

# Sinteza i karakterizacija novih urea klorokina s aminoalkoholima

---

**Plavša, Branimir**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:807097>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Branimir Plavša**

**Sinteza i karakterizacija novih urea klorokina s  
aminoalkoholima**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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

Zahvaljujem se djelatnicima Zavoda za Farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu, posebice Zrinki Rajić i Kristini Pavić, na pomoći tijekom provođenja i pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima, bratu, i ostaloj obitelji na podršci tijekom studiranja, kao i prijateljima i kolegama koji su obogatili iskustvo studiranja mnogim lijepim uspomnama.

## KRATICE

$^{13}\text{C}$ NMR	$^{13}\text{C}$ nuklearna magnetska rezonancija
$^1\text{H}$ NMR	$^1\text{H}$ nuklearna magnetska rezonancija
A549	humana stanična linija adenokarcinoma pluća alveolarnih bazalnih epitelnih stanica
BtcCl	klorid 1-benzotriazol karboksilne kiseline
BtH	benzotriazol
BxPC-3	humana stanična linija adenokarcinoma gušterače
CQ	klorokin
Csp3	udio $sp^3$ hibridiziranih atoma ugljika u ukupnom broju ugljikovih atoma
CYP 450	citokrom P 450
DMSO	dimetilsulfoksid
ESI	ionizacija elektronskim raspršenjem
H540	humana stanična linija karcinoma pluća ne malih stanica
IR	infracrvena spektroskopija
KMB	krvno-moždana barijera
$\log K_p$	koeficijent propusnosti otopljene tvari kroz <i>stratum corneum</i>
$\log P$	dekadski logaritam particijskog koeficijenta
MR	molarna refraktivnost
MS	masena spektroskopija
TEA	triethylamin
TMS	trimetilsilan
TPSA	topološka polarna površina molekule
PANC-1	humana stanična linija dukalnog adenokarcinoma gušterače
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza

## SADRŽAJ

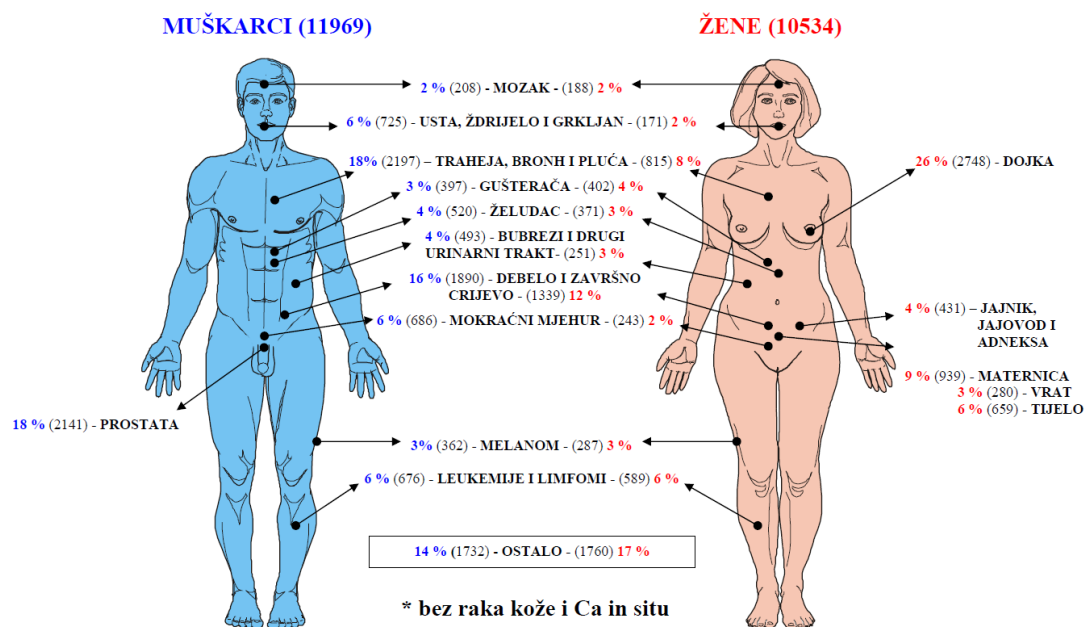
1. UVOD.....	1
1.1. Rak .....	2
1.2. Autofagija.....	3
1.3. Uloga autofagije u raku .....	5
1.4. Antimalarici kao potencijalni citostatici .....	7
1.5. Klorokin kao citostatik .....	7
1.6. Klorokin .....	8
1.6.1. Fizikalno-kemijske značajke klorokina .....	8
1.6.2. Djelovanje i upotreba klorokina .....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.2. Sinteza $N^1$ -(7-klorkinolin-4-il)-1,4-diaminobutana ( <b>2</b> ).....	15
3.3. Sinteza $N$ -(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,2,3]triazol-1-karboksamida ( <b>BtcCQ, 3</b> ).....	15
3.4. Sinteza urea <b>4a-d</b> .....	16
3.4.1. Sinteza 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil)uree ( <b>4a</b> ).....	16
3.4.2. Sinteza 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(1-(hidroksimetil)ciklobutil)uree ( <b>4b</b> ) .....	17

3.4.3. Sinteza 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(1-(hidroksimetil)ciklopropil)uree (4c).....	18
3.4.4. Sinteza 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(4-fluor-1-hidroksibutan-2-il)uree (4d) .....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
5. ZAKLJUČCI.....	30
6. LITERATURA .....	32
7. SAŽETAK .....	38
8. SUMMARY .....	40
9. PRILOZI .....	42
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	53

## **1. UVOD**

## 1.1. Rak

Rak je skupni naziv za više od 100 različitih bolesti. Razvoj raka je postepen proces pri kojem dolazi do nakupljanja promjena u normalnim stanicama koje mogu dovesti do transformacije u tumorsku stanicu. Temeljna karakteristika stanica raka je nekontroliran rast te invazivno širenje u okolna tkiva (<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije rak je drugi najčešći uzrok smrti u svijetu. U svijetu je 2016. godine od raka umrlo gotovo 9 milijuna ljudi (World Health Organization, 2018). U Hrvatskoj je rak također drugi vodeći uzrok smrti; 2017. godine od raka je umrlo 13 964 ljudi, a stopa na 100 000 stanovnika iznosila je 339/100 000 (Čorić i sur., 2018). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo ukupan broj novodijagnosticiranih zloćudnih bolesti u 2015. godini bio je 22 503, a stopa incidencije iznosila je 535,3/100 000. Najčešća sijela novih slučajeva raka kod muškaraca bila su traheja, bronhi i pluća (18%), prostata (18%) i debelo crijevo (9%), a kod žena dojka (26%), debelo crijevo (8%) te traheja, bronhi i pluća (8%) (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2018). Raspodjela novodijagnosticiranih zloćudnih bolesti prema organima prikazana je na Slici 1.



**Slika 1.** Raspodjela novooboljelih od raka prema sijelima u 2015. godini (prilagođeno prema M. Šekerija i sur., 2018) (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2018)



Posljednjih desetljeća došlo je do znatnog napretka u liječenju i dijagnostici raka. Brojni oblici raka koji su u prošlosti bili gotovo neizlječivi danas zbog ranijeg otkrivanja i razvoja kemoterapije postaju izlječivi ili se vrijeme preživljavanja znatno povećava. Velik napredak je učinjen i s aspekta javnog zdravstva, smanjenjem broja pušača te nacionalnim programima ranog otkrivanja raka dojke, debelog crijeva i vrata maternice.

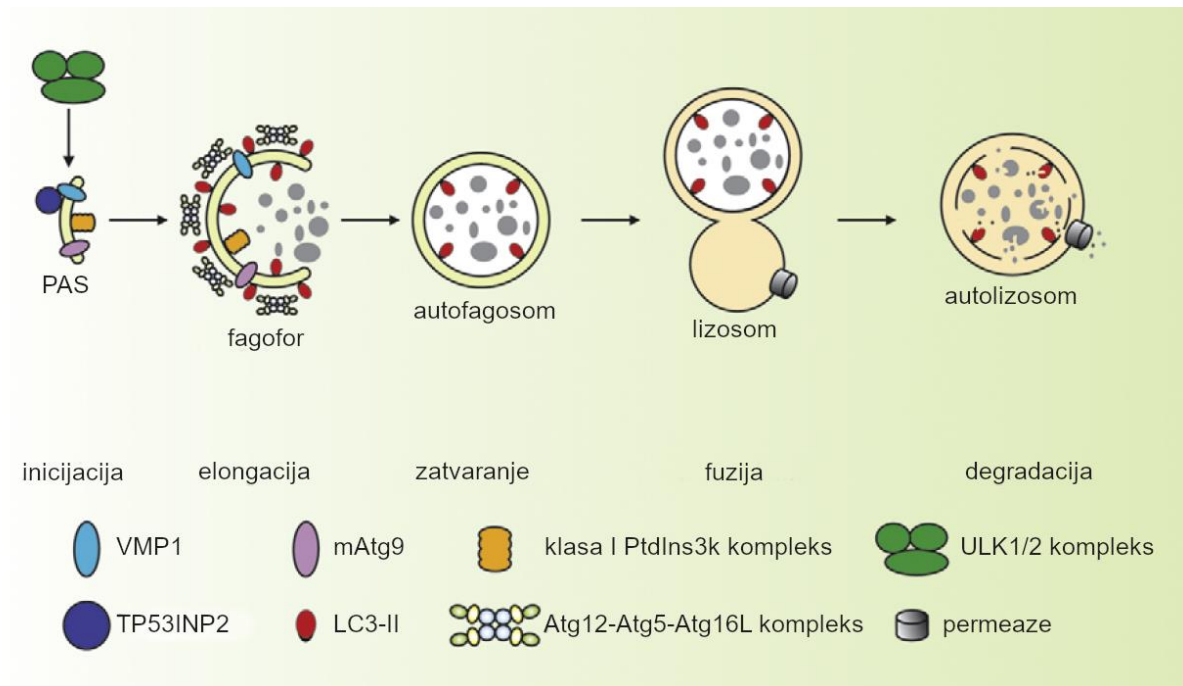
Usprkos svim napretcima koje je medicina učinila posljednjih godina, sve dulji životni vijek, kao i promjene u načinu života, čine rak i dalje jednim od najvećih javnozdravstvenih problema budućnosti. Karakteristike raka kao bolesti također predstavljaju velik problem u liječenju. Rak je iznimno heterogena skupina bolesti te vjerojatno nikada nećemo pronaći univerzalni lijek za rak. Također, tumorske stanice imaju veliku stopu mutacije tako da lako dolazi do razvoja rezistencije. Iz tih razloga razvoj novih, naprednijih i sigurnijih citostatika jedno je od najaktivnijih područja znanosti.

## **1.2. Autofagija**

Autofagija je proces lizosomalne razgradnje i recikliranja staničnih komponenti koji je evolucijski očuvan u svih eukariota – od kvasaca pa do čovjeka. Kod sisavaca postoje tri primarna tipa autofagije: mikroautofagija, makroautofagija i autofagija posredovana šaperonima, eng. *chaperone-mediated autophagy* (CMA). Premda su ove tri vrste međusobno morfološki različite, sve u konačnici rezultiraju dostavljanjem staničnog materijala u lizosom gdje se isti razgrađuje (Parzych i Klionsky, 2014).

Kod mikroautofagije invaginacijama lizosomalne membrane zahvaća se stanični materijal za razgradnju (Mijaljica i sur., 2011). CMA se razlikuje od mikroautofagije u tome što ne koristi membranske strukture kako bi unijela teret, već koristi šaperone koji prepoznaju ciljane proteine sa specifičnim pentapeptidnim motivom. Ovi supstrati se zatim direktno prenose preko lizosomalne mebrane (Massey i sur., 2004). Makroautofagija (dalje u tekstu samo autofagija) je oblik autofagije koji je najbolje istražen. Odvija se u 5 faza: inicijacija, elongacija, zatvaranje, fuzija, te degradacija. Inicijacija započinje aktivacijom kompleksa kinaze 1 slične Unc-51 (ULK 1) što pokreće *de novo* sintezu fosfolipidne vezikule, koja se u ovoj fazi naziva fagofor. Fagofor se u fazi elongacije produžuje te u potpunosti okružuje stanične komponente predodređene za autofagiju. Nakon spajanja krajeva fagofora nastaje vezikula s dvostrukom mebranom koja se naziva autofagosom. Nastali autofagosom se zatim

stapa s lizosomom te dolazi do razgradnje djelovanjem lizosomalnih enzima (Parzych i Klionsky, 2014). Produkti razgradnje, aminokiseline, šećeri i lipidi se zatim otpuštaju u citoplazmu gdje služe za dobivanje energije ili kao supstrati za različite biosintetske reakcije (Rabinowitz i White, 2010). Na Slici 2. prikazan je proces autofagije s temeljnim molekulama.

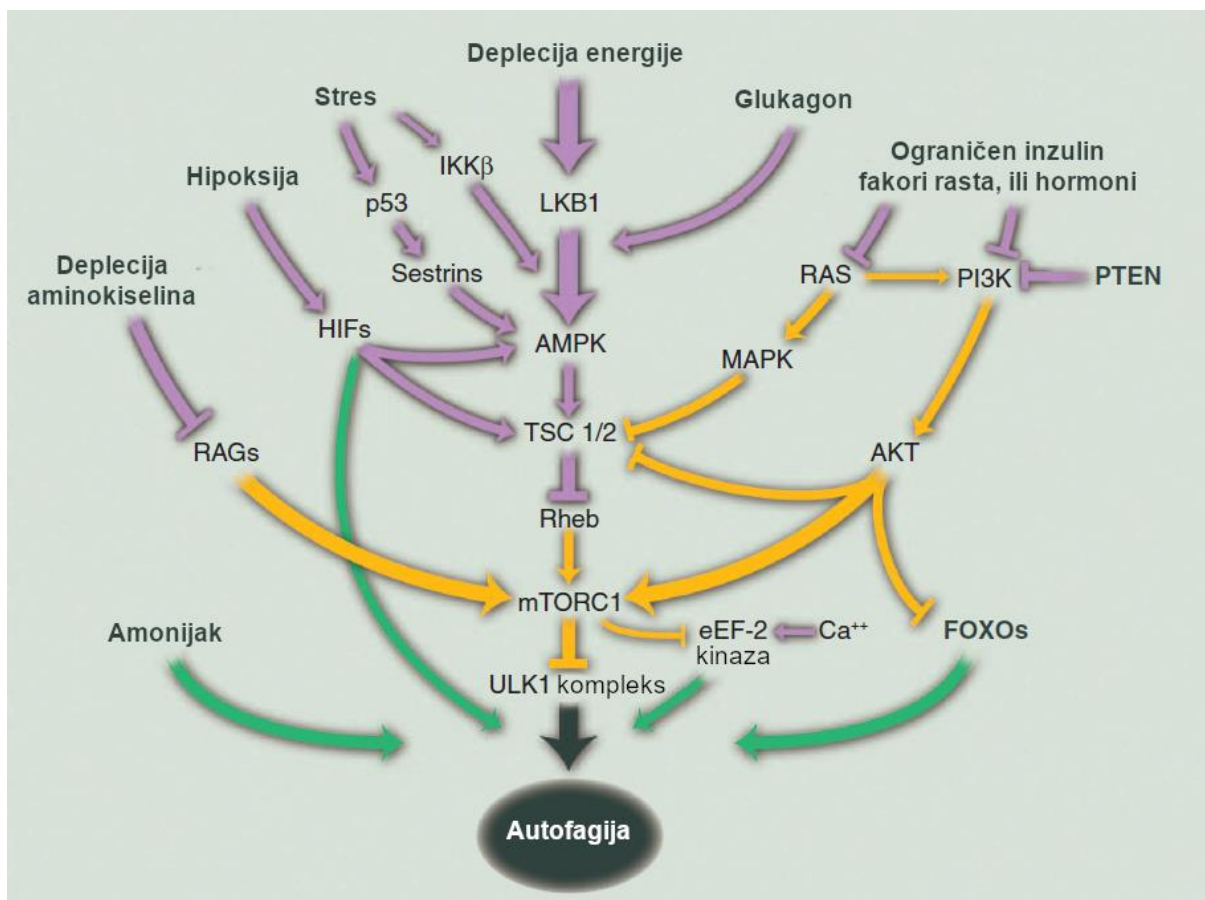


**Slika 2.** Shematski prikaz autofagije uz temeljnu molekularnu mašineriju uključenu u proces (prilagođeno prema Yang i Klionsky, 2010) (Yang i Klionsky, 2010)

U normalnim uvjetima autofagija se odvija niskom bazalnom stopom koja se znatno povećava u uvjetima stresa kao što su nutrijentna deprivacija, infekcija, hipoksija i slično. Proteini uključeni u autofagiju kodirani su skupinom gena koje nazivamo ATG (eng. *autophagy related genes*). Dosad je nađeno preko 30 ATG gena (Ktistakis i Tooze, 2016).

