

Heterociklički aromatski spojevi i njihovo antitumorsko djelovanje

KUI – 16/2007
Prispjelo 27. ožujka 2007.
Prihvaćeno 10. travnja 2007.

G. Karminski-Zamola^{*a} i K. Starčević^b

^a Zavod za organsku kemiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Marulićev trg 20, Zagreb, e-mail: gzamola@fkit.hr

^b GSK Istraživački centar Zagreb, Prilaz baruna Filipovića 29, Zagreb

Pregledni članak opisuje dugogodišnji rad prve autorice na sintezi kondenziranih policikličkih heteroaromatskih spojeva, koji su priređeni višestupnjevitim sintezama i fotokemijskim sintezama. Osobito se ističu spojevi koji ponajprije sadržavaju tiofensku i/ili furansku jezgru kondenziranu s benzenskim jezgrama ili drugim heteroaromatskim jezgrama ponajprije kinolonima. Terminalna faza svih sinteza obuhvaćala je fotokemijsku ciklizaciju u smislu nastajanja policikličkih kondenziranih heteroaromata najčešće s tri i četiri jezgre, a rjeđe s više kondenziranih jezgara.

Proučavala se reakcija fotokemijske dehidrociklizacije na supstituiranim etenskim sustavima kao i fotokemijskog dehidrohalogeniranja na aromatskim i heteroaromatskim anilidima. Studirane su i dvostruke fotokemijske dehidrociklizacije kao i kombinacija fotokemijske dehidrociklizacije i fotokemijskog dehidrohalogeniranja na jednom supstratu. Sve priređene molekule bile su planarne strukture. Ta činjenica je dalje primjenjivana u pripravi sličnih sustava, ali uvođenjem farmakofornih supstituenata, a najčešće kationskih ili dikationskih soli, koje su mogle interkalirati u intramolekularne prostore DNA i na taj način sprječavati replikaciju tumorskih stanica. Čitav niz priređenih spojeva upotrebljen je za studij vezivanja na DNA i stvaranje odgovarajućih kompleksa koji su dokazivali antitumorsku aktivnost supstancija kao interkalatora. Većini spojeva određena je antitumorska aktivnost na niz stanica humanog karcinoma kao i na normalne fibroblaste. Velik broj spojeva pokazao je izrazitu antitumorsku aktivnost *in vitro*.

Ključne riječi: *Kondenzirani policiklički aromatski spojevi, fotokemija, interkalatori, antitumorska aktivnost*

Uvod

Nobelovac Vladimir Prelog djelovao je u Zavodu za organsku kemiju, kemijskog odsjeka (danas Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije) Tehničkog fakulteta u Zagrebu 1935.–1941. godine. Tijekom tog razdoblja organizirao je laboratorij za sintetsku organsku kemiju u kojem je uz svoje suradnike i studente sintetizirao čitav niz organskih supstancija. Među mnogima treba spomenuti kemiju adamantana i kemiju heterocikličkih spojeva ponajprije kemiju kinuklidina. Osim toga radio je na čitavom nizu biološki aktivnih spojeva i na taj način postavio temelje za istraživanje heterocikličkih spojeva i niza drugih medicinski interesantnih spojeva. Tu problematiku su u Zavodu za organsku kemiju nastavili i proširivali njegovi nasljednici, tako da se već čitav niz godina u Zavodu za organsku kemiju FKIT-a provodi sinteza niza novih heterocikličkih spojeva s naglaskom na njihovu biološku aktivnost.

Po dolasku u Zavod za Organsku kemiju i ja sam se uključila u kemiju heterocikličkih spojeva i u tada za Zavod novu metodu pripreme; fotokemijsku sintezu, tj. sintezu heterocikličkih spojeva pod utjecajem ultraljubičastog svjetla. Iako je organska fotokemijska sinteza već bila kojih dvadesetak godina dobro razvijena u svijetu, za našu sredinu to je bio početak, tako da su se prve reakcije i to u krutom stanju,

provodile sunčevim svjetlom u proljetnim i ljetnim mjesecima kada je u Zagrebu bilo dovoljno sunca. Nabavkom najjednostavnije opreme ponajprije UV lampi započeo je rad i u otopinama.

I. Dio

Fotokemijske dehidrociklizacije heterocikličkih analoga stilbena u polikondenzirane heteroaromate i njihovo antitumorsko djelovanje

Jedna od prvih reakcija fotokemijske dehidrociklizacije, koja je ranije provedena u svijetu, na stilbenu i njegovim derivatima u odgovarajuće fenantrenske derivate¹ otvorila je put provedbi takvih reakcija u heterocikličkom redu.

Tako je prvi put u našem laboratoriju provedena fotokemijska dehidrociklizacija 3-(2-furil)-2-fenil-akrilne kiseline u alkoholnoj otopini uz propuhivanje zraka, s relativno dobrim iskorištenjem u odgovarajući naftofuranski derivat^{2,3} uz prethodnu fotokemijsku *cis/trans*-izomerizaciju (shema 1).

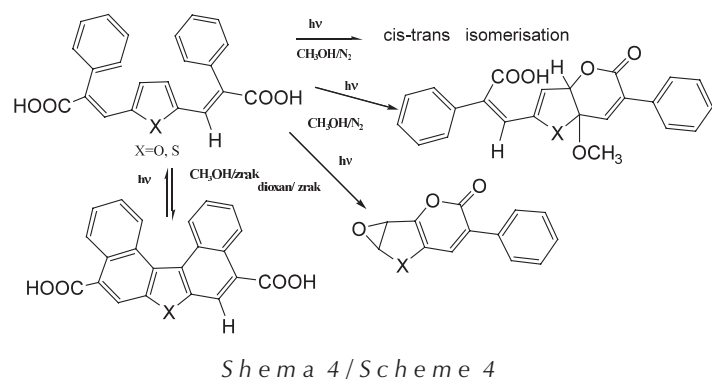
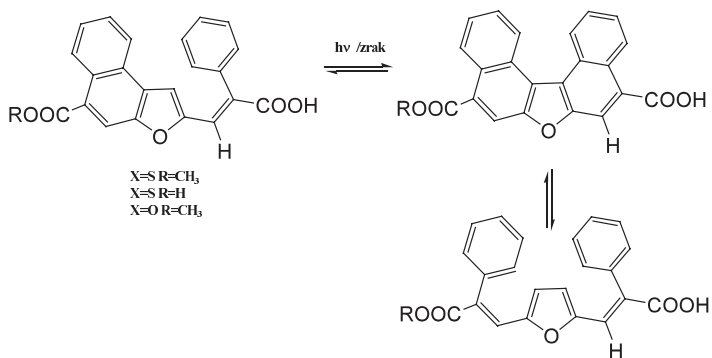
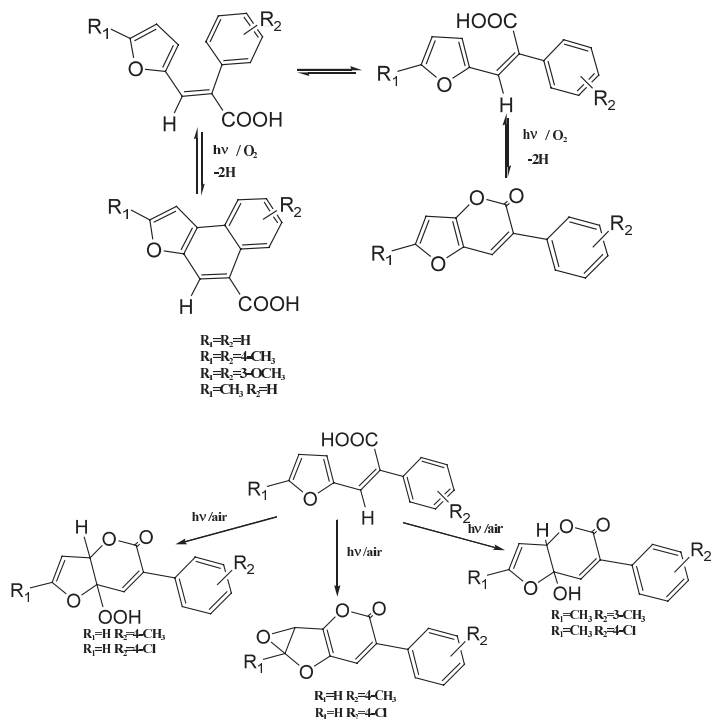
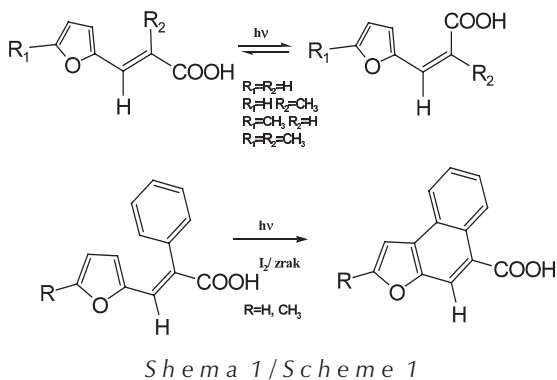
Slijedio je niz istraživanja na fotokemijskoj sintezi drugih derivata furilakrilne kiseline uz izolaciju, osim dehidrocikliziranih (oksidativnih) naftofuranskih spojeva i nekoliko laktona, također produkata dehidrociklizacije (oksidacije), te

* Predavanje održano na stručno-znanstvenom skupu "Vladimir Prelog i hrvatska kemija", održanom u Zagrebu 12.–13. listopada 2006. u povodu obilježavanja 100. godišnjice rođenja nobelovca Vladimira Preloga

produkata dodatne fotokemijske oksidacije u epoksi-laktone, hidroksi-laktone i hidroperoksi-laktone.⁴ (shema 2)

Prethodne reakcije na monostirilnim derivatima furana, navele su autore da pokušaju pod istim oksidativnim uvjetima provesti dvostruku fotokemijsku dehidrociklizaciju na 2,5-(2-karboksistiril)furanu. I u ovom slučaju iz fotokemijske smjese izolirani su produkti jednostruke fotokemijske dehidrociklizacije odnosno 2-(2-karboksistiril)naftofuran[2,3-b]-8-karboksilna kiselina uz produkte dvostruke dehidrociklizacije, tj. dinafto-dikarboksilnu kiselinu. Mijenjanjem vremena ozračavanja mijenjao se i odnos produkata jednostruke fotokemijske dehidrociklizacije u odnosu na produkte dvostruke dehidrociklizacije. Na taj način je dokazano da fotokemijska reakcija ide u dva stupnja preko mono produkta, a ne kako se pretpostavljalo kao *concerted* reakcija.⁵ (shema 3)

Kad je reakcija fotokemijske oksidacije provedena u metanolu i uz propuhivanje zraka, izoliran je produkt dvostruke dehidrociklizacije, dok je u dioksanu nastupila dehidrociklizacija u smislu laktonezicije uz stvaranje epoksidnog



prstena na furanskoj jezgri i otcjepljena jednog stirilnog supstituenta. Fotokemijska reakcija provedena pod dušikom u metanolu rezultirala je *trans/cis*-izomerizacijom i transformacijom u laktone uz adiciju jedne molekule otapala. U furanskom i tiofenskom redu rezultati su bili identični.⁶ (shema 4)

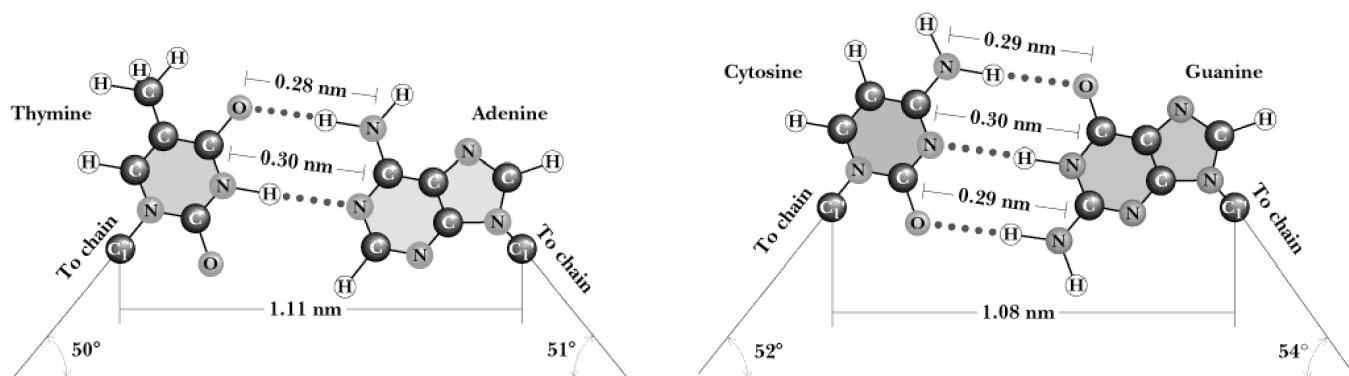
Sva daljnja istraživanja na ovom tipu spojeva bila su usmjerena na sintezu potencijalnih biološki aktivnih tvari. Kako se pokazalo da su ovi tipovi spojeva planarni, te da posjeduju odgovarajuću aromatsku strukturu sa delokaliziranim π -elektronima koji bi mogli interagirati s DNA kao interkalatori i na taj spriječiti replikaciju tumorskih stanica, sva daljnja istraživanja bila su usmjerena u tom smjeru.

Radi boljeg razumijevanja interakcija između DNA i planarnih heteropolikličkih spojeva potrebno je sasvim kratko nešto reći o strukturi DNA.

