

**Hrvoje Boić**

*Sinteza i karakterizacija bis-urea primakina s  
aminoalkoholima*

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmaceutska kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Kristine Pavić.

Zahvaljujem dr. sc. Kristini Pavić na vođenju diplomskog rada, pomoći u eksperimentalnom dijelu rada, strpljenju i znanju koje mi je prenijela. Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Zrinki Rajić Džolić i prof. dr. sc. Branki Zorc na savjetima i pomoći u izradi rada, kao i doc. dr. sc. Ivani Perković na savjetima i društvu u laboratoriju. Hvala i tehničkoj suradnici Ljiljani Jurkin. Iskreno hvala i mojim „spodobama“: Juri Borasu, Goranu Poji i Zvonimiru Mlinariću s kojima su sati u laboratoriju letjeli i bili provedeni uz osmijeh. Hvala mojim prijateljima i mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci. Veliko hvala mojoj djevojci Ledi na ljubavi, razumijevanju, podršci i strpljenju.

Ovaj rad posvećujem pokojnom prijatelju Luki Deviću kao vječni znamen našeg prijateljstva.

Rad je financiran sredstvima projekta *Dizajniranje, sinteza i evaluacija derivata primakina, vorinostata i sorafeniba kao potencijalnih citostatika* (IP-09-2014-1501) Hrvatske zaklade za znanost.



## KRATICE

ADH	alkohol dehidrogenaza
AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije
ALDH	aldehid dehidrogenaza
BtH	benzotriazol
BtcCl	klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline
Caco-2	humana stanična linija adenokarcinoma debelog crijeva
Csp3	udio $sp^3$ hibridiziranih atoma ugljika u ukupnom broju atoma ugljika u strukturi
CYP	citokrom P450
DHFR	dihidrofolat reduktaza
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (eng. <i>Food and Drug Administration</i> )
GC/MS	povezana tehnika plinske kromatografije i masene spektroskopije
GI	gastrointestinalni sustav
H540	humana stanična linija karcinoma pluća ne-malih stanica
HT-29	humana stanična linija adenokarcinoma debelog crijeva
$IC_{50}$	koncentracija koja inhibira rast 50% stanica
INN	međunarodno nezaštićeno ime
IR	infracrveno elektromagnetsko zračenje
KMB	krvno-moždana barijera
$\log K_p$	koeficijent propusnosti otopljene tvari kroz <i>stratum corneum</i>
$\log P$	koeficijent razdjeljenja
MAO	monoaminoooksidaza
MCF-7	humana stanična linija adenokarcinoma dojke

MR	molarna refraktivnost
MS	masena spektrometrija
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
NSAID	nesteroidni protuupalni lijekovi
PfATP 6	ATP-aza 6 iz <i>P. falciparum</i>
RNK	ribonukleinska kiselina
SW 620	humana stanična linija adenokarcinoma debelog crijeva
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TEA	triethylamin
TGA	Australska agencija za lijekove (eng. <i>Therapeutic Goods Administration</i> )
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TPSA	topološka polarna površina molekule
$t_f$	temperatura taljenja
UV	ultraljubičasto elektromagnetsko zračenje

# Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1.	Malaria.....	2
1.1.1.	Liječenje malarije .....	4
1.1.2.	Antimalarici .....	4
1.1.2.1.	4-Supstituirani kinolini .....	4
1.1.2.2.	8-Aminokinolini.....	5
1.1.2.3.	Seskviterpenski laktoni (artemizinini) .....	6
1.1.2.4.	Bigvanidini i atovakvon.....	6
1.1.2.5.	Diaminopiridini.....	7
1.1.2.6.	Ostali antimalarici.....	7
1.2.	Primakin.....	8
1.2.1.	Mehanizam djelovanja.....	9
1.2.2.	Nuspojave primakina .....	9
1.2.3.	Farmakokinetika .....	10
1.3.	Primakin kao model za razvoj i optimiranje strukture.....	12
1.3.1.	Optimiranje kinolinskog prstena.....	13
1.3.2.	Modifikacija bočnog aminoalkilnog lanca .....	14
1.4.	Ostali biološki učinci primakina i njegovih derivata .....	15
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	19
3.	MATERIJALI I METODE.....	22
3.1.	Sinteza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline <b>1</b> (BtcCl) .....	24
3.2.	Sinteza benzotriazolida primakina <b>2</b> ( <i>N</i> -{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,2,3]triazol-1-karboksamid).....	24

3.3. Sinteza semikarbazida primakina <b>3</b> (3-amino-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}urea).....	24
3.4. Sinteza benzotriazolida semikarbazida primakina <b>4</b> ( <i>N</i> -[({4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}karbamoil)amino]-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,2,3]triazol-1-karboksamid).....	25
3.5. Sinteza <i>bis</i> -urea primakina <b>5</b> .....	25
3.5.1. Sinteza <i>N</i> <sup>1</sup> -((1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-3-hidroksiciklopentil)- <i>N</i> <sup>2</sup> -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazin-1,2-dikarboksamida ( <b>5a</b> ).....	25
3.5.2. Sinteza <i>N</i> <sup>1</sup> -(4-hidroksifenetil)- <i>N</i> <sup>2</sup> -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazin-1,2-dikarboksamida ( <b>5b</b> ).....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	27
5. ZAKLJUČCI.....	37
6. LITERATURA .....	39
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	49
8. PRILOZI .....	52
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	

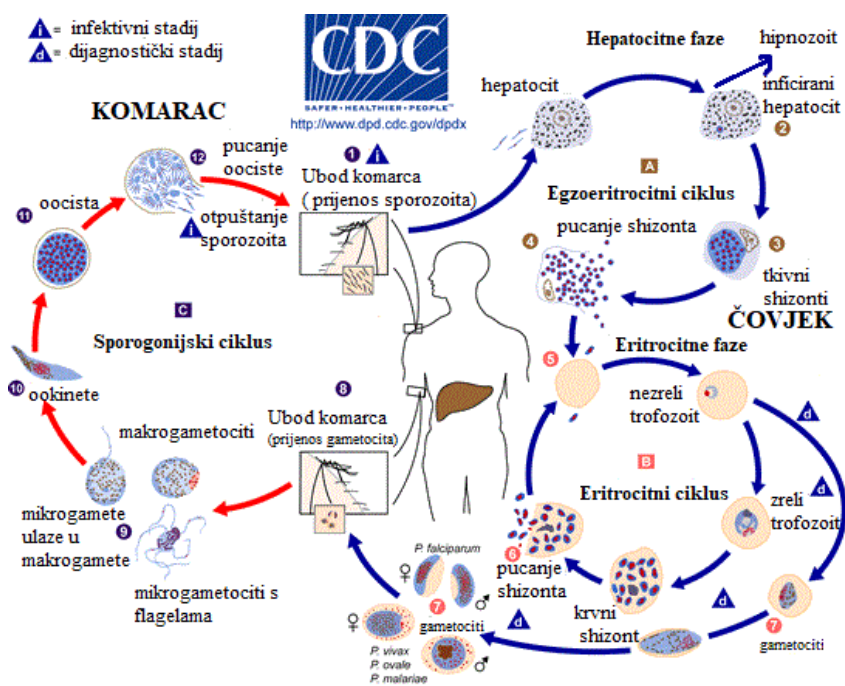
## **1. UVOD**



## 1.1. Malarija

Malarija je infektivna bolest čiji je uzročnik parazit iz roda *Plasmodium*. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) u 2016. g. bilo je 216 milijuna novooboljelih, a umrlo je 445 000 (<http://www.who.int/malaria/en/>). Poznato je pet vrsta iz roda *Plasmodium* za koje se dokazano može ustvrditi da su uzročnici malarije u ljudi, a to su: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* i *P. knowlesi* (Daneshvar i sur., 2009).

Vektor, odnosno prijenosnik bolesti jest ženka komarca iz roda *Anopheles*. Životni ciklus parazita ovisan o vektoru i domaćinu čovjeku prikazan je na Slici 1. Prijenos započinje kad se ženka komarca hrani krvlju zaražene osobe koja sadrži gametocite parazita. U komarcu dolazi do spajanja ženskog i muškog gametocita u zigotu koja sazrijeva u oocistu iz koje se otpuštaju sporozoiti. Sporozoiti migriraju u žlijezde slinovnice komarca i mogu zaraziti drugog čovjeka tijekom idućeg uboda komarca (Golan i sur., 2011). Sporozoiti nakon uboda brzo prodiru u hepatocite, gdje se zatim paraziti razmnožavaju jedan do dva tjedna (hepatocitna faza) i sazrijevaju u shizonte. Rupturom hepatocita oslobađaju se tisuće merozoita koji potom napadaju eritrocite. Kod vrsta *P. vivax* i *P. ovale* sporozoiti mogu prijeći u hipnozoite (latentni ili dormantni oblik) koji se u domaćinu mogu zadržati više mjeseci ili godina bez izazivanja simptoma. U eritrocitima paraziti najprije poprimaju oblik prstena (trofozoiti), a zatim rastom sazrijevaju u krvne shizonte. Rupturom eritrocita oslobađaju se merozoiti koji potom napadaju nove eritrocite. Neki od parazita u eritrocitima prelaze u spolne gametocite kojima se zaraze komarci sišući krv (Vrhovac i sur., 2008).



**Slika 1.** Životni ciklus parazita iz roda *Plasmodium* [8]

Iako je glavni put širenja malarije preko komaraca roda *Anopheles*, moguće je oboljeti od malarije posredno, npr. preko transfuzije zaražene krvi, dijeljenjem igli za zloupotrebu narkotika ili intrauterinim prijenosom s majke na nerođeno dijete (Nadjm i sur., 2012; <https://www.mayoclinic.org>).

Prvi simptomi malarije javljaju se 8–25 dana nakon infekcije, a nalikuju simptomima gripe, što značajno otežava pravovremenu dijagnostiku. Uobičajeni simptomi uključuju glavobolju, povraćanje, hemolitičku anemiju, žuticu, povišenu tjelesnu temperaturu, bol u zglobovima, tresavicu te hemoglobin u urinu (<https://www.mayoclinic.org>; Beare i sur., 2006).

Teže oblike malarije uzrokuje *P. falciparum*. Simptomi se javljaju nešto kasnije te su moguće veće komplikacije poput hipoglikemije, povećanja jetre i slezene te moguće rupture slezene, zatajenja bubrega, cirkulacijskog šoka, koagulopatije, encefalopatije, nistagmusa i problema s disanjem zbog plućnog edema, a ukoliko parazit prijeđe krvno-moždanu barijeru (KMB) oboljeli pada u komu (<https://www.mayoclinic.org>; Bartoloni i Zammarchi, 2012).

### 1.1.1. Liječenje malarije

Najpoželjnija je prevencija malarije. Smjernice i upute za prevenciju od strane europskih, britanskih i američkih agencija za kontrolu i prevenciju bolesti su uglavnom ujednačene – preporučaju izbjegavanje putovanja u zemlje u kojima je zabilježena malarija ili nošenje odjeće dugih rukava, uporabu repelenata i mreža za krevete impregniranih insekticidima te izbjegavanje izlaska na otvoreno noću s obzirom na noćnu aktivnost komaraca iz roda *Anopheles*. Također, potiče se na dezinsekciju s ciljem smanjenja populacije komaraca. Osim toga, prije odlaska u zemlje u kojima žive malarični komarci preporučaju se antimalarici u svrhu profilakse (<https://wwwnc.cdc.gov>; <https://www.nhs.uk>; <https://ecdc.europa.eu>).

### 1.1.2. Antimalarici

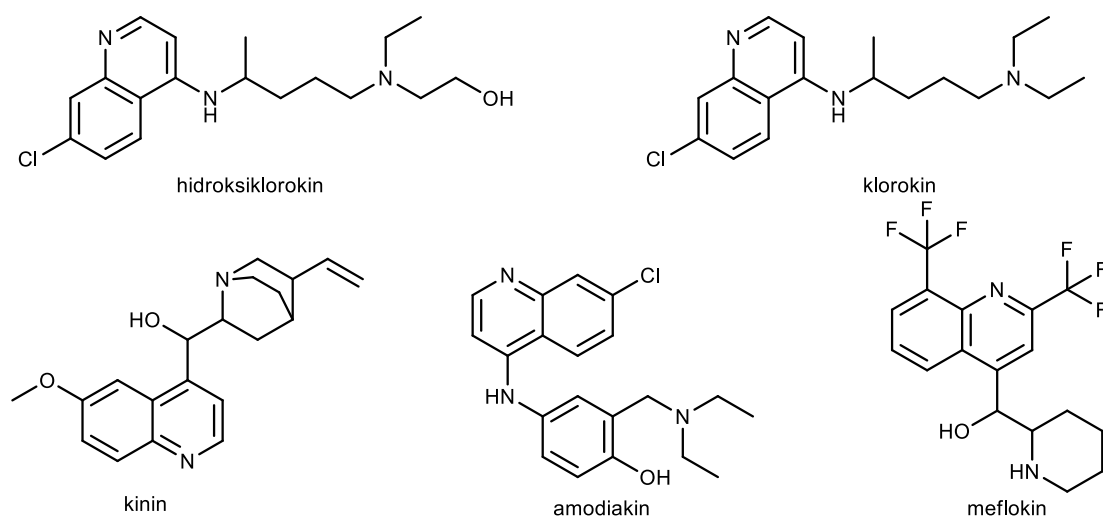
Antimalarici se uobičajeno preporučaju kao kombinacija dva ili više antimalarika s obzirom na brz razvoj rezistencije. Kemijski se klasificiraju kao:

- 4-supstituirani kinolini: kinin, hidroksiklorokin, klorokin, amodiakin, meflokin
- 8-aminokinolini: primakin, tafenokin, bulakin
- seskviterpenski laktoni: artemizinin, artemeter, artesunat
- bigvanidi: progvanil (u kombinaciji s atovakvomom)
- diaminopiridini: pirimetamin (u kombinaciji sa sulfadoksinom)
- ostali: halofantrin, lumefantrin, pironaridin, doksiciklin (antibiotik sa značajnom antimalarijskom aktivnosti) (Makoah i Pradel, 2013).

#### 1.1.2.1. 4-Supstituirani kinolini

Pretpostavljen je zajednički mehanizam djelovanja za cijelu kemijsku skupinu, a najdetaljnije je dokumentiran za klorokin. Nakon ulaska u eritrocit klorokin prodire u parazita i odlazi u njegove probavne vakuole u kojima je pH~4,7. Budući da je klorokin slaba baza, pri kiselom pH se protonira i ostaje zarobljen u probavnim vakuolama (Goldberg, 2013). Plazmodij u eritrocitima koristi proteinski dio hemoglobina kao izvor hrane. Hem je za plazmodij toksičan, zbog čega plazmodij ima razvijen mehanizam polimerizacije hema u

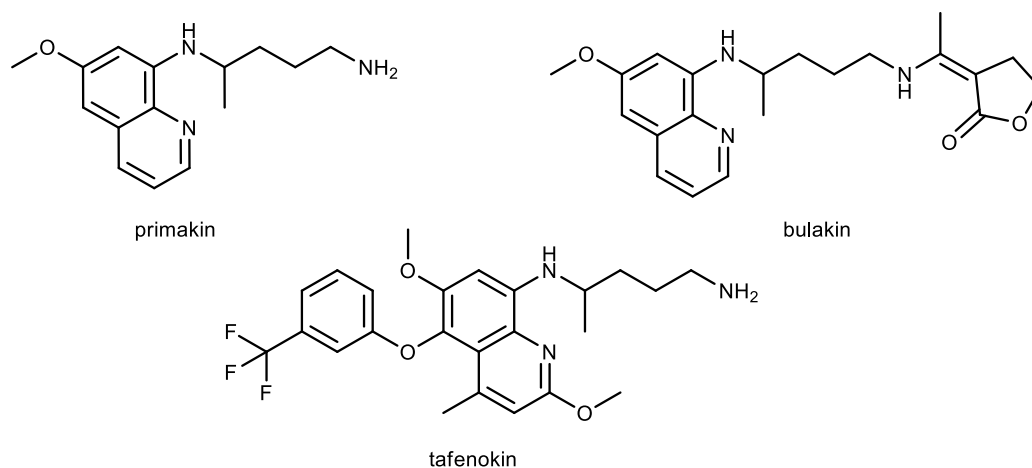
hemozoin. Klorokin onemogućava taj mehanizam detoksikacije, što dovodi do smrti parazita (Hempelmann, 2013). Strukture antimalarika ove skupine su prikazane na Slici 2.



**Slika 2.** 4-Supstituirani kinolini

### 1.1.2.2. 8-Aminokinolini

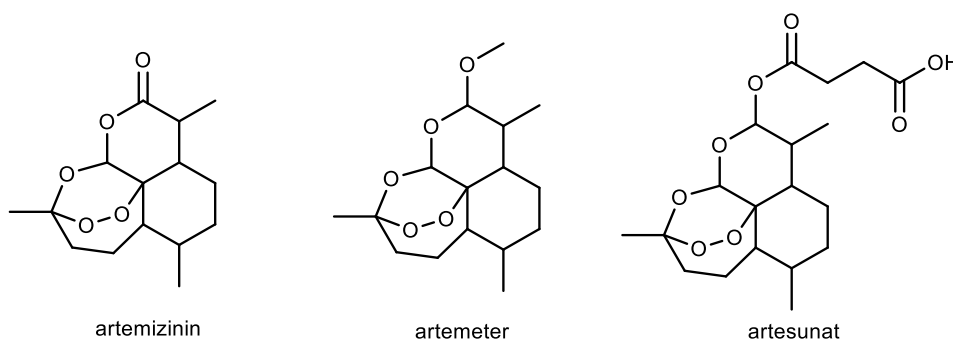
Mehanizam djelovanja svih pripadnika ove skupine je sličan ili istovjetan primakinu o čijem mehanizmu se govori naknadno. Slika 3 prikazuje strukture 8-aminokinolina.



**Slika 3.** 8-Aminokinolini

### 1.1.2.3. Seskviterpenski laktoni (artemizinini)

Mehanizam djelovanja artemizinina nije u potpunosti razjašnjen, no pretpostavlja se da ključnu ulogu imaju  $\text{Fe}^{2+}$  ioni koji uzrokuju cijepanje endoperoksida artemizinina pri čemu nastaju slobodni radikali i reaktivni kisikovi spojevi koji uzrokuju smrt stanice parazita. Zbog toga je artemizinin selektivno toksičan samo za one stanice gdje postoje slobodni  $\text{Fe}^{2+}$  ioni, odnosno u inficiranim eritrocitima u kojima je došlo do razgradnje hemoglobina, oslobađanja hema, te posljedično povećanja koncentracije  $\text{Fe}^{2+}$  iona (Cravo i sur., 2015). Istraživan je i utjecaj derivata artemizinina na ATP-azu 6 iz *P. falciparum* (PfATP6), enzima koji regulira koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  u plazmodiju. Njegovom inhibicijom dolazi do akumulacije unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$  zbog promjene elektrodnog potencijala membrane, što za posljedicu dovodi do smrti stanice (Guo, 2016). Slika 4 prikazuje artemizinine odobrene za liječenje malarije.