Autofagija je visoko reguliran proces te ovisi o dostupnosti nutrijenata, prisutnosti faktora rasta, aktivaciji hormonskih receptora, dostupnosti kisika i energetske statusu unutar stanice. Jedan od najbolje istraženih signalnih putova uključenih u regulaciju autofagije je mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*) signalni put. Većina signalnih putova uključenih u regulaciju konvergira na mTORC1 kompleks (Rabinowitz i White, 2010). U uvjetima bogatim nutrijentima mTOR kompleks 1 (mTORC1) je vezan za ULK1 kompleks te

ga inhibira fosforilacijom. Inhibicija mTOR signalnog puta u uvjetima gladovanja, pogotovo kod manjka aminokiselina, dovodi do smanjenja fosforilacije ULK-1 kompleksa te posljedično do povećanja stope autofagije (Hosokawa i sur., 2009). Uzvodno od mTOR signalnog puta nalazi se AMPK (eng. *adenosine mono-phosphate activated kinase*). Visoke koncentracije AMP-a u stanici signaliziraju manjak energije te aktiviraju AMPK koja posljedično inhibira mTOR (Rabinowitz i White, 2010). Signalni putovi koji reguliraju autofagiju prikazani su na Slici 3.



**Slika 3.** Signalni putovi uključeni u regulaciju autofagije (prilagođeno prema Rabinowitz i White, 2010) (Rabinowitz i White, 2010)

### 1.3. Uloga autofagije u raku

Autofagija ima suprotne, o kontekstu ovisne, učinke na razvoj raka. Uklanjanjem pogrešno smotanih proteina i oštećenih staničnih organela ima ulogu u supresiji razvoja tumora. U već razvijenim tumorima može imati suprotan učinak, tako što unutarstaničnim recikliranjem

može održavati metabolizam stanica raka u uvjetima gladovanja (Amaravadi i sur., 2016; White, 2012).

Uloga autofagije u sprječavanju razvoja tumora prvo je istraživana u pokusima na genetički modificiranim miševima. U tim pokusima miševima su isključeni različiti geni uključeni u autofagiju (ATG). Primijećena je povećana incidencija tumora, kao i neurodegenerativnih bolesti (Karsli-Uzunbas i sur., 2014; Takamura i sur., 2011). Premda istraživanja ukazuju da autofagija igra ulogu u supresiji razvoja tumora, mali broj istraživanja usmjeren je na farmakološku inhibiciju autofagije u svrhu prevencije raka.

Od veće kliničke važnosti su istraživanja vezana uz mogućnost inhibicije autofagije kao metode borbe protiv raka. Prva naznaka da autofagija može imati ulogu u preživljavanju tumora bilo je otkriće da je autofagija osobito pojačana u hipoksičnim regijama unutar tumora, stoga je pretpostavljeno da podržava preživljavanje tumorskih stanica (Degenhardt i sur., 2006). Velik broj istraživanja je proveden na genetskim modificiranim miševima s ciljem utvrđivanja kako inhibicija autofagije utječe na preživljavanje tumora. Miševima su genetskim modifikacijama inducirane različite vrste raka te u isto vrijeme isključeni određeni ATG-ovi. Nađeno je da za velik broj različitih vrsta tumora isključivanje gena za autofagiju dovodi do znatno smanjene proliferacije tumorskih stanica. Amaravadi i suradnici u sistemskom pregledu iz 2016. godine iznose velik broj takvih istraživanja na različitim vrstama raka (Amaravadi i sur., 2016).

Kod navedenih istraživanja autofagija je potpuno inhibirana genetskim modifikacijama, ali nije za očekivati da se to može postići farmakološkim metodama. Isto tako, zbog izrazite važnosti autofagije u normalnom funkcioniranju stanice postavlja se pitanje sigurnosti. Pretpostavka je da postoji određeni terapijski prozor u kojem bi inhibicija autofagije dovela do antitumorskog učinka bez negativnih posljedica na ostatak organizma (White, 2012). Jedna od vrsta raka kod koje je zabilježena najveća ovisnost o autofagiji jest rak uzrokovan aktivacijom RAS onkogenom. Pokusima na staničnim linijama raka gušterače nađeno je da je bazalna stopa autofagije znatno povećana te da su stanice jako podložne inhibiciji autofagije (Guo i sur., 2011; Yang i sur., 2011). Za očekivati je da će određivanjem stope autofagije biti moguće identificirati vrste raka kod kojih bi inhibicija autofagije bila od najveće koristi. Time bi se povećala klinička učinkovitost inhibitora autofagije.

Intenzivno se radi na otkrivanju potencijalnih meta za inhibiciju autofagije i razvoju malih molekula inhibitora. Dosad identificirane mete su ULK1, protein ključan za inicijaciju autofagije, PI3K klase III, odnosno Vsp3, ATG4 te lizosomalni inhibitori (Amaravadi i sur., 2016). Sintetizirane su molekule koje djeluju na te mete te su trenutno u fazi prekliničkih ispitivanja. Jedine molekule u kliničkoj fazi istraživanja su klorokin (CQ) i hidroksiklorokin koji spadaju u skupinu lizosomalnih inhibitora (Yang i sur., 2013).

#### **1.4. Antimalarici kao potencijalni citostatici**

Zbog rastućih cijena razvoja novoga lijeka, jedna od metoda kojom se farmaceutska industrija sve više služi je ispitivanje drugih farmakoloških djelovanja poznatih lijekova, odnosno prenamjena lijekova (engl. *repurposing*). Kako su ti lijekovi već na tržištu i imaju dobro poznat farmakokinetički i sigurnosni profil lako ih je uključiti u klinička ispitivanja (Aronson, 2007; Chong i Sullivan Jr, 2007). Tako se zadnjih godina intenzivno istražuje korisnost antimalarika kao potencijalnih antitumorskih lijekova. Od 20 registriranih antimalarijskih lijekova 14 je pokazalo antitumorsko djelovanje *in vitro* ili *in vivo* (Duffy i sur., 2012). Klorokin, hidroksiklorokin, kinin, artemisinin, artesunat i artemeter su već u fazi kliničkih ispitivanja (Das, 2015; Duffy i sur., 2012; Ghantous i sur., 2010; Solomon i Lee, 2009). Osim kao samostalni lijekovi, ispituje se njihovo protutumorsko djelovanje u kombinacijama s različitim citostaticima.

#### **1.5. Klorokin kao citostatik**

Klorokin i njegovi derivati posljednjih se godina intenzivno istražuju kao potencijalni antitumorski lijekovi, samostalno ili u kombinaciji s drugim citostaticima i radioterapijom. Brojne *in vitro* i *in vivo* studije demonstrirale su antitumorsku aktivnost klorokina. Utvrđeno je da klorokin u nižim koncentracijama inhibira proliferaciju, a u višim koncentracijama dovodi do smrti A549 stanica karcinoma pluća (Fan i sur., 2006). Istraživanje provedeno *in vitro* na više staničnih linija melanoma pronašlo je da je klorokin citotoksičan kao samostalni agens, te da ima sinergistički učinak s ehinomicinom, pogotovo u kada se pokus provodio u hipoksičnim uvjetima (Egger i sur., 2013). Kombinacija klorokina s 5-fluorouracilom i gemcitabinom imala je sinergistički učinak *in vitro* na PANC-1 i BxPC-3 stanice raka gušterače (Hashimoto i sur., 2014). Potvrđen je i sinergistički učinak klorokina i lidamicina *in vitro* pokusima na staničnim linijama A549 i H460 karcinoma pluća ne-malih stanica, kao i *in*

*vivo* na ksenograftima tih staničnih linija u mišu (Liu i sur., 2014). Klorokin povećava učinkovitost erlotiniba na stanice karcinoma pluća ne-malih stanica (Zou i sur., 2013). Primjena klorokina i doksorubicina smanjila je rezistenciju stanica raka dojke na doksorubicin (Vezmar i Georges, 2000). Osim u kombinaciji s raznim kemoterapeuticima, klorokin se koristi i u kombinaciji s radioterapijom (Zhao i sur., 2005).

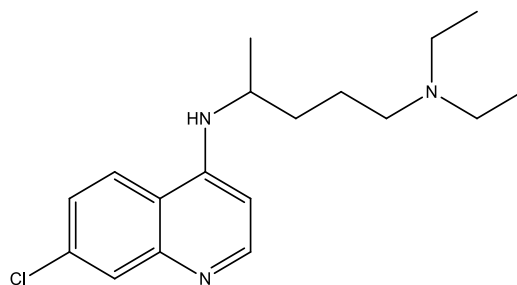
U tijeku je, ili je već proveden, i određen broj kliničkih ispitivanja. Početni rezultati su ohrabrujući. Meta-analiza koju su proveli Ran Xu i suradnici analizirala je 7 kontroliranih kliničkih studija provedenih na ukupno 293 pacijenta. Jedna studija uključivala je kombinaciju klorokina i radioterapije, dvije kombinaciju klorokina, temozolomida i radioterapije, jedna kombinaciju hidroksiklorokina i doksorubicina, dvije kombinaciju hidroksiklorokina i gemcitabina, te jedna hidroksiklorokin kao monoterapiju. Meta-analizom utvrđeno je da su terapije koje su uključivale klorokin ili hidroksiklorokin imale statistički značajno bolje ishode. Praćeni ishodi bili su šestomjesečno preživljavanje bez progresije, jednogodišnje ukupno preživljavanje te ukupna stopa odgovora (Xu i sur., 2018).

Molekularni mehanizmi anitumorske aktivnosti klorokina i hidroksiklorokina još se istražuju. Najbolje istražen učinak klorokina je inhibicija autofagije. Klorokin je slabo bazični tercijarni amin koji se nakuplja u lizosomima. Kiseli pH unutar lizosoma uzrokuje protonaciju CQ, koji tada ne može difundirati van lizosoma. Nakupljanje CQ u lizosomu inhibira njegovu normalnu funkciju tako što ometa kiselost lizosoma (Zhang i sur., 2015). Ostali mehanizmi koji se još istražuju vezani su za indukciju apoptoze stabilizacijom p53 tumor supresorskog gena (Kim i sur., 2010) te sprječavanje rezistencije na antitumorsku terapiju inhibicijom P-glikoproteina (Vezmar i Georges, 2000).

## **1.6. Klorokin**

### **1.6.1. Fizikalno-kemijske značajke klorokina**

Prema kemijskoj strukturi klorokin ubrajamo u skupinu 4-aminokinolina. Kemijsko ime po IUPAC-u glasi *N'*-(7-klorokinolin-4-il)-*N,N*-dietil-pentan-1,4-diamin, a struktura mu je prikazana na Slici 4.



**Slika 4.** Struktura klorokina

Molekulska formula klorokina je  $C_{18}H_{26}ClN_3$ , relativna molekulska masa 319,87, a topljivost u vodi 10,6 mg/L (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00608>).

### 1.6.2. Djelovanje i upotreba klorokina

Klorokin je antimalarijski lijek koji je dugi niz godina bio lijek prvog izbora za prevenciju i liječenje malarije. Široka upotreba neizbježno je dovela do razvoja rezistencije, te je glavni uzročnik malarije, *Plasmodium falciparum*, danas rezistentan na klorokin u gotovo cijelom endemskom području malarije (Skrzypek i Callaghan, 2017). Klorokin je ostao lijek izbora za liječenje i profilaksu malarije uzrokovane vrstama *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malarie*, kao i *P. falciparum* u područjima gdje nije zabilježena rezistencija. Klorokin je učinkovit krvni shizontocid, ali ne djeluje protiv hipnozoita *P. vivax* i *P. ovale* te se za radikalno liječenje infekcija tim vrstama kombinira s primakinom (Katzung i sur., 2012). Njegovo antimalarijsko djelovanje temelji se na inhibiciji polimerizacije hema u hemozoin, što dovodi do nakupljanja slobodnog hema, koji je toksičan za parazita (Hempelmann, 2007).

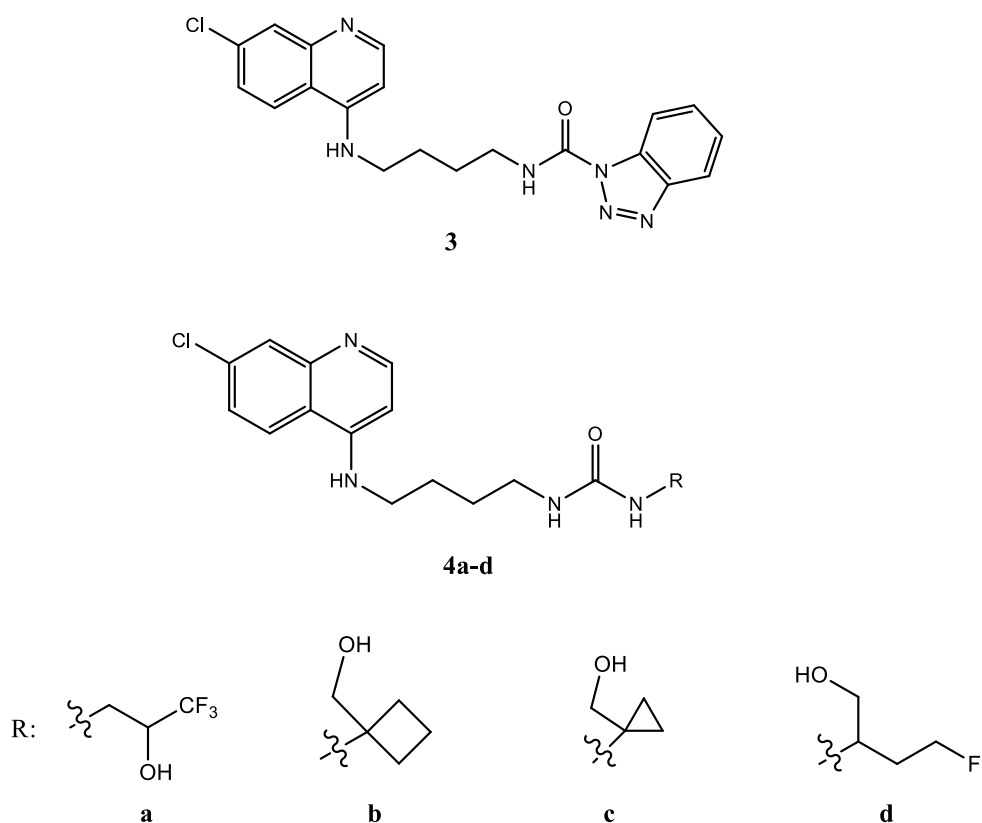
Osim za terapiju i profilaksu malarije klorokin i njegov analog hidroksiklorokin odobreni su za liječenje reumatoidnog artritisa (RA) i sistemskog eritematoznog lupusa (SLE). Zbog protuupalnog i imunomodulatornog djelovanja primjenjuju se i *off-label* za različite upalne i autoimune bolesti kao što su: Sjögrenov sindrom, kronični ulcerozni stomatitis, *porphyria cutanea tarda* (Al-Bari, 2015). Mehanizmi imunomodulatornog djelovanja klorokina nisu u potpunosti razjašnjeni, ali određeni učinci su poznati. Na već opisan način klorokin se nakuplja u lizosomima i ometa njihovu normalnu funkciju, što ima za posljedicu inhibiciju prezentacije antigena jer je razgradnja potencijalnih antigena u lizosomu ključan korak za taj proces. Uz to, inhibira otpuštanje proupalnih citokina IL2, 6 i 18 od strane T-limfocita i djeluje antagonistički na *Toll-like* receptore (TLR) (Wallace i sur., 2012).

