

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Filip Kozlina

**Sinteza i karakterizacija novih derivata
cimetne kiseline i primakina**

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Zorc i suvodstvom Kristine Pavić, mag. pharm. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016.

KRATICE

AKR1C3	aldo-keto reduktaza 1C3
BtH	benzotriazol
BtcCl	klorid 1-benzotriazol karboksilne kiseline
Caco-2	stanična linija humanog kolorektalnog adenokarcinoma
CAD	derivati cimetine kiseline (<i>cinnamic acid derivatives</i>)
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
FDA	Agencija za hranu i lijekove (<i>Food and Drug Administration</i>)
G6PD	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
HL-60	stanična linija humane akutne mijeloične leukemije
HT-29	stanična linija humanog adenokarcinoma debelog crijeva
IC_{50}	koncentracija koja inhibira rast 50 % stanica
INN	međunarodno nezaštićeno ime (<i>International Nonproprietary Name</i>)
IR	infracrveno elektromagnetsko zračenje (<i>infrared</i>)
$\log P$	koeficijent razdjeljenja
MCF-7	stanična linija humanog adenokarcinoma dojke
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (<i>minimal inhibitory concentration</i>)
MR	molarna refraktivnost (<i>molar refractivity</i>)
MS	masena spektrometrija
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PSA	polarna površina molekule (<i>polar surface area</i>)
PQ	primakin
QSAR	kvantitativni odnos strukture i djelovanja (<i>quantitative structure-activity relationship</i>)
s.t.	sobna temperatura
SW 620	stanična linija humanog karcinoma kolona
TEA	trietilamin
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TNF- α	tumor nekrotski faktor α
t_t	temperatura taljenja
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (<i>World Health Organization</i>)

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
1.1. Cimetna kiselina	3
1.1.1. Cimetna kiselina u prirodi.....	3
1.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva cimetne kiseline	4
1.1.3. Upotreba cimetne kiseline i njenih derivata	4
1.1.4. Biološko djelovanje cimetne kiseline i njenih derivata	5
1.2. Primakin.....	9
1.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva primakina	9
1.2.2. Upotreba primakina	10
1.2.3. Biološko djelovanje derivata primakina	11
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Sinteza klorida 1-benzotriazol karboksilne kiseline (BtcCl, 1).....	18
3.2. Sinteza CAD kiselinskih klorida 2a-d	18
3.3. Sinteza CAD benzotriazolida 4a-d	18
3.4. Sinteza CAD-primakin amida 3a-d	18
3.5. Sinteza <i>N</i> -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-1 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-1-karboksamida (5).....	21
3.6. Sinteza <i>N</i> -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazinkarboksamida (6).....	22
3.7. Sinteza CAD-primakin semikarbazida 7a-d	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. ZAHVALE	38
7. POPIS LITERATURE	40
8. SAŽETAK.....	46
9. SUMMARY	48
PRILOZI	
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

Unatoč poboljšanju antitumorske terapije, karcinom je još uvijek po učestalosti drugi uzročnik smrtnosti u razvijenim zemljama. Produljenje životnog vijeka, povećanje osjetljivosti suvremenog čovjeka na karcinom u zadnjih nekoliko desetljeća, prevelika toksičnost i premala selektivnost postojećih citostatika te stvaranje rezistencije na citostatike rezultirali su potrebom za novim antitumorskim lijekovima. Lijekovi koji se danas koriste u kemoterapiji nisu dorasli ozbiljnim terapijskim problemima pa je istraživanje u potrazi za sigurnijim i učinkovitijim citostaticima i dalje vrlo aktualno.

Mogućnost da se novi antitumorski lijekovi razviju iz antimalarika postala je vidljiva nakon otkrića da lijekovi koji se koriste u terapiji malarije (artemisinin, artezumat, tetraciklini, klorokin, primakin) posjeduju i antitumorsko djelovanje. Trenutno se na listi antimalarika nalazi dvadeset lijekova, od kojih 14 posjeduju antitumorsko djelovanje, a čak 7 se nalazi u kliničkim ispitivanjima kao potencijalni citostatici (1, 2). Dokazano je i da istovremena primjena nekih antimalarika uz citostatike povoljno utječe na njihovo djelovanje. Konkretno, kombinirana primjena antimalarika klorokina uz lidamicin potencira njegovo antitumorsko djelovanje *in vitro* (3), dok se farmakokinetička svojstva imatiniba poboljšavaju ako se uz njega primijeni primakin (4).

U potrazi za novim antitumorskim lijekovima istraživanja na Zavodu za farmaceutsku kemiju fokusirana su na primakin, antimalarik s kinolinskom strukturom. Naime, u literaturi je poznato djelovanje derivata kinolina kao inhibitora različitih enzima (npr. topoizomerase, protein kinaza, telomerase) pa se neki od njih smatraju potencijalnim vodećim spojevima u razvoju novih citostatika (5). U preglednom radu Afzala i suradnika s 280 literaturnih citata opisani su mehanizmi citostatskog djelovanja različitih derivata kinolina (6). U nekoliko znanstvenih radova koje je osmislila i publicirala istraživačka grupa na Zavodu za farmaceutsku kemiju pripremljeni su novi derivati primakina iz skupine urea i semikarbazida koji su u ispitivanjima *in vitro* pokazali značajno citostatsko djelovanje u mikromolarnim koncentracijama te veliku selektivnost prema staničnim linijama MCF-7 (stanična linija humanog adenokarcinoma dojke) ili SW 620 (stanična linija humanog karcinoma kolona). Nadalje, u znanstvenoj je literaturi opisano citostatsko djelovanje derivata klorokina (također kinolinskog antimalarika) s cimetnom kiselinom (7). Na temelju tih indikacija, u nastavku istraživanja na Zavodu planirana je sinteza derivata primakina koji u svojoj strukturi sadrže cimetnu kiselinu i njene derivate (CAD, *cinnamic acid derivatives*).

1.1. Cimetna kiselina

1.1.1. Cimetna kiselina u prirodi

Cimetna kiselina (3-fenilprop-2-enska kiselina, fenilakrilna kiselina) i njeni derivati (CAD), prije svega esteri (cinamati), cinamaldehyd te hidroksi i metoksi derivati cimetne kiseline, široko su rašireni u biljnom svijetu. U značajnim količinama cimetna kiselina prisutna je u vrstama roda *Cinnamomum* iz porodice Lauraceae, prema kojemu je i dobila naziv. Nekoliko vrsta iz tog roda uzgaja se komercijalno za dobivanje začina cimeta, a najvažnija među njima je vrsta *Cinnamomum verum* J. Presl (Slike 1-3).



Slika 1. *Cinnamomum verum* J. Presl (Lauraceae)



Slika 2. List i cvat biljke *C. verum*

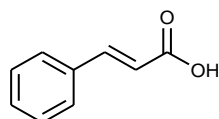


Slika 3. Kora biljke *C. verum*

Cimetna kiselina je ključni intermedijer u biosintezi važnih spojeva kao što su derivati šikimata, fenilpropanoida, stirena i stilbena. Šikiminska kiselina je prekursor u biosintezi mnogih alkaloida, aromatskih aminokiselina i derivata indola, a prisutna je u različitim eteričnim uljima, gumama i balzovima kao slobodna kiselina ili esterificirana. Za industrijske potrebe cimetna kiselina i njeni derivati ne izoliraju se iz prirodnih izvora nego se priređuju sintetskim putem, a njihova godišnja proizvodnja i potrošnja kreće se od 1 do 10 tona (8).

1.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva cimetne kiseline

Cimetna kiselina je nezasićena aromatska kiselina. Može postojati kao *cis* i *trans* stereoizomer, a u prirodi je više zastupljen *trans* izomer. Bijela je kristalinična tvar slabo topljiva u vodi (500 mg L^{-1}), a dobro topljiva u mnogim organskim otapalima. Miriše na med. Molekulska formula cimetne kiseline je $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$, relativna molekulska masa 148,16, a talište $133 \text{ }^\circ\text{C}$ (9). Strukturna formula cimetne kiseline prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Cimetna kiselina

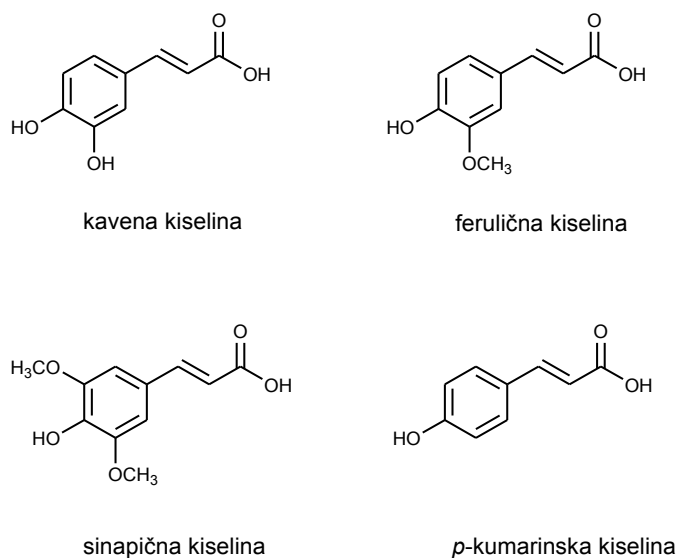
1.1.3. Upotreba cimetne kiseline i njenih derivata

Cimetna kiselina i njeni derivati koriste se u velikim količinama u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Sastojci su šampona, parfema, kozmetičkih proizvoda i sapuna. Cimetna kiselina nije nosilac karakterističnog mirisa cimeta, već je to metil-cinamat. On se dodaje različitim kozmetičkim i prehrambenim proizvodima, a sličnu primjenu ima i cinamaldehyd. Sama cimetna kiselina važna je sirovina za sintezu L-fenilalanina iz kojeg se zatim proizvodi dipeptidni zaslađivač aspartam. Cinamol i njegovi esteri, naročito cinamil-acetat, koriste se u proizvodnji parfema, a cinamol je i polazni reaktant za pripravu fotosenzitivnih polimera i boja za pisane. Esteri cimetne kiseline s dugolančanim alkoholima, poput oktil-metoksicinamata, koriste se pak u pripravcima za zaštitu kože od sunca (8).

1.1.4. Biološko djelovanje cimetine kiseline i njenih derivata

Derivati cimetine kiseline imaju izuzetno širok farmakološki profil. Postoje bogati literaturni izvori o njihovom antioksidativnom, antimikrobnom, antituberkulotskom, antimikotskom, antidiabeteskom, hepatoprotektivnom, antidepresivnom, hipolipemičkom, antimalarijskom, antivirusnom, anksiolitičkom, protuupalnom i citostatskom djelovanju. Publikacije autora Sharme (8) te Lone i suradnika (10) daju pregled bioloških djelovanja cimetine kiseline i njenih derivata.

Prisutnost vinilne skupine smatra se odgovornom za antioksidativno djelovanje derivata cimetine kiseline. Dokazano je antioksidativno djelovanje feniletilnih estera kavene i ferulične kiseline i nekih derivata sinapične i *p*-kumarinske kiseline (11, 12). Strukturne formule navedenih kiselina, koje su prisutne i u prirodi, prikazane su na Slici 5.

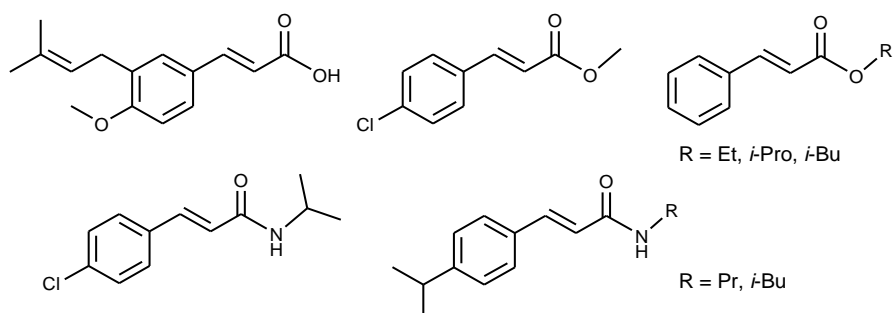


Slika 5. Prirodni strukturni analozi cimetine kiseline

Metil-kafeat iz biljaka *Gaillardia pulchella*, *Gochnatra rusbyana*, *Notopterygium incisum* i *Linum usitatissimum* posjeduje antimikrobno djelovanje te antitumorsko djelovanje na staničnu liniju Sarcoma 180 (13). Esterski i amidni derivati cimetine kiseline, a naročito izobutil-cinamat, pokazali su značajno antimikrobno djelovanje na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (14). O antimikrobnom djelovanju derivata cimetine kiseline napisan je i pregledni članak sa 166 literaturnih citata (15).

Bairwa i suradnici sintetizirali su fenilakrilamidne derivate cimetne kiseline i gvanilhidrazona te ispitali njihovo djelovanje protiv uzročnika tuberkuloze (*M. tuberculosis*). Neki od ispitanih spojeva pokazali su antituberkulotsko djelovanje ($MIC\ 6,49\ \mu\text{mol L}^{-1}$) i dobar sigurnosni profil (16).

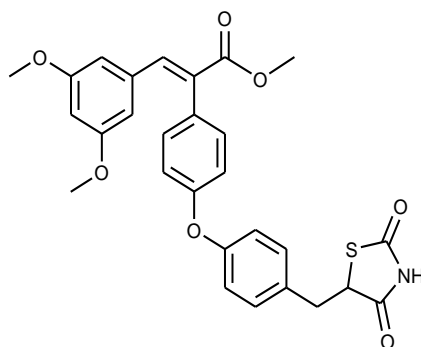
U nekoliko publikacija opisano je i antimikotsko djelovanje derivata cimetne kiseline (17, 18), a derivati s najjače izraženim inhibitornim djelovanjem na rast i razvoj gljivica prikazani su na Slici 6.



Slika 6. Derivati cimetne kiseline s antimikotskim djelovanjem

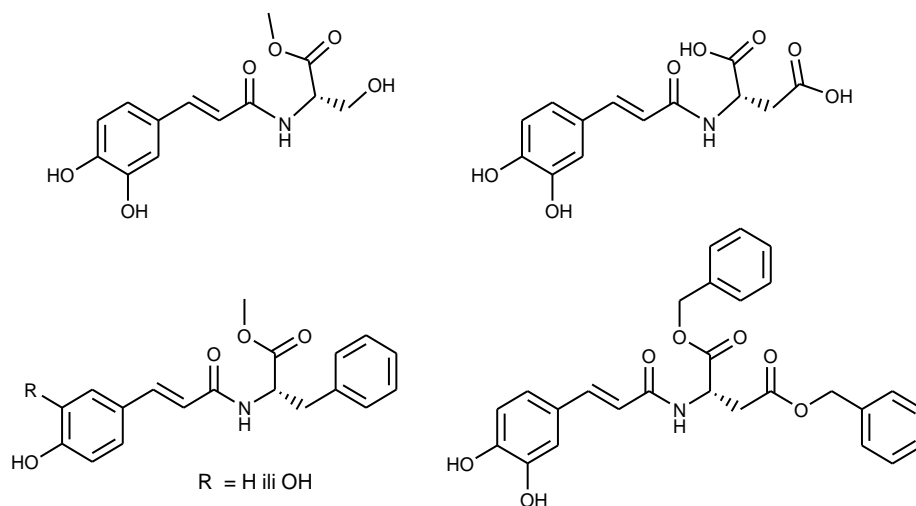
U novije vrijeme dokazano je i virustatsko djelovanje cimetne kiseline i p-sulfoksicimetne kiseline (19, 20). Nekoliko CAD pokazalo je učinkovito antimalarijsko djelovanje (21). Ti spojevi inhibiraju transport monokarboksilata kroz membrane eritrocita i mitohondrija i tako sprječavaju rast i nezrelih i zrelih stadija parazita.

Cimetna kiselina i njeni derivati pokazali su antidijabetičko djelovanje, koje se opsežno istražuje, a za samu cimetnu kiselinu dokazano je da stimulira sekreciju inzulina *in vitro* te poboljšava toleranciju na glukozu *in vivo* (22). Među derivatima cimetne kiseline, antidijabetičko djelovanje pokazali su derivati s metoksi skupinom u *meta* i hidroksilnom skupinom u *para* položaju (derivati ferulične kiseline): dokazano je da potiču izlučivanje inzulina *in vitro* i *in vivo* (23). Tiazolidinski derivat prikazan na Slici 7 vrlo je učinkovit u snižavanju povišene koncentracije glukoze u krvi (24). S druge strane, hidroksilni derivati cimetne kiseline (3-hidroksi, 4-hidroksi i 3,4-dihidroksi derivati) opisani su kao učinkoviti hepatoprotektivi (25).



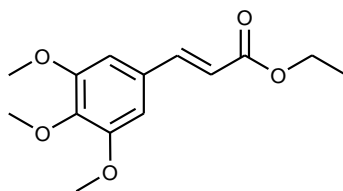
Slika 7. Tiazolidinski derivat cimetine kiseline s antihiperглиkemijskim djelovanjem

Nadalje, dokazano je i hipolipemičko djelovanje CAD, i to derivata kavene kiseline s aminokiselinama. Kim i suradnici opisali su hipolipemički učinak derivata kavene kiseline amidirane serinom, odnosno asparaginskom kiselinom (26). Dibenzilester L-asparaginske kiseline amidiran kavenom kiselinom i metilni ester L-fenilalanina amidiran *p*-kumarinskom kiselinom ili kavenom kiselinom inhibiraju pohranu kolesterola u stanice i djeluju kao antiaterosklerotici (Slika 8) (27).



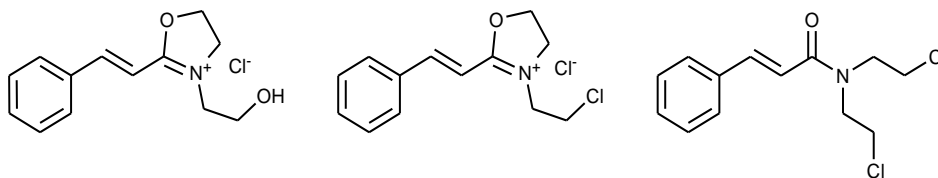
Slika 8. Derivati kavene kiseline s aminokiselinama – antihiperlipemici

Konjugati cimetine kiseline i moronizida snažni su inhibitori TNF- α i potencijalni protuupalni agensi (28). Također, metoksi supstituirani cinamati, poput etil-3,4,5-trimetoksicinamata (Slika 9) iz biljke *Piper longum* inhibiraju TNF- α induciranu ekspresiju adhezijskih molekula (npr. E-selektina) i stoga imaju važnu ulogu u kontroli inflamatornih bolesti (29).



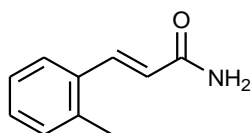
Slika 9. Etil-3,4,5-trimetoksicinamat, CAD s protuupalnim djelovanjem

Neki derivati cimetne kiseline pokazuju i citotoksični učinak. Među njima su derivati s oksazolinijem i dušikovim iperitom koji mogu poslužiti kao vodeći spojevi za razvoj novih citostatika (30) (Slika 10).



Slika 10. Derivati cimetne kiseline s citotoksičnim učinkom

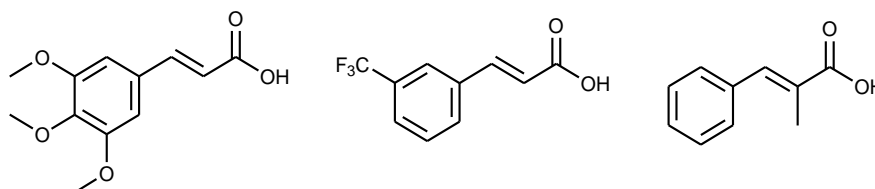
De i suradnici objavili su pregledni članak o citostatskom djelovanju CAD (31). Prirodni hidroksi derivati cimetne kiseline posjeduju antitumorsko djelovanje. Nitzsche i suradnici su dokazali da kavena kiselina u uvjetima *in vitro* ima slabo citotoksično djelovanje na HL-60 (stanična linija akutne mijeloične leukemije) te nisku toksičnost zbog čega predstavlja zanimljivu molekulu za razvoj cistostatika (32). Antitumorsko djelovanje pokazuju i amidi cimetne kiseline, a osobito 2-metilcinamid (Slika 11), produkt fermentacije piva iz *Streptomyces griseoluteus*, koji je pokazao značajno antiinvazivno i antimetastatsko djelovanje (33).



Slika 11. 2-metilcinamid – amidni derivat cimetne kiseline s citostatskim djelovanjem

Cimetna kiselina i njeni 3,4,5-trimetoksi, 3-trifluormetil i α -metil derivati (Slika 12) potentni su inhibitori enzima AKR1C3 (aldo-keto reduktaza 1C3) u mikromolarnim koncentracijama.

Ovaj enzim je također poznat kao 17-hidroksisteroid-dehidrogenaza tip 5, a uloga mu je pretvorba androstendiona u testosteron te estrona u 17-estradiol te stoga predstavlja terapijsku metu u liječenju karcinoma ovisnih o hormonima, poput karcinoma prostate, dojke i endometrija (31).

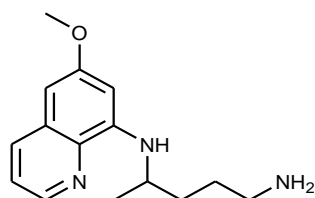


Slika 12. CAD – potentni inhibitori AKR1C3

1.2. Primakin

1.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva primakina

Primakin (PQ) je međunarodno nezaštićeno ime (*International Nonproprietary Name*, INN) za *N*-(6-metoksikinolin-8-il)pentan-1,4-diamin (Slika 13).



Slika 13. Primakin

Dostupan je kao generički lijek od različitih proizvođača, a upotrebljava se kao sol s fosfornom kiselinom. Molekulska formula primakin difosfata je $C_{15}H_{21}N_3O \times 2 H_3PO_4$, relativna molekulska masa 455,34, topljivost u vodi $50 g L^{-1}$, a talište $205-206 ^\circ C$. Iako primakin ima kiralni atom ugljika, upotrebljava se kao racemat (34).

1.2.2. Upotreba primakina

Primakin je u upotrebi kao antimalarik već više od 60 godina. Prvi put ga je za američko tržište odobrila Agencija za hranu i lijekove (*Food and Drug Administration*, FDA) 1952. godine, a danas se nalazi na listi esencijalnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije (*World Health Organization*, WHO) (35). Primjenjuje se pri radikalnom liječenju infekcija uzrokovanih parazitima *Plasmodium ovale* i *P. vivax*, a vrlo je djelotvoran i protiv primarnih egzoeritrocitnih faza *P. falciparum*. Aktivan je i prema gametocitima svih vrsta uzročnika ljudske malarije te tako onemogućava njezino širenje. Jedini je antimalarik u upotrebi koji sprječava pojavu recidiva infekcije hipnozoitima *P. vivax* i *P. ovale* (36).

Primakin izaziva hemolizu kod ljudi s nedostatkom enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD), čestog kod afričkih muškaraca. Međutim, jačina hemolize ovisna je o dozi, trajanju terapije te stupnju deficijencije G6PD. Procjenjuje se da je rizik od smrtonosne hemolize kod pojedinaca sa slabim do umjerenim nedostatkom G6PD vrlo nizak ako se primakin primijeni jednokratno (35).

