

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

**Hrvoje Boić**

**Sinteza i karakterizacija druge generacije urea i  
*bis*-urea primakina s aminoalkoholima**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Zrinke Rajić Džolić i dr.sc. Kristine Pavić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

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

A549	humana stanična linija adenokarcinoma pluća alveolarnih bazalnih epitelnih stanica
BtH	benzotriazol
BtcCl	klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline
Csp3	udio $sp^3$ hibridiziranih atoma ugljika u ukupnom broju atoma ugljika u strukturi
DMSO	dimetilsulfoksid
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
GI	gastrointestinalni sustav
GLP-1	glukagonu sličan peptid-1
H540	humana stanična linija karcinoma pluća ne-malih stanica
$IC_{50}$	koncentracija koja inhibira rast 50% stanica
IR	infracrveno elektromagnetsko zračenje
KMB	krvno-moždana barijera
$\log K_p$	koeficijent propusnosti otopljene tvari kroz <i>stratum corneum</i>
$\log P$	koeficijent razdjeljenja
MCF-7	humana stanična linija adenokarcinoma dojke
MR	molarna refraktivnost
MS	masena spektrometrija
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PET	pozitronska emisijska tomografija
SW 620	humana stanična linija adenokarcinomadebelog crijeva
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TEA	trietilamin
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TPSA	topološka polarna površina molekule
$t_f$	temperatura taljenja

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Rak.....	2
1.2. Antimalarici kao citostatici.....	5
1.3. Lijekovi s fluorom .....	7
1.3.1. Inhalacijski anestetici.....	8
1.3.2. Prisutnost lijekova s fluorom .....	8
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. Sinteza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl, <b>1</b> ).....	17
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) .....	17
3.3. Sinteza urea primakina ( <b>3</b> ).....	17
3.3.1. Sinteza 1-(4-fluor-1-hidroksibutan-2-il)-3-(4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil)uree ( <b>3a</b> ) .....	17
3.3.2. Sinteza 1-(4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil)-3-(3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil)uree ( <b>3b</b> ).....	18
3.4. Sinteza semikarbazida primakina <b>4</b> (3-amino-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}urea) .....	19
3.5. Sinteza benzotriazolida semikarbazida primakina <b>5</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) .....	19
3.6. Sinteza <i>bis</i> -urea primakina ( <b>6</b> ).....	19
3.6.1. Sinteza 3-[[4-fluor-1-hidroksibutan-2-il]karbamoil]amino]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}uree ( <b>6a</b> ) .....	19
3.6.2. Sinteza 1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}-3-[[3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil]karbamoil]amino}uree ( <b>6b</b> ) .....	20
3.6.3. Sinteza 3-([1-(hidroksimetil)ciklopropil]karbamoil)amino)-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}uree ( <b>6c</b> ).....	21
3.6.4. Sinteza 3-([1-(hidroksimetil)ciklobutil]karbamoil)amino)-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}uree ( <b>6d</b> ) .....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	23
5. ZAKLJUČCI.....	34

6. ZAHVALE .....	36
7. POPIS LITERATURE .....	38
8. SAŽETAK.....	46
9. SUMMARY .....	48
PRILOZI.....	50
ŽIVOTOPIS .....	64

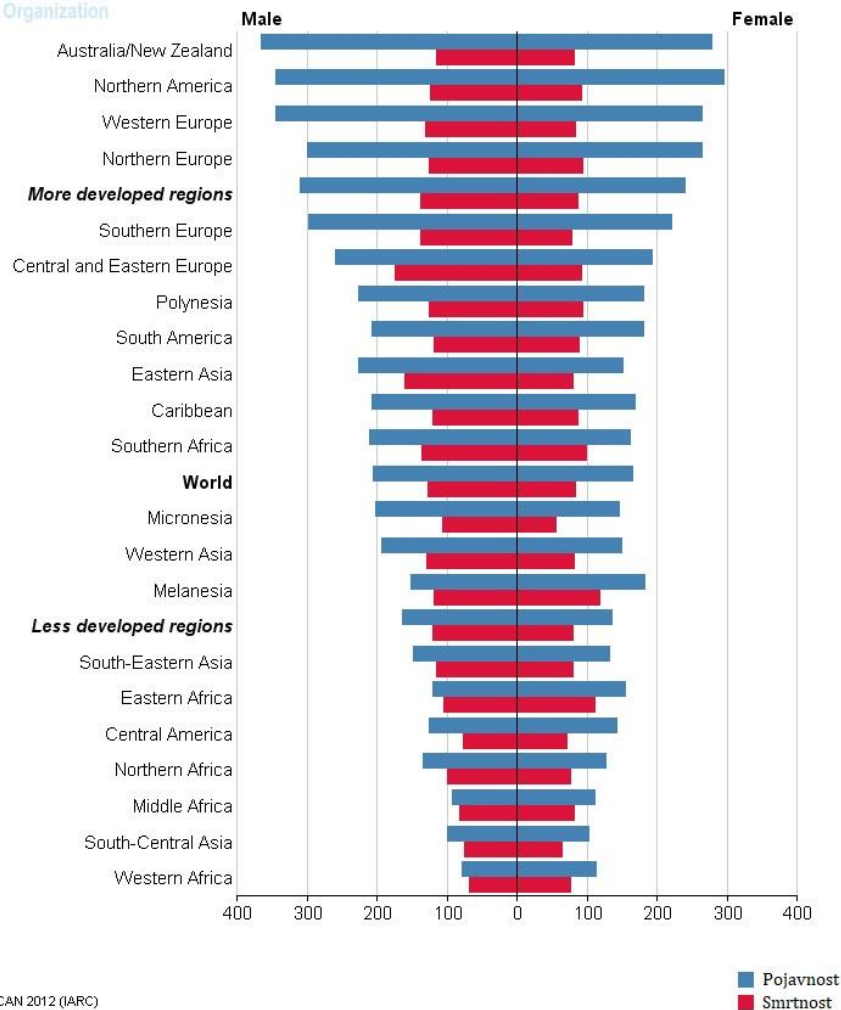
## **1. UVOD**

## 1.1. Rak

Rak predstavlja skupinu srodnih bolesti kojima je zajedničko obilježje intenzivni, nekontrolirani i invazivni rast određenih stanica u tijelu [1]. S obzirom na histologiju dijele se na šest osnovnih skupina: karcinome, leukemije, limfome, sarkome, mijelome i miješane tipove. Karcinom je rak epitelnih stanica koje prekrivaju unutarnje i vanjske površine ljudskog tijela, a različiti tipovi karcinoma predstavljaju glavninu (80–90%) svih oblika raka [2].

Značaj i status raka se promijenio u posljednjih 30 godina. Danas se brojni oblici raka mogu liječiti i izliječiti zahvaljujući napretku u dijagnostici, kirurgiji i kemoterapiji. Usprkos činjenici da rak postaje kronična bolest i da je stopa izlječenja kontinuirano u porastu, valja istaknuti da produljenje životnog vijeka, povećanje incidencije raka kod suvremenog čovjeka u zadnjih nekoliko desetljeća te sklonost mutaciji ima za posljedicu smanjenje učinkovitosti kemoterapije ili potpunu otpornost stanica raka na lijekove. Zbog svega navedenog, rak i dalje predstavlja globalni javnozdravstveni problem te je razvoj novih sigurnijih i učinkovitijih citostatika i dalje iznimno aktualno područje. Slika 1 prikazuje pojavnost i smrtnost svih oblika raka, izuzev nemelanomskog raka kože, u svijetu na 100.000 stanovnika prema GLOBOCAN-u, projektu u sklopu *Global Cancer Observatory*-ja koji je dio Svjetske zdravstvene organizacije (SZO).



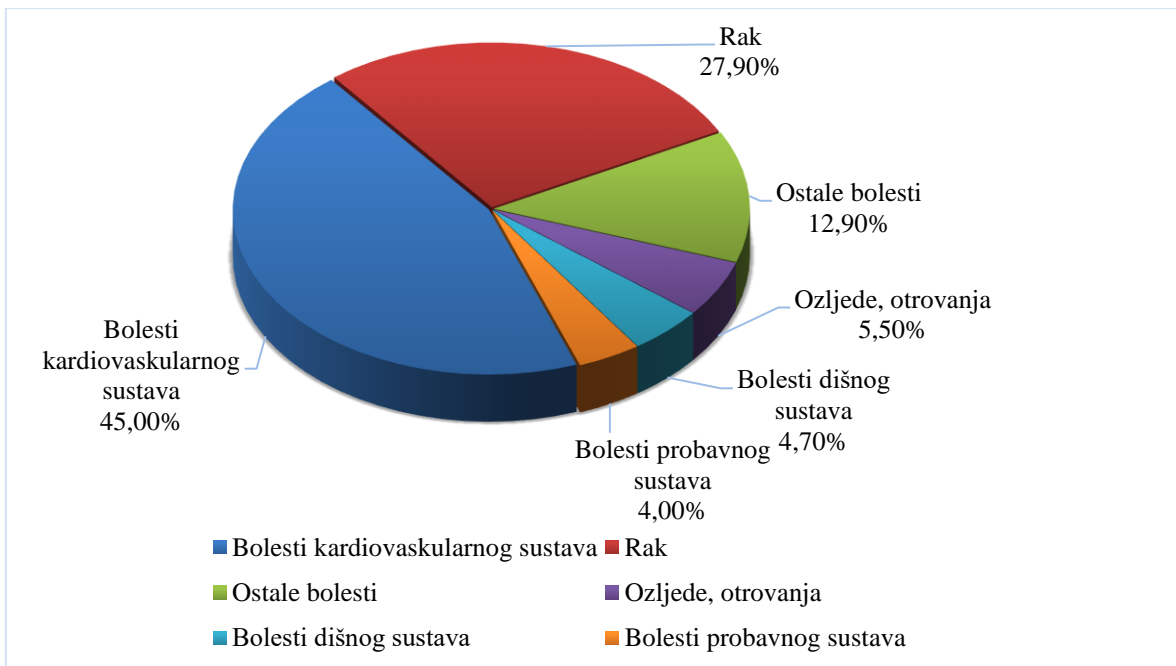


GLOBOCAN 2012 (IARC)

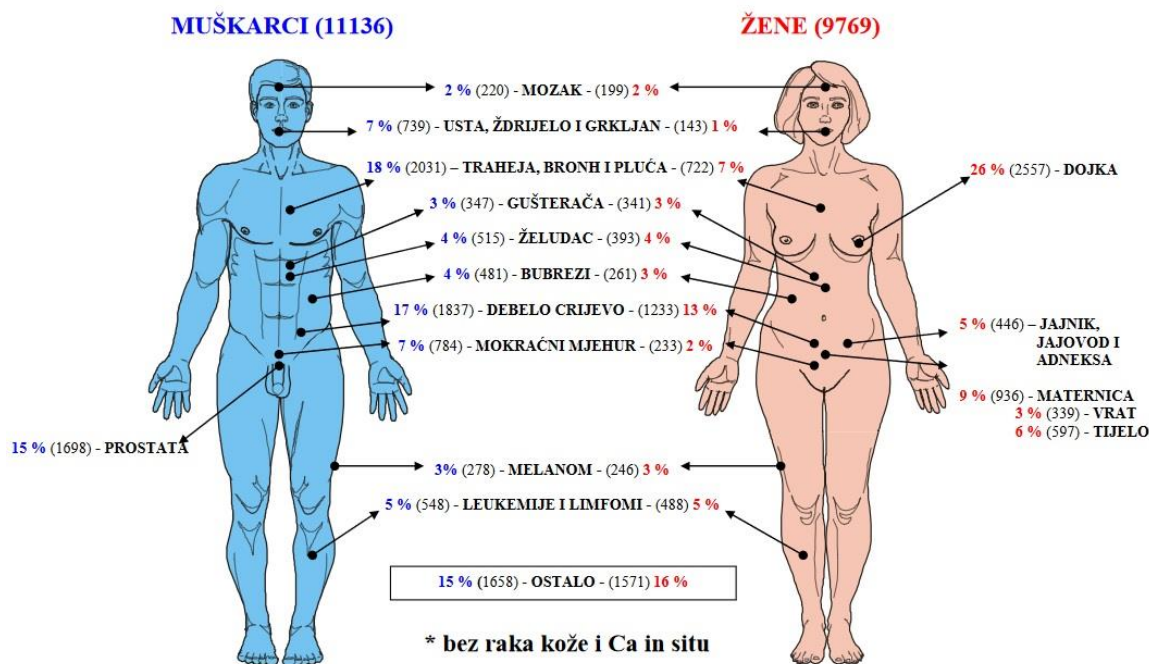
■ Pojavnost  
■ Smrtnost

**Slika 1.** Pojavnost i smrtnost raka u svijetu za 2012. g. prema GLOBOCAN-u [3]

Rak je po učestalosti drugi uzročnik smrti u svijetu prema podacima SZO te je bio uzrok smrti 8,8 milijuna ljudi u 2015. g. Primijećeno je da je pojava raka veća u razvijenim zemljama, a omjer smrtnosti naspram pojavnosti je u pravilu veći što je regija manje razvijena [3]. Prema podacima Službe za epidemiologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo rak je također drugi vodeći uzročnik smrti u 2016.g. u Republici Hrvatskoj. Slika 2 prikazuje uzroke smrti u općoj populaciji u Republici Hrvatskoj u 2016. g., a Slika 3 prikazuje raspodjelu novooboljelih od raka prema spolu i zahvaćenim organima [4]. Zanimljivo, u svijetu i u Republici Hrvatskoj muškarci češće obolijevaju od raka i smrtnost je veća u odnosu na žene.



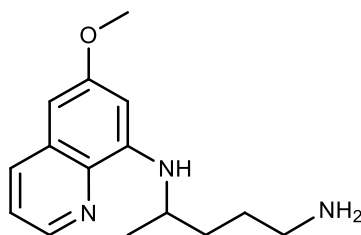
**Slika 2.** Prikaz uzroka smrti prema skupinama bolesti u 2016. godini u Republici Hrvatskoj (prilagođeno prema T. Ćorić *et al.*, 2017) [4]



**Slika 3.** Raspodjela novooboljelih od raka prema spolu i zahvaćenom organu u 2013. g. u Republici Hrvatskoj (prilagođeno prema T. Ćorić *et al.*, 2017) [4]

## 1.2. Antimalarici kao citostatici

Jedna od priznatih i češće korištenih strategija u razvoju novih lijekova je modifikacija poznatih lijekova koji se već nalaze u kliničkoj praksi. Vodeći se tom strategijom, u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta zadnjih se nekoliko godina intenzivno radi na derivatima primakina (Slika 4) kao potencijalnim citostaticima.



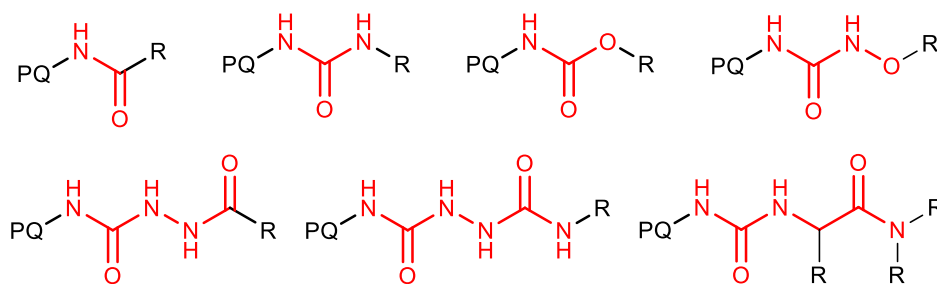
**Slika 4.** Primakin

Potencijal razvoja novih citostatika iz antimalarika uočen je prije desetak godina kada je primijećeno da su mnogi antimalarici korisni u terapiji raka [5-7]. Trenutno je poznato da čak 14 od 20 registriranih antimalarika ima citostatski učinak, a pet se nalazi u kliničkim studijama: artemizinin, artemeter, artesunat, klorokin, kinin [8, 9].

Intenzivno se proučava i istovremena upotreba citostatika i antimalarika u terapiji raka. Dokazano je da hidroksiklorokin, klorokin i primakin pojačavaju djelovanje citostatika doksorubicina i cisplatine te inhibiraju razvoj rezistencije tumorskih stanica [10]. Eksperimentalno je potvrđeno da je klorokin koristan u koadministraciji s lidamicinom, sunitinibom ili artemizininom. U kombinaciji s lidamicinom dolazi do sinergističkog učinka prema humanim staničnim linijama karcinoma pluća ne-malih stanica (H460) i adenokarcinoma pluća alveolarnih bazalnih epitelnih stanica (A549). Ova kombinacija je u drugoj fazi kliničkih ispitivanja [11]. Kombinacija sunitiniba i klorokina ima sinergistički učinak prema više vrsta stanica raka u *in vitro* i *in vivo* uvjetima [12]. Kombinacija artemizininina i klorokina ima sinergistički učinak prema više humanih staničnih linija karcinoma pluća [13]. Primakin istovremeno upotrijebljen s imatinibom mijenja klirens imatiniba, njegovu bioraspoloživost i distribuciju, što može poboljšati učinkovitost u terapiji karcinoma bubrega i mozga, ali i povećati toksičnost [14].

Klorokin, primakin i kinin su derivati kinolina. Kinolinski heterociklički sustav često je prisutan u strukturama farmakološki aktivnih spojeva. Tako su različiti derivati kinolina aktivni kao inhibitori tubulin polimeraze ili tirozin kinaze [15]. Njihov potencijal u razvoju citostatskih lijekova opisan je u revijalnom članku Afzal i suradnika. Članak donosi pregled brojnih citostatika koji u svojoj strukturi sadrže kinolinski prsten. Opisani lijekovi imaju različite mehanizme citostatskog djelovanja poput izazivanja apoptoze, inhibicije angiogeneze inhibicijom rasta stanica, prekidanjem migracije stanica i modulacijom odgovora nuklearnih receptora. Među opisanim lijekovima nalaze se brojni lijekovi koji su u eksperimentalnoj fazi, kao i oni prisutni na tržištu: irinotekan, topotekan, bosutinib, lenvatinib i kabozantinib [16].

Kao što je već spomenuto, u Zavodu za farmaceutsku kemiju zadnjih se nekoliko godina intenzivno radi na derivatima primakina kao potencijalnim citostaticima. Sintetizirano je više odsto novih spojeva: amida, urea, karbamata, *bis*-urea, semikarbazida i ureidoamida (Slika 5) [17-24].



**Slika 5.** Različiti derivati primakina dizajnirani, sintetizirani i biološki ispitani u Zavodu za farmaceutsku kemiju

Sintetizirani spojevi mogu se smatrati konjugatima primakina s različitim alkilnim, cikloalkilnim i arilnim derivatima koji su povezani razmaknicom bogatom heteroatomima tipa amida, urea, karbamata, *bis*-urea, semikarbazida i ureidoamida. Ti spojevi su evaluirani prije svega kao potencijalni citostatici, ali je mnogima ispitano i antioksidativno, antimalarijsko i antibakterijsko djelovanje. Više spojeva pokazalo je antiproliferativno djelovanje *in vitro* u niskim mikromolarnim koncentracijama prema velikom broju ispitivanih tumorskih staničnih linija i/ili selektivni učinak na pojedine stanične linije, prije svega prema humanoj staničnoj liniji adenokarcinoma dojke (MCF-7). Najveću selektivnost prema MCF-7 pokazao je simetrični derivat s dva primakinska ostatka povezana *bis*-urea razmaknicom ( $IC_{50}=0,2 \mu\text{M}$ ) [20]. Urea s 5-hidroksipentilim supstuentom na jednom atomu dušika i ostatkom primakina

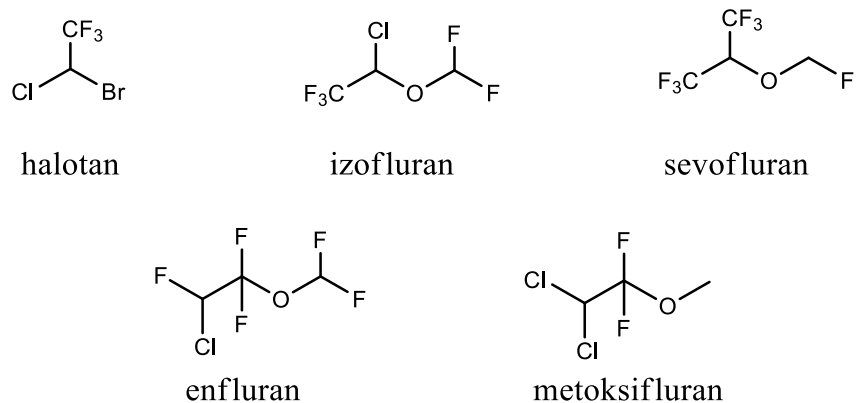
na drugom atomu dušika, pokazala je veliku selektivnost prema humanoj staničnoj liniji adenokarcinoma debelog crijeva (SW 620,  $IC_{50}=0,2 \mu\text{M}$ ) [18].