Klorokin i hidroksiklorokin uglavnom se jako dobro podnose u terapijskim dozama. Najčešće nuspojave su pruritus, mučnina, povraćanje i abdominalni bolovi. Kod produljene primjene, kao što je to kod liječenja SLE ili RA moguće su i ozbiljnije nuspojave: retinopatija, miopatija, kardiomiopatija, hipoglikemija, ototoksičnost (Katzung i sur., 2012). Od ozbiljnijih nuspojava najčešća je retinopatija, koja može dovesti do ireverzibilnog oštećenja mrežnice i gubitka vida te je kod produljene primjene klorokina uputno periodično raditi preglede oka. Opasnost od retinopatije je znatno manja kod hidroksiklorokina, stoga se za liječenje kroničnih upalnih bolesti preferira njegova upotreba (Al-Bari, 2015; Wallace i sur., 2012).



## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Cilj ovog diplomskog rada bio je sintetizirati i okarakterizirati nove derivate klorokina. Spojevi su sintetizirani u svrhu istraživanja potencijalnog citostatskog djelovanja. Na temelju literaturnih podataka, iz kojih je očit potencijal citostatskog djelovanja derivata klorokina, i dosadašnjih istraživanja derivata drugih antimalarika provedenih na Zavodu za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, dizajnirani su i sintetizirani spojevi **3** i **4a-d** (Slika 5.).



**Slika 5.** Kemijske strukture spojeva **3** i **4a-d**

### **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 F<sub>254</sub> (Merck, Njemačka), te diklormetan/metanol (9:1 i 85:15) i cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5) kao pokretne faze. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Sigma Aldrich, SAD) i diklormetan/metanol (9:1) kao pokretna faza. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ( $\lambda = 254\text{nm}$ ) i parama joda.

Za reakcije u mikrovalnom reaktoru korišten je CEM Discover reaktor (CEM GmbH, Njemačka). IR spektri snimljeni su na Paragon FT-IR spektrometru (Perkin Elmer, UK). <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-600 (Bruker, SAD) kod 300,13, odnosno 600,13 MHz za <sup>1</sup>H i kod 75,47, odnosno 150,90 MHz za <sup>13</sup>C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO-*d*<sub>6</sub> otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama od 5 mm. Kemijski pomaci dani su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarjni standard u <sup>1</sup>H, odnosno signal dimetilsulfoksida (DMSO) u <sup>13</sup>C spektru. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadropole 6420). Kao tehnika ionizacije korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom modu. Za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava koja utječu na farmakokinetičke parametre korišteni su računalni programi Chemicalize (ChemAxon, SAD) i SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, Švicarska).

4,7-diklorkinolin, 1,4-diaminobutan, trifozgen i trietilamin (TEA) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD), a benzotriazol (BtH) 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). Natrijev ditionit je nabavljen od tvrtke Kemika (Hrvatska).

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 druge kemikalije bile su *p. a.* čistoće.

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

Klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline **1** pripremljen je prema već opisanoj reakciji (Kalčić i sur., 2003).

Smjesa 0,213 g (1,788 mmol) benzotriazola i 0,301 g (1,016 mmol) trifozgena u bezvodnom toluenu refluksirana je 3 sata na 115 °C. Otapalo je upareno, a dobiveni BtcCl (**1**) je bez čišćenja upotrijebljen u daljnjim reakcijama.

### 3.2. Sinteza *N*<sup>1</sup>-(7-klorkinolin-4-il)-1,4-diaminobutana (**2**)

Spoj **2** pripremljen je prema modificiranoj prethodno opisanoj metodi (Pérez i sur., 2013).

Smjesa 0,295 g (1,49 mmol) 4,7-diklorkinolina i 1,313 g (14,9 mmol) 1,4-diaminobutana zagrijavana je u mikrovalnom reaktoru 60 minuta na 300 W i 95 °C. Sirovi produkt otopljen u diklormetanu, ekstrahiran 4 puta 5% NaOH te ispran 2 puta destiliranom vodom. Organski sloj sušen nad bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni bijeli talog **2** upotrebljen je u kasnijim reakcijama bez daljnjeg pročišćavanja.

### 3.3. Sinteza *N*-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-karboksamida (BtcCQ, **3**)

Hladnoj otopini (0 °C) BtcCl (0,324 g, 1,788 mmol) i TEA (0,181 g, 1,788 mmol) u suhom toluenu (5 mL) dokapavan je spoj **2** (0,313g, 1,25 mmol) suspendiran u dioksanu (8 mL). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 1 h. Otapalo je otpareno pod sniženim tlakom. Dobiveni talog adsorbiran je na silikagel, a potom pročišćen kolonskom kromatografijom uz diklormetan/metanol (9:1) kao pokretnu fazu. Čiste frakcije spojene su i uparene pod sniženim tlakom. Talog je pročišćen rastrljavanjem u dietil-eteru. Dobiveni bijeli talog **3** upotrebljen je u daljnjim reakcijama.

Iskorištenje: 0,415 g (84%)

$t_f = 190\text{--}192\text{ }^\circ\text{C}$

IR (KBr):  $\nu_{\max}$  3365, 3248, 2939, 2860, 1736, 1592, 1577, 1529, 1446, 1366, 1284, 1234, 1142, 1083, 1009, 892, 822, 820, 754 cm<sup>-1</sup>.

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 9,31-9,27 (t,  $J = 5,76$ , 1H, 1), 8,39-8,37 (d,  $J = 5,45$ , 1H, 9), 8,30-8,27 (d,  $J = 9,1$ , 1H, 3'), 8,22-8,19 (d,  $J = 9,1$ , 2H, 14, 6'), 7,80-7,77 (dd,  $J = 2,22$ , 6,01, 1H, 11), 7,74-7,69 (m, 1H, 4'), 7,58-7,53 (m, 1H, 5'), 7,48-7,45 (m, 1H, 13), 7,43-7,40 (dd,  $J = 3,6$ , 8,12, 1H, 6), 6,52-6,50 (d,  $J = 5,55$ , 1H, 8), 3,53-3,43 (m, 2H, 5), 3,36-3,34 (d,  $J = 5,07$ , 2H, 2), 1,78 (s, 4H, 3,4).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 151,53 (9), 150,26 (1'), 149,02 (10), 148,69 (7), 145,45 (7'), 133,5 (12), 131,33 (2'), 129,87 (4'), 127,15 (13), 125,47 (5'), 124,15 (11), 124,06 (14), 119,74 (6'), 117,37 (15), 113,57 (3'), 98,65 (8), 42,06 (5), 39,52 (2), 26,55 (3), 25,07 (4).

ESI-MS ( $m/z$ ): 295 ( $M+1$ ) $^+$ .

### 3.4. Sinteza urea 4a-d

**Opća metoda:** Smjesa 0,158 g (0,4 mmol) BtcCQ **3**, 0,8 mmol aminoalkohola i 0,111 mL (0,8 mmol) TEA u bezvodnom diklormetanu (2 mL) grijana je 20 ili 40 min na 65 °C u mikrovalnom reaktoru uz snagu mikrovalova 300 W u prisutnosti nekoliko miligrama natrijevog ditonita. Ukoliko je aminoalkohol bio u obliku soli, dodan je još jedan ekvivalent TEA (0,8 mmol). Otapalo je uklonjeno uparavanjem pod sniženim tlakom.

#### 3.4.1. Sinteza 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil) uree (4a)

Količina aminoalkohola: 0,132 g 3-amino-1,1,1-trifluorpropan-2-ol hidroklorida.

Trajanje reakcije: 20 minuta.

Sirovi produkt otopljen je u etil-acetatu i ekstrahiran 3 puta 5% NaOH te ispran 2 puta destiliranom vodom. Organski sloj sušen je nad bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtriran, a otapalo uklonjeno uparavanjem pod sniženim tlakom. Rastrljavanjem taloga u dietil-eteru dobiven čisti produkt **4a**.

Iskorištenje: 0,113g (73%).

$t_i = 112$  °C (raspad).

IR (KBr):  $\nu_{\max}$  3332, 2938, 2870, 1612, 1582, 1452, 1370, 1325, 1274, 1166, 1118, 850, 807  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,39-8,38 (d,  $J = 5,41$ , 1H, 9), 8,29-8,26 (d,  $J = 9,1$ , 1H, 14), 7,78-7,77 (d,  $J = 2,17$ , 1H, 11), 7,45-7,42 (dd,  $J = 2,2$ , 8,98, 1H, 13), 7,34-7,31 (t,  $J = 5,15$ , 1H, 1), 6,48-6,47 (d,  $J = 5,47$ , 1H, 8), 6,45 (s, 1H, 2'), 6,15-6,12 (t,  $J = 5,59$ , 5,59, 1H, 6), 6,07-6,03 (t,  $J = 5,77$ , 5,77, 1H, 4''), 3,95 (s, 1H, 2''), 3,30-3,24 (m, 3H, 5, 1''), 3,09-2,98 (m, 3H, 2, 1''), 1,69-1,60 (m, 2H, 4), 1,53-1,46 (m, 2H, 3).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 158,2 (1'), 151,93 (9'), 150,09 (10), 149,12 (7), 133,37 (12), 130,97-119,73 (q,  $J_1 = 283,76$ , 3''), 127,49 (13), 124,12 (14), 123,99 (11), 117,47 (15), 98,66 (8), 68,84-67,71 (q,  $J_2 = 28,35$ , 2''), 42,14 (5), 40,36-38,69 (2, 1''), 27,71 (3), 25,19 (4).

ESI-MS ( $m/z$ ): 405,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

### 3.4.2. Sinteza 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(1-(hidroksimetil)ciklobutil)uree (4b)

Količina aminoalkohola: 0,081 g (1-aminociklobutil)metanola.

Trajanje reakcije: 20 minuta.

Sirovi produkt otopljen je u etil-acetatu i ekstrahiran 3 puta 5% NaOH te ispran destiliranom vodom 2 puta. Organski sloj sušen je nad bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtriran, a otapalo uklonjeno uparavanjem pod sniženim tlakom. Čisti produkt **4b** dobiven je rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje: 0,082 g (54%).

$t_f = 160$  °C (raspad).

IR (KBr):  $\nu_{\max}$  3353, 2940, 2850, 1659, 1585, 1548, 1372, 1333, 1281, 1136, 1040, 855, 802  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,40-8,38 (d,  $J = 5,37$ , 1H, 9), 8,30-8,27 (d,  $J = 9,04$ , 1H, 14), 7,78-7,77 (d,  $J = 2,15$ , 1H, 11), 7,45-7,42 (dd,  $J = 2,18$ , 8,96, 1H, 13), 7,36-7,32 (t,  $J = 4,96$ , 1H, 1), 6,49-6,47 (d,  $J = 5,49$ , 1H, 8), 5,93 (m, 2H, 6, 2''), 5,03 (s, 1H, 6''), 3,45 (s, 2H,

5"), 3,31-3,26 (m, 2H, 5) 3,06-2,99 (dd,  $J = 6,44, 12,41$ , 2H, 2), 2,14-2,07, 1,99-1,94, 1,76-1,73 (3m, 6H, 2", 3", 4" ), 1,67-1,63 (m, 2H, 4), 1,50-1,45 (m, 2H, 3).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 157,80 (1'), 151,92 (9), 150,07 (10), 149,12 (7), 133,30 (12), 127,48 (13), 124,11 (14), 123,95 (11), 117,46 (15), 98,65 (8), 66,13 (5"), 56,64 (1") 42,17 (5), 38,65 (2), 29,55 (2", 4") 27,77 (3), 25,21 (4), 13,95 (3").

ESI-MS ( $m/z$ ): 377,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

### 3.4.3. Sinteza 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(1-(hidroksimetil)ciklopropil)uree (4c)

Količina aminoalkohola: 0,099 g (1-aminociklopropil)metanol hidroklorida.

Trajanje reakcije: 20 minuta.

Sirovi produkt otopljen je u etil-acetatu, ekstrahiran 3 puta 5% NaOH i ispran 2 puta destiliranom vodom. Organski sloj sušen je nad bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtriran, a otapalo uklonjeno uparavanjem pod sniženim tlakom. Čisti produkt **4c** dobiven je rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje: 0,113 g (78%),

$t_f = 165$  °C (raspad).

IR (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  3358, 2936, 2858, 1648, 1591, 1572, 1454, 1431, 1376, 1326, 1272, 1138, 1040, 902, 870, 853, 798  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,39-8,37 (d,  $J = 5,42$ , 1H, 9), 8,31-8,28 (d,  $J = 9,05$ , 1H, 14), 7,77-7,76 (d,  $J = 2,21$ , 1H, 11), 7,45-7,41 (dd,  $J = 2,25, 8,99$ , 1H, 13), 7,38-7,33 (t,  $J = 5,04$ , 1H, 1), 6,48-6,46 (d,  $J = 5,48$ , 1H, 8), 6,41 (s, 1H, 2') 6,12 (bs, 1H, 6) 4,95 (s, 1H, 5"), 3,28-3,23 (m, 4H, 5, 4") 3,07-3,00 (dd,  $J = 6,54, 12,51$ , 2H, 2), 2,14-2,07, 1,99-1,94, 1,76-1,73 (3m, 6H, 2", 3", 4" ), 1,67-1,62 (m, 2H, 4), 1,53-1,46 (m, 2H, 3), 0,65-0,59 (m, 2H, 2"), 0,57-0,51 (m, 2H, 3").



$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 158,84 (1'), 151,92 (9), 150,08 (10), 149,12 (7), 133,31 (12), 127,47 (13), 124,15 (14), 123,95 (11), 117,47 (15), 98,64 (8), 66,19 (4''), 42,17 (5), 38,86 (2), 34,29 (1''), 27,69 (3), 25,15 (4), 11,62 (2'', 3'').

ESI-MS ( $m/z$ ): 363,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

#### 3.4.4. Sinteza 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(4-fluor-1-hidroksibutan-2-il)uree (4d)

Količina aminoalkohola: 0,086 g 2-amino-4-fluorbutan-1-ola.

Trajanje reakcije: 40 minuta.

Reakcijska smjesa je uparena, dobiveni bijeli talog rastrljan u destiliranoj vodi. Rastrljavanjem u dietil-eteru dobiven je čisti produkt **4d**.

Iskorištenje: 0,113 g (80%).

$t_f = 176\text{--}181$  °C.

IR (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  3319, 2937, 2864, 1626, 1582, 1428, 1371, 1284, 1254, 1234, 1135, 1070, 1044, 954, 853, 807  $\text{cm}^{-1}$ .