Uspješnost liječenja primakinom uvelike ovisi o ukupnoj dozi. Smatra se da je doza od 30 mg (0,5 mg/kg) tijekom 14 dana optimalna protiv tropskih sojeva plazmodija, dok je 15 mg (0,25 mg/kg) dovoljno protiv sojeva umjerenih područja. Kraća terapija višim dozama primakina jednako je učinkovita, međutim tada postoji rizik od hemolize kod pojedinaca s nedostatkom G6PD pa je potrebno testiranje aktivnosti G6PD. Kod profilakse malarije primakin se uzima u dozi od 30 mg dnevno (0,5 mg/kg), jedan dan prije dolaska u rizična područja do sedam dana nakon povratka. Kao gametocid primakin se primjenjuje u sprječavanju transmisije *P. falciparum*. Obično se koristio u jednokratnoj dozi od 0,5 do 0,75 mg primakin baze po kg tjelesne mase (30-45 mg dnevno), ali nove smjernice WHO preporučuju nižu dozu od 0,25 mg/kg (15 mg dnevno) jednokratno u kombinaciji s artemisininom bez testiranja aktivnosti G6PD. Zbog njegove slabe aktivnosti prema nespolnim krvnim oblicima parazita, uzima se zajedno s krvnim shizontocidom, klorokinom ili artemisininom kod radikalnog liječenja infekcija uzrokovanih parazitima *P. vivax* i *P. ovale* (35).

Točan mehanizam kojim primakin djeluje na hipnozoite i gametocite *Plasmodium* vrsta još uvijek nije razjašnjen, ali pretpostavlja se da djeluje na metabolizam u mitohondriju parazita interferirajući s funkcijom ubikinona kao prenosioca elektrona u respiratornom lancu.

Drugi mogući mehanizam antimalarijskog djelovanja primakina je stvaranje visokoreaktivnih metabolita koji povećavaju oksidativni potencijal unutar stanice. Biotransformacija 8-aminokinolina odgovorna je, osim za antimalarijsko djelovanje, i za njihovu toksičnost (35). To potvrđuju i najnovija istraživanja mehanizma djelovanja primakina i klorokina, koja su pokazala kako primakin oštećuje Fe-S klustere enzima akonitaze i fumaraze uključenih u ciklus limunske kiseline, pa time interferira s aerobnom respiracijom plazmodija (37). Uz to, primakin djeluje i na proliferaciju mitohondrija te inhibira rast parazita u fazi koja zahtjeva funkcionalne mitohondrije. Još uvijek je upitno zašto primakin djeluje samo na određene faze u životnom ciklusu parazita. Obično su gametociti u kasnijoj fazi rezistentniji na antimalarike od gametocita ranijih faza i aseksualnih forma parazita, a primakin je jedini antimalarik na koji su osjetljiviji gametociti kasnijih faza od nespolnih oblika (38).

1.2.3. Biološko djelovanje derivata primakina

U literaturi su opisani mnogobrojni derivati primakina. Možemo ih podijeliti u dvije skupine: derivate sa supstituentima na kinolinskom prstenu i derivate koji su nastali modifikacijom primarne amino skupine primakina. Neki od njih pokazali su veću djelotvornost i/ili manju toksičnost, veću selektivnost prema pojedinim vrstama iz roda *Plasmodium* ili pak povećanu aktivnost na shizonte.

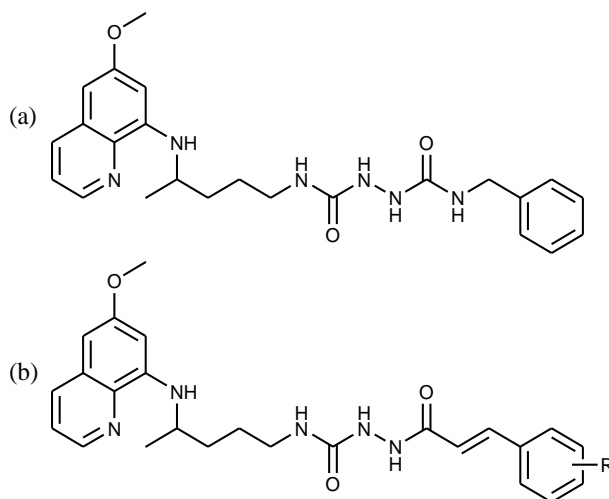
Modifikacije na terminalnoj primarnoj amino skupini primakina pokazale su se jako učinkovite u povećanju bioraspoloživosti, smanjenju biorazgradnje lijeka u karboksiprimakin (inaktivni metabolit) ili povećanju antimalarijskog djelovanja (38). Sintetizirani su brojni derivati primakina i aminokiselina ili peptida te su neki od njih pokazali snažnije antimalarijsko djelovanje od samog primakina: jedni zbog smanjene metaboličke razgradnje, a drugi zbog toga što su zahvaljujući hidrolizi peptidazama djelovali kao prolijekovi primakina (39, 40). Farmakološka aktivnost primakina značajno se povećava ako je lijek vezan na lizosomotropne nosače kao što su poliakrilne škrobne mikročestice ili asialofetuin. Konjugati primakina s polimerima poliaspartamidnog tipa imaju bolju topljivost i produljeni učinak u odnosu na primakin, a djelotvorni su protiv krvnih shizontocida kod eksperimentalnih životinja (41).

Uvođenjem imidazolidin-4-ona na terminalnu amino skupinu primakina dobiveni su spojevi koji su, uz antimalarijsko, pokazali i djelovanje na HT-29 (stanična linija adenokarcinoma debelog crijeva), Caco-2 (stanična linija humanog kolorektalnog adenokarcinoma) i MCF-7 (stanična linija humanog adenokarcinoma dojke) (42). Primakin i neki njegovi derivati imaju snažno i/ili specifično djelovanje na MCF-7 pa se može očekivati da se među derivatima primakina pronađu lijekovi za terapiju karcinoma dojke (42-47).

Istraživanja na Zavodu za farmaceutsku kemiju usmjerena su upravo na pronalaženje novih derivata primakina s pojačanim cistostatskim djelovanjem. Tijekom zadnjih nekoliko godina sintetizirano je stotinjak novih derivata koji su pokazali citostatsko djelovanje u mikromolarnim koncentracijama (43-47), a neki od njih i veliku selektivnost prema MCF-7 stanicama ili prema staničnoj liniji SW 620. Testirani su i farmakološki učinci nekoliko derivata primakina na središnji živčani sustav: u pokusima *in vivo* dokazano je njihovo antinociceptivno djelovanje te sniženje lokomotoričke aktivnosti (48).

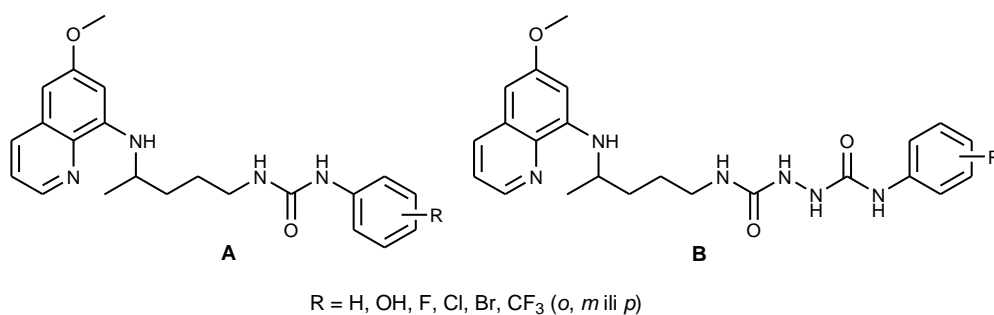
Na temelju dosadašnjih ispitivanja citostatskog djelovanja derivata primakina može se zaključiti da je za antiproliferativni učinak nužan primakinski (kinolinski) dio molekule. Nadalje, dodatak lipofilnih ostataka vezanih za primarnu amino skupinu primakina preko mosta od nekoliko elektronegativnih atoma (npr. urea ili semikarbazidnom skupinom) predstavlja strukturnu modifikaciju koja potencira antiproliferativno djelovanje ili povećava selektivnost prema MCF-7, odnosno SW 620 staničnim linijama. Derivati s velikim aromatskim skupinama, poput benzhidrilne ili tritilne pokazali su snažno antiproliferativno djelovanje, ali manju selektivnost prema MCF-7 ili SW 620 staničnim linijama. Generalno su semikarbazidni derivati imali izraženije citostatsko djelovanje od svojih urea analoga, ali i uree su često pokazivale selektivno djelovanje na stanice MCF-7 linije (43-47).

Karbamoilsemikarbazidni derivati s cikloalkilnim, arilnim, benziloksi i hidroksi supstituentima pokazali su selektivno antiproliferativno djelovanje na MCF-7 stanice (43). Među njima je najpotentniji bio derivat s benzilnom skupinom (IC_{50} $1,0 \pm 0,2$ μM), čija je struktura srodna strukturi acilsemikarbazidnih derivata primakina i CAD (Slika 14). Taj spoj je pokazao potpunu selektivnost prema MCF-7 stanicama, dok prema ostalim ispitanim staničnim linijama nije pokazao djelovanje. Otkriće takvih spojeva od posebne je važnosti, jer upućuje na to da se antiproliferativno djelovanje tih tvari ne temelji na citotoksičnosti, već je posljedica specifičnih mehanizama djelovanja.



Slika 14. Karbamoilsemikarbazidni derivat primakina s benzilnim supstituentom posve selektivnog djelovanja (a) i opća formula PQ-CAD acilsemikarbazida (b)

Na posljetku, derivati opće formule **A** i **B** (Slika 15) u kojima je primakin povezan sa supstituiranim benzenskim prstenom preko urea ili semikarbazidnog ostatka pokazali su se posebno aktivni i/ili selektivni prema MCF-7 staničnoj liniji u pokusima *in vitro* na cijelom nizu tumorskih staničnih linija (47). Osobito su aktivni bili karbamoilsemikarbazidni derivati s 4-bromfenilnom, 4-fluorfenilnom i 3,5-*bis*-(trifluormetil)fenilnom skupinom. Ti spojevi mogu poslužiti kao spojevi uzori za razvoj novih citostatika.



Slika 15. Derivati primakina s izraženim citostatskim djelovanjem

U svrhu daljnjeg optimiranja strukture derivata primakina bit će sintetizirani i biološki evaluirani derivati srodni opisanima, koji umjesto halogenfenilnog ili hidroksifenilnog dijela molekule sadrže fenilakrilnu kiselinu, tj. cimetnu kiselinu ili derivat cimetne kiseline.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija novih derivata primakina koji u svojoj strukturi sadrže cimetnu kiselinu ili derivat cimetne kiseline.

Dizajniranje novih spojeva koji sadrže primakinsku komponentu i derivat cimetne kiseline temelji se na pregledu literaturnih podataka te rezultata istraživanja na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. U publikacijama istraživačke skupine s Fakulteta (43-47) dokazano je snažno antiproliferativno djelovanje srodnih spojeva koji sadrže primakin-urea-supstituirani benzen ili primakin-semikarbazid-supstituirani benzen. Karbamoilsemikarbazidni derivati s hidroksilnom skupinom ili halogenim atomom na benzenskoj jezgri pokazali su i veliku selektivnost prema MCF-7 staničnoj liniji (IC_{50} 0,1-2,6 μ M). Među karbamoilsemikarbazidnim derivatima koje su sintetizirali i biološki evaluirali Perković i suradnici (43), potpuno selektivno i najsnažnije antiproliferativno djelovanje prema MCF-7 pokazao je upravo benzilni derivat čija je struktura srodna strukturi acilsemikarbazidnih derivata primakina i cimetne kiseline ili CAD. Uz to, na temelju literaturnih izvora (7, 8, 10-33) može se zaključiti kako derivati cimetne kiseline, a osobito hidroksi, metoksi i halogenirani derivati, imaju velik potencijal za niz bioloških djelovanja, uključujući antitumorsko, antioksidativno, antimikrobno, antiinflamatorno i druga.

Slijedom tih otkrića, u nastavku istraživanja derivata primakina kao potencijalnih novih citostatika, započela je sinteza i biološka evaluacija spojeva koji umjesto supstituiranog benzena imaju cimetnu kiselinu ili CAD, dakle fenilakrilnu komponentu.

U ovom radu opisat će se dio tih istraživanja i to sinteza i karakterizacija novih amidnih i acilsemikarbazidnih derivata primakina i cimetne kiseline, odnosno 3,4,5-trimetoksicimetne, 4-klorcimetne i 3,5-*bis*-(trifluormetil)cimetne kiseline. Tim spojevima naknadno će biti utvrđeno i biološko djelovanje, te će rezultati biti pridruženi dosadašnjim i činiti bazu za razvoj modela za istraživanja kvantitativnog odnosa strukture i djelovanja (QSAR), a time daljnji dizajn i optimizaciju strukture derivata primakina.

3. MATERIJALI I METODE

Tališta (t_r) su određena na Stuart SMP3 instrumentu (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana. Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su upotrijebljene silikagel ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka), te petroleter/etil-acetat/metanol (3:1:0,5), diklormetan/metanol (97:3) i diklormetan/metanol (95:5) kao pokretne faze. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Kemika, Hrvatska) i 0,040–0,063 mm (Merck, Njemačka), uz iste pokretne faze kao i u tankoslojnoj kromatografiji. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ($\lambda = 254$ nm) i parama joda.

IR spektri snimljeni su na Paragon FT-IR spektrometru (Perkin Elmer, UK). ¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-600 (Bruker, SAD) kod 300,13, odnosno 600,13 MHz za ¹H i kod 75,47, odnosno 150,90 MHz za ¹³C jezgru te na Varian Inova 400 spektrometru (Varian, SAD) kod 399,59 MHz za ¹H i 100,48 MHz za ¹³C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO-*d*₆ otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama od 5 mm. Kemijski pomaci dani su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420).

Primakin difosfat, benzotriazol (BtH), trifozgen, tionil-klorid, hidrazin hidrat, trietilamin (TEA), cimetna kiselina, 3,4,5-trimetoksicimetna kiselina, 4-klorcimetna kiselina i 3,5-*bis*(trifluormetil)cimetna kiselina nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD). Sve reakcije s primakinom izvođene su uz zaštitu od svjetlosti.

Bezvodni toluen dobiven je sljedećim postupkom: toluen je ekstrahiran vodom, zatim je osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destilirana i čuvan nad natrijem. Bezvodni dimetilformamid (DMF): smjesa 1 L DMF-a i 100 mL bezvodnog toluena destilirana je, pri čemu prvo destilira azeotropna smjesa toluena i vode, a zatim čisti DMF. Čuvan je nad aktiviranim molekulskim sitima. Bezvodni diklormetan dobiven je na sljedeći način: diklormetan je ekstrahiran vodom, sušen iznad kalcijeva klorida i predestilirana. Bezvodni dioksan dobiven je 24-satnim refluksiranjem na natriju. Destilirana je i čuvan nad natrijem. Sve ostale kemikalije bile su *p. a.* čistoće.

3.1. Sinteza klorida 1-benzotriazol karboksilne kiseline (BtcCl, 1)

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. Otopalo je upareno, a dobiveni BtcCl (**1**) je bez čišćenja upotrijebljen u daljnjim reakcijama.

3.2. Sinteza CAD kiselinskih klorida 2a-d

Smjesa 0,001 mol cimetine kiseline ili odgovarajuće CAD, 0,595 g tionil-klorida (0,005 mol) i bezvodnog DMF-a (2 kapi) u bezvodnom toluenu (8 mL) miješana je na sobnoj temperaturi (s.t.) 3 h. Tionil-klorid je uparen pod sniženim tlakom, ostatak je naparen bezvodnim toluenom i bez čišćenja upotrijebljen u daljnjim reakcijama.

3.3. Sinteza CAD benzotriazolida 4a-d

U smjesu 0,005 mol cimetine kiseline ili odgovarajuće CAD i 0,505 g (0,005 mol) TEA u bezvodnom toluenu (15 mL) dokapavana je otopina 0,907 g (0,005 mol) BtcCl (**1**) u 10 mL bezvodnog toluena tijekom 10 min. Reakcijska smjesa je miješana na s.t. 30 min, uparena te otopljena u smjesi etil-acetata i vode (1:1, 30 mL). Organski sloj ekstrahiran je vodom (3×30 mL) te osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom. Produkti **4a-d** dobiveni su rastrijavanjem u eteru i bez daljnjeg čišćenja upotrijebljeni za dobivanje amida **3a-d**.

3.4. Sinteza CAD-primakin amida 3a-d

Metoda A: Suspenzija 0,364 g (0,0008 mol) primakin difosfata i 0,263 g (0,0026 mol) TEA u bezvodnom diklormetanu (10 mL) miješana je na s.t. 15 minuta. Zatim je u reakcijsku smjesu dokapana otopina CAD kiselinskog klorida (**2**) (0,001 mol) u bezvodnom diklormetanu (5 mL) tijekom 10 min. Reakcijska smjesa miješana je 0,5–3 h na s.t. zaštićena od svjetlosti. Zatim je uparena pod sniženim tlakom te otopljena u smjesi etil-acetata i 5 % otopine NaOH (1:1, 20 mL). Organski sloj ekstrahiran je 5 % otopinom NaOH (3×20 mL), ispran vodom (2×20 mL) te osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom.

Metoda B: Otopina 0,364 g (0,0008 mol) primakin difosfata u 10 mL vode zaluzena je 5 % otopinom NaOH do pH 9 te ekstrahirana diklormetanom (4×20 mL). Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt i 0,081 g (0,0008 mol) TEA otopljeni su u 10 mL bezvodnog dioksana te dokapani

otopini 0,0008 mol CAD-benzotriazolida **4** u 5 mL bezvodnog dioksana. Reakcijska smjesa je miješana na s.t. 20 h. Zatim je otapalo upareno, a dobiveni produkt otopljen u smjesi etil-acetata i 5 % otopine NaOH (1:1, 20 mL). Organski sloj ekstrahiran je 5 % otopinom NaOH (3×20 mL), ispran vodom (2×20 mL), sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen.

3.4.1. (2E)-N-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-3-fenilprop-2-enamid (**3a**)

Metoda A: Masa klorida **2a**: 0,167 g. Vrijeme reakcije: 0,5 h.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz nepokretnu fazu silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm te pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5). Rastrljavanjem u eteru dobiven je čisti produkt **3a**.

Iskorištenje: 0,203 g (65 %)

t_f 69,6–74,1 °C

MS/MS m/z 399,3 (M+1)⁺

IR (KBr): ν_{max} 3387, 3282, 3061, 2927, 2852, 1660, 1614, 1576, 1556, 1516, 1454, 1424, 1387, 1338, 1220, 1203, 1160, 1052, 1031, 977, 902, 863, 822, 791, 766, 680, 626 cm⁻¹.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J /Hz): 8,55-8,53 (dd, 1H, 11, $J = 1,43, 4,13$), 8,13 (t, 1H, 2, $J = 5,69$), 8,09-8,06 (dd, 1H, 13, $J = 1,43, 8,28$), 7,55 (d, 2H, 4', 8', $J = 6,49$), 7,45-7,34 (m, 5H, 12, 2', 5', 6', 7'), 6,61 (d, 1H, 1', $J = 15,82$), 6,47 (s, 1H, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,15 (d, 1H, 8, $J = 8,73$), 3,81 (s, 3H, 18), 3,66 (m, 1H, 6), 3,21 (m, 2H, 3), 1,64 (m, 4H, 4, 5), 1,22 (d, 3H, 7, $J = 6,25$).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 164,78 (1), 159,01 (16), 144,64 (9), 144,23 (11), 138,40 (2'), 134,96 (10), 134,80 (13), 134,52 (3'), 129,58 (14), 129,33 (6'), 128,89 (5', 7'), 127,44 (4', 8'), 122,32 (12), 122,10 (1'), 96,12 (17), 91,61 (15), 54,96 (18), 47,01 (6), 39,02 (3), 33,54 (5), 26,03 (4), 20,23 (7).

3.4.2. (2E)-N-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)prop-2-enamid (**3b**)

Metoda A: Masa klorida **2b**: 0,257 g. Vrijeme reakcije: 1 h. Iskorištenje: 0,200 g (52 %).

Metoda B: Masa benzotriazolida **4b**: 0,271 g. Iskorištenje: 0,265 g (69 %).

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz nepokretnu fazu silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm te pokretnu fazu sastava petroleter/etil-acetat/metanol (3:1:0,5). Čisti produkt **3b** dobiven je kristalizacijom iz etil-acetata i rastrljavanjem u eteru.

t_r 119,2–123,6 °C

MS/MS m/z 480,3 (M+1)⁺

IR (KBr): ν_{max} 3367, 3285, 3084, 2962, 1657, 1617, 1583, 1520, 1456, 1421, 1388, 1328, 1277, 1241, 1221, 1200, 1164, 1125, 1052, 1014, 978, 824, 792, 682, 622, 604 cm⁻¹.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J /Hz): 8,54-8,53 (d, 1H, 11, $J = 2,85$), 8,09-8,03 (m, 2H, 2, 13), 7,44-7,40 (m, 1H, 12), 7,37-7,32 (d, 1H, 2', $J = 15,68$), 6,88 (s, 2H, 4', 8'), 6,54-6,52 (d, 1H, 1', $J = 15,69$), 6,47 (s, 1H, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,15-6,12 (d, 1H, 8, $J = 8,69$), 3,81 (s, 9H, 9', 11', 18), 3,68 (s, 4H, 6, 10'), 3,21-3,19 (m, 2H, 3), 1,69-1,65 (m, 4H, 4, 5), 1,23-1,22 (d, 3H, 7, $J = 6,15$).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 164,83 (1), 158,97 (16), 153,00 (5', 7'), 144,62 (9), 144,18 (11), 138,57 (6'), 138,46 (2'), 134,74 (13), 134,49 (10), 130,55 (14), 129,53 (3'), 122,04 (12), 121,66 (1'), 104,87 (4', 8'), 96,08 (17), 91,61 (15), 60,02 (10'), 55,82 (9', 11'), 54,92 (18), 46,99 (6), 39,02 (3), 33,56 (5), 25,98 (4), 20,20 (7).

3.4.3. (2E)-3-(4-klorfenil)-N-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)prop-2-enamid (3c)

Metoda A: Masa klorida **2c**: 0,201 g. Vrijeme reakcije: 2 h. Iskorištenje: 0,268 g (79 %).

Metoda B: Masa benzotriazolida **4c**: 0,227 g. Iskorištenje: 0,112 g (33 %).

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz nepokretnu fazu silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm te pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (97:3). Čisti produkt **3c** dobiven je kristalizacijom iz etil-acetata i rastrljavanjem u eteru.

t_r 83,9–87,1 °C

MS/MS m/z 424,2 (M+1)⁺

IR (KBr): ν_{max} 3358, 3275, 3078, 2958, 2327, 2857, 1740, 1655, 1615, 1558, 1520, 1492, 1457, 1426, 1388, 1343, 1227, 1202, 1168, 1097, 1052, 1013, 982, 903, 823, 791, 736, 709, 677, 628 cm⁻¹.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J /Hz): 8,54-8,53 (dd, 1H, 11, $J = 1,60, 4,19$), 8,13-8,05 (m, 2H, 2, 13), 7,58-7,56 (d, 2H, 4', 8', $J = 8,54$), 7,47-7,37 (m, 4H, 5, 12, 2', 7'), 7,63-7,58 (d, 1H, 1', $J = 15,82$), 7,47 (s, 1H, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,15-6,12 (d, 1H, 8, $J = 8,79$), 3,81 (s, 3H, 18), 3,65 (m, 1H, 6), 3,22-3,20 (m, 2H, 3), 1,72-1,53 (m, 4H, 4, 5), 1,23-1,21 (d, 3H, 7, $J = 6,28$).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 164,56 (1), 158,97 (16), 144,60 (9), 144,18 (11), 136,97 (2'), 134,73 (13), 134,49 (10), 133,91 (6'), 133,68 (3'), 129,53 (14), 129,08 (5', 7'), 128,85 (4', 8'), 123,14 (12), 122,03 (1'), 96,08 (17), 91,61 (15), 54,92 (18), 46,98 (6), 39,02 (3), 33,51 (5), 26,95 (4), 20,19 (7).

3.4.4. (2E)-3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-N-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)prop-2-enamid (3d)

Metoda A: Količina klorida **2d**: 0,303 g. Vrijeme reakcije: 3 h.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz nepokretnu fazu silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm te pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5). Konačan produkt **3d** kristalizira stajanjem te je rastrljan u eteru i odsisan.

