

AKADEMIA MEDYCZNA

W GDAŃSKU

Wydział Farmaceutyczny

JAROSŁAW SŁAWIŃSKI

**SYNTEZY, BADANIA STRUKTURALNE ORAZ POSZUKIWANIA
POTENCJALNYCH ŚRODKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH
I INHIBITORÓW INTEGRAZY HIV-1 W NOWYCH SZEREGACH
POCHODNYCH 4-CHLORO-2-MERKAPTOBENZENOSULFONAMIDU**

ROZPRAWA HABILITACYJNA

GDAŃSK 2005

SPIS TREŚCI

1.	Wprowadzenie	4
2.	Charakterystyka istniejącego stanu wiedzy o sulfonamidach przeciwnowotworowych i HIV-przeciwwirusowych	6
2.1.	Sulfonamidy przeciwnowotworowe zaburzające cykl komórkowy	7
2.1.1.	Sulfonamidy - inhibitory deacetylazy histonowej (HDAC)	9
2.1.2.	Sulfonamidy - inhibitory kinazy 2 cyklinozależnej (CDK2)	10
2.1.3.	Sulfonamidy - inhibitory transferazy farnezylowej (FT)	11
2.1.4.	Sulfonamidy - inhibitory β -tubuliny	12
2.2.	Sulfonamidy przeciwnowotworowe - inhibitory metaloproteinazy (MMP)	13
2.3.	Sulfonamidy o nieznanym mechanizmie działania przeciwnowotworowego	15
2.4.	Sulfonamidy HIV-przeciwwirusowe	22
2.4.1.	Sulfonamidy - antagoniści receptora dla chemokin CCR5	22
2.4.2.	Sulfonamidy - inhibitory odwrotnej transkryptazy HIV-1	23
2.4.3.	Sulfonamidy - inhibitory integrazy HIV-1	26
2.4.4.	Sulfonamidy - inhibitory proteazy HIV-1	29
2.4.5.	Sulfonamidy wiążące się z nukleokapsydem p7 HIV-1	32
3.	Sposoby syntezy pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu w świetle danych z piśmiennictwa	34
4.	Badania własne	46
4.1.	Synteza nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu o spodziewanej aktywności przeciwnowotworowej	46
4.1.1.	Badania nad syntezą nowych 3-amino-6-chloro-1,1-dioksa-1,4,2-benzoditiazyn i ich przemian w pochodne 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu	46
4.1.2.	Badania nad możliwościami wykorzystania soli potasowych <i>N</i> -[4-chloro-2-(R^2 -metylotio)benzenosulfonylo]cyjanamidów do syntezy kolejnych szeregów nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu	51
4.1.2.1.	Syntezy <i>N</i> -podstawionych <i>N'</i> -[4-chloro-2-(R^2 -metylotio)benzenosulfonylo]guanidyn w reakcjach <i>N</i> -(4-chlorobenzenosulfonylo)cyjanamidów z niektórymi <i>N</i> -nukleofilami	51
4.1.2.2.	Syntezy 3-arylidenoamino-1-[4-chloro-2-(R^2 -metylotio)benzenosulfonylo]guanidyn i 1-arylideno-2-[4-chloro-2-(R^2 -metylotio)benzenosulfonylo]-3-metyloaminoguanidyn w reakcjach wybranych pochodnych <i>N</i> -amino- <i>N'</i> -(4-chlorobenzenosulfonylo)guanidyny z aldehydami	56

4.1.2.3.	Syntezy 4-chloro-2-(R ² -metylotio)-N-(1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidów i 1-[4-chloro-2-(R ² -metylotio) benzenosulfonylo]-3-(2-oksobutyl-3-ylidenoimino)guanidyn w reakcjach N-amino-N'-(4-chlorobenzenosulfonylo) guanidyn z niektórymi biacylami lub 3,4-dihydroksy-3-cyklobuteno-1,2-dionem	58
4.1.3.	Syntezy S-podstawionych pochodnych 4-chloro-2-merkaptto-5-metylobenzenosulfonamidu w reakcjach bromków kwasów hydrazonowych z solą dipotasową N-(4-chloro-2-merkaptto-5-metylobenzenosulfonylo)cyjanamidu lub 4-chloro-2-merkaptto-5-metylobenzenosulfonamidem	61
4.2.	Syntezy pochodnych 4-chloro-2-merkaptto-N-(4H-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamidu, potencjalnych inhibitorów integrazy HIV-1	63
4.3.	Omówienie wyników badań aktywności biologicznej	67
4.3.1.	Aktywność przeciwnowotworowa <i>in vitro</i> niektórych spośród otrzymanych w pracy nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu	67
4.3.2.	Wpływ niektórych spośród otrzymanych w pracy nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptto-N-(4H-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamidu na hamowanie funkcji integrazy HIV-1	82
5.	Podsumowanie	86
6.	Piśmiennictwo	88
7.	Publikacje P1 – P8	95

1. Wprowadzenie

Publikowane od 1984 roku prace badawcze Katedry Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Akademii Medycznej w Gdańsku dotyczące budowy oryginalnej dziedziny chemii 1,1-dioksy-1,4,2-benzoditiazyny i ich przemian w pochodne 2-merkaptobenzenosulfonamidu, zaowocowały poznaniem licznych sulfonamidów wykazujących zależną od struktury interesującą aktywność diuretyczną, hipotensyjną, przeciwarrytmiczną, przeciwnowotworową lub skierowaną wobec HIV, a 2-merkaptobenzenosulfonamidy (MBSA) uznane zostały za nową klasę efektywnych inhibitorów integrazy i replikacji wirusa HIV-1 (MBSA). Z kolei opublikowane w latach 1991 i 2001 dwie prace innych zespołów badawczych (Shinogi Research Laboratories, Shinogi & Co., Ltd Koka-cho, Shigo 520-34, Japan; Pfizer Global Research and Development, Groton, CT 06340) wskazały na nowe, alternatywne możliwości syntezy niektórych 3-(dimetyloamino)-1,1-dioksy-1,4,2-benzoditiazyn i 2-(fenylo- lub metylo)-1,1-dioksy-2,3-dihydro-1,4,2-benzoditiazyno-3-tionów.

Przedstawiona do oceny rozprawa habilitacyjna jest podsumowującym omówieniem uzyskanych w latach 1997-2005 wyników badań autora, zmierzających do poszerzenia wiedzy o metodach syntezy pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu oraz zależnościach między ich strukturą chemiczną i aktywnością przeciwnowotworową lub zdolnością hamowania funkcji integrazy HIV-1. Integralną częścią rozprawy są załączone kserokopie opublikowanych 8 prac cząstkowych (**P1-P8**), które zawierają szczegółowe informacje o badaniach strukturalnych (IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ i MS) i rentgenostrukturalnych, a także obliczeń kwantowo-chemicznych otrzymanych nowych związków.

- P1.** Sławiński J., Syntheses and some reactions of 3-amino-6-chloro-7-methyl-1,1-dioxo-1,4,2-benzodithiazine. *Polish J. Chem.*, **75**, 1309-1316 (2001).
- P2.** Sławiński J., Syntheses of *N*-aryl-*N'*-(4-chloro-2-alkylthio-5-methylbenzenesulphonyl) guanidines with potential biological activity. *Polish J. Chem.*, **76**, 937-944 (2002).
- P3.** Sławiński J., Bednarski P., Grünert R., Reszka P., Syntheses of a new series of *N*-amino-*N'*-(benzenesulphonyl)guanidine derivatives with potential antitumor activity. *Polish J. Chem.*, **77**, 53-64 (2003).

- P4.** Sławiński J., Bednarski P., Reszka P., Syntheses and *in vitro* antitumor activity of 3-amino-*N*-(4-chlorobenzenesulfonyl)guanidine derivatives containing *N'*-arylidene moiety. *Polish J. Chem.*, **78**, 369-379 (2004).
- P5.** Sławiński J., Gdaniec M., Synthesis, molecular structure, and *in vitro* antitumor activity of new 4-chloro-2-mercaptobenzenesulfonamide derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **40**, 377 - 389 (2005).
- P6.** Sławiński J., Synthesis of a new series of 4-chloro-2-mercapto-5-methylbenzenesulfonamide derivatives with potential antitumor activity. *Eur. J. Med. Chem.*, **39**, 179-188 (2004).
- P7.** Sławiński J., Syntheses of some new 4-chloro-2-mercapto-*N*-(4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenesulphonamides with potential anticancer or anti-HIV activity. *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **54**, 461-466 (1997).
- P8.** Kuo Ch.L., Assefa H., Kamath S, Brzozowski Z., Sławinski J., Saczewski F., Buolamwini J.K., Neamati N., Application of CoMFA and CoMSIA 3D-QSAR and docking studies in optimization of mercaptobenzenesulfonamides as HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **47**, 385 – 399 (2004).

W dwóch pierwszych rozdziałach rozprawy przedstawiono charakterystykę istniejącego stanu wiedzy o sulfonamidach przeciwnowotworowych i HIV-przeciwwirusowych oraz znane sposoby syntezy pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu. W kolejnych rozdziałach omówiono wyniki badań własnych nad synteza i aktywnością biologiczną nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu, których oczekiwaną aktywność przeciwnowotworową oceniał w testach *in vitro* National Cancer Institute (Bethesda, USA) lub Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry (University of Greifswald, Niemcy), a wpływ na hamowanie funkcji integrazy HIV-1 i dokowanie w enzymie badań Department of Pharamceutical Sciences (University of Southern California, Los Angeles, USA).

*Panu Profesorowi Zdzisławowi Brzozowskiemu
i Panu Profesorowi Franciszkowi Saczewskiemu
składam serdeczne podziękowania*

*za inspirację, życzliwość i twórczą dyskusję oraz stworzenie przychylnych warunków
do realizacji tej pracy.*

2. Charakterystyka istniejącego stanu wiedzy o sulfonamidach przeciwnowotworowych i HIV-przeciwwirusowych

W ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się ponowny wzrost zainteresowania sulfonamidami jako potencjalnymi środkami leczniczymi. Zainteresowanie to nie ogranicza się do kontynuowania poszukiwań sulfonamidów o aktywności przeciwbakteryjnej, hipoglikemicznej czy diuretycznej, lecz dotyczy głównie ich zależnych od struktury innych kierunków działania biologicznego. Pojawiają się liczne doniesienia o sulfonamidach jako selektywnych inhibitorach COX-2, antagonistach receptora bradykininowego B₂, selektywnych antagonistach receptora 5-HT₇, selektywnych antagonistach receptora endotelinowego ET_A, ligandach receptora serotoninowego 5-HT₆ czy też selektywnych inhibitorach bakteryjnej kolagenazy. Jednak liczbowo największy udział w tych doniesieniach stanowią prace dotyczące syntezy i mechanizmów biologicznego działania sulfonamidów o aktywności przeciwnowotworowej lub skierowanej wobec HIV.

Choroby nowotworowe, ze względu na częstość występowania i nikłe możliwości wyleczenia, są jednym z najważniejszych wyzwań współczesnych nauk medycznych i chemicznych. Wśród wielu sposobów zwalczania nowotworów szczególne miejsce przypada chemioterapii. Nie jest to jednak spowodowane dużą skutecznością stosowanych już środków leczniczych, lecz brakiem lepszych sposobów walki z chorobami nowotworowymi. Niedoskonała współczesna chemioterapia uzasadnia celowość kontynuowania poszukiwań nowych, bardziej skutecznych i bezpiecznych cytostatyków.

Niemniej ważnym problemem współczesnej nauki jest walka z chorobą nabytego niedoboru odporności immunologicznej (AIDS) wywołanej wirusem HIV-1, najlepiej poznanym drobnoustrojem w dziejach nauki a wciąż niepokonanym w konfrontacji z naturalnymi siłami odpornościowymi jak i współczesnymi metodami leczenia.

Historię sulfonamidów przeciwnowotworowych zapoczątkowały opublikowane w latach 1988 – 1992 prace dotyczące syntezy oraz aktywności przeciwnowotworowej 4-amino-*N*-(chinoksalin-2-ylo)benzenosulfonamidów [1,2] i *N*-arylosulfonylomoczników [3,4], które to grupy związków wcześniej budziły zainteresowanie jako potencjalne środki bakteriostatyczne, przeciwcukrzycowe lub selektywne i efektywne środki ochrony roślin.

Do najwcześniej poznanych sulfonamidów o aktywności skierowanej wobec HIV-1 zaliczyć można opisane w 1996 roku pochodne 5,5,11-triokso-10*H*-pirolo[1,2-*b*]1,2,5]benzotiadiazepiny (PBTDs) oraz 1-(benzenosulfonylo)-1*H*-pirolo i 1-(benzenosulfonylo)-1*H*-indolu [5,6], chociaż związki te z reguły są omawiane jako analogi diarylosulfonów znanych wcześniej z aktywności wobec HIV-1.

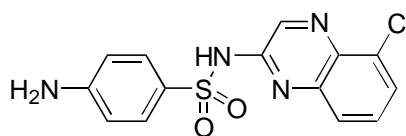
Współczesne poszukiwania potencjalnych leków przeciwnowotworowych i HIV-przeciwwirusowych prowadzone są w oparciu o wyniki testów biologicznych nowych grup związków lub celowo zmodyfikowanych struktur związków znanych już ze wspomnianych kierunków aktywności biologicznej. Strategia tych poszukiwań sprowadza się też do prób atakowania wybranych celów biochemicznych cyklu komórkowego nowotworów lub dobrze poznanego cyklu rozwojowego wirusa HIV-1.

Poznane w ostatnich latach, wzbudzające coraz szersze zainteresowanie liczne sulfonamidy przeciwnowotworowe i HIV-przeciwwirusowe charakteryzują się różnorodnością struktur podstawowych i mechanizmów działania biologicznego. Ich struktury i kierunki działania przeciwnowotworowego [7-9] lub przeciw HIV [8,9] są omówione w pracach przeglądowo-poglądowych opublikowanych w latach 2002-2003 [7-9].

Przedstawiony dalej przegląd sulfonamidów obejmuje związki reprezentujące znane już grupy cytostatyków lub potencjalnych środków HIV-przeciwwirusowych, a także związki, których wysoka aktywność przeciwnowotworowa lub skierowana wobec HIV nie jest jeszcze powiązana z ich wpływem na określone procesy biochemiczne cyklu komórkowego nowotworów lub cyklu rozwojowego wirusa HIV-1.

2.1. Sulfonamidy przeciwnowotworowe zaburzające cykl komórkowy

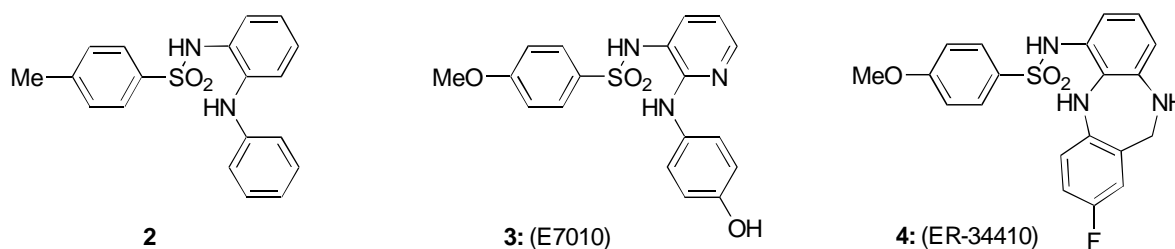
Jednym z najwcześniej poznanych sulfonamidów przeciwnowotworowych był *N*-(5-chlorochinoksalin-2-yl)benzenosulfonamid **1** (CQS) [1], który w stężeniach 10 µg/ml hamuje wzrost wielu linii komórkowych nowotworów ludzkiego raka piersi, płuc, czerniaka i jajnika [1,2,10]. W badaniach nad mechanizmem jego działania stwierdzono jak dotąd, że inkubowanie komórek czerniaka (B16) lub ludzkich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej w obecności CQS hamuje cykl komórkowy w fazie G0/G1 [1,2,10].



1: (CQS)

W kolejnych latach nastąpił wyraźny postęp w poszukiwaniach nowych, aktywnych przeciwnowotworowo sulfonamidów. Badania nad syntezą i aktywnością przeciwnowotworową szeregu pochodnych *N*-(2-anilinofenylo)benzenosulfonamidu, pozwoliły na wyselekcjonowanie struktury wiodącej **2** [11]. Sulfonamid ten w testach *in vitro* hamował wzrost wielu komórek nowotworowych, jednak w badaniach *in vivo* na myszach

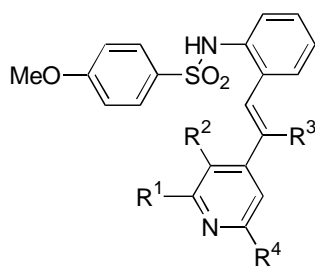
jego aktywność okazała się wyraźnie słabsza [11]. Wiele wysiłku włożono w poszukiwanie aktywnych przeciwnowotworowo kolejnych sulfonamidów, w których podobnie jak w strukturze wiodącej **2**, dwa pierścienie aromatyczne są związane atomem azotu w pozycji *orto* do grupy sulfonamidowej. Wynikiem tych prac było wyselekcjonowanie dwóch analogów wyróżniających się aktywnością przeciwnowotworową *in vivo*, tj. *N*-[2-[(4-hydroksyfenylo)amino]-3-pirydynylo]-4-metoksybenzenosulfonamidu **3** (E7010) [11-14] i



N-(2-fluoro-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*b,e*][1,4]diazepin-6-yl)benzenosulfonamidu **4** (ER-34410), należących do antymitotycznych sulfonamidów drugiej generacji [12,15].

Pierwszy z nich, E7010 w dawkach *p.o.* 25-100 mg/kg hamuje wzrost guza nowotworowego okrężnicy (38) u myszy o 60-99% [11-14] i wykazuje również efektywne działanie w stosunku do linii komórkowych białaczki (P338) opornych na działanie winkrystyny, cis-platyny i 5-fluorouracylu. Stwierdzono również, że E7010 wiąże się z β -tubuliną, zaburzając tym samym fazę M cyklu komórkowego [11-14]. Drugi, ER-34410 wykazał ponad dwukrotnie wyższą w porównaniu z E7010 aktywność *in vitro* w stosunku do wielu linii komórkowych nowotworów ludzkich. Jego skuteczność przeciwnowotworowa w dawce 50 mg/kg *i.v.* była porównywalna z efektem wywołanym przez E7010 po podaniu *p.o.* w dawce 400 mg/kg [15]. Analiza zależności struktura-aktywność (SAR) szeregu antymitotycznych sulfonamidów typu **3** i **4** wskazała na ugrupowanie *p*-metoksybenzenosulfonamidowe jako optymalne dla ich aktywności przeciwnowotworowej [15, 16].

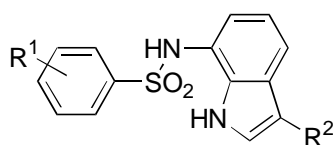
Aktywnością przeciwnowotworową obdarzone są również analogowe 4-metoksybenzenosulfonamidowe pochodne o wzorze ogólnym **5**, w których dwa pierścienie aromatyczne *N*-podstawnika połączone są mostkiem winylenowym. Związek **6** (HMN-154) w badaniach *in vitro* wyróżnił się wysoką aktywnością przeciw komórkom linii KB raka nosowo-gardłowego ($IC_{50} = 0,0026 \mu\text{g/ml}$) i raka okrężnicy (38) ($IC_{50} = 0,003 \mu\text{g/ml}$) [17, 18]. Prawdopodobny mechanizm jego działania polega na wiązaniu się z tymozyną β -10 i aktywatorem transkrypcji – białkiem NF-YB [18].



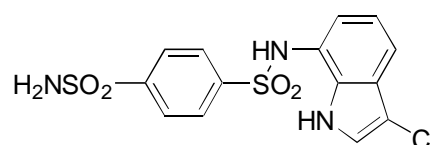
5: $R^1 - R^4 = H, Me$

6: (HMN-154) $R^1 - R^4 = H$

Wiele nadziei wiąże się obecnie z pochodnymi *N*-(7-indoilo)benzenosulfonamidu o ogólnym wzorze **7** [19,20], z których do drugiej fazy badań klinicznych w Europie i Stanach Zjednoczonych wyłoniono Indisulam **8** (E7070) [19,20].



7: $R^1 = MeO, Cl, NO_2, NH_2, CN$
 $R^2 = Cl, CN$



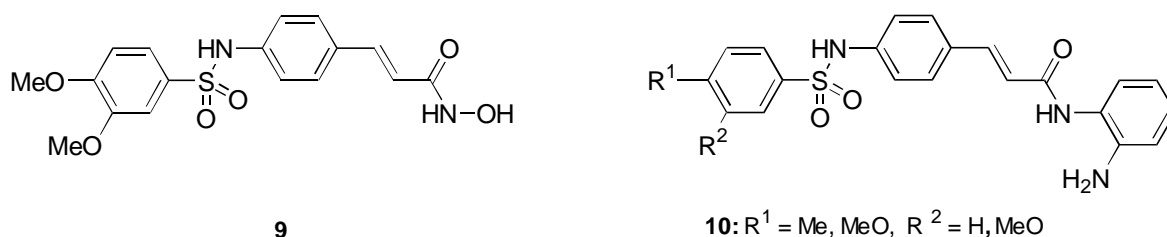
8: (E7070)
 Indisulam

Wykazuje on znaczącą aktywność przeciwnowotworową zarówno w badaniach *in vitro* ($IC_{50} = 0,10 \mu g/ml$) jak też *in vivo* przeciw komórkom raka okrężnicy (HCT-116). Podawany dootrzewnowo lub dożylnie w dawce 25 mg/kg (po 4 dniach) powoduje nie tylko spowolnienie, lecz również znaczną redukcję rozmiaru guzów raka okrężnicy (HCT-116, LS174T, SW620 i HCT-5) [21] oraz płuc (LX-1, PC-9), względnie całkowitą remisję takich guzów jak (HCT-116, LX-1) po 8 dniach podawania. W opinii wielu autorów E7070 uważany jest za najbardziej aktywny przeciwnowotworowo sulfonamid spośród opisanych do 2001 roku [15,21-23]. Wyniki badań jego mechanizmu działania sugerują, że należy on do nowej klasy inhibitorów wielu punktów kontrolnych cyklu komórkowego ze wskazaniem na fazę G1 [15].

2.1.1. Sulfonamidy - inhibitory deacetylazy histonowej (HDAC)

Uważa się obecnie, że związki będące inhibitorami deacetylazy histonowej (HDAC) mogą być potencjalnymi środkami przeciwnowotworowymi [24,25]. Acetylacja/deacetylacja białek histonowych to kluczowy proces w przebudowie chromatyny i funkcjonalnego regulowania transkrypcji genów [24,25]. Enzymy te uczestniczą w procesach regulacyjnych cyklu komórkowego oraz w onkogenezie, stąd też znalezienie skutecznych inhibitorów tych enzymów może stanowić istotny przełom w leczeniu chorób nowotworowych [24,25].

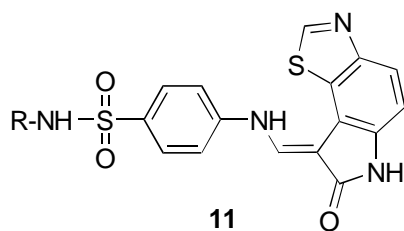
Interesującymi i skutecznymi inhibitorami HDAC, wykazującymi również zdolność hamowania wzrostu niektórych typów nowotworów w badaniach modelowych na myszach okazały się niektóre pochodne kwasu 4-(benzenosulfonamido)cynamonohydroksamowego **9** i amidu kwasu 4-(benzenosulfonamido)cynamonowego **10**. Związki te oraz ich analogi zróżnicowane rodzajem i/lub umiejscowieniem podstawników w pierścieniu ugrupowania benzenosulfonylowego hamowały aktywności HDAC-1 *in vitro* przy niskich stężeniach mikromolowych: $IC_{50} = 0,01 - 0,7 \mu M$ dla związku **9** i jego analogów lub $IC_{50} = 1-4 \mu M$ dla związków typu **10** [24].



Sulfonamidy **9** i **10** wykazały również aktywność cytotoksyczną *in vitro* w stosunku do linii komórkowych nowotworów ludzkich takich jak: T24, HCT-116, SW48, A549, H446, DU145, MDAMB 231 i MCF-7 ($IC_{50} = 0,2 - 9 \mu M$) [24]. Z kolei w modelowych badaniach *in vivo* na przeszczepach guzów nowotworowych, w których związki **9** i **10** podawano *i.p.* w dawkach 40-50mg/kg przez 21 dni, odnotowano zdolność hamowania wzrostu raka płuc (A549) w 57% i raka okrężnicy (HCT-116) w 45-55% [24]. Mechanizm działania zdaniem autorów, polega na hamowaniu cyklu komórkowego w fazie G1 [24].

2.1.2. Sulfonamidy - inhibitory kinazy 2 cyklinozależnej (CDK2)

Kinazy są kluczowymi regulatorami podziału komórkowego, a ich inhibitory mogą być wykorzystane jako leki przeciwnowotworowe. Wśród poznanych dotąd sulfonamidów efektywnymi inhibitorami kinazy 2 cyklinozależnej (CDK2) okazały się pochodne 4-{{(7-okso-16,17-dihydro-8*H*-[1,3]tiazolo[5,4-*e*]indol-8-ylideno)metylo}amino}benzenosulfonamidu o ogólnym wzorze **11**. Sulfonamidy te, wykazują duże powinowactwo do CDK2 ($IC_{50} = 5,6 - 9,7 \text{ nM}$). W badaniach *in vitro* na komórkach nowotworowych (HFF, RKO, HT29, SW620, MDAMB468) wykazały również wysoką zdolność hamowania ich wzrostu ($IC_{50} = 0,65 - 13 \mu M$) [26].



11a: R = Me,

11b: R = Bz

11c: R = 2-pirydył

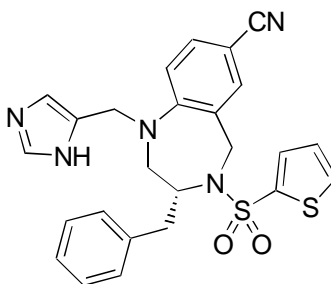
Sulfonamid **11c**, w którym podstawnik R jest 2-pirydylem, blokuje cykl komórkowy w fazie G1/S oraz chroni zdrowe komórki przed cytotoksycznym efektem wywołanym chemioterapią [26,27]

2.1.3. Sulfonamidy - inhibitory transferazy farnezyłowej (FT)

Wśród onkogenów odpowiedzialnych za procesy nowotworowe u ludzi, onkogeny *Ras* stanowią jeden z bardziej interesujących celów chemioterapeutycznych. Zmutowane geny *Ras* znaleziono w około 30% populacji ludzkich nowotworów, szczególnie często występują one w nowotworach trzustki, okrężnicy, odbytu, płuc i białaczki. Białko Ras, peptyd o masie 21 kDa zbudowany z nukleotydów guaninowych, jest odpowiedzialny za stymulację czynników wzrostu nowotworu, gdy ulokowany jest na wewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej [28,29]. W następstwie wspomnianych mutacji białko Ras jest w stanie ciągłej „nadczynności” i powoduje kaskadę niekontrolowanej proliferacji.

Biochemiczny proces farnezylowania grupy SH cysteiny w pozycji C-terminalnej fragmentu CAAX (C-cysteina, A- alifatyczny aminokwas, X- dowolny aminokwas) – wysoce konserwatywnej sekwencji białka Ras, katalizowany przez transferazę farnezyłową (FT) prowadzi do zakotwiczenia zmodyfikowanego białka Ras do błony komórkowej i podjęcia przez nie funkcji aktywujących wzrost komórek [28,29]. Uważa się, że inhibitory FT są efektywnymi czynnikami blokującymi funkcje aktywacyjne białka Ras, będąc jednocześnie skutecznymi *in vitro* (kolonie komórkowe) oraz *in vivo* (zwierzęce modele nowotworów) związkami przeciwnowotworowymi [28,29].

Przedstawiona poniżej pochodna 4-(2-tiofenosulfonylo)-1,4-benzodiazepiny **12** (BMS-214662), reprezentująca grupę sulfonamidów z endocyklicznym atomem azotu, jest skutecznym inhibitorem procesu farnezylowania mutantów H-Ras ($IC_{50} = 0.7$ nM) i K-Ras ($IC_{50} = 19$ nM).



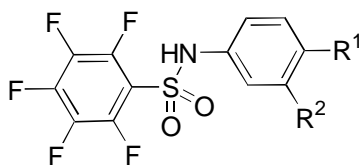
12: (BMS-214662)

Związek ten a w testach *in vivo* wykazał wysoką aktywność w stosunku do ludzkich nowotworów raka okrężnicy (HCT116, HT29), raka płuc (Calu-1), pęcherza (EJ-1) i trzustki (MiaPaCa-2) [30,31]. Podawany doustnie lub dootrzewnowo, w dawkach równych lub mniejszych od tolerowanych, powodował całkowity zanik przeszczepionych guzów nowotworowych. Sulfonamid ten jest obecnie w I fazie badań klinicznych i jest podawany doustnie lub dożylnie pacjentom z chorobą nowotworową [32].

2.1.4. Sulfonamidy - inhibitory β -tubuliny

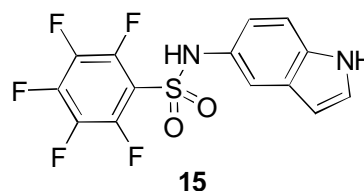
Leki antymitotyczne są efektywnymi środkami w leczeniu wielu typów nowotworów. Przykładami mogą być takie związki pochodzenia roślinnego jak winkrystyna, winblastyna, kolchicyna lub taksol, które wiążą się z tubuliną [33].

Nową klasą związków będących inhibitorami polimeryzacji tubuliny są *N*-(arylo)-pentafluorobenzenosulfonamidy typu **13-16**. Związki te silnie hamują wzrost różnorodnych typów nowotworów, w tym linii komórkowych opornych (MDR), przy nanomolowych wartościach GI_{50} w zakresie 11- 165 nM [34].

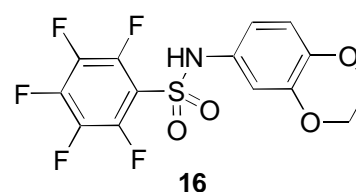


13: $R^1 = \text{Me, OMe, NMe}_2$; $R^2 = \text{H, Me}$

14: (T138067) $R^1 = \text{OMe}$; $R^2 = \text{F}$



15



16

Szczególnie obiecującym jest *N*-(3-fluoro-4-metoksyfenilo)-2,3,4,5,6-pentafluorobenzenosulfonamid **14** (T138067), który znajduje się aktualnie w II fazie badań klinicznych [33-35].

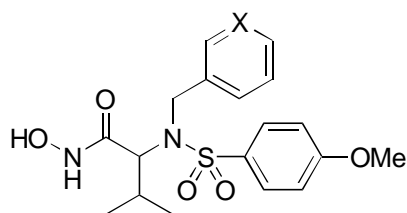
Stwierdzono, że T138067 łączy się kowalencyjnie z cysteiną-239 izoformy 1, 2 i 4 β -tubuliny w wyniku nukleofilowego podstawienia atomu fluoru w pozycji 4 pierścienia pentafluorobenzenosulfonamidowego przez grupę SH cysteiny. Kowalencyjna modyfikacja β -tubuliny hamuje polimeryzację heterodimerów α,β -tubulin w mikrotubulach, co w konsekwencji powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M i wywołuje programowaną śmierć komórek - apoptozę [33].

2.2. Sulfonamidy przeciwnowotworowe - inhibitory metaloproteiny (MMP)

Metaloproteiny (MMP) należą do rodziny endopeptydaz zawierających cynk. Ich działanie polega na degradacji i przebudowie białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Enzymy te towarzyszą wielu różnym stanom patologicznym, w tym również odpowiedzialnym za angiogenezę, wzrost i rozprzestrzenianie się guzów nowotworowych [36]. Zauważono na przykład znaczne podwyższenie stężenia MMP w obrębie tkanek otaczających nowotwory inwazyjne – stromelizynę-1 (MMP-3) wykryto w sąsiedztwie czerniaków i przerzutów raka piersi. Ostatnie lata przynoszą liczne doniesienia o syntezie inhibitorów MMP jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych [36].

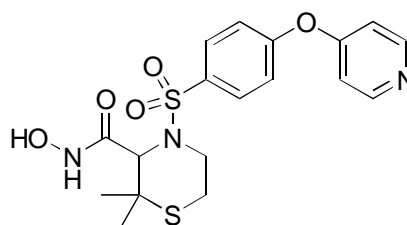
Skuteczne inhibitory MMP powinny posiadać zdolność koordynacyjnego wiązania cynku i tworzenia wiązań wodorowych z resztami kwasu glutaminowego i alaniny enzymu. Za wiązanie to odpowiedzialne są najczęściej ugrupowania *N*-hydroksyacetylowe, grupy karboksylowe, merkaptanowe lub sulfodiiminowe [36], niezbędne jest również oddziaływanie pozostałych fragmentów struktury z innymi rejonami wiążącymi enzymu, jak na przykład kieszeniami S1, S1', S2' i S3'. Takimi oddziaływaniami charakteryzują się między innymi sulfonamidowe pochodne kwasów hydroksamowych lub karboksylowych, stanowiąc ważną grupę inhibitorów wielu typów metaloproteinaz [37,38].

W badaniach klinicznych znajdują się obecnie trzy sulfonamidy o wzorach: **17** (CGS 27023A), **18** (CGS 25966) oraz **19** (Agouron, AG-3340). Związek z podstawnikiem *N*-(3-pirydylometylowym) **17** jest inhibitorem MMP o szerokim spektrum działania, badanym klinicznie jako potencjalny środek przeciwnowotworowy [39]. Jego analog *N*-(benzylowy) **18** oraz kwas 2,2-dimetylo-4-[4-(4-pirydyloksy)fenylosulfonylo]tiomorfolino-3-hydroksamowy (Agouron) **19**, badane są klinicznie jako związki zapobiegające przerzutom nowotworów [38,40].



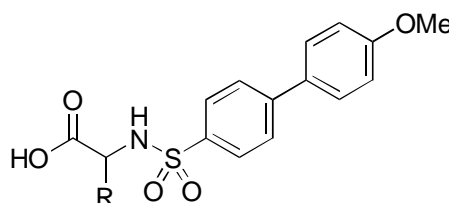
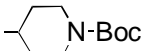
17: X = N (CGS 27023A)

18: X = CH (CGS 25966)



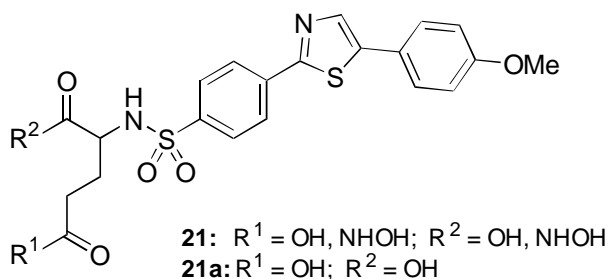
19: Agouron (AG-3340)

Niektóre inne doniesienia o selektywnych inhibitorach MMP dotyczą bifenylosulfonamidowych pochodnych kwasów karboksylowych o ogólnym wzorze **20**, które wykazują zdolność inhibicji MMP-2,-3,-9 i -13 przy niskich nanomolowych wartościach IC_{50} [41-43].

20: R = *i*-Pr, propargil, Bz, 

Zdolność selektywnego blokowania metaloproteinaz ma istotne znaczenie ze względu na efektywność przeciwnowotworową inhibitora. Niektóre z MMP, jak na przykład żelatynazy A i B (MMP-2 i -9) nazywane też kolagenazami typu IV, są ściśle związane z procesem rozwoju nowotworu [44,45]. Należy podkreślić, że doświadczalne myszy pozbawione MMP-2 i -9 wykazują dużą odporność zarówno na wzrost jak i przerzuty nowotworów [46,47]. Selektywne blokowanie MMP możliwe jest poprzez różnicowanie i właściwy dobór podstawnika, którym jest arylo- lub diarylosulfonyłowy fragment cząsteczki oddziałujący z kieszenią $S1'$ enzymu [48]. MMP dzielą się, bowiem na dwie klasy strukturalne, pierwszą o względnie głębokiej kieszeni $S1'$ (MMP-2, -3, -8, -9 i -13) oraz drugą z płytką kieszenią $S1'$ (MMP-1 i -7) [49,50].

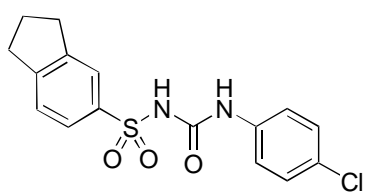
Najnowsze prace donoszą o syntezie szeregu pochodnych 4-[5-(4-metoksyfenyl)-tiazol-2-yl]benzenosulfonamidów o ogólnym wzorze **21**, z których związek **21a** wykazywał 60-krotnie wyższą aktywność jako inhibitor MMP-2 i -9 w porównaniu z referencyjnym związkiem **17** (CGS 27023A) [51].



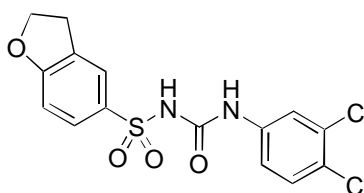
Związek ten, dokowany w modelu receptora MMP-9A16 [52] wykazywał zdolność tworzenia wiązań wodorowych z Leu181, Ala182, Glu219 i Pro238 jak również koordynacyjnego wiązania jonu Zn(II) atomami tlenami grupy karboksylowej w pozycji C2 fragmentu kwasu glutaminowego, podczas gdy aromatyczny fragment 5-(4-metoksyfenylo)tiazolowy zajmował kieszeń S1`receptora [51].

2.3. Sulfonamidy o nieznanym mechanizmie działania przeciwnowotworowego

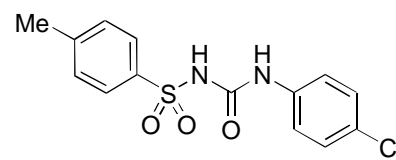
Jednymi z pierwszych, wyselekcjonowanych do badań klinicznych sulfonamidów przeciwnowotworowych był *N*-(5-indanylosulfonylo)-*N'*-(4-chlorofenylo)mocznik **22** (LY 186641) i *N*-(2,3-dihydro-1-benzofurano-5-sulfonylo)-*N'*-(3,4-dichlorofenylo)mocznik **23** (LY 295501) [3,4,53]. Związki te, jak też *N*-(*p*-tolilosulfonylo)-*N'*-(4-chlorofenylo)mocznik **24** wykazały wysoką aktywność w badaniach na wielu szeregach międzygatunkowych przeszczepów jednorodnych guzów nowotworowych u myszy [3,4,15,53-57]. Nie został jak dotąd całkowicie poznany mechanizm działania wspomnianych sulfonylomoczników, jednak wydaje się, że ich aktywność nie jest związana z wpływem na DNA, RNA oraz syntezę białek [3,4,15,53-57].