Struktura molekule DNA

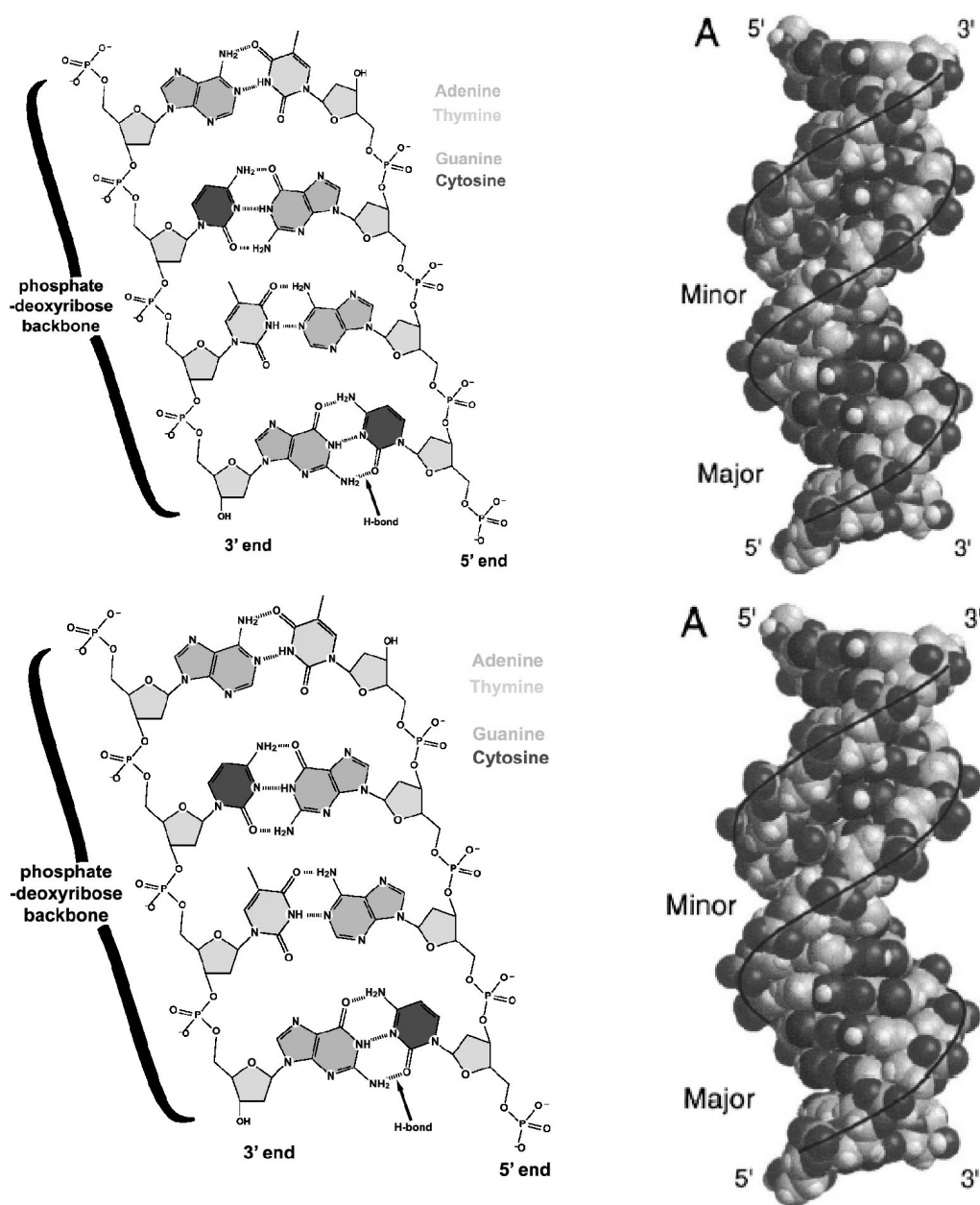
Jedno od najznačajnijih otkrića u medicinskoj kemiji 20. stoljeća bilo je ono Watsona i Cricka 1953. godine, kada su prikazali strukturu DNA i RNA molekula kao dvostruke uzvojnice. DNA je polimer deoksiribonukleotida, a molekula se sastoji od dva desna polinukleotidna lanca koji se pravilno zavijaju u prostoru u suprotnom smjeru te se sastoje od purinskih i pirimidinskih baza, šećera deoksiriboze te fosfatnih skupina esterski vezanih na šećere. Purinske i pirimidinske baze stvaraju parove preko vodikovih veza, pri čemu se timin (T) veže s adeninom (A), a gvanin (G) s citozinom (C), što je prikazano na slici 1.

U strukturi DNA nukleotidni je dio uzajamno povezan fosfatnim jedinicama preko položaja 3 i 5 susjednih pentoznih



Slika 1 – Vežanje parova baza preko vodikovih veza u molekuli DNA

Fig. 1 – Hydrogen binding of the base pairs in the molecule of DNA



Slika 2 – Prikaz opće strukture molekule DNA u B-formi

Fig. 2 – Presentation of the DNA structure in B-form

jedinica, tj. oni su fosfatni esteri 1,3-diola (slika 2), a svaki se nukleotidni dio razlikuje s obzirom na postojeću bazu. Potpuni zaokret uzvojnica čini nakon deset nukleotidnih dijelova. Razmak između parova baza iznosi 3,4 Å, što znači da je razmak između potpunih zaokreta 34 Å.

Ugljikohidratni i fosfatni dio je bogat hidroksilnim skupinama koje se nalaze s vanjske strane uzvojnice te na taj način mogu reagirati s vodom, dok se baze, koje više sličje ugljikohidratima, nalaze s unutrašnje strane zavojnice.

Postoje tri osnovne konformacije uzvojnice DNA: *A-DNA* i *B-DNA* koje su desno zakrećuće i *Z-DNA* koja je lijevo zakrećuća. One se razlikuju međusobno u udaljenosti parova baza koja je potrebna za potpuni zaokret, dimenzijama utora, položajima šećera te kutovima između parova baza i osi uzvojnice.

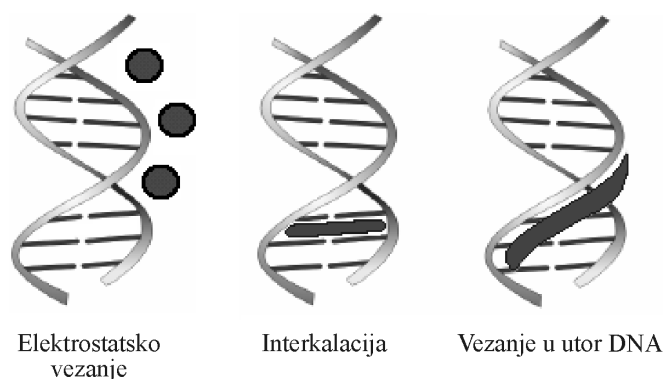
U fiziološkim uvjetima gotovo sve molekule DNA imaju *B-DNA* oblik (slika 2), koji ima mali (minor groove) utor širok 6 Å i veliki (major groove) utor širok 12 Å. Utori ove molekule, a posebno veliki utor, važni su zbog interakcije ostalih makromolekula, a posebno proteina s DNA. Zbog vodikovih veza koje postoje između parova baza, određena sekvencija jednog polinukleotidnog lanca (Watsonov lanac) komplementarna je sa sekvencom drugog polinukleotidnog lanca (Crickov lanac).

Kako se timin (T) isključivo veže s adeninom (A), a gvanin (G) s citozinom (C), dvostruka zavojnica DNA sadrži jednak broj molekula adenina i timina te gvanina i citozina. U slijedu nukleozidnih baza sadržana je genetska poruka DNA, tzv. *genetska šifra*, koja je potrebna pri sintezi novih proteinskih molekula. Uzajamnim djelovanjem komplementarnih nukleozidnih parova baza u DNA i RNA zbiva se značajan proces genetičkog prijenosa i sinteze proteina, odnosno replikacije živih organizama.⁷

Načini interakcije supstancije s DNA

U osnovi interakcije malih molekula i uzvojnice DNA mogu se podijeliti na povratne i nepovratne interakcije.⁸ Kod povratnih interakcija male molekule nekovalentnim vezama stvaraju kompleks s molekulom DNA. U tu skupinu spadaju molekule koje s molekulom DNA stvaraju komplekse:⁹

– elektrostatskim vezanjem (slika 3) na negativno nabijene fosfatne skupine (poliamini, spojevi koji uzrokuju kondenzaciju DNA)



Slika 3 – Načini interakcije supstancije s molekulom DNA

Fig. 3 – Interactions of the compound with the DNA molecule

– interkalacijom između parova baza (slika 3) pri čemu dolazi do promjene konformacije DNA i interakcije DNA s proteinima (klasični interkalatori, bisinterkalatori, interkalatori s upletanjem u dvolančane uzvojnice polinukleotida, nekondenzirani aromatski interkalatori)

– vezanjem u utor DNA (slika 3), pri čemu molekule imaju izduženu strukturu, te sadrže skupine koje mogu stvarati vodikove veze (spojevi koji se vežu u mali utor, oligonukleotidi)

– kombinacija interkaliranja s vezanjem u mali utor DNA, pri čemu supstancija posjeduje skupine koje se interkaliraju i skupine koje se vežu u mali utor

Male molekule koje stvaraju nepovratne interakcije s molekulom DNA mogu se podijeliti u dvije skupine:

– na molekule koje djeluju kao alkilirajući agensi¹⁰ (mnogi od njih su mutageni i/ili kancerogeni)

– na molekule koje cijepaju polinukleotidni lanac.¹¹

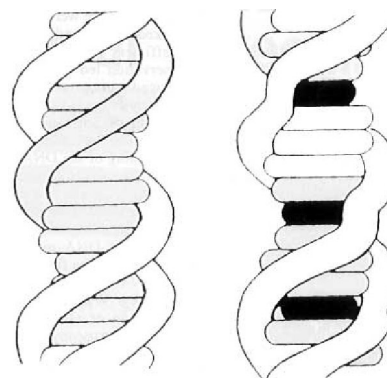
Interkalacijsko vezivanje na DNA

Interkalacijski agensi predstavljaju danas značajnu klasu supstancija koje se uspješno upotrebljavaju u liječenju viralnih, bakterijskih, a osobito tumorskih bolesti.¹²

Taj model vezanja uključuje umetanje (interkaliranje) planarnog aromatskog sustava između parova baza, što zahtijeva određene termodinamičke i fizikalno-kemijske promjene molekule DNA.¹³ Razumijevanje interkalacijskog mehanizma kao i geometrije nastalog kompleksa ligand-DNA od velike je važnosti pri dizajnu i sintezi još učinkovitijih, selektivnijih i klinički učinkovitijih supstancija.¹⁴

Povijesne činjenice

Temeljni interkalacijski model predstavio je 1961. godine Lerman, koji je proučavao promjene koje se događaju kada se *proflavin* dodaje u otopinu DNA, te je uočio značajne promjene u viskoznosti i sedimentacijskom koeficijentu DNA.¹⁵ Takva zapažanja pomogla su mu da dođe do zaključka da takvi spojevi induciraju strukturne promjene na dvostrukoj uzvojnici DNA preko interkalativnog načina vezanja. On je predvidio da takav mehanizam vezanja dovodi do produljenja uzvojnice DNA, što ju čini duljom i tanjom, kao što je prikazano na slici 4:



Slika 4 – Lermanov interkalacijski model

Fig. 4 – Lerman's intercalation model

Interkaliranje nije bilo proučavano samo na *proflavinu*, već je studirano na manje ili više planarnim kationskim molekulama s konjugiranim π -elektronskim sustavima, gdje su klasični primjeri *etidijev bromid* i *aminoakridini*.

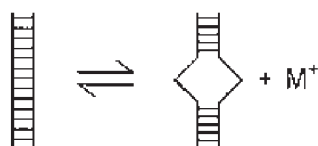
Prvu biofizikalnu karakterizaciju interkalacijskog kompleksa ligand-DNA dao je 1965. godine Waring, koji je opisao interakciju *etidijevog bromida* s DNA koristeći UV spektroskopiju, te su kasnije 1967. godine Le Pecq i Paoletti opisali interkaliranje pomoću fluorescencijske spektroskopije.^{16,17} Waring je također opisao i utjecaj ionske jakosti na vezanje *etidijevog bromida* na DNA. Godine 1968. Mueller i Crothers opisali su biofizikalne promjene koje se dešavaju pri interakciji *aktinomocina D* s DNA, te su došli do zaključka da interakcija malih molekula s DNA ovisi o njezinoj sekvenciji.

Takve početne studije vezanja malih aromatskih molekula na DNA dale su temelje razvoju interkalacijskog modela brojnih policikličkih aromatskih molekula. Istraživanja i studije vezanja interkalatora na DNA proširene su zahvaljujući strukturoj rendgenskoj analizi i nuklearnoj magnetskoj rezonanciji i na znatno veće i kompleksnije molekule. Jedan od najznačajnijih dokaza mehanizma interkaliranja bilo je otkriće strukture kristalnog kompleksa *etidijevog bromida* s DNA, koju su Sobell i suradnici dobili zahvaljujući strukturoj rendgenskoj analizi, a kasnije su potvrđene i strukture kompleksa nekih *akridina* s DNA. Mora se naglasiti da se u takvim preliminarnim istraživanjima većinom koristila uzvojnica DNA od svega 2 para baza i s niskom molekularnom masom, pa se sve činjenice nisu mogle u potpunosti primijeniti na molekule DNA sa znatno većom molekularnom masom i brojem parova baza.