Iskorištenje: 0,311 g (74 %)

t_f 148,2–150,1 °C

MS/MS m/z 526,4 (M+1)⁺

IR (KBr): ν_{max} 3395, 3286, 3095, 2964, 2934, 2861, 1663, 1623, 1576, 1521, 1456, 1423, 1334, 1341, 1278, 1224, 1174, 1136, 1052, 1031, 978, 940, 899, 868, 845, 822, 792, 683, 624 cm^{-1} .

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J/Hz): 8,54 (s, 1H, 11), 8,26 (s, 2H, 4', 8'), 8,18 (t, 1H, 2, $J = 5,21$), 8,08-8,07 (m, 2H, 13, 6'), 7,60-7,58 (d, 1H, 2', $J = 15,82$), 7,44-7,42 (m, 1H, 12), 6,91-6,88 (d, 1H, 1', $J = 15,90$), 6,47 (s, 1H, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,16-6,14 (d, 1H, 8, $J = 8,54$), 3,80 (s, 3H, 18), 3,66 (m, 1H, 6), 3,23 (m, 2H, 3), 1,70-1,58 (m, 4H, 4, 5), 1,23-1,22 (d, 3H, 7, $J = 5,99$).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 164,07 (1), 159,00 (16), 144,64 (9), 144,24 (11), 137,97 (3'), 135,16 (2'), 134,81 (13), 134,53 (10), 131,14-130,48 (q, 5', 7', $J = 33,83$), 129,58 (14), 127,84 (4', 8'), 126,61 (6'), 125,94-120,54 (q, 9', 10', $J = 272,30$), 122,23 (1'), 122,11 (12), 96,14 (17), 91,59 (15), 54,95 (18), 46,99 (6), 39,02 (3), 33,51 (5), 25,92 (4), 20,25 (7).

3.5. Sinteza N-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-karboksamida (5)

U ohlađenu otopinu (ledena kupelj) 0,908 g (0,005 mol) klorida **1** i 0,505 g (0,005 mol) TEA u 25 mL bezvodnog toluena dokapavana je otopina 1,297 g (0,005 mol) primakina u 20 mL bezvodnog toluena tijekom 10 minuta. Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 2 h, zaštićena od svjetlosti. Istaloženi TEA × HCl je odsisan, ispran pomoću 3 mL toluena te kvantitativno uklonjen ekstrakcijom vodom (3 puta). Organski sloj je osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i uparen pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz nepokretnu fazu silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm i pokretnu fazu sastava cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5) te rastrljavanjem u eteru. Iskorištenje: 1,655 g (95 %)

t_f 107–108 °C

IR (KBr): ν_{\max} 3427, 3389, 3087, 3047, 2996, 2932, 2858, 1750, 1614, 1579, 1518, 1386, 1224, 1202, 1167, 1077, 1024, 829, 789, 748 cm^{-1} .

3.6. Sinteza *N*-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazinkarboksamida (6)

Otopina 0,809 g (0,002 mol) benzotriazolida primakina **5**, 0,200 g (0,004 mol) hidrazin hidrata i 2 mg natrijevog ditionita u 4 mL dioksana miješana je na s.t. 4 dana, zaštićena od svjetlosti. Otopalo je upareno pod sniženim tlakom, ostatak je otopljen u 10 mL etil-acetata i ekstrahiran 5 %-tnom otopinom NaOH (3×10 mL) i vodom (3×15 mL), osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i uparen pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz nepokretnu fazu silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm i pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5) te rastrljavanjem u eteru.

Iskorištenje: 0,514 g (81 %)

t_f 109–110,5 °C

IR (KBr): ν_{\max} 3370, 3328, 2960, 2930, 1618, 1570, 1524, 1456, 1388, 1294, 1275, 1208, 1170, 1054, 900, 820, 795, 680, 623 cm^{-1} .

3.7. Sinteza CAD-primakin semikarbazida 7a-d

U otopinu 0,001 mol kiselinskog klorida **2a-d** u bezvodnom diklormetanu (3 mL) dokapana je otopina 0,254 g (0,0008 mol) semikarbazida **6** i 0,081 g (0,0008 mol) TEA u bezvodnom diklormetanu (6 ml) kroz 10 min. Reakcijska smjesa miješana je 1,5 h do 3 dana na s.t., zaštićena od svjetlosti. Zatim je uparena pod sniženim tlakom te otopljena u smjesi etil-acetata i 5 % otopine NaOH (1:1, 20 mL). Organski sloj ekstrahiran je 5 % otopinom NaOH (3×20 mL), ispran vodom (2×20 mL) te osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom.

3.7.1. (2*E*)-*N*-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)karbamoil)amino)-3-fenilprop-2-enamid (7a)

Količina klorida **2a**: 0,167 g. Vrijeme reakcije: 2 dana.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz nepokretnu fazu silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm te pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5). Rastrljavanjem u smjesi etera i petroletera dobiven je konačan produkt **7a**.

Iskorištenje: 0,200 g (56 %)

t_t 187,7–190,3 °C (raspad)

MS/MS m/z 448,3 (M+1)⁺

IR (KBr): ν_{\max} 3249, 3027, 2936, 1654, 1620, 1575, 1521, 1456, 1423, 1387, 1342, 1222, 1161, 1052, 1030, 978, 822, 791, 763, 718, 682, 627, 555, 486 cm⁻¹.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J /Hz): 9,75 (s, 1H, 2"), 8,54-8,53 (dd, 1H, 11, J = 1,41, 4,11), 8,09-8,06 (dd, 1H, 13, J = 1,30, 8,25), 7,85 (s, 1H, 1"), 7,58-7,36 (m, 7H, 12, 2', 4'-8'), 6,65-6,60 (d, 1H, 1', J = 15,90), 6,48-6,44 (m, 2H, 2, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,13-6,10 (d, 1H, 8, J = 8,62), 3,82 (s, 3H, 18), 3,64 (m, 1H, 6), 3,06-3,04 (m, 2H, 3), 1,63-1,47 (m, 4H, 4, 5), 1,22-1,20 (d, 3H, 7, J = 6,24).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 164,65 (3"), 158,98 (16), 157,92 (1), 144,61 (9), 144,20 (11), 139,46 (2'), 134,74 (13), 134,67 (10), 134,49 (3'), 129,60 (6'), 129,53 (14), 128,92 (5', 7'), 127,50 (4', 8'), 122,04 (12), 119,94 (1'), 96,07 (17), 91,61 (15), 54,95 (18), 47,01 (6), 39,02 (3), 33,41 (5), 26,65 (4), 20,18 (7).

3.7.2. (2E)-N-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)karbamoil)amino)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)prop-2-enamid (7b)

Količina klorida **2b**: 0,257 g. Vrijeme reakcije: 1,5 h

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz nepokretnu fazu silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm te pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5). Rastrljavanjem u smjesi etera i petroletera dobiven je konačan produkt **7b**.

Iskorištenje: 0,267 g (62 %)

t_t 90,4 °C (raspad)

MS/MS m/z 538,3 (M+1)⁺

IR (KBr): ν_{\max} 3250, 2937, 1654, 1618, 1582, 1508, 1454, 1420, 1388, 1326, 1266, 1240, 1221, 1203, 1155, 1126, 1051, 1031, 1003, 976, 822, 791, 677, 624, 585, 526, 512, 464 cm⁻¹.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J /Hz): 9,64-9,63 (d, 1H, 2", J = 1,91), 8,53-8,52 (dd, 1H, 11, J = 1,51, 4,16), 8,07-8,05 (dd, 1H, 13, J = 1,41, 8,28), 7,83 (s, 1H, 1"), 7,45-7,40 (m, 2H, 12, 2'), 6,90 (s, 2H, 4', 8'), 6,59-6,55 (d, 1H, 1', J = 15,80), 6,46-6,43 (m, 2H, 2, 17), 6,26 (s, 1H, 15), 6,11-6,09 (d, 1H, 8, J = 8,78), 3,81 (s, 3H, 18), 3,80 (s, 6H, 9', 11'), 3,68 (s, 3H, 10'), 3,63 (m, 1H, 6), 3,04-3,02 (m, 2H, 3), 1,61-1,51 (m, 4H, 4, 5), 1,21-1,19 (d, 3H, 7, J = 6,25).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 164,92 (3"), 159,05 (16), 158,05 (1), 153,14 (5', 7'), 144,69 (9), 144,33 (11), 139,82 (2'), 138,89 (6'), 134,88 (13), 134,56 (10), 130,38 (14), 129,64 (3'),

122,17 (12), 119,26 (1'), 105,09 (4', 8'), 96,17 (17), 91,69 (15), 60,16 (10'), 55,96 (9', 11'), 55,05 (18), 47,10 (6), 39,02 (3), 33,49 (5), 26,76 (4), 20,28 (7).

3.7.3. (2E)-3-(4-klorfenil)-N-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)karbamoil)amino)prop-2-enamid (7c)

Količina klorida **2c**: 0,201 g. Vrijeme reakcije: 20 h.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz nepokretnu fazu silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm te pokretnu fazu sastava petroleter/etil-acetat/metanol (3:1:0,5).

Rastrljavanjem u eteru dobiven je konačan produkt **7c**.

Iskorištenje: 0,227 g (59 %)

t_f 183,2–187,6 °C

MS/MS m/z 482,2 (M+1)⁺

IR (KBr): ν_{max} 3337, 3230, 3037, 2966, 2937, 2362, 2343, 1697, 1661, 1625, 1592, 1521, 1490, 1458, 1425, 1408, 1391, 1354, 1290, 1266, 1239, 1221, 1199, 1161, 1090, 1052, 1010, 982, 945, 899, 866, 819, 790, 726, 676, 628, 495 cm⁻¹.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J /Hz): 9,79 (s, 1H, 2"), 8,53-8,52 (dd, 1H, 11, $J = 1,06, 4,11$), 8,08-8,05 (dd, 1H, 13, $J = 1,30, 8,25$), 7,88 (s, 1H, 1"), 7,61-7,59 (d, 2H, 4', 8', $J = 8,47$), 7,50-7,45 (m, 3H, 2', 5', 7'), 7,43-7,40 (m, 1H, 12), 6,64-6,60 (d, 1H, 1', $J = 15,89$), 6,51-6,48 (t, 1H, 2, $J = 5,44$), 6,46 (s, 1H, 17), 6,25 (s, 1H, 15), 6,11-6,09 (d, 1H, 8, $J = 8,71$), 3,81 (s, 3H, 18), 3,62 (m, 1H, 6), 3,04 (m, 2H, 3), 1,61-1,51 (m, 4H, 4, 5), 1,20-1,19 (d, 3H, 7, $J = 6,25$).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 164,63 (3"), 159,05 (16), 158,03 (1), 144,68 (9), 144,33 (11), 138,28 (2'), 134,89 (13), 134,56 (10), 134,18 (6), 133,68 (3'), 129,64 (14), 129,35 (4', 8'), 129,09 (5', 7'), 122,19 (12), 120,75 (1'), 96,17 (17), 91,66 (15), 55,06 (18), 47,08 (6), 39,02 (3), 33,47 (5), 26,77 (4), 20,28 (7).

3.7.4. (2E)-3-(3,5-bis(trifluormetil)fenil)-N-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)karbamoil)amino)prop-2-enamid (7d)

Količina klorida **2d**: 0,303 g. Vrijeme reakcije: 3 dana.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz nepokretnu fazu silikagel veličine čestica 0,040–0,063 mm te pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5). Konačan produkt **7d** kristalizira iz toluena.

Iskorištenje: 0,261 g (56 %)

t_f 117,9–119,7 °C (raspad)

MS/MS m/z 584,3 (M+1)⁺

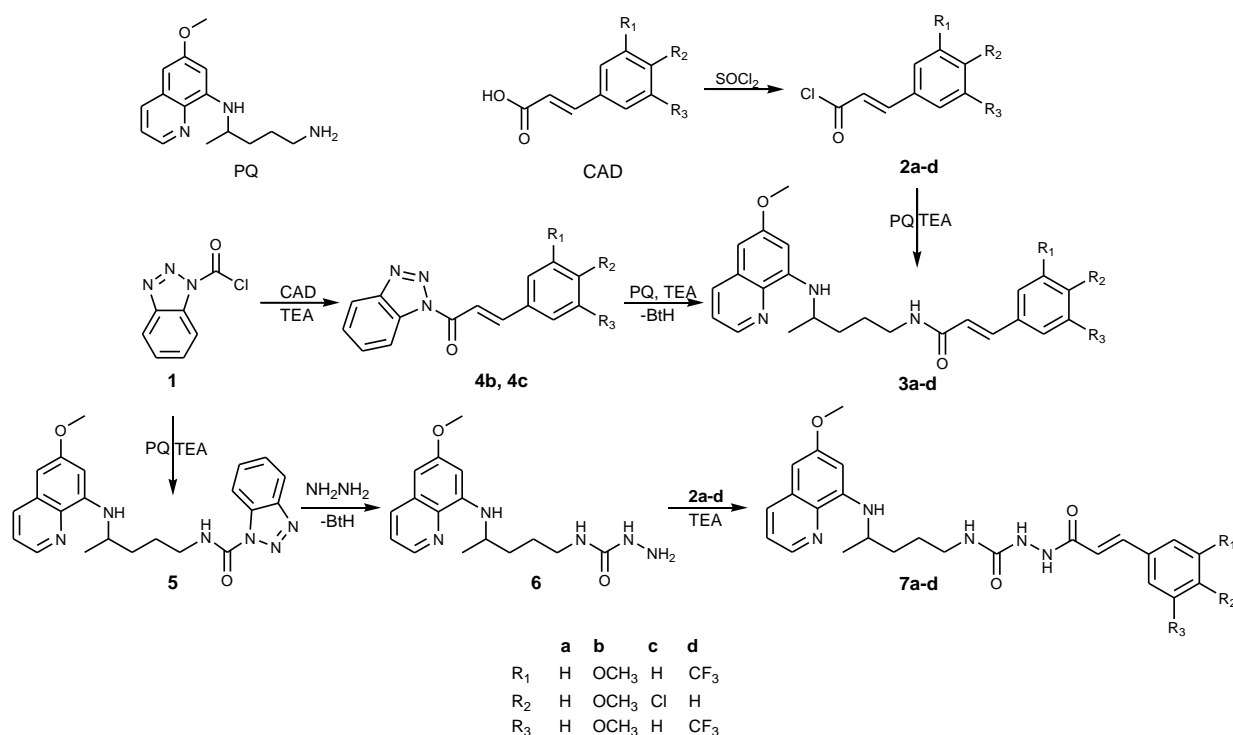
IR (KBr): ν_{\max} 3393, 3335, 3220, 3020, 2942, 2363, 1647, 1617, 1579, 1521, 1459, 1425, 1384, 1340, 1280, 1224, 1175, 1135, 1053, 971, 942, 898, 847, 823, 792, 730, 683, 629, 599, 561, 519, 466 cm^{-1} .

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J/Hz): 9,81 (s, 1H, 2''), 8,55-8,53 (dd, 1H, 11, $J = 1,62, 4,19$), 8,29 (s, 2H, 4', 8'), 8,12 (s, 1H, 6'), 8,09-8,07 (dd, 1H, 13, $J = 1,58, 8,31$), 7,99 (s, 1H, 1''), 7,72-7,68 (d, 1H, 2', $J = 15,92$), 7,77-7,41 (m, 1H, 12), 6,94-6,90 (d, 1H, 1', $J = 15,97$), 6,51-6,47 (m, 2H, 2, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,14-6,11 (d, 1H, 8, $J = 8,74$), 3,82 (s, 3H, 18), 3,64 (m, 1H, 6), 3,06 (m, 2H, 3), 1,66-1,48 (m, 4H, 4, 5), 1,22-1,21 (d, 3H, 7, $J = 6,28$).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 163,86 (3''), 159,02 (16), 157,78 (1), 144,65 (9), 144,27 (11), 137,67 (3'), 136,28 (2'), 134,83 (13), 134,53 (10), 131,40-130,40 (q, 5', 7', $J = 33,53$), 129,60 (14), 128,22 (4', 8'), 127,28-119,14 (q, 9', 10', $J = 272,61$), 125,53 (6'), 124,23 (1'), 122,13 (12), 96,13 (17), 91,61 (15), 55,01 (18), 47,04 (6), 39,02 (3), 33,45 (5), 26,74 (4), 20,25 (7).

4. REZULTATI I RASPRAVA

S ciljem proučavanja odnosa strukture i djelovanja te optimizacije strukture derivata primakina, na temelju literaturnih izvora i rezultata dosadašnjih istraživanja na Zavodu za farmaceutsku kemiju, sintetizirani su novi derivati primakina koji u strukturi sadrže cimetnu kiselinu ili derivat cimetne kiseline supstituiran metoksi, kloro i trifluorometilnim supstituentima. Sintetizirane su dvije serije derivata. Prvu seriju predstavljaju amidni derivati PQ i CAD (**3a-d**), a drugu acilsemikarbazidni derivati (**7a-d**) (Shema 1).

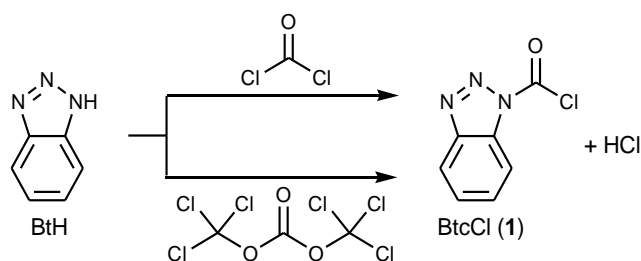


Shema 1

Amidni derivati **3a-d** mogu se sintetizirati na dva načina. Prvi način obuhvaća prevođenje cimetne kiseline ili CAD pomoću tionil-klorida u kiselinski klorid **2** koji s primakinom daje odgovarajući amid (Metoda A). Reakcija je provedena u prisutnosti TEA koji veže reakcijom oslobođeni HCl. Drugi način polazi iz klorida 1-benzotriazol karboksilne kiseline (BtcCl, **1**) koji s cimetnom kiselinom ili CAD (uz TEA) daju prvo odgovarajuće benzotriazolide **4**, a zatim s primakinom uz TEA amide **3** (Metoda B). Metoda B je prikladnija za sintezu većeg broja različitih derivata izvedenih iz iste CAD jer su benzotriazolidi **4** stabilni intermedijeri koji se ne moraju pripravljeti neposredno prije izvođenja reakcije kao kiselinski kloridi **2**. Metodom A sintetizirani su svi amidi **3a-d**, a amidi **3b** i **3c** su dodatno sintetizirani i metodom B.

Primakin komercijalno dolazi kao difosfatna sol pa se prije upotrebe u reakcijama treba prevesti u slobodnu bazu. To je provedeno na dva načina. U sintezama CAD-primakin amida metodom A kao otapalo je korišten diklormetan (u kojem je PQ topljiv) pa je primakin difosfat prvo miješan s dvostruko većom količinom TEA tijekom 15 min, a tek onda dodan reaktant **2**. S druge strane, u sintezama primakin benzotriazolida **5** i amida **3b** i **3c** metodom B, kao otapalo je korišten dioksan, u kojem se primakin ne otapa, pa je oslobođen na drugi način: otopina primakin difosfata je zaluzena otopinom NaOH i primakin ekstrahiran diklormetanom.

Klorid 1-benzotriazol karboksilne kiseline (**1**) je dobiven refluksiranjem benzotriazola i trifozgena u otopini toluena pri 115 °C (Shema 2) (49). Klorid **1** može se prirediti i iz benzotriazola i 20 % otopine fozgena.



Shema 2

Za sintezu acilsemikarbazidnih derivata, dobiveni BtcCl (**1**) bez daljnjeg je čišćenja upotrijebljen u sljedećem reakcijskom koraku, sintezi *N*-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-karboks-amida (benzotriazolida primakina, **5**) prema postupku opisanom u ranijim radovima (45). Spoj **5** je zatim pomoću hidrazina preveden u *N*-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazinkarboksamid (**6**), koji s kiselinskim kloridima **2a-d** daje konačne CAD-primakin derivate **7a-d**. Spoj **6** je također opisan u prijašnjim radovima (44), dok su acilsemikarbazidi **7a-d** novi spojevi.

U reakcijama u kojima benzotriazol predstavlja izlaznu skupinu oslobođeni BtH uklonjen je po završetku reakcije ekstrakcijom s 5%-tnom vodenom otopinom NaOH. Dodatkom otopine NaOH deprotonira se atom dušika na poziciji 1 benzotriazolskog prstena te nastaje natrijeva sol topljiva u vodi: benzotriazol u tom obliku prelazi u vodeni sloj dok u organskom sloju zaostaju željeni produkti.

Iskorištenja u reakcijama priprava amida bila su u pravilu visoka, a u sintezama acilsemikarbazida nešto niža. U pripravi acilsemikarbazida **7a-d** najveću poteškoću predstavljalo je čišćenje produkata. Kao najbolji način pročišćavanja pokazala se kromatografija na koloni (nepokretna faza silikagel, pokretna faza diklormetan/metanol 95:5 za **7a**, **7b** i **7d** te petroleter/etil-acetat/metanol 3:1:0,5 za **7c**). Veličina čestica silikagela bitno je utjecala na uspješnost pročišćavanja produkata kromatografijom na koloni: uz silikagel s krupnijim česticama (0,063–0,200 mm) pročišćavanje je bilo bitno manje uspješno nego uz silikagel veličine čestica 0,040–0,063 mm, a ukupne mase dobivenih čistih produkata bile su mnogo veće uz korištenje silikagela sitnijih čestica. Čisti produkti **7** dobiveni su dodatnim rastrljavanjem u smjesi etera i petroletera.

Svim novosintetiziranim spojevima određeni su parametri prema kojima se određuje zadovoljavaju li Lipinskijeva i Gelovanijeva pravila za male molekule lijekova. Ta pravila služe procjeni fizikalno-kemijskih svojstava lijekova na temelju strukture ljekovite tvari. Osobito se često u dizajnu lijekova utvrđuje zadovoljava li ljekovita tvar Lipinskijeva pravila ($M_r \leq 500$, $\log P \leq 5$, broj donora vodikove veze ≤ 5 , broj akceptora vodikove veze ≤ 10). Gelovanijeva pravila zahtijevaju da je polarna površina molekule (PSA) manja od 140 \AA^2 , molarna refraktivnost (MR) između 40 i $130 \text{ cm}^3/\text{mol}$ te broj atoma u molekuli od 20 do 70. Za tvari koje zadovoljavaju ta pravila smatra se da bi trebale imati dobru apsorpciju nakon peroralne primjene i da svojim očekivanim fizikalno-kemijskim svojstvima predstavljaju osobito dobre kandidate za buduće lijekove ("*drug-likeness*") (50, 51). Navedeni parametri su izračunati pomoću programa dostupnog na internetskoj stranici Chemicalize.org i prikazani u Tablici 1. Većina novosintetiziranih spojeva u potpunosti je sukladna s Lipinskijevim (**3a-c**, **7a**, **7c**) i/ili Gelovanijevim pravilima (**3a**, **3c**, **7a**), a ostali analozi pokazuju minimalno odstupanje od kriterija. Stoga novosintetizirani spojevi **3a-d** te **7a-d** prema navedenim parametrima predstavljaju dobre kandidate za razvoj novih lijekova.

Strukture novih spojeva određene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS), dok su strukture ranije opisanih spojeva (**5** i **6**) potvrđene samo usporedbom IR spektara i R_f vrijednosti u odgovarajućem kromatografskom sustavu. Novim spojevima određene su i temperature taljenja. Analitički i spektroskopski podaci prikazani su u Tablicama 2-4.

