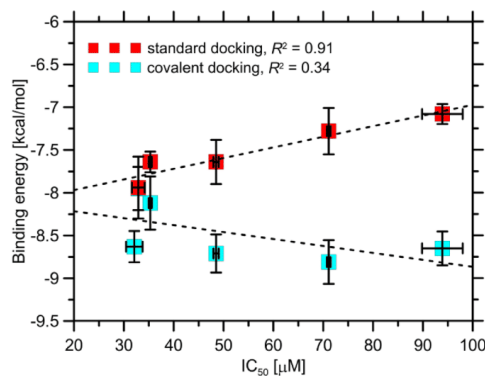


Fig. 6. The correlation between the calculated binding energies, averaged over the five protein structures available in the PDB database and the corresponding (experimental) values of IC₅₀. The horizontal bars represent the standard deviation values within the set of binding energies. See Table 3 for numerical values.

Gln192 maintaining contacts with corresponding distances varying in the range ~0.32–0.38 nm. Also in this case no systematic, strongly attractive interactions were observed which again suggests a collective but moderate influence of the involved amino acid residues. The related spatial fluctuations are of moderate magnitude in comparison to those described above which is in line with such statement.

Finally, it is worth noting that due to a large flexibility of the ligand molecule, the dichlorophenyl moiety is located relatively close to the remaining groups of the ligand, in particular to the carbonyl oxygen atoms attached to the phthalimide ring and to the thiazole ring. The exact magnitude of the corresponding distance depends on the substituent type (0.4–0.48 nm) and the existence of such contacts suggests a small contribution of the intramolecular interactions into the calculated binding energies. The binding energies assessed in the results of covalent docking procedure are collected in Tab. 3 and graphically illustrated in Fig. 6. In comparison to the standard, non-covalent binding, the different type of scoring function is applied, thus, the energy values obtained in accordance to these two protocols cannot be directly compared against each other. However, the applicability of the alternative, covalent docking methodology as well as the underlying assumption can be estimated on the basis of the agreement with the experimental data. In contrast to standard docking, the correlation of the binding energies with the IC₅₀ value is extremely poor, indicating a very limited possibility that the ligand binding is driven by covalent interactions with the protein. For this reason, the pattern of ligand–protein contacts will not be described in detail. We only notice that the due to

enforced (covalent) contact of the ligand with Ser195, the previously described network of interactions is disrupted and the new contacts formed instead. Moreover, the conformation of the ligand molecule is significantly altered to enable its accommodation in the binding cavity (this results in e.g. intramolecular π – π interactions between aromatic moieties of ligand). Graphical illustration of the results is given in Fig. S2.

4. Conclusions

In summary, a series of phthalimide-thiazole derivatives has been synthesized and their antiproliferative activity associated with the presence of dichloro-substituents has been studied on selected cancer cell lines. We have found that the location of two chlorine atoms in the phenyl ring plays a significant role in antitumor activity, as well as in the ability to inhibit specific molecular targets. Among the derivatives, compounds (**5a–5e**) and (**6a–6f**) showed high activity against human leukemia (MV4-11) cells with IC₅₀ 5.56–16.10 μ M, and compounds (**5a**), (**5b**) and (**5d**) had high selectivity index values of 11.92, 10.80 and 8.21, respectively. The antiproliferative activity of compounds (**5e**), (**5f**) and (**6e**), (**6f**) against human lung carcinoma (A549) cells was also very high, with IC₅₀ values in the range of 6.69–10.41 μ M. Among the derivatives, compounds (**6e**) and (**6f**) were the most active against all cancer cell lines.

Analysing the effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives containing 3,4-dichloro and 3,5-dichloro substituents showed the highest activity against all cancer cell lines. Lead compounds (**6e**) and (**6f**) showed elastase inhibition effect, with IC₅₀ values about 32 μ M with mixed mechanism of action. The molecular modeling studies showed that the binding energies calculated for the whole set of compounds are strongly correlated with the experimentally determined values of IC₅₀. The lead compound (**6e**) increases almost 16 times caspase 3/7 activity in A549 cells compared to control. We have also demonstrated that compound (**6f**) reduced EGFR tyrosine kinase levels in A549 cells by approximately 31%. These results clearly suggest that compounds (**6e**) i (**6f**) could constitute lead dual-targeted anticancer drug candidates.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was supported by the PhD student grant number MN-SDF/3/WF/2019.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104819>.

References

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, CA cancer, *J. Clin. Oncol.* 39 (1) (2021) 7–34.
- [2] V.V. Padma, An overview of targeted cancer therapy, *Biomedicine (Taipei)* 5 (2015) 19.
- [3] R.R. Ramsay, M.R. Popovic-Nikolic, K. Nikolic, E. Uliassi, M.L. Bolognesi, A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases, *Clin. Transl. Med.* 7 (2018) 3.
- [4] M.M. Alam, A.H.E. Hassan, Y.H. Kwon, H.J. Lee, N.Y. Kim, K.H. Min, S.-Y. Lee, D.-H. Kim, Y.S. Lee, Design, synthesis and evaluation of alkylphosphocholine-gefitinib conjugates as multitarget anticancer agents, *Arch. Pharm. Res.* 41 (1) (2018) 35–45.
- [5] M.M. Alam, A.H.E. Hassan, K.W. Lee, M.C. Cho, J.S. Yang, J. Song, K.H. Min, J. Hong, D.-H. Kim, Y.S. Lee, Design, synthesis and cytotoxicity of chimeric erlotinib-alkylphospholipid hybrids, *Bioorg. Chem.* 84 (2019) 51–62.
- [6] A.K. Farag, A.H.E. Hassan, B.S. Ahn, K.D. Park, E.J. Roh, Reprofitting of pyrimidine-based DAPK1/CSF1R dual inhibitors: identification of 2,5-diamino-4-pyrimidinol derivatives as novel potential anticancer lead compounds, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 35 (2020) 311–324.
- [7] A.K. Farag, A.H.E. Hassan, H. Jeong, Y. Kwon, J.G. Choi, M.S. Oh, K.D. Park, Y. K. Kim, E.J. Roh, First-in-class DAPK1/CSF1R dual inhibitors: discovery of 3,5-dimethoxy-N-(4-(4-methoxyphenoxy)-2-(6-morpholinopyridin-3-yl)amino)pyrimidin-5-ylbenzamide as a potential anti-taupoathies agent, *Eur. J. Med. Chem.* 162 (2018) 161–175.
- [8] K.K. Hunt, H. Wingate, T. Yokota, Y. Liu, G.B. Mills, F. Zhang, B. Fang, C.-H. Su, M. Zhang, M. Yi, K. Keyomars, Elafin, an inhibitor of elastase, is a prognostic indicator in breast cancer, *Breast Cancer Res.* 15 (2013) R3.
- [9] J.A. Foekens, C. Ries, M.P. Look, C. Gippner-Stepert, J.G. Klijn, M. Jochum, The prognostic value of polymorphonuclear leukocyte elastase in patients with primary breast cancer, *Cancer Res.* 63 (2003) 337–341.
- [10] Y. Xu, J. Zhang, J. Han, X. Pan, Y. Cao, H. Guo, Y. Pan, Y. An, X. Li, Curcumin inhibits tumor proliferation induced by neutrophil elastase through the upregulation of $\alpha 1$ -antitrypsin in lung cancer, *Mol. Oncol.* 6 (2012) 405–417.
- [11] B. Goulet, Y. Markovic, L. Leduy, A. Nepveu, Proteolytic processing of cut Homeobox 1 by neutrophil elastase in the MV4;11 myeloid leukemia cell line, *Mol. Cancer Res.* 6 (4) (2008) 644–653.
- [12] Y. Wada, K. Yoshida, Y. Tsutani, H. Shigematsu, M. Oeda, Y. Sanada, T. Suzuki, H. Mizuri, Y. Hamai, K. Tanabe, K. Ukou, J. Hihara, Neutrophil elastase induces cell proliferation and migration by the release of TGF- α , PDGF and VEGF in esophageal cell lines, *Oncol. Rep.* 17 (2007) 161–167.
- [13] Y.-Y. He, J.-J. Huang, C.F. Chignell, Cleavage of epidermal growth factor receptor by caspase during apoptosis is independent of its internalization, *Oncogene* 25 (10) (2006) 1521–1531.
- [14] S.S. Bae, J.H. Choi, Y.S. Oh, D.K. Perry, S.H. Ryu, P.-G. Suh, Proteolytic cleavage of epidermal growth factor receptor by caspases, *FEBS Lett.* 491 (2001) 16–20.
- [15] A.H.E. Hassan, E. Choi, Y.M. Yoon, K.W. Lee, S.Y. Yoo, M.Ch. Cho, J.S. Yang, H. I. Kim, J.Y. Hong, J.-S. Shin, K.-S. Chung, J.-H. Lee, K.-T. Lee, Y.S. Lee, Natural products hybrids: 3,5,4'-Trimethoxystilbene-5,6,7-trimethoxyflavone chimeric analogs as potential cytotoxic agents against diverse human cancer cells, *Eur. J. Med. Chem.* 161 (2019) 559–580.
- [16] A.H.E. Hassan, S.Y. Yoo, K.W. Lee, Y.M. Yoon, H.W. Ryu, Y. Jeong, J.-S. Shin, S.-Y. Kang, S.-Y. Kim, H.-H. Lee, B.Y. Park, K.-T. Lee, Y.S. Lee, Repurposing mosloflavone/5,6,7-trimethoxyflavone-resveratrol hybrids: discovery of novel p38- α MAPK inhibitors as potent interceptors of macrophage-dependent production of proinflammatory mediators, *Eur. J. Med. Chem.* 180 (2019) 253–267.
- [17] A.H.E. Hassan, K.-T. Lee, Y.S. Lee, Flavone-based arylamides as potential anticancers: design, synthesis and in vitro cell-based/cell-free evaluations, *Eur. J. Med. Chem.* 187 (2020) 111965.
- [18] A.K. Farag, A.H.E. Hassan, K.-S. Chung, J.-H. Lee, H.-S. Gil, K.-T. Lee, E.J. Roh, Diarylurea derivatives comprising 2,4-diarylpyrimidines: discovery of novel potential anticancer agents via combined failed-ligands repurposing and molecular hybridization approaches, *Bioorg. Chem.* 103 (2020) 104121.
- [19] J.Y. Hong, K.-S. Chung, J.-S. Shin, J.-H. Lee, H.-S. Gil, H.-H. Lee, E. Choi, J.-H. Choi, A.H.E. Hassan, Y.S. Lee, K.-T. Lee, The anti-proliferative activity of the hybrid TMS-TM-4f compound against human cervical cancer involves apoptosis mediated by STAT3 inactivation, *Cancers* 11 (2019) 1927.
- [20] H. Aziz, A. Mahmood, S. Zaib, A. Saeed, Z. Shafiq, J. Pelletier, J. Sévigny, J. Iqbal, Synthesis, characterization, in vitro tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) and intestinal alkaline phosphatase (IAP) inhibition studies and computational evaluation of novel thiazole derivatives, *Bioorg. Chem.* 102 (2020) 104088.
- [21] H. Aziz, A. Mahmood, S. Zaib, A. Saeed, H.R. El-Seedi, J. Pelletier, J. Sévigny, J. Iqbal, Synthesis, characterization, alkaline phosphatase inhibition assay and molecular modeling studies of 1-benzylidene-2-(4-tert-butylthiazol-2-yl)hydrazines, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2020), <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1802336>.
- [22] L.R.P. de Siqueira, P.A.T. de Moraes Gomes, L.P. de Lima Ferreira, M.J.B. de Melo Rego, A.C.L. Leite, Multi-target compounds acting in cancer progression: focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues, *Eur. J. Med. Chem.* 170 (2019) 237–260.
- [23] Krzysztof Z. Łączkowski, Joanna Anusiak, Marta Świątalska, Katarzyna Dziłko, Joanna Cytarska, Angelika Baranowska-Łączkowska, Tomasz Plech, Agata Paneth, Joanna Wietrzyk, Joanna Białczyk, Synthesis, molecular docking, ctDNA interaction, DFT calculation and evaluation of antiproliferative and anti-Toxoplasma gondii activities of 2,4-diaminotriazine-thiazole derivatives, *Med. Chem. Res.* 27 (4) (2018) 1131–1148.
- [24] K. Piechowska, M. Świątalska, J. Cytarska, K. Jaroń, K. Łuczkiński, J. Chałupka, J. Wietrzyk, K. Misiura, B. Bojko, S. Kruszewski, K.Z. Łączkowski, Discovery of tropinone-thiazole derivatives as potent caspase 3/7 activators, and noncompetitive tyrosinase inhibitors with high antiproliferative activity: rational design, one-pot tricomponent synthesis, and lipophilicity determination, *Eur. J. Med. Chem.* 175 (2019) 162–171.
- [25] Temístocles Italo de Santana, Miria de Oliveira Barbosa, Paulo André Teixeira de Moraes Gomes, Anne Cecília Nascimento da Cruz, Teresinha Gonçalves da Silva, Ana Cristina Lima Leite, Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 144 (2018) 874–886.
- [26] T.A. Farghaly, G.S. Masaret, Z.A. Muhammad, M.F. Harras, Discovery of thiazole-based-chalcones and 4-hetarylthiazoles as potent anticancer agents: Synthesis, docking study and anticancer activity, *Bioorg. Chem.* 98 (2020) 103761.
- [27] J.B. Bartlett, K. Drege, A.G. Dalglish, The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 314–322.
- [28] K.Z. Łączkowski, A. Baranowska-Łączkowska, Recent studies on the thalidomide and its derivatives, *Future Med. Chem.* 10 (2018) 2133–2136.
- [29] Seema Singhal, Jayesh Mehta, Raman Desikan, Dan Ayers, Paula Roberson, Paul Eddlemon, Nikhil Munshi, Elias Anaisie, Carla Wilson, Madhav Dhodapkar, Jerome Zeldis, David Siegel, John Crowley, Bart Barlogie, Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma, *N. Engl. J. Med.* 341 (21) (1999) 1565–1571.
- [30] S. Belluti, G. Ortea, V. Semeghini, G. Rigillo, F. Parenti, E. Ferrari, C. Imbriano, Potent anti-cancer properties of phthalimide-based curcumin derivatives on prostate tumor cells, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 28.
- [31] Magdy A.H. Zahran, Yasmin G. Abdin, Amany M.A. Osman, Amira M. Gamal-Eldeen, Roba M. Talaat, Erik B. Pedersen, Synthesis and evaluation of thalidomide and phthalimide esters as antitumor agents, *Arch. Pharm.* 347 (9) (2014) 642–649.
- [32] Wenlu Li, Chummei Gao, Lei Zhao, Zigao Yuan, Yuzong Chen, Yuyang Jiang, Phthalimide conjugations for the degradation of oncogenic PI3K, *Eur. J. Med. Chem.* 151 (2018) 237–247.
- [33] Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso, Diogo Rodrigo Magalhães Moreira, Gevanio Bezerra Oliveira Filho, Suellem Melo Tiburelo Cavalcanti, Lucas Cunha Duarte Coelho, José Wanderlan Pontes Espíndola, Laura Rubio Gonzalez, Marcelo Montenegro Rabello, Marcelo Zaldini Fernandes, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, Cláudia Pessoa, Carlos Alberto de Simone, Elisavie Teixeira Guimarães, Milena Botelho Pereira Soares, Ana Cristina Lima Leite, Design, synthesis and structure-activity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities, *Eur. J. Med. Chem.* 96 (2015) 491–503.
- [34] Efrat Resnick, Anthony Bradley, Jinruai Gan, Alice Doungamath, Tobias Krojer, Ritika Sethi, Paul P. Geurink, Anthony Aimon, Gabriel Amitai, Dom Bellini, James Bennett, Michael Fairhead, Oleg Fedorov, Ronen Gabizon, Jin Gan, Jingxu Guo, Alexander Plotnikov, Nava Reznik, Gian Filippo Ruda, Laura Díaz-Sáez, Verena M. Straub, Tamas Szommer, Srikanthasasan Velupillai, Daniel Zaidman, Yanling Zhang, Alun R. Coker, Christopher G. Dowson, Haim M. Barr, Chu Wang, Kilian V.M. Huber, Paul E. Brennan, Huib Ovaa, Frank von Delft, Nir London, Rapid covalent-probe discovery by electrophile-fragment screening, *J. Am. Chem. Soc.* 141 (22) (2019) 8951–8968.
- [35] Zheng Zhao, Philip E. Bourne, Progress with covalent small-molecule kinase inhibitors, *Drug Discov. Today* 23 (3) (2018) 727–735.
- [36] K. Ramkumar, S. Samanta, A. Kyani, S. Yang, S. Tamura, E. Ziemke, J.A. Stuckey, S. Li, K. Chinnaswamy, H. Otake, B. Debnath, V. Yarovenko, J.S. Sebolt-Leopold, M. Ljungman, N. Neamati, Mechanistic evaluation and transcriptional signature of a glutathione S-transferase omega 1 inhibitor, *Nat. Commun.* 7 (2016) 13084.
- [37] Eyal Mishani, Galith Abourbeh, Orit Jacobson, Samar Dissoki, Revital Ben Daniel, Yulia Rozen, Mazal Shaul, Alexander Levitzki, High-affinity epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) irreversible inhibitors with diminished chemical reactivities as Positron Emission Tomography (PET)-imaging agent candidates of EGFR overexpressing tumors, *J. Med. Chem.* 48 (16) (2005) 5337–5348.
- [38] A.M. Malebari, D. Fayne, S.M. Nathwani, F. O'Connell, S. Noorani, B. Twamley, N. M. O'Boyle, J. O'Sullivan, D.M. Zisterer, M.J. Meegan, β -Lactams with antiproliferative and antiapoptotic activity in breast and chemoresistant colon cancer cells, *Eur. J. Med. Chem.* 189 (2020) 112050.
- [39] John C. Eriks, Henk Van der Goot, Geert Jan Sterk, Hendrik Timmerman, Histamine H2-receptor agonists. Synthesis, in vitro pharmacology, and qualitative structure-activity relationships of substituted 4- and 5-(2-aminoethyl)thiazoles, *J. Med. Chem.* 35 (17) (1992) 3239–3246.
- [40] Stephanie Russell, Raphaël Rahmani, Amy J. Jones, Harriet L. Newton, Kevin Neilde, Ignacio Cotillo, Marzieh Rahmani Khajouei, Lori Ferrins, Sana Qureshi, Nghi Nguyen, Maria S. Martinez-Martinez, Donald F. Weaver, Marcel Kaiser, Jennifer Riley, John Thomas, Manu De Rycker, Kevin D. Read, Gavin R. Flematt, Eileen Ryan, Scott Tanghe, Ana Rodriguez, Susan A. Charman, Albane Kessler, Vicky M. Avery, Jonathan B. Baell, Matthew J. Piggott, Hit-to-lead optimization of a novel class of potent, broad-spectrum Trypanosomacides, *J. Med. Chem.* 59 (21) (2016) 9686–9720.
- [41] K.Z. Łączkowski, K. Misiura, M. Świątalska, J. Wietrzyk, A. Baranowska-Łączkowska, B. Fernández, A. Paneth, T. Plech, Synthesis and in vitro antiproliferative activity of thiazole-based nitrogen mustards. The hydrogen

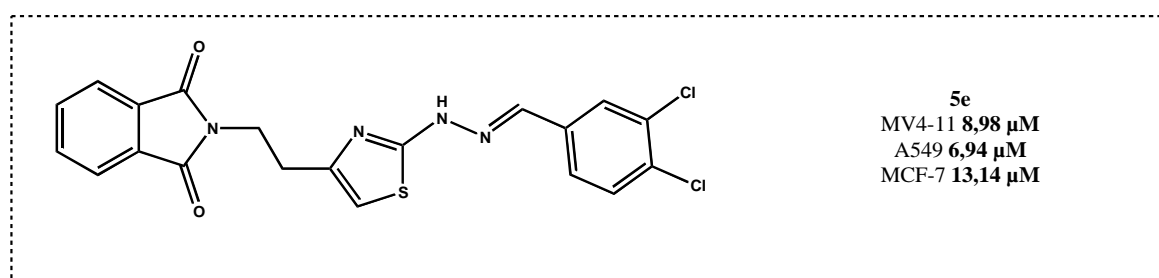
- bonding interaction between model systems and nucleobases, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 14 (2014) 1271–1281.
- [42] L.V. Rubinstein, R.H. Shoemaker, K.D. Paull, R.M. Simon, S. Tosini, P. Skehan, D. A. Scudiero, A. Monks, M.R. Boyd, Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines, *J. Nat. Cancer Inst.* 82 (13) (1990) 1113–1117.
- [43] J. Bramson, A. McQuillan, R. Aubin, M. Alaoui-Jamali, G. Batist, G. Christodouloupolos, L.C. Panasci, Nitrogen mustard drug resistant B-cell chronic lymphocytic leukemia as an in vivo model for crosslinking agent resistance, *Mut. Res.* 336 (3) (1995) 269–278.
- [44] Katarzyna Sidoryk, Marta Świtalska, Joanna Wietrzyk, Anna Jaromin, Magdalena Piętka-Ottlik, Piotr Cmoch, Joanna Zagrodzka, Wojciech Szczepek, Łukasz Kaczmarek, Wanda Peczyńska-Czoch, Synthesis and biological evaluation of new amino acid and dipeptide derivatives of neoptolepine as anticancer agents, *J. Med. Chem.* 55 (11) (2012) 5077–5087.
- [45] Kyung Eun Lee, Shiv Bharadwaj, Umesh Yadava, Sang Gu Kang, Evaluation of caffeine as inhibitor against collagenase, elastase and tyrosinase using in silico and in vitro approach, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 34 (1) (2019) 927–936.
- [46] A.R.S. Butt, M.A. Abbasi, S.Z. Aziz-ur-Rehman, M. Siddiqui, H. Hassan, S.A. A. Raza, S.-Y. Seo Shah, Synthesis and structure-activity relationship of elastase inhibiting novel ethylated thiazole-triazole acetamide hybrids: Mechanistic insights through kinetics and computational contemplations, *Bioorg. Chem.* 86 (2019) 197–209.
- [47] M. Psurski, Ł. Janczewski, M. Świtalska, A. Gajda, T.M. Goszczyński, J. Oleksyszyn, J. Wietrzyk, T. Gajda, Novel phosphonate analogs of sulforaphane: synthesis, in vitro and in vivo anticancer activity, *Eur. J. Med. Chem.* 132 (2017) 63–80.
- [48] M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminformatics* 4 (2012) 17.
- [49] A.K. Rappe, C.J. Casewit, K.S. Colwell, W.A. Goddard, W.M. Skiff, UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (25) (1992) 10024–10035.
- [50] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 455–461.
- [51] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A. J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791.
- [52] G. Bianco, S. Forli, D.S. Goodsell, A.J. Olson, Covalent docking using autodock: two-point attractor and flexible side chain methods, *Protein Sci.* 25 (2016) 295–301.
- [53] A.B. Denisova, V.A. Bakulev, W. Dehaen, S. Toppet, L. Van Meervelt, M.I. Kodess, Acylation and carbamoylation of 2-hydrazinothiazole derivatives. Identification of isomeric structures, *Russ. J. Org. Chem.* 41 (4) (2005) 584–590.
- [54] R. Mezencev, Interactions of cisplatin with non-DNA targets and their influence on anticancer activity and drug toxicity: the complex world of the platinum complex, *Curr. Cancer Drug Targets* 14 (2014) 794–816.
- [55] Anastasia De Luca, Lorian J. Parker, Wee Han Ang, Carlo Rodolfo, Valentina Gabbarini, Nancy C. Hancock, Francesca Palone, Anna P. Mazzetti, Laure Menin, Craig J. Morton, Michael W. Parker, Mario Lo Bello, Paul J. Dyson, A structure-based mechanism of cisplatin resistance mediated by glutathione transferase P1–1, *PNAS* 116 (28) (2019) 13943–13951.
- [56] Omar Peña-Morán, María Villarreal, Laura Álvarez-Berber, Angélica Meneses-Acosta, Verónica Rodríguez-López, Cytotoxicity, post-treatment recovery, and selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on breast cancer cell lines, *Molecules* 21 (8) (2016) 1013, <https://doi.org/10.3390/molecules21081013>.
- [57] B. Donarska, K.Z. Łączkowski, Recent advances in the development of elastase inhibitors, *Future Med. Chem.* 12 (20) (2020) 1809–1813.
- [58] D. Guillaume, T.N.T. Huynh, C. Denhez, K.P.P. Nguyen, A. Belaaouaj, Triterpenoids as neutrophil elastase inhibitors, *Nat. Prod. Commun.* 10 (2015) 167–170.
- [59] Yigong Shi, Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view, *Protein Sci.* 13 (8) (2004) 1979–1987.
- [60] Klaus-Michael Debatin, Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy, *Cancer Immunol. Immunother.* 53 (3) (2004) 153–159.
- [61] M. Poreba, P. Kasperkiewicz, S.J. Snipas, D. Fasci, G.S. Salvesen, M. Drag, Unnatural amino acids increase sensitivity and provide for the design of highly selective caspase substrates, *Cell Death Differ.* 21 (9) (2014) 1482–1492.

W **publikacji II** otrzymano pochodne talidomidu o strukturach **A-C (Rycina 25)** zawierające układy farmakoforowe ftalimidu i tiazolu, będące zasadami Schiffa, które będą wykazywać aktywność przeciwnowotworową i hamującą aktywność elastazy.

W celu ich otrzymania ftalimid poddano reakcji z metylowinyloketonem w obecności etanolanu sodu jako katalizatora, a uzyskany z wysoką wydajnością (83%) 2-(3-oksobutylo)ftalimid poddano dalszej reakcji bromowania, co doprowadziło do uzyskania z równie wysoką wydajnością (87%) 2-(4-bromo-3-oksobutylo)ftalimidu. Następnie wykorzystując reakcję Hantzsch, obejmującą reakcje kondensacji z dichloropodstawionymi tiosemikarbazonami benzaldehydu, otrzymano 6 związków **serii A** z wydajnością w zakresie 67-92%. Następnie w celu wprowadzenia do struktury cząsteczek grupy chloroacetamidowe, związki **serii A** poddano reakcji z chlorkiem chloroacetylu w obecności trietyloaminy, ogrzewając mieszaninę reakcyjną przez 4 godziny w dioksanie otrzymując związki **serii B** z wydajnością około 85%. Kolejnym krokiem było otrzymanie związków **serii C** poprzez dwuetapową syntezę obejmującą reakcje 2-(3-oksobutylo)ftalimidu z tiosemikarbazodem w absolutnym alkoholu etylowym zawierającym katalityczną ilość lodowatego kwasu octowego, w wyniku której otrzymano hydrazynokarbotioamid z 92% wydajnością. Następnie uzyskany związek poddano cyklizacji z 2,4-dichloro- i 3,4-dichloropodstawionymi bromoacetofenonami, w roztworze etanolowym w temperaturze wrzenia roztworu, uzyskując związki **serii C** z wydajnością 55-63%. Wysoką czystość związków uzyskano poprzez rekrytalizację z alkoholu etylowego.

Nowo zsyntezowane związki **serii A-C** przebadano pod kątem aktywności antyproliferacyjnej. Otrzymane rezultaty wykazały, że przedstawione pochodne charakteryzują się wysoką aktywnością antyproliferacyjną wobec wszystkich badanych linii komórek nowotworowych tj. MV4-11, A549 oraz MCF-7. Związki **5a-5f serii A** zawierające w układzie pierścienie ftalimidu, tiazolu oraz pierścienie dichlorofenyłowe wykazywały najwyższą aktywność wobec linii komórek raka płuc A549 z IC_{50} 6,69-23,38 μM oraz wobec linii komórek białaczki szpikowej MV4-11 z IC_{50} dla związków **5a-5e** w zakresie od 8,9 μM do 16,10 μM i 38,69 μM dla związku **5f**. Dodatkowo związki **5a** i **5b** zawierające w układzie pierścieni 2,3- i 2,4-dichlorofenyłowy wykazały najniższą toksyczność wobec komórek zdrowych,

z jednocześnie najwyższym indeksem selektywności (SI) odpowiednio 11,92 i 10,80 co wskazuje, że związki te mogą być najbardziej efektywne i bezpieczne w warunkach *in vivo*. W porównaniu z lekiem referencyjnym - cisplatiną, związki te wykazywały tylko około 4-krotnie niższą aktywność antyproliferacyjną wobec komórek nowotworowych z jednoczesną kilkunastokrotną mniejszą toksycznością wobec komórek zdrowych. Związek **5e (Rycina 26)** zawierający podstawnik 3,4-dichlorofenyłowy spośród związków **serii A** wykazywał najwyższą aktywność wobec wszystkich linii komórek nowotworowych z IC_{50} w zakresie 6,94-13,14 μM , będąc tylko około 2-krotnie słabszy niż cisplatina wobec komórek A549 i MCF-7.

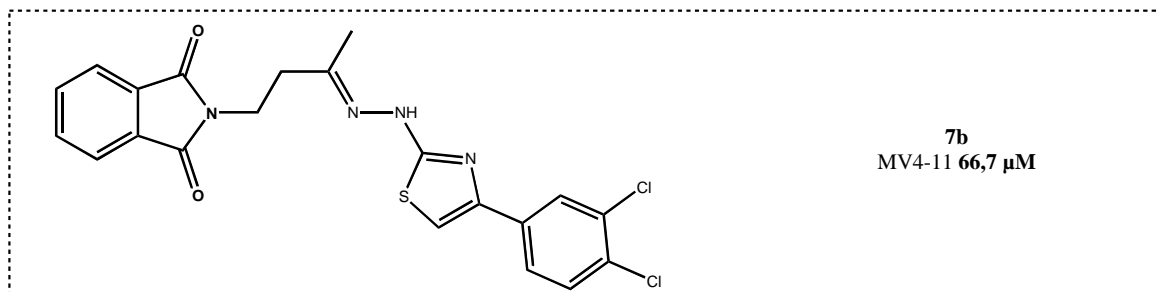


Rycina 26. Najaktywniejszy związek **serii A**

Kolejną zaprojektowaną serią związków była **seria B (związki 6a-6f)**, którą otrzymano poprzez wprowadzenie do struktury związków **5a-5f** podstawnika chloroacetamidowego. Zabieg ten poskutkowało otrzymaniem związków o wyższej sile działania antyproliferacyjnego wobec linii komórek MV4-11 w porównaniu ze związkami wyjściowymi, z IC_{50} w zakresie 5,56-8,82 μM . Dodatkowo pochodne **6a-6d** charakteryzowały się dobrym indeksem selektywności w zakresie 3,54-5,94. Spośród związków **serii B** najaktywniejsze wobec badanych linii komórek nowotworowych okazały się pochodne **6e** i **6f** zawierające 3,4-dichloro i 3,5-dichloropodstawione pierścienie fenyłowe, z IC_{50} odpowiednio w zakresie 8,66-18,69 μM oraz 5,81-9,41 μM .

Poprzez bezpośrednie przyłączenie do pierścienia tiazolu podstawnika dichlorofenyłowego oraz wprowadzenie dłuższego łańcucha alifatycznego otrzymano pochodne **serii C**. Taka zmiana struktury zaprojektowanych pochodnych spowodowała drastyczny spadek aktywności antyproliferacyjnej związków. Pochodne **7a** i **7b** wykazywały aktywność cytotoksyczną jedynie wobec linii komórek MV4-11, wobec pozostałych komórek były

nieaktywne. Najaktywniejszym związkiem **serii C (Rycina 27)** okazała się pochodna **7b**, zawierająca podobnie jak najaktywniejszy związek **serii A** podstawnik 3,4-dichlorofenylowy.



Rycina 27. Najaktywniejszy związek **serii C**

Reasumując, w stosunku do linii komórek MV4-11 wszystkie zaprojektowane pochodne z wyjątkiem związków **5f**, **7a** i **7b** wykazywały bardzo wysoką aktywność przeciwnowotworową z IC_{50} w zakresie 5,56-16,10 μM , a spośród nich wysoce selektywne okazały się pochodne **5a**, **5b** i **5d**. W stosunku do linii komórek A549 najaktywniejsze okazały się pochodne **serii A i B** z grupami 3,4-dichloro- (**5e** i **6e**) z IC_{50} odpowiednio 6,94 μM i 6,69 μM oraz 3,5-dichlorofenylowymi (**5f** i **6f**) z IC_{50} odpowiednio 9,41 μM i 10,41 μM . Wobec linii komórek raka piersi MCF-7 najwyższą cytotoksyczność wykazywał związek **6f** **serii B** ($\text{IC}_{50}=9,06 \mu\text{M}$) oraz związek **5e** **serii A** ($\text{IC}_{50}=13,14 \mu\text{M}$).

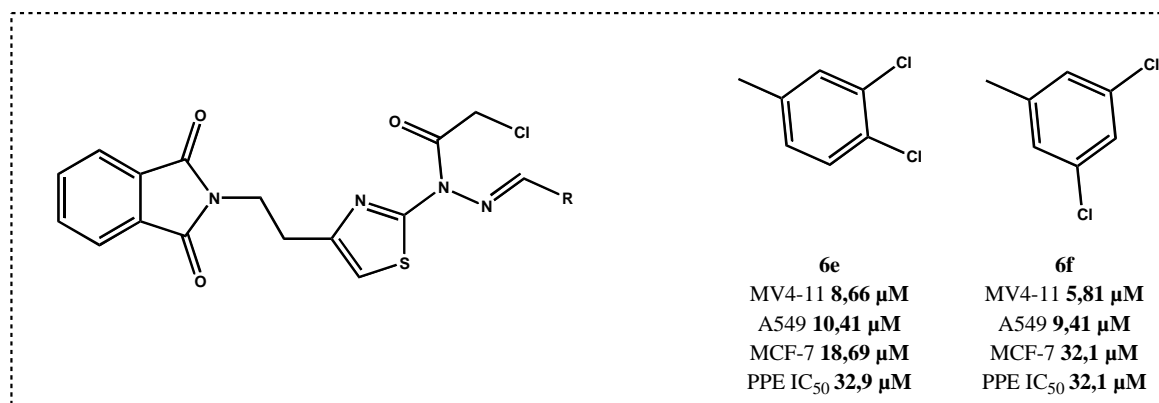
Analizując strukturę oraz aktywność związków **serii A-C** wobec badanych linii komórek nowotworowych można stwierdzić, że:

- 1) na aktywność antyproliferacyjną duży wpływ miał sposób rozmieszczenia atomów chloru w pierścieniu fenylowym,
- 2) wprowadzenie do układu pierścienia 3,4- i 3,5-dichlorofenylowego prowadziło do zwiększenia aktywności antyproliferacyjnej wobec wszystkich linii komórek nowotworowych,
- 3) podstawniki 2,3- i 2,4-dichlorowe w pierścieniu fenylowym wpływały na aktywność związków w zależności od badanej linii komórek nowotworowych tj. wzrost aktywności obserwowano w przypadku komórek MV4-11, a odwrotną zależność zaobserwowano dla komórek A549 i MCF-7, gdzie wprowadzenie tych podstawników w strukturę **serii A i B** znacząco zmniejszyło aktywność związków,

4) na aktywność antyproliferacyjną zaprojektowanych pochodnych oprócz podstawników w pierścieniu fenylowym wpływ miał sposób łączenia i rozmieszczenia w cząsteczce grup farmakoforowych, najkorzystniejszy z punktu widzenia aktywności przeciwnowotworowej jest układ związków **serii B**.

