
Nuevos agentes antineoplásicos: diseño, síntesis y determinación experimental

New anti-neoplastic agents: design, synthesis and experimental determination

M.J. Gil¹, M. Manú¹, V. Martínez¹, A. González¹, I. Encío², C. Arteaga², M. Migliaccio²

INTRODUCCIÓN

La quimioterapia en enfermedades neoplásicas ha hecho grandes avances desde que se introdujeron los primeros regímenes clínicamente activos en los años 40; aún hoy la quimioterapia constituye la terapia de choque en aproximadamente el 25% de todos los pacientes de cáncer. El advenimiento de una quimioterapia verdaderamente eficaz en la década de los 60 generó la esperanza de que la mayoría de los tumores clínicos podrían curarse. Sin embargo, en términos de cura a largo plazo, los avances prácticamente se han restringido a tumores de origen hematopoyético (ej. leucemia y linfomas). Para los carcinomas y otros tumores no hematogénicos las mejoras en la supervivencia, medida en ciclos de 5 años, han sido como mucho modestas o se produjeron en tipos de enfermedades relativamente raras como el cáncer testicular y han llegado a través de una refinada combinación de protocolos de manipulación

hormonal. Por otro lado los tumores no hematogénicos representan más del 90% del millón de nuevos casos de cáncer diagnosticados en U.S.A. al año. En la década de los 80 el número de nuevos agentes que presentan suficiente avance clínico como para ser aprobados, ha disminuido dramáticamente.

En la presente década ha sido descubierta una nueva familia de compuestos, las diarilsulfonilureas^{1,2} no emparentada con los oncolíticos conocidos y que posee un amplio espectro de actividad contra tumores sólidos³. Methotrexate ó 5-FU poseen un espectro de actividad claramente inferior a las diarilsulfonilureas.

A diferencia de los agentes quimioterapéuticos antineoplásicos convencionales, el sulofenur (primera diarilsulfonilurea en fase clínica) en estudios clínicos en fase II no induce alopecia, ni es mielosupresivo, ni cardiotóxico, ni nefrotóxico. Como efectos secundarios de esta familia cabe destacar la metahemoglobinemia, producida

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 85-92.

1. Departamento de Química Aplicada. Universidad Pública de Navarra.
2. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Navarra.

Correspondencia:

Víctor Martínez Merino
Departamento de Química Aplicada
Universidad Pública de Navarra
Campus Arrosadía s/n
31006 Pamplona
Tfno. 948 169590
Fax 948 169565

por uno de los metabolitos³ y la hipoglucemia¹ que suele venir asociada a un buen número de sulfonilureas. Los estudios realizados y publicados³ hasta el momento sobre el sulofenur, han demostrado que es muy activo en cepas de linfoma (6C3HED) y mielomas de células plasmáticas (X5563), adenocarcinomas (CA755 y C3H), carcinoma de ovario (M-5), de colon (26), e inactivo en carcinoma de pulmón Lewis, melanoma (B16) y leucemia linfocítica (P388).

Los estudios de relación entre la estructura química de las sulfonilureas y su actividad antitumoral realizados hasta el momento por métodos clásicos, no han arrojado luz sobre el mecanismo de acción y únicamente han dado lugar a conclusiones vagas o nulas¹. Por ello, la optimización de esta familia se realiza en la actualidad de forma prácticamente empírica⁴.

Un estudio exhaustivo de relación estructura-actividad en tres dimensiones de las diarilsulfonilureas con los métodos más modernos, como el CoMFA⁵, permite el estudio físico-químico molecular en 3 dimensiones de los agentes activos, mejorando considerablemente la comprensibilidad y aplicabilidad de los estudios de relación entre la estructura química de los fármacos y su actividad. Un trabajo preliminar de nuestro equipo de investigación⁶ sobre diarilsulfonilureas, ya ha demostrado que el método CoMFA es de gran utilidad en la predicción de la actividad antitumoral de este tipo de moléculas. En base a ello, nuestra hipótesis de trabajo fue que pueden determinarse a través de CoMFA los requerimientos físico-químicos condicionantes de la actividad antitumoral de los nuevos agentes diarilsulfonilureas, con el fin de hallar los derivados óptimos con el menor número de efectos secundarios y que sean clínicamente eficaces.