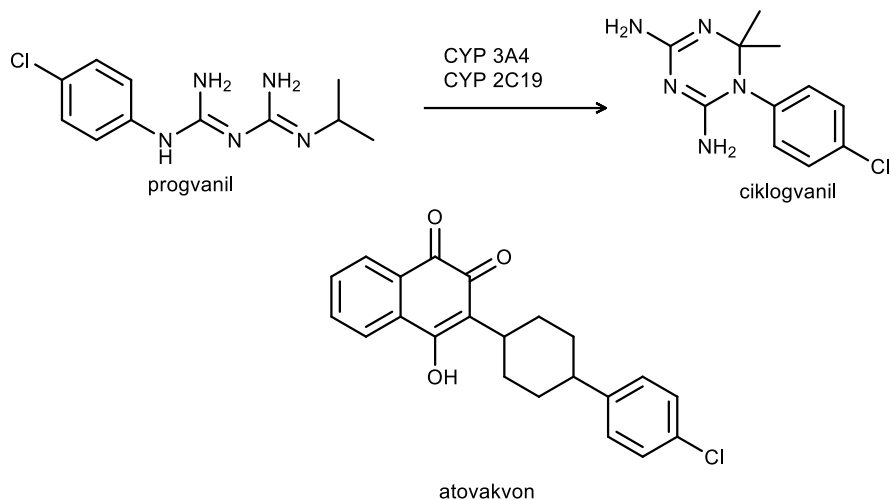
Slika 4. Seskviterpenski laktoni

### 1.1.2.4. Bigvanidini i atovakvon

Progvanil se primjenjuje u kombinaciji s atovakvom zbog sinergističkog učinka. Progvanil je prolijek koji metaboličkim reakcijama kataliziranim enzimima citokroma P450 (CYP) 3A4 i 2C19 prelazi u aktivni oblik ciklogvanil. Ciklogvanil djeluje kao inhibitor dihidrofolat reduktaze (DHFR). Inhibicijom DHFR spriječeno je recikliranje tetrahidrofolata iz dihidrofolata u parazitu, što posljedično izaziva poremećaje u sintezi deoksiribonukleinske kiseline (DNK), ribonukleinskih kiselina (RNK), metilaciju DNK te sintezu aminokiselina (Srivastava i Vaidya, 1999).

Atovakvon selektivno inhibira citokrom  $bc_1$  plazmodija u lancu prijenosa elektrona, čime dolazi do promjena u membranskom potencijalu membrane mitohondrija. Smatra se

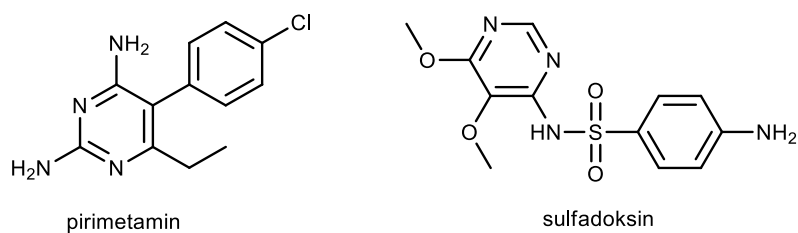
da prekidom lanca dolazi do posredne inhibicije dihidroorotat dehidrogenaze, što dovodi do smanjenja sinteze pirimidina, a posljedično i DNK (Srivastava i Vaidya, 1999). Slika 5 prikazuje progvanil, ciklogvanil i atovakvon.



**Slika 5.** Bigvanidi i atovakvon

#### 1.1.2.5. Diaminopiridini

Pirimetamin je inhibitor DHFR, a primjenjuje se u kombinaciji sa sulfadoksinom koji je kompetitivni inhibitor dihidropteroat sintaze, čime se sprječava ugradnja *p*-aminobenzojeve kiseline u dihidropteroat difosfat i sinteza dihidrofolne kiseline (Yaro, 2009). Slika 6 prikazuje pirimetamin i sulfadoksin.



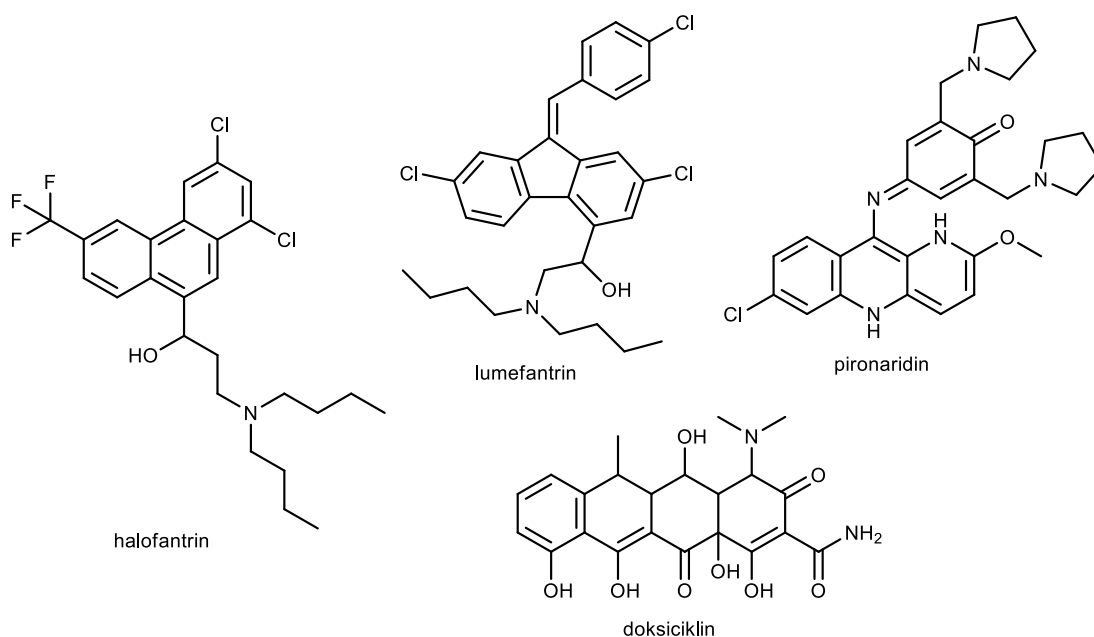
**Slika 6.** Pirimetamin i sulfadoksin

#### 1.1.2.6. Ostali antimalarici

Mehanizam djelovanja lumefantrina i halofantrina je sličan mehanizmu 4-supstituiranih kinolina (Wesche i sur., 2000).

Pironaridin stvara spiralne otvore u trofozoitima narušavajući osmotski tlak (Wu i sur., 1988). Drugo istraživanje povezuje pironaridin s inhibicijom DNK topoizomeraze II (Auparakkitanon i Wilairat, 2000), a treće je pokazalo da ima sličan učinak kao i klorokin uz dodatnu inhibiciju razgradnje hema ovisnu o glutationu (Auparakkitanon i sur., 2006).

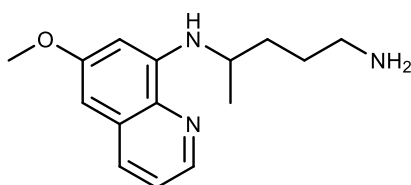
Doksiciklin je tetraciklinski antibiotik koji ima i antimalarijsko djelovanje. Inhibira ekspresiju apikoplastnih gena u plazmodiju, te uzrokuje greške u diobi stanice. Iz tog razloga koristi se samo u profilaksi, a u liječenju isključivo u kombinaciji s drugim antimalaricima (Dahl i sur., 2006). Slika 7 prikazuje ostale antimalarike.



**Slika 7.** Ostali antimalarici

## 1.2. Primakin

Primakin (Slika 8) je međunarodno nezaštićeno ime (eng. *International Nonproprietary Name*, INN) *N*-(6-metoksikinolin-8-il)pentan-1,4-diamina.



**Slika 8.** Primakin

### 1.2.1. Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja primakina nije u potpunosti razjašnjen. Djeluje kao tkivni shizontocid na sve vrste roda *Plasmodium* koji uzrokuju malariju kod čovjeka, ali posebno osjetljivi na njegovo djelovanje su metabolički inaktivni oblici plazmodija (npr. zreli gametociti *P. falciparum* i hipnozoiti *P. vivax* i *P. ovale*). Međutim, njegovo djelovanje prema aseksualnim eritrocitnim oblicima plazmodija vrlo je slabo, te se kombinira s krvnim shizontocidima poput klorokina ili artemizina (Baird i Hoffman, 2004).

Rezultati istraživanja na različitim organizmima daju naznake mehanizma djelovanja. Strukturna promatranja sugeriraju da je mjesto njegova djelovanja membrana, osobito unutarnja mitohondrijska membrana. Primakinom tretirani tkivni shizonti i gametociti pokazuju abnormalnosti membrana, akumulacija radioaktivno obilježenog primakina u mitohondrijima vremenski se podudara s bubrenjem mitohondrija tkivnih stadija vrste *P. fallax*, dok u kvascu primakin sprječava razvojne događaje koji zahtijevaju funkcionalne mitohondrije (Brueckner i sur., 2001).

Funkcija mitohondrija kod plazmodija nije potpuno razjašnjena, ali poznato je da su funkcionalni mitohondriji i transport elektrona nužni za preživljenje parazita. Transport elektrona važan je za aktivnost dihidroorotat dehidrogenaze, ključnog enzima za sintezu pirimidina i generiranje potencijala na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani. Mitohondriji su važni i za metabolizam aminokiselina, lipida i hema, homeostazu kalcijevih iona itd. Međutim, nije poznato narušavaju li 8-aminokinolini koji od tih procesa kod plazmodija (Brueckner i sur., 2001).

Drugi mogući mehanizam antimalarijskog djelovanja primakina je stvaranje visokoreaktivnih metabolita koji povećavaju oksidativni potencijal unutar stanice. Osim za antimalarijsko djelovanje, biotransformacija primakina odgovorna je i za njegovu toksičnost (Lalève i sur., 2016).

### 1.2.2. Nuspojave primakina

U usporedbi s drugim antimalaricima, primakin se dobro podnosi i siguran je za primjenu kod osoba s normalnom aktivnošću glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD). Gastrointestinalne nuspojave javljaju se ukoliko se uzima na prazan želudac, a vjerojatnost



njihova pojavljivanja raste s porastom primijenjene doze. Ipak, lijek se uglavnom dobro tolerira i pri najvećim dozama ukoliko se uzima uz hranu (Baird i Hoffman, 2004).

G6PD prvi je enzim u putu pentoza fosfata i uključen je u produkciju nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH), koji je neophodan za opskrbu stanica reduciranim glutationom. Također, NADPH je esencijalan za funkciju katalaze (Recht i sur., 2014) i zato je vrlo bitan za zaštitu stanica od oksidativnog stresa. Kod osoba s deficijencijom G6PD oksidativni stres najjače je izražen u eritrocitima jer nemaju mitohondrije, a time ni alternativni izvor NADPH (Berg i sur., 2013). Kod osoba s urođenom deficijencijom G6PD primakin izaziva akutnu intravaskularnu hemolizu, koja je često praćena anemijom, hemoglobinurijom i u nekim slučajevima bubrežnim zatajenjem (Recht i sur., 2014). Deficijencija G6PD posebno je česta među ljudima u endemskim regijama s visokom stopom malarije, npr. u subsaharskoj Africi (učestalost 5–10%). Pretpostavlja se da je povećana stopa deficijencije na područjima s malarijom evolutivna prilagodba koja djeluje zaštitno, a ova teza je potkrijepljena činjenicom da je primijećena niža stopa oboljenja od malarije osoba sa deficijencijom G6PD, kao i niža stopa pacijenata s težim simptomima malarije (Manganelli i sur., 2013).

Primakin također povećava razinu methemoglobina. Međutim, vjerojatnost za klinički značajnu methemoglobinemiju raste ukoliko pacijent ima urođenu deficijenciju methemoglobin reductaze (Baird i Hoffman, 2004).

### **1.2.3. Farmakokinetika**

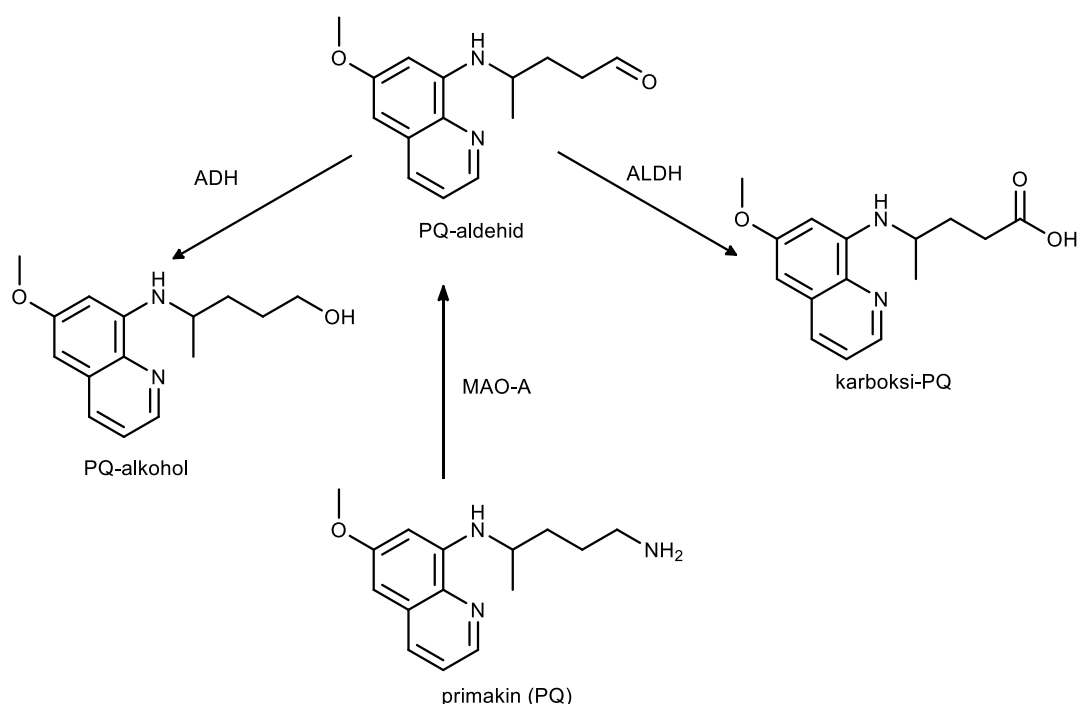
Primakin se brzo apsorbira iz gastrointestinalnog sustava i koncentrira u jetri, mozgu, srcu, plućima i skeletnim mišićima. Maksimalnu koncentraciju u krvi doseže 1–3 h nakon primjene, brzo se metabolizira u jetri i izlučuje urinom, s vremenom polueliminacije 4–9 h (Vale i sur., 2009).

Iako istraživani desetljećima, saznanja o metabolizmu primakina tek su u posljednjih nekoliko godina značajnije proširena. Najnovija otkrića ukazuju da je primakin prolijek koji se putem enzima CYP 2D6 pretvara u jedan ili više oksidiranih metabolita odgovornih za djelovanje na hipnozoite (Marcsisin i sur., 2016).

Pybus i suradnici su 2013. g. dokazali da se metabolizam primakina uglavnom odvija preko dva metabolička puta: djelovanjem CYP 2D6 nastaju fenolni metaboliti, a djelovanjem

monoaminooksidaze-A (MAO-A), aldehid dehidrogenaze (ALDH) i alkohol dehidrogenaze (ADH) nastaju alkoholi, aldehidi i konjugati druge faze. U *in vitro* istraživanjima CYP 2D6, MAO-A, CYP 2C19 i CYP 3A4 (poredani prema katalitičkoj učinkovitosti) pokazali su sposobnost metaboliziranja primakina (Pybus i sur., 2013).

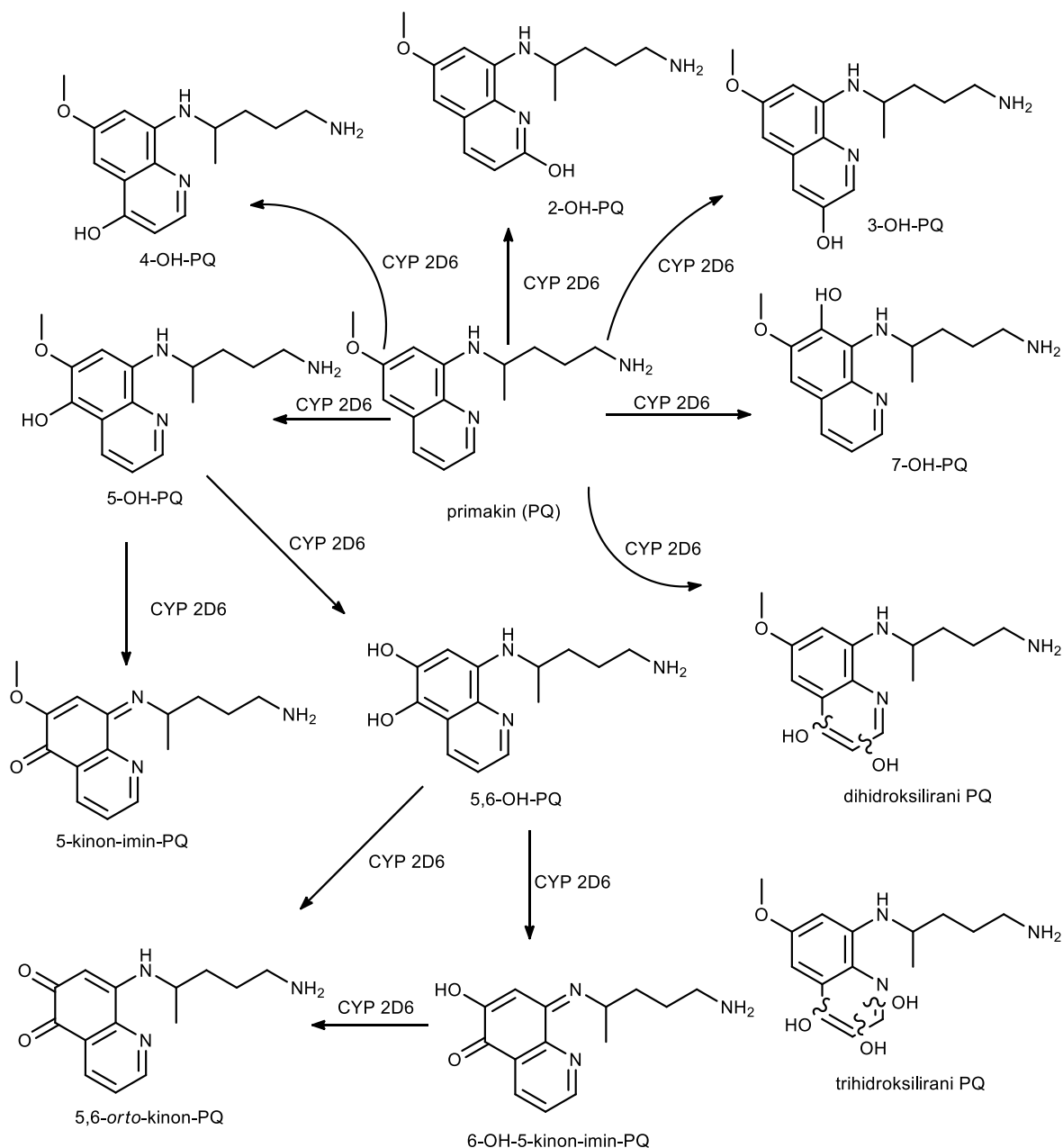
Karboksiprimakin je inaktivni, glavni metabolit primakina u tijelu koji se ne akumulira, već izlučuje kao konjugat, npr. glukuronid. MAO-A put (Shema 1) najvjerojatnije je odgovoran za generiranje aldehida primakina, neposrednog prethodnika karboksiprimakina (Pybus i sur., 2013).