### 1.3. Lijekovi s fluorom

Organski spojevi s fluorom imaju jedinstvena fizikalno-kemijska i biokemijska svojstva, često različita od njihovih nefluoriranih analoga. Česti su sastojci agrokemijskih spojeva, lijekova i novih materijala. Uključivanje fluora ili fluoralkilne skupine u spojeve, potencijalne lijekovite tvari, gotovo da je redovita strategija kojom se može povećati afinitet vezanja na aktivno mjesto, optimirati fizikalno-kemijska svojstva (npr.  $pK_a$ ) ili povećati metabolička stabilnost potencijalnog lijeka. Također, primijećen je porast bioraspoloživosti i jačanja djelovanja potencijalne lijekovite tvari uvođenjem fluora u strukturu. Veza C-F se uvriježeno smatra bioizosterom C-O i C-H veza s obzirom na relativno male razlike u van der Waalsovima polumjerima između atoma fluora i vodika, odnosno fluora i kisika, kao i malih razlika u duljini veza C-F i C-H, odnosno C-O [25]. Stoga bi se fluorirani analozi trebali vezati za ciljni protein na istom mjestu kao i nefluorirani. Fluorirani analozi pokazuju drugačiji afinitet vezanja i selektivnost s obzirom na tip interakcija između lijeka i ciljnog proteina. Ukoliko se radi o slabijim polarnim interakcijama koje dominiraju u interakciji lijek-ciljni protein, zamjena vodika fluorom na strateškim položajima u molekuli lijeka dovodi do povećanja afiniteta vezanja. Također, uvođenje fluora u strukturu lijeka povećava metaboličku stabilnost. Naime, energija C-F veze je viša od energije C-H veze te je stoga metaboličko kidanje C-F veze manje izvjesno, nego kidanje C-H veze [26]. Ta spoznaja omogućuje racionalan pristup dizajniranju lijeka, odnosno integriranju fluora u strukturu na metabolički osjetljive položaje. Osim toga često se u molekule uvodi atom fluora u blizini neke bazične skupine, primjerice amino skupine. Naime, fluor svojim snažnim elektron odvlačućim učinkom smanjuje  $pK_a$ , odnosno bazičnost amina. Smanjena bazičnost posljedično dovodi do smanjenja protonacije amino skupine, te time ona uglavnom egzistira u neutralnoj formi i raste lipofilnost u usporedbi s analogima bez fluora [27].

### 1.3.1. Inhalacijski anestetici

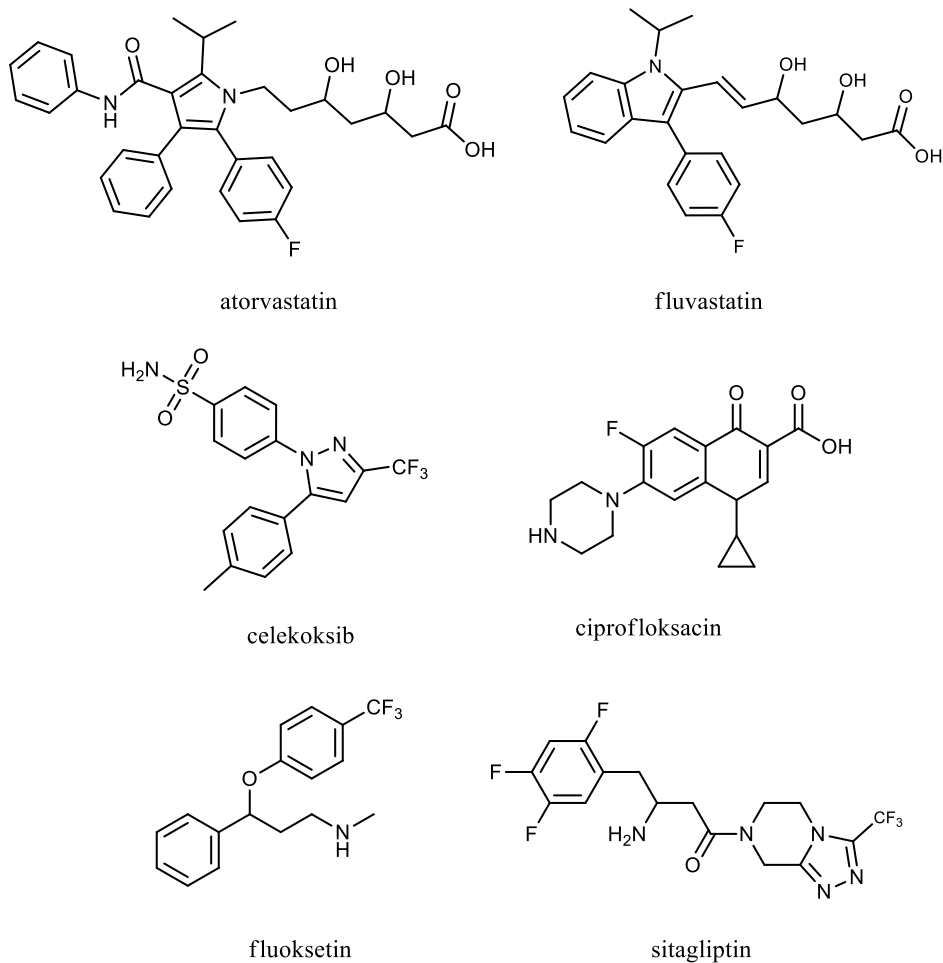
Prvi lijek koji je u strukturi sadržavao atome fluora bio je inhalacijski anestetik halotan (registriran 1955. godine). Nakon njega su otkriveni i uvedeni u praksu i drugi fluorirani anestetici (izofluran, sevofluran, enfluran, metoksifluran) (Slika 6)[28].



**Slika 6.** Fluorirani inhalacijski anestetici

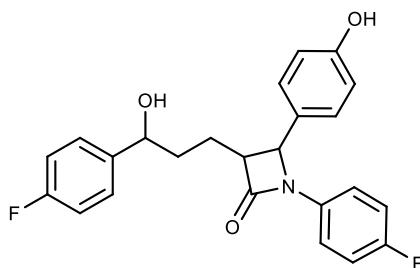
### 1.3.2. Prisutnost lijekova s fluorom

Brojne farmakološke skupine sadrže lijekove s fluorom, primjerice antibakterijski lijekovi, antiviroci, antidiabetici, protuupalni nesteroidni lijekovi (NSAID), antidepresivi, antiagregacijski lijekovi, hipolipemici te fluorirani kortikosteroidi od kojih se neki koriste kao antiastmatici, odnosno kao lokalni protuupalni lijekovi. *Blockbuster* lijekovi s fluorom su: atorvastatin i fluvastatin (antihiperlipemici), celekoksib (NSAID – COX-2 inhibitor), ciprofloksacin (antimikrobni lijek), fluoksetin (antidepresiv), sitagliptin (oralni antidiabetik) (Slika 7). Čak 20% trenutno registriranih lijekova sadrži fluor, a njihov broj brzo raste [29].



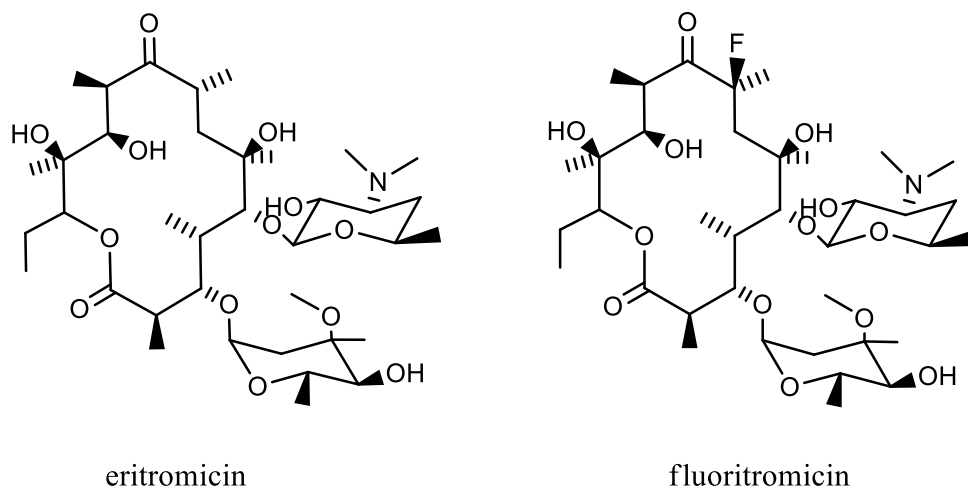
**Slika 7.** Neki registrirani lijekovi koji sadrže fluor

Iako učinak fluora na biološka svojstva nekog spoja nije u potpunosti predvidiv, često se koristi u dizajniranju novih lijekova. Uvođenje fluora na mjesto u molekuli lijeka koje je podložno metaboličkim reakcijama ili u njegovu blizinu povećava metaboličku stabilnost, a time i bioraspoloživost. Antihiperlipemik ezetimib je primjer jednog takvog lijeka (Slika 8) [30].



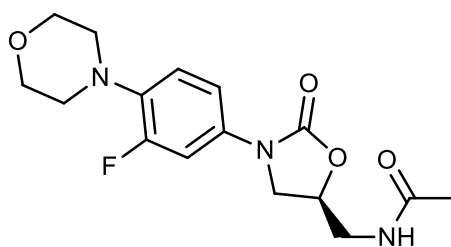
**Slika 8.** Ezetimib

Kao što je već rečeno ranije, uvođenje fluora može povećati i kemijsku stabilnost. Npr. fluoritromicin se kemijski razlikuje od eritromicina samo po atomu fluora smještenom u blizini tercijarne alkoholne skupine, što rezultira većom stabilnosti u kiseloj sredini (Slika 9). Zbog tog je fluoritromicin pogodniji za terapiju gastritisa uzrokovanog *Helicobacter pylori* [31].



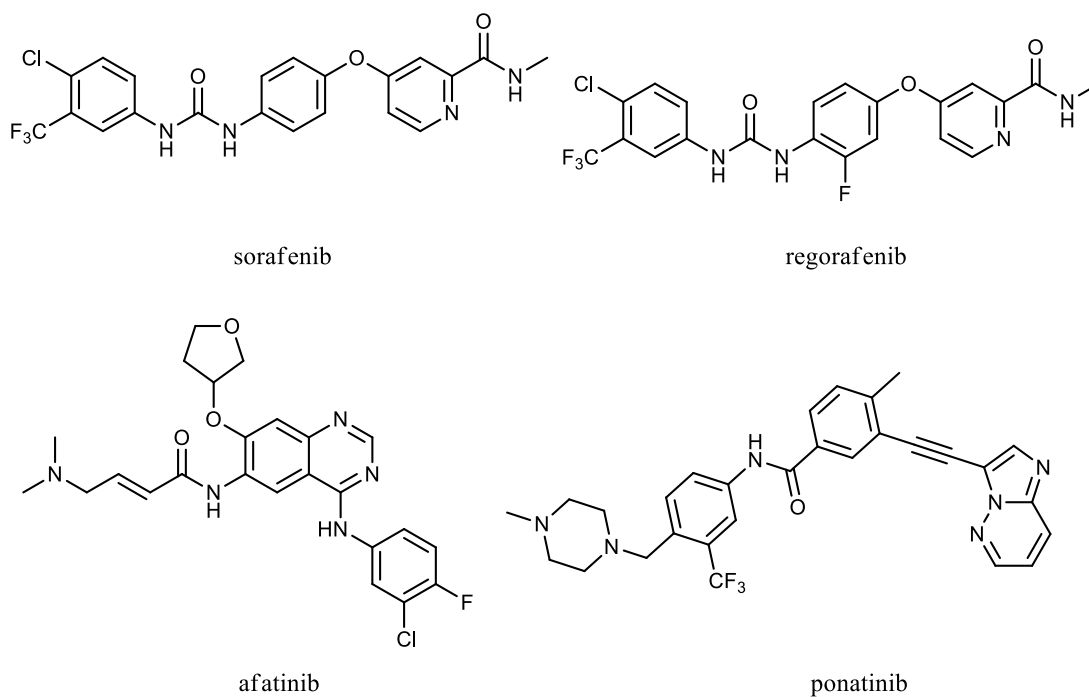
**Slika 9.** Eritromicin i fluoritromicin

Uvođenje atoma fluora u aromatski dio strukture lijeka može povećati i učinak lijeka. Primjer za to je linezolid [32], antibakterijski lijek djelotvoran na rezistentne sojeve bakterija, npr. enterokoke rezistentne na vankomicin (VRE) ili stafilokoke rezistentne na meticilin (MRSA) (Slika 10) te mnogobrojni antitumorski lijekovi: sorafenib, ponatinib, klofarabin, afatinib, regorafenib, trametinib, dabrafenib, vemurafenib (Slika 11) [33].



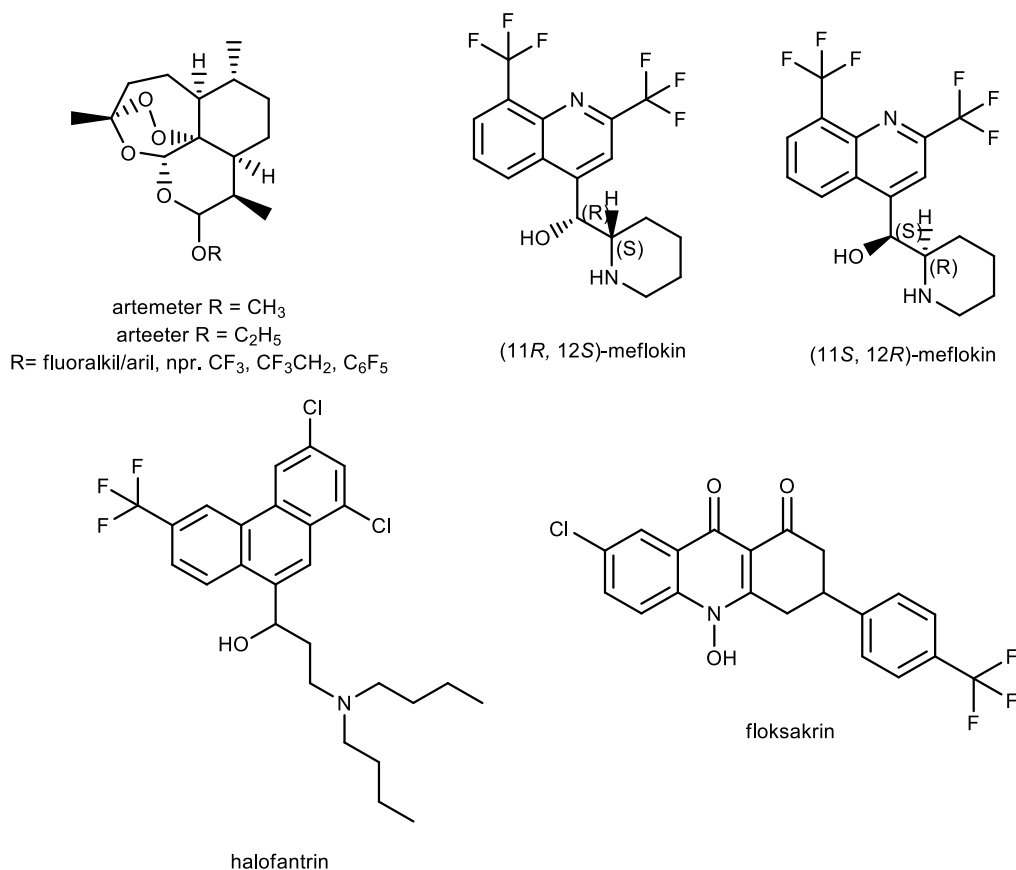
**Slika 10.** Linezolid





**Slika 11.** Neki antitumorski lijekovi s fluorom

Također treba istaknuti i da među antimalaricima (Slika 12) postoje oni koji u svojoj strukturi sadrže atome fluora. Svakako najzanimljiviji fluorirani antimalarici su oni prisutni na tržištu: halofantrin i meflokin. Zanimljivo je spomenuti kako je meflokin nastao variranjem supstituenata prethodnika, WR 7930 i SN 10275. Upravo je uvođenje fluora, odnosno  $\text{CF}_3$  supstituenta dovelo do jačanja aktivnosti i smanjenja fototoksičnosti [34]. Također postoje i antimalarici koji nisu više na tržištu, no dokazano su učinkoviti prema vrsti *Plasmodium falciparum*, poput floksakrina i fluoriranih derivata artemizinina [25].



**Slika 12.** Antimalarici s fluorom u strukturi

<sup>19</sup>F NMR spektroskopija i rendgenska strukturalna analiza kompleksa enzim-supstrat koristi se sve više za praćenje mehanizama biokemijskih reakcija te za praćenje jačine vezanja fluoriranog potencijalnog lijeka za metu [35].

Spojevi s fluorom našli su još jednu primjenu u medicini – kao dijagnostici. Izotop <sup>18</sup>F ima najdulje vrijeme poluživota među svim izotopima koji emitiraju pozitrone pa su dijagnostici markirani tim izotopom najpovoljniji za PET (*positron tomography imaging*) dijagnostiku neurodegenerativnih bolesti (Alzheimerova i Parkinsonova bolest) i epilepsije [36].

Zadnjih godina intenzivno se razvijaju peptidi i proteini povećane termičke i proteolitičke stabilnosti koji sadrže nekласične aminokiseline, poput fluoriranog kolagena i fluoriranog glukagonu sličnog peptida (GLP-1), koji imaju potencijalnu primjenu kao lijekovi [37].

## **2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija druge generacije urea i *bis*-urea primakina s aminoalkoholima.

Dizajniranje ciljnih spojeva temelji se na pregledu literaturnih podataka te rezultata istraživanja u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Mnogi od ispitanih spojeva pokazali su citostatsko djelovanje *in vitro* u niskim mikromolarnim koncentracijama na velik broj ispitanih tumorskih staničnih linija i/ili selektivan učinak na pojedine stanične linije[17-21, 23]. Među opisanim spojevima isticala se urea s 5-hidroksipentilnim supstituentom na jednom atomu dušika i primakinskim ostatkom na drugom atomu dušika koja je vrlo selektivna prema humanoj staničnoj liniji SW620 ( $IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ ).

Imajući na umu gore navedene činjenice, dizajnirane i sintetizirane druge generacije urea i *bis*-urea primakina. Aminoalkoholni dio strukture zamijenjen je fluoralkilnim aminoalkoholima, odnosno rigidnijim aminoalkoholima.

U ovom radu opisan je dio tih istraživanja – sinteza i karakterizacija druge generacije urea i *bis*-urea primakina s aminoalkoholima. Sintetizirani spojevi su karakterizirani uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama. Računalnim programima predviđena su fizikalno-kemijska svojstva koja utječu na farmakokinetičke parametre. Tim spojevima naknadno će biti ispitano citostatsko i antimalarijsko 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. MATERIЈALI I METODE**

Tališta ( $t_r$ ) 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 etil-acetat/metanol (1:1), etil-acetat/metanol (1:1,5), cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5), cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,75), 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 i 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 cijevčicama 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 3-amino-1,1,1-trifluorpropan-2-ol hidroklorid, (1-aminociklobutil)metanol, (1-aminociklopropil)metanol hidroklorid i 2-amino-4-fluorbutan-1-ol 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 diklormetan dobiven je na sljedeći način: diklormetan je ekstrahiran vodom, sušen nad kalcijevim kloridom i predestiliran, te čuvan nad aktiviranim molekulskim sitima. 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 (BtcCl, 1)

Klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline **1** pripravljen je prema poznatom propisu [38]. Smjesa 0,596 g (0,005 mol) benzotriazola i 0,991 g (0,00334 mol) trifozgena 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)

Spoj je sintetiziran prema ranije opisanom postupku[17].IR spektar i talište benzotriazolida primakina **2** u potpunosti odgovaraju ranije sintetiziranom spoju.

### 3.3. Sinteza urea primakina (**3**)

**Opća metoda:** Smjesa 0,201 g (0,510 mmol) benzotriazolida primakina **2**, 1,109 mmol aminoalkohola i 0,142mL (1,109 mmol) TEA u suhom diklormetanu (2 mL) grijana je 0,5 h na 65 °C u mikrovalnom reaktoru snage valova 300 W u prisutnosti nekoliko miligrama natrijevog ditionita. Ukoliko je aminoalkohol bio u obliku soli, dodano je dodatnih 1,019 mmol TEA. Otapalo je uklonjeno uparavanjem pod sniženim tlakom.

#### 3.3.1. Sinteza 1-(4-fluor-1-hidroksibutan-2-il)-3-(4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil)uree (**3a**)

Količina reaktanta: 0,109g 2-amino-4-fluorbutan-1-ola.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretne faze cikloheksan/etil-acetat (1:1,5) i cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,75).Stajanjem na 4°C iz smjese aceton/cikloheksan kristalizirao je čisti produkt **3a**.

Iskorištenje: 0,172g (86%)

$t_{65,5-68^{\circ}\text{C}}$ .