22: Sulofenur (LY 186641)



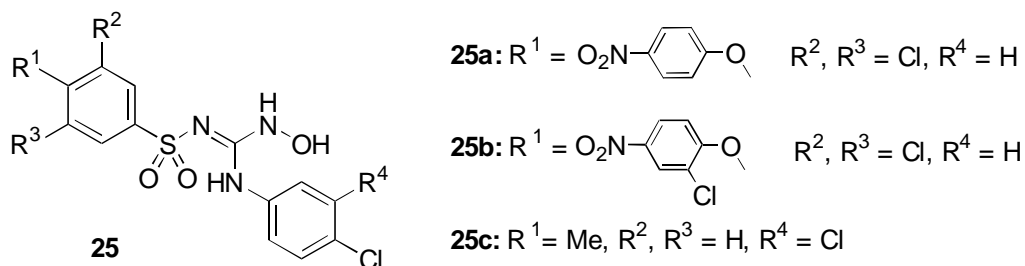
23: (LY 295501)



24

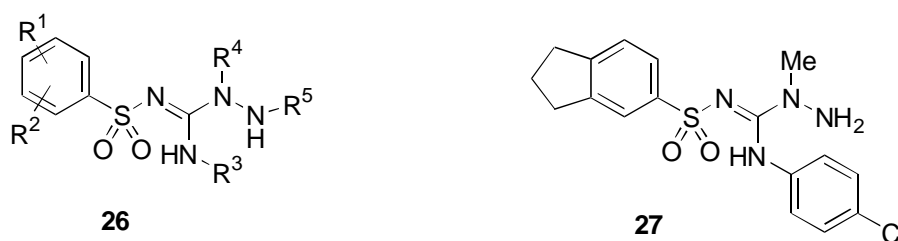
Obiecujące wyniki I i II fazy badań klinicznych tej grupy związków skłoniły badaczy chińskich do syntezy ich analogów. Zastąpiono ugrupowanie mocznikowe bioizosterycznym ugrupowaniem hydroksyguanidynowym. Otrzymane pochodne *N*-hydroksy-*N'*-(4-chlorofenylo)-*N''*- R^1, R^2, R^3 -(benzenosulfonylo)guanidyny o ogólnym wzorze **25** w testach *in vitro* wykazały zróżnicowaną aktywność przeciwnowotworową. Wysoką zdolnością

hamowania wzrostu komórek raka okrężnicy COLO 205 ($IC_{50} = 6-12 \mu\text{g/ml}$) i raka KB ($IC_{50} = 7-12 \mu\text{g/ml}$) wyróżniały się związki **25a-c** [54].



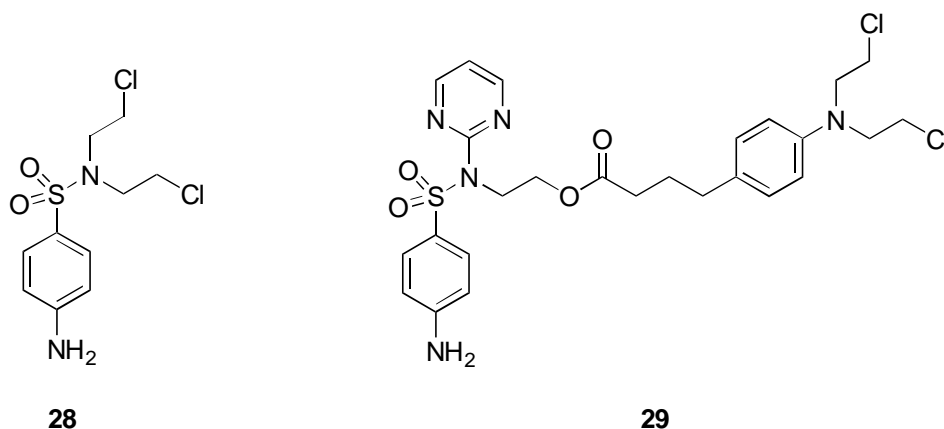
Związek **25b** w badaniu modelowym mysiego czerniaka (K1735/M2) hamował wzrost guza o 70,7% po podaniu *p.o.* 300 mg/kg w dwóch cyklach pięciodniowych [54].

Kolejne modyfikacje struktury wspomnianych *N,N*-diarylosulfonylomoczników, polegające na zastąpieniu ugrupowania mocznikowego ugrupowaniem aminoguanidynowym, zaowocowały uzyskaniem szeregu 1-amino-2-benzenosulfonyloguanidyn o ogólnym wzorze **26**, z których aktywnością przeciwnowotworową wyróżniała się 1-amino-1-metylo-3-(4-chlorofenylo)-2-(5-indanylosulfonylo)guanidyna **27**. Podawana myszom z nowotworem jelita grubego w dawce *p.o.* 500 mg/kg przedłużała życie o 154% [58].



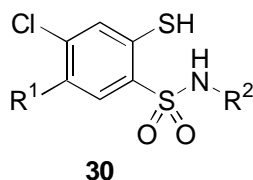
Inną ze strategii poszukiwań nowych związków przeciwnowotworowych jest synteza sulfonamidowych pochodnych znanych cytostatyków, oparta na wcześniejszych spostrzeżeniach, że sulfanilamidy takie jak sulfanilamid, sulfadiazyna lub sulfapirazyne [59,60] selektywnie kumulują się w niektórych mięsach. Przykładami mogą być sulfanilamidowe pochodne iperytu azotowego **28** lub połączenie sulfadiazyny i chlorambucilu **29**. Toksyczność ostra 4-amino-*N,N*-di(2-chloroetylo)benzenosulfonamidu **28** jest ponad 250-krotnie niższa w porównaniu z iperytem azotowym, przy jednoczesnej zdolności hamowania wzrostu mięsaka (S-180) w dawce 30-60 mg/kg o 38 - 47% [61]. Niską toksyczność i wysoką

aktywność przeciwnowotworową *in vivo* z indeksem terapeutycznym około 50, odnotowano też dla związku **29** [61].

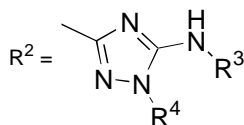


Kilka oryginalnych szeregów sulfonamidów o interesującej aktywności przeciwnowotworowej udało się wyłonić w cyklu badań zespołu pracowników Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych AMG nad syntezą i zależnościami struktura-aktywność biologiczna związków z farmakoforowym ugrupowaniem 4-chloro-2-tiobenzenosulfonamidowym [62-78], których aktywność oceniał National Cancer Institute (Bethesda, USA) w testach *in vitro* na 50-60 liniach komórkowych pochodzących z 9 różnych typów nowotworów ludzkich. Na zwrócenie uwagi wydają się zasługiwać przedstawione dalej szeregi pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu A-C [62-71] i 1,1-dioksyo-1,4,2-benzoditiazyny D-F [72-77]:

A. Pochodne 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu o ogólnym wzorze **30**, w których sulfonamidowy atom azotu jest związany z jedno- lub dwupierścieniowym układem heterocyklicznym takim jak 5-amino-1*H*-1,2,4-triazol **30a** [62,63], 4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazol-5-on **30b** [64], 1,4,5,6-tetrahydropirydyna **30c** [65], benzimidazol **30d** [66], 1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pirydyna **30e** [67] lub 3,4-dihydrochinazolina **30f** [68]



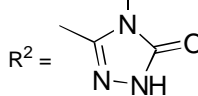
R¹ = Me, 4-Cl-PhNHCO



R³ = H, 4-(Cl lub Me)-Ph, 2-naftyl
R⁴ = H, Ph, 2-pirydył, 2-chinoksalinył

30a

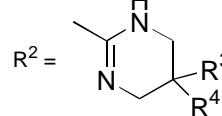
R¹ = Me



R³ = 4-Cl-Ph

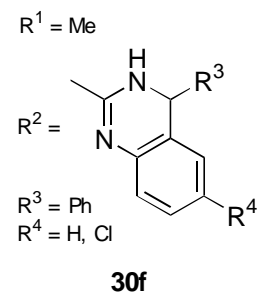
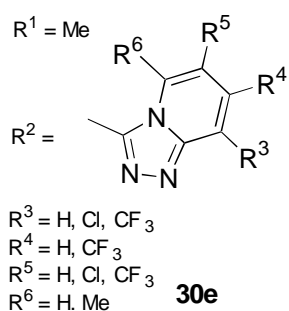
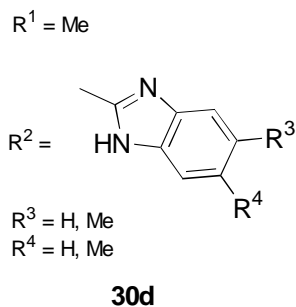
30b

R¹ = Me

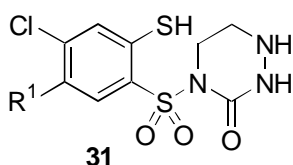


R³ = H, Me
R⁴ = H, Me

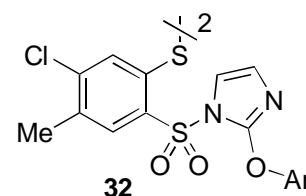
30c



B. Pochodne 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu z endocyklicznym sulfonamidowym atomem azotu wbudowanym w pierścień perhydro-1,2,4-triazyn-3-onu typu **31** [69] lub imidazolu o wzorze ogólnym **32** [70]

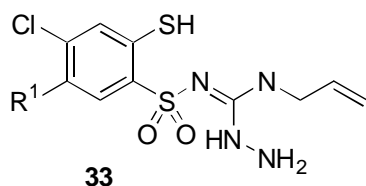


$R^1 = \text{Me, PhNHCO, 4-Cl-PhNHCO, 4-Me-PhNHCO}$



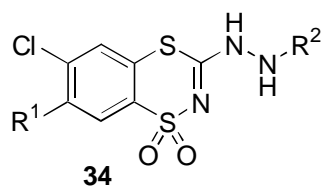
$\text{Ar} = \text{Ph, 3-Cl-Ph}$

C. Pochodne 1-allilo-3-amino-2-(4-chloro-2-merkaptobenzosulfonylo)guanidyny o wzorze ogólnym **33** [71]



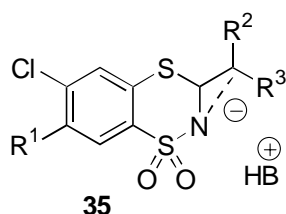
$R^1 = \text{Me, COOMe, PhNHCO, 4-(Cl lub F)-PhNHCO}$

D. Pochodne (6-chloro-1,1-dioekso-1,4,2-benzoditiazyn-3-ylo)hydrazyny o wzorze ogólnym **34** [72]

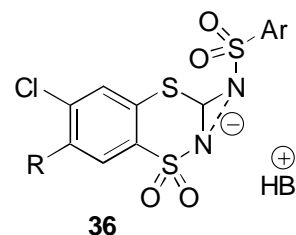
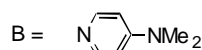


$R^1 = \text{Me, COOMe}$
 $R^2 = \text{Me, PhCO, 2-imidazolidynyl}$
lub 3-pirydynokarbonyl

E. Pochodne (6-chloro-1,1-dioekso-1,4,2-benzoditiazyn-3-ylo)metanidów 4-dimetyloaminopirydyniowych [73] i *N*-(6-chloro-7-metylo-1,1-dioekso-1,4,2-benzoditiazyn-3-ylo)arylosulfonamidów aminiowych o wzorach ogólnych **35** i **36** [74]

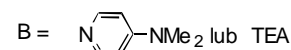


R¹ = H, Me, aryl- lub heteroarylokarbamoil
R² = CN, 4-NO₂-PhCO
R³ = PhCO, 4-Cl-PhCO lub COOEt

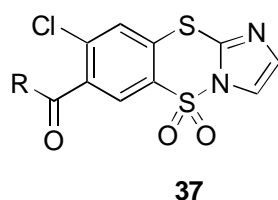


R = H, Me, PhNHCO

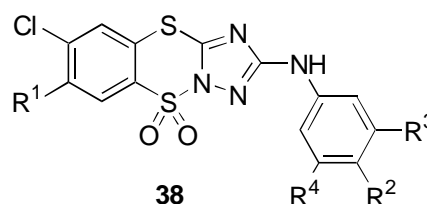
Ar = Ph, podstawiony fenyl lub 2,5-dichlorotienyl



F. Pochodne 5,5-dioekso-8-chloroimidazo[1,2-*b*][1,4,2]benzoditiazyny [75,76] i 2-fenylamino-5,5-dioekso[1,2,4]triazolo[2,3-*b*][1,4,2]benzoditiazyny [77] o wzorach ogólnych **37** i **38**

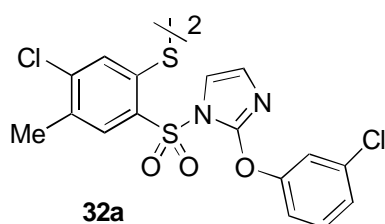


R = Me, CN, COOMe, arylokarbamoil, heteroarylokarbamoil lub heteroaryl

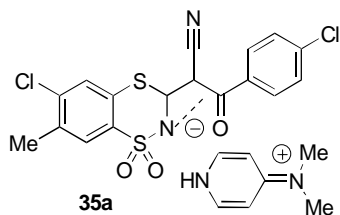


R¹ = Me, COOMe lub CN
R² = H, Me lub Cl
R³ = H, Me lub MeO
R⁴ = H, Me lub MeO

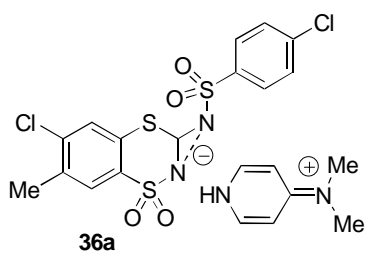
Porównując aktywność przedstawicieli poszczególnych grup związków z farmakoforowym ugrupowaniem 4-chloro-2-tiobenzenosulfonamidowym w przedziałach niskich stężeń molowych hamujących wzrost komórek nowotworowych w 50% (GI₅₀ < 3,0 μM) i 100% (TGI < 10 μM) można uznać, że ich struktury wiodące reprezentują przedstawione niżej sulfonamidy **32a**, **35a**, **36a**, **37a-c** i **38a-b**.



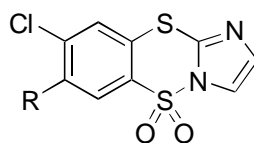
Nowotwory	Linie komórkowe	GI ₅₀ [μM]	TGI [μM]
białaczki	CCRF-CEM	2,8	7,7
	HL-60(TB)	1,6	7,6
okężnicy	COLO-205	1,6	2,3
piersi	MCF 7	2,8	8,6
	NCI/ADR-RES	1,7	5,5
	HS 578T	1,9	7,4



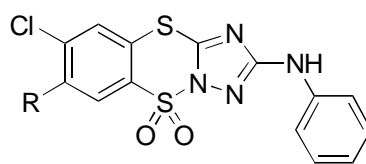
Nowotwory	Linie komórkowe	GI ₅₀ [μM]	TGI [μM]
czerniak	UACC-257	< 0,01	< 0,01
płuc	HOP-62	< 0,01	< 0,01



Nowotwór	Linia komórkowa	GI ₅₀ [μM]	TGI [μM]
białaczka	SR	< 0,01	3,16



Nr zw.	R	Aktywność przeciwnowotworowa			
		Nowotwory	Linie komórkowe	GI ₅₀ [μM]	TGI [μM]
37a		białaczki	HL-60(TB)	< 0,01	< 0,01
		mózgu	SF-539	1,82	4,89
37b		płuc	HOP-62	1,66	3,80
		piersi	MCF 7	1,73	3,39
		jajnika	OVCAR-3	1,77	3,47
37c		nerki	CAKI-1	0,26	0,82

**38a-b**

Nr zw.	R	Aktywność przeciwnowotworowa			
		Nowotwory	Linie komórkowe	GI ₅₀ [μM]	TGI [μM]
38a	CN	białaczki	SR	0,02	0,12
		płuc	HOP-92	0,35	5,75
		jajnika	OVCAR-3	1,12	2,45
38b	COOMe	jajnika	IGROVI	0,07	1,51

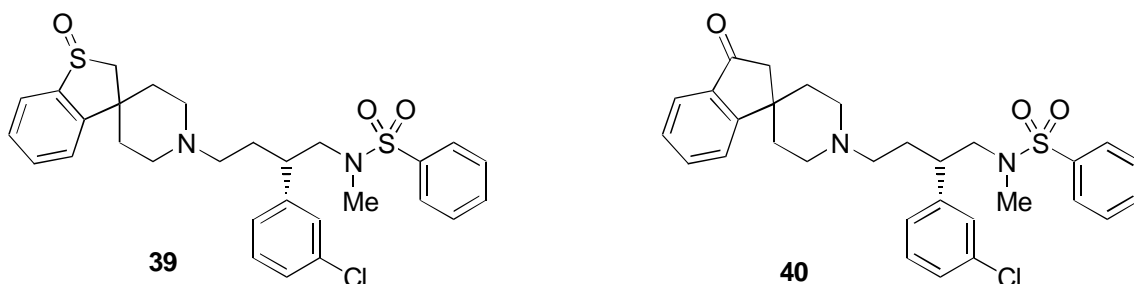
2.4. Sulfonamidy HIV-przeciwwirusowe

Przedstawiony przegląd obejmuje sulfonamidy będące inhibitorami kolejnych etapów cyklu rozwojowego wirusa HIV-1, począwszy od procesu zakażenia komórki gospodarza poprzez syntezę komplementarnego dwuniciowego DNA i jego integrację z genomem gospodarza aż po rozszczepienie białek prekursorowych w procesie dojrzewania i uwalniania wirionów potomnych.

2.4.1. Sulfonamidy - antagoniści receptora dla chemokin CCR5

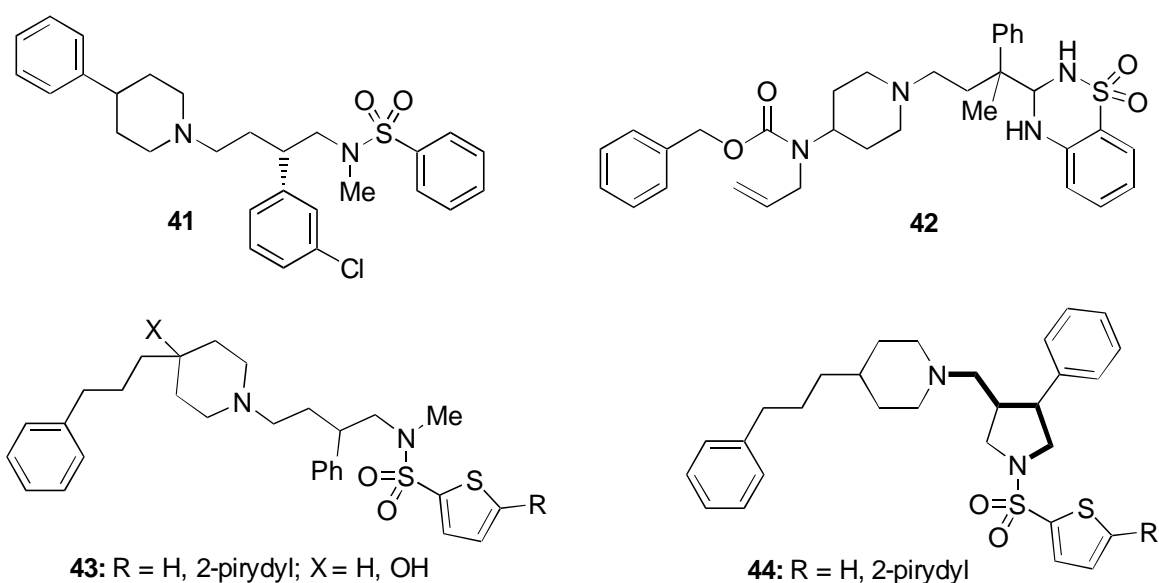
Wirus HIV, wykorzystując cząsteczkę CD4 występującą głównie na limfocytach T pomocniczych oraz koreceptory należące do receptorów dla chemokin, zakaża różne populacje limfocytów, makrofagów i komórek dendrytycznych. Wirusowe białko otoczkowe gp120 wykazujące wprawdzie niewielką homologię strukturalną z chemokinami, rozpoznaje jednak i wiąże receptory dla chemokin np. CCR5 i CXCR4. Połączenie gp120 i CD4 powoduje odsłanianie pętli V3, wysoce zmiennego fragmentu (na skutek licznych mutacji) gp120, które wiąże jeden z wymienionych koreceptorów. To z kolei powoduje zmiany strukturalne glikoproteiny gp41 (odsłonięcie końca bogatego w aminokwasy hydrofobowe), która to glikoproteina zakotwicza wirusa w błonie komórkowej i umożliwia jego endocytozę [79]. Zainteresowanie rolą receptora CCR5 w zapobieganiu zakażeniom wirusem HIV-1 datuje się od czasu, kiedy w 1995 roku zidentyfikowano chemokiny MIP-1 α , MIP-1 β i RANTES jako czynniki powstrzymujące endocytozę szczepów M-tropowych wirusa HIV-1 [80]. Chemokiny te, są fizjologicznymi ligandami receptora CCR5, który w następstwie uznany został za specyficzny dla zakażeń makrofago-tropowymi szczepami wirusa HIV-1 [81].

Finke i współpracownicy przeprowadzili syntezy szeregu 2-arylo-1-(*N*-metylo-*N*-fenylosulfonyloamino)-4-(piperdyn-1-ylo)butanów typu **39** – **41** i stwierdzili, że niektóre z nich są silnymi antagonistami receptora CCR5 [82-84]. Stwierdzili również, że aktywności tej są pozbawione analogi strukturalne, w których ugrupowanie sulfonamidowe zastąpiono karboksamidowym [82]. Jako struktury wiodące wskazali związki **39** i **40**



wyróżniające się selektywnym nanomolowym powinowactwem do receptora CCR5 (**39**: $IC_{50} = 10$ nM [83]; **40**: $IC_{50} = 5$ nM [84]), bez tendencji do wiązania spokrewnionych receptorów dla chemokin CCR1, CCR2, CCR3 i CCR4 (**39**: $IC_{50} > 10\ 000$ nM) [83].

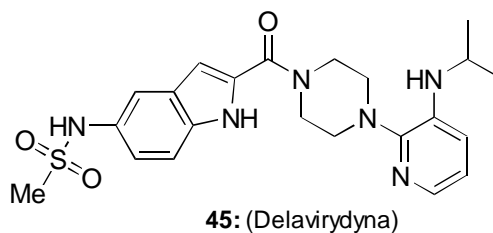
Wykazano ponadto, że niektóre większe modyfikacje struktury podstawników podstawowego ugrupowania 1-sulfonyloamino-4-(1-piperydinylo)butanowego prowadzą również do wysokoaktywnych i selektywnych antagonistów CCR5, których przykładami mogą być związki **41** ($IC_{50} = 30$ nM) [83] i **42** ($IC_{50} = 18$ nM) [85] oraz **43** i **44** ($IC_{50} = 2$ - 20 nM) [86].



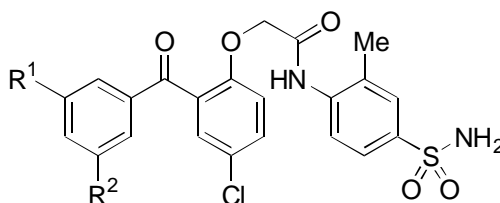
Konfrontacja przedstawionych struktur wiodących nowej grupy sulfonamidowych antagonistów CCR5 z ich zdolnością zapobiegania infekcjom wirusem HIV-1 nie była jak dotąd przedmiotem prac opublikowanych.

2.4.2. Sulfonamidy - inhibitory odwrotnej transkryptazy HIV-1

Nienulkeozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy HIV-1 (NNRTI) hamują infekcje HIV poprzez wiązanie się z enzymem w miejscu allosterycznym nie będącym receptorem dla naturalnych substratów odwrotnej transkryptazy (RT) [87,88]. Miejsce to jest oddalone o około 10 Å od miejsca wiążącego substraty RT, jednak są one funkcjonalnie powiązane [87,88]. Spośród klinicznie stosowanych sulfonamidowych inhibitorów RT HIV-1 wymienić można jak dotąd, tylko 2-((4-[3-izopropylamino]pirydyn-2-ylo)piperazyn-1-ylo)karbonylo)-1H-indolo-5-metanosulfonamid **45** [87,88]

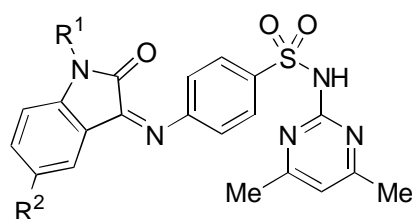


Duże nadzieje wiąże się z pochodnymi *N*-[4-aminosulfonylo]-2-metylofenylo]-2-[4-chloro-2-(benzoilo)fenoksy]acetamidu o ogólnym wzorze **46**, których wysoka aktywność skierowana jest przeciw dzikim typom wirusa HIV-1 ($IC_{50} \leq 2$ nM) oraz 16 mutantom ($IC_{50} < 10$ nM). Są one szczególnie aktywne wobec szczepów Y181C i K103N NNTRI-opornych. Zdaniem autorów, aktywność ta i korzystne wyniki badań farmakokinetycznych świadczą o tym, że najaktywniejszy z nich **46a** (GW4511) posiada atrybuty nowego kandydata na lek z grupy NNTRI [89].



46: $R^1, R^2 = H, F, Cl, CN, CF_3$
46a: $R^1 = CF_3; R^2 = F$ (GW4511)

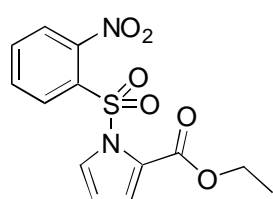
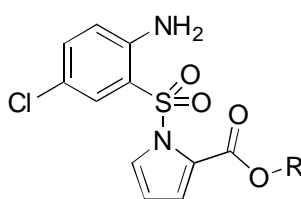
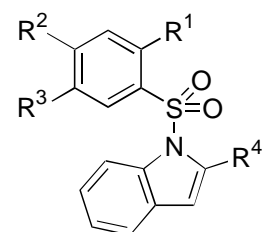
Aktywność przeciw-HIV-1 (IIIB) i HIV-2 (ROD) wykazują również pochodne 4-[(1,2-dihydro-2-okso-3*H*-indol-3-ylideno)amino]-*N*-(4,6-dimetylo-2-pirymidinylo)benzenosulfonamidu o ogólnym wzorze **47**, z których najaktywniejszym okazał się związek **47a**: $EC_{50} = 8.0$ $\mu\text{g/ml}$ HIV-1 (IIIB) i 90.9 $\mu\text{g/ml}$ HIV-2 (ROD) [90].



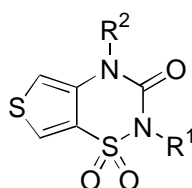
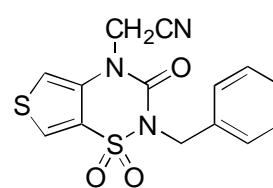
47: $R^1 = H, Ac; R^2 = H, Cl, Br, Me$
47a: $R^1 = COCH_3; R^2 = H$

Inhibitory odwrotnej transkryptazy i replikacji wirusa HIV-1, Artico i współpracownicy poznali w otrzymanych szeregach nowego typu diarylosulfonów **48** i **49** [5,6,91], w których atom azotu ugrupowania sulfonamidowego jest wbudowany w pierścień

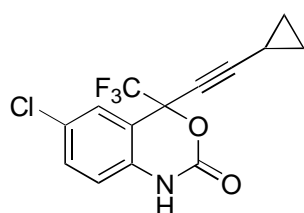
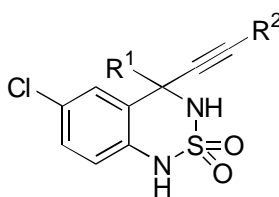
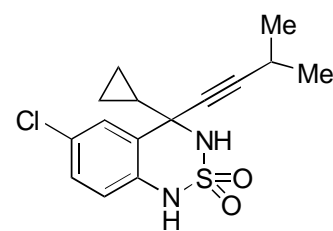
pirolu lub indolu. Związkami wyróżniającymi się aktywnością przeciw-HIV-1 i/lub indeksem terapeutycznym okazały się: **48a** ($IC_{50} = 15,08 \mu M$, $TI_{50} > 20$) [5,91], **48b-d** ($IC_{50} = 0,14 - 0,22 \mu M$, $TI_{50} > 500-2140$) [5] i **49** ($IC_{50} = 1 - 15 \mu M$) [6].

**48a****48b-d:** R = Me, Et, i-Pr**49:** R¹ = Cl, NO₂, NH₂
R² = H, Cl
R³ = H, Cl, NO₂
R⁴ = H, COOEt

Większe nadzieje wiąże się z kolejną grupą sulfonamidów, nienukleozydowych inhibitorów RT HIV-1. Są to pochodne 1,1,3-triokso-2*H*,4*H*-tieno[3,4-*e*][1,2,4]tiadiazyny (TTDs) o wzorze ogólnym **50** [92,93], reprezentujące drugą generację NNRTI [94]. Aktywnością oraz działaniem na dzikie typy i NNRTI-oporne szczepy HIV-1 wyróżniał się związek **50a** ($IC_{50} = 0,18 - 60 \mu M$) [92,93].

**50:** R¹ = Bz, podst. Bz; R² = alkil**50a:** QM96521

Podobne nadzieje budzą pochodne 2,2-diookso-1,3-*H*-2,1,3-benzotiadiazyny o ogólnym wzorze **51** [95], które są sulfonamidowym analogami Efavirenu. Względnie najwyższą aktywność przeciw-HIV-1 wykazywał związek **51a** ($IC_{90} = 47 \text{ nM}$) [95].

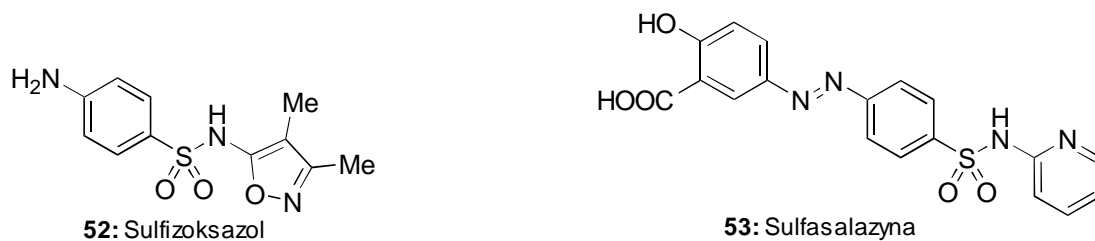
Efavirenz
($IC_{90}=1,7 \text{ nM}$)**51:** R¹, R² = CF₃, i-Pr, cyklo-Pr**51a:** ($IC_{90} = 47 \text{ nM}$)

2.4.3. Sulfonamidy - inhibitory integrazy HIV-1

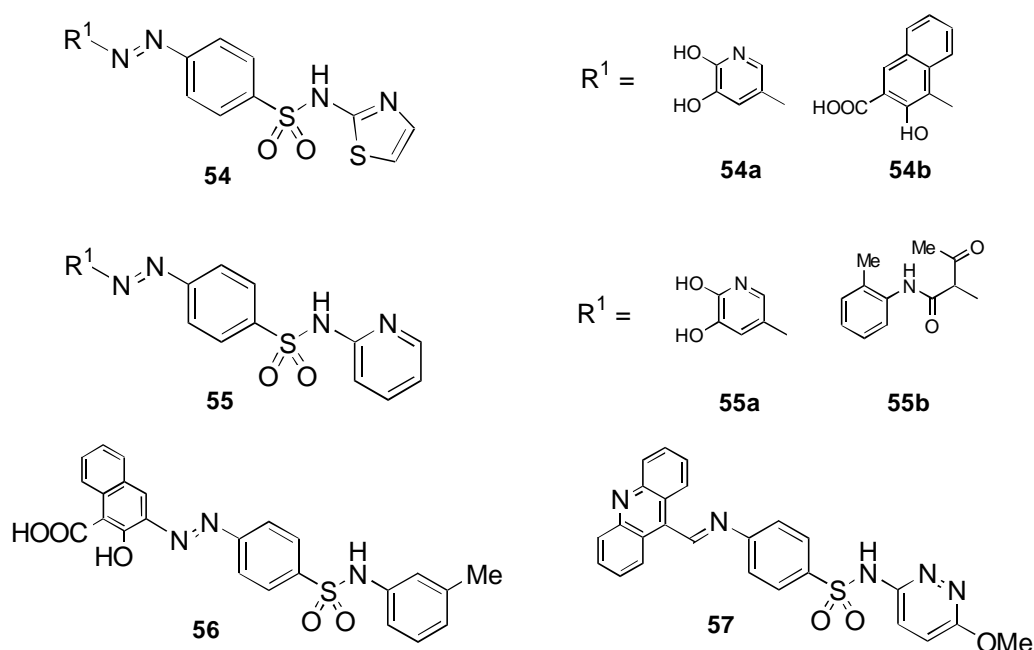
Jednym z istotnych elementów cyklu rozwoju wirusa HIV-1 jest proces integracji dwuniciowego łańcucha DNA (prowirusa) z genomem gospodarza. Proces integracji ma duże znaczenie patogenetyczne. Podział komórki dokonuje się bowiem wraz ze zintegrowanym DNA wirusa. Integracja w chromosomach dokonuje się losowo. Oznacza to, że nie ma preferowanego miejsca w DNA gospodarza, wiążącego się z DNA-HIV, ani określonego chromosomu. Odpowiedzialną za ten proces jest integraza (IN), enzym o masie 32 kDa, którego rola polega na katalizowaniu dwóch rozdzielnych, lecz chemicznie podobnych reakcji zwanych w literaturze jako "3'-processing" (3'-Proc) i "strand transfer" (ST) [94,96-98]. Pierwsza reakcja polega na odszczepieniu pary nukleotydów guanozyny-tymidyny (GT3') z dwóch 3' końców wirusowego DNA (o wysoce konserwatywnej sekwencji 5'ACTG.....CAGT3') druga zaś, na nukleofilowym ataku powstałych grup OH-3' na fosfodiesterowe wiązania zlokalizowane na dwóch przypadkowych 5' końcach DNA gospodarza, lecz oddalonych od siebie nie więcej niż o 4-6 par zasad. W konsekwencji powstaje linearny półprodukt wbudowanego DNA wirusa do dwóch nici DNA gospodarza z niesparowanymi 5' końcami wirusowego DNA. W wyniku enzymatycznej „reperacji” półproduktu integracji (przy udziale enzymów gospodarza) pary nukleotydów wirusowego DNA na końcu 5', tj. adenozyne-cytydina (5'AC) zostają odrzucone a pozostające nukleotydy wirusowego DNA (5'TG) łączą się 3' końcami DNA gospodarza tworząc w pełni zintegrowany produkt. Ponieważ w organizmie ludzkim nie ma odpowiedników integrazy HIV stanowi ona doskonały cel w poszukiwaniach potencjalnych leków przeciwwirusowych [94,96-98].

Wiele zespołów badawczych w Stanach Zjednoczonych, w tym zespoły Pommiera i Neamatiego [98-101], prowadzą szeroko zakrojone poszukiwania inhibitorów IN wśród związków należących do różnych grup chemicznych. Wynikiem tych badań było zidentyfikowanie wielu klas inhibitorów IN, wśród których znalazły się również sulfonamidy reprezentujące zróżnicowane struktury chemiczne.

Znane przeciwbakteryjne pochodne sulfanilamidu takie jak sulfizoksazol **52** i sulfasalazyna **53** wykazywały dobrą aktywność jako inhibitory IN ($IC_{50} = 50-100 \mu\text{g/ml}$) [100].

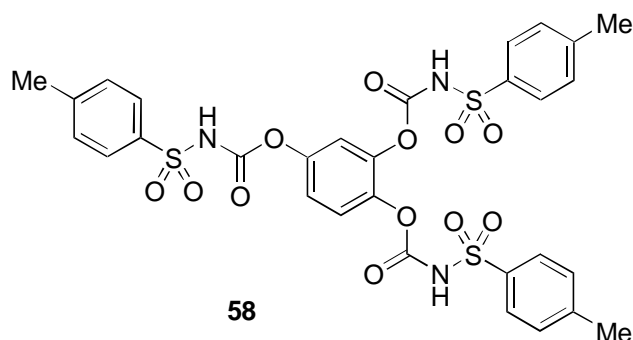


Bardziej aktywnymi inhibitorami IN okazały się analogowe sulfonamidy **54a-b**, **55a-b**, **56** i **57**, które w niskich stężeniach mikromolowych hamują reakcję 3'-Proc ($IC_{50} = 21 - 60 \mu M$) i reakcję ST ($IC_{50} = 20 - 50 \mu M$) [101].

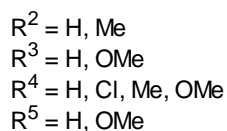
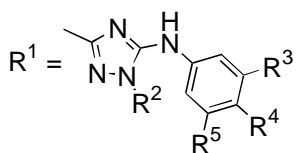
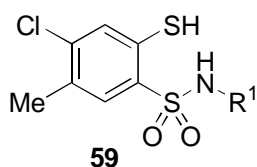
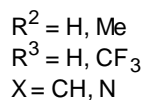
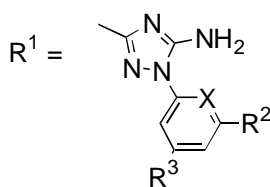
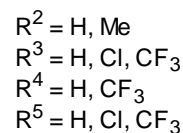
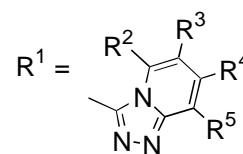
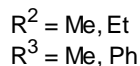
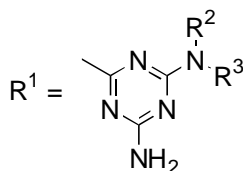
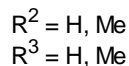
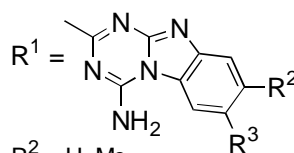
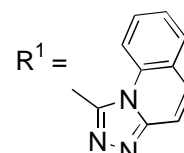
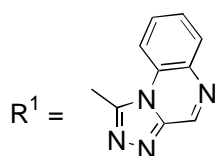
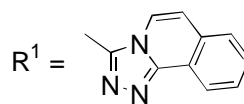
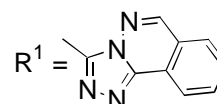


Neamati zauważył, że większość tych związków uczestniczy w sieci wiązań wodorowych z aktywnymi miejscami enzymu (IN), głównie z fragmentem glutaminy Gln148 [99,101]. Analiza rentgenokrytalograficzna kompleksu związku **55b** z integrazą wskazuje, że sulfonamidowa grupa NH jest donorem wiązania wodorowego z atomem tlenu fragmentu $CONH_2$ Gln148, jeden z atomów tlenu grupy SO_2 jest akceptorem wiązania wodorowego z Gln62, a drugi atom tlenu jest akceptorem wiązania wodorowego z His114 [102].