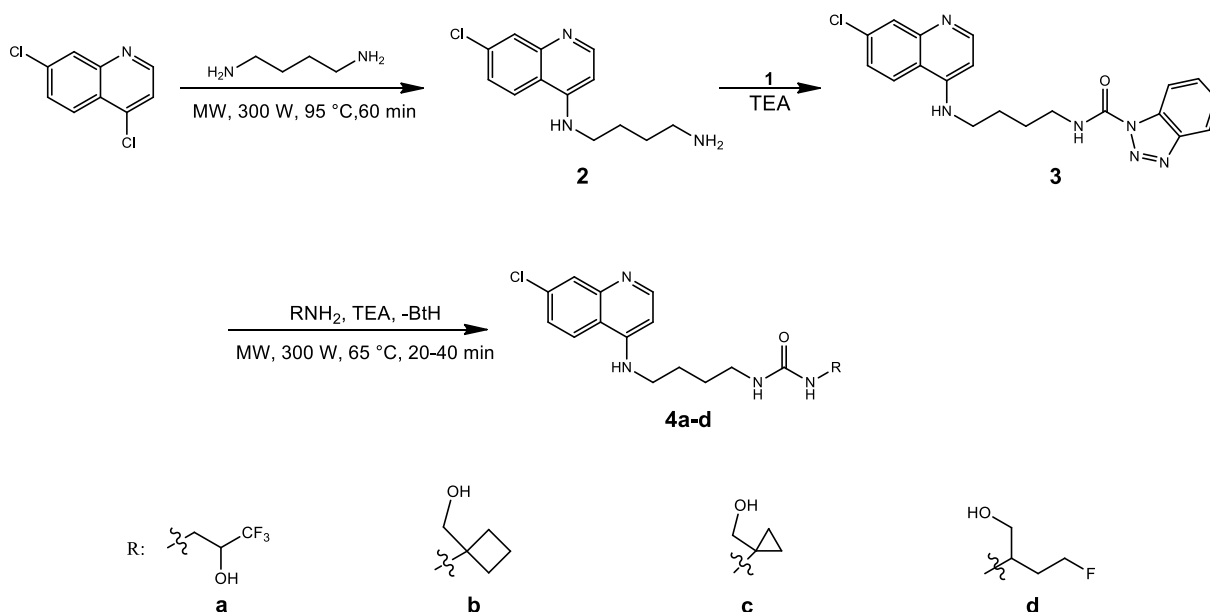
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,40-8,38 (d,  $J = 5,40$ , 1H, 9), 8,30-8,27 (d,  $J = 9,06$ , 1H, 14), 7,78-7,74 (d,  $J = 2,15$ , 1H, 11), 7,46-7,42 (dd,  $J = 2,17$ , 8,97, 1H, 13), 7,36-7,32 (t,  $J = 5,11$ , 1H, 1), 6,48-6,46 (d,  $J = 5,48$ , 1H, 8), 5,94-5,90 (t,  $J = 5,57$  1H, 6), 5,75-5,72 (d,  $J = 8,49$  1H, 2'), 4,77 (s, 1H, 5''), 4,56-4,36 (dt,  $J = 6,25$ , 47,48, 2H, 3'') 3,70-3,62 (td,  $J = 4,34$ , 8,62, 1H, 1''), 3,08-3,02 (dd,  $J = 6,50$ , 12,58, 2H, 2), 1,97-1,84 (m, 1H, 2''), 1,72-1,59 (m, 2H, 4), 1,53-1,44 (m, 2H, 3).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 157,92 (1'), 151,90 (9), 150,08 (10), 149,10 (7), 133,34 (12), 127,47 (13), 124,12 (14), 123,97 (11), 117,46 (15), 98,64 (8), 82,65-80,51 (d,  $J_1 = 161,31$ , 4''), 63,67 (4'), 47,64-47,57 (d,  $J_2 = 5,23$ , 1''), 42,17 (5), 38,96 (2), 32,72-32,47 (d,  $J_3 = 19,13$ , 2''), 27,79 (3), 25,18 (4),

ESI-MS ( $m/z$ ): 383,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

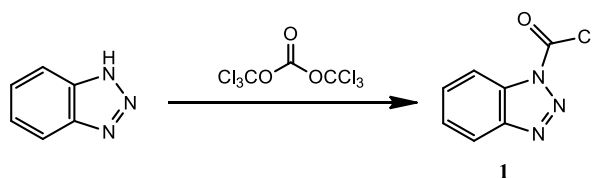
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu sintetizirani su novi strukturni analozi klorokina, spojevi **3** i **4a-d**, koji prethodno nisu bili opisani u literaturi. Sinteza je provedena prema Shemi 1.



**Shema 1.** Sinteza urea **4a-d**

U prvom koraku sinteze 4,7-diklorokinolin u reakciji s 1,4-diaminobutanom daje *N*<sup>1</sup>-(7-klorkinolin-4-il)-1,4-diaminobutan (**2**) (Pérez i sur., 2013) koji u drugom koraku reagira s kloridom 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl, **1**) i daje benzotriazolid derivata klorokina (BtcCQ, **3**). BtcCl je spoj koji je iznimno koristan u organskoj sintezi jer reagirajući s nukleofilima daje reaktivne spojeve iz kojih se mogu pripraviti različiti organski spojevi (Butula i Zorc, 2007). Pripremljen je *ex tempore* reakcijom benzotriazola (BtH) i trifozgena prema Shemi 2 (Kalčić i sur., 2003).



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

U posljednjem koraku reakcijom između BtcCQ i odgovarajućih aminoalkohola dobivene se uree **4a-d**. Reakcije su u pravilu bile dobrog iskorištenja (73-80%), izuzev reakcije s (1-aminociklobutil)metanolom koja se odvijala s iskorištenjem od 54%.

Za pripravu urea korišteni su sljedeći aminoalkoholi: 3-amino-1,1,1-trifluorpropan-2-ol, (1-aminociklopropil)metanol, (1-aminociklobutil)metanol, 2-amino-4fluorbutan-1-ol te su sintetizirane sljedeće uree:

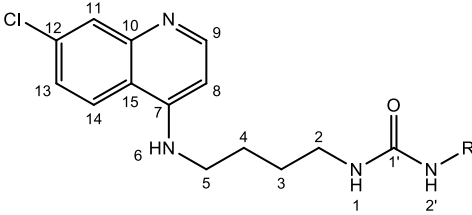
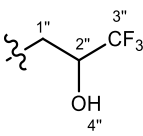
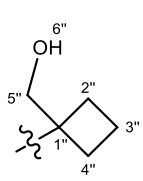
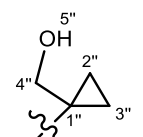
- 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil)urea (**4a**)
- 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(1-(hidroksimetil)ciklobutil)urea (**4b**)
- 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(1-(hidroksimetil)ciklopropil)urea (**4c**)
- 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(4-fluor-1-hidroksibutan-2-il)urea (**4d**).

Strukture svih novih spojeva potvrđene su korištenjem MS-a te odgovarajućih spektroskopskih metoda (IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR). Novim spojevima su također određena tališta. Analitički i spektroskopski podaci prikazani su u Tablicama 1 i 2 dok se spektri nalaze u Prilogu.

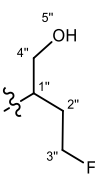
**Tablica 1.** Analitički i spektroskopski podaci spoja **3** i urea **4a-d**.

Spoj	$t_f$ (°C)	Molekulska formula	$M_r$	MS ( $m/z$ )	IR (KBr) $\nu_{\max}$ (cm <sup>-1</sup> )
<b>3</b>	190–192	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>6</sub> O	394,86	395,0 (M+1) <sup>+</sup>	3365, 3248, 2939, 2860, 1736, 1592, 1577, 1529, 1446, 1366, 1284, 1234, 1142, 1083, 1009, 892, 822, 820, 754
<b>4a</b>	112 (raspad)	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	404,81	405,1 (M+1) <sup>+</sup>	3332, 2938, 2870, 1612, 1582, 1452, 1370, 1325, 1274, 1166, 1118, 850, 807
<b>4b</b>	160 (raspad)	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	376,88	377,1 (M+1) <sup>+</sup>	3353, 2940, 2850, 1659, 1585, 1548, 1372, 1333, 1281, 1136, 1040, 855, 802
<b>4c</b>	165 (raspad)	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	362,85	363,1 (M+1) <sup>+</sup>	3358, 2936, 2858, 1648, 1591, 1572, 1454, 1431, 1376, 1326, 1272, 1138, 1040, 902, 870, 853, 798
<b>4d</b>	176-181	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> ClFN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	382,86	383,1 (M+1) <sup>+</sup>	3319, 2937, 2864, 1626, 1582, 1428, 1371, 1284, 1254, 1234, 1135, 1070, 1044, 954, 853, 807

**Tablica 2.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopski podaci za spojeve **3** i **4a-d**

Spoj	R	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ / ppm)	$^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ / ppm)
<b>3</b>		9,31-9,27 (t, $J = 5,76$ , 1H, 1), 8,39-8,37 (d, $J = 5,45$ , 1H, 9), 8,30-8,27 (d, $J = 9,1$ , 1H, 3'), 8,22-8,19 (d, $J = 9,1$ , 2H, 14, 6'), 7,80-7,77 (dd, $J = 2,22$ , 6,01, 1H, 11), 7,74-7,69 (m, 1H, 4'), 7,58-7,53 (m, 1H, 5'), 7,48-7,45 (m, 1H, 13), 7,43-7,40 (dd, $J = 3,6$ , 8,12, 1H, 6), 6,52-6,50 (d, $J = 5,55$ , 1H, 8), 3,53-3,43 (m, 2H, 5), 3,36-3,34 (d, $J = 5,07$ , 2H, 2), 1,78 (s, 4H, 3,4)	151,53 (9), 150,26 (1'), 149,02 (10), 148,69 (7), 145,45 (7'), 133,5 (12), 131,33 (2'), 129,87 (4'), 127,15 (13), 125,47 (5'), 124,15 (11), 124,06 (14), 119,74 (6'), 117,37 (15), 113,57 (3'), 98,65 (8), 42,06 (5), 39,52 (2), 26,55 (3), 25,07 (4)
<b>4a</b>		8,39-8,38 (d, $J = 5,41$ , 1H, 9), 8,29-8,26 (d, $J = 9,1$ , 1H, 14), 7,78-7,77 (d, $J = 2,17$ , 1H, 11), 7,45-7,42 (dd, $J = 2,2$ , 8,98, 1H, 13), 7,34-7,31 (t, $J = 5,15$ , 1H, 1), 6,48-6,47 (d, $J = 5,47$ , 1H, 8), 6,45 (s, 1H, 2'), 6,15-6,12 (t, $J = 5,59$ , 5,59, 1H, 6), 6,07-6,03 (t, $J = 5,77$ , 5,77, 1H, 4''), 3,95 (s, 1H, 2''), 3,30-3,24 (m, 3H, 5, 1''), 3,09-2,98 (m, 3H, 2, 1''), 1,69-1,60 (m, 2H, 4), 1,53-1,46 (m, 2H, 3)	158,84 (1'), 151,92 (9), 150,08 (10), 149,12 (7), 133,31 (12), 127,47 (13), 124,15 (14), 123,95 (11), 117,47 (15), 98,64 (8), 66,19 (4''), 42,17 (5), 38,86 (2), 34,29 (1''), 27,69 (3), 25,15 (4), 11,62 (2'', 3'')
<b>4b</b>		8,40-8,38 (d, $J = 5,37$ , 1H, 9), 8,30-8,27 (d, $J = 9,04$ , 1H, 14), 7,78-7,77 (d, $J = 2,15$ , 1H, 11), 7,45-7,42 (dd, $J = 2,18$ , 8,96, 1H, 13), 7,36-7,32 (t, $J = 4,96$ , 1H, 1), 6,49-6,47 (d, $J = 5,49$ , 1H, 8), 5,93 (m, 2H, 6, 2''), 5,03 (s, 1H, 6''), 3,45 (s, 2H, 5''), 3,31-3,26 (m, 2H, 5) 3,06-2,99 (dd, $J = 6,44$ , 12,41, 2H, 2), 2,14-2,07, 1,99-1,94, 1,76-1,73 (3m, 6H, 2'', 3'', 4''), 1,67-1,63 (m, 2H, 4), 1,50-1,45 (m, 2H, 3)	157,80 (1'), 151,92 (9), 150,07 (10), 149,12 (7), 133,30 (12), 127,48 (13), 124,11 (14), 123,95 (11), 117,46 (15), 98,65 (8), 66,13 (5''), 56,64 (1'') 42,17 (5), 38,65 (2), 29,55 (2'', 4'') 27,77 (3), 25,21 (4), 13,95 (3'')
<b>4c</b>		8,39-8,37 (d, $J = 5,42$ , 1H, 9), 8,31-8,28 (d, $J = 9,05$ , 1H, 14), 7,77-7,76 (d, $J = 2,21$ , 1H, 11), 7,45-7,41 (dd, $J = 2,25$ , 8,99, 1H, 13), 7,38-7,33 (t, $J = 5,04$ , 1H, 1), 6,48-6,46 (d, $J = 5,48$ , 1H, 8), 6,41 (s, 1H, 2') 6,12 (bs, 1H, 6) 4,95 (s, 1H, 5''), 3,28-3,23 (m, 4H, 5, 4'') 3,07-3,00 (dd, $J = 6,54$ , 12,51, 2H, 2), 2,14-2,07, 1,99-1,94, 1,76-1,73 (3m, 6H, 2'', 3'', 4''), 1,67-1,62 (m, 2H, 4), 1,53-1,46 (m, 2H, 3), 0,65-0,59 (m, 2H, 2''), 0,57-0,51 (m, 2H, 3'')	158,84 (1'), 151,92 (9), 150,08 (10), 149,12 (7), 133,31 (12), 127,47 (13), 124,15 (14), 123,95 (11), 117,47 (15), 98,64 (8), 66,19 (4''), 42,17 (5), 38,86 (2), 34,29 (1''), 27,69 (3), 25,15 (4), 11,62 (2'', 3'')

nastavlja se

Spoj	R	<sup>1</sup> H NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ / ppm)	<sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ / ppm)
<b>4d</b>		8,40-8,38 (d, <i>J</i> = 5,40, 1H, 9), 8,30-8,27 (d, <i>J</i> = 9,06, 1H, 14), 7,78-7,74 (d, <i>J</i> = 2,15, 1H, 11), 7,46-7,42 (dd, <i>J</i> = 2,17, 8,97, 1H, 13), 7,36-7,32 (t, <i>J</i> = 5,11, 1H, 1), 6,48-6,46 (d, <i>J</i> = 5,48, 1H, 8), 5,94-5,90 (t, <i>J</i> = 5,57 1H, 6), 5,75-5,72 (d, <i>J</i> = 8,49 1H, 2'), 4,77 (s, 1H, 5''), 4,56-4,36 (dt, <i>J</i> = 6,25, 47,48, 2H, 3'') 3,70-3,62 (td, <i>J</i> = 4,34, 8,62, 1H, 1''), 3,08-3,02 (dd, <i>J</i> = 6,50, 12,58, 2H, 2), 1,97-1,84 (m, 1H, 2''), 1,72-1,59 (m, 2H, 4), 1,53-1,44 (m, 2H, 3)	157,92 (1'), 151,90 (9), 150,08 (10), 149,10 (7), 133,34 (12), 127,47 (13), 124,12 (14), 123,97 (11), 117,46 (15), 98,64 (8), 82,65-80,51 (d, <i>J</i> <sub>1</sub> = 161,31, 4''), 63,67 (4''), 47,64-47,57 (d, <i>J</i> <sub>2</sub> = 5,23, 1''), 42,17 (5), 38,96 (2), 32,72-32,47 (d, <i>J</i> <sub>3</sub> = 19,13, 2''), 27,79 (3), 25,18 (4)

Osim povoljnog farmakološkog djelovanja, klinički koristan lijek mora imati i zadovoljavajući farmakokinetički profil. Zbog toga su razvijeni različiti modeli za procjenu tzv. svojstava sličnih lijeku (eng. „*drug-likeness*“). Lipinski i suradnici su, analizirajući svojstva lijekova koji su dospjeli u fazu 2 kliničkih ispitivanja, donijeli tzv. Lipinskijevo pravilo pet (eng. *Lipinski rule of five*) (Lipinski, 2004, 2000; Lipinski i sur., 1997). Uz pravilo pet, koje je možda najpoznatije, postoji još cijeli niz različitih metoda za procjenu *drug-like* svojstava. Veber i suradnici 2002. predložili su pravila koja uzimaju u obzir fleksibilnost i polarnost molekule (Veber i sur., 2002), dok su Luzina i Popov predložili Gelovanijeva pravila (Luzina i Popov, 2012). Sva navedena pravila pokušavaju predvidjeti oralnu bioraspoloživost molekule na temelju njene strukture i fizikalno-kemijskih svojstava.