IR (ATR):  $\nu_{\max}$  3290, 2924, 2854, 1712, 1614, 1564, 1514, 1450, 1421, 1385, 1219, 1196, 1157, 1034, 949, 818, 783, 617  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,54-8,53 (dd,  $J = 1,56, 4,15$ , 1H, 10), 8,08-8,07 (dd,  $J = 1,50, 8,23$ , 1H, 12), 7,43-7,41 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,26 (s, 1H, 14), 5,91-5,89 (d,  $J = 8,70$ , 1H, 7), 5,91-5,89 (t,  $J = 5,58$ , 1H, 1), 5,69-5,67 (d,  $J = 8,49$ , 1H, 2'), 4,73-4,72 (t,  $J = 5,29$ , 1H, 5''), 4,49-4,40 (m, 2H, 3''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,65-3,62 (m, 2H, 5, 1''), 3,38-3,27 (m, 2H, 4''), 3,00 (m, 2H, 2), 1,94-1,85, 1,67-1,61, 1,54-1,42 (3m, 6H, 3, 4, 2''), 1,22-1,20 (d,  $J = 6,32$ , 3H, 6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 159,00 (15), 157,83 (1'), 144,62 (8), 144,22 (10), 134,77 (12), 134,51 (9), 129,56 (13), 122,07 (11), 96,10 (16), 91,63 (14), 82,08-81,01 (d,  $J_1 = 161,35$ , 3''), 63,66 (4''), 54,96 (17), 47,62 (1''), 47,04 (5), 39,02 (2), 33,52 (4), 32,63-32,50 (d,  $J_2 = 19,40$ , 2''), 26,83 (3), 20,21 (6).

MS/MS ( $m/z$ ): 393,1 ( $\text{M}+1$ )<sup>+</sup>, 286,0 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2^+$ ).

### 3.3.2. Sinteza 1-(4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil)-3-(3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil)uree (3b)

Količina reaktanta: 0,183 g 3-amino-1,1,1-trifluorpropan-2-ol hidroklorida.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat (1:1). Prekristalizacijom iz smjese aceton/petroleter dobiven je čisti produkt **3b**.

Iskorištenje: 0,185 g (88%).

$t_t$  108–110,5 °C.

IR (ATR):  $\nu_{\max}$  3321, 2914, 2854, 1610, 1556, 1514, 1448, 1421, 1385, 1259, 1221, 1178, 1140, 1113, 1049, 816, 789, 619  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,54-8,53 (dd,  $J = 1,60, 4,16$ , 1H, 10), 8,08-8,07 (dd,  $J = 1,56, 8,25$ , 1H, 12), 7,43-7,41 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,41-6,40 (d,  $J = 6,24$ , 1H, 2'), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12-6,11 (m, 2H, 7, 4''), 6,01-5,99 (t,  $J = 5,68$ , 1H, 1), 3,95-3,93 (m, 1H, 2''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,63-3,61 (m, 1H, 5), 3,42-3,32 (m, 1H, 1''), 3,02-3,01 (m, 3H, 2, 1''), 1,65-1,45 (m, 4H, 3, 4), 1,22-1,21 (d,  $J = 6,30$ , 3H, 6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 159,00 (15), 158,10 (1'), 144,62 (8), 144,22 (10), 134,77 (12), 134,51 (9), 129,56 (13), 128,13-122,50 (q,  $J = 282,61$ , 3''), 122,07 (11), 96,10 (16),



91,62 (14), 68,53-67,98 (q,  $J = 28, 2''$ ), 54,95 (17), 47,03 (5), 39,66 (1''), 39,02 (2), 33,49 (4), 26,78 (3), 20,21(6).

MS/MS ( $m/z$ ): 415,0 ( $M+1$ )<sup>+</sup>, 286,0 ( $C_{16}H_{20}N_3O_2^+$ ).

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

Spoj je sintetiziran prema ranije opisanom postupku [20]. IR spektar i talište semikarbazida primakina 4 u potpunosti odgovaraju ranije sintetiziranom spoju.

### **3.5. Sinteza benzotriazolida semikarbazida primakina 5 (N-[[{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}karbamoil)amino]-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-karboksamid)**

Spoj je sintetiziran prema ranije opisanom postupku [20]. Otopina sirovog spoja 5 korištena je bez pročišćavanja u sintezi spojeva 6a-d.

### **3.6. Sinteza bis-urea primakina (6)**

**Opća metoda:** Otopini 0,232 g (0,5 mmol) spoja 5 u dioksanu (8 mL) uz miješanje je dokapana otopina 0,5 mmol aminoalkohola i 0,070mL (0,5 mmol) TEA u dioksanu (6 mL), odnosno 0,101 g (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.

#### **3.6.1. Sinteza 3-[[{4-fluor-1-hidroksibutan-2-il}karbamoil]amino]-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}uree (6a)**

Količina reaktanta: 0,054g 2-amino-4-fluorbutan-1-ola.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (9:1). Rastrljavanjem u eteru dobiven je čisti produkt **6a**.

Iskorištenje: 0,173 g(77%).

$t_r$  121,5–124°C.

IR (ATR):  $\nu_{\max}$  3284, 2910, 1647, 1612, 1552, 1514, 1448, 1419, 1383, 1194, 1151, 1051, 1034, 1026, 941, 895, 816, 787  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,55-8,53 (dd,  $J = 1,37, 4,06$ , 1H, 10), 8,09-8,06 (dd,  $J = 1,26, 8,21$ , 1H, 12), 7,59 (s, 1H, 3'), 7,52 (s, 1H, 2'), 7,45-7,40 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,41 (t,  $J = 5,35$ , 1H, 1), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12-6,10 (d,  $J = 8,71$ , 2H, 7, 5'), 4,74-4,70 (t,  $J = 5,36$ , 1H, 5''), 4,55-4,51, 4,39-4,35 (2t,  $J = 6,14$ , 2H, 3''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,70-3,62 (m, 1H, 5, 1''), 3,44-3,26 (m, 4'', djelomično prekriven signalom  $\text{H}_2\text{O}$ ), 3,04 (m, 1H, 2), 1,93-1,07 (m, 6H, 3, 4, 2''), 1,21-1,19 (d,  $J = 6,20$ , 3H, 6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 159,01 (15), 158,65, 158,41 (1', 4'), 144,65 (8), 144,25 (10), 134,81 (12), 134,53 (9), 129,58 (13), 122,11 (11), 96,09 (16), 91,59 (14), 82,53-80,40 (d,  $J_1 = 166,41$ , 3''), 63,49 (4''), 54,99 (17), 47,64-47,57 (d,  $J_3 = 2,94$ , 1''), 47,06 (5), 39,13 (2), 33,37 (4), 32,37-32,11 (d,  $J_2 = 19,92$ , 2''), 26,69 (3), 20,20 (6).

MS/MS ( $m/z$ ): 451,2 ( $\text{M}+1$ )<sup>+</sup>.

### 3.6.2. Sinteza 1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}-3-[(3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil)karbamoil]amino}uree (**6b**)

Količina reaktanta: 0,083 g 3-amino-1,1,1-trifluorpropan-2-ol hidroklorida.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (9:1). Rastrljavanjem u eteru dobiven je čisti produkt **6b**.

Iskorištenje: 0,097 g (41%).

$t_r$  163–165,5°C.

IR (ATR):  $\nu_{\max}$  3273, 3201, 3072, 2918, 1649, 1585, 1550, 1516, 1450, 1419, 1383, 1321, 1259, 1194, 1126, 1111, 1049, 816, 787, 617, 455, 451  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,54-8,53 (dd,  $J = 1,54, 4,17$ , 1H, 10), 8,09-8,06 (dd,  $J = 1,50, 8,29$ , 1H, 12), 7,79 (s, 1H, 3'), 7,57 (s, 1H, 2'), 7,45-7,40 (m, 1H, 11), 6,48-6,47 (m, 2H, 16, 5'), 6,40-6,34 (m, 2H, 1, 4''), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12-6,10 (d,  $J = 8,74$ , 1H, 7), 4,06-3,97 (m, 1H, 2''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,63 (m, 1H, 5), 3,43-3,36, 3,14-3,02 (2m, 4H, 2, 1''), 1,61-1,50 (m, 4H, 3, 4), 1,21-1,19 (d,  $J = 6,25$ , 3H, 6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 159,01 (15), 158,77, 158,58 (1', 4'), 144,65 (8), 144,25 (10), 134,81 (12), 134,53 (9), 130,94-119,65 (q,  $J_1 = 286,23$ , 3"), 129,59 (13), 122,11 (11), 96,09 (16), 91,59 (14), 68,56-67,42 (q,  $J_2 = 28,53$ , 2"), 54,99 (17), 47,05 (5), 39,68 (1"), 39,18 (2), 33,39 (4), 26,68 (3), 20,21 (6).

MS/MS ( $m/z$ ): 473,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>, 286,1 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2^+$ ).

### 3.6.3. Sinteza 3-([1-(hidroksimetil)ciklopropil]karbamoil)amino)-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}uree (6c)

Količina reaktanta: 0,062g (1-aminociklopropil)metanol hidroklorida.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (9:1). Rastrljavanjem u eteru dobiven je čisti produkt **6c**.

Iskorištenje: 0,129g (60%).

$t_r$  154–156,5 °C.

IR (ATR):  $\nu_{\text{max}}$  3273, 3194, 3068, 2914, 2850, 1655, 1612, 1527, 1514, 1450, 1419, 1383, 1288, 1194, 1163, 1153, 1024, 814, 787, 667, 596  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,55-8,53 (dd,  $J = 1,57$ , 4,17, 1H, 10), 8,09-8,06 (dd,  $J = 1,51$ , 8,29, 1H, 12), 7,55 (s, 1H, 3'), 7,45 (s, 1H, 2'), 7,43-7,40 (m, 1H, 11), 6,52 (s, 1H, 5'), 6,47 (s, 1H, 16), 6,36-6,32 (t,  $J = 5,67$ , 1H, 1), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12-6,09 (d,  $J = 8,72$ , 1H, 7), 4,72-4,69 (t,  $J = 5,58$ , 1H, 5"), 3,82 (s, 3H, 17), 3,62 (m, 1H, 5), 3,38-3,36 (d,  $J = 5,63$ , 2H, 4"), 3,03-2,98 (q,  $J = 7,27$ , 11,85, 2H, 2), 1,61-1,45 (m, 4H, 3, 4), 1,21-1,19 (d,  $J = 6,25$ , 3H, 6), 0,66-0,56 (m, 4H, 2", 3").

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 159,01 (15), 158,63 (1', 4'), 144,65 (8), 144,25 (10), 134,80 (12), 134,52 (9), 129,58 (13), 122,11 (11), 96,09 (16), 91,60 (14), 65,29 (4"), 54,99 (17), 47,03 (5), 39,02 (2), 34,17 (1"), 33,37 (4), 26,68 (3), 20,22 (6), 11,12 (2", 3").

MS/MS ( $m/z$ ): 431,2 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

### 3.6.4. Sinteza 3-([1-(hidroksimetil)ciklobutil]karbamoil)amino)-1-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}uree (6d)

Količina reaktanta: 0,051 g (1-aminociklobutil)metanola.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (9:1). Rastrljavanjem u eteru dobiven čisti produkt **6d**.

Iskorištenje: 0,167 g (75%).

$t_r$  128–131°C.

IR (ATR):  $\nu_{\max}$  3273, 3207, 3062, 2924, 2848, 1647, 1612, 1554, 1527, 1514, 1448, 1390, 1383, 1286, 1194, 1167, 1153, 1047, 1026, 814, 787, 617, 463  $\text{cm}^{-1}$ .

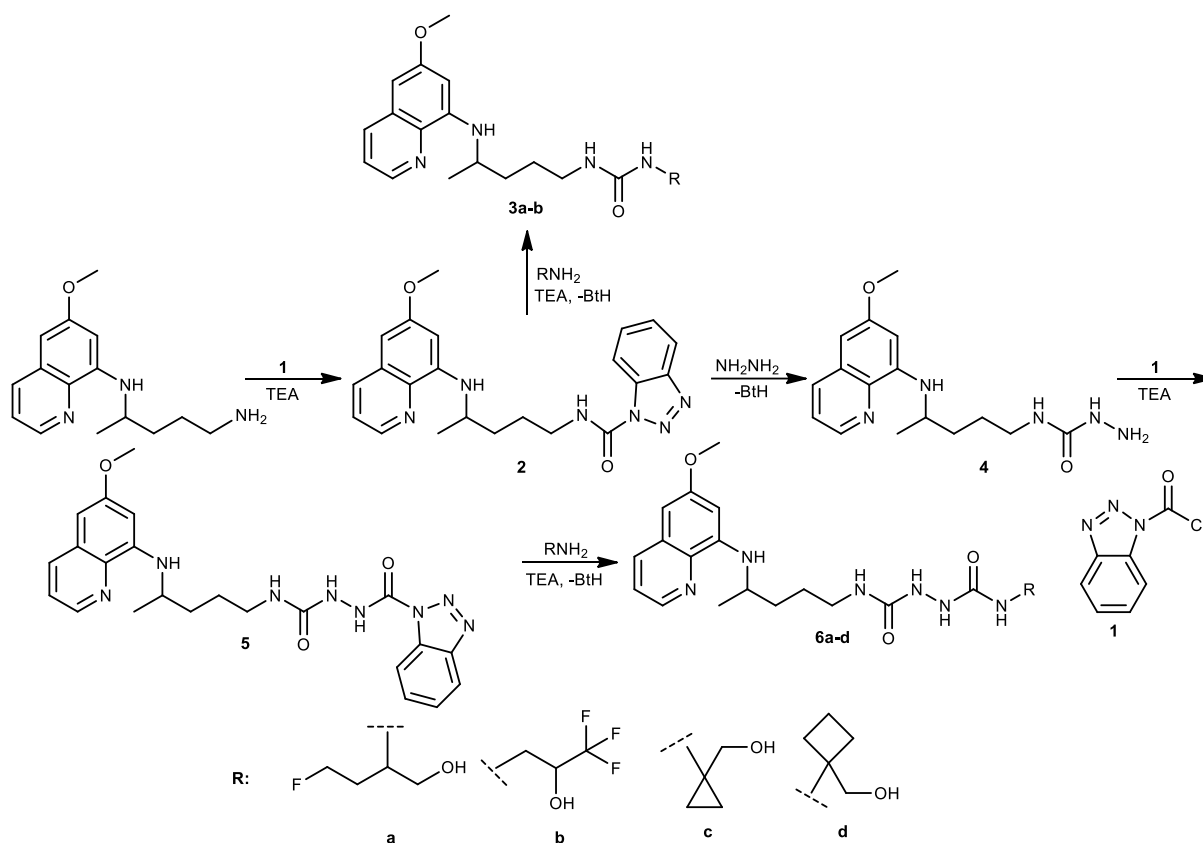
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,54–8,52 (dd,  $J = 1,49, 4,16$ , 1H, 10), 8,09–8,06 (dd,  $J = 1,39, 8,27$ , 1H, 12), 7,53 (s, 1H, 3'), 7,47 (s, 1H, 2'), 7,44–7,40 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,41–6,37 (t,  $J = 5,49$ , 1H, 1), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12–6,09 (d+s, 2H, 7, 5'), 4,88–4,84 (t,  $J = 5,60$ , 1H, 6''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,62 (m, 1H, 5), 3,47–3,45 (d,  $J = 5,58$ , 2H, 5''), 3,04–3,02 (q,  $J = 7,35, 11,08$ , 1H, 2), 2,30–2,20, 1,94–1,88, 1,62–1,51 (m, 10H, 3, 4, 2''–4''), 1,21–1,19 (d,  $J = 6,24$ , 3H, 6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 159,01 (15), 158,70, 157,93 (1', 4'), 144,65 (8), 144,24 (10), 134,80 (12), 134,53 (9), 129,58 (13), 122,10 (11), 96,09 (16), 91,59 (14), 65,48 (5''), 56,62 (1''), 54,99 (17), 47,04 (5), 39,02 (2), 33,37 (4), 29,17 (2'', 4''), 26,68 (3), 20,21 (6), 13,80 (3'').

MS/MS ( $m/z$ ): 445,2 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

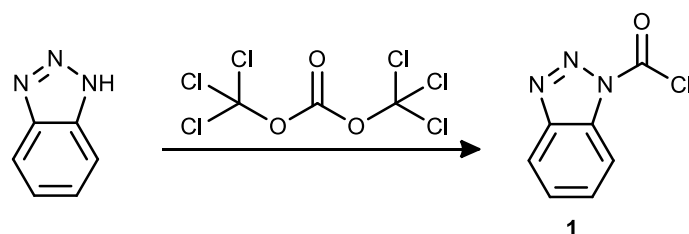
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu sintetizirani su derivati primakina, uree **3a-b** i bis-uree **6a-d**, do sada neopisane u literaturi. Njihova sinteza provedena je prema Shemi 1.



**Shema 1.** Shema sinteze urea **3a-b** i bis-urea primakina **6a-d**

U prvom sintetskom koraku primakin u reakciji s kloridom 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl, **1**) daje benzotriazolid primakina **2** [17]. BtcCl je priređen reakcijom benzotriazola (BtH) s trifozgenom prema Shemi 2 [38].



**Shema 2.** Sinteza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl, **1**)

Benzotriazolid primakina **2** je reaktivan spoj pogodan za sintezu različitih derivata primakina, npr. urea i semikarbazida [17]. Sinteza urea **3** provedena je aminolizom spoja **2** odgovarajućim aminoalkoholima u suhom diklormetanu. U ovim reakcijama upotrijebljena je dvostruko veća količina aminoalkohola kako bi se ravnoteža reakcije pomaknula na stranu produkata.

Reakcijom spoja **2** s hidrazinom priređen je semikarbazid primakina **4** [20]. Spoj **4** u reakciji s BtcCl daje benzotriazolid semikarbazida primakina **5** [20] koji je bez daljnjeg čišćenja upotrijebljen za sintezu *bis*-urea **6a-d**. Sinteza *bis*-urea **6** provedena je reakcijom spoja **5** i odgovarajućeg aminoalkohola u dioksanu.

U sintezi su korištena četiri različita aminoalkohola: dva ciklička (1-aminociklopropil)metanol hidroklorid i (1-aminociklobutil)metanol, te dva alifatska aminoalkohola koja u svojoj strukturi sadrže atom fluora (2-amino-4-fluorbutan-1-ol, 3-amino-1,1,1-trifluorpropan-2-olhidroklorid). Sintetizirane su sljedeće uree:

- 1-(4-fluor-1-hidroksibutan-2-il)-3-(4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil)urea (**3a**),
- 1-(4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil)-3-(3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil)urea (**3b**),

odnosno *bis*-uree:

- 3-[[4-fluor-1-hidroksibutan-2-il]karbamoil]amino-1-[[4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil]urea (**6a**),
- 1-[[4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil]-3-[[3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil]karbamoil]amino]urea (**6b**),
- 3-[[1-(hidroksimetil)ciklopropil]karbamoil]amino-1-[[4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil]urea (**6c**),
- 3-[[1-(hidroksimetil)ciklobutil]karbamoil]amino-1-[[4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil]urea (**6d**).

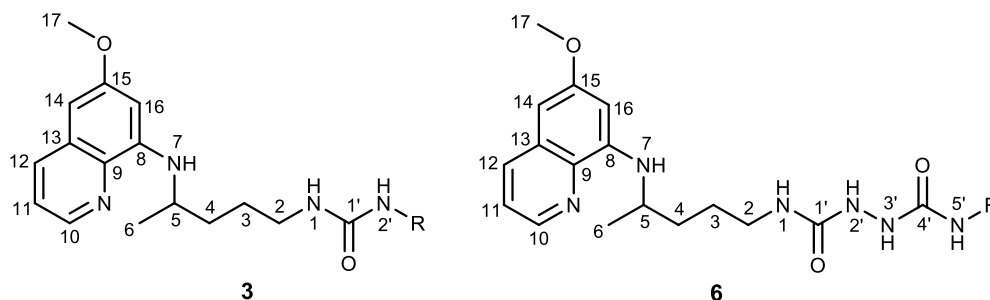
Strukture novih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS). Novim spojevima određene su i temperature taljenja. U Tablicama 1 i 2 dani su njihovi analitički i spektroskopski podaci, dok se spektri nalaze u Prilogu.

