

Diarilamidini: dizajn, interakcija s DNA i biološka aktivnost

KUI – 12/2011
Prispjelo 8. srpnja 2010.
Prihvaćeno 18. studenog 2010.

I. Stolić* i M. Bajić

Zavod za kemiju i biokemiju, Veterinarski fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diarilamidini čine skupinu biološki aktivnih spojeva koji se više od pola stoljeća upotrebljavaju za tretman parazitskih bolesti. Iako mehanizam njihovog biološkog djelovanja još nije potpuno razjašnjen, utvrđeno je kako je biološka aktivnost posljedica vezanja u mali utor DNA. Zbog toga su spojevi iz ove klase, prvotno razvijani radi pronalaska lijekova protiv parazitskih bolesti, s vremenom prepoznati kao lijekovi potencijalno široke primjene (protiv npr. HIV-oportunističkih infekcija ili tumora) koja se temelji na interakciji s DNA – primarnim genskim materijalom. Pojava rezistencije i nekih neželjenih pratećih posljedica potakla je istraživanja i razvoj novih učinkovitijih lijekova kao i određivanje mehanizma njihovog djelovanja na molekularnom nivou. U ovom radu dan je pregled istraživanja utjecaja strukture pojedinih diarilamidina na afinitet i selektivnost pri vezanju u mali utor DNA i na njihovu biološku aktivnost.

Ključne riječi: *Diarilamidini, mali utor B-DNA, biološko djelovanje*

Uvod

Tijekom čitave ljudske povijesti parazitske bolesti uzrokovane različitim, u pravilu smrtonosnim mikroorganizmima, odnijele su velik broj ljudskih života. Malaria, afrička tripanosomijaza (HAT ili bolest spavanja), koju uzrokuju *Trypanosoma brucei gambiense* i *Trypanosoma brucei rhodesiense*, Changesova bolest, koju uzrokuje *Trypanosoma cruzi* i lišmanioza, najraširenije su parazitarne bolesti. Navedene bolesti primarno su raširene u tropskim i subtropskim područjima. Pretpostavlja se da je 300 – 500 tisuća ljudi zaraženo HAT-om, 16 – 18 milijuna ljudi boluje od Changesove bolesti, dok je lišmanioza raširena u stotinjak država, s oko 350 milijuna potencijalnih žrtava i oko 2 milijuna novooboljelih svake godine. Među navedenim bolestima malaria je najraširenija. Procjenjuje se da danas od malarije boluje više od 300 milijuna ljudi, a umre ih najmanje milijun godišnje.¹

Siromaštvo, nedostatak hrane, ratovi, klimatske promjene, migracija i porast stanovništva u zaraženim područjima glavni su uzroci povećanja broja novooboljelih kao i daljnje širenje navedenih bolesti. Početkom dvadesetog stoljeća zabilježen je najveći broj smrtnih slučajeva uzrokovanih epidemijom HAT-a. I danas ta bolest, koja je bez odgovarajućeg tretmana u pravilu smrtonosna, ima status epidemije u oko dvadesetak subsaharskih država afričkog kontinenta. Uz to, svake se godine i u nerazvijenim i u razvijenim zemljama povećava broj oboljelih od lišmanioze, bolesti koju izazivaju paraziti iz roda *Leishmania*.

Napredak u antiprotozoalnoj kemoterapiji sredinom prošlog stoljeća ograničio je daljnje širenje bolesti uzrokovanih parazitima. Međutim danas se javila potreba za razvijanjem novih lijekova jer oni koji se već desetljećima upotrebljavaju u liječenju, osim što izazivaju brojne sporedne reakcije

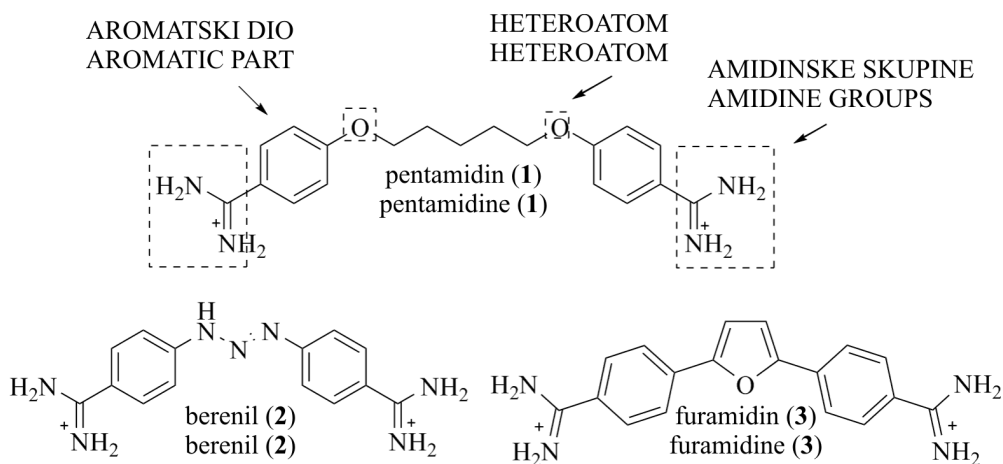
u ljudskom organizmu, postali su nedjelotvorni zbog toga što su paraziti tijekom godina razvili otpornost na njih. Pojava rezistencije na postojeće lijekove danas čini glavnu prepreku u kontroli i suzbijanju navedenih bolesti.

Diarilamidini

Diarilamidini, molekule koje se nekovalentnim vezama vežu u mali utor DNA, jedna su od najispitivanijih klasa spojeva koju karakterizira visoka selektivnost i širok spektar bioloških aktivnosti, od antimikrobnih, antiviralnih, antibakterijskih do antitumorskih.² Molekule iz ove klase spojeva od iznimnog su terapijskog interesa, posebno u liječenju parazitskih bolesti.

Klasični spojevi koji pripadaju klasi diarilamidina su nekoncenzirani aromatski dikationi kao što su pentamidin (**1**) i berenil (**2**), za koje se zna da se vežu u mali utor DNA bogat AT-parovima baza, koji imaju dugu povijest antimikrobnog djelovanja (slika 1).^{3,4} Pentamidin (**1**) se upotrebljava u liječenju bolesti uzrokovanih protozoama kao što su lišmanioza i tripanosomijaza još od 30-ih godina prošlog stoljeća.³ Danas je također u kliničkoj uporabi u liječenju upale pluća, uzrokovane oportunističkim patogenom *Pneumocystis jiroveci* (poznatiji pod ranije upotrebljavanim imenom *Pneumocystis carinii*), koja je najsmrtonosnija bolest za ljude zaražene HIV-om. Iako je u kliničkoj uporabi, pentamidin ima nedostataka – izaziva neželjene sporedne reakcije u organizmu i nije oralno primjenjiv. Početkom 1970-ih pripremljen je velik broj diarilamidinskih derivata radi dobivanja učinkovitijih lijekova. Od brojnih priređenih spojeva jedino se furamidin (**3**) pokazao potencijalnim antiparazitskim lijekom, posebno u liječenju bolesti uzrokovanih mikroorganizmima *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum* i *Trypanosoma rhodesiense*.⁴ Furamidin (**3**), koji ima širok spektar biološke aktivnosti odličan je primjer diarilamidina

* Autor za dopisivanje: dr. sc. Ivana Stolić, e-pošta: stolic@vef.hr



Slika 1 – Kemijske strukture diarilamidina

Fig. 1 – Chemical structures of diarylamidines

razvijenog radi pronalaska odgovarajućeg terapeutika.^{2,5} U terapijskom smislu furamidin (3) danas predstavlja vodeću molekulu važne klase antiparazitskih lijekova.

Mehanizmi biološkog djelovanja diarilamidina

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je molekula od istaknutog biološkog interesa. Ukupna količina DNA unutar organizma zove se genom. Svaki organizam posjeduje svoj specifični genski materijal koji ga definira kao pripadnika neke vrste kao i pojedinca u istoj.^{5,6} Genom je jedinstven za svaki pojedini organizam i predstavlja banku podataka koja upravlja svim procesima unutar organizma. U organizmu se DNA javlja u više konformacija, od kojih je unutar genoma najzastupljenija B-DNA.^{2,7}

Transkripcija i replikacija dva su procesa od vitalnog značenja za normalno funkcioniranje čitavog organizma. DNA započinje prepisivanje samo kada dobije signal koji prenose regulacijski proteini. Proteini su u pravilu velike molekule specifične za svaki pojedini gen i vežu se u određene sekvencije unutar gena. Oponašanjem njihovog djelovanja upotrebom malih molekula moglo bi se umjetno manipulirati funkcijom DNA tako da se aktivira ili inhibira aktivnost pojedinih gena. Postići selektivnost i afinitet proteina malim molekulama koje se nekovalentno vežu u DNA ostaje glavni izazov u dizajnu lijekova.