Tablica 1. Lipinskijevi i Gelovanijevi parametri za amidne (**3a-d**) i acilsemikarbazidne derivate (**7a-d**) CAD-primakina^a

Spoj	Molekulska formula	Broj atoma	M_r	$\log P$	Donor H-veze	Akceptor H-veze	Lipinski ^b	MR (cm ³ /mol)	PSA (Å ²)
3a	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₂	56	389,49	3,82	2	4	4	118,375	63,25
3b	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₅	68	479,57	3,35	2	7	4	137,764	90,94
3c	C ₂₄ H ₂₆ ClN ₃ O ₂	56	423,94	4,43	2	4	4	123,180	63,25
3d	C ₂₆ H ₂₅ F ₆ N ₃ O ₂	62	525,49	5,58	2	4	2	130,322	63,25
7a	C ₂₅ H ₂₉ N ₅ O ₃	62	447,53	2,90	4	5	4	129,918	104,38
7b	C ₂₈ H ₃₅ N ₅ O ₆	74	537,61	2,43	4	8	3	149,307	132,07
7c	C ₂₅ H ₂₈ ClN ₅ O ₃	62	481,97	3,50	4	5	4	134,722	104,38
7d	C ₂₇ H ₂₇ F ₆ N ₅ O ₃	68	583,53	4,65	4	5	3	141,865	104,38

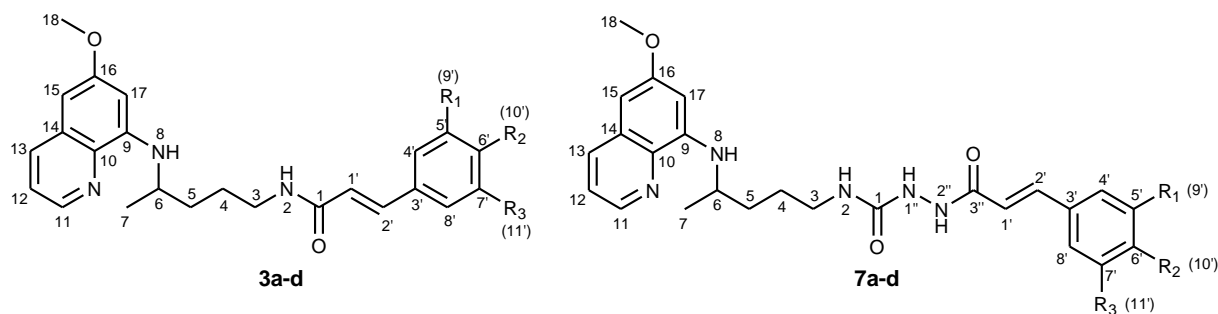
^a izračunato pomoću Chemicalize.org programa;

^b slaganje s 4 Lipinskijeva pravila.

Tablica 2. Analitički podaci za amidne (**3a-d**) i acilsemikarbazidne derivate (**7a-d**) CAD-primakina

Spoj	t_f (°C)	Molekulska formula	M_r	MS (m/z)	IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1})
3a	69,6– 74,1	$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$	389,49	390,3 (M+1) ⁺	3387, 3282, 3061, 2927, 2852, 1660, 1614, 1576, 1556, 1516, 1454, 1424, 1387, 1338, 1220, 1203, 1160, 1052, 1031, 977, 902, 863, 822, 791, 766, 680, 626
3b	119,2– 123,6	$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$	479,57	480,3 (M+1) ⁺	3367, 3285, 3084, 2962, 1657, 1617, 1583, 1520, 1456, 1421, 1388, 1328, 1277, 1241, 1221, 1200, 1164, 1125, 1052, 1014, 978, 824, 792, 682, 622, 604
3c	83,9– 87,1	$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_2$	423,94	424,2 (M+1) ⁺	3358, 3275, 3078, 2958, 2327, 2857, 1740, 1655, 1615, 1558, 1520, 1492, 1457, 1426, 1388, 1343, 1227, 1202, 1168, 1097, 1052, 1013, 982, 903, 823, 791, 736, 709, 677, 628
3d	148,2– 150,1	$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_2$	525,49	526,4 (M+1) ⁺	3395, 3286, 3095, 2964, 2934, 2861, 1663, 1623, 1576, 1521, 1456, 1423, 1334, 1341, 1278, 1224, 1174, 1136, 1052, 1031, 978, 940, 899, 868, 845, 822, 792, 683, 624
7a	187,7– 190,3	$\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_3$	447,53	448,3 (M+1) ⁺	3249, 3027, 2936, 1654, 1620, 1575, 1521, 1456, 1423, 1387, 1342, 1222, 1161, 1052, 1030, 978, 822, 791, 763, 718, 682, 627, 555, 486
7b	90,4 (raspad)	$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_6$	537,61	538,3 (M+1) ⁺	3250, 2937, 1654, 1618, 1582, 1508, 1454, 1420, 1388, 1326, 1266, 1240, 1221, 1203, 1155, 1126, 1051, 1031, 1003, 976, 822, 791, 677, 624, 585, 526, 512, 464
7c	183,2– 187,6	$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{ClN}_5\text{O}_3$	481,97	482,2 (M+1) ⁺	3337, 3230, 3037, 2966, 2937, 2362, 2343, 1697, 1661, 1625, 1592, 1521, 1490, 1458, 1425, 1408, 1391, 1354, 1290, 1266, 1239, 1221, 1199, 1161, 1090, 1052, 1010, 982, 945, 899, 866, 819, 790, 726, 676, 628, 495
7d	117,9– 119,7 (raspad)	$\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{F}_6\text{N}_5\text{O}_3$	583,53	584,3 (M+1) ⁺	3393, 3335, 3220, 3020, 2942, 2363, 1647, 1617, 1579, 1521, 1459, 1425, 1384, 1340, 1280, 1224, 1175, 1135, 1053, 971, 942, 898, 847, 823, 792, 730, 683, 629, 599, 561, 519, 466

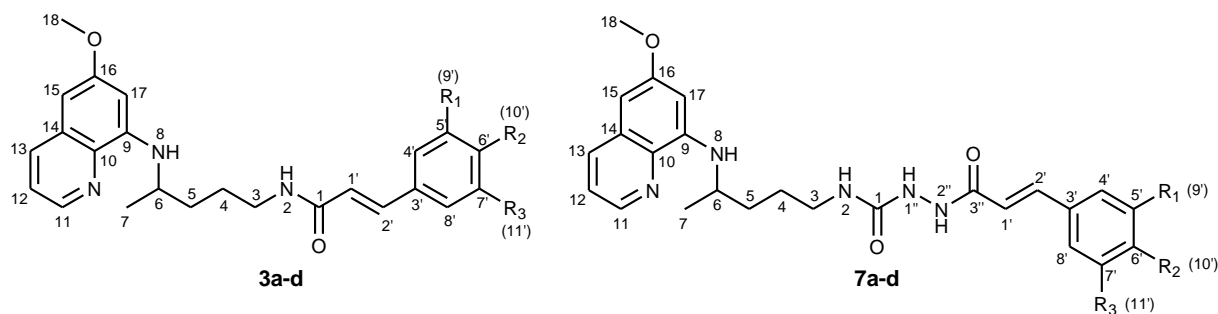
Tablica 3. ¹H NMR za amidne (**3a-d**) i acilsemikarbazidne derivate (**7a-d**) CAD-primakina



Spoj	R ₁	R ₂	R ₃	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)
3a	H	H	H	8,55-8,53 (dd, 1H, 11, <i>J</i> = 1,43, 4,13), 8,13 (t, 1H, 2, <i>J</i> = 5,69), 8,09-8,06 (dd, 1H, 13, <i>J</i> = 1,43, 8,28), 7,55 (d, 2H, 4', 8', <i>J</i> = 6,49), 7,45-7,34 (m, 5H, 12, 2', 5', 6', 7'), 6,61 (d, 1H, 1', <i>J</i> = 15,82), 6,47 (s, 1H, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,15 (d, 1H, 8, <i>J</i> = 8,73), 3,81 (s, 3H, 18), 3,66 (m, 1H, 6), 3,21 (m, 2H, 3), 1,64 (m, 4H, 4, 5), 1,22 (d, 3H, 7, <i>J</i> = 6,25)
3b	O ^{9'} CH ₃	O ^{10'} CH ₃	O ^{11'} CH ₃	8,54-8,53 (d, 1H, 11, <i>J</i> = 2,85), 8,09-8,03 (m, 2H, 2, 13), 7,44-7,40 (m, 1H, 12), 7,37-7,32 (d, 1H, 2', <i>J</i> = 15,68), 6,88 (s, 2H, 4', 8'), 6,54-6,52 (d, 1H, 1', <i>J</i> = 15,69), 6,47 (s, 1H, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,15-6,12 (d, 1H, 8, <i>J</i> = 8,69), 3,81 (s, 9H, 9', 11', 18), 3,68 (s, 4H, 6, 10'), 3,21-3,19 (m, 2H, 3), 1,69-1,65 (m, 4H, 4, 5), 1,23-1,22 (d, 3H, 7, <i>J</i> = 6,15)
3c	H	Cl	H	8,54-8,53 (dd, 1H, 11, <i>J</i> = 1,60, 4,19), 8,13-8,05 (m, 2H, 2, 13), 7,58-7,56 (d, 2H, 4', 8', <i>J</i> = 8,54), 7,47-7,37 (m, 4H, 5, 12, 2', 7'), 7,63-7,58 (d, 1H, 1', <i>J</i> = 15,82), 7,47 (s, 1H, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,15-6,12 (d, 1H, 8, <i>J</i> = 8,79), 3,81 (s, 3H, 18), 3,65 (m, 1H, 6), 3,22-3,20 (m, 2H, 3), 1,72-1,53 (m, 4H, 4, 5), 1,23-1,21 (d, 3H, 7, <i>J</i> = 6,28)
3d	⁹ CF ₃	H	¹¹ CF ₃	8,54 (s, 1H, 11), 8,26 (s, 2H, 4', 8'), 8,18 (t, 1H, 2, <i>J</i> = 5,21), 8,08-8,07 (m, 2H, 13, 6'), 7,60-7,58 (d, 1H, 2', <i>J</i> = 15,82), 7,44-7,42 (m, 1H, 12), 6,91-6,88 (d, 1H, 1', <i>J</i> = 15,90), 6,47 (s, 1H, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,16-6,14 (d, 1H, 8, <i>J</i> = 8,54), 3,80 (s, 3H, 18), 3,66 (m, 1H, 6), 3,23 (m, 2H, 3), 1,70-1,58 (m, 4H, 4, 5), 1,23-1,22 (d, 3H, 7, <i>J</i> = 5,99)
7a	H	H	H	9,75 (s, 1H, 2''), 8,54-8,53 (dd, 1H, 11, <i>J</i> = 1,41, 4,11), 8,09-8,06 (dd, 1H, 13, <i>J</i> = 1,30, 8,25), 7,85 (s, 1H, 1''), 7,58-7,36 (m, 7H, 12, 2', 4'-8'), 6,65-6,60 (d, 1H, 1', <i>J</i> = 15,90), 6,48-6,44 (m, 2H, 2, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,13-6,10 (d, 1H, 8, <i>J</i> = 8,62), 3,82 (s, 3H, 18), 3,64 (m, 1H, 6), 3,06-3,04 (m, 2H, 3), 1,63-1,47 (m, 4H, 4, 5), 1,22-1,20 (d, 3H, 7, <i>J</i> = 6,24), 1,11-1,07 (t, 0,6H, ???, <i>J</i> = 6,98)
7b	O ^{9'} CH ₃	O ^{10'} CH ₃	O ^{11'} CH ₃	9,64-9,63 (d, 1H, 2'', <i>J</i> = 1,91), 8,53-8,52 (dd, 1H, 11, <i>J</i> = 1,51, 4,16), 8,07-8,05 (dd, 1H, 13, <i>J</i> = 1,41, 8,28), 7,83 (s, 1H, 1''), 7,45-7,40 (m, 2H, 12, 2'), 6,90 (s, 2H, 4', 8'), 6,59-6,55 (d, 1H, 1', <i>J</i> = 15,80), 6,46-6,43 (m, 2H, 2, 17), 6,26 (s, 1H, 15), 6,11-6,09 (d, 1H, 8, <i>J</i> = 8,78), 3,81 (s, 3H, 18), 3,80 (s, 6H, 9', 11'), 3,68 (s, 3H, 10'), 3,63 (m, 1H, 6), 3,04-3,02 (m, 2H, 3), 1,61-1,51 (m, 4H, 4, 5), 1,21-1,19 (d, 3H, 7, <i>J</i> = 6,25)

7c	H	Cl	H	9,79 (s, 1H, 2"), 8,53-8,52 (dd, 1H, 11, $J = 1,06, 4,11$), 8,08-8,05 (dd, 1H, 13, $J = 1,30, 8,25$), 7,88 (s, 1H, 1"), 7,61-7,59 (d, 2H, 4', 8', $J = 8,47$), 7,50-7,45 (m, 3H, 2', 5', 7'), 7,43-7,40 (m, 1H, 12), 6,64-6,60 (d, 1H, 1', $J = 15,89$), 6,51-6,48 (t, 1H, 2, $J = 5,44$), 6,46 (s, 1H, 17), 6,25 (s, 1H, 15), 6,11-6,09 (d, 1H, 8, $J = 8,71$), 3,81 (s, 3H, 18), 3,62 (m, 1H, 6), 3,04 (m, 2H, 3), 1,61-1,51 (m, 4H, 4, 5), 1,20-1,19 (d, 3H, 7, $J = 6,25$)
7d	$^9\text{CF}_3$	H	$^{11}\text{CF}_3$	9,81 (s, 1H, 2"), 8,55-8,53 (dd, 1H, 11, $J = 1,62, 4,19$), 8,29 (s, 2H, 4', 8'), 8,12 (s, 1H, 6'), 8,09-8,07 (dd, 1H, 13, $J = 1,58, 8,31$), 7,99 (s, 1H, 1"), 7,72-7,68 (d, 1H, 2', $J = 15,92$), 7,77-7,41 (m, 1H, 12), 6,94-6,90 (d, 1H, 1', $J = 15,97$), 6,51-6,47 (m, 2H, 2, 17), 6,28 (s, 1H, 15), 6,14-6,11 (d, 1H, 8, $J = 8,74$), 3,82 (s, 3H, 18), 3,64 (m, 1H, 6), 3,06 (m, 2H, 3), 1,66-1,48 (m, 4H, 4, 5), 1,22-1,21 (d, 3H, 7, $J = 6,28$)

Tablica 4. ^{13}C NMR za amidne (**3a-d**) i acilsemikarbazidne derivate (**7a-d**) CAD-primakina



Spoj	R ₁	R ₂	R ₃	^{13}C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)
3a	H	H	H	164,78 (1), 159,01 (16), 144,64 (9), 144,23 (11), 138,40 (2'), 134,96 (10), 134,80 (13), 134,52 (3'), 129,58 (14), 129,33 (6'), 128,89 (5', 7'), 127,44 (4', 8'), 122,32 (12), 122,10 (1'), 96,12 (17), 91,61 (15), 54,96 (18), 47,01 (6), 39,02 (3), 33,54 (5), 26,03 (4), 20,23 (7)
3b	O ⁹ CH ₃	O ¹⁰ CH ₃	O ¹¹ CH ₃	164,83 (1), 158,97 (16), 153,00 (5', 7'), 144,62 (9), 144,18 (11), 138,57 (6'), 138,46 (2'), 134,74 (13), 134,49 (10), 130,55 (14), 129,53 (3'), 122,04 (12), 121,66 (1'), 104,87 (4', 8'), 96,08 (17), 91,61 (15), 60,02 (10'), 55,82 (9', 11'), 54,92 (18), 46,99 (6), 39,02 (3), 33,56 (5), 25,98 (4), 20,20 (7)
3c	H	Cl	H	164,56 (1), 158,97 (16), 144,60 (9), 144,18 (11), 136,97 (2'), 134,73 (13), 134,49 (10), 133,91 (6'), 133,68 (3'), 129,53 (14), 129,08 (5', 7'), 128,85 (4', 8'), 123,14 (12), 122,03 (1'), 96,08 (17), 91,61 (15), 54,92 (18), 46,98 (6), 39,02 (3), 33,51 (5), 26,95 (4), 20,19 (7)
3d	⁹ CF ₃	H	¹¹ CF ₃	164,07 (1), 159,00 (16), 144,64 (9), 144,24 (11), 137,97 (3'), 135,16 (2'), 134,81 (13), 134,53 (10), 131,14-130,48 (q, 5', 7', <i>J</i> = 33,83), 129,58 (14), 127,84 (4', 8'), 126,61 (6'), 125,94-120,54 (q, 9', 10', <i>J</i> = 272,30), 122,23 (1'), 122,11 (12), 96,14 (17), 91,59 (15), 54,95 (18), 46,99 (6), 39,02 (3), 33,51 (5), 25,92 (4), 20,25 (7)
7a	H	H	H	164,65 (3''), 158,98 (16), 157,92 (1), 144,61 (9), 144,20 (11), 139,46 (2'), 134,74 (13), 134,67 (10), 134,49 (3'), 129,60 (6'), 129,53 (14), 128,92 (5', 7'), 127,50 (4', 8'), 122,04 (12), 119,94 (1'), 96,07 (17), 91,61 (15), 54,95 (18), 47,01 (6), 39,02 (3), 33,41 (5), 26,65 (4), 20,18 (7)
7b	O ⁹ CH ₃	O ¹⁰ CH ₃	O ¹¹ CH ₃	164,92 (3''), 159,05 (16), 158,05 (1), 153,14 (5', 7'), 144,69 (9), 144,33 (11), 139,82 (2'), 138,89 (6'), 134,88 (13), 134,56 (10), 130,38 (14), 129,64 (3'), 122,17 (12), 119,26 (1'), 105,09 (4', 8'), 96,17 (17), 91,69 (15), 60,16 (10'), 55,96 (9', 11'), 55,05 (18), 47,10 (6), 39,02 (3), 33,49 (5), 26,76 (4), 20,28 (7)
7c	H	Cl	H	164,63 (3''), 159,05 (16), 158,03 (1), 144,68 (9), 144,33 (11), 138,28 (2'), 134,89 (13), 134,56 (10), 134,18 (6), 133,68 (3'), 129,64 (14), 129,35 (4', 8'), 129,09 (5', 7'), 122,19 (12), 120,75 (1'), 96,17 (17), 91,66 (15), 55,06 (18), 47,08 (6), 39,02 (3), 33,47 (5), 26,77 (4), 20,28 (7)

7d	$^9\text{CF}_3$	H	$^{11}\text{CF}_3$	163,86 (3"), 159,02 (16), 157,78 (1), 144,65 (9), 144,27 (11), 137,67 (3'), 136,28 (2'), 134,83 (13), 134,53 (10), 131,40-130,40 (q, 5', 7', J = 33,53), 129,60 (14), 128,22 (4', 8'), 127,28-119,14 (q, 9', 10', J = 272,61), 125,53 (6'), 124,23 (1'), 122,13 (12), 96,13 (17), 91,61 (15), 55,01 (18), 47,04 (6), 39,02 (3), 33,45 (5), 26,74 (4), 20,25 (7)
-----------	-----------------	---	--------------------	---

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu opisana je sinteza nekoliko novih derivata primakina koji u svojoj strukturi sadrže cimetnu kiselinu ili derivat cimetine kiseline s metoksi, kloro ili trifluormetilnim supstuentima. Sintetizirane su dvije serije derivata: prvu seriju predstavljaju amidni derivati PQ i CAD (**3a-d**), a drugu acilsemikarbazidni derivati (**7a-d**). Konkretno, sintetizirani su i karakterizirani sljedeći novi spojevi koji do sada nisu opisani u literaturi:

- (2*E*)-*N*-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-3-fenilprop-2-enamid (**3a**)
- (2*E*)-*N*-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)prop-2-enamid (**3b**)
- (2*E*)-3-(4-klorfenil)-*N*-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)prop-2-enamid (**3c**)
- (2*E*)-3-(3,5-*bis*(trifluormetil)fenil)-*N*-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)prop-2-enamid (**3d**)
- (2*E*)-*N*-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)karbamoil)amino)-3-fenilprop-2-enamid (**7a**)
- (2*E*)-*N*-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)karbamoil)amino)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)prop-2-enamid (**7b**)
- (2*E*)-3-(4-klorfenil)-*N*-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)karbamoil)amino)prop-2-enamid (**7c**) i
- (2*E*)-3-(3,5-*bis*(trifluormetil)fenil)-*N*-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)karbamoil)amino)prop-2-enamid (**7d**)

te prekursori za njihovu sintezu:

- klorid 1-benzotriazol karboksilne kiseline (**1**),
- CAD kiselinski kloridi **2a-d**,
- CAD benzotriazolidi **4b** i **4c**,
- *N*-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-karboksamid (**5**) i
- *N*-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)hidrazinkarboksamid (**6**).

Struktura novih spojeva potvrđena je uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS). Većina novosintetiziranih spojeva zadovoljava sva Lipinskijeva i Gelovanijeva pravila za male molekule lijekova, dok ostali minimalno odudaraju od kriterija, pa s obzirom na tako predviđena fizikalno-kemijska svojstva predstavljaju dobre kandidate za nove lijekove. U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, ispituje se antitumorsko, antimikrobno i antioksidativno djelovanje sintetiziranih spojeva.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem se svim članovima Zavoda za farmaceutsku kemiju, a prije svega prof.dr.sc. Branki Zorc na vodstvu u izradi ovog rada, ali i na tome što je svojim dugogodišnjim vođenjem priprema za Međunarodnu kemijsku olimpijadu uvelike doprinjela mojoj motivaciji i interesu za radom u kemiji i farmaciji.

Veliko hvala i drugoj mentorici, Kristini Pavić, mag. pharm., što me učila radu u laboratoriju i snimanju spektara te maksimalnoj suradljivosti u svim aspektima izrade ovog rada.

Hvala Petri Gilja na ugodnom društvu u labosu te svim savjetima i podršci.

7. POPIS LITERATURE

1. R. Duffy, C. Wade, R. Chang, Discovery of anticancer drugs from antimalarial natural products: a MEDLINE literature review, *Drug Discov. Today* **17** (2012) 942–953.
2. 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.
3. 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. Sinica* **35** (2014) 645–652.
4. 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.
5. 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, *Anti-cancer Agents Med. Chem.* **7** (2007) 685–709.
6. 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.
7. B. C. Pérez, I. Fernandes, N. Mateus, C. Teixeira, P. Gomes, Recycling antimalarial leads for cancer: Antiproliferative properties of *N*-cinnamoyl chloroquine analogues, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23** (2013) 6769–6772.
8. P. Sharma, Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities, *J. Chem. Pharm. Res.* **3** (2011) 403–423.
9. https://en.wikipedia.org/wiki/Cinnamic_acid, pristup 17.2.2016.
10. R. Lone, R. Shuab, K. K. Koul, Role of cinnamate and cinnamate derivatives in pharmacology, *Glob. J. Pharmacol.* **8** (2014) 328–335.
11. J. H. Chen, C. T. Ho, Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 2374–2378.
12. F. Natella, M. Nardini, M. Di Felice, C. Scaccini, Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 1453–1459.
13. N. H. Nam, Y. J. You, Y. Kim, D. H. Hong, H. M. Kim, B. Z. Ahn, Syntheses of certain 3-aryl-2-propenoates and evaluation of their cytotoxicity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11** (2001) 1173–1176.
14. B. Narasimhan, D. Belsare, D. Pharande, V. Mourya, A. Dhake, Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations, *Eur. J. Med. Chem.* **39** (2004) 827–834.