**Tablica 1.** Analitički i spektroskopski podaci za uree **3a-b** i *bis*-uree primakina **6a-d**

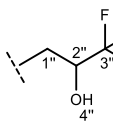
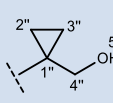
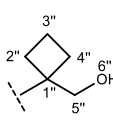
Spoj	$t_f(^{\circ}\text{C})$	Molekulska formula	$M_r$	IR (ATR) $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$	MS( $m/z$ )
<b>3a</b>	65,5–68	$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{FN}_4\text{O}_3$	392,475	3284, 2910, 1647, 1612, 1552, 1514, 1448, 1419, 1383, 1194, 1151, 1051, 1034, 1026, 941, 895, 816, 787	393,1 (M+1) <sup>+</sup> , 286,0 (C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>+</sup>
<b>3b</b>	108–110,5	$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3$	414,429	3321, 2914, 2854, 1610, 1556, 1514, 1448, 1421, 1385, 1259, 1221, 1178, 1140, 1113, 1049, 816, 789, 619	415,0 (M+1) <sup>+</sup> , 286,0 (C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>+</sup>
<b>6a</b>	121,5–124	$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{FN}_6\text{O}_4$	450,515	3284, 2910, 1647, 1612, 1552, 1514, 1448, 1419, 1383, 1194, 1151, 1051, 1034, 1026, 941, 895, 816, 787	451,2 (M+1) <sup>+</sup>
<b>6b</b>	163–165,5	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_4$	472,469	3273, 3201, 3072, 2918, 1649, 1585, 1550, 1516, 1450, 1419, 1383, 1321, 1259, 1194, 1126, 1111, 1049, 816, 787, 617, 455, 451	473,1 (M+1) <sup>+</sup> , 286,1 (C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>+</sup>
<b>6c</b>	154–156,5	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_4$	430,509	3273, 3194, 3068, 2914, 2850, 1655, 1612, 1527, 1514, 1450, 1419, 1383, 1288, 1194, 1163, 1153, 1024, 814, 787, 667, 596	431,2 (M+1) <sup>+</sup>
<b>6d</b>	128–131	$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_4$	444,536	3273, 3207, 3062, 2924, 2848, 1647, 1612, 1554, 1527, 1514, 1448, 1390, 1383, 1286, 1194, 1167, 1153, 1047, 1026, 814, 787, 617, 463	445,2 (M+1) <sup>+</sup>



**Tablica 2.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopski podaci za uree **3a-b** i bis-uree primakina **6a-d**



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>3a</b>		8,54-8,53 (dd, $J = 1,56, 4,15$ , 1H, 10), 8,08-8,07 (dd, $J = 1,50, 8,23$ , 1H, 12), 7,43-7,41 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,26 (s, 1H, 14), 5,91-5,89 (d, $J = 8,70$ , 1H, 7), 5,91-5,89 (t, $J = 5,58$ , 1H, 1), 5,69-5,67 (d, $J = 8,49$ , 1H, 2'), 4,73-4,72 (t, $J = 5,29$ , 1H, 5''), 4,49-4,40 (m, 2H, 3''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,65-3,62 (m, 2H, 5, 1''), 3,38-3,27 (m, 2H, 4''), 3,00 (m, 2H, 2), 1,94-1,85, 1,67-1,61, 1,54-1,42 (3m, 6H, 3, 4, 2''), 1,22-1,20 (d, $J = 6,32$ , 3H, 6)	159,00 (15), 157,83 (1'), 144,62 (8), 144,22 (10), 134,77 (12), 134,51 (9), 129,56 (13), 122,07 (11), 96,10 (16), 91,63 (14), 82,08-81,01 (d, $J_1 = 161,35, 3''$ ), 63,66 (4''), 54,96 (17), 47,62 (1''), 47,04 (5), 39,02 (2), 33,52 (4), 32,63-32,50 (d, $J_2 = 19,40, 2''$ ), 26,83 (3), 20,21 (6)
<b>3b</b>		8,54-8,53 (dd, $J = 1,60, 4,16$ , 1H, 10), 8,08-8,07 (dd, $J = 1,56, 8,25$ , 1H, 12), 7,43-7,41 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,41-6,40 (d, $J = 6,24$ , 1H, 2'), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12-6,11 (m, 2H, 7, 4''), 6,01-5,99 (t, $J = 5,68$ , 1H, 1), 3,95-3,93 (m, 1H, 2''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,63-3,61 (m, 1H, 5), 3,42-3,32 (m, 1H, 1''), 3,02-3,01 (m, 3H, 2, 1''), 1,65-1,45 (m, 4H, 3, 4), 1,22-1,21 (d, $J = 6,30$ , 3H, 6)	159,00 (15), 158,10 (1'), 144,62 (8), 144,22 (10), 134,77 (12), 134,51 (9), 129,56 (13), 128,13-122,50 (q, $J = 282,61, 3''$ ), 122,07 (11), 96,10 (16), 91,62 (14), 68,53-67,98 (q, $J = 28, 2''$ ), 54,95 (17), 47,03 (5), 39,66 (1''), 39,02 (2), 33,49 (4), 26,78 (3), 20,21(6)
<b>6a</b>		8,55-8,53 (dd, $J = 1,37, 4,06$ , 1H, 10), 8,09-8,06 (dd, $J = 1,26, 8,21$ , 1H, 12), 7,59 (s, 1H, 3'), 7,52 (s, 1H, 2'), 7,45-7,40 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,41 (t, $J = 5,35$ , 1H, 1), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12-6,10 (d, $J = 8,71$ , 2H, 7, 5'), 4,74-4,70 (t, $J = 5,36$ , 1H, 5''), 4,55-4,51, 4,39-4,35 (2t, $J = 6,14, 2\text{H}, 3''$ ), 3,82 (s, 3H, 17), 3,70-3,62 (m, 1H, 5, 1''), 3,44-3,26 (m, 4'', prekriven signalom $\text{H}_2\text{O}$ ), 3,04 (m, 1H, 2), 1,93-1,07 (m, 6H, 3, 4, 2''), 1,21-1,19 (d, $J = 6,20$ , 3H, 6)	159,01 (15), 158,65, 158,41 (1', 4'), 144,65 (8), 144,25 (10), 134,81 (12), 134,53 (9), 129,58 (13), 122,11 (11), 96,09 (16), 91,59 (14), 82,53-80,40 (d, $J_1 = 166,41, 3''$ ), 63,49 (4''), 54,99 (17), 47,64-47,57 (d, $J_3 = 2,94, 1''$ ), 47,06 (5), 39,13 (2), 33,37 (4), 32,37-32,11 (d, $J_2 = 19,92, 2''$ ), 26,69 (3), 20,20 (6)

6b		8,54-8,53 (dd, $J = 1,54, 4,17$ , 1H, 10), 8,09-8,06 (dd, $J = 1,50, 8,29$ , 1H, 12), 7,79 (s, 1H, 3'), 7,57 (s, 1H, 2'), 7,45-7,40 (m, 1H, 11), 6,48-6,47 (m, 2H, 16, 5'), 6,40-6,34 (m, 2H, 1, 4''), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12-6,10 (d, $J = 8,74$ , 1H, 7), 4,06-3,97 (m, 1H, 2''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,63 (m, 1H, 5), 3,43-3,36, 3,14-3,02 (2m, 4H, 2, 1''), 1,61-1,50 (m, 4H, 3, 4), 1,21-1,19 (d, $J = 6,25$ , 3H, 6)	159,01 (15), 158,77, 158,58 (1', 4'), 144,65 (8), 144,25 (10), 134,81 (12), 134,53 (9), 130,94-119,65 (q, $J_1 = 286,23, 3''$ ), 129,59 (13), 122,11 (11), 96,09 (16), 91,59 (14), 68,56-67,42 (q, $J_2 = 28,53, 2''$ ), 54,99 (17), 47,05 (5), 39,68 (1''), 39,18 (2), 33,39 (4), 26,68 (3), 20,21 (6)
6c		8,55-8,53 (dd, $J = 1,57, 4,17$ , 1H, 10), 8,09-8,06 (dd, $J = 1,51, 8,29$ , 1H, 12), 7,55 (s, 1H, 3'), 7,45 (s, 1H, 2'), 7,43-7,40 (m, 1H, 11), 6,52 (s, 1H, 5'), 6,47 (s, 1H, 16), 6,36-6,32 (t, $J = 5,67$ , 1H, 1), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12-6,09 (d, $J = 8,72$ , 1H, 7), 4,72-4,69 (t, $J = 5,58$ , 1H, 5''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,62 (m, 1H, 5), 3,38-3,36 (d, $J = 5,63$ , 2H, 4''), 3,03-2,98 (q, $J = 7,27, 11,85$ , 2H, 2), 1,61-1,45 (m, 4H, 3, 4), 1,21-1,19 (d, $J = 6,25$ , 3H, 6), 0,66-0,56 (m, 4H, 2'', 3'')	159,01 (15), 158,63 (1', 4'), 144,65 (8), 144,25 (10), 134,80 (12), 134,52 (9), 129,58 (13), 122,11 (11), 96,09 (16), 91,60 (14), 65,29 (4''), 54,99 (17), 47,03 (5), 39,02 (2), 34,17 (1''), 33,37 (4), 26,68 (3), 20,22 (6), 11,12 (2'',3'')
6d		8,54-8,52 (dd, $J = 1,49, 4,16$ , 1H, 10), 8,09-8,06 (dd, $J = 1,39, 8,27$ , 1H, 12), 7,53 (s, 1H, 3'), 7,47 (s, 1H, 2'), 7,44-7,40 (m, 1H, 11), 6,47 (s, 1H, 16), 6,41-6,37 (t, $J = 5,49$ , 1H, 1), 6,26 (s, 1H, 14), 6,12-6,09 (d+s, 2H, 7, 5') 4,88-4,84 (t, $J = 5,60$ , 1H, 6''), 3,82 (s, 3H, 17), 3,62 (m, 1H, 5), 3,47-3,45 (d, $J = 5,58$ , 2H, 5''), 3,04-3,02 (q, $J = 7,35$ , 11,08, 1H, 2), 2,30-2,20, 1,94-1,88, 1,62-1,51 (m, 10H, 3, 4, 2''-4''), 1,21-1,19 (d, $J = 6,24$ , 3H, 6)	159,01 (15), 158,70, 157,93 (1', 4'), 144,65 (8), 144,24 (10), 134,80 (12), 134,53 (9), 129,58 (13), 122,10 (11), 96,09 (16), 91,59 (14), 65,48 (5''), 56,62 (1''), 54,99 (17), 47,04 (5), 39,02 (2), 33,37 (4), 29,17 (2'', 4''), 26,68 (3), 20,21 (6), 13,80 (3'').

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*) [39-42], Gelovani i suradnici su predložili tri parametra [43], Congreve i suradnici “pravilo tri” (*rule of 3*) [44], a Rayna i suradnici postavili su cijeli set pravila [45]. O tim pravilima se neprestano diskutira – uvode se modifikacije i dodaci [46-57].

Uree **3a-b** i *bis*-uree **6a-d** sintetizirani u okviru ovog rada u potpunosti zadovoljavaju pravila Lipinskog i Gelovanija za ljekovite tvari. Gotovo se uvijek 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 [39-42]. Gelovanijeva pravila pak zahtijevaju da je topološka polarna površina molekule (TPSA) manja od  $140 \text{ \AA}^2$ , molarna refraktivnost (MR) između 40 i 130

cm<sup>3</sup>/mol te broj atoma u molekuli od 20 do 70, koja se, kao i Lipinskijeva pravila, koriste za predviđanje oralne biorasploživosti [43]. Većina parametara, koji su potrebni za Lipinskijeva i Gelovanija pravila, računati su pomoću programa Chemicalize [58] i navedeni u Tablici 3.

**Tablica 3.** Lipinskijevi i Gelovanijevi parametri za uree **3a-b** i *bis*-uree primakina **6a-d** računati programom Chemicalize [58]

Spoj	Molekulska formula	Broj atoma	$M_r$	Donori u H-vezi	Akceptori u H-vezi	Pravila Lipinskog <sup>a</sup>	MR (cm <sup>3</sup> /mol)	TPSA (Å <sup>2</sup> )
<b>3a</b>	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	57	392,475	4	5	4	106,96	95,51
<b>3b</b>	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	54	414,429	4	5	4	102,94	95,51
<b>6a</b>	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> FN <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	63	450,515	6	6	3	118,50	136,64
<b>6b</b>	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	60	472,469	6	6	3	114,49	136,64
<b>6c</b>	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	61	430,509	6	6	3	116,47	136,64
<b>6d</b>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	64	444,536	6	6	3	121,07	136,64

<sup>a</sup> od 4; MR – molarna refraktivnost; TPSA – topološka polarna površina molekule

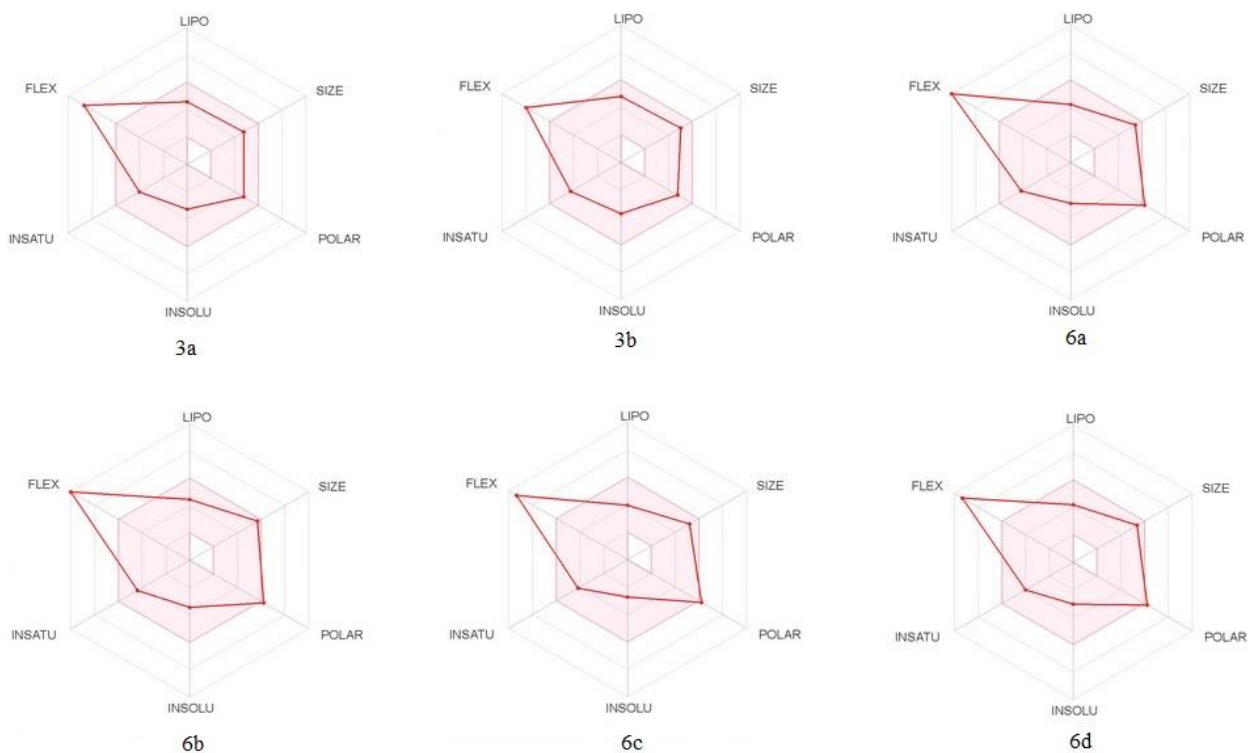
*Bioavailability radar*, alat programa SwissADME [59], uzima za predviđanje oralne biorasploživosti sljedećih šest parametara: lipofilnost (XLOGP3 u vrijednosti između -0,7 do 5,0), relativnu molekulsku masu ( $M_r$  150–500), polarnost (TPSA 20–130 Å<sup>2</sup>), topljivost u vodi (log *S* 0–6 (ESOL 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 uree **3a-b** i *bis*-uree **6a-d** računati programom SwissADME.ch [59]

Spoj	XLOG P3 <sup>a</sup>	log S <sup>b</sup>	Csp3 <sup>c</sup>	Broj rotirajućih veza
<b>3a</b>	2,52	-3,27	0,5	13
<b>3b</b>	2,93	-3,72	0,47	12
<b>6a</b>	1,86	-2,98	0,48	16
<b>6b</b>	2,27	-3,43	0,45	15
<b>6c</b>	1,46	-2,74	0,48	14
<b>6d</b>	1,82	-3,05	0,5	14

<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 13 prikazuje ilustrativne modele za predviđanje bioraspoloživosti pomoću *Bioavailability radar*a za sve 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 13 pokazuju kako svi sintetizirani spojevi zadovoljavaju pet od šest kriterija i nijedan ne zadovoljava kriterij fleksibilnosti. Najmanje odstupanje od kriterija fleksibilnosti pokazuje **3b**. Ako bi se pristupilo daljnjem optimiranju struktura spojeva trebalo bi ukrotiti strukture, tj. smanjiti fleksibilnost.



**Slika 13.** Prikaz *Bioavailabilityradar* modela za predviđanje oralne bioraspodivnosti sintetiziranih urea **3a-b** i *bis*-urea primakina **6a-d**

Pomoću programa SwissADME [59] napravljeno je farmakokinetičko predviđanje *in silico*. Programom su predviđene tri etape farmakokinetike ljekovite tvari—apsorpcija, distribucija i metabolizam. Podaci su prikazani u Tablici 5.

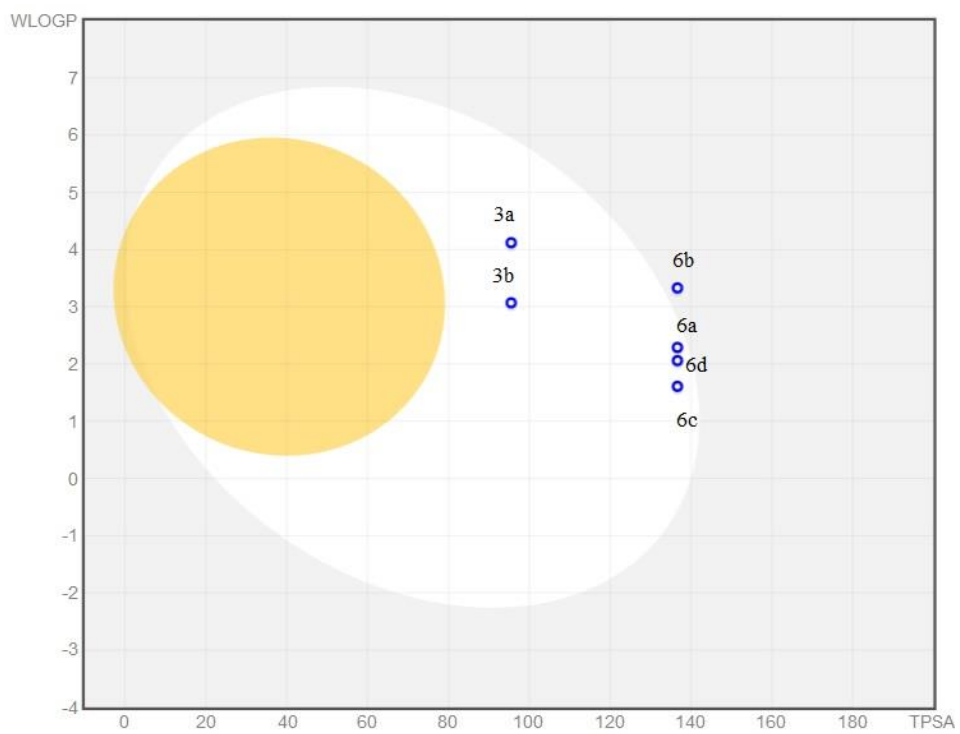
**Tablica 5.** Farmakokinetički parametri za uree **3a-bi** bis-uree **6a-d** računati programom SwissADME [59]

Spoj	GI aps. <sup>a</sup>	KMB prolazak <sup>b</sup>	Supstrat P-glikoproteina	CYP1A2 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP 2D6 inhibitor	CYP 3A4 inhibitor	log $K_p$ (cm/s) <sup>c</sup>
<b>3a</b>	visoka	-	+	-	-	-	+	+	-6,90
<b>3b</b>	visoka	-	+	-	-	+	-	+	-6,75
<b>6a</b>	visoka	-	+	-	-	+	-	+	-7,73
<b>6b</b>	niska	-	+	-	-	+	-	+	-7,57
<b>6c</b>	visoka	-	+	-	-	-	-	+	-7,89
<b>6d</b>	visoka	-	+	-	-	+	-	+	-7,72

<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 svi spojevi izuzev **6b** imaju predviđenu visoku razinu apsorpcije iz gastrointestinalnog sustava (GI). Svi su predviđeni kao supstrati P-glikoproteina te niti jedan ne prelazi krvno-moždanu barijeru (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. U tom slučaju lijek se treba 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 su sintetizirani spojevi supstrati za P-glikoproteine može im potencijalno umanjiti učinkovitost, pogotovo ako se radi o djelovanju na tumorske stanice [60]. Svi spojevi su potencijalni inhibitori enzima CYP3A4, a većina su potencijalni inhibitori i drugih enzima CYP P450. Iznimka je bis-urea **6c**, s obzirom da je inhibitor samo enzima CYP 3A4, što smanjuje mogućnost potencijalne interakcije s drugim lijekovima.

Slika 14 predstavlja prikaz farmakokinetičkog *BOILED-Egg* modela koji opisuje prolazak lijekovite 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 [61]. Svim sintetiziranim spojevima predviđa se pasivna apsorpcija iz GI, izuzev bis-uree **6b**, svi su supstrati za P-glikoprotein te nijedan ne prelazi KMB.