**Shema 1.** Reakcije katalizirane enzimima MAO-A te ADH i ALDH

Fenolni metaboliti su primarno produkti CYP 2D6 (Marcsisin i sur., 2016). Iako je CYP 2D6 zastupljen u relativno maloj koncentraciji u jetri, njegova katalitička učinkovitost je najveća, što ukazuje na njegov veliki značaj u metabolizmu primakina u organizmu (Auparakkitanon i sur., 2000; Auparakkitanon i sur., 2006). Dugo vremena se smatralo da fenolni metaboliti primakina, pogotovo 5-hidroksiprimakin, imaju ulogu u hemolitičkoj toksičnosti primakina (Vale i sur., 2009). Hidroksilacija primakina posredovana enzimom CYP 2D6 generira nestabilne metabolite koji ulaze u redoks ciklus. U redoks ciklusu 5-hidroksiprimakina izmjenjuju se reducirani hidroksi oblik i oksidirani 5-kinon-imin, pri čemu se generiraju vodikov peroksid i reaktivne kisikove vrste koji uzrokuju oksidativni stres. 5-

Hidroksiprimakin i odgovarajući kinon-imin (Shema 2) vrlo su nestabilni metaboliti te brzo reagiraju s vodom dajući stabilne 5,6-*orto*-kinone (Marcsisin i sur., 2016).



**Shema 2.** Metabolički put primakina kataliziran enzimom CYP 2D6

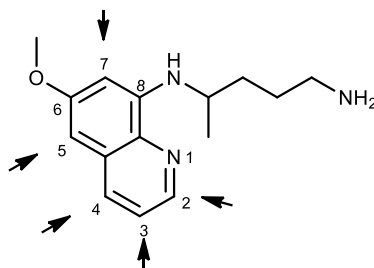
### 1.3. Primakin kao model za razvoj i optimiranje strukture

Primakin je jedini antimalarik koji djeluje na gametocite svih vrsta plazmodija, uključujući i sojeve *P. falciparum* rezistentne na klorokin te latentne oblike u jetri, hipnozoite *P. ovale* i *P. vivax*, odgovorne za recidivirajuću malariju. Ipak, ima i negativne strane,

ponajprije hematološku toksičnost. Drugi ograničavajući faktor je njegovo kratko poluvrijeme života u organizmu zbog brze inaktivacije u karboksiprimakin, što zahtijeva učestalo doziranje i smanjuje suradljivost pacijenta (Davanço i sur., 2014). Stoga se pristupa razvoju i optimiranju strukture kako bi se povećala metabolička stabilnost i produljio učinak, smanjila toksičnost i poboljšao profil nuspojava te poboljšali antimalarijski i ostali biološki učinci o kojima će dalje biti govora u ovome radu. Promjene u strukturi se mogu raditi na kinolinskom prstenu i bočnom aminoalkilnom lancu, posebice na terminalnoj amino skupini.

### 1.3.1. Optimiranje kinolinskog prstena

Jedna od strategija povećanja učinkovitosti i smanjenja toksičnosti primakina je uvođenje supstituenata na slobodne položaje kinolinskog prstena (2, 3, 4, 5 i 7) (Slika 9).



**Slika 9.** Položaji na kinolinskom prstenu primakina za modifikaciju

Istraživanja su pokazala kako su za poboljšanje antimalarijskog djelovanja najpogodnija mjesta supstitucije kinolinskog prstena položaji 2 i 4 (npr. metil ili etil u položajima 2 i 4, *tert*-butilna skupina u položaju 2). Osim toga, aktivni derivati primakina dobiveni su supstitucijom u položaju 5 (pentoksi/alkoksi/fluor) te supstitucijom fenoksi skupinom u položajima 3 i 4 kinolinskog prstena. Mnogi od tih derivata imali su gametocidnu i shizontocidnu aktivnost usporedivu s primakinom ili čak veću (Vale i sur., 2009).

Uvođenje halogenih, manjih alkilnih i halogeniranih alkilnih, ariloksi i halogeniranih ariloksi supstituenata na položaje 2, 3, 4 i 5 u pravilu je dovodilo do smanjenja toksičnosti na laboratorijskim životinjama te do istovjetne ili, češće, smanjene antimalarijske aktivnosti. Uvođenje alkoksi skupine na položaj 5 nije dovodilo do značajne promjene u aktivnosti, dok je uvođenjem metilne skupine na položaj 4 rasla aktivnost 5-alkoksi derivata (Chen i sur., 1987). Ariloksi supstituenti na položaju 5 4-metilprimakina ne samo da su bili učinkovitiji u radikalnom kurativnom djelovanju od samog primakina, već su imali i vrlo jaku supresivnu aktivnost (LaMontagne i sur., 1982). Monosupstituirani derivati s fenoksi skupinom na

položaju 5 bili su relativno aktivni, a neki i manje toksični od primakina. Uvođenjem metilne skupine na poziciju 3 ili 4 nekih 5-fenoksiprimakina značajno se povećala shizontocidna aktivnost (Nodiff i sur., 1982).

2-*Tert*-butilprimakin ima djelovanje *in vitro* na *P. falciparum* osjetljiv na klorokin i *in vivo* na krvne shizonte *P. berghei*, usporedivo s klorokinom, a mnogo učinkovitije od primakina. Djeluje i na multirezistentne sojeve plazmodija. Dobiveni rezultati u skladu su s hipotezom da postavljanje metabolički stabilne skupine na poziciju 2 dovodi do smanjenog metabolizma i inaktivacije primakina, te time do veće učinkovitosti. Nadalje, 2-*tert*-butilprimakin prvi je 8-aminokinolin koji ne uzrokuje methemoglobinemiju (Jain i sur., 2004). Daljnjim optimiranjem sintetizirani su derivati 2-*tert*-butilprimakina među kojima je najaktivniji bio 5-(3-trifluormetil)fenoksi derivat te je poslužio kao spoj uzor za tafenokin (Bawa i sur., 2010). Tafenokin je GlaxoSmithKline prijavio Američkoj agenciji za hranu i lijekove (FDA) za registraciju u SAD-u u studenom 2017., a u Australiji Australskoj agenciji za lijekove (TGA) (<https://www.mmv.org>).

Modificiranje samog heterocikla kinolina je započelo redukcijom primakina u 1,2-dihidroprimakin, odnosno 1,2,3,4-tetrahidroprimakin. Varirani su i supstituenti, no uglavnom je dolazilo do naglog pada aktivnosti redukcijom kinolina. Pokušalo se i zamijeniti kinolinski prsten naftalenom, akridinom i benzofuranom. Svi takvi derivati bili su inaktivni (Nodiff i sur., 1991).

### **1.3.2. Modifikacija bočnog aminoalkilnog lanca**

Blokiranje terminalne primarne amino skupine primakina znatno povećava njegovu bioraspoloživost jer je smanjena pretvorba u karboksiprimakin (Kaur i sur., 2012). S druge strane, vezanje primakina preko terminalne amino skupine za proteinski nosač, jedan je od načina kojim se pokušalo smanjiti njegovu toksičnost. Derivat s tiolnom skupinom na aminoalkilnom lancu, vezan disulfidnom vezom za proteinski nosač pokazao je manju toksičnost (Hofsteenge i sur., 1986), što je dovelo do sinteze konjugata primakina i malih peptida te otkrića da time dolazi do povećanja učinkovitosti i smanjenja toksičnosti. Pretpostavlja se da su ti peptidni konjugati prolijekovi primakina koji se polako hidroliziraju u serumu u primakin (Vangapandu i sur., 2004).

Nadalje, dizajnirani su i sintetizirani konjugati primakina i bazičnih aminokiselina, lizina, arginina i ornitina, bazičnih dipeptida ili pseudopeptida budući da je ranije dokazano da vezanje bazične aminokiseline povećava antimalarijsku aktivnost 8-aminokinolina (Vangapandu i sur., 2004). Sintetiziran je izuzetno velik broj aminokiselinskih i oligopeptidnih derivata primakina od kojih neki imaju veći indeks selektivnosti (omjer djelotvornosti i toksičnosti). Međutim, većina njih se razgrađuje uz peptidaze u gastrointestinalnom traktu. Kako bi se spriječila ili odgodila navedena hidroliza, sintetizirani su peptidilprimakinski derivati s dodatnom zaštitom peptidnog ostatka vezanjem na polimerni nosač, uvođenjem bioizostera peptidne veze, uvođenjem steričke zaštite (npr. metiliranje amino skupine u peptidnoj vezi) ili tvorbom dvostrukog prolijeka (Kaur i sur., 2012).

Gomes i suradnici 2004. g. opisali su pripravu aminokiselinskih derivata primakina kod kojih je peptidna veza bila zaštićena imidazolidin-4-onskim prstenom u svrhu povećanja enzimske stabilnosti peptida. Rezultati istraživanja antimalarijskog djelovanja pokazali su da imaju gametocidno djelovanje *in vivo* na *P. berghei* usporedivo s primakinom te da sprječavaju prijenos uzročnika sa zaraženih miševa na komarce vrste *A. stephensi* (Araujo i sur., 2005).

Problem brzog metabolizma primakina u karboksiprimakin probalo se spriječiti sintezom karbamatnih prolijekova. Sintetizirana je serija *O*-alkil i *O*-aril karbamata. Na homogenatu jetre štakora uočeno je da dolazi do spore aktivacije obje serije prolijekova. Etilni i *n*-heksilni karbamatni derivati uzrokovali su značajno smanjenje broja oocista u komarcima u usporedbi s kontrolnom skupinom (Mata i sur., 2012).

#### **1.4. Ostali biološki učinci primakina i njegovih derivata**

U znanstvenoj literaturi je opisano nekoliko bioloških učinaka primakina, uz temeljni antimalarijski. Potvrdilo se da je djelotvoran, ne samo protiv vrsta iz roda *Plasmodium*, već i protiv vrsta iz rodova *Trypanosoma*, među kojima se ističe aktivnost prema *T. cruzi*, te *Leishmania*. Ovi biološki učinci opaženi su kod derivata primakina i ostalih 8-aminokinolina (Tewkani i Walker, 2006).

Kod lišmenijaze nije potpuno razjašnjen mehanizam djelovanja primakina, no pretpostavlja se da izaziva oksidativni stres u makrofagima zaraženima lišmenijom. Također, uočena je brza i opsežna alkalizacija acidokalcisoma, vakuola koje sadrže glavninu iona

kalcija u stanici parazita, te time dolazi do narušavanja potencijala membrane stanica i propadanja unutarnje mitohondrijske membrane (Vercesi i Docampo, 1992).

Više je razloga zašto se intenzivno proučava učinak primakina na *T. cruzi*. Chagasova bolest je uzrok smrti oko 400 000 ljudi, a za tu indikaciju su registrirana samo dva lijeka: nifurtimoks i benznidazol. Oba lijeka imaju loš profil nuspojava, slabu djelotvornost te se na njih razvija rezistencija. U odnosu na njih primakin pokazuje bolje djelovanje prema unutarstaničnoj fazi *T. cruzi* (McCabe, 1988). Kod zaraženih miševa primakin je pokazao četiri puta jače djelovanje u odnosu na nifurtimoks, a njegovi analozi još i veću aktivnost. Posebice su se istaknuli dipeptidni analozi s fenilalanil-argininom i lizil-argininom koje vjerojatno prepoznaje cisteinska proteaza parazita cruzipain (Beveridge i sur., 1980). Pretpostavljen je sličan mehanizam djelovanja kao i na lišmeniju (Tewkani i Walker, 2006).

Primakin se pokazao učinkovit i prema *Pneumocystis jiroveci* (ranije *P. carinii*) koja izaziva pneumoniju najčešće kod osoba oboljelih od sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS) (Feldman, 2005). Odobren je u Sjedinjenim Američkim Državama i Ujedinjenom Kraljevstvu za tu indikaciju, a pretpostavlja se da je mehanizam djelovanja sličan kao i na lišmeniju (Tewkani i Walker, 2006).

Potencijal za otkriće novog citostatika među antimalaricima prvi put je otkriven kod artemizininina i njegovih derivata. Od 21 antimalarika na listi SZO, kod dvije trećine otkriveno je antitumorsko djelovanje, koje se ispituje u kliničkim studijama (Duffy i Wade, 2012).

Istraživanjima se ustanovilo da kinolinski prsten ima važnu ulogu u citostatskoj aktivnosti te su sintetizirane serije analoga koje su pokazale širok spektar antitumorskog djelovanja. Kinolinski derivati imaju različite mehanizme citostatskog djelovanja poput izazivanja apoptoze, inhibicije angiogeneze inhibicijom rasta stanica, prekidanjem migracije stanica i modulacijom odgovora nuklearnih receptora (Afzal i sur., 2015).

Daljnijim istraživanjem derivata kinolina ispitano je citostatsko djelovanje primakina, *N*-dipeptidil-primakina i drugih kinolina na tri različite maligne stanične linije. Rezultati su pokazali da primakin ima najveću aktivnost od svih ispitivanih spojeva prema humanoj staničnoj liniji adenokarcinoma dojke (MCF-7), a pokazivao je umjereno djelovanje i prema dvjema humanim staničnim linijama adenokarcinoma debelog crijeva (Caco-2 i HT-29). Ovo istraživanje otkriva važnost 4-amino-1-metilbutilnog alifatskog lanca na položaju C8 kinolinskog prstena za antitumorsko djelovanje (Fernandes i sur., 2009).

Tijekom zadnjih desetak godina u Zavodu za farmaceutsku kemiju sintetizirano je više različitih serija derivata primakina od kojih su neki pokazali citostatsko djelovanje na niz ispitanih malignih staničnih linija u mikromolarnim koncentracijama. Sintetizirani derivati imali su alkilne, cikloalkilne, arilne, hidroksialkilne ili cinamoilne supstituente vezane preko poveznice bogate atomima dušika i kisika (amid, urea, karbamat, hidroksiurea, 1-acilsemikarbazid, *bis*-urea, ureidoamid) na primarnu amino skupinu primakina (Džimbeg i sur., 2008; Šimunović i sur., 2009; Perković i sur., 2013; Pavić i sur., 2014; Perković i sur., 2016; Pavić i sur., 2016; Levatić i sur., 2018).

Među sintetiziranim ureama primakina naj snažniji citostatski učinak na stanične linije mišje limfocitne leukemije (L1210) ( $IC_{50} = 3,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ), humane akutne limfoblastičke leukemije (CEM) ( $IC_{50} = 2,9 \pm 1,7 \mu\text{M}$ ) i humanog adenokarcinoma debelog crijeva (SW 620) ( $IC_{50} = 2,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$ ) imao je piridinski derivat (Džimbeg i sur., 2008), hidroksipentilni derivat uree pokazao je izuzetno snažno antiproliferativno djelovanje na staničnu liniju SW 620 ( $IC_{50} = 0,2 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ) (Šimunović i sur., 2009), urea s halogeniranim benzenskim prstenom kakav se nalazi u molekuli citostatskog lijeka sorafeniba, inhibitora tirozin kinaze, bila je aktivna prema svim ispitanim malignim staničnim linijama ( $IC_{50} = 3,1\text{--}28 \mu\text{M}$ ) (Pavić i sur., 2014), dok su uree s halogeniranim ili hidroksiliranim fenilnim supstituentima imale najjače antiproliferativno djelovanje na humanu staničnu liniju adenokarcinoma dojke (MCF-7) (najaktivniji *bis*-(3,5)-trifluormetilni derivat,  $IC_{50}$  (MCF-7) =  $1,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ) (Perković i sur., 2016).