Dla związków **serii B 6a-6f** wykazujących najwyższą aktywność antyproliferacyjną wobec badanych linii komórek nowotworowych przeprowadzono szereg badań w celu wyjaśnienia prawdopodobnego mechanizmu działania związków.

Pierwszym badaniem było określenie zdolności pochodnych **6a-6f** do hamowania aktywności elastazy trzustkowej za pomocą metody spektrofotometrycznej i porównanie ich aktywności do kwasu oleanolowego, jako inhibitora referencyjnego. Spośród badanych związków najaktywniejsze okazały się pochodne **6f**, **6e** i **6c** wykazujące IC_{50} w zakresie 32,1-35,3 μM . Pochodne te wykazywały tylko o połowę niższą aktywność niż kwas oleanolowy. Dodatkowo wykazano, że badane związki charakteryzują się mieszanym mechanizmem inhibicji elastazy, co oznacza, że związki te mogą wiązać się z enzymem niezależnie czy enzym związał substrat, czy nie. Podobnie jak w przypadku działania antyproliferacyjnego pochodne zawierające w układzie podstawniki 3,4- i 3,5-dichlorofenyłowe wykazywały najwyższą aktywność inhibującą elastazę (**Rycina 28**).



Rycina 28. Najaktywniejsze związki **serii B**

Przeprowadzone badania dokowania molekularnego dla związków **serii B** umożliwiły określenie energii wiązania związków do miejsca aktywnego pięciu różnych struktur elastazy (1bma, 1hv7, 1qnj, 2de9, 2h1u) uzyskane z bazy PDB (Protein Data Bank). Wszystkie uzyskane energie wiązania wykazywały zbliżoną wartość w zakresie

od -7,1 do -8,1 kcal/mol. Najsilniejsze wiązanie z enzymem wykazywał związek **6f** z energią wiązania -8,12 kcal/mol, a najsłabsze związek **6b** (-7,1 kcal/mol). Należy zaznaczyć, że uzyskane wyniki dokowania molekularnego ściśle korelują z eksperymentalnie wyznaczonymi wartościami IC₅₀.

Dodatkowo zidentyfikowano wzór oddziaływania z wnęką wiążącą elastazy. Analizie poddano oddziaływania białko-ligand, które mają miejsce gdy odległość pomiędzy odpowiadającymi im parami atomów jest mniejsza niż 0,4 nm. Wyniki wskazują na następujące korzystne typy oddziaływań:

- pierścień ftalimidowy z Thr175, Trp172, Phe215 (oddziaływania typu π - π i H- π) – główne miejsce zakotwiczenia ligandu w miejscu wiązania enzymu,
- ugrupowanie dichlorofenyłowe i Thr147, Cys220, Gln192, Ser217, Arg217, Val216 (oddziaływania niespecyficzne),
- pierścień tiazolowy oraz linkery alifatyczne i Val99, Ser214, Val216, Gln192 (oddziaływania niespecyficzne).

Oprócz standardowego dokowania molekularnego przeprowadzono kowalencyjne dokowanie związków **serii B** do wybranych struktur elastazy. W tym przypadku nie uzyskano podobnej korelacji wartości IC₅₀ z wynikami dokowania, co wskazuje na małe prawdopodobieństwo występowania kowalencyjnych interakcji w mechanizmie wiązania ligandu.

Kolejnym badaniem była ocena zdolności związków **6a-6f** do aktywacji kaspazy 3/7. Pomiar przeprowadzono metodą spektrofluorymetryczną na komórkach linii raka płuc A549. Wykazano, że na zdolność badanych pochodnych do aktywacji kaspazy 3/7 znaczący wpływ ma sposób podstawienia atomów chloru w pierścieniu fenyłowym. Największy wpływ na aktywność kaspazy miał związek **6e** zawierający podstawnik 3,4-dichlorofenyłowy, zwiększał on aktywność enzymu prawie 16-krotnie, co łączy się z jego wysoką aktywnością antyproliferacyjną i inhibującą elastazę. Kolejno związki **6a** i **6b** z pierścieniami 2,3-dichloro- i 2,4-dichlorofenyłowymi wykazywały umiarkowany wpływ na aktywność kaspazy, zwiększając ją około 3- do 4-krotnie. Co ciekawe pozostałe związki **serii B** w stężeniu 20 μ g/ml nie wykazywały zdolności do aktywacji kaspazy w komórkach A549. Interesujący jest fakt, że związek **6f** (3,5-dichloro-) wykazujący podobnie, jak związek **6e** (3,4-dichloro-) wysoką aktywność antyproliferacyjną oraz hamującą elastazę, nie wykazywał zdolności

do aktywacji kaspazy 3/7, co potwierdza znaczący wpływ rodzaju podstawnika w pierścieniu fenylowym na aktywność tych związków.

Dalej poszukując możliwych mechanizmów działania związków **serii B** poddano je badaniu na zdolność do inhibicji EGFR. Badanie wykonano za pomocą testu ELISA z wykorzystaniem komórek A549, jako źródła enzymu. Kolejny raz potwierdzone zostało znaczenie sposobu podstawienia atomów chloru w pierścieniu fenylowym cząsteczki na jej aktywność. Spośród badanych związków pochodna **6f**, zawierająca podstawnik 3,5-dichlorofenylowy, wykazywała najwyższą zdolność do obniżenia poziomu EGFR w komórkach A549, dokładnie o 31%. Należy zauważyć, że związek ten działa selektywnie wobec EGFR, nie wykazując aktywności wobec kaspazy 3/7. Pozostałe pochodne **serii B 6c-6d** obniżały poziom EGFR o około 15-16%, a związki **6a** i **6b** poniżej 4%. Związek **6e** o wysokiej aktywności cytotoksycznej oraz zdolności do aktywacji kaspazy 3/7 wykazywał niską skuteczność wobec hamowania EGFR.

Badania przeprowadzone w **publikacji II** dowiodły, że związki zawierające w cząsteczce ugrupowania ftalimidu, tiazolu oraz chloroacetamidu są obiecującymi kandydatami dla nowych związków przeciwnowotworowych wykazujących zdolność do inhibicji elastazy, a ich aktywność można modyfikować przez odpowiednio podstawione pierścienie fenyłowe.

2. Publikacja III: Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity



Article

Spectrofluorimetric and Computational Investigation of New Phthalimide Derivatives towards Human Neutrophil Elastase Inhibition and Antiproliferative Activity

Beata Donarska ¹, Marta Świtalska ², Joanna Wietrzyk ² , Wojciech Płaziński ^{3,4} and Krzysztof Z. Łączkowski ^{1,*}

¹ Department of Chemical Technology and Pharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, Poland

² Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, Poland

³ Jerzy Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry, Polish Academy of Sciences, Niezapominajek 8, 30-239 Cracow, Poland

⁴ Department of Biopharmacy, Medical University of Lublin, Chodzki 4a, 20-093 Lublin, Poland

* Correspondence: krzysztof.laczkowski@cm.umk.pl

Abstract: Herein, nine phthalimide-based thiazoles (**4a–4i**) were synthesized and investigated as new human neutrophil elastase (HNE) inhibitors using spectrofluorimetric and computational methods. The most active compounds containing 4-trifluoromethyl (**4c**), 4-naphthyl (**4e**) and 2,4,6-trichloro (**4h**) substituents in the phenyl ring exhibited high HNE inhibitory activity with IC₅₀ values of 12.98–16.62 μM. Additionally, compound **4c** exhibited mixed mechanism of action. Computational investigation provided a consistent picture of the ligand-receptor pattern of inter-actions, common for the whole considered group of compounds. Moreover, compounds **4b**, **4c**, **4d** and **4f** showed high antiproliferative activity against human cancer cells lines MV4-11, and A549 with IC₅₀ values of 8.21 to 25.57 μM. Additionally, compound **4g** showed high activity against MDA-MB-231 and UMUC-3 with IC₅₀ values of 9.66 and 19.81 μM, respectively. Spectrophotometric analysis showed that the most active compound **4c** demonstrated high stability under physiological conditions.

Keywords: spectrofluorimetric method; human neutrophil elastase; antiproliferative activity; phthalimide; thiazole



Citation: Donarska, B.; Świtalska, M.; Wietrzyk, J.; Płaziński, W.; Łączkowski, K.Z. Spectrofluorimetric and Computational Investigation of New Phthalimide Derivatives towards Human Neutrophil Elastase Inhibition and Antiproliferative Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 110. <https://doi.org/10.3390/ijms24010110>

Academic Editors: Dharmendra Kumar Yadav, Paolo Coghi and Xingxing Fan

Received: 29 October 2022

Revised: 15 December 2022

Accepted: 16 December 2022

Published: 21 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Tumor cells interact with surrounding tissues leading to changes in their structure and biochemistry, resulting in a specific tumor microenvironment that can stimulate tumor growth. The tumor microenvironment includes the surrounding blood vessels, immune cells, fibroblasts, signaling molecules and the extracellular matrix (ECM). Recently, processes in the tumor microenvironment have been an important point of interest in the search for new anticancer drugs [1]. In this context, neutrophils, which in response to cytokines and chemokines secreted by the tumor are released from the bone marrow and richly infiltrate the tumor microenvironment, become interesting. Increased activity of tumor-associated neutrophils (TANs) has been shown to be associated with faster tumor progression, angiogenesis and reduced survival in various types of cancer [2].

Tumor-associated neutrophils are capable of forming neutrophil extracellular traps (NETs), which under physiological conditions play an important role in defense against infection, and in the case of tumors can stimulate metastasis and angiogenesis [3]. NETs consist of secreted nuclear DNA supplied with proteases and various inflammatory mediators [4].

An important component of NETs are neutrophil serine proteases (NSPs), which include neutrophil elastase (NE), cathepsin G and proteinase 3. These homologous enzymes

belong to the chymotrypsin family, which contains aspartate, histidine and serine residues in the active site [5]. The most abundant serine protease in neutrophils is elastase, which has broad substrate specificity [6]. Potential substrates of NE are components of the extracellular matrix mainly elastin, fibrin, fibronectin, as well as various proteins, i.e., coagulation factors, immunoglobulins and cytokines. Under physiological conditions, elastase together with another neutrophil serine proteases, plays an important role in the immune response during infection or in modulating the inflammatory process, and its activity is controlled by its endogenous inhibitors, i.e., α 1-antitrypsin or elafin [7,8]. An imbalance between elastase activity and its inhibitors can cause many inflammatory pathological processes such as cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease, atherosclerosis or arthritis [9–11]. Increased elastase activity has also been marked in the pathomechanism of various types of cancer. Using the LSK-K-ras mouse model of lung adenocarcinoma as an example, it was shown that mice lacking the ELANE gene (encoding neutrophil elastase) had a higher surface survival rate compared to ELANE (+) mice. In addition, NE was shown to stimulate tumor cell proliferation by degrading the insulin receptor substrate-1 (IRS-1), resulting in an increased interaction between phosphatidylinositol kinase-3 (PI3K) and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) [12]. Neutrophil elastase also plays an important role in the development of acute promyelocytic leukemia (APL). It has been recently shown that neutrophil elastase stimulates proliferation and exhibits anti-apoptotic effects in cells of leukemia lines K562 and U937, and that the treatment of cells with the specific elastase inhibitor GW311616A led to inhibition of cell growth and induction of apoptosis [13]. Another study demonstrated that increased NE expression and levels were also found in tissues and sera collected from patients with colorectal cancer (CRC). In addition, tumor volume was compared in two xenografts with and without Sivelestat administration. The results proved that Sivelestat, an elastase inhibitor, significantly reduced tumor growth [14]. In breast cancer, increased elastase activity was found in tumor cells and overexpression of elafin, a specific elastase inhibitor, resulted in inhibition of proliferation and reduction in tumor size [15]. It has also been confirmed that neutrophil elastase stimulates proliferation, migration and invasion of other types of cancer cells including prostate cancer and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) [16,17].

Taking into account the involvement of elastase in the development of many types of cancer, it becomes interesting to search for new compounds with anticancer activity with synergistic elastase inhibitory activity. Among the already known elastase inhibitors are such compounds as 1H-pyrrolo [2,3-b] pyridines [18], isoxazolones [19], ethylated thiazole-triazole acetamides [20], indoles [21] and cinnolines derivatives [22]. Interesting elastase inhibitors include cyclic depsipeptides such as loggerpeptins A-C and molassamide isolated from marine cyanobacteria, which in addition to their high inhibitory activity against neutrophil elastase also inhibited the migration of highly invasive MDA-MB-231 breast cancer cells [23].

An interesting pharmacophore in the search for compounds with different biological activities is phthalimide. The best-known compound containing this moiety is Thalidomide, an agent used in the 1960s as a sedative and antiemetic for pregnant women, withdrawn from the market due to teratogenic effects [24]. However, it is a great example of drug repositioning, as subsequent studies on thalidomide have led to the discovery of its pleiotropic biological activity. Thalidomide has been shown to be an inhibitor of peptidases, glucosidase and COX, it decreases the activity of the important pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), and also exhibits antiangiogenic and proapoptotic activity. The discovered potent antineoplastic and immunomodulatory properties have led to the application of Thalidomide and its derivatives in the therapy of multiple myeloma, erythema nodosum, as well as in studies on the use of this compound in other types of cancer, including haematological ones [25]. Such broad biological activity of Thalidomide prompts a closer look at its chemical structure. It consists of two rings, glutarimide and phthalimide, the latter of which is an important pharmacophore used in drug design. Due to its hydrophobic nature, it has the ability to cross biological membranes under in vivo

conditions. Phthalimide derivatives have been shown to exhibit antibacterial [26], antiparasitic [27], antifungal [28] and analgesic [29] activities. Compounds containing a phthalimide group in the molecule also show potent anticancer activity against various types of tumor cells, i.e., prostate [30,31], breast [31,32] or liver cancer cells [31,33].

Another biologically important pharmacophore is thiazole ring, found in compounds with anticancer [34–36], antimicrobial [37], antituberculosis [38], anticonvulsant [39,40], and anti-Toxoplasma gondii activity [41,42]. Thiazole derivatives were presented as inhibitors of important protein kinases such as EGFR, VEGF and PI3Ks [43], and SARS-CoV 3CL protease [44].

Our previous studies showed that dichloro-substituted phthalimido-thiazole derivatives showed high antitumor activity against MV4-11 and A549 with IC_{50} values in the range of 5.56–16.10 μ M. They also showed the ability to inhibit porcine pancreatic elastase, with IC_{50} values in the range of 32.10–93.90 μ M [45].

In this study, we report the synthesis of new phthalimide-thiazole derivatives and investigate them as new human neutrophil elastase (HNE) inhibitors using spectrofluorimetric and computational methods. The main core of the molecule contains various substituents that are intended to modify the electronic properties and geometry of the molecules. The main compounds were tested for their antitumor activity against four human cancer cells lines, namely biphenotypic B myelomonocytic leukemia MV4-11, human lung carcinoma A549, human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 and human bladder translational cell carcinoma UMUC-3, and their cytotoxicity was tested using normal mouse fibroblast (BALB/3T3). Finally, chemical stability of the key compound was also investigated in an aqueous phosphate buffer simulating physiological conditions using the spectrophotometric method.

2. Results and Discussion

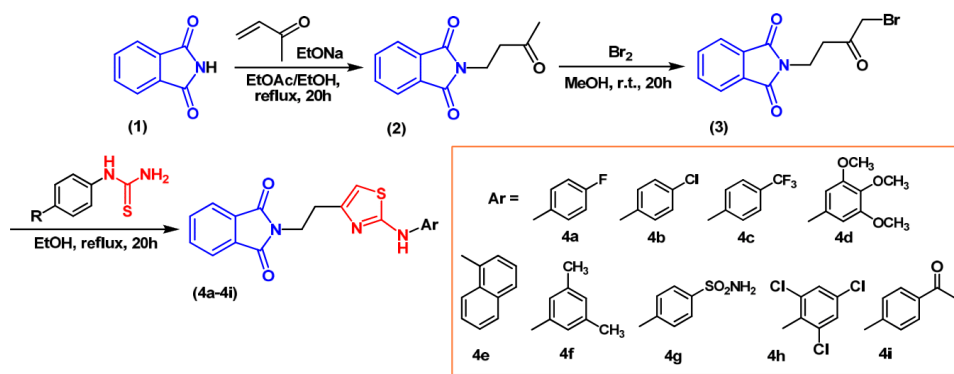
2.1. Chemical Synthesis

The synthetic pathway leading to compounds **4a–4i** is shown in Scheme 1. In the first step, phthalimide **1** was reacted with methyl vinyl ketone in the presence of sodium ethoxide as a catalyst to obtain 2-(3-oxobutyl)phthalimide **2**. In the next step ketone was brominated with bromine in methyl alcohol to give 2-(4-bromo-3-oxobutyl)phthalimide **3** [45–47]. In the last step using the Hantzsch reaction of bromoketone **3** with various thioureas, ten final compounds **4a–4i** were obtained. The newly synthesized compounds were identified using spectroscopic methods, such as 1H NMR (700 MHz), ^{13}C NMR (100 MHz) and ESI-HRMS analysis [see Supplementary Materials]. The 1H NMR spectra of compounds **4a–4i** have four characteristic signals: two triplets derived from methylene groups at about 2.90 ppm and 3.90 ppm, thiazole-5H proton singlet at about 6.50 ppm and singlet of the NH group at 9.45–10.44 ppm. The structure of the newly synthesized compounds was also confirmed using ^{13}C NMR spectra. The most characteristic signals were found at about 30 ppm and 37 ppm derived from the two methylene groups, and at about 105 ppm corresponding to the CH of the thiazole ring. The key signals are also those from the two carbonyl groups of the phthalimide ring at about 168 ppm.

2.2. Elastase Inhibitory Activity and Kinetic Analysis

The study of human neutrophil elastase inhibition by compounds **4a–4i** was carried out using a spectrofluorimetric method. The results of the study are shown in Table 1. Ursolic acid was used as the reference inhibitor. All newly synthesized phthalimide derivatives showed the ability to inhibit neutrophil elastase. The best inhibitory activity was shown by compounds with 4-trifluoromethyl (**4c**), 4-naphthyl (**4e**) and 2,4,6-trichloro (**4h**) substituents in the phenyl ring with IC_{50} values of 12.98 μ M, 15.58 μ M and 16.62 μ M, respectively. These values are only two to three times higher than the IC_{50} value for reference inhibitor—ursolic acid, IC_{50} 5.32 μ M. Compounds containing 4-COCH₃ (**4i**), 3,4,5-triOMe (**4d**) and 4-fluorophenyl (**4a**) substituents also proved to be good elastase inhibitors, with IC_{50} values in the range of 22.92–29.35 μ M. The weakest inhibitory activity

among the 4a–4i derivatives was shown by compounds 4f and 4g, with IC_{50} 49.88 and 64.89 μ M, respectively. It can be seen that the HNE inhibitory activity increases in a series of compounds 4a and 4c containing 4-fluorophenyl and 4-trifluoromethylphenyl groups, probably due to an increased electron-acceptor or steric effect. Moreover, the same relationship can be seen for derivatives 4b and 4h containing chlorophenyl and 2,4,6-trichlorophenyl groups and for derivatives 4b and 4a containing chlorophenyl and fluorophenyl groups.



Scheme 1. Synthesis of the target phthalimide-thiazoles 4a–4i.

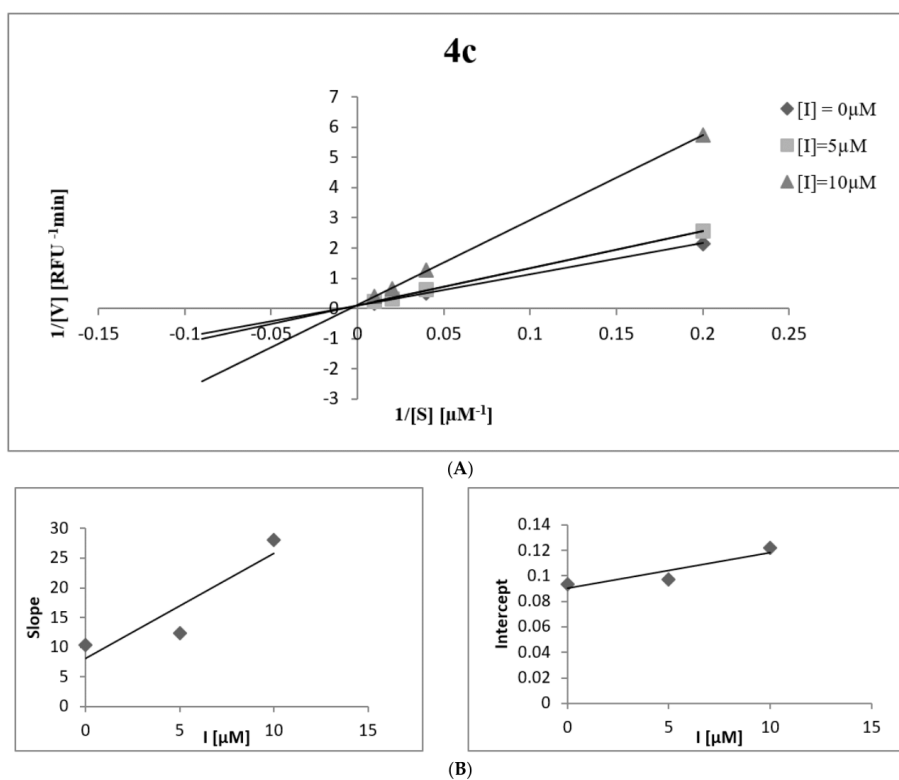
To better understand the mechanism of inhibition of human neutrophil elastase by the newly synthesized compounds, kinetic studies using double-reciprocal plots of Lineweaver–Burk and Dixon analysis were performed. The most active compound 4c was selected for this study. The results are shown in Table 2 and Figure 1. Compound 4c has been identified as an elastase inhibitor characterized by a mixed type of action. This means that the compound can inhibit the enzyme through two different mechanisms, depending on whether it has a higher affinity for the free enzyme (type I) or the enzyme-substrate complex (type II). To determine which inhibition model characterizes compound 4c, the appropriate inhibition constants K_i and K_{is} were determined using secondary plots of K_m/V_{max} and $1/V_{max}$ versus inhibitor concentration. In the case of compound 4c, the K_i constant is smaller than the K_{is} constant, indicating that the compound has a higher affinity for the free enzyme than the enzyme-substrate complex, showing mixed type I inhibition.

Table 1. Elastase inhibitory activity of phthalimide-thiazoles 4a–4i compared to standard inhibitor.

Compound	$IC_{50} \pm SD$ [μ M]
4a	29.35 \pm 3.13
4b	46.51 \pm 4.85
4c	12.89 \pm 0.98
4d	22.92 \pm 1.59
4e	15.58 \pm 0.16
4f	49.88 \pm 0.98
4g	64.89 \pm 7.75
4h	16.62 \pm 2.06
4i	25.60 \pm 1.78
Ursolic acid	5.32 \pm 0.68

Table 2. Kinetic analysis of mechanism of elastase inhibition by compound **4c**.

Compound	Dose [μM]	V_{max}	K_m	Inhibition Type	K_i [μM]	K_{is} [μM]
4c	5	10.29	127.27	mixed	4.54	32.18
	10	8.22	230.63			

**Figure 1.** (A) Lineweaver–Burk plots for elastase inhibition for compound **4c**. (B) The secondary plots of the slope and the intercept of the straight lines versus the concentration of compound **4c**.

2.3. Antiproliferative Activity

The newly synthesized compounds were tested for their antiproliferative activity against four cancer cell lines: human biphenotypic B myelomonocytic leukemia (MV4-11), lung carcinoma (A549), human breast adenocarcinoma (MDA-MB-231), urinary bladder carcinoma (UMUC-3), and normal mouse fibroblast (BALB/3T3) cells. The results are shown in Table 3. It can be seen that compounds **4b**, **4d** and **4f** containing 4-chloro, 3,4,5-trimethoxy and 3,5-dimethyl substituents in the phenyl ring have high antiproliferative activity against human cancer cells lines MV4-11, with IC_{50} in the range of 8.21–13.19 μM . The same series of compounds **4b**, **4d** and **4f** extended by the compound **4c** with trifluoromethyl group have also high antiproliferative activity against A549 cell lines, with IC_{50} in the range of 13.99–25.57 μM . Additionally, compounds **4g** with sulfonamide group showed high activity against MDA-MB-231 and UMUC-3 with IC_{50} values of 9.66 and 19.81 μM , respectively. Moreover, compound **4e** containing a naphthyl ring in its structure showed

good antiproliferative activity against MV4-11 and A549 cancer cell lines, with IC_{50} of 33.25 and 41.07 μ M, respectively. The less potent of the series for this cancer cell line were compounds **4a**, **4h** and **4i**, with IC_{50} values in the range of 44.45–120.05 μ M. Next, we decided to calculate the selectivity index (SI) by comparing the cytotoxic activity (IC_{50}) of compounds against the normal fibroblasts BALB/3T3 with the cytotoxic activity (IC_{50}) of cancer cell lines (Table 4). The selectivity indexes for phthalimide derivatives **4a–4i** against MV4-11 and A-549 cancer cell lines were in general much higher than for MDA-MB-231 and UMUC-3 cancer cells. The highest selectivity index for MV4-11 and A549, SI values in the range of 5.42–7.68, was found for the compounds **4b**, **4c**, **4d** and **4f**. Additionally, with the exception of compounds **4a** and **4g**, the SI values are greater than 1, which proves that the obtained phthalimides are more effective against cancer cells than toxic against normal cells.

Table 3. Antyproliferative activity of compounds **4a–4i** against human biphenotypic B myelomonocytic leukemia (MV4-11), lung carcinoma (A549), human breast adenocarcinoma (MDA-MB-231), human bladder transitional cell carcinoma (UMUC-3) and normal mouse fibroblast BALB/3T3 cells.

Phthalimide Derivatives	$IC_{50} \pm SD$ [μ M]				
	MV4-11	A549	MDA-MB-231	UMUC-3	BALB/3T3
4a	59.55 \pm 4.63	50.71 \pm 3.32	109.83 \pm 24.50	82.31 \pm 2.18	74.17 \pm 12.25
4b	12.22 \pm 4.56	18.11 \pm 0.94	86.47 \pm 10.68	61.74 \pm 1.56	66.25 \pm 4.17
4c	46.57 \pm 25.39	13.99 \pm 1.56	77.48 \pm 13.66	75.20 \pm 6.71	84.90 \pm 18.21
4d	8.21 \pm 2.37	23.73 \pm 5.23	48.87 \pm 13.20	46.08 \pm 7.28	46.80 \pm 2.05
4e	33.25 \pm 11.99	41.07 \pm 3.13	76.44 \pm 11.14	80.01 \pm 16.19	102.74 \pm 30.70
4f	13.19 \pm 4.77	25.57 \pm 3.63	86.39 \pm 12.19	66.47 \pm 9.80	101.31 \pm 12.19
4g	83.32 \pm 26.61	NA	9.66 \pm 1.40	19.81 \pm 1.40	14.35 \pm 2.10
4h	48.48 \pm 21.43	57.05 \pm 19.35	NA	120.05 \pm 36.00	NA
4i	44.45 \pm 20.18	62.87 \pm 5.75	87.73 \pm 21.97	74.06 \pm 12.01	98.97 \pm 21.20
cisplatin	1.43 \pm 0.40	5.41 \pm 0.60	15.61 \pm 2.00	1.73 \pm 0.17	8.47 \pm 1.96

IC_{50} —compound concentration leading to 50% inhibition of cell proliferation was calculated for each experiment separately (experiments were repeated 3–5 times) and data are presented as mean values \pm SD, calculated using ProLab-3 system based on Cheburator 0.4 software. NA—not active. cisplatin was used as a positive control [45].

Table 4. The calculated selectivity index (SI) of tested compounds. The SI index = IC_{50} of compound in a normal cell line/ IC_{50} of the compound in cancer cell line.

Phthalimide Derivatives	SI			
	BALB/3T3/ MV4-11	BALB/3T3/ A549	BALB/3T3/ MDA-MB-231	BALB/3T3/ UMUC-3
4a	1.25	1.46	0.68	0.90
4b	5.42	3.66	0.77	1.07
4c	1.82	6.07	1.10	1.13
4d	5.70	1.97	0.96	1.02
4e	3.09	2.50	1.34	1.28
4f	7.68	3.96	1.17	1.52
4g	0.17	-	1.49	0.72
4h	-	-	-	-
4i	2.23	1.57	1.13	1.33

A beneficial SI > 1.0 indicates a drug with efficacy against cancer cells greater than toxicity against normal cells.

2.4. Compounds Stability

The stability of new substances is a key parameter that determines the effectiveness of a drug as well as its safety. Therefore, the most active phthalimide derivative **4c** was assessed for chemical stability in an aqueous phosphate buffer at pH 7.3 simulating physiological conditions using spectrophotometric method (Table 5). In the tested phosphate buffer, a decrease in the maximum absorbance at 305 nm was observed over time, which indicates a spontaneous hydrolysis of the compound **4c** (Figures 2 and 3). The calculated half-life ($t_{1/2}$)

value is 38.5 min, which proves the high stability of the compound under physiological pH conditions.

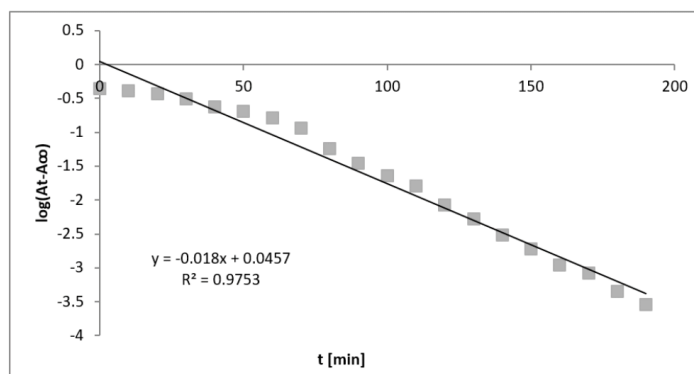


Figure 2. Semilogarithmic plot used to determine rate constants for spontaneous hydrolysis of compound 4c.

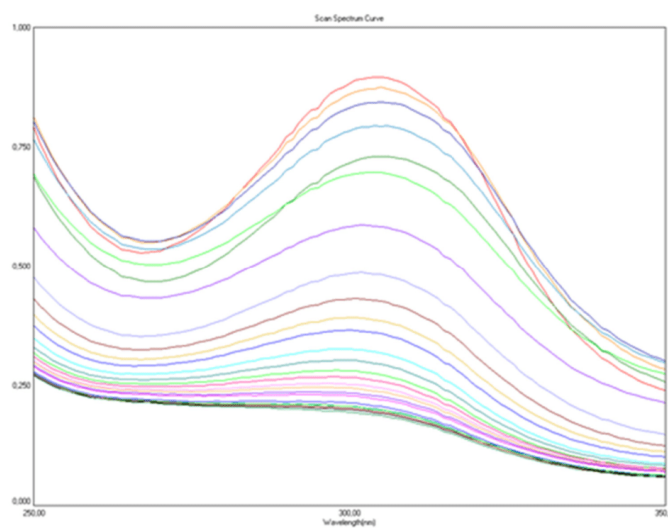


Figure 3. The changes in absorbance spectra of compound 4c during spontaneous hydrolysis. Spectrum was monitored for 250 min with 10 min intervals in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.3, 25 °C).

Table 5. Half-life ($t_{1/2}$) for the spontaneous hydrolysis of selected compound 4c.

Phthalimide	λ [nm]	k [min^{-1}]	$t_{1/2}$ [min]
4c	305	0.018	38.5

2.5. Molecular Docking Study

The molecular docking study was used to analyse the influence of pharmacophore group on the activity of the studied compounds. According to literature reports [48] the elas-

tase inhibitors can be bound to protein by the formation of covalent bond between Ser195 and the ligand group capable to participate in the condensation reaction. Subsequently, the ligand molecule may undergo a decomposition into two fragments. Paradoxically, event in such case, the covalent docking procedure, involving the whole ligand molecule does not seem suitable for predicting the inhibition properties due to the following facts: (i) the low-energy ligand poses do not necessarily correspond to the conformations that facilitates the prospective reaction with serine, thus, they may be chemically meaningless; (ii) after the ligand decomposition, the covalently bound ligand fragment may be common for all considered compounds, thus, performing covalent docking would not produce any distinguishable results. On the other hand, one of our previous results indicate that standard docking produces the trend in binding energies which is in agreement with the experimental values of IC_{50} [45]. Previously [49], we have applied the standard, non-covalent docking with the so-called 'logical constraint', responsible to reflect the spatial requirements necessary to consider the ligand-Ser195 reaction. This resulted in a reasonable agreement of the binding energies with the experimentally-inferred IC_{50} values but also provided a consistent picture of the ligand-receptor pattern of interactions, common for the whole considered group of compounds. In the initial stages of the current study, we planned to apply the 'logical constraint'-based procedure, analogous to that described in more detail in ref. [49]. In short, such a procedure relies on introducing the cutoff-based criteria and ignoring all the docking results (structures) in which the distance between Ser195 sidechain and the reaction site within the ligand molecule is larger than 0.3 nm. Here, the prospective reaction site was defined as the two oxygen atoms of the isoindoline-1,3-dione moiety of the ligand molecule. However, during analysis of the obtained docking poses, it was concluded that all the low energy structures already fulfill this additional distance-based condition and no poses corresponding to more favorable ligand-protein interactions and some other arrangements in the binding cavity were observed. This indicates that the mechanism of binding is associated either with the formation of a covalent bond involving Ser195 or at least with creating the network of ligand-protein interactions compatible with early stages of such processes.