El objetivo principal del presente proyecto es la optimización de las diarilsulfonilureas como agentes oncolíticos. Este objetivo general se apoya en los siguientes objetivos secundarios:

- Parametrización del lugar de acción de las diarilsulfonilureas, a través del estudio de la relación estructura química-acti-

vidad antineoplásica sobre linfoma 6C3HED.

- Proposición del modelo fisicoquímico de máxima actividad antineoplásica.

- Síntesis y parametrización de las moléculas óptimas propuestas.

- Determinación experimental de la actividad antitumoral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Parametrización

Partiendo de un estudio conformacional, y en base a los datos cristalográficos de algunas de las sulfonilureas más utilizadas en medicina, se parametrizaron 96 diarilsulfonilureas con actividad antineoplásica recogidas en la bibliografía^{1,4}, utilizando para ello métodos semiempíricos de cálculo de orbitales moleculares (OM). Una vez parametrizadas las moléculas, se procedió al estudio de relación estructura química-actividad biológica (QSAR) a través de CoMFA, con el fin de determinar las características fisicoquímicas necesarias para que estas moléculas presenten actividad antineoplásica.

El nuevo método "Comparative Molecular Field Analysis"⁷ (CoMFA) que se ha aplicado en el presente trabajo, es la herramienta más potente para abordar los estudios de relación estructura química-actividad biológica (QSAR) con el objeto de optimizar una serie o concluir un modelo de receptor. Las principales características que definen este método son:

- Representación de las moléculas en función de sus campos estérico y electrostático, calculados en las intersecciones de un entramado tridimensional.

- Utilización de una nueva técnica de ajuste de campos que permite un alineamiento óptimo entre las moléculas, minimizando las diferencias entre sus campos.

- Análisis estadístico de los parámetros basado en los métodos SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analysis*) para variables categóricas, o PLS (*Partial Least Squares*) para variables continuas, utilizando una validación cruzada como medida de la capacidad predictiva.

- Representación gráfica tridimensional de los resultados según Cramer y col⁸.

Los resultados permiten la elaboración del modelo de actividad anticancerígena y a partir de esta premisa la proposición de la síntesis de moléculas óptimas.

Como paso previo a la modelización molecular de diarilsulfonilureas se llevó a cabo la aplicación de diversos métodos computacionales sobre el sistema isotiazolo[5,4-*b*]piridin-3(2H)-ona y derivados⁹. La estructura, dipolos y densidades de carga de las moléculas seleccionadas se calcularon mediante programas de mecánica molecular (SYBYL 6.1¹⁰), mecano-cuánticos semiempíricos (MOPAC 6.0¹¹ y AMPAC 5.0¹²) y *ab-initio* (GAUSSIAN 92¹³). Los modelos teóricos empleados fueron: *Tripos* (SYBYL), MNDO, AM1 y PM3 (MOPAC), SAM1 (AMPAC), HF/3-21G*, HF/6-31G* y MP2/6-31G* (GAUSSIAN 92). Los programas fueron procesados en una estación de trabajo Iris 4D35-TG de Silicon Graphics.

Los análisis de correlación estadística y de regresión entre cualquiera de las propiedades experimentales y las resultantes de los distintos modelos teóricos se abordaron con el método PLS (Partial Least Squares) incluido en el módulo QSAR del programa Sybyl¹⁰. Este método presenta la ventaja, frente a la regresión múltiple con-

vencional, de poder abordar análisis estadísticos con mayor número de variables independientes que de casos.

Síntesis

Las sulfonilureas se representan por la estructura siguiente: R₁-SO₂-NH-CO-NH-R₂

Una de las rutas sintéticas básicas utilizadas para la obtención de estos compuestos es la reacción de sulfonamidas con arilisocianatos (Delarge¹⁴, Sarges y cols¹⁵). La síntesis de 2-[(4-clorofenilcarbamoil) aminosulfonil]-3-piridincarboxilato de etilo se llevó a cabo por tratamiento de 2-aminosulfonil-3-piridincarboxilato de etilo con 4-clorofenilisocianato en DMF, utilizando NaH como base y manteniendo atmósfera de N₂. El rendimiento fue del 60% (Fig. 1).