*Bis*-uree primakina su generalno imale jače antiproliferativno djelovanje od analognih urea. Benzhidrilna *bis*-urea pokazala je citostatsko djelovanje prema svim ispitanim malignim staničnim linijama ( $IC_{50} = 4\text{--}18 \mu\text{M}$ ) (Perković i sur., 2013), dok su simetrična *bis*-primakinska *bis*-urea i *bis*-uree s halogeniranim ili hidroksiliranim fenilnim supstituentima bile izuzetno selektivne prema staničnoj liniji MCF-7 ( $IC_{50} = 0,2 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ) (Pavić i sur., 2014),  $IC_{50} = 0,1\text{--}2,6 \mu\text{M}$  (Perković i sur., 2016), redom). 1-Acilsemikarbazidni konjugati primakina i derivata cimetne kiseline pokazali su jače citostatsko djelovanje od analognih amida. Najselektivniji prema SW 620 bio je amidni derivat *o*-fluorcimetne kiseline ( $IC_{50} = 0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ), dok je *p*-trifluormetilcimetni detivat 1-acilsemkarbazida bio najselektivniji prema MCF-7 ( $IC_{50} = 0,03 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) (Pavić i sur., 2016). Ureidoamidi primakina nisu pokazali citostatsko djelovanje, međutim na soj NF54 *P. falciparum* imali su djelovanje usporedivo s primakinom, ali uz smanjenu toksičnost (Levatić i sur., 2018). Osim toga, ureidoamidi su vrlo



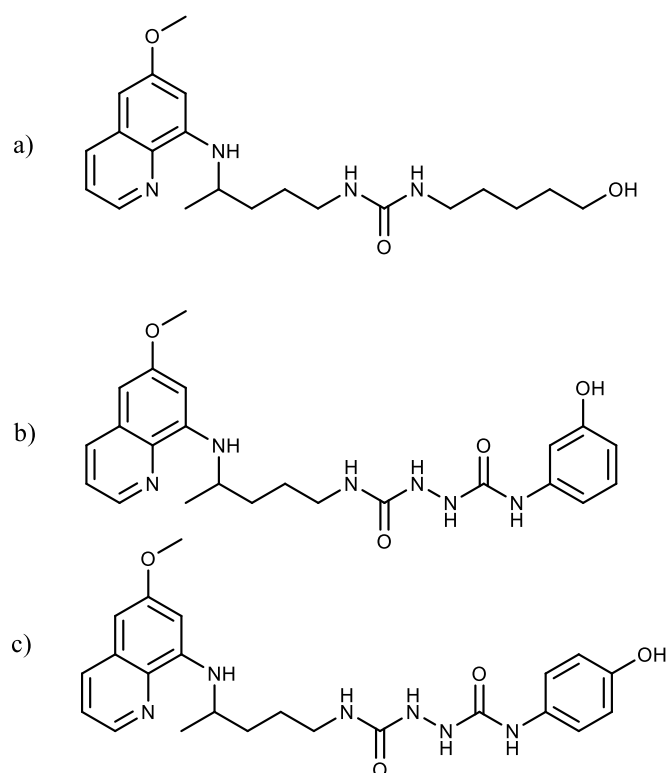
snažno inhibirali stvaranje biofilma bakterija *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i gljivice *Candida albicans* (Vlainić i sur., 2018).

Osim citostatskog djelovanja, opisano je i antituberkulozno djelovanje *in vitro* derivata primakina sintetiziranih u Zavodu za farmaceutsku kemiju na *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* i *M. avium subsp. paratuberculosis*. Među promatranim spojevima najveću aktivnost pokazale su uree s halogeniranim fenilnim supstituentima i *bis*-uree s benzhidrilnim supstituentima (Pavić i sur., 2018).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija *bis*-urea primakina s aminoalkoholima. Dizajniranje ciljnih spojeva temelji se na pregledu literaturnih podataka i rezultata istraživanja derivata primakina u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Kao što je opisano u uvodnom dijelu ovog rada, mnogi od prethodno sintetiziranih spojeva pokazali su citostatsko djelovanje *in vitro* u niskim mikromolarnim koncentracijama na velik broj ispitanih malignih staničnih linija i/ili selektivan učinak na pojedine stanične linije (Džimbeg i sur., 2008; Šimunović i sur., 2009; Perković i sur., 2013; Pavić i sur., 2014; Perković i sur., 2016; Pavić i sur., 2016).

Kao uzor pri dizajniranju poslužili su prethodno sintetizirani derivati primakina: uree i *bis*-uree s hidroksialkilnim supstytutentima, među kojima se ističe urea s 5-hidroksipentilnim supstytutentom koja je vrlo selektivna prema humanoj staničnoj liniji SW 620 ( $IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ ) (Šimunović i sur., 2009) te *bis*-uree s *m*- i *p*-fenolnim supstytutentima koje su pokazale izuzetnu selektivnost prema staničnoj liniji MCF-7 ( $IC_{50} = 1,1 \mu\text{M}$  i  $2,6 \mu\text{M}$ , redom) (Perković i sur., 2016) (Slika 10).



**Slika 10.** Strukture: a) uree s 5-hidroksipentilnim, b) *bis*-uree s *m*-fenolnim i c) *bis*-uree s *p*-fenolnim supstytutentom

Stoga je dizajnirana i sintetizirana druga generacija *bis*-urea primakina s alifatskim ili aromatskim aminoalkoholnim supstituentima. Sintetizirani spojevi su karakterizirani uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR). Računalnim programima predviđena su fizikalno-kemijska svojstva koja utječu na farmakokinetičke parametre.

Ovim spojevima naknadno će biti ispitano citostatsko, antimalarijsko i antituberkulozno djelovanje *in vitro* te će rezultati biti pridruženi dosadašnjim i činiti bazu za razvoj modela za istraživanje kvantitativnog odnosa strukture i djelovanja (QSAR), a time daljnje dizajniranje i optimizaciju strukture derivata primakina.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Tališta ( $t$ ) su određena na Stuart SMP3 instrumentu za određivanje tališta (Barloworld Scientific, UK) u otvorenim kapilarama i nisu korigirana. Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su upotrijebljene silikagel ploče 60 F<sub>254</sub> (Merck, Njemačka), te cikloheksan/etil-acetat/metanol 3:1:0,5, diklormetan/metanol 95:5 i diklormetan/metanol 9:1 kao pokretne faze. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Sigma Aldrich, SAD), uz iste pokretne faze kao u TLC-u. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ( $\lambda = 254$  nm) i parama joda.

IR spektri snimljeni su na Nicolet 6700 (Thermo Scientific, SAD) FT-IR spektrofotometru uz ATR komoru s dijamantnom kristalnom pločicom. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-600 (Bruker, SAD) kod 300,13, odnosno 600,13 MHz za <sup>1</sup>H i kod 75,47, odnosno 150,90 MHz za <sup>13</sup>C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO-*d*<sub>6</sub> otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standardu <sup>1</sup>H, odnosno signal dimetilsulfoksida (DMSO) u <sup>13</sup>C spektru. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS instrumentu (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420). Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom modu korištena je kao tehnika ionizacije. Za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava koja utječu na farmakokinetičke parametre korišteni su računalni programi Chemicalize (ChemAxon, SAD) i SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, Švicarska).

Primakin difosfat, trifozgen, hidrazin hidrat i trietilamin (TEA) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD), a benzotriazol (BtH) je nabavljen od tvrtke Alfa Aesar (SAD). Aminoalkoholi (1*R*, 3*S*)-3-aminociklopentan-1-ol hidroklorid i tiramin nabavljeni su od tvrtke Enamine (Ukrajina). Sve reakcije s primakinom izvođene su uz zaštitu od svjetlosti.

Bezvodni toluen dobiven je sljedećim postupkom: toluen je ekstrahiran vodom, osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destiliran i čuvan nad natrijem. Bezvodni dioksan dobiven je 24-satnim refluksiranjem na natriju. Destiliran je i čuvan nad natrijem. Sve kemikalije bile su *p. a.* čistoće.

### 3.1. Sinteza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline **1** (BtcCl)

Klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline **1** pripravljen je prema poznatom propisu (Kalčić i sur., 2003). Smjesa benzotriazola (0,596 g, 5 mmol) i trifozgena (0,991 g, 3,34 mmol) u bezvodnom toluenu refluksirana je 3 sata na 115 °C. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom te je reakcijska smjesa naparena nekoliko puta bezvodnim toluenom. Dobiveni BtcCl **1** je bez čišćenja upotrijebljen u daljnjim reakcijama.

### 3.2. Sinteza benzotriazolida primakina **2** (*N*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-karboksamid)

Benzotriazolid primakina sintetiziran je prema poznatom propisu (Džimbeg i sur., 2008). Otopini spoja **1** (0,904 g, 5 mmol) i TEA (0,696 mL, 5 mmol) u bezvodnom toluenu (15 mL) dokapana je otopina primakina (1,296 g, 5 mmol) u bezvodnom toluenu (15 mL) uz miješanje na ledenoj kupelji tijekom 0,25 h. Reakcijska smjesa je miješana 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega je ekstrahirana vodom (3 × 30 mL). Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen. Čisti produkt dobiven je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 3:1:0,5 i rastrljavanjem u eteru. IR spektar i talište benzotriazolida primakina **2** u potpunosti odgovaraju ranije sintetiziranom spoju.

### 3.3. Sinteza semikarbazida primakina **3** (3-amino-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}urea)

Spoj je sintetiziran prema poznatom propisu (Pavić i sur., 2014). Otopina benzotriazolida primakina **2** (0,5 g, 1,24 mmol) i hidrazin hidrata (0,124 g, 2,48 mmol) u dioksanu (8 mL) miješana je 4 dana na sobnoj temperaturi uz natrijev ditionit. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a sirovi produkt je otopljen u etil-acetatu (10 mL) i ekstrahiran 5% otopinom NaOH (3 × 10 mL) te ispran vodom (3 × 15 mL). Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen. Sirovi produkt **3** pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 95:5. Rastrljavanjem u eteru dobiven je čisti produkt **3**. IR spektar i talište semikarbazida primakina **3** u potpunosti odgovaraju ranije sintetiziranom spoju.

### 3.4. Sinteza benzotriazolida semikarbazida primakina 4 (*N*-[({4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}karbamoil)amino]-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-karboksamid)

Spoj je sintetiziran prema poznatom propisu (Pavić i sur., 2014). Otopini spoja **1** (0,091 g, 0,5 mmol) u bezvodnom dioksanu (3 mL) dokapana je otopina semikarbazida primakina **3** (0,159 g, 0,5 mmol) i TEA (0,070 mL, 0,5 mmol) u dioksanu (3mL) uz miješanje tijekom 0,1 h. Reakcijska smjesa je miješana 1 h na sobnoj temperaturi. Otopina sirovog spoja **4** korištena je bez pročišćavanja u sintezi spojeva **5a-b**.

### 3.5. Sinteza *bis*-urea primakina 5

**Opća metoda:** Otopini 0,232 g (0,5 mmol) spoja **4** u dioksanu (8 mL) uz miješanje je dokapana otopina 0,5 mmol aminoalkohola i 0,070 mL (0,5 mmol) TEA u dioksanu (6 mL), odnosno 0,139 mL (0,1 mmol) TEA ako je aminoalkohol bio u obliku soli, tijekom 0,25 h. Reakcijska smjesa je miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom.

#### 3.5.1. Sinteza *N*<sup>1</sup>-((1*S*,3*R*)-3-hidroksiciklopentil)-*N*<sup>2</sup>-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazin-1,2-dikarboksamida (**5a**)

Količina reaktanta: 0,069 g (1*R*, 3*S*)-3-aminociklopentan-1-ol hidroklorida.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 9:1. Rastrljavanjem u eteru dobiven je čisti produkt **5a**.

Iskorištenje: 0,127 g (57%).

*t*<sub>f</sub> 165–167,5°C.

IR (ATR):  $\nu_{\max}$  3275, 3192, 3064, 2916, 1653, 1612, 1545, 1514, 1448, 1392, 1381, 1308, 1194, 1165, 1151, 1090, 1049, 1028, 814, 787, 646, 619, 449 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm, *J*/Hz): 8,55-8,53 (dd, *J* = 1,63, 4,19, 1H, 10), 8,09-8,06 (dd, *J* = 1,60, 8,31, 1H, 12), 7,52 (s, 1H, 3'), 7,48 (s, 1H, 2'), 7,44-7,40 (m, 1H, 11), 6,48 (s, 1H, 16), 6,38-6,35 (t, *J* = 5,74, 1H, 1), 6,26 (s, 1H, 14), 6,21-6,19 (d, *J* = 8,37, 1H, 5'), 6,12-6,09 (d, *J* = 8,72, 1H, 7), 4,67-4,66 (d, *J* = 3,83, 1H, 6''), 4,07-4,06 (m, 1H, 1''), 3,95 (m, 1H, 3''), 3,82



(s, 3H, 17), 3,62 (m, 1H, 5), 3,03 (m, 2H, 2), 1,97-1,92 (m, 1H), 1,79-1,76 (m, 1H), 1,64-1,49 (m, 7H), 1,38-1,32 (m, 1H) (3, 4, 2", 4", 5"), 1,21-1,19 (d,  $J = 6,26$ , 3H, 6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 159,01 (15), 158,70, 157,98 (1', 4'), 144,65 (8), 144,25 (10), 134,80 (12), 134,52 (9), 129,58 (13), 122,10 (11), 96,09 (16), 91,59 (14), 70,71 (3"), 54,99 (17), 49,25 (1"), 47,05 (5), 40,00 (2"), 39,11 (2), 33,70 (4"), 33,38 (4), 31,33 (5"), 26,68 (3), 20,21 (6).

MS/MS ( $m/z$ ): 445,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

### 3.5.2. Sinteza $N^1$ -(4-hidroksifenetil)- $N^2$ -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazin-1,2-dikarboksamida (**5b**)

Količina reaktanta: 0,069 g tiramina.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 9:1. Rastrljavanjem u eteru dobiven je čisti produkt **5b**.

Iskorištenje: 0,094 g (39%).

$t_f$  136–140 °C.

IR (ATR):  $\nu_{\text{max}}$  3273, 3192, 3062, 2916, 1655, 1610, 1562, 1527, 1510, 1446, 1381, 1309, 1196, 1167, 1153, 1030, 1028, 816, 785, 644, 617, 515, 503  $\text{cm}^{-1}$ .

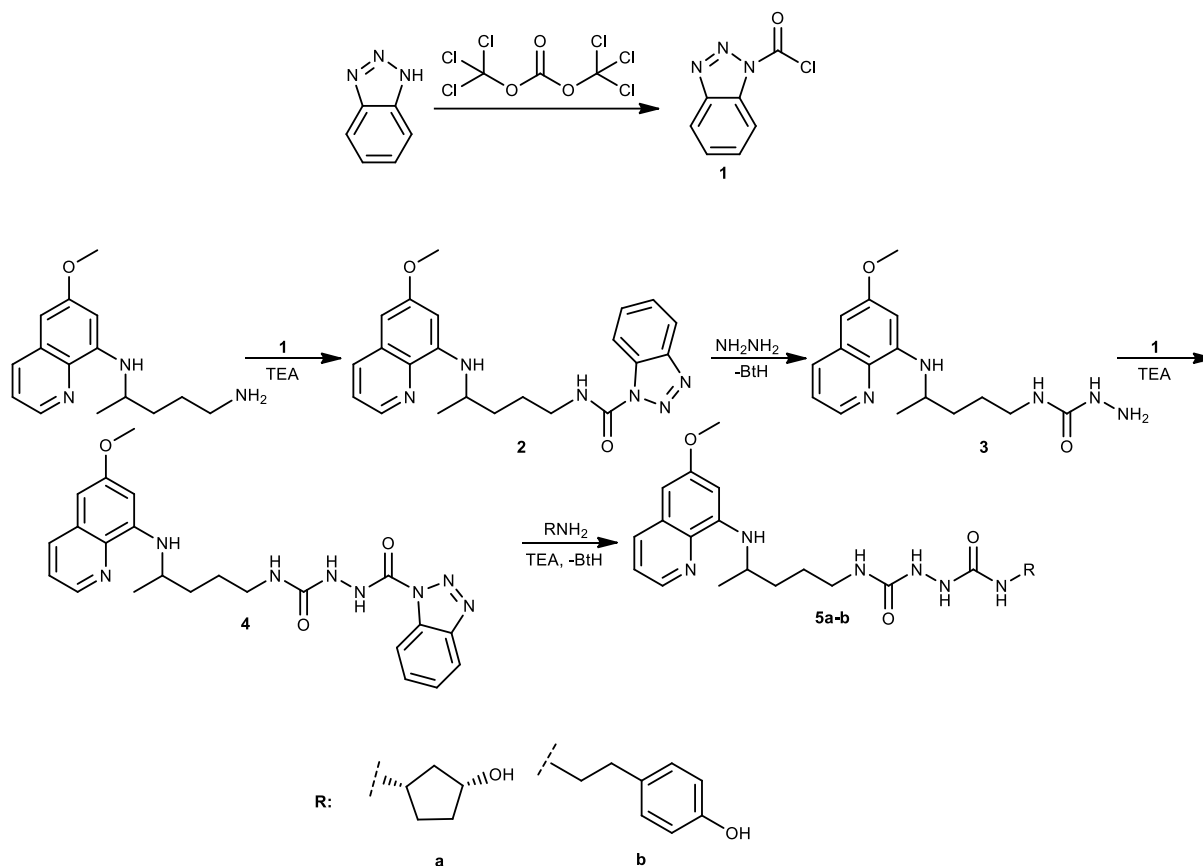
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 9,15 (s, 1H, 9"), 8,53-8,52 (dd,  $J = 1,59$ , 4,15, 1H, 10), 8,08-8,06 (dd,  $J = 1,52$ , 8,24, 1H, 12), 7,56 (s, 1H, 3'), 7,51 (s, 1H, 2'), 7,43-7,41 (m, 1H, 11), 6,97-6,95 (d,  $J = 8,39$ , 2H, 4", 8"), 6,67-6,66 (d,  $J = 8,41$ , 2H, 5", 7"), 6,47 (s, 1H, 16), 6,36 (t,  $J = 5,20$ , 1H, 1), 6,27-6,26 (m, 2H, 14, 5'), 6,12-6,10 (d,  $J = 8,72$ , 1H, 7), 3,82 (s, 3H, 17), 3,62-3,61 (m, 1H, 5), 3,17-3,13 (q,  $J = 6,29$ , 2H, 1"), 3,06-3,02 (m, 1H, 2), 2,57-2,54 (t,  $J = 7,61$ , 2H, 2"), 1,64-1,45 (m, 4H, 3, 4), 1,21-1,17 (d,  $J = 6,29$ , 3H, 6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 158,99 (15), 158,62, 158,50 (1', 4'), 155,54 (6"), 144,63 (8), 144,22 (10), 134,77 (12), 134,50 (9), 129,59 (3"), 129,56 (13), 129,41 (4", 8"), 122,07 (11), 115,06 (5", 7"), 96,09 (16), 91,60 (14), 54,97 (17), 47,04 (5), 41,12 (1"), 39,07 (2), 35,17 (2"), 33,37 (4), 26,65 (3), 20,19 (6).

MS/MS ( $m/z$ ): 481.2 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

#### **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu sintetizirani su derivati primakina, *bis*-uree **5a-b**, do sada neopisane u literaturi. Njihova sinteza provedena je prema Shemi 3.



**Shema 3.** Shema sinteze *bis*-urea primakina **5a-b**

Prvi korak u sintezi *bis*-urea **5a-b** bila je priprava benzotriazolida primakina **2**. Spoj **2** sintetiziran je aciliranjem primakina kloridom 1-benzotriazolkarboksilne kiseline **1** (BtcCl) uz ekvimolarnu količinu TEA koji je služio kao akceptor oslobođenog klorovodika (Shema 3) (Džimbeg i sur., 2008). BtcCl je priređen reakcijom benzotriazola (BtH) s trifozgenom (Kalčić i sur., 2003). Reakcija sinteze spoja **2** je izvođena uz zaštitu od svjetlosti jer se primakin na svjetlosti raspada (Ahmad i sur., 2016). Primakin je komercijalno dostupan u obliku soli difosfata te je neposredno prije upotrebe oslobođen iz soli zaluživanjem natrijevom lužinom ( $w = 5\%$ ) do pH 10–11. Sinteza i karakterizacija benzotriazolida primakina **2** prethodno je opisana te su temperatura tališta i IR spektar odgovarali literaturnim podacima. Benzotriazolid primakina **2** je reaktivan spoj pogodan za sintezu različitih derivata primakina, npr. urea i semikarbazida (Džimbeg i sur., 2008).