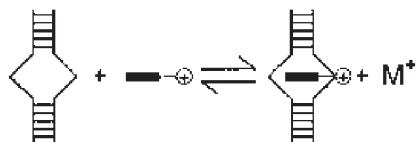
Mehanizam interkaliranja

Interkaliranje predstavlja atipičan reverzibilni način vezanja između polianiona DNA i kationa interkalatora, pri čemu kation ulazi između parove baza uzvojnice DNA, te se pri tome dvostruka uzvojnica mora izvinuti kako bi oslobodila prostor potreban za ulazak molekule interkalatora.¹⁸ Te-

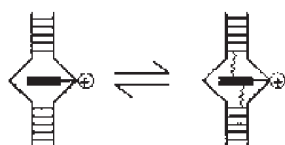
1. Conformational Change ($\Delta G > 0$)



2. Hydrophobic Transfer ($\Delta G < 0$)



3. Molecular Interactions/Anchoring ($\Delta G < 0$)

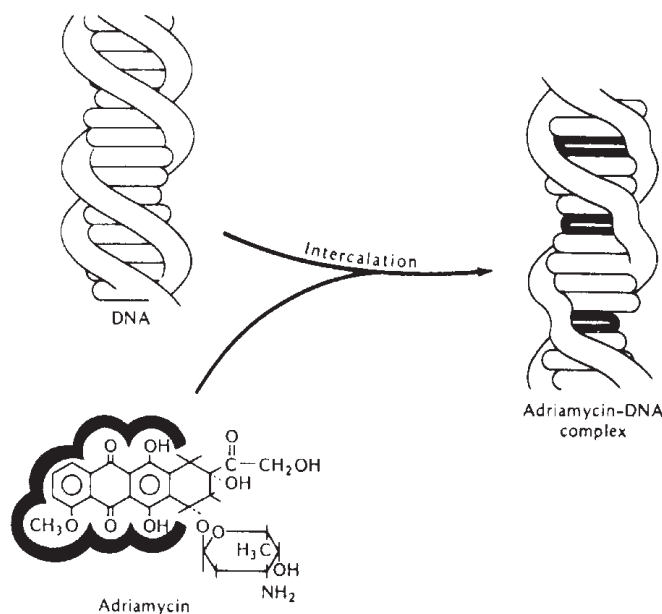


Slika 5 – Temeljni hipotetski model interkaliranja s minimalnim prikazom reakcija koje se dešavaju pri formiranju kompleksa

Fig. 5 – Basic hypothetical intercalation model with the schemes of complex formation

meljni hipotetski model interkaliranja s minimalnim prikazom reakcija koje se dešavaju pri formiranju kompleksa, prikazan je na slici 5, a predložili su ga Ross i Subramanian:^{19,20}

Jedan od prvih interkalatora je adriamicin, citostatik koji se već čitav niz godina koristi u antitumorskoj terapiji. On svojim tetracikličkim dijelom interkalira u intramolekularne prostore DNA između parova baza kao na slici 6.²¹



Slika 6 – Shematski model interkalacije planarnog dijela molekule adriamicina u DNA, koji pokazuje lokalno razmotavanje uzvojnice. Vidi: Lerman, L. S. *J. Cell. Comp. Physiol.* **64**, Suppl. 1:1 (1964) s dopuštanjem LISS-a (Alan R. Liss, Inc.), New York.

Fig. 6 – Diagrammatic model of intercalation of the flat part of the adriamycin molecule (in black) into DNA, showing local unwinding of the helical structure. From Lerman, L. S. *J. Cell. Comp. Physiol.* **64** Suppl. 1:1 (1964) with permission by LISS (Alan R. Liss, Inc.). New York.

1. Molekula DNA mora najprije podlijeći strukturnim promjenama kako bi se formirala interkalacijska strana, pri čemu se parovi baza moraju razdvojiti kako bi se formirala šupljina u koju će moći ući molekula interkalatora. Kako se parovi baza razdvajaju, dolazi do izvijanja dvostruke uzvojnice i slobodni prostor između fosfatnih skupina raste, lokalna gustoća naboja je manja, pa dolazi do otpuštanja kondenziranog protuiona.

2. U ovom stupnju dolazi do prijenosa molekule interkalatora iz otopine prema interkalacijskoj strani, te se ovaj korak može shvatiti kao hidrofobni prijenosni proces, jer se nepolarni, planarni, aromatski prsten tipičan za interkalatora uklanja iz otopine i ulazi u DNA uzvojnica. Ukoliko je interkalator nabijen pozitivno, dolazi do otpuštanja protuiona.

3. Kada je jednom interkalator došao do interkalacijske strane, mogu nastati brojne nekovalentne molekularne interakcije, čime se energija nastalog kompleksa optimalizira, pa tako dolazi do formiranja specifičnih vodikovih veza između interkalatora i DNA, kao i van der Waalsovih interakcija, specifičnih elektrostatskih sila te mnogih drugih.

Utvrđeno je da 1,2-diaril- ili diheteroaril-supstituirani eteni ne interkaliraju u dvostruku uzvojnica DNA ili RNA zbog nepovoljnih konformacijskih i konformacijskih karakteristika te da se ti spojevi u reakciji fotoinducirane dehidrociklizacije mogu prevesti u tricikličke aromatske ili heteroaromske sustave čije su strukturne karakteristike povoljne za interkalativni način vezanja na polinukleotide.²²

Ta saznanja rezultirala su pripremom hidrokloridne soli metilnog estera 2-(izopropilamidino) 8-nafto[2,3-b]furankarboksilne kiseline iz odgovarajućeg metilnog estera 3-(5-izopropilamidino-2-furil)-2-fenilakrilne kiseline, fotokemijskom dehidrociklizacijom u vodenom mediju (slika 7) kao modelne reakcije koja predstavlja novi pristup fotoinduciranoj antitumorskoj terapiji.²³

Vidljivo je iz dobivenih rezultata da reakcija fotokemijske dehidrociklizacije završava nakon 70 min (praćena je promjena absorbancije na 258 nm).

Izvršena su ispitivanja interakcije acikličkog (1) i cikličkog, naftofuranskog amidinskog derivata (2) s DNA. Kao što je već ranije spomenuto aciklički derivat nije pokazao nikakve mjerljive interakcije s polinukleotidima, dok se ciklički, naftofuranski derivat ponašao kao tipični interkalator, što je prikazano na slici 7.

Također su izvršena i antitumorska ispitivanja na nizu stanica humanog karcinoma, kao i na normalne fibroblaste (tablica 1).

Tablica 1 – In vitro inhibicija rasta tumorskih stanica ispitivanih spojeva i normalnih fibroblasta (WI 38)

Table 1 – In vitro growth inhibition of tumor cells and normal human fibroblasts (WI 38)

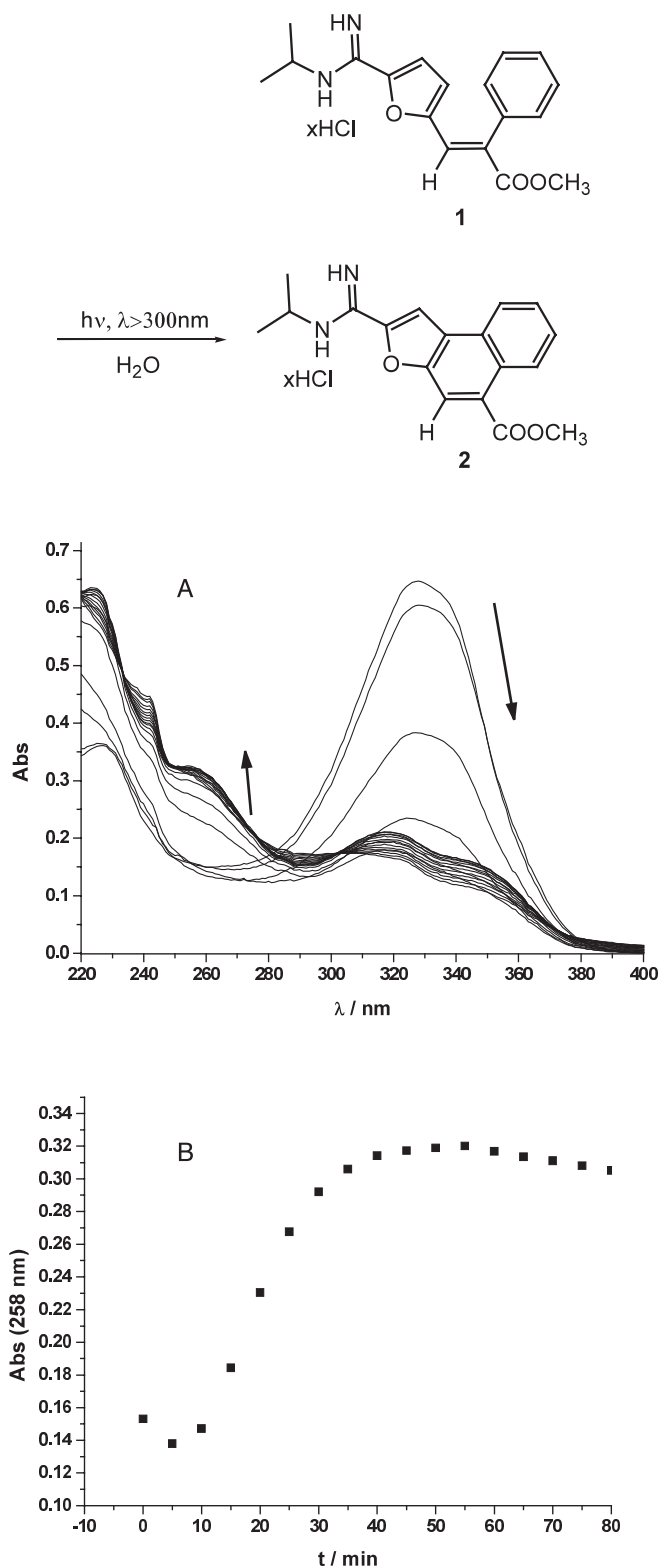
Spoj	IC ₅₀ (μM)*					
	HeLa	MCF-7	MiaPaCa-2	Hep-2	SW 620	WI 38
1	39±43	78±21	52,6±0,9	60±27	43±45	50,3±7
2	4,6±0,7	5,4±0,01	6±0,3	5±0,7	4,3±0,2	7,2±1,9

* IC₅₀ – koncentracija koja uzrokuje 50 % inhibicije rasta tumorskih stanica

* IC₅₀ – concentration that causes a 50 % reduction of tumor cell growth

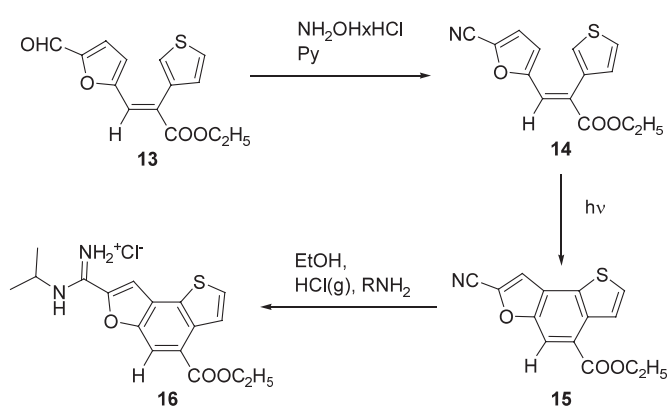
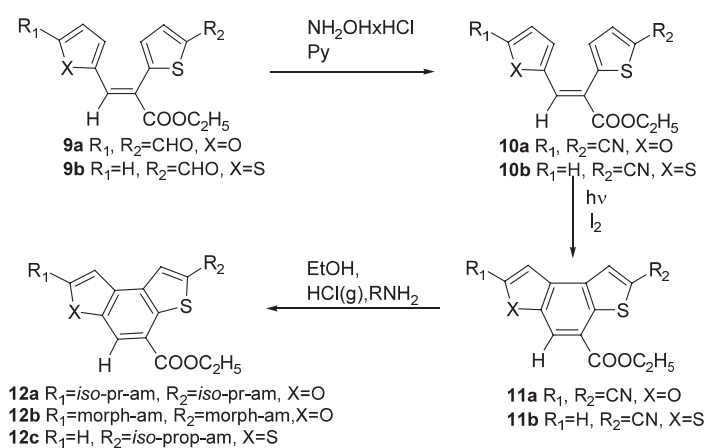
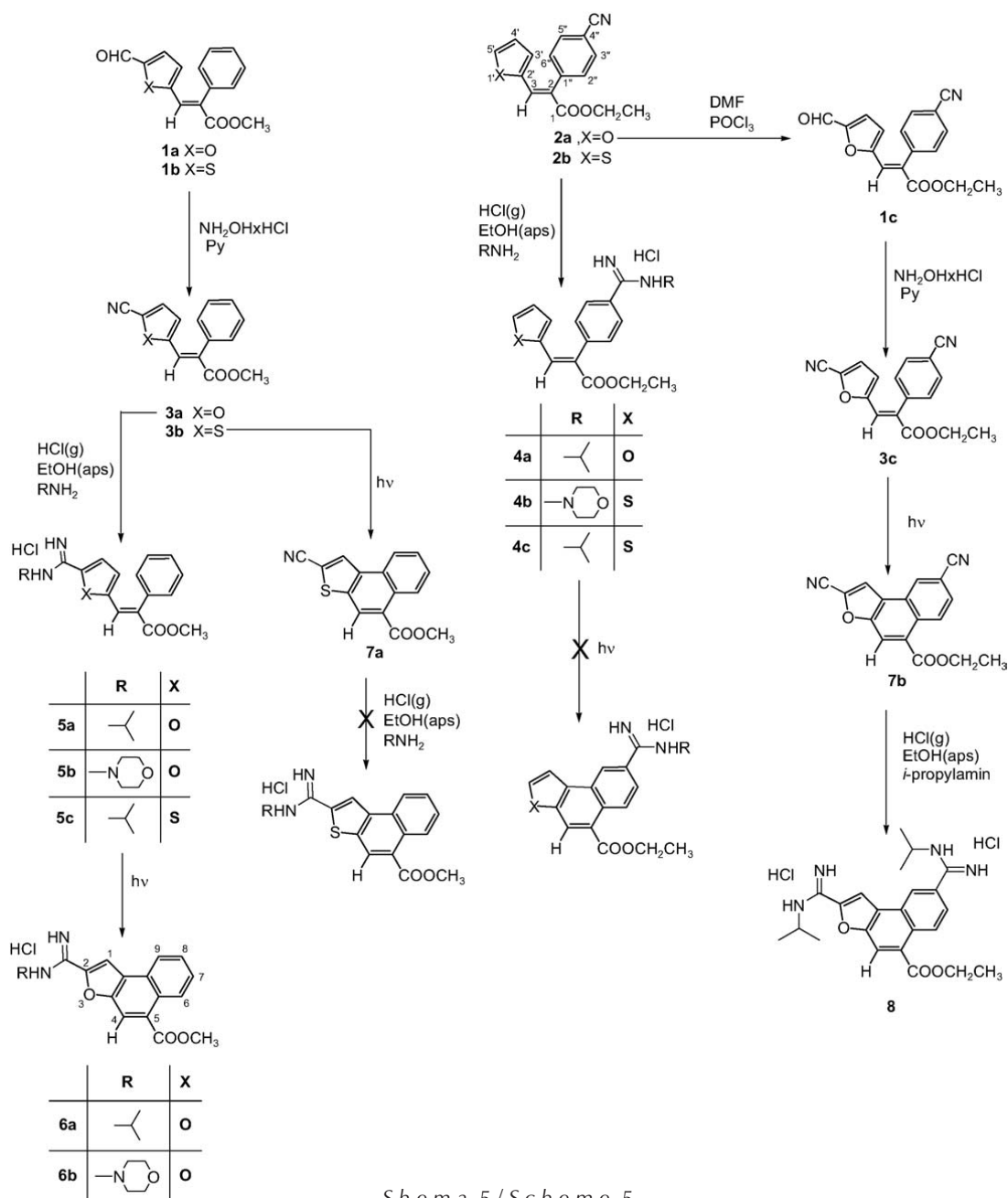
Iz tablice 1 može se vidjeti da aciklički spoj (1) pokazuje slabu aktivnost na više vrsta stanica humanog karcinoma, kao i na normalne fibroblaste, dok fotociklički naftofuranski produkt (2) pokazuje izrazitu antitumorsku aktivnost, ali i povećanu toksičnost.