Las sulfenimidias reaccionan con arilisocianatos para dar sulfenilureas¹⁶. Asimismo está reseñada en la bibliografía la síntesis de N-aryl-3-oxoisotiazolo[5,4-*b*]piridin-2-carboxamidas a partir del sistema 3-oxoisotiazolo[5,4-*b*]piridina y arilisocianatos¹⁷. La condensación de 1,2-dihidro-3-oxoisotiazolo[5,4-*b*]piridina con *p*-clorofenilisocianato produjo N-*p*-clorofenil-3-oxoisotiazolo[5,4-*b*]piridin-2-carboxamida con rendimiento del 90% (Fig. 1).

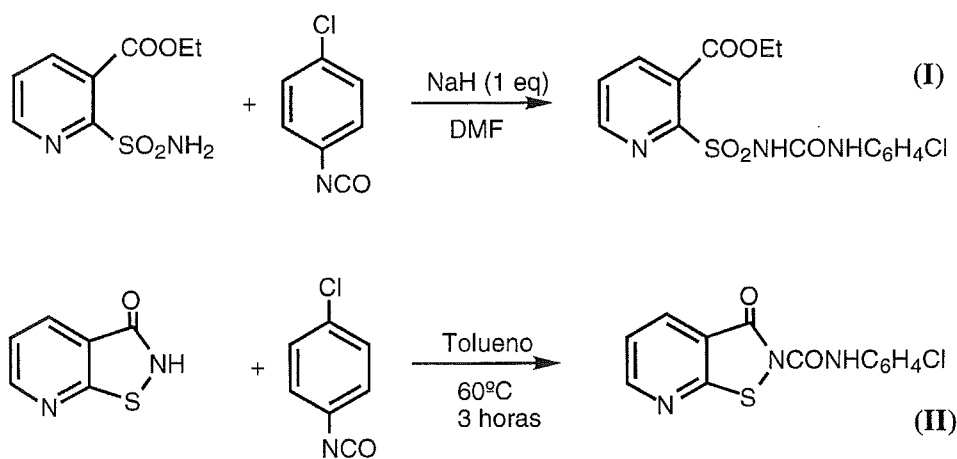


Figura 1. Síntesis de los compuestos propuestos I y II.

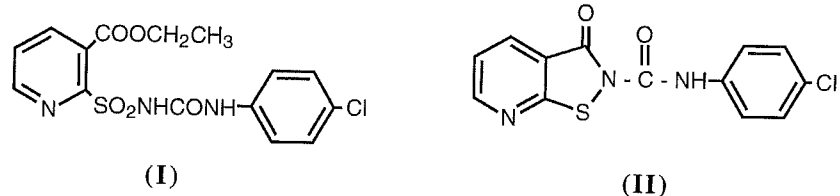
Determinación de la actividad antitumoral *in vitro*

Para estudiar la posible actividad inhibidora del crecimiento tumoral de los productos sintetizados realizamos una serie de experimentos en los que diferentes líneas de células tumorales se incubaron en presencia de estos productos. A continuación comparamos mediante un ensayo de citotoxicidad el crecimiento de estas células con el de otras incubadas en ausencia de productos.

Los estudios de citotoxicidad se realizaron sobre cinco líneas celulares de origen tumoral: HT29, HTB54, K562, MI13443, CCRF-CEM, representativas de cinco tipos de cáncer humano (Tabla 1). Cada línea celular fue cultivada en frascos de 75 cm²

en medio RPMI 1640 suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2mM. La concentración de suero bovino fetal fue del 5% excepto en el caso de la línea CCRF-CEM, que necesitó un 20% de suero para crecer de forma adecuada. Los cultivos se realizaron en incubador a 37°C y en atmósfera humidificada conteniendo un 5% de CO₂. Las células se mantuvieron en crecimiento exponencial mediante la realización de subcultivos dos veces por semana. En el caso de las líneas de células adherentes (HT29, HTB54 y MI13443) se empleó una solución de 0,05 % de tripsina- EDTA (3 ml por cada frasco) para soltarlas del plástico, siendo la tripsina neutralizada a continuación mediante la adición de 10 ml de medio completo.

Tabla 1. Crecimiento celular (%) a diferentes concentraciones de los productos.