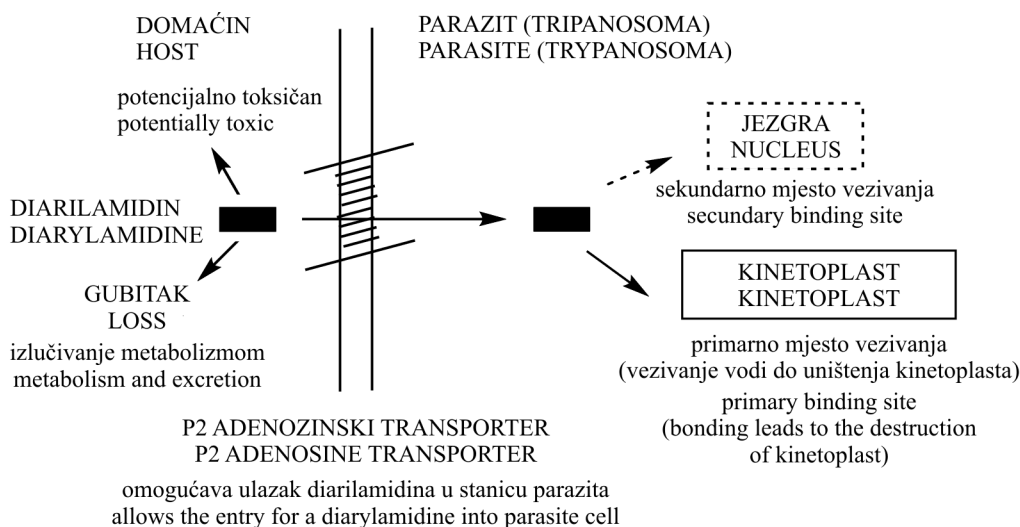
Diarilamidinski derivati, koji su osmišljeni i sintetizirani kao potencijalni lijekovi za tripanosomijazu, pokazali su se aktivnima protiv različitih patogenih agensa, kao i potencijalni protutumorski lijekovi. Na molekulskom nivou, mehanizam njihovog djelovanja temelji se na vezivanju u mali utor DNA bogat AT-parovima baza zbog čega dolazi do inhibicije vezivanja enzima DNA-topoizomeraze I i/ili II, ili do inhibicije transkripcije, čime je spriječeno normalno funkcioniranje DNA patogena ili tumorskih stanica.^{7,8}

Kako su danas poznati genomi triju najraširenijih parazita, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* i *Leishmania major*, kao što su poznate i sekvencije različitih onkogenih u tumora, omogućen je novi pristup u dizajnu i sintezi potencijalnih lijekova. Nadalje, sekvencioniranjem genoma kinetoplastne DNA tripanosoma i lišmanioza, kao i genomske DNA malarije nađeno je da navedeni genomi imaju iznim-

no velik udjel parova baza AT, što kao posljedicu ima visok afinitet molekula iz klase diarilamidina prema navedenim genomima i, što je vrlo važno, selektivnost u odnosu na DNA sisavaca.

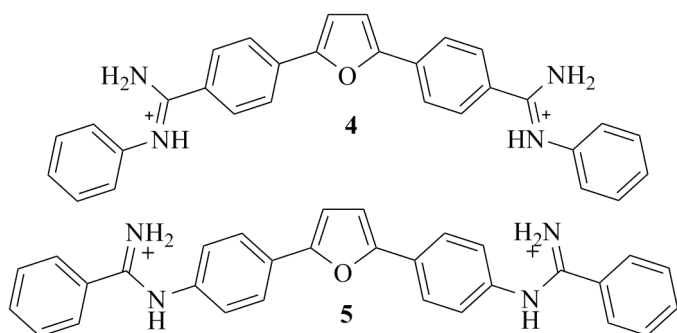
Pretpostavlja se da diarilamidini ulaze u stanice parazita difuzijom, ali postoji i nekolicina potencijalnih transportera. Carter i Fairlamb prvi su opisali neobičan purinski transporter iz *T. brucei* nazvan P2 (slika 2).^{2,9} Danas je P2 adenzin/aminopurinski-transporter indentificiran kao primarni diamidinski transporter. Ispitivanja provedena na transporteru P2 pokazala su da on ima visok afinitet za veliki broj kemijski različitih spojeva, od kojih su mu primarni supstrati adenin i adenzin. Za razliku od odgovarajućih transportera u sisavaca, P2 se pokazao kao dobar transporter za spojeve kao što su melamin i benzamidin, kao i niz strukturno sličnih spojeva. Provedena biološka ispitivanja prepoznavanja diarilamidina od strane transportera P2 općenito su ukazala na strukturne zahtjeve koji se moraju ispuniti tijekom dizajna potencijalnih antiparazitskih lijekova. Priređeni spojevi moraju posjedovati amidinsku skupinu, aromatski prsten i elektronegativan heteroatom – skupine označene iscrtkanom linijom na pentamidinu (1) na slici 1. Tijekom bioloških ispitivanja pentamidina kao supstrata za transporter P2, nađena su još dva transportera – HAPT1 (pentamidinski transporter visokog afiniteta) i LAPT1 (pentamidinski transporter niskog afiniteta) – međutim njihova fiziološka funkcija nije poznata. Nakon što uđu u stanicu diarilamidini odlaze prema kinetoplastu u sastavu parazita iz porodice tripanosoma i *Leishmania*. Vezivanjem u DNA smještenom u njemu (kDNA) kinetoplasti postupno nestaju, zbog čega parazit ugiba.

Osim antiparazitskih svojstava spojevi iz ove klase pokazuju i značajnu protutumorsku aktivnost.¹⁰ Mehanizam prema kojem diarilamidini ulaze u tumorske stanice slabo je poznat. Kako normalne tako i tumorske stanice imaju visokofinitetni transportni sustav kojim kontroliraju ulazak poliamina i gvanidina. Pretpostavlja se da se diarilamidini koriste navedenim membranskim transportnim sustavom za prelazak plazma membrane. Nadalje je utvrđeno da ciljno mjesto djelovanja diarilamidina u tumorskim stanicama ovisi o kemijskoj strukturi primijenjenih spojeva, tako dok se spoj 4 ponajprije veže u staničnu DNA, njegov strukturni izomer, spoj 5 primarno se veže u mitohondrijsku DNA (slika 3).^{10a}



Slika 2 – Shematski prikaz protuparazitske aktivnosti spojeva iz klase diarilamidina

Fig. 2 – Schematic representation of antiparasitic activity of diarylamidines



Slika 3 – Kemijske strukture amidina 4 i 5

Fig. 3 – Chemical structures of amidines 4 and 5

Načini vezivanja u DNA

Molekule se u DNA općenito vežu kovalentnim i nekovalentnim vezama (tablica 1).¹¹ Kovalentno vezivanje u DNA je ireverzibilno i vodi do potpune inhibicije biološke funkcije DNA, što u konačnici rezultira smrću stanice. Ne-kovalentno vezivanje je reverzibilno i ako se uzme u obzir neselektivnost velikog broja sintetiziranih molekula uključujući i one koje su u farmakološkoj upotrebi, preferirano je pred kovalentnim jer se smanjuje broj sporednih reakcija unutar organizma.

Molekule koje se nekovalentno vežu u DNA općenito se vežu na tri načina: elektrostatskim interakcijama, interkalaranjem između parova baza i vezivanjem u mali ili veliki utor DNA.

Elektrostatske interakcije

Elektrostatske interakcije, koje su u pravilu slabe i neselektivne, javljaju se između pozitivno nabijenih atoma ili molekula s pozitivnim nabojem, koje se nalaze s vanjske strane dvostruke uzvojnice, i negativno nabijenih fosfata. Najčešće nemaju utjecaja na funkciju DNA. Molekule od značajnog biološkog interesa u pravilu se vežu interkalaranjem ili vezivanjem u mali utor DNA.

Interkalaranje

Do danas su poznati brojni primjeri antibiotika i antitumorskih lijekova, kao što su daunomicin, aktinomycin D i ehinomicin, čija se biološka aktivnost temelji na interkalaranju u B-DNA. Interkalaranje malih molekula u nukleinske kiseline kao mehanizma njihovog biološkog djelovanja prvi je predložio Lerman još 1961. godine.¹² Interkalaranje uključuje ulazak planarnog kondenziranog dijela molekule između parova baza zbog čega dolazi do formiranja van der Waalsovih i hidrofobnih interakcija koje stabiliziraju novonastali kompleks. Ovakav tip vezivanja u pravilu produljuje uzvojnici DNA zbog odvajanja parova baza i djelomičnog odvijanja uzvojnice na mjestu interkalaranja.¹³ Posljedica ovakvog načina vezivanja su strukturne perturbacije unutar nativne DNA, čime se sprječava replikacija DNA i inhibira sinteza proteina. Više informacija o vezivanju malih molekula interkalaranjem može se naći u dva pregledna rada ranije objavljena u časopisu *Kemija u industriji*.¹⁴

Vezivanje u utore

Većina molekula koje se nekovalentno vežu u DNA veže se u mali utor. Utori su ključan element u sintezi potencijalnih lijekova jer se nukleinske baze smještene u unutrašnjosti dvostruke uzvojnice čitaju izvana, točnije pristup bazama odvija se kroz utore.¹⁵

Grupa spojeva čije se djelovanje temelji na vezivanju u mali utor B-DNA uključuje prirodne spojeve kao što su antibiotik netropsin i antiviralni lijek distamicin, kao i velik broj sintetskih molekula od kojih su najpoznatiji predstavnici pentamidin (1) i berenil (2), spojevi iz klase diarilamidina. Brojni do danas priređeni spojevi iz ove klase koji se preferirano vežu unutar malog utora građenog od AT-parova baza pozitivno su nabijene molekule, konkavnog oblika, u kojima slobodna rotacija oko jednostrukih veza osigurava mogućnost formiranja najpovoljnije konformacije tijekom vezivanja u B-DNA. Iscrpna biofizikalna ispitivanja ove klase spojeva pokazala su da se molekule vežu u dvostruku uzvojnici B-DNA, ne vežu se u RNA, vezivanje se preferirano odvija u područjima bogatim AT-parovima baza, i tijekom vezivanja nema velikih perturbacija u B-DNA.^{1b,2,16}