Na zwrócenie uwagi zasługuje 1,2,4-tris-(p-toluenosulfonylokarbaminian)fenylowy **58**, jako aktywny inhibitor reakcji ST ($IC_{50} = 5.5 \mu M$) i nieaktywny w hamowaniu reakcji 3'-Proc [8].



Prowadzone w tym kierunku badania Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Akademii Medycznej w Gdańsku zaowocowały poznaniem szeregu oryginalnych sulfonamidów wykazujących zależną od struktury zróżnicowaną aktywność przeciw-HIV-1 i z reguły niską toksyczność. Są to głównie przedstawione wzorem ogólnym **59** i znaczeniem podstawników 4-chloro-2-merkapto-5-metylo-*N*-(azolyl- lub azynyl)benzenosulfonamidy **59a** [62,63,103], **59b** [63], **59c** [67], **59d** [104], **59e** [104] oraz **59f-i** [105]:

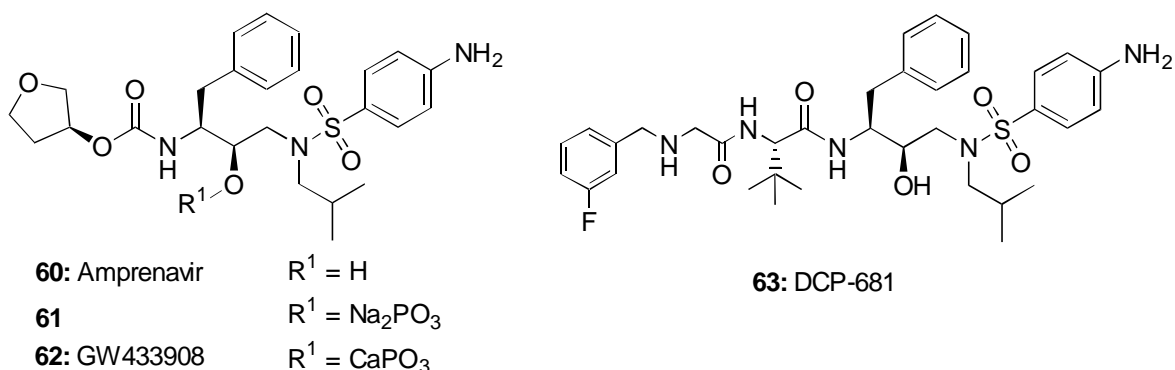
**59a****59b****59c****59d****59e****59f****59g****59h****59i**

Interesująca aktywność przeciw-HIV przedstawicielei związków **59a-i**, a zwłaszcza wyróżniające się wartości EC_{50} (0,38 - 80 μ M) i TI_{50} (2,1 - 515,0) 4-chloro-2-merkaptio-5-metylo-*N*-(1,2,4-triazolo[3,4-*a*]ftalazyn-3-ylo)benzenosulfonamidu **59i** [105] w odniesieniu do HIV-1 oraz jego mutantów HIV-1 (RF), HIV-1 (6R) AZT Resistant, 4 x AZT (AZT Resistant), HIV-2 (ROD), SIV (B 670), OC/100, HEPT/236, ddi Resistant, Calo Resistant i Diphenyl Resistant – zdecydowały o wdrożeniu 2-merkaptobenzenosulfonamidów do badań nad mechanizmem ich działania AIDS-przeciwwirusowego. Przeprowadzone w Laboratorium Farmakologii Molekularnej (NCI, Bethesda, USA), badania wykazały, że 2-merkaptobenzenosulfonamidy są inhibitorami integrazy HIV-1, wykazującymi zdolność hamowania zarówno reakcji 3'-Proc (IC_{50} = 3,7 – 78 μ M) jak też reakcji ST (IC_{50} = 3,5 – 42,1 μ M) [106]. W rezultacie 2-merkaptobenzenosulfonamidy zostały uznane za nową klasę efektywnych inhibitorów integrazy i replikacji wirusa HIV-1 [106,107].

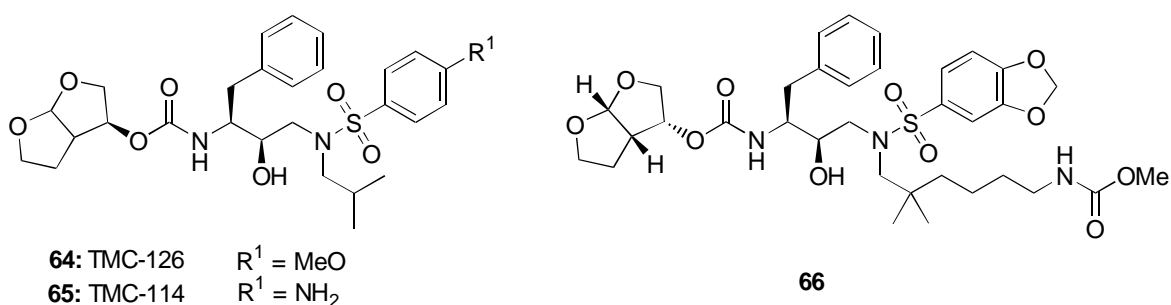
2.4.4. Sulfonamidy - inhibitory proteazy HIV-1

Genom wirusa składający się z dwóch identycznych nici RNA zawiera trzy geny wspólne dla retrowirusów (*Gag*, *Pol* i *Env*) oraz geny regulatorowe, które kodują odpowiednie białka. Inhibitory proteazy (PI) HIV-1 zapobiegają rozszczepianiu białek prekursorowych Gag i Gag-Pol do białek strukturalnych (p17, p24, p7 i p6) oraz białek funkcjonalnych (proteazy, odwrotnej transkryptazy i integrazy) [108], zatrzymując tym samym proces dojrzewania wirionów. Wbudowanie inhibitora proteazy HIV-1 do łańcucha polipeptydowego, następuje po rozszczepieniu wiązania peptydowego sekwencji fenyloalanina-prolina w pozycji 167-168 polipeptydu Gag-Pol. Można więc było oczekiwać, że potencjalnym inhibitorem może być odpowiedni związek z ugrupowaniem imitującym wiązanie peptydowe, który po wbudowaniu do łańcucha polipeptydowego utworzy nie dający się rozszczepiać analog naturalnego substratu proteazy HIV-1 [94].

Wprowadzonym do leczenia sulfonamidowym inhibitorem proteazy HIV-1, zaprojektowanym w oparciu o wspomniane spostrzeżenie, jest Amprenavir **60** [108,109]. Jego analogi z zachowanym ugrupowaniem hydroksyetyloaminowym jako izosterem wiązania peptydowego, są również bardzo interesujące [110-114].



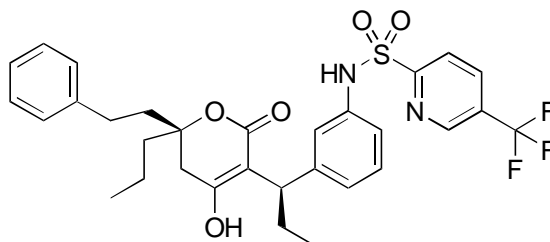
Ortofosforany(V) disodu lub wapnia **61** i **62**, jako proleki Amprenawiru są obecnie w I i II fazie badań klinicznych [110,111]. Analog **63**, w którym ugrupowanie furanoksyłowe Amprenawiru zastąpiono ugrupowaniem 2-[(3-fluorobenzyl)amino]-*N*-(2,2-dimetylopropylo)acetamidowym, wyróżnia się wysoką zdolnością hamowania aktywności proteazy różnorodnych dzikich mutantów HIV i jest w I fazie badań klinicznych [111,112]. Kolejne analogi **64** i **65** charakteryzują się bardzo wysoką aktywnością w stężeniach nanomolowych w stosunku do opornych na wiele leków (MDR) izolatów wirusa HIV i są również wdrożone do badań klinicznych [113,114].



Najnowsze doniesienia informują o syntezie związku **66**, którego powinowactwo do enzymu jest ponad 4000 razy wyższe od stwierdzonego dla Amprenawiru i wyraża się wartościami fentomolowymi ($K_i = 0,014$ pM) (Amprenawir, $K_i = 57$ pM), przy jednoczesnej wysokiej aktywności ($IC_{50} = 1,6 - 15$ nM) w stosunku do dzikich typów wirusa HIV PI-opornych (HXB2, EP13 i D545701) [115]. Przeprowadzone już badania farmakokinetyczne na szczurach wykazały, że doustna biodostępność tego związku wynosi 20% a czas półtrwania 1,3 godziny [115].

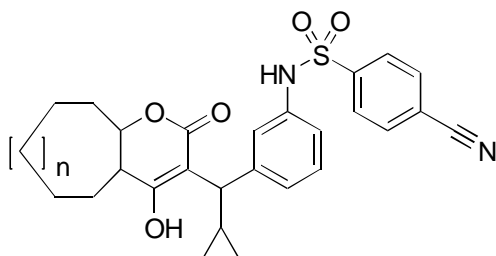
Znajdujący się w fazie badań klinicznych sulfonamid o nazwie Tipranawir (PNU 140690) **67**, będący inhibitorem proteazy HIV-1 [116], posiada w swojej strukturze fragment 5,6-dihydro-4-hydroksy-2*H*-piran-2-onu charakterystyczny dla innych inhibitorów proteazy HIV-1 [117]. Badania rentgenokrytalograficzne wskazują na wiele miejsc wiązania się

Tipranaviru i jego analogów z enzymem, w wyniku tworzenia wiązań wodorowych grup wodorotlenowej i atomu tlenu grupy karbonylowej z dwoma grupami

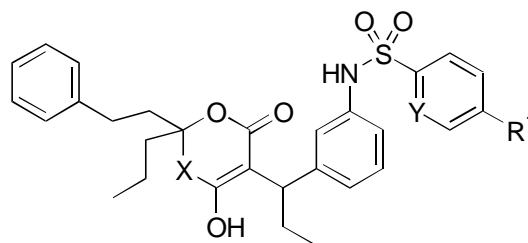


67: Tipranavir (PNU-140690)

karboksylowymi kwasu asparaginowego (25 i 25') i dwoma grupami aminowymi izoleucyny (50 i 50'). Ponadto grupa sulfonamidowa tworzy kilka mocnych wiązań wodorowych z miejscami aktywnymi enzymu, podczas gdy podstawniki fenetylowy i propylowy zajmują kieszenie S1' i S2', grupy etylowa i fenylova w pozycji C-3 α zajmują miejsca S1 i S2 a ugrupowanie 5-trifluorometylo-2-pirydylowe kieszeń S3. Tak silne wiązanie z enzymem wyjaśnia wysoką aktywność *in vitro* (IC₅₀ = 30 nM; IC₉₀ = 100 nM) i dużą siłę inhibicji Tipranaviru (K_I = 8 pM) przeciw dzikim typom i mutantom proteazy HIV [116,117].



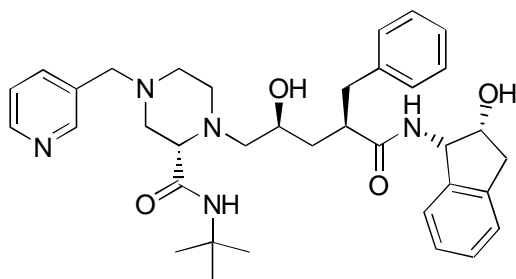
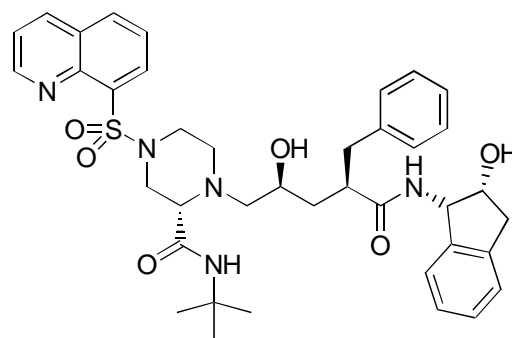
68: n=2: PNU-103017



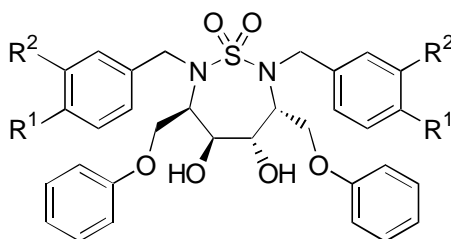
69: R¹ = H, F, CN, NO₂, NH₂ lub CF₃
X = CH₂, O; Y = CH₂ lub N

Strukturalne analogi Tipranaviru **68-69** wykazują również nanomolowe powinowactwo do dzikich typów i mutantów proteazy HIV [118-120].

Wyróżniającym się aktywnością inhibitorem proteazy HIV jest również sulfonamidowy analog Indinaviru - związek **70** (IC₅₀ ~ 0,013 nM), który jednak z uwagi na znikomą rozpuszczalność w wodzie (< 1 μ g/ml) nie został wdrożony do badań klinicznych [121].

Indinavir ($IC_{50} = 0,41 \text{ nM}$)**70:** ($IC_{50} = 0,013 \text{ nM}$)

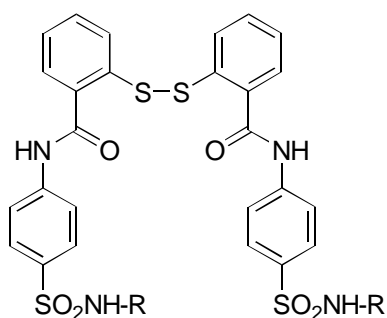
Kolejną grupę inhibitorów proteazy HIV-1 reprezentują pochodne 1,1-dioekso-1,2,7-tiadiazepiny o ogólnym wzorze **71** ($K_I = 3 - 43 \text{ nM}$) [122-125].

**71:** $R^1, R^2 = \text{H, MeCO, CH}_2\text{OH lub CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

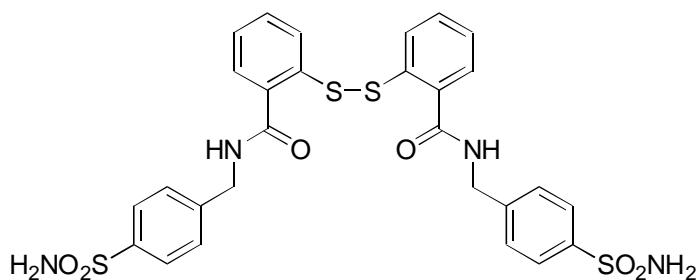
2.4.5. Sulfonamidy wiążące się z nukleokapsydem p7 HIV-1

Kolejnym celem biochemicznym w poszukiwaniu związków przeciw-HIV jest nukleokapsyd p7 (NCp7) HIV-1 [126,127]. Nukleokapsyd p7 zawiera dwa identyczne fragmenty (domeny) o stałej dla wirusów HIV i mutantów wysoce konserwatywnej sekwencji aminokwasów Cys-(X)₂-Cys-(X)₄-His-(X)₄-Cys, gdzie X oznacza dowolny aminokwas, a domeny oddzielone są od siebie łańcuchem polipeptydowym długości siedmiu aminokwasów [128,129]. Fragmenty te, nazywane również jako domeny palca cynkowego (ang. zinc finger), posiadają zdolność koordynacyjnego wiązania jonów Zn(II) przez trzy kolejne grupy merkaptanowe cysteiny i imidazolowy atom azotu histydyny [128,129]. Nukleokapsyd p7 powstaje w procesie przekształcania białek prekursorowych Gag i Gag-Pol w białka strukturalne. Białko to odgrywające kluczową rolę w cyklu życiowym wirusa HIV, powoduje między innymi oderwanie wirusowego RNA od RNA gospodarza, jego dimeryzację i dostarczenie RNA do tworzącego się wirionu [79,94,130].

Rice i współpracownicy [126,127] wykazali, że możliwa jest chemiczna modyfikacja nukleofilowych atomów siarki cysteiny, koordynującej jony Zn(II) w obrębie domeny palca cynkowego NCp7, a związkami obdarzonymi takimi właściwościami są między innymi 2,2'-ditiobisbenzamidami o ogólnym wzorze **72a-b** i **73** [131]. Autorzy sugerują mechanizm działania polegający na wypieraniu jonów cynku z palca cynkowego na skutek tworzenia się w pierwszym etapie międzycząsteczkowego wiązania disulfidowego (reakcja wymiany tiol/disulfid) [132] w wyniku elektrofilowego ataku atomu siarki disulfidowego reagenta na jeden z atomów siarki koordynującej jon Zn(II) w obrębie palca cynkowego, co powoduje z kolei destabilizację strefy koordynacyjnej, a w następstwie usunięcie jonu metalu poza domenę. Efektem końcowym zdaniem autorów jest denaturacja palca cynkowego i powstawanie nie zakaźnych wirionów [127-129,131].

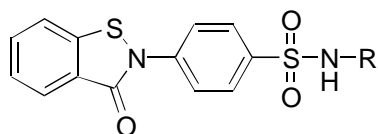


72a: R = H (DIBA-1)
72b: R = COCH₃ (DIBA-2-)

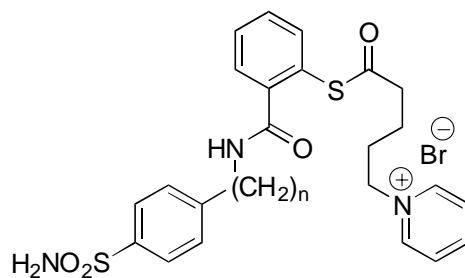


73

Donosi się również o aktywności ich analogów strukturalnych nie będących jednak disulfidami. Przykładami mogą być pochodne (3-okso-3*H*-benzo[*d*]izotiazol-2-yl)benzenosulfonamidów typu **74** oraz bromków 2-(5-pirydynowaleroilatio)benzoilo-*N*-(4-amino- lub 4-aminoalkilo)benzenosulfonamidu **75** będących skutecznymi inhibitorami *in vitro* replikacji wirusa HIV-1 [133,134].



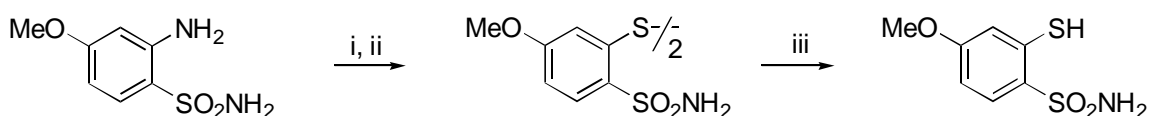
74: R = H, Ac, heteroaryl



75: n = 0, 1, 2

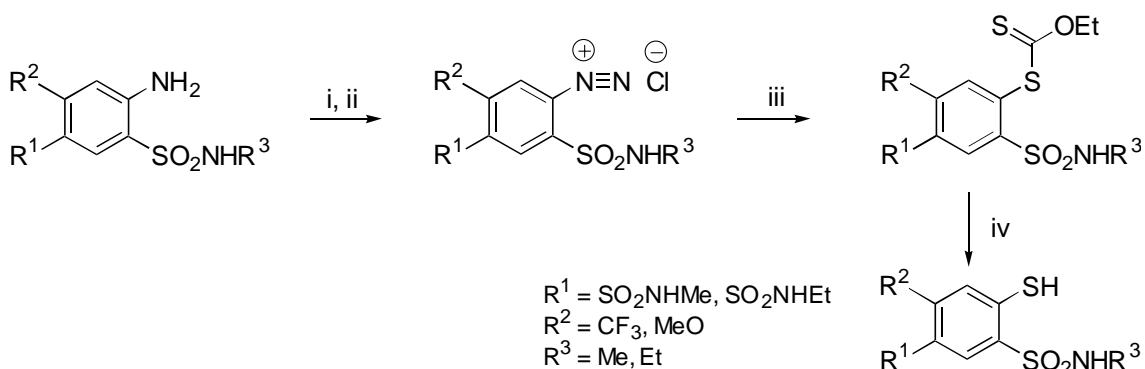
3. Sposoby syntezy pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu w świetle danych z piśmiennictwa

Pierwszym z poznanych 2-merkaptobenzenosulfonamidów był opisany w 1960 roku 2-merkapto-4-metoksybenzenosulfonamid [135], otrzymany w myśl następującego schematu reakcji.



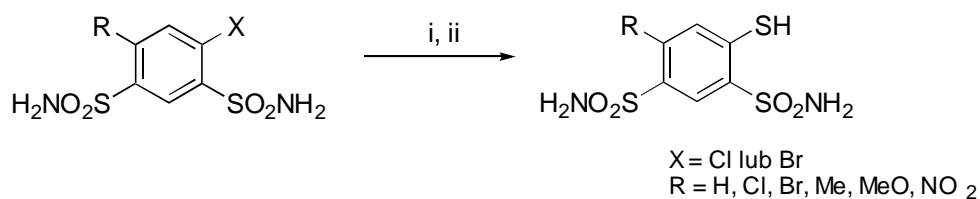
(i) $\text{NaNO}_2 / \text{HCl}$, t. 0°C ; (ii) Na_2S ; (iii) Zn , AcOH , t.wrz.

Podobnie, wychodząc z 2-aminobenzenosulfonamidów, otrzymano i opatentowano [136] szereg *N*-alkilo-2-merkaptobenzenosulfonamidów:

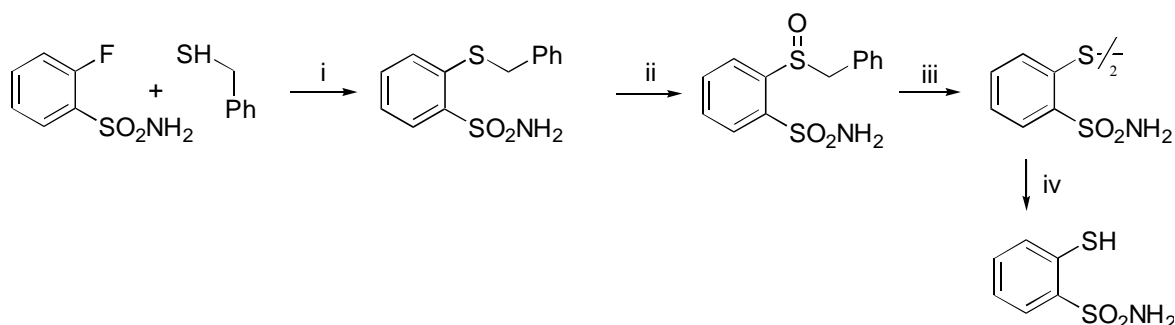
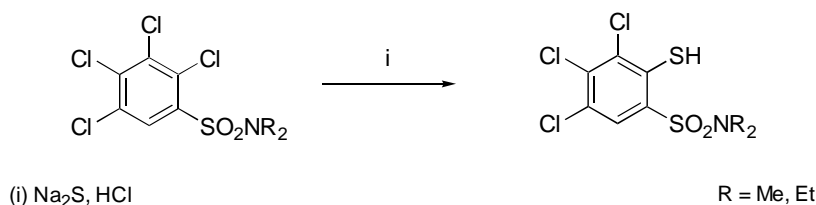


(i) 1N NaOH ; (ii) $\text{NaNO}_2 / \text{HCl}$, t. 0°C ; (iii) KSC(=S)OEt , H_2O , t. 80°C ; (iv) KOH , EtOH , t.wrz., HCl

Kolejne szeregi 2-merkaptobenzenosulfonamidów uzyskano wychodząc z odpowiednich 2-halogenobenzenosulfonamidów i siarczków sodu [136-138] lub benzyliotolu [138].



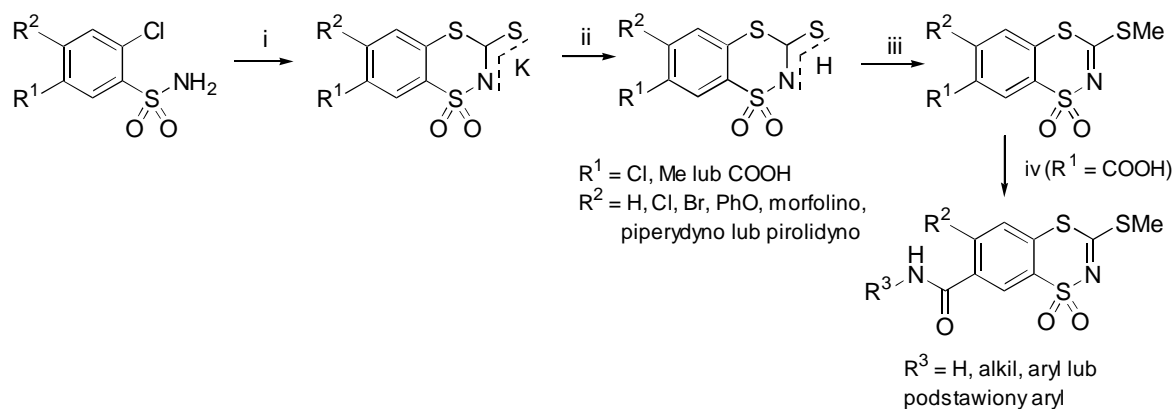
(i) $\text{Na}_2\text{S}_x / \text{S}$, EtOH , t.wrz.; (ii) $\text{NaHCO}_3 / \text{HCl}$



(i) DMF , K_2CO_3 , $t. 60^\circ\text{C}$; (ii) $30\% \text{H}_2\text{O}_2$, AcOH , $t. 10-25^\circ\text{C}$; (iii) HCl / MeOH , $t. \text{wrz.}$; (iv) Zn / AcOH , $t. \text{wrz.}$

Inne drogi syntezy zróżnicowanych strukturalnie 2-merkaptobenzosulfonamidów pojawiły się sukcesywnie do postępu badań nad metodami otrzymywania 1,1-diokso-1,4,2-benzoditiazyn i ich dalszych przemian w reakcjach z odczynnikami nukleofilowymi.

Podstawione 1,1-diokso-1,4,2-benzoditiazyn-3-ylotiolany potasowe otrzymuje się w reakcjach 2-chlorobenzosulfonamidów z disiarczkiem węgla w etanolowym roztworze wodorotlenku potasu, a następnie przez zakwaszenie lub w kolejnych reakcjach z siarczanem dimetylu – uzyskuje się odpowiednie 3-merkpto-1,1-diokso-1,4,2-benzoditiazyny i ich pochodne *S*-metylowe [139, 140]. Z kolei otrzymane tak kwasy 3-metylotio-1,1-diokso-1,4,2-benzoditiazyno-7-karboksyłowe przeprowadza się w chlorki kwasowe, z których w reakcjach z aminami uzyskuje się odpowiednie amidy kwasu 3-metylotio-1,1-diokso-1,4,2-benzoditiazyno-7-karboksyłowego [141].

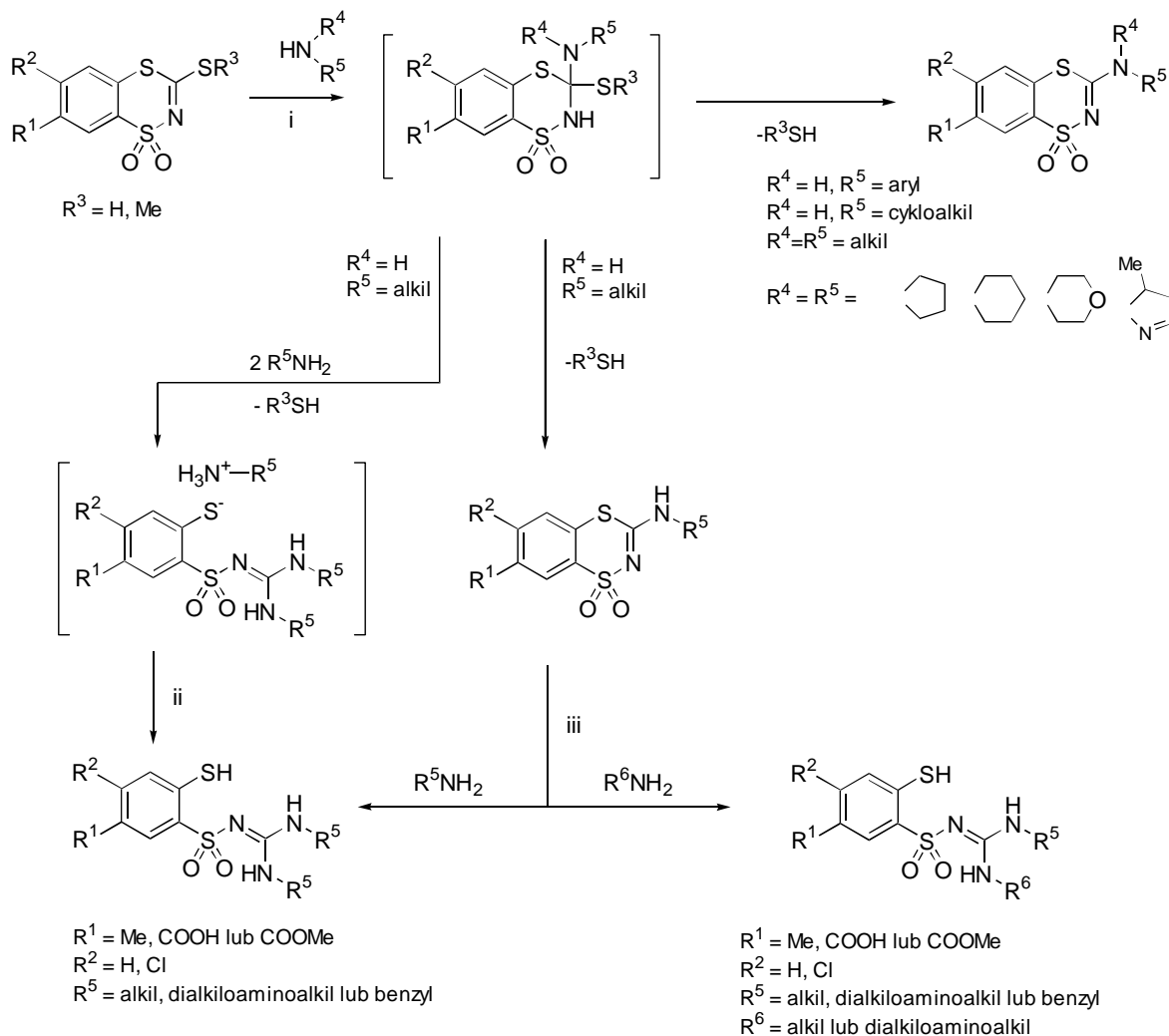


(i) EtOH / KOH , CS_2 , $t. \text{wrz.}$; (ii) $18-36\% \text{HCl}$, $t. \text{otoczenia}$; (iii) Me_2SO $t. 0-20^\circ\text{C}$; (iv) SOCl_2 , $t. \text{wrz.}$, R^3NH_2

Reakcje 3-(merkpto- lub metylo)-1,1-dioksy-1,4,2-benzoditiazyn z aminami, w zależności od stosunku molowego substratów, rzędowości i zasadowości aminy, przebiegają z utworzeniem odpowiednich 3-aminobenzoditiazyn lub *N*-(2-merkptobenzeno-sulfonylo)guanidyn.

Działając na 3-metylotiobenzoditiazynę alkiloaminami pierwszorzędowymi lub drugorzędowymi w odpowiednio dobranych stosunkach molowych, uzyskuje się odpowiednie 3-alkiloaminobenzoditiazyny [142-145]. Podobnie reagują 3-merkpto- lub 3-metylotiobenzoditiazyny z pierwszorzędowymi aminami aromatycznymi [142, 146].

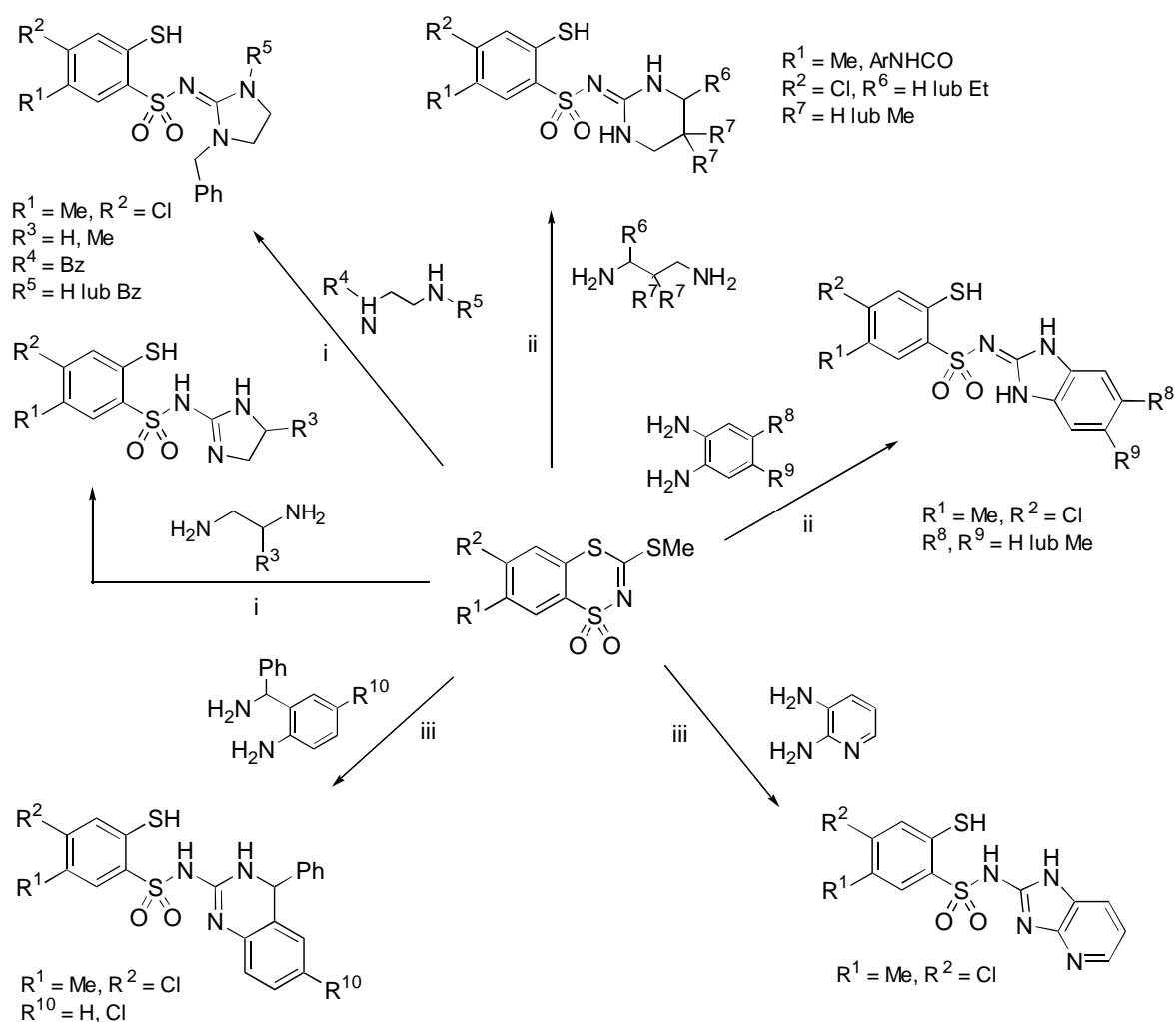
Jednakże reakcje 3-merkpto-, 3-metyloti- lub 3-alkiloaminobenzoditiazyn z nadmiarem pierwszorzędowych amin alifatycznych przebiegają z utworzeniem 1,3-dialkilo-2-(2-merkptobenzenosulfonylo)guanidyn [145, 147-149] z jednakowymi [145, 147, 148] lub różnymi [145, 147, 149] podstawnikami w pozycjach 1 i 3.



(i) MeOH, toluen lub benzen t.wrz.; (ii) HCl/H₂O, 20°C; (iii) MeOH lub EtOH, t.wrz.

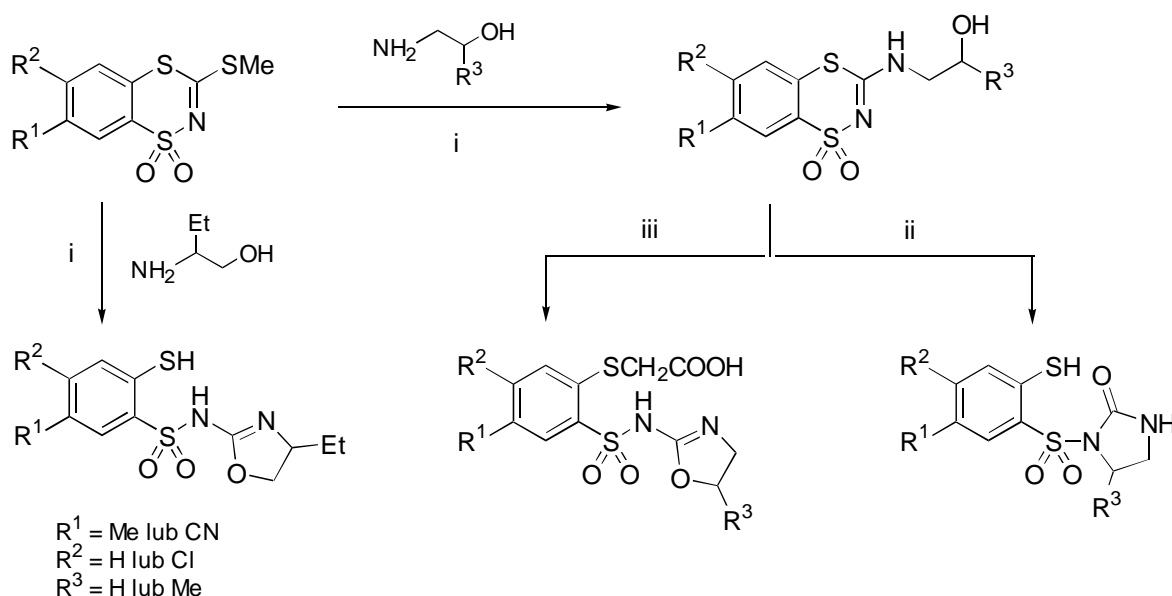
Łatwość z jaką 3-metylotiobenzoditiazyny reagują z niektórymi diaminami otworzyła drogę syntezy licznych szeregów 2-merkapto-*N*-(azolilo- lub azynolilo)benzenosulfonamidu.

W reakcjach 3-metylotiobenzoditiazyn z 1,2-diaminoetanem lub 1,2-diaminopropanem uzyskuje się 2-(2-merkaptobenzenosulfonamido)imidazolinę [150, 151]. Natomiast reakcje z *N*-benzylo- lub *N,N'*-dibenzylo-1,2-diaminoetanem przebiegają z utworzeniem 2-(2-merkaptobenzenosulfonyloimino)imidazolidyny [68]. Podobnie w reakcjach z 1,3-propylenodiaminami otrzymuje się 2-(2-merkaptobenzenosulfonyloimino)perhydropiryminy [65], a w reakcjach z 1,2-fenylendiaminą i 2,3-diaminopirydyną lub 2-aminobenzhydrylaminą uzyskuje się odpowiednio pochodne 2-merkapto-*N*-(benzimidazol-2-yl)benzenosulfonamidu [66], 2-merkapto-*N*-(pirydo[3,2-*d*]imidazo-2-yl)benzenosulfonamidu [66] lub 2-merkapto-*N*-(3,4-dihydrochinazolin-2-yl)benzenosulfonamidu [68].