Conc. (M)	HT29		HTB54		MI13443		K562		CCRFCEM	
	Media	S.D	Media	S.D	Media	S.D	Media	S.D	Media	S.D
I 1,0E-04	78,07	8,12	71,83	5,97	72,14	2,98	-42,79	6,23	-61,11	0,24
1,0E-05	109,92	5,15	86,75	10,35	109,09	2,90	66,63	8,13	22,97	4,42
1,0E-06	108,42	2,87	101,45	2,18	104,01	4,58	74,29	4,32	98,96	0,06
1,0E-07	111,04	2,76	100,00	6,80	108,65	6,84	57,15	3,74	94,27	5,70
1,0E-08	109,98	5,16	117,40	3,45	101,27	3,98	58,00	7,68	90,65	1,14
II 1,0E-04	60,81	4,17	-20,30	1,97	9,23	1,01	-54,90	0,87	-62,50	0,46
1,0E-05	95,89	9,26	76,38	11,49	64,41	3,30	24,34	1,60	27,44	4,41
1,0E-06	113,53	9,08	109,95	4,76	93,77	1,23	65,79	3,23	46,13	9,44
1,0E-07	105,49	8,54	113,31	2,60	94,64	1,23	89,54	5,09	46,71	7,80
1,0E-08	97,70	3,73	113,01	0,43	94,64	2,87	62,40	10,10	102,94	10,20

El efecto citotóxico de cada producto debía ser ensayado a cinco dosis diferentes entre 10⁻⁴ a 10⁻⁸ M. Para ello cada producto se disolvió inicialmente en DMSO a una concentración 0,1 M, y posteriormente se realizaron diluciones seriadas con medio de cultivo hasta obtener soluciones de concentración 100 veces superior a cada una de las

dosis finales que se proyectaba ensayar. Estas alícuotas fueron guardadas hasta la realización de cada experimento a -20°C. Experimentos preliminares demostraron claramente que las pequeñas cantidades de DMSO añadidas junto con cada producto a los cultivos celulares no tenían efecto alguno sobre el crecimiento de las células.

Las células de cada línea, procedentes de un cultivo en crecimiento exponencial, fueron retiradas de los frascos (empleando la solución de tripsina antes citada en el caso de células adherentes), centrifugadas a 1200 r.p.m. durante 5 min, resuspendidas en un pequeño volumen de medio completo y contadas con un hemocitómetro en el microscopio invertido. (Tabla 2).

Tras el recuento, se añadió el volumen de medio necesario para obtener una densidad celular apropiada (diferente para cada línea celular), y a continuación se colocaron 100 ml de esta suspensión de células en cada pocillo de placas de micro-

cultivo de 96 pocillos (de fondo plano en el caso de células adherentes, de fondo en U en el caso de células no adherentes). El número de células por pocillo que resultaba adecuado para cada línea celular fue determinado en experimentos preliminares. En ellos estudiamos la relación entre el número de células colocado inicialmente en los pocillos y la absorbancia que se obtiene en el ensayo final con MTT, y determinamos en qué rango esta relación era lineal. El número de células escogido en cada caso se encontraba dentro de este rango, siendo lo más elevado posible para aumentar la sensibilidad del método.

Tabla 2. Relación del número de células por pocillos de cada tipo de tumor.

<i>Línea celular</i>	<i>Tipo de tumor</i>	<i>Nº de células iniciales por pocillo</i>
HT-29	Carcinoma de colon	10000
HTB-54	Carcinoma de pulmón	10000
MI13443	Melanoma	10000
K-562	Leucemia mieloblástica	5000
CCRF-CEM	Leucemia linfoide	40000

A continuación se añadió a cada pocillo 100 ml de medio con el producto en estudio o 100 ml de medio completo para los pocillos control y "tiempo cero", de modo que el volumen final fue de 200 ml. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Las células preparadas para calcular la absorbancia a "tiempo cero" se colocaron en una placa aparte y el ensayo colorimétrico de MTT para estas células se llevó a cabo a continuación. El resto de las placas fueron incubadas durante 3 días a 37°C y en atmósfera humidificada conteniendo un 5% de CO₂, procediendo posteriormente al ensayo colorimétrico.

La actividad inhibidora del crecimiento tumoral fue estudiada mediante un microensayo colorimétrico de citotoxicidad basado en el empleo del Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoilo (MTT)¹⁸. Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución, a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales de color azul oscuro. Esta reacción está catalizada por la succinato deshidrogenasa mitocondrial, y la cantidad de producto formado puede ser

fácilmente cuantificada utilizando un lector de placas de ELISA. Esto permite estimar el número de células vivas y activas que existe en un cultivo realizado en presencia de un producto cuyo efecto se quiere estudiar.