T a b l i c a 1 – Način vezivanja i djelovanja nekih lijekova čija je biološka aktivnost posljedica vezivanja u B-DNA¹¹T a b l e 1 – Mode of binding and biological activity of some drugs whose biological activity is based on their binding in B-DNA¹¹

| Lijek Drug | Djelovanje Biological activity | Način vezivanja Mode of binding |
|---------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Hoechst 33258 | antitumorsko | vezivanje u mali utor |
| Hoechst 33258 | antitumor | binding in the minor groove |
| pentamidin | aktivan prema <i>P. carinii</i> | vezivanje u mali utor |
| pentamidine | active against <i>P. carinii</i> | binding in the minor groove |
| diminazen | aktivan prema tripanosomi | vezivanje u mali utor |
| diminazen | active against tripanosome | binding in the minor groove |
| netropsin | antitumorsko, antiviralno | vezivanje u mali utor |
| netropsin | antitumor, antiviral | binding in the minor groove |
| distamicin | antitumorsko, antiviralno | vezivanje u mali utor |
| distamycin | antitumor, antiviral | binding in the minor groove |
| SN7167 | antitumorsko, antiviralno | vezivanje u mali utor |
| SN7167 | antitumor, antiviral | binding in the minor groove |
| SN6999 | aktivan prema <i>P. falciparum</i> | vezivanje u mali utor |
| SN6999 | active against <i>P. falciparum</i> | binding in the minor groove |
| menogaril | antitumorsko | interkalacija |
| menogaril | antitumor | intercalation |
| cisplatina | antikarcinogeno | kovalentno vezivanje |
| cisplatinum | anticancer | covalent binding |

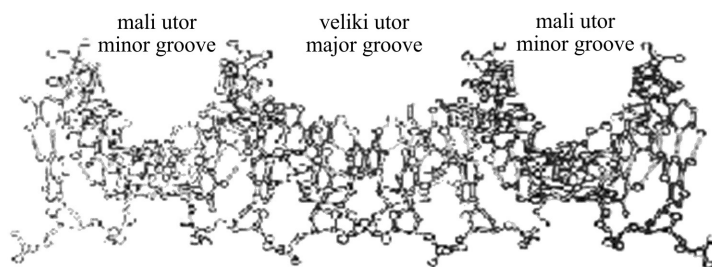
Dizajn spojeva iz klase diarilamidina

Iako je DNA dobro definirana makromolekula, ona predstavlja iznimno kompleksnu molekulu u dizajnu lijekova. Već glavne karakteristike DNA, smještaj unutar stanične jezgre i položaj baza unutar utora, ističu velik problem u sintezi selektivnih molekula.

Mali utor dvostruke uzvojnice DNA ciljno je mjesto u dizajnu i sintezi potencijalnih lijekova iz diarilamidinske klase spojeva. Dimenzije utora kao i njegova fizikalno-kemijska svojstva definirana su vrstom, rasporedom i orijentacijom parova baza koje ga izgrađuju (slika 4).^{1,17}

Strukturne karakteristike utora važne za dizajn selektivnih molekula su:

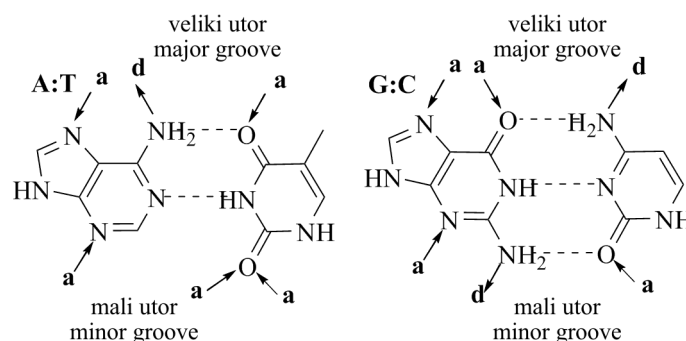
- (i) geometrija utora;
- (ii) distribucija elektrostatskog potencijala;
- (iii) distribucija molekule vode unutar utora;
- (iv) mjesta na krajevima baza koja su u stanju formirati vodikove veze.



Slika 4 – Prikaz malog i velikog utora u B-DNA

Fig. 4 – Minor and major groove in B-DNA

Selektivno vezivanje unutar odabrane sekvencije u DNA može se postići odabirom odgovarajućih funkcijskih skupina na način da funkcijske skupine koje mogu formirati vodikove veze budu unutar molekule raspoređene na mjestima komplementarnim s onima u odabranom slijedu baza. Funkcijske skupine baza tvore motiv akceptora i donora vodikovih veza i time daju različite mogućnosti formiranja vodikovih veza i hidrofobnih kontakata. Navedena mjesta su potencijalna vezna mjesta u dizajnu lijekova. Čitanje informacija odvija se vodikovim vezama između funkcijskih skupina molekule i donora ili akceptora vodikove veze unutar utora te kroz van der Waalove kontakte i elektrostatske interakcije (slika 5).



Slika 5 – Motiv donorskih (d) i akceptorskih skupina (a) unutar malog i velikog utora B-DNA

Fig. 5 – The motif of the donor (d) and acceptor groups (a) in the minor and major groove of B-DNA

Na osnovu prethodnih spoznaja da su krajevi parova baza prenosioci informacija u sekvencijama B-DNA, može se pretpostaviti da se formiranjem većeg broja vodikovih veza između malih molekula i parova baza koje izgrađuju ciljno mjesto postiže veće razlikovanje između sekvencija u B-DNA. Međutim brojna kristalografska ispitivanja kompleksa molekula s B-DNA pokazala su da je prepoznavanje sekvencija znatno kompleksnije i uključuje čitav niz faktora te da je motiv vodikovih veza samo jedan od njih. Indirektne vodikove veze između malih molekula i B-DNA putem molekula vode unutar utora, nevezne van der Waalove interakcije, hidrofobne interakcije i niz drugih, sve su to čimbenici koji utječu na selektivnost i afinitet vezivanja.¹⁵

Iako se većina do danas priređenih spojeva iz klase diarilamidina preferirano veže unutar malog utora DNA bogatog AT-parovima baza, do danas su priređeni spojevi koji se selektivno vežu u sekvencije bogate GC-parovima baza i miješane ATGC-sekvencije.

Struktura molekula

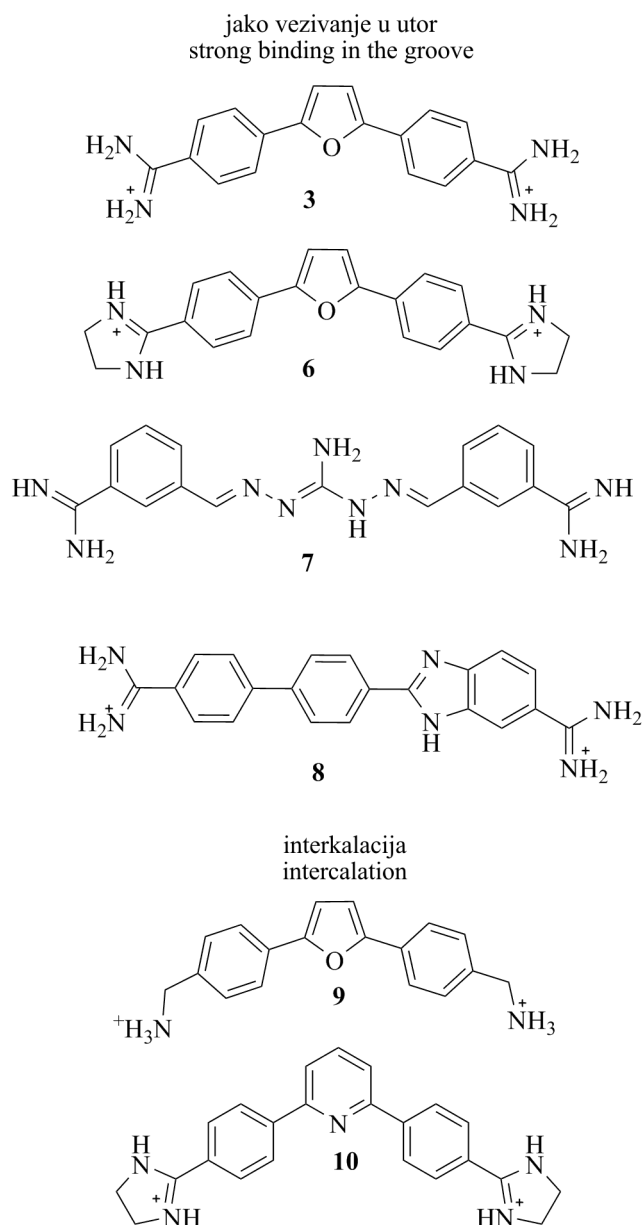
Budući da je vezivanje molekula u DNA kompleksan proces koji ovisi o brojnim strukturnim i elektronskim parametrima, već i mala promjena u funkcijskim skupinama, distribuciji naboja, rigidnosti spoja i/ili prostornom rasporedu atoma, ima velik utjecaj na afinitet priređenih molekula prema ciljnom mjestu. Selektivnost kao i afinitet prema odabranoj sekvenciji postiže se pravilnim odabirom funkcijskih skupina, čime se postiže optimalna geometrija molekula, što je uvijek za formiranje izravnih vodikovih veza s ciljnim mjestom.^{5,12,13}