15. J. D. Guzman, Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity, *Molecules* **19** (2014) 19292–19349.
16. R. Bairwa, M. Kakwani, N. R. Tawari, J. Lalchandani, M. K. Ray, M. G. Rajan, M. S. Degani, Novel molecular hybrids of cinnamic acids and guanylhydrazones as potential antitubercular agents, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2010) 1623–1625.
17. J. H. Kim, B. C. Campbell, N. E. Mahomey, K. L. Chan, R. J. Molyneux, Identification of phenolics for control of *Aspergillus flavus* using *Saccharomyces cerevisiae* in a model target-gene bioassay, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 7814–7821.
18. S. Tawata, S. Taira, N. Kobamoto, J. Zhu, M. Ishihara, S. Toyama, Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** (1996) 909–910.
19. H. D. Gravina, N. F. Tafuri, A. S. Junior, J. L. R. Fietto, T. T. Oliveira, M. A. N. Diaz, M. R. Almeida, In vitro assessment of the antiviral potential of trans-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1, *Res. Veterinary Sci.* **91** (2010) e158–e162.
20. C. R. Rees, J. M. Costin, R. C. Finka, M. McMichael, K. A. Fontaine, S. Iserna, S. F. Michael, In vitro inhibition of dengue virus entry by *p*-sulfoxy-cinnamic acid and structurally related combinatorial chemistries, *Antiviral Res.* **80** (2008) 135–142.
21. J. Kanaani, H. Ginsburg, Effects of cinnamic acid derivatives on *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* and on the permeability of the membrane of malaria-infected erythrocytes, *Antimicrob. Agents Chemother.* **36** (1992) 1102–1108.
22. R. M. Hafizur, A. Hameed, M. Shukrana, S. A. Raza, S. Chishti, N. Kabir, R. A. Siddiqui, Cinnamic acid exerts anti-diabetic activity by improving glucose tolerance *in vivo* and by stimulating insulin secretion *in vitro*, *Phytomedicine* **22** (2015) 297–300.
23. S. Adisakwattana, P. Moonsan, S. Yibchok-Anun, Insulin-releasing properties of a series of cinnamic acid derivatives in vitro and in vivo, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 7838–7844.
24. P. Neogi, F. J. Lakner, S. Medicherla, J. Cheng, D. Dey, M. Gowri, B. Nag, S. D. Sharma, L. B. Pickford, C. Gross, Synthesis and structure-activity relationship studies of cinnamic acid-based novel thiazolidinedione antihyperglycemic agents, *Bioorg. Med. Chem.* **11** (2003) 4059–4067.
25. E. Fernandez-Martinez, R. A. Bobadilla, M. S. Morales-Rios, P. Muriel, V. M. Perez-Alvarez, *trans*-3-Phenyl-2-propenoic acid (cinnamic acid) derivatives: structure-activity relationship as hepatoprotective agents, *Med. Chem.* **3** (2007) 475–479.

26. S. J. Kim, S. H. Bok, S. Lee, H. J. Kim, M. K. Lee, Y. B. Park, M. S. Choi, Anticholesterolemic effect of 3,4-di(OH)-phenylpropionic amides in high-cholesterol fed rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **208** (2005) 29–36.
27. S. Lee, J. M. Han, H. Kim, E. Kim, T. S. Jeong, W. S. Lee, K. H. Cho, Synthesis of cinnamic acid derivatives and their inhibitory effects on LDL-oxidation, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 and -2 activity, and decrease of HDL-particle size, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14** (2004) 4677–4681.
28. Y. Takeda, N. Tanigawa, F. Sunghwa, M. Ninomiya, M. Hagiwara, K. Matsushita, M. Koketsu, Morroniside cinnamic acid conjugate as an anti-inflammatory agent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** (2010) 4855–4857.
29. S. Kumar, P. Arya, C. Mukherjee, B. K. Singh, N. Singh, V. S. Parmar, V. S. Prasad, B. Ghosh, Novel aromatic ester from *Piper longum* and its analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells, *Biochemistry* **44** (2005) 15944–15952.
30. L. Hedvati, A. Nudelman, E. Falb, B. Kraiz, R. Zhuk, M. Sprecher, Cinnamic acid derived oxazolinium ions as novel cytotoxic agents, *Eur. J. Med. Chem.* **37** (2002) 607–616.
31. P. De, M. Baltas, F. Bedos-Belval, Cinnamic acid derivatives as anticancer agents – a review, *Curr. Med. Chem.* **18** (2011) 1672–1703.
32. A. Nitzsche, S. V. Tokolov, H. O. Gutzeit, J. Ludwig-Müller, Chemical and biological characterization of cinnamic acid derivatives from cell cultures of lavender (*Lavandula officinalis*) induced by stress and jasmonic acid, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 2915–2923.
33. D. R. Welch, D. E. Harper, K. H. Yohem, U-77,863: A novel cinnamide isolated from *Streptomyces griseoluteus* that inhibits cancer invasion and metastasis, *Clin. Exp. Metastasis* **11** (1993) 201–212.
34. <https://en.wikipedia.org/wiki/Primaquine>, pristup 16.2.2016.
35. J. Recht, E. Ashley, N. White, Safety of 8-aminoquinoline antimalarial medicines, WHO, Ženeva, 2014.
36. www.malariasite.com, pristup 25.2.2016.
37. A. Lalève, C. Vallières, M. P. Golinelli-Cohem, C. Bouton, Z. Song, G. Pawlik, S. M. Tindall, S. V. Avery, J. Clain, B. Meunier, The antimalarial drug primaquine targets Fe-S cluster proteins and yeast respiratory growth, *Redox Biol.* **7** (2016) 21–29.
38. N. Vale, R. Moreira, P. Gomes, Primaquine revisited six decades after its discovery, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 937–953.

39. K. Kaur, M. Jain, S. I. Khan, M. R. Jacob, B. L. Tekwani, S. Singh, P. Singh, R. Jain, Amino acid, dipeptide and pseudodipeptide conjugates of ring-substituted 8-aminoquinolines: Synthesis and evaluation of anti-infective, β -haematin inhibitor and cytotoxic activities. *Eur. J. Med. Chem.* **52** (2012) 230-241.
40. S. Vangapandu, S. Sachdeva, M. Jain, S. Singh, P. Singh, C. Lal Kaul, R. Jain, 8-quinolinamines conjugated with amino acids are exhibiting potent blood-schizontocidal antimalarial activities. *Bioorg. Med. Chem.* **12** (2004) 239-247.
41. Z. Rajić, G. Kos, B. Zorc, P. P. Singh, S. Singh, Macromolecular prodrugs. XII. Primaquine conjugates: synthesis and antimalarial evaluation, *Acta Pharm.* **59** (2009) 107–115.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. I. Perković, K. Pavić, K. Ester, M. Kralj, I. Marijanović, D. Schols, D. Hadjipavlou-Litina, E. Pontiki, B. Zorc, Novel urea and semicarbazide primaquine derivatives with hydroxyphenyl and halogenphenyl substituents as potential antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.* **88** (2016) (u tisku).

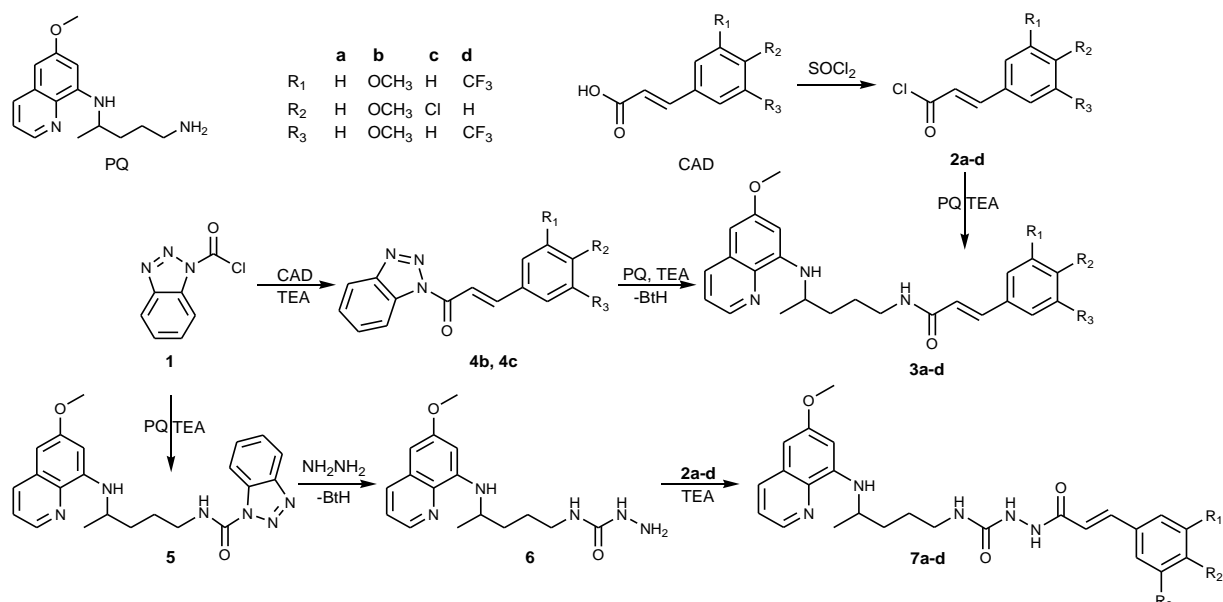
48. E. Kedzierska, J. Orzelska, I. Perković, D. Knežević, S. Fidecka, M. Kaiser, B. Zorc, Pharmacological activity of primaquine ureas and semicarbazides on central nervous system in mice and antimalarial activity in vitro, *Fund. Clin. Pharmacol.* **30** (2016) 58–69.
49. I. Kalčić, M. Zovko, M. Jadrijević-Mladar Takač, B. Zorc, I. Butula, Synthesis and reactions of some azolecarboxylic acid derivatives, *Croat. Chem. Acta* **76** (2003) 217–228.
50. P. Leeson, Chemical beauty contest, *Nature* **481** (2012) 455-456.
51. E. L. Luzina, A. V. Popov, Synthesis, evaluation of anticancer activity and COMPARE analysis of N-bis(trifluoromethyl)alkyl-N²-substituted ureas with pharmacophoric moieties, *Eur. J. Med. Chem.* **53** (2012) 364-373.

8. SAŽETAK

Sinteza i karakterizacija novih derivata cimetne kiseline i primakina

U ovom radu dan je pregled literaturnih podataka o cimetnoj kiselinu i njenim derivatima, s posebnim naglaskom na njihovo biološko djelovanje. Nadalje, ukratko su opisana svojstva i primjena primakina, ljekovite tvari iz skupine antimalarika. U uvodnom dijelu detaljnije je opisan potencijal derivata primakina kao vodećih spojeva za razvoj antitumorskih lijekova.

Rad se nadovezuje na višegodišnja istraživanja na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koja obuhvaćaju dizajniranje, sintezu i biološku evaluaciju derivata primakina s antiproliferativnim djelovanjem. Rezultati tih istraživanja, uz literaturne izvore o biološkim djelovanjima derivata cimetne kiseline, temelj su dizajna novih derivata primakina i cimetne kiseline kao potencijalnih citostatika. U radu je opisana sinteza i karakterizacija (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS) nekoliko novih derivata primakina koji u strukturi sadrže cimetnu kiselinu ili CAD s metoksi, kloro ili trifluormetilnim supstituentima. Sintetizirane su dvije serije derivata: amidi (**3a-d**) i acilsemikarbazidi (**7a-d**). Spojevi **3a-d** i **7a-d** zadovoljavaju Lipinskijeva i Gelovanijeva pravila ili minimalno odstupaju od kriterija, pa s obzirom na očekivana fizikalno-kemijska svojstva predstavljaju dobre kandidate za razvoj novih lijekova.



U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, provodi se ispitivanje antitumorskog, antimikrobnog i antioksidativnog djelovanja sintetiziranih spojeva.

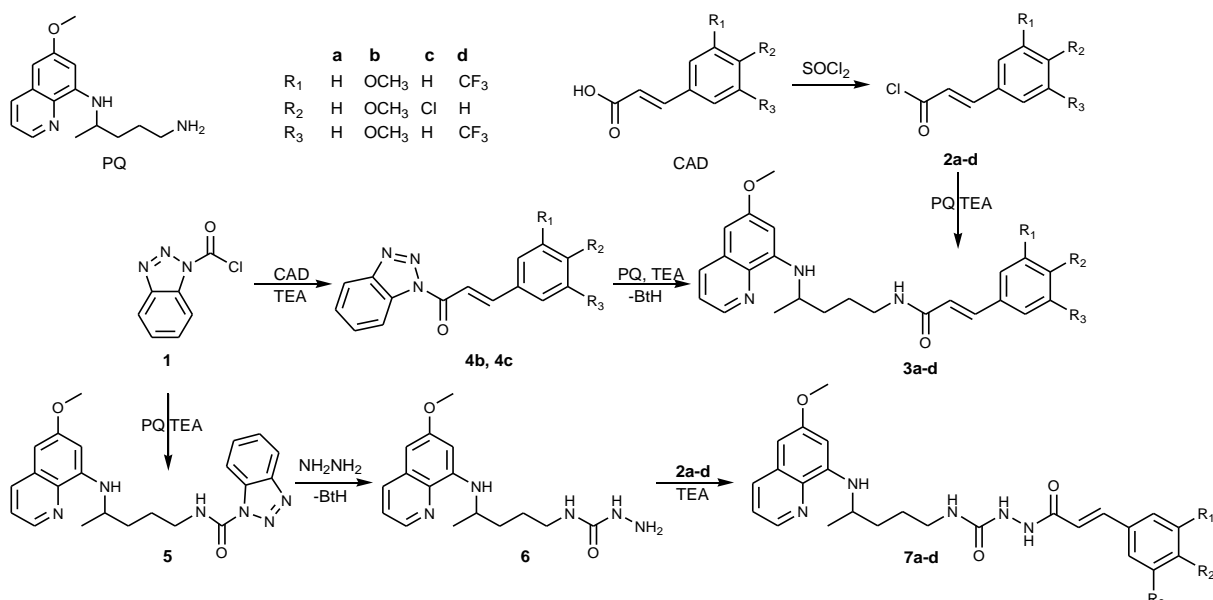
Ključne riječi: primakin, cimetna kiselina, amid, acilsemikarbazid, sinteza.

9. SUMMARY

Synthesis and characterization of novel cinnamic acid-primaquine derivatives

A brief literature review of cinnamic acid and its derivatives, with an emphasis on their biological activities is given. Furthermore, characteristics and use of the antimalarial drug primaquine are described and the potential of primaquine derivatives as antiproliferative drugs is especially noted and supported by references.

In the last few years, a research group at Faculty of Pharmacy and Biochemistry has focused on primaquine derivatization. More than a hundred primaquine derivatives were designed and prepared and their antiproliferative activity *in vitro* has been well documented. In order to give a better insight into the structural requirements needed for improvement of cytostatic activity of primaquine derivatives, synthesis and characterization (IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS) of a new set of PQ derivatives bearing a cinnamic acid component with methoxy, chloro or trifluoromethyl substituents is undertaken and described. Two series of compounds are prepared: amides (**3a-d**) and acylsemicarbazides (**7a-d**). Lipinski and Gelovani parameters of novel compounds are determined as well, and it is concluded that most novel compounds have good drug-likeness, with most meeting all of the Lipinski and/or Gelovani rules.

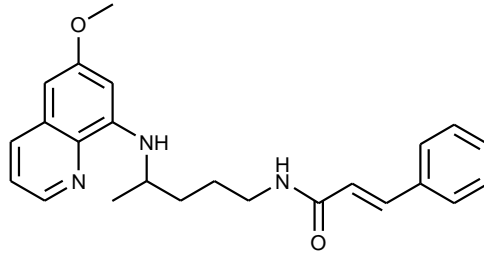


Biological evaluation, with an emphasis on cytostatic activity, of here described CAD-primaquine derivatives is in progress.

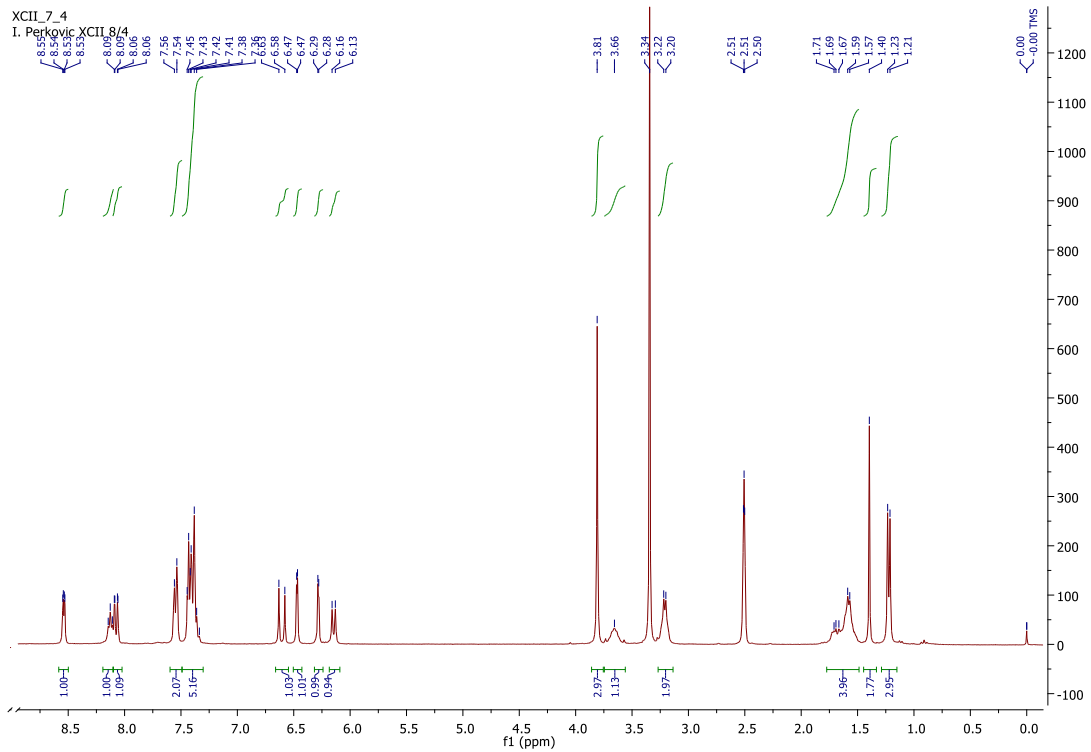
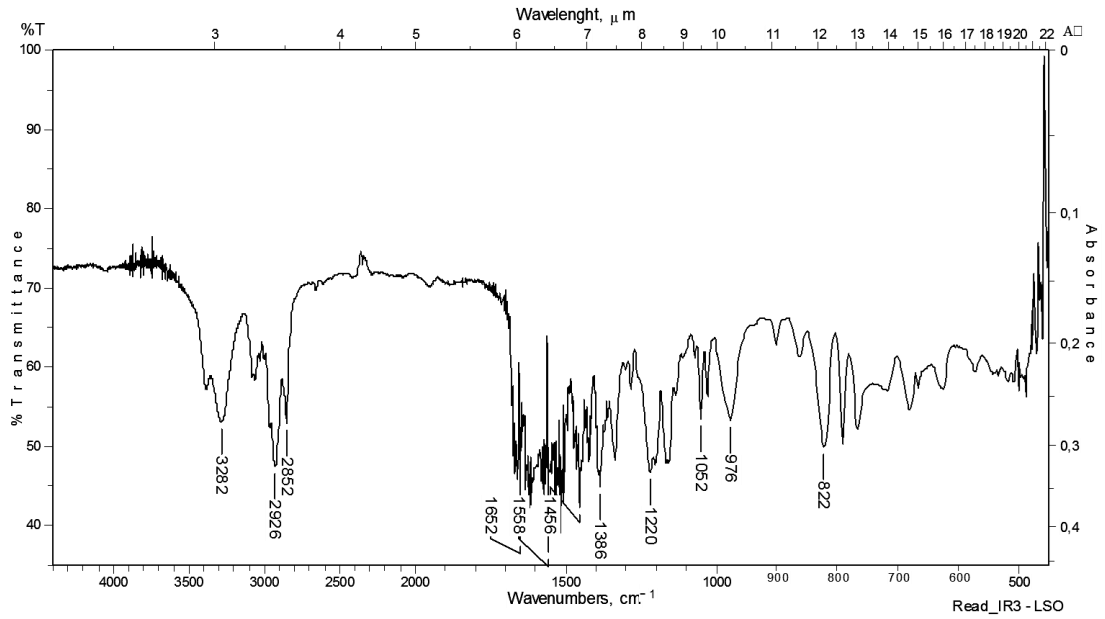
Key words: primaquine, cinnamic acid, amide, acylsemicarbazide, synthesis.

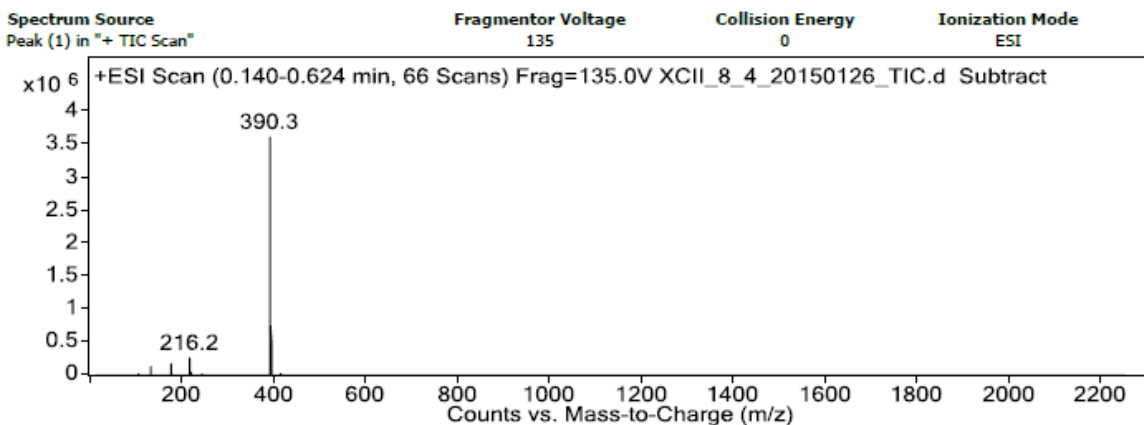
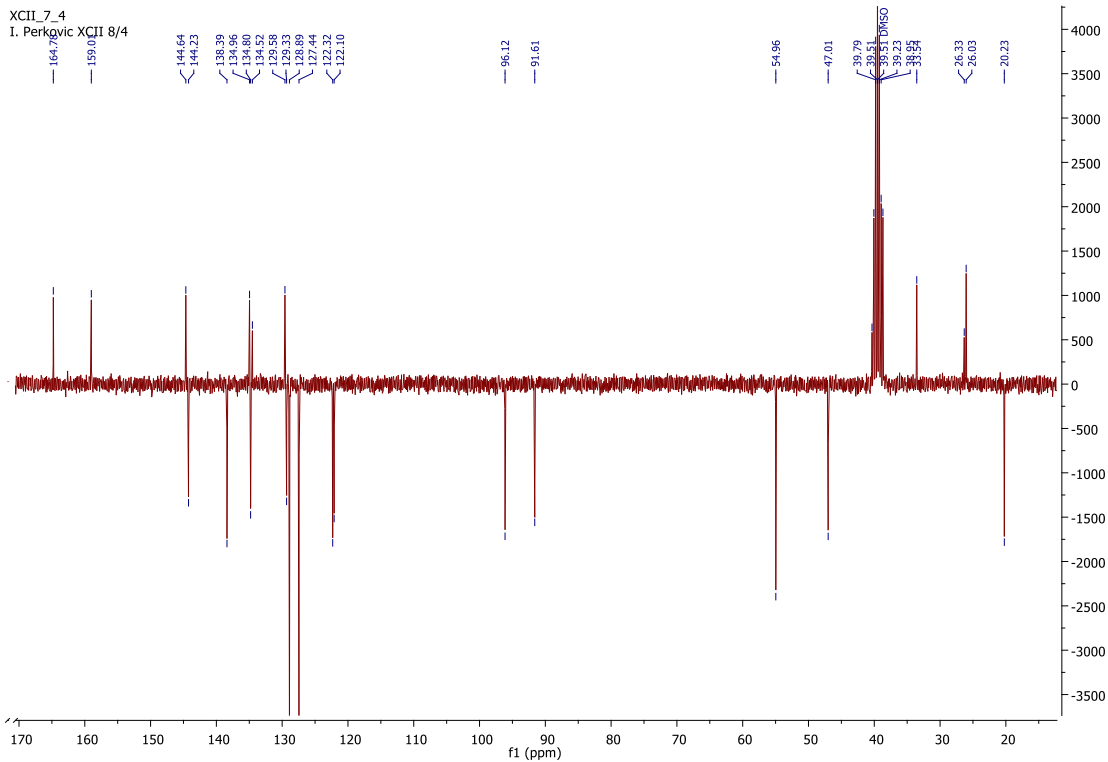
PRILOZI

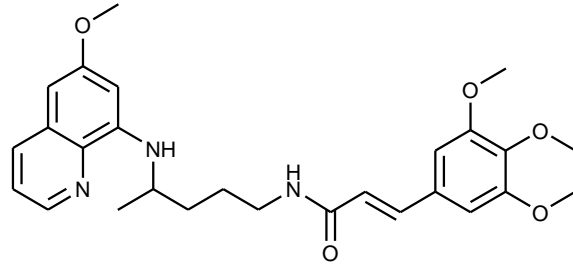
Prilozi sadrže IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR i MS spektre u ovom radu novosintetiziranih spojeva.