Una vez transcurridos los 3 días de incubación (o el primer día en el caso de la placa "tiempo cero") añadimos 50 ml de solución de MTT disuelto en medio de cultivo a cada uno de los pocillos con células y las incubamos en la estufa de cultivo durante 4 horas permitiendo a las células vivas metabolizar el MTT a formazán. A continuación el sobrenadante es aspirado en un aparato lavador de placas programado de forma que sólo quede un pequeño volumen de medio en cada pocillo, de unos 10 ml aproximadamente. En el caso de las líneas celulares de crecimiento en suspensión las placas fueron centrifugadas previamente a 1500 r.p.m. durante 3 minutos para evitar que las células fueran succionadas con el medio. Posteriormente añadimos 150 ml de DMSO que disuelve los cristales de formazán. Las placas se agitaron mecánicamente durante unos minutos para facilitar la disolución del for-

mazán y obtener una coloración homogénea, y la lectura se llevó a cabo en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 550 nm, sustrayendo el valor obtenido a 630 nm para retirar ruido de fondo.

Con la absorbancia obtenida en cada pocillo de células incubadas con un producto a una determinada dosis (A_x) se obtuvo el % de crecimiento de esa muestra de células respecto al control aplicando las fórmulas:

$$\text{Si } A_x > 0, \quad \% = \frac{A_x - A_{T0}}{A_c - A_{T0}}$$

$$\text{Si } A_x < 0, \quad \% = \frac{A_x - A_{T0}}{A_{T0}}$$

Donde A_c es la absorbancia media de las células control incubadas en ausencia de producto, y A_{T0} la de las células a tiempo cero, determinada en el momento de la inoculación, tres días antes.

Adicionalmente se calcularon los siguientes parámetros de citotoxicidad:

GI₅₀ (Concentración de producto que provoca la inhibición del 50% del crecimiento celular)

TGI (Inhibición total del crecimiento)

LC₅₀ (Concentración del compuesto que provoca la muerte del 50% de las células).

RESULTADOS

Modelo de actividad antineoplásica

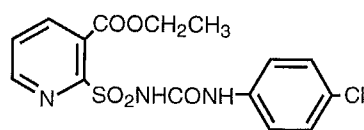
El análisis SIMCA establece un modelo de actividad antineoplásica para las arilsulfonilureas donde el grupo R_1 debe ser un sistema arílico, esencialmente plano y lipofílico. La actividad antitumoral aumenta cuando los sustituyentes sobre un sistema feníli-

co, tomado como núcleo básico en R_1 , crean potencial electrostático positivo alrededor de su posición *meta* y potencial electrostático negativo alrededor de su posición *para*. El grupo R_2 debe ser también esencialmente plano, preferentemente un sistema arílico. Las interacciones estéricas de sistemas fenílicos 3 y/o 4 sustituidos, tanto en R_1 como en R_2 , son favorables para presentar actividad. Sin embargo, los sustituyentes fenílicos tienen limitado su tamaño en alrededor de 8 Å medidos desde el puente sulfonilurea hacia su dirección *para* y en alrededor de 7,5 Å medidos desde el puente sulfonilurea hacia su dirección *meta*. A diferencia de R_1 , para que se presente actividad los sustituyentes en *meta* y *para* de R_2 no pueden estar enlazados entre sí.

Fórmula: $R_1\text{-SO}_2\text{-NH-CO-NH-R}_2$

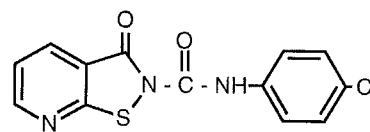
Entre los posibles nuevos derivados se eligió el sistema piridínico (C_5H_5N) como R_1 porque cumple las condiciones de tamaño y planaridad del modelo y además mimetiza las bases púricas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos. Adicionalmente se introdujo un grupo carboxilato de etilo (COOEt) para ocupar la posición *orto*, dado que este grupo aumenta la facilidad de transporte de los sistemas heterocíclicos a través de las membranas biológicas¹⁹.

En función de las justificaciones anteriores y del modelo elaborado, se propuso la síntesis de la piridinsulfonilurea I. Adicionalmente, mostraban particular interés las proto-sulfonilureas cíclicas del tipo de N-aril-3-oxoisotiazolo[5,4-b]piridin-2-carboxamidas puesto que podían permitir fijar conformacionalmente el modelo. El carbonilo en posición 3 mimetiza el grupo SO_2 de las sulfonilureas que fija la conformación del anillo arílico R_1 . Por lo tanto se propuso la síntesis de 2-(4-clorofenil)aminocarbonil-3-oxoisotiazolo[5,4-b]piridina II correspondiente a la reducción y ciclación de la sulfonilurea I (Fig. 2).