Molekule koje se vežu unutar malog utora DNA moraju ispuniti određene strukturne zahtjeve: zakrivljenost koja prati utor, broj i priroda kationskih skupina, broj i raspored donora i akceptora vodikove veze.¹⁸ Zbog toga su u pravilu građene od (hetero)aromatskih građevnih jedinica povezanih različitim prenosnicama s terminalnim pozitivno nabijenim skupinama. Pripravljene molekule posjeduju i hidrofobne aromatske dijelove s kojima formiraju aromatske π - π -interakcije s nukleinskim bazama i stijenkama utora. Unutar molekula u pravilu su raspoređeni donori i akceptori vodikovih veza ovisno o rasporedu istih unutar ciljnog mjesta. Jednako tako broj strukturnih jedinica, točnije duljina molekule, utječe na afinitet, selektivnost i način vezivanja u DNA, a time i na biološki učinak. Pozitivan naboj smješten na terminalnom dijelu molekula odgovoran je za elektrostatsko privlačenje ispitivanih spojeva i fosfatnog dijela polinukleotida. Amidinska skupina i njezini derivati najčešće su upotrebljavane terminalne građevne jedinice koje osiguravaju pozitivan naboj molekule, i odličan su kromofor koji omogućava nastajanje vodikovih veza s bazama u DNA.

Molekule iz klase diarilamidina vežu se u DNA na dva načina, interkaliranjem i vezivanjem u mali utor. Način vezivanja, kao i afinitet prema ciljnom mjestu određeni su kemijskom strukturom pripremljenih spojeva. Provedena biofiziikalna ispitivanja serije diamidina **3**, **6–10** (slika 6) pokazala su da na afinitet i selektivnost molekula možemo utjecati pravilnim izborom prenosnice, prirodom i brojem kationskih skupina, duljinom molekule, točnije geometrijom i kemijskom strukturom molekula.¹⁶

Geometrija molekula

Dugo se smatralo da je geometrija molekule jedan od glavnih kriterija u razvoju učinkovitih lijekova iz klase diarilamidina. Komplementarnost oblika molekule i malog utora u DNA od strane je brojnih autora pretpostavljena kao ključan čimbenik za jake interakcije između molekula i DNA. Na temelju kristalne strukture netropsina, Cory i suradnici su formulirali glavni princip prema kojemu se afinitet molekule povezuje s komplementarnošću geometrije molekula i ciljnoga mjesta.¹⁷ Važnost komplementarnosti geometrije molekule i ciljnog mjesta ispitivana je na nizu strukturnih izomera furamidina (**3**) koji se međusobno razlikuju prema položaju amidinskih skupina (slika 7).^{15,19} Provedena ispitivanja radijusa zakrivljenosti priređenih spojeva pokazala su da geometrija molekula, kao funkcija položaja amidinskih skupina, utječe na jačinu vezivanja, a time i na biološki odgovor. U navedenim serijama samo su spojevi s para,para-amidinskim skupinama pokazali velik afinitet za vezivanje u ciljno mjesto. Para,meta- (**11**) i meta,meta-derivati (**12**), kako nemaju geometriju kompatibilnu ciljnom mjestu, nisu u

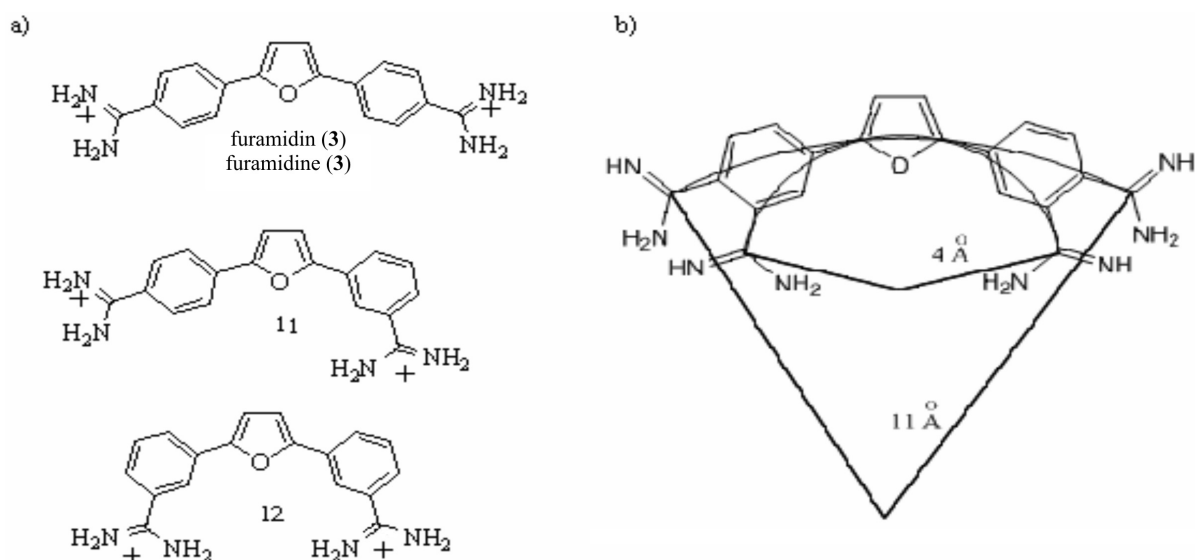


Slika 6 – Kemijske strukture diaminske i diamidinskih molekula i način njihovog vezivanja unutar maloga utora B-DNA građenog od AT-parova baza

Fig. 6 – Chemical structures of diamine and diamidine molecules and their binding within the AT pair bases in the minor groove of B-DNA

mogućnosti formirati veći broj van der Wallsovih kontakata s ciljnim mjestom, što u konačnici rezultira slabim vezivanjem i lošijim biološkim odgovorom.

Danas se, na temelju kristalografskih ispitivanja, zna da komplementarnost oblika nije strukturni zahtjev koji se nužno mora ispuniti da bi se molekula vezala u odabranu sekvenciju. Molekule koje nemaju geometriju kompatibilnu ciljnom mjestu mogu se vezati tako da jedna terminalna amidinska skupina formira izravne veze s bazom na dnu utora, a druga terminalna amidinska skupina veže se na odgovarajuću bazu "mostom" od jedne ili više molekula vode.^{1e} Na taj se način nadopunjuje zakrivljenost molekule, što u konačnici rezultira formiranjem stabilnog kompleksa.



Slika 7 – a) Kemijske strukture difenilfuranskih derivata korištenih u biokemijskim i biofizikalnim ispitivanjima, b) shematski prikaz radijusa zakrivljenosti para, para- i meta, meta-derivata

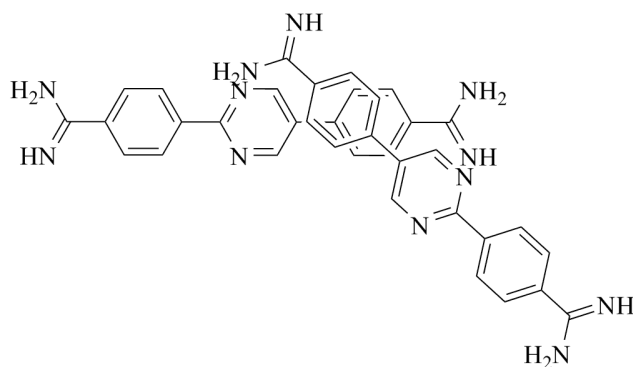
Fig. 7 – a) Chemical structures of diphenylfuran derivatives used in biochemical and biophysical investigations, b) schematic representation of the radius of curvature for para, para- and meta, meta-derivatives

Utjecaj molekula vode, kao bitnog faktora, na vezivanja kationskih diamidinskih molekula primijećen je kod linearnih molekula **7** i **8**, čija geometrija ne prati zakrivljenost maloga utora DNA (slika 6). Provedena biofizikalna ispitivanja pokazala su ne samo da se molekula iznimno jako veže unutar utora DNA građenog od AT-parova baza nego je to vezivanje jače i od furamidina (**3**). Kristalografskim ispitivanjima otkriveno je da pri njihovom vezivanju u AATT-sekvencije sudjeluju i molekule vode koje nadopunjuju zakrivljenost molekule.^{1e,21}

Dizajn i sinteza malih molekula koje bi se selektivno vezivale u male utore građene od GC-parova baza, uključili su ispitivanje brojnih heterocikličkih dikationskih molekula koje nemaju klasičnu zakrivljenu strukturu karakterističnu za molekule koje se vežu u područja bogata AT-parovima baza. Od ispitivanih spojeva samo se pirimidinski heterociklički derivat **13** veže u sekvencije bogate GC-parovima baza, GCTCG. Vezivanje se odvija unutar maloga utora tako da molekula formira kooperativni dimer (slika 8). Molekula **13** prvi je nepoliamidni, sintetski spoj koji specifično prepoznaje sekvencije u DNA bogate GC-parovima baza, i kao takva iskazuje predložak u razvoju novih molekula koje bi se selektivno vezivale u sekvencije bogate GC-parovima baza unutar malog utora DNA, koje su uz to u stanju proći staničnu membranu, te pokazuju odgovarajući terapijski učinak.^{20,22}