Lipinskijeva pravila zahtijevaju da molekula ima  $M_r \leq 500$ ,  $\log P \leq 5$ , broj donora vodikove veze  $\leq 5$ , broj akceptora vodikove veze  $\leq 10$  (Lipinski, 2004, 2000; Lipinski i sur., 1997). Gelovanijeva pravila zahtijevaju da topološka polarna površina (TPSA) bude manja od 140 Å<sup>2</sup>, moralna refraktivnost (MR) između 40 i 130 cm<sup>3</sup>/mol te broj atoma u molekuli od 20 do 70 (Luzina i Popov, 2012). Veberova pravila pak traže da molekula ima 10 ili manje veza koje mogu slobodno rotirati, manje od 12 donora i akceptora vodikove veze te polarnu površinu manju od 140 Å<sup>2</sup> (Veber i sur., 2002).

Spojevi **3** i **4a-d** u potpunosti zadovoljavaju Lipinskijeva, Gelovanijeva i Veberova pravila. Parametri za procjenu pridržavanja Lipinskijevim pravilima dani su u Tablici 3, a za Gelovanijeva i Veberova pravila u Tablici 4. Svi parametri izračunati su pomoću programa

Chemicalize (<https://chemicalize.com/>), osim log *P*, koji je izračunat putem programa *SwissAdme* (<http://www.swissadme.ch/>).

**Tablica 3.** Parametri za procjenu pridržavanja Lipinskijevih pravilima za spojeve **3** i **4a-d**

Spoj	Molekulska formula	<i>M<sub>r</sub></i>	log <i>P</i> <sup>a</sup>	Donori H-veze	Akceptori H-veze	Lipinski <sup>b</sup>
<b>3</b>	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>6</sub> O	394,86	3,56	2	5	4
<b>4a</b>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	404,81	3,03	4	4	4
<b>4b</b>	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	376,88	2,82	4	4	4
<b>4c</b>	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	362,85	2,35	4	4	4
<b>4d</b>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> ClFN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	382,86	2,78	4	4	4

<sup>a</sup> Srednja vrijednost log *P*<sub>o/w</sub> izračunatih programom *SwissAdme*; <sup>b</sup> broj parametara (od 4) koji odgovaraju Lipinskijevim parametrima

**Tablica 4.** Parametri za procjenu pridržavanja Gelovanijevih i Veberovih pravilima za spojeve **3** i **4a-d**

Spoj	Molekulska formula	Broj atoma	MR <sup>a</sup> (cm <sup>3</sup> /mol)	TPSA <sup>b</sup> (Å <sup>2</sup> )	Broj donora i akceptora H-veze	Broj rotirajućih veza	Gelovani <sup>c</sup>	Veber <sup>d</sup>
<b>3</b>	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>6</sub> O	47	109,42	84,73	7	6	+	+
<b>4a</b>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	47	96,87	86,28	8	9	+	+
<b>4b</b>	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	51	103,45	86,28	7	8	+	+
<b>4c</b>	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	48	98,85	86,28	7	8	+	+
<b>4d</b>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> ClFN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	50	100,88	86,28	8	10	+	+

<sup>a</sup> MR – molekularna refraktivnost; <sup>b</sup> TPSA – topološka polarna površina; <sup>c</sup> slaganje s Gelovanijevih pravilima; <sup>d</sup> slaganje s Veberovih pravilima

*Bioavailability radar* je alat programa *SwissAdme* (<http://www.swissadme.ch/>) koji se koristi za procjenu oralne bioraspodivnosti molekule. Uzima u obzir 6 parametara: lipofilnost, veličinu, polarnost, netopljivost, nezasićenost i fleksibilnost molekule. Uvjeti za vrijednosti parametara su sljedeći :

- lipofilnost, izražena kao XLOGP3, mora biti između -0,7 i +5,0
- veličina, izražena kao molekulska masa, mora biti između 150 i 500
- polarnost, izražena ka TPSA, mora biti između 20Å<sup>2</sup> i 140 Å<sup>2</sup>



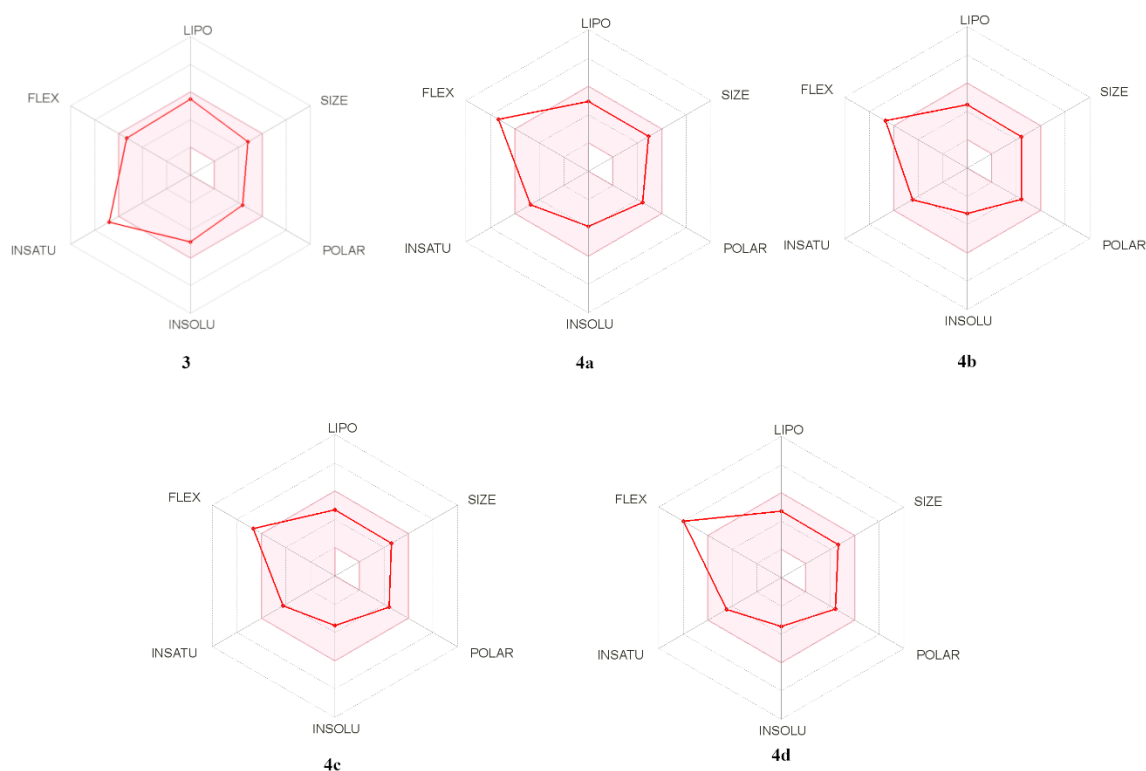
- netopljivost, izražena kao LogS (ESOL), mora biti između 0 i 6
- nezasićenost, izražena kao udio *sp*<sup>3</sup> hibridiziranih atoma, mora biti između 0,25 i 1
- fleksibilnost, izražena kao broj veza koje mogu rotirati, mora biti između 0 i 9.

Vrijednosti parametara za uree **4a-d** dane su u Tablici 5, a grafički prikaz dan je na Slici 6.

**Tablica 5.** Vrijednosti parametara za *Bioavailability radar* za spojeve **3** i **4a-d** izračunati alatom *SwissAdme* (<http://www.swissadme.ch/>)

Spoj	XLOGP <sup>a</sup>	<i>M<sub>r</sub></i>	TPSA	log <i>S</i> <sup>b</sup>	FCsp3 <sup>c</sup>	Broj rotirajućih veza
<b>3</b>	4,11	394,86	84,73	-4,85	0,20	8
<b>4a</b>	3,15	404,81	86,28	-3,88	0,41	11
<b>4b</b>	2,70	376,88	86,28	-3,50	0,47	10
<b>4c</b>	2,35	362,85	86,28	-3,21	0,44	10
<b>4d</b>	2,74	382,86	86,28	-3,43	0,44	12

<sup>a</sup> XLOGP3 – log *P* izračunat računalnim programom XLOGP (verzija 3.2.2); <sup>b</sup> log *S* – logaritam topljivosti u vodi izračunat računalno ESOL metodom; <sup>c</sup> FCsp3 – udio *sp*<sup>3</sup> hibridiziranih C atoma u molekuli



**Slika 6.** Grafički prikaz *Bioavailability Radar* alata za spojeve **3** i **4a-d**

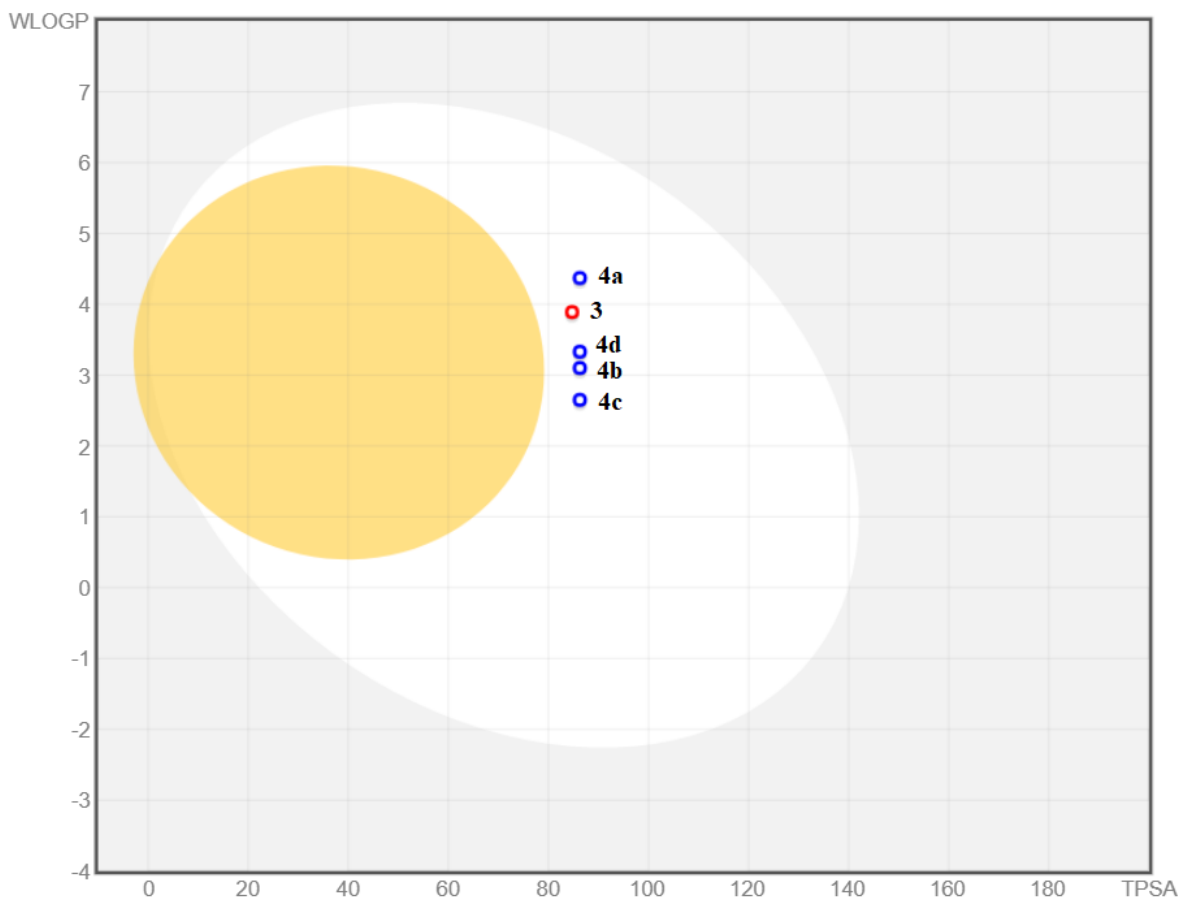
Za procjenu farmakokinetike, uz oralnu bioraspoloživost, sve se više važnosti pridaje predviđanju metabolizma lijeka. Tako postoje modeli koji na temelju strukture predviđaju potencijalnu inhibiciju različitih CYP enzima, je li neka molekula supstrat P-glikoproteina te prelazi li krvno-moždanu barijeru. Računalnim programom *SwissAdme* napravljeno je predviđanje farmakokinetike sintetiziranih spojeva. Podaci za spojeve **3** i **4a-d** dani su u Tablici 6.

**Tablica 6.** Farmakokinetička predviđanja za spojeve **3** i **4a-d** dobivena računalnim programom *SwissAdme* (<http://www.swissadme.ch/>)

Spoj	GI <sup>a</sup>	KMB prolazak	P-gp <sup>b</sup>	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor	log $K_p$ (cm/S) <sup>c</sup>
<b>3</b>	visoka	-	-	+	+	+	+	+	-5,79
<b>4a</b>	visoka	-	+	-	+	-	-	+	-6,53
<b>4b</b>	visoka	-	+	-	+	-	+	+	-6,68
<b>4c</b>	visoka	-	+	-	+	-	+	+	-6,84
<b>4d</b>	visoka	-	+	-	+	-	+	+	-6,69

<sup>a</sup> GI – apsorpcija u gastrointestinalnom traktu na temelju *Boiled Egg* dijagrama; <sup>b</sup> P-gp – P-glikoprotein; <sup>c</sup> log  $K_p$  – mjera permeabilnosti kroz kožu izračunata prema QSPR modelu

Alatom *SwissAdme* također je kreiran tzv. *Boiled-Egg* dijagram. To je graf koji uzima u obzir TPSA i WLOGP te je podijeljen u tri zone. Zona označena žutom bojom, „žumanjak jajeta“, označava molekule koje pasivno prelaze krvno moždanu barijeru. Bijela zona, „bjelanjak“, označava lijekove koji se pasivno apsorbiraju u probavnom traktu. Molekule označene plavim krugom su supstrati P-glikoproteina, dok molekule označen crvenim krugom nisu supstrati P-glikoproteina (Daina i Zoete, 2016). *Boiled-Egg* dijagram za spojeve **3** i **4a-d** prikazan je na Slici 7.



**Slika 7.** *Boiled-Egg* dijagram za spojeve **3** i **4a-d** kreiran alatom *SwissAdme* (Daina i Zoete, 2016)

Analizom spojeva **3** i **4a-d** pomoću navedenih modela vidimo da se u potpunosti slažu s Lipinskijevim, Gelovanijevim i Veberovim pravilima. Iz tog razloga možemo očekivati dobru oralnu bioraspoloživost. Analizom *Bioavailability Radar* alatom se može ustanoviti da bi oralna bioraspoloživost mogla biti nešto lošija zbog prevelike fleksibilnosti molekule. To sugerira da bi se ukrućivanje strukture moglo pokazati korisnim u daljnjem optimiranju molekula. Na temelju predviđanja farmakokinetike računalnim programom *SwissAdme* možemo zaključiti da su uree **4a-d** potencijalni supstrati P-glikoproteina. Spoj **4a** je potencijalni inhibitor enzima CYP2C19 i CYP3A4, a uree **4b-d** su potencijalni inhibitori enzima CYP2C19, CYP 2C9 te CYP3A4, dok je spoj **3** potencijalni inhibitor svih testiranih enzima. Iz *BoiledEgg* dijagrama možemo iščitati da molekule ne prelaze KMB i da je očekivana GI apsorpcija visoka.