**Slika 14.** Prikaz farmakokinetičkog *BOILED-Egg* modela [61]

## **5. ZAKLJUČCI**



U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija dvije serije spojeva koji dosad nisu opisani u literaturi. Sintetizirane i karakterizirane su uree:

- 1-(4-fluor-1-hidroksibutan-2-il)-3-(4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil)urea(**3a**),
- 1-(4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil)-3-(3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil)urea(**3b**),

odnosno *bis*-uree:

- 3-[[4-fluor-1-hidroksibutan-2-il]karbamoil]amino}-1-{4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil}urea (**6a**),
- 1-{4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil}-3-[[3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil]karbamoil]amino}urea (**6b**),
- 3-[[1-(hidroksimetil)ciklopropil]karbamoil]amino)-1-{4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil}urea (**6c**),
- 3-[[1-(hidroksimetil)ciklobutil]karbamoil]amino)-1-{4-[[6-metoksikinolin-8-il]amino]pentil}urea (**6d**).

Struktura novih spojeva potvrđena je uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR). Većina novosintetiziranih spojeva zadovoljava sva Lipinskijeva i Gelovanijeva pravila za male molekule za oralnu biorasploživost, dok ostali minimalno odudaraju od kriterija, pa s obzirom na tako predviđena fizikalno-kemijska svojstva predstavljaju dobre kandidate za nove lijekove. Prema predviđanjima pomoću alata *Bioavailability radara* novosintetizirani spojevi zadovoljavaju 5 od 6 kriterija te bi mogli imati dobru do vrlo dobru oralnu biorasploživost. Za sve spojeve je predviđeno da su potencijalni supstrati P-glikoproteina, svi se, izuzev spoja **6b**, pasivno apsorbiraju iz GI i nijedan ne prelazi KMB. Osim toga, predviđeno je da će svi spojevi biti inhibitori CYP 3A4, dok će svi, osim spoja **6c**, inhibirati i još poneke enzime CYP P450. U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada i koja su u tijeku, ispituje se citostatsko i antimalarijsko djelovanje sintetiziranih spojeva.

## **6. ZAHVALE**

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Zrinki Rajić Džolić na ukazanom povjerenju, iskrenoj i neupitnoj podršci prilikom izrade ovog rada, mentorstvu i interesu za znanstveni rad. Zahvaljujem se i dr. sc. Kristini Pavić prvenstveno na strpljivosti, predanosti i usmjerenosti u procesu unaprjeđenja mojih znanja i vještina u laboratoriju, te mentorstvu. Također, veliko hvala prof. dr. sc. Branki Zorc na savjetima, pomoći pri pisanju i doprinosu mome interesu za farmaciju i znanstveni rad.

Hvala i ostalim članovima Zavoda za farmaceutsku kemiju.

Konačno, hvala mojim prijateljima i kolegama, znanima i pod nadimkom „spodobe“, Juri Borasu, Goranu Poji i Zvonimiru Mlinariću, s kojima su sati bili kraći, problemi manji i atmosfera ugodnija. Savjeti i podrška s njihove strane nisu izostali.

## **7. POPIS LITERATURE**

- [1] <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, pristup 14.3.2018.
- [2] <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>, pristup 14.3.2018.
- [3] [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx), pristup 14.3.2018.
- [4] T. Ćorić, A. Miler Knežević, P. Čukelj, Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2016. godini (2017) 1–7.
- [5] N. Vale, R. Moreira, P. Gomes, Primaquine revisited six decades after its discovery, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 937–953.
- [6] M. Frédérich, J.-M. Dognée, L. Angenot, P. De Mol, New trends in anti-malarial agents, *Curr. Med. Chem.* **9** (2002) 1435–1456.
- [7] I. Fernandes, N. Vale, V. de Freitas, R. Moreira, N. Mateus, P. Gomes, Anti-tumoral activity of imidazoquinones, a new class of antimalarials derived from primaquine, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 6914–6917.
- [8] R. Duffy, C. Wade, Discovery of anticancer drugs from antimalarial natural products, *Drug Discov. Today* **50** (2012) 942–953.
- [9] V.R. Solomon, H. Lee, Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies, *Eur. J. Pharmacol.* **625** (2009) 220–233.
- [10] K.C. Keum, N.C. Yoo, W.M. Yoo, K.K. Chang, Y.N. Choon, Y.W. Min, WO 2002013826 A1, Feb 21, 2002.
- [11] F. Liu, Y. Shang, S.-Z. Chen, Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of lidamycin on non-small cell lung cancer cells *in vitro*, *Acta Pharmacol. Sin.* **35** (2014) 645–652.
- [12] A. Kamal, A. Aziz, S. Shouman, E. El-Demerdash, M. Elgendy, A.B. Abdel-Naim, Chloroquine as a promising adjuvant chemotherapy together with sunitinib, *Sci. Proc.* **1** (2014) e384.

- [13] A. Ganguli, D. Choudhury, S. Datta, S. Bhattacharya, G. Chakrabarti, Inhibition of autophagy by chloroquine potentiates synergistically anti-cancer property of artemisinin by promoting ROS dependent apoptosis, *Biochimie* **107** (2014) 338–349.
- [14] G.W. Soo, J.H. Law, E. Kan, S.Y. Tan, W.Y. Lim, G. Chay, N.I. Bukhari, I. Segarra, Differential effects of ketoconazole and primaquine on the pharmacokinetics and tissue distribution of imatinib in mice, *Anticancer Drugs* **21** (2010) 695–703.
- [15] S.K. Srivastava, A. Jha, S.K. Agarwal, R. Mukherjee, A.C. Burman, Synthesis and structure-activity relationships of potent antitumor active quinoline and naphthyridine derivatives, *Anticancer Agents Med. Chem.* **7** (2007) 685–709.
- [16] O. Afzal, S. Kumar, R. Haider, R. Ali, R. Kumar, M. Jaggi, S. Bawa, A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline, *Eur. J. Med. Chem.* **97** (2015) 871–910.
- [17] G. Džimbeg, B. Zorc, M. Kralj, K. Ester, K. Pavelić, J. Balzarini, E. De Clercq, M. Mintas, The novel primaquine derivatives of *N*-alkyl, cycloalkyl or aryl urea: synthesis, cytostatic and antiviral activity evaluations, *Eur. J. Med. Chem.* **43** (2008) 1180–1187.
- [18] M. Šimunović, I. Perković, B. Zorc, K. Ester, M. Kralj, D. Hadjipavlou-Litina and E. Pontiki, Urea and carbamate derivatives of primaquine: synthesis, cytostatic and antioxidant activities, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 5605–5613.
- [19] I. Perković, S. Tršinar, J. Žanetić, M. Kralj, I. Martin-Kleiner, J. Balzarini, D. Hadjipavlou-Litina, A. M. Katsori, B. Zorc, Novel 1-acyl-4-substituted semicarbazide derivatives of primaquine – synthesis, cytostatic, antiviral and antioxidative studies, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **28** (2013) 601–610.
- [20] K. Pavić, I. Perković, M. Cindrić, M. Pranjić, I. Martin-Kleiner, M. Kralj, D. Schols, D. Hadjipavlou-Litina, A.-M. Katsori, B. Zorc, Novel semicarbazides and ureas of primaquine with bulky aryl or hydroxyalkyl substituents: Synthesis, cytostatic and antioxidative activity, *Eur. J. Med. Chem.* **86** (2014) 502–514.

- [21] I. Perković, M. Antunović, I. Marijanović, K. Pavić, K. Ester, M. Kralj, J. Vlainić, I. Kosalec, D. Schols, D. Hadjipavlou-Litina, E. Pontiki, B. Zorc, Novel urea and *bis*-urea primaquine derivatives with hydroxyphenyl and halogenphenyl substituents: synthesis and biological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* **124** (2016) 622–636.
- [22] Z. Rajić, M. Zovko Končić, K. Miloloža, I. Perković, I. Butula, F. Bucar, B. Zorc, Primaquine-NSAID twin drugs: Synthesis, radical scavenging, antioxidant and Fe<sup>2+</sup> chelating activity, *Acta Pharm.* **60** (2010) 325–337.
- [23] K. Pavić, I. Perković, P. Gilja, F. Kozlina, K. Ester, M. Kralj, D. Schols, D. Hadjipavlou-Litina, E. Pontiki, B. Zorc, Design, synthesis and biological evaluation of novel primaquine-cinnamic acid conjugates of amide and acylsemicarbazide type, *Molecules* **21** (2016) 1629–1653.
- [24] K. Pavić, I. Perković, Š. Pospíšilová, M. Machado, D. Fontinha, M. Prudêncio, J. Jampilek, A. Coffey, H. Rimac, B. Zorc, Primaquine hybrids as promising antimycobacterial and antimalarial agents, *Eur. J. Med. Chem.* **143** (2018) 769–779.
- [25] V. Reddy, *Organofluorine Compounds in Biology and Medicine*, 1st Ed., Elsevier, Amsterdam 2015.
- [26] L. W. Kitchen, D. W. Vaughn, D. R. Skillman, Role of US Military Research Programs in the development of US Food and Drug Administration–approved antimalarial drugs, *Clin. Infect. Dis.* **43** (2006) 67–71.
- [27] R. Paulini, K. Mueller; F. Diederich, Orthogonal multipolar interactions in structural chemistry and biology, *Angew. Chem., Int. Ed.* **44** (2005) 1788–1805.
- [28] J. G. Kenna, Mechanism, pathology, and clinical presentation of hepatotoxicity of anesthetic agents. In *Drug-Induced Liver Disease*, 3rd ed.; N. Kaplowitz, L. D. DeLeve, Eds. Elsevier, London, 2013, 403–422.
- [29] D. O’Hagan, Fluorine in health care: Organofluorine containing blockbuster drugs. *J. Fluorine Chem.* **131** (2010) 1071–1081.

- [30] S. B. Rosenblum, T. Huynh, A. Afonso, H. R. Davis Jr, N. Yumibe, J. W. Clader, D. A. Burnett, Discovery of 1-(4-fluorophenyl)-(3*R*)-[3-(4-fluorophenyl)-(3*S*)-hydroxypropyl]-(4*S*)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): A designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption. *J. Med. Chem.* **41** (1998) 973–980.
- [31] S. Mabe, J. Eller, W. S. Champney, Structure-activity relationships for three macrolide antibiotics in *Haemophilus influenzae*. *Curr. Microbiol.* **49** (2004) 248–254.
- [32] H. M. Senn, D. O'Hagan, W. Thiel, Insight into enzymatic C-F bond formation from QM and QM/MM calculations, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 13643–13655.
- [33] S. Breitler, N. J. Oldenhuis, B. P. Fors, S. L. Buchwald, Synthesis of unsymmetrical diarylureas via Pd-catalyzed C–N cross-coupling reactions. *Org. Lett.* **13** (2011) 3262–3265.
- [34] P. Shah, A. D. Westwell, The role of fluorine in medicinal chemistry, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **22** (2008) 527–540.
- [35] M. Neerathilingam, L. H. Greene, S. A. Colebrooke, I. D. Campbell, D. Staunton, Quantitation of protein expression in a cell-free system: Efficient detection of yields and <sup>19</sup>F NMR to identify folded protein. *J. Biomol. NMR* **31** (2005) 11–19.
- [36] B. Gaye, A. Adejare, Fluorinated molecules in the diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases. *Future Med. Chem.* **1** (2009) 821–833.
- [37] M. D. Shoulders, K. J. Kamer, R. T. Raines, Origin of the stability conferred upon collagen by fluorination. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 3859–3862.
- [38] I. Kalčić, M. Zovko, M. Jadrijević-Mladar Takač, B. Zorc, I. Butula, Synthesis and reactions of some azolecarboxylic acid derivatives, *Croat. Chem. Acta* **76** (2003) 217–228.
- [39] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23** (1997) 3–25.



- [40] C.A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *J. Pharmacol. Toxicol. Method* **44** (2000) 235–249.
- [41] C.A. Lipinski, Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, *Drug Discov. Today* **1** (2004) 337–341.
- [42] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46** (2001) 3–26.
- [43] E. L. Luzina, A. V. Popov, Synthesis, evaluation of anticancer activity and COMPARE analysis of *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-substituted ureas with pharmacophoric moieties, *Eur. J. Med. Chem.* **53** (2012) 364–373.
- [44] M. Congreve, R. Carr, C. Murray, H. Jhoti, A rule of three for fragment-based lead discovery, *Drug Discov. Today* **8** (2003) 876–877.
- [45] A. Rayan, D. Marcus, A. Goldblum, Predicting oral druglikeness by iterative stochastic elimination, *J. Chem. Inf. Model* **50** (2010) 437–445.
- [46] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 2615–2623.
- [47] T. Luker, L. Alcaraz, K.K. Chohan, N. Blomberg, D.S. Brown, R.J. Butlin, T. Elebring, A.M. Griffin, S. Guile, S. St-Gallay, B.M. Swahn, S. Swallow, M.J. Waring, M.C. Wenlock, P.D. Leeson, Strategies to improve in vivo toxicology outcomes for basic candidate drug molecules, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 5673–5679.
- [48] Y. Takaoka, Y. Endo, S. Yamanobe, H. Kakinuma, T. Okubo, Y. Shimazaki, T. Ota, S. Sumiya, K. Yoshikawa, 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.* **43** (2003) 1269–1275.
- [49] J.R. Proudfoot, The evolution of synthetic oral drug properties, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15** (2005) 1087–1090.

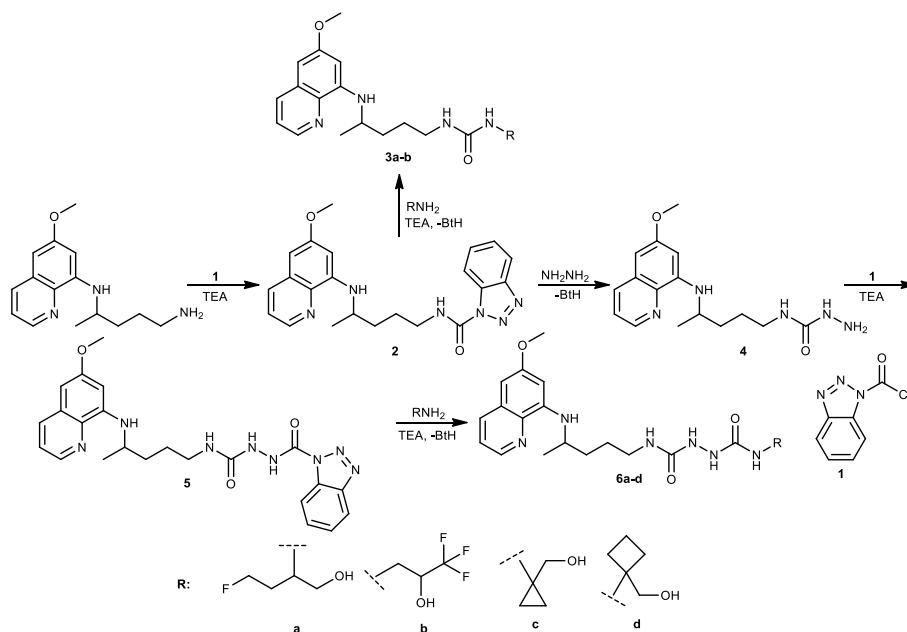
- [50] T.H. Keller, A. Pichota, Z. Yin, A practical view of 'druggability', *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10** (2006) 357–361.
- [51] C. Abad-Zapatero, A Sorcerer's apprentice and the rule of five: from rule-of-thumb to commandment and beyond, *Drug Discov. Today* **12** (2007) 995–997.
- [52] M.Q. Zhang, B. Wilkinson, Drug discovery beyond the 'rule-of-five', *Curr. Opin. Biotech.* **18** (2007) 478–488.
- [53] P.D. Leeson, B. Springthorpe, The influence of drug-like concepts on decisionmaking in medicinal chemistry, *Nat. Rev. Drug Discov.* **6** (2007) 881–890.
- [54] J.D. Hughes, J. Blagg, D.A. Price, S. Bailey, G.A. DeCrescenzo, R.V. Devraj, E. Ellsworth, Y.M. Fobian, M.E. Gibbs, R.W. Gilles, N. Greene, E. Huang, T. Krieger-Burke, J. Loesel, T. Wager, L. Whiteley, Y. Zhang, Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (2008) 4872–4875.
- [55] M.J. Waring, Defining optimum lipophilicity and molecular weight ranges for drug candidates-Molecular weight dependent lower log*D* limits based on permeability, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 2844–2851.
- [56] K. Ohno, Y. Nagahara, K. Tsunoyama, M. Orita, Are there differences between launched drugs, clinical candidates, and commercially available compounds? , *J. Chem. Inf. Model* **50** (2010) 815–821.
- [57] G.R. Bickerton, G.V. Paolini, J. Besnard, S. Muresan, A.L. Hopkins, Quantifying the chemical beauty of drugs, *Nat. Chem.* **4** (2012) 90–98.
- [58] <http://www.chemicalize.org/>, pristup 20.3.2018.
- [59] <http://www.swissadme.ch/>, pristup 20.3.2018.
- [60] K.Ueda, D. P.Clark, C. J.Chen, I. B.Roninson, M. M.Gottesman, I.Pastan, The human multidrug resistance (mdr1) gene, cDNA cloning and transcription initiation, *J. Biol. Chem.* **262** (1987) 505–508.

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

## **8. SAŽETAK**

## Sinteza i karakterizacija druge generacije urea i bis-urea primakina s aminoalkoholima

Unatoč inovativnosti farmaceutske industrije i napretku znanosti te značajnom poboljšanju ishoda liječenja i produljenju očekivane životne dobi u populaciji oboljelih, rak, odnosno maligna oboljenja su i dalje među vodećim uzročnicima smrti. Stoga posve opravdano postoji značajni impuls i potreba za novim lijekovima. U uvodnom dijelu ovog rada predstavljen je potencijal antimalarika primakina kao vodećeg spoja za razvoj novih citostatika. Nadalje, opisane su prednosti i povoljni učinci uvođenja atoma fluora u nove kemijske entitete, potencijalne lijekove. Ovaj rad je nastavak dugogodišnjih istraživanja novih derivata primakina s citostatskim djelovanjem u Zavodu za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Rezultati prethodnih istraživanja temelj su dizajniranja nove generacije urea i bis-urea primakina kao potencijalnih citostatika i/ili antimalarika koje u svojoj strukturi sadrže atom fluora ili rigidniji ciklički aminoalkohol. Sintetizirane su dvije serije spojeva: uree **3a-b** i bis-uree primakina **6a-d** koje su karakterizirane uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR). Navedeni spojevi u potpunosti ili gotovo u potpunosti zadovoljavaju kriterije dane Lipinskijevim i Gelovanijevim pravilima, odnosno kriterijima *Bioavailability radara* (SwissADME) za male molekule. Trenutno su u tijeku ispitivanja citostatskog i antimalarijskog djelovanja sintetiziranih spojeva koja prelaze okvire ovog rada.

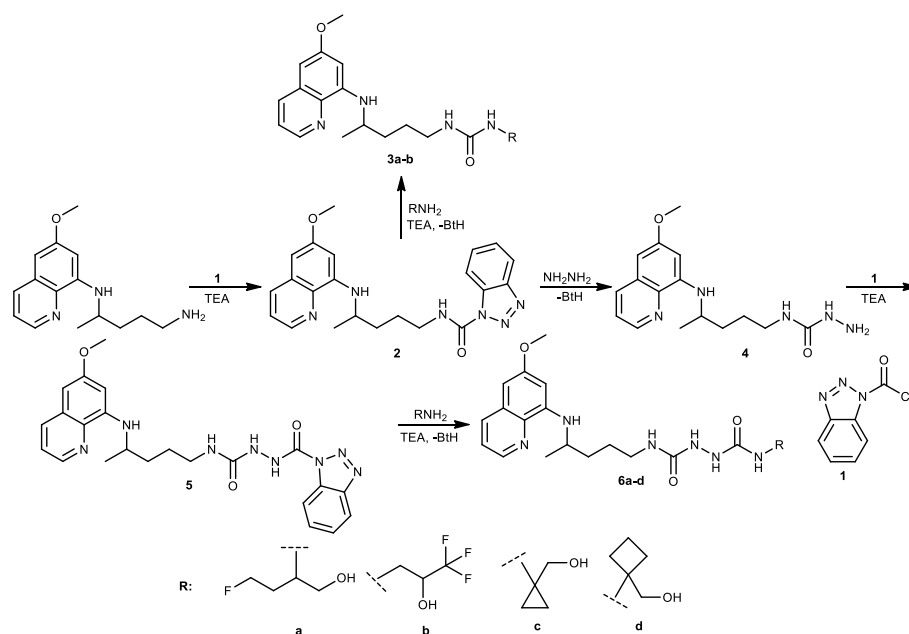


Ključne riječi: primakin, fluor, rak, urea, bis-urea

## **9. SUMMARY**

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

Despite innovativeness of pharma industry and progress in science, as well as significant improvement in patient outcome, and higher life expectancy, cancer is still among leading causes of death. Therefore, there exists strong stimuli and need for new medications. In the introduction of this paper, the potential of antimalarial drug primaquine, as leading compound for new anticancer agents, is presented. Further, we describe benefits of introducing fluorine atom in new chemical entities, potential medicines. This paper is a continuum of longtime research on new primaquine derivatives as potential anticancer agents at the Department of Medicinal Chemistry. These research results represent the base for the design of the new generation of primaquine ureas and *bis*-ureas as potential anticancer or antimalarial agents with a fluorine atom or a small, rigid, cyclic aminoalcohol moiety in their structure. Two series of compounds are prepared: ureas (**3a-b**) and *bis*-ureas (**6a-d**). Newly synthesized compounds are characterized using classical analytical and spectroscopic methods (IR, MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR). It is concluded that majority of 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 antimalarial and anticancer activity is in progress.