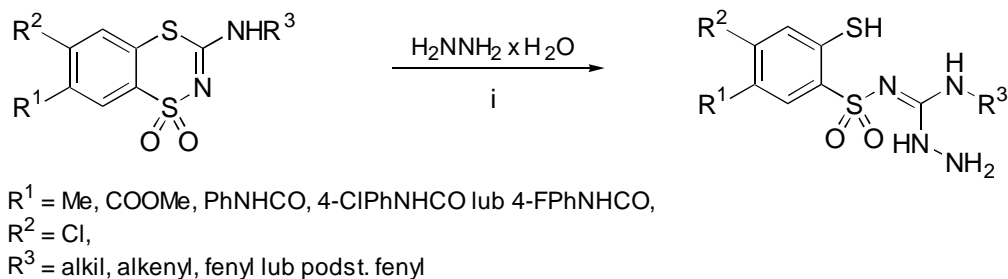
(i) MeOH lub toluen, t.wrz.; (ii) toluen t. wrz.; (iii) toluen, t.wrz, DMAP.

Przebieg reakcji 3-metylobenzoditiazyn z 1,2-aminoalkoholami uzależniony jest od struktury użytego aminoalkoholu. Reakcje z 2-amino-1-butanołem przebiegają w zwykłej temperaturze z utworzeniem pochodnych 2-(2-merkaptobenzenosulfonamido)oksazoliny [152]. Natomiast prowadzone w tych samych warunkach reakcje z aminoetanolem lub 1-amino-2-propanolem przebiegają z utworzeniem typowych 3-(hydroksyalkiloamino) benzoditiazyn, które w dalszych reakcjach z kwasem chlorooctowym można przeprowadzić w pochodne oksazoliny [152], a z POCl_3 w pochodne 1-(2-merkaptobenzenosulfonylo)-2-imidazolidynonu [153, 154].



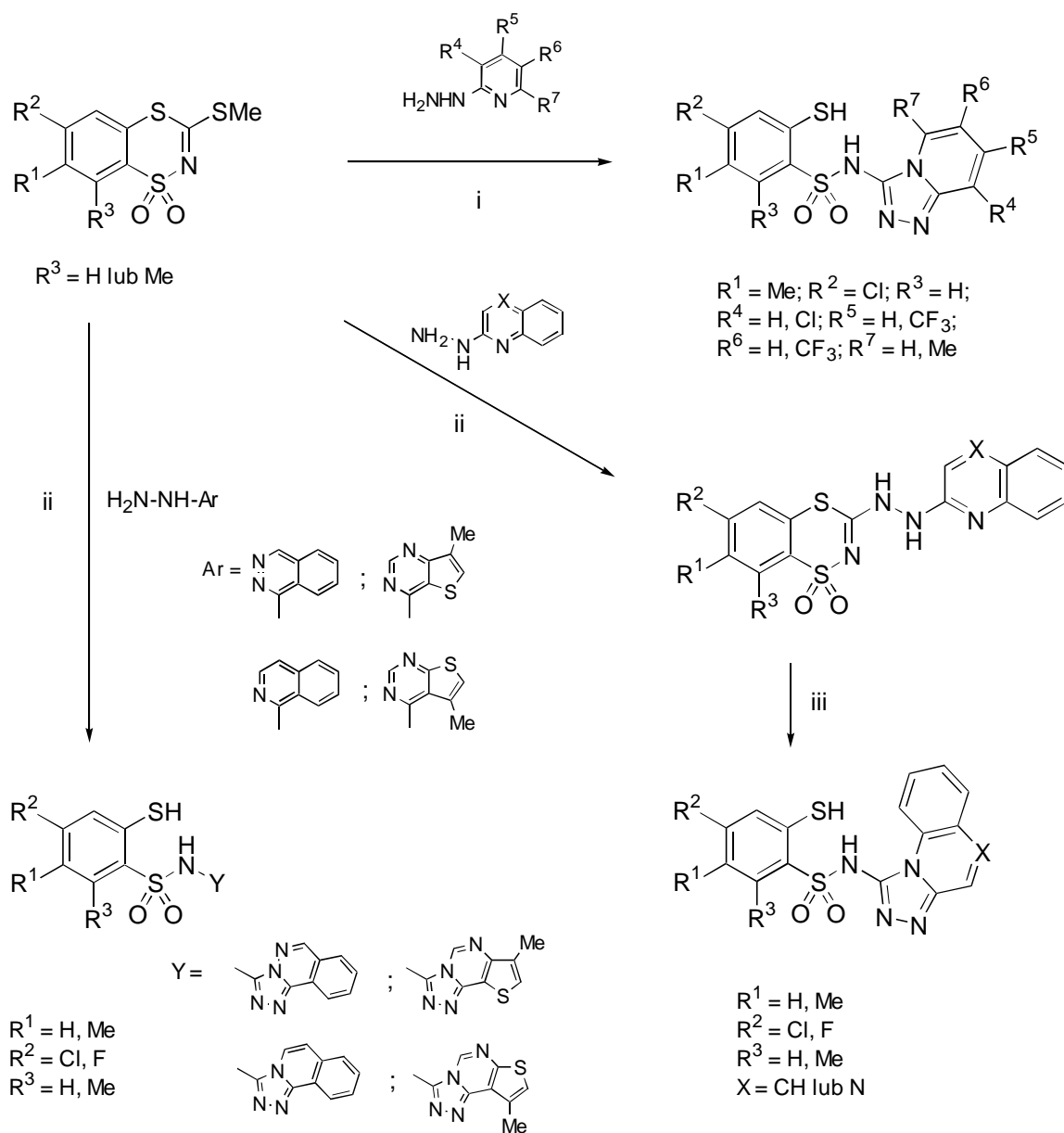
(i) MeOH, 20°C; (ii) POCl_3 , t. 65-70°C; (iii) ClCH_2COOH , $\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{H}_2\text{O}$ t.80-90°C, $\text{HCl} / \text{H}_2\text{O}$, t.20 °C.

Reakcje 3-(alkilo- lub aryloamino)benzoditiazyn z nadmiarem wodzianu hydrazyny w środowisku metanolowym, stanowią dogodną metodę syntezy *N*-amino-*N'*-(alkilo- lub arylo)-*N''*-(2-merkaptobenzenosulfonylo)guanidyn [71, 155].



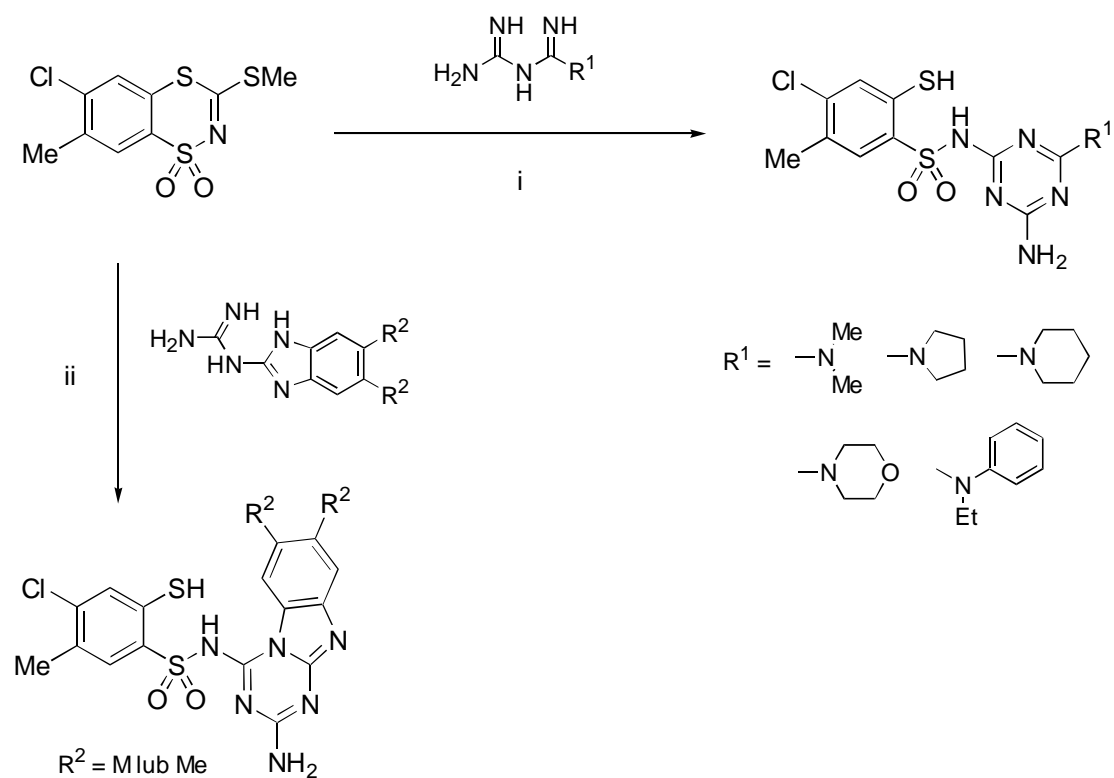
(i) MeOH, t. 20 °C

Do syntezy kolejnych szeregów pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu, w których atom azotu grupy sulfonamidowej jest związany z pierścieniem 1,2,4-triazolu skondensowanym z pierścieniem heteroaromatycznym, wykorzystano reakcje 3-metylotio-1,1-dioksy-1,4,2-benzoditiazyn z niektórymi heteroarylohydrazynami [67, 105].



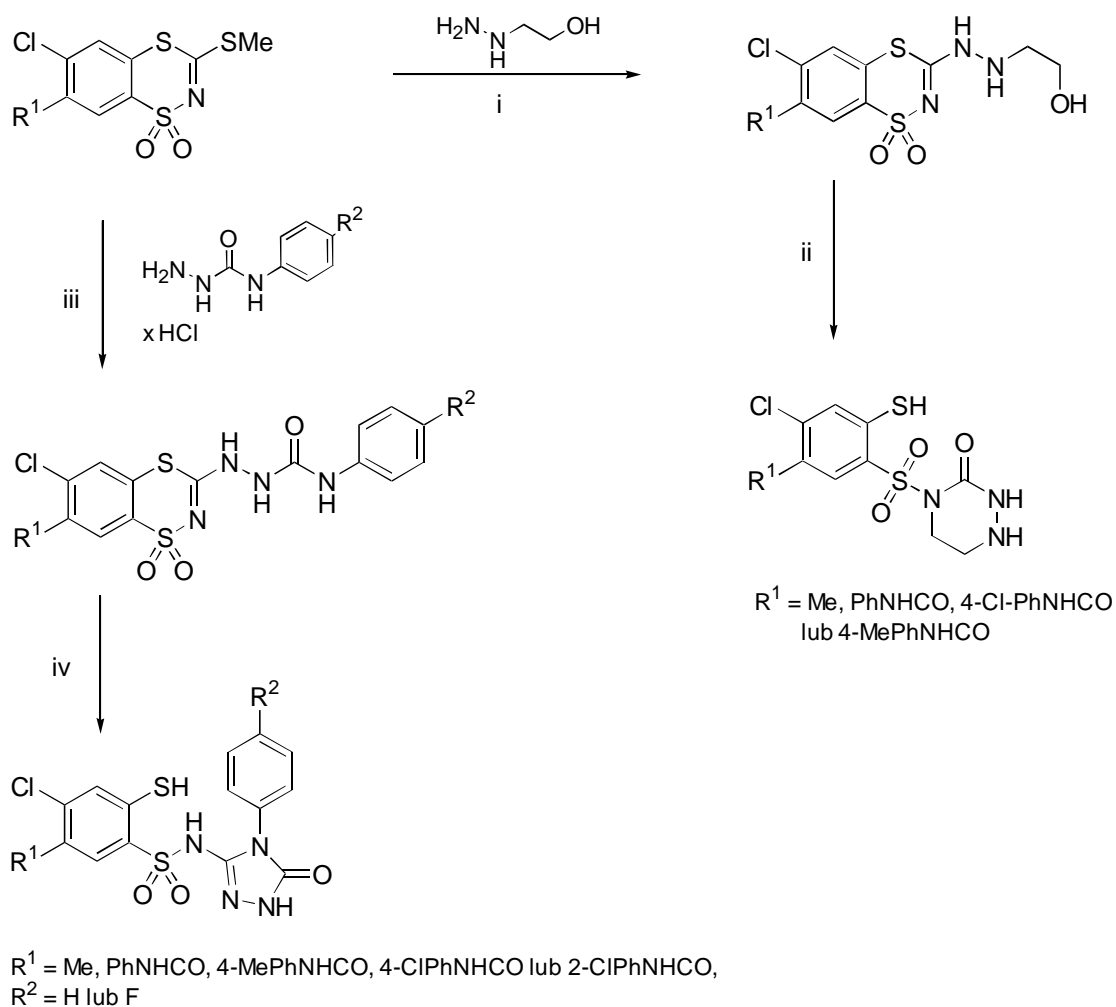
(i) Toleun, t.wrz.; (ii) toluen lub benzen, t.wrz.; (iii) pirydyna, t.wrz.

Podobnie w reakcjach 6-chloro-7-metylo-3-metylotio-1,1-dioksy-1,4,2-benzoditiazyny z biguanidami lub benzimidazoliloganidynami otrzymano odpowiednio pochodne 2-merkapto-*N*-(2-amino-1,3,5-triazyn-4-ylo)benzenosulfonamidu lub 2-merkapto-*N*-(2-aminobenzo[4,5]imidazo[1,2-*a*][1,3,5]triazyn-4-ylo)benzenosulfonamidu [104].



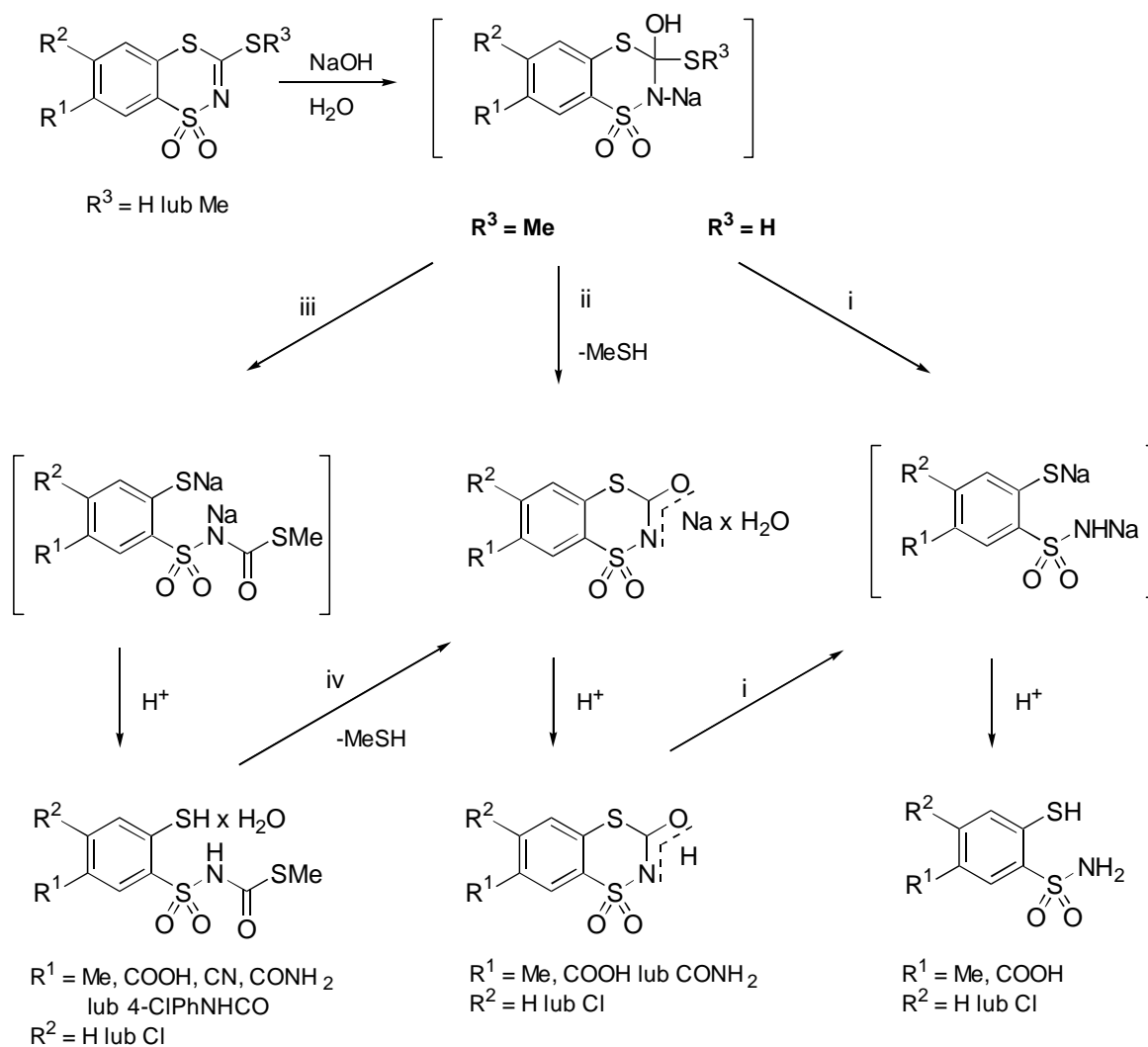
(i) Toluen, t.wrz.; (ii) toluen, DMAP, t.wrz.

3-Metylotiobenzoditiazyny reagują z 2-hydroksyetylohydrazyną z utworzeniem typowych produktów podstawienia grupy metylio tj. *N*-(benzoditiazyn-3-ylo)-*N'*-(2-hydroksyetylo)hydrazyn, które w reakcji z POCl₃ można przeprowadzić w odpowiednie 4-(2-merkaptobenzenosulfonylo)perhydro-1,2,4-triazyn-3-ony [69]. Natomiast reakcje 3-metylotiobenzoditiazyn z 4-arylosemikarbazydami mogą być wykorzystane do syntezy 2-merkapto-*N*-(4-arylo-4,5-dihydro-5-okso-1*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamidów [64].



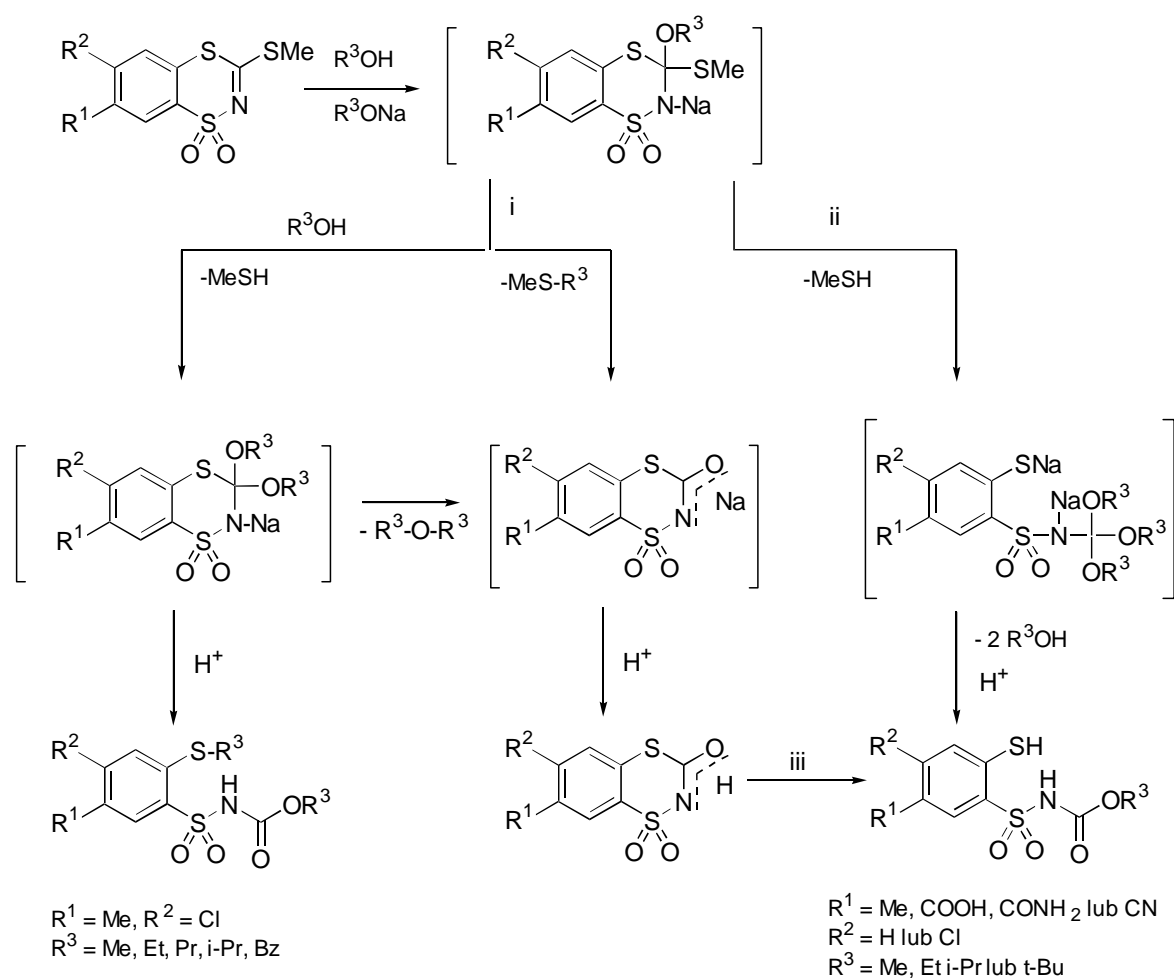
(i) MeOH, t. 20 °C; (ii) POCl₃, t. 65 - 70 °C; (iii) MeOH, TEA, t.wrz.; (iv) NaOH / H₂O, t. 95 °C, HCl / H₂O, t. 20 °C.

Alkaliczna hydroliza 3-merkaptobenzoditiazyn [139,140] lub 3-metylotiobenzoditiazyn w zależności od parametrów reakcji pozwala na otrzymanie z dobrą wydajnością pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu [139,140] lub *N*-(2-merkaptobenzenosulfonyl)tiokarbaminianów metylowych [157].



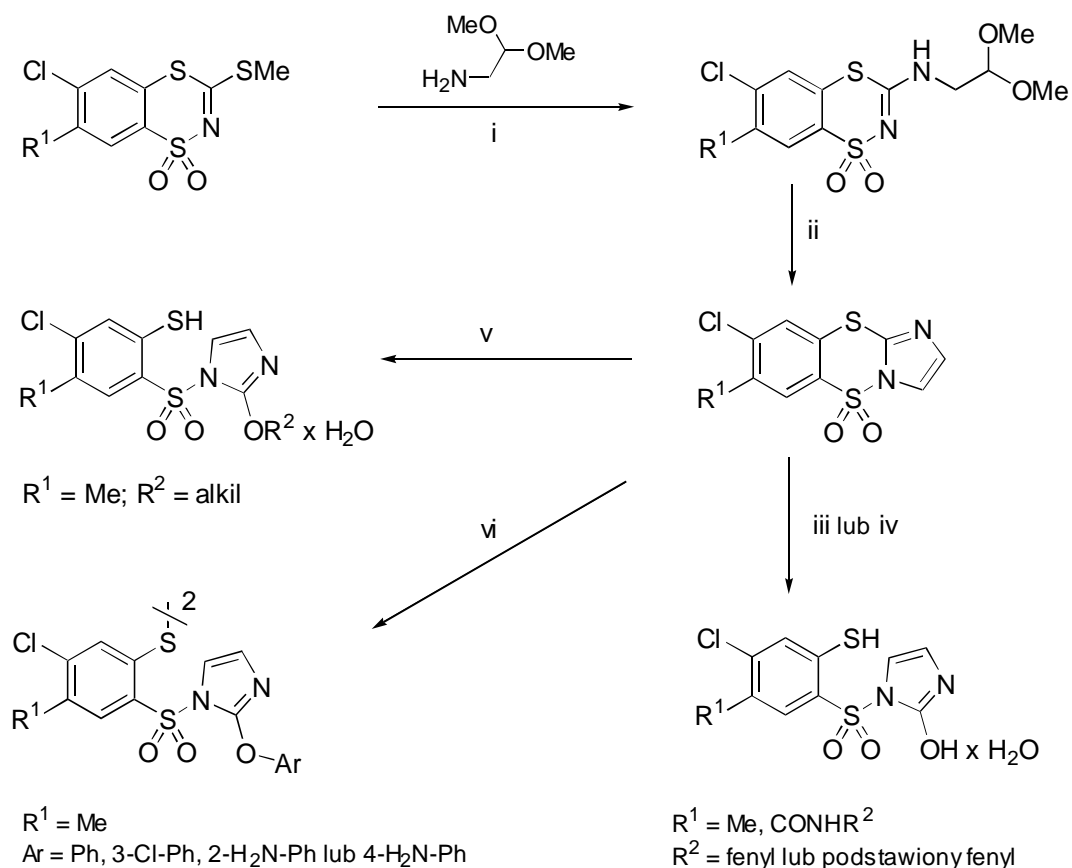
(i) 6-7 moli NaOH, t.wrz.; (ii) 1-2 moli NaOH, 100°C; (iii) 1-2 moli NaOH, 0-20°C; (iv) NaOH / H₂O, t.wrz.

Reakcje równomolowych ilości 3-metylotiobenzoditiazyn i alkoholowych roztworów alkoholianów sodu lub amin trzeciorzędowych przebiegają w podwyższonej temperaturze dwukierunkowo, z utworzeniem odpowiednich *N*-(2-alkilotiobenzosulfonylo)karbaminianów alkilowych i 3-hydroksybenzoditiazyn [158,159]. Z kolei przeprowadzone w zwykłej temperaturze reakcje 3-metylotiobenzoditiazyn z nadmiarem alkoholianu sodu przebiegają z utworzeniem *N*-(2-merkaptobenzosulfonylo)karbaminianów alkilowych, które można również otrzymać w reakcjach alkoholi alifatycznych z 3-hydroksybenzoditiazynami [157,160].



(i) t. 85-90°C; (ii) t. 20°C; (iii) R³OH, t. 20°C.

Wykazano ponadto, że skondensowane pochodne 1,1-dioekso-1,4,2-benzoditiazyny takie jak 8-chloro-5,5-dioekso-imidazo[1,2-*b*][1,4,2]benzoditiazyny [75], ulegają również alkalicznej hydrolizie lub alkoholizacji tworząc odpowiednio pochodne 2-(hydroksy, alkoksy lub aryloksy)-1-[(2-merkaptofenylo)sulfonylo]imidazolu [70].



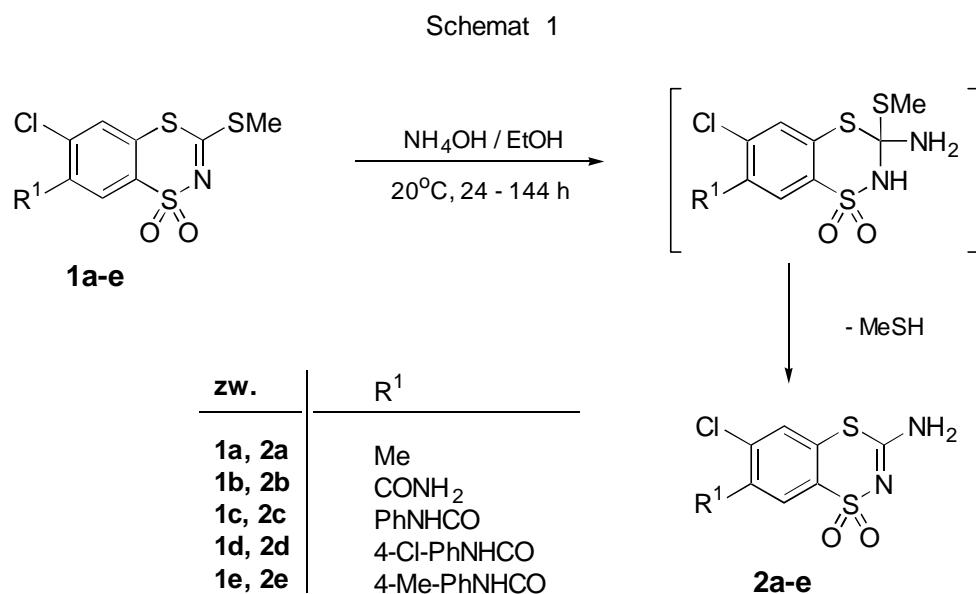
(i) Toluen lub benzen, t.wrz.; (ii) 98% H_2SO_4 , t. 20 °C, H_2O (lód), t. 0-3 °C;
 (iii) $\text{NaOH} / \text{H}_2\text{O}$ / dioksan, t. 80-90 °C, $\text{HCl} / \text{H}_2\text{O}$; (iv) $\text{MeOH} / 96\% \text{H}_2\text{SO}_4$, t.wrz;
 (v) $\text{MeOH} / \text{MeONa}$ lub $\text{PrOH} / \text{PrONa}$, t.wrz., $\text{HCl} / \text{H}_2\text{O}$; (vi) $\text{ArOH} / \text{ArONa}$, t.wrz., $\text{HCl} / \text{H}_2\text{O}$.

4. Badania własne

4.1. Synteza nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu o spodziewanej aktywności przeciwnowotworowej

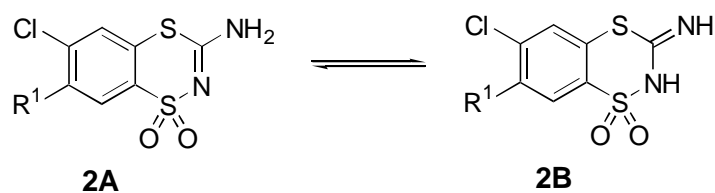
4.1.1. Badania nad syntezą nowych 3-amino-6-chloro-1,1-dioekso-1,4,2-benzoditiazyn i ich przemian w pochodne 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu

W pracy niniejszej przeprowadzając reakcje 6-chloro-3-metylotio-1,1-dioekso-1,4,2-benzoditiazyn **1a-e** z etanolem w 25% roztworze wody amoniakalnej w zwykłej temperaturze otrzymano nie opisane wcześniej 3-amino-6-chloro-1,1-dioekso-1,4,2-benzoditiazyny **2a-e** (Schemat 1, publikacje **P1**, **P4** i **P5**), a następnie poznano ich interesujące, niekiedy nieoczekiwane właściwości chemiczne.



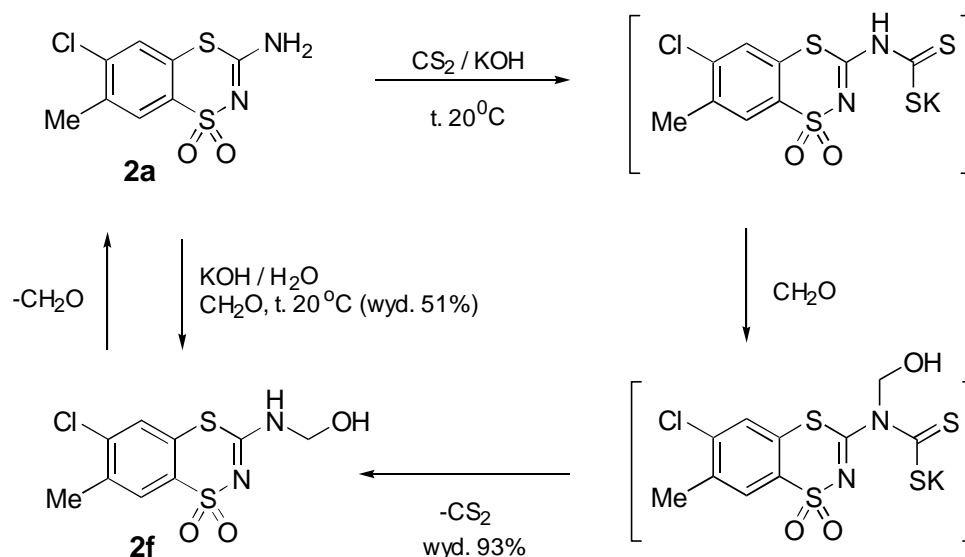
Związki typu **2** są interesującymi przykładami struktur, w których może występować zjawisko tautomerii pierścieniowej, należało więc oczekiwać współistnienia dwóch prawdopodobnych odmian tautomerycznych **2A** i **2B** (Schemat 2). W badaniach strukturalnych (¹H i ¹³C-NMR) stwierdzono, że występują one w roztworze (DMSO) w temp. pokojowej jako trwałe tautomery aminowe typu **2A**. Większą trwałość tautomeru **2A** potwierdzały również wyniki kwantowo-chemicznych obliczeń względnej energii możliwych tautomerów w próżni, dokonanych na przykładzie związku **2a** metodami *ab initio* Hartree-Fock (RHF) i Becke-Perdew (BP) przy zastosowaniu bazy 6-31G** (publikacja **P1**)

Schemat 2



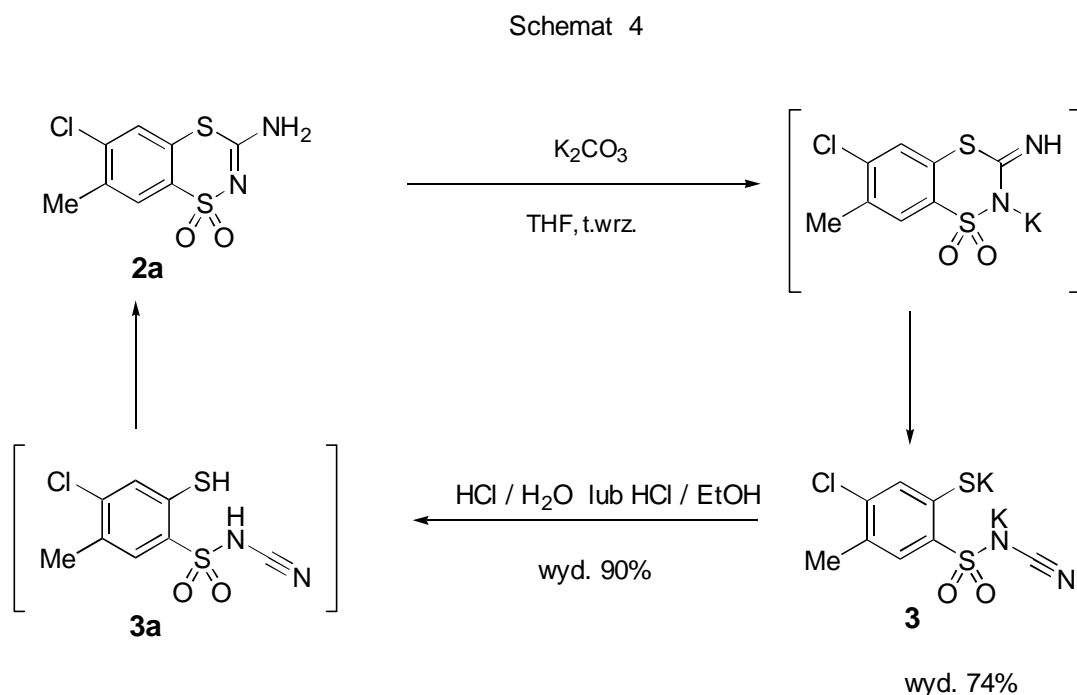
Zmierzając do poznania właściwości chemicznych 3-amino-6-chloro-7-metylo-1,1-dioksy-1,4,2-benzoditiazyny **2a** zbadano przebieg jej reakcji z formaldehydem. Niezależnie od stosowanych parametrów reakcji otrzymywano zamierzoną 6-chloro-3-(hydroksymetyloamino)-7-metylo-1,1-dioksy-1,4,2-benzoditiazynę **2f** z wydajnością około 51%. Stwierdzono, że jej wydajność można podwyższyć do 93% przy prowadzeniu reakcji w obecności disiarczku węgla. Stwierdzono również, że związek ten (**2f**), ogrzewany w temp 100°C lub w środowisku wrzącego etanolu łatwo ulega rozkładowi do wyjściowej 3-aminobenzoditiazyny **2a** (Schemat 3, publikacja **P1**).

Schemat 3



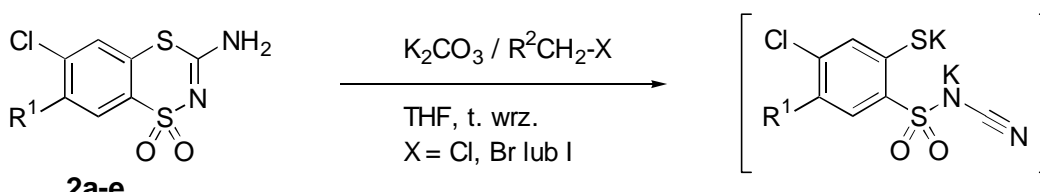
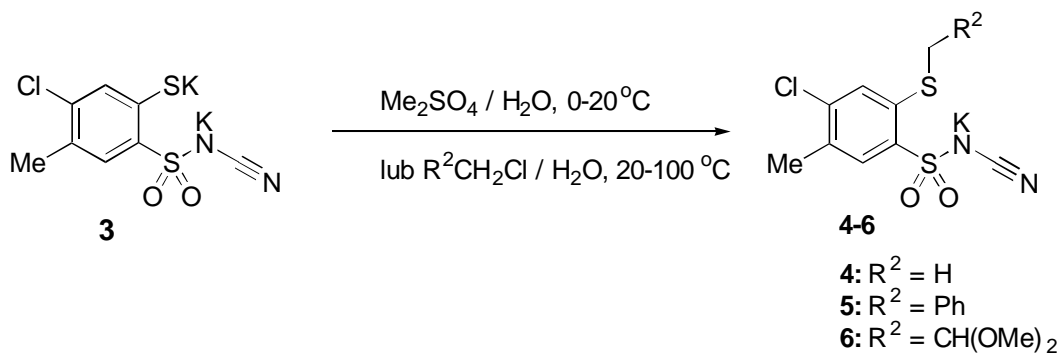
Badając z kolei przebieg reakcji wspomnianej 3-aminobenzoditiazyny **2a** z K₂CO₃ w środowisku wrzącego tetrahydrofuranu okazało się, że oczekiwana sól potasowa 6-chloro-3-imino-7-metylo-1,1-dioksy-2,3-dihydro-1,4,2-benzoditiazyny ulega dalszej przemianie

przebiegającej z rozerwaniem wiązania C₃-S i utworzeniem soli dipotasowej *N*-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)cyjanamidu **3**. Stwierdzono również, że wolny sulfonamid **3a**, powstający przez zakwaszenie jego soli dipotasowej **3** w środowisku wodnym lub bezwodnym, ulega szybkiej cyklizacji do wyjściowej 3-aminobenzoditiazyny **2a** (Schemat 4, publikacja **P1**).

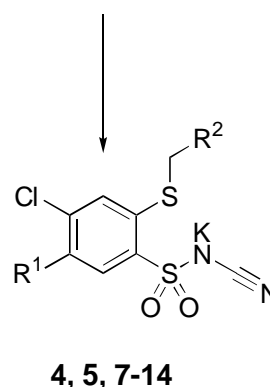


Podejmując badania nad reakcjami soli dipotasowej **3** z odczynnikami alkilującymi oczekiwano produktów *S*- i *S,N*-dipodstawionych. Okazało się jednak, że kierunek przebiegu tych reakcji jest niezależny od parametrów czasu, temperatury i stosunku molowego substratów, a w konsekwencji uzyskuje się tylko sole monopotasowe odpowiednich *N*-[4-chloro-5-metylo-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]cyjanamidów **4-6** (Schemat 5, publikacja **P1**). Pozwoliło to na uproszczenie i opracowanie ogólnej metody otrzymywania soli potasowych *N*-[4-chloro-2-(R²-metylotio)-5-R¹-benzenosulfonylo]cyjanamidów, opartej na prowadzonych według procedury „one pot” reakcjach 3-amino-6-chloro-7-R¹-1,1-diokso-1,4,2-benzoditiazyn z K₂CO₃ i odczynnikami alkilującymi (Schemat 5, publikacje **P1**, **P4** i **P5**).

Schemat 5



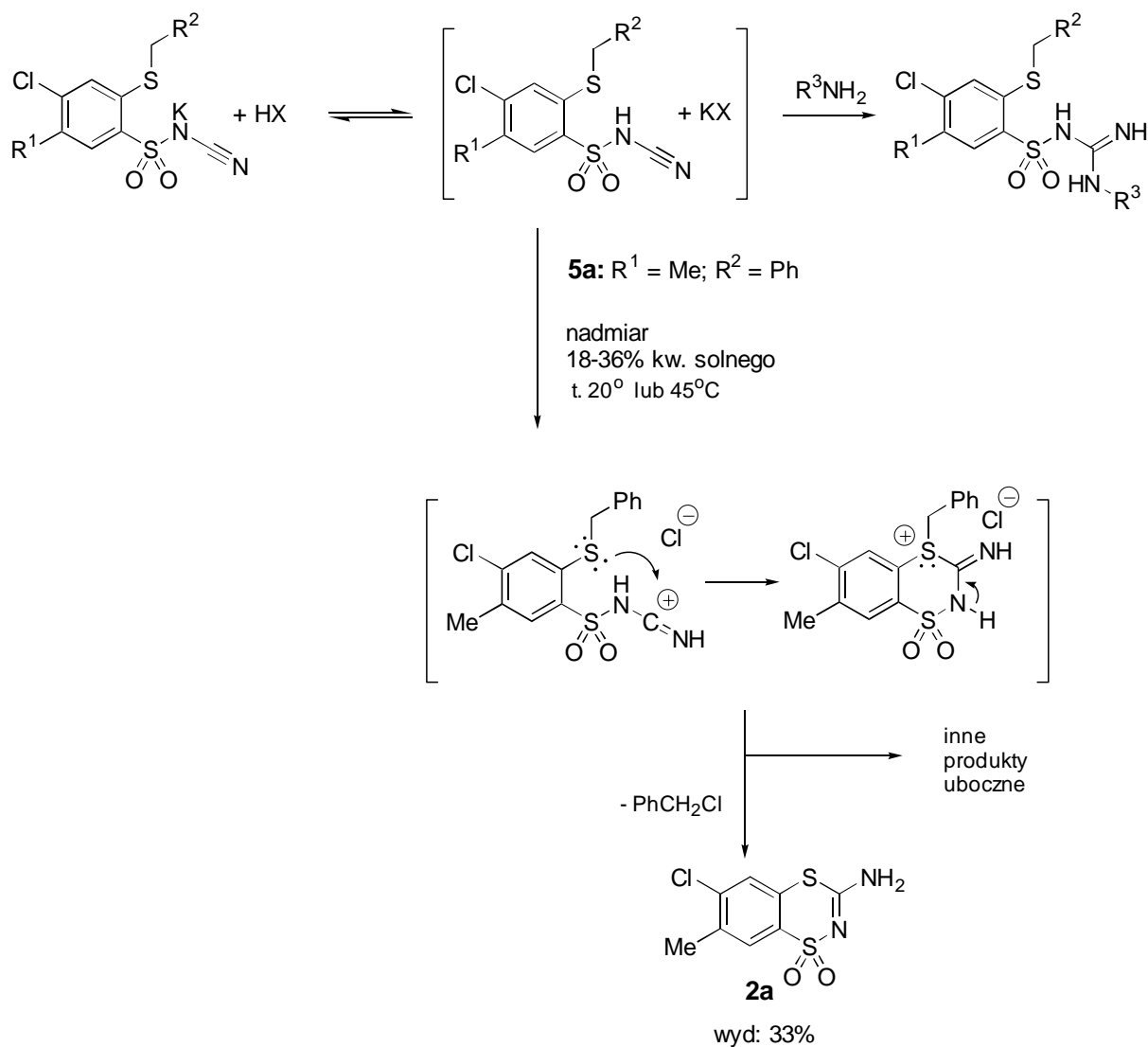
zw.	R ¹	R ²
1a, 4	Me	H
1a, 5	Me	Ph
1a, 7	Me	Me
1a, 8	Me	COOEt
1a, 9	Me	CONH ₂
1b, 10	H ₂ NCO	COOEt
1b, 11	H ₂ NCO	Ph
1c, 12	PhNHCO	Ph
1d, 13	4-Cl-PhNHCO	Ph
1e, 14	4-Me-PhNHCO	Ph



Wzmiankowany już, jednokierunkowy przebieg omawianych reakcji z wytworzeniem pochodnych *S*-podstawionych wydaje się być uwarunkowany dużą nukleofilowością anionu tiofenolanowego [161,162] i możliwością stabilizacji anionu sulfonylocyjanamidowego przez rezonans [163,164]. Z tej ostatniej przypuszczalnie przyczyny, sole potasowe otrzymanych *N*-[4-chloro-2-(*R*²-metylotio)-5-*R*¹-benzenosulfonylo]cyjanamidów **4-14** są trwale w kwaśnym środowisku wodnym (pH 1). Okazało się jednak, że zakwaszenie tych soli równoważnikową ilością mocnego kwasu (H₂SO₄, HCl) prowadzi do ustalenia się stanu równowagi między ich pierwotną strukturą „cyjanamidanową” i wytworzoną „cyjanamidową” (Schemat 6) w stopniu wystarczającym do przeprowadzenia typowych reakcji grupy cyjanowej z odczynnikami nukleofilowymi. Natomiast próby

otrzymania wolnego *N*-(2-benzyltio-4-chloro-5-metylobenzenosulfonylo)cyjanamidu **5a** z jego soli potasowej **5** przez wytrącenie nadmiarem 18-36% kwasu solnego, w zwykłej i podwyższonej temperaturze (45°C), prowadziły do wytworzenia złożonych produktów rozkładu, z których w stanie czystym udało się wyodrębnić tylko 3-aminobenzoditiazynę **2a** z wydajnością około 33% (Schemat 6, publikacja **P1**).

Schemat 6



Reakcje przedstawione na schematach 5 i 6 stały się punktem wyjścia do przeprowadzenia dalszych badań nad możliwościami wykorzystania soli potasowych *N*-(4-chlorobenzenosulfonylo)cyjanamidów **3-14** do syntezy niektórych nowych szeregów pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu o spodziewanej aktywności przeciwnowotworowej.

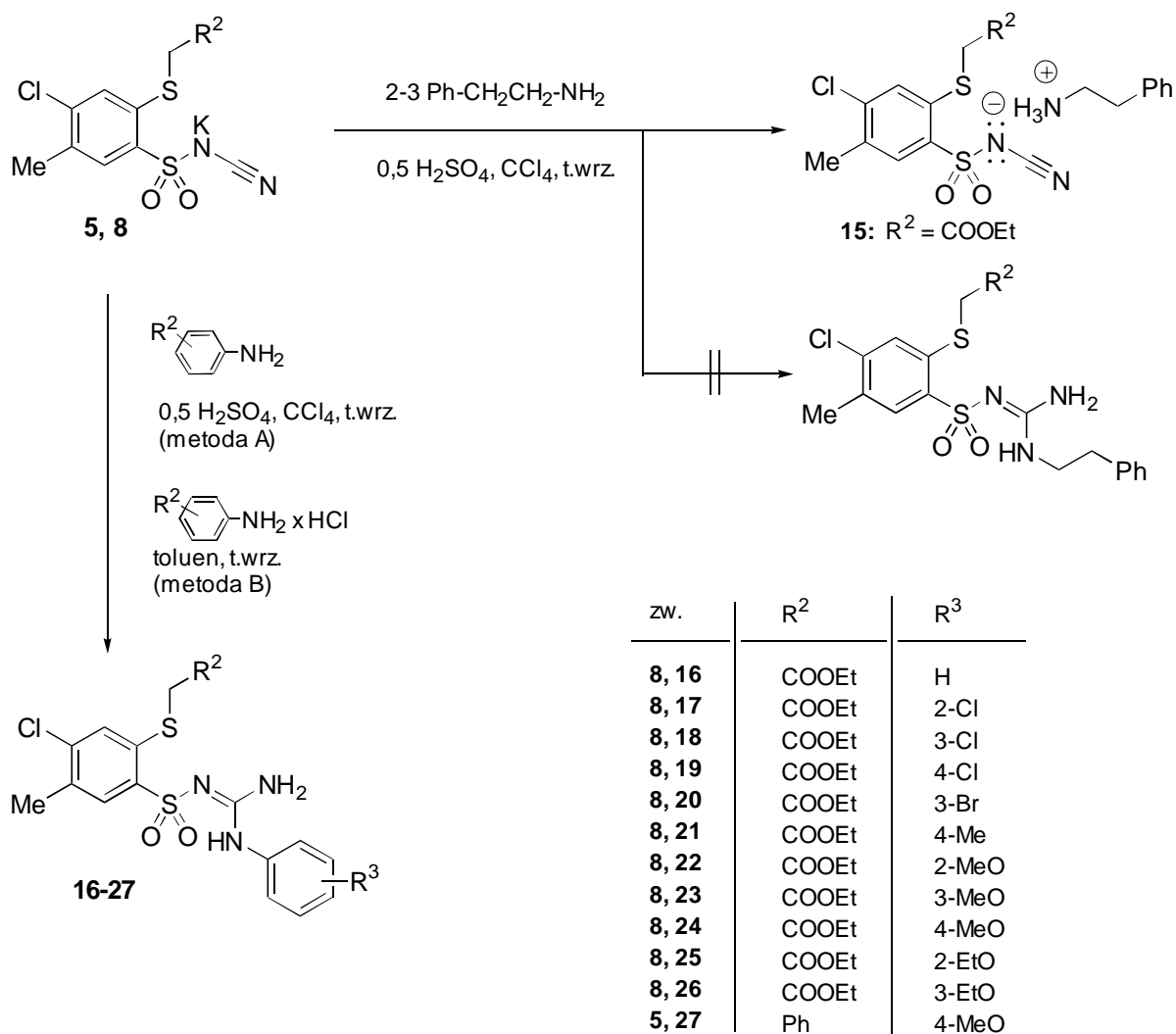
4.1.2. *Badania nad możliwościami wykorzystania soli potasowych N-(4-chlorobenzosulfonylo)cyjanamidów do syntezy kolejnych szeregów nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu*

4.1.2.1. *Syntezy N-podstawionych N'-[4-chloro-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]guanidyn w reakcjach N-(4-chlorobenzosulfonylo)cyjanamidów z niektórymi N-nukleofilami*

Przeprowadzając reakcje soli potasowych N-[4-chloro-5-metylo-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]cyjanamidów z równoważnikową ilością H₂SO₄ i aminami pierwszorzędowymi (Schemat 7) lub hydrazynami (Schemat 9) stwierdzono, że ich przebieg jest zależny od rodzaju i zasadowości użytego nukleofilu. Produktem reakcji soli potasowej **8** z nadmiarem 2-fenyletyloaminy, przeprowadzonej w środowisku wrzącego czterochlorku węgla w obecności równoważnikowych ilości H₂SO₄, okazała się jego sól aminowa **15**, tj. N-cyjano-4-chloro-2-etoksykarbonylometylotio-5-metylobenzenosulfonamid 2-fenyletyloaminiowy. Natomiast przeprowadzone w analogicznych warunkach (metoda A) reakcje soli potasowych **5** lub **8** z aryloaminami pozwoliły na otrzymanie z dobrą wydajnością (55-92%) zamierzonych N-arylo-N'-[4-chloro-5-metylo-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]guanidyn **16-27**. Niektóre z tych związków (**16-18**) otrzymano również z dobrą wydajnością (76-92%) przeprowadzając reakcje wspomnianej soli **5** z równomolową ilością chlorowodoru odpowiednich aryloamin w środowisku wrzącego toluenu (metoda B) (Schemat 7, publikacja **P2**).

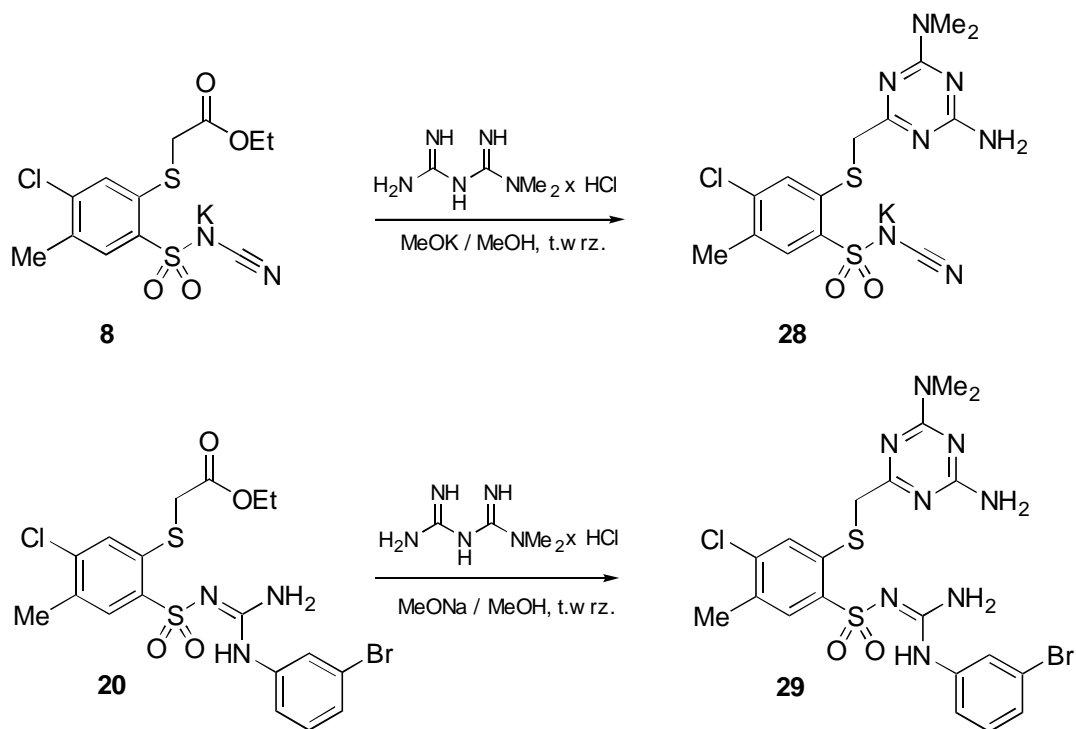
W badaniach strukturalnych (¹H-NMR) stwierdzono, że sulfonyloguanidyny **16-27** występują w stabilnej, sulfonyloiminowej odmianie tautomerycznej z wolną grupą NH₂ przy węglu guanidynowym. Relatywnie większą trwałość tautomeru sulfonyloiminowego potwierdzały również wyniki kwantowo-chemicznych obliczeń względnej energii możliwych tautomerów w próżni, przeprowadzonych metodą *ab initio* Hartree-Fock (RHF/6-31G**), na przykładzie związku **16** (publikacja **P2**).

Schemat 7



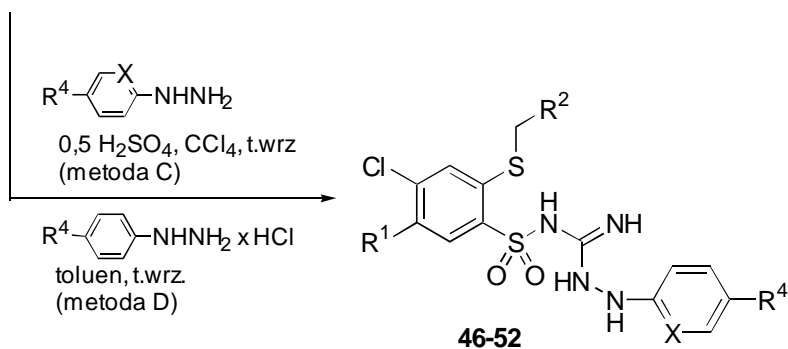
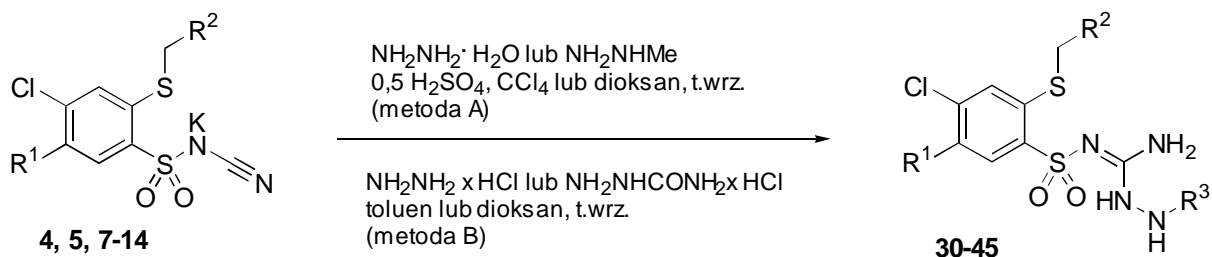
Obecność grupy etoksykarbonylowej w strukturach soli potasowej *N*-(4-chlorobenzoylo)sulfonylo)cyjanamidu **8** i *N*-(4-chlorobenzoylo)sulfonylo)guanidynu **16-26** otwiera liczne możliwości syntezy ich pochodnych w typowych reakcjach aminolizy i cyklocondensacji. Przykładowo wykazano, że zarówno sól potasowa *N*-(4-chlorobenzoylo)sulfonylo)cyjanamidu **8**, jak i *N*-(4-chlorobenzoylo)sulfonylo)guanidyna **20**, reagując z 1,1-dimetylobiguanidem tworzą odpowiednio *N*-cyjano-4-chloro-2-[2-amino-6-dimetyloamino-1,3,5-triazyn-4-ylo)metylotio]-5-metylobenzoylo)sulfonylo)guanidynian potasu **28** lub *N*-(3-bromofenylo)-*N'*-(4-chloro-2-[(2-amino-6-dimetyloamino-1,3,5-triazyn-4-ylo)metylotio]-5-metylobenzoylo)sulfonylo)guanidynę **29** (Schemat 8, publikacja **P2**).

Schemat 8



Zobrazowane na Schemacie 9 wyniki przeprowadzonych w pracy badań nad reakcjami soli potasowych *N*-(4-chlorobenzenosulfonyl)cyjanamidów **4**, **5** i **7-14** z hydrazynami, w obecności równoważnikowych ilości mocnego kwasu mineralnego, wykazały, że kierunki ich przebiegu zależą od rodzaju użytej hydrazyny i prowadzą do jednej z dwóch stabilnych odmian tautomerycznych pochodnych aminoguanidyny, tj. tautomerów sulfonyloiminowych **30-45** lub sulfonyloaminowych **46-52**. Stosując do reakcji wodzian hydrazyny lub metylohydrazynę (metoda A), względnie chlorowodorki hydrazyny lub semikarbazydu (metoda B), uzyskano odpowiednio 3-amino-2-[4-chloro-2-(R^2 -metylotio)-5- R^1 -benzenosulfonyl]guanidyny **30-43** oraz analogowe 2-[4-chloro-5-metylo-2-(R^2 -metylotio)benzenosulfonyl]-3-ureidoguanidyny **44** i **45**. Natomiast w reakcjach z arylohydrazynami (metoda C) lub ich chlorowodorkami (metoda D), otrzymano 3-aryloamino-1-[4-chloro-5-metylo-2-(R^2 -metylotio)benzenosulfonyl]guanidyny **46-52** (Schemat 9, publikacje **P3**, **P4** i **P5**).

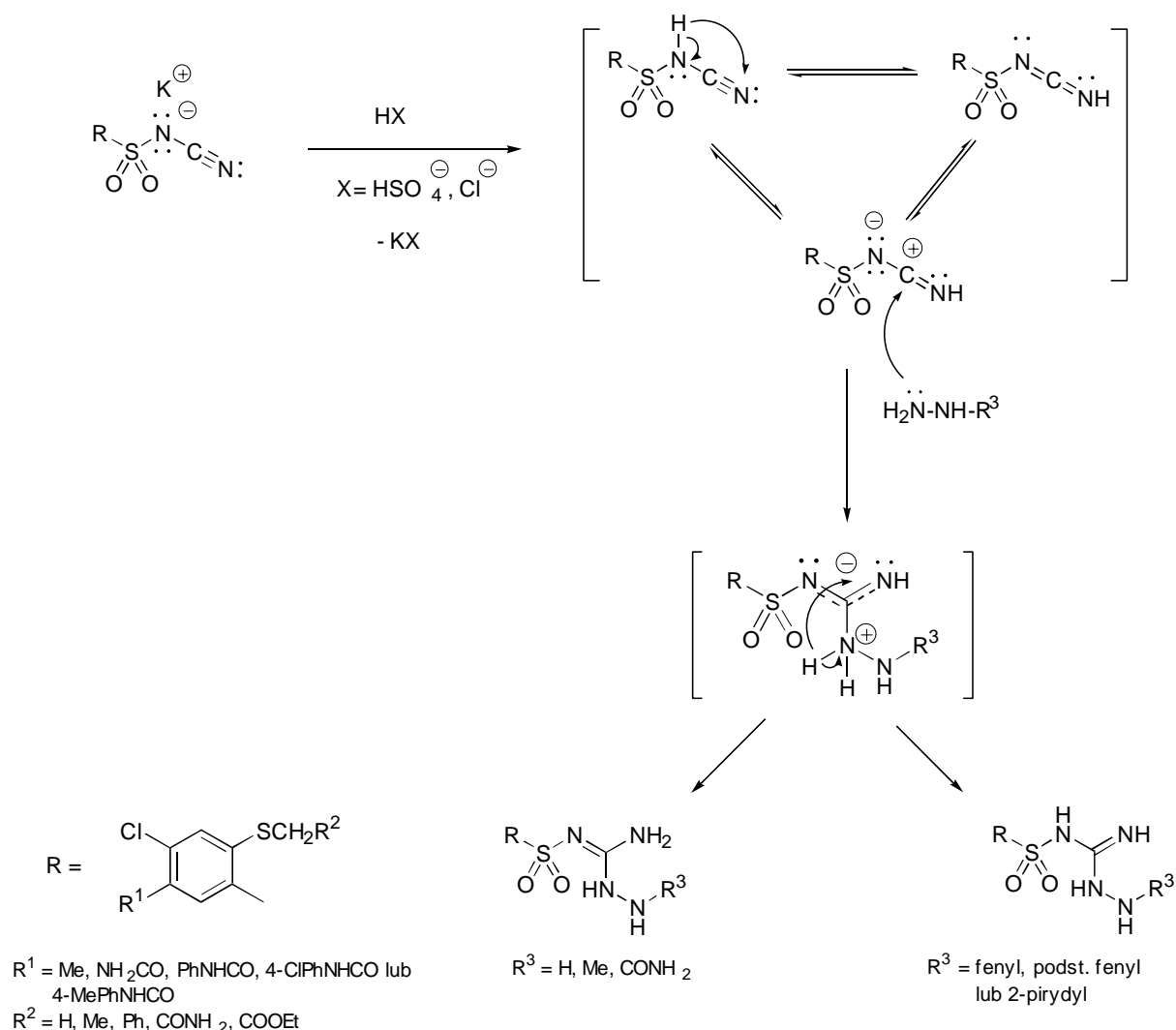
Schemat 9



zw.	metoda	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X
4, 30	B	Me	H	H		
7, 31	A	Me	Me	H		
5, 32	A	Me	Ph	H		
8, 33	A	Me	COOEt	H		
9, 34	B	Me	CONH ₂	H		
10, 35	B	H ₂ NCO	COOEt	H		
11, 36	B	H ₂ NCO	Ph	H		
12, 37	B	PhNHCO	Ph	H		
13, 38	B	4-Cl-PhNHCO	Ph	H		
14, 39	B	4-Me-PhNHCO	Ph	H		
4, 40	A	Me	Me	Me		
5, 41	A	Me	Ph	Me		
8, 42	A	Me	COOEt	Me		
13, 43	A	4-Cl-PhNHCO	Ph	Me		
5, 44	B	Me	Ph	CONH ₂		
8, 45	B	Me	COOEt	CONH ₂		
4, 46	C	Me	Me		H	CH
5, 47	C	Me	Ph		H	CH
8, 48	C	Me	COOEt		H	CH
5, 49	C	Me	Ph		NO ₂	CH
5, 50	C	Me	Ph		H	N
5, 51	D	Me	Ph		Me	CH
8, 52	D	Me	COOEt		Me	CH

Prawdopodobny mechanizm omawianych reakcji przedstawiono na schemacie 10 (publikacja P3)

Schemat 10

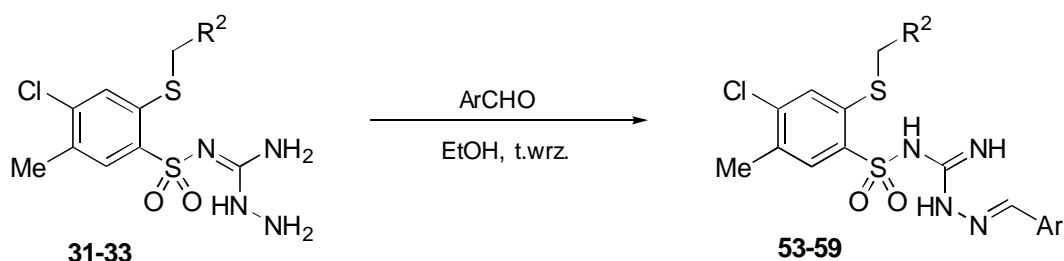


Obecność w strukturze niektórych spośród otrzymanych w niniejszej pracy *N*-amino-*N'*-(4-chlorobenzenosulfonylo)guanidyn ugrupowania aminoguanidynowego zawierającego dwie (30-39) lub jedną wolną grupą aminową (40-45) stwarzała liczne możliwości ich dalszych przemian chemicznych, z których przedstawione dalej przemiany w reakcjach z aldehydami, biacylami lub 3,4-di(hydroksy- lub alkoksy)-3-cyklobuteno-1,2-dionami były podyktowane dążeniem do otrzymania kolejnych nowych sulfonamidów o spodziewanej aktywności przeciwnowotworowej.

4.1.2.2. Syntezy 3-arylidenoamino-1-[4-chloro-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]guanidyn i 1-arylideno-2-[4-chloro-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]-3-metyloaminoguanidyn w reakcjach wybranych pochodnych N-amino-N'-(4-chlorobenenosulfonylo)guanidyny z aldehydami

Obecność dwóch wolnych grup aminowych w strukturze pierwszego szeregu wybranych do badań 3-amino-2-[4-chloro-5-metylo-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]guanidyn **31-33** sugerować może ewentualność alternatywnego przebiegu ich reakcji kondensacji z aldehydami, z udziałem grupy NH₂ w pozycjach 1 lub 3 ugrupowania guanidynowego. Uwzględniając jednak tautomerię aminowo-iminową ugrupowania guanidynowego i możliwość migracji protonu z atomu N¹ do N², można było oczekiwać relatywnie wyższej nukleofilowości grupy N³-NH₂ i jej podatności na kondensację z aldehydami. Znalazło to potwierdzenie w badaniach strukturalnych produktów kondensacji **53-59**, tj. 3-arylidenoamino-1-[4-chloro-5-metylo-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]guanidyn, które z wydajnością 53-97% otrzymano ogrzewając wspomniane aminoguanidyny **31-33** z aryloaldehydami w środowisku wrzącego etanolu (Schemat 11, publikacja **P4**).

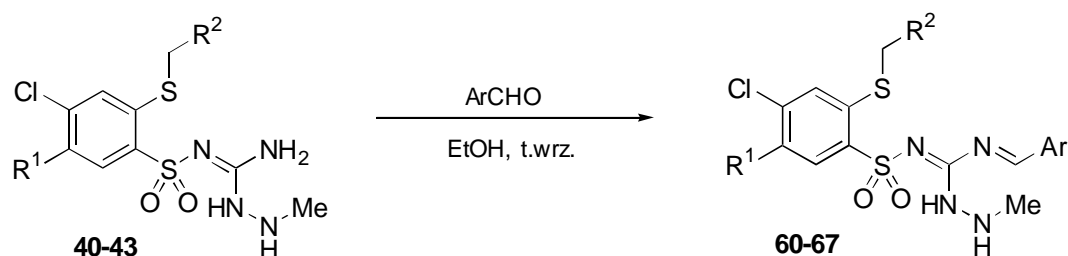
Schemat 11



zw.	R ²	Ar
31, 53	Me	Ph
32, 54	Ph	Ph
31, 55	Me	5-NO ₂ -2-tienyl
32, 56	Ph	5-NO ₂ -2-tienyl
33, 57	COOEt	5-NO ₂ -2-tienyl
32, 58	Ph	5-NO ₂ -2-furyl
33, 59	COOEt	5-NO ₂ -2-furyl

Celowym wydawało się również zbadanie przebiegu analogowych reakcji aldehydów z 3-amino-2-[4-chloro-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]guanidynami **40-43**, zawierającymi wolną grupę aminową w pozycji 1 ugrupowania guanidynowego i grupę metylową przy *N*-terminalnym atomie azotu ugrupowania hydrazynowego. Ich produktami zgodnie z oczekiwaniem okazały się 1-arylideno-2-[4-chloro-2-(R²-metylotio)-5-R¹-benzenosulfonylo]-3-metyloaminoguanidyny **53-59** wyodrębnione z wydajnością 68-92% (Schemat 12, publikacja **P4**).

Schemat 12



zw.	R ¹	R ²	Ar
40, 60	Me	Me	Ph
41, 61	Me	Ph	Ph
40, 62	Me	Me	5-NO ₂ -2-tienyl
41, 63	Me	Ph	5-NO ₂ -2-tienyl
42, 64	Me	COOEt	5-NO ₂ -2-tienyl
41, 65	Me	Ph	5-NO ₂ -2-furyl
42, 66	Me	COOEt	5-NO ₂ -2-furyl
43, 67	4-Cl-PhNHCO	Ph	5-NO ₂ -2-tienyl

4.1.2.3. Syntezy 4-chloro-2-(R²-metylotio)-N-(1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidów i 1-[4-chloro-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]-3-(2-oksobutyl-3-ylidenoimino)guanidyn w reakcjach N-amino-N'-(4-chlorobenzenosulfonylo)guanidyn z niektórymi biacylami lub 3,4-dihydroksy-3-cyklobuteno-1,2-dionem

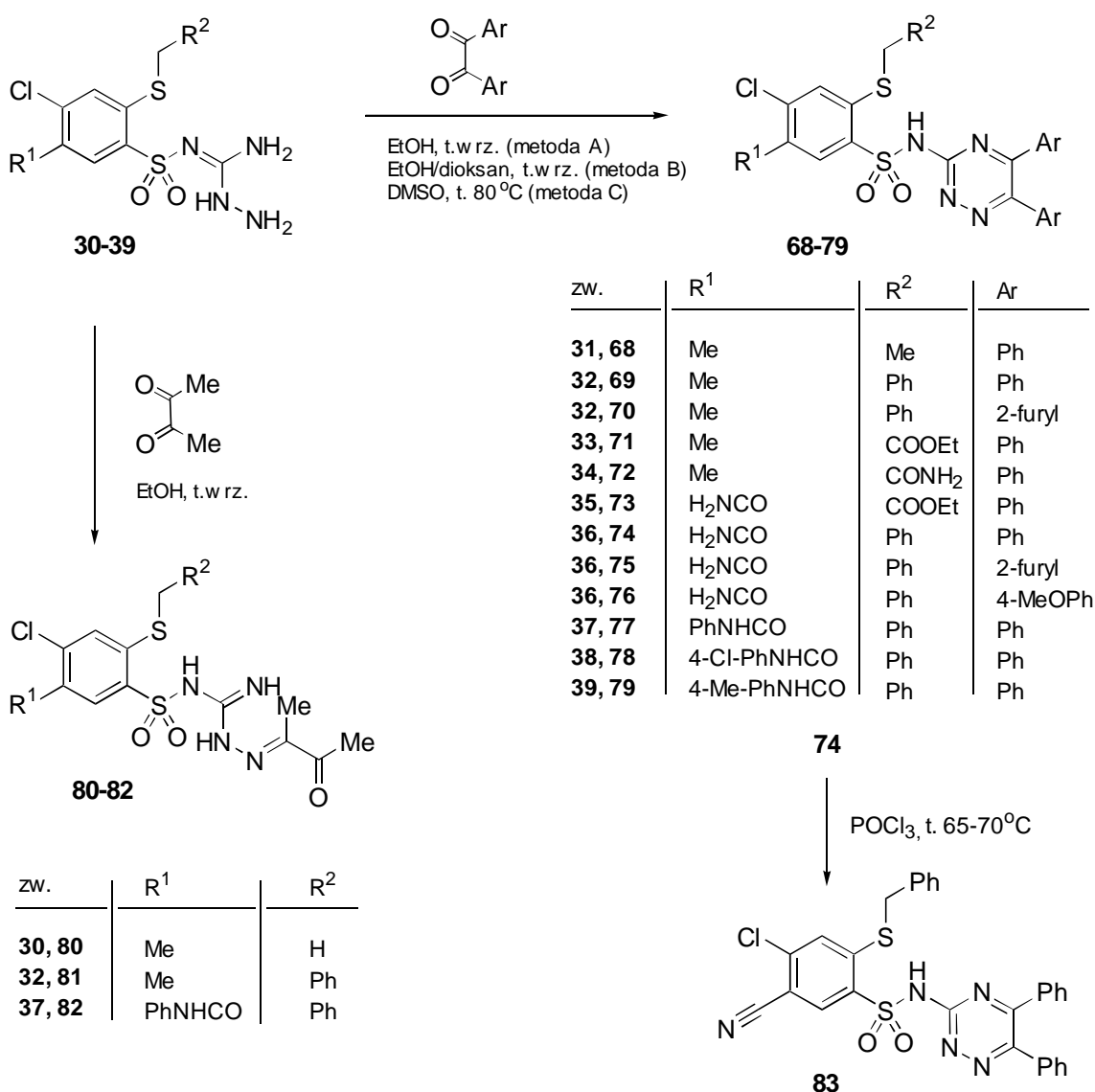
Przeprowadzając reakcje 3-amino-[4-chloro-2-(R²-metylotio)-5-R¹-benzenosulfonylo]guanidyn z biacylami stwierdzono, że ich przebieg jest zależny od rodzaju użytego biacylu i prowadzi do produktów cyklokondensacji lub tylko kondensacji z udziałem grupy NH₂ w pozycji 3 ugrupowania guanidynowego.

Wykazano, że reakcje aminoguanidyn **31-39** z 1,2-diaryloetano-1,2-dionami, takimi jak dibenzoil, di(4-metoksybenzoil) lub 2,2'-difuroil, przebiegają z utworzeniem 4-chloro-2-(R²-metylotio)-5-R¹-N-(5,6-diarylo-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamidów **68-79**.

Zauważono przy tym, że reakcje te w środowisku etanolowym (metoda A) przebiegają korzystnie tylko w przypadkach stosowania wyjściowych aminoguanidyn o względnie dobrej rozpuszczalności (**31-34**, R¹ = Me). Natomiast zapewnienie korzystnego przebiegu reakcji z trudno rozpuszczalnymi aminoguanidynami **35-39** wymagało zastąpienia etanolu jego mieszaniną z dioksanem (metoda B) lub bezwodnym DMSO (metoda C). Z kolei stwierdzono, że prowadzone w analogicznych warunkach reakcje aminoguanidyn **30**, **32** i **37** z diacetylem przebiegają w odmienny sposób i pozwalają na otrzymanie z dobrą wydajnością (65-89%) 1-[4-chloro-2-(R²-metylotio)-5-R¹-benzenosulfonylo]-3-(2-oksobutyl-3-ylidenoimino)guanidyn **80-82** (Schemat 13, publikacja **P5**).

Uwzględniając dalsze możliwości modyfikacji struktury otrzymanych N-(triazynylo)benzenosulfonamidów **73-76**, ukierunkowane dążeniem do poznania ich zależności struktura chemiczna - aktywność przeciwnowotworowa, przykładowo otrzymano zamierzony 2-benzylotio-4-chloro-5-cyjano-N-(5,6-difenylo-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzenosulfonamid **83** (wyd. 85%) w typowej reakcji POCl₃ z grupą CONH₂ wyjściowego benzamidu **74** (Schemat 13, publikacja **P5**).

Schemat 13

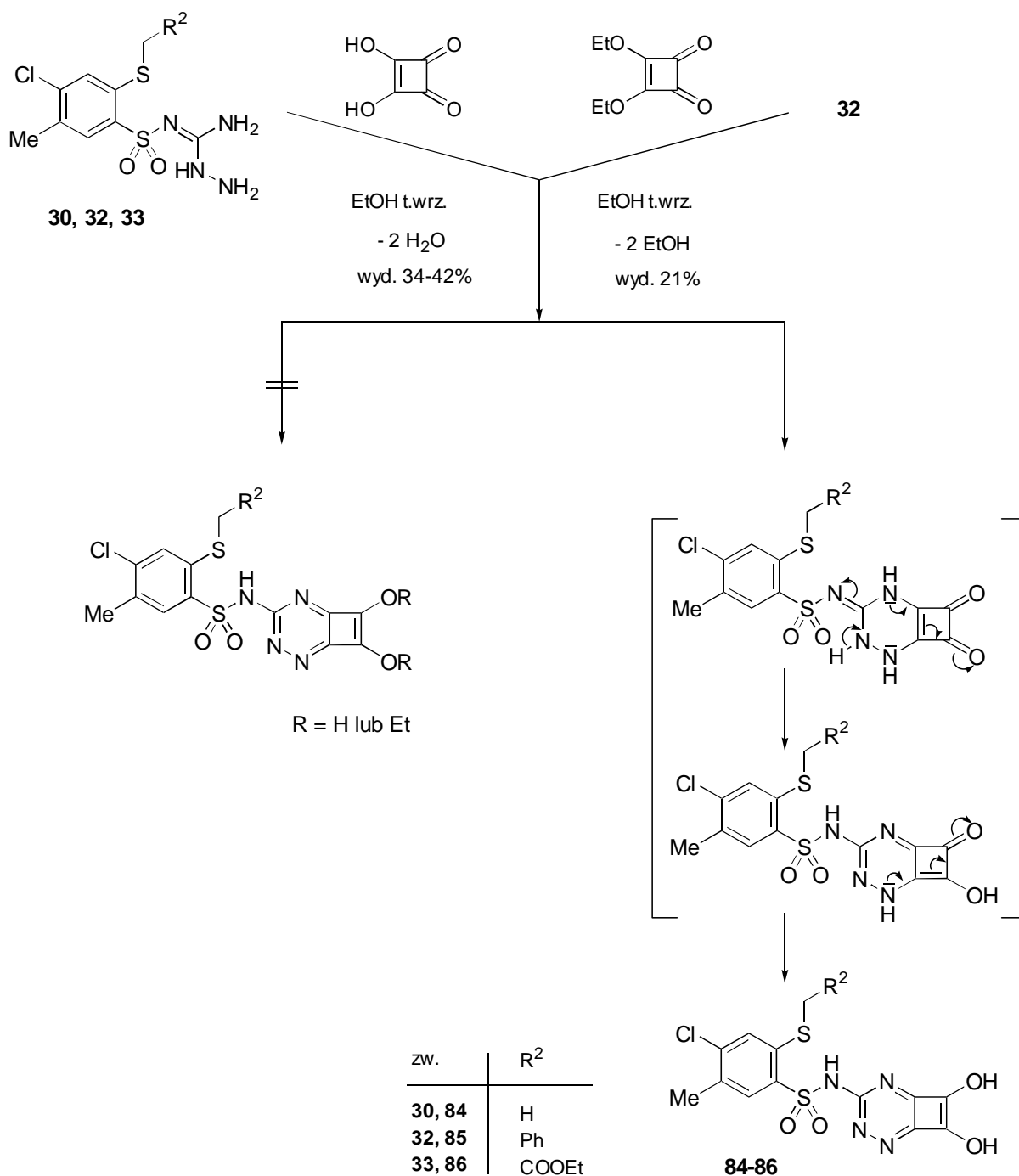


Podejmując z kolei badania nad reakcjami aminoguanidyn **30**, **32** i **33** z 3,4-dihydroksi-3-cyklbuteno-1,2-dionem (kwas kwadratowy) można było oczekiwać ich kilku alternatywnie zbudowanych produktów, powstających z udziałem jednej lub dwóch grup aminowych ugrupowania aminoguanidynowego oraz grup hydroksylowych lub karbonylowych 3,4-dihydroksi-3-cyklbuteno-1,2-dionu – podobnie do znanych z piśmiennictwa alternatywnych produktów reakcji 3,4-di(hydroksy- lub alkoksy)-3-cyklbuteno-1,2-dionów z aminami lub hydrazynami [165-169].

Przeprowadzając omawiane reakcje aminoguanidyn **30**, **32** i **33** w środowisku wrzącego etanolu stwierdzono (publikacja **P5**), że ich głównymi produktami są odpowiednie 4-chloro-5-metylo-2-(R²-metylotio)-*N*-(1,2-dihydroksycyklbuta[e]1,2,4-triazyn-3-yl)

benzenosulfonamidy **84-86**, wydrebnione z wydajnością 34-42%. Stwierdzono ponadto, że reakcja aminoguanidyny **32** z 3,4-dietoksy-3-cyklobuteno-1,2-dionem przebiega również z utworzeniem sulfonamidu **85** (wyd. 21%). Oparty na tych spostrzeżeniach, proponowany mechanizm przebiegu omawianych reakcji przedstawiono na Schemacie 14 (publikacja **P5**).

Schemat 14

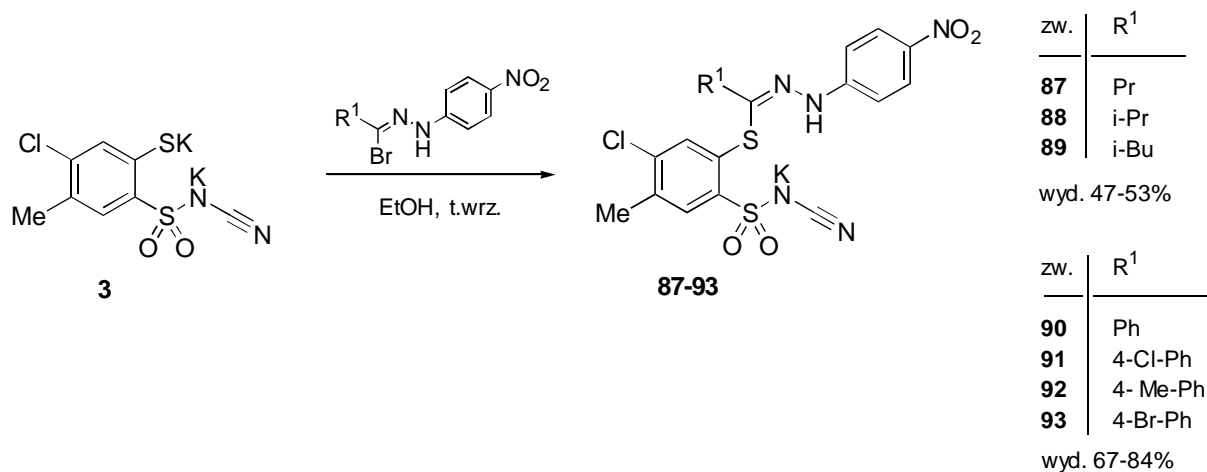


4.1.3. Syntezy *S*-podstawionych pochodnych 4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonamidu w reakcjach bromków kwasów hydrazonowych z solą dipotasową *N*-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)cyjanamidu lub 4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonamidem

Znane z aktywności przeciwnowotworowej pochodne 4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu posiadają w pozycji 2 wolną grupę SH [62-71], a tylko nieliczne z nich ugrupowanie S-CH₂-R, w którym R jest wodorem [170] lub heteroarylem [171]. W pracy niniejszej stwierdzono jednak, że aktywnością przeciwnowotworową są również obdarzone liczne 4-chloro-2-(R-CH₂-S)-5-metylobenzenosulfonamidy, w których R jest metylem, fenylem, grupą karboksamidową lub alkoksykarbonylową. Skłoniło to do zbadania przebiegu reakcji tytułowych w celu otrzymania i poznania aktywności przeciwnowotworowej niektórych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu zawierających podstawnik elektroakceptorowy związany bezpośrednio z atomem siarki w pozycji 2.

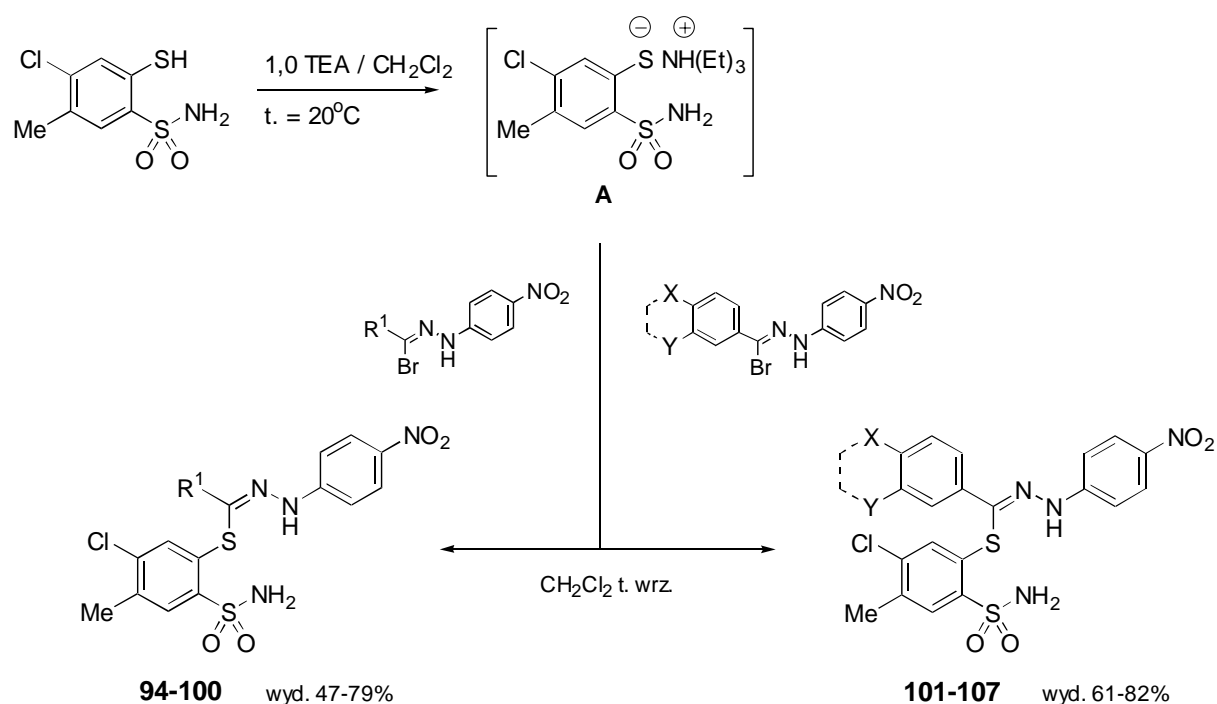
Przeprowadzając reakcje soli dipotasowej *N*-(4-chloro-2-merkapto-5-metylobenzenosulfonylo)cyjanamidu **3** z bromkami kwasów hydrazonowych [172-175] w etanolu uzyskano odpowiednio do użytych bromków zamierzone *S*-[5-chloro-2-(cyjanoamidano)sulfonylo-4-metylofenylo]-*N*-(4-nitrofenylo)alkanotiohidrazoniany potasowe **87-89** i *S*-[5-chloro-2-(cyjanoamidano)sulfonylo-4-metylofenylo]-*N*-(4-nitrofenylo)benzotiohidrazoniany potasowe **90-93** (Schemat 15, publikacja **P6**).

Schemat 15



Z kolei zamierzone analogowe *N*-(4-nitrofenylo)tiohydrazoniany *S*-(5-chloro-4-metylo-2-sulfoamioilofenylo) **94-107**, uzyskano z dobrą lub umiarkowaną wydajnością podczas ogrzewania bromków kwasów hydrazonowych z roztworem (5-chloro-4-metylo-2-sulfoamio)tiofenolanu trietyloaminiowego **A** w chlorku metylenu (Schemat 16, publikacja **P6**).

Schemat 16



zw.	R ¹
94	Et
95	Pr
96	i-Pr
97	i-Bu
98	t-Bu
99	C ₅ H ₁₁
100	CH ₂ CH ₂ Ph

zw.	X	Y
101	H	H
102	Cl	H
103	NO ₂	H
104	Me	H
105	MeO	H
106	HO	Br
107	-CH=CH-CH=CH-	

4.2. Syntezy pochodnych 4-chloro-2-merkapto-*N*-(4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidu, potencjalnych inhibitorów integrazy HIV-1

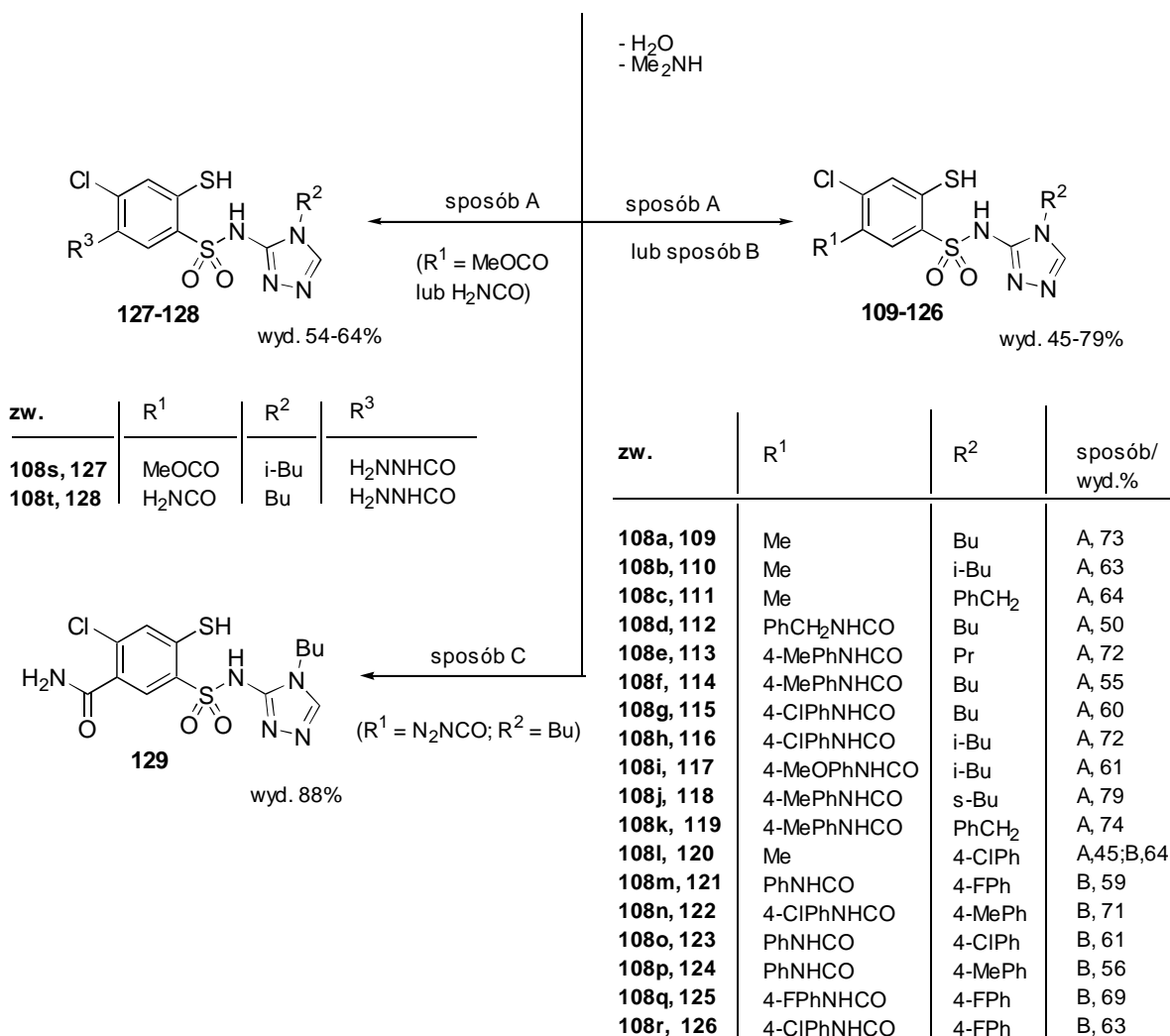
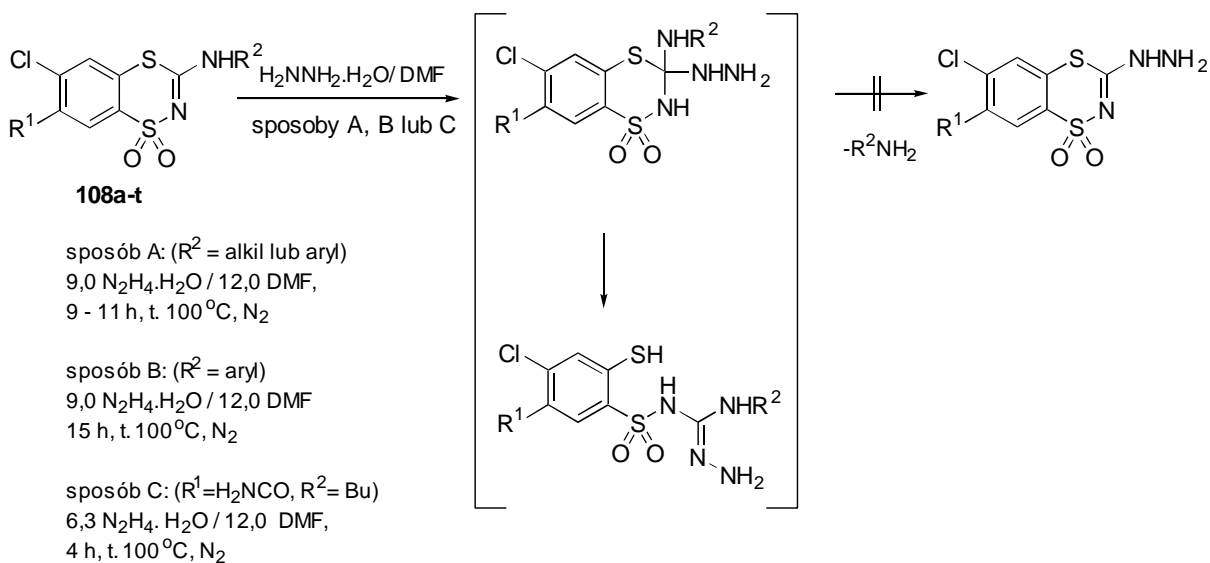
Znane z interesującej aktywności przeciw-HIV pochodne 4-chloro-2-merkapto-*N*-(1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidu [62,63] w badaniach nad mechanizmem ich działania AIDS-przeciwwirusowego okazały się pierwszymi z poznanych efektywnych inhibitorów integrazy HIV-1 [106].

Analizując zależności struktura chemiczna – aktywność biologiczna znanych 4-chloro-2-merkapto-*N*-(1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidów [106] daje się zauważyć, że ich zdolność hamowania funkcji integrazy HIV-1 jest zależna od rodzaju i położenia podstawnika pierścienia triazolowego i może być też kształtowana efektami elektronowymi podstawników w pozycji 5 pierścienia benzenowego. Wydawało się więc celowym, otrzymanie i poznanie wpływu na integrzę HIV-1 nie opisanych wcześniej analogowych pochodnych 4*H*-1,2,4-triazolu.

Podjmując w tym celu próby otrzymania związków tytułowych w reakcjach 3-(alkilo- lub aryloamino)-6-chloro-1,1-dioksa-1,4,2-benzoditiazyn **108a-t** z wodzianem hydrazyny i *N,N*-dimetyloformamidem, przeprowadzonych według procedury „one-pot” można było oczekiwać ich przebiegu w dwóch głównych kierunkach, w których powstający początkowo produkt addycji hydrazyny do benzoditiazyny (Schemat 17) stabilizuje się przez eliminację aminy (R^2NH_2) i utworzenie odpowiedniej *N*-(benzoditiazyn-3-yl)hydrazyny, względnie przez rozerwanie pierścienia benzoditiazynowego i utworzenie pochodnej *N*-amino-*N'*-(4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonyl)guanidyny, która reagując z obecnym w środowisku *N,N*-dimetyloformamidem tworzy zamierzone pochodne 4-chloro-2-merkapto-*N*-(4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidu (publikacje **P7** i **P8**).

Obecności wspomnianych *N*-(benzoditiazyn-3-yl)hydrazyn w produktach omawianych reakcji nie stwierdzono. W rezultacie, dalsze badania nad przebiegiem tych reakcji koncentrowały się na określeniu korzystnych stosunków molowych substratów oraz parametrów czasu i temperatury, warunkujących otrzymanie zamierzonych 4-chloro-2-merkapto-*N*-(4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidów **109-129** z możliwie dobrą wydajnością, bez znaczącego udziału ubocznie powstających typowych produktów ich utlenienia do disulfidów, a także disulfidów pośrednio wytworzonych *N*-amino-*N'*-(4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonyl)guanidyn.

Schemat 17



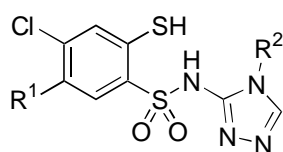
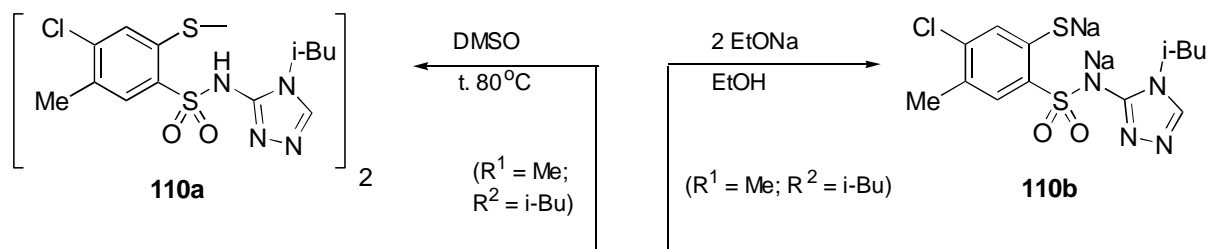
Ogólnie można stwierdzić (publikacje **P7** i **P8**), że korzystny przebieg omawianych reakcji 3-aminobenzoditiazyn **108a-t** (Schemat 17) wymaga stosowania temperatur około 100°C, dużych nadmiarów wodzianu hydrazyny (9 M ekwiwalentów) i *N,N*-dimetyloformamidu (12 M ekwiwalentów) oraz atmosfery gazu obojętnego.

Przedstawione na Schemacie 17 trzy warianty opracowanej metody otrzymywania zamierzonych związków są odpowiednio dostosowane do różnic w reaktywności wyjściowych 3-aminobenzoditiazyn **108a-t**. Stwierdzono bowiem, że w porównywalnych warunkach omawiane reakcje 3-alkiloaminobenzoditiazyn **108a-k** przebiegają w czasie 9-11 godzin (sposób A), natomiast 3-aryloaminobenzoditiazyn **108l-t** w czasie wydłużonym do około 15 godzin. Stwierdzono również, że analogowe reakcje estru metylowego kwasu 6-chloro-3-(2-metylopropyloamino)-1,1-diokso-1,4,2-benzoditiazyno-7-karboksyowego **108s** lub amidu kwasu 3-butyloamino-6-chloro-1,1-diokso-1,4,2-benzoditiazyn-7-karboksyowego **108t** przeprowadzone sposobem A, przebiegają z równoczesną hydrazynolizą obecnych w ich cząsteczkach grup (R^1) metoksykarbonylowej lub karbamoilowej i utworzeniem odpowiednich 4-chloro-5-karbazoilo-2-merkaptto-*N*-{4-[(2-metylopropylo)- lub butylo]-4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo}benzenosulfonamidów **127** i **128**. Stwierdzono ponadto, że analogiczna reakcja wspomnianego amidu **108t** z wodzianem hydrazyny w temperaturze 100° przy obniżonym nadmiarze wodzianu hydrazyny (6,3 M ekwiwalentów) i czasie skróconym do 4 godzin (sposób C), pozwala na otrzymanie zamierzonego 4-chloro-5-karbamoilo-2-merkaptto-*N*-(4-butylo-4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamidu **129** z wydajnością 88% (publikacja **P7**).

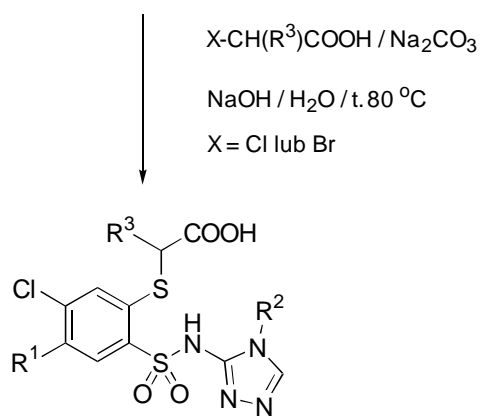
Obecność wolnej grupy tiolowej w strukturze otrzymanych pochodnych 4-chloro-2-merkaptto-*N*-(4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamidu **109-129** stwarza liczne możliwości ich dalszych przemian chemicznych.

Przykładowo stwierdzono, że 4-chloro-2-merkaptto-5-metylo-*N*-[4-(2-metylopropylo)-4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo]benzenosulfonamid **110** może być łatwo utleniony do disulfidu **110a**, lub w reakcji zobojętnienia przeprowadzony w trwałą, rozpuszczalną w wodzie sól disodową **110b** (Schemat 18, publikacja **P7**). Z kolei w typowych reakcjach 2-merkaptto-benzenosulfonamidów **109-111**, **113** i **129** z kwasami α -halogenoalkanokarboksyłowymi, ukierunkowanych dążeniem do poznania zależności struktura – aktywność biologiczna, otrzymano zamierzone kwasy 2-{5-chloro-4- R^1 -2-[(4- R^2 -4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)aminosulfonylo]fenylotio}alkanowe **130-141** (Schemat 18, publikacje **P7** i **P8**).

Schemat 18



109-111, 113, 129



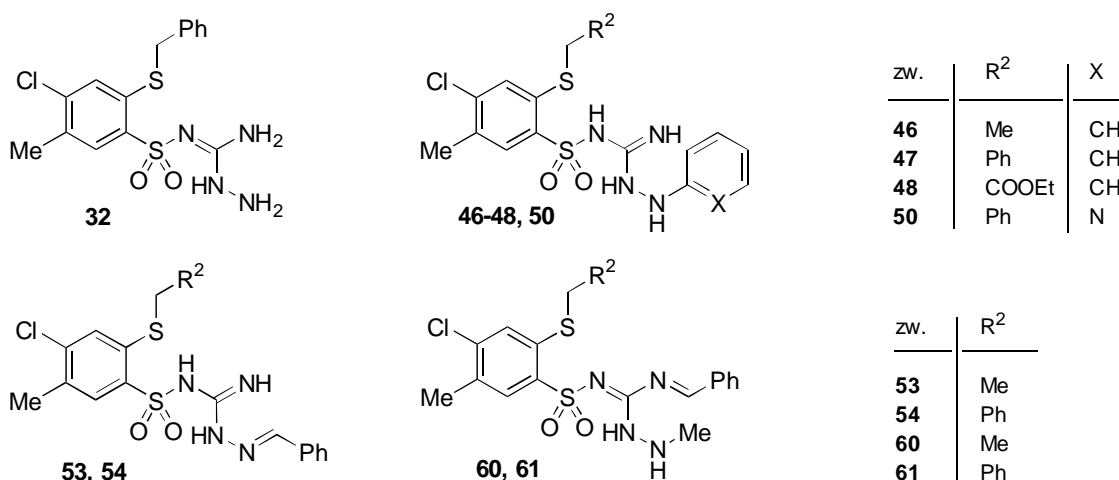
130-141

zw.	R ¹	R ²	R ³
109, 130	Me	Bu	H
109, 131	Me	Bu	Me
109, 132	Me	Bu	Et
109, 133	Me	Bu	Pr
109, 134	Me	Bu	i-Pr
110, 135	Me	i-Bu	Pr
110, 136	Me	i-Bu	Bu
110, 137	Me	i-Bu	C ₆ H ₁₃
111, 138	Me	PhCH ₂	i-Pr
111, 139	Me	PhCH ₂	H
129, 140	H ₂ NCO	Bu	H
113, 141	4-MePhNHCO	Pr	H

4.3. Omówienie wyników badań biologicznych

4.3.1. Aktywność przeciwnowotworowa *in vitro* niektórych spośród otrzymanych w pracy nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu

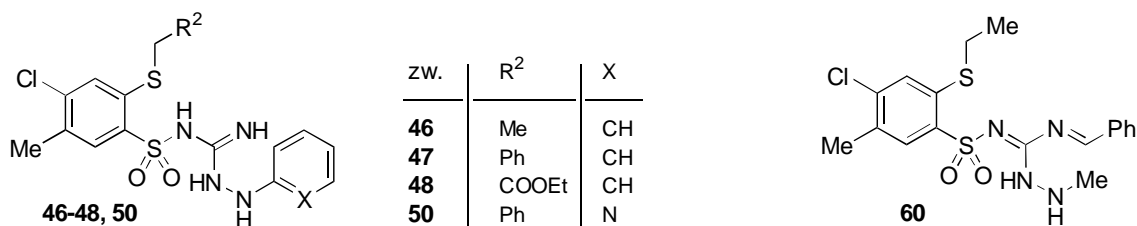
Zmierzając do poznania właściwości biologicznych otrzymanych w pracy nowych sulfonamidów do oceny oczekiwanej aktywności przeciwnowotworowej wytypowano początkowo 9 związków, reprezentujących cztery szeregi pochodnych *N*-[4-chloro-2-(R^2 -metylotio)-5-metylobenzenosulfonylo]guanidyny **32**, **46-48**, **50**, **53**, **54**, **60** i **61**.



Ocenę wykonał Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, University of Greifswald, w testach *in vitro* na jedenastu liniach komórkowych ludzkich nowotworów: pęcherza moczowego (RT-4, RT-112 i 5637), przełyku (KYSE-70, KYSE-510 i KYSE-520), trzustki (YPAC, DAN-G), szyjki macicy (SISO) płuc (LCLC-103H) i piersi (MCF7). Wyniki przedstawiono w wartościach oznaczonego IC_{50} (stężenie powodujące zahamowanie wzrostu 50% populacji komórek nowotworowych). Przyjętym kryterium selekcji związków aktywnych w zastosowanych badaniach był poziom $IC_{50} < 40,0 \mu M$, a cis-platynę użyto jako związek referencyjny.

Zależne od struktury działanie przeciwnowotworowe wykazują 3-aryloamino-1-[4-chloro-2-(R^2 -metylotio)-5-metylobenzenosulfonylo]guanidyny (**46-48**, **50**) i 1-benzylideno-2-(4-chloro-2-etylotio-5-metylobenzenosulfonylo)-3-metyloaminoguanidyna (**60**) (Tabela 1).

Na zwrócenie uwagi wydaje się zasługiwać względnie wysoka aktywność związku **47** w odniesieniu do wszystkich badanych linii komórek nowotworowych ($IC_{50} = 2,4 - 8,1 \mu M$), porównywalna lub zbliżona do aktywności cis-platyny (Tabela 1, publikacje **P3** i **P4**).

Tabela 1. Aktywność przeciwnowotworowa *in vitro* związków **32**, **46-48**, **50**, **53**, **54**, **60** i **61***

Typ nowotworu Linia komórkowa	IC ₅₀ [μM]					
	Nr związku					
	Cis-platyna	46	47	48	50	60
N. pęcherza moczowego						
RT-4	3,7	17,5	3,5	4,8	8,1	> 40,0
RT-112	2,1	22,5	5,3	9,6	13,5	> 40,0
5637	0,3	16,9	3,0	4,2	5,9	20,4
N. przelyku						
KYSE-70	1,5	25,7	4,3	9,8	9,5	19,1
KYSE-510	0,9	28,1	4,0	6,5	9,1	29,3
KYSE-520	5,0	31,7	5,7	9,9	13,1	17,9
N. trzustki						
YPAC	6,0	27,9	8,1	10,6	15,6	34,5
DAN-G	1,4	24,3	3,4	6,5	9,3	32,1
N. szyjki macicy						
SISO	0,2	17,7	4,9	7,2	11,7	29,6
N. płuc						
LCLC-103H	1,6	8,0	3,4	3,6	10,0	8,7
N. piersi						
MCF7	0,7	11,1	2,4	2,7	4,4	19,9
Wartość średnia	2,1	21,0	4,4	6,8	10,0	26,5

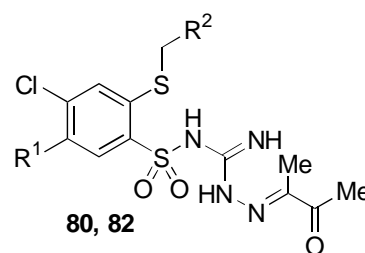
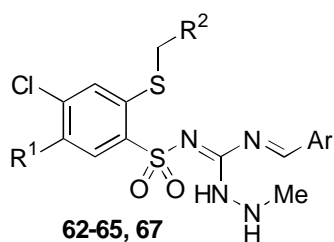
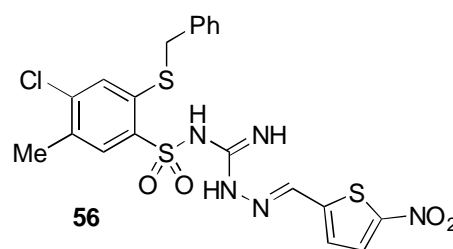
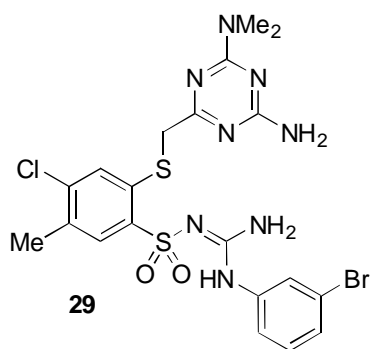
* Związki **32**, **53**, **54** i **61** nie spełniały kryterium selekcji w badaniach na liniach komórkowych raka przelyku (KYSE-510), raka szyjki macicy (SISO) i raka płuc (LCLC-103H) - IC₅₀ > 40,0 μM

Ocenę aktywności przeciwnowotworowej kolejnych spośród otrzymanych i typowanych do badań biologicznych pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu oceniał w testach *in vitro* National Cancer Institute (NCI) Bethesda, USA. Badania przeprowadzono na około 60 liniach komórkowych pochodzących z 9 typów nowotworów ludzkich: białaczki, płuc, okrężnicy, mózgu, czerniaka, jajnika, nerki, prostaty i piersi, w szerokim zakresie stężeń testowanych związków (10⁻⁴ – 10⁻⁸ M).

Parametry GI₅₀ TGI i LC₅₀ wyznaczono na podstawie krzywych przedstawiających zależność procentowego wzrostu komórek nowotworowych od stężenia molowego badanego związku, wyrażonego w skali logarytmicznej (log₁₀M). Określały one interpolowane wartości odpowiadające stężeniom, przy których procentowy wzrost wynosił odpowiednio: +50%

(GI₅₀), 0% (TGI) i -50% (LC₅₀). Za kryterium aktywności przeciwnowotworowej NCI przyjmuje wartości GI₅₀ < 100 μM.

Spośród skierowanych do oceny kolejnych pochodnych *N*-[4-chloro-2-(R²-metylotio)-R¹-benzenosulfonyl]guanidyny **29**, **56**, **62-65**, **67**, **80** i **82** (publikacje **P2**, **P4** i **P5**):



zw.	R ¹	R ²	Ar
62	Me	Me	5-NO ₂ -2-tienyl
63	Me	Ph	5-NO ₂ -2-tienyl
64	Me	COOEt	5-NO ₂ -2-tienyl
65	Me	Ph	5-NO ₂ -2-furyl
67	4-Cl-PhNHCO	Ph	5-NO ₂ -2-tienyl

zw.	R ¹	R ²
80	Me	H
82	PhNHCO	Ph

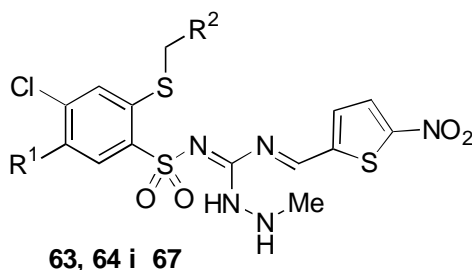
aktywność przeciwnowotworową wykazały związki **63**, **64**, **67** i **82** (Tabele 2, 3 i 4). Związek **64** wyróżnia się zdolnością hamowania wzrostu wszystkich badanych 51 linii komórkowych (GI₅₀ = 0,3 – 42,7 μM), a wysoką aktywność oraz selektywność działania wobec niektórych linii komórkowych wykazały związki: **63** (GI₅₀ = 0,3 – 7,6 μM), **67** (GI₅₀ = 1,3 – 7,9 μM) (Tabela 3) i **82** (GI₅₀ = 0,05 – 7,9 μM) (Tabela 4) (publikacje **P4** i **P5**).

Na zwrócenie uwagi wydaje się zasługiwać fakt, że mała modyfikacja struktury wyróżniającego się aktywnością związku **63**, przez wymianę jego podstawnika 5-nitro-2-tienyloвого na 5-nitro-2-furylowy, prowadzi do związku **65** pozbawionego aktywności w zakresie badanych stężeń (Tabela 2).

Tabela 2. Ogólna charakterystyka aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* związków **29**, **56**, **62-65**, **67**, **80** i **82***

Nr zw.	GI ₅₀ [μM] (wartość średnia)	Liczba linii komórkowych spełniających kryterium aktywności / liczba badanych linii komórkowych. Zakres stężeń cytotoksycznych dla parametrów GI ₅₀ , TGI i LC ₅₀					
		GI ₅₀ [μM]		TGI [μM]		LC ₅₀ [μM]	
		Liczba	Zakres	Liczba	Zakres	Liczba	Zakres
63	33,9	20/51	0,3 – 95,8	3/51	0,8 – 13,9	2/51	8,3 – 84,0
64	19,9	51/51	6,0 – 42,7	41/51	24,7 – 89,9	17/51	51,3 – 95,9
67	42,7	17/53	1,3 – 38,1	2/53	7,6 – 47,7	0/53	-
82	22,4	42/55	0,05 – 97,7	7/55	0,38 – 79,4	1/55	4,83

* Związki **29**, **56**, **62**, **65** i **80** (podane w stężeniu 0,1 mM) nie spełniały kryterium selekcji w przedwstępnym badaniu na trzech liniach komórkowych raka piersi (MCF7), raka płuc (NCI-H460) i raka mózgu (SF-268).

Tabela 3. Aktywność przeciwnowotworowa *in vitro* związków **63**, **64** i **67** wobec wybranych linii komórkowych nowotworów ludzkich (GI₅₀ < 8 μM)

Nr zw.	R ¹ R ²	Wartość średnia GI ₅₀ (μM) dla wszystkich linii	Typ nowotworu Linia komórkowa	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM
63	Me Ph	33,9	Białaczka RPMI-8226	0,3	*	*
			N. płuc HOP-92	7,6	*	*
			N. okrężnicy COLO 205	0,3	0,8	8,3
			HCC-2998	0,3	0,8	84,0
			HCT-116	0,6	*	*
			HCT-15	0,5	*	*
			KM12	2,0	*	*
			Czerniak MALME-3M	0,4	*	*
			SK-MEL-5	0,4	13,9	*
			64	Me COOEt	19,9	N. jajnika OVCAR-5
N. prostaty DU-145	7,4	41,5				*

ciąg dalszy

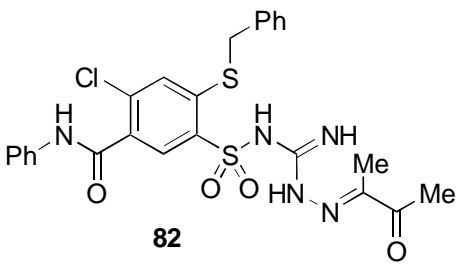
Tabela 3. *cd.*

Nr zw.	R ¹ R ²	Wartość średnia GI ₅₀ (μM) dla wszystkich linii	Typ nowotworu Linia komórkowa	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM
67	4-Cl-PhNHCO Ph	42,7	N. płuc			
			A549/ATCC	6,6	*	*
			NCI-H460	2,5	7,6	*
			HOP-92	4,3	47,7	*
			N. okrężnicy			
			COLO 205	5,9	*	*
			HCC-2998	1,4	*	*
			HCT-116	1,3	*	*
			HT29	7,9	*	*
			SW-620	4,4	*	*
			N. nerki			
			SN12C	3,3	*	*
			N. piersi			
T-47D	6,4	*	*			

* Wartości TGI i LC₅₀ > 100 μM

Podobnie małe modyfikacje struktury wspomnianego związku **63** – polegające na zmianach jego podstawników R² = Ph na R² = COOEt lub R¹ = Me na R¹ = 4-ClPhNHCO – prowadzą do związków o niższej aktywności, znacząco różniących się liczebnością i/lub rodzajem komórek nowotworowych najbardziej wrażliwych na ich działanie (GI₅₀ = 0,3 – 7,6 μM) (Tabela 3, publikacja **P4**).

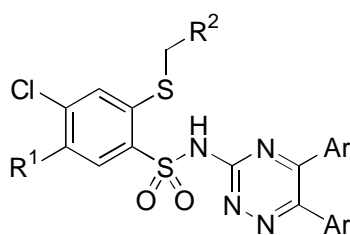
Tabela 4. Aktywność przeciwnowotworowa *in vitro* związku **82** wobec wybranych linii komórkowych nowotworów ludzkich (GI₅₀ < 8 μM)

Wartość średnia GI ₅₀ dla wszystkich linii komórkowych = 22,4 μM	Typ nowotworu Linia komórkowa	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM	
 <p style="text-align: center;">82</p>	Białaczka				
	HL-60(TB)	2,3	24,2	*	
	K-562	5,6	*	*	
	MOLT-4	3,7	56,3	*	
	RPMI-8226	7,0	*	*	
	SR	6,2	*	*	
	N. płuc				
	EKVX	6,6	39,5	*	
	HOP-62	0,05	0,4	4,8	
	N. okrężnicy				
	HCT-116	0,3	*	*	
	N. mózgu				
	SF-539	2,8	8,1	*	
	Czerniak				
	M14	1,1	3,9	*	
	N. nerki				
	786-0	0,8	*	*	
	ACHN	7,9	*	*	
	N. prostaty				
DU-145	3,5	*	*		
N. piersi					
MDA-MB-231/ATCC	5,9	*	*		

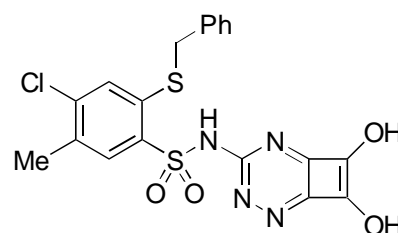
* Wartości TGI i LC₅₀ > 100 μM

Porównanie z kolei struktur dwóch analogowych 1-[4-chloro-2-(R²-metylotio)-5-R¹-benzenosulfonylo]-3-(2-oksobutyl-3-ylidenoimino)guanidyn **80** i **82**, pozbawionej aktywności **80** (Tabela 2, R¹ = Me, R² = H) i wyróżniającej się aktywnością **82** (Tabela 4, R¹ = PhNHCO, R² = Ph) wskazuje na znaczną rolę oraz korzystny wpływ na aktywność przeciwnowotworową efektów elektronoakceptorowych podstawników R¹ i R² (publikacja **P5**).

Przedstawione wyniki oceny aktywności przeciwnowotworowej pochodnych *N*-[4-chloro-2-(R²-metylotio)benzenosulfonylo]guanidyny, skłoniły do przeprowadzenia syntez ich cyklicznych analogów, z których do testów biologicznych skierowano pochodne *N*-(5,6-diarylo-1,2,4-triazyn-3-yl)benzenosulfonamidu **69**, **70**, **72**, **74**, **75**, **77-79** i **83** oraz *N*-(1,2-dihydroksycyklobuta[e]1,2,4-triazyn-3-yl)benzenosulfonamid **85** (publikacja **P5**).



69, 70, 72, 74, 75, 77-79, 83



85

zw.	R ¹	R ²	Ar
69	Me	Ph	Ph
70	Me	Ph	2-furyl
72	Me	CONH ₂	Ph
74	H ₂ NCO	Ph	Ph
75	H ₂ NCO	Ph	2-furyl
77	PhNHCO	Ph	Ph
78	4-Cl-PhNHCO	Ph	Ph
79	4-Me-PhNHCO	Ph	Ph
83	NC	Ph	Ph

Aktywność przeciwnowotworową stwierdzono dla 7 spośród 10 testowanych związków (Tabela 5). Związki **69**, **70**, **79** i **83** hamują wzrost większości badanych linii nowotworowych (wartości średnie GI₅₀ w zakresie 20,9 – 24,5 μM, Tabela 5), a związki **72**, **74** i **78** wyróżniają się aktywnością oraz selektywnością działania wobec jednej lub kilku linii komórek nowotworowych (GI₅₀ = 0,05 – 0,7 μM) (Tabela 6).

Tabela 5. Ogólna charakterystyka aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* związków **69**, **70**, **72**, **74**, **75**, **77-79**, **83** i **85***

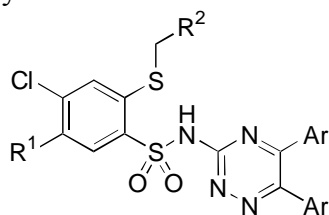
Nr zw.	GI ₅₀ [μM] (wartość średnia)	Liczba linii komórkowych spełniających kryterium aktywności / liczba badanych linii komórkowych. Zakres stężeń cytotoksycznych dla parametrów GI ₅₀ , TGI i LC ₅₀					
		GI ₅₀ [μM]		TGI [μM]		LC ₅₀ [μM]	
		Liczba	Zakres	Liczba	Zakres	Liczba	Zakres
69	20,9	54/55	5,7 – 37,3	53/55	25,2 – 90,3	31/55	59,4 – 97,5
70	24,5	55/56	17,1 – 39,4	49/56	32,5 – 83,1	28/56	60,4 – 96,3
72	45,7	41/56	0,7 – 78,7	16/56	30,1 – 97,6	6/56	68,9 – 93,9
74	35,5	36/56	0,1 – 78,4	20/56	36,9 – 60,0	3/56	73,2 – 92,3
78	30,2	54/55	0,05 – 76,1	22/55	36,5 – 90,0	3/55	74,3 – 90,1
79	22,9	51/52	11,8 – 49,4	40/52	28,6 – 93,7	22/52	57,6 – 98,2
83	24,5	51/53	6,3 – 44,5	39/53	22,6 – 89,5	18/53	61,4 – 95,8

* Związki **75**, **77** i **85**, (podane w stężeniu 0,1 mM) nie spełniały kryterium selekcji w przedwstępnym badaniu na trzech liniach komórkowych raka piersi (MCF7), raka płuc (NCI-H460) i raka mózgu (SF-268).

Daje się zauważyć, że aktywność i spektrum działania przeciwnowotworowego omawianych 4-chloro-5-R¹-2-(R²-metylotio)-N-(5,6-diarylo-1,2,4-triazyn-3-ylo)benzeno-sulfonamidów (Tabele 5 i 6) są zależne przede wszystkim od trafności doboru ich podstawników R¹ i R².

Przykładowa wymiana w związkach **69** i **83** ich podstawników R¹ = Me lub CN na R¹ = H₂NCO prowadzi do związku **74** wyróżniającego się wysoką zdolnością wybiórczego hamowania wzrostu komórek nowotworowych okrężnicy (HT29), mózgu (SNB-75) i czerniaka (SK-MEL-28) (GI₅₀ = 0,1 – 0,5 μM, Tabela 6). Podobnie związek **78** (R¹ = 4-ClPhNHCO) charakteryzuje się wysoką aktywnością wobec komórek RXF 393 raka nerki (GI₅₀ = 0,05 μM), natomiast jego bliski analog **77** (R¹ = PhNHCO) nie wykazywał aktywności w zakresie badanych stężeń (Tabela 5). Również inna modyfikacja struktury związku **69**, przez zmianę grupy R² = Ph na R² = H₂NCO, prowadzi do związku **72** wykazującego silne działanie na komórki SF-539 raka mózgu (GI₅₀ = 0,7 μM, Tabela 6).

Tabela 6. Aktywność przeciwnowotworowa *in vitro* związków **69**, **70**, **72**, **74**, **78**, **79** i **83** wobec wybranych linii komórkowych nowotworów ludzkich

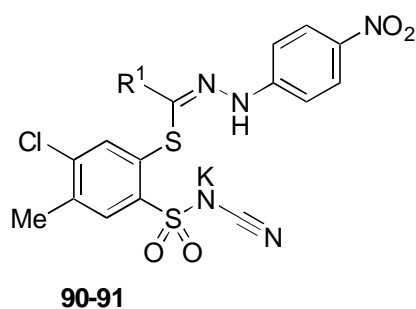


69, **70**, **72**, **74**, **78**, **79**, **83**

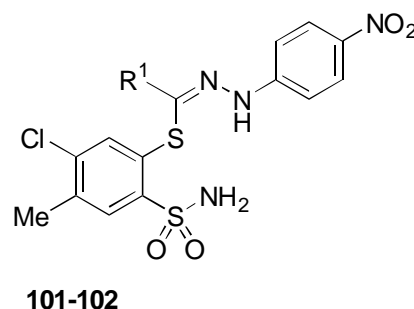
Nr zw.	R ¹ R ² Ar	Wartość średnia GI ₅₀ (μM) dla wszystkich linii	Typ nowotworu Linia komórkowa	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM
69	Me Ph Ph	20,9	Białaczka			
			MOLT-4	15,0	36,8	90,1
			RPMI-8226	11,5	52,8	*
			N. płuc			
			EKVX	5,7	25,2	66,9
			NCI-H322M	14,1	30,9	67,9
70	Me Ph 2-furyl	24,5	N. nerki			
			786-0	14,5	29,8	61,1
72	Me CONH ₂ Ph	45,7	N. prostaty			
			DU-145	15,2	30,7	61,8
74	CONH ₂ Ph Ph	35,5	Czerniak			
			SK-MEL-5	17,5	32,5	60,4
78	4-Cl-PhNHCO Ph Ph	30,2	N. prostaty			
			DU-145	17,1	32,5	61,8
79	Me CONH ₂ Ph	45,7	N. mózgu			
			SF-539	0,7	30,1	93,3
83	CN Ph Ph	24,5	N. jajnika			
			OVCAR-3	19,6	42,8	93,8
			N. okrężnicy			
			HT29	0,1	*	*
74	CONH ₂ Ph Ph	35,5	N. mózgu			
			SNB-75	0,5	37,8	*
			Czerniak			
			SK-MEL-28	0,5	*	*
78	4-Cl-PhNHCO Ph Ph	30,2	N. prostaty			
			DU-145	2,7	41,7	*
79	4-Me-PhNHCO Ph Ph	22,9	Białaczka			
			MOLT-4	15,0	36,5	89,0
78	4-Cl-PhNHCO Ph Ph	30,2	N. nerki			
			RXF 393	0,05	*	*
79	4-Me-PhNHCO Ph Ph	22,9	Białaczka			
			RPMI-8226	11,8	44,8	*
			N. mózgu			
			U251	13,7	28,7	59,9
			Czerniak			
83	CN Ph Ph	24,5	LOX IMVI	13,3	28,6	61,3
			N. piersi			
79	4-Me-PhNHCO Ph Ph	22,9	MDA-MB-435	15,5	35,0	71,1
			N. nerki			
83	CN Ph Ph	24,5	RXF 393	6,3	22,6	96,5
			Białaczka			
			HL-60(TB)	7,1	*	*
			RPMI-8226	9,8	*	*

* Wartości TGI i LC₅₀ > 100 μM

Badania nad aktywnością przeciwnowotworową przedstawicielei kolejnej grupy nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu zapoczątkowano przeprowadzeniem syntez i przekazaniem do testów *in vitro* *S*-[5-chloro-2-(cyanoamidano)sulfonylo-4-metylofenylo]-*N*-(4-nitrofenylo)benzotiohydrazonianów potasowych (**90**, **91**) i *N*-(4-nitrofenylo)benzotiohydrazonianów *S*-(5-chloro-4-metylo-2-sulfoamioilofenylowych) (**101**, **102**).



zw.	R ¹
90	Ph
91	4-CIPh



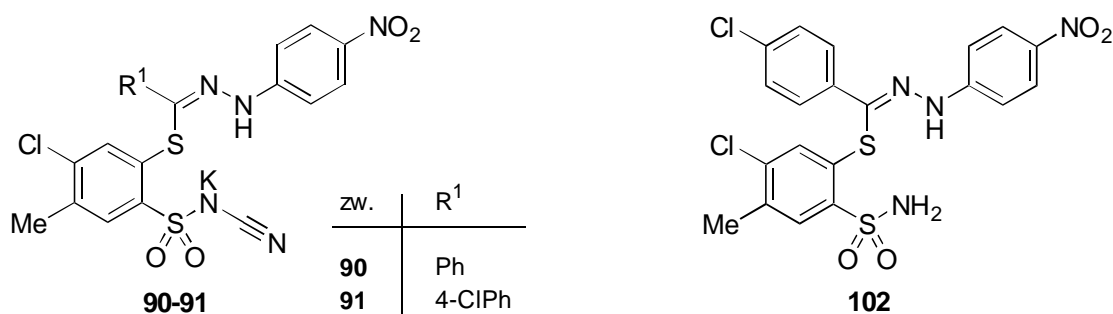
zw.	R ¹
101	Ph
102	4-CIPh

Zdolność hamowania wzrostu komórek nowotworowych wykazały trzy związki (Tabela 7). Wyróżniający się aktywnością związek **102** hamuje wzrost wszystkich 56 badanych linii komórkowych (wartość średnia GI₅₀ = 2,8 μM), natomiast związki **90** i **91** wyróżniały się działaniem w niskich nanomolowych wartościach (GI₅₀ < 0,01 μM) wobec linii komórkowej A498 raka nerki (Tabele 7 i 8, publikacja **P6**).

Tabela 7. Ogólna charakterystyka aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* związków **90**, **91**, **101-102***

Nr zw.	GI ₅₀ [μM] (wartość średnia)	Liczba linii komórkowych spełniających kryterium aktywności / liczba badanych linii komórkowych.					
		Zakres stężeń cytotoksycznych dla parametrów GI ₅₀ , TGI i LC ₅₀					
		GI ₅₀ [μM]		TGI [μM]		LC ₅₀ [μM]	
Liczba	Zakres	Liczba	Zakres	Liczba	Zakres		
90	16,2	51/57	< 0,01 – 44,7	48/57	22,5 – 83,1	38/57	47,5 – 96,0
91	25,1	49/57	< 0,01 – 77,6	21/57	2,3 – 98,3	5/57	35,7 – 98,3
102	2,8	56/56	0,5 – 44,3	45/56	3,4 – 77,9	20/56	6,9 – 71,8

* Związek **101** (podany w stężeniu 0,1 mM) nie spełniał kryterium selekcji w przedwstępnym badaniu na trzech liniach komórkowych raka piersi (MCF7), raka płuc (NCI-H460) i raka mózgu (SF-268).

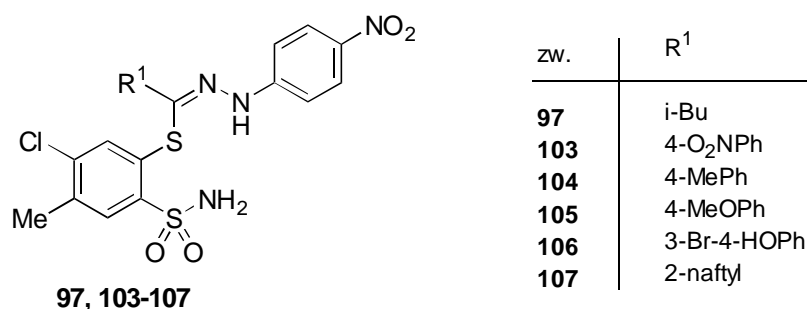
Tabela 8. Aktywność przeciwnowotworowa *in vitro* związków **90**, **91** i **102** wobec wybranych linii nowotworowych

Typ nowotworu Linia komórkowa	Nr związku								
	90			91			102		
	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM
Białaczka									
MOLT-4	4,4	81,2	*	19,5	*	*	4,1	*	*
K-562	15,2	42,9	*	35,2	80,3	*	3,4	*	*
N. Pluc									
HOP-92	10,7	32,7	99,8	19,4	96,9	*	2,2	5,4	*
NCI-H322M	13,1	29,0	63,9	22,5	*	*	1,8	4,3	16,0
NCI-H522	14,6	32,6	72,6	21,8	89,5	*	3,2	11,5	*
NCI-H460	18,5	36,3	72,0	26,7	*	*	2,1	5,3	*
N. okrężnicy									
HCT-116	13,8	30,6	68,1	11,2	26,0	60,6	3,1	4,4	*
KM12	16,6	30,2	55,0	24,6	56,9	*	1,9	4,2	8,9
N. mózgu									
U251	14,9	28,1	53,0	48,2	*	*	2,2	5,4	*
SF-268	19,2	43,7	99,7	26,0	*	*	2,3	6,5	53,6
SF-295	15,9	34,0	72,4	22,7	65,5	*	2,1	5,4	*
SNB-75	20,4	*	*	38,1	*	*	1,8	4,0	8,8
Czerniak									
LOX IMVI	15,4	28,8	53,7	30,1	*	*	2,1	*	*
MALME-3M	16,5	39,6	94,8	24,4	96,3	*	1,6	4,3	17,1
SK-MEL-28	17,2	37,4	81,1	31,2	*	*	0,5	4,9	36,4
N. jajnika									
OVCAR-3	14,2	30,5	65,7	21,2	*	*	1,7	3,9	8,5
OVCAR-4	13,9	31,8	72,9	20,9	75,0	*	1,7	4,5	22,1
SK-OV-3	*	*	*	17,9	57,6	*	1,9	3,9	7,9
N. nerki									
A498	< 0,01	*	58,7	< 0,01	2,3	35,7	4,3	21,8	*
UO-31	15,5	36,7	86,6	34,1	*	*	4,4	22,0	*
TK-10	16,0	38,3	92,0	25,0	*	*	1,8	3,5	6,9
ACHN	18,0	41,5	95,6	34,1	*	*	2,9	10,4	71,8
RXF 393	23,5	48,9	*	34,4	*	*	1,7	3,5	6,9
N. prostaty									
DU-145	11,7	24,0	49,0	17,6	*	*	2,2	5,5	90,9
N. piersi									
MCF7	14,7	28,3	54,7	15,9	42,6	*	2,0	4,6	*
BT-549	15,7	36,7	86,0	20,3	73,4	*	4,6	35,4	*
HS 578T	16,2	43,2	*	17,2	58,0	*	4,9	*	*

* Wartości GI₅₀, TGI i LC₅₀ > 100 μM

Względnie wyższa aktywność i szerokość spektrum działania przeciwnowotworowego związku **90** ($R^1 = \text{Ph}$) w porównaniu z jego analogiem **91** ($R^1 = 4\text{-ClPh}$) oraz odnotowane istotne różnice w aktywności związków **101** ($R^1 = \text{Ph}$) i **102** ($R^1 = 4\text{-ClPh}$) (Tabele 7 i 8), przemawiały za celowością kontynuowania poszukiwań potencjalnych środków przeciwnowotworowych wśród analogowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu, zróżnicowanych efektami elektronowymi podstawników R^1 .

Do testów *in vitro* skierowano kolejny szereg *N*-(4-nitrofenylo)tiohydrazonianów *S*-(5-chloro-4-metylo-2-sulfoamioilofenyloowych) (**97**, **103-107**).

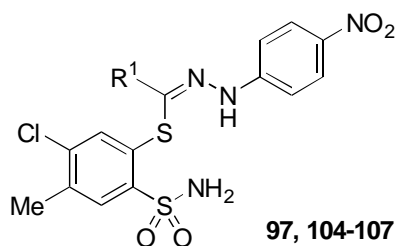


Aktywność przeciwnowotworową wykazały związki **97**, **104-107** (Tabele 9 i 10, publikacja **P6**). Uwagę zwraca niskie stężenie mikromolowe, przy których związki **104-106** hamują wzrost wszystkich 56 badanych linii komórkowych (wartości średnie $GI_{50} = 1,9 - 3,1 \mu\text{M}$). Szerokim spektrum działania charakteryzują się również związki **97** i **107** o nieco słabszej aktywności ($GI_{50} = 6,0 - 19,1 \mu\text{M}$), przy czym związek **107** wyróżnia się wybiórczym działaniem wobec linii komórkowej T-47D raka piersi ($GI_{50} < 0,01 \mu\text{M}$) (Tabele 9 i 10, publikacja **P6**).

Tabela 9. Ogólna charakterystyka aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* związków **97**, **103-107***

Nr zw.	GI_{50} [μM] (wartość średnia)	Liczba linii komórkowych spełniających kryterium aktywności / liczba badanych linii komórkowych.					
		Zakres stężeń cytotoksycznych dla parametrów GI_{50} , TGI i LC_{50}					
		GI_{50} [μM]		TGI [μM]		LC_{50} [μM]	
Liczba	Zakres	Liczba	Zakres	Liczba	Zakres		
97	6,0	56/56	1,8 – 18,8	54/56	5,7 – 97,0	46/56	19,7 – 96,0
104	1,9	56/56	0,3 – 19,5	54/56	4,1 – 46,3	46/56	4,8 – 86,3
105	2,6	56/56	0,03 – 21,1	55/56	1,3 – 86,9	48/56	4,3 – 86,3
106	3,1	56/56	0,6 – 51,6	52/56	1,8 – 53,3	41/56	6,1 – 76,4
107	19,1	54/57	< 0,01 – 84,0	34/57	8,8 – 83,7	16/56	48,6 – 98,3

* Związek **103** (podany w stężeniu 0,1 mM) nie spełniał kryterium selekcji w przedwstępnym badaniu na trzech liniach komórkowych raka piersi (MCF7), raka płuc (NCI-H460) i raka mózgu (SF-268).

Tabela 10. Aktywność przeciwnowotworowa *in vitro* związków **97**, **104-107** wobec wybranych linii komórkowych nowotworów ludzkich ($GI_{50} \leq 5,0 \mu M$)

zw.	R ¹
97	i-Bu
104	4-MePh
105	4-MeOPh
106	3-Br-4-HOPh
107	2-naftyl

Nr zw.	Typ nowotworu Linia komórkowa	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM	Nr zw.	Typ nowotworu Linia komórkowa	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM	
97	Białaczka				<i>cd.</i> 104	NCI-H460	2,3	9,7	86,3	
	SR	1,8	6,2	*		N. okrężnicy	COLO 205	1,8	5,3	*
	MOLT-4	4,6	*	*		HCC-2998	1,2	2,7	5,8	
	RPMI-8226	2,5	7,3	96,0		HCT-116	1,1	2,3	4,8	
	N. płuc					HCT-15	3,8	24,6	*	
	NCI-H226	2,8	7,8	27,2		HT29	1,3	3,1	7,4	
	NCI-H23	3,7	12,6	39,4		KM12	1,0	2,6	7,0	
	NCI-H322M	3,8	15,5	39,4		SW-620	2,5	10,5	47,5	
	NCI-H460	4,0	17,8	63,1		N. mózgu				
	N. okrężnicy					SF-268	1,2	5,6	32,6	
	HCC-2998	2,5	6,3	22,5		SF-295	1,4	2,9	6,0	
	HCT-116	3,5	13,0	36,2		SF-539	0,6	2,1	6,6	
	HT29	3,9	15,3	51,0		SNB-19	1,5	4,1	15,3	
	KM12	3,3	13,2	36,2		U251	1,5	3,7	*	
	N. mózgu					Czerniak				
	SNB-75	4,0	18,7	45,7		LOX IMVI	1,0	2,6	6,5	
	SF-295	2,3	5,7	19,7		MALME-3M	1,6	4,7	17,3	
	Czerniak					M14	1,3	3,1	7,3	
	M14	4,9	16,5	42,6		SK-MEL-28	3,4	12,2	36,6	
	UACC-62	3,1	8,9	29,5		SK-MEL-5	0,8	2,2	5,4	
	N. jajnika					UACC-62	1,5	3,4	7,4	
	OVCAR-3	3,1	7,0	23,6		N. jajnika				
	OVCAR-4	5,0	20,5	57,9		IGROV1	2,4	14,6	*	
	N. nerki					OVCAR-3	0,9	2,2	5,2	
	CAKI-1	2,2	6,8	25,0		OVCAR-4	0,7	3,4	*	
	RXF 393	4,1	19,0	55,3		OVCAR-5	1,9	5,5	20,2	
	SN12C	2,8	9,9	33,1		SK-OV-3	1,4	3,2	7,3	
	TK-10	2,9	8,3	28,8		N. nerki				
	N. prostaty					768-0	1,7	3,2	6,1	
	PC-3	3,1	11,9	37,5		A498	1,8	4,5	13,0	
	N. piersi					ACHN	2,0	5,0	15,8	
MCF7	2,3	7,3	*	CAKI-1	1,3	2,7	5,4			
MDA-MB-231/ATCC	2,8	9,5	40,0	RXF 393	1,7	4,2	12,3			
MDA-MB-435	2,9	9,4	32,1	SN12C	1,6	3,9	9,2			
T-47D	3,0	8,3	41,5	TK-10	1,4	3,3	7,6			
104	Białaczka				UO-31	2,5	10,7	32,7		
	K-562	4,3	14,8	38,4	N. prostaty					
	MOLT-4	3,3	12,3	35,0	PC-3	1,9	5,4	19,5		
	RPMI-8226	1,9	5,0	21,4	DU-145	1,4	3,5	8,2		
	SR	0,9	3,5	*	N. piersi					
	N. płuc				MCF7	1,7	4,6	21,2		
	A549/ACTT	3,1	12,9	45,5	NCI/ADR-RES	1,6	4,1	11,8		
	EKVX	4,0	16,0	61,0	MDA-MB-231/ATCC	0,3	1,5	4,9		
	HOP-62	2,5	6,6	23,3	HS-578T	1,4	5,5	55,7		
	HOP-92	1,4	3,6	9,1	MDA-MB-435	1,5	3,8	9,4		
	NCI-H226	1,4	3,3	7,6	T-47D	2,2	5,3	19,1		
	NCI-H23	1,2	2,7	6,2						
	NCI-H322M	1,7	5,0	17,9						

* Wartości TGI i LC₅₀ > 100 μM

ciąg dalszy

Tabela 10. *cd.*

Nr zw.	Typ nowotworu Linia komórkowa	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM	Nr zw. <i>cd.</i>	Typ nowotworu Linia komórkowa	GI ₅₀ μM	TGI μM	LC ₅₀ μM	
105	Białaczka				106	RPMI-8226	1,6	4,3	*	
	K-562	3,8	12,2	35,0		N. płuc				
	MOLT-4	3,7	13,7	37,1		A549/ATCC	4,0	29,6	*	
	RPMI-8226	2,4	6,5	23,4		HOP-62	5,0	16,8	45,4	
	SR	2,1	5,4	*		NCI-H226	2,6	7,1	30,5	
	N. płuc					NCI-H23	2,4	7,5	27,7	
	A549/ATCC	3,7	16,8	81,6		NCI-H322M	2,3	7,4	27,5	
	EKVX	3,1	10,4	36,2		NCI-H460	2,9	10,1	68,7	
	HOP-62	3,0	10,0	31,3		N. okrężnicy				
	HOP-92	1,2	3,5	9,8		COLO 205	4,2	17,6	*	
	NCI-H226	2,4	5,2	42,7		HCC-2998	1,6	3,8	9,1	
	NCI-H23	1,9	4,0	8,2		HCT-116	2,9	10,6	33,8	
	NCI-H322M	2,3	7,1	25,8		HCT-15	3,5	23,2	*	
	NCI-H460	4,7	22,0	87,5		HT29	3,2	7,3	*	
	N. okrężnicy					KM12	1,9	4,1	8,7	
	COLO 205	4,0	22,1	*		SW-620	3,5	11,6	45,4	
	HCC-2998	1,6	3,2	6,1		N. mózgu				
	HCT-116	1,7	3,2	6,1		SF-268	2,2	8,1	42,2	
	HT29	2,0	4,0	7,9		SF-295	2,0	3,9	7,4	
	KM12	2,2	5,8	20,0		SF-539	3,3	8,7	58,6	
	SW-620	3,0	10,9	33,0		SNB-19	4,4	16,1	82,3	
	N. mózgu					U251	2,8	11,1	47,1	
	SF-268	2,8	10,8	46,2		Czerniak				
	SF-290	2,0	4,0	7,8		LOX IMV1	2,1	4,5	-	
	SF-539	2,2	4,7	11,0		MALME-3M	1,7	4,3	13,5	
	Czerniak					M14	2,6	7,1	33,3	
	LOX IMV1	2,0	4,9	15,2		SK-MEL-2	3,9	53,3	*	
	MALME-3M	2,2	6,7	24,7		SK-MEL-28	2,6	5,7	27,4	
	M14	2,7	9,2	30,4		SK-MEL-5	1,8	3,3	6,1	
	SK-MEL-28	3,4	10,2	32,0		UACC-62	1,7	3,8	8,2	
	SK-MEL-5	0,03	1,3	4,3		N. jajnika				
	UACC-62	1,9	4,5	11,6		IGROV1	4,2	19,9	67,3	
	N. jajnika					OVCAR-3	2,0	4,0	7,9	
	IGROV1	3,3	86,9	*		OVCAR-4	3,4	7,9	*	
	OVCAR-3	1,6	3,3	6,6		OVCAR-5	2,0	4,7	12,4	
	OVCAR-4	1,9	4,6	*		SK-OV-3	4,3	18,5	*	
	OVCAR-5	3,1	11,1	33,3		N. nerki				
	SK-OV-3	2,6	5,8	17,6		786-0	3,8	13,5	45,5	
	N. nerki					ACHN	3,0	12,9	38,4	
	786-0	3,2	12,3	35,1		CAKI-1	2,3	5,2	15,3	
	A498	0,1	2,6	13,4		RXF 393	0,6	3,5	27,0	
	ACHN	3,3	12,0	34,7		SN12C	2,3	5,2	16,5	
	CAKI-1	1,8	3,8	8,0		TK-10	2,0	5,1	17,7	
	RXF 393	1,6	4,5	*		N. prostaty				
	SN12C	2,2	4,2	8,3		PC-3	3,2	8,5	33,6	
	TK-10	2,1	4,5	9,6		N. piersi				
	UO-31	4,8	17,4	42,4		MCF7	2,1	5,0	19,7	
N. prostaty				NCI/ADR-RES	2,6	8,5	42,0			
PC-3	2,7	11,5	33,8	MDA-MB-231/ATCC	1,7	4,6	19,4			
DU-145	2,2	4,5	9,2	HS-578T	2,9	9,2	68,5			
N. piersi				MDA-MB-435	1,8	3,4	6,5			
MCF7	2,6	7,6	26,8	T-47D	2,5	6,6	*			
NCI/ADR-RES	2,1	5,4	*	107						
MDA-MB-231/ATCC	2,1	4,2	8,5	N. płuc						
HS-578T	1,1	3,5	21,5	HOP-92	1,3	19,6	48,6			
MDA-MB-435	2,5	7,8	27,7	N. okrężnicy						
T-47D	3,6	9,0	38,7	HCT-116	4,7	*	*			
106	Białaczka			N. mózgu						
HL-60(TB)	1,9	*	*	SF-539	4,1	18,7	49,4			
K-562	2,7	*	*	N. piersi						
MOLT-4	2,9	*	*	HS-578T	2,1	8,8	88,1			
				T-47D	<0,01	83,7	*			

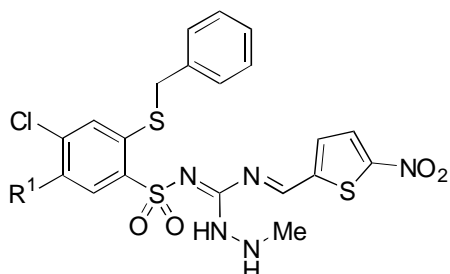
* Wartości TGI i LC₅₀ > 100 μM

Na zwrócenie uwagi wydaje się zasługiwać porównywalna ilość linii komórkowych (54 – 56) wrażliwych ($GI_{50} = 0,01 - 84,0 \mu\text{M}$) na działanie związków **102**, **104-107** z elektronoakceptorowym podstawnikiem $R^1 = 4\text{-ClPh}$, 4-MePh , 4-MeOPh , 3-Br-4-HOPh lub 2-naftyl , i związku **97** z elektronodonorowym podstawnikiem $R^1 = i\text{-Bu}$ (Tabele 7 i 9). Nadmienić należy, że podobny wpływ skrajnie różnych efektów elektronowych podstawników na aktywność przeciwnowotworową 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu stwierdzono wcześniej w szeregu badanych 1-allilo-3-amino-2-(5-R-4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonylo)guanidyny, w których porównywalną aktywność pochodnych z podstawnikiem $R = \text{Me}$ lub 4-ClPhNHCO tłumaczono możliwością ich działania na odmienne cele biochemiczne cyklu komórkowego nowotworów [71].

Zależne od podstawników R^1 różnice w aktywności omawianych związków **97**, **102**, **104-107** są wyraźniej dostrzegalne przy porównaniu liczebności linii komórkowych najbardziej wrażliwych na ich działanie, zwłaszcza w zakresie niskich stężeń $GI_{50} = 0,01 - 5,0 \mu\text{M}$ (Tabele 8 i 10). Daje się zauważyć, że związki o zbliżonych efektach elektronowych podstawników R^1 (4-MePh , 4-MeOPh , 3-Br-4-HOPh) **104-106** i porównywalnej aktywności w zakresie stężeń $GI_{50} = 1,9 - 3,1 \mu\text{M}$, zachowują wysoką aktywność ($GI_{50} \leq 2,0 \mu\text{M}$) wobec określonych typów komórek nowotworowych, takich jak: HCC-2998 okrężnicy, SK-MEL-5 i UACC-62 czerniaka, OVCAR-3 jajnika oraz RXF 393 nerki (Tabela 10).

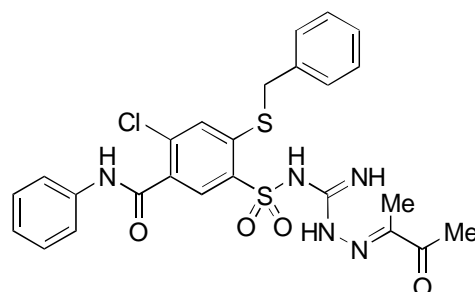
Ogółem w wyniku przeprowadzonych badań wyselekcjonowano 24 nowe pochodne 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu (**46-48**, **50**, **60**, **63**, **64**, **67**, **69**, **70**, **72**, **74**, **78**, **79**, **82**, **83**, **90**, **91**, **97**, **102**, **104-107**) o interesującym działaniu przeciwnowotworowym. Po raz pierwszy wykazano, że aktywność i spektrum działania przeciwnowotworowego zależą nie tylko od wpływu podstawników w pozycji 5 pierścienia benzenowego i podstawników atomu azotu grupy sulfonamidowej, lecz mogą być również korzystnie kształtowane podstawnikami atomu siarki grupy merkaptanowej.

Wyróżniająca się aktywność związków **63** i **67** (Tabela 3), **82** (Tabela 4), **74** (Tabela 6), **102** (Tabela 8) i **104-106** (Tabela 10), zwłaszcza w odniesieniu do pojedynczych lub liczących linii komórek nowotworowych ($GI_{50} = 0,03 - 3,0 \mu M$), wydają się upoważniać do wskazania ich struktur jako wiodących:

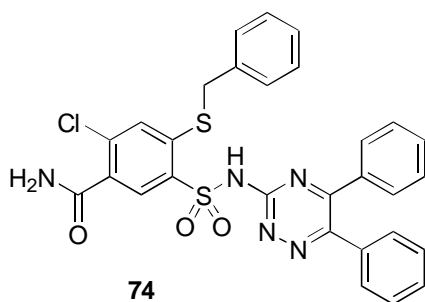


63: ($R^1 = Me$)

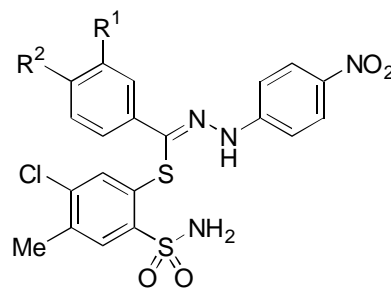
67: ($R^1 = 4\text{-ClPhNHCO}$)



82



74



zw.	R^1	R^2
102	H	Cl
104	H	Me
105	H	MeO
106	Br	HO

4.3.2. Wpływ niektórych spośród otrzymanych w pracy nowych pochodnych 4-chloro-2-merkapto-*N*-(4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidu na hamowanie funkcji integrazy HIV-1

Znane z aktywności skierowanej wobec HIV niektóre pochodne 4-chloro-2-merkapto-*N*-(1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidu [62,63] okazały się efektywnymi inhibitorami integrazy HIV-1 [106]. Skłoniło to do przeprowadzenia syntez nie opisanych wcześniej strukturalnie zbliżonych pochodnych 4-chloro-2-merkapto-*N*-(4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidu (**109-141**), w celu poznania ich wpływu na hamowanie funkcji integrazy HIV-1 i ewentualnych zależności struktura – aktywność.

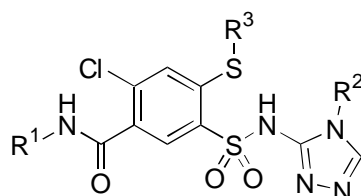
Do testów biologicznych wytypowano 5-(benzylokarbamoilo- lub arylokarbamoilo-4-chloro-2-merkapto-*N*-(4-alkilo-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidy (**112-119**), 5-arylokarbamoilo-4-chloro-2-merkapto-*N*-(4-arylo-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidy (**121-126**) i dwie pochodne kwasu 2-{5-chloro-4-karbamoilo-2-[(4-alkilo-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)aminosulfonylo]fenylotio}octowego (**140, 141**). Ich wpływ na integrzę HIV-1 oceniał Department of Pharmaceutical Sciences, University of Southern California (Los Angeles, USA) w testach *in vitro* z użyciem oczyszczonej integrazy HIV-1 i podwójnego oligonukleotydu (21-merowego), o sekwencji odpowiadającej fragmentom U5 lub U3 - powtarzalnych sekwencji końcowych (LTR) retrowirusowego DNA [106]. Zastosowana metodyka pozwala na ilościowe oznaczenie stopnia hamowania dwóch charakterystycznych procesów enzymatycznych przebiegających z udziałem integrazy HIV-1 i związku testowanego. Pierwszy z nich jest procesem odszczepiania dinukleotydu 3'-GT z modelowego podwójnego oligonukleotydu, zwany w piśmiennictwie jako „3'-processing” (**3'-Proc**), a następny procesem kowalencyjnego wbudowania powstałego produktu (19-merowego) do łańcucha kolejnego identycznego podwójnego oligonukleotydu (modelowego DNA gospodarza) o nazwie – „strand transfer” lub „3'-end joining” (**ST**) [106,176].

Parametr IC_{50} dla procesu 3'-Proc wyznaczono na podstawie krzywych przedstawiających zależność procentowego hamowania procesu enzymatycznego od stężenia badanego związku. Podobnie wyznaczono parametr IC_{50} dla procesu ST. Określały one interpolowane wartości odpowiadające stężeniom, przy których stopień inhibicji wynosił 50%. Badania przeprowadzono w szerokim zakresie stężeń od 1 do 1000 μ M. Wartość $IC_{50} < 10 \mu$ M przyjmuje się za wielkość progową przy typowaniu struktur wiodących [177].

Wszystkie testowane związki wykazały zależną od struktury zdolność hamowania funkcji integrazy HIV-1 (Tabela 11) i posłużyły dla przeprowadzenia trójwymiarowej analizy QSAR metodą analizy porównawczej pól molekularnych (CoMFA) oraz analizy

porównawczej indeksów podobieństwa molekularnego (CoMSIA). Wyróżniającymi się aktywnością są związki **122** ($IC_{50} = 3,9 \mu M$) oraz **119**, **123** i **124** ($IC_{50} = 6,0 - 12,0 \mu M$) (publikacja **P8**).

Tabela 11. Zdolność hamowania *in vitro* funkcji integrazy HIV-1, tj. procesów 3'-Proc i ST pochodnych 4-chloro-2-merkpto-*N*-(4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidu **112-119**, **121-126**, **140** i **141**



112-119, **121-126**, **140**, **141**

Nr związku	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μM)	
				3'-Proc	ST
112	PhCH ₂	Bu	H	89,1	70,8
113	4-MePh	Pr	H	40,7	39,8
114	4-MePh	Bu	H	60,2	33,9
115	4-ClPh	Bu	H	36,3	43,6
116	4-ClPh	i-Bu	H	38,0	39,8
117	4-MeOPh	i-Bu	H	75,8	100,0
118	4-MePh	s-Bu	H	199,5	112,2
119	4-MePh	PhCH ₂	H	8,9	7,9
121	Ph	4-FPh	H	45,7	50,1
122	4-ClPh	4-MePh	H	3,9	3,9
123	Ph	4-ClPh	H	6,0	12,0
124	Ph	4-MePh	H	6,0	10,0
125	4-FPh	4-FPh	H	79,4	37,1
126	4-ClPh	4-FPh	H	37,1	37,1
140	H	Bu	CH ₂ COOH	333,0	333,0
141	4-MePh	Pr	CH ₂ COOH	43,6	43,6

W szeregu pochodnych z wolną grupą merkaptanową ($R^3 = H$) uwagę zwraca fakt, że ich aktywność jest zależna zarówno od podstawników arylokarbamoilowych w pozycji 5 pierścienia benzenowego, jak i podstawników (R^2) w pozycji 4 pierścienia triazolowego, przy czym bardziej znaczący wpływ posiada trafność doboru podstawnika R^2 . Przemawia za tym między innymi porównanie analogowych związków, krańcowo różniących się aktywnością **119** ($R^2 = PhCH_2$) i **118** ($R^2 = s-Bu$) lub **122** ($R^2 = 4-ClPh$) i **126** ($R^2 = 4-FPh$) (Tabela 11).

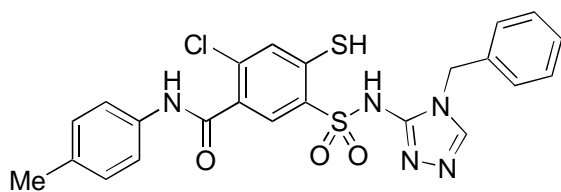
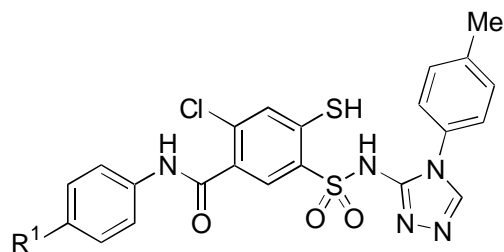
W mniejszym stopniu na aktywność wpływają modyfikacje podstawnika R^1 . Związek **122** ($R^1 = 4-ClPh$) jest zaledwie dwukrotnie bardziej aktywny od analogu **124** ($R^1 = Ph$), podobnie jak analogi **115** ($R^1 = 4-ClPh$) i **112** ($R^1 = PhCH_2$) lub **116** ($R^1 = 4-ClPh$) i **117** ($R^1 = 4-MeOPh$) (Tabela 11).

Uwagę zwraca około 10-krotnie wyższa aktywność związku **122** ($R^1 = 4-ClPh$, $R^2 = 4-MePh$) w porównaniu z aktywnością jego analogów ($R^1 = 4-ClPh$) zawierających elektronodonorowe podstawniki $R^2 = Bu$ (**115**) lub $R^2 = i-Bu$ (**116**) (Tabela 11). Z kolei porównywalna aktywność związku **126** ($R^1 = 4-ClPh$, $R^2 = 4-FPh$) i jego analogów ($R^1 = 4-ClPh$) z elektronodonorowymi podstawnikami $R^2 = Bu$ (**115**) i $R^2 = i-Bu$ (**116**) może wskazywać, że wpływ efektu elektronoakceptorowego podstawnika R^2 nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na omawianą aktywność. Wydaje się też sugerować, że działanie to zależy również od wpływu innych efektów, na przykład objętościowych, co znajduje potwierdzenie w obliczonych teoretycznie wartościach refrakcji molowej (R_M) podstawników R^2 (R_M : $4-MePh > 4-ClPh \geq PhCH_2 > 4-FPh > alkil$).

Na zwrócenie uwagi zasługuje także związek **141** ($R^1 = 4-MePh$, $R^2 = Pr$, $R^3 = CH_2COOH$), który jest pierwszą z poznanych dotąd *S*-podstawionych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu wykazujących znaczący wpływ na hamowanie funkcji integrazy HIV-1 (Tabela 11).

Porównanie wyróżniających się aktywnością pochodnych 5-arylokarbamoilo-4-chloro-2-merkapto-*N*-(4- R^2 -4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)benzenosulfonamidu **119**, **122-124** z poznanymi wcześniej inhibitorami integrazy HIV-1, tj. zbliżonymi strukturalnie 4-chloro-2-merkapto-5-metylo-*N*-[5-(*R*-amino)-1*H*-1,2,4-triazol-3-yl]benzenosulfonamidami ($R = Ph$, 4-*MePh*, 4-*MeOPh*, 3-*MeOPh* lub 3,4,5-tri-(*MeO*)-*Ph*, $IC_{50} = 6,3 - 22,4 \mu M$ (dla procesu 3'-*Proc*) i $IC_{50} = 12,6 - 23,9 \mu M$ (dla procesu ST) [106] wskazuje, że korzystny wpływ na aktywność wywiera zarówno elektronoakceptorowe ugrupowanie arylokarbamoilowe w pozycji 5 pierścienia benzenowego jak i podstawnik aryłowy (R^2) związany bezpośrednio lub mostkiem metylenowym z atomem N-4 pierścienia 4*H*-1,2,4-triazolowego $IC_{50} = 3,9 - 8,9 \mu M$ i $IC_{50} = 3,9 - 12,0 \mu M$ (odpowiednio dla procesów 3'-*Proc* i ST) (Tabela 11).

Względnie wysoka zdolność hamowania *in vitro* badanych procesów enzymatycznych ($IC_{50} = 3,9 - 10,0 \mu M$) wydaje się uzasadniać typowanie związków **119**, **122** i **124** jako struktur wiodących.

**119**

zw.	R ¹
122	Cl
124	H

5. Posumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa habilitacyjna zawiera omówienie najważniejszych kierunków i wyników badań autora nad metodami syntezy, strukturą i aktywnością biologiczną nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu.

Stwierdzono, że 3-amino-6-chloro-1,1-dioksa-1,4,2-benzoditiazyny mogą być przekształcone w nie opisane wcześniej sole di- lub monopotasowe *N*-(4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonylo)cyjanamidu. Związki te wykorzystano do opracowania dogodnych metod syntezy nowych *S,N*-dipodstawionych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu, zawierających grupę cyjanową, acykliczne ugrupowania poliazotowe lub układy heterocykliczne przy sulfonamidowym atomie azotu i podstawniki o zróżnicowanych efektach elektronowych przy atomie siarki w pozycji 2. Przedstawiono także sposób syntezy nowych *S*-podstawionych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidów z wolną grupą sulfonamidową.

Wykazano, że otrzymane związki posiadają zależną od struktury zdolność hamowania wzrostu ludzkich komórek nowotworowych w testach *in vitro*. Określono niektóre zależności struktura – aktywność i po raz pierwszy odnotowano, że znaczącą aktywnością i szerokim spektrum działania przeciwnowotworowego mogą być obdarzone *S*-podstawione pochodne 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu nie zawierające podstawnika przy atomie azotu grupy sulfonamidowej. Wskazano nowe struktury wiodące, do których należą między innymi: 2-(2-benzylotio-4-chloro-5-metylobenzenosulfonylo)-3-metyloamino-1-(5-nitrotienylideno) guanidyna (**63**), 2-benzylotio-4-chloro-5-karbamoilo-*N*-(5,6-difenylo-1,2,4-triazyn-3-ylo) benzenosulfonamid (**74**), 1-(2-benzylotio-4-chloro-5-fenylokarbamoilobenzenosulfonylo)-3-(2-oksobutyl-3-ylidenoimino)guanidyna (**82**) i *N*-(4-nitrofenylo)benzotiohydrazoniany *S*-(5-chloro-4-metylo-2-sulfoamiloifenylowe) (**102, 104-106**).

Stwierdzono również, że reakcje *N*-podstawionych 3-amino-6-chloro-7-*R*-1,1-dioksa-1,4,2-benzoditiazyny z wodzianem hydrazyny i *N,N*-dimetyloformamidem przebiegać mogą z utworzeniem odpowiednich 4-chloro-2-merkapt-5-*R*-*N*-(4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamidów. Opracowana ogólna metoda ich syntezy jest też łatwym sposobem funkcjonalizowania pierścienia triazolowego w pozycji 4 i benzenowego w pozycji 5.

Stwierdzono, że otrzymane 4-chloro-2-merkapt-5-*R*¹-*N*-(4-*R*²-4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamidy posiadają zdolność hamowania funkcji integrazy HIV-1 w testach *in vitro*. Zaobserwowano wyraźną zależność aktywności od "efektu objętościowego" podstawnika w pozycji 4 pierścienia triazolowego (*R*²) oraz korzystny wpływ efektu elektronoakceptorowego podstawnika *R*¹ w pozycji 5 pierścienia benzenowego. Strukturami

wiodącymi w tej grupie sulfonamidów, hamującymi badane procesy enzymatyczne przy wartościach $IC_{50} = 3,9 - 10,0 \mu M$, okazały się 4-chloro-2-merkaptio-5-(4-metylofenylokarbamoilo)-*N*-(4-benzylo-4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)benzenosulfonamid (**119**), 4-chloro-5-(4-chlorofenylokarbamoilo)-2-merkaptio-*N*-[4-(4-metylofenylo)-4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo]benzenosulfonamid (**122**) i 4-chloro-5-fenylokarbamoilo-2-merkaptio-*N*-[4-(4-metylofenylo)-4*H*-1,2,4-triazol-3-ylo]benzenosulfonamid (**124**).

Wyniki testów biologicznych *in vitro* typowanych do oceny 54 nowych pochodnych 4-chloro-2-merkaptobenzenosulfonamidu pozwoliły na wyselekcjonowanie 24 związków o działaniu przeciwnowotworowym i 16 inhibitorów integrazy HIV-1, a ich struktury wiodące wydają się wytyczać nowe, obiecujące kierunki poszukiwań 2-merkaptobenzenosulfonamidów o wspomnianych rodzajach aktywności biologicznej.

Ogółem w pracy przeprowadzono syntezy 159 nowych związków, których budowę chemiczną potwierdzono wynikami analizy elementarnej i metodami spektroskopowymi (IR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR i MS), a w uzasadnionych przypadkach także badaniami rentgenostrukturalnymi.

6. Piśmiennictwo

1. Branda R.F., McCormack J.J., Perlmutter C.A., *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 4557 (1988).
2. Fisherman J.S., Osborn B.L., Chun H.G., *Invest. New Drugs*, **11**, 1 (1993).
3. Howbert J.J., Grossman C.S., Crowell T.A., Rieder B.J., Harper R.W., Kramer K.E., Tao E.V., Aikins J., Poore G.A., Rinzel S.M., Grindey G.B., Shaw W.N., Todd G., *J. Med. Chem.* **33**, 2393 (1990).
4. Mohamadi F., Spees M.M., Grindey G.B., *J. Med. Chem.*, **35**, 3012 (1992).
5. Artico M., *Farmaco* **51**, 305 (1996).
6. Artico M., Silvestri R., Massa S., Loi A.G., Corrias S., Piras G., La Colla P., *J. Med. Chem.*, **39**, 522 (1996).
7. Casini A., Scozzafava A., Mastrolorenzo A., Supuran C.T., *Curr. Cancer Drug Targets*, **2**, 55 (2002).
8. Scozzafava A., Owa T., Mastrolorenzo A., Supuran C.T., *Curr. Med. Chem.*, **10**, 925 (2003).
9. Supuran C.T., Casini A., Scozzafava A., *Med. Res. Rev.*, **23**, 535 (2003).
10. Rigas J.R., Francis P.A., Miller V.A. Tong W.P., Roistacher N., Kris M.G., Orazem J.P., Young C.W., Warrell R.P. Jr., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **35**, 483 (1995).
11. Yoshino H., Ueda N., Nijima J., Sugumi H., Kotake Y., Koyanagi N., Yoshimatsu K., Asada M., Watanabe T., Nagasu T., Tsukahara K., Iijima A., Kitoh K., *J. Med. Chem.*, **35**, 2496 (1992).
12. Yoshimatsu K., Yamaguchi A., Yoshino H., Koyanagi N., Kitoh K., *Cancer Res.*, **57**, 3208 (1997).
13. Koyanagi N., Nagasu T., Fujita F., Watanabe T., Tsukahara K., Funahashi Y., Fujita M., Taguchi T., Yoshino H., Kitoh K., *Cancer Res.*, **54**, 1702 (1994).
14. Yamamoto K., Noda K., Yoshimura A., Fukuoka M., Furuse K., Niitani H., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **42**, 127 (1998).
15. Owa T., Nagasu T., *Exp. Opin. Ther. Patents*, **10**, 1725 (2000).
16. Ueda N., Tsukahara N., Watanebe T., Haneda T., Kotake Y., Nijima J., Nagasu T., Yoshimatsu K., Yoshino H., Koyanagi N., Kitoh K., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res. Toronto Canada*, **36**, 2290 (1995).
17. Gwaltney S.L. II, Imade H.M., Li Q., Gehrke L., Credo R.B., Warner R.B., Le J.Y., Kovar P., Frost D., Ng S.C., Sham H.L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 1671 (2001).
18. Tanaka H., Ohshima N., Hidaka H., *Mol. Pharmacol.* **55**, 356 (1999).
19. Owa T., Okauchi T., Yoshimatsu K., Hata Sugi N., Ozawa Y., Nagasu T., Koyanagi N., Okabe T., Kitoh K., Yoshino H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 1223 (2000).
20. Owa T., Yoshino H., Okauchi T., Okabe T., Ozawa Y., Hata Sugi N., Yoshimatsu K., Nagasu T., Koyanagi N., Kitoh K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 2097 (2002).
21. Owa T., Yoshino H., Okauchi T., Yoshimatsu K., Ozawa Y., Hata Sugi N., Nagasu T., Koyanagi N., Kitoh K., *J. Med. Chem.*, **42**, 3789 (1999).
22. Ozawa Y., Sugi N.H., Nagasu T., Owa T., Watanabe T., Koyanagi N., Yoshino H., Kitoh K., Yoshimatsu K., *Eur. J. Cancer*, **37**, 2275 (2001).
23. Owa T., Yokoi A., Yamazaki K., Yoshimatsu K., Yamori T., Nagasu T., *J. Med. Chem.*, **45**, 4913 (2002).
24. Bouchain G., Delorme D., *Curr. Med. Chem.*, **10**, 2359 (2003).
25. Meinke P.T., Liberator P., *Curr. Med. Chem.* **8**, 211 (2001).
26. Bramson H.N., Corona J., Davis S.T., Dickerson S.H., Edelstein M., Frye S.V., Gampe R.T., Harris P.A., Hassell A., Holmes W.D., Hunter R.N., Lackey K.E., Lovejoy B., Luzzio M.J., Montana V., Rocque W.J., Rusnak D., Shewchuk L., Veal J.M., Walker D.H., Kuyper L.F., *J. Med. Chem.*, **44**, 4339 (2001).
27. Davis S.T., Benson B.G., Bramson H.N., Chapman D.E., Dickerson S.H., *Science*, **291**, 134 (2001).

28. Owa T., Yoshino H., Yoshimatsu K., Nagasu T., *Curr. Med. Chem.*, **8**, 1487 (2001).
29. Buolamwini J.K., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 500 (1999).
30. Manne V., Ricca C., Gullo-Brown J., Penhallow B., Carboni J., Lynch M., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **41**, 445, A2835 (2000).
31. Rose W.C., Arico M.A., Burke C.L., Clark J.L., Fager K.L., VanDeren C., Kramer R.A., Lee F.Y.F., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **41**, 446, A2836 (2000).
32. Gibbs J.B., *J. Clin. Invest.*, **105**, 9, (2000).
33. Shan B., Medina J.C., Santha E., Frankmoelle W.P., Chou T.C., Learned R.M., Narbut M.R., Scott D., Wu P., Jaen J.C., Rosen T., Timmermans P.B.M., Beckmann H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5686 (1999).
34. Medina J.C., Shan B., Beckmann H., Farrell R.P., Clark D.L., Learned R.M., Roche D., Li A., Baichwal V., Case C., Baeuerle P.A., Rosen T., Jean J.C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 2653 (1998).
35. Medina J.C., Roche D., Shan B., Learned R.M., Frankmoelle W.P., Clark D.L., Rosen T., Jaen J.C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1843 (1999).
36. Woessner J.F., Nagaes H., *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. Oxford Univ. Press, Oxford, 2000, s. 1-223.
37. MacPherson L.J., Bayburt E.K., Capparelli M.P., Carroll B.J., Goldstein R., Justice M.R., Zhu L., Hu S., Melton R.A., Fryer L., Goldberg R.L., Doughty J.R., Spirito S., Blancuzzi V., Wilson D., O'Byrne E.M., Ganu V., Parker D.T., *J. Med. Chem.* **40**, 2525 (1997).
38. Whittaker M., Floyd C.D., Brown P., Gearing A.J.H., *Chem. Rev.*, **99**, 2735 (1999).
39. Montana J., Baxter A., *Curr. Opin. Drug Disc. Devel.* **3**, 353 (2000).
40. Sorbera L.A., *Drugs Future*, **25**, 150 (2000).
41. O'Brien P.M., Ortwine D.F., Pavlovsky A.G., Picard J.A., Sliskovic D.R., Roth B.D., Dyer R.D., Johnson L.L., Man C.F., Hallak H., *J. Med. Chem.* **43**, 156 (2000).
42. Natchus M.G., Bookland R.G., Laufersweiler M.J., Pikul S., Almstead N.G., De B., Janusz M.J., Hsieh L.C., Gu F., Pokross M.E., Patel V.S., Garver S.M., Peng S.X., Branch T.M., King S.L., Baker T.R., Foltz D.J., Mieling G.E., *J. Med. Chem.* **44**, 1060 (2001).
43. Pikul S., Ohler N.E., Ciszewski G., Laufersweiler M.C., Almstead N.G., De B., Natchus M.G., Hsieh L.C., Janusz M.J., Peng S.X., Branch T.M., King S.L., Taiwo Y.O., Mieling G.E., *J. Med. Chem.*, **44**, 2499 (2001).
44. Foda H.D., Zucker S., *Drug Discovery Today*, **6**, 478 (2001).
45. Hidalgo M., Eckhardt S.G., *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**, 178 (2001).
46. Itoh T., Tanioka M., Matsuda H., Nishimoto H., Yoshioka T., Suzuki R., Uehira M., *Clin. Exp. Metastasis*, **17**, 177 (1999).
47. Itoh T., Tanioka M., Yoshida, H., Yoshioka T., Nishimoto H., Itohara S., *Cancer Res.*, **58**, 1048 (1998).
48. Kiyama R., Tamura Y., Watanabe F., Tsuzuki H., Ohtani M., Yodo M., *J. Med. Chem.*, **42**, 1723 (1999).
49. Lovejoy B., Cleasby A., Hassell A.M., Longley K., Luther M.A., Weigl D., McGeehan G., McElroy A.B., Drewry D., Lambert M.H., Jordan S.R., *Science*, **263**, 375 (1994).
50. Gooley P.R., O'Connell J.F., Marcy A.L., Cuca G.C., Salowe S.P., Bush B.L., Hermes J.D., Esser C.K., Hagmann W.K., Springer J.P., Johnson B.A., *Struct. Biol.*, **1**, 111 (1994).
51. Delbecq F., Cordonnier G., Pommery N., Barbry D., Henichart J-P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1119 (2004).
52. Watanabe F., Tamura Y., Patent WO 02/28844, 2002; *Chem. Abstr.* **136**, 355251 (2002).

53. Toth J.E., Grindey G.B., Ehlhardt W.J., Ray J.E., Boder G.B., Bewley J.R., Klingerman K.K., Gates S.B., Rinzel S.M., Schultz R.M., Weir L.C., Worzalla J.F., *J. Med. Chem.*, **40**, 1018 (1997).
54. Chern J.W., Leu Y.L., Wang S.S., Jou R., Lee C.F., Tsou P.C., Hsu S.C., Liaw Y.C., Lin H.M., *J. Med. Chem.*, **40**, 2276 (1997).
55. Rush G.F., Rinzel S.M., Boder G., Heim R.A., Toth J.E., Ponsler G.D., *Biochem. Pharmacol.* **44**, 2387 (1992).
56. Sosinski J., Thakar J.H., Germain G.S., Dias P., Harwood F.C., Kuttesch J.F., Houghton P.J., *Mol. Pharmacol.*, **45**, 926 (1994).
57. Houghton P.J., Houghton J.A., *Invest. New Drugs*, **14**, 271 (1996).
58. Matsuno S., Myaguchi M., Ito A., Hara N., Sakurada N., Pat japoński nr 06 192 215 (1994); Chem. Abstr., **121**, 300598y (1994).
59. Calvert N., Connors T.A., Ross W.C.J., *Eur. J. Cancer*, **4**, 627 (1968)
60. Stevens C.D., Quinlin P.M., Meinken M.A., et.al., *Science* **112**, 561 (1950).
61. Huang Z., Lin Z., Huang J., *Eur. J. Med. Chem.* **36**, 863 (2001)
62. Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **52**, 91 (1995).
63. Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **53**, 269 (1996).
64. Pomarnacka E., Kozlarska-Kedra I., *Farmaco*, **58**, 423 (2003).
65. Pomarnacka E., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **53**, 373 (1996).
66. Pomarnacka E., Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **54**, 215 (1997).
67. Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **55**, 375 (1998).
68. Pomarnacka E., Kornicka A., *Farmaco*, **56**, 571 (2001).
69. Pomarnacka E., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **55**, 481 (1998).
70. Brzozowski Z., Kornicka A., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **56**, 135 (1999).
71. Brzozowski Z., Sączewski F., Gdaniec M., *Eur. J. Med. Chem.*, **37**, 285 (2002).
72. Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **54**, 49 (1997).
73. Brzozowski Z., Sączewski F., Gdaniec M., *Eur. J. Med. Chem.*, **38**, 991 (2003).
74. Brzozowski Z., Sączewski F., Gdaniec M., *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 3673 (2003).
75. Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **54**, 293 (1997).
76. Brzozowski Z., Sączewski F., *J. Med. Chem.*, **45**, 430 (2002).
77. Pomarnacka E., Gdaniec M., *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 1259 (2003).
78. Pomarnacka E., Kornicka A., Sączewski F., *Heterocycles*, **55**, 753 (2001).
79. Gołąb J., Jakubisiak M., Lasek W., Immunologia, Wyd. nowe, PWN, Warszawa 2002, 464-481.
80. Cocchi F., DeVico A.L., Garzino Demo A., Arya S.K., Gallo R.C., Lusso P., *Science*, **270**, 1811 (1995).
81. Choe H., Farzan M., Sun Y., Sullivan N., Rollins B., Ponath P.D., Wu L., Mackay C.R., LaRosa G., Newman W., Gerard N., Gerard C., Sodroski J., *Cell*, **85**, 1135 (1996).
82. Dorn C.P., Finke P.E., Oates B., Budhu R.J., Mills S.G., MacCoss M., Malkowitz L., Springer M.S., Daugherty B.L., Gould S.L., DeMartino J.A., Siciliano S.J., Carella A., Carver G., Holmes K., Danzeisen R., Hazuda D., Kessler J., Lineberger J., Miller M., Schleif W., Emini E.A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 259 (2001).
83. Finke P.E., Meurer L.C., Oates B., Mills S.G., MacCoss M., Maklowitz L., Springer M.S., Daugherty B.L., Gould S.L., DeMartino J.A., Siciliano S.J., Carella A., Carver G., Holmes K., Danzeisen R., Hazuda D., Kessler J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 265 (2001).

84. Finke P.E., Meurer L.C., Oates B., Shah S.K., Loebach J.L., Mills S.G., MacCoss M., Castonguay L., Malkowitz L., Springer M.S., Gould S.L., DeMartino J.A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2469 (2001).
85. Kim D., Wang L., Caldwell C.G., Chen P., Finke P.E., Oates B., MacCoss M., Mills S.G., Malkowitz L., Gould S.L., DeMartino J.A., Springer M.S., Hazuda D., Miller M., Kessler J., Danzeisen R., Carver G., Carella A., Holmes K., Lineberger J., Schleif W.A., Emini E.A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 3103 (2001).
86. Willoughby C.A., Berk S.C., Rosauer K.G., Degrado S., Chapman K.T., Gould S.L., Springer M.S., Malkowitz L., Schleif W.A., Hazuda D., Miller M., Kessler J., Danzeisen R., Holmes K., Lineberger J., Carella A., Carver G., Emini E.A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 3137 (2001).
87. De Clercq E., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, **297**, 1 (2001).
88. De Clercq E., *Nature Drug Discov.*, **1**, 13 (2002).
89. Chan J.H., Freeman G.A., Tidwell J.H., Romines K.R., Schaller L.T., Cowan J.R., Gonzales S.S., Lowell G.S., Andrews III C.W., Reynolds D.J., Clair M. St., Hazen R.J., Ferris R.G., Creech K.L., Roberts G.B., Short S.A., Weaver K., Koszalka G.W., Boone L.R., *J. Med. Chem.*, **47**, 1175 (2004).
90. Selvam P., Chandramohan M., De Clercq E., Witvrouw M., Pannecouque C., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **14**, 313 (2001).
91. Artico M., Silvestri G., Stefancich G., Massa S., Pagnozzi E., Musu D., Scintu F., Pinna E., Tinti E., La Colla P., *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **328**, 223 (1995).
92. Arranz E., Diaz J.A., Ingate S.T., Witvrouw M., Pannecouque C., Balzarini J., De Clercq E., Vega S., *J. Med. Chem.*, **41**, 4109 (1998).
93. Arranz E., Diaz J.A., Ingate S.T., Witvrouw M., Pannecouque C., Balzarini J., De Clercq E., Vega S., *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 2811 (1999).
94. De Clercq E., *Curr. Med. Chem.*, **8**, 1543 (2001).
95. Corbett J.W., Gearhart L.A., Ko S.S., Rodgers J.D., Cordova B.C., Klabe R.M., Erickson-Viitanen S.K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 193 (2000).
96. Katz R.A., Skalka A.M., *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 133 (1994).
97. Maurin C., Bailly F., Cotelle P., *Curr. Med. Chem.*, **10**, 1795 (2003).
98. Neamati N., *Exp. Opin. Invest. Drugs* **10**, 281 (2001).
99. Pommier Y., Neamati N., *Adv. Virus Res.*, **52**, 427 (1999).
100. Neamati N., Mazumder A., Zhao H., Sunder S., Burke T.R., Schultz R.J., Pommier Y., *Antivir. Chem. Chemother.*, **8**, 385 (1997).
101. Chen I.J., Neamati N., Nicklaus M.C., Orr A., Anderson L., Barchi J.J., Kelley J.A., Pommier Y., MacKerell A.D., Jr., *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 2385 (2000).
102. Goldkur Y., Graigie R., Cohen G.H., Fujiwara T., Yoshinaga T., Fujishita T., Sugimoto H., Endo T., Murai H., Davies D.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 13040 (1999).
103. Brzozowski Z.: *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **52**, 287 (1995).
104. Brzozowski Z.: *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **55**, 49 (1998).
105. Brzozowski Z.: *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **55**, 473 (1998).
106. Neamati N., Mazumder A., Sunder S., Owen J.M., Schultz R.J., Pommier Y., *Antivir. Chem. Chemother.*, **8**, 485 (1997).
107. Nicklaus M.C., Neamati N., Hong H., Mazumder A., Sunder S., Chen J., Milne G., Pommier Y., *J. Med. Chem.*, **40**, 920 (1997).

108. Flexner C.W., *Engl. J. Med.*, **338**, 1281 (1998).
109. Molla A., Granneman G.R., Sun E., Kempf D.J., *Antiviral Res.*, **39**, 1 (1998).
110. Gatell J.M., *J. HIV Ther.*, **6**, 95 (2001).
111. Casini A., Scozzafava A., Supuran C.T., *Exp. Opin. Ther. Patents*, **12**, 1307 (2002).
112. Rusconi S., La Seta Catamanacio S., *Expert Opin. Investig. Drugs*, **11**, 387 (2002).
113. Ghosh A.K., Shin D., Swanson L., *Farmaco*, **56**, 29 (2001).
114. De Meyer S., Aziijn H., van Ginderen M., de Baere J., Pauwels S., De Bethune M.P., *Antiviral Ther.*, **7**, 5 (2002).
115. Miller J.F., Furfine E.S., Hanlon M.H., Hazen R.J., Ray J.A., Robinson L., Samano V., Spaltenstein A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 959 (2004).
116. Turner S.R., Strohbach J.W., Tommasi R.A., Aristoff P.A., Johnson P.D., Skulnick H.I., Dolak L.A., Seest E.P., Tomich P.K., Bohanon M.J., Horng M.M., Lynn J.C., Chong K.T., Hinshaw R.R., Watenpaugh K.D., Janakiraman M.N., Thaisrivongs S., *J. Med. Chem.*, **41**, 3467 (1998).
117. Chrusciel R.A., Thaisrivongs S., Nicholas J.A., HIV protease inhibitors in early development. *Protease inhibitors in AIDS therapy*, Ogden R.C., Flexner C.W., Eds., Marcel Dekker. New York, **2001**, ss. 119-137.
118. Wlodawer A., Gustchina A., *Biochem. Biophys. Acta*, **1477**, 16 (2000).
119. Schechter I., Berger A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157 (1967).
120. Lee Y.S., Lee Y.S., Lee J.Y., Kim S.N., Lee C.K., Park H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 2625 (2000).
121. Dorsey B.D., Vacca J.P., Protease inhibitors in AIDS therapy, Eds, Marcel Dekker, New York, 2001, ss 65-83.
122. Hulten J., Bonham N.M., Nillroth U., Hansson T., Zuccarello G., Bouzide A., Aquist J., Classon B., Danielson U.H., Karlen A., Kvarnstrom I., Samuelsson B., Hallberg A., *J. Med. Chem.*, **40**, 885 (1997).
123. Backbro K., Lowgren S., Osterlund K., Atepo J., Unge T., Hulten J., Bonham N.M., Schaal W., Karlen A., Hallberg A., *J. Med. Chem.*, **40**, 898 (1997).
124. Hulten J., Andersson H.O., Schaal W., Danielson U.H., Classon B., Kvarnstrom I., Karlen A., Unge T., Samuelsson B., Hallberg A., *J. Med. Chem.*, **42**, 4054 (1999).
125. Schaal W., Karlsson A., Ahlsen G., Lindberg J., Andersson H.O., Danielson U.H., Classon B., Unge T., Samuelsson B., Hulten J., Hallberg A., Karlen A., *J. Med. Chem.*, **44**, 155 (2001).
126. Rice W.G., Schaeffer C.A., Harten B., Villinger F., South T.L., Summers M.F., Henderson L.E., Bess J.W.Jr., Arthur L.O., McDougal J.S., *Nature*, **361**, 473 (1993).
127. Rice W.G., Supko J.G., Malspeis L., Buckheit R.W.Jr., Clanton D., Bu M., Graham L., Schaeffer C.A., Turpin J.A., Domagala J., Gogliotti R., Bader J.P., Halliday S.M., Coren L., Sowder R.C., II, Arthur L.O., Henderson L.E., *Science*, **270**, 1194 (1995).
128. Mely Y., Cornille F., Fournie-Zaluski M.C., Darlix J.L., Roques B.P., Gerard D., *Biopolymers*, **31**, 899 (1991).
129. Ramboarina S., Moreller N., Fournie-Zaluski M.C., Roques B.P., *Biochemistry*, **38**, 9600 (1999).
130. Jones I.M., Morikawa Y., *Rev. Med. Virol.*, **8**, 87 (1998).
131. Loo J.A., Holler T.P., Sanchez J., Goliotti R., Maloney L., Reily M.D., *J. Med. Chem.*, **39**, 4313 (1996).
132. Scozzafava A., Casini A., Supuran C.T., *Curr. Med. Chem.*, **9**, 1167 (2002).
133. Huang M., Maynard A., Turpin J.A., Graham, Janini G.M., Covell D.G., Rice W.G., *J. Med. Chem.*, **41**, 1371 (1998).

134. Turpin J.A., Song Y., Inman J.K., Huang M., Wallqvist A., Maynard A., Covell D.G., Rice W.G., Appella E., *J. Med. Chem.*, **42**, 67 (1999).
135. Passerini R., Purrello G., *Gazz. Chim. Ital.*, **90**, 1277 (1960).
136. Merck & Co. Inc. *Patent belgijski* 669,534; *Chem. Abstr.*, **65**, 5467d (1965).
137. Goralski C.T., Pews R.G., Burk G.A., (Dow Chemicals Co.), *Patent Stanów Zjednoczonych Ameryki Pn.* 4,041,073; *Chem. Abstr.*, **87**, 151851a (1997).
138. Szczepanski H., Meyer W., Weibel F., (Ciba-Geigy A-G), *Patent europejski* 420,815; *Chem. Abstr.* **115**, 71151d (1991).
139. Brzozowski Z., Sławiński J., *Acta Polon. Pharm.*, **41**, 5 (1984).
140. Brzozowski Z., Sławiński J., *Acta Polon. Pharm.*, **41**, 133 (1984).
141. Brzozowski Z., Sławiński J., Gajewski F., Pomarnacka E., *Acta Polon. Pharm. Drug-Res.*, **50**, 199 (1993).
142. Brzozowski Z., Sławiński J., Angielski S., Szczepańska-Konkiel M., *Acta Polon. Pharm.*, **42**, 313 (1985).
143. Brzozowski Z., Sławiński J., *Acta Polon. Pharm.*, **42**, 319 (1985).
144. Brzozowski Z., Gajewski F., Sławiński J., Pomarnacka E., *Acta Polon. Pharm.*, **43**, 291 (1986).
145. Brzozowski Z., Sławiński J., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **49** (4), 85 (1992).
146. Brzozowski Z., Sławiński J., Gajewski F., Angielski S., Hoppe A., *Acta Polon. Pharm.*, **42**, 413 (1985).
147. Brzozowski Z., Sławiński J., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **49** (5), 81 (1992).
148. Brzozowski Z., Sławiński J., Borowik W., Gajewski F., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **49**, 93 (1992).
149. Brzozowski Z., Sławiński J., Kosmala M., Ołędzka K., Filczewski M., Miłobędzka J., Lewandowski K., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **48**, 39 (1991).
150. Pomarnacka E., Brzozowski Z., Filczewski M., Szymańska-Kosmala M., Ołędzka K., *Acta Polon. Pharm.* **42**, 501 (1985).
151. Brzozowski Z., Sławiński J., Ołędzka K., Kosmala M., Lewandowski K., Filczewski M., Miłobędzka J., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **50**, 353 (1993).
152. Pomarnacka E., Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.*, **43**, 6 (1986).
153. Pomarnacka E., *Sci. Pharm.*, **55**, 121 (1987).
154. Brzozowski Z., Pomarnacka E., Gajewski F., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **51**, 149 (1994).
155. Pomarnacka E. Kornicka A., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **56**, 143 (1999).
156. Brzozowski Z., Kornicka E., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **51**, 251 (1994).
157. Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **51**, 69 (1994).
158. Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.* **42**, 421 (1985).
159. Pomarnacka E., Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.* **43**, 195 (1986).
160. Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **50**, 195 (1993).
161. Swain C.G., Scott C.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 141 (1953).
162. Pryor W.A., *Mechanisms of Sulfur Reactions*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1962.
163. Exner O., Janák P., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **40**, 2510 (1975).
164. Buděšínský Z., Letovský V., Zikmund E., *Česk. Farm.*, **9**, 466 (1960).
165. Maahs G., Hegenberg P., *Angew. Chem*, **78**, 927 (1966).
166. Kinney W.A., Lee N.E., Garrison D.T., Podlesny E.J., Jr., Simmonds J.T., Bramlett D., Notvest R.R., Kowal D.M., Tasse R.P., *J. Med. Chem.*, **35**, 4720 (1992).

167. Butera J.A., Antane M.M., Antane S.A., Argentieri T.M., Freedon C., Graceffa R.F., Hirth B.H., Jenkins D., Lennox J.R., Matelan E., Norton N.W., Quagliato D., Sheldon J.H., Spinelli W., Warga D., Wojdan A., Woods M., *J. Med. Chem.* **43**, 1187 (2000).
168. El Khadem H.S., Shalaby M.A., Coxon B., Fatiadi A.J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1511 (1992).
169. El Khadem H.S., Shalaby M.A., Coxon B., Fatiadi A.J., *Carbohydr. Res.* **239**, 85 (1993).
170. Brzozowski Z., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **55**, 233 (1998).
171. Pomarnacka E., Kornicka A., *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.*, **55**, 297 (1998).
172. Heagarty A.F., Cashman M.P., Scott F.L., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1381 (1972).
173. Shawali A.S., Hassaneen H.M., *Indian J. Chem. Sect. B*, **14**, 549 (1976).
174. Aylward J.B., Scott F.L., *J. Chem. Soc. B*, 1080 (1969).
175. Heagarty A.F., Scott F.L., *J. Chem. Soc. B*, 672 (1966).
176. Marchand C., Neamati N., Pommier Y., *Methods Enzymol.*, **340**, 624 (2001).
177. Neamati N., Barchi J.J., Jr., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2**, 211 (2002).

7. PUBLIKACJE P1 – P8