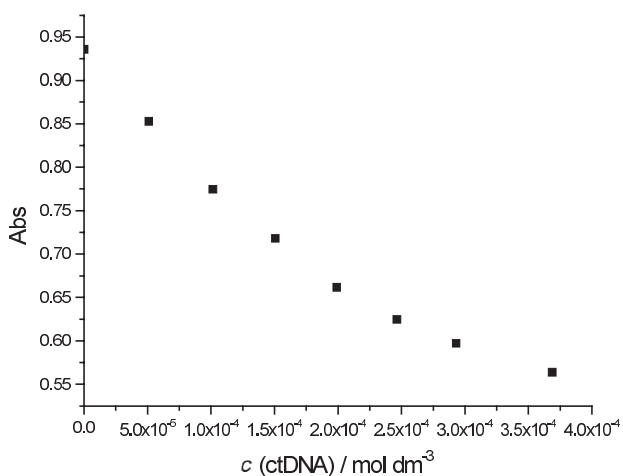
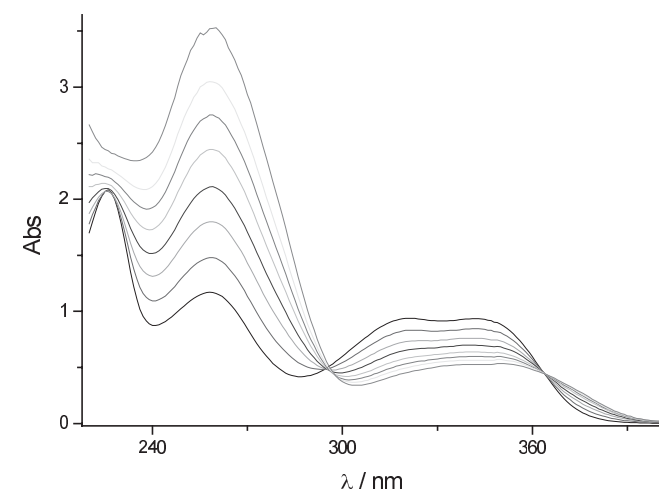
Dakle suština ovakvog pristupa je uspješna primjena reakcije opisane slikom 6 u uvjetima potrebnim za fotodinamičku terapiju tumora kojom se neinterkalativni reaktant može fotociklizacijom prevesti u interkalativni produkt. Neinterkalativni reaktant prevodi se u interkalativni produkt *in situ* tumorske bolesti unutar prihvatljivog vremenskog intervala, pri čemu je nastali interkalativni produkt kemijski izrazito stabilan, što onemogućava naknadne neželjene reakcije koje smanjuju visoku lokalnu koncentraciju aktivnog spoja. Prednost ovog izuma je u izrazitoj fluorescenciji interkalativnih produkata koja omogućava praćenje aktiv-



Slika 7 – A) Promjene UV/Vis spektra vodene otopine metilnog estera 3-(5-izopropilamidino-2-furil)-2-fenilakrilne kiseline, $c(1) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{HCl}) = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, osvjetljeno s visokotlačnom živinom svjetiljkom (400 W) uronjenom u oblogu od Pyrexa. B) Porast ovisan o vremenu kod $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ karakterističan za naftofuranski spoj.

Fig. 7 – (A) Changes of UV/Vis spectra of the aqueous solution of methyl 3-(5-isopropylamidino-2-furyl)-phenylacrylate, $c(1) = 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{HCl}) = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, irradiated with the high pressure Hg lamp (400 W) immersed in a Pyrex coat. (B) time dependent increase at $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ characteristic for (2).





	ct-DNA	Poly A – poly U	Poly G – poly C
$\log K_s^a$	4,9	4,3	4,9
n^b	0,22	0,22	0,10
$H / \%^c$	50	41	14
342 nm ^d	8 nm	8 nm	1 nm

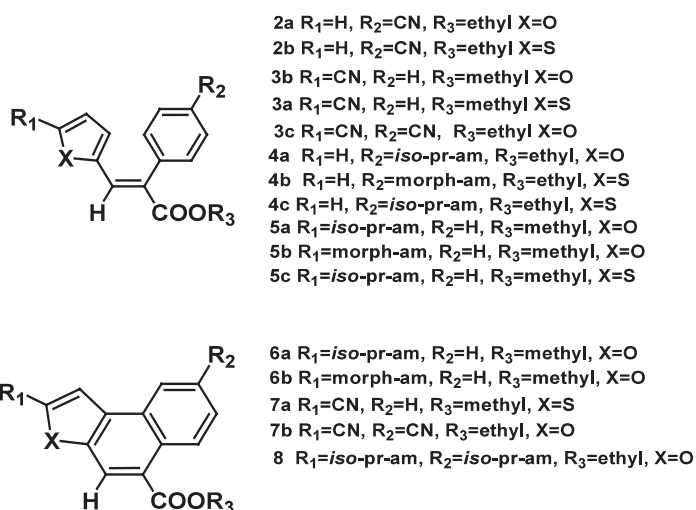
^a konstanta stabilnosti $\log K_s$; ^b omjer n ([vezani spoj 2] / [polynucleotide phosphate]); ^c Hipokromni efekt; $H = (\text{Abs}(2) - \text{Abs}(\text{complex})) / \text{Abs}(2) \times 100$; ^d $\lambda_{342 \text{ nm}} = \lambda_{342 \text{ nm}}(2) - \lambda_{342 \text{ nm}}(\text{complex})$.

Slika 8 – Titracijske krivulje amidino-supstituiranog naftofuran-skog derivata 2

Fig. 8 – Titration curves of amidino-substituted naphthofuran derivative 2

nih spojeva u tretiranom području te različitost UV/Vis spektara reaktanata i produkata, što omogućava jednostavno spektroskopsko praćenje niza parametara antitumorske terapije.

Nakon ovog saznanja nastojali smo prirediti čitav niz analoga kao i strukturnih izomera prethodnog spoja kako bismo eventualno pomaknuli apsorbanciju svjetla u duže valno područje, odnosno kako bismo poboljšali antitumorska svojstva. U tu svrhu priređen je čitav niz spojeva:



prema shemi 5.²⁴

Također su priređeni i triciklički sustavi s dvije heterocikličke jezgre prema shemama 6 i 7.²⁴

Tablica 2 – In vitro inhibicija rasta tumorskih stanica i normalnih fibroblasta (WI 38) sa pozitivno nabijenim molekulama te referentnim supstancijama: cisplatin, doksorubicin i etopoksid

Table 2 – In vitro growth inhibition of tumor cells and normal human fibroblasts (WI 38) by positively charged molecules and reference compounds cisplatin, doxorubicin and etopoxide

Spoj	Stanične linije					
	Hep-2	HeLa	MiaPa Ca-2	SW 620	MCF-7	WI 38
4a	≥100	≥100	>100	>100	69±22	83±46
4b	71±37	≥100	89±0,5	>100	78±29	53±27
4c	43±26	52±10	70±8	76±26	73±35	37±35
5a	43±3	78±21	53±0,9	60±27	43±10	50±7
5b	61±32	85±18	≥100	>100	75±26	>100
5c	53±6	100	79±26	>100	≥100	56±39
6a	4,6±0,7	5±0,008	6±0,3	5±0,7	4±0,2	7±2
6b	39±15	31±14	41±5	16±22	44±17	41±9
8	54±11	33±9	20±7	36±0,7	31±9	38±2
12a	6±3	3±1,5	4,3±0,3	4±2	7±1	5±3
12b	7±1	8±3	11±3	6±3	19±17	20±14
16	19±11	11±0,1	29±1	22±16	39±10	40±1
Cisb	2±0,3	3±0,6	5±2	4±2	12±6	19±20
Doxb	0,04±0,01	0,04±0,01	0,02±0,01	0,02±0,02	0,04±0,01	0,1±0,01
Etob	N.T.c	3±1	15,4±14	20±3,4	50±30	N.T.

^a IC_{50} – koncentracija koja uzrokuje 50 % inhibicije rasta tumorskih stanica; HeLa – karcinom grlića maternice, MCF-7 – karcinom dojke, SW 620 – karcinom debelog crijeva, MiaPaCa-2 – karcinom gušterače, Hep-2 – karcinom grkljana, WI-38 – normalni fibroplasti

^a IC_{50} – concentration that causes a 50 % reduction of the tumor cell growth

T a b l i c a 3 – Inhibicija rasta tumorskih stanica i normalnih fibroblasta (WI 38) sa neutralnim molekulama in vitro

T a b l e 3 – In vitro growth inhibition of tumor cells and normal human fibroblasts (WI 38) by neutral molecules

Spoj	IC ₅₀ ^a (μM)					
	Stanične linije					
	Hep-2	HeLa	MiaPaCa-2	SW 620	MCF-7	WI 38
1c	62±16	44±4	35±7	7±2	33±5	43±2
2a	96±60	73±36	≥100	>100	31±44	50±20
2b	91±21	68±12	33±47	68±8	67±7	46±6
3a	64±30	60±5	62±4	66±12	≥100	>100
3b	71±19	87±10	79±8	100	83±2	>100
3c	78±21	62±18	46±12	48±14	57±25	32±16
7a	2±1	0,6±0,1	18±12	≥100	≥100	20±6
7b	>100	>100	>100	≥100	≥100	≥100
10a	4±3	6±1	6±2	6±2	23±5	43±23
10b	74±8	54±24	74±10	78±23	86±12	≥100
11a	≥100	>100	>100	>100	≥100	≥100
11b	97±19	17±12	13±10	4±0,5	100	6±4
14	81±1	39±1	43±6	52±14	86±17	>100
15	8±1	6±0,3	57±5	71±17	≥100	92±17

^a IC₅₀ – koncentracija koja uzrokuje 50 % inhibicije rasta tumorskih stanica; HeLa – karcinom grlića maternice, MCF-7 – karcinom dojke, SW 620 – karcinom debelog crijeva, MiaPaCa-2 – karcinom gušterače, Hep-2 – karcinom grkljana, WI-38 – normalni fibroplasti

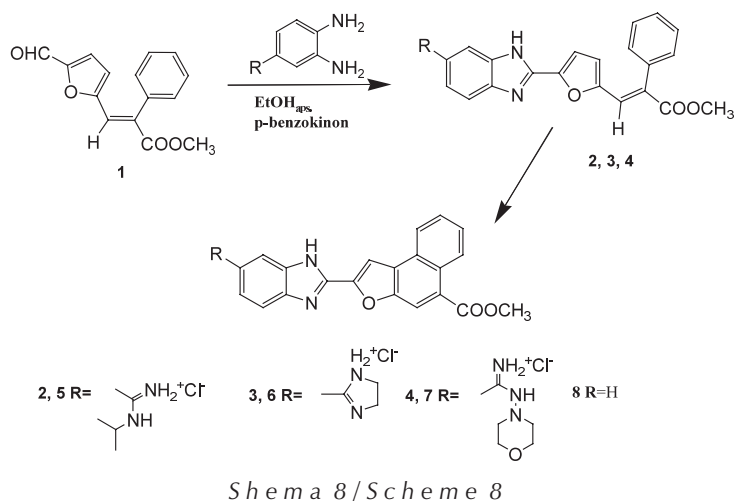
^a IC₅₀⁵⁰ – concentration that causes a 50 % reduction of the tumor cell growth

Iz tablica 2 i 3 koje prikazuju antitumorsko djelovanje, vidljivo je da se u čitavom novom sustavu priređenih kondenziranih tricikličkih heterocikličkih spojeva koji u strukturi sadrže protonirane amidino-farmakofore, osim kod spoja (12), koji u svojoj tricikličkoj planarnoj strukturi na furanskoj i tiofenskoj jezgri sadrži izopropilamidinski supstituent, nije postigla bolja antitumorska djelotvornost. Interesantno je međutim spomenuti da neutralne molekule s cijano-supstituentom, (spojevi **7a** i **15**) pokazuju izrazitu aktivnost i selektivnost na stanice karcinoma grlića maternice (He-La).