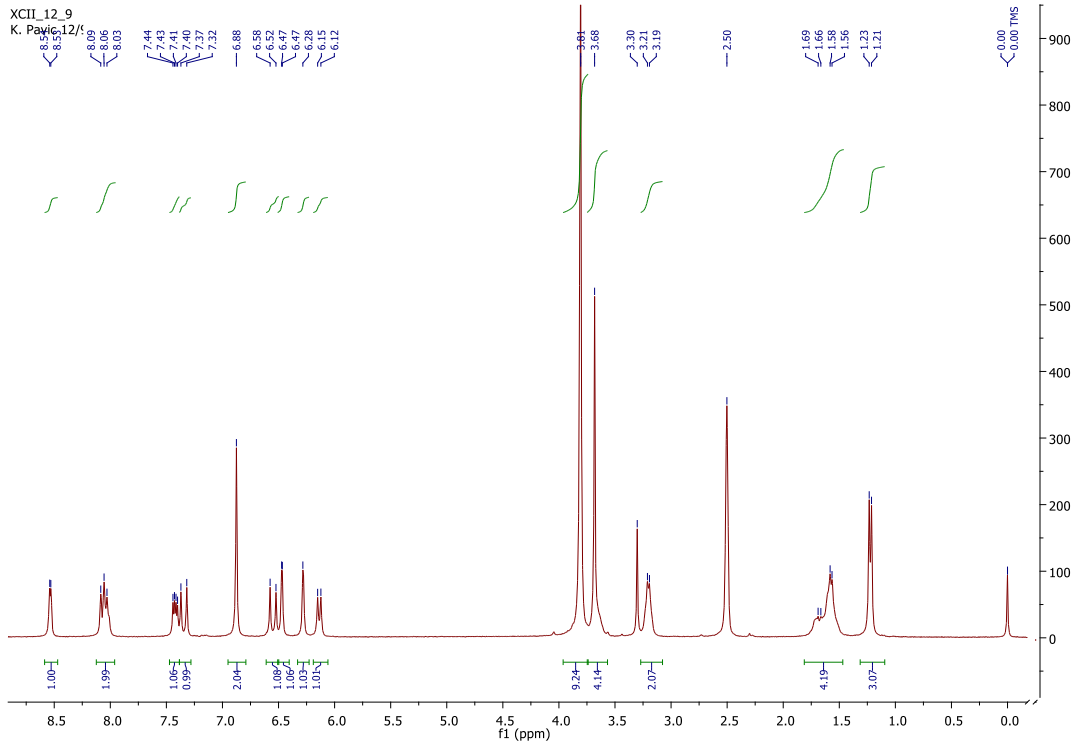
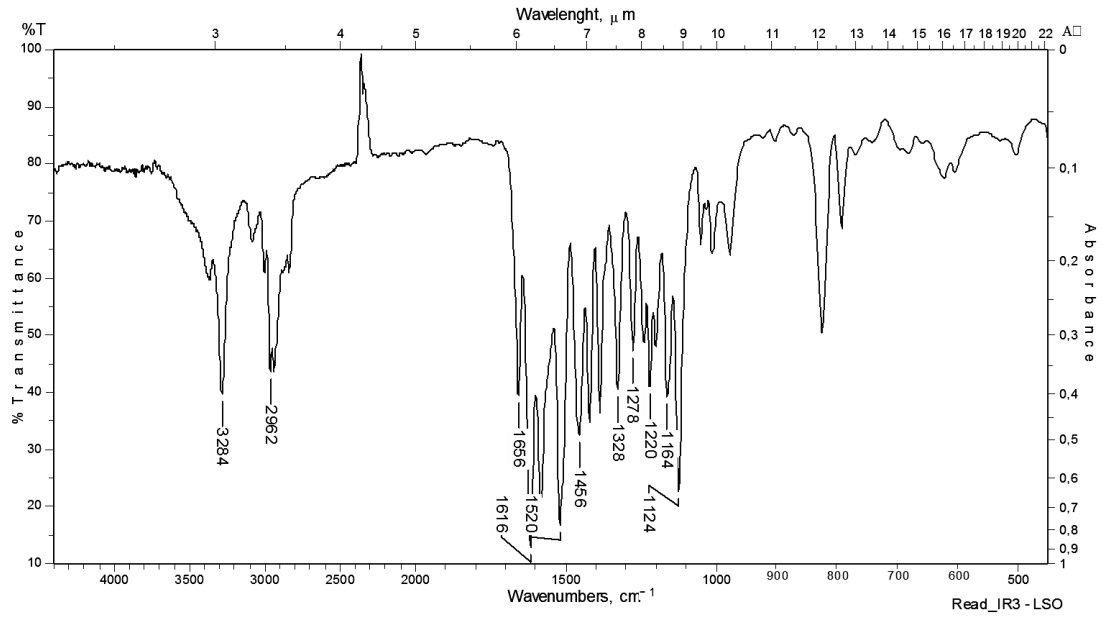
3a

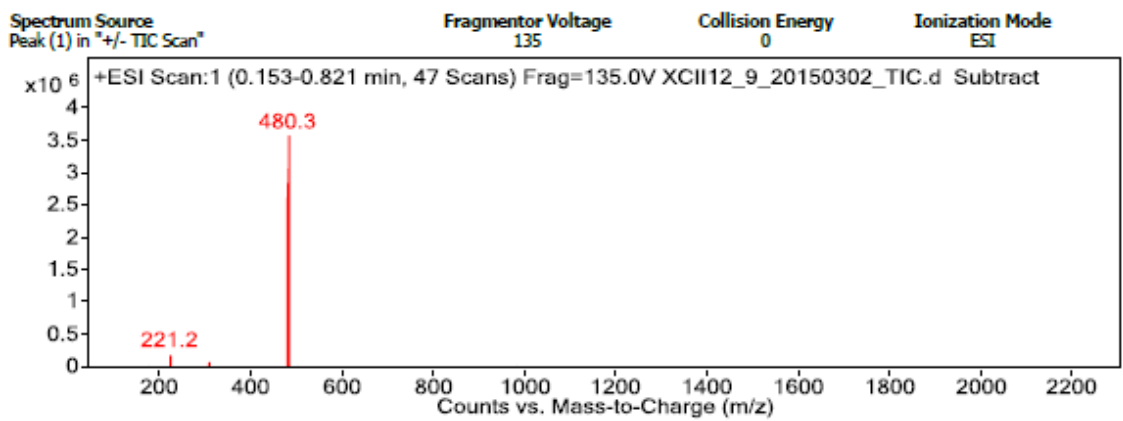
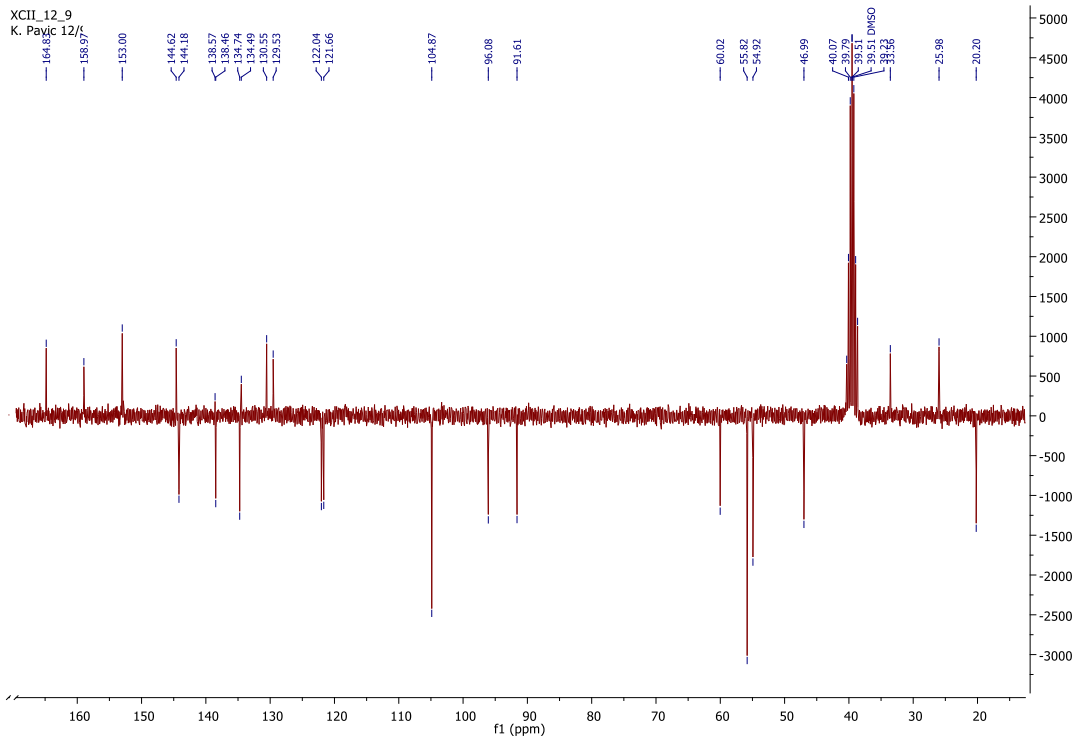


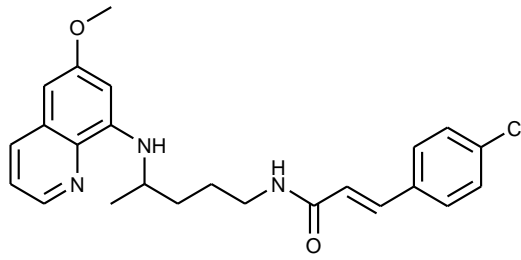




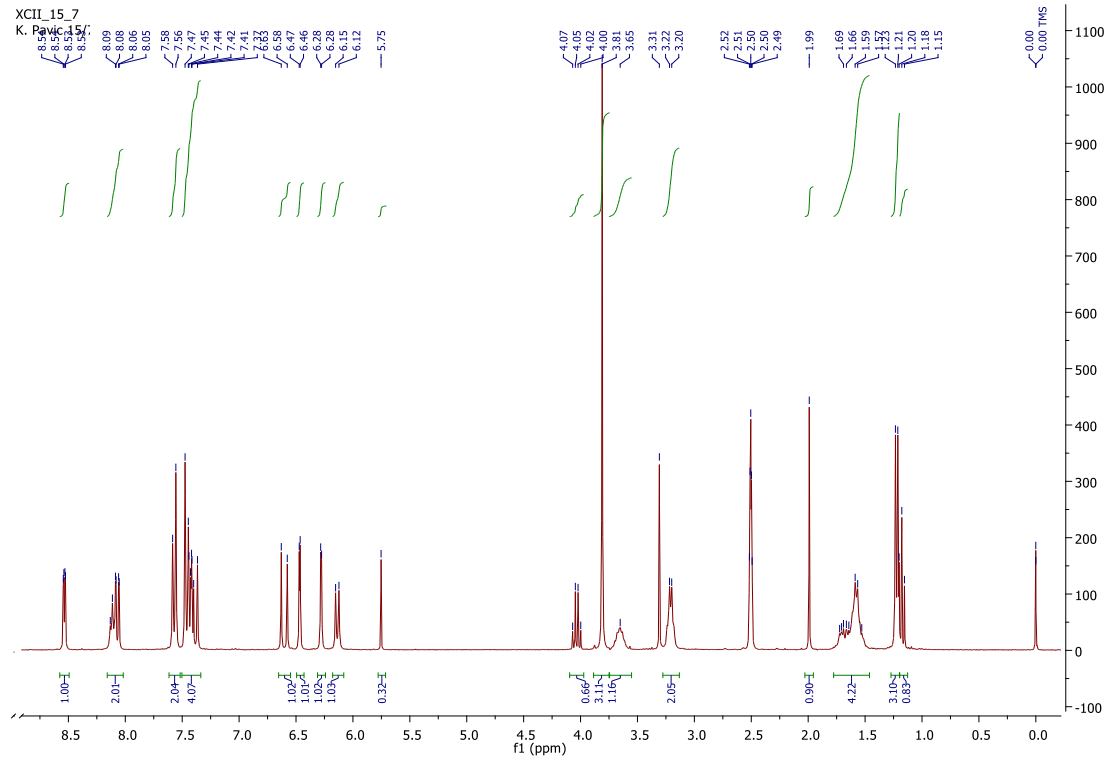
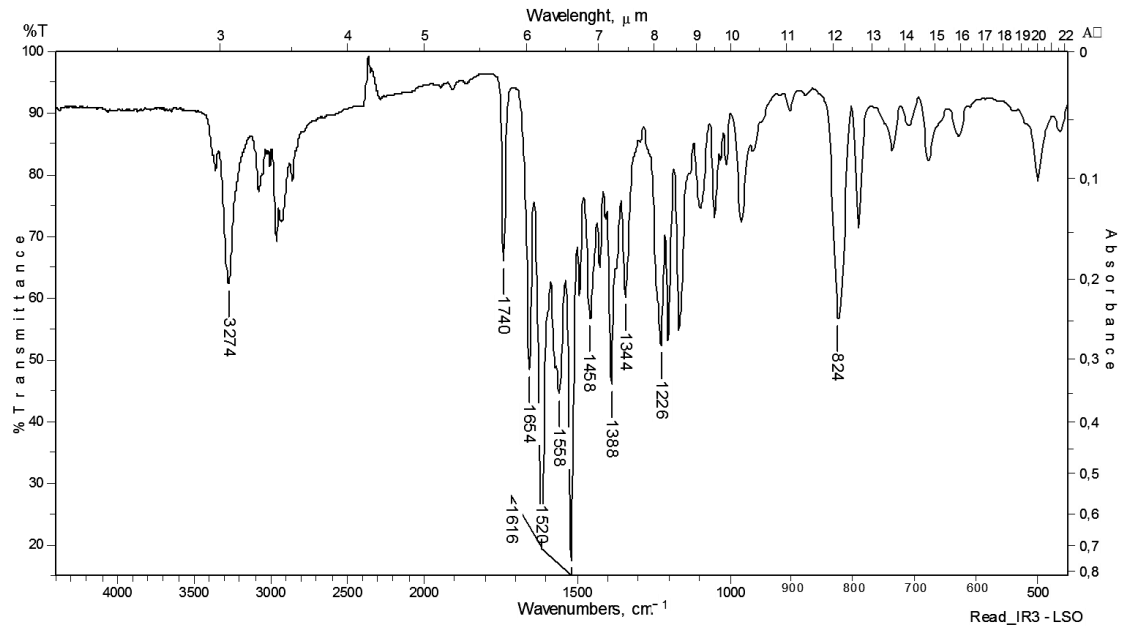
3b

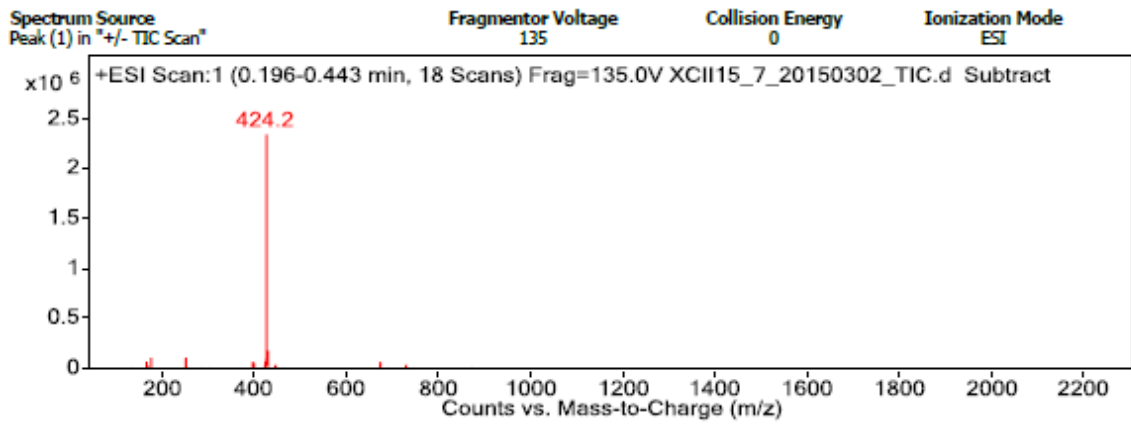
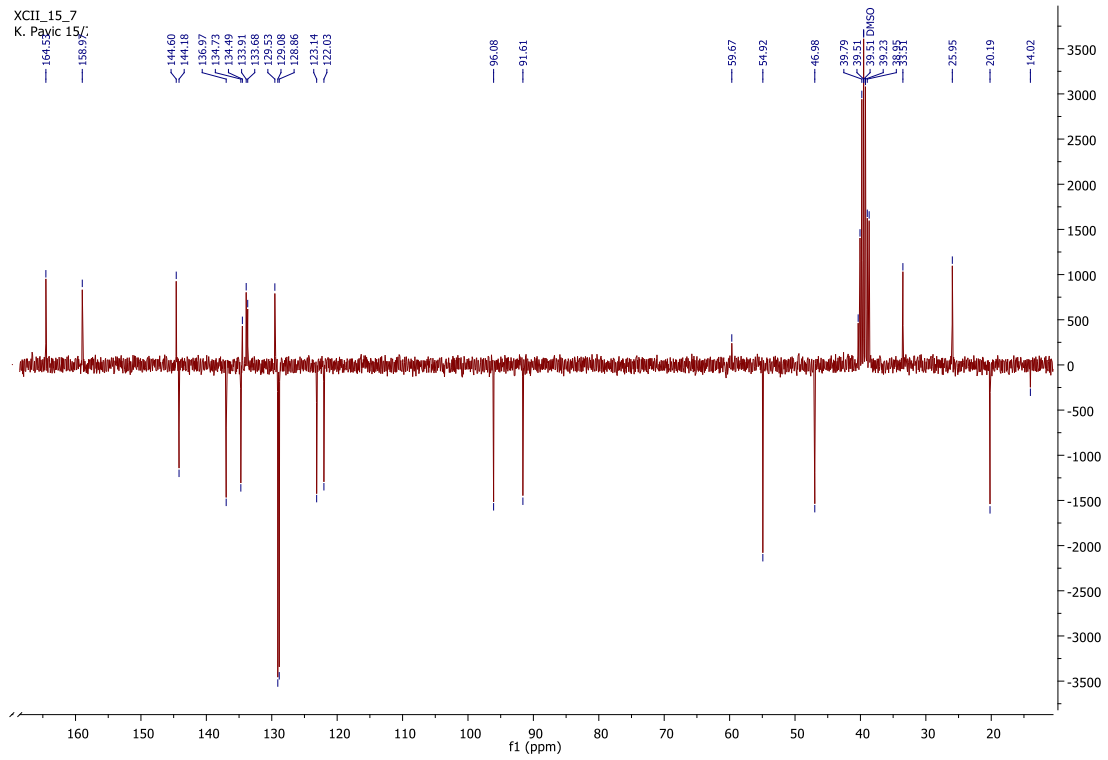


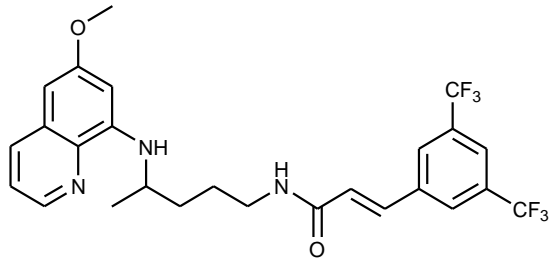




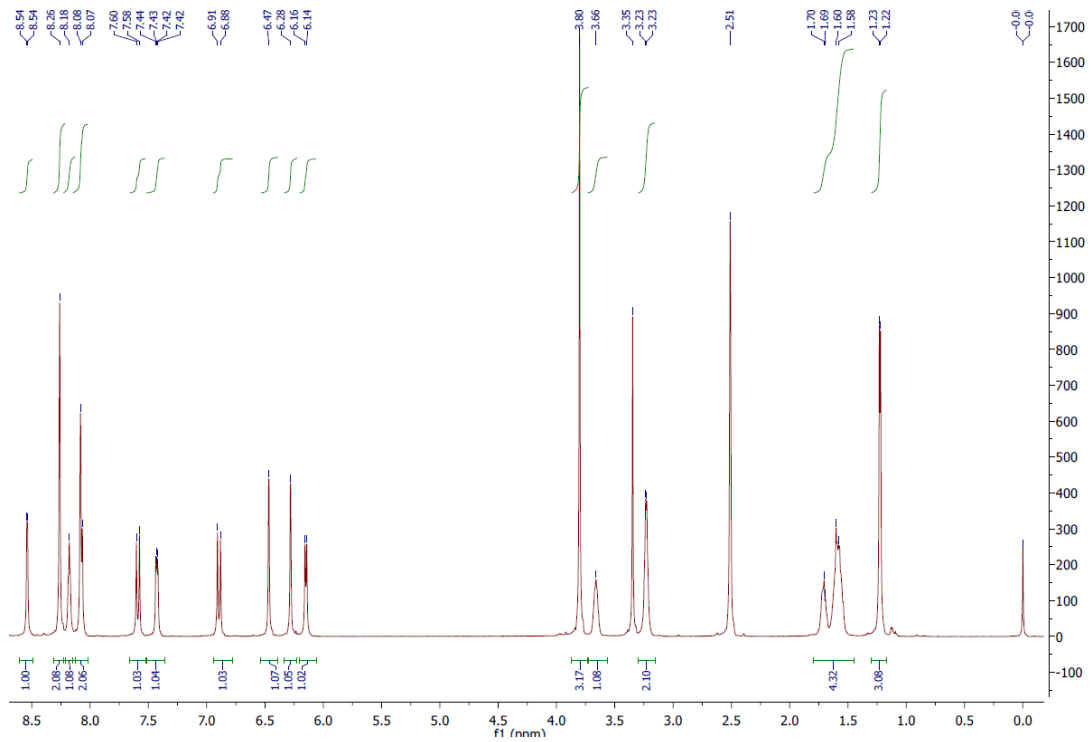
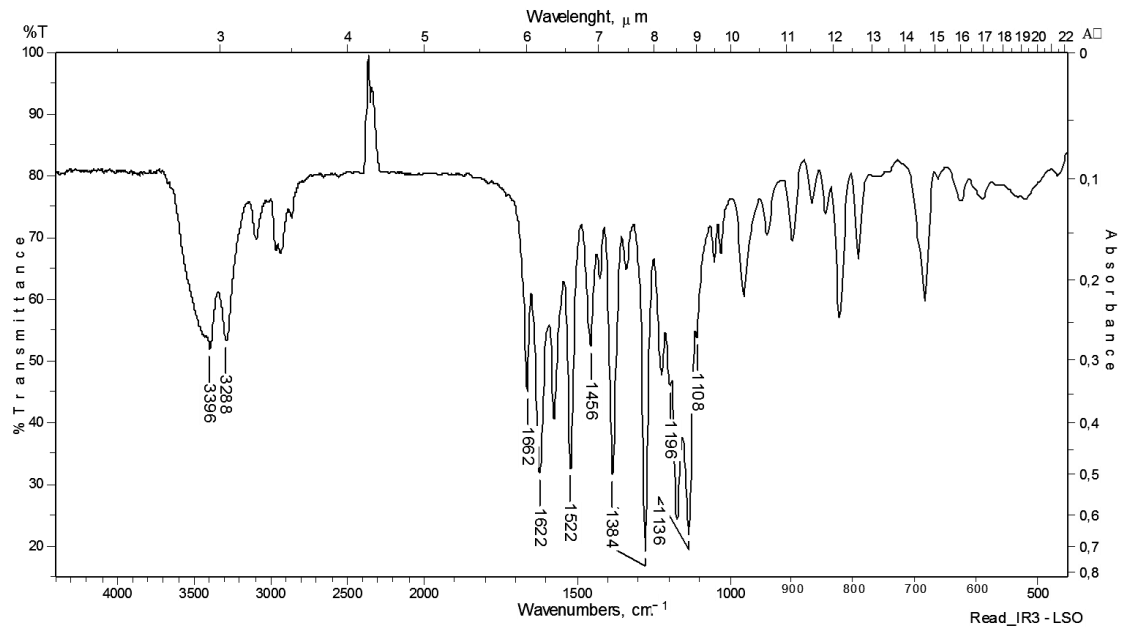
3c