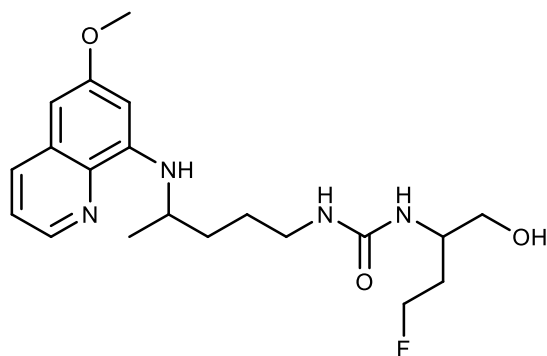


Keywords: primaquine, fluorine, cancer, urea, *bis*-urea

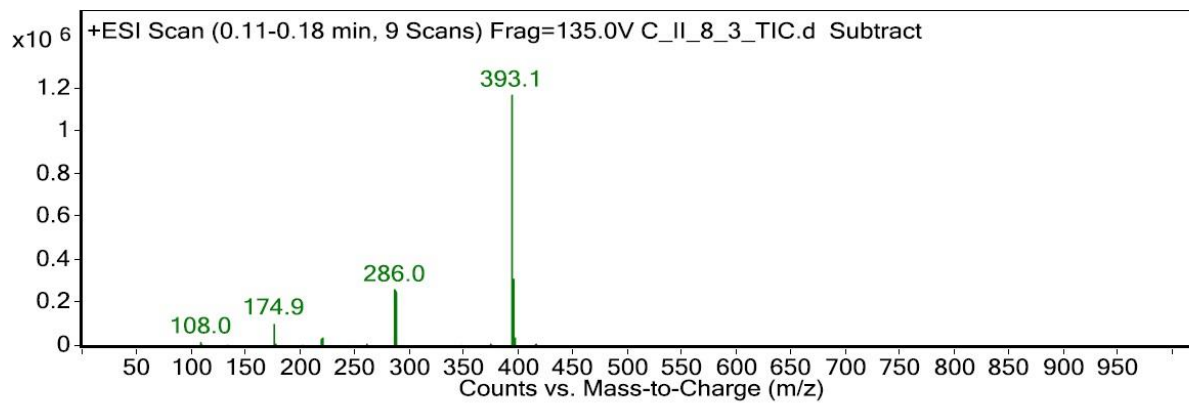
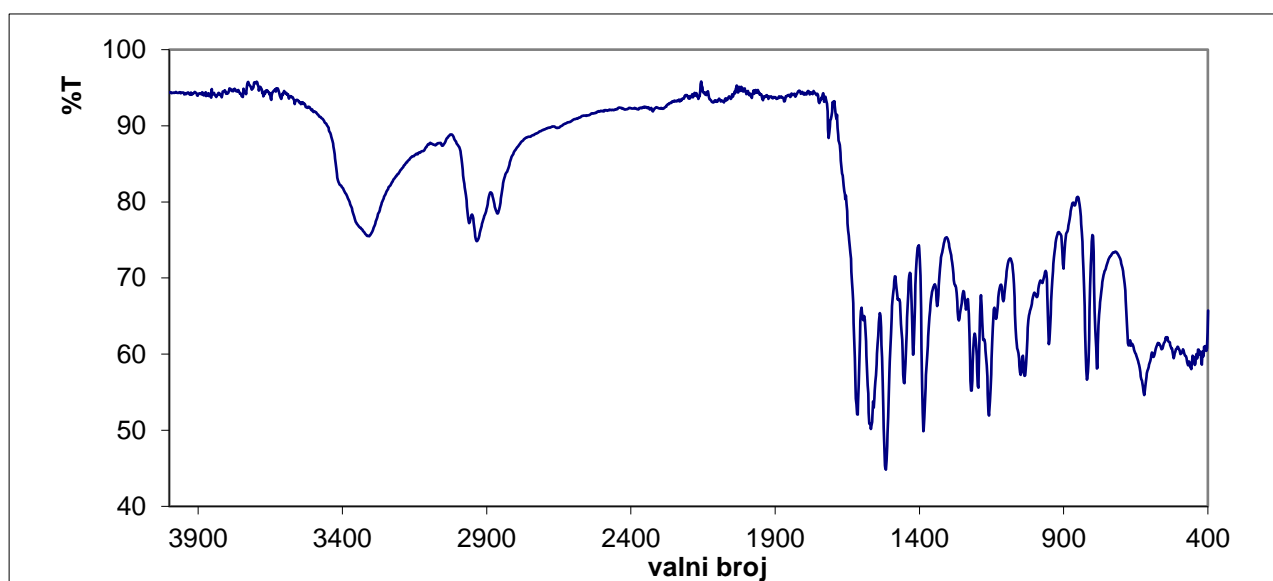
**PRILOZI**

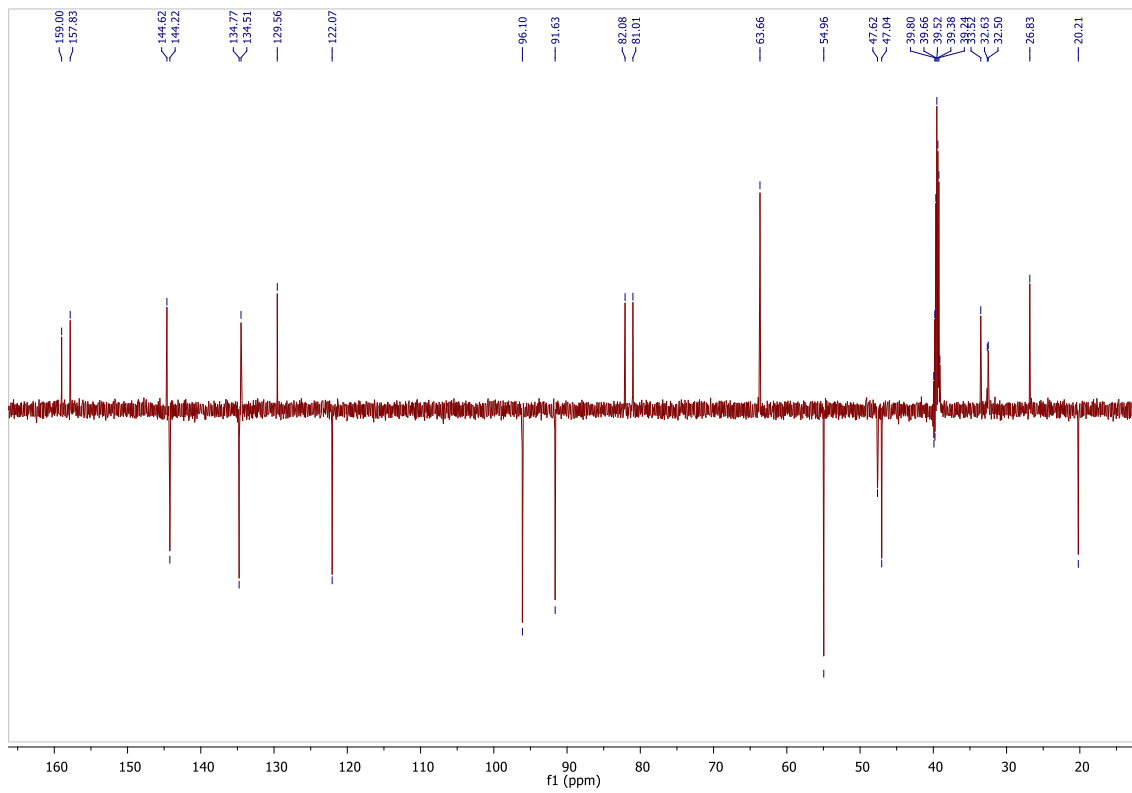
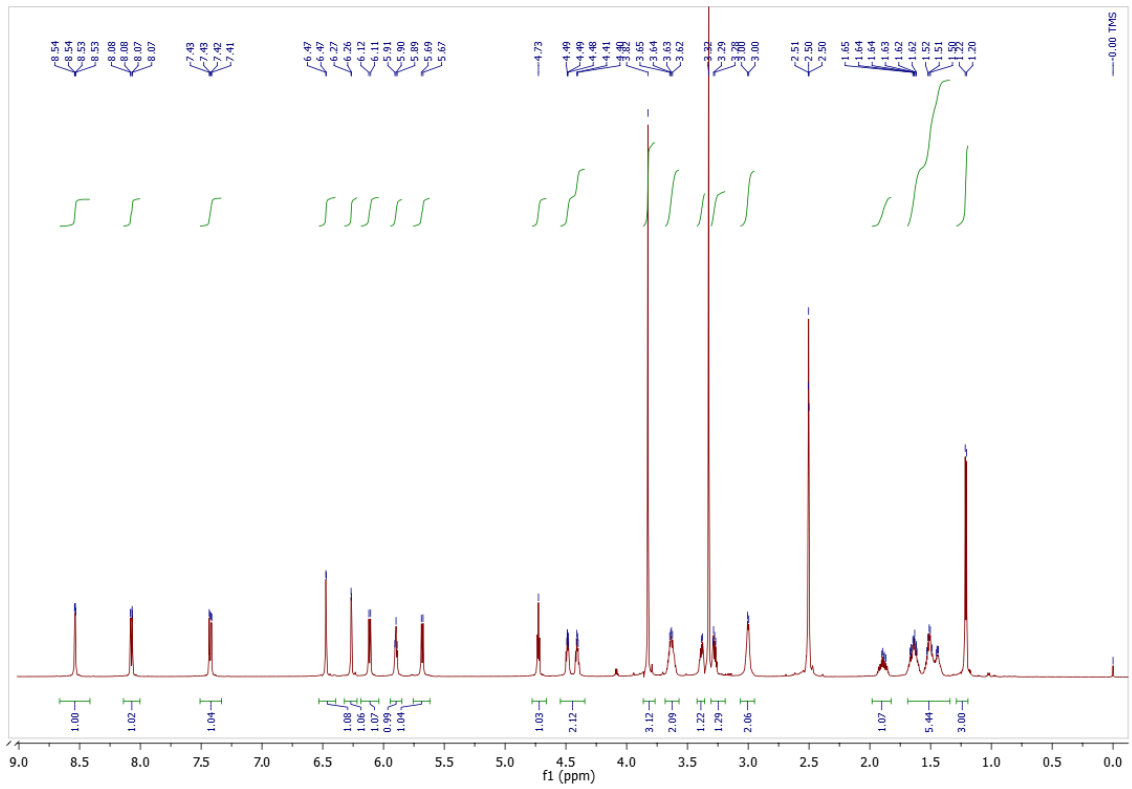


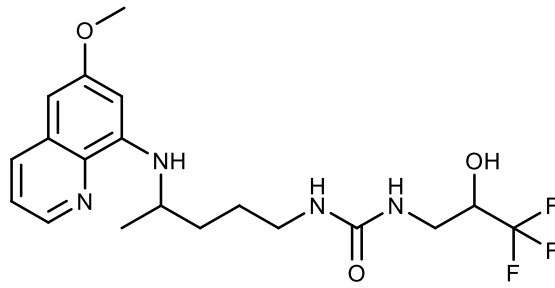
Prilozi sadrže IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR i MS spektre novosintetiziranih spojeva u ovom radu.



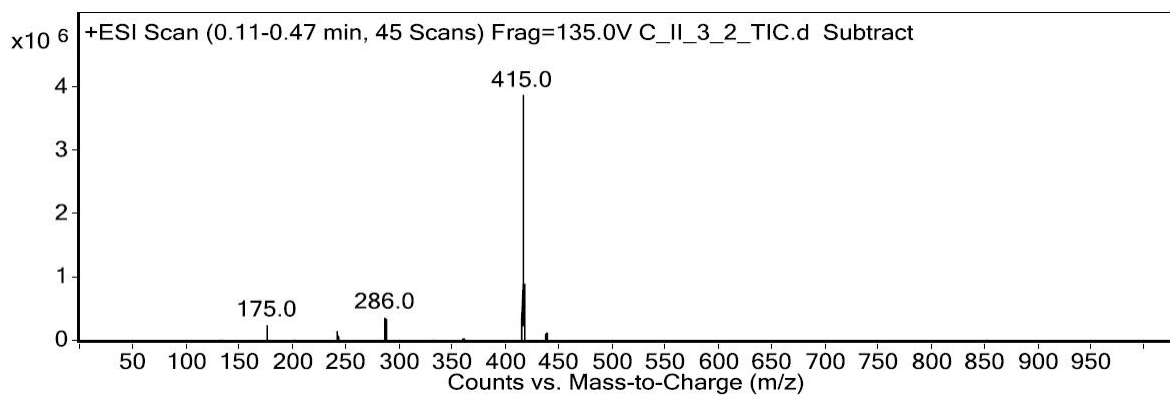
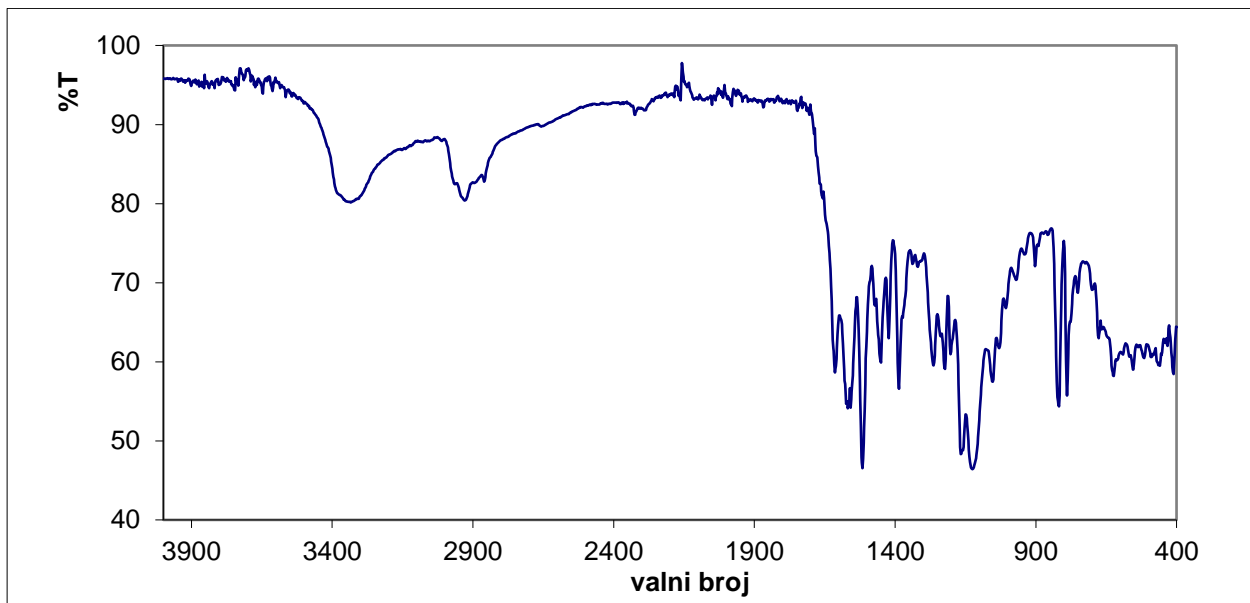
**3a**

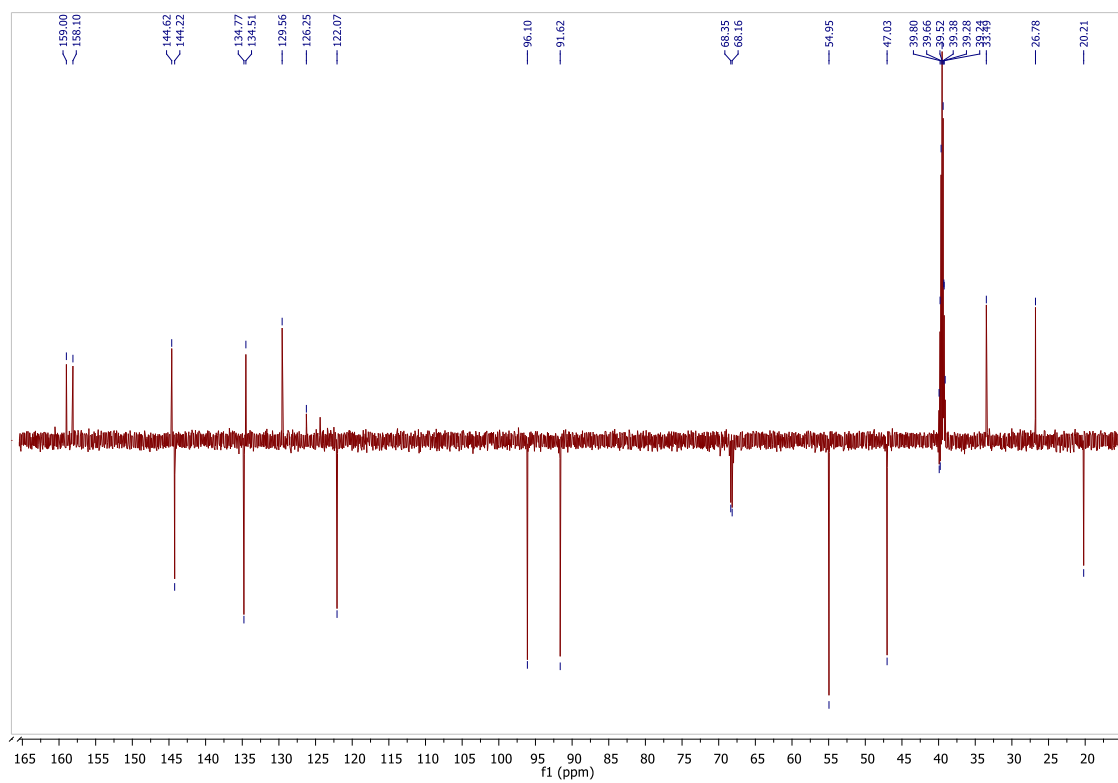
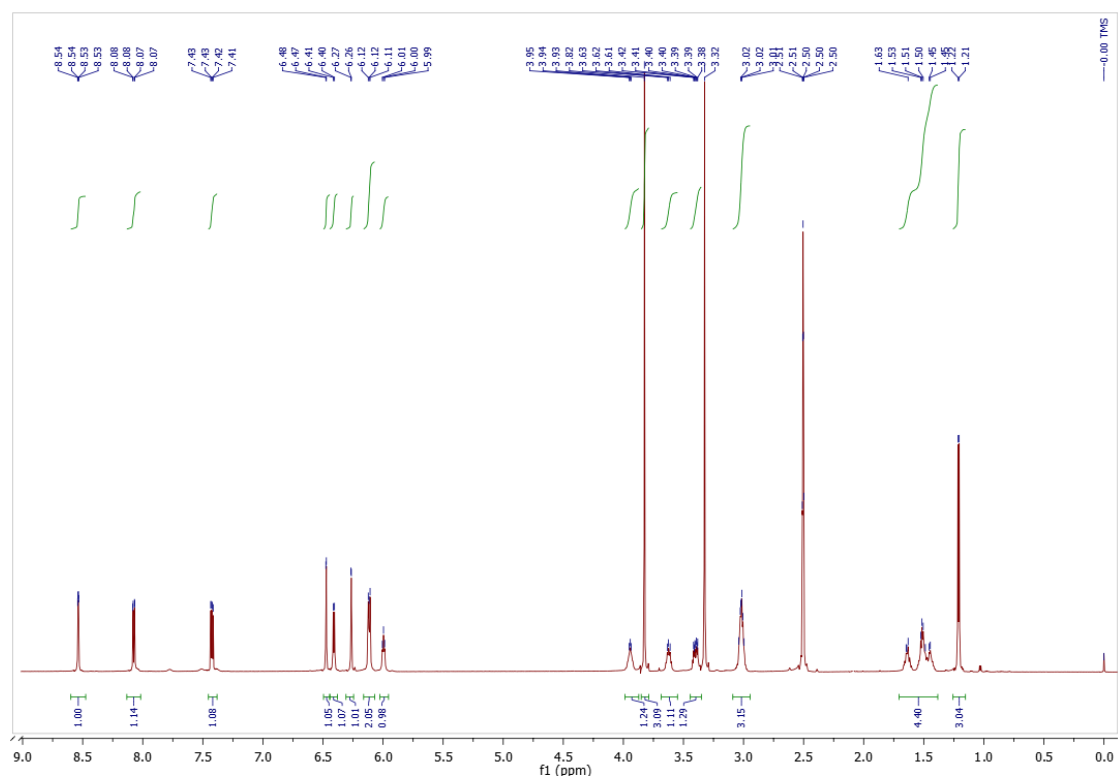