Utjecaj prenosnice

Na temelju brojnih ispitivanja niza sintetiziranih molekula primijećeno je da izbor prenosnice jako utječe na njihovu biološku aktivnost. Strukturna modifikacija na pentamidinu, kojom je dobivena konformacijski zakočena struktura, *cis*-butamidin **14** (slika 9), rezultirala je sintezom molekule koja imaju veću biološku aktivnosti protiv patogena *P. carinii* u odnosu na pentamidin (**1**). Ispitivanja učinka pentamidina (**1**) *in vivo* pokazala su da neki njegovi metaboliti

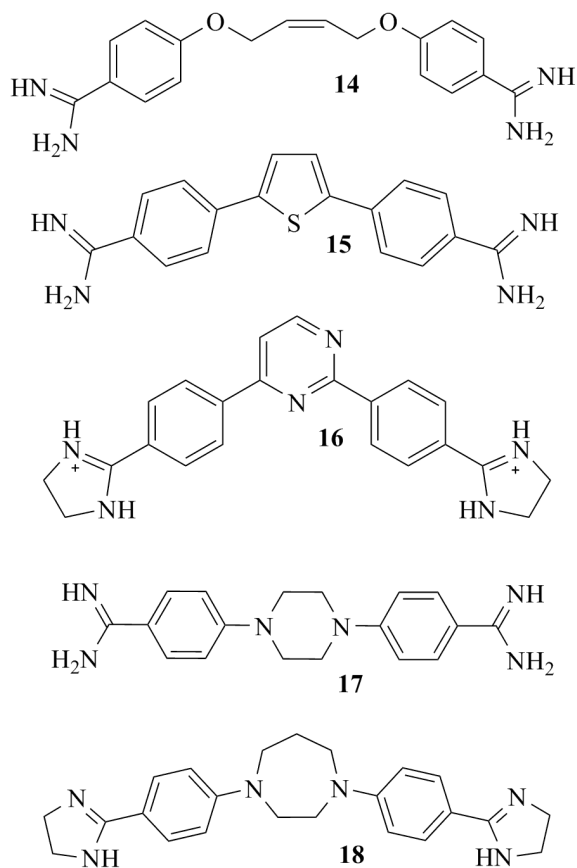


Slika 8 – Model dimera dobiven iz dvije molekule spoja **13**
Fig. 8 – Dimer of compound **13**

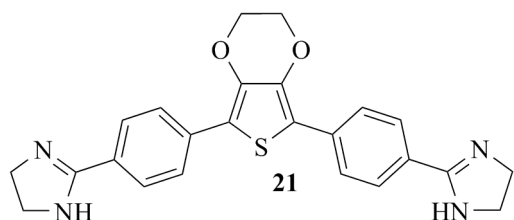
uzrokuju sporedne reakcije štetne po organizam domaćina.^{2,23}

Posljedica toksičnosti dizajn je i sinteza strukturnih derivata kod kojih je aciklička prenosnica u pentamidinu (**1**) zamijenjena heteroaromatskom jezgrom. Ugradnjom furanskog prstena kao prenosnice između dva fenilamidina priređen je furamidin (**3**), koji se pokazao iznimno učinkovit u ispitivanjima *in vivo* protiv brojnih infektivnih parazita. Zamjenom furanskog prstena (**3**, **19**) tiofenskim (**20a**, **b**) ne mijenjaju se selektivnost i afinitet priređenih spojeva prema sekvencijama bogatim AT-parovima baza u malom utoru DNA, ali su biološka ispitivanja pokazala da su tiofenski derivati aktivniji od furanskih analoga (tablica 2).

Zamjenom 2,5-dioksopentilne prenosnice pentamidina piperizinskom ili homopiperizinskom priređeni su spojevi **16–18**, koji su se pokazali učinkovitiji od pentamidina u ispitivanjima *in vitro* na *P. carinii* (slika 9, tablica 3).²⁴ Promjena temperature "mekšanja" polinukleotida ($\Delta\theta_m$, °C) pokazuje kako se čvrsto ispitivane molekule vežu u odabrani polinukleotid. Što je veća vrijednost $\Delta\theta_m$ to je jače vezivanje malih molekula u DNA.



Slika 9 – Kemijske strukture diarilamidina **14–18**
 Fig. 9 – Chemical structures of diarylamidines **14–18**



Slika 10 – 2,5-Bis[4-(2-imidazolin-2-yl)fenil]-3,4-
 -etilendioksitiofen (**21**)
 Fig. 10 – 2,5-Bis[4-(2-imidazolin-2-yl)phenyl]-3,4-
 -ethylenedioxythiophene (**21**)

Proširivanjem tiofenskog dijela uvođenjem 1,4-dioksan-skog prstena pripravljeni su spojevi iz 3,4-etilendioksitiofenske serije koji su pokazali znatnu protutumorsku aktivnost (slika 10).²⁵

Od ispitanih spojeva najbolje biološko djelovanje pokazao je spoj **21** (GI_{50} od $1,5 \cdot 10^{-6}$ do $9,0 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3}), prema odabranim stanicama raka.

Utjecaj duljine molekule

Ispitivanja na klasi fenil-benzimidazolnih derivata furana pokazala su da afinitet prema ciljnom mjestu definiraju ne samo geometrija i fizikalno-kemijske karakteristike spoja već i duljina molekule (tablica 4).^{16,26}

Tablica 2 – Struktura i *in vitro*-aktivnost difenilfurana i tiofena
 Table 2 – Structure and *in vitro* activity of diphenylfurane and thiophene derivatives

| Spoj Compound | X | R ₁ | <i>L. donovani</i> ^a <i>L. donovani</i> ^a (IC ₅₀ / μmol L ⁻¹) | Stanična linija J774.G8 J774.G8 cell line (IC ₅₀ / μmol L ⁻¹) |
|----------------------------------|------------------------------------|---|---|---|
| Pentamidin Pentamidine (1) | O(CH ₂) ₅ O | amidin amidine | 2,59 ± 0,54 | 100 |
| 3 | furan furan | amidin amidine | 2,76 ± 0,60 | 26,84 ± 2,44 |
| 19 | furan furan | izopropil- amidin isopropyl- amidine | 60,57 ± 17,01 | – |
| 18 | tiofen thiophene | amidin amidine | 0,42 ± 0,08 | 65,3 ± 4,6 |
| 20 | tiofen thiophene | izopropil- amidin isopropyl- amidine | 7,74 ± 0,25 | 21,26 ± 2,58 |

^a Prosječna vrijednost ± standardna devijacija od minimalno dva neovisna mjerenja. (–) nije testirano. Stanične linije J774.G8 su inficirane *Leishmania mexicana* za koju je standardni lijek amfotericin B koji ima aktivnost od IC₅₀ = 46 ± 6 nmol L⁻¹, dok se pentamidin pokazao neaktivnim.

^a Average value ± standard deviation of at least two independent measurements. (–) Not been tested. J774.G8 cell lines were infected with *Leishmania mexicana*. Standard drug for *Leishmania mexicana* is amphotericin B, which possesses the activity of IC₅₀ = 46 ± 6 nmol L⁻¹, while pentamidine is inactive.

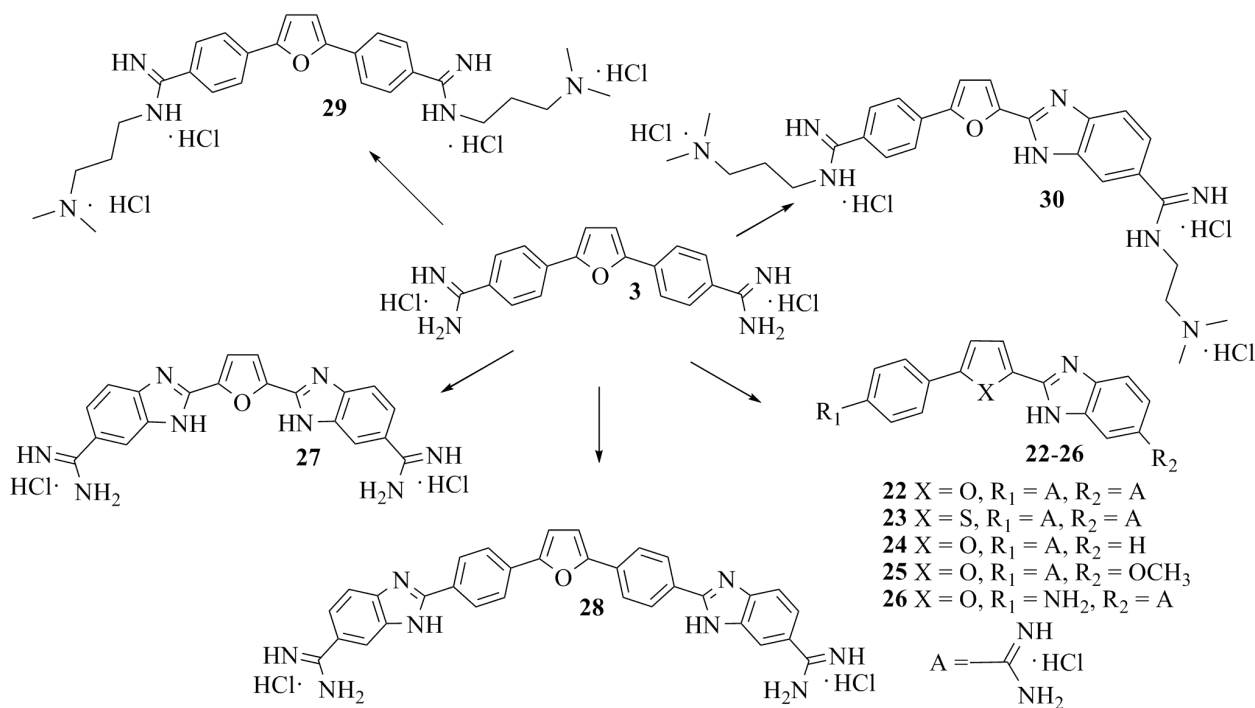
Tablica 3 – Biološka aktivnost protiv *P. carinii* pneumonije (PCP) i vrijednosti $\Delta\theta_m$ za vezivanje u poli(dA)-poli(dT) sintetiziranih spojeva **14**, **16–18**²⁴