The binding energies found during docking simulations are graphically illustrated in Figure 4A. Each of the final energy values was averaged over the set of poses exhibiting the same structural orientation in the binding cavity, as confirmed by separate RMSD calculations and visual inspection (Figure 4B). All the obtained ligand-protein interaction energies display similar magnitude, varying in the range of -7.8 – -6.8 kcal/mol. Such a small scatter of ligand-protein interaction energies across the studied set of compounds (1.0 kcal/mol) can be explained in terms of their high structural similarity of the studied compounds combined by extremely close locations and orientations exhibited by them when interacting with binding cavity.

Although the correlation between $\ln(IC_{50})$ values and the determined binding energies is not as good ($R = 0.41$, $p < 0.27$) as those obtained in our previous studies [45,49], some binding trends are reflected correctly. For instance, the two most potent compounds (**4c** and **4e**) display the most and second most favourable binding energies. At the same time one can observe that compounds exhibiting the highest IC_{50} values (**4g** and **4h**) are not correctly identified in the calculations. In fact, ignoring these two data points results in a significant improvement of the statistical parameters that describe the above-mentioned correlation ($R = 0.72$, $p < 0.04$). There exist several distinct factors that may be responsible for that, for instance: (i) the large scatter of binding energies across the set of considered PDB structures (standard deviation is of magnitude of broadness of the data set values); (ii) the small scatter of both the experimental and theoretical values; (iii) the influence of mechanisms that cannot be reflected by classical force field-based docking, i.e., the processes related to the electronic structure of ligand, essential for hypothetical reaction with Ser195.

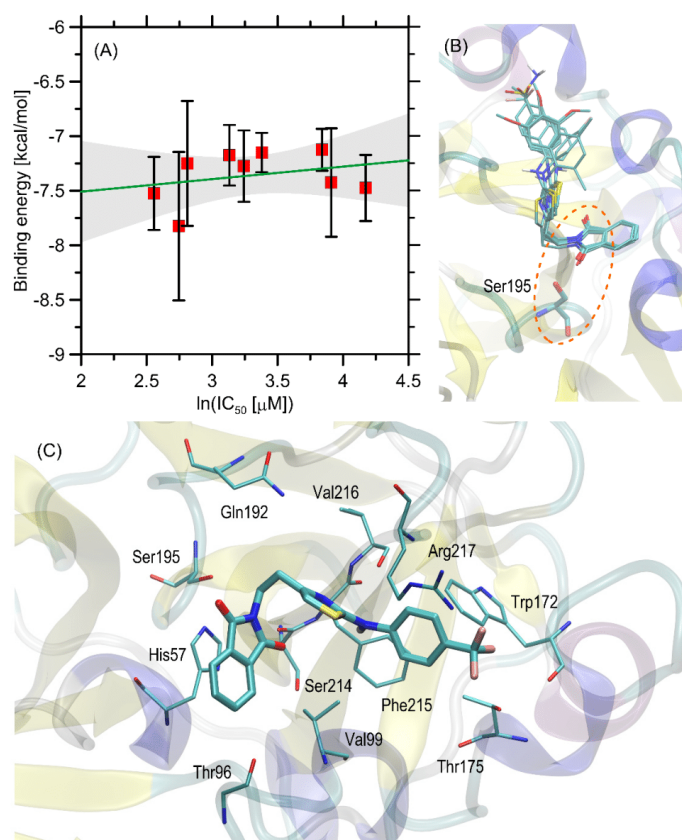


Figure 4. (A) The correlation between the calculated binding energies, averaged over the five elastase structures available in the PDB database and the corresponding (experimental) values of IC_{50} (recalculated as $\log(IC_{50})$). The horizontal bars represent the standard deviation values within the set of binding energies. The green solid line represents the linear regression (with 95% confidence intervals filled in grey) ($R = 0.41$; $p < 0.27$). (B) The superposed positions of all studied ligands (stick representation, colored by atom type) in the binding cavity of the 1bma structure of elastase. All these positions were identified as the optimal ones during the standard (non-covalent) docking procedure. The maximal distance of oxygen atoms at the isoindoline-1,3-dione group and Ser195 does not exceed 0.3 nm. (C) The location of the 4c ligand molecule bound to the 1bma structure of elastase and found in the docking procedure. The ligand molecule and all the closest amino-acid residues are represented by thick and thin sticks, respectively. The description of the interaction types is given in the text.

In our previous paper [49], we concluded that a good correlation of the binding energies with the IC_{50} values speaks for dependence of the inhibition properties on the stage of ligand alignment in the binding cavity before the subsequent reaction with Ser195. Here, the analogous correlation is not so obvious. Therefore, it is hard to draw a similar, unmistakable conclusion. Nevertheless, the consistent arrangement of the lowest-energy ligand poses, common for all considered compounds and all protein structures support the hypothesis about the contribution of Ser195 in covalent ligand binding.

The results of the docking studies were also analysed with respect to the structural/mechanistic protein-ligand interaction pattern that is essential for interpretation of the obtained binding energy values and identifying the physical basis responsible for ligand binding. The summary given below relies on analysing the ligand-protein contacts that take place if the distance between any corresponding atom pair is smaller than the arbitrarily accepted value of 0.4 nm. The provided description can be related to all the studied compounds due to their nearly identical orientations in the binding cavity (Figure 4B). The accuracy limits in this context result mainly from the molecular topology of the ligand, i.e., different chemical character of a single moiety). The graphical illustration of the docking results (on example of 4c) is given in Figure 4C. Note that the analysis below concerns only the non-covalent ligand-protein interactions and does not include the hypothetical, subsequent steps involving covalent bonding with Ser195. The network of interactions responsible for distinguishing between potencies of particular compounds is created by Trp172, Thr175, Phe215 and Arg217. The limiting, aromatic substituents of all compounds always maintain contact with Phe215 and Trp172 via attractive π - π or CH- π interactions. The type of interactions with Thr175 varies on the character of substituent and may concern either polar or non-polar interactions, dependent of the character of moieties located in this region of ligand molecule. Interactions with Arg217 occur with both the thiazole ring and limiting, aromatic moiety (as shown in Figure 4C and according to description below). The Arg217 sidechain is the most flexible among all sidechains considered explicitly during docking and can exhibit various, conformationally-diverse contacts with those two regions of the ligand molecule. Nearly the same network of contacts, also distinguishing between inhibition properties, has been identified for other group of elastase inhibitors in our previous study [49]. The physical-chemical character of interactions formed by this crucial substituent and neighboring residues is not uniform and involves e.g., hydrogen bonding donation and acceptance, CH- π and π - π stacking, therefore, the detailed interpretation of the dependence of the moiety type on the compound potency is not straightforward. Basing on the case of the two most potent compounds (for which the prediction of docking results agrees with the experimental results) it can be concluded that the increased contribution of the CH- π and π - π stacking (compound 4e) has a positive effect on the favorability of the ligand-protein interactions. The same can be said about introduction of fluorine atoms (compound 4c), which, in theory, allows for creation of halogen bonds with Trp172 and Thr175. However, larger number of fluorine atoms at the aromatic substituent (compound 4e) apparently results in unfavorable steric restrictions and increase of the interaction energy. The remaining ligand-protein interactions concern the polar interactions of Arg217 with thiazole ring (hydrogen bonding) and CH- π stacking involving also the thiazole ring and Val99 sidechain. The thiazole ring also maintains contact with backbone fragment of Val216, but it seems to be only an opportunistic consequence of other, stronger interactions, imposing the corresponding conformational arrangement. The aliphatic linker connecting thiazole ring with the isoindoline-1,3-dione group maintains contact with Gln192. Again, this interaction does not seem to be crucial in the context of ligand-protein interactions strength. The part of the ligand molecule that contains the isoindoline-1,3-dione moiety is especially crucial for occurrence of the possible reaction with Ser195. The attractive, hydrogen bonding-mediated interactions are always observed in the case of one of the oxygen atoms in the isoindoline-1,3-dione group and neighboring Ser195 sidechain. However, the associated O-O distance is slightly larger (0.27) than it was observed in the case of our previous study and analogous contact [49]; this is the consequence of increase dimension of the group interacting with Ser195. This contact and arrangement of the isoindoline-1,3-dione group is stabilized by the CH- π and π - π stacking with neighboring His57 sidechain. The vicinity of the two other residues (Thr96 and Ser214) seems to be only an opportunistic consequence of other protein-ligand interactions discussed above.

3. Materials and Methods

3.1. Chemistry

3.1.1. 2-(3-Oxobutyl)phthalimide (2)

3-Buten-2-one (7.0 g, 100.0 mmol) was added to a stirred solution of phthalimide (1) (14.70 g, 100.0 mmol) in ethyl acetate (100 mL) and then sodium ethoxide (0.27 g) in absolute ethyl alcohol (25 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, and next under reflux until a clear solution was obtained. Heating was continued for additional 2 h, next solvent was evaporated, and the crude product was crystallized from ethyl alcohol to yield 18.0 g (83%); mp 108–110 °C [45–47]; eluent: dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.55$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 2.12 (s, 3H, CH_3); 2.84 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz); 3.76 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.4$ Hz); 7.81–7.87 (m, 4H, 4CH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 30.11 (CH_3); 33.04 (CH_2); 41.29 (CH_2); 123.35 (2C); 132.02 (2C); 134.74 (2C); 168.05 (2C); 206.77 (C).

3.1.2. 2-(4-Bromo-3-oxobutyl)phthalimide (3)

4-N-Phthalimido-2-butanone (2) (7.0 g, 32.23 mmol) was dissolved in methanol (100 mL). A solution of bromine (1.65 mL, 32.23 mmol) was added dropwise over 30 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 h. The separate precipitate was collected by filtration and dried under vacuum to yield 8.33 g (87%); mp 115–116 °C [45–47]; eluent: dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.84$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 3.00 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.1$ Hz); 3.82 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.1$ Hz); 4.37 (s, 2H, CH_2); 7.81–7.89 (m, 4H, 4CH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 33.06 (CH_2); 37.09 (CH_2); 37.88 (CH_2); 123.38 (2C); 132.04 (2C); 134.75 (2C); 168.04 (2C); 200.09 (C).

3.1.3. 2-(2-(2-(4-Fluorophenylamino)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (4a)

Typical Procedure

2-(4-Bromo-3-oxobutyl)phthalimide (3) (0.296 g, 1.0 mmol) was added to a stirred solution of 4-fluorophenylthiourea (0.17 g, 1 mmol) in absolute ethyl alcohol (20 mL). The reaction mixture was stirred under reflux for 20 h. Next, the reaction mixture was added to water (50 mL) and neutralized with NaHCO_3 solution. The separate precipitate was collected by filtration and dried under vacuum over P_2O_5 to afford the desired product: 0.24 g (66%); mp 153–154 °C; eluent: dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.63$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 2.86 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.3$ Hz); 3.85 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.3$ Hz); 6.51 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 6.94 (t, 2H, 2CH_{Ar} , $J = 8.4$ Hz); 7.46 (q, 2H, 2CH_{Ar} , $J = 9.1$ Hz); 7.77–7.79 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 7.80–7.83 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 10.03 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 30.23 (CH_2); 37.82 (CH_2); 103.83 ($\text{C}_{\text{thiazole}}$); 115.61 (d, 2C, $J = 22.5$ Hz); 118.51 (d, 2C, $J = 7.6$ Hz); 123.45 (2C); 132.12 (2C); 134.76 (2C); 138.09 (C); 149.51 (C); 157.03 (d, C, $J = 235.9$ Hz); 163.71 (C); 168.18 (2C=O). ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$: 368.0869 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$. Found 368.0862.

3.1.4. 2-(2-(2-(4-Chlorophenylamino)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (4b)

Yield: 0.29 g, 76%, (dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.52$); mp 165–167 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 2.88 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.0$ Hz); 3.85 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.3$ Hz); 6.56 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.12 (d, 2H, 2CH_{Ar} , $J = 9.8$ Hz); 7.47 (d, 2H, 2CH_{Ar} , $J = 8.4$ Hz); 7.76–7.79 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 7.79–7.82 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 10.16 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 30.20 (CH_2); 37.82 (CH_2); 104.33 ($\text{C}_{\text{thiazole}}$); 118.45 (2C); 123.44 (2C); 124.54 (C); 128.85 (2C); 132.11 (2C); 134.71 (2C); 140.44 (C); 149.60 (C); 163.27 (C); 168.17 (2C=O). ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$: 384.0573 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$. Found 384.0569.

3.1.5. 2-(2-(2-(4-(Trifluoromethyl)phenylamino)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (4c)

Yield: 0.31 g, 73%, (dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.62$); mp 170–172 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 2.91 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.0$ Hz); 3.86 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.0$ Hz); 6.65 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.38 (d, 2H, 2CH_{Ar} , $J = 8.4$ Hz); 7.60 (d, 2H, 2CH_{Ar} ,

$J = 8.4$ Hz); 7.74–7.76 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 7.79–7.80 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 10.44 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 30.06 (CH₂); 37.86 (CH₂); 105.29 (C_{thiazole}); 116.56 (2C); 123.44 (2C); 126.34 (q, C, $J = 7.65$ Hz); 126.38 (C); 126.42 (C); 132.16 (2C); 134.72 (2C); 144.71 (C); 149.77 (2C); 162.78 (C); 168.21 (2C=O). ESI-HRMS (m/z) calculated for C₂₀H₁₅F₃N₃O₂S: 418.0837 [M + H]⁺. Found 418.0831.

3.1.6. 2-(2-(2-(3,4,5-Trimethoxyphenylamino)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (4d)

Yield: 0.26 g, 58%, (dichloromethane/methanol (95:5); R_f = 0.63); mp 80–82 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.85 (t, 2H, CH₂, $J = 7.7$ Hz); 3.56 (s, 3H, CH₃); 3.75 (s, 6H, 2CH₃); 3.89 (t, 2H, CH₂, $J = 7.7$ Hz); 6.52 (s, 1H, CH_{thiazole}); 6.98 (s, 2H, 2CH_{Ar}); 7.76–7.78 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 7.79–7.83 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 9.99 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 30.57 (CH₂); 37.56 (CH₂); 56.09 (2CH₃); 60.57 (CH₃); 95.20 (2C); 103.76 (C_{thiazole}); 123.44 (2C); 132.09 (2C); 132.28 (C); 134.74 (2C); 137.88 (C); 149.10 (C); 153.37 (2C); 163.73 (C); 168.21 (2C=O). ESI-HRMS (m/z) calculated for C₂₂H₂₂N₃O₅S: 440.1280 [M + H]⁺. Found 440.1274.

3.1.7. 2-(2-(2-(Naphthalen-1-ylamino)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (4e)

Yield: 0.27 g, 67%, (dichloromethane/methanol (95:5); R_f = 0.48); mp 161–162 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.87 (t, 2H, CH₂, $J = 7.7$ Hz); 3.87 (t, 2H, CH₂, $J = 7.0$ Hz); 6.53 (s, 1H, CH_{thiazole}); 7.28 (t, 1H, CH_{Ar}, $J = 7.7$ Hz); 7.49–7.51 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 7.55 (d, 1H, CH_{Ar}, $J = 8.4$ Hz); 7.77–7.79 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 7.82–7.84 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 7.87–7.89 (m, 1H, CH_{Ar}); 8.02 (d, 1H, CH_{Ar}, $J = 7.0$ Hz); 8.22 (t, 1H, CH_{Ar}, $J = 4.2$ Hz); 9.92 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 30.39 (CH₂); 37.80 (CH₂); 104.36 (C_{thiazole}); 116.36 (C); 122.61 (C); 123.21 (C); 123.45 (2C); 125.94 (C); 126.17 (C); 126.33 (C); 126.47 (C); 128.66 (C); 132.12 (2C); 134.39 (C); 134.78 (2C); 137.16 (C); 149.33 (C); 165.75 (C); 168.20 (2C=O). ESI-HRMS (m/z) calculated for C₂₃H₁₈N₃O₂S: 400.1120 [M + H]⁺. Found 400.1114.

3.1.8. 2-(2-(2-(3,5-Dimethylphenylamino)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (4f)

Yield: 0.22 g, 58%, (dichloromethane/methanol (95:5); R_f = 0.55); mp 60–61 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.18 (s, 6H, 2CH₃); 2.87 (t, 2H, CH₂, $J = 7.2$ Hz); 3.88 (t, 2H, CH₂, $J = 7.6$ Hz); 6.49 (s, 1H, CH_{Ar}); 6.53 (s, 1H, CH_{thiazole}); 7.14 (s, 2H, 2CH_{Ar}); 7.77–7.83 (m, 4H, 4CH_{Ar}); 9.89 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 21.69 (2CH₃); 30.51 (CH₂); 37.64 (CH₂); 103.52 (C_{thiazole}); 115.05 (2C); 123.17 (C); 123.41 (2C); 132.09 (2C); 134.76 (2C); 138.23 (2C); 141.57 (C); 149.38 (C); 163.77 (C); 168.18 (2C=O). ESI-HRMS (m/z) calculated for C₂₁H₂₀N₃O₂S: 378.1276 [M + H]⁺. Found 378.1269.

3.1.9. 4-(4-(2-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)ethyl)thiazol-2-ylamino)benzenesulfonamide (4g)

Yield: 0.23 g, 54%, (dichloromethane/methanol (95:5); R_f = 0.23); mp > 260 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.92 (t, 2H, CH₂, $J = 6.8$ Hz); 3.89 (t, 2H, CH₂, $J = 6.8$ Hz); 6.65 (s, 1H, CH_{thiazole}); 7.13 (s, 2H, NH₂); 7.55–7.58 (m, 4H, 4CH_{Ar}); 7.75–7.78 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 7.78–7.82 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 10.42 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 30.16 (CH₂); 37.77 (CH₂); 105.27 (C_{thiazole}); 116.22 (2C); 123.42 (2C); 127.27 (2C); 132.07 (2C); 134.83 (2C); 136.04 (C); 144.19 (C); 149.69 (C); 162.81 (C); 168.22 (2C=O). ESI-HRMS (m/z) calculated for C₁₉H₁₇N₄O₄S₂: 429.0691 [M + H]⁺. Found 429.0685.

3.1.10. 2-(2-(2-(2,4,6-Trichlorophenylamino)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (4h)

Yield: 0.37 g, 81%, (dichloromethane/methanol (95:5); R_f = 0.39); mp 168–169 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.75 (t, 2H, CH₂, $J = 7.0$ Hz); 3.74 (t, 2H, CH₂, $J = 7.0$ Hz); 6.48 (s, 1H, CH_{thiazole}); 7.63 (s, 2H, 2CH_{Ar}); 7.80 (bs, 4H, 4CH_{Ar}); 9.54 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 29.70 (CH₂); 37.38 (CH₂); 123.38 (2C); 129.04 (4C); 132.08 (2C); 134.74 (2C); 165.60 (C); 168.11 (2C=O). ESI-HRMS (m/z) calculated for C₁₉H₁₃Cl₃N₃O₂S: 451.9794 [M + H]⁺. Found 451.9791.

3.1.11. 2-(2-(2-(4-Acetylphenylamino)thiazol-4-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (4i)

Yield: 0.24 g, 62%, (dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.38$); mp 174–175 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 2.46 (s, 3H, CH_3); 2.93 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.8$ Hz); 3.88 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.8$ Hz); 6.67 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{thiazole}}$); 7.53 (d, 2H, 2CH_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 7.69 (d, 2H, 2CH_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 7.75–7.78 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 7.8–7.83 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 10.48 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 26.72 (CH_3); 30.13 (CH_2); 37.88 (CH_2); 105.48 ($\text{C}_{\text{thiazole}}$); 115.97 (2C); 123.50 (2C); 129.81 (C); 130.05 (2C); 132.18 (2C); 134.78 (2C); 145.51 (C); 149.76 (C); 162.82 (C); 168.13 (2C=O); 196.14 (C=O). ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: 392.1069 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Found 392.1061.

3.2. Inhibitory Activity

3.2.1. Elastase Inhibition Assay

Fluorometric assay for human neutrophil elastase (HNE) inhibition was performed according to the previously presented method with some modifications [50], using *N*-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-7-amido-4-methyl-coumarin (MOSuc-AAPV-AMC, Calbiochem) as substrate. Stock solutions of the tested compounds were prepared in DMSO, the final content of which in the tested sample did not exceed 1%. The reaction was carried out in assay buffer containing 0.1 M HEPES (pH 7.5). Briefly, different concentration of tested compounds was incubated with 20 mU/mL of HNE (Bradford) in 25 °C. The reaction was started by addition of 25 μM elastase substrate to final reaction volume 100 μL and monitored for 30 min at 25 °C on a microplate reader (FP-8500 Spectrofluorometer, JASCO, USA) with excitation and emission wavelengths of 380 nm and 440 nm, respectively. By computing the log of inhibitors concentrations versus the percentage of activity, the IC_{50} values were determined by non-linear regression analysis. Assays were performed in triplicate and data presented as the mean and the standard deviation. Ursolic acid was used as the reference compound.

3.2.2. Kinetic Analysis of the Inhibition of Elastase

Kinetic studies were conducted in the presence of different concentrations of substrate (5, 25, 50 and 100 μM) and test compound (in the range of 0–10 μM). The reaction conditions were the same as in the HNE inhibition assay and the reaction was monitored for 10 min at 25 °C with the same E_x and E_m wavelengths. By Lineweaver–Burk plots, kinetic values such as Michaelis–Menten constants and maximum velocity were determined. Next, two inhibition constants for inhibitor binding with free enzyme or enzyme–substrate complex (K_i and K_{is}) were obtained by plotting the secondary plot of the slopes of the determined straight lines or vertical intercept versus inhibitor concentration [51].

3.3. Antiproliferative Activity

Cell preparation, in vitro antiproliferative assay, MTT and SRB cytotoxic tests were performed according to literature [45,52–55].

3.4. Analysis of Compounds Stability

Spontaneous compound hydrolysis studies were performed following the literature procedure [56]. The kinetics hydrolysis of the compounds was evaluated at 25 °C in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.3, by measuring changes in absorbance spectra during incubation using a T60U spectrophotometer (PG Instruments). The absorbance (A_t) at characteristic absorption maxima for each compound was measured at 10 min intervals until there was no further decrease in absorbance (A_∞). Using these measurements, semilogarithmic plots of the dependence of $\log(A_t - A_\infty)$ on time were prepared, and k' values were determined from the slope of these plots according to the first order reaction kinetics. Half-conversion times were calculated using equation: $t_{1/2} = 0.693/k'$.

3.5. Molecular Docking Study

The ligand molecules were drawn manually by using Avogadro 1.1.1 [57] and optimized within the UFF force field [58] (5000 steps, conjugate gradient algorithm). The flexible, optimized ligands were docked into the binding pockets of the high-resolution elastase structures found in the following five PDB (rcsb.org) entries: 1bma (X-ray resolution: 0.192 nm), 1hv7 (X-ray resolution: 0.17 nm), 1qnj (X-ray resolution: 0.11 nm), 2de9 (X-ray resolution: 0.13 nm) and 2h1u (X-ray resolution: 0.16 nm). The AutoDock Vina software [59] was applied in all docking simulations. The procedure of docking was carried out within the cuboid region (of dimensions: $20 \times 20 \times 20 \text{ \AA}^3$) which covered the whole co-crystallized ligand present in the PDB:2h1u structure as well as the closest amino-acid residues that exhibit contact with that ligand. In order to provide sufficient numbers of conformationally-diverse ligand arrangements, the number of possible poses generated during single run was increased to 20, whereas the energy threshold between highest- and lowest-ranked poses was increased to 4 kcal/mol. Apart from that, all the default procedures and algorithms implemented in AutoDock Vina were kept. The predicted binding energies were averaged over all protein structures applied for docking. The more favorable binding mode is associated with the lower binding energy value; only the lowest energy values corresponding to the given ligand were accounted for during subsequent analysis. The visual inspection of the location and orientation of the docked ligands, in order to control the uniformity of the binding pattern was performed. The docking methodology was initially validated by docking simulation of the non-covalently-bound ligand molecule originally included in one of the studied protein structures (i.e., 2h1u). Details are given in our previous work [45].

4. Conclusions

The phthalimide-thiazole derivatives with various substituents in the phenyl ring have been synthesized to explore their role in human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity using spectrofluorimetric, spectrophotometric and computational approaches. The most active compounds containing 4-trifluoromethyl, 4-naphthyl and 2,4,6-trichloro substituents exhibit high HNE inhibitory activity with IC_{50} values of 12.98–16.62 μM . Additionally, compound with 4-trifluoromethyl group showed mixed mechanism of action. Computational investigation resulted in a consistent picture of the ligand-receptor pattern of interactions, common for the whole considered group of compounds in spite of a series of discrepancies observed between the calculated binding energies and the experimentally-inferred IC_{50} values. Moreover, some compounds showed high antiproliferative activity against leukemia, lung, breast, and urinary bladder human cancer cells lines with IC_{50} values of 8.21 to 25.57 μM . Additionally, spectrophotometric analysis showed that the most active compounds demonstrated high stability under physiological conditions. We believe that analogues containing 4-trifluoromethyl, 4-naphthyl and 2,4,6-trichloro substituents may serve as lead structures to design highly potent HNE inhibitors with good antiproliferative profile.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24010110/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, B.D.; organic synthesis, B.D.; validation B.D., M.Š., J.W. and W.P.; formal analysis, B.D., M.Š., W.P.; investigation, B.D., M.Š., W.P.; writing—original draft preparation, B.D. and W.P.; writing—review and editing, B.D.; visualization, B.D., W.P.; supervision, K.Z.L.; funding acquisition, K.Z.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Nicolaus Copernicus University (project No. WF 540/2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Galdiero, M.R.; Varricchi, G.; Loffredo, S.; Mantovani, A.; Marone, G. Roles of neutrophils in cancer growth and progression. *J. Leukoc. Biol.* **2018**, *103*, 457–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shaul, M.E.; Fridlender, Z.G. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**, *16*, 601–620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Masucci, M.T.; Minopoli, M.; Carriero, M.V. Tumor associated neutrophils. Their role in tumorigenesis, metastasis, prognosis and therapy. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1146. [[CrossRef](#)]
- Cristinziano, L.; Modestino, L.; Antonelli, A.; Marone, G.; Simon, H.U.; Varricchi, G.; Galdiero, M.R. Neutrophil extracellular traps in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *79*, 91–104. [[CrossRef](#)]
- Korkmaz, B.; Horwitz, M.S.; Jenne, D.E.; Gauthier, F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 726–759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lerman, I.; Hammes, S.R. Neutrophil elastase in the tumor microenvironment. *Steroids* **2018**, *133*, 96–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lee, W.L.; Downey, G.P. Leukocyte elastase: Physiological functions and role in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, *164*, 896–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Donarska, B.; Łączkowski, K.Z. Recent advances in the development of elastase inhibitors. *Future Med. Chem.* **2020**, *12*, 1809–1813. [[CrossRef](#)]
- Voynow, J.A.; Shinbashi, M. Neutrophil elastase and chronic lung disease. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1065. [[CrossRef](#)]
- Di Cesare Mannelli, L.; Micheli, L.; Cinci, L.; Maresca, M.; Vergelli, C.; Pacini, A.; Quinn, M.T.; Giovannoni, P.M.; Ghelardini, C. Effects of the neutrophil elastase inhibitor EL-17 in rat adjuvant-induced arthritis. *Rheumatology* **2016**, *55*, 1285–1294. [[CrossRef](#)]
- Wen, G.; An, W.; Chen, J.; Maguire, E.M.; Chen, Q.; Yang, F.; Pearce, S.W.A.; Kyriakides, M.; Zhang, L.; Ye, S.; et al. Genetic and pharmacologic inhibition of the neutrophil elastase inhibits experimental atherosclerosis. *J. Am. Heart. Assoc.* **2018**, *7*, 008187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Houghton, A.M.; Rzymkiewicz, D.M.; Ji, H.; Gregory, A.D.; Egea, E.E.; Metz, H.E.; Stolz, D.B.; Land, S.R.; Marconcini, L.A.; Kliment, C.R.; et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 219–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jiang, K.L.; Ma, P.P.; Yang, X.Q.; Zhong, L.; Wang, H.; Zhu, X.Y.; Liu, B.Z. Neutrophil elastase and its therapeutic effect on leukemia cells. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 4165–4172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ho, A.S.; Chen, C.H.; Cheng, C.C.; Wang, C.C.; Lin, H.C.; Luo, T.Y.; Lien, G.S.; Chang, J. Neutrophil elastase as a diagnostic marker and therapeutic target in colorectal cancers. *Oncotarget* **2014**, *30*, 473–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hunt, K.K.; Wingate, H.; Yokota, T.; Liu, Y.; Mills, G.B.; Zhang, F.; Fang, B.; Su, C.-H.; Zhang, M.; Yi, M.; et al. Elafin, an inhibitor of elastase, is a prognostic indicator in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, R3. [[CrossRef](#)]
- Duan, J.; Xiaokaiti, Y.; Fan, S.; Pan, Y.; Li, X.; Li, X. Direct interaction between caffeic acid phenethyl ester and human neutrophil elastase inhibits the growth and migration of PANC-1 cells. *Oncol. Rep.* **2017**, *37*, 3019–3025. [[CrossRef](#)]
- Lerman, I.; Garcia-Hernandez, M.L.; Rangel-Moreno, J.; Chiriboga, L.; Pan, C.; Nastiuk, K.L.; Krolewski, J.J.; Sen, A.; Hammes, S.R. Infiltrating myeloid cells exert protumorigenic actions via neutrophil elastase. *Mol. Cancer Res.* **2017**, *15*, 1138–1152. [[CrossRef](#)]
- Giovannoni, M.P.; Cantini, N.; Crocetti, L.; Guerrini, G.; Iacovone, A.; Schepetkin, I.A.; Vergelli, C.; Khlebnikov, A.I.; Quinn, M.T. Further modifications of 1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine derivatives as inhibitors of human neutrophil elastase. *Drug Dev. Res.* **2019**, *80*, 617–628. [[CrossRef](#)]
- Giovannoni, M.P.; Crocetti, L.; Cantini, N.; Guerrini, G.; Vergelli, C.; Iacovone, A.; Teodori, E.; Schepetkin, I.A.; Quinn, M.T.; Ciattini, S.; et al. New 3-unsubstituted isoxazolones as potent human neutrophil elastase inhibitors: Synthesis and molecular dynamic simulation. *Drug Dev. Res.* **2020**, *81*, 338–349. [[CrossRef](#)]
- Butt, A.R.S.; Abbasi, M.A.; Aziz-Ur-Rehman; Siddiqui, S.Z.; Hassan, M.; Raza, H.; Shah, S.A.A.; Seo, S.Y. Synthesis and structure-activity relationship of elastase inhibiting novel ethylated thiazole-triazole acetamide hybrids: Mechanistic insights through kinetics and computational contemplations. *Bioorg. Chem.* **2019**, *86*, 197–209. [[CrossRef](#)]
- Crocetti, L.; Schepetkin, I.A.; Ciciani, G.; Giovannoni, M.P.; Guerrini, G.; Iacovone, A.; Khlebnikov, A.I.; Kirpotina, L.N.; Quinn, M.T.; Vergelli, C. Synthesis and pharmacological evaluation of indole derivatives as deaza analogues of potent human neutrophil elastase inhibitors. *Drug Dev. Res.* **2016**, *77*, 285–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Giovannoni, M.P.; Schepetkin, I.A.; Crocetti, L.; Ciciani, G.; Cilibrizzi, A.; Guerrini, G.; Khlebnikov, A.I.; Quinn, M.T.; Vergelli, C. Cinnoline derivatives as human neutrophil elastase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 628–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Al-Awadhi, F.H.; Paul, V.J.; Luesch, H. Structural diversity and anticancer activity of marine-derived elastase inhibitors: Key features and mechanisms mediating the antimetastatic effects in invasive breast cancer. *ChemBioChem* **2018**, *19*, 815–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Łączkowski, K.Z.; Baranowska-Łączkowska, A. Recent studies on the thalidomide and its derivatives. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 2133–2136. [[CrossRef](#)]