Da bi se poboljšala antitumorska svojstva, prišlo se pripremi amidinobenzimidazol-supstituiranih furil(fenil)akrilata i njihovoj fotokemijskoj ciklizaciji u odgovarajuće cikličke produkte; derivate naftofurana prema shemi 8.²⁵

Ovi spojevi pokazali su dobru antitumorsku aktivnost *in vitro* prema tablici 4.

Uvođenjem amidino-supstituirane benzimidazolne jezgre u položaj 5 furanske jezgre u 3-(2-furil)-2-metakrilatu kao i u cikličkom naftofuranskom sustavu, antitumorska aktivnost je znatno porasla, a posebnu aktivnost na stanice tumora dojke (MiaPaCa2) pokazali su spojevi s izopropilamidinskim supstituentom na benzimidazolnoj jezgri, (spojevi **2** i **5**), a bili su potpuno netoksični za normalne fibroblaste.



T a b l i c a 4 – Antitumorsko djelovanje amidinobenzimidazol-supstituiranih furil(fenil)akrilata i naftofurana in vitro

T a b l e 4 – In vitro antitumor activity of amidinobenzimidazol substituted furyl(phenyl)acrylates and naphthofurans

Spoj	IC ₅₀ (μM)						
	HT29	Hep2	HeLa	MCF7	MiaPa Ca2	HBL	WI38
2	75,8	12,6	3,24	2,63	3,09	2,57	>1000000
3	42,7	5,01	5,62	-	35,5	41,7	56
4	1,38	1,66	3,16	4,37	2,45	1,78	5,5
5	1580	39,8	199	6,3	21,4	6,3	>1000000
6	398	6,02	4,26	10	3,72	7,58	63
7	42,7	4,17	5,01	-	46,7	39,8	60,2

Zaključak

Na osnovi ispitivanja antitumorske aktivnosti i studije kompleksiranja priređenih spojeva s DNA može se zaključiti da heterociklički spojevi, koji u svojoj strukturi sadrže furansku jezgru na koju je izravno vezana benzimidazolna jezgra supstituirana amidinskim supstituentima, predstavljaju interesantnu grupu heterocikličkih spojeva, čija se istraživanja nastavljaju.

Literatura References

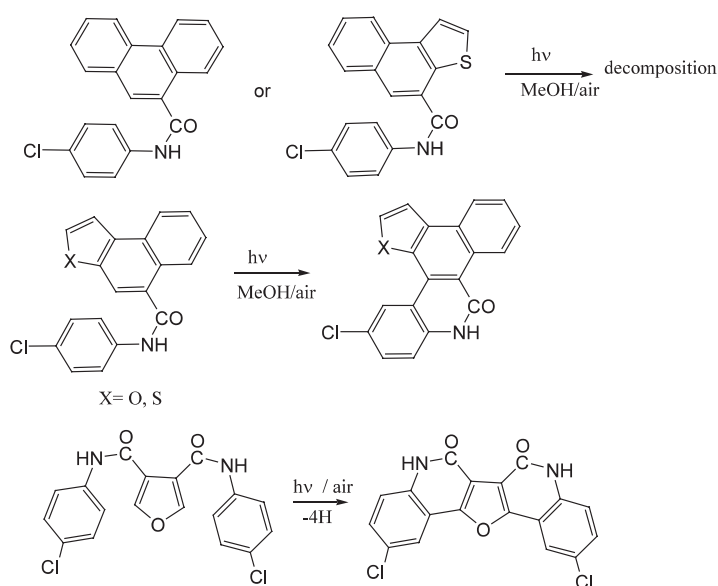
- (a) M. V. Sargent, C. J. Timons, *J. Chem. Soc.* **1964**, 5544. (b) E. V. Blackburn, C. J. Timmons, *Quart. Rev.* **23** (1969) 482-496.
- G. Karminski-Zamola, K. Jakopčić, *Bulletin Scientifique, Section A., Sciences naturelles, Techniques et Medicales* **21** (1976) 134-135.
- G. Karminski-Zamola, K. Jakopčić, *Croat. Chem. Acta* **46** (1974) 71-78.
- G. Karminski-Zamola, L. Fišer-Jakić, K. Jakopčić, *Tetrahedron* **38** (1982) 1329-1335.
- M. Bajić, G. Karminski-Zamola, N. Blažević, *Croat. Chem. Acta* **65** (1992) 836-846.

6. M. Bajić, G. Karminski-Zamola, *Croat. Chem. Acta* **69** (1996) 261-266.
7. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford Univ. Press, NY (2001), 1347-1352.
8. B. S. P. Reddy, S. M. Sondhi, J. W. Lown, *Pharmac. & Therap.* **84** (1999) 1-111.
9. D. Chuan, W. Yu-xia, W. Yan-li, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **174** (2005) 15-22.
10. W. A. Denny, *Curr. Med. Chem.* **8** (2001) 533-544.
11. P. M. Warner, J. Qi, B. Meng, G. Li, L. Xie, A. El. Shafey, G. B. Jones, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **12** (2002) 1-4.
12. D. A. Graves, *Intercalative Binding of Small Molecules to Nucleic Acids.*
13. H. W. Zimmermann, *Angewandte Chemie* **25** (1986) 115-196.
14. J. Ren, J. B. Chaires, *Biochemistry* **38** (1999) 16067-16075.
15. L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 18-30.
16. M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **13** (1965) 269-282.
17. J. B. LePecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **27** (1967) 87-106.
18. I. Haq, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **403** (2002) 1-15.
19. J. B. Chaires, Inc. *Biopoly* **44** (1997) 201-215.
20. P. D. Ross, S. Subramanian, *Biochemistry* **20** (1981) 3096-3102.
21. L. S. Lerman, *J. Cell. Comp. Physiol.* **64** (1964) Supl.1:1
22. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, "Small molecule DNA and RNA Binders" Wiley-VCH, NY 2003, Vol 1.
23. K. Starčević, G. Karminski-Zamola, I. Piantanida, M. Žinić, L. Šuman, M. Kralj, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 1074-1075.
24. K. Starčević, M. Kralj, I. Piantanida, L. Šuman, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *Eur. J. Med. Chem.* **41** (2006) 925-939.
25. M. Hranjec, M. Grdiša, K. Pavelić, W. D. Boykin, Karminski-Zamola, G. Karminski-Zamola, *Il Farmaco* **58** (2003) 1319-1324.

II. Dio

Fotokemijsko dobivanje polikondenziranih heterocikličkih aromatskih kinolona i njihovo antitumorsko djelovanje

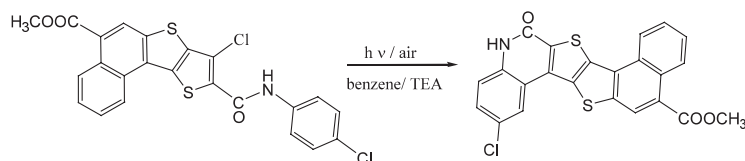
U svijetu provedena fotokemijska dehidrociklizacija na različitim heterocikličkim anilidima,¹ u našem radu rezultirala je stvaranjem heterocikličkih kinolona, najčešće planarne strukture, iz odgovarajućih monoanilida naftofuran- ili naftotiofenkarboksilne kiseline.² Također je provedena dvostruka fotokemijska dehidrociklizacija bis(anilida)3,4-furan- dikarboksilne kiseline u odgovarajući dikinolon³ prema shemi 9.



Shema 9/Scheme 9

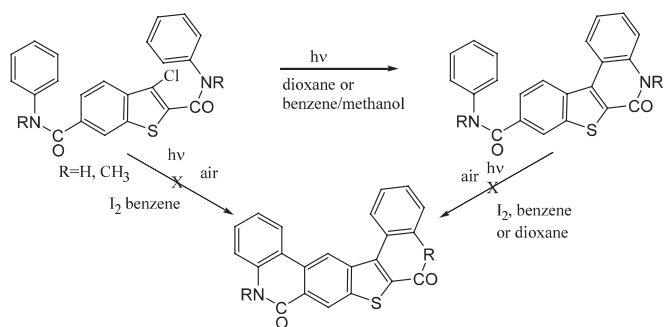
Osim fotokemijskih dehidrociklizacija aromatskih i heteroaromatskih anilida provedeno je i fotokemijsko dehidrohalogeniranje aromatskih i heteroaromatskih anilida, koji su u orto-položaju kiselinskog dijela molekule bili supstituirani

halogenom, najčešće klorom. Reakcija je provedena u otopini metanol-benzen 1:10 uz prisutnost trimetilamina kao baze za vezivanje oslobođenog HCl-a. Fotokemijskom reakcijom dehidrohalogeniranja izolirani su heteropoliklički nafto-tieno-tien-kinoloni u vrlo dobrom iskorištenju.⁴ (shema 10)



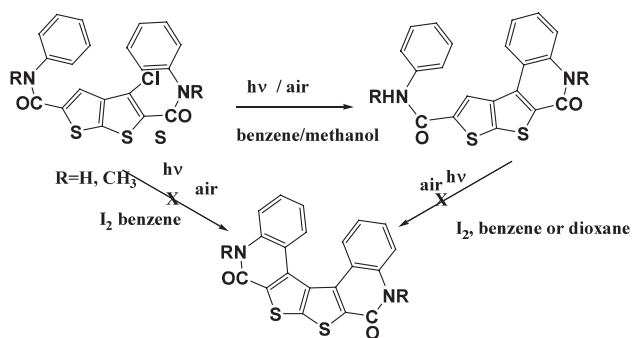
Shema 10/Scheme 10

U pokušaju povezivanja dviju fotokemijskih reakcija; fotokemijskog dehidrogeniranja (oksidacije) i fotokemijsko dehidrohalogeniranja na istom supstratu, priređeni su bis(anilidi) nesimetrične heterocikličke 3-klorbenzo[b]tiofen-2,5-dikarboksilne kiseline, koju se pokušalo prevesti u odgovarajuće kondenzirane dikinoline. Reakcijski uvjeti; metanol-benzen (1:10), trietilamin ili dioksan uz propuhivanje zraka. Izolirani su samo produkti fotokemijskog dehidrogeniranja, tj. anilido-benzo[b]tienokinolon, a ne i odgovarajući bis-kinolon.⁵ (shema 11)



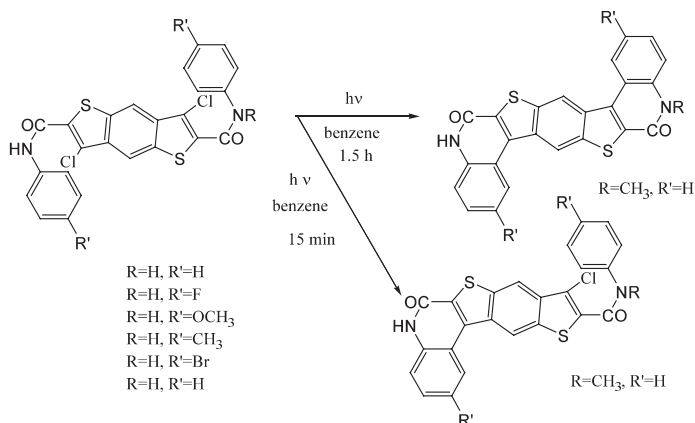
Shema 11/Scheme 11

Ista se reakcija dogodila i s ozračivanjem dianilida 3-klor-tieno[2,3-b]tiofen-2,5-dikarboksilne kiseline prema shemi 12. Izoliran je odgovarajući monokinolon.



Shema 12 / Scheme 12

Kod dianilida simetrične 3,7-diklorbenzo[1,2-b:4,5-b']-2,6-dikarboksilne kiseline uspješno je provedena reakcija dvostrukog dehidrohalogeniranja u odgovarajuće dikinolone, ali je ovisno o vremenu osvjetljavanja izoliran i anilidomonokinolon, što dokazuje da reakcija dvostrukog dehidrohalogeniranja ide u dva stupnja preko mono-produkta jednako kao i kod reakcije dvostruke dehidrociklizacije.⁶ (shema 13)

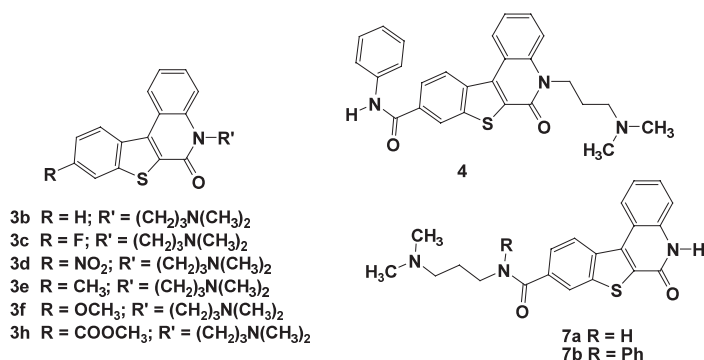


Shema 13 / Scheme 13

Sinteza novih heteropolikondenziranih kinolona i njihovo antitumorsko djelovanje

Prethodna znanja u primjeni fotokemijskih reakcija dehidrociklizacije, a osobito fotokemijskog dehidrohalogeniranja koja su rezultirala nastajanjem polikondenziranih heterocikličkih sustava, osobito kinolona i bis(kinolona), uglavnom planarne strukture, našla su svoju primjenu u sintezi novih heteropolikondenziranih kinolona potencijalno biološki aktivnih. Naime, uvođenjem kationskih supstituenata u osnovnu kinolonsku strukturu postigla bi se mogućnost ugrađivanja takvih molekula u intramolekularne prostore dvostruke zavojnice DNA i njihovog reverzibilnog vezivanja na slobodne elektronske parove purinskih i pirimidinskih baza bilo elektrostatski, bilo vodikovim vezama i na taj način sprečavanje replikacije DNA. Sprečavanje replikacije DNA moglo bi se primijeniti i na stanice tumora i na taj način zaustaviti njihov rast.