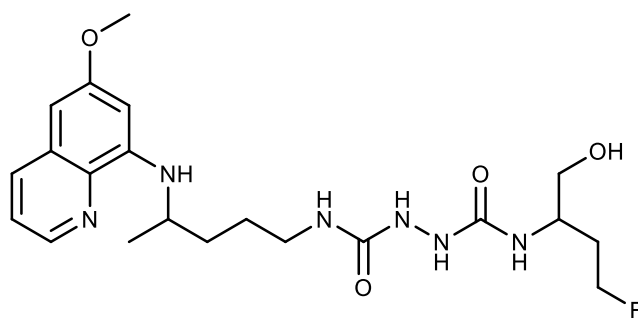




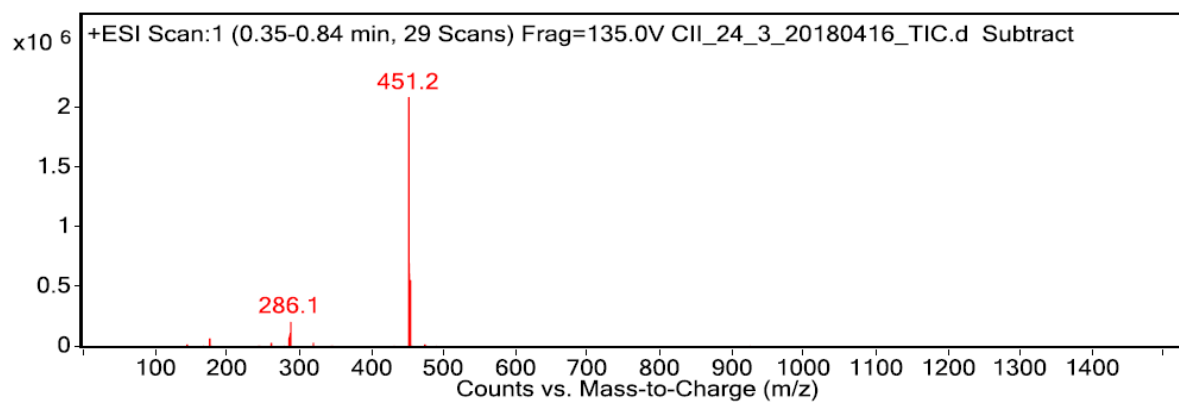
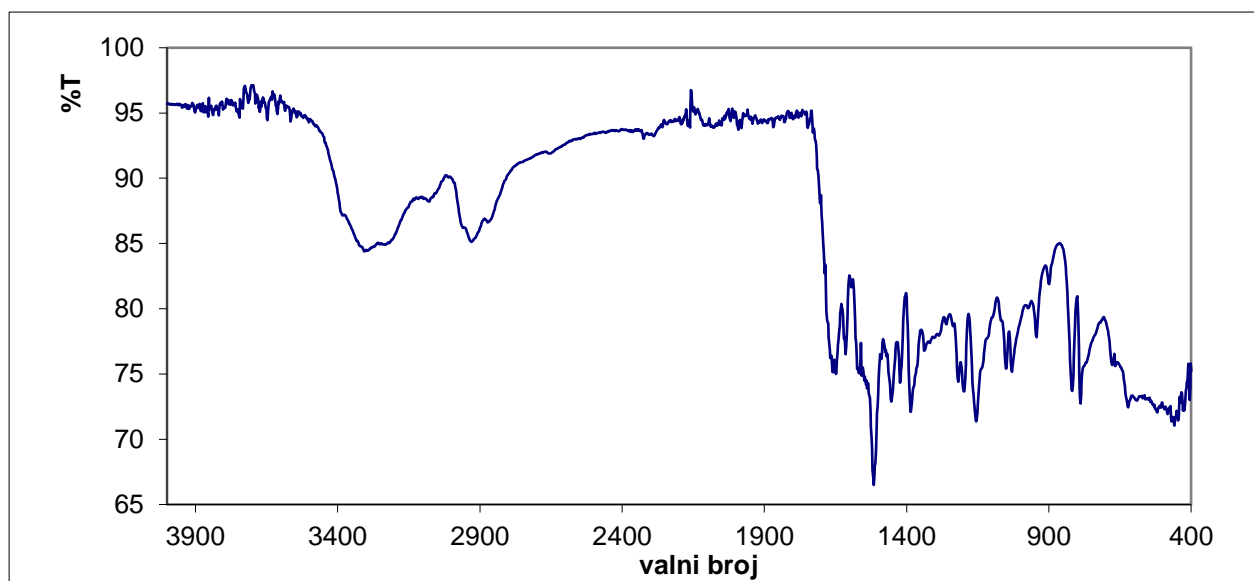
**3b**

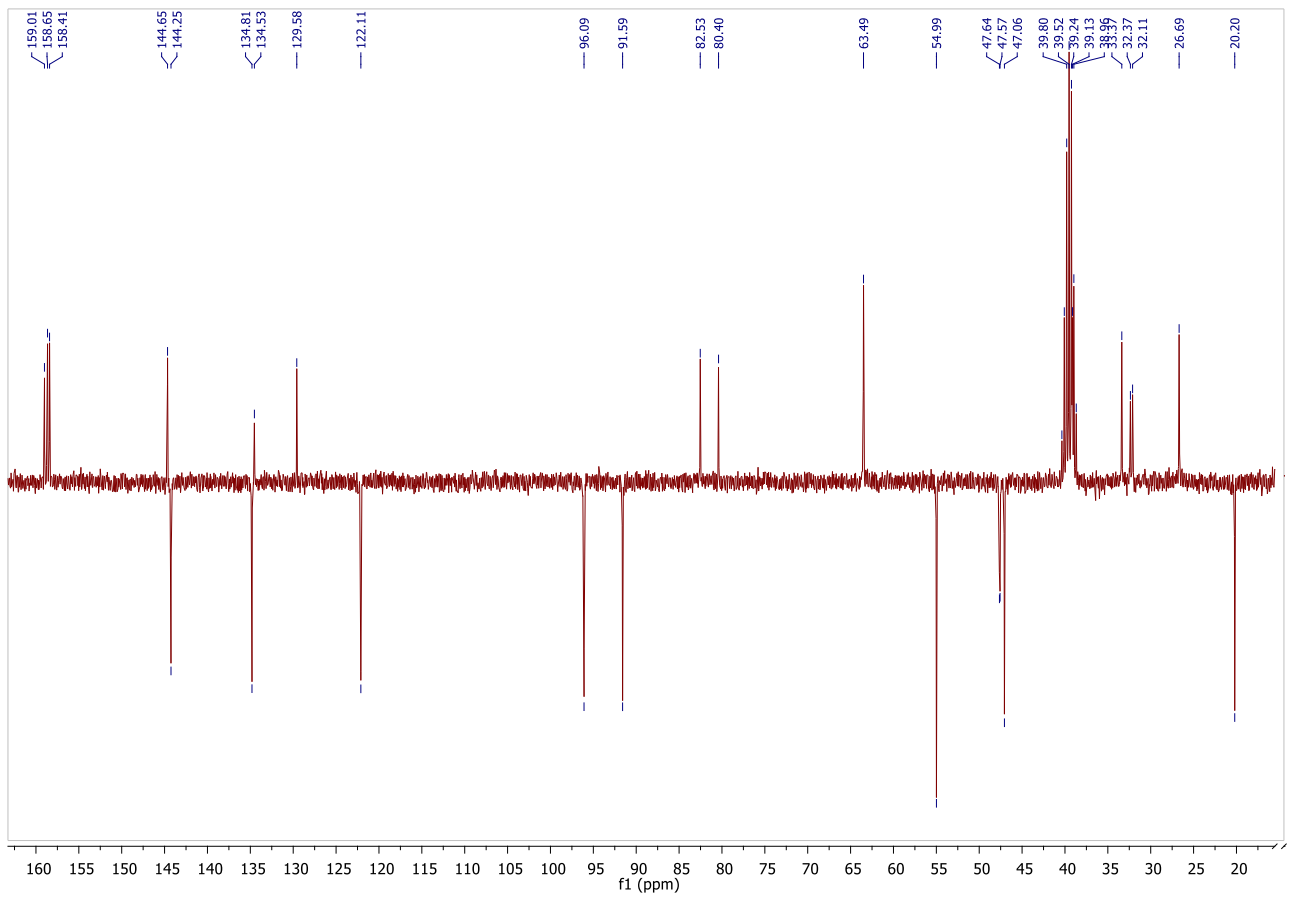
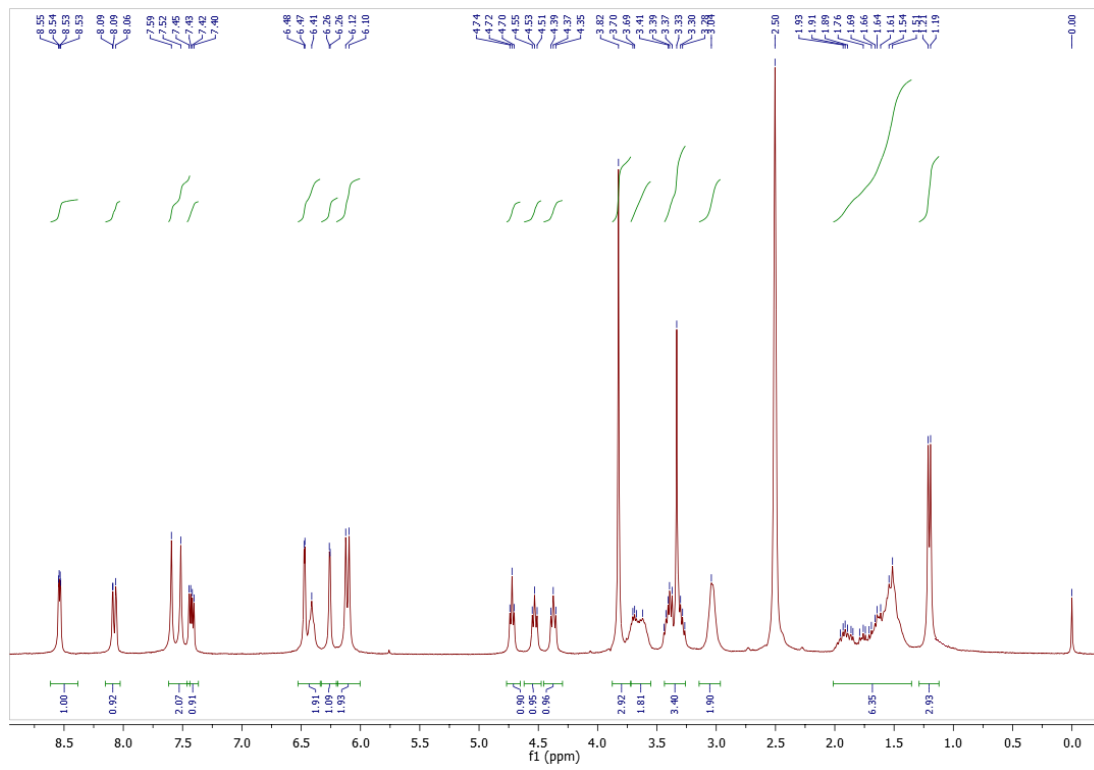


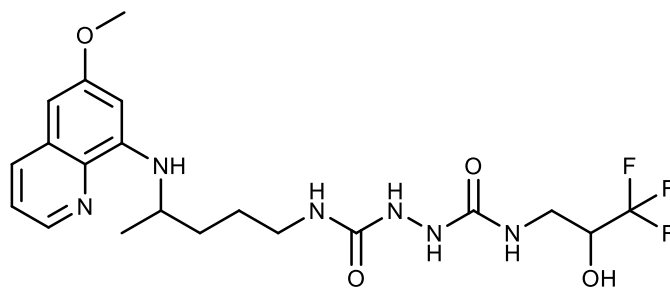




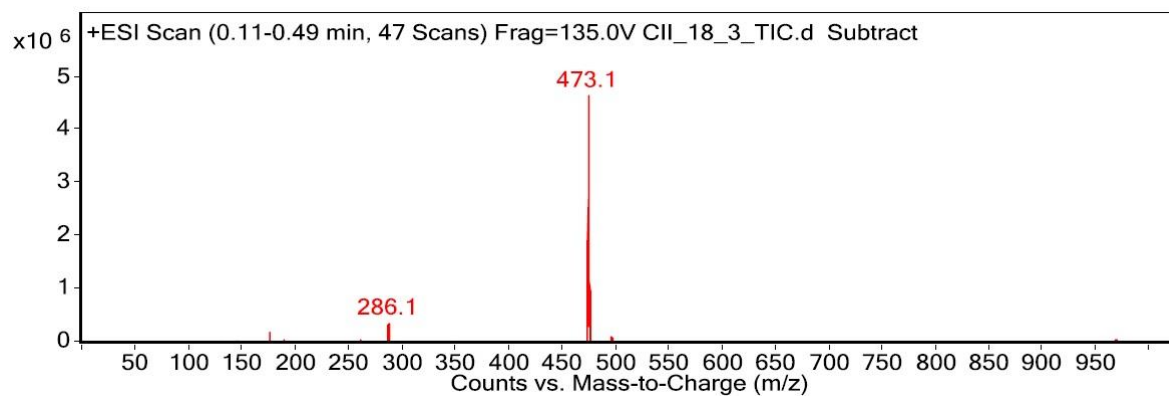
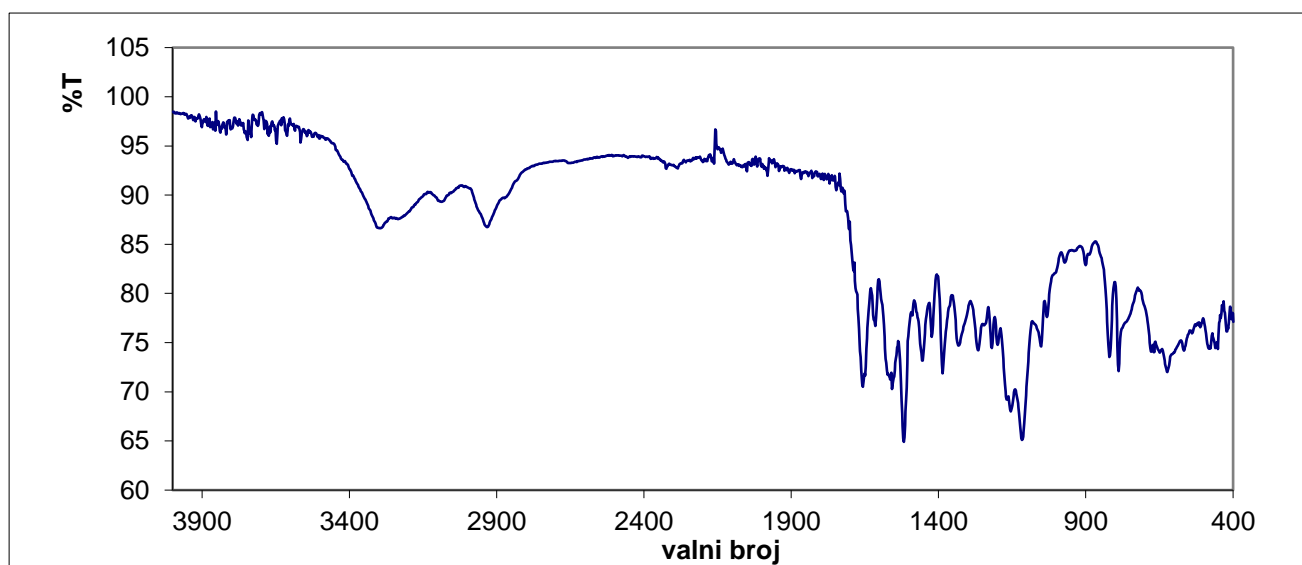
**6a**



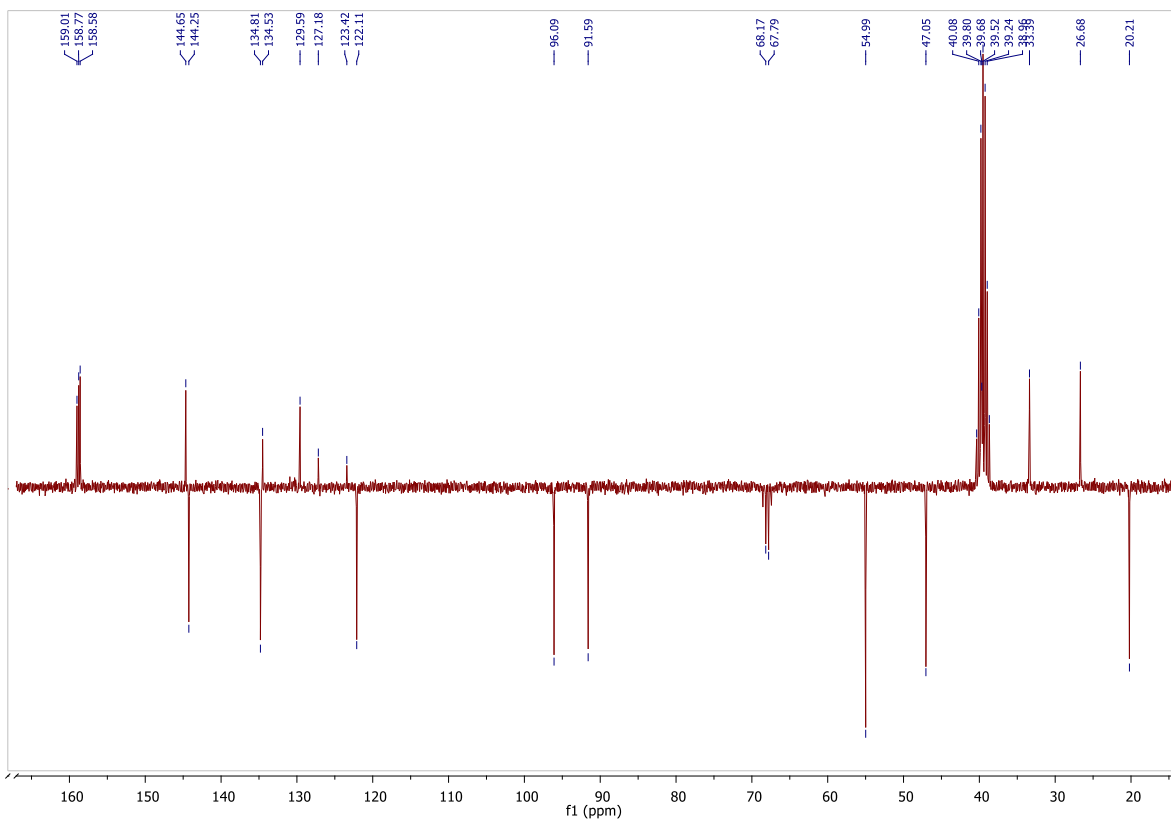
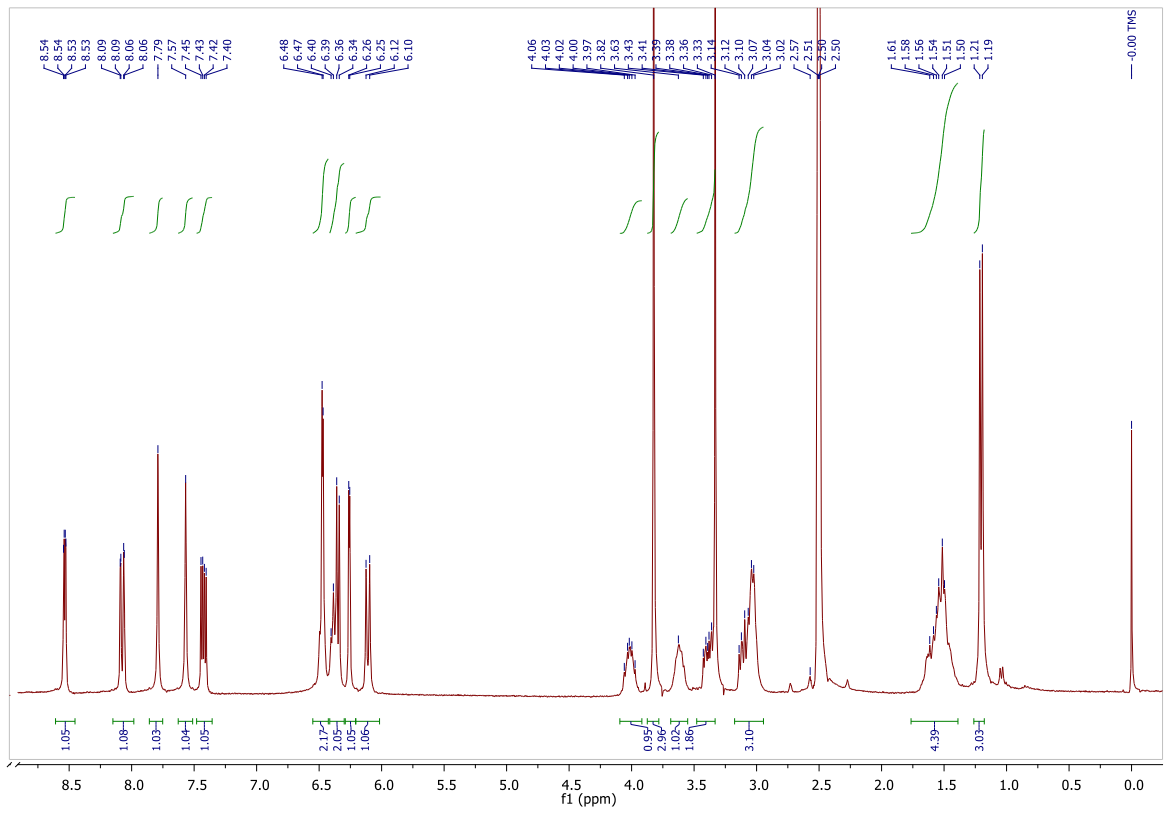