Aminolizom benzotriazolida **2** hidrazinom u prisutnosti natrijevog ditionita kao antioksidansa priređen je semikarbazid primakina **3** prema ranije objavljenom propisu. Reakcijska smjesa bila je također zaštićena od svjetlosti. Temperature tališta i IR spektar semikarbazida **3** odgovarali su literaturnim podacima (Pavić i sur., 2014). Aciliranjem semikarbazida primakina **3** kloridom **1** uz TEA prema prethodno objavljenom propisu sintetiziran je benzotriazolid semikarbazida primakina **4** (Pavić i sur., 2014) koji je bez daljnjeg čišćenja upotrijebljen za sintezu *bis*-urea **5a-b**.

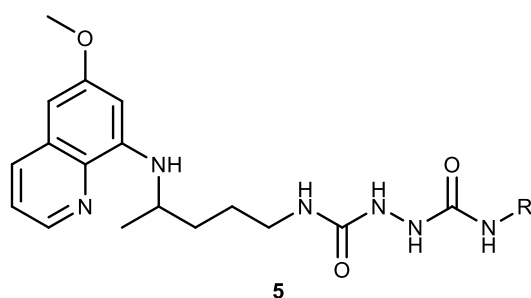
Sinteza *bis*-urea **5** provedena je aminolizom benzotriazolida **4** odgovarajućim aminoalkoholom uz ekvimolarnu količinu TEA ili dvostruku ako je komercijalno dostupan aminoalkohol bio u obliku soli.

U sintezi su korištena dva aminoalkohola: alifatski ciklički (1*R*, 3*S*)-3-aminociklopentan-1-ol hidroklorid i aromatski tiramin (4-(2-aminoetil)fenol). Sintetizirane su sljedeće *bis*-uree:

- $N^1$ -((1*S*,3*R*)-3-hidroksiciklopentil)- $N^2$ -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazin-1,2-dikarboksamid (**5a**),
- $N^1$ -(4-hidroksifenetil)- $N^2$ -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazin-1,2-dikarboksamid (**5b**).

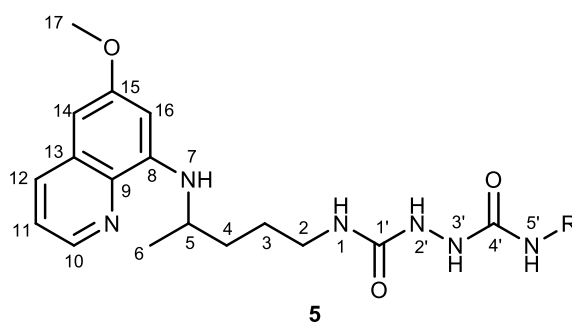
Novi spojevi su *bis*-uree primakina **5a-b**. Sinteze derivata i njihova čistoća praćeni su tankoslojnom kromatografijom. Strukture spojeva **5** potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, MS). Novim spojevima određene su i temperature taljenja. U Tablicama 1 i 2 dani su njihovi analitički i spektroskopski podaci, dok se spektri nalaze u Prilozima.

**Tablica 1.** Analitički i spektroskopski podaci za *bis*-uree primakina **5a-b**



Spoj	R	$t_f$ (°C)	Molekulska formula	$M_r$	IR (ATR) $\nu_{\max}$ (cm <sup>-1</sup> )	MS (m/z)
<b>5a</b>		165–167,5	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	444,536	3275, 3192, 3064, 2916, 1653, 1612, 1545, 1514, 1448, 1392, 1381, 1308, 1194, 1165, 1151, 1090, 1049, 1028, 814, 787, 646, 619, 449	445,1 (M+1) <sup>+</sup>
<b>5b</b>		136–140	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	480,569	3273, 3192, 3062, 2916, 1655, 1610, 1562, 1527, 1510, 1446, 1381, 1309, 1196, 1167, 1153, 1030, 1028, 816, 785, 644, 617, 515, 503	481,2 (M+1) <sup>+</sup>

**Tablica 2.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopski podaci za *bis*-uree primakina **5a-b**



Spoj	R	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm, $J/\text{Hz}$ )	$^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm, $J/\text{Hz}$ )
<b>5a</b>		8,55-8,53 (dd, $J = 1,63, 4,19$ , 1H, 10), 8,09-8,06 (dd, $J = 1,60, 8,31$ , 1H, 12), 7,52 (s, 1H, 3'), 7,48 (s, 1H, 2'), 7,44-7,40 (m, 1H, 11), 6,48 (s, 1H, 16), 6,38-6,35 (t, $J = 5,74$ , 1H, 1), 6,26 (s, 1H, 14), 6,21-6,19 (d, $J = 8,37$ , 1H, 5'), 6,12-6,09 (d, $J = 8,72$ , 1H, 7), 4,67-4,66 (d, $J = 3,83$ , 1H, 6''), 4,07-4,06 (m, 1H, 1''), 3,95 (m, 1H, 3''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,62 (m, 1H, 5), 3,03 (m, 2H, 2), 1,97-1,92 (m, 1H), 1,79-1,76 (m, 1H), 1,64-1,49 (m, 7H), 1,38-1,32 (m, 1H) (3, 4, 2'', 4'', 5''), 1,21-1,19 (d, $J = 6,26$ , 3H, 6)	159,01 (15), 158,70, 157,98 (1', 4'), 144,65 (8), 144,25 (10), 134,80 (12), 134,52 (9), 129,58 (13), 122,10 (11), 96,09 (16), 91,59 (14), 70,71 (3''), 54,99 (17), 49,25 (1''), 47,05 (5), 40,00 (2''), 39,11 (2), 33,70 (4''), 33,38 (4), 31,33 (5''), 26,68 (3), 20,21 (6)
<b>5b</b>		9,15 (s, 1H, 9''), 8,53-8,52 (dd, $J = 1,59, 4,15$ , 1H, 10), 8,08-8,06 (dd, $J = 1,52, 8,24$ , 1H, 12), 7,56 (s, 1H, 3'), 7,51 (s, 1H, 2'), 7,43-7,41 (m, 1H, 11), 6,97-6,95 (d, $J = 8,39$ , 2H, 4'', 8''), 6,67-6,66 (d, $J = 8,41$ , 2H, 5'', 7''), 6,47 (s, 1H, 16), 6,36 (t, $J = 5,20$ , 1H, 1), 6,27-6,26 (m, 2H, 14, 5'), 6,12-6,10 (d, $J = 8,72$ , 1H, 7), 3,82 (s, 3H, 17), 3,62-3,61 (m, 1H, 5), 3,17-3,13 (q, $J = 6,29$ , 2H, 1''), 3,06-3,02 (m, 1H, 2), 2,57-2,54 (t, $J = 7,61$ , 2H, 2''), 1,64-1,45 (m, 4H, 3, 4), 1,21-1,17 (d, $J = 6,29$ , 3H, 6)	158,99 (15), 158,62, 158,50 (1', 4'), 155,54 (6''), 144,63 (8), 144,22 (10), 134,77 (12), 134,50 (9), 129,59 (3''), 129,56 (13), 129,41 (4'', 8''), 122,07 (11), 115,06 (5'', 7''), 96,09 (16), 91,60 (14), 54,97 (17), 47,04 (5), 41,12 (1''), 39,07 (2), 35,17 (2''), 33,37 (4), 26,65 (3), 20,19 (6)

IR spektri *bis*-urea primakina **5a-b** pokazuju karakteristične vrpce kod 3275–3192 (NH i OH rastezanje), 1657–1612 (C=O rastezanje, amid I) i 1552–1512 (NH uvijanje, amid II)  $\text{cm}^{-1}$ . Primakinski ostatak potvrđen je  $^1\text{H}$  NMR spektrom: dublet dubleta koji odgovara

aromatskom vodikovom atomu na položaju 10 u susjedstvu piridinskog dušika kinolinskog prstena nalazi se na 8,55–8,52, metoksi skupina vidi se kao singlet na 3,82, CH kiralnog ugljikovog atoma je multiplet na 3,62–3,61, dok je metilna skupina dublet na 1,21–1,17 ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar pokazuje signale ugljikovih atoma koji odgovaraju gore navedenim signalima u protonskom spektru pri 144,25 i 144,22, 54,99 i 54,97, 47,05 i 47,04 te 20,21 i 20,19 ppm, redom. U  $^1\text{H}$  NMR spektru *bis*-uree **5a** vidi se hidroksilna skupina kao dublet na 4,67-4,66, a kiralni centri na položajima 1" i 3" kao multipliteti na 4,07-4,06, odnosno 3,95 ppm. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru se kiralni centri nalaze na 70,71 za 3", odnosno 49,25 ppm za 1". U  $^1\text{H}$  NMR spektru *bis*-uree **5b** vidi se fenolna skupina kao singlet na 9,15 ppm, a u aromatskom području vidi se *para* supstitucija – dubleti na 6,97-6,95 za položaje 4" i 8", odnosno na 6,67-6,66 ppm za položaje 5" i 7".

U MS spektrima obje *bis*-uree **5a** i **5b** vide se pseudomolekulski ioni.

Za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava poželjnih za ljekovite tvari (tzv. *drug-like properties* ili *drug-likeness*) predložena su različita pravila. Lipinski i suradnici predložili su “pravilo pet” (rule of 5) (Lipinski i sur., 1997; Lipinski, 2000; Lipinski i sur., 2001; Lipinski, 2004), Gelovani i suradnici su predložili tri parametra (Luzina i Popov, 2012), Congreve i suradnici “pravilo tri” (rule of 3) (Congreve i sur., 2003), a Rayan i suradnici postavili su cijeli set pravila (Rayan i sur., 2010). O tim pravilima rasprava je uvijek otvorena s ciljem poboljšanja, stoga se često uvode novine, ispravci i dodaci (Veber i sur., 2002; Takaoka i sur., 2003; Proudfoot, 2005; Keller i sur., 2006; Abad-Zapatero, 2007; Zhang i Wilkinson, 2007; Leeson i Springthorpe, 2007; Hughes i sur., 2008; Waring, 2009; Ohno i sur., 2010; Luker i sur., 2011; Bickerton i sur., 2012).

Uobičajena praksa u dizajniranju lijekova utvrđuje zadovoljava li ljekovita tvar Lipinskijeva pravila ( $M_r \leq 500$ ,  $\log P \leq 5$ , broj donora vodikove veze  $\leq 5$ , broj akceptora vodikove veze  $\leq 10$ ), koja se koriste za predviđanje oralne bioraspodivnosti (Lipinski i sur., 1997; Lipinski, 2000; Lipinski i sur., 2001; Lipinski, 2004). Gelovanijeva pravila pak zahtijevaju da je topološka polarna površina molekule (TPSA) manja od  $140 \text{ \AA}^2$ , molarna refraktivnost (MR) između 40 i  $130 \text{ cm}^3/\text{mol}$  te broj atoma u molekuli od 20 do 70, koja se, kao i Lipinskijeva pravila, koriste za predviđanje oralne bioraspodivnosti (Luzina i Popov, 2012). Većina parametara, koji su potrebni za Lipinskijeva i Gelovanijska pravila, računati su pomoću programa Chemicalize (<http://www.chemicalize.org/>) i navedeni u Tablici 3. *Bis*-uree

primakina **5a-b** sintetizirane u okviru ovog rada gotovo u potpunosti zadovoljavaju pravila Lipinskog i Gelovanija za ljekovite tvari.

**Tablica 3.** Lipinskijevi i Gelovanijeve parametri *bis*-uree primakina **5a-b** računati programom Chemicalize (<http://www.chemicalize.org/>)

Spoj	Molekulska formula	Broj atoma	$M_r$	Donori H-veze	Akceptori H-veze	Pravila Lipinskog	MR (cm <sup>3</sup> /mol)	TPSA (Å <sup>2</sup> )
<b>5a</b>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	64	444,536	6	6	3/4	121,11	136,64
<b>5b</b>	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	67	480,569	6	6	3/4	134,42	136,64

*Bioavailability radar*, alat programa SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), uzima za predviđanje oralne bioraspoloživosti sljedećih šest parametara: lipofilnost (XLOGP3 u vrijednosti između -0,7 do 5,0), relativnu molekulska masu ( $M_r$  150–500), polarnost (TPSA 20–130 Å<sup>2</sup>), topljivost u vodi (log *S* 0–6 (ESOL model)), nezasićenost (udio *sp*<sup>3</sup> hibridiziranih atoma ugljika u ukupnom broju atoma ugljika u strukturi (Csp3 0,25–1)) i fleksibilnost molekule (broj rotirajućih veza < 9). Fizikalno-kemijska svojstva poput log *P*, log *S*, Csp3 i broja rotirajućih veza u strukturi prikazana su u Tablici 4, a izračunati su pomoću programa SwissADME.ch.

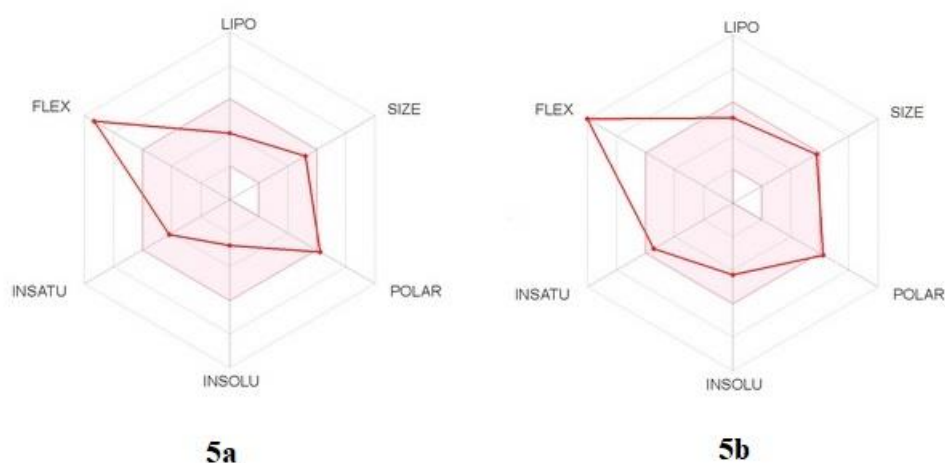
**Tablica 4.** *Bioavailability radar* parametri za *bis*-uree **5a-b** računati programom SwissADME.ch (<http://www.swissadme.ch/>)

Spoj	XLOG P3 <sup>a</sup>	log S <sup>b</sup>	Csp3 <sup>c</sup>	Broj rotirajućih veza
<b>5a</b>	2,07	-4,57	0,32	13
<b>5b</b>	3,37	-4,27	0,5	15

<sup>a</sup>XLOG P3 – metoda izračuna log *P* programom XLOGP, v. 3.2.2.; <sup>b</sup>log *S* – mjera topljivosti spoja u vodi: netopljivo < -10 < slabo topljivo < -6 < osrednje topljivo < -4 < topljivo < -2 < dobro topljivo < 0 < visoko topljivo; <sup>c</sup>Csp3 – udio *sp*<sup>3</sup> hibridiziranih atoma ugljika u ukupnom broju atoma ugljika u strukturi



Slika 11 prikazuje ilustrativne modele za predviđanje bioraspoloživosti pomoću *Bioavailability radar* za sintetizirane spojeve. Ovaj model ima gore navedene kriterije za *Bioavailability radar*, a gornje granice kriterija su vrhovi pravilnog šesterokuta ružičaste boje. Svaki analizirani spoj s obzirom na vrijednosti parametara opisuje vlastiti šesterokut čije su stranice crvene boje. Ukoliko se neki vrh šesterokuta nalazi izvan ružičastog šesterokuta znači da u tom parametru analizirani spoj odstupa od kriterija. Modeli na Slici 14 pokazuju kako oba sintetizirana spoja zadovoljavaju pet od šest kriterija, odnosno nijedan ne zadovoljava kriterij fleksibilnosti. Manje odstupanje od kriterija fleksibilnosti pokazuje **5a** u odnosu na **5b**. Ako bi se pristupilo daljnjem optimiranju struktura spojeva trebalo bi ukrutiti strukture, tj. smanjiti fleksibilnost.



**Slika 11.** *Bioavailability radar* – model za predviđanje oralne bioraspoloživosti za *bis-uree*  
**5a-b**

Pomoću programa SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) napravljeno je farmakokinetičko predviđanje *in silico*. Programom su predviđene tri etape farmakokinetike ljekovite tvari – apsorpcija, distribucija i metabolizam. Podaci su prikazani u Tablici 5.