Table 3 – Biological activity of compounds **14**, **16–18** against *P. carinii* pneumonia (PCP) and $\Delta\theta_m$ values for binding in poly(dA)-poly(dT)²⁴

| Spoj Compd. | $\Delta\theta_m$ / °C ^a | PCP |
|----------------|------------------------------------|--------------------------|
| 14 | – | 1,1 ± 0,84 ^b |
| 16 | 18,8 | 2,12 ± 0,88 ^c |
| 17 | 23,8 | 2,6 ^b |
| 18 | 23,1 | 2 ^b |

^a poli(dA)-poli(dT), ^b broj cisti na plućima / 10⁶ g⁻¹, ^c (IC₅₀ / μmol L⁻¹).

^a poly(dA)-poly(dT), ^b No. of lung cysts / 10⁶ g⁻¹, ^c (IC₅₀ / μmol L⁻¹).



Slika 11 – Modifikacije strukture furamidina (3)

Fig. 11 – The modifications of structure of furamidine (3)

Tablica 4 – Vrijednosti $\Delta\delta_m$ za ispitivane spojeve s oligomerima koji imaju vezno mjesto građeno od 4, 6 i 8 AT-parova baza^aTable 4 – $\Delta\delta_m$ values for test compounds with oligomers containing 4, 6 and 8 base pair binding sites^a

| Oligonukleotid Oligonucleotide | $\Delta\delta_m / ^\circ\text{C}$ | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | spoj 3 compound 3 | spoj 22 compound 22 | spoj 27 compound 27 | spoj 28 compound 28 |
| d(GCGAATTCGC) ₂ | 8,3 | 11,7 | 10,0 | – |
| d(CGAAATTTTCG) ₂ | 12,6 | 17,1 | 14,1 | –1,5 |
| d(GAAAATTTTCGAAAATTTTC) ₂ | 7,3 | 18,0 | 14,8 | 29,5 |

^a Ispitivanja su izvedena upotrebom natrijeva kakodilatnog pufera (CAC 10) pri omjeru koncentracija spoj/vezno mjesto = 1^a Experiments were performed using sodium cacodilate buffer (CAC 10) and were done at the ratio of 1,0 drug per binding site

Kao vodeći spoj ponovno je upotrijebljena molekula furamidin (3) kod koje su na furansku jezgru vezana dva fenilamidina. Zamjenom prvo jednog a zatim oba benzenska prstena s benzimidazolskim sustavom priređeni su spojevi 22 i 27. Spoj 28 priređen je uvođenjem bis(fenilbenzimidazola) kao poveznice između furanske jezgre i amidinskih skupina (slika 11). Svrha provedenih ispitivanja bila je odrediti odnos duljine molekula i broja parova baza na koje se one vežu, a time i selektivnost i afinitet ispitivanih molekula prema DNA.

U tablici 4 navedene su vrijednosti $\Delta\delta_m$ za ispitivane spojeve s oligomerima koji imaju vezno mjesto građeno od 4, 6 i 8 AT-parova baza.^{26a}

Iz navedene tablice jasno se može vidjeti da povećanje duljine molekule vodi do prepoznavanja većeg broja parova baza, a time i duljih sekvencija unutar malih utora u B-DNA. Međutim provedena biološka ispitivanja priređenih spojeva na *P. carinii* pneumoniji (tablica 5) pokazala su da su priređeni spojevi toksičniji i manje aktivni u odnosu na furamidin (3). Dobiveni podatci ukazuju da postoji opti-

malan intenzitet interakcije između reverzibilno vezanih spojeva i ciljnog mjesta u DNA. Prečvrsto vezane molekule u pravilu su neselektivne i toksične za organizam domaćina.

Tablica 5 – In vivo aktivnost protiv parazita *P. carinii* pneumonia^{26a}Table 5 – In vivo activity against *P. carinii* pneumonia^{26a}

| Spoj Compound | Doza Dose $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ^a | Preostale ciste na plućima u odnosu na kontrolu / % ^a Remaining lung cysts compared with control group / % ^a |
|------------------|--|---|
| 3 | 13,3 | 2,1 |
| 22 | 5,0 | 51,0 |
| 27 | 10,0 | 1,8 |
| 28 | 7,1 | 180 |

^a Rezultati četiriju mjerenja ispitivanih spojeva prema *P. carinii* u štakora.^a Evaluation of four dosages of the selected compounds against *P. carinii* in rats.

Za razliku od drugih diamidina temeljenih na furamidinu (**3**), spoj **22** se preferirano veže u mali utor DNA građen od ATGA-parova baza.²¹ Provedena biofizikalna i spektroskopska ispitivanja pokazala su da se spoj veže tako da formira dimere u malome utoru DNA. Formiranje kompleksa spoj–DNA 2:1 već je opisano s monokationima kao što su distamicin i slični poliamidi, ali ne i s dikationima ili nepoliamidima. Molekula **22** je prvi aromatski dikation za kojega je nađeno da formira dimer u malome utoru B-DNA građenom od miješane ATGA-sekvencije i kao takav uzet je kao predložak za dizajn i sintezu malih molekula kao selektivnih regulatora gena.

Ispitivanja utjecaja strukture molekule na formiranje dimera unutar utora pokazala su da raspored strukturnih jedinica uvjetuje način vezivanja molekula unutar utora. Malim promjenama u strukturi molekule **22**, uklanjanjem jedne od amidinskih skupina, zamjenom benzimidazolnog prstena fenilnim ili benzofuranskim ili uvođenjem alkilnih skupina na dušikov atom amidne skupine priređeni su derivati kod kojih nije opaženo formiranje dimera.²¹

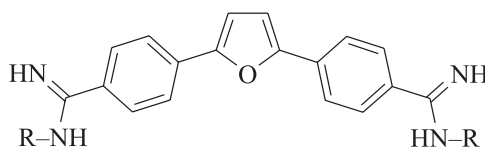
Utjecaj broja i prirode kationskih skupina

Da bi se sintetizirana molekula vezala u mali utor DNA, najprije mora ući u stanicu nakon čega mora ući u staničnu jezgru ili mitohondrij.¹⁰ Fluorescencijskom mikroskopijom ispitivana je stanična distribucija strukturnih analoga furamidina. Na temelju provedenih ispitivanja na strukturnim analogima furamidina s jednim, dva ili četiri pozitivna naboja (slika 11) nađeno je da je blizina dva ili četiri pozitivna naboja optimalna za njihovu staničnu distribuciju, dok su gubitkom jednog ili oba kationska bočna lanca strukturnih derivata furamidina priređeni spojevi koji u pravilu ne ulaze u staničnu jezgru.^{10b} Dobiveni rezultati pokazuju da je prisustvo dvije terminalne amidinske skupine ili njihovih cikličkih formi važan strukturni element koji potpomaže akumuliranju molekula unutar staničnih odjeljaka.

Daljnje, kemijske modifikacije na osnovnoj strukturi furamidina (**3**) radi dobivanja biološki aktivnijih spojeva koji bi bili oralno primjenjivi i manje toksični uključuje i sintezu 2,5-bis(*N*-alkilamidinofenil)furanskih derivata, koji su se pokazali manje toksičnim i aktivnijim od furamidina (**3**) u ispitivanjima *in vivo* na *P. carinii* (tablica 6).^{3,27}

Tablica 6 – Antitumorsko djelovanje i antigljivična aktivnost te citotoksičnost supstituiranih derivata furamidina i vrijednosti $\Delta\theta_m$ za vezivanje sintetiziranih analoga u dodekanukleotidu d(CGCGAATTCGCG)₂^{3,26b}

Table 6 – Antitumor and antifungal activity and cytotoxicity of substituted derivatives of furamidina and $\Delta\theta_m$ values for their binding in d(CGCGAATTCGCG)₂ dodecamer^{3,26b}



| Spoj Compd. | R | A2780 ^a | CH1 ^a | SKOV-3 ^a | $\Delta\theta_m / ^\circ\text{C}^b$ | $\Delta\theta_m / ^\circ\text{C}^c$ | Doza ^d / $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ Dosage ^d / $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ | Preostale ciste na plućima u odnosu na kontrolu / % ^d Remaining lung cysts compared with control group / % ^d |
|----------------|----------------------------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|---|
| 3 | H | 46 | 46,5 | 42,5 | 11,7 | 25 | 0,3 | 5,38 ± 2,61 |
| 31 | etil ethyl | – | – | – | – | – | 10,4 | 0,05 ± 0,02 |
| 32 | n-propil n-propyl | – | – | – | 13,0 | 25,9 | 10,6 | 0,08 ± 0,04 |
| 33 | izopropil isopropyl | 38 | 44,5 | 20,5 | 14,4 | > 28 | 10,8 | 0,20 ± 0,18 |
| 34 | izobutil isobutyl | 22,5 | 9 | 52 | 10,0 | – | 10,0 | 2,20 ± 1,35 |
| 35 | ciklopropil cyclopropyl | 37 | 18 | 48 | – | > 28 | – | – |
| 36 | ciklobutil cyclobutyl | 11 | 4,2 | 25 | – | > 28 | – | – |
| 37 | ciklopentil cyclopentyl | 12 | 3,6 | 17 | 15,8 | > 28 | 1,9 | 0,08 ± 0,05 |
| 38 | cikloheksil cyclohexyl | 4,8 | 2,1 | 5,2 | – | – | – | – |

^a Citotoksičnost je izražena u vrijednostima $\text{IC}_{50} / \mu\text{mol L}^{-1}$. ^b Ispitivanja izvedena na poliA-poliT. ^c Ispitivano na oligomeru d(CGCGAATTCGCG)₂.