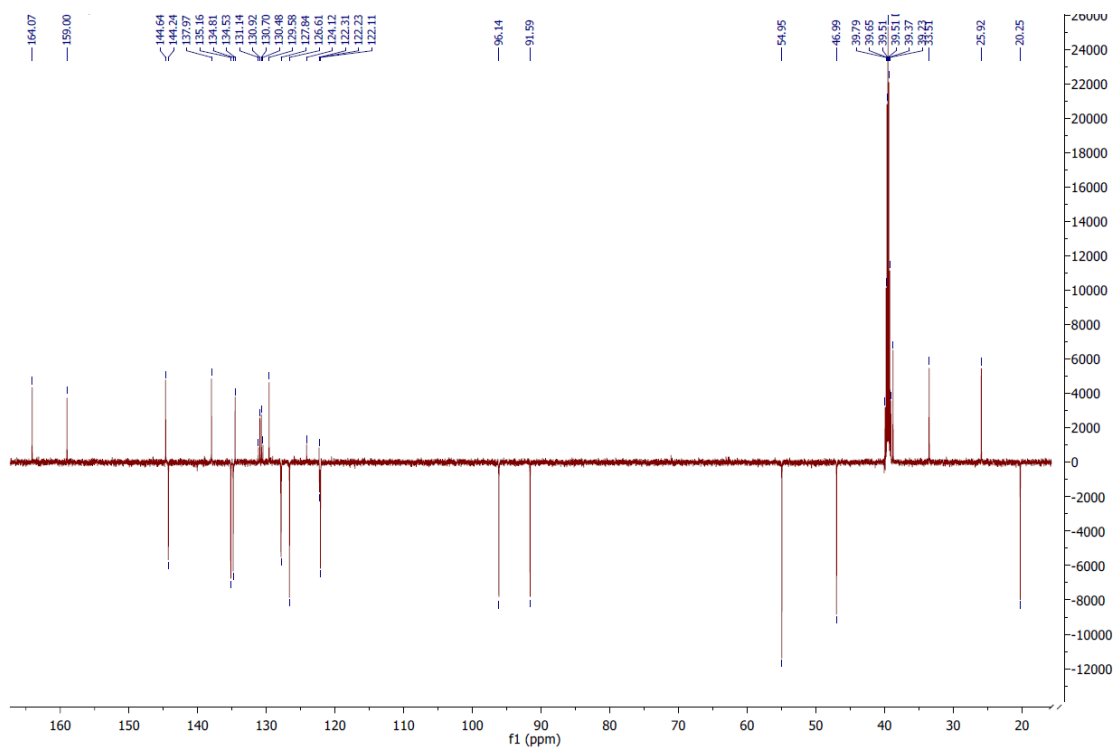






3d



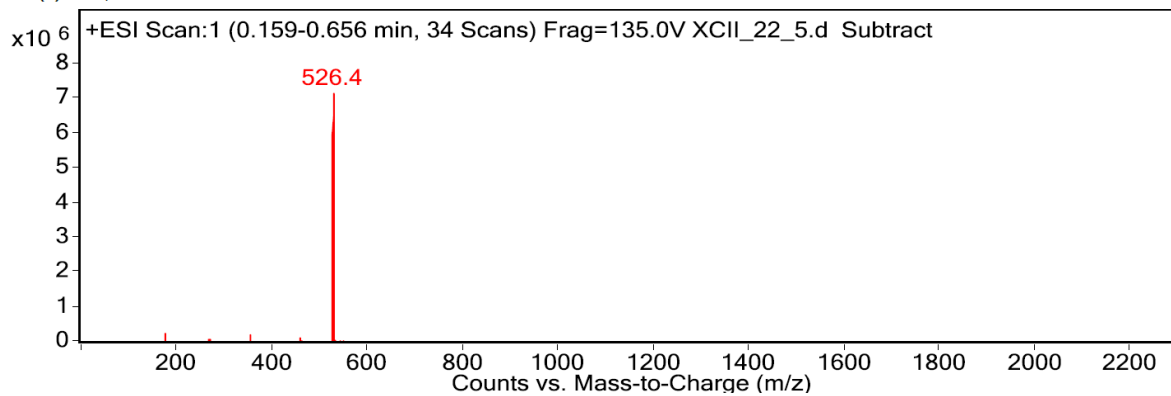


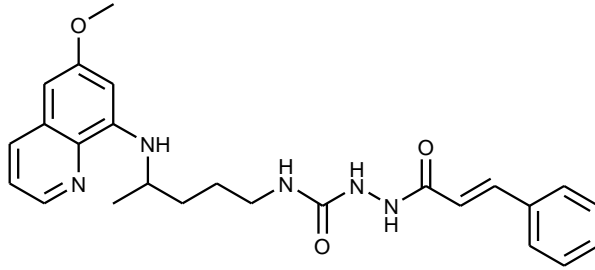
Peak (1) in "+/- TIC Scan"

135

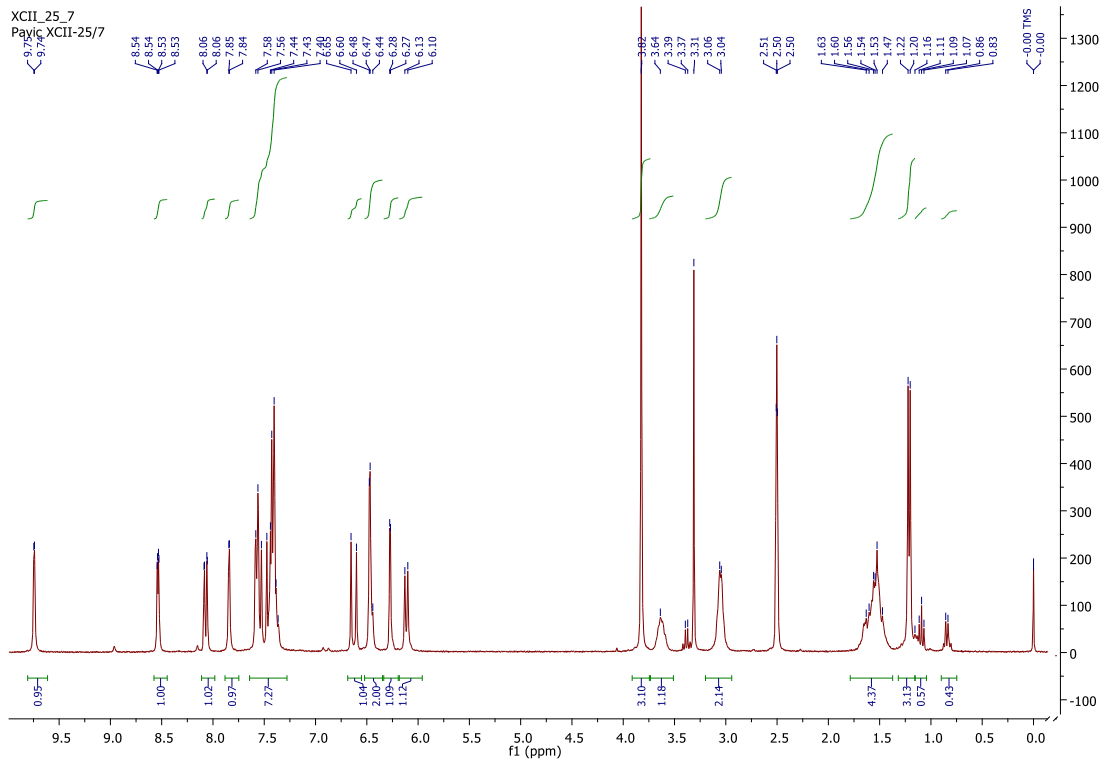
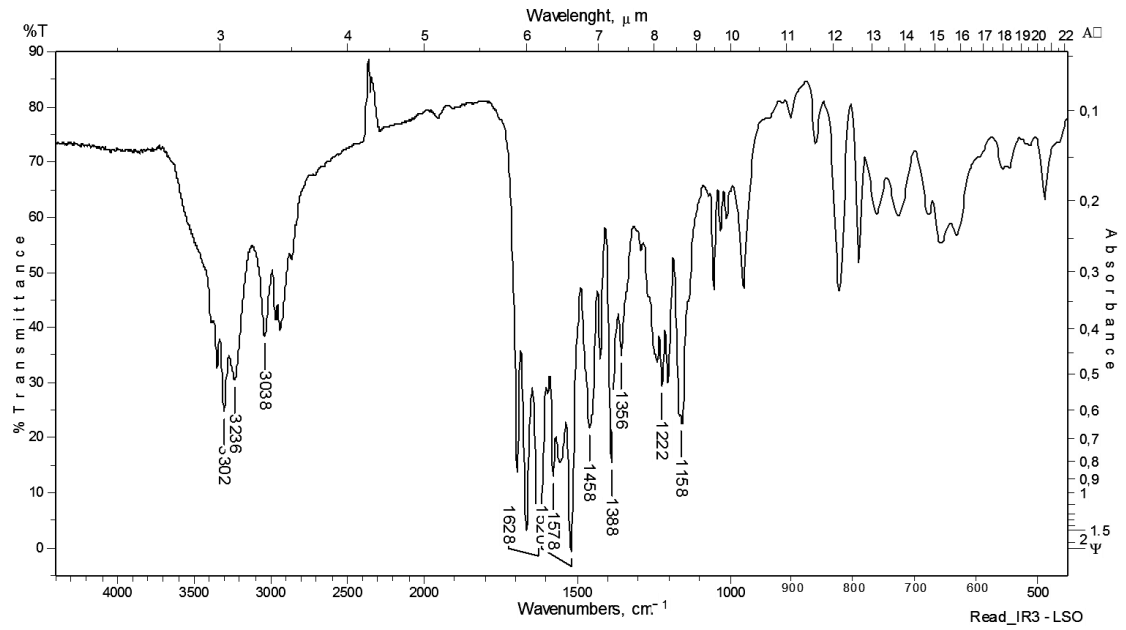
0

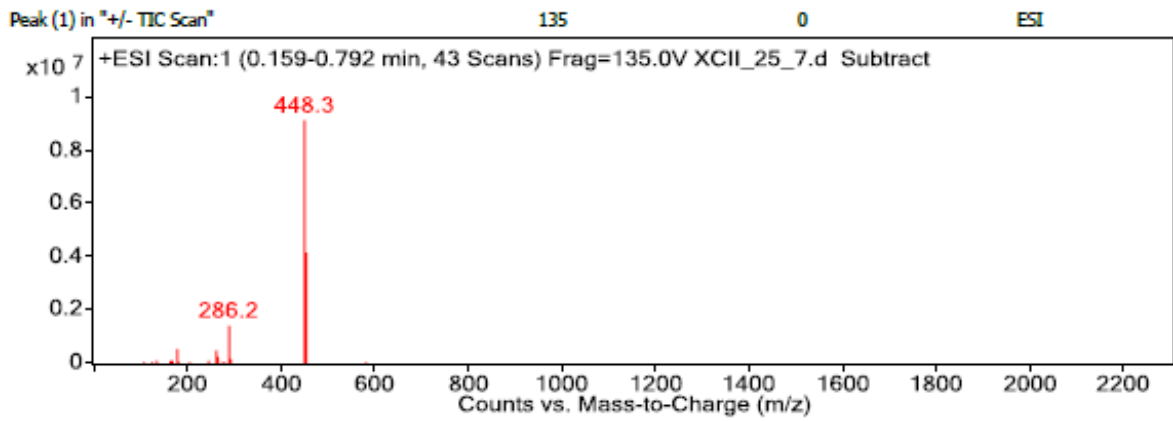
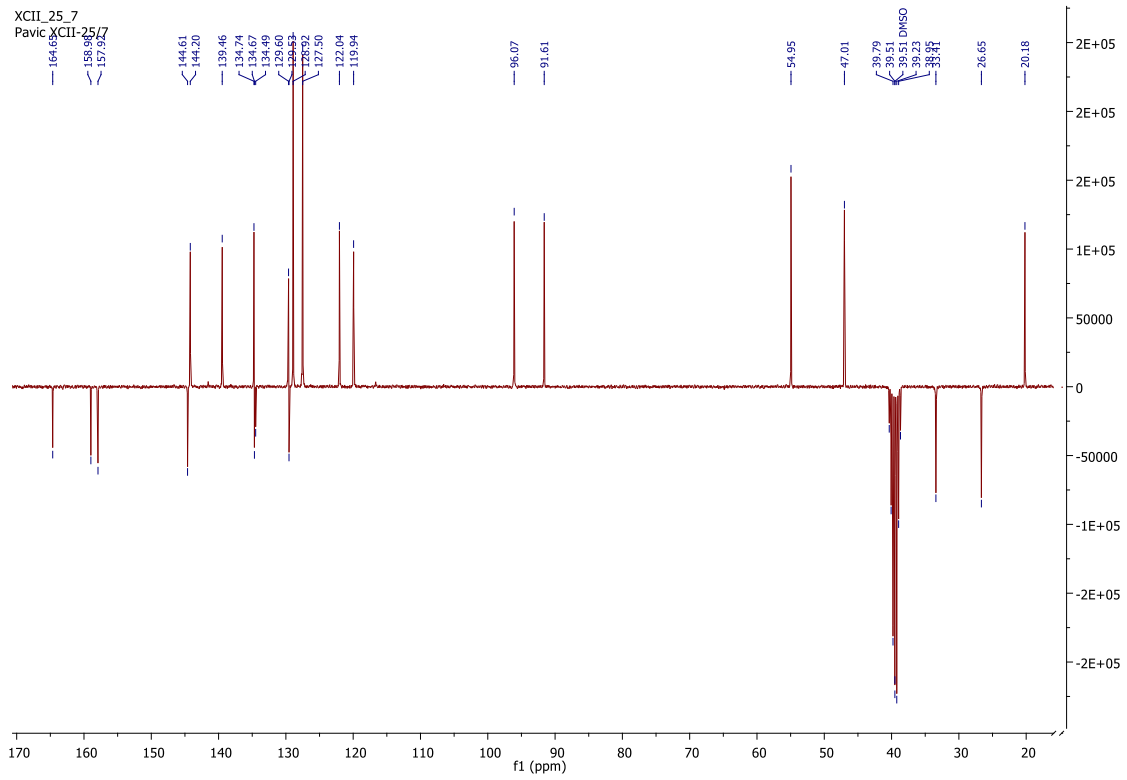
ESI

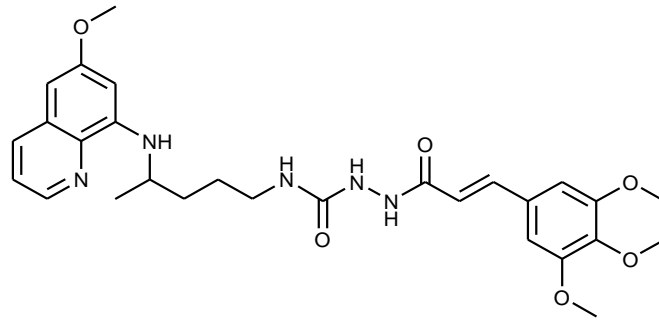




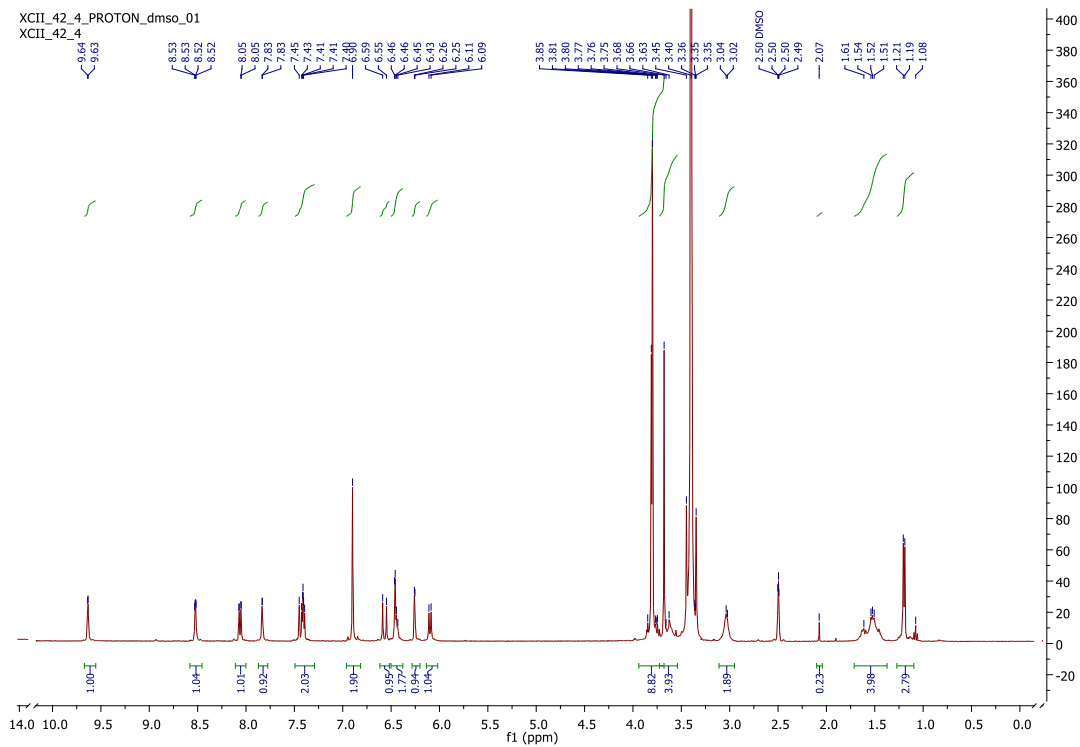
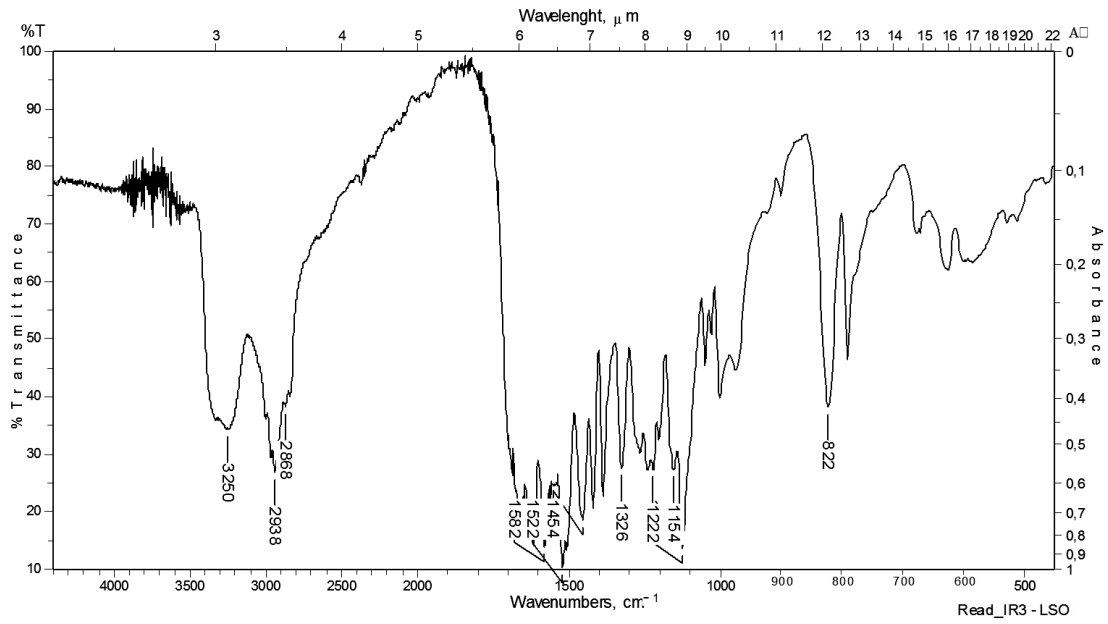
7a

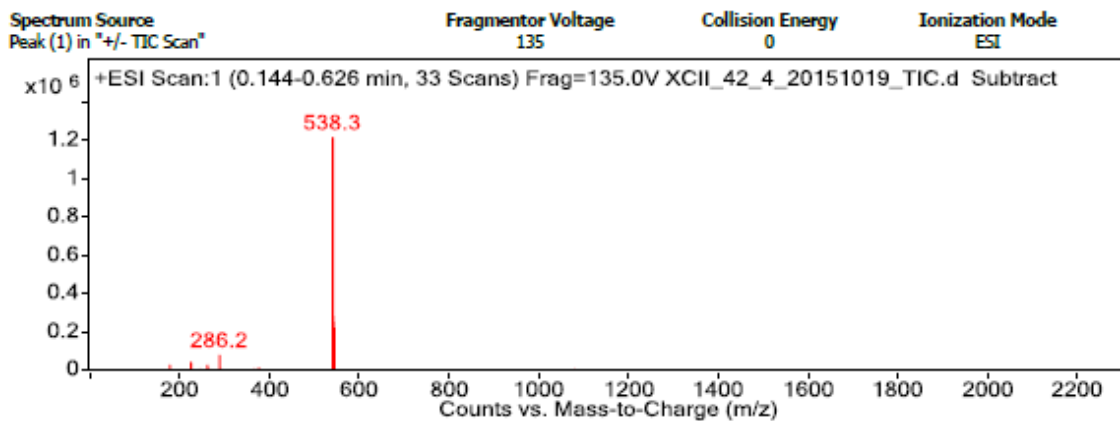
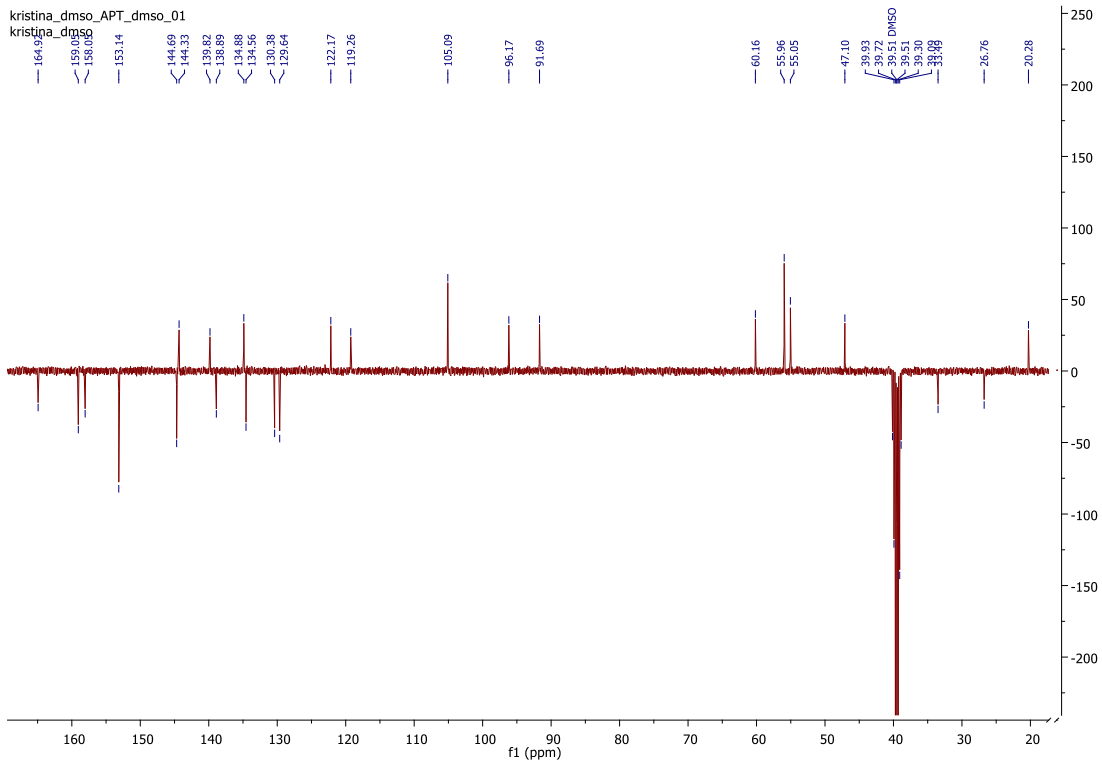