25. El-Zahabi, M.A.; Sakr, H.; El-Adl, K.; Zayed, M.; Abdelraheem, A.S.; Eissa, S.I.; Elkady, H.; Eissa, I.H. Design, synthesis, and biological evaluation of new challenging thalidomide analogs as potential anticancer immunomodulatory agents. *Bioorg. Chem.* **2020**, *104*, 104218. [[CrossRef](#)]
26. Rateb, H.S.; Ahmed, H.E.; Ahmed, S.; Ihmaid, S.; Affi, T.H. Discovery of novel phthalimide analogs: Synthesis, antimicrobial and antitubercular screening with molecular docking studies. *EXCLI J.* **2016**, *6*, 781–796.
27. Okada-Junior, C.Y.; Monteiro, G.C.; Aguiar, A.C.C.; Batista, V.S.; de Souza, J.O.; Souza, G.E.; Bueno, R.V.; Oliva, G.; Nascimento-Junior, N.M.; Guido, R.V.C.; et al. Phthalimide derivatives with bioactivity against plasmodium falciparum: Synthesis, evaluation, and computational studies involving bc1 cytochrome inhibition. *ACS Omega* **2018**, *3*, 9424–9430. [[CrossRef](#)]
28. Pan, L.; Li, X.; Gong, C.; Jin, H.; Qin, B. Synthesis of N-substituted phthalimides and their antifungal activity against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Microb. Pathog.* **2016**, *95*, 186–192. [[CrossRef](#)]
29. Alanazi, A.M.; El-Azab, A.S.; Al-Suwaidan, I.A.; ElTahir, K.E.; Asiri, Y.A.; Abdel-Aziz, N.I.; Abdel-Aziz, A.A. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Anti-inflammatory and analgesic activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 115–123. [[CrossRef](#)]
30. Belluti, S.; Orteca, G.; Semeghini, V.; Rigillo, G.; Parenti, F.; Ferrari, E.; Imbriano, C. Potent Anti-cancer properties of phthalimide-based curcumin derivatives on prostate tumor cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *20*, 28. [[CrossRef](#)]
31. Zahran, M.A.; Abdin, Y.G.; Osman, A.M.; Gamal-Eldeen, A.M.; Talaat, R.M.; Pedersen, E.B. Synthesis and evaluation of thalidomide and phthalimide esters as antitumor agents. *Arch. Pharm.* **2014**, *347*, 642–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ihmaid, S.K.; Alraqa, S.Y.; Aouad, M.R.; Aljuhani, A.; Elbadawy, H.M.; Salama, S.A.; Rezki, N.; Ahmed, H.E.A. Design of molecular hybrids of phthalimide-triazole agents with potent selective MCF-7/HepG2 cytotoxicity: Synthesis, EGFR inhibitory effect, and metabolic stability. *Bioorg. Chem.* **2021**, *111*, 104835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Othman, I.M.M.; Gad-Elkareem, M.A.M.; El-Naggar, M.; Nossier, E.S.; Amr, A.E.E. Novel phthalimide based analogues: Design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 1259–1270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sayed, A.R.; Gomha, S.M.; Taher, E.A.; Muhammad, Z.A.; El-Seedi, H.R.; Gaber, H.M.; Ahmed, M.M. One-pot synthesis of novel thiazoles as potential anti-cancer agents. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 1363–1375. [[CrossRef](#)]
35. Grozav, A.; Găină, L.L.; Pileczki, V.; Crisan, O.; Silaghi-Dumitrescu, L.; Therrien, B.; Zaharia, V.; Berindan-Neagoe, I. The synthesis and antiproliferative activities of new arylidene-hydrazinyl-thiazole derivatives. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 22059–22072. [[CrossRef](#)]
36. Łączkowski, K.Z.; Misiura, K.; Świtalska, M.; Wietrzyk, J.; Baranowska-Łączkowska, A.; Fernández, B.; Paneth, A.; Plech, T. Synthesis and in vitro antiproliferative activity of thiazole-based nitrogen mustards. The hydrogen bonding interaction between model systems and nucleobases. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2014**, *14*, 1271–1281. [[CrossRef](#)]
37. Lino, C.I.; de Souza, I.G.; Borelli, B.A.; Matos, T.T.S.; Teixeira, I.N.S.; Ramos, J.P.; de Souza Fagundes, E.M.; de Oliveira Fernandes, P.; Maltarollo, V.G.; Johann, S.; et al. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 248–260. [[CrossRef](#)]
38. Karale, U.B.; Krishna, V.S.; Krishna, E.V.; Choudhari, A.S.; Shukla, M.; Gaikwad, V.R.; Mahizhaveni, B.; Chopra, S.; Misra, S.; Sarkar, D.; et al. Synthesis and biological evaluation of 2,4,5-trisubstituted thiazoles as antituberculosis agents effective against drug-resistant tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *178*, 315–328. [[CrossRef](#)]
39. Łączkowski, K.Z.; Biernasiuk, A.; Baranowska-Łączkowska, A.; Zielińska, S.; Sałat, K.; Furgała, A.; Misiura, K.; Malm, A. Synthesis, antimicrobial and anticonvulsant screening of small library of tetrahydro-2H-thiopyran-4-yl based thiazoles and selenazoles. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 24–39. [[CrossRef](#)]
40. Siddiqui, A.A.; Partap, A.; Khisal, S.; Yar, M.S.; Mishra, R. Synthesis, anticonvulsant activity and molecular docking study of novel thiazole pyridazinone hybrid analogues. *Bioorg. Chem.* **2020**, *99*, 103584. [[CrossRef](#)]
41. Rosada, B.; Bekier, A.; Cytarska, J.; Płaziński, W.; Zavyalova, O.; Sikora, A.; Dzitko, K.; Łączkowski, K.Z. Benzo[b]thiophene-thiazoles as potent anti-Toxoplasma gondii agents: Design, synthesis, tyrosinase/tyrosine hydroxylase inhibitors, molecular docking study, and antioxidant activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *184*, 111765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Hencken, C.P.; Jones-Brando, L.; Bordón, C.; Stohler, R.; Mott, B.T.; Yolken, R.; Posner, G.H.; Woodard, L.E. Thiazole, oxadiazole, and carboxamide derivatives of artemisinin are highly selective and potent inhibitors of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3594–3601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ayati, A.; Emami, S.; Moghimi, S.; Foroumadi, A. Thiazole in the targeted anticancer drug discovery. *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 1929–1952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Konno, S.; Thanigaimalai, P.; Yamamoto, T.; Nakada, K.; Kakiuchi, R.; Takayama, K.; Yamazaki, Y.; Yakushiji, F.; Akaji, K.; Kiso, Y.; et al. Design and synthesis of new tripeptide-type SARS-CoV 3CL protease. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 412–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Donarska, B.; Świtalska, M.; Płaziński, W.; Wietrzyk, J.; Łączkowski, K.Z. Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives. Rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study. *Bioorg. Chem.* **2021**, *110*, 104819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Eriks, J.C.; van der Goot, H.; Sterk, G.J.; Timmerman, H. Histamine H2-receptor agonists. Synthesis, in vitro pharmacology, and qualitative structure-activity relationships of substituted 4- and 5-(2-aminoethyl)thiazoles. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3239–3246. [[CrossRef](#)]

47. Russell, S.; Rahmani, R.; Jones, A.J.; Newson, H.L.; Neilde, K.; Cotillo, I.; Khajouei, M.R.; Ferrins, L.; Qureishi, S.; Nguyen, N.; et al. Hit-to-lead optimization of a novel class of potent, broad-spectrum Trypanosomacides. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9686–9720. [[CrossRef](#)]
48. Nunes, A.; Marto, J.; Gonçalves, L.M.; Simões, S.; Félix, R.; Ascenso, A.; Lopes, F.; Ribeiro, H.M. Novel and modified neutrophil elastase inhibitor loaded in topical formulations for psoriasis management. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 358. [[CrossRef](#)]
49. Donarska, B.; Świtalska, M.; Wietrzyk, J.; Płaziński, W.; Mizerska-Kowalska, M.; Zdzisińska, B.; Łączkowski, K.Z. Discovery of new 3,3-diethylazetidine-2,4-dione based thiazoles as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors with broad-spectrum antiproliferative activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7566. [[CrossRef](#)]
50. Crocetti, L.; Giovannoni, M.P.; Schepetkin, I.A.; Quinn, M.T.; Khlebnikov, A.I.; Cilibrizzi, A.; Piaz, V.D.; Graziano, A.; Vergelli, C. Design, synthesis and evaluation of N-benzoylindazole derivatives and analogues as inhibitors of human neutrophil elastase. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4460–4472. [[CrossRef](#)]
51. Kim, J.Y.; Lee, J.H.; Song, Y.H.; Jeong, W.M.; Tan, X.; Uddin, Z.; Park, K.H. Human neutrophil elastase inhibitory alkaloids from *Chelidonium majus* L. *J. Appl. Biol. Chem.* **2015**, *58*, 281–285. [[CrossRef](#)]
52. Rubinstein, L.V.; Shoemaker, R.H.; Paul, K.D.; Simon, R.M.; Tosini, S.; Skehan, P.; Sudiero, D.A.; Monks, A.; Boyd, M.R. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1113–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bramson, J.; McQuillan, A.; Aubin, R.; Alaoui-Jamali, M.; Batist, G.; Christodoulouopoulos, G.; Panasci, L.C. Nitrogen mustard drug resistant B-cell chronic lymphocytic leukemia as an in vivo model for crosslinking agent resistance. *Mut. Res.* **1995**, *336*, 269–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sidoryk, K.; Świtalska, M.; Wietrzyk, J.; Jaromin, A.; Piętka-Ottlik, M.; Cmoch, P.; Zagrodzka, J.; Szczepek, W.; Kaczmarek, L.; Peczyńska-Czoch, W. Synthesis and biological evaluation of new amino acid and dipeptide derivatives of neocryptolepine as anticancer agents. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5077–5087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Piechowska, K.; Mizerska-Kowalska, M.; Zdzisińska, B.; Cytarska, J.; Baranowska-Łączkowska, A.; Jaroch, K.; Łuczykowski, K.; Płaziński, W.; Bojko, B.; Kruszewski, S.; et al. Tropinone-derived alkaloids as potent anticancer agents: Synthesis, tyrosinase inhibition, mechanism of action, DFT calculation, and molecular docking studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9050. [[CrossRef](#)]
56. Schepetkin, I.A.; Khlebnikov, A.I.; Quinn, M.T. N-Benzoylpyrazoles are novel small-molecule inhibitors of human neutrophil elastase. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4928–4938. [[CrossRef](#)]
57. Hanwell, M.D.; Curtis, D.E.; Lonie, D.C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G.R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminformatics* **2012**, *4*, 17. [[CrossRef](#)]
58. Rappe, A.K.; Casewit, C.J.; Colwell, K.S.; Goddard, W.A.; Skiff, W.M. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10024–10035. [[CrossRef](#)]
59. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

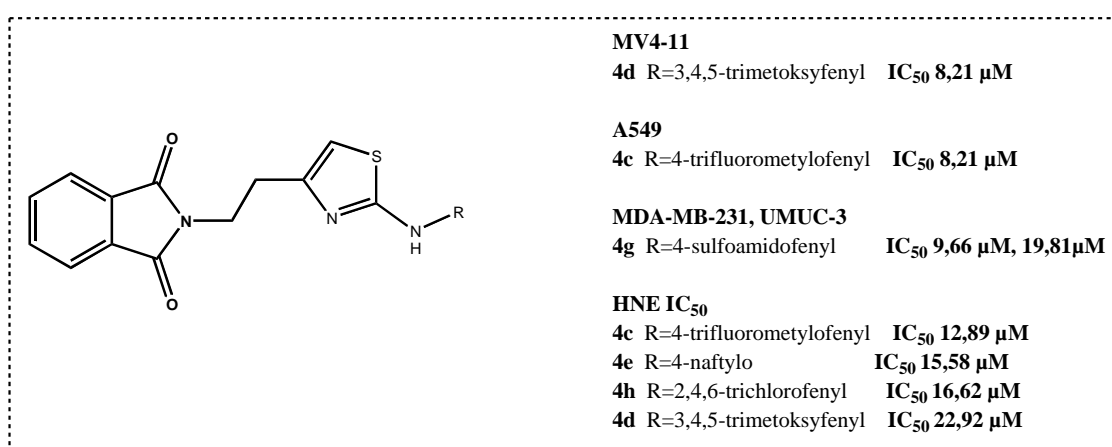
W **publikacji III** badano pochodne talidomidu o strukturze **D (Rycina 25)** zawierające wcześniej wybrane grupy farmakoforowe, jednakże nie zawierające dodatkowych łańcuchów bocznych oraz wiązań iminowych. Dodatkowo wcześniejsze badania dla **serii A-C** wykazały, że istotny wpływ na aktywność biologiczną ma sposób podstawienia pierścienia fenyloвого, dlatego postanowiono w niniejszej serii wprowadzić różne grupy elektrono-donorowe i elektrono-akceptorowe do pierścienia fenyloвого i zbadać ich wpływ na aktywność antyproliferacyjną i zdolność do inhibicji elastazy.

Ścieżkę syntezy związków **serii D** podobnie, jak wcześniej otrzymanych pochodnych rozpoczęto od reakcji ftalimidu z ketonem metylowinylowym uzyskując 2-(3-oksobutylo)ftalimid, a następnie poddano otrzymany keton reakcji bromowania w alkoholu metylowym otrzymując 2-(4-bromo-3-oksobutylo)ftalimid. Wykorzystując cyklizację Hantzsch otrzymamy bromoketon poddano reakcji z podstawionymi *N*-fenylotiomocznikami w absolutnym alkoholu etylowym otrzymując docelowe związki **serii D** z wydajnością w zakresie 54-81%.

Aktywność antyproliferacyjną otrzymanych cząsteczek, tak jak w przypadku poprzednich badań oceniono wobec linii komórek nowotworowych MV4-11, A549 oraz wobec komórek raka piersi MDA-MB-231 i pęcherza moczowego UMUC-3, a toksyczność oceniono wobec linii BALB/3T3. Lekiem referencyjnym podobnie, jak wcześniej była cisplatyna.

Wobec komórek linii nowotworowej bifenotypowej białaczki mielomonocytovej B najaktywniejszymi związkami okazały się pochodne zawierające podstawniki 4-chlorofenyloвого- (**4b**), 3,4,5-trimetoksyfenyloвого- (**4d**) oraz 3,5-dimetylofenyloвого- (**4f**) z wartościami IC_{50} odpowiednio 12,22 μ M, 8,21 μ M i 13,19 μ M. Związki te charakteryzowały się dobrym indeksem selektywności w zakresie 5,42-7,68. Pozostałe pochodne wykazywały zdecydowanie niższą aktywność antyproliferacyjną wobec MV4-11, z wartościami IC_{50} od 33,25 μ M (podstawnik naftyloвого) do 83,32 μ M (podstawnik sulfonamidowy). Wobec komórek raka płuc A549 najaktywniejszy okazał się związek **4c**, zawierający grupę trifluorometylową w pozycji 4 pierścienia fenyloвого, z IC_{50} wynoszącym 13,99 μ M oraz wyżej wymienione pochodne **4b**, **4d** i **4f** z IC_{50} w zakresie 18,11-25,57 μ M. Zarówno w stosunku do linii komórek raka piersi MDA-MB-231, jak i pęcherza moczowego UMUC-3 wysoką aktywność cytotoksyczną wykazywała

jedynie pochodna **4g**, zawierająca ugrupowanie sulfonamidowe, z IC_{50} wynoszącym odpowiednio 9,66 μ M i 19,81 μ M. Dodatkowo, w stosunku do linii komórkowej MDA-MB-231 pochodna **4g** działa prawie dwukrotnie silniej niż cisplatyna, będąca lekiem referencyjnym i była od niej prawie dwukrotnie mniej toksyczna w stosunku do komórek zdrowych. Należy również zaznaczyć, że w przeciwieństwie do działania wobec linii MDA-MB-231 i UMUC-3 pochodna **4g** wykazywała najniższą aktywność wobec MV4-11 oraz była nieaktywna wobec A549. Podsumowując dla każdej z badanych linii komórek nowotworowych spośród pochodnych **serii D** można wskazać wiodącą pochodną, która wykazywała największą aktywność antyproliferacyjną wobec danej linii komórek (**Rycina 29**).



Rycina 29. Najaktywniejsze związki **serii D** w odniesieniu do danych linii komórek nowotworowych i elastazy neutrofilowej

Poszukując najaktywniejszego związku **serii D**, który wykazywał najsilniejszą aktywność antyproliferacyjną ogólnie wobec wszystkich linii komórek nowotworowych, wskazać należy związek **4d** zawierający podstawnik 3,4,5-trimetoksyfenylowy z IC_{50} w zakresie 8,21-48,87 μ M. Natomiast najniższą aktywnością antyproliferacyjną charakteryzowały się pochodne **4a** (podstawnik 4-fluorofenylowy), **4h** (2,4,6-trichlorofenylowy) i **4i** (4-acetylofenylowy).

Następnym krokiem było określenie zdolności nowo otrzymanej **serii D** do hamowania działania ludzkiej elastazy neutrofilowej (HNE). W celu zbadania aktywności związków **4a-4f** zastosowano metodę spektrofotometryczną, z wykorzystaniem MOSuc-AAPV-AMC, jako substratu dla HNE oraz kwasu ursolowego, jako inhibitora referencyjnego. Wszystkie związki **serii D** wykazywały zdolność do inhibicji aktywności HNE.

Najsilniej działającymi związkami (**Rycina 29**) okazały się pochodne **4c** (podstawnik 4-trifluorometylofenylowy), **4e** (podstawnik naftylowy) oraz **4h** (podstawnik 2,4,6-trichlorofenylowy) z wartościami IC_{50} odpowiednio: 12,89 μ M, 15,58 μ M oraz 16,62 μ M. Dla najbardziej aktywnego związku **4c** wyznaczono dodatkowo parametry kinetyczne i stwierdzono, że związek ten wykazuje mieszany mechanizm inhibicji ludzkiej elastazy neutrofilowej. W porównaniu z inhibitorem referencyjnym wyżej wymienione pochodne działały 2- do 3-krotnie słabiej. Kolejno umiarkowaną aktywność hamującą wobec elastazy neutrofilowej wykazywały związki **4d** (podstawnik 3,4,5-trimetoksyfenylowy), **4i** (4-acetylofenylowy) i **4a** (4-fluorofenylowy), z wartościami IC_{50} w zakresie od 22,92 μ M do 29,35 μ M. Najslabiej działającymi związkami **serii D** okazały się pochodne **4f** i **4g** zawierające odpowiednio podstawniki 3,5-dimetylofenylowy i 4-sulfonamidofenylowy, które wykazywały wartość IC_{50} odpowiednio 49,88 μ M i 64,89 μ M. Należy zauważyć, że większą aktywność inhibującą elastazę w serii związków o podobnej strukturze i grupach funkcyjnych wykazują związki zawierające podstawniki o silniejszych właściwościach elektrono-akceptorowych i o większej zawadzie sterycznej. Zależność tę widać zestawiając ze sobą aktywności związków **4a** i **4c** (podstawniki 4-fluoro i 4-trifluorometylofenylowe), **4b** i **4h** (podstawniki 4-chloro i 2,4,5-trichlorofenylowe) oraz **4b** i **4c** (podstawniki 4-chloro- i 4-fluorofenylowy).

W kolejnym etapie przeprowadzono dokowanie molekularne. Obliczenia wykazały, że dwa atomy tlenu pierścienia ftalimidu (izoindolino-1,3-dionu), odpowiadają za wiązanie z miejscem aktywnym elastazy. Stwierdzono, że mechanizm wiązania badanych związków z enzymem, może być wynikiem tworzenia wiązania kowalencyjnego z udziałem Ser195, bądź tworzeniem innych sieci oddziaływań ligand-białko. Energie wiązania dla **serii D** uzyskane podczas symulacji dokowania wykazują podobną wielkość, w zakresie od -7,8 do -6,8 kcal/mol. Chociaż, w przypadku **serii D** nie uzyskano wysokiej korelacji pomiędzy wynikami eksperymentalnymi, a obliczeniami teoretycznymi, to dla dwóch najaktywniejszych związków **4c** i **4e** uzyskano najkorzystniejsze energie wiązania, potwierdzające wysoką aktywność eksperymentalną pochodnych.

Przeprowadzono również analizę mechanistycznych oddziaływań białko-ligand, występujących pomiędzy parami atomów, których odległość pomiędzy sobą nie przekracza 0,4 nm. Analiza pozwoliła na wytypowanie następujących korzystnych typów oddziaływań:

- atom tlenu grupy karbonylowej ftalimidu i łańcuch boczny Ser195 (wiązanie wodorowe),
- podstawniki aromatyczne i Phe215, Trp172 (oddziaływania polarne lub niepolarne w zależności od typu podstawnika),
- pierścień tiazolowy z Arg217 (polarne oddziaływania).

Z uwagi na fakt, że stabilność nowo projektowanych substancji jest kluczowym parametrem determinującym ich aktywność biologiczną i biorąc pod uwagę podobną strukturę związków **serii D** postanowiono wybrać związek charakteryzujący się wysoką aktywnością antyproliferacyjną oraz hamującą elastazę neutrofilową i ocenić jego stabilność chemiczną w wodnym buforze fosforanowym (pH 7,3). Wybrana pochodna **4c** wykazywała wysoką stabilność ($t_{1/2}=38,5\text{min}$) w warunkach zbliżonych do fizjologicznych.

Podsumowując nowo zaprojektowana **seria D**, podobnie jak wcześniej otrzymane pochodne stanowi zbiór związków o wysokiej aktywności antyproliferacyjnej i hamującej aktywność elastazy, potwierdzając, że układy ftalimidu i tiazolu stanowią ważne farmakofory warunkujące aktywność projektowanych pochodnych. Usunięcie ugrupowania chloroacetamidowego oraz wiązania iminowego w porównaniu do struktury związków **serii B**, spowodowało uzyskanie związków **serii D**, o aktywności antyproliferacyjnej słabszej w stosunku do linii komórek MV4-11, podobnej w stosunku do linii komórek A549 oraz mniej toksycznych w stosunku do linii komórek zdrowych BALB/3T3. Związki **serii D** wykazywały także dobrą aktywność antyproliferacyjną wobec komórek raka piersi (MDA-MB-231) oraz pęcherza moczowego (UMUC-3). Wprowadzone zmiany strukturalne nowo zaprojektowanej serii doprowadziły do uzyskania pochodnych o wysokiej aktywności hamującej elastazę neutrofilową z IC_{50} w zakresie mikromolowym, co wskazuje na fakt, że ugrupowania chloroacetamidowe i wiązanie iminowe nie są niezbędne do aktywności prezentowanych związków wobec badanego enzymu. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej publikacji potwierdziły również znaczenie rodzaju podstawników w pierścieniu fenylowym, w strukturze badanych związków na ich aktywność, oraz pozwoliły na wytypowanie podstawników determinujących najwyższą aktywność biologiczną wobec danych linii komórek nowotworowych. Dodatkowo zestawiając ze sobą aktywność antyproliferacyjną i hamującą elastazę neutrofilową można stwierdzić, że związek **4d** zawierający

ugrupowanie 3,4,5-trimetoksyfenylowe wykazywał zarówno silne działanie wobec badanych linii komórek nowotworowych oraz silną zdolność do inhibicji elastazy neutrofilowej, co czyni go obiecującym kandydatem dla związków przeciwnowotworowych działających między innymi poprzez zdolność do inhibicji aktywności elastazy neutrofilowej.

3. Publikacja IV: Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action

Bioorganic Chemistry 138 (2023) 106608



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioorg



Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: Rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action

Beata Donarska^{a,*}, Adrianna Sławińska-Brych^b, Magdalena Mizerska-Kowalska^c,
Barbara Zdzisińska^c, Wojciech Płaziński^{d,e}, Krzysztof Z. Łączkowski^a

^a Department of Chemical Technology and Pharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Juraska 2, 85-089 Bydgoszcz, Poland

^b Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19 Street, 20-033 Lublin, Poland

^c Department of Virology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19 Street, 20-033 Lublin, Poland

^d Jerzy Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry, Polish Academy of Sciences, Niezapominajek 8, 30-239, Cracow, Poland

^e Department of Biopharmacy, Medical University of Lublin, Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Thalidomide
Human neutrophil elastase
Antiproliferative activity
Competitive inhibitor
Molecular docking

ABSTRACT

Here, we rationally designed a human neutrophil elastase (HNE) inhibitors **4a-4f** derived from thalidomide. The HNE inhibition assay showed that synthesized compounds **4a**, **4b**, **4e** and **4f** demonstrated strong HNE inhibition properties with IC₅₀ values of 21.78–42.30 nM. Compounds **4a**, **4c**, **4d** and **4f** showed a competitive mode of action. The most potent compound **4f** shows almost the same HNE inhibition as sivelestat. The molecular docking analysis revealed that the strongest interactions occur between the azetidine-2,4-dione group and the following three aminoacids: Ser195, Arg217 and His57. A high correlation between the binding energies and the experimentally determined IC₅₀ values was also demonstrated. The study of antiproliferative activity against human T47D (breast carcinoma), RPMI 8226 (multiple myeloma), and A549 (non-small-cell lung carcinoma) revealed that designed compounds were more active compared to thalidomide, pomalidomide and lenalidomide used as the standard drugs. Additionally, the most active compound **4f** derived from lenalidomide induces cell cycle arrest at the G2/M phase and apoptosis in T47D cells.

1. Introduction

Thalidomide was originally prescribed as a sedative and antiemetic, mainly to treat nausea in pregnant women, but was forgotten for many years due to its discovered teratogenic effects. However, reports on its high effectiveness in the therapy of erythema nodosum have put it back in the spotlight in the search for new therapeutic agents [1,2]. Particularly noteworthy are the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of thalidomide, i.e. inhibition of the production of tumor necrosis factor (TNF- α) and other pro-inflammatory cytokines, and stimulating activity on T-lymphocytes [3,4]. The anti-angiogenic effect of thalidomide, related to the inhibition of fibroblast growth factor (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF), was another reason for its use in anticancer therapy [5].

Numerous studies have shown high activity of thalidomide in the

treatment of advanced multiple myeloma (MM), a hematopoietic malignancy characterized by clonal proliferation of atypical plasma cells [6,7]. As a result, in 2006, the FDA approved thalidomide for use in newly diagnosed cases of multiple myeloma. Despite high therapeutic efficacy, thalidomide is also characterized by high toxicity [8]. Therefore, attempts were made to modify the structure of thalidomide, leading to the discovery of a new class of immunomodulatory compounds (IMiDs). In addition, the discovery of cereblon responsible for the therapeutic effect of thalidomide in the treatment of multiple myeloma, but also for its teratogenicity, led to the rapid growth of this family of compounds [9,10]. By introducing an amino group at position 4 in the thalidomide ring, lenalidomide, a second-generation IMiD, was obtained. Lenalidomide has a stronger anti-inflammatory and immunomodulatory effect than the parent compound, with a better safety profile, especially in terms of neurotoxicity. It is currently approved for

* Corresponding author.
E-mail address: 265000@stud.umk.pl (B. Donarska).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106608>

Received 21 March 2023; Received in revised form 5 May 2023; Accepted 9 May 2023

Available online 12 May 2023

0045-2068/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

the treatment of multiple myeloma and myelodysplastic syndromes [11]. In 2013, the FDA approved another thalidomide derivative, pomalidomide (Pomalyst), for use in relapsed and/or refractory MM [12]. Ixeromide (CC-220) is a modulator of brain ligase E3, currently in phase 1b/2a clinical trials in relapsed refractory multiple myeloma (RRMM), showing activity against lenalidomide- and pomalidomide-resistant multiple myeloma cells [13]. Another new lenalidomide derivative (CC-885) containing a urea group in its structure has been found to be effective against acute myeloid leukemia (AML) cells, which is an interesting finding because classic IMiDs have not been shown to be effective in the treatment of this type of cancer (Fig. 1) [14]. Apart from haematological malignancies, thalidomide and its derivatives have been shown to be active in other types of malignancies [15,16]. Using a mouse breast tumor model (4T1), thalidomide has been shown to significantly reduce tumor growth by inhibiting angiogenesis and promoting tumor cell necrosis [17]. The phthalimide system found in the thalidomide molecule has been used in the design of drugs against prostate [18], breast and liver cancers [19].

Despite significant progress in the search for new compounds with anticancer activity, the drug resistance and the ability of cancer cells to form metastases are still important issues limiting the effectiveness of therapy. When looking for new entry points for anticancer drugs, attention is paid to the chronic inflammation occurring in the tumor microenvironment and the ability of cancer cells to adapt the host's immune system to facilitate the growth and progression of cancer cells [20]. Tumor-associated neutrophils (TAN) are among the first fractions of cells to appear in response to cytokines secreted by the tumor [21,22]. The protumorigenic role of TANs is related to their ability to generate NETs (neutrophil extracellular traps), which play an important role in the body's defense against infection; while during tumor development, they stimulate the progression and metastasis of tumor cells [21,23]. NETs are structures composed of DNA fibres, chromatin and proteolytic enzymes, which include neutrophil elastase, myeloperoxidase,

proteinase 3 and cathepsin G. Human neutrophil elastase (HNE) is a 29 kDa cytotoxic serine protease whose activity is determined by the catalytic triad composed three amino acids, Asp102, His57 and Ser195 responsible of its proteolytic activity. During infection, it is one of the key enzymes that break down pathogens. However, due to its high activity during the inflammatory response, it is implicated in the pathogenesis of many diseases characterized by chronic inflammation, such as chronic obstructive pulmonary disease, rheumatoid arthritis, psoriasis and cancer [24]. It has been shown that elastase is involved in the initiation, progression and at the metastasis stage of many types of cancer [25–27]. It has been found to stimulate the growth of cancer cells in the A549 lung adenocarcinoma cell line [28], and in a mouse model of lung cancer (CC-LR) the absence of neutrophil elastase has been shown to arrest tumor growth by inhibiting proliferation and angiogenesis [29]. In the case of a HER2-positive breast cancer cell line (SKBR-3), which exhibits a tumor autoprogression mechanism associated with the activation of transforming growth factor- α (TGF- α) initiated by neutrophil elastase, it was found that the combined use of trastuzumab (HER2 inhibitor) and sivelestat (HNE inhibitor) inhibited tumor growth to a greater extent than monotherapy [30]. Therefore, the inhibition of neutrophil elastase activity is currently a promising molecular target in the design of anticancer drugs.

Currently, many inhibitors of human neutrophil elastase are known containing various pharmacophores, such as: benzoxazinone [31], indole [32], aminoglycoside [33], thiazole [34,35], phthalimide [35] and azetidine-2,4-diones [36–39]. However, only Sivelestat has been approved for clinical use in Japan and the Republic of Korea for the treatment of acute lung injury [40]. Considering the above-mentioned findings, there is an urgent need to develop synthetic low molecular weight HNE inhibitors that show high anticancer activity.

In our recent studies, we identified two leading structures of thiazole derivatives containing phthalimide A1 [35] and 3,3-diethylazetidine-2,4-dione A2 moieties [37], which show high HNE inhibition activity

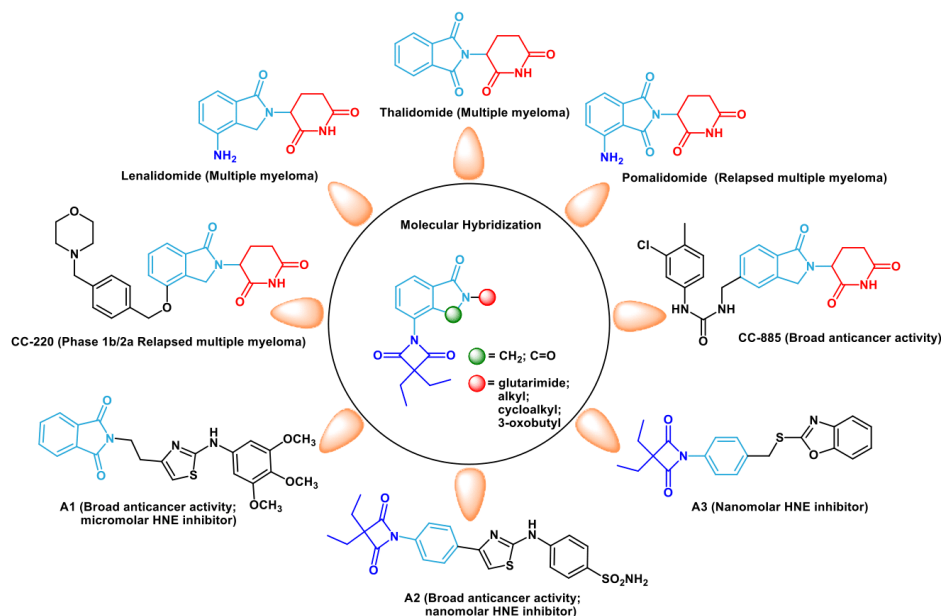


Fig. 1. The rational design strategy for the thalidomide derivatives.

and anticancer activity. Other authors have found that benzothiazole containing 3,3-diethylazetidine-2,4-dione **A3** pharmacophore has the ability to inhibit HNE [36]. As can be easily observed, the presence of phthalimide and 3,3-diethylazetidine-2,4-dione moieties are key building blocks in these compounds. Therefore, we hypothesized that substitution of the phthalimide fragment of thalidomide with 3,3-diethylazetidine-2,4-dione system, could modulate their inhibitory activity against HNE as well as induce high anticancer activity (Fig. 1). To the best of our knowledge, the anticancer properties of azetidine-2,4-dione derivatives are only studied in our group.

In order to assess the effect of the newly obtained compounds on the activity of human neutrophil elastase, spectrofluorimetric studies were performed using *N*-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-7-amido-4-methyl-coumarin (MeOSuc-AAPV-AMC) as a substrate and followed by a thorough kinetic analysis of their mechanism of action. Next, the anticancer activity was evaluated against human T47D (breast carcinoma), RPMI 8226 (multiple myeloma), and A549 (non-small-cell lung carcinoma), while toxicity was assessed against normal human skin fibroblasts (HSF). For the most active compound, the mechanism of antiproliferative activity was also investigated, evaluating the compound's effect on the cell cycle and the process of apoptosis and necrosis in T47D cancer cells. Finally, the effect of compounds structure on their activity and the possible binding mechanism were evaluated using the molecular docking.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

All reactions were performed under nitrogen atmosphere. All reagents and starting materials were purchased from commercial suppliers and used without further purification. The dichloromethane was dried over calcium hydride. ¹H NMR (400 MHz) and ¹³C NMR (100 MHz) spectra were recorded on a Bruker Avance III multinuclear instrument. High resolution mass spectrometry measurements were performed using Synapt G2-Si mass spectrometer (Waters) equipped with quadrupole-Time-of-flight mass analyser. The mass spectrometer was operated in the positive ion detection mode. The results of the measurements were processed using the MassLynx 4.1 software (Waters) incorporated with the instrument. Melting points were determined in open glass capillaries and are uncorrected. The product was purified by column chromatography using silicagel (230–400 mesh). Analytical TLC was performed using Macherey-Nagel Polygram Sil G/UV254 0.2 mm plates.

2.2. Chemistry

2.2.1. 3- and 4-Nitro-N-alkylphthalimides (2a–2c)

Compounds (**2a–2c**) were obtained according to the literature procedure [41–43].

2.2.2. 3-Nitro-2-(3-oxobutyl)phthalimide (2d)

3-Buten-2-one (0.70 g, 10.0 mmol) was added to a stirred solution of 3-nitrophthalimide (**1c**) (1.92 g, 10.0 mmol) in mixture of ethyl acetate (20 mL) and absolute ethyl alcohol (20 mL) after which sodium ethoxide (0.027 g) was added. The solution was stirred at room temperature for 1 h, then heated under reflux for 20 h. After this time, the solvent was evaporated and the crude product was crystallized from ethyl alcohol to yield (2.22 g, 84%); dichloromethane/methanol (95:5); *R*_f = 0.64; mp 124–126 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 2.09 (s, 3H, CH₃); 2.84 (t, 2H, CH₂, *J* = 6.8 Hz); 3.75 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.2 Hz); 8.04 (t, 1H, CH_{Ar}, *J* = 8.0 Hz); 8.14 (dd, 1H, CH_{Ar}, *J*₁ = 7.2 Hz, *J*₂ = 0.8 Hz); 8.25 (dd, 1H, CH_{Ar}, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 0.8 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 30.23 (CH₃); 33.50 (CH₂); 40.95 (CH₃); 123.49 (C); 127.20 (C); 128.67 (C); 134.12 (C); 136.55 (C); 144.68 (C); 163.59 (C); 166.14 (C); 206.78 (C).

2.2.3. 3- and 4-Amino-N-alkylphthalimides (3a–3c)

Compounds (**3a–3c**) were obtained according to the literature procedure [41–43].