Tako su sintetizirani novi derivati benzo[b]tieno[2,3-c]kinolona koji su nosili *N*-dimetilaminopropilnu grupu supstituiranu bilo na kinolonskom dušiku, bilo na amidnom/anilidnom dušiku uz druge različite supstituente (slika 9).⁷



Slika 9 – Novi derivati benzo[b]tieno[2,3-c]kinolona

Fig. 9 – New derivatives of benzo[b]thieno[2,3-c]quinolones

Višestupnjevita sinteza provedena je prema shemi 10, gdje je u zadnjoj fazi sinteze primijenjeno fotokemijsko dehidrohalogeniranje odgovarajućih anilida u kinolone. Reakcije fotokemijske ciklizacije provedene su s dobrim iskorištenjem. Naknadnim protoniranjem aminskog supstituenta s plinovitim HCl priređene su odgovarajuće hidrokloridne soli radi bolje topljivosti supstancija.

Priređenim kinolonima ispitano je njihovo antitumorsko djelovanje na niz stanica humanog karcinoma prikazano u tablici 5.

Tablica 5 – Inhibicijski efekt in vitro na rast tumorskih stanica kao i na rast normalnih fibroblasta (WI-38)

Table 5 – In vitro growth inhibition effect of tumor cells and normal human fibroblasts (WI 38)

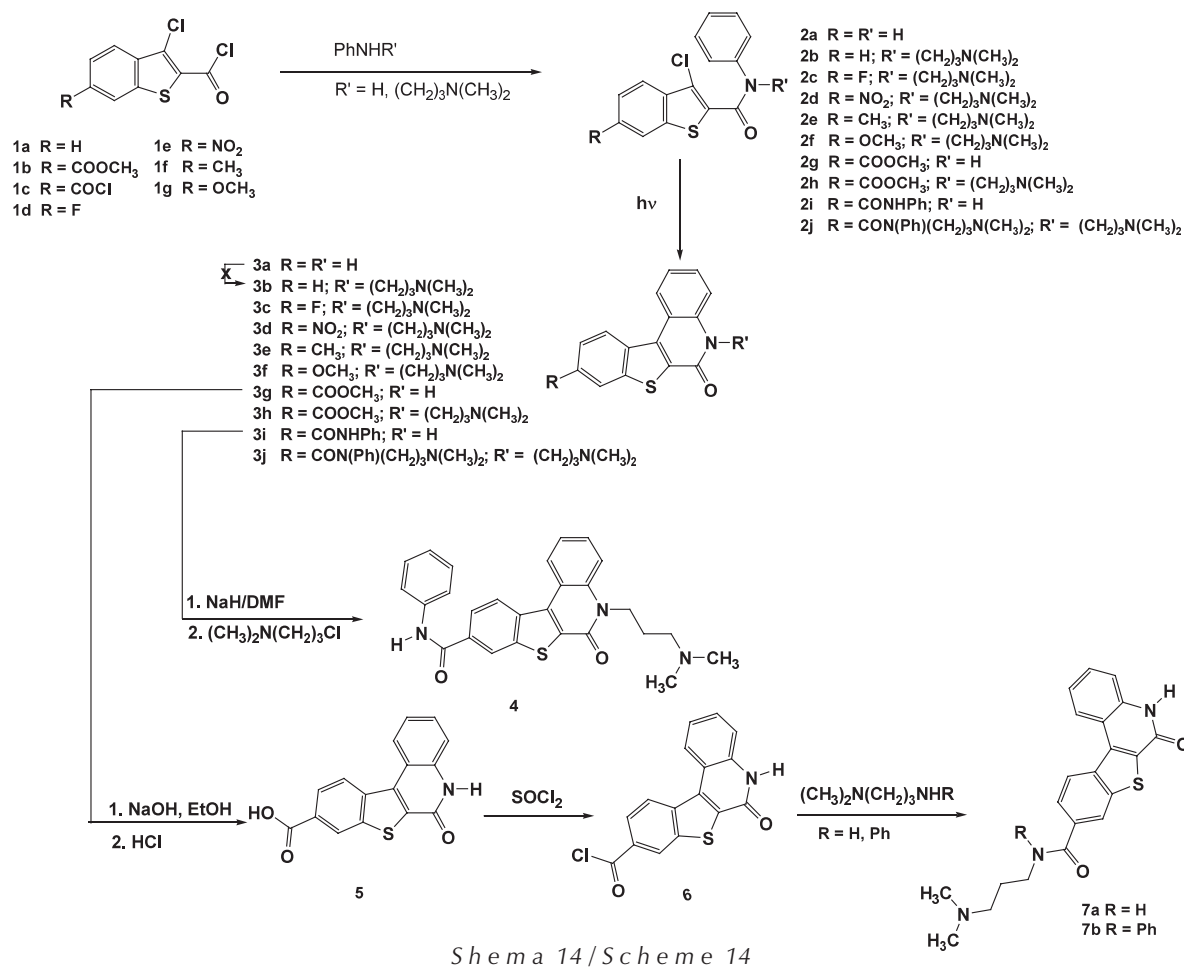
Spoj	IC ₅₀ (μM)*						
	HeLa	MCF-7	CaCo-2	MiaPa Ca-2	HBL	Hep-2	WI-38
3b	2,5	4,27	0,62	1,4	0,58	3,63	4,5
3c	0,65	4,6	0,98	2,5	3,98	3,16	2,9
3d	1,0	5,8	0,79	1,25	1,2	3,54	2,4
3e	1,0	4,5	1,7	1,1	1,1	3,63	2,45
3f	0,85	2,2	0,47	0,51	1,58	2,96	2,3
3h	1,3	0,59	0,47	1,0	0,35	0,65	1,6
4	2,8	2,63	0,49	1,0	<0,01	1,77	2,3
7a	6,3	10,0	3,8	6,6	1,0	6,6	4,4
7b	34,7	19,5	4,79	4,79	0,67	3,16	10,0

* IC₅₀ – koncentracija koja uzrokuje 50 % inhibicije rasta tumorskih stanica

* IC₅₀ – concentration that causes a 50 % reduction of the cell growth

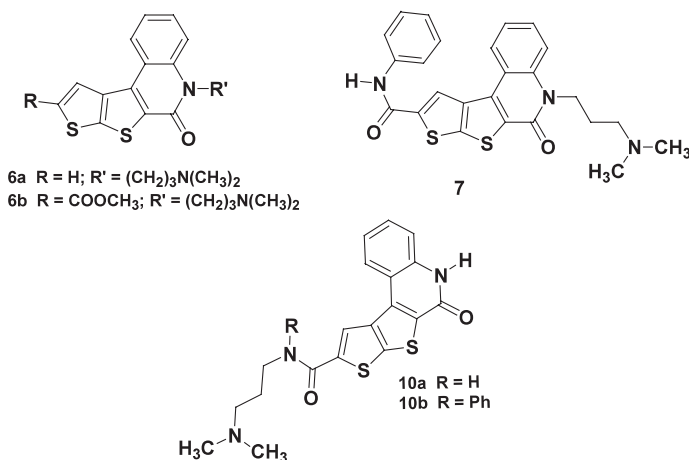
Antitumorska ispitivanja su provedena na stanicama karcinoma grlića maternice (HeLa), stanicama karcinoma prsiju (MCF-7), stanicama karcinoma kolona (CaCo-2), stanicama karcinoma gušterače (MIA PaCa-2), stanicama melanoma (HBL), stanicama karcinoma grla (Hep-2) i na normalnim humanim fibroblastima (WI-38).

Svi spojevi iz ove grupe pokazali su izrazitu inhibitornu aktivnost na stanice humanog karcinoma. Najosjetljivije su bile stanice melanoma (HBL). Najjači inhibitorni efekt nađen je za sve stanične linije kod spojeva, **3f**, **3h** i **4**. Spoj **4**



uzrokovao je i apoptozu (smrt) stanica melanoma ispitanu protočnom citometrijom.

Priredeni su i njihovi analozi u tiofenskom redu odnosno derivati tieno[3',2':4,5]tieno[2,3-c]kinoloni također s dimetilaminopropilnim supstituentom na kinolonskom dijelu molekule u svrhu poboljšanja antitumorskog djelovanja (slika 10).⁸



Slika 10 – *N,N*-dimetilamino-supstituirani tieno[3',2':4,5]tieno[2,3-c]kinoloni

Fig. 10 – *N,N*-dimethylamino-substituted thieno[3',2':4,5]thieno[2,3-c]quinolones

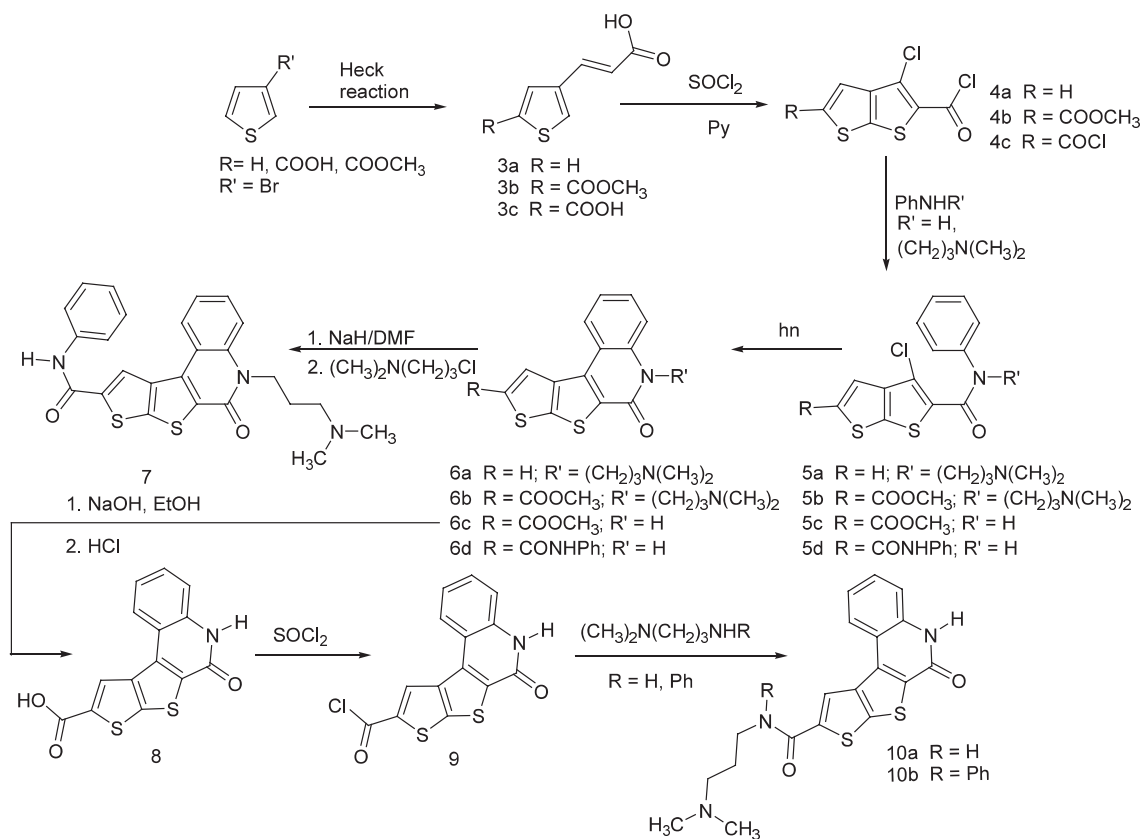
Višestupnjevitom sintezom priredeni su željeni spojevi (shema 15), gdje su u terminalnoj fazi reakcije odgovarajući anilidi prevedeni fotokemijskim dehidrohalogeniranjem u kinolone, koji su protoniranjem s plinovitom HCl prevedeni u hidrokloridne soli na dimetilaminopropilnom supstituentu kako bi bili topivi u vodi i tako pogodni za antitumorska ispitivanja.

Svi spojevi pokazali su dosta dobru antitumorsku aktivnost s IC₅₀ od 0,1 do 51 M osim spoja 7, gdje je antitumorska aktivnost bila slabija. Najaktivnijim se pokazao spoj 6b s dimetilaminopropilnim supstituentom na kinolonskoj strani molekule i 10a s privjeskom na tieno-tiofenskoj strani molekule. U usporedbi s drugim ranije opisanim kinolinima ovi su pokazali izrazitu antitumorsku aktivnost, ali i neselektivnost i toksičnost (tablica 6).