^d Rezultati četiriju mjerenja ispitivanih spojeva prema *P. carinii* u štakora.

^a Cytotoxicity is expressed in values of $\text{IC}_{50} / \mu\text{mol L}^{-1}$. ^b Tests performed on poliA-poliT. ^c Tests performed on oligomer d(CGCGAATTCGCG)₂.

^d Evaluation of four dosages of the furan dications against *P. carinii* in rats.

Supstitucija amidinskih skupina alkilnim lancima ne vodi do promjene u distribuciji spojeva u malignim stanicama. Za razliku od njih spojevi s aromatskim prstenima imaju drugačiji distribucijski profil s tendencijom akumulacije u mitohondriju.¹⁰ Ovo ključno otkriće dovelo je do izrazitog zaokreta u sintezi diarilamidina kao spojeva koji se preferirano vežu ili u jezgrinu ili u mitohondrijsku DNA. Budući da mitohondrijska DNA ima ključnu funkciju u propagiranju apoptotičnog signala kojim većina protutumorskih lijekova uništava stanice tumora, od iznimne je važnost pronaći građevne jedinice kojima bi se priredili diarilamidini koji bi se ciljano vezali u mitohondrijsku DNA. Iz svega navedenog slijedi da je stanična distribucija diarilamidina izravno ovisna o strukturi pripremljenih spojeva.

Zaključak

Osnovni cilj u sintezi i razvoju novih lijekova je sinteza spoja koji će djelovati učinkovito i selektivno, tako da uništi uzročnika bolesti, a ne naškodi organizmu domaćina.

Male molekule koje se selektivno vežu u odabrane sekvencije u DNA pokazale su se kao uspješni regulatori gena, a time i potencijalni lijekovi.

Biološko djelovanje diarilamidina je posljedica njihovog vezivanja u mali utor DNA. Dizajn i sinteza spojeva iz klase diarilamidina ovisi o slijedu parova baza koji definira fizikalno-kemijska svojstva ciljnog mjesta. U pravilu, molekule koje se vežu unutar malog utora u DNA građene su od (hetero)aromatskih građevnih jedinica koje su povezane premosnicom. Na krajnjim građevnim jedinicama vezane su amidinske skupine.

Iako postoji čitav niz čimbenika koji utječu na selektivnost i afinitet sintetiziranih molekula, kao što su postojanje donorskih i akceptorskih skupina u molekuli, duljina molekule, radijus zakrivljenost, kao i geometrija i morfologija ciljnoga mjesta, relativan doprinos svakog od njih još nije razjašnjen. Točnije, još uvijek nije postavljen opći skup pravila prema kojemu bi se dizajnirale visoko selektivne molekule.

Popis kratica

List of symbols

- GI₅₀ – koncentracija koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju rasta, mol L⁻¹, μmol L⁻¹
 – the concentration required to achieve 50 % growth inhibition, mol L⁻¹, μmol L⁻¹
- IC₅₀ – koncentracija koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju, mol L⁻¹, μmol L⁻¹
 – half maximal inhibitory concentration, mol L⁻¹, μmol L⁻¹
- Δ*d*_m – promjena temperature mekšanja, °C
 – melting point change, °C

Literatura

References

1. a) S. I. Hirst, L. A. Stapley, *Parasitology: The Dawn of a New Millennium*, *Parasitology Today* **16** (2000) 1–3; b) Y. Miao, P. H. Lee, G. N. Parkinson, A. Batista-Parra, M. A. Ismail, S. Neidle, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Out-of-shape DNA minor groove binders: Induced fit interactions of heterocyclic di-
2. a) C. A. Bell, M. Cory, T. A. Fairley, J. E. Hall, R. R. Tidwell, Structure-activity relationships of pentamidine analogs against *Giardia lamblia* and correlation of anti-*Giardia* activity with DNA-binding affinity, *Antimicrob. Agents Chemother.* **35** (1991) 1099–1107; b) J. E. Hall, J. E. Kerrigan, K. Ramachandran, B. C. Bender, J. P. Stanko, S. K. Jones, D. A. Patrick, R. R. Tidwell, Anti-*Pneumocystis* activities of aromatic diamidoxime prodrugs, *Antimicrob. Agents Chemother.* **42** (1998) 666–674; c) P. G. Baraldi, F. Fruttarolo, D. Preti, M. A. Tabrizi, M. G. Pavani, R. Romagnoli, DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents, *Med. Res. Rev.* **24** (2004) 475–528.
3. a) D. W. Boykin, A. Kumar, G. Xiao, W. D. Wilson, B. C. Bender, D. R. McCurdy, J. E. Hall, R. R. Tidwell, 2,5-Bis[4-(N-alkylamidino)phenyl]furans as anti-*Pneumocystis carinii* agents, *J. Med. Chem.* **41** (1998) 124–129; b) C. A. Bell, C. C. Dykstra, N. A. Naiman, M. Cory, T. A. Fairley, R. R. Tidwell, Structure-activity studies of dicationically substituted bis-benzimidazoles against *Giardia lamblia*: correlation of anti-*Giardia* activity with DNA binding affinity and giardial topoisomerase II inhibition, *Antimicrob. Agents Chemother.* **37** (1993) 2668–2673; c) M. Del Poeta, W. A. Schell, C. C. Dykstra, S. Jones, R. R. Tidwell, A. Czarny, M. Bajić, Ma. Bajić, A. Kumar, D. W. Boykin, J. R. Perfect, Structure-in vitro activity relationships of pentamidine analogues and dication-substituted bis-benzimidazoles as new antifungal agents, *Antimicrob. Agents Chemother.* **42** (1998) 2495–2502.
4. a) J. P. Monk, P. Benfield, Inhaled pentamidine: an overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in *Pneumocystis carinii* pneumonia, *Drugs* **39** (1990) 741–756; b) P. G. Bray, M. P. Barrett, S. A. Ward, H. P. Koning, Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future, *Trends Parasitol.* **19** (2003) 232–239; c) C. A. Bell, J. E. Hall, D. E. Kyle, M. Grogl, K. A. Ohemeng, M. A. Allen, R. R. Tidwell, Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **34** (1990) 1381–1386.
5. P. R. Turner, W. A. Denny, The genome as a drug target sequence specific minor groove binding ligands, *Curr. Drug Targets* **1** (2000) 1–14.
6. D. W. Boykin, A. Kumar, J. Szychala, M. Zhou, R. J. Lombardy, W. D. Wilson, C. C. Dykstra, S. K. Jones, J. E. Hall, R. R. Tidwell, C. Laughton, C. M. Nunn, S. Neidle, Dicationic diarylfurans as anti-*Pneumocystis carinii* agents, *J. Med. Chem.* **38** (1995) 912–916.
7. E. Hildebrandt, D. W. Boykin, A. Kumar, R. R. Tidwell, C. C. Dykstra, Identification and characterization of an endo/exonuclease in *Pneumocystis carinii* that is inhibited by dicationic diarylfurans with efficacy against *Pneumocystis pneumonia*, *J. Eukaryot. Microbiol.* **45** (1998) 112–121.
8. a) C. Bailly C, L. Dassonneville, C. Carrasco, D. Lucas, A. Kumar, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Relationship between topoisomerase II inhibition, sequence-specificity and DNA binding mode of dicationic diphenylfuran derivatives, *Anti-Cancer Drug Design* **14** (1999) 47–60; b) D. Henderson, L. H. Hurley, Molecular struggle for transcriptional control, *Nat. Med.* **1** (1995) 525–527; c) C. C. Dykstra, D. R. McClernon, L. P. Elwell, R. R. Tidwell, Selective inhibition of topoisomerases from *Pneumocystis carinii* compared with that of topoisomerases from mammalian cells, *Antimicrob. Agents Chemother.* **38** (1994) 1890–1898.