2.2.4. 3-Amino-2-(3-oxobutyl)phthalimide (3d)

Tin chloride dihydrate (5.42 g, 24 mmol) was added to 3-nitro-2-(3-oxobutyl)phthalimide (**2d**) (2.09 g, 8.0 mmol) dissolved in absolute ethyl alcohol (80 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h. Next, the reaction mixture was added to water and extracted with dichloromethane. The solution was dried with MgSO₄ and the solvent was evaporated to yield (1.30 g, 70%); dichloromethane/methanol (95:5); *R*_f = 0.57; mp 89–90 °C; ¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 2.10 (s, 3H, CH₃); 2.79 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.0 Hz); 3.69 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.7 Hz); 7.14 (d, 1H, CH_{Ar}, *J* = 7.0 Hz); 7.37 (d, 1H, CH_{Ar}, *J* = 8.4 Hz); 7.62 (t, 1H, CH_{Ar}, *J* = 7.7 Hz); 8.90 (s, 1H, NH₂), 9.07 (s, 1H, NH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 30.16 (CH₃); 32.76 (CH₂); 41.54 (CH₂); 110.82 (C); 113.19 (C); 118.54 (C); 132.48 (C); 135.98 (C); 149.11 (C); 168.26 (C); 168.49 (C); 207.01 (C).

2.2.5. 4-(3,3-Diethyl-2,4-dioxazetidin-1-yl)-2-propylisoindoline-1,3-dione (4a). Typical procedure

To dry dichloromethane (15 mL), 3-amino-*N*-propylphthalimide (**3a**) (0.50 g, 2.44 mmol), diethylmalonyldichloride (0.62 g, 0.55 mL, 3.17 mmol) and triethylamine (0.64 g, 0.88 mL, 6.34 mmol) were added. The solution was stirred at room temperature for 20 h. The solvent was then evaporated, THF was added and the precipitate was filtered off. The product was purified by column chromatography. Yield: 0.26 g, 33%, (dichloromethane/methanol (95:5)); *R*_f = 0.43; mp 66–68 °C;

¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 0.88 (t, 3H, CH₃, *J* = 7.7 Hz); 1.09 (t, 6H, 2CH₃, *J* = 7.7 Hz); 1.59 (sext, 2H, CH₂, *J* = 7.7 Hz); 1.90 (q, 4H, 2CH₂, *J* = 7.7 Hz); 3.52 (t, 2H, CH₂, *J* = 7.0 Hz); 7.81–7.84 (m, 1H, CH_{Ar}); 7.94–7.99 (m, 2H, 2CH_{Ar}).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 9.37 (2CH₃); 11.64 (CH₃); 21.70 (CH₂); 23.28 (2CH₂); 39.75 (CH₂); 71.09 (C); 124.00 (C); 124.99 (C); 125.44 (C); 132.04 (C); 133.76 (C); 136.38 (C); 165.88 (C); 167.29 (C); 171.33 (2C). ESI-HRMS (*m/z*) calculated for C₁₈H₂₁N₂O₄: 329.1501 [M + H]⁺. Found 329.1500.

2.2.6. 5-(3,3-Diethyl-2,4-dioxazetidin-1-yl)-2-propylisoindoline-1,3-dione (4b)

Yield: 0.48 g, 60%, (dichloromethane/methanol (95:5)); *R*_f = 0.64; mp 88–89 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 0.85 (t, 3H, CH₃, *J* = 7.2 Hz); 0.98 (t, 6H, 2CH₃, *J* = 7.2 Hz); 1.58 (sext, 4H, 2CH₂, *J* = 6.8 Hz); 1.87 (q, 4H, 2CH₂, *J* = 8.0 Hz); 3.53 (t, 2H, CH₂, *J* = 6.4 Hz); 7.99 (dd, 1H, CH_{Ar}, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz); 7.97–8.01 (m, 1H, CH_{Ar}); 8.06–8.08 (m, 1H, CH_{Ar}); 8.09–8.13 (m, 1H, CH_{Ar}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 9.28 (2CH₃); 11.64 (CH₃); 21.72 (CH₂); 23.09 (2CH₂); 40.67 (CH₂); 72.19 (C); 113.39 (C); 124.32 (C); 125.24 (C); 129.25 (C); 133.59 (C); 137.98 (C); 167.42 (C); 167.57 (C); 171.86 (2C). ESI-HRMS (*m/z*) calculated for C₁₈H₂₁N₂O₄: 329.1501 [M + H]⁺. Found 329.1494.

2.2.7. 2-Cyclohexyl-4-(3,3-diethyl-2,4-dioxazetidin-1-yl)isoindoline-1,3-dione (4c)

Yield: 0.34 g, 42%, (dichloromethane/methanol (95:5)); *R*_f = 0.56; mp 113–115 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 1.08 (t, 6H, 2CH₃, *J* = 7.2 Hz); 1.12–1.19 (m, 1H, CH₂); 1.24–1.36 (m, 2H, CH₂); 1.58–1.65 (m, 1H, CH₂); 1.66–1.81 (m, 4H, 2CH₂); 1.88 (q, 4H, 2CH₂, *J* = 7.3 Hz); 1.95–2.07 (m, 2H, CH₂); 3.94 (tt, 1H, CH, *J*₁ = 1.2 Hz, *J*₂ = 3.6 Hz); 7.79 (dd, 1H, CH_{Ar}, *J*₁ = 7.0 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz); 7.89–7.96 (m, 2H, 2CH_{Ar}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 9.39 (2CH₃); 23.23 (2CH₂); 25.39 (C); 25.88 (2C); 29.78 (2C); 50.86 (C); 71.02 (C); 123.98 (C); 124.95 (C); 125.24 (C); 132.14 (C); 133.64 (C); 136.37 (C); 165.68 (C); 167.13 (C); 171.41 (2C). ESI-HRMS (*m/z*) calculated for C₂₁H₂₅N₂O₄: 369.1814 [M + H]⁺. Found 369.1813.

2.2.8. 4-(3,3-Diethyl-2-methylene-4-oxoazetidin-1-yl)-2-(3-oxobutyl)isoindoline-1,3-dione (**4d**)

Yield: 0.61 g, 70%, (dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.58$; mp 130–131 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.01 (t, 6H, 2CH_3 , $J = 7.2$ Hz); 1.94 (q, 4H, 2CH_2 , $J = 7.6$ Hz); 2.09 (s, 3H, CH_3); 2.82 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz); 3.74 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz); 7.95–7.97 (m, 3H, 3CH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 8.98 (2CH_3); 28.06 (2CH_2); 30.22 (CH_3); 33.31 (CH_2); 41.17 (CH_2); 52.85 (C); 124.35 (C); 125.65 (C); 129.11 (C); 130.86 (C); 133.85 (C); 136.45 (C); 165.15 (C); 166.94 (C); 169.85 (C); 172.72 (C); 206.78 (C). ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_5$: 357.1451 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Found 357.1453.

2.2.9. 4-(3,3-Diethyl-2,4-dioxazetidin-1-yl)-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)isoindoline-1,3-dione (**4e**)

Yield: 0.34 g, 35%, (dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.36$; mp 214–215 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.07 (t, 6H, 2CH_3 , $J = 7.2$ Hz); 1.88 (q, 4H, 2CH_2 , $J = 7.6$ Hz); 2.01–2.09 (m, 1H, CH_2); 2.54–2.67 (m, 2H, CH_2); 2.79–2.92 (m, 1H, CH_2); 5.16 (dd, 1H, CH, $J_1 = 13.2$ Hz; $J_2 = 5.2$ Hz); 7.84–7.93 (m, 1H, CH_{Ar}); 7.96–8.08 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 11.13 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 9.38 (2CH_3); 22.31 (C); 23.29 (2CH_2); 31.36 (C); 49.62 (C); 71.19 (C); 124.49 (C); 125.03 (C); 125.30 (C); 132.59 (C); 133.30 (C); 136.99 (C); 165.09 (C); 166.48 (C); 170.06 (C); 171.26 (C); 173.19 (C). ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_6$: 398.1352 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Found 398.1351.

2.2.10. 3-(4-(3,3-Diethyl-2,4-dioxazetidin-1-yl)-1-oxoisindolin-2-yl)piperidine-2,6-dione (**4f**)

Yield: 0.32 g, 43%, (dichloromethane/methanol (95:5); $R_f = 0.36$; mp 102–105 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.01 (t, 6H, 2CH_3 , $J = 7.2$ Hz); 1.86 (q, 4H, 2CH_2 , $J = 7.3$ Hz); 1.95–2.05 (m, 1H, CH_2); 2.37–2.46 (m, 1H, CH_2); 2.54–2.63 (m, 1H, CH_2); 2.84–2.93 (m, 1H, CH_2); 4.53 (dd, 2H, CH_2 , $J_1 = 18.4$ Hz; $J_2 = 23.2$ Hz); 5.12 (dd, 1H, CH, $J_1 = 5.2$ Hz; $J_2 = 13.2$ Hz); 7.67 (t, 1H, CH_{Ar} , $J = 8.0$ Hz); 7.76–7.80 (m, 2H, 2CH_{Ar}); 10.99 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 9.49 (2CH_3); 22.77 (C); 23.12 (2CH_2); 31.63 (C); 47.46 (C); 52.26 (C); 70.59 (C); 123.48 (C); 126.53 (C); 126.97 (C); 129.93 (C); 134.29 (C); 135.17 (C); 167.40 (C); 171.29 (C); 171.78 (C); 173.28 (C). ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5$: 384.1559 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Found 384.1560.

2.3. Biological activity

2.3.1. Elastase inhibition assay and kinetic analysis of the inhibition of elastase

The neutrophil elastase inhibition assay and kinetic analysis of the inhibition of elastase were performed with some modifications according to the literature [44]. For more details see also the [Supporting information](#).

2.3.2. Antiproliferative activity

Antiproliferative activity of the investigated compounds was evaluated after 72-h exposure employing the MTT assay, and the IC_{50} values were calculated as described previously [45].

2.3.3. Apoptosis and cell cycle assays

The quantitative analysis of apoptosis, necrosis and cell cycle analysis were performed as previously described [45]. For more details see also the [Supporting information](#).

2.4. Analysis of compounds stability

Spontaneous compound hydrolysis studies were performed as previously described [35].

2.5. Molecular docking study

All ligands were prepared using Avogadro 1.1.1 [46] and optimized within the UFF force field [47]. The AutoDock Vina software [48] was applied in all docking simulations. More details are given in our previous work [49].

3. Results and discussion

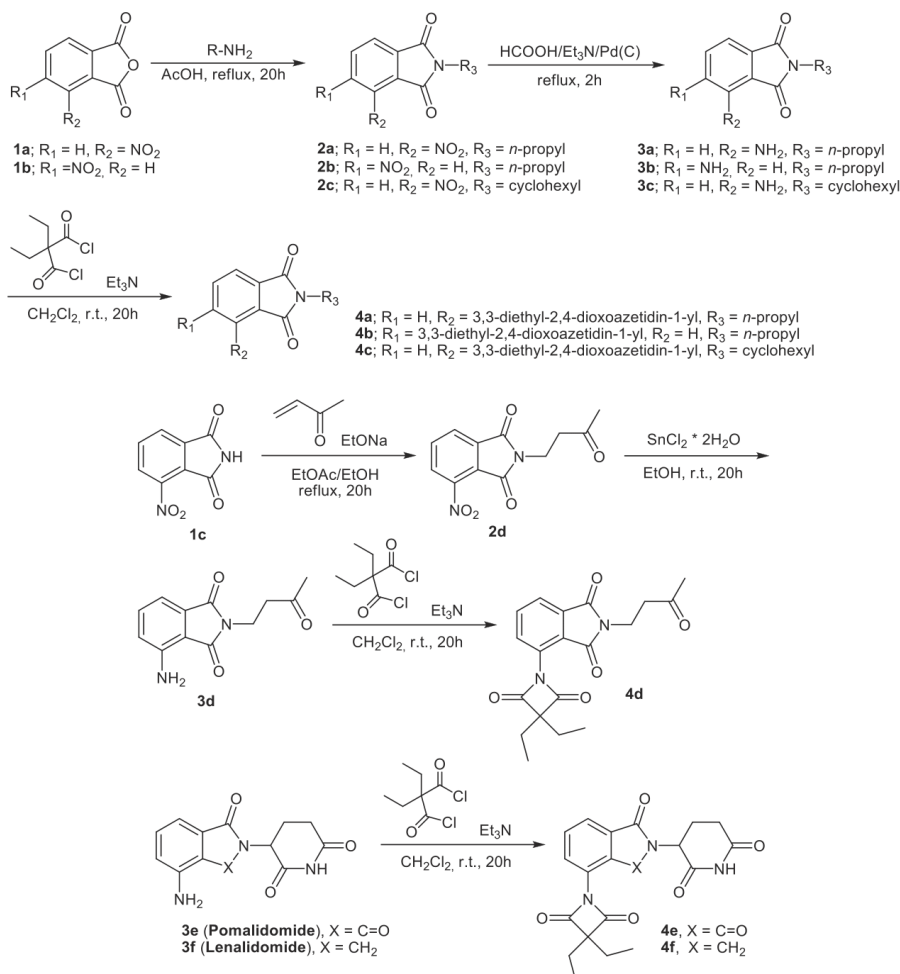
3.1. Chemistry

The synthesis pathway for the novel thalidomide derivatives **4a–4f** is shown in [Scheme 1](#). In the first step, 3-nitro- or 4-nitrophthalic anhydrides were reacted with *n*-propylamine or cyclohexylamine to obtain the corresponding *N*-substituted nitrophthalimides (**2a–2c**) [41–43]. 3-Nitro-2-(3-oxobutyl)phthalimide (**2d**) was obtained by reacting 3-nitrophthalimide (**1c**) with 3-buten-2-one in the presence of sodium ethoxide in the mixture of ethyl acetate and absolute ethyl alcohol. Then, the nitro-derivatives **2a–2c** were subjected to transfer hydrogenation in a mixture of formic acid and triethylamine in the presence of (Pd/C) as a catalyst, yielding quantitatively *N*-substituted aminophthalimides (**3a–3c**) [41–43]. 3-Amino-2-(3-oxobutyl)phthalimide (**3d**) was obtained by reduction of the nitro-derivative **2d** with tin dichloride dihydrate in ethyl alcohol solution. The final thalidomide derivatives **4a–4f** were obtained by the reaction of *N*-substituted aminophthalimides (**3a–3d**) as well as pomalidomide and lenalidomide with diethylmalonyldichloride in the presence of triethylamine in dry dichloromethane with good yield. The $^1\text{H NMR}$ spectra of the derivatives **4a–4f** showed characteristic two peaks from ethyl groups at about 1.00 and 1.90 ppm. On the $^{13}\text{C NMR}$ spectrum these groups are represented by signals at about 9.00 and 23.00 ppm. In addition, in the $^{13}\text{C NMR}$ spectra of derivatives **4a–4f**, characteristic signals derived from two carbonyl groups of the phthalimide group were observed at about 165 ppm. ESI-HRMS mass spectra of all compounds fully support the proposed structures.

3.2. HNE inhibitory assay and kinetic study

The inhibitory activity of compounds **4a–4f** against human neutrophil elastase was evaluated by spectrofluorimetric method and compared with Sivelestat as a reference HNE inhibitor and the results are summarized in [Table 1](#). Among the investigated compounds, the best inhibition effect was demonstrated by lenalidomide derivative **4f**, with IC_{50} value 21.78 nM. This compound inhibited elastase activity almost at the same level as the reference inhibitor Sivelestat with IC_{50} value 18.33 nM. The pomalidomide derivative **4e** also showed strong elastase inhibition with an IC_{50} value 36.23 nM. However, its activity is almost two times lower than the activity of the lenalidomide derivative **4f**. This indicates a beneficial effect of the introduction of the CH_2 group in place of the carbonyl group in the phthalimide ring on the ability to inhibit the HNE activity. Compounds **4a** and **4b** contain an *n*-propyl substituent instead of the glutarimide ring and differ from each other in the position of the 3,3-diethyl-2,4-dioxazetidin-1-yl group in the phthalimide ring. Studies have shown that compound **4b** containing a 3,3-diethyl-2,4-dioxazetidin-1-yl group in position 5 in the phthalimide ring shows higher activity compared to compound **4a** with the same substituent in position 4, with IC_{50} values 30.21 and 42.30 nM, respectively. The introduction of a cyclohexyl substituent reduces the ability to inhibit elastase, however, the highest decrease in activity was observed for the 3-oxobutyl substituent. The IC_{50} values for compounds **4c** and **4d** were 120.40 and 1313.00 nM, respectively.

To investigate the mechanism of HNE inhibition, appropriate kinetic studies were performed, and the results are presented in [Table 1](#). An example of Lineweaver-Burk plots (L-B plots) and secondary plots generated to determine the inhibition constants (K_i and K_{is}) for the most active compound **4f** is presented in [Fig. 2](#). The performed studies showed



Scheme 1. Synthesis of thalidomide derivatives 4a–4f.

Table 1
HNE inhibitory effect and kinetic analysis of compounds 4a–4f.

Compound	IC ₅₀ ± SD [nM]	Inhibition type	K _i [nM]	K _{IS} [nM]
4a	42.30 ± 1.34	competitive	22.38	—
4b	30.21 ± 0.86	mixed type I	5.62	7.40
4c	120.4 ± 3.30	competitive	70.35	—
4d	1313.00 ± 52.80	competitive	245.77	—
4e	36.23 ± 1.26	mixed type I	21.74	25.93
4f	21.78 ± 0.44	competitive	8.04	—
Sivelestat	18.33 ± 0.73	—	—	—

that compounds **4a**, **4c**, **4d** and **4f** are characterized by a competitive inhibition model with K_i values of 22.38, 70.35, 245.77 and 8.04 nM, respectively. Derivatives **4b** and **4e** were characterized by a mixed type of inhibition. Additionally, shifting the azetidine-2,4-dione group from

position 4 to position 5 in the phthalimide ring changes the mechanism of inhibition from competitive to mixed.

3.3. Antiproliferative activity

As we have already mentioned, neutrophil elastase present in the tumor microenvironment may promote tumor growth and metastasis [20], therefore we decided to investigate the anticancer potential of the newly obtained derivatives through analysis of their antiproliferative activity against three human cancer cell lines: T47D (breast carcinoma), RPMI 8226 (multiple myeloma), and A549 (non-small-cell lung carcinoma). Moreover, the antiproliferative activity of all compounds was tested against normal human skin fibroblasts, i.e. the HSF cell line, to evaluate the selectivity index (SI). The SI index = IC₅₀ of compound in a normal cell line/IC₅₀ of the compound in cancer cell line. The

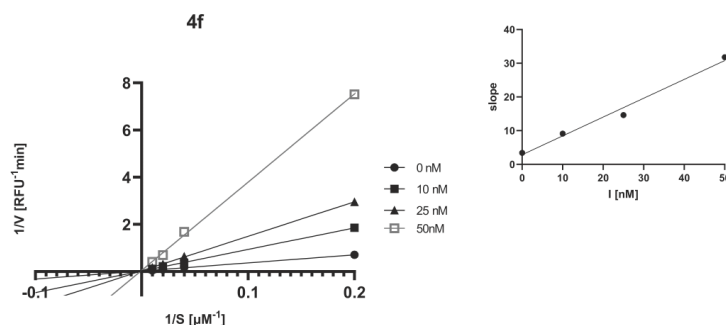


Fig. 2. L-B plots for inhibition of HNE for compound **4f**. The plot is expressed as $1/\text{velocity}$ [$\text{RFU}/\text{min}^{-1}$] vs. $1/\text{substrate concentration}$ [μM^{-1}] and the secondary plots of the slope and intercept of the straight lines vs. inhibitor concentration, respectively.

antiproliferative activity of well-known IMiDs drugs currently used in treatment of MM and other hematological malignancies (phthalimide derivatives), i.e. thalidomide, lenalidomide, and pomalidomide was evaluated as well.

The results of the study are collected in Table 2. Among the newly designed compounds, derivatives **4b** and **4f** showed the highest antiproliferative activity against all tested cancer cell lines with IC_{50} ranging from 24.31 to 32.72 μM and from 21.25 to 34.17 μM , respectively. Compound **4f** also exerted a weak antiproliferative activity against normal HSF cells, which suggests that compound **4f** can inhibit the growth of cancer cells selectively without the toxic influence on normal cells. It is worth noting that designed compounds **4b** and **4f** showed 5 to 13 times higher antiproliferative activity against cancer cells than thalidomide, pomalidomide and lenalidomide. Also, compounds **4a** and **4c** showed high antiproliferative activity against all cancer cell lines compared to standard drugs, with IC_{50} in the range of 32.32–57.05 μM and 32.5–47.24 μM , respectively. They also show 1.5–10 times higher activity than reference drugs. In turn, compounds **4d** and **4e** showed good activity against RPMI 8226 and A549 cancer cell lines with IC_{50} in the range of 84.41–95.05 and 62.10.5–101.6 μM , respectively. They also show higher activity than thalidomide, pomalidomide and lenalidomide (Table 2). An important highlight is the good selectivity index of the thalidomide derivatives. The highest selectivity index against all tested

cancer cell lines was shown by compounds **4a** and **4f** ranging from 1.75 to 4.66 (see Table 3).

The SAR analysis showed that the introduction of the azetidine-2,4-dione group in all cases significantly increased anticancer activity against all tested cancer lines. Replacing the carbonyl group in the phthalimide ring in compound **4e** with a methylene group significantly increases the anticancer activity and the selectivity index. An important observation is that replacing the glutarimide group in compound **4e** with a simple *n*-propyl or cyclohexyl group increases the anticancer activity. Also, shifting the azetidine-2,4-dione group from position 4 to 5 in the phthalimide ring increases the anticancer activity. The presence of the 3-oxobutyl group reduces the anticancer activity of thalidomide derivatives.

3.4. Compound **4f** induces cell cycle arrest at the G2/M phase and apoptosis in T47D cells

Since compound **4f** showed the greatest antiproliferative activity against the T47D cells and a good selectivity index suggesting low toxicity against normal cells, the mechanism of its antiproliferative activity was studied. To this end, the influence of this compound on the distribution of cell cycle phases in the T47D cells was first analyzed. As can be seen in Fig. 3A and B, the 48-h treatment with **4f** resulted in an increased number of T47D cells in the G2 phase and a sub-G1 apoptotic subpopulation with a concomitant reduction of the cell number in the G1 phase. Compared to the control, compound **4f** used at the concentrations of 5, 10, 20, and 40 μM significantly elevated the G2 fraction from $15.77 \pm 1.07\%$ to $17.83 \pm 0.86\%$, $24.68 \pm 1.22\%$, $26.11 \pm 1.25\%$, and $22.82 \pm 1.54\%$, respectively (Fig. 3B). In contrast, the exposure of the T47D cells to lenalidomide at a concentration of 20 μM did not result in the arrest of G2 or other phases of the cell cycle. Compound **4f** also induced a concentration-dependent increase in the number of cells in the

Table 2

Antiproliferative activity of compounds **4a–4f**. The IC_{50} values were calculated from a nonlinear regression ($\log(\text{inhibitor})$ vs. normalized response-variable slope) using GraphPad Prism 5.0. Immunomodulatory drugs: thalidomide, pomalidomide, and lenalidomide were used as controls.

Compound	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ (μM)			
	T47D	RPMI 8226	A549	HSF
4a	32.32 ± 4.83	57.05 ± 2.82	44.04 ± 8.49	99.73 ± 19.45
4b	24.31 ± 5.22	30.08 ± 4.45	32.72 ± 6.93	33.36 ± 1.98
4c	32.56 ± 6.17	32.5 ± 6.08	47.24 ± 18.47	68.49 ± 2.88
4d	162.2 ± 12.04	95.05 ± 24.64	84.41 ± 29.55	205.7 ± 25.2
4e	106.2 ± 23.73	101.6 ± 23.38	67.13 ± 27.05	174.5 ± 12.66
4f	21.25 ± 2.78	34.17 ± 4.14	29.93 ± 13.35	99.11 ± 8.22
Thalidomide	115.8 ± 44.42	142.1 ± 4.66	179.1 ± 68.38	198.6 ± 4.12
Pomalidomide	135.9 ± 26.8	134.1 ± 30.07	747.2 ± 20.51	161.8 ± 10.98
Lenalidomide	325.4 ± 170.2	366.1 ± 12	336.8 ± 165.4	298.5 ± 10.45

Table 3

The calculated SI of tested compounds. A beneficial SI > 1.0 indicates a drug with efficacy against cancer cells greater than toxicity against normal cells.

Compound	SI		
	HSF/T47D	HSF/RPMI 8226	HSF/A549
4a	3.08	1.75	2.26
4b	1.37	1.11	1.02
4c	2.1	2.11	1.45
4d	1.27	2.16	2.44
4e	1.64	1.72	2.6
4f	4.66	2.90	3.31
Thalidomide	1.72	1.40	1.10
Pomalidomide	1.19	1.21	0.22
Lenalidomide	0.92	0.82	0.89

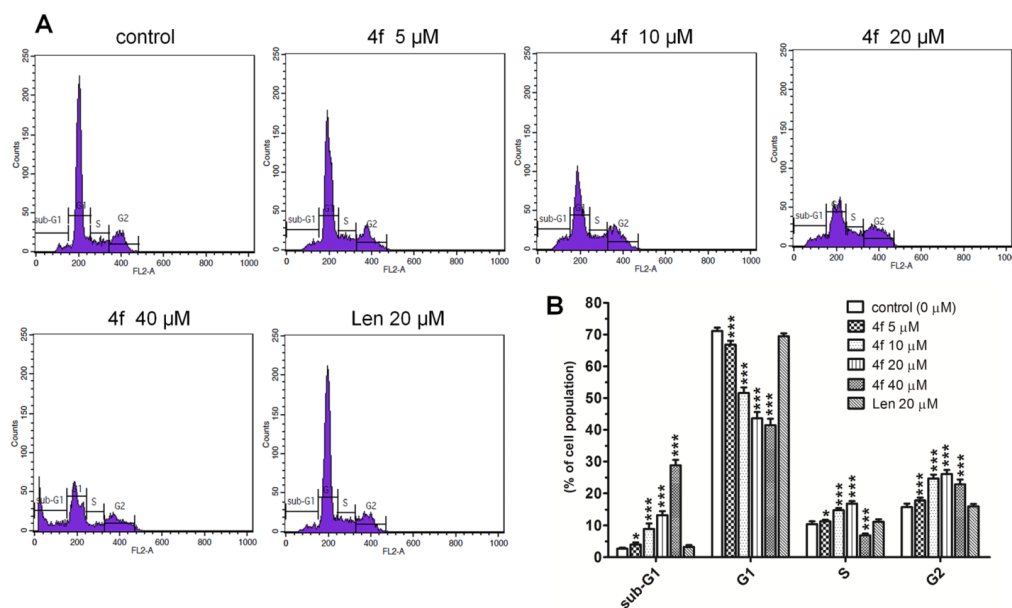


Fig. 3. Influence of compound **4f** and lenalidomide on cell cycle distribution in T47D cells. The cells were treated with different concentrations (5, 10, 20, and 40 μM) of compound **4f** or with lenalidomide (20 μM) for 48 h, stained with propidium iodide, and analyzed with the flow cytometry method. (A) The pictures present representative DNA histograms of compound **4f**- and lenalidomide-treated T47D cells. (B) The bar graph presents the percentages of compound **4f**- and lenalidomide-treated T47D cells in different cell cycle phases, i.e. sub-G1, G1, S, and G2. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test and are shown as means \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ in comparison to the control.

sub-G1 phase (Fig. 3A and B), which corresponds to apoptotic cells. Therefore, the rate of cell apoptosis and necrosis was then detected using Annexin V-FITC/PI double staining. As shown in Fig. 4A and B, compound **4f** induced predominantly apoptotic cell death in the T47D cells, although the percentage of cells undergoing necrosis also increased, especially at the highest concentrations of the compound, i.e. 20 and 40 μM (from $2.19 \pm 0.47\%$ in the control to $10.52 \pm 4.47\%$ and $9.77 \pm 3.46\%$, respectively). The percentage of T47D cells undergoing apoptosis increased significantly from $2.17 \pm 0.67\%$ in the control to $3.99 \pm 0.65\%$, $13.99 \pm 1.3\%$, $21.54 \pm 3.22\%$, and $34.49 \pm 3.03\%$ after the incubation with 5, 10, 20, or 40 μM of **4f**, respectively (Fig. 4B). In turn, lenalidomide was a weak inducer of apoptosis in the T47D cells: when used at a concentration of 20 μM , it increased the percentage of apoptotic cells from $2.17 \pm 0.67\%$ in the control to $5.16 \pm 1.04\%$, i.e. it was more than four times weaker in induction of apoptosis than compound **4f**.

3.5. Compounds stability

Stability studies are an integral part of drug development and is a key parameter that determines the effectiveness of a drug as well as its safety. Therefore, the most active thalidomide derivatives **4a**, **4e** and **4f** were assessed for chemical stability using spectrophotometric method at 25 $^{\circ}\text{C}$ in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.3 simulating physiological conditions (Table 4). The decrease in maximum absorbance for compounds **4a**, **4e** and **4f** was measured initially every 15 min for 3 h, and then after 8, 24, 33, 48, 57 and 72 h. For these derivatives, the stability of the compounds was evaluated as a percentage of the compound remaining. The obtained data suggest high stability of compounds in the tested solution even after 72 h, which demonstrate their potential as new

therapeutic agents.

3.6. Molecular docking study

To elucidate the effect of the pharmacophore on the activity of compounds and to determine the binding mechanism, molecular docking was used. Elastase inhibitors can form a covalent bond with the protein between Ser195 and a group of ligands co-responsible for condensation reactions [50]. As a result of this process, the ligand molecule can be decomposed into two fragments. However, even for such a case, the covalent docking may not be suitable procedure for predicting the inhibition properties, as explained in our previous papers [35,37]. Currently, we apply the same procedure, and neglect all the structures for which the carbonyl group of the ligand molecule is too distant from the Ser195 sidechain to participate in the nucleophilic attack being an essential step in the ligand-enzyme binding [47, <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00795>]. This essential to the distance of 0.35 nm (when considering the carbonyl carbon atom) or 0.3 nm (when considering the carbonyl oxygen atom). In contrary to previously studied compounds, in the current series of compounds there exist two distinct potential reaction sites within ligand molecules: (1) the two equivalent carbon atoms of the phthalimide moiety (or, in the case of **4f**, one carbon atom of the chemically-related isoindoline-1-one group) and (2) the two equivalent carbon atoms of the azetidine-2,4-dione group. In spite of the additional cutoff criteria, the majority of the low energy structures already fulfilled this condition and some other arrangements in the binding cavity corresponded to high energy poses. Based on the above, we conclude that the investigated mechanism involves either the formation of a covalent bonding between Ser195 and the ligand molecule, or at least non-covalent interactions between them, consistent with

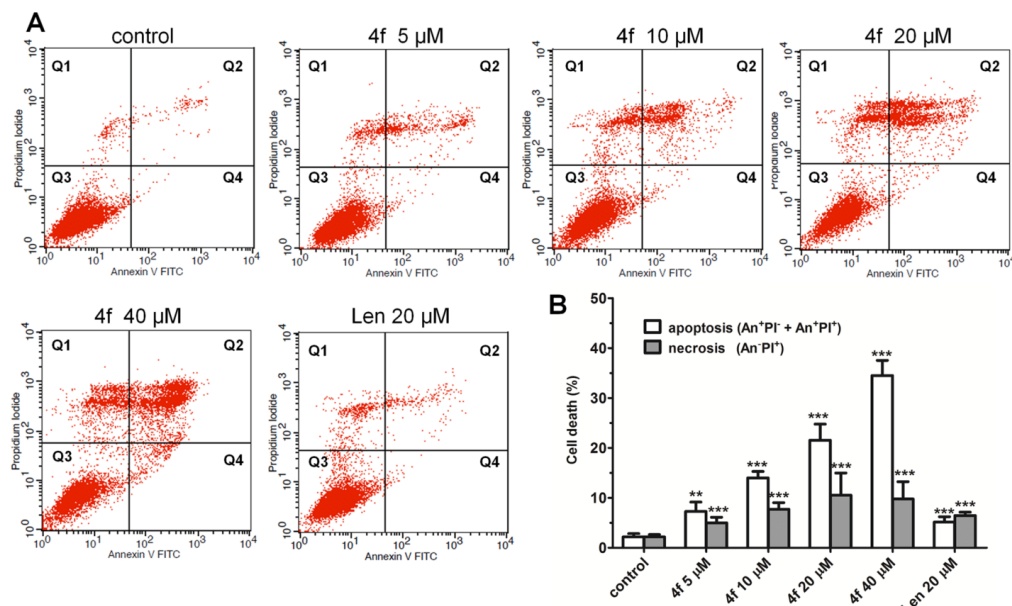


Fig. 4. Influence of compound **4f** and lenalidomide on apoptosis induction in T47D cells. The T47D cells were treated with different concentrations (5, 10, 20, and 40 μM) of compound **4f** or with lenalidomide (20 μM) for 48 h, stained with annexin (An) V-FITC/propidium iodide (PI), and analyzed with the flow cytometry method. (A) The dot plot pictures are representative and present the percentage of An⁻/PI⁺ necrotic cells (Q1), An⁺/PI⁺ late apoptotic cells (Q2), An⁻/PI⁻ viable cells (Q3), and An⁺/PI⁻ early apoptotic cells (Q4). (B) The bar graph presents the percentages of compound **4f**- and lenalidomide-treated T47D apoptotic and necrotic cells. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test and are shown as means \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in comparison to the control.

Table 4
Compounds stability in phosphate buffer at pH 7.3.

Compound	Remaining Compound (%)							
	0 h	3 h	8 h	24 h	33 h	48 h	57 h	72 h
4a	100	99.38	97.94	87.84	86.82	84.76	84.86	84.14
4e	100	98.81	94.24	72.49	66.63	61.37	61.17	59.08
4f	100	99.89	98.99	92.25	89.43	86.52	85.41	84.10

first steps of this process (e.g. hydrogen bonding involving Ser195).