## **5. ZAKLJUČCI**

U ovom radu opisana je sinteza novih urea klorokina s aminoalkoholima. Sintetizirani su sljedeći spojevi:

- *N*-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-karboksamid (**3**)
- 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(3,3,3-trifluor-2-hidroksipropil)urea (**4a**)
- 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(1-(hidroksimetil)ciklobutil)urea (**4b**)
- 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(1-(hidroksimetil)ciklopropil)urea (**4c**)
- 1-(4-((7-klorkinolin-4-il)amino)butil)-3-(4-fluor-1-hidroksibutan-2-il)urea (**4d**)

Struktura novih spojeva potvrđena je standardnim analitičkim metodama (IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS), te su im određena tališta. Svi novosintetizirani spojevi zadovoljavaju Lipinskijeva, Gelovanijeva i Veberova pravila za male molekule lijekova te stoga predstavljaju dobre kandidate za nove lijekove. Pomoću alata *SwissAdme* napravljena su računalna predviđanja farmakokinetike. Za sve spojeve se očekuje dobra oralna bioraspodjivost. Uree **4a-d** su potencijalni supstrati P-glikoproteina. Niti jedan novosintetizirani spoj ne prelazi KMB. U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovoga diplomskog rada, bit će ispitano njihovo citostatsko djelovanje.

## **6. LITERATURA**

Al-Bari MAA. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70, 1608–21.

Amaravadi R, Kimmelman AC, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev*, 2016, 30, 1913–1930.

Aronson JK. Old drugs--new uses. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 64, 563–5.

Butula I, Zorc B. Čudesna molekula benzotriazol. *Kem Ind*, 2007, 56, 123–134.

Chemicalize, 2018., <https://chemicalize.com/>, pristupljeno 22. 10. 2018.

Chong CR, Sullivan Jr DJ. New uses for old drugs. *Nature*, 2007, 448, 645.

Čorić T, Erceg M, Miler Knežević A, Čukelj P. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2017. godini. Zagreb, 2018,

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

Das AK. Anticancer Effect of AntiMalarial Artemisinin Compounds. *Ann Med Health Sci Res*, 2015, 5, 93–102.

Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 2006, 10, 51–64.

Drug bank, 2018., <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00608>, pristupljeno 19. 11. 2018.

Duffy R, Wade C, Chang R. Discovery of anticancer drugs from antimalarial natural products: a MEDLINE literature review. *Drug Discov Today*, 2012, 17, 942–953.

Egger ME, Huang JS, Yin W, McMasters KM, McNally LR. Inhibition of autophagy with chloroquine is effective in melanoma. *J Surg Res*, 2013, 184, 274–281.

Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell

death in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14, 3218–3222.

Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov Today*, 2010, 15, 668–678.

Guo JY, Chen H-Y, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JMS, Karantza V, Collier HA, DiPaola RS, Gelinas C, Rabinowitz JD, White E. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev*, 2011, 25, 460–470.

Hashimoto D, Bläuer M, Hirota M, Ikonen NH, Sand J, Laukkarinen J. Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. *Eur J Cancer*, 2014, 50, 1382–1390.

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

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan J-L, Oshiro N, Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell*, 2009, 20, 1981–1991.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Zagreb, 2018,

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

Karsli-Uzunbas G, Guo JY, Price S, Teng X, Laddha S V., Khor S, Kalaany NY, Jacks T, Chan CS, Rabinowitz JD, White E. Autophagy Is Required for Glucose Homeostasis and Lung Tumor Maintenance. *Cancer Discov*, 2014, 4, 914–927.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic & Clinical Pharmacology. New York, McGraw-Hill Medical, 2012, str. 915-920.

Kim EL, Wüstenberg R, Rübsam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bücken E-M, Pettkus N, Speidel D, Rohde V, Schulz-Schaeffer W, Deppert W, Giese A. Chloroquine activates the



p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro Oncol*, 2010, 12, 389–400.

Ktistakis NT, Tooze SA. Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends Cell Biol*, 2016, 26, 624–635.

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

Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2000, 44, 235–49.

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

Liu F, Shang Y, Chen S. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of lidamycin on non-small cell lung cancer cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35, 645–52.

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

Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36, 2420–2434.

Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 2011, 7, 673–82.

Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20, 460–473.

Pérez BC, Teixeira C, Albuquerque IS, Gut J, Rosenthal PJ, Gomes JRB, Prudêncio M, Gomes P. N-Cinnamoylated Chloroquine Analogues as Dual-Stage Antimalarial Leads. *J Med Chem*, 2013, 56, 556–567.

Rabinowitz JD, White E. Autophagy and Metabolism. *Science (80- )*, 2010, 330, 1344–1348.

Skrzypek R, Callaghan R. The “pushmi-pullyu” of resistance to chloroquine in malaria. *Essays Biochem*, 2017, 61, 167–175.

Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625, 220–233.

SwissAdme, 2018., <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 22. 10. 2018.

Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*, 2011, 25, 795–800.

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

Vežmar M, Georges E. Reversal of MRP-mediated doxorubicin resistance with quinoline-based drugs. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59, 1245–52.

Wallace DJ, Gudsoorkar VS, Weisman MH, Venuturupalli SR. New insights into mechanisms of therapeutic effects of antimalarial agents in SLE. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8, 522–533.

What Is Cancer? - National Cancer Institute, 2018., <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, pristupljeno 22. 10. 2018.

White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12, 401–410.

World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, 2018,

Xu R, Ji Z, Xu C, Zhu J. The clinical value of using chloroquine or hydroxychloroquine as autophagy inhibitors in the treatment of cancers. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97, e12912.

Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, Bause A, Li Y, Stommel JM, Dell’Antonio G, Mautner J, Tonon G, Haigis M, Shirihai OS, Doglioni C, Bardeesy N,

Kimmelman AC. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev*, 2011, 25, 717–729.

Yang Y, Hu L, Zheng H, Mao C, Hu W, Xiong K, Wang F, Liu C. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34, 625–35.

Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22, 124–131.

Zhang Y, Liao Z, Zhang L, Xiao H. The utility of chloroquine in cancer therapy. *Curr Med Res Opin*, 2015, 31, 1009–1013.

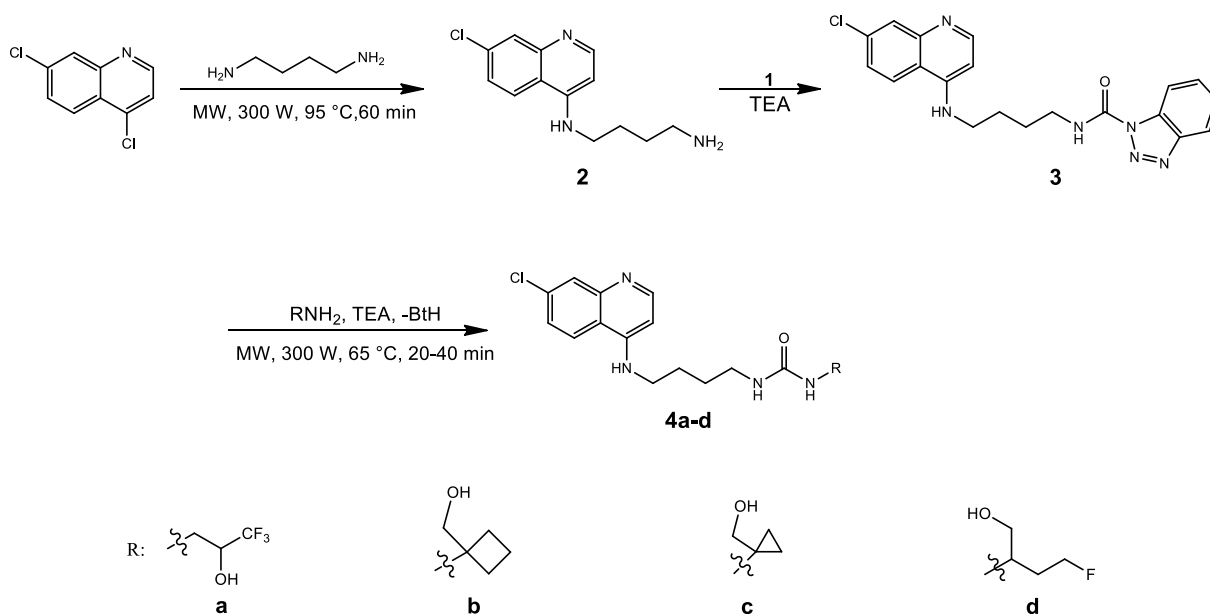
Zhao H, Cai Y, Santi S, Lafrenie R, Lee H. Chloroquine-mediated radiosensitization is due to the destabilization of the lysosomal membrane and subsequent induction of cell death by necrosis. *Radiat Res*, 2005, 164, 250–7.

Zou Y, Ling Y-H, Sironi J, Schwartz EL, Perez-Soler R, Piperdi B. The Autophagy Inhibitor Chloroquine Overcomes the Innate Resistance of Wild-Type EGFR Non-Small-Cell Lung Cancer Cells to Erlotinib. *J Thorac Oncol*, 2013, 8, 693–702.

## **7. SAŽETAK**

## Sinteza i karakterizacija novih urea klorokina s aminoalkoholima

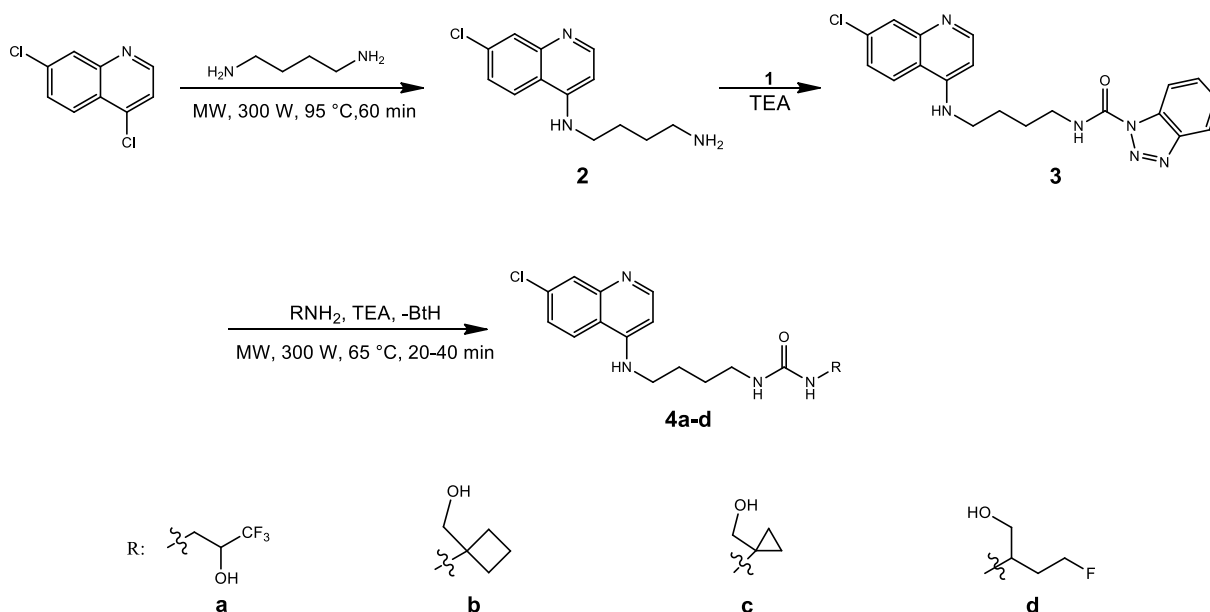
Klorokin je antimalarijski lijek za kojeg je poznato da ima i antitumorsko djelovanje. U ovom radu dan je pregled literaturnih podataka o antitumorskom djelovanju antimalarika, s naglaskom na klorokinu, kao i o njihovom potencijalu da posluže kao spojevi uzori za sintezu novih antitumorskih lijekova. Detaljnije je opisan proces autofagije, budući da se smatra da je glavni mehanizam kojim klorokin inhibira preživljavanje stanica raka vezan uz inhibiciju autofagije. U svrhu daljnjeg istraživanja potencijalne antitumorske aktivnosti derivata klorokina sintetizirano je 5 novih spojeva: BtcCQ (**3**) i uree **4a-d**. Novosintetizirani spojevi su okarakterizirani uobičajenim analitičkim tehnikama (IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR). Spojevi **3** i **4a-d** u potpunosti odgovaraju Lipinskijevim, Gelovanijevim i Veberovim pravilima, odnosno kriterijima alata *Bioavailability radar* (SwissAdme). U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovoga diplomskog rada, bit će ispitano njihovo citostatsko djelovanje.



## **8. SUMMARY**

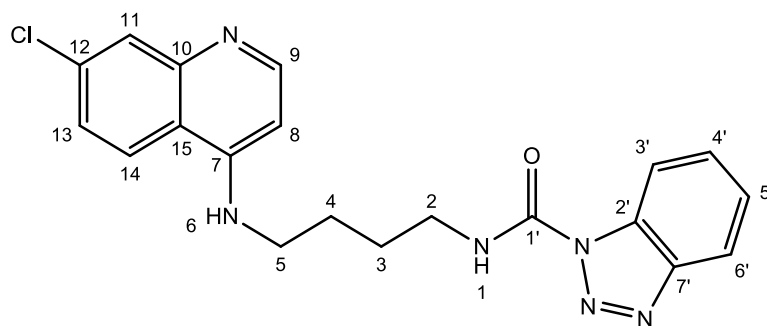
## SYNTHESIS AND CHARACTERISATION OF NEW UREA DERIVATIVES OF CHLOROQUINE AND AMINOALCOHOLS

Chloroquine is an antimalarial drug with well-known cytostatic properties. This thesis gives an overview of the current literature regarding the cytotoxic activity of antimalarials and their potential to serve as lead compounds for the synthesis of new anticancer agents. The process of autophagy is described in more detail since it is believed that chloroquine owes its anticancer activity to the inhibition of autophagy. Five novel chloroquine derivatives were synthesized: BtcCQ (**3**) and ureas **4a-d**. Newly synthesized compounds were characterized by standard analytical techniques (IR, MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR). Compounds **3** and **4a-d** comply with Lipinski, Gelovani and Veber rules, as well as with the criteria of *Bioavailability radar* (SwissAdme). Future investigations will focus on the evaluation of their cytostatic activity.