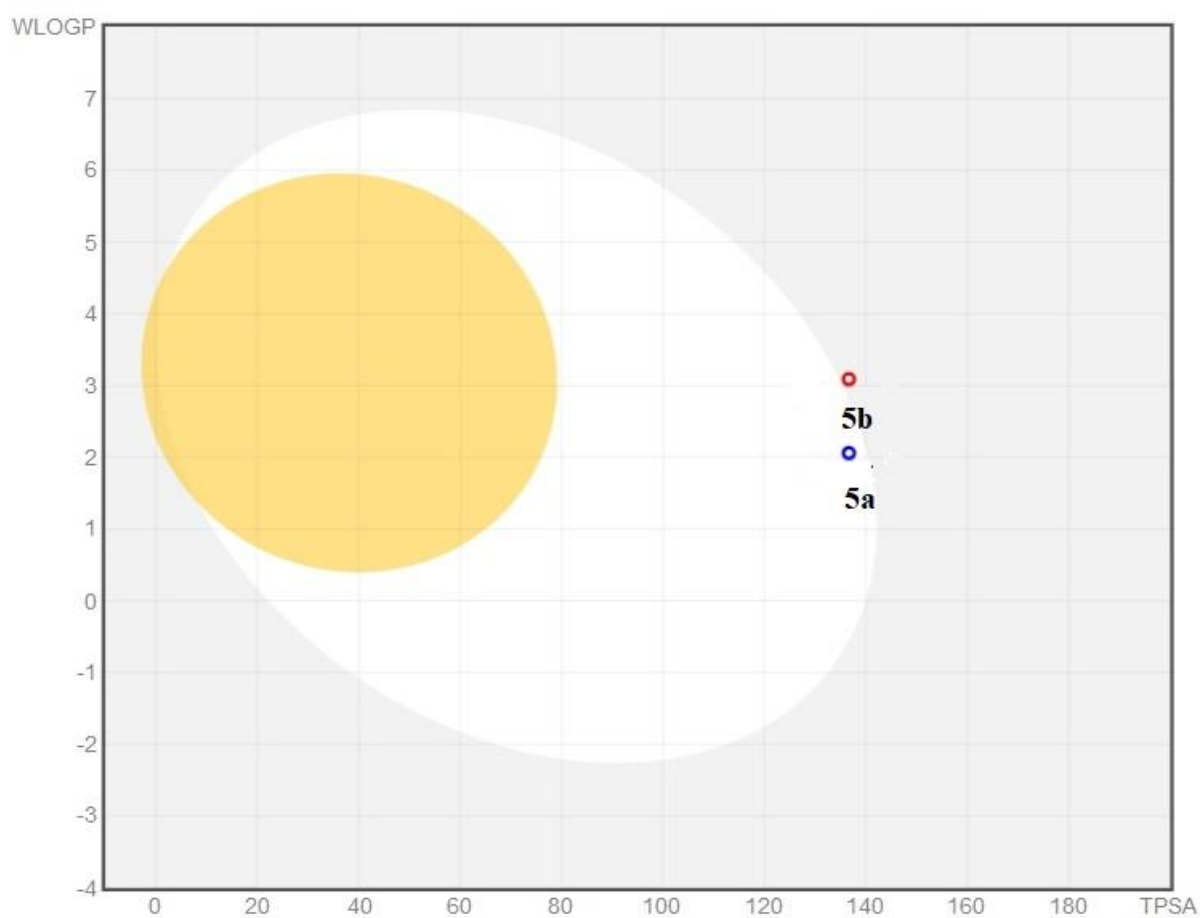
**Tablica 5.** Farmakokinetički parametri za *bis*-uree **5a-b** računati programom SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>)

Spoj	<b>5a</b>	<b>5b</b>
GI aps. <sup>a</sup>	visoka	niska
KMB prolazak <sup>b</sup>	-	-
Supstrat P-glikoproteina	+	-
CYP1A2 inhibitor	-	-
CYP2C9 inhibitor	-	-
CYP2C19 inhibitor	+	-
CYP2D6 inhibitor	-	-
CYP3A4 inhibitor	+	+
$\log K_p$ (cm/s) <sup>c</sup>	-7,54	-6,84

<sup>a</sup> GI aps. – gastrointestinalna apsorpcija; <sup>b</sup> KMB – krvno-moždana barijera; <sup>c</sup> $\log K_p$  – koeficijent propusnosti otopljene tvari kroz *stratum corneum*

Prema predviđanjima prikazanim u Tablici 5 očekuje se visoka razina apsorpcije iz gastrointestinalnog sustava (GI) za spoj **5a**, dok se za spoj **5b** ne očekuje apsorpcija iz GI. Za *bis*-ureu **5a** program predviđa da je supstrat P-glikoproteina, a za **5b** ne. Oba spoja ne prelaze KMB. S obzirom na ova predviđanja, spojevi neće izazivati nuspojave u središnjem živčanom sustavu jer ne prelaze KMB. Međutim, ako je cilj liječiti rak mozga, lijek mora proći KMB, a u slučaju da ne prelazi KMB, lijek valja primijeniti intratekalno. Nadalje, P-glikoprotein je protein prisutan u KMB te u više organa u GI, a značajan je za izbacivanje lijeka iz stanica. Dakle, činjenica da je **5a** supstrat za P-glikoproteine može mu potencijalno umanjiti učinkovitost, pogotovo ako se radi o djelovanju na tumorske stanice (Ueda i sur., 1987). Oba spoja su potencijalni inhibitori enzima CYP 3A4, dok **5a** inhibira i CYP 2C19. Prema tome se može zaključiti da je vjerojatnost da spoj **5b** stupi u interakcije s drugim lijekovima manja u odnosu na **5a**.

Slika 12 predstavlja prikaz farmakokinetičkog *BOILED-Egg* modela koji opisuje prolazak ljekovite tvari kroz tjelesne barijere. Kružići označavaju molekule i opisuju ih kao supstrate P-glikoproteina ako su obojeni plavo, u suprotnom su kružići crvene boje. Ukoliko se spojevi nalaze u bijelom polju (tzv. bjelanjku), tada se predviđa pasivna apsorpcija iz GI, a ako se nalaze u žutom polju (tzv. žumanjku), pasivno prolaze kroz KMB (Daina i Zoete, 2016). *BOILED-Egg* model predviđa pasivnu apsorpciju spoja **5a** iz GI, da je potencijalni supstrat za P-glikoprotein te da ne prelazi KMB. S druge strane, za spoj **5b** predviđa nisku apsorpciju iz GI, da nije supstrat za P-glikoprotein te da ne prelazi KMB.



**Slika 12.** Prikaz farmakokinetičkog *BOILED-Egg* modela (Daina i Zoete, 2016)

## **5. ZAKLJUČCI**

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija dvije *bis*-uree primakina s aminoalkoholima koje do sada nisu opisane u literaturi. Sintetizirane i karakterizirane su *bis*-uree:

- $N^1$ -((1*S*,3*R*)-3-hidroksiciklopentil)- $N^2$ -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazin-1,2-dikarboksamid (**5a**),
- $N^1$ -(4-hidroksifenetil)- $N^2$ -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazin-1,2-dikarboksamid (**5b**).

Struktura novih spojeva potvrđena je uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR).

Oba novosintetizirana spoja zadovoljavaju većinu Lipinskijevih (tri od četiri) i Gelovanijevih pravila (**5a**: tri od tri, **5b**: dva od tri) za oralnu bioraspoloživost malih molekula, stoga predviđena fizikalno-kemijska svojstva ukazuju da sintetizirani spojevi predstavljaju dobre kandidate za nove lijekove. Prema predviđanjima alata *Bioavailability radar* novosintetizirani spojevi zadovoljavaju pet od šest kriterija. Za spoj **5a** predviđena je pasivna apsorpcija iz GI te da je supstrat P-glikoproteina, dok je za spoj **5b** predviđeno da se ne apsorbira pasivno iz GI te da ne predstavlja supstrat za P-glikoprotein. Stoga se može pretpostaviti da će spoj **5a** imati dobru do vrlo dobru bioraspoloživost, dok je za spoj **5b** realno očekivati nižu bioraspoloživost. Oba spoja ne prelaze KMB. Program ujedno predviđa da su oba spoja inhibitori CYP 3A4, a spoj **5a** je dodatno i potencijalni inhibitor CYP 2C19.

U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada i koja su u tijeku, ispituje se citostatsko i antimalarijsko djelovanje sintetiziranih spojeva.

## **6. LITERATURA**

Abad-Zapatero C. A Sorcerer's apprentice and the rule of five: from rule-of-thumb to commandment and beyond. *Drug Discov Today*, 2007, 12, 995-997.

Afzal O, Kumar S, Haider R, Ali R, Kumar R, Jaggi M, Bawa S. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur J Med Chem*, 2015, 97, 871-910.

Ahmad I, Ahmad S, Anwar Z, Sheraz MA, Sikorski M. Photostability and photostabilization of drugs and products. *Int J Photoenergy*, 2016, 2016, 1-19.

Araujo MJ, Bom J, Capela R, Casimiro C, Chambel P, Gomes P, Iley J, Lopes F, Morais J, Moreira R, de Oliveira E, do Rosario V, Vale N. Imidazolidin-4-one derivatives of primaquine as novel transmission-blocking antimalarials. *J Med Chem*, 2005, 48, 888-892.

Auparakkitanon S, Wilairat P. Cleavage of DNA induced by 9-anilinoacridine inhibitors of topoisomerase II in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commu*, 2000, 269, 406-409.

Auparakkitanon S, Chapoomram S, Kuaha K, Chirachariyavej T, Wilairat P. Targeting of hemozoin by the antimalarial pyronaridine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50, 2197-2200.

Baird JK, Hoffman SL. Primaquine therapy for malaria. *Clin Infect Dis*, 2004, 39, 1336-1345.

Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Diseases*, 2012, 4, e2012026.

Bawa S, Kumar S, Drabu S, Kumar R. Structural modifications of quinoline-based antimalarial agents: Recent developments. *J Pharm Bioallied Sci*, 2010, 2, 64-71.

Beare NA, Taylor TE, Harding SP, Lewallen S, Molyneux ME. Malarial retinopathy: A newly established diagnostic sign in severe malaria. *Am J Trop Med Hygiene*, 2006, 75, 790-797.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. New York, W. H. Freeman and Co, Školska knjiga, 2013, str. 586-587.

Beveridge E, Caldwell IC, Latter VS, Neal RA, Udall V, Waldron MM. The activity against *Trypanosoma cruzi* and cutaneous leishmaniasis, and toxicity, of moxipraquine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1980, 74, 43-51.

Bickerton GR, Paolini GV, Besnard J, Muresan S, Hopkins AL. Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nat Chem*, 2012, 4, 90-98.

Brueckner RP, Ohrt C, Baird JK, Milhous WH. 8-Aminoquinolines. U: Antimalarial chemotherapy: Mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery. Rosenthal PJ, urednik, Totowa, New Jersey, Humana Press Inc., 2001, str. 123-143.

Chen EH, Tanabe K, Saggiomo AJ, Nodiff EA. Modifications of primaquine as antimalarials. Part 4. 5-Alkoxy derivatives of primaquine. *J Med Chem*, 1987, 30, 1193-1199.

Congreve M, Carr R, Murray C, Jhoti H. A rule of three for fragment-based lead discovery. *Drug Discov Today*, 2003, 8, 876-877.

Cravo P, Napolitano H, Culleton R. How genomics is contributing to the fight against artemisinin-resistant malaria parasites. *Acta Tropica*, 2015, 148, 1-7.

Dahl EL, Shock JL, Shenai BR, Gut J, DeRisi JL, Rosenthal PJ. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50, 3124-3131.

Daina A, Zoete V. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem*, 2016, 11, 1117-1121.

Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, Singh B. Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 49, 852-860.

Davanço MG, Aguiar ACC, dos Santos LA, Padilha EC, Campos ML, de Andrade CR, de Fonseca LM, dos Santos JL, Chin CM, Krettli AU, Goncalves Peccinini R. Evaluation of antimalarial activity and toxicity of a new primaquine prodrug. *PLoS ONE*, 2014, 9, e105217.



Duffy R, Wade C. Discovery of anticancer drugs from antimalarial natural products. *Drug Discov Today*, 2012, 50, 942-953.

Džimbeg G, Zorc B, Kralj M, Ester K, Pavelić K, Andrei G, Snoeck R, Balzarini J, De Clercq E, Mintas M. The novel primaquine derivatives of N-alkyl, cycloalkyl or aryl urea: Synthesis, cytostatic and antiviral activity evaluations. *Eur J Med Chem*, 2008, 43, 1180-1187.

Feldman C. Pneumonia associated with HIV infection. *Curr Opin Infect Dis*, 2005, 18, 165-170.

Fernandes I, Vale N, de Freitas V, Moreira R, Mateus N, Gomes P. Anti-tumoral activity of imidazoquinones, a new class of antimalarials derived from primaquine. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19, 6914-6917.

Golan DE, Tashjian Jr. AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. Principles of pharmacology: The pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2011, str. 110-131.

Goldberg DE. Complex nature of malaria parasite hemoglobin degradation. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2013, 110, 5283-5284.

GSK submits US regulatory application for single-dose tafenoquine for *Plasmodium vivax* malaria, 2017., <https://www.mmv.org/newsroom/press-releases/gsk-submits-us-regulatory-application-single-dose-tafenoquine-plasmodium>, pristupljeno 10.5.2018.

Guo Z. Artemisinin anti-malarial drugs in China. *Acta Pharm Sinica B*, 2016, 6, 115-124.

Hempelmann E. Hemozoin biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. *Parasitol Res*, 2007, 100, 671-676.

Hofsteenge J, Capuano A, Altszuler R, Moore S. Carrier-linked primaquine in the chemotherapy of malaria. *J Med Chem*, 1986, 29, 1765-1769.

Chemicalize, <http://www.chemicalize.org/>, pristupljeno 10.5.2018.

Swiss ADME, <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 10.5.2018.

Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, DeCrescenzo GA, Devraj RV, Ellsworth E, Fobian YM, Gibbs ME, Gilles RW, Greene N, Huang E, Krieger-Burke T, Loesel J, Wager T, Whiteley L, Zhang Y. Physiochemical drug properties associated with *in vivo* toxicological outcomes. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18, 4872-4875.

Jain M, Vangapandu S, Sachdeva S, Singh S, Singh PP, Jena GB, Tikoo K, Ramarao P, Kaul CL, Jain R. Discovery of a bulky 2-*tert*-butyl group containing primaquine analogue that exhibits potent blood-schizontocidal antimalarial activities and complete elimination of methemoglobin toxicity. *J Med Chem*, 2004, 47, 285-287.

Kalčić I, Zovko M, Jadrijević-Mladar Takač M, Zorc B, Butula I. Synthesis and reactions of some azolecarboxylic acid derivatives. *Croat Chem Acta*, 2003, 76, 217-228.

Kaur K, Jain M, Khan SI, Jacob MR, Tekwani BL, Singh S, Pal Singh P, Jain R. Amino acid, dipeptide and pseudodipeptide conjugates of ring-substituted 8-aminoquinolines: Synthesis and evaluation of anti-infective,  $\beta$ -haematin inhibitor and cytotoxic activities. *Eur J Med Chem*, 2012, 52, 230-241.

Keller TH, Pichota A, Yinz Z. A practical view of 'druggability'. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10, 357-361.

Lalève A, Vallières C, Golinelli-Cohem MP, Bouton C, Song Z, Pawlik G, Tindall SM, Avery SV, Clain J, Meunier B. The antimalarial drug primaquine targets Fe-S cluster proteins and yeast respiratory growth. *Redox Biol*, 2016, 7, 21-29.

LaMontagne MP, Blumbergs P, Strube RE. Antimalarials 14. 5-(aryloxy) methylprimaquine analogues. A highly effective series of blood and tissue schizonticidal agents. *J Med Chem*, 1982, 25, 1094-1097.

Leeson PD, Springthorpe B. The influence of drug-like concepts on decisionmaking in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6, 881-890.

Levatić J, Pavić K, Perković I, Uzelac L, Ester K, Kralj M, Kaiser M, Rottmann M, Supek F, Zorc B. Machine learning prioritizes synthesis of primaquine ureidoamides with high antimalarial activity and attenuated cytotoxicity. *Eur J Med Chem*, 2018, 146, 651-667.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23, 3-25.

Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Method*, 2000, 44, 235-249.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46, 3-26.

Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today*, 2004, 1, 337-341.

Luker T, Alcaraz L, Chohan KK, Blomberg N, Brown DS, Butlin RJ, Elebring T, Griffin AM, Guile S, St-Gallay S, Swahn BM, Swallow S, Waring MJ, Wenlock MC, Leeson MD. Strategies to improve in vivo toxicology outcomes for basic candidate drug molecules. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21, 5673-5679.

Luzina EL, Popov AV. Synthesis, evaluation of anticancer activity and COMPARE analysis of *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-substituted ureas with pharmacophoric moieties. *Eur J Med Chem*, 2012, 53, 364-373.

Makoah N, Pradel G. Antimalarial drugs resistance in *Plasmodium falciparum* and the current strategies to overcome them. U: Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education, Vol. 1. Mendez-Vilas A, urednik, Badajos, Fromatex Research Center, 2013, str. 269-282.

Malaria symptoms and causes, 2018., <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/malaria/symptoms-causes/syc-20351184> , pristupljeno 8.5.2018.

Malaria, 2015., <https://www.nhs.uk/conditions/malaria/prevention/>, pristupljeno 8.5.2018.

Malaria, 2017., <https://wwwnc.cdc.gov/travel/diseases/malaria>, pristupljeno 8.5.2018.

Malaria, 2018., <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>, pristupljeno 8.5.2018.

Malaria, 2018., <http://www.who.int/malaria/en/>, pristupljeno 8.5.2018.

Manganelli G, Masullo U, Passarelli S, Filosa S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: disadvantages and possible benefits. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2013, 13, 73-82.

Marcisin SR, Reichard G, Pybus BS. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. *Pharmacol Ther*, 2016, 161, 1-10.

Mata G, do Rosario VE, Iley J, Constantino L, Moreira R. A carbamate-based approach to primaquine prodrugs: Antimalarial activity, chemical stability and enzymatic activation. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20, 886-892.

McCabe RE. Primaquine is lethal for intracellular but not extracellular *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*, 1988, 74, 748-753

Nadim B, Behrens RH. Malaria: An update for physicians. *Infect Dis Clin North Am*, 2012, 26, 243-259.

Nodiff EA, Chatterjee S, Musallam HA. Antimalarial activity of the 8 – Aminoquinolines. *Prog Med Chem*, 1991, 28, 1-40.

Ohno K, Nagahara Y, Tsunoyama K, Orita M. Are there differences between launched drugs, clinical candidates, and commercially available compounds? *J Chem Inf Model*, 2010, 50, 815-821.

Pavić K, Perković I, Cindrić M, Pranjić M, Martin-Kleiner I, Kralj M, Schols D, Hadjipavlou-Litina D, Katsori AM, Zorc B. Novel semicarbazides and ureas of primaquine with bulky aryl or hydroxyalkyl substituents: Synthesis, cytostatic and antioxidative activity. *Eur J Med Chem*, 2014, 86, 502-514.

Pavić K, Perković I, Gilja P, Kozlina F, Ester K, Kralj M, Schols D, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E, Zorc B. Design, synthesis and biological evaluation of novel primaquine-cinnamic acid conjugates of amide and acylsemicarbazide type. *Molecules*, 2016, 21, 1629-1653.

Pavić K, Perković I, Pospišilova Š, Machado M, Fontinha D, Prudencio M, Jampilek J, Coffey A, Endersen L, Rimac H, Zorc B. Primaquine hybrids as promising antimycobacterial and antimalarial agents. *Eur J Med Chem*, 2018, 143, 769-779.

Perković I, Tršinar S, Žanetić J, Kralj M, Martin-Kleiner I, Balzarini J, Hadjipavlou-Litina D, Katsori AM, Zorc B. Novel 1-acyl-4-substituted semicarbazide derivatives of primaquine – synthesis, cytostatic, antiviral and antioxidative studies. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2013, 28, 601-610.