The docking results were analysed with respect to the two distinct clusters of poses, called further cluster I and cluster II, in the case of Ser195 distance to either the isoindoline-1,3-dione (isoindoline-1-one) or azetidine-2,4-dione group, respectively. The binding energies found during docking simulations and the corresponding clusters of poses are graphically illustrated in Fig. 5. Values of the ligand-protein interaction energies are close to each other, being in the order of ca. -9.1 – -6.6 kcal/mol (cluster I) or -7.7 – -6 kcal/mol (cluster II). For all compounds, the binding energy is always more favourable in the case of cluster I in comparison to cluster II. However, when assuming the existence of subsequent processes (covalent binding) that cannot be captured by docking procedure, such difference cannot be treated as a proof of preferential binding occurring according to cluster I. Both clusters differ substantially when considering the correlation between $\ln(\text{IC}_{50})$ values and the determined binding energies. Such correlation is much better in the case of cluster II in comparison to cluster I ($R = 0.78$ vs. $R = 0.38$). However, in both cases the most potent compound has been identified correctly. In fact, in the case of cluster II, the binding

energies order follow the order of experimental IC_{50} values (except of compound **4a**). Such high correlation suggests that ligand arrangement compatible with cluster II controls the inhibition properties at the stage of ligand alignment in the binding cavity and before the subsequent reaction with Ser195. For obvious reasons, the course of potential reaction as well as the energy levels of reactants cannot be studied by classical force field-based docking. Moreover, the binding energy of sivelestat (determined in our previous study [37] by using the same methodology) and its IC_{50} value also fit in the trend characteristic of cluster II better in comparison to cluster I; the corresponding R value is unchanged when including the sivelestat data in the case of cluster II whereas doing the same for cluster I, does not significantly improve the correlation (although formally the R value is increased by 0.05).

Summarizing, the compound arrangement compatible with cluster II seems to be more probable in relation to cluster I, as indicated by higher correlation with the experimental data (including the data measured for sivelestat) and, additionally, by a nanomolar range of experimental IC_{50} values, in line with previous data obtained for compounds containing only one potential reaction site, i.e. the azetidine-2,4-dione group [37].

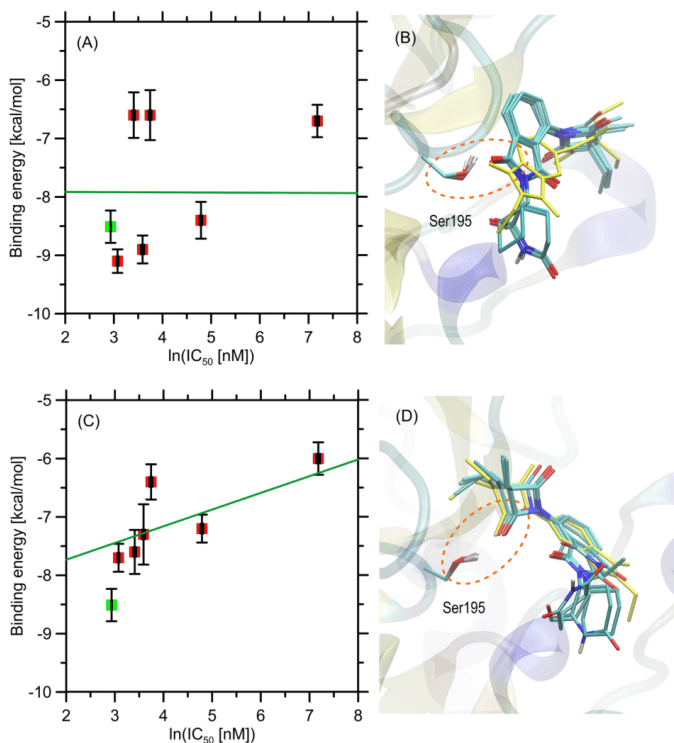


Fig. 5. The results of docking divided into two types of obtained clusters of ligand poses. The maximal distance of carbonyl carbon atoms at the isoindoline-1,3-dione (isoindoline-1-one) group (A,B) or the azetidine-2,4-dione group (C,D) and Ser195 was assumed not to exceed 0.35 nm. (A,C) The correlations between the calculated binding energies, averaged over the five elastase structures and the corresponding (experimental) values of IC_{50} (recalculated as $\ln(IC_{50})$). The horizontal bars represent the standard deviation values within the set of binding energies. The solid lines represent the linear regression ($R = 0.38$; $p < 0.46$ for (A) and $R = 0.78$; $p < 0.05$ for (C)). The data point coloured in green corresponds to the sivelestat (not included in the statistics reported above). (B,D) The superposed positions of all studied ligands in the binding cavity of the PDB:1b0f structure of elastase. The ligand structures are colored by atom type, except of compound **4b** (colored in yellow), exhibiting distinct topology of molecular scaffold. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Compounds containing an alternative reaction site, i.e. isoindoline-1,3-dione group are usually characterized by a micromolar range of the IC_{50} values [35,49].

To provide more complete interpretation of the binding energy

values and deeper understanding of the physics behind the ligand binding, the docking study results were additionally analysed in terms of the protein–ligand interaction pattern. The analysis was carried out for the protein–ligand contacts occurring for the distances between any

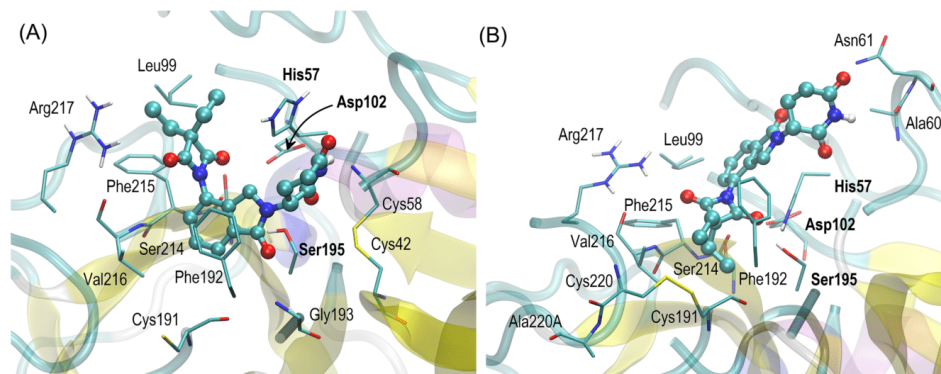


Fig. 6. The two alternative locations of the **4f** ligand molecule bound to the PDB:1b0f structure of elastase, found in the docking procedure and corresponding to cluster I (A) and cluster II (B). Poses correspond to those depicted in Fig. 5(B) and (D). The ligand molecule is shown in ball-and-stick representation whereas the closest amino-acid residues (distances between any ligand–protein atom pair smaller than 0.4 nm) and Asp102 are shown as sticks. The labels of the components of the catalytic triad are bolded.

corresponding atom pair smaller than 0.4 nm. The presented description can be related to all investigated compounds, as they all are similarly arranged in the binding cavity (Fig. 5B and 5D). Fig. 6 presents graphical illustration of the docking results for the most potent compound 4f. In the following analysis, only the non-covalent ligand–protein interactions are taken into account, and no hypothetical, subsequent steps involving covalent bonding with Ser195 are included.

In the case of cluster I, the most intensive interactions are located in the vicinity of isoindoline-1-one group which maintains contact with Ser195 (hydrogen bonding with carbonyl oxygen), Phe192 (π - π interactions with isoindoline ring), Val216 (CH- π interactions with isoindoline ring) and Phe215 (CH- π and π - π interactions with isoindoline ring). Apart from that, some less significant contacts of the isoindoline ring with Cys191, Gly193 and Ser214 are observed. The azetidine-2,4-dione group maintains contacts with Arg217 (hydrogen bonding) whereas its two aliphatic substituents form hydrophobic clusters with Leu99. Finally, the unique substituents, differing between compounds, interact with His57, and the pair of cysteines creating a disulfide bridge (Cys42 and Cys52). The latter series of interactions is responsible for distinguishing between potencies of particular compounds and prefers the substituents of larger dimensions capable to interact with both cysteines and His57 (compounds 4a, 4b and 4d exhibit clearly the least favorable binding energy among the whole series).

In the case of cluster II, the most intensive interactions involve the azetidine-2,4-dione group. It displays contact with Ser195 (hydrogen bond with carbonyl oxygen), Arg217 (also hydrogen bond with carbonyl oxygen), and His57 (hydrogen bonding competing with respect to that with Ser195). Moreover, Phe192 and Phe215 are also located in proximity of the azetidine ring but seem to exhibit more intensive interactions with other moieties of the ligand. The two aliphatic substituents of the azetidine group create hydrophobic contacts with Val216 and the sidechain of Phe215. A series of less significant contacts with Cys220, Cys119 and Ser214 are observed as well. The isoindoline ring displays attractive interactions with Phe192 (edge-to-edge π - π interactions) and Leu99 (CH- π interactions). Finally, the interactions of the unique substituents, differing between compounds, with Asn61 and Ala60 are responsible for distinguishing between potencies of particular compounds. The substituent containing both the hydrogen bond acceptors (due to hydrogen bonding with Asn61), hydrogen bond donors (due to hydrogen bonding with the Ala60 backbone fragment), and non-polar part (non-polar contact with the Ala sidechain) are preferred. The only substituents that fulfill these conditions are those present in 4e and 4f.

Interestingly, the cluster II-compatible arrangement of 4f explains why this compound is more potent in comparison to its closest analogue, i.e. 4e, differing from it only by the lack of only one carbonyl oxygen at the isoindoline-1,3-dione group (being essentially the isoindoline-1-one group). Namely, the lack of such oxygen atom is preferred due to edge-to-edge π - π interactions with Phe192 which are possible only when one of carbonyl atoms is absent, i.e. as in the case of 4f. When the isoindoline-1,3-dione group is considered, the analogous contact with Phe192 is more restricted for steric reasons. Both clusters correspond to intensive interactions of the ligand molecule with the two out of three components of the catalytic triad (i.e. His57 and Ser195). The third component, Asp102, is located slightly further, i.e. 0.46 and 0.49 nm for cluster I and II, respectively, when considering any pair of atoms belonging either to ligand or Asp102. Still, for the steric reasons both discussed arrangements are associated with blocking the access of the potential substrates to the active site, even if the bound inhibitor does not exhibit simultaneous contact with all components of the catalytic triad.

Finally, let us briefly discuss the docking results obtained for reference inhibitor, sivelestat. The original results are given in our previous paper [37] and were obtained by using the same docking methodology. The most favorable docking pose corresponds to a highly favorable binding energy (–8.5 kcal/mol) which agrees with the highest activity

of this compound; this is also the most favorable binding energy among all presently studied compounds, when accepting the cluster II-compatible arrangement of ligand molecules in the binding cavity. Moreover, the qualitative binding pattern agrees with the expected mechanism of action, displaying the close proximity of the carbonyl residue to all sidechains belonging to the catalytic triad (Asp102, His57 and Ser195). A very similar pattern has been reported in several independent docking studies [51–53], therefore, we will not discuss it here in detail.

4. Conclusion

The design of competitive inhibitors is currently being developed around the world due to the wide clinical use as therapeutics. In the present work, we have designed and synthesized new competitive inhibitors that are thalidomide derivatives containing the azetidine-2,4-dione system, showing the ability to inhibit human neutrophil elastase at nanomolar ranges. The most active compound showed a similar ability to inhibit HNE as the reference inhibitor Sivelestat.

Our compounds showed stronger antiproliferative activity against breast, lung and multiple myeloma cancer cell lines than the well-known IMiDs i.e. thalidomide, pomalidomide and lenalidomide. The most active compound 4f turned out to be a potent inducer of apoptosis in T47D cells, being four times more potent than lenalidomide. 4f-mediated apoptotic cell death was related to the induction of cell cycle arrest at the G2/M phase. Molecular docking results showed a good correlation of binding energy with IC_{50} values and showed that azetidine-2,4-dione pharmacophore is responsible for the high activity against HNE. The obtained data suggest also high stability of compounds at physiological conditions.

CRedit authorship contribution statement

Beata Donarska: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Adrianna Sławińska-Brych:** Methodology, Investigation, Formal analysis. **Magdalena Mizerska-Kowalska:** Methodology, Investigation, Formal analysis. **Barbara Zdzisinska:** Methodology, Investigation, Formal analysis. **Wojciech Płaziński:** Methodology, Investigation, Formal analysis. **Krzysztof Z. Łączkowski:** Supervision, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Krzysztof Z. Łączkowski reports financial support was provided by Nicolaus Copernicus University in Toruń.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This study was supported by the Nicolaus Copernicus University (project No. WF 540/2020).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106608>.

References

- [1] S. Zhou, F. Wang, T.C. Hsieh, J.M. Wu, E. Wu, Thalidomide-a notorious sedative to a wonder anticancer drug, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 4102–4108, <https://doi.org/10.2174/09298673113209990198>.
- [2] J. Sheskin, Thalidomide in the treatment of lepra reactions, *Clin. Pharmacol. Ther.* 6 (1965) 303–306, <https://doi.org/10.1002/cpt1.96563303>.
- [3] A.L. Moreira, E.P. Sampaio, A. Zmuidzinas, P. Frindt, K.A. Smith, G. Kaplan, Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation, *J. Exp. Med.* 177 (1993) 1675–1680, <https://doi.org/10.1084/jem.177.6.1675>.
- [4] P.A. Haslett, L.G. Corral, M. Albert, G. Kaplan, Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8⁺ subset, *J. Exp. Med.* 187 (1998) 1885–1892, <https://doi.org/10.1084/jem.187.11.1885>.
- [5] R.J. D'Amato, M.S. Loughnan, E. Flynn, J. Folkman, Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis, *PNAS* 91 (1994) 4082–4085, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.4082>.
- [6] S. Singhal, J. Mehta, R. Desikan, D. Ayers, P. Roberson, P. Eddlemon, N. Munshi, E. Anaissie, C. Wilson, M. Dhodapkar, J. Zeldis, D. Siegel, J. Crowley, B. Barlogie, Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma, *N. Engl. J. Med.* 341 (21) (1999) 1565–1571.
- [7] D. Weber, K. Rankin, M. Gavino, K. Delasalle, R. Alexanian, Thalidomide alone or with dexamethasone for previously untreated multiple myeloma, *J. Clin. Oncol.* 21 (2003) 16–19, <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.03.139>.
- [8] M.A. Dimopoulos, V. Eleutherakis-Papaikavou, Adverse effects of thalidomide administration in patients with neoplastic diseases, *Am. J. Med.* 117 (2004) 508–515, <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.03.040>.
- [9] R. Knight, IMiDs: A novel class of immunomodulators, *Semin. Oncol.* 32 (2005) 24–30, <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2005.06.018>.
- [10] A. Lopez-Girona, D. Mendy, T. Ito, K. Miller, A.K. Gandhi, J. Kang, S. Karasawa, G. Carmel, P. Jackson, M. Abbasian, A. Mahmoudi, B. Cathers, E. Rychak, S. Gaidarova, R. Chen, P.H. Schafer, H. Handa, T.O. Daniel, J.F. Evans, R. Chopra, Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide, *Leukemia* 26 (2012) 2326–2335, <https://doi.org/10.1038/leu.2012.119>.
- [11] Y. Zou, Z. Sheng, S. Niu, H. Wang, J. Yu, J. Xu, Lenalidomide versus thalidomide based regimens as first-line therapy for patients with multiple myeloma, *Leuk. Lymphoma* 10 (2013) 2219–2225, <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.774393>.
- [12] M. Offidani, L. Corvatta, P. Caraffa, P. Leoni, C. Pautasso, A. Larocca, A. Palumbo, Pomalidomide for the treatment of relapsed-refractory multiple myeloma: a review of biological and clinical data, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 14 (2014) 499–510, <https://doi.org/10.1586/14737140.2014.906904>.
- [13] C.C. Bjorklund, J. Kang, M. Amatangelo, A. Polonskaia, M. Katz, H. Chiu, S. Couto, M. Wang, Y. Ren, M. Ortiz, F. Towfic, J.E. Flynt, W. Pierceall, A. Thakurta, Iberdomide (CC-220) is a potent cereblon E3 ligase modulator with antitumor and immunostimulatory activities in lenalidomide- and pomalidomide-resistant multiple myeloma cells with dysregulated CRBN, *Leukemia* 34 (2020) 1197–1201, <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0620-8>.
- [14] M.E. Matyskiela, G. Lu, T. Ito, B. Pagarigan, C.-C. Lu, K. Miller, W. Fang, N.-Y. Wang, D. Nguyen, J. Houston, G. Carmel, T. Tran, M. Riley, L. Nosaka, G. C. Lander, S. Gaidarova, S. Xu, A.L. Ruchelman, H. Handa, J. Carmichael, T. O. Daniel, B.E. Cathers, A. Lopez-Girona, P.P. Chamberlain, A novel cereblon modulator recruits GSP11 to the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase, *Nature* 535 535 (7611) (2016) 252–257.
- [15] S.M. Capitoli, T.P. Hansen, M.L. Brown, Thalidomide analogues demonstrate dual inhibition of both angiogenesis and prostate cancer, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 327–336, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.11.007>.
- [16] R. Talat, W. El-Sayed, H. Agwa, A. Gamal-Eldien, S. Moawia, M. Zahran, Novel thalidomide analogs: anti-angiogenic and apoptotic effects on Hep-G2 and MCF-7 cancer cell lines, *Biomed Aging Pathol* 4 (2014) 179–189, <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2014.03.002>.
- [17] X. Wang, Y. Shen, L. Meng, X. Zhang, J. Yang, F. Wang, J. Yang, Thalidomide suppresses breast cancer tumor growth by inhibiting tumor-associated macrophage accumulation in breast tumor-bearing mice, *Eur. J. Pharm. Sci.* 151 (2020), 105302, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105302>.
- [18] S. Belluti, G. Orteca, V. Semeghini, G. Rigillo, F. Parenti, E. Ferrari, C. Imbriano, Potent Anti-cancer properties of phthalimide-based curcumin derivatives on prostate tumor cells, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2018) 28, <https://doi.org/10.3390/ijms2010028>.
- [19] J.N. Phloppes, P.F. Lamie, Design and synthesis of new benzoxazole/benzothiazole-phthalimide hybrids as antitumor-apoptotic agents, *Bioorg. Chem.* 89 (2019), 102978, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102978>.
- [20] E. Deryugina, A. Carré, V. Ardi, T. Muramatsu, J. Schmidt, C. Pham, J.P. Quigley, Neutrophil elastase facilitates tumor cell intravasation and early metastatic events, *Science* 23 (12) (2020) 101799.
- [21] M.T. Masucci, M. Minopoli, M.V. Carriero, Tumor associated neutrophils. Their role in tumorigenesis, metastasis, prognosis and therapy, *Front Oncol* 9 (2019) 1146, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01146>.
- [22] S. Raftopoulos, P. Valadez-Cosmes, Z.N. Mihalic, R. Schicho, J. Kargl, Tumor-mediated neutrophil polarization and therapeutic implications, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 3218, <https://doi.org/10.3390/ijms23063218>.
- [23] U. Demkow, Neutrophil extracellular traps (NETs) in cancer invasion, evasion and metastasis, *Cancer (Basel)* 13 (2021) 4495, <https://doi.org/10.3390/cancers13174495>.
- [24] B. Korkmaz, T. Moreau, F. Gauthier, Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions, *Biochimie* 90 (2008) 227–242, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.10.009>.
- [25] I. Lerman, S.R. Hammes, Neutrophil elastase in the tumor microenvironment, *Steroids* 133 (2018) 96–101, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.11.006>.
- [26] I. Lerman, M. Garcia-Hernandez, J. Rangel-Moreno, L. Chiriboga, Ch. Pan, K.L. Nastuik, J.J. Krolewski, A. Sen, S.R. Hammes, Infiltrating myeloid cells exert pro-tumorigenic actions via neutrophil elastase, *Mol. Cancer Res.* 15 (2017) 1138–1152, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0003>.
- [27] J. Duan, Y. Xiaokaiti, S. Fan, Y. Pan, X. Li, X. Li, Direct interaction between caffeic acid phenethyl ester and human neutrophil elastase inhibits the growth and migration of PANC-1 cells, *Oncol. Rep.* 37 (2017) 3019–3025, <https://doi.org/10.3892/or.2017.5516>.
- [28] Y. Xu, J. Zhang, J. Han, X. Pan, Y. Cao, H. Guo, Y. Pan, Y. An, X. Li, Curcumin inhibits tumor proliferation induced by neutrophil elastase through the upregulation of a1-antitrypsin in lung cancer, *Mol. Oncol.* 6 (2012) 405–417, <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.03.005>.
- [29] L. Gong, A.M. Cumpian, M.S. Caetano, C.E. Ochoa, M.M. De la Garza, D.J. Lapid, S. G. Mirabolfathinejad, B.F. Dickey, Q. Zhou, S.J. Moghaddam, Promoting effect of neutrophils on lung tumorigenesis is mediated by CXCR2 and neutrophil elastase, *Mol. Cancer* 12 (2013) 154, <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-154>.
- [30] M. Nawa, S. Osada, K. Morimitsu, K. Nonaka, M. Futamura, Y. Kawaguchi, K. Yoshida, Growth effect of neutrophil elastase on breast cancer: favourable action of sivelestat and application to anti-HER2 therapy, *Anticancer Res.* 32 (2012) 13–19.
- [31] S. Sengupta, J.R. Reddy, N. Rajesh, A. Jaiswal, U. Mahalirajan, R.K. Palakodety, P. Mukherjee, A. Bandyopadhyay, Novel benzoxazinone derivative as potent human neutrophil elastase inhibitor: Potential implications in lung injury, *Eur. J. Pharmacol.* 931 (2022), 175187, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175187>.
- [32] L. Crocetti, I.A. Schepetkin, G. Ciciani, M.P. Giovannoni, G. Guerrini, A. Iacovone, A.I. Khelebnikov, L.N. Kirpotina, M.T. Quinn, C. Vergelli, Synthesis and pharmacological evaluation of indole derivatives as deaza analogues of potent human neutrophil elastase inhibitors (HNE), *Drug Dev. Res.* 77 (2016) 285–299, <https://doi.org/10.1002/ddr.21323>.
- [33] I. Craiciu, A.M. Fenner, R.J. Kerns, N-Arylacyl O-sulfonated aminoglycosides as novel inhibitors of human neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase 3, *Glycobiology* 26 (2016) 701–709, <https://doi.org/10.1093/glycob/cww011>.
- [34] A.R.S. Buti, M.A. Abbasi, Aziz-ur-Rehman, S.Z. Siddiqui, M. Hassan, H. Raza, S.A. A. Shah, S.-Y. Seo, Synthesis and structure-activity relationship of elastase inhibiting novel ethylated thiazole-triazole acetamide hybrids: Mechanistic insights through kinetics and computational contemplations, *Bioorg. Chem.* 86 (2019) 197–209.
- [35] B. Donarska, M. Świątalska, J. Wietrzyk, W. Płaziński, K.Z. Łączkowski, Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 110, <https://doi.org/10.3390/ijms24010110>.
- [36] J. Mulchande, R. Oliveira, M. Carrasco, L. Gouveia, R.C. Guedes, J. Iley, R. Moreira, 4-Oxo-β-lactams (azetidine-2,4-diones) are potent and selective inhibitors of human leukocyte elastase, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 241–253, <https://doi.org/10.1021/jm91082k>.
- [37] B. Donarska, M. Świątalska, J. Wietrzyk, W. Płaziński, M. Mizerska-Kowalska, B. Zdzisińska, K.Z. Łączkowski, Discovery of new 3,3-diethylazetidine-2,4-dione based thiazoles as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors with broad-spectrum antiproliferative activity, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 7566, <https://doi.org/10.3390/ijms23147566>.
- [38] J. Mulchande, S.I. Simões, M.M. Gaspar, C.V. Eleuterio, R. Oliveira, M.E.M. Cruz, R. Moreira, J. Iley, Synthesis, stability, biochemical and pharmacokinetic properties of a new potent and selective 4-oxo-β-lactam inhibitor of human leukocyte elastase, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 26 (2011) 169–175, <https://doi.org/10.3109/14756366.2010.486794>.
- [39] E.F.P. Ruivo, L.M. Gonçalves, L.A.R. Carvalho, R.C. Guedes, S. Hofbauer, J.A. Brito, M. Archer, R. Moreira, S.D. Lucas, Clickable 4-oxo-β-lactam-based selective probing for human neutrophil elastase related proteomes, *ChemMedChem* 11 (2016) 2037–2042, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600258>.
- [40] K. Iwata, A. Doi, G. Ohji, H. Oka, Y. Oba, K. Takimoto, W. Igarashi, D. H. Gremillion, T. Shimada, Effect of neutrophil elastase inhibitor (sivelestat sodium) in the treatment of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): a systematic review and meta-analysis, *Intern. Med.* 49 (2010) 2423–2432, <https://doi.org/10.2169/10002169.49.4010>.
- [41] H. Okamoto, K. Itani, M. Yamaji, H. Konishi, H. Ota, Excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) fluorescence from 3-amidophthalimides displaying RGBY emission in the solid state, *Tetrahedron Lett.* 59 (2018) 388–391, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.12.049>.
- [42] L. Zhang, R. Chen, X. Li, X. Xu, Z. Xu, J. Cheng, Y. Wang, Y. Li, X. Shao, Z. Li, Synthesis, insecticidal activities, and 3D-QASR of N-pyridylpyrazole amide derivatives containing a phthalimide as potential ryanodine receptor activators, *J. Agric. Food Chem.* 70 (2022) 12651–12662, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03971>.
- [43] M.T. Scerba, M.A. Siegler, N.H. Greig, Thionation of aminophthalimide hindered carbonyl groups and application to the synthesis of 3,6'-dithionated pomalidomides, *Synlett* 32 (2021) 917–922, <https://doi.org/10.1055/s-0040-1720460>.
- [44] L. Crocetti, M.P. Giovannoni, I.A. Schepetkin, M.T. Quinn, A.I. Khelebnikov, A. Cilibrizzi, V.D. Piaz, A. Graziano, C. Vergelli, Design, synthesis and evaluation of N-benzoylindazole derivatives and analogues as inhibitors of human neutrophil

- elastase, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 4460–4472, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.036>.
- [45] K. Piechowska, M. Mizerska-Kowalska, B. Zdzisińska, J. Cytarska, A. Baranowska-Lączkowska, K. Jaroch, K. Luczykowski, W. Plaziński, B. Bojko, S. Kruszewski, K. Misiura, K.Z. Łączkowski, Tropinone-derived alkaloids as potent anticancer agents: synthesis, tyrosinase inhibition, mechanism of action, DFT calculation, and molecular docking studies, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 9050, <https://doi.org/10.3390/ijms21239050>.
- [46] M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminformatics* 4 (2012) 17, <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- [47] A.K. Rappe, C.J. Casewit, K.S. Colwell, W.A. Goddard III, W.M. Skiff, UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and dynamics simulations, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10024–10035, <https://doi.org/10.1021/ja00051a040>.
- [48] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 455–461, <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [49] B. Donarska, M. Świtalska, W. Plaziński, J. Wietrzyk, K.Z. Łączkowski, Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives. Rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study, *Bioorg. Chem.* 110 (2021), 104819, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104819>.
- [50] A. Nunes, J. Marto, L.M. Gonçalves, S. Simões, R. Félix, A. Ascenso, F. Lopes, H. M. Ribeiro, Novel and modified neutrophil elastase inhibitor loaded in topical formulations for psoriasis management, *Pharmaceutics* 12 (2020) 358, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040358>.
- [51] L. Feng, W. Zhu, Ch. Huang, Y. Li, Direct interaction of ONO-5046 with human neutrophil elastase through 1H NMR and molecular docking, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 196–200, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.04.023>.
- [52] L. Crocetti, M.P. Giovannoni, N. Cantini, G. Guerrini, C. Vergelli, I.A. Schepetkin, A.I. Khlebnikov, M.T. Quinn, Novel sulfonamide analogs of sivelestat as potent human neutrophil elastase inhibitors, *Front. Chem.* 8 (2020) 795, <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00795>.
- [53] D. Ghosh, S. Bansode, R. Joshi, B. Kolte, R. Gacche, Molecular elucidation of pancreatic elastase inhibition by baicalein, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 40 (2022) 5759–5768, <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1873189>.

W ostatniej z cyklu pracy eksperymentalnej, oznaczonej jako **publikacja IV**, przedstawiono pochodne talidomidu o **strukturze E (Rycina 25)**. Zaprezentowane badania dotyczyły połączenia układu ftalimidu z nowym, istotnym z punktu widzenia celów i założeń niniejszej dysertacji układem farmakoforowym tj. strukturą 3,3-dietyloazetydino-2,4-dionu. Dotychczasowe badania dokowania molekularnego wykazały, że atom tlenu grupy karbonylowej ftalimidu oddziałuje z miejscem aktywnym elastazy. Zgodnie z badaniami literaturowymi układ 3,3-dietyloazetydino-2,4-dionu również może oddziaływać z miejscem aktywnym tego enzymu. Dodatkowo wiadomo, że układ 3,3-dietyloazetydino-2,4-dionu łatwo ulega otwarciu pod wpływem ataku SerOH elastazy. Dlatego podczas projektowania związków **serii E** w strukturę nowych pochodnych talidomidu wprowadzono układ 3,3-dietyloazetydino-2,4-dionu. Aby zmniejszyć masę cząsteczkową związków ze struktur został usunięty pierścień tiazolu oraz podstawiony pierścień fenyłowy. W zamian tego pozycja *N*-pierścienia ftalimidu zawiera mniejsze podstawniki, takie jak grupa *n*-propylowa, 3-oksobutyłowa, cykloheksylowa i glutarimidowa.

Związki **serii E** otrzymano w trzech głównych etapach. Pierwszy etap polegał na otrzymaniu *N*-podstawionych nitroftalimidów, w tym celu bezwodnik 3- lub 4-nitroftalowy poddano reakcji z odpowiednią aminą. Równolegle 3-nitroftalimid poddano reakcji z 3-buten-2-onem. Następnie w celu otrzymania *N*-podstawionych aminoftalimidów wykorzystano reakcję uwodornienia transferowego stosując mieszaninę kwasu mrówkowego i trietyloaminy oraz jako katalizatory Pd/C lub dichlorek cyny w roztworze alkoholu etylowego. Tak uzyskane *N*-podstawione aminoftalimidy oraz handlowo dostępne pochodne talidomidu (pomalidomid i lenalidomid) poddano reakcji z dichlokiem dietylomalonu w obecności trietyloaminy w suchym dichlorometanie otrzymujące docelowe związki **serii E**, które wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej.

Aktywność antyproliferacyjną nowo otrzymanych związków **serii E 4a-4f** oceniono wobec trzech linii komórek nowotworowych, tj. T47D (ludzki rak piersi), RPMI 8226 (szpiczak mnogi) oraz A549 (rak płuc), a toksyczność zbadano wobec prawidłowych ludzkich fibroblastów. Jako związki referencyjne wykorzystano talidomid, lenalidomid i pomalidomid. Należy zaznaczyć, że wszystkie nowo otrzymane pochodne **serii E** działały silniej antyproliferacyjnie wobec badanych linii komórek nowotworowych

niż wybrane wyżej leki referencyjne. Spośród związków **serii E** pochodne **4b** oraz **4f** wykazywały najwyższą aktywność antyproliferacyjną wobec wszystkich badanych linii komórek nowotworowych z IC_{50} w zakresie odpowiednio 21,25-34,17 μM oraz 24,31-32,72 μM . Na szczególną uwagę zasługuje tutaj fakt, że związki **4b** i **4f** wykazały od 5 do 13 razy wyższą aktywność antyproliferacyjną niż talidomid, lenalidomid i pomalidomid. Związek **4b** zawierał w strukturze podstawnik *n*-propylowy, a związek **4f** podstawnik glutarimidowy. Kolejne wysokie aktywności cytotoksyczne wykazywały związki **4a** i **4c** działając w zakresie IC_{50} odpowiednio 32,32-57,05 μM oraz 32,5-47,24 μM , które zawierały w strukturze podstawniki *n*-propylowy i cykloheksylowy. Najniższą aktywnością przeciwnowotworową z tej serii związków charakteryzowały się pochodne **4d** i **4e**, które zawierały odpowiednio podstawniki 3-oksobutyłowy oraz pierścień glutarimidowy. Związki **4a** i **4f** wykazywały zdecydowanie słabszą aktywność antyproliferacyjną wobec komórek zdrowych w porównaniu z komórkami nowotworowymi, a indeksy selektywności mieściły się w granicach 1,75-4,66, co oznacza, że mogą one wykazywać skuteczne działanie antyproliferacyjne wobec komórek nowotworowych, z niską toksycznością wobec komórek zdrowych.

Analizując zależność struktury od aktywności przeciwnowotworowej dla pochodnych **serii E** należy zauważyć, że:

- 1) przesunięcie ugrupowania azetydno-2,4-dionu z pozycji 4 do pozycji 5 pierścienia ftalimidu wpływa na zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej,
- 2) zastąpienie grupy karbonylowej pierścienia ftalimidu grupą metylenową dla pochodnej zawierającej podstawnik glutarimidowy zdecydowanie zwiększa działanie przeciwnowotworowe,
- 3) w przypadku pochodnych talidomidu zastąpienie pierścienia glutarimidowego grupą *n*-propylową lub cykloheksylową znacząco poprawia aktywność antyproliferacyjną, a zastąpienie jej grupą 3-oksobutyłową powoduje zmniejszenie działania przeciwnowotworowego.

W celu poznania mechanizmu działania antyproliferacyjnego najaktywniejszego związku **4f** zbadano jego wpływ na rozkład faz cyklu komórkowego w komórkach linii T47D. Wykazano, że związek **4f** jest silnym induktorem apoptozy w komórkach T47D, działając czterokrotnie silniej niż lenalidomid. Śmierć apoptotyczna komórek w wyniku działania związku **4f** była związana z indukcją zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M.

Następnie w celu oceny zdolności związków **serii E** do inhibicji aktywności ludzkiej elastazy neutrofilowej przeprowadzono badania spektrofluorymetryczne, a jako inhibitor referencyjny wykorzystano sivelestat. Spośród badanych związków **serii E** najlepszym inhibitorem HNE okazał się związek **4f**, będący pochodną lenalidomidu, z IC_{50} wynoszącym 21,78 nM. Związek wykazywał porównywalną aktywność ze związkiem referencyjnym, dla którego wyznaczona wartość IC_{50} wynosiła 18,33 nM. Kolejnymi wysoce aktywnymi związkami wobec ludzkiej elastazy neutrofilowej były pochodne **4a** i **4b** zawierające podstawnik *n*-propylowy oraz związek **4e**, dla których wartości IC_{50} mieściły się w zakresie 30,21-42,3 nM. Związek **4e**, będący pochodną pomalidomidu, działał prawie dwukrotnie słabiej wobec HNE niż pochodna otrzymana z lenalidomidu. Najsłabsze działanie inhibujące elastazę wykazywały związki **4c** oraz **4d**, zawierające w strukturze odpowiednio podstawniki cykloheksylowy i oksobutylowy. Analizując zależność struktury od aktywności wobec elastazy neutrofilowej dla pochodnych **serii E** można stwierdzić, że:

- 1) zmiana lokalizacji ugrupowania azetydino-2,4-dionu z pozycji 4 do pozycji 5 pierścienia ftalimidu wpływa na spadek aktywności wobec HNE,
- 2) zastąpienie grupy karbonylowej grupą metylenową w pierścieniu ftalimidu prowadzi do zwiększenia aktywności inhibującej badany enzym,
- 3) najlepszą aktywność wykazują pochodne zawierające w pozycji *N* ugrupowanie glutarimidowe bądź *n*-propylowe, a spadek aktywności następuje w kolejności: podstawnik cykloheksylowy, podstawnik oksobutylowy.