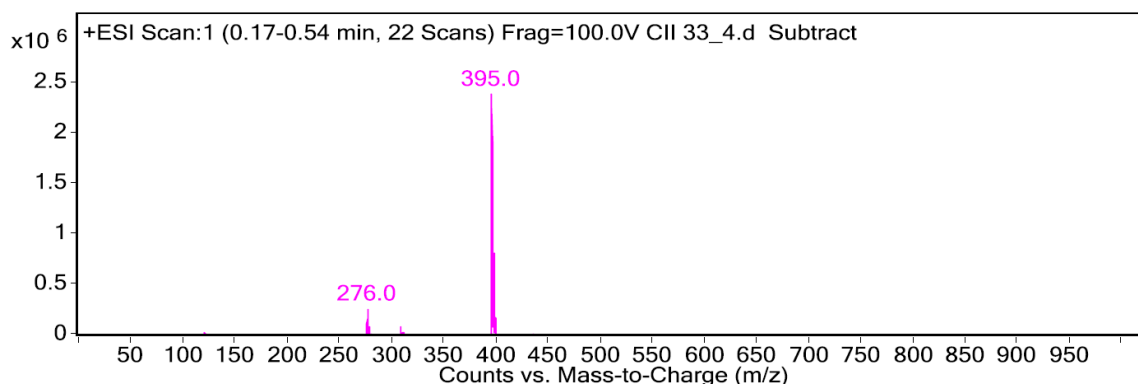
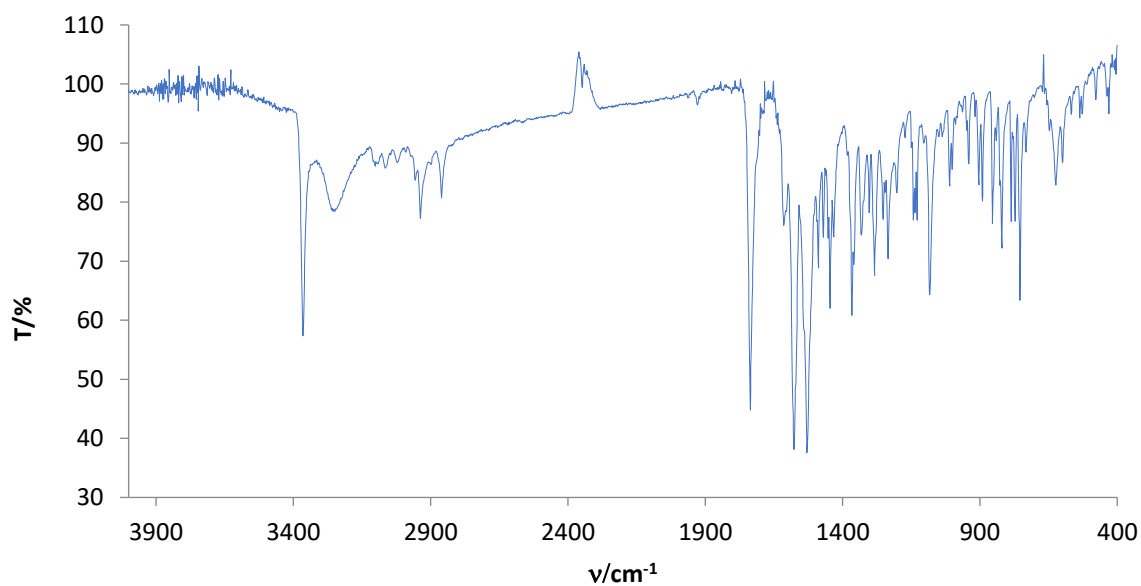


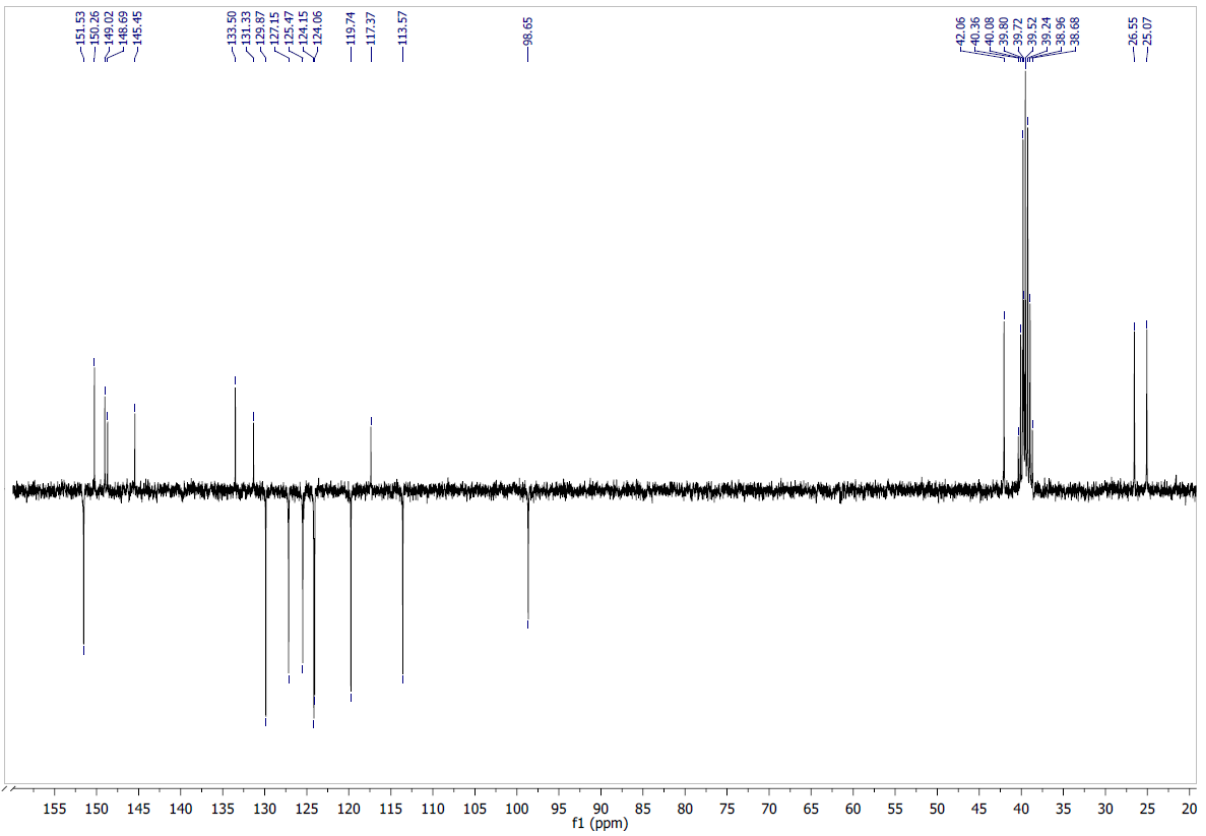
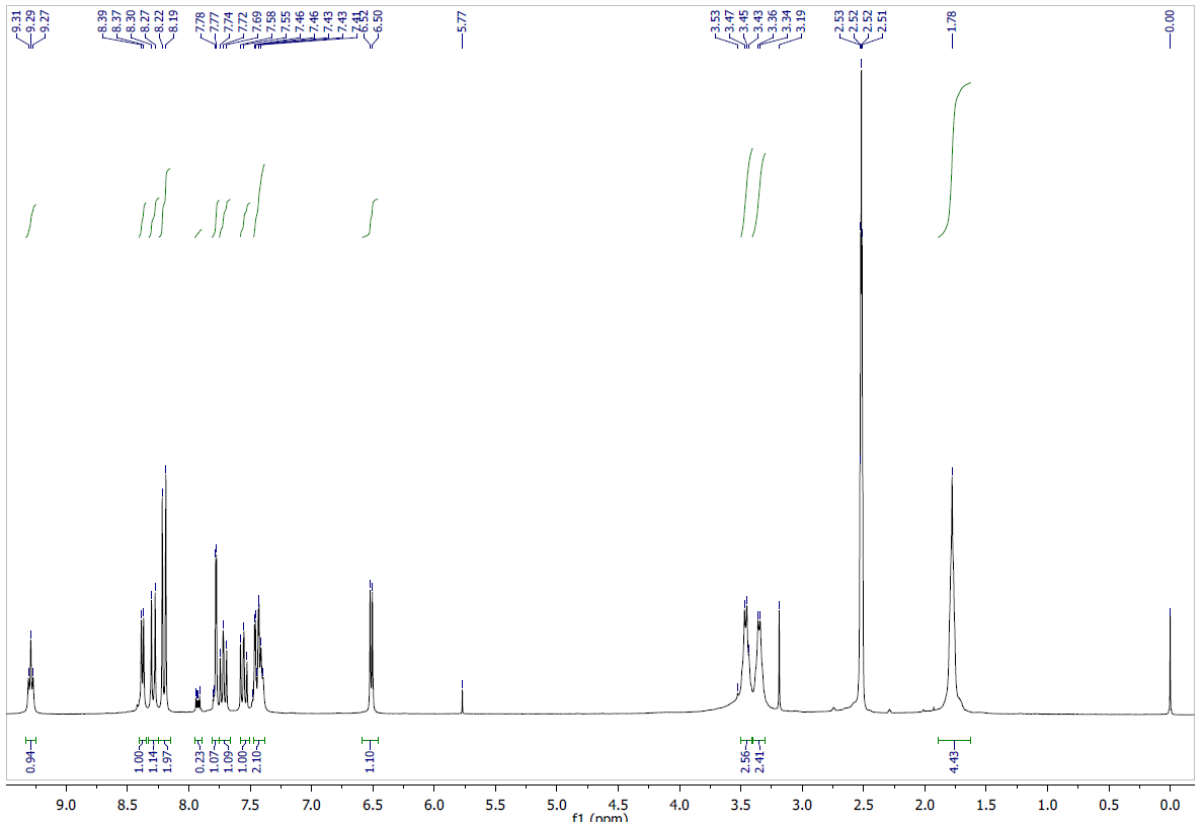
## **9. PRILOZI**

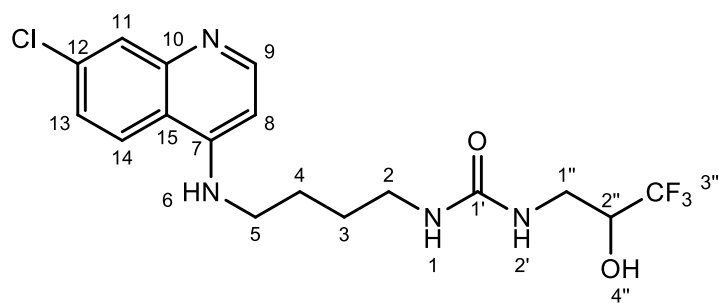




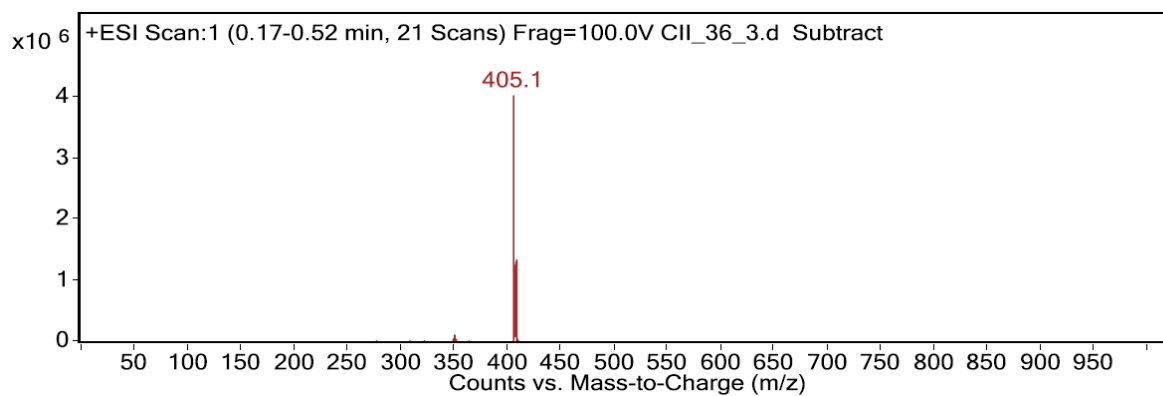
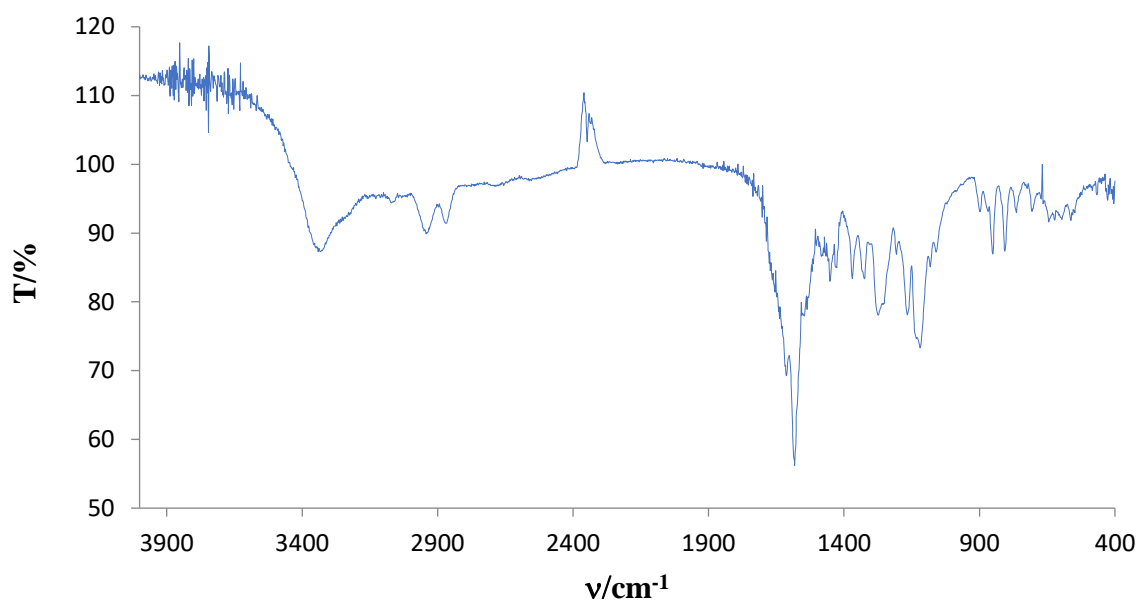
**3**