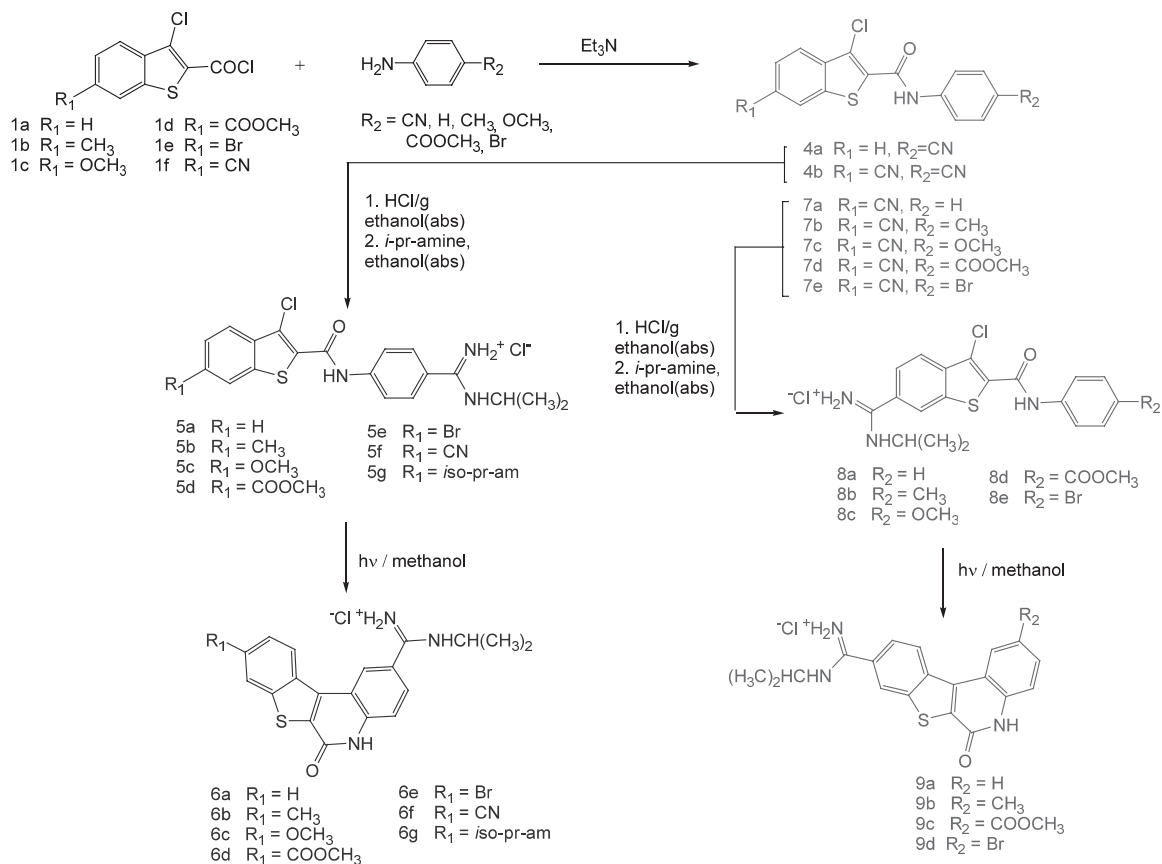
Nova serija benzo[b]tieno[2,3-c]kinolona s cijano i/ili amidinskim supstituentima kako na kinolonskoj tako i na benzotiofenskoj strani molekule priredena je u novije vrijeme (slika 11).⁹

Provedena je višestupnjevita sinteza, koja je uključivala Pinnerovu reakciju priprave amidina i supstituiranih amidina iz odgovarajućih nitrila te fotokemijsko dehidrohalogeniranje u vodi ili razrijeđenom etanolu amidinskih hidrokloridnih soli anilida u amidin-hidrokloridne kinolone (shema 16).

U zadnjofazi reakcije provedena je reakcija fotokemijskog dehidrohalogeniranja amidinskih soli u razrijeđenom metanolu ili vodi, što je novi doprinos tzv. zelenoj fotokemiji,



SHEMA 15/Scheme 15



SHEMA 16/Scheme 16

engl. *green photochemistry*. Treba istaknuti da su fotokemijske reakcije organskih kationa na heteroatomu (osim karbokationa) u otopini slabo zastupljene u literaturi, tako da su i ova istraživanja novi doprinosi poznavanju fotokemijskih reakcija. Iskorištenja su se kretala od 64–90 %.

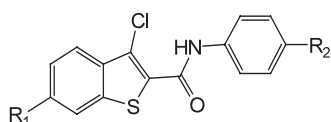
T a b l i c a 6 – Inhibicijski efekt in vitro na rast tumorskih stanica kao i na rast normalnih fibroblasta (WI-38)

T a b l e 6 – In vitro growth inhibition of tumor cells and normal human fibroblasts (WI 38)

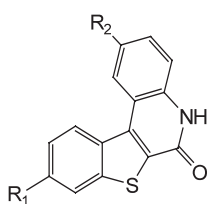
Spoj	IC ₅₀ (μM)*						
	HeLa	MCF-7	CaCo-2	MiaPaCa-2	HBL	Hep-2	WI-38
6a	0,1	7,41	0,23	4,57	0,46	5,82	2,88
6b	2,2	6,23	1,0	1,0	6,17	2,5	4,67
7	31,6	47,9	38,0	34,7	4,5	51,0	7,59
10a	0,1	2,5	0,15	0,74	7,24	1,0	4,9
10b	2,5	6,3	3,8	2,34	0,59	4,17	5,76

* Koncentracija u mikromolovima koja uzrokuje 50 % inhibicije rasta tumorskih stanica

* Concentration in micromoles that causes a 50 % reduction of the cell growth of tumor cells



2a	R ₁ = H, R ₂ = COOCH ₃	7a	R ₁ = CN, R ₂ = H
2b	R ₁ = COOCH ₃ , R ₂ = H	7b	R ₁ = CN, R ₂ = CH ₃
4a	R ₁ = H, R ₂ = CN	7c	R ₁ = CN, R ₂ = OCH ₃
4b	R ₁ = CN, R ₂ = CN	7d	R ₁ = CN, R ₂ = COOCH ₃
5a	R ₁ = H, R ₂ = <i>iso-pr-am</i>	7e	R ₁ = CN, R ₂ = Br
5b	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = <i>iso-pr-am</i>	8a	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = H
5c	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = <i>iso-pr-am</i>	8b	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = CH ₃
5d	R ₁ = COOCH ₃ , R ₂ = <i>iso-pr-am</i>	8c	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = OCH ₃
5e	R ₁ = Br, R ₂ = <i>iso-pr-am</i>	8d	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = COOCH ₃
5f	R ₁ = CN, R ₂ = <i>iso-pr-am</i>	8e	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = Br
5g	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = <i>iso-pr-am</i>		



3a	R ₁ = H, R ₂ = COOCH ₃
3b	R ₁ = COOCH ₃ , R ₂ = H
6a	R ₁ = H, R ₂ = <i>iso-pr-am</i>
6b	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = <i>iso-pr-am</i>
6c	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = <i>iso-pr-am</i>
6d	R ₁ = COOCH ₃ , R ₂ = <i>iso-pr-am</i>
6e	R ₁ = Br, R ₂ = <i>iso-pr-am</i>
6f	R ₁ = CN, R ₂ = <i>iso-pr-am</i>
6g	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = <i>iso-pr-am</i>
9a	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = H
9b	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = CH ₃
9c	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = COOCH ₃
9d	R ₁ = <i>iso-pr-am</i> , R ₂ = Br

Slika 11 – Cijano i/ili amidinski supstituirani benzo[b]tieno[2,3-c]kinoloni

Fig. 11 – Cyano or/and amidino-substituted benzo[b]tieno[2,3-c]quinolones

Provedena su antitumorska ispitivanja, ali ovaj put kako na cijanoanilidima, tako i na amidino supstituiranim anilidima u obliku kationskih soli, te je njihova aktivnost uspoređivana s antitumorskom aktivnošću amidinskih kinolona kao krutih planarnih molekula koje su pogodne da djeluju kao interkalatori, dok anilidi zbog svoje fleksibilnosti ne mogu djelovati kao interkalatori, ali se također mogu vezivati na DNA ili djelovati na enzime topoizomerazu I i II.

Uspoređivano je antitumorsko djelovanje cijano- i amidino-supstituiranih anilida kao acikličkih prekursora cikličkih kinolona i to na dvije grupe spojeva; acikličkih anilida, koji su supstituente nosili na anilidnom odnosno kinolonskom dijelu molekule i one anilide i odgovarajuće kinolone sa supstituentom na benzotiofenskom dijelu molekule (tablica 7 i 8).

T a b l i c a 7 – Antitumorsko djelovanje cijano- i amidino-supstituiranih anilida (4-5g) i amidino-supstituiranih kinolona sa supstituentom na kinolonskoj strani (6a-6g)

T a b l e 7 – Antitumor activity of cyano and amidino-substituted anilides (4-5g) and amidino-substituted quinolones with substituent on quinolone side (6a-6g)

Spoj	Stanične linije, IC ₅₀ (μM)*					
	HeLa	MCF-7	MiaPaCa-2	Hep-2	SW 620	WI 38
4a	0,86	≥100	>100	6,50	>100	8,12
5a	12,9	1,967	6,99	15,3	27,8	36,4
5b	3,0	3,49	4,44	3,94	3,53	3,3
5c	2,7	3,7	4,67	2,55	3,86	4,01
5d	2,24	1,23	3,49	5,37	3,67	2,85
5e	2,15	2,54	3,51	2,37	3,93	2,99
5f	22,2	23,9	8,72	21	8,02	25,1
5g	25,6	15,6	75,9	67,3	>100	86,9
6a	25,3	1,36	7,3	16,6	32,2	≥100
6b	4,3	5,4	5,98	8,59	7,57	18,66
6c	2,34	38	6,73	34,7	20,6	40,6
6d	4,79	65,1	5,64	45,9	48,8	100
6e	1,7	5,78	3,71	6,95	6,84	19
6f	6,14	>100	42,1	≥100	>100	≥100
6g	31,6	78,5	86,9	>100	≥100	≥100

* Koncentracija spojeva u mikromolovima potrebna da zaustavi rast 50 % tumorskih stanica

* Concentration in micromoles that causes a 50 % reduction of the cell growth of tumor cells

Iz tablica 7 i 8 mogu se uspoređivati interakcija acikličkih anilida (5d i 8d) i cikličkih kinolona (6d i 9c). Ciklički kinoloni su po svojoj građi kruti, planarni i aromatski, aciklički anilidi su fleksibilni, ne posjeduju aromatsku kondenziranu strukturu da bi mogli dobro interkalirati, pa se može očekivati da je njihova biološka aktivnost drugačija.

Da bismo dokazali da se odgovarajući kondenzirani kinoloni ponašaju kao interkalatori, usporedili smo njihovo djelovanje s aromatskim policikličkim kondenziranim molekulama s tri ili četiri člana, koji se ponašaju kao interkalatori^{22 (I dio)} i modelirali molekulu cikličkog kinolona 9a u odnosu na isječak molekule DNA (slika 12).

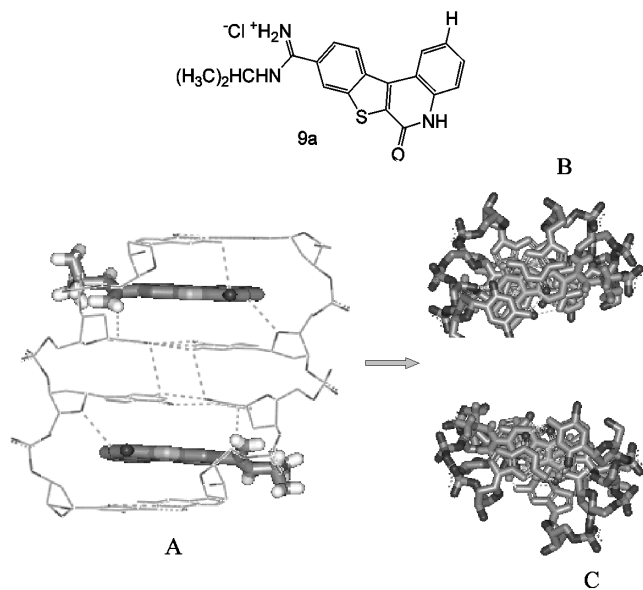
Tablica 8 – Antiproliferativno djelovanje cijano (7a-7e) i amidino-supstituiranih anilida (8a-8e) sa supstuentima na benzotiofenskoj strani molekule

Table 8 – Antiproliferative activity of cyano and amidino-substituted anilides (7a-7e) and amidino-substituted quinolones with substituent on benzothiofene side of the molecule (8a-8e)

Spoj	Stanične linije, IC ₅₀ (μM)*					
	HeLa	MCF-7	MiaPaCa-2	Hep-2	SW 620	WI 38
7a	0,35	84,93	>100	0,69	≥100	≥100
7b	>100	>100	>100	>100	>100	0,75
7c	40,35	17,56	90,87	48,38	>100	23,43
7d	24,10	100	>100	59,06	4,62	2,71
7e	>100	>100	>100	>100	>100	5,99
8a	4,26	1,27	7,23	23,8	4,57	4,7
8b	2,35	7,26	5,11	2,96	3,54	2,03
8c	5,83	17,37	22,49	9,70	8,24	29,81
8d	5,65	2,36	7,10	8,16	3,60	6,90
8e	3,05	2,62	2,54	3,14	4,18	3,64

* Koncentracija spojeva u mikromolovima potrebna da zaustavi rast 50 % stanica

* Concentration in micromoles that causes a 50 % reduction of the cell growth of tumor cells



Slika 12 – Molekula 9a izvađena iz njezine kristalne strukture i uvedena u ds-5'-d(CpGpCpG)-3' na položaj bis-interkalatora Flexi-Di. Isprekidane linije na strukturi A označuju moguće vodikove veze. Pogledi B i C pokazuju preklapanje parova baza s aromatskim sustavom 9a (zeleno).

Fig. 12 – Molecule of 9a taken from its crystal structure and inserted into ds-5'-d(CpGpCpG)-3' on position of the bis-intercalator Flexi-Di. Dotted lines on structure A mark possible hydrogen bonds. Views B and C show the overlapping of basepairs with the aromatic system of 9a (green).