Następnie w celu określenia mechanizmu inhibicji ludzkiej elastazy neutrofilowej przez badane związki przeprowadzono badania kinetyczne, z wykorzystaniem wykresów Lineweavera-Burka. Przeprowadzone badania wykazały, że związki **4a**, **4c**, **4d** oraz **4f** wykazują kompetycyjny model inhibicji, a związki **4b** oraz **4e** mieszany typ inhibicji. Stwierdzono, że przesunięcie grupy azetydino-2,4-dionowej z pozycji 4 na 5 pierścienia ftalimidowego wpływa na zmianę mechanizmu inhibicji prezentowanego przez badane związki.

Ostatnim etapem było przeprowadzenie dokowania molekularnego, którego celem było wyjaśnienie wpływu grup farmakoforowych na aktywność związków oraz określenie mechanizmu ich wiązania z centrum aktywnym elastazy. Zgodnie z założeniami przyjętymi w trakcie projektowania struktury pochodnych **serii E**, związki te zawierały w układzie dwa różne potencjalne miejsca wiązania z centrum aktywnym elastazy

tj. pierścień ftalimidowy oraz układ azetydino-2,4-dionu. Dlatego analiza dokowania molekularnego została przeprowadzona dla dwóch różnych sposobów wiązania, tj. klastra I – układu ftalimidu (izoindolino-1,3-dionu) oraz klastra II – układu azetydino-2,4-dionu. Podobnie, jak w przypadku wcześniejszych publikacji, zastosowano tę samą procedurę, biorąc pod uwagę tylko te struktury dla których grupa karbonylowa cząsteczki liganda nie była zbyt odległa od łańcucha bocznego Ser195, aby uczestniczyć w ataku nukleofilowym, niezbędnym do wiązania z enzymem. Znalezione energie oddziaływań białko-ligand dla obu klastrów przyjmują zbliżone wartości w zakresie od -9,1 do -6,6 kcal/mol (klaster I) i od -7,7 do -6,0 kcal/mol (klaster II). Dla wszystkich związków korzystniejsze energie wiązania występują w przypadku klastra I, jednak zakładając istnienie procesów, które nie zostają uchwycone w procedurze dokowania, różnica ta nie jest traktowana jako dowód na preferencyjne wiązanie według klastra I. Analizując korelację wyników dokowania z danymi eksperymentalnymi korzystniejsze wyniki uzyskano w przypadku klastra II ($R=0,38$ vs. $R=0,78$). Ponadto dla klastra II uzyskano znacznie lepszą korelację między obliczonymi energiami wiązania z elastazą, a eksperymentalnymi wartościami inhibicji. W przypadku obu klastrów wyniki dokowania poprawnie identyfikują najaktywniejszy związek **4f**. Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że bardziej prawdopodobnym układem jest ten prezentowany przez klaster II, ponieważ związki zawierające w strukturze tylko układ ftalimidowy osiągały IC_{50} w zakresie mikromolowym, a związki **serii E** zawierające także układ azetydino-2,4-dionu w zakresie nanomolowym.

Analizując wzorce oddziaływań białko-ligand, w przypadku klastra I, najbardziej intensywne oddziaływania zlokalizowano w następujących pozycjach:

- tlen karbonylowy ftalimidu i Ser195 (wiązanie wodorowe),
- pierścień ftalimidu i Phe192, Val216, Phe215 (oddziaływania π - π , CH- π) oraz Cys191, Gly193, Ser214,
- grupa azetydino-2,4-dionu i Arg217 (wiązanie wodorowe),
- dwie grupy etylenowe i Leu99 (oddziaływania hydrofobowe),
- podstawniki w pozycji *N* pierścienia ftalimidowego i His57, Cys42, Cys52 (preferowane w tej pozycji są pochodne zawierające podstawniki większych rozmiarów).

Analizując podobnie wzorce oddziaływań dla klastra II zaznaczyć należy korzystne oddziaływania w następujących pozycjach:

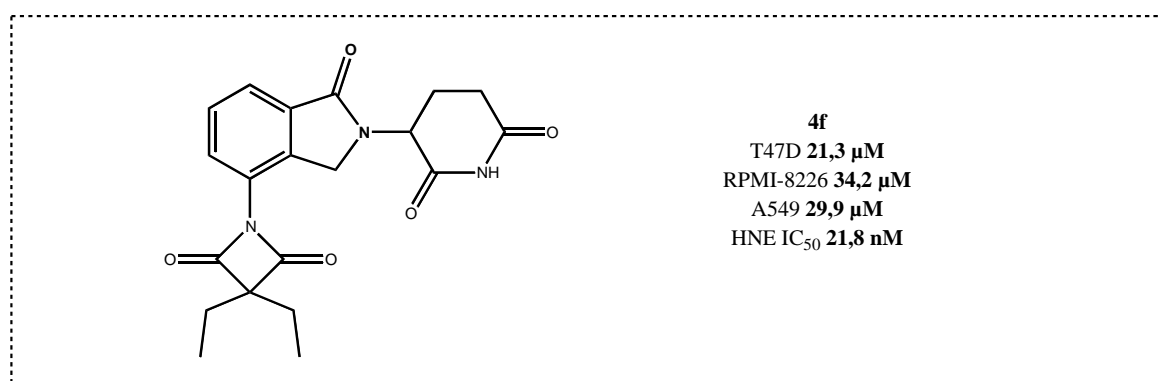
- tlen karbonylowy grupy azetydino-2,4-dionu i Ser195, Arg217, His57 (wiązania wodorowe),
- dwie grupy etylenowe w układzie azetydino-2,4-dionu i Val216, Phe215 (oddziaływania hydrofobowe),
- pierścień ftalimidu i Phe192, Leu99 (oddziaływania π - π , CH- π),
- podstawniki w pozycji *N* pierścienia ftalimidowego i Asn61, Ala60 (preferowane są podstawniki zawierające zarówno akceptory, jak i donory wiązania wodorowego oraz fragment niepolarny w strukturze).

Dodatkowo dane uzyskane w analizie dokowania molekularnego wyjaśniają silniejsze działanie związku **4f** (niższa wartość IC_{50}), który zawiera jedną grupę karbonylową w porównaniu do analogicznego związku **4e** zawierającego dwie grupy karbonylowe w pierścieniu ftalimidu. Układ izoindolino-1-onu (jedna grupa karbonylowa w pierścieniu ftalimidu) jest preferowany z uwagi na brak ograniczeń sterycznych w interakcji z Phe192. Należy zaznaczyć, że w przypadku obu klastrów zauważono intensywne oddziaływania cząsteczek ligandów z dwoma z trzech składników triady katalitycznej elastazy tj. His57 i Ser195. Brak oddziaływania ze wszystkim składnikami triady katalitycznej nie wyklucza możliwości blokowania sterycznego centrum aktywnego enzymu przez badane inhibitory dla potencjalnych substratów elastazy.

Ostatnim parametrem charakteryzującym związki **serii E** było określenie stabilności chemicznej wybranych pochodnych. Badanie przeprowadzono metodą spektrofotometryczną w buforze fosforanowym o pH 7,3, symulującym warunki fizjologiczne. Badane pochodne **4a**, **4e** i **4f** wykazały wysoką stabilność w badanym roztworze (powyżej 72h), co wskazuje na ich korzystne właściwości, jako potencjalne związki terapeutyczne.

Analizując wyniki uzyskane dla związków **serii E** należy stwierdzić, że połączenie dwóch ważnych farmakoforów tj. układu ftalimidu i azetydino-2,4-dionu doprowadziło do uzyskania związków o podobnie (w porównaniu do związków **serii A-D**) wysokiej aktywności antyproliferacyjnej i zdecydowanie silniejszej aktywności inhibującej elastazę. Dodatkowo badane związki wykazywały silniejsze działanie antyproliferacyjne wobec badanych linii komórek nowotworowych, niż obecnie stosowane leki tj. talidomid, pomalidomid i lenalidomid. Najaktywniejszym związkiem zarówno wobec aktywności

przeciwnowotworowej, jak i hamującej elastazę neutrofilową okazał się związek **4f**, będący pochodną lenalidomidu (**Rycina 30**). Podsumowując otrzymane rezultaty należy stwierdzić, że związki **serii E** są obiecującą grupą potencjalnych leków przeciwnowotworowych charakteryzujących się zdolnością do inhibicji elastazy w zakresie nanomolowym.



Rycina 30. Najaktywniejszy związek **serii E**

Przedstawione badania aktywności antyproliferacyjnej w publikacjach II i III oraz wobec EGFR i kaspazy 3/7 zostały zrealizowane we współpracy z dr Martą Świtalską oraz prof. dr hab. Joanną Wietrzyk z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk z Wrocławia.

Przedstawione badania w publikacji IV dotyczące aktywności antyproliferacyjnej oraz badania wpływu otrzymanych związków na procesy apoptozy, nekrozy oraz cykl komórkowy zostały zrealizowane we współpracy z dr Magdaleną Mizerską-Kowalską, dr Adrianną Sławińską-Brych oraz dr hab. Barbarą Zdzińska, prof. UMCS z Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Badania dokowania molekularnego przedstawione w publikacjach II-IV zostały przeprowadzone we współpracy z prof. dr hab. Wojciechem Płazińskim z Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

VI. WNIOSKI

- W ramach przeprowadzonych badań zaprojektowano, opracowano metodologię syntezy, wydzielenia i oczyszczania **29 nowych nieznanymi w literaturze pochodnych talidomidu**.
- Większość pochodnych charakteryzuje się **wysoką aktywnością antyproliferacyjną wobec badanych linii komórek nowotworowych oraz niską toksycznością wobec prawidłowych linii komórkowych**.
- **Związki serii E** wykazują **wyższą aktywność antyproliferacyjną** w stosunku do badanych linii komórek nowotworowych niż leki referencyjne tj. talidomid, pomalidomid i lenalidomid.
- Nowo zaprojektowane pochodne okazały się związkami o wysokiej zdolności do inhibicji aktywności elastazy, zbliżonej bądź porównywalnej do aktywności inhibitorów referencyjnych. **Najbardziej aktywne pochodne wykazują zdolność do inhibicji ludzkiej elastazy neutrofilowej w zakresach nanomolowych**.
- W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że pierścienie ftalimidu, tiazolu oraz azetydino-2,4-dionu stanowią obiecujące **farmakofory nowych leków przeciwnowotworowych i inhibitorów ludzkiej elastazy neutrofilowej**.
- Wykazano, że **rodzaj podstawnika w grupie fenylowej ma znaczący wpływ** na ich aktywność biologiczną.
- Przeprowadzone badania pozwoliły na wyłonienie **najbardziej aktywnej struktury (związek 4f seria E)** spośród nowych pochodnych talidomidu wykazującej wysoką aktywność przeciwnowotworową oraz hamującą aktywność elastazy w zakresie nanomolowym. Dla wyżej wymienionego związku sporządzono **zgłoszenie do Urzędu Patentowego** o numerze P.443102.

VII. STRESZCZENIE

Nowotwory stanowią obecnie jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie, a zapadalność na choroby nowotworowe stale rośnie. Nadal, pomimo znacznego postępu w terapiach onkologicznych, niekontrolowany wzrost, przerzutowanie i lekooporność komórek nowotworowych jest ważnym problemem ograniczającym efektywność leczenia. Dlatego poszukiwanie nowych związków wykazujących wysoką aktywność przeciwnowotworową oraz charakteryzujących się jednocześnie niską toksycznością, jest ważnym zadaniem chemii medycznej. Skutecznym sposobem poszukiwania nowych, aktywnych związków jest modyfikowanie struktur obecnie stosowanych leków w celu poprawy ich aktywności oraz zmniejszenia toksyczności.

W trakcie projektowania nowych związków przeciwnowotworowych ważnym zagadnieniem jest znalezienie celów molekularnych wobec których związki te będą aktywne. Ostatnio wykazano, że ważnym celem dla związków skierowanych wobec komórek nowotworowych jest elastaza neutrofilowa. Jest to neutrofilowa proteaza serynowa, której zwiększoną aktywność wykazano w rozwoju i progresji raka piersi, płuc, prostaty oraz okrężnicy. Wykazano również, że inhibitory elastazy wykazują aktywność antyproliferacyjną w wielu modelach raka.

Przedstawione w niniejszej pracy badania dotyczyły modyfikacji struktury, znanego leku przeciwnowotworowego – talidomidu, w celu otrzymania nowych nieznanych dotąd w literaturze związków wykazujących możliwie wysoką aktywność przeciwnowotworową i inhibującą elastazę. Wykorzystując jako układy farmakoforowe pierścienie ftalimidu, tiazolu oraz układ azetydino-2,4-dionu zaprojektowano 5 serii nowych pochodnych talidomidu. Opracowano wydajne metody syntezy, sposobu wydzielenia i oczyszczania nowo zaprojektowanych związków, których struktury potwierdzono za pomocą metod spektroskopowych. Kolejnym krokiem była ocena aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych pochodnych wobec 7 linii komórek nowotworowych i zbadanie ich toksyczności wobec 2 linii komórek zdrowych. Przeprowadzono badania aktywności inhibującej świńską elastazę trzustkową i ludzką elastazę neutrofilową oraz określono mechanizm inhibicji. Dla wybranych pochodnych zbadano również zdolność do inhibicji kinazy tyrozynowej EGFR, aktywacji kaspazy 3/7 oraz wpływu na procesy apoptozy, nekrozy i cykl komórkowy. Dodatkowo określono stabilność chemiczną nowo zaprojektowanych związków. Ostatnim etapem badań było przeprowadzenie dokowania

molekularnego, które pozwoliło na poznanie mechanizmu interakcji nowych pochodnych talidomidu ze strukturą elastazy.

W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano łącznie 29 nowych, nieznanych dotąd w literaturze pochodnych talidomidu. Większość nowych związków charakteryzowała się wysoką aktywnością antyproliferacyjną, z jednocześnie niską toksycznością wobec komórek zdrowych. Nowo zaprojektowane związki okazały się dobrymi inhibitorami elastazy, a najaktywniejsze z nich działały w zakresie nanomolowym. Badania pozwoliły na wyłonienie struktury wiodącej dla nowych pochodnych talidomidu o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej i hamującej elastazę, która w przyszłości może zostać wykorzystana jako potencjalny lek w terapii nowotworów.

słowa kluczowe: elastaza, pochodne talidomidu, nowotwory, dokowanie molekularne, tiazol

VIII. SUMMARY

Cancer is now one of the leading causes of death worldwide, and the incidence of cancer is steadily rising. Despite significant advances in anticancer therapies, uncontrolled growth, metastasis and drug resistance of cancer cells is an important problem limiting the effectiveness of treatment. In this regard, the research on new anticancer drugs with high activity and low toxicity is an important task for medicinal chemistry. An effective way to search for new active compounds is to modify the structures of currently used drugs to improve their activity and reduce toxicity.

In anticancer drug design, an important issue is to find molecular targets against which these compounds will act. Recently, neutrophil elastase has been shown to be an important target for compounds directed against cancer cells. It is a neutrophil serine protease whose increased activity has been associated with the pathomechanism of breast, lung, prostate and colon cancer growth and progression. Elastase inhibitors have also been shown to exhibit antiproliferative activity in a number of cancer models.

The research presented in this doctoral thesis focused on modifying the structure of the well-known anticancer drug - thalidomide, to obtain new compounds, previously unknown in the literature, that exhibit the highest possible anticancer and elastase inhibitory activity. Using as pharmacophores the rings of phthalimide, thiazole and azetidine-2,4-dione system, 5 series of new thalidomide derivatives were designed. Efficient methods of synthesis, separation and purification of the newly designed compounds were presented and their structures were confirmed using spectroscopic methods. The next step was to evaluate the antiproliferative activity of the obtained derivatives against 7 cancer cell lines and to test their toxicity against 2 healthy cell lines. The inhibitory activity of porcine pancreatic elastase and human neutrophil elastase was tested and the mechanism of inhibition was determined. For selected derivatives, the ability to inhibit EGFR tyrosine kinase, activate caspase 3/7 and affect the processes of apoptosis, necrosis and the cell cycle were also investigated. In addition, the chemical stability of the newly designed compounds was determined. The final stage of the study was molecular docking, which allowed to find out the mechanism of interaction of the new thalidomide derivatives with the elastase structure.

As a result of the conducted research, a total of 29 new thalidomide derivatives, previously unknown in the literature, were obtained. Most of the new compounds were characterized by high antiproliferative activity with simultaneous low toxicity to healthy cells.

The newly designed compounds proved to be good elastase inhibitors, and the most active of them were active in the nanomolar range. The performed research identified a lead structure for new thalidomide derivatives with high anticancer and elastase inhibitory activities, which could be used as potential drugs in cancer therapy in the future.

keywords: elastase, thalidomide derivatives, cancer, molecular docking, thiazole

IX. SPIS RYCIN

Rycina 1. Struktura chemiczna talidomidu	14
Rycina 2. Struktury chemiczne pochodnych talidomidu	15
Rycina 3. Mechanizm aktywności elastazy neutrofilowej	16
Rycina 4. Stany chorobowe, w których patogenezie uczestniczy elastaza neutrofilowa....	19
Rycina 5. Sivelestat	22
Rycina 6. Wybrane struktury nowych inhibitorów elastazy	23
Rycina 7. Techniki hybrydyzacji molekularnej	29
Rycina 8. Reakcja otrzymywania ftalimidu z bezwodnika ftalowego	31
Rycina 9. Różne metody otrzymywania pochodnych ftalimidu	32
Rycina 10. Reakcja Gabriela.....	32
Rycina 11. Pochodne ftalimidu o aktywności biologicznej	33
Rycina 12. Pierścień tiazolu	34
Rycina 13. Reakcja Hantzsha z użyciem tioamidu (A), N-podstawionej pochodnej mocznika (B), estru kwasu tiokarbaminowego (C)	35
Rycina 14. Wybrane związki zatwierdzone przez FDA w terapii przeciwnowotworowej zawierające pierścień tiazolu	36
Rycina 15. Związek 3g przedstawiony przez Piechowską i innych [100].....	36
Rycina 16. Struktury najaktywniejszych związków 3c i 4 otrzymanych przez Salema i innych [101].....	37
Rycina 17. Związek 9h otrzymany przez Butta i innych [102]	37
Rycina 18. Wzór ogólny zasad Schiffa	38
Rycina 19. Mechanizm tworzenia zasad Schiffa	38
Rycina 20. Związki zaprezentowane przez Vanjarea [106] i innych oraz przez Abdulragmana i innych [107]	39
Rycina 21. Reakcja otrzymywania pierścienia 4-okso- β -laktamu	40
Rycina 22. Mechanizm wiązania z miejscem aktywnym HNE układu 4-okso- β -laktamu.	40
Rycina 23. Struktury pochodnych 3c i 3e otrzymanych przez Donarską i innych [110]....	41
Rycina 24. Modyfikacja układu talidomidu	43
Rycina 25. Wzory ogólne związków przedstawionych w publikacjach II-IV	44
Rycina 26. Najaktywniejszy związek serii A	65
Rycina 27. Najaktywniejszy związek serii C	66
Rycina 28. Najaktywniejsze związki serii B	67

Rycina 29. Najaktywniejsze związki serii D w odniesieniu do danych linii komórek nowotworowych i elastazy neutrofilowej	88
Rycina 30. Najaktywniejszy związek serii E	109

X. SPIS TABEL

Tabela 1. Potencjalne zastosowania terapeutyczne talidomidu 12

Tabela 2. Wybrane substraty elastazy neutrofilowej 18

XI. LITERATURA

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229-263. doi:10.3322/caac.21834.
- [2] Matore BW, Banjare P, Sarthi AS, Roy PP, Singh J. Phthalimides represent a promising scaffold for multi-targeted anticancer agents. *ChemistrySelect.* 2023(8):e202204851. doi: 10.1002/slct.202204851.
- [3] Lerman I, Hammes SR. Neutrophil elastase in the tumor microenvironment. *Steroids.* 2018;133:96-101. doi:10.1016/j.steroids.2017.11.006.
- [4] Lulla AR, Akli S, Karakas C, Caruso JA, Warma LD, Fowlkes NW, Rao X, Wang J, Hunt KK, Watowich SS, Keyomarsi K. Neutrophil elastase remodels mammary tumors to facilitate lung metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2024;23(4):492-506. doi:10.1158/1535-7163.MCT-23-0414.
- [5] Nawa M, Osada S, Morimitsu K, Nonaka K, Futamura M, Kawaguchi Y, Yoshida K. Growth effect of neutrophil elastase on breast cancer: favorable action of sivelestat and application to anti-HER2 therapy. *Anticancer Res.* 2012;32(1):13-19.
- [6] Vargesson N. Thalidomide embryopathy: an enigmatic challenge. *ISRN Developmental Biology.* 2013;2013:241016. doi:10.1155/2013/241016.
- [7] Sheskin J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 1965;6: 303-306. doi:10.1002/cpt196563303.
- [8] D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(9):4082-4085. doi:10.1073/pnas.91.9.4082.
- [9] Verheul HM, Panigrahy D, Yuan J, D'Amato RJ. Combination oral antiangiogenic therapy with thalidomide and sulindac inhibits tumour growth in rabbits. *Br J Cancer.* 1999;79(1):114-8. doi:10.1038/sj.bjc.6690020.
- [10] Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med.* 1999;341(21):1565-1571. doi:10.1056/NEJM199911183412102.
- [11] Zeldis JB, Williams BA, Thomas SD, Elsayed ME. S.T.E.P.S.: a comprehensive program for controlling and monitoring access to thalidomide. *Clin Ther.* 1999;21(2):319-330. doi:10.1016/s0149-2918(00)88289-2.

- [12] Coelho A, Souto MI, Cardoso CR, Salgado DR, Schmal TR, Waddington Cruz M, de Souza Papi JA. Long-term thalidomide use in refractory cutaneous lesions of lupus erythematosus: a 65 series of Brazilian patients. *Lupus*. 2005;14(6):434-439. doi:10.1191/0961203305lu2124oa.
- [13] Shek LP, Lim DL. Thalidomide in Behçet's disease. *Biomed Pharmacother*. 2002;56(1):31-35. doi:10.1016/s0753-3322(01)00154-8.
- [14] Raza A, Meyer P, Dutt D, Zorat F, Lisak L, Nascimben F, du Randt M, Kaspar C, Goldberg C, Loew J, Dar S, Gezer S, Venugopal P, Zeldis J. Thalidomide produces transfusion independence in long-standing refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2001;98(4):958-965. doi:10.1182/blood.v98.4.958.
- [15] Rubegni P, Sbrano P, De Aloe G, Flori ML, Fimiani M. Thalidomide in the treatment of Kaposi's sarcoma. *Dermatology*. 2007;215(3):240-244. doi:10.1159/000106583.
- [16] Lehman TJ, Schechter SJ, Sundel RP, Oliveira SK, Huttenlocher A, Onel KB. Thalidomide for severe systemic onset juvenile rheumatoid arthritis: a multicenter study. *J Pediatr*. 2004;145(6):856-857. doi:10.1016/j.jpeds.2004.08.020.
- [17] Wang X, Shen Y, MengLv L, Zhang X, Yang J, Wang F, Yang J. Thalidomide suppresses breast cancer tumor growth by inhibiting tumor-associated macrophage accumulation in breast tumor-bearing mice. *Eur J Pharm Sci*. 2020;151:105302. doi:10.1016/j.ejps.2020.105302.
- [18] Moutsopoulos NM, Angelov N, Sankar V, Leakan RA, Pillemer S, Wahl SM. Immunological consequences of thalidomide treatment in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(1):112-114. doi:10.1136/ard.2005.038406.
- [19] Davis M, Lasheen W, Walsh D, Mahmoud F, Bicanovsky L, Lagman R. A phase II dose titration study of thalidomide for cancer-associated anorexia. *J Pain Symptom Manage*. 2012;43(1):78-86. doi:10.1016/j.jpainsymman.2011.03.007.
- [20] Fazzi P, Manni E, Cristofani R, Cei G, Piazza S, Calabrese R, Antonelli A, Siciliano G, Barachini P, Carpi A. Thalidomide for improving cutaneous and pulmonary sarcoidosis in patients resistant or with contraindications to corticosteroids. *Biomed Pharmacother*. 2012;66(4):300-307. doi:10.1016/j.biopha.2012.03.005.
- [21] Morabito A, Fanelli M, Carillio G, Gattuso D, Sarmiento R, Gasparini G. Thalidomide prolongs disease stabilization after conventional therapy in patients with recurrent glioblastoma. *Oncol Rep*. 2004;11(1):93-95. doi.org/10.3892/or.11.1.93.

- [22] Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med.* 1991;173(3):699-703. doi:10.1084/jem.173.3.699.
- [23] Majumder S, Sreedhara SR, Banerjee S, Chatterjee S. TNF α signaling beholds thalidomide saga: a review of mechanistic role of TNF- α signaling under thalidomide. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(13):1456-1467. doi:10.2174/156802612801784443.
- [24] Gordon JN, Goggin PM. Thalidomide and its derivatives: emerging from the wilderness. *Postgrad Med J.* 2003;79(929):127-132. doi:10.1136/pmj.79.929.127.
- [25] Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science.* 2010;327(5971):1345-1350. doi:10.1126/science.1177319.
- [26] Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, Svinkina T, Heckl D, Comer E, Li X, Ciarlo C, Hartman E, Munshi N, Schenone M, Schreiber SL, Carr SA, Ebert BL. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science.* 2014;343(6168):301-305. doi:10.1126/science.1244851.
- [27] Lu G, Middleton RE, Sun H, Naniong M, Ott CJ, Mitsiades CS, Wong KK, Bradner JE, Kaelin WG Jr. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science.* 2014;343(6168):305-309. doi:10.1126/science.1244917.
- [28] Stewart AK. Medicine. How thalidomide works against cancer. *Science.* 2014;343(6168):256-257. doi:10.1126/science.1249543.
- [29] Charliński G, Vesole DH, Jurczyszyn A. Rapid Progress in the Use of Immunomodulatory Drugs and Cereblon E3 Ligase Modulators in the Treatment of Multiple Myeloma. *Cancers (Basel).* 2021;13(18):4666. doi:10.3390/cancers13184666.
- [30] Kurtin SE, Bilotti E. Novel agents for the treatment of multiple myeloma: proteasome inhibitors and immunomodulatory agents. *J Adv Pract Oncol.* 2013;4(5):307-321.
- [31] Matyskiela ME, Lu G, Ito T, Pagarigan B, Lu CC, Miller K, Fang W, Wang NY, Nguyen D, Houston J, Carmel G, Tran T, Riley M, Nosaka L, Lander GC, Gaidarova S, Xu S, Ruchelman AL, Handa H, Carmichael J, Daniel TO, Cathers BE, Lopez-Girona A, Chamberlain PP. A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase. *Nature.* 2016;535(7611):252-257. doi:10.1038/nature18611.

- [32] Tarhini M, Fessi H, Bentaher A, Greige-Gerges H, Elaissari A. A potential new strategy for using elastase and its inhibitor as therapeutic agents. *J Transl Sci.* 2018;5:1-8. doi: 10.15761/JTS.1000290.
- [33] Ohbayashi, H. Current synthetic inhibitors of human neutrophil elastase. *Expert Opin Ther Pat.* 2002;12(1):65–84. doi:10.1517/13543776.12.1.65.
- [34] Skoreński M, Torzyk K, Sieńczyk M. Neutrophil serine proteases. *RDODJ.* 2023; 2(6):1-23. doi: 10.20517/rdodj.2022.21.
- [35] Belaaouaj A, Kim KS, Shapiro SD. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science.* 2000;289(5482):1185-1188. doi:10.1126/science.289.5482.1185.
- [36] Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro SD, Weiss J, Zychlinsky A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature.* 2002;417(6884):91-94. doi:10.1038/417091a.
- [37] Zeng W, Song Y, Wang R, He R, Wang T. Neutrophil elastase: from mechanisms to therapeutic potential. *J Pharm Anal.* 2023;13(4):355-366. doi:10.1016/j.jpha.2022.12.003.
- [38] Kelly E, Greene CM, McElvaney NG. Targeting neutrophil elastase in cystic fibrosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(2):145-157. doi:10.1517/14728222.12.2.145.
- [39] Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev.* 2010;62(4):726-759. doi:10.1124/pr.110.002733.
- [40] Fitch PM, Roghanian A, Howie SE, Sallenave JM. Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity. *Biochem Soc Trans.* 2006;34:279-282. doi:10.1042/BST20060279.
- [41] Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond).* 2006;110(1):21-35. doi:10.1042/CS20050115.
- [42] Kawabata K, Hagio T, Matsuoka S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur J Pharmacol.* 2002;451(1):1-10. doi:10.1016/s0014-2999(02)02182-9.
- [43] Quinn DJ, Weldon S, Taggart CC. Antiproteases as therapeutics to target inflammation in cystic fibrosis. *Open Respir Med J.* 2010;4:20-31. doi:10.2174/1874306401004020020.
- [44] Voynow JA, Shinbashi M. Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease. *Biomolecules.* 2021;11(8):1065. doi:10.3390/biom11081065.
- [45] Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, Sibila O, Finch S, Furrrie E, Dicker A, Wrobel K, Elborn JS, Walker B, Martin SL, Marshall SE, Huang JT, Fardon TC.

Neutrophil elastase activity is associated with exacerbations and lung function decline in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(10):1384-1393. doi:10.1164/rccm.201605-1027OC.

[46] Hilscher MB, Sehrawat T, Arab JP, Zeng Z, Gao J, Liu M, Kostallari E, Gao Y, Simonetto DA, Yaqoob U, Cao S, Revzin A, Beyder A, Wang RA, Kamath PS, Kubes P, Shah VH. Mechanical stretch increases expression of CXCL1 in liver sinusoidal endothelial cells to recruit neutrophils, generate sinusoidal microthrombi, and promote portal hypertension. *Gastroenterology.* 2019;157(1):193-209. doi:10.1053/j.gastro.2019.03.013.

[47] Greten FR, Grivnenkov SI. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity.* 2019;51(1):27-41. doi:10.1016/j.immuni.2019.06.025.

[48] Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 2008;27(45):5904-5912. doi:10.1038/onc.2008.271.

[49] Hurt B, Schulick R, Edil B, El Kasmi KC, Barnett C Jr. Cancer-promoting mechanisms of tumor-associated neutrophils. *Am J Surg.* 2017;214(5):938-944. doi:10.1016/j.amjsurg.2017.08.003.

[50] Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV. Tumor associated neutrophils. Their role in tumorigenesis, metastasis, prognosis and therapy. *Front Oncol.* 2019;9:1146. doi:10.3389/fonc.2019.01146.

[51] Cools-Lartigue J, Spicer J, Najmeh S, Ferri L. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(21):4179-4194. doi:10.1007/s00018-014-1683-3.

[52] Rivera-Franco MM, Leon-Rodriguez E, Torres-Ruiz JJ, Gómez-Martín D, Angles-Cano E, de la Luz Sevilla-González M. Neutrophil extracellular traps associate with clinical stages in breast cancer. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(3):1781-1785. doi:10.1007/s12253-019-00763-5.

[53] Deryugina E, Carré A, Ardi V, Muramatsu T, Schmidt J, Pham C, Quigley JP. Neutrophil elastase facilitates tumor cell intravasation and early metastatic events. *iScience.* 2020;23(12):101799. doi:10.1016/j.isci.2020.101799.

[54] Jia W, Luo Q, Wu J, Shi Y, Guan Q. Neutrophil elastase as a potential biomarker related to the prognosis of gastric cancer and immune cell infiltration in the tumor immune microenvironment. *Sci Rep.* 2023;13(1):13447. doi:10.1038/s41598-023-39404-y.

[55] Akizuki M, Fukutomi T, Takasugi M, Takahashi S, Sato T, Harao M, Mizumoto T, Yamashita J. Prognostic significance of immunoreactive neutrophil elastase in human

breast cancer: long-term follow-up results in 313 patients. *Neoplasia*. 2007;9(3):260-264. doi:10.1593/neo.06808.

[56] Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, Stolz DB, Land SR, Marconcini LA, Kliment CR, Jenkins KM, Beaulieu KA, Mouded M, Frank SJ, Wong KK, Shapiro SD. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med*. 2010;16(2):219-223. doi:10.1038/nm.2084.

[57] Caruso JA, Akli S, Pigeon L, Hunt KK, Keyomarsi K. The serine protease inhibitor elafin maintains normal growth control by opposing the mitogenic effects of neutrophil elastase. *Oncogene*. 2015;34(27):3556-3567. doi:10.1038/onc.2014.284.

[58] Hunt KK, Wingate H, Yokota T, Liu Y, Mills GB, Zhang F, Fang B, Su CH, Zhang M, Yi M, Keyomarsi K. Elafin, an inhibitor of elastase, is a prognostic indicator in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013;15(1):R3. doi:10.1186/bcr3374.

[59] Okamoto M, Mizuno R, Kawada K, Itatani Y, Kiyasu Y, Hanada K, Hirata W, Nishikawa Y, Masui H, Sugimoto N, Tamura T, Inamoto S, Sakai Y, Obama K. Neutrophil extracellular traps promote metastases of colorectal cancers through activation of ERK signaling by releasing neutrophil elastase. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2):1118. doi:10.3390/ijms24021118.

[60] Wada Y, Yoshida K, Tsutani Y, Shigematsu H, Oeda M, Sanada Y, Suzuki T, Mizuiri H, Hamai Y, Tanabe K, Ukon K, Hihara J. Neutrophil elastase induces cell proliferation and migration by the release of TGF- α , PDGF and VEGF in esophageal cell lines. *Oncol Rep*. 2007;17(1):161-167. doi: 10.3892/or.17.1.161.