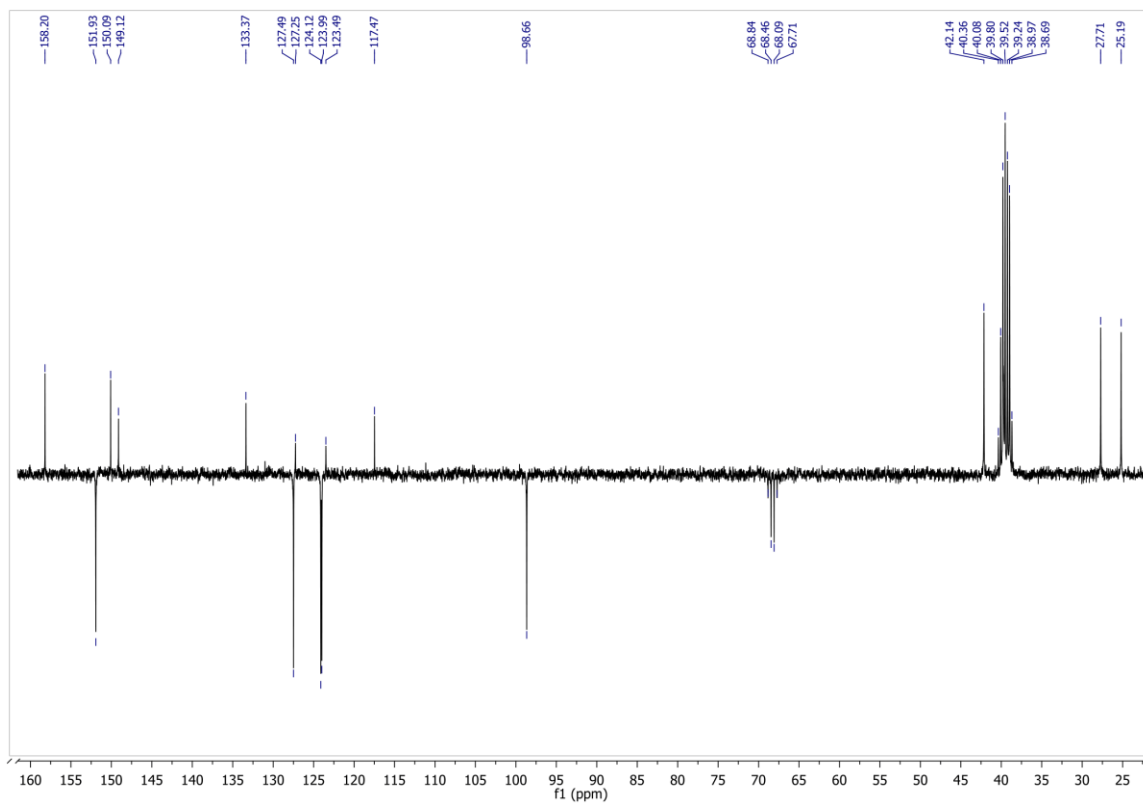
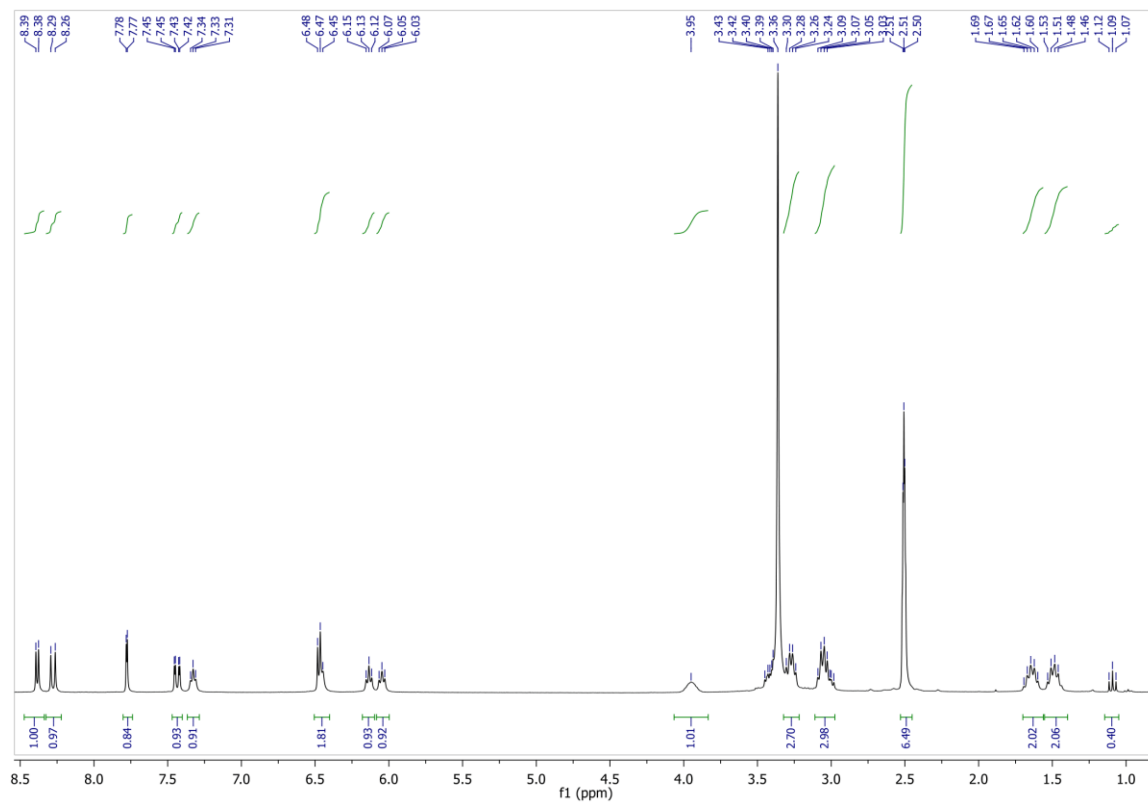


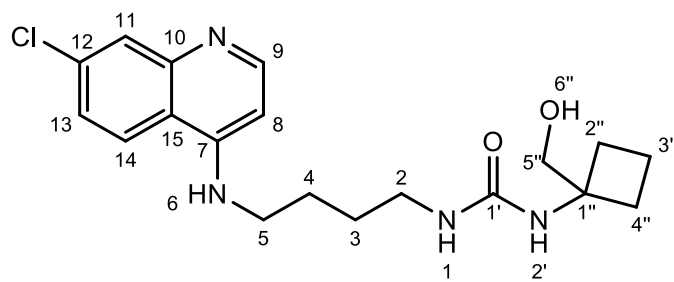




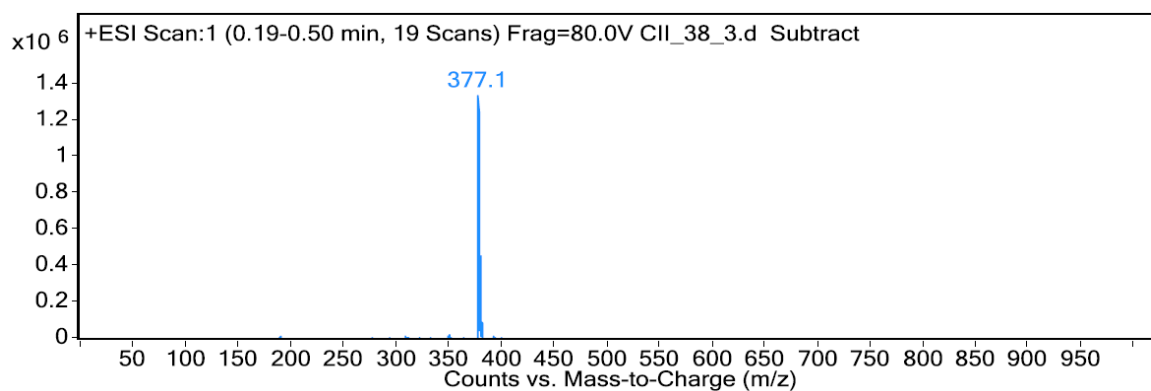
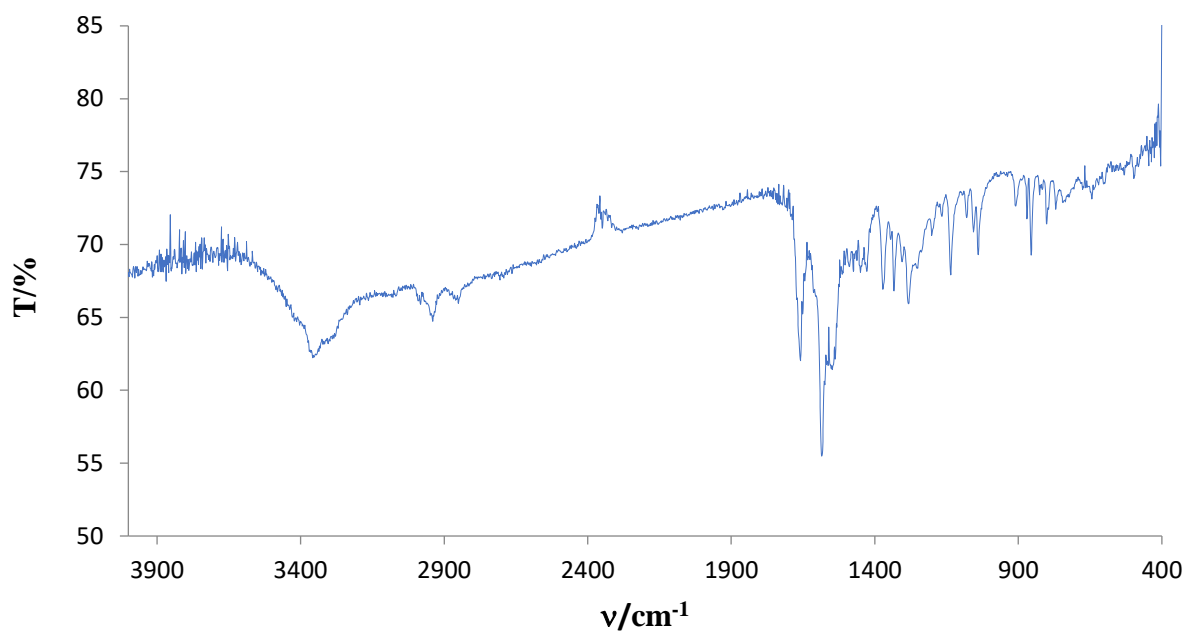
4a

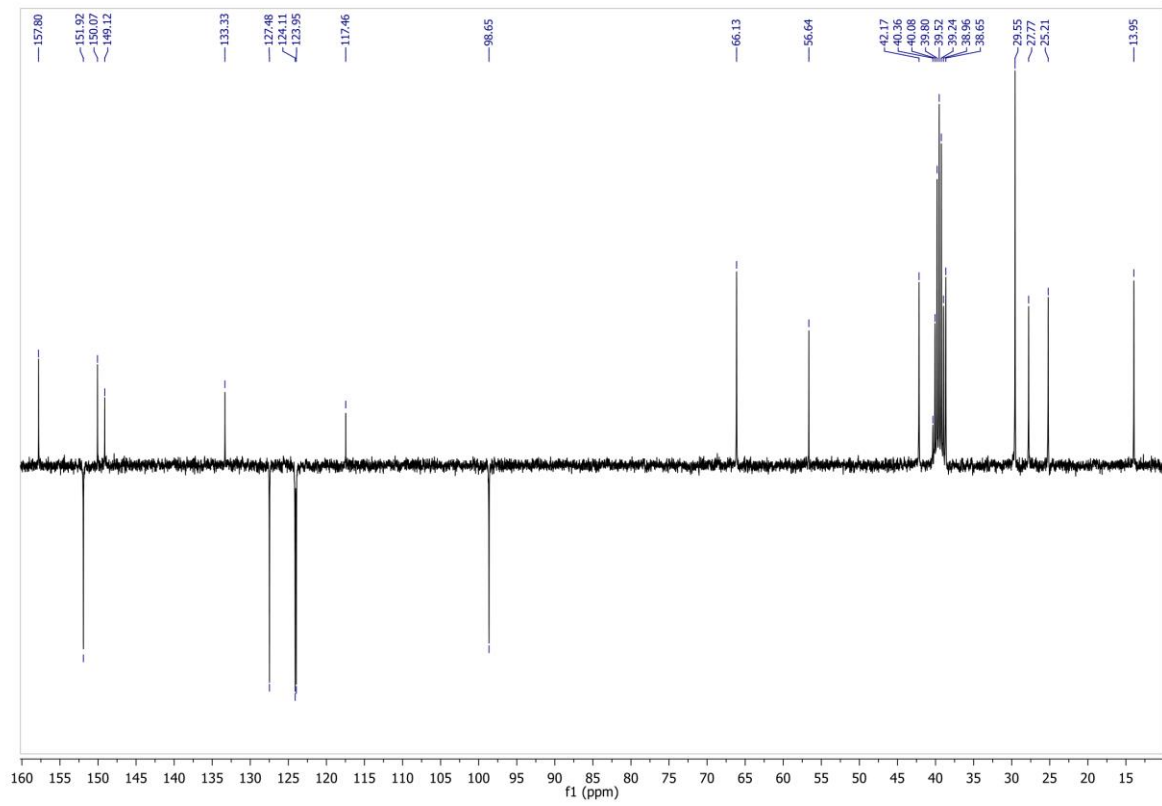
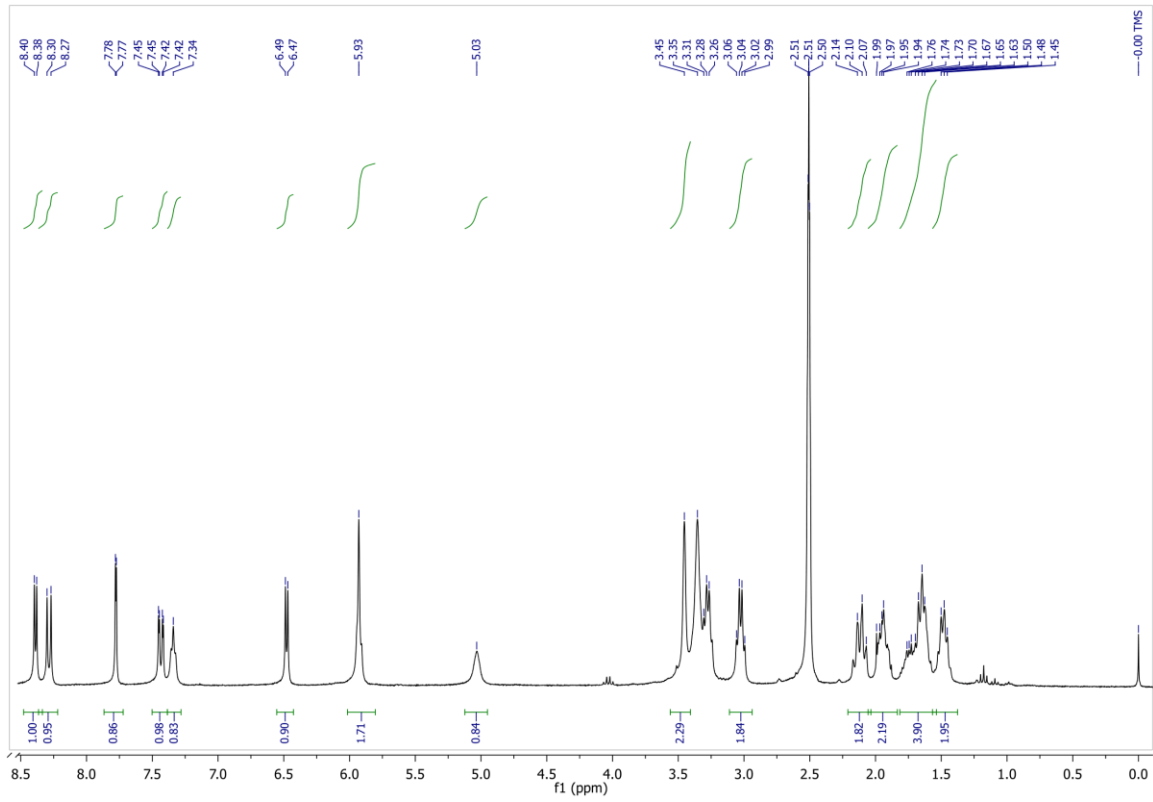


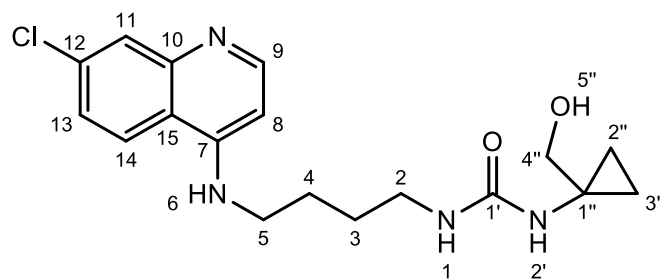




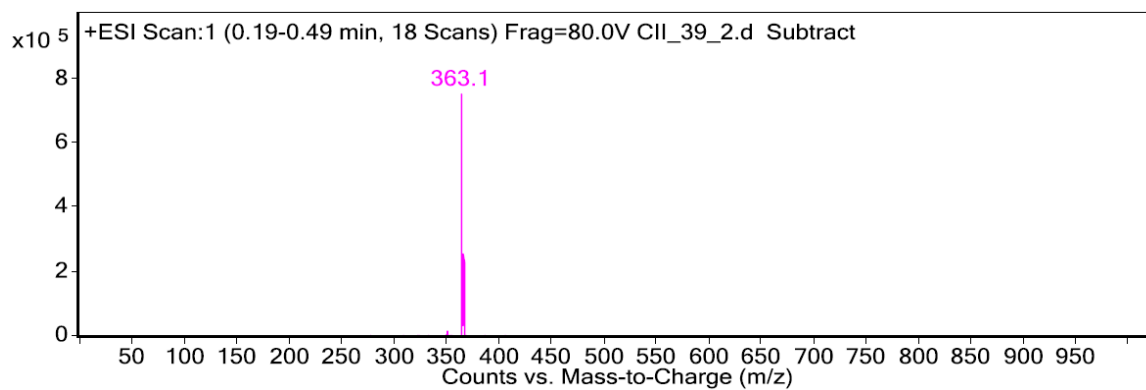