Molekula je planarna, a amidino-grupa je “out of plane”, što je vidljivo iz kristalografskih podataka. Molekula je nešto veća od u literaturi opisanih (najduža os je 13,6 Å, dok je za etidijev bromid 9,8 Å). Za usporedbu je stoga promatran kompleks ranije opisanog interkalatora s dvije peridokarbolske jedinice, ranije opisan u literaturi.¹⁰

Metode ispitivanja vezivanja acikličkih i cikličkih spojeva na ct-DNA

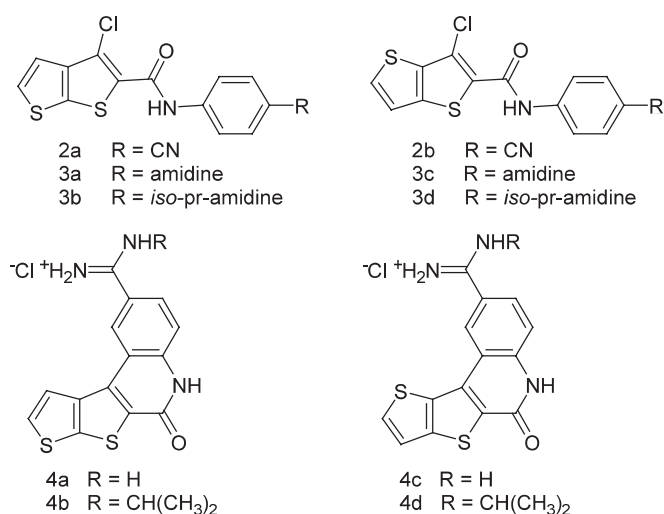
Najčešće metode ispitivanja učinkovitosti vezivanja molekule na DNA su UV/Vis, fluorescentne i ¹H NMR-ispitivanja.

Određivani su fluorescentni spektri i nađeno je da kod pH 6,2 amidinske soli cikličkih spojeva imaju 14–80 puta jaču emisiju od acikličkih anilida u koncentracijama manjim oko 100 puta od UV-koncentracija. Dodatkom polinukleotida došlo je do slabljenja emisije cikličkog spoja. Iz UV titracija zaključivali smo također na jako vezivanje cikličke molekule na polinukleotid (jaki hipokromni efekt), dok je aciklička molekula pokazivala male promjene što govori o njezinom slabom vezivanju na polinukleotid.

Anilidi s cijano-supstuentima bili su slabo topljivi i nepovoljni za ispitivanja. Anilidi s amidino grupom na anilinskom dijelu molekule bili su daleko jače aktivni, ali i vrlo neselektivni, od onih koji nose amidino-supstuent na benzotiofenskom dijelu molekule.

Kinoloni s amidinosupstuentima na kinolonskom dijelu molekule pokazali su dobru selektivnost osobito 6a i 6d, koji nisu toksični na normalne fibroblaste. Od cikličkih kinolona s amidino-supstuentom na benzotiofenskom dijelu molekule najaktivniji su 9c i 9d. Spojevi 6d i 9c djeluju kao interkalatori. Svi ostali ciklički i aciklički spojevi, koji su pokazali određenu antitumorsku aktivnost djeluju kao inhibitori topoizomeraza ili djeluju na neki drugi način. Tablice 7 i 8.

Novi cijano- i amidino-supstituirani derivati tieno[2,3-b]- i tieno[3,2-b]tiofenkarboksanilida i tieno[3',2':4,5]tieno- i tieno[3',2':4,5]tieno[2,3-c]kinolona prikazani su u shemi 15. priređeni su višestupnjevitom sintezom, fotokemijskom sintezom, ispitano je njihovo vezivanje na DNA i određeno antitumorsko djelovanje (slika 13).¹¹



Slika 13 – Novi cijano- i amidino-supstituirani derivati tieno[2,3-b]-, tieno[3,2-b]tiofenkarboksanilida i tieno[3',2':4,5]tieno- i tieno[2',3':4,5]tieno[2,3-c]kinolona

Fig. 13 – New cyano and amidino substituted derivatives of thieno[2,3-b]-, thieno[3,2-b] thiophene-carboxanilides and thieno[3',2':4,5]thieno- and thieno[2',3':4,5]thieno[2,3-c] quinolones

T a b l i c a 9 – Ispitivanje in vitro antitumorskog djelovanja djelovanja spojeva (2a-4d)

T a b l e 9 – In vitro growth inhibition of the of tumor cells and normal human fibroblasts (WI 38)

Spoj	Stanične linije, IC ₅₀ (μM)*					
	Hep-2	HeLa	MiaPaCa-2	SW 620	MCF-7	WI 38
2a	0,7±0,1	0,1±0,01	36±45	15,6±7,8	100	18,6±30
2b	0,7±0,01	0,2±0,001	100	76±20	100	?100
3a	3,8±0,8	2,2±0,08	1,6±0,2	1,6±0,1	3±0,1	3,4±1,5
3b	6,3±1,3	14,5±1	3,8±0,03	5,5±1,2	9,5±3,6	1,8±1,5
3c	2,7±1,3	1,8±0,001	1,9±0,2	1,8±0,1	1,9±0,2	1,8±0,5
3d	4,8±0,6	3,8±3,5	4,4±2	2,7±1,1	6,2±9,7	1,8±0,3
4a	20±3,5	40±14	34±1,9	100	11±1,5	3,6±2
4b	21±0,3	28±4	27,7±4	36±10	8,7±2,8	10±6,5
4c	21±1,4	37±9	30,5±0,4	?100	21±19	4,7±0,8
4d	11±5	14±5	12±2	18±0,8	9,7±6,5	6,4±5
Cis	2,4±0,3	2,9±0,6	5,4±1,6	4±1,8	12±6	19±20
Dox	0,04±0,01	0,04±0,01	0,02±0,01	0,02±0,02	0,04±0,01	0,1±0,01
Eto	N.T.	2,9±1	15,4±14	20±3,4	50±30	N.T.

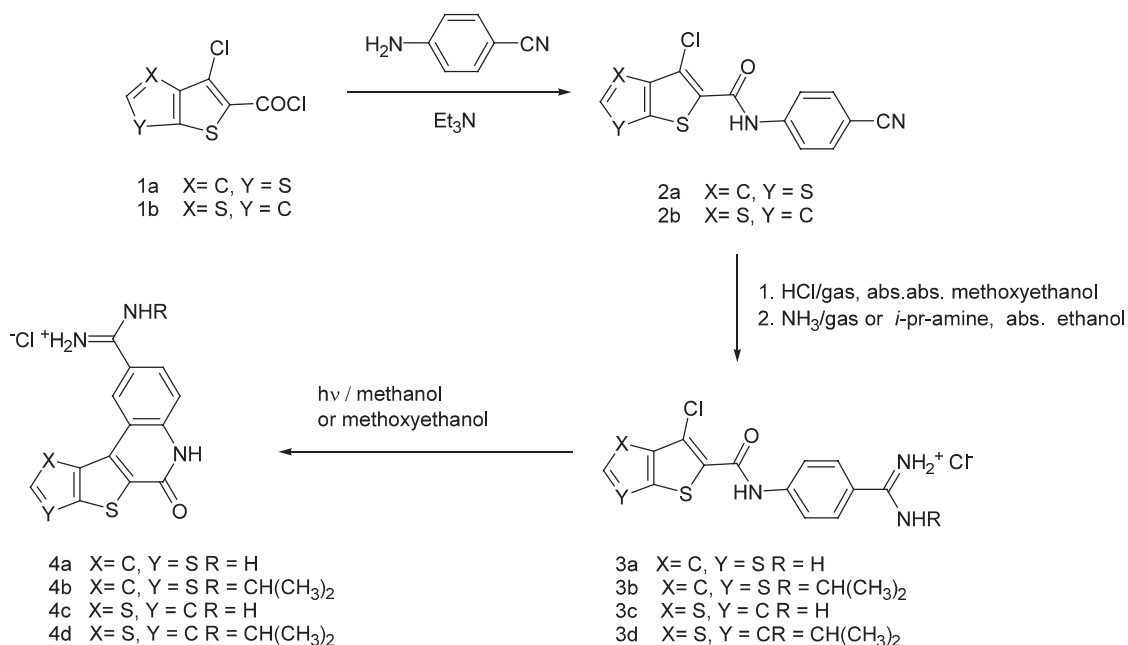
* Koncentracija spojeva u mikromolovima potrebna da zaustavi rast 50 % stanica

* Concentration in micromoles that causes a 50 % reduction of the cell growth of tumor cells

N.T. – not tested. Cis – cisplatin, Dox – doxorubicine, Eto – etoposide

Privedeni su višestupnjevitom sintezom, fotokemijom sintezom, ispitano njihovo vezivanje na DNA i određeno antitumorsko djelovanje (shema 17).

Svi privedeni spojevi pokazali su jako i različito antiproliferativno djelovanje. Aciklički anilidi pokazali su se začuđujuće aktivniji od prethodnih benzotieno-anilida, ali su pokazali i veću neselektivnost i toksičnost kao i poliheterociklički kinoloni, dok su dva cijano-spoja **2a** i **2b** bili vrlo selektivni na stanice HeLa i Hep-2, dok su na druge stanice raka nereaktivni. **2b** je osim toga potpuno netoksičan za zdrave stanice. Navedene stanične linije imaju istu genetičku pozadinu, kao i humani papiloma-virus (HPV) tip 18 DNA, koji je i uzročnik karcinoma. Stoga se ta molekula i dalje biološki ispituje u antitumorskoj terapiji HPV-uzrokovanih karcinoma. Slične rezultate objavili su Beneteau i sur. (cit. 14).



S h e m a 17 / S c h e m e 17

Zaključak

Iz gore iznesenog može se zaključiti da ciklički supstituirani benzotienokinoloni, za razliku od svojih acikličkih prekursora, pokazuju jako antitumorsko djelovanje *in vitro*. Iz ispitivanja njihovog vezivanja na DNA može se nadalje zaključiti da ti spojevi djeluju kao interkalatori na tumorske stanice. Priređeni su i njihovi analozi, tj. tieno-tienil-kinoloni s odgovarajućim supstituentima i amino odnosno amidino-protoniranim grupama kao farmakoforima iz njihovih acikličkih prekursora; cijano i amidino-anilida. Nađeno je u svim grupama priređenih i ispitivanih heterocikličkih kinolona, da, kada se farmakoforna grupa u obliku kationske soli nalazi na kinolonskoj strani molekule, ima bolje antiproliferativno djelovanje od onih spojeva kada se farmakoforna grupa nalazi na benzotiofenskom odnosno tienotiofenskom dijelu molekule. Zamjena benzotiofenske jezgre u kinolonima s tienotiofenskom jezgrom, nije uzrokovala bitne promjene u antitumorskoj aktivnosti.

Kod svih cijano-supstituiranih spojeva, bilo anilida bilo kinolona, unatoč njihovoj slabo topljivosti, uočena je izrazita i vrlo selektivna antitumorska aktivnost na HeLa i Hep-2, stanice humanog karcinoma.

Iz svih dosadašnjih istraživanja može se zaključiti, da ova grupa spojeva pokazuje izrazitu antitumorsku aktivnost *in vitro*. Ukoliko bi se postiglo, da neki od ispitivanih spojeva dobro kristaliziraju, moglo bi se provesti molekulsko modeliranje i tako doći do strukture s najboljom antitumorskom aktivnošću. Daljnja ispitivanja su u tijeku.

Literatura References

1. a) M. Terashima, K. Seki, *Heterocycles* **8**, (1977) 421-426, b) Y. Kanaoka, K. San-nohe, Y. Hatanaka, K. Itoh, M. Machida, M. Terashima, *Heterocycles* **6** (1972), 29-45.
2. G. Karminski-Zamola, M. Bajić, *Synthetic Commun* **19** (1989) 1325-1333.
3. Fišer-Jakić, G. Karminski-Zamola, *Croat. Chem. Acta* **59** (1986) 891-894.
4. G. Karminski-Zamola, D. Pavličić, M. Bajić, N. Blažević, *Heterocycles* **32** (1991) 2323-2327.
5. J. Dogan, G. Karminski-Zamola, D. W. Boykin, *Heterocycles* **41** (1995) 1659-1666.
6. M. Malešević, G. Karminski-Zamola, M. Bajić, D. W. Boykin, *Heterocycles* **41** (1995) 2691-2699.
7. a) J. Dogan Koružnjak, N. Slade, M. Grdiša, B. Zamola, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *Journal of Medicinal Chem.* **45** (2002), b) Hrvatski patent br. P20000118A (2001) "Sinteza novih biološki aktivnih hdeterocikla iz reda benzotieno-kinolona i tieno-tienil-kinolona".
8. J. Dogan-Koružnjak, N. Slade, B. Zamola, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *Chemical & Pharmaceutical Bulliten* **55** (2002) 656-660.
9. I. Jarak, M. Kralj, L. Šuman, G. Pavlović, J. Dogan, I. Piantanida, M. Žinić, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J. Med.Chem.* **48** (2005) 2346-2360.
10. T. Mossman, *J. Immunol. Methods* **65** (1983) 55-63.
11. I. Jarak, M. Kralj, I. Piantanida, L. Šuman, M. Žinić, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006) 2859-2868.

SUMMARY

Heterocyclic Aromatic Compounds and Their Antitumor Activity

G. Karminski-Zamola^a and K. Starčević^b

This review describes the longtime scientific work of the first author on the synthesis of condensed polycyclic heteroaromatic compounds, prepared in multistep synthesis and photochemical synthesis, particularly compounds with thiophene and furan nuclei condensed with benzene or other heterocyclic nuclei like quinolone. The terminal phase of the synthesis include photochemical cyclization of the corresponding chain heterocyclic precursors.

Studied was the photochemical dehydrocyclization reaction of substituted ethylenic systems, as well, as the photochemical dehydrohalogenation reaction of heteroaromatic anilides and the combination of these two photochemical reactions on one substrate. These reactions gave the polycondensed heteroaromatic systems, planar in their structure. This fact was used later in introducing pharmacophoric groups, mostly cationic and dicationic salts of corresponding amines and amidines, which could interact with the DNA molecule as intercalators. Most of the prepared compounds exhibited pronounced antitumor activity.

^a Department of Organic Chemistry,
Faculty of Chemical Engineering and Technology,
University of Zagreb, Marulićev trg 20,
10000 Zagreb, Croatia

^b GSK Research Centre Zagreb,
Prilaz baruna Filipovića 29,
10000 Zagreb, Croatia

Received March 27, 2007

Accepted April 10, 2007