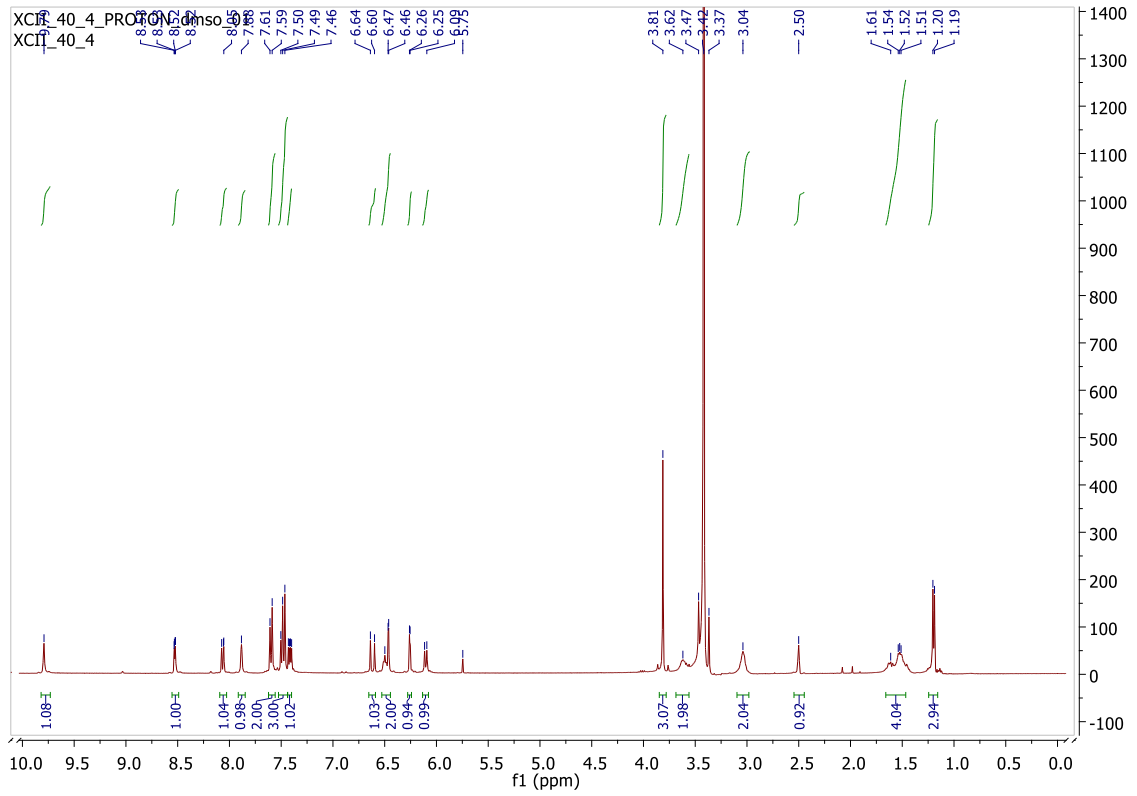
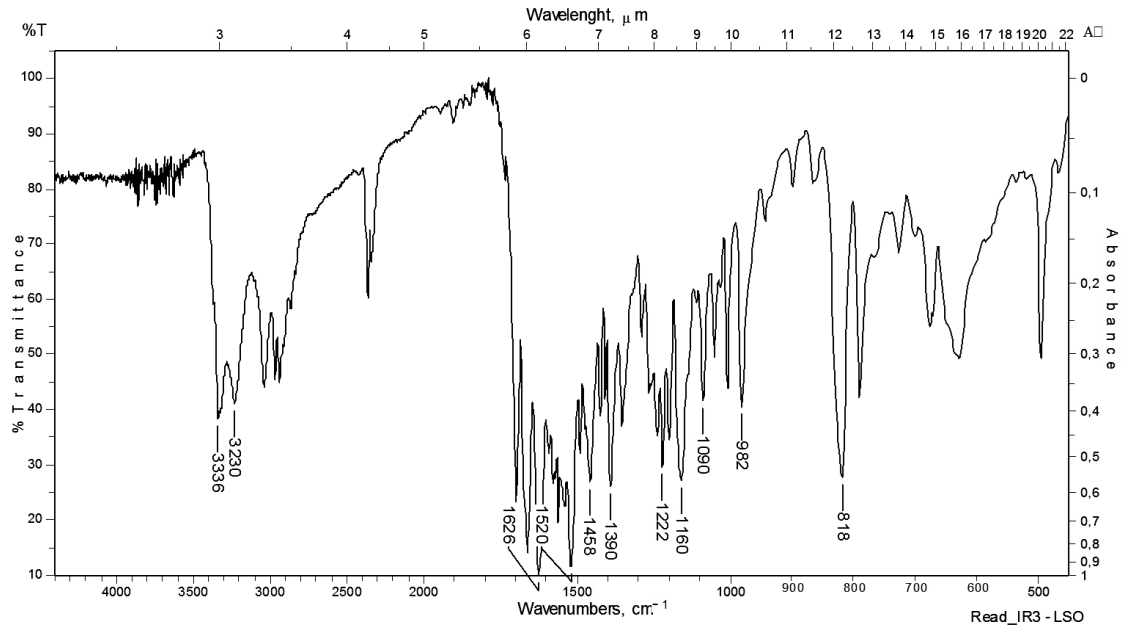
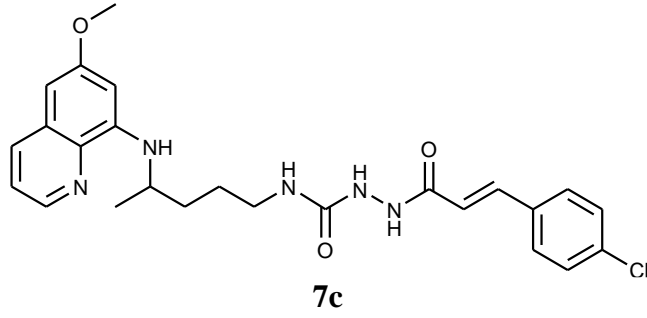


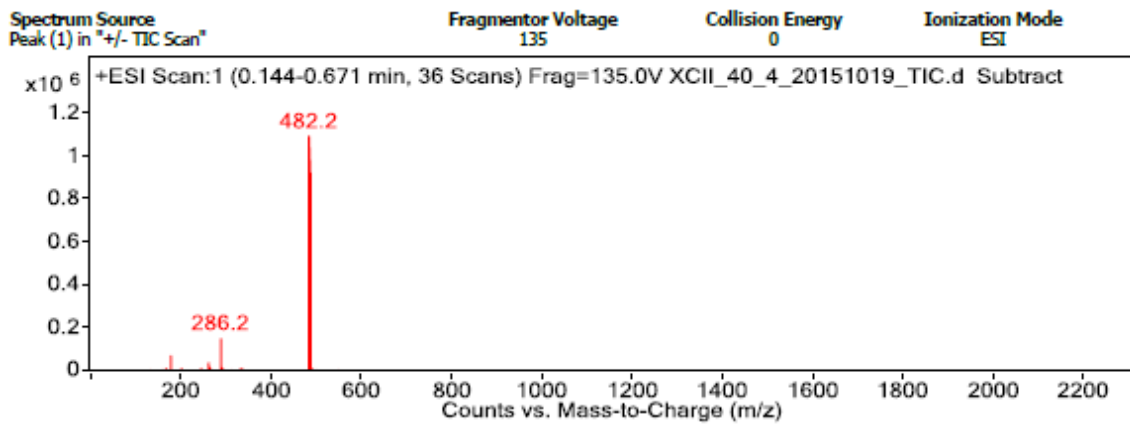
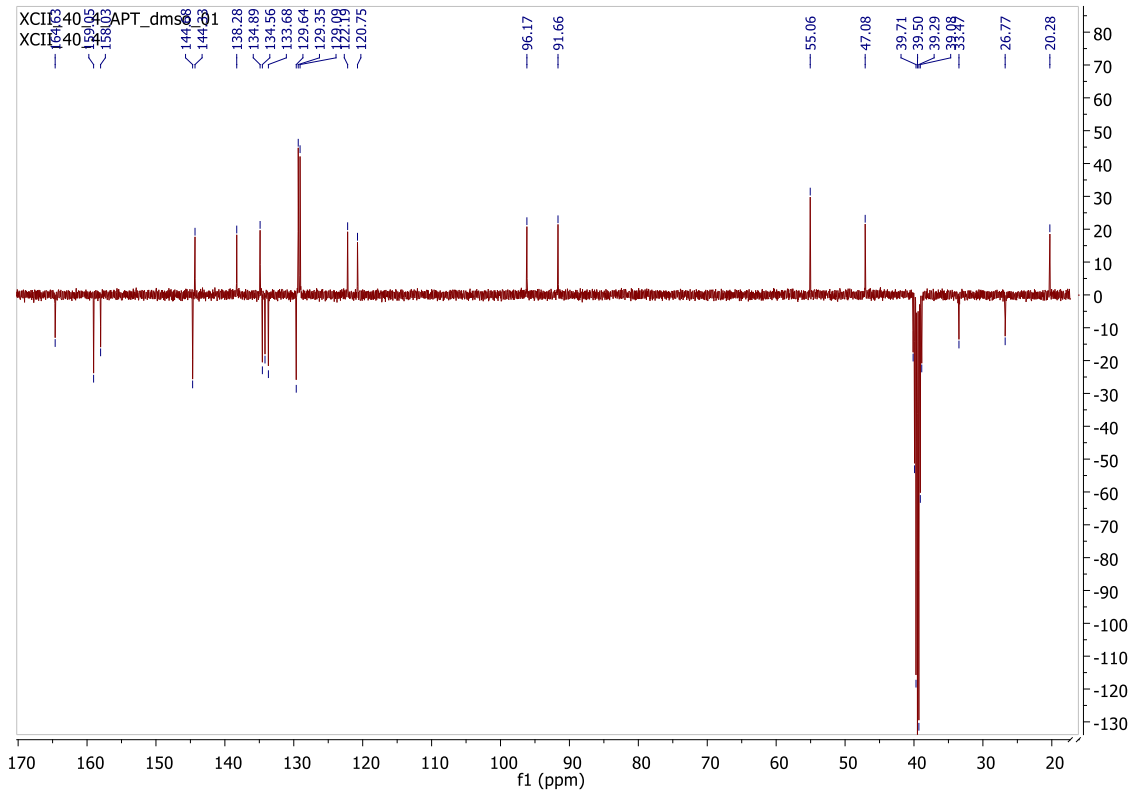


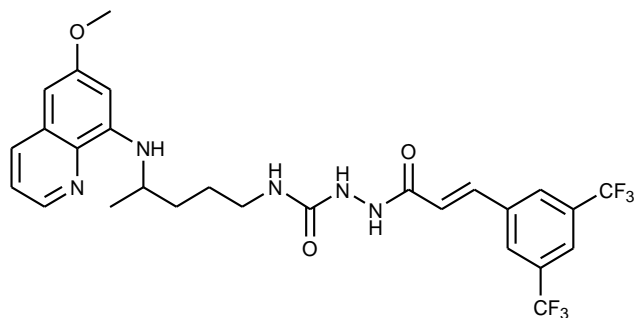
7b



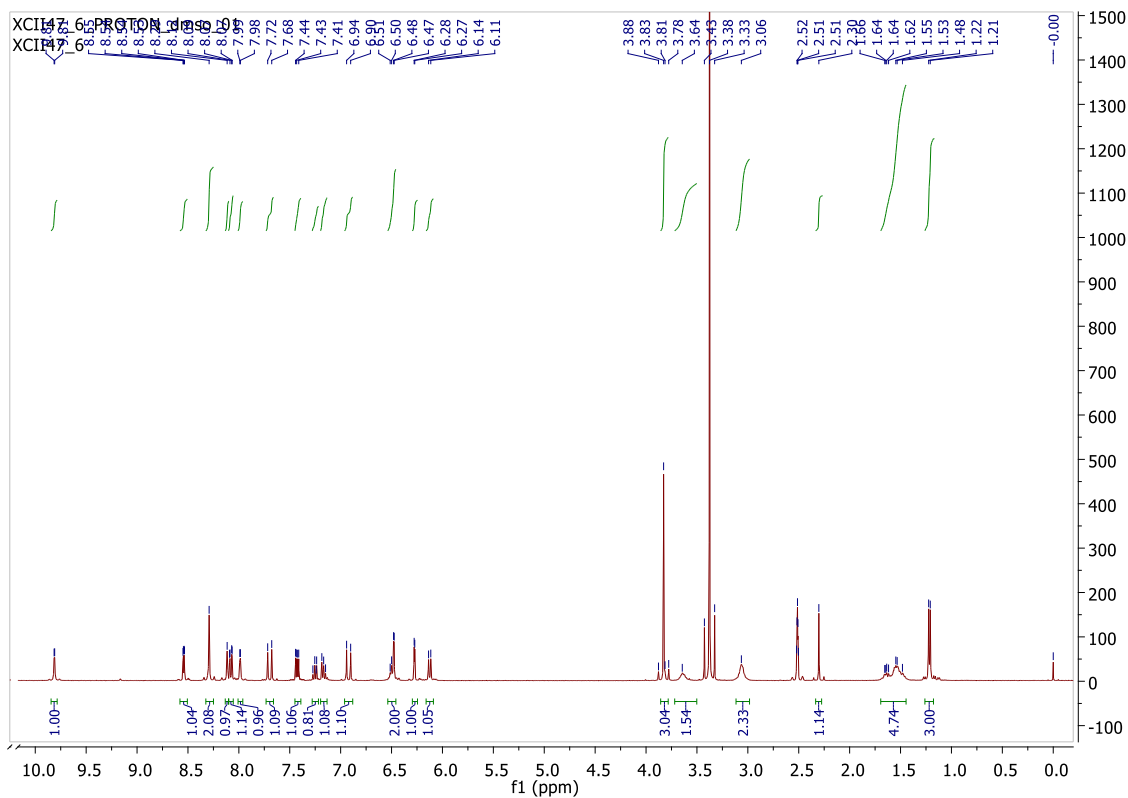
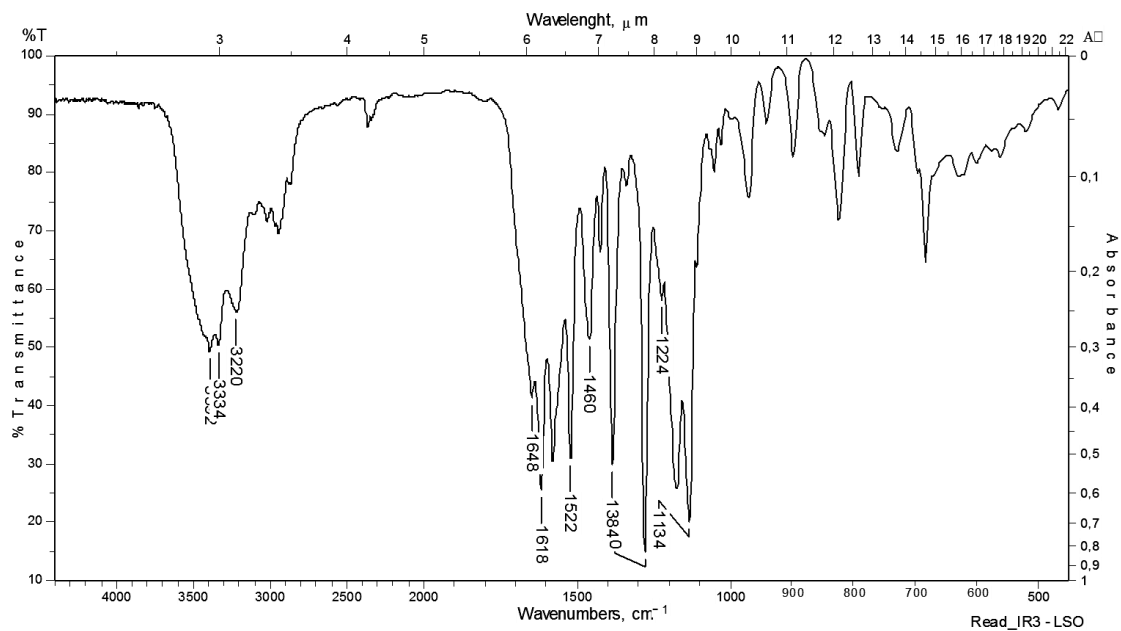


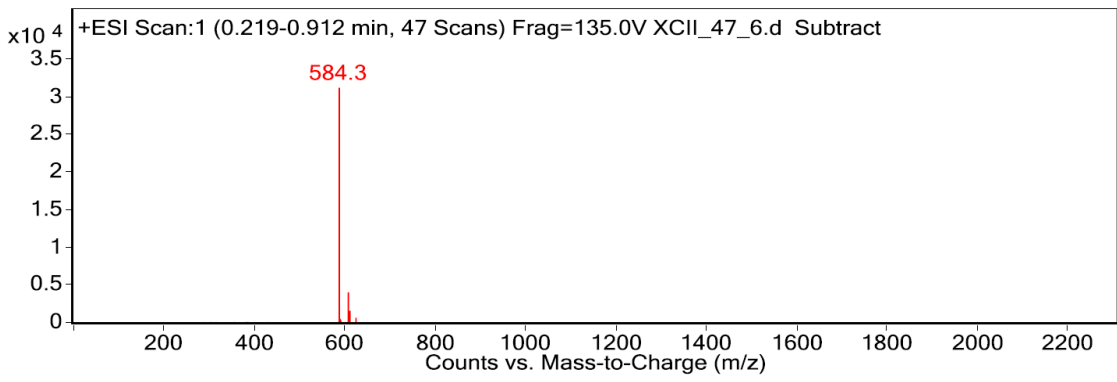
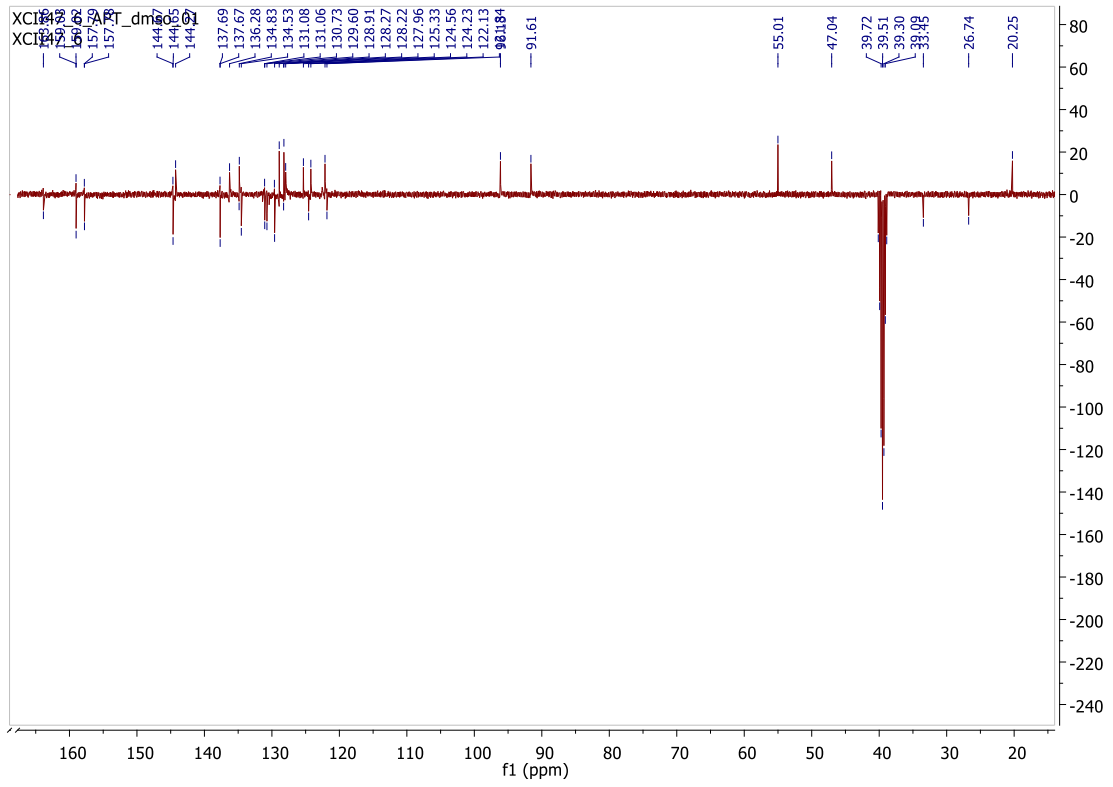






7d





ŽIVOTOPIS

Filip Kozlina rođen je 16. lipnja 1994. godine u Zagrebu. Završio je V. gimnaziju u Zagrebu. Tijekom školovanja sudjelovao je na brojnim županijskim i državnim natjecanjima iz kemije, biologije, logike, matematike i engleskog jezika na kojima je postizao vrlo zapažene rezultate. Na državnim natjecanjima iz kemije osvojio je drugo (u 1. razredu), prvo (u 2. razredu), četvrto (u 3. razredu) i treće mjesto (u 4. razredu). Godine 2013. bio je član hrvatske reprezentacije na 45. Međunarodnoj kemijskoj olimpijadi (*45th International Chemistry Olympiad*) u Moskvi na kojoj je osvojio brončanu medalju. Upisao je Farmaceutsko-biokemijski fakultet, smjer farmacija, 2013. godine, kao prvi na upisnoj listi, a sada je student treće godine. Godine 2015. dobio je pohvalu Fakultetskog vijeća za izvrstan uspjeh u studiju, kao jedan od pet najboljih studenata u generaciji. Tijekom akademske godine 2014./2015. bio je demonstrator na Zavodu za farmaceutsku botaniku, na kolegiju Stanična biologija s genetikom. Ovaj fakultet upisao je zbog velikog zanimanja za biomedicinske znanosti i kemiju, koje studij farmacije najbolje povezuje. Izradi ovog rada pristupio je zbog želje za stjecanjem novih iskustava i znanja u istraživanju novih lijekova.