Perković I, Antunović M, Marijanović I, Pavić K, Ester K, Kralj M, Vlainić J, Kosalec I, Schols D, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E, Zorc B. Novel urea and bis-urea primaquine derivatives with hydroxyphenyl and halogenphenyl substituents: synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem*, 2016, 124, 622-636.

Prevention and control measures for malaria, 2018., <https://ecdc.europa.eu/en/malaria/prevention-and-control>, pristupljeno 8.5.2018.

Proudfoot JR. The evolution of synthetic oral drug properties. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15, 1087-1090.

Pybus BS, Marcsisin SR, Jin X, Deye G, Sousa JC, Li Q, Caridha D, Zeng Q, Reichard GA, Ockenhouse C, Bennett J, Walker LA, Ohrt C, Melendez V. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar J*, 2013, 12, e212.

Rayan A, Marcus D, Goldblum A. Predicting oral druglikeness by iterative stochastic elimination. *J Chem Inf Model*, 2010, 50, 437-445.

Recht J, Ashley E, White N. Safety of 8-aminoquinoline antimalarial medicines. WHO, Ženeva, 2014.

Srivastava IK, Vaidya AB. A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimic Agents Chemother*, 1999, 43, 1334-1339.

Šimunović M, Perković I, Zorc B, Ester K, Kralj M, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E. Urea and carbamate derivatives of primaquine: Synthesis, cytostatic and antioxidant activities. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17, 5605-5613.

Takaoka Y, Endo Y, Yamanobe S, Kakinuma H, Okubo T, Shimazaki Y, Ota T, Sumiya S, Yoshikawa K. Development of a method for evaluating druglikeness and ease of synthesis using a data set in which compounds are assigned scores based on chemists' intuition. *J. Chem Inf Comp Sci*, 2003, 43, 1269-1275.

Tekwani BL, Walker LA. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr Opin Infect Dis*, 2006, 196, 623-31.

Ueda K, Clark DP, Chen CJ, Roninson IB, Gottesman MM, Pastan I. The human multidrug resistance (mdr1) gene, cDNA cloning and transcription initiation. *J Biol Chem*, 1987, 262, 505-508.

Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem*, 2009, 44, 937-953.

Vangapandu S, Sachdeva S, Jain M, Singh S, Pal Singh P, Lal Kaul C, Jain R. 8-quinolinamines conjugated with amino acids are exhibiting potent blood-schizontocidal antimalarial activities. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12, 239-247.

Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 2002, 45, 2615-2623.

Vercesi AE, Docampo R. Ca<sup>2+</sup> transport by digitonin permeabilized *Leishmania donovani*: effects of Ca<sup>2+</sup>, pentamidine and WR6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. *Biochem J*, 1992, 284, 463-467.

Vlainić J, Kosalec I, Pavić K, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E, Zorc B. Insights into biological activity of ureidoamides with primaquine and amino acid moieties. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2018, 33, 376-382.

Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. *Interna medicina*. Zagreb, Naklada Ljevak, 2008, str. 1616-1617.

Waring MJ. Defining optimum lipophilicity and molecular weight ranges for drug candidates- Molecular weight dependent lower log *D* limits based on permeability. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19, 2844-2851.

Wesche DL, Schuster BG, Wang WX, Woosley RL. Mechanism of cardiotoxicity of halofantrine. *Clin Pharmacol Ther*, 2000, 67, 521-529.

Wu LJ, Rabbege JR, Nagasawa H, Jacobs G, Aikawa M. Morphological effects of pyronaridine on malarial parasites. *Am J Trop Med Hyg*, 1988, 38, 30-36.

Yaro A. Mechanisms of sulfadoxine pyrimethamine resistance and health implication in *Plasmodium falciparum* malaria: A mini review. *Ann Trop Med Public Health*, 2009, 2, 20-23.

Zhang MQ, Wilkinson B. Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Curr Opin Biotech*, 2007, 18, 478-488.

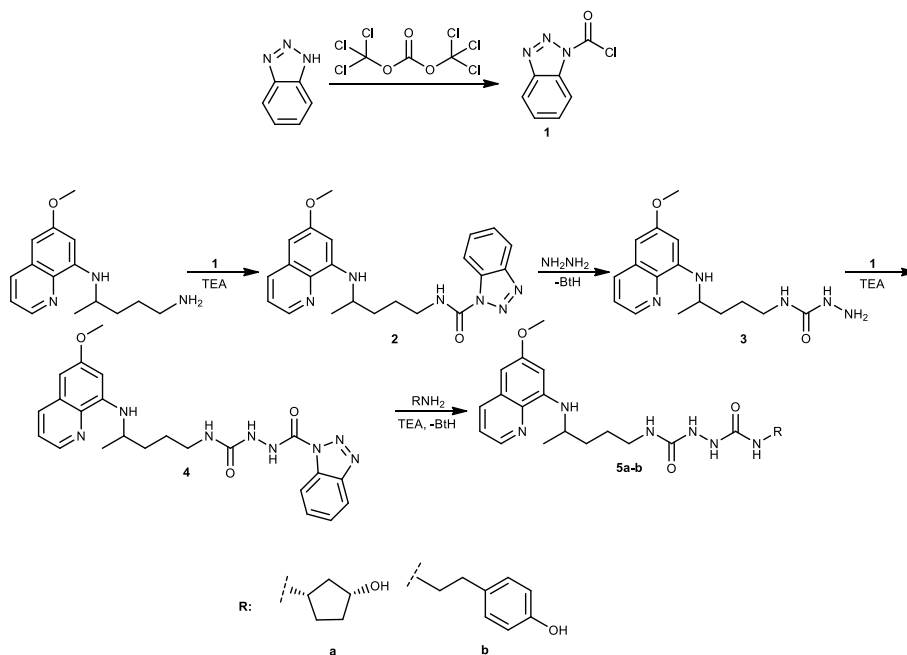
## **7. SAŽETAK/SUMMARY**



## Sinteza i karakterizacija *bis*-urea primakina s aminoalkoholima

Malarija je smrtonosna parazitska bolest tropskih i subtropskih krajeva koja se prenosi ubodom komarca roda *Anopheles*, a uzrokovana je vrstama roda *Plasmodium*. Primakin je antimalarik koji djeluje na tkivne shizonte te je jedini dostupni hipnozoitocid, a djeluje i na gametocite svih vrsta plazmodija koji uzrokuju malariju kod čovjeka. S druge strane, istraživanja pokazuju da poznati antimalarici, uključujući primakin, imaju i citostatsko djelovanje na maligne stanične linije. Stoga primakin predstavlja vrlo zanimljivu molekulu pogodnu za derivatizaciju u potrazi za novim citostaticima.

Ovaj rad je nastavak dugogodišnjih istraživanja derivata primakina u Zavodu za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Rezultati prethodnih istraživanja temelj su dizajniranja novih *bis*-urea primakina kao potencijalnih citostatika i/ili antimalarika koje u svojoj strukturi sadrže alifatski ciklički ili aromatski aminoalkohol. Sintetizirane su dvije *bis*-uree **5a-b** (Shema) koje su karakterizirane uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR). Oba spoja zadovoljavaju gotovo sve kriterije dane Lipinskijevim i Gelovanijevim pravilima, odnosno kriterijima *Bioavailability radara* (SwissADME) za male molekule. Trenutno su u tijeku ispitivanja citostatskog, antimalarijskog i antituberkuloznog djelovanja sintetiziranih spojeva koja prelaze okvire ovog rada.

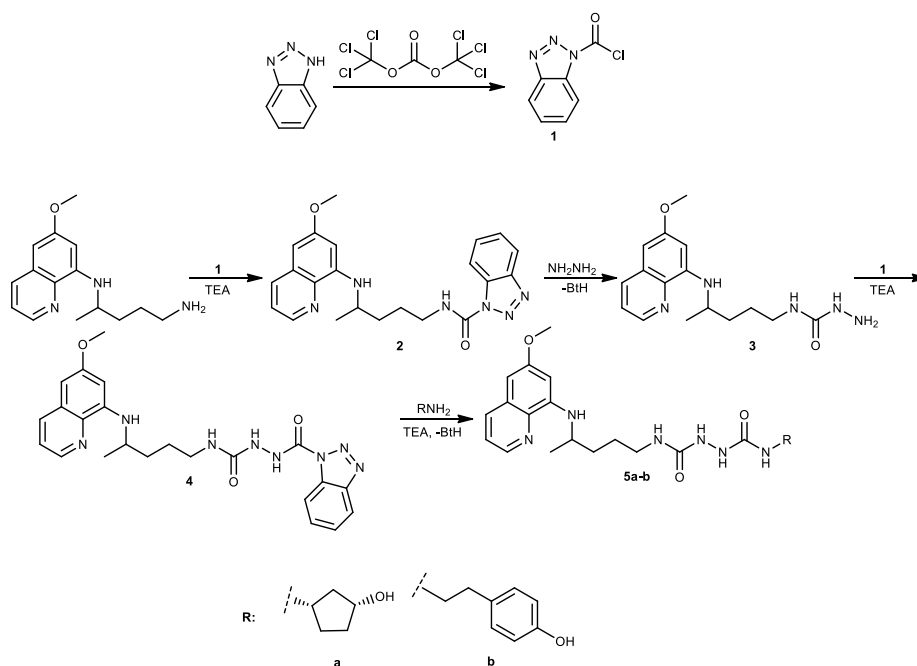


Ključne riječi : primakin, *bis*-urea, malarija, rak, aminoalkoholi

## Synthesis and characterization of primaquine *bis*-ureas with aminoalcohols

Malaria is a life-threatening parasitic disease of tropic and sub-tropic areas transmitted through the bite of infected *Anopheles* mosquito, caused by protozoa *Plasmodium*. Primaquine is an antimalarial drug effective on tissue schizonts and only hypnozoiticide available, also effective against gametocytes all plasmodiums that cause disease in humans. Furthermore, researches indicate that well-known antimalarials, including primaquine, have anticancer activity on malignant cell lines. Therefore, primaquine presents a fascinating molecule suitable for further derivatization in search for new anticancer drugs.

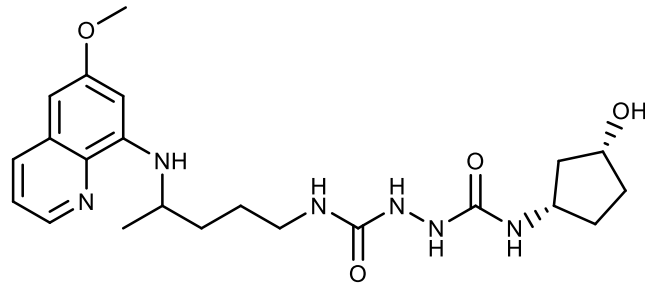
This paper is a continuum of longtime research on new primaquine derivatives as potential anticancer agents at University of Zagreb Department of Medicinal Chemistry. Results of past research represent a base for the design of novel primaquine *bis*-ureas as potential antimalarial or anticancer agents with aliphatic cyclic or aromatic aminoalcohol moieties in their structure. Newly synthesized primaquine *bis*-ureas **5a-b** (Scheme) are characterized using classical analytical and spectroscopic methods (IR, MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR). Both novel compounds have a good drug-likeness score, with most of them meeting all of the Lipinski's and/or Gelovani's rules, as well as criteria given by the Bioavailability radar (SwissADME) for small molecules. Evaluation of their anticancer, antimalarial and antitubercular activity is in progress.



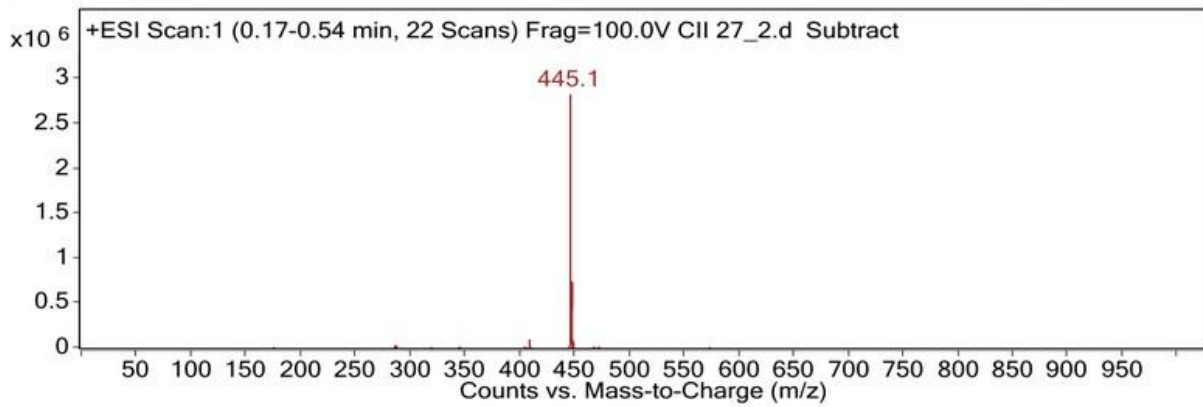
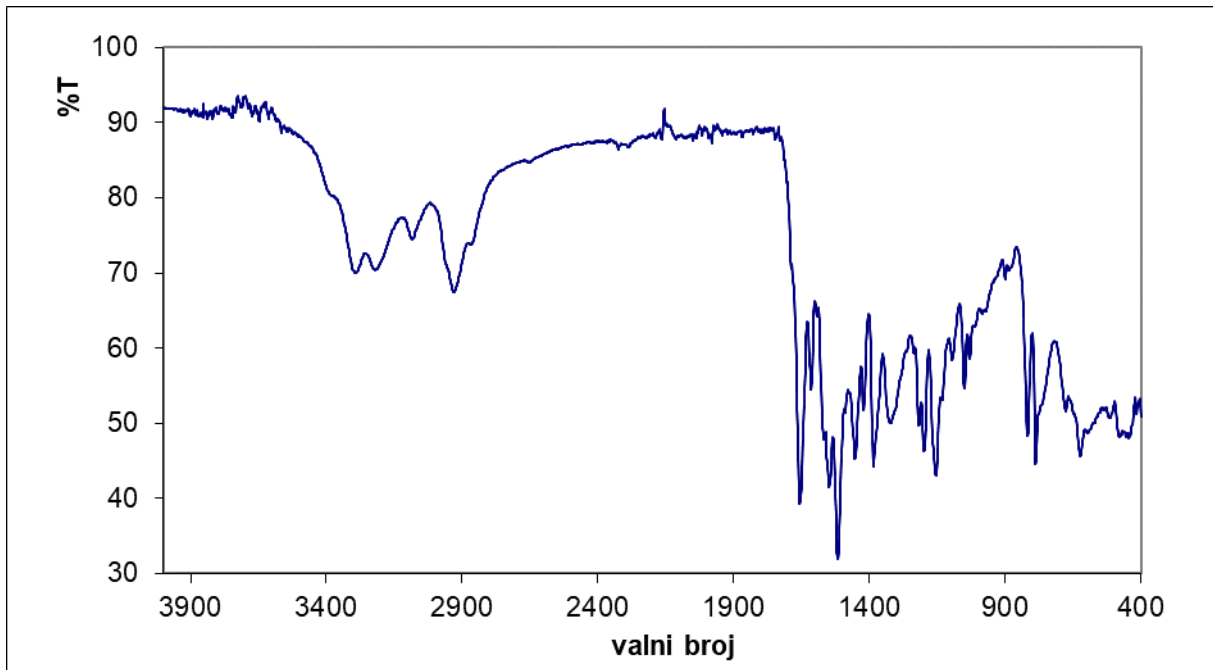
Keywords: primaquine, *bis*-urea, malaria, cancer, aminoalcohols