(I)

Figura 2. Piridinsulfonilureas I y II.



(II)

Establecido el modelo de actividad y sintetizadas las moléculas propuestas según material y métodos, se llevó a cabo la determinación de la actividad antitumoral *in vitro* por el método descrito en el apartado anterior.

En la tabla 1 se detallan los crecimientos celulares (% respecto al control, *media*±*S.D.*) en las líneas HT29 (colon), HTB54 (pulmón), MI13443 (melanoma), K562 (leucemia) y CCRF-CEM (leucemia) para los nuevos productos ensayados. La tabla 2 refleja los datos de citotoxicidad.

DISCUSIÓN

La sulfonilurea 2-[(4-clorofenilcarbamoyl)aminosulfonil]-3-piridincarboxilato de etilo I propuesta por el modelo de actividad antineoplásica deducido en este proyecto, ha resultado ser tan activa como la sulfonilurea más activa *in vitro* frente a la leucemia linfocítica (CCRF-CEM) publicada hasta la fecha. Dicha línea celular es el nexo de unión entre los resultados de este trabajo y los publicados anteriormente para las diarilsulfonilureas^{1,4}.

Tabla 2. Citotoxicidad (μM) de los compuestos I y II.

Líneas	I			II		
	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀
HT29	>100	>100	>100	>100	>100	>100
HTB54	>100	>100	>100	18	61	>100
MI13443	>100	>100	>100	18	>100	>100
K562	14	46	>100	2,3	20	86
CEM	4,3	18	73	1,0	18	73

Como puede observarse en la tabla 2 la dosis necesaria del compuesto I para inhibir el crecimiento celular de la línea celular CCRF-CEM hasta el 50% respecto al control (GI₅₀) fue de 4,3 mM, al igual que las más activa publicada anteriormente [N³-(3,4-diclorofenil)-N¹-(fenilsulfonil)urea]¹.

Frente a la línea de leucemia mieloblástica (K562) la actividad de I disminuye apreciablemente, y queda sólo como actividad residual frente al melanoma (MI13443) y los carcinomas de colon (HT29) y pulmón (HTB54).

La conversión de una cadena abierta a otra cíclica, como la isotiazolo[5,4-*b*]piridina II ha conducido a una mayor actividad frente a CEM (GI₅₀ de 1,0 mM), siendo también activa frente al melanoma (MI13443) y el carcinoma de pulmón (HTB54).

La mayor actividad del sistema cíclico II parece indicar que el sistema arílico R₁ adopta preferentemente una conformación bisectriz del grupo SO₂ a pesar de un coste energético moderado. Tampoco puede descartarse con los datos actuales, que

ambas moléculas actúen sobre receptores diferentes.

A tenor de los resultados anteriores la 2-(4-clorofenil)aminocarbonil-3-oxoisotiazolo[5,4-*b*]piridina II puede ser un excelente cabeza de serie para un estudio de desarrollo posterior que en estos momentos se está abordando.

Del presente trabajo se concluye que:

- Se ha parametrizado el lugar de acción de las sulfonilureas sobre el linfoma 6C3HED, que es extrapolable a los resultados *in vitro* sobre la línea celular leucemia linfocítica CCRF-CEM. Sobre la base estructural R₁-SO₂-NH-CO-NH-R₂ ha podido concluirse que el fenómeno de transporte de las moléculas hacia el lugar de acción es irrelevante en la actividad. Sin embargo el acoplamiento sustrato-receptor sí parece estar gobernado por interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y estéricas.

- El análisis 3D-QSAR ha establecido un modelo de actividad antineoplásica para las sulfonilureas.

- A tenor del modelo anterior se propone como molécula óptima la diarilsulfonilurea 2-[(4-clorofenilcarbamoil)amino-sulfonil]-3-piridincarboxilato de etilo I y como molécula de interés la estructura cíclica relacionada 2-(4-clorofenil)amino-carbonil-3-oxoisotiazolo[5,4-*b*]piridina II.