[61] Lerman I, Garcia-Hernandez ML, Rangel-Moreno J, Chiriboga L, Pan C, Nastiuk KL, Krolewski JJ, Sen A, Hammes SR. Infiltrating Myeloid Cells Exert Protumorigenic Actions via Neutrophil Elastase. *Mol Cancer Res*. 2017;15(9):1138-1152. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0003.

[62] Maiorani O, Pivetta E, Capuano A, Modica TM, Wassermann B, Bucciotti F, Colombatti A, Doliana R, Spessotto P. Neutrophil elastase cleavage of the gC1q domain impairs the EMILIN1- α 4 β 1 integrin interaction, cell adhesion and anti-proliferative activity. *Sci Rep*. 2017;7:39974. doi:10.1038/srep39974.

[63] Yu L, Zhong L, Xiong L, Dan W, Li J, Ye J, Wan P, Luo X, Chu X, Liu C, He C, Mu F, Liu B. Neutrophil elastase-mediated proteolysis of the tumor suppressor p200 CUX1 promotes cell proliferation and inhibits cell differentiation in APL. *Life Sci*. 2020;242:117229. doi:10.1016/j.lfs.2019.117229.

- [64] Kamohara H, Sakamoto K, Mita S, An XY, Ogawa M. Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046.Na) suppresses the proliferation, motility and chemotaxis of a pancreatic carcinoma cell line, Capan-1. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1997;98(1):103-108.
- [65] Inada M, Yamashita J, Nakano S, Ogawa M. Complete inhibition of spontaneous pulmonary metastasis of human lung carcinoma cell line EBC-1 by a neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046.Na). *Anticancer Res*. 1998;18(2A):885-890.
- [66] António JPM, Gonçalves LM, Guedes RC, Moreira R, Gois PMP. Diazaborines as New Inhibitors of Human Neutrophil Elastase. *ACS Omega*. 2018;3(7):7418-7423. doi:10.1021/acsomega.8b00702.
- [67] Giovannoni MP, Crocetti L, Cantini N, Guerrini G, Vergelli C, Iacovone A, Teodori E, Schepetkin IA, Quinn MT, Ciattini S, Rossi P, Paoli P. New 3-unsubstituted isoxazolones as potent human neutrophil elastase inhibitors: Synthesis and molecular dynamic simulation. *Drug Dev Res*. 2020;81(3):338-349. doi:10.1002/ddr.21625.
- [68] Areias LRP, Ruivo EFP, Gonçalves LM, Duarte MT, André V, Moreira R, Lucas SD, Guedes RC. A unified approach toward the rational design of selective low nanomolar human neutrophil elastase inhibitors. *RSC Adv*. 2015;5:51717–51721. doi: 10.1039/C5RA07783D.
- [69] Giovannoni MP, Schepetkin IA, Crocetti L, Ciciani G, Cilibrizzi A, Guerrini G, Khlebnikov AI, Quinn MT, Vergelli C. Cinnoline derivatives as human neutrophil elastase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(4):628-639. doi:10.3109/14756366.2015.1057718.
- [70] Crocetti L, Schepetkin IA, Cilibrizzi A, Graziano A, Vergelli C, Giomi D, Khlebnikov AI, Quinn MT, Giovannoni MP. Optimization of N-benzoylindazole derivatives as inhibitors of human neutrophil elastase. *J Med Chem*. 2013;56(15):6259-6272. doi:10.1021/jm400742j.
- [71] Crocetti L, Giovannoni MP, Schepetkin IA, Quinn MT, Khlebnikov AI, Cantini N, Guerrini G, Iacovone A, Teodori E, Vergelli C. 1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine: A new scaffold for human neutrophil elastase (HNE) inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2018;26(21):5583-5595. doi:10.1016/j.bmc.2018.09.034
- [72] Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017;8(23):38022-38043. doi:10.18632/oncotarget.16723.

- [73] Shalini, Kumar V. Have molecular hybrids delivered effective anti-cancer treatments and what should future drug discovery focus on?. *Expert Opin Drug Discov.* 2021;16(4):335-363. doi:10.1080/17460441.2021.1850686.
- [74] de Oliveira Pedrosa M, Duarte da Cruz RM, de Oliveira Viana J, de Moura RO, Ishiki HM, Barbosa Filho JM, Diniz MF, Scotti MT, Scotti L, Bezerra Mendonca FJ. Hybrid compounds as direct multitarget ligands: a review. *Curr Top Med Chem.* 2017;17(9):1044-1079. doi:10.2174/1568026616666160927160620.
- [75] Fu RG, Sun Y, Sheng WB, Liao DF. Designing multi-targeted agents: An emerging anticancer drug discovery paradigm. *Eur J Med Chem.* 2017;136:195-211. doi:10.1016/j.ejmech.2017.05.016.
- [76] Viegas-Junior C, Danuello A, da Silva Bolzani V, Barreiro EJ, Fraga CA. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr Med Chem.* 2007;14(17):1829-1852. doi:10.2174/092986707781058805.
- [77] Singh AK, Kumar A, Singh H, Sonawane P, Paliwal H, Thareja S, Pathak P, Grishina M, Jaremko M, Emwas AH, Yadav JP, Verma A, Khalilullah H, Kumar P. Concept of hybrid drugs and recent advancements in anticancer hybrids. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(9):1071. doi:10.3390/ph15091071.
- [78] Kushwaha N, Kaushik D. Recent advances and future prospects of phthalimide derivatives. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2016;6(03):159–171. doi:10.7324/JAPS.2016.60330.
- [79] Das S. Beyond conventional construction of the phthalimide core: a review. *New J Chem.* 2021;45(44):20519–20536. doi:10.1039/D1NJ03924E.
- [80] Gibson MS, Bradshaw RW. The Gabriel Synthesis of primary amines. *Angew Chem.* 1968;7(12):919-930. doi:10.1002/anie.196809191.
- [81] Asadollahi A, Asadi M, Hosseini FS, Ekhtiari Z, Biglar M, Amanlou M. Synthesis, molecular docking, and antiepileptic activity of novel phthalimide derivatives bearing amino acid conjugated anilines. *Res Pharm Sci.* 2019;14(6):534-54. doi:10.4103/1735-5362.272562.
- [82] Chi CL, Xu L, Li JJ, Liu Y, Chen BQ. Synthesis, antiproliferative, and antimicrobial properties of novel phthalimide derivatives. *Med Chem Res.* 2022;31:120–131. doi:10.1007/s00044-021-02823-5.
- [83] Holanda VN, Lima EMA, Silva WVD, Maia RT, Medeiros RL, Ghosh A, Lima VLM, Figueiredo RCBQ. Identification of 1,2,3-triazole-phthalimide derivatives as potential drugs against COVID-19: a virtual screening, docking and molecular dynamic study. *J Biomol Struct Dyn.* 2022;40(12):5462-5480. doi:10.1080/07391102.2020.1871073.

- [84] Bhavani GV, Kondapuram SK, Shamsudeen AF, Coumar MS, Selvin J, Kannan T. Synthesis, antitubercular evaluation, and molecular docking studies of hybrid pyridinium salts derived from isoniazid. *Drug Dev Res.* 2023;84(3):470-483. doi:10.1002/ddr.22039.
- [85] Askarzadeh M, Azizian H, Adib M, Mohammadi-Khanaposhtani M, Mojtabavi S, Faramarzi MA, Sajjadi-Jazi SM, Larijani B, Hamedifar H, Mahdavi M. Design, synthesis, in vitro α -glucosidase inhibition, docking, and molecular dynamics of new phthalimide-benzenesulfonamide hybrids for targeting type 2 diabetes. *Sci Rep.* 2022;12:10569. doi:10.1038/s41598-022-14896-2.
- [86] Karim N, Khan I, Khan I, Halim SA, Khalid A, Abdalla AN, Rehman NU, Khan A, Al-Harrasi A. Antiamnesic effects of novel phthalimide derivatives in scopolamine-induced memory impairment in mice: a useful therapy for Alzheimer's disease. *ACS Omega.* 2023;8(8):8052-8065. doi:10.1021/acsomega.2c07951.
- [87] Alanazi AM, El-Azab AS, Al-Suwaidan IA, ElTahir KE, Asiri YA, Abdel-Aziz NI, Abdel-Aziz AA. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: anti-inflammatory and analgesic activities. *Eur J Med Chem.* 2015;92:115-123. doi:10.1016/j.ejmech.2014.12.039.
- [88] Zahran MAH, El-Aarag B, Mehany ABM, Belal A, Younes AS. Design, synthesis, biological evaluations, molecular docking, and in vivo studies of novel phthalimide analogs. *Arch Pharm (Weinheim).* 2018;351(5):e1700363. doi:10.1002/ardp.201700363.
- [89] Philoppes JN, Lamie PF. Design and synthesis of new benzoxazole/benzothiazole-phthalimide hybrids as antitumor-apoptotic agents. *Bioorg Chem.* 2019;89:102978. doi:10.1016/j.bioorg.2019.102978.
- [90] Mansour NI, El-Sayed SM, El-Gohary NS, Abdel-Aziz NI, El-Subbagh HI, Ghaly MA. New phthalimide-based derivatives as EGFR-TK inhibitors: synthesis, biological evaluation, and molecular modeling study. *Bioorg Chem.* 2022;127:105966. doi:10.1016/j.bioorg.2022.105966.
- [91] Othman IMM, Gad-Elkareem MAM, El-Naggar M, Nossier ES, Amr AEE. Novel phthalimide based analogues: design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2019;34(1):1259-1270. doi:10.1080/14756366.2019.1637861.
- [92] Borcea AM, Ionuț I, Crișan O, Oniga O. An overview of the synthesis and antimicrobial, antiprotozoal, and antitumor activity of thiazole and bisthiazole derivatives. *Molecules.* 2021;26(3):624. doi:10.3390/molecules26030624.

- [93] Ripain IHA, Nurziana N. A brief review on the thiazole derivatives: synthesis methods and biological activities. *Malays. J. Anal. Sci.* 2021;25:257-267.
- [94] Ibrahim SA, Rizk HF. Synthesis and biological evaluation of thiazole derivatives. *Azoles: Synthesis, Properties, Applications and Perspectives*. IntechOpen. 2021. doi:10.5772/intechopen.93037.
- [95] Scott KA, Njardarson JT. Analysis of US FDA-approved drugs containing sulfur atoms. *Top Curr Chem (Cham)*. 2018;376(1):5. doi:10.1007/s41061-018-0184-5.
- [96] Sharma PC, Bansal KK, Sharma A, Sharma D, Deep A. Thiazole-containing compounds as therapeutic targets for cancer therapy. *Eur J Med Chem*. 2020;188:112016. doi:10.1016/j.ejmech.2019.112016.
- [97] Olivieri A, Manzione L. Dasatinib: a new step in molecular target therapy. *Ann Oncol*. 2007;18 Suppl 6:vi42-vi46. doi:10.1093/annonc/mdm223.
- [98] Juric D, Janku F, Rodón J, Burris HA, Mayer IA, Schuler M, Seggewiss-Bernhardt R, Gil-Martin M, Middleton MR, Baselga J, Bootle D, Demanse D, Blumenstein L, Schumacher K, Huang A, Quadt C, Rugo HS. Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CA-altered and PIK3CA-wild-type estrogen receptor-positive advanced breast cancer: a phase 1b clinical trial. *JAMA Oncol*. 2019;5(2):e184475. doi:10.1001/jamaoncol.2018.4475.
- [99] Alizadeh SR, Hashemi SM. Development and therapeutic potential of 2-aminothiazole derivatives in anticancer drug discovery. *Med Chem Res*. 2021;30(4):771-806. doi:10.1007/s00044-020-02686-2.
- [100] Piechowska K, Świtalska M, Cytarska J, Jaroch K, Łuczykowski K, Chałupka J, Wietrzyk J, Misiura K, Bojko B, Kruszewski S, Łączkowski KZ. Discovery of tropinone-thiazole derivatives as potent caspase 3/7 activators, and noncompetitive tyrosinase inhibitors with high antiproliferative activity: rational design, one-pot tricomponent synthesis, and lipophilicity determination. *Eur J Med Chem*. 2019;175:162-171. doi:10.1016/j.ejmech.2019.05.006.
- [101] Salem MG, El-Maaty DMA, El-Deen YIM, Elesawy BH, Askary AE, Saleh A, Saied EM, Behery ME. Novel 1,3-thiazole analogues with potent activity against breast cancer: a design, synthesis, in vitro, and in silico study. *Molecules*. 2022;27(15):4898. doi:10.3390/molecules27154898.
- [102] Butt ARS, Abbasi MA, Aziz-Ur-Rehman, Siddiqui SZ, Hassan M, Raza H, Shah SAA, Seo SY. Synthesis and structure-activity relationship of elastase inhibiting novel ethylated thiazole-triazole acetamide hybrids: Mechanistic insights through

- kinetics and computational contemplations. *Bioorg Chem.* 2019;86:197-209. doi:10.1016/j.bioorg.2019.01.040.
- [103] Silva CM, Silva DL, Modolo LV, Alves RB, Resende MA, Martins CV, Fátima ÂD. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research.* 2011; 2:1-8. doi:10.1016/j.jare.2010.05.004.
- [104] Singh A, Prerna C. Review on Schiff Bases. *World J Pharm Sci.* 2021;9(8):133-40.
- [105] Dzeikala A, Sykula A. Schiff bases as important class of pharmacological agents. *J Pharm Pharmacol.* 2018, 6:12. doi:10.17265/2328-2150/2018.12.002.
- [106] Vanjare BD, Seok Eom Y, Raza H, Hassan M, Hwan Lee K, Ja Kim S. Elastase inhibitory activity of quinoline analogues: synthesis, kinetic mechanism, cytotoxicity, chemoinformatics and molecular docking studies. *Bioorg Med Chem.* 2022;63:116745. doi:10.1016/j.bmc.2022.116745.
- [107] Abdulrahman HS, Hassan Mohammed M, Al-Ani LA., Ahmad MH, Hashim NM, Yehye WA. Synthesis of phthalimide imine derivatives as a potential anticancer agent, *journal of chemistry.* 2020;1:3928204. doi:10.1155/2020/3928204.
- [108] Mulchande J, Guedes RC, Tsang WY, Page MI, Moreira R, Iley J. Azetidine-2,4-diones (4-oxo-beta-lactams) as scaffolds for designing elastase inhibitors. *J Med Chem.* 2008;51(6):1783-1790. doi:10.1021/jm701257h.
- [109] Mulchande J, Oliveira R, Carrasco M, Gouveia L, Guedes RC, Iley J, Moreira R. 4-Oxo-beta-lactams (azetidine-2,4-diones) are potent and selective inhibitors of human leukocyte elastase. *J Med Chem.* 2010;53(1):241-253. doi:10.1021/jm901082k.
- [110] Donarska B, Świtalska M, Wietrzyk J, Płaziński W, Mizerska-Kowalska M, Zdzisińska B, Łączkowski KZ. Discovery of new 3,3-diethylazetidine-2,4-dione based thiazoles as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors with broad-spectrum antiproliferative activity. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):7566. doi:10.3390/ijms23147566
- [111] Sanjai C, Hakkimane SS, Guru BR, Gaonkar SL. A comprehensive review on anticancer evaluation techniques. *Bioorg Chem.* 2024;142:106973. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106973.
- [112] Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers.* 2020; 1(3):332-349. doi:10.1002/fft2.44.
- [113] McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008656. doi:10.1101/cshperspect.a008656.

- [114] Zubair T, Bandyopadhyay D. Small molecule EGFR inhibitors as anti-cancer agents: discovery, mechanisms of action, and opportunities. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2651. doi:10.3390/ijms24032651.
- [115] Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):448. doi:10.3390/ijms19020448.
- [116] Eun Lee K, Bharadwaj S, Yadava U, Gu Kang S. Evaluation of caffeine as inhibitor against collagenase, elastase and tyrosinase using in silico and in vitro approach. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2019;34(1):927-936. doi:10.1080/14756366.2019.1596904.
- [117] Crocetti L, Giovannoni MP, Schepetkin IA, Quinn MT, Khlebnikov AI, Cilibrizzi A, Piaz VD, Graziano A, Vergelli C. Design, synthesis and evaluation of N-benzoylindazole derivatives and analogues as inhibitors of human neutrophil elastase. *Bioorg. Med. Chem.* 2011;19(15): 4460–4472. doi: 10.1016/j.bmc.2011.06.036.
- [118] Kim JY, Lee JH, Song YH, Jeong WM, Tan X, Uddin Z, Park KH. Human neutrophil elastase inhibitory alkaloids from *Chelidonium majus* L. *J. Appl. Biol. Chem.* 2015;58(3):281–285. doi: 10.3839/jabc.2015.044.
- [119] Schepetkin IA, Khlebnikov AI, Quinn MT. N-Benzoylpyrazoles are novel small-molecule inhibitors of human neutrophil elastase. *J. Med. Chem.* 2007;50:4928–4938.

XII. OŚWIADCZENIA AUTORA I WSPÓLAUTORÓW

Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia 26 września 2023 r.
w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora na Uniwersytecie
Mikołaja Kopernika w Toruniu

mgr Beata Donarska
Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o autorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Łączkowski KZ. Recent advances in the development of elastase inhibitors. Future Medicinal Chemistry. 2020;12:1809–1813. doi:10.4155/fmc-2020-0163** mój udział polegał na dokonaniu przeglądu literatury, przygotowaniu i redagowaniu manuskryptu oraz przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 95%.


(podpis)

dr hab. Krzysztof Z. Łączkowski, prof. UMK
Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Łączkowski KZ. Recent advances in the development of elastase inhibitors. Future Medicinal Chemistry. 2020;12:1809–1813. doi:10.4155/fmc-2020-0163** mój udział polegał na opiece merytorycznej oraz korespondencji z wydawnictwem. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


.....
(podpis)

mgr Beata Donarska
Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o autorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Świtalska M, Plaziński W, Wietrzyk J, Łączkowski KZ. Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives: rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study. Bioorganic Chemistry. 2021;110:1–12. doi:10.1016/j.bioorg. 2021.104819** mój udział polegał na dokonaniu przeglądu literatury fachowej, współpracowaniu koncepcji i projektu badań, zaprojektowaniu struktur nowych związków, opracowaniu metodologii syntezy, wydzielenia i oczyszczenia otrzymanych substratów i produktów, analizie widm NMR i HRMS, przeprowadzeniu badań inhibicji elastazy, określeniu mechanizmu inhibicji elastazy, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu i redagowaniu manuskryptów oraz przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 70%.


(podpis)


dr Marta Świtalska
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Świtalska M, Płaziński W, Wietrzyk J, Łączkowski KZ. Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives: rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study. Bioorganic Chemistry. 2021;110:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2021.104819** mój udział polegał na przeprowadzeniu badań biologicznych dotyczących aktywności cytotoksycznej badanych związków, zdolności do aktywacji kaspazy 3/7 i inhibicji kinazy tyrozynowej EGRF oraz napisanie części manuskryptów dotyczących metodologii wyżej wymienionych badań. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.


.....
(podpis)

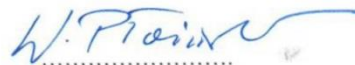
prof. dr hab. Wojciech Płaziński
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk
ul. Niezapominajek 8
30-239 Kraków

Toruń, 24.06.24

Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Świtalska M, Płaziński W, Wietrzyk J, Łączkowski KZ. Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives: rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study. Bioorganic Chemistry. 2021;110:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2021.104819** mój udział polegał na przeprowadzeniu dokowania molekularnego, analizę oraz opis otrzymanych wyników i metodologii wyżej wymienionych badań. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.



(podpis)

prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

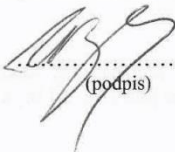
Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika**

w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Świtalska M, Płaziński W, Wietrzyk J, Łączkowski KZ. Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives: rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study. Bioorganic Chemistry. 2021;110:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2021.104819** mój udział polegał na nadzorze merytorycznym nad przeprowadzeniem badań biologicznych dotyczących aktywności cytotoksycznej badanych związków, ich zdolności do aktywacji kaspazy 3/7 i inhibicji kinazy tyrozynowej EGFR oraz edycję części manuskryptów dotyczących metodologii wyżej wymienionych badań. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


.....
(podpis)


dr hab. Krzysztof Z. Łączkowski, prof. UMK
Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Świtalska M, Płaziński W, Wietrzyk J, Łączkowski KZ. Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives: rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study. Bioorganic Chemistry. 2021;110:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2021.104819** mój udział polegał na współpracowaniu koncepcji i projektu badań, opiece merytorycznej nad prowadzonymi badaniami, edycji manuskryptu i korespondencji z wydawnictwem. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


.....
(podpis)

mgr Beata Donarska
Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o autorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Świtalska M, Wietrzyk J, Plaziński W, Łączkowski KZ. Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24:1–17. doi:10.3390/ijms24010110** mój udział polegał na dokonaniu przeglądu literatury fachowej, współpracowaniu koncepcji i projektu badań, zaprojektowaniu struktury nowych związków, opracowaniu metodologii syntezy, wydzielenia i oczyszczania otrzymanych substratów i produktów, analizie widm NMR i HRMS, przeprowadzeniu badań inhibicji elastazy, stabilności otrzymanych związków, określeniu mechanizmu inhibicji elastazy, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu i redagowaniu manuskryptów oraz przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 70%.


(podpis)

dr Marta Świtalska
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Świtalska M, Wietrzyk J, Płaziński W, Łączkowski KZ. Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24:1–17. doi:10.3390/ijms24010110** mój udział polegał na przeprowadzeniu badań biologicznych dotyczących aktywności cytotoksycznej badanych związków oraz napisanie części manuskryptów dotyczących metodologii wyżej wymienionych badań. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.

Marta Świtalska
.....
(podpis)

prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

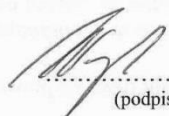
Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika**

w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Świtalska M, Wietrzyk J, Płaziński W, Łączkowski KZ. Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24:1–17. doi:10.3390/ijms24010110** mój udział polegał na nadzorze merytorycznym nad przeprowadzeniem badań biologicznych dotyczących aktywności cytotoksycznej badanych związków oraz edycję części manuskryptu dotyczącą metodologii wyżej wymienionych badań. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


.....
(podpis)

prof. dr hab. Wojciech Płaziński
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk
ul. Niezapominajek 8
30-239 Kraków

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Świtalska M, Wietrzyk J, Płaziński W, Łączkowski KZ. Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24:1–17. doi:10.3390/ijms24010110** mój udział polegał na przeprowadzeniu dokowania molekularnego, analizę oraz opis otrzymanych wyników i metodologii wyżej wymienionych badań. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.



.....
(podpis)

dr hab. Krzysztof Z. Łączkowski, prof. UMK
Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Świtalska M, Wietrzyk J, Plaziński W, Łączkowski KZ. Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24:1–17. doi:10.3390/ijms24010110** mój udział polegał na współpracowaniu koncepcji i projektu badań, opiece merytorycznej nad prowadzonymi badaniami, edycję manuskryptu i korespondencję z wydawnictwem. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


.....
(podpis)

mgr Beata Donarska
Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o autorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Sławińska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Zdzińska B, Płaziński W, Łączkowski KZ. Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action. Bioorganic Chemistry. 2023;138:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106608** mój udział polegał na dokonaniu przeglądu literatury fachowej, współpracowaniu koncepcji i projektu badań, zaprojektowaniu struktury nowych związków, opracowaniu metodologii syntezy, wydzielenia i oczyszczania otrzymanych substratów i produktów, analizie widm NMR i HRMS, przeprowadzeniu badań inhibicji elastazy, stabilności otrzymanych związków, określeniu mechanizmu inhibicji elastazy, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu i redagowaniu manuskryptów, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów i korespondencję z wydawnictwem. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 60%.


(podpis)

dr Adrianna Sławińska-Brych
Katedra Biologii Komórki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. M. Curie-Skłodowskiej 5
20-031 Lublin

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Sławińska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Zdzisińska B, Płaziński W, Łączkowski KZ. Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action. Bioorganic Chemistry. 2023;138:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106608** mój udział polegał na przeprowadzeniu badań biologicznych dotyczących wpływu badanych związków na procesy apoptozy, nekrozy i na cykl komórkowy. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.

Sławińska Brych
.....
(podpis)

000001353
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Katedra Wirusologii i Immunologii
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia 26 września 2023 r.
w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora na Uniwersytecie
Mikołaja Kopernika w Toruniu

dr Magdalena Mizerska-Kowalska
Katedra Wirusologii i Immunologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. M. Curie-Skłodowskiej 5
20-031 Lublin

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Sławińska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Zdzisińska B, Płaziński W, Łączkowski KZ. Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action. Bioorganic Chemistry. 2023;138:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106608** mój udział polegał na przeprowadzeniu badań biologicznych dotyczących aktywności antyproliferacyjnej badanych związków i analizie otrzymanych wyników. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.


(podpis)

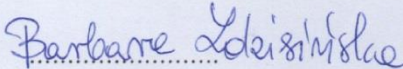
dr hab. Barbara Zdzińska, prof. UMCS
Katedra Wirusologii i Immunologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. M. Curie-Skłodowskiej 5
20-031 Lublin

Lublin, 24.06.2024

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Sławińska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Zdzińska B, Płaziński W, Łączkowski KZ. Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action. Bioorganic Chemistry. 2023;138:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106608** mój udział polegał na nadzorze merytorycznym nad badaniami biologicznymi dotyczącymi aktywności antyproliferacyjnej badanych związków, ich wpływu na procesy apoptozy, nekrozy i na cykl komórkowy oraz edycję części manuskryptu dotyczącą metodologii wyżej wymienionych badań. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


(podpis)

prof. dr hab. Wojciech Płaziński
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk
ul. Niezapominajek 8
30-239 Kraków

Toruń, 24.06.24

Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Sławińska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Zdzińska B, Płaziński W, Łączkowski KZ. Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action. Bioorganic Chemistry. 2023;138:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106608** mój udział polegał na przeprowadzeniu dokowania molekularnego, analizę oraz opis otrzymanych wyników i metodologii wyżej wymienionych badań. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.



.....
(podpis)

dr hab. Krzysztof Z. Łączkowski, prof. UMK
Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 24.06.24

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Donarska B, Sławińska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Zdzińska B, Plaziński W, Łączkowski KZ. Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action. Bioorganic Chemistry. 2023;138:1–12. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106608** mój udział polegał na współopracowaniu koncepcji i projektu badań, opiece merytorycznej nad prowadzonymi badaniami, edycję manuskryptu. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


.....
(podpis)

XIII. DROBEK NAUKOWY

UNIwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Biblioteka Medyczna
ul. M. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz
tel. 52 585 3511, fax 52 585 3505
e-mail: biblio@cm.umk.pl

Bydgoszcz, 24.06.2024 r.

OBG-02-1.63.274.2024

WYKAZ PUBLIKACJI

DONARSKA BEATA (ROSADA)

Łączna wartość punktacji KBN/MNiSzW: 1055.000
Wartość wskaźnika IF: 41.083

Cytowania (Web of Science): 103
Index H (Web of Science): 5

Cytowania (Scopus): 105
Index H (Scopus): 6

1.
Rosada Beata*, Zavyalova Olga.
Badanie właściwości antyutleniających związków o działaniu biologicznym.
W: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2017. Materiały konferencyjne - wiosna. Część druga - Poznań.
J. Nyćkowiak, J. Leśny.
Poznań : Młodzi Naukowcy, 2017
s. 87.
2.
Trapkowska Justyna*, Hoppe Kamila*, Kuc Katarzyna*, Rosada Beata*, Zavyalova Olga.
Ceramidy jako substancje biologicznie czynne o znaczeniu kosmetycznym.
W: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce : nauki medyczne i nauki o zdrowiu : Cz. 6.
J. Leśny, J. Nyćkowiak.
Poznań : Młodzi Naukowcy, 2017
s. 138-144.
MNiSW: 5.000

3.

Rosada Beata*, Dąbrowska Dominika*, Zawadzka Patrycja*, Karczewska Jagoda*,
Zavalyova Olga.
Pochodne celulozy : właściwości, otrzymywanie i zastosowanie w kosmetyce i farmacji.
W: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce : nauki medyczne i nauki o zdrowiu :
Cz. 6.
J. Leśny, J. Nyćkowiak.
Poznań : Młodzi Naukowcy, 2017
s. 72-77.
MNiSW: 5.000

4.
Rosada Beata*, Zavalyova Olga.
Znaczenie terapeutyczne związków z ugrupowaniem moczniakowym.
W: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce : nauki medyczne i nauki o zdrowiu :
Cz. 6.
J. Leśny, J. Nyćkowiak.
Poznań : Młodzi Naukowcy, 2017
s. 65-71.
MNiSW: 5.000

5.
Rosada Beata*, Bekier A., Cytarska Joanna, Płaziński W., Zavalyova Olga, Sikora Adam,
Dzitko K., Łączkowski Krzysztof Z..
Benzo[b]thiophene-thiazoles as potent anti-*Toxoplasma gondii* agents : design, synthesis,
tyrosinase/tyrosine hydroxylase inhibitors, molecular docking study, and antioxidant activity.
Eur. J. Med. Chem.
2019 : Vol. 184, Article 111765, s. 1-12.
5.572
MNiSW: 140.000

6.
Biernasiuk A., Kawczyńska Magdalena*, Berecka-Rycerz A., Rosada Beata*, Gumieniczek
A., Malm A., Dzitko K., Łączkowski Krzysztof Z..
Synthesis, antimicrobial activity, and determination of the lipophilicity of ((cyclohex-3-
enylmethylene)hydrazinyl)thiazole derivatives.
Med. Chem. Res.
2019 : Vol. 28, nr 11, s. 2023-2036.
1.783
MNiSW: 40.000

7.
Donarska Beata*, Łączkowski Krzysztof Z..
Recent advances in the development of elastase inhibitors.
Future Med. Chem.
2020 : Vol. 12, nr 20, s. 1809-1813.
3.808
MNiSW: 100.000

8.
Baranowska-Łączkowska A., Banaszak-Piechowska A., Donarska Beata*, Łączkowski

Krzysztof Z..

Towards understanding the interaction of (S)-thalidomide with nucleobases.

Arch. Biochem. Biophys.

2020 : Vol. 693, 108566, s. 1-9.

4.013

MNiSW: 100.000

9.

Donarska Beata*, Świtalska M., Płaziński W., Wietrzyk J., Łączkowski Krzysztof Z..

Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives : rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study.

Bioorg. Chem.

2021 : Vol. 110, s. 1-12, 104819.

5.307

MNiSW: 100.000

10.

Donarska Beata*, Świtalska M., Wietrzyk J., Płaziński W., Mizerska-Kowalska M., Zdzisińska B., Łączkowski Krzysztof Z..

Discovery of new 3,3-diethylazetidine-2,4-dione based thiazoles as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors with broad-spectrum antiproliferative activity.

Int. J. Mol. Sci.

2022 : Vol. 23, nr 14, s. 1-21, 7566.

5.600

MNiSW: 140.000

11.

Mizerska-Kowalska M., Sowa S., Donarska Beata*, Płaziński W., Sławińska-Brych A., Tomasiak A., Ziarkowska A., Łączkowski Krzysztof Z., Zdzisińska B..

New borane-protected derivatives of alpha-aminophosphonous acid as anti-osteosarcoma agents : ADME analysis and molecular modeling, in vitro studies on anti-cancer activities, and NEP inhibition as a possible mechanism of anti-proliferative activity.

Int. J. Mol. Sci.

2022 : Vol. 23, nr 12, s. 1-24, 6717.

5.600

MNiSW: 140.000

12.

Donarska Beata*, Świtalska M., Płaziński W., Wietrzyk J., Łączkowski Krzysztof.

Nowe pochodne ftalamido-tiazoli jako inhibitory elastazy o działaniu przeciwnowotworowym.

W: XV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie Organizowane przez Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Toruń, 20-22 czerwca 2022.

A. Kmiecik, A. Ściagała.

Toruń, 2022

s. 97.

13.

Donarska Beata*, Świtalska M., Płaziński W., Wietrzyk J., Łączkowski Krzysztof.

Projektowanie i synteza nowych pochodnych ftalamido-tiazoli o działaniu przeciwnowotworowym, ocena aktywności biologicznej wobec elastazy, kinazy tyrozynowej EGFR oraz kaspazy 3/7.

W: Materiały Konferencyjne Młodych Naukowców nt.: "Biologia, Chemia i Środowisko - Spojrzenie Młodych Naukowców". Edycja III : streszczenia wystąpień.

Kraków : CREATIVETIME, 2022

s. 24.

14.

Donarska Beata*, Świtalska M., Wietrzyk J., Płaziński W., Mizerska-Kowalska M., Zdzisińska B., Łączkowski Krzysztof Z..

Discovery of new 3,3-diethylazetidone-2,4-dione based thiazoles as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors with broad-spectrum antiproliferative activity.

W: Novel strategies in the development of new therapies, drug substances and drug carriers 2.0.

A. Kutner, G. Brown, E. Kallay.

Basel : MDPI, 2023

s. 243-263.

15.

Donarska Beata*, Świtalska M., Wietrzyk J., Płaziński W., Łączkowski Krzysztof Z..

Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity.

Int. J. Mol. Sci.

2023 : Vol. 24, nr 1, s. 1-17, 110.

4.900

MNiSW: 140.000

16.

Donarska Beata*, Sławińska-Brych A., Mizerska-Kowalska M., Zdzisińska B., Płaziński W., Łączkowski Krzysztof Z..

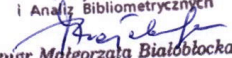
Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors : rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action.

Bioorg. Chem.

2023 : Vol. 138, s. 1-12, 106608.

4.500

MNiSW: 140.000

Kierownik
Sekcji Bibliografii
i Analiz Bibliometrycznych

mgr Małgorzata Białobłocka

17. Mizerska-Kowalska Magdalena, Sowa Sylwia, Zdzisińska Barbara, **Donarska Beata Bettina**, Łączkowski Krzysztof, Płaziński Wojciech, Ester diizopropylowy kwasu [1-(N-p-bromofenyloamino)]-1-(p-nitrofenylo)metyloboranatofosfonowego do zastosowania w leczeniu schorzeń, w których efekt terapeutyczny osiągnany jest poprzez zahamowanie aktywności neutralnej endopeptydazy, Numer patentu/prawa: Pat.244979, Data udzielenia prawa: 16-01-2024, Publikacja patentu/wzoru: [WUP 08-04-2024].