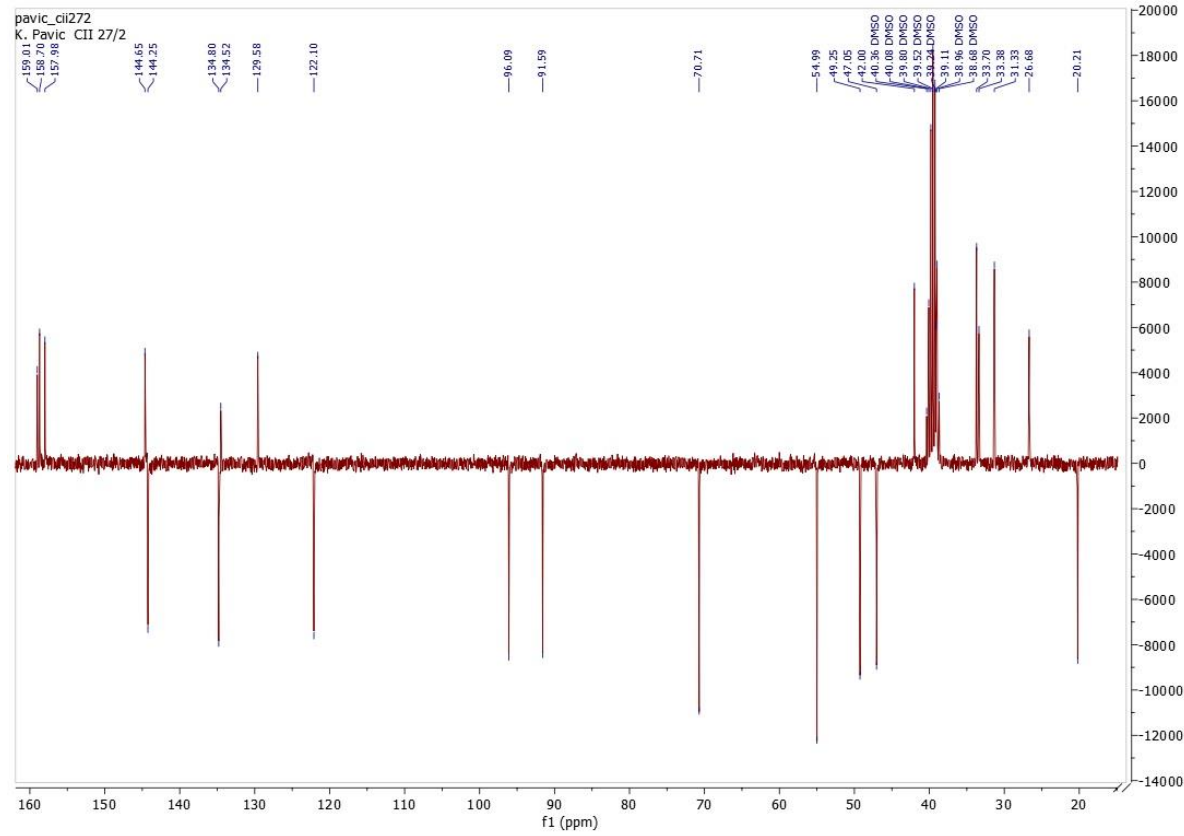
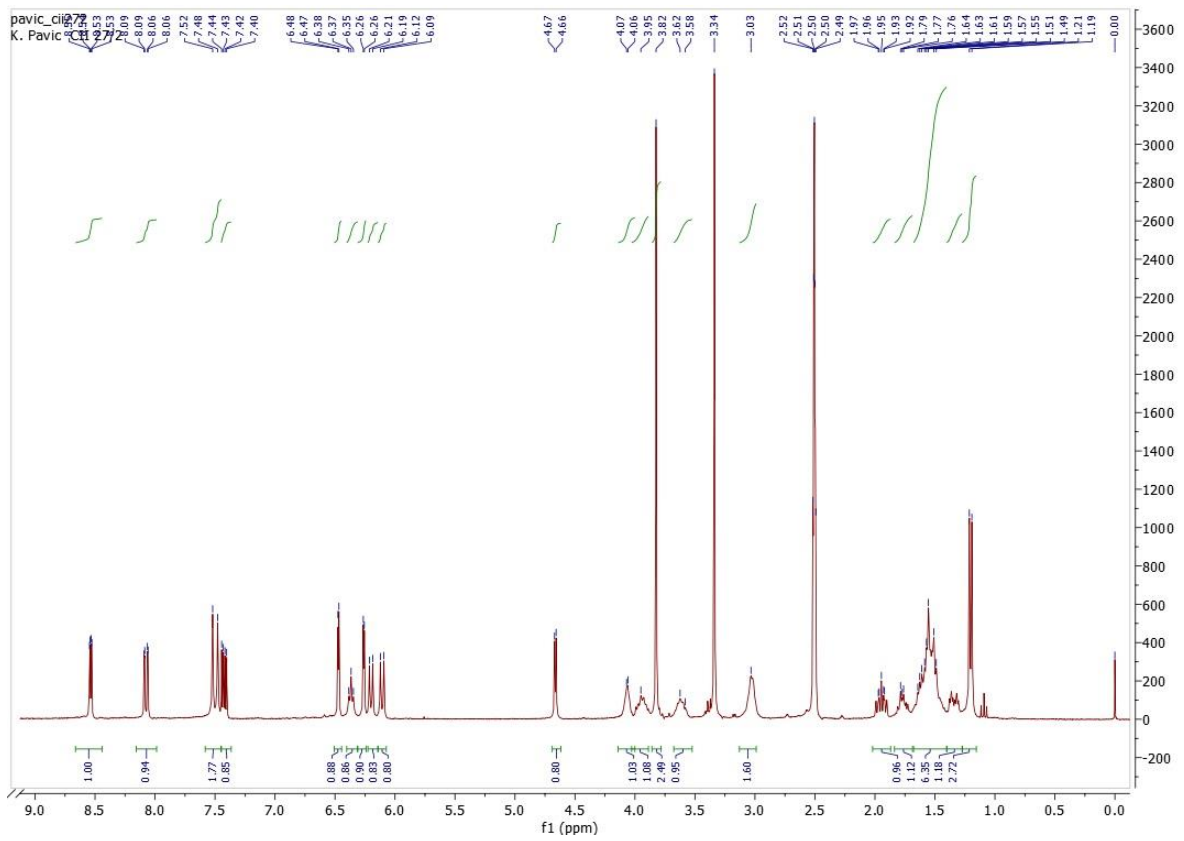
## **8. PRILOZI**

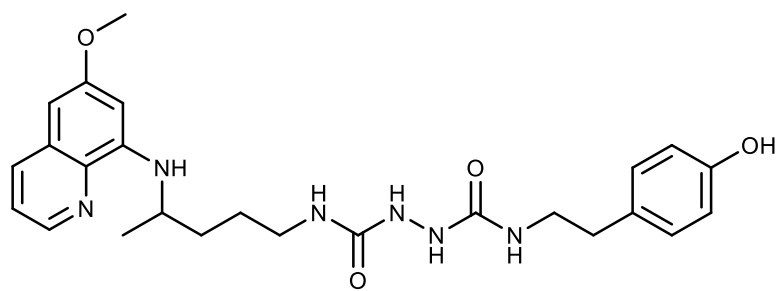
Prilozi sadrže IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR i spektre novosintetiziranih spojeva u ovom radu.



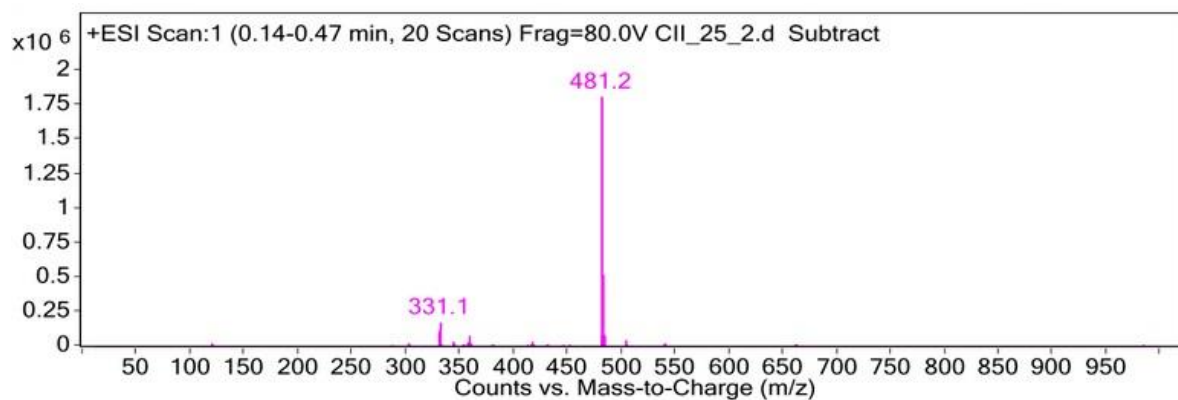
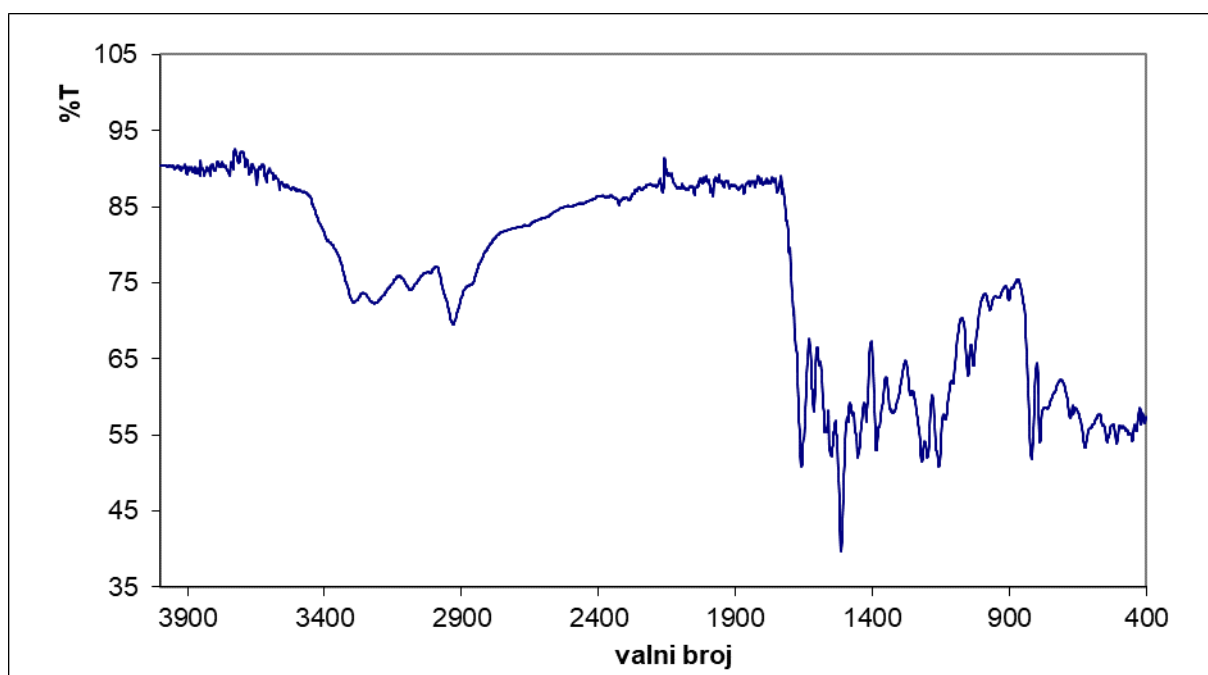
**5a**

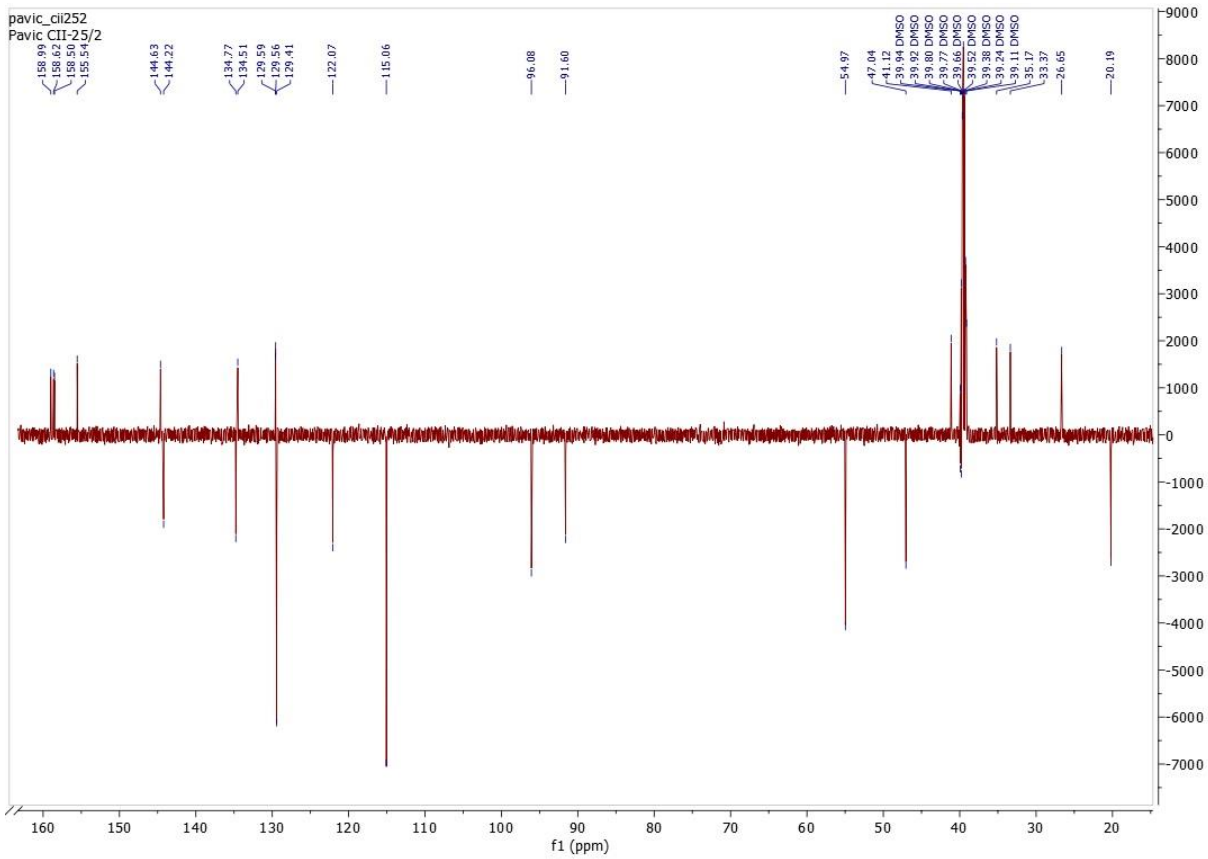
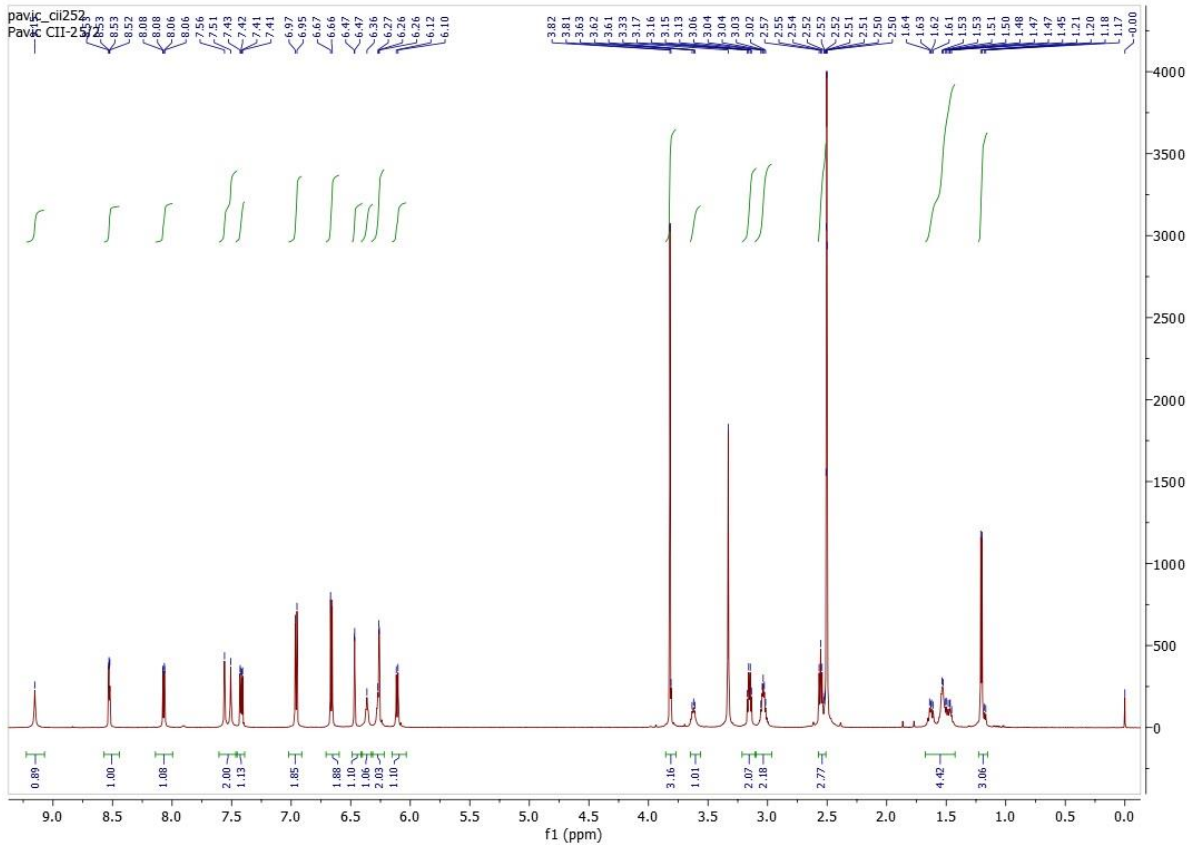






**5b**







## **9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Farmaceutsku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Sinteza i karakterizacija *bis*-urea primakina s aminoalkoholima

Hrvoje Boić

#### SAŽETAK

Malarija je smrtonosna parazitska bolest tropskih i subtropskih krajeva koja se prenosi ubodom komarca roda *Anopheles*, a uzrokovana je vrstama roda *Plasmodium*. Primakin je antimalarik koji djeluje na tkivne shizonte te je jedini dostupni hipnozoitocid, a djeluje i na gametocite svih vrsta plazmodija koji uzrokuju malariju kod čovjeka. S druge strane, istraživanja pokazuju da poznati antimalarici, uključujući primakin, imaju i citostatsko djelovanje na maligne stanične linije. Stoga primakin predstavlja vrlo zanimljivu molekulu pogodnu za derivatizaciju u potrazi za novim citostaticima.

Ovaj rad je nastavak dugogodišnjih istraživanja derivata primakina u Zavodu za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Rezultati prethodnih istraživanja temelj su dizajniranja novih *bis*-urea primakina kao potencijalnih citostatika i/ili antimalarika koje u svojoj strukturi sadrže alifatski ciklički ili aromatski aminoalkohol. Sintetizirane su dvije *bis*-uree **5a-b** koje su karakterizirane uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR). Oba spoja zadovoljavaju gotovo sve kriterije dane Lipinskijevim i Gelovanijevim pravilima, odnosno kriterijima *Bioavailability radara* (SwissADME) za male molekule. Trenutno su u tijeku ispitivanja citostatskog, antimalarijskog i antituberkuloznog djelovanja sintetiziranih spojeva koja prelaze okvire ovog rada.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 57 stranica, 15 grafičkih prikaza, 5 tablica i 87 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: primakin, *bis*-urea, malarija, rak, aminoalkoholi

Mentor: **Dr. sc. Kristina Pavić**, *asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Kristina Pavić**, *asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

**Dr. sc. Mirela Matić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Zrinka Rajić Džolić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: svibanj 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Synthesis and characterization of primaquine *bis*-ureas with aminoalcohols

Hrvoje Boić

#### SUMMARY

Malaria is a life-threatening parasitic disease of tropic and sub-tropic areas transmitted through the bite of infected *Anopheles* mosquito, caused by protozoa *Plasmodium*. Primaquine is an antimalarial drug effective on tissue schizonts and only hypnozoitocide available, also effective against gametocytes all plasmodiums that cause disease in humans. Furthermore, researches indicate that well-known antimalarials, including primaquine, have anticancer activity on malignant cell lines. Therefore, primaquine presents a fascinating molecule suitable for further derivatization in search for new anticancer drugs.

This paper is a continuum of longtime research on new primaquine derivatives as potential anticancer agents at University of Zagreb Department of Medicinal Chemistry. Results of past research represent a base for the design of novel primaquine *bis*-ureas as potential antimalarial or anticancer agents with aliphatic cyclic or aromatic aminoalcohol moieties in their structure. Newly synthesized primaquine *bis*-ureas **5a-b** are characterized using classical analytical and spectroscopic methods (IR, MS, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR). Both novel compounds have a good drug-likeness score, with most of them meeting all of the Lipinski's and/or Gelovani's rules, as well as criteria given by the Bioavailability radar (SwissADME) for small molecules. Evaluation of their anticancer, antimalarial and antitubercular activity is in progress.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 57 pages, 15 figures, 5 tables and 87 references. Original is in Croatian language.

Keywords: primaquine, *bis*-urea, malaria, cancer, aminoalcohols

Mentor: **Kristina Pavić, Ph.D.**, Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Kristina Pavić, Ph.D.**, Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Mirela Matić, Ph.D.**, Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Zrinka Rajić Džolić, Ph.D.**, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: May 2018.