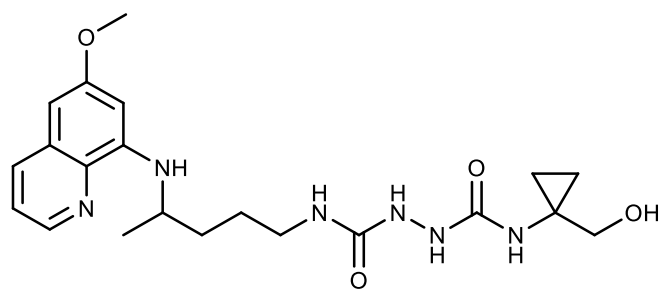


**6b**

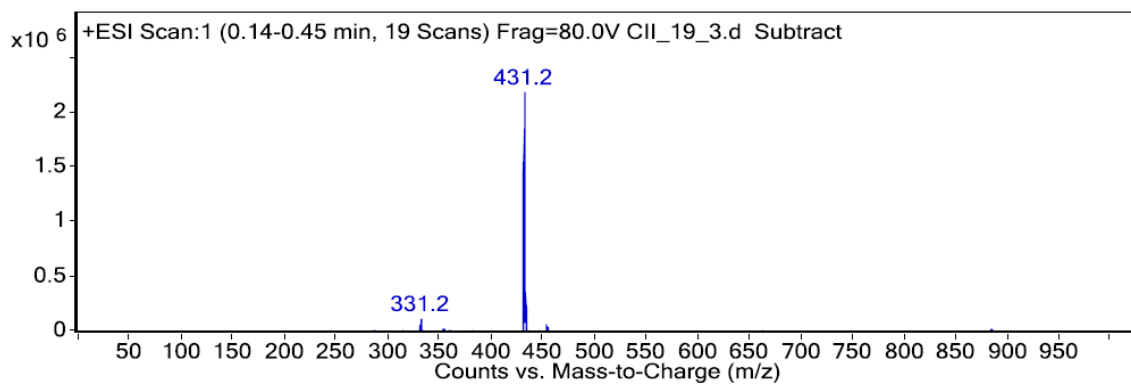
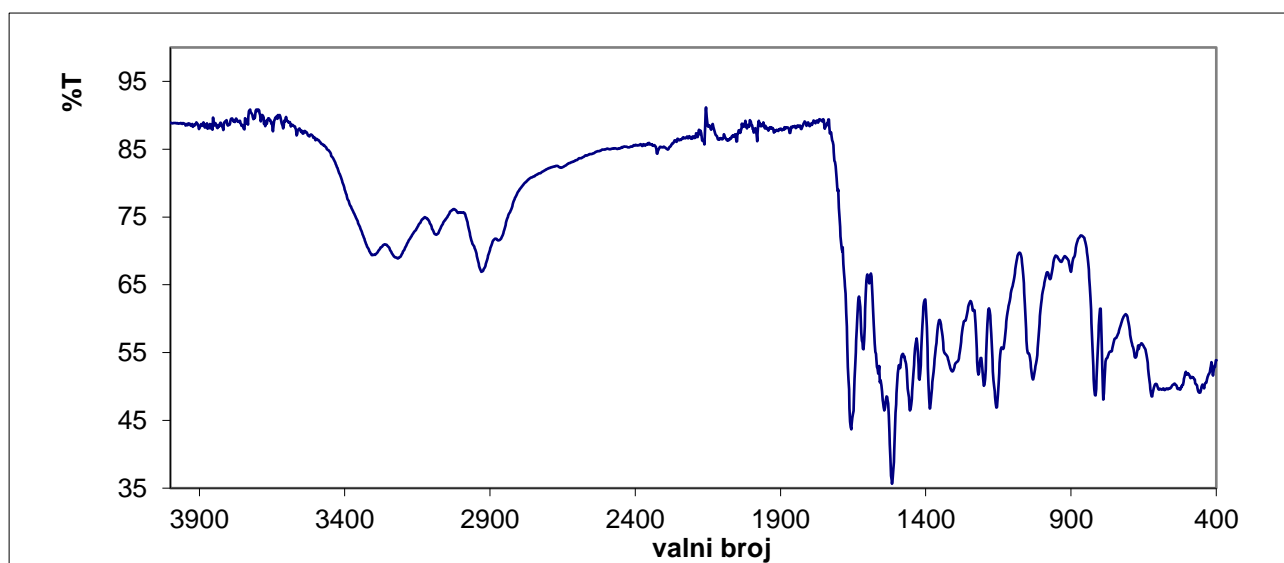


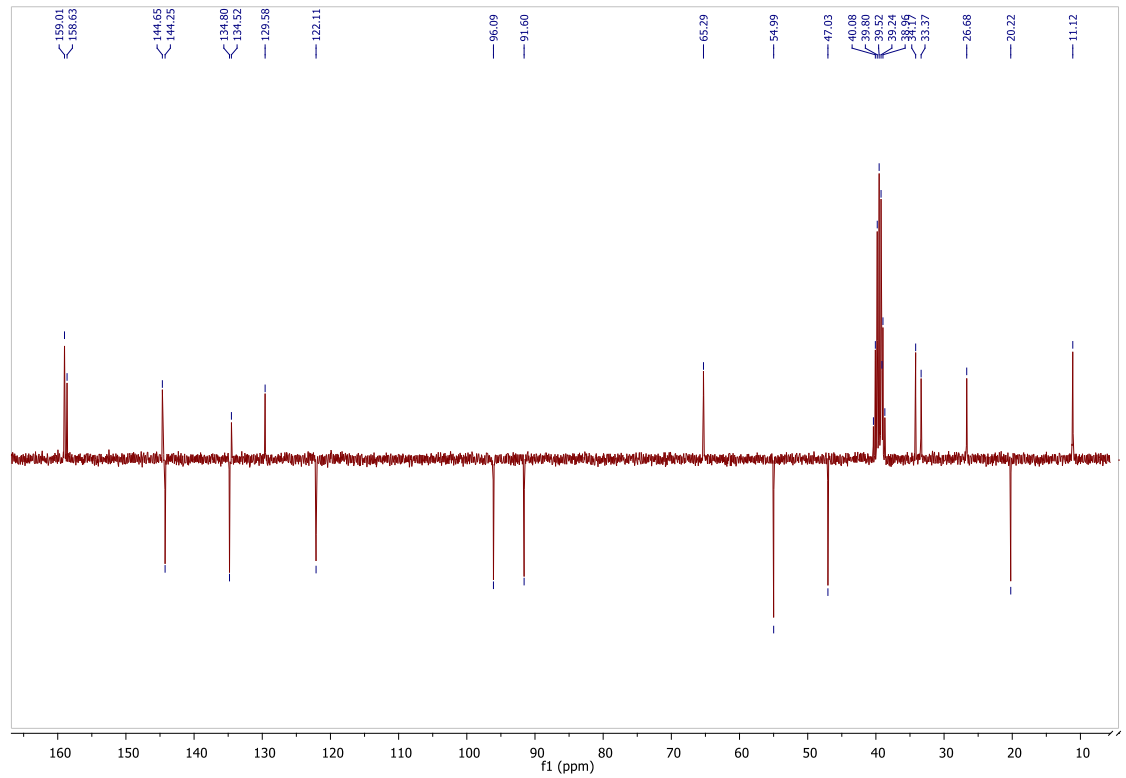
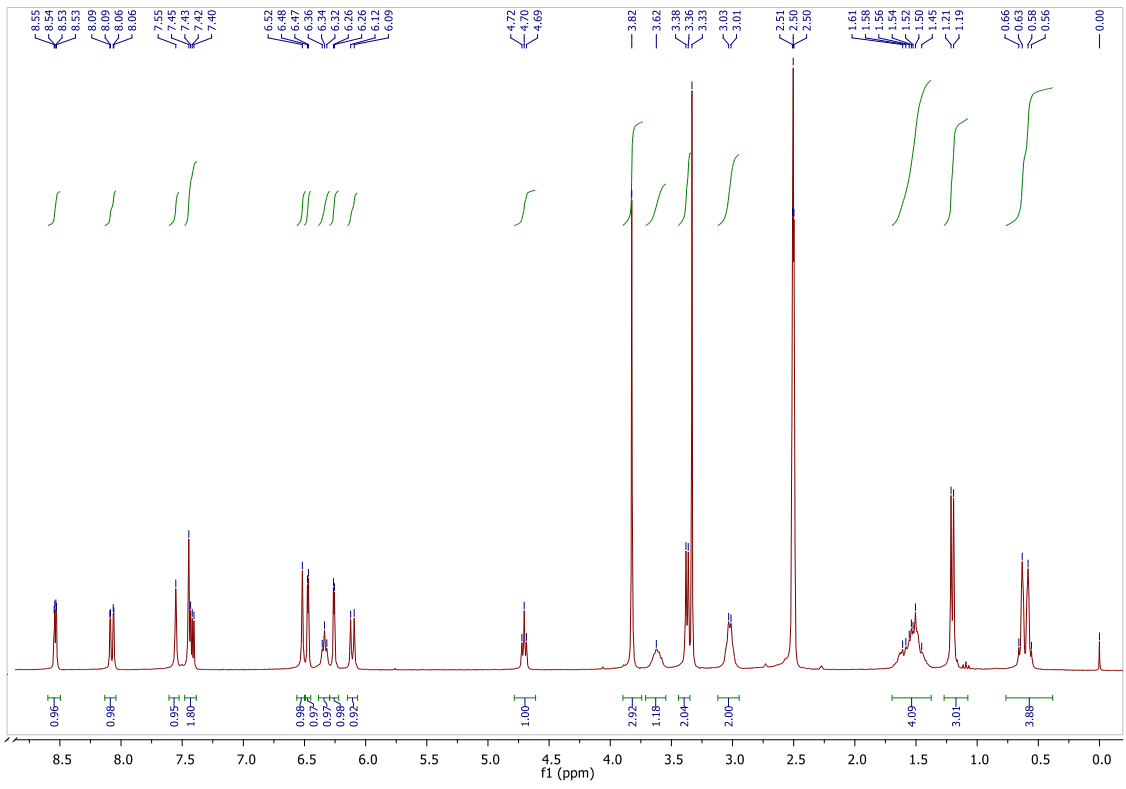


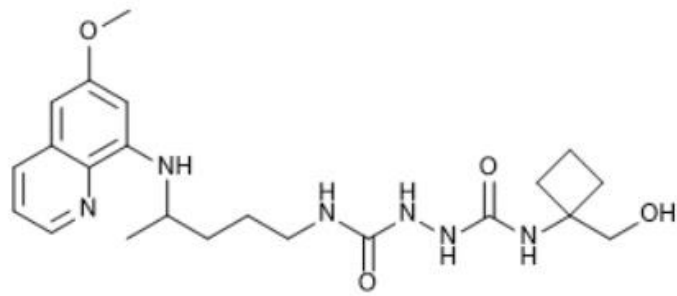




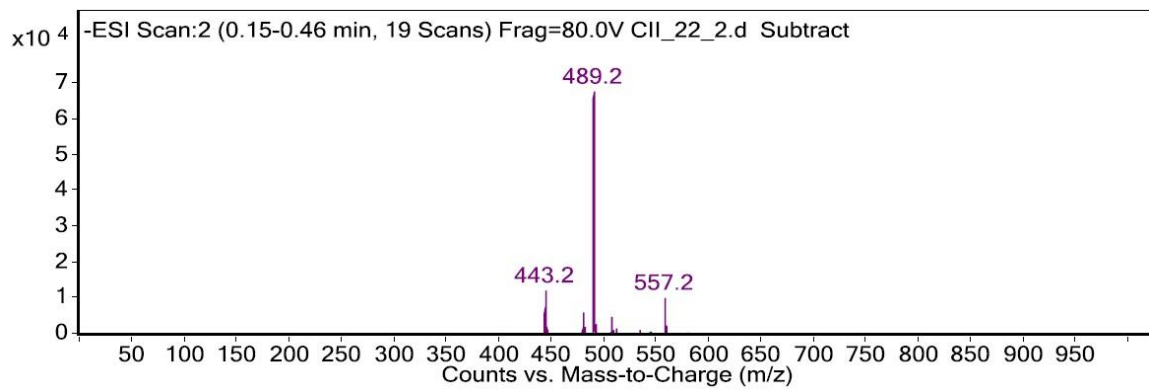
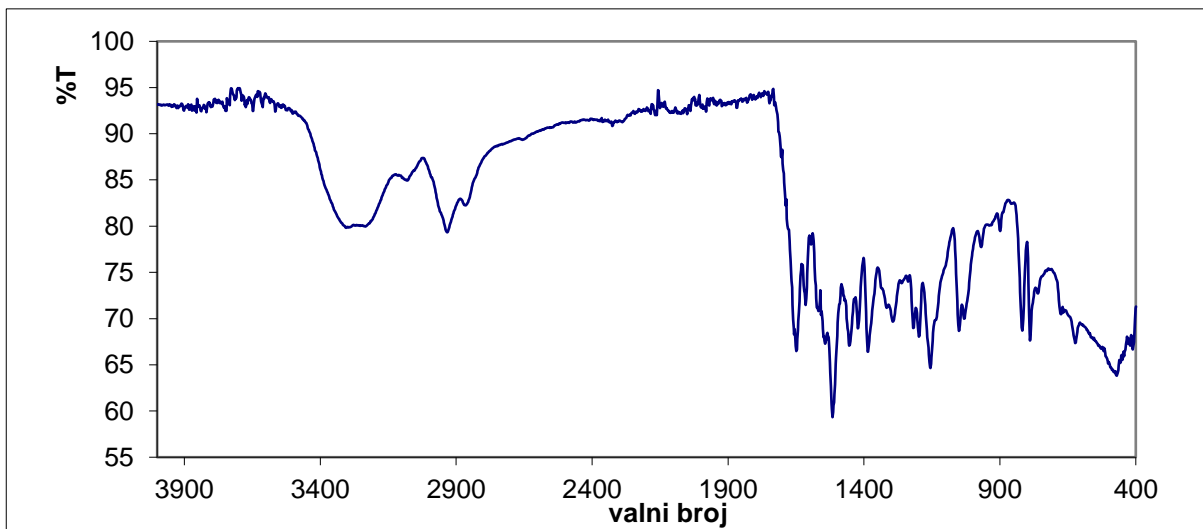
**6c**

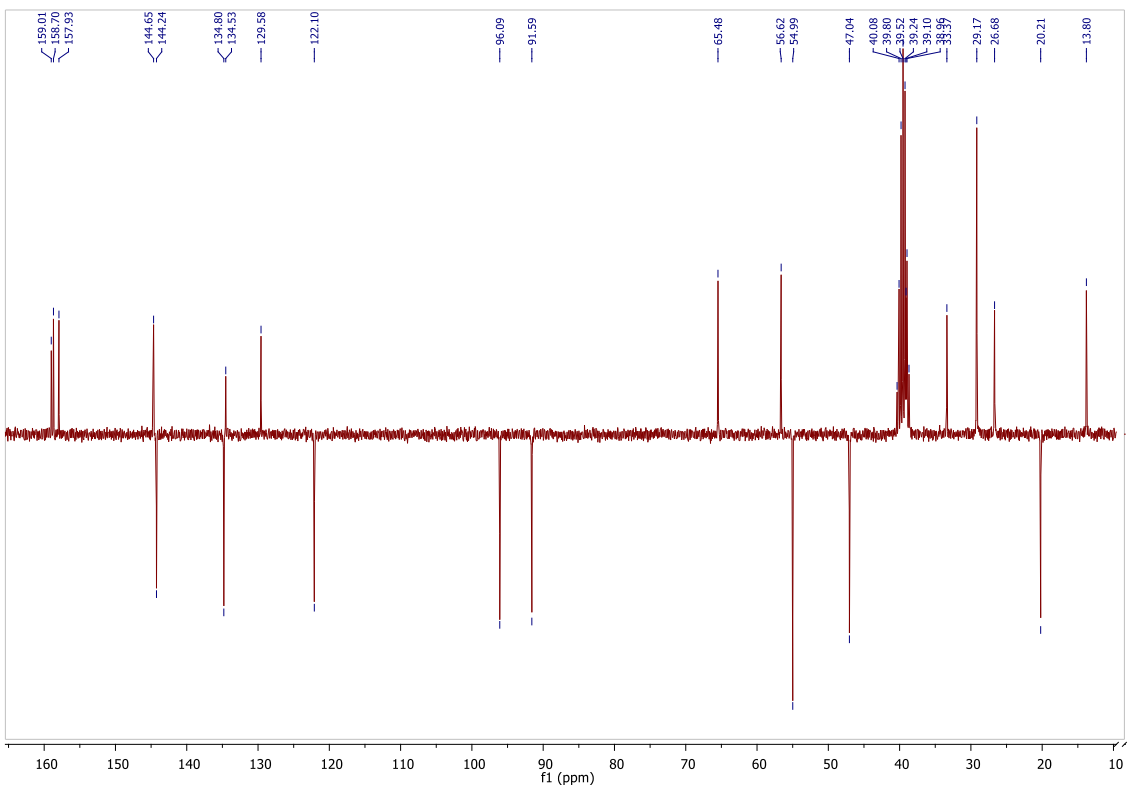
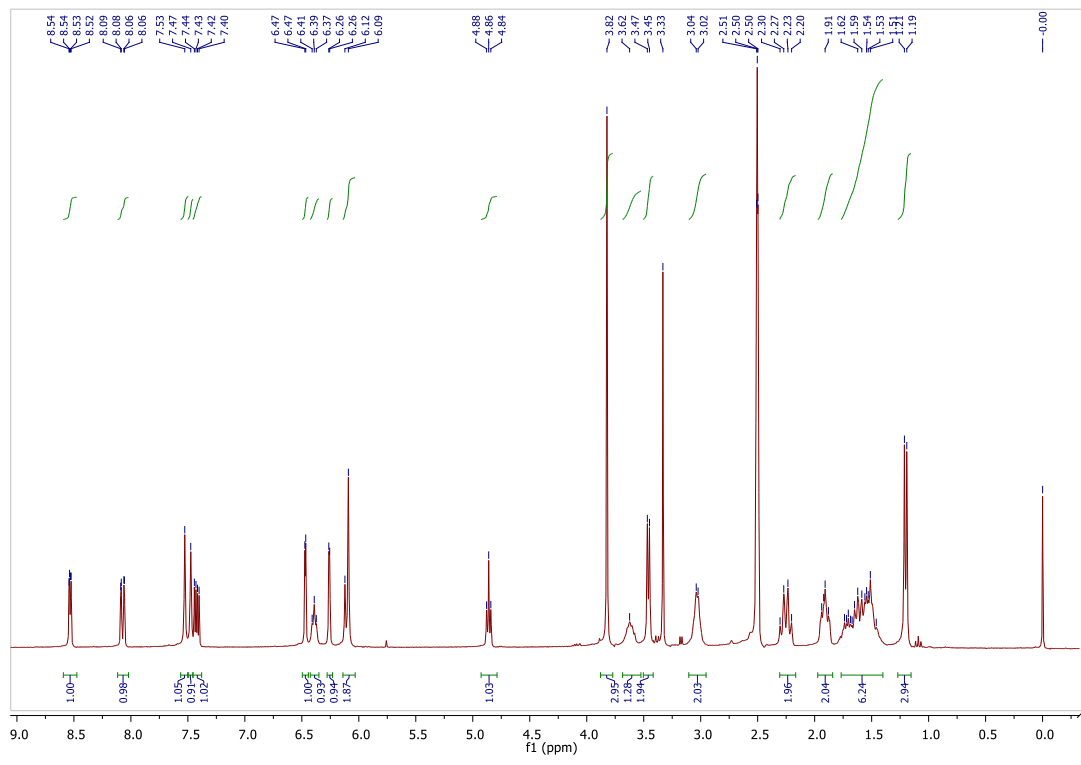






**6d**





## **ŽIVOTOPIS**

Hrvoje Boić rođen je 29. srpnja 1994. u Zagrebu. Završio je XV. gimnaziju u Zagrebu. Tijekom osnovne, a posebice tijekom srednje škole pokazao je zanimanje za kemiju i biologiju. Kao logičan nastavak upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet, studij farmacije 2013. U akademskim godinama 2015./2016. i 2016./2017. bio je član Studentskog zbora Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Izradi ovog rada pristupio je u Zavodu za farmaceutsku kemiju zbog velikog zanimanja za organsku i farmaceutsku kemiju. Također, privukla ga je i prilika za stjecanje znanja i vještina u istraživanju novih lijekova.