9. a) N. S. Carter, A. H. Fairlamb, Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter, *Nature* **361** (1993) 173–176; b) H. P. De Koning, S. M. Jarvis, Adenosine transporters in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*: substrate recognition motifs and affinity for trypanocidal drugs, *Mol. Pharmacol.* **56** (1999) 1162–1170; c) A. Baliani, G. J. Bueno, M. L. Stewart, V. Yardley, R. Brun, M. P. Barrett, I. H. Gilbert, Design and synthesis of a series of melamine-based nitroheterocycles with activity against trypanosomatid parasites, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 5570–5579.
10. a) A. Lansiaux, F. Tanious, Z. Mishal, L. Dassonneville, A. Kumar, C. E. Stephens, Q. Hu, W. D. Wilson, D. W. Boykin, C. Bailly, Distribution of Furamidine Analogues in Tumor Cells: Targeting of the Nucleus or Mitochondria Depending on the Amidine Substitution, *Cancer Res.* **62** (2002) 7219–7229; b) A. Lansiaux, L. Dassonneville, M. Facompre, A. Kumar, C. E. Stephens, M. Bajić, F. Tanious, W. D. Wilson, D. W. Boykin, C. Bailly, Distribution of furamidine analogues in tumor cells: influence of the number of positive charges, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 1994–2002; c) S. Neidle, L. R. Kelland, J. O. Trent, I. J. Simpson, D. W. Boykin, A. Kumar, W. D. Wilson, Cytotoxicity of bis(phenylamidinium)furan alkyl derivatives in human tumour cell lines: relation to DNA minor groove binding, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7** (1997) 1403–1408.
11. C. L. Propst, T. J. Perun, *Nucleic Acid Targeted Drug Design*, Marcel Dekker, inc., New York, 1992.
12. L. S. Lerman, Structural considerations in the interactions of deoxyribonucleic acid and acridines, *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 18–30.
13. A. H. J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, A. Rich, Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å resolution, *Biochemistry* **26** (1987) 1152–1163.
14. a) I. Piantanida, Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s DNA i RNA. Detaljniji osvrt na ispitivanje interkalativnog načina vezanja, *Kem. Ind.* **52** (2003) 545–552; b) G. Karminski-Zamola, K. Starčević, Heterociklički aromatski spojevi i njihovo antitumorsko djelovanje, *Kem. Ind.* **56** (2007) 257–273.
15. a) S. Neidle, Crystallographic insights into DNA minor groove recognition by drugs, *Biopolymers* **44** (1997) 105–121; b) S. A. Shaikh, S. R. Ahmed, B. Jayaram, A molecular thermodynamic view of DNA–drug interactions: a case study of 25 minor-groove binders, *Arch. Biochem. Biophys.* **429** (2004) 81–99.
16. a) D. W. Wilson, F. A. Tanious, H. Buczak, L. S. Ratmeyer, M. K. Venkatraman, A. Kumar, D. W. Boykin, B. Munson, *Structure and Function 1: Nucleic Acids*, Adenine Press, New York, 1992. str. 83–105; b) F. A. Tanious, J. Sychala, A. Kumar, K. Greene, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Different binding mode in AT and GC sequences for unfused-aromatic dications, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **11** (1994) 1063–1083; c) D. W. Boykin, A. Kumar, M. Bajić, G. Xiao, W. D. Wilson, B. C. Bender, D. R. McCurdy, J. E. Hall, R. R. Tidwell, Anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia activity of dicationic diaryl methylprimidines, *Eur. J. Med. Chem.* **32** (1997) 965–972.
17. a) F. A. S. Menezes, C. A. Montanari, R. E. Bruns, 3D-WHIM pattern recognition study for bisamidines. A structure-property relationship study, *J. Braz. Chem. Soc.* **11** (2000) 393–397; b) M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **82** (1985) 1376–1380; c) M. L. Kopka, C. Yoon, S. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, Binding of an antitumor drug to DNA: Netropsin and C-G-C-G-A-A-T-T-^BC-G-C-G, *J. Mol. Biol.* **183** (1985) 553–563.
18. a) W. D. Wilson, B. Nguyen, F. A. Tanious, A. Mathis, J. E. Hall, C. E. Stephens, D. W. Boykin, Dications that target the DNA minor groove: compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological activity, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **5** (2005) 389–408; b) J. B. Chaires, J. Ren, D. Hamelberg, A. Kumar, V. Pandya, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Structural Selectivity of Aromatic Diamidines, *J. Med. Chem.* **47** (2004) 5729–5742; c) B. Nguyen, C. Tardy, C. Bailly, P. Colson, C. Houssier, A. Kumar, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Influence of Compound Structure on Affinity, Sequence Selectivity, and Mode of Binding to DNA for Unfused Aromatic Dications Related to Furamidine, *Biopolymers* **63** (2002) 281–297.
19. A. Höglund, O. Kohlbacher, From sequence to structure and back again: approaches for predicting protein-DNA binding, *Proteome Science* **2** (2004) 1–7.
20. M. Munde, M. A. Ismail, R. Arafa, P. Peixoto, C. J. Collar, Y. Liu, L. Hu, M. H. David-Cordonnier, A. Lansiaux, C. Bailly, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Design of DNA minor groove binding diamidines that recognize GC base pair sequences: a dimeric-hinge interaction motif, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 13732–13743.
21. a) L. Wang, C. Carrasco, A. Kumar, C. E. Stephens, C. Bailly, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Evaluation of the influence of compound structure on stacked-dimer formation in the DNA minor groove, *Biochemistry* **40** (2001) 2511–2521; b) C. Bailly, C. Tardy, L. Wang, B. Armitage, K. Hopkins, A. Kumar, G. B. Schuster, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Recognition of ATGA sequences by the unfused aromatic dication DB293 forming stacked dimers in the DNA minor groove, *Biochemistry* **40** (2001) 9770–9779; c) L. Wang, C. Bailly, A. Kumar, D. Ding, M. Bajić, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Specific molecular recognition of mixed nucleic acid sequences: an aromatic dication that binds in the DNA minor groove as a dimer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (2000) 12–16.
22. B. H. Geierstanger, M. Mrksich, P. B. Dervan, D. E. Wemmer, Design of a GC-Specific DNA Minor Groove-Binding Peptide, *Science* **266** (1994) 646–650.
23. D. W. Boykin, A. Kumar, J. E. Hall, B. C. Bender, R. R. Tidwell, Anti-pneumocystis activity of bis-amidoximes and bis-o-alkylamidoximes prodrugs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6** (1996) 3017–3020.
24. a) J. J. V. Eynde, A. Mayence, M. T. Johnson, T. L. Huang, M. S. Collins, S. Rebholz, P. D. Walzer, M. T. Cushion, I. O. Donkor, Antitumor and anti-pneumocystis carinii activities of novel bisbenzamidines, *Med. Chem. Res.* **14** (2005) 143–157; b) O. Donkor, R. R. Tidwell, S. K. Jones, Pentamidine congeners. 2. 2-Butene-bridged aromatic diamidines and diimidazolines as potential anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia agent, *J. Med. Chem.* **37** (1994) 4554–4557; c) I. O. Donkor, T. L. Huang, B. Tao, D. Rattendi, S. Lane, M. Vargas, B. Goldberg, C. Bacchi, Trypanocidal Activity of Conformationally Restricted Pentamidine Congeners, *J. Med. Chem.* **46** (2003) 1041–1048.
25. a) I. Stolić, K. Mišković, A. Magdaleno, A. M. Silber, I. Piantanida, M. Bajić, Lj. Glavaš-Obrovac, Effect of 3,4-ethylenedioxy-extension of thiophene core on the DNA/RNA binding properties and biological activity of bisbenzimidazole amidines, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 2544–2554; b) I. Stolić, Sinteza, interakcija s DNA i RNA i protutumska ispitivanja diamidinskih derivata 3,4-etilendioksiofena, doktorska disertacija, PMF, Zagreb, 2009.
26. a) K. T. Hopkins, W. D. Wilson, B. C. Bender, D. R. McCurdy, J. E. Hall, R. R. Tidwell, A. Kumar, M. Bajic, D. W. Boykin, Extended aromatic furan amidino derivatives as anti-*Pneumocystis carinii* agents, *J. Med. Chem.* **41** (1998) 3872–3878; b) R. R. Tidwell, S. K. Jones, N. A. Naiman, L. C. Berger, W. B. Brake, C. C. Dykstra, J. E. Hall, Activity of Cationically Substituted Bis-Benzimidazoles against Experimental *Pneumocystis carinii* Pneumonia, *Antimicrob. Agents Chemotherap.* **37** (1993) 1713–1716.
27. a) T. L. Gilchrist, Synthesis of aromatic heterocycles, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* (1999) 2849–2866; b) S. Mazur, F. A. Tanious, D. Ding, A. Kumar, D. W. Boykin, I. J. Simpson, S. Neidle, W. D. Wilson, A thermodynamic and structural analysis of DNA minor-groove complex formation, *J. Mol. Biol.* **300** (2000) 321–337.

SUMMARY**Diarylmidines: Design, Interaction with DNA and Biological Activity***I. Stolić* and M. Bajić*

Diarylmidines are a group of biologically active compounds that are more than half a century used for treatment of parasitic diseases. Although the biological mechanism of action has not yet been fully explained it was found that the biological activity of compounds of this class is based on their binding in a small groove of DNA. Therefore, the compounds of this class, originally developed for the purpose of finding parasitic drugs, over time are recognized as potential drugs with broad application (e. g. anti-HIV opportunistic infections or tumours) based on their interaction with DNA – the primary genetic material. The occurrence of resistance and some associated adverse consequences prompted the research and development of new effective drugs and finding their mechanism of action at the molecular level. In the first part of this work, basic concepts are given accompanied by selected examples of this class of compounds.

*Department of Chemistry and Biochemistry,
Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb
Heinzlova 55, 10 000 Zagreb, Croatia*

*Received July 8, 2010
Accepted November 18, 2010*