- Se han sintetizado las moléculas propuestas (I y II) por los modelos de actividad, y se ha realizado la parametrización del sistema cíclico.

- Se ha determinado la actividad antitumoral in vitro de las moléculas propuestas sobre cinco líneas celulares de origen tumoral humano: HT29 (carcinoma de colon), HTB54 (carcinoma de pulmón), MI13443 (melanoma), K562 (leucemia mieloblástica) y CCRF-CEM (leucemia linfoide).

- La sulfonilurea I ha resultado tan potente frente a la cepa CCRF-CEM como la sulfonilurea publicada¹ más activa. Dicha línea celular es el nexo de unión entre los resultados aquí recogidos y los publicados anteriormente para las diarilsulfonilureas^{1,4}. El compuesto II ha dado mejores resultados frente a 4 de las cinco líneas celulares ensayadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. HOWERT JJ, GROSSMAN CS. Novel agents effective against solid tumors: The diarylsulfonylureas. Synthesis, activities, and analysis of quantitative structure-activity relationships. *J Med Chem* 1990; 33: 2393-2407.
2. HOWERT JJ. Sulofenur. *Drugs of the future* 1991; 16: 517-520.
3. BODER GB, EHLHARDT WJ, et al. Discovery of novel antineoplastic sulfonylureas. *Drugs Future* 1992; 17: 1111-1114.
4. MOHAMADI F, SPEES MM, GRINDEY GB. Sulfonylureas: A new class of cancer chemotherapeutic agents. *J Med Chem* 1992; 35: 3012-3016.
5. KIM KH. 3D-Quantitative Structure-Activity-Relationships-Description of electronic effects directly from 3D-structures using a grid comparative molecular field analysis (CoMFA) approach. *Quant Struct Act Relatsh* 1992; 11: 127.
6. MARTÍNEZ-MERINO V, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ A, GONZÁLEZ A, GIL MJ. 10th European Symposium on structure-activity relationships: QSAR and molecular modelling. Barcelona 1994.
7. HANDLEY S. Rd. Qsar module of Sybyl 6.1 1994 Tripos Associates Inc., 1699, St. Louis, Missouri 63144-2913, USA.
8. CRAMER RD, PATTERSON DE, BUNCE JD. Comparative molecular field analysis (CoMFA) 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc* 1988; 110: 5959-5967.
9. MARTÍNEZ-MERINO V, GARCIA JI, MAYORAL JA, GIL MJ, ZABALZA JM, FAYET JP et al. Molecular modelling of the Isothiazolo[5,4-*b*]pyridin-3(2*H*)-one Derivatives. *Tetrahedron* 1996; 52: 8947-8956.
10. LEVITT G. Synthesis and chemistry of agrochemicals II. ACS Symposium Series 443. Washington 1991: 16-31.
11. MORIMOTO K, MAKINO K, YAMAMOTO S, SAKATA G. Synthesis of Fluoromethyl, Difluoromethyl and Trifluoromethyl analogues of Pyrazosulfuron-ethyl as herbicides. *J Het Chem* 1990; 27: 807-810.
12. RABJOHN N. *Organic Synthesis Vol VII*, Wiley Intersciencie. New York, 1963: 307-308.
13. DELARGE J, LAPIERE CL. Synthèse et propriétés diurétiques de quelques sulfonylurées apparentées au torasémide. *Eur J Med Chem* 1980; 15: 299-304.
14. DELARGE J. Chemistry and pharmacological properties of the Pyridine-3-sulfonylurea Derivative Torasemide. *Arzneim Forsch/ Drug Res* 1988; 38: 144-146.
15. SARGES R, KUHLA DE, WIEDERMANN E, MAIHEW, DA. Sulfamylurea hypoglycemic agents. 6. High-potency Derivatives. *J Med Chem* 1976; 19: 695-709.
16. MACLOGP 1.0. BioByte Corp., 201 W. Fourth STç., Suite 204, Claremont, CA 91711, 1994.
17. ZAWISZA T, MALINKA W. Synthesis and properties of some derivatives of 2H-4,6-dimethylpyrido[3,2-*d*]isothiazolin-3-one. *II Farmaco Ed Sc* 1985; 40: 124-132.
18. MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
19. LEO AJ. *Comprehensive Medicinal Chemistry*, vol 4, cap.18.7. Ed C.Hansch, Pergamon Press, Oxford 1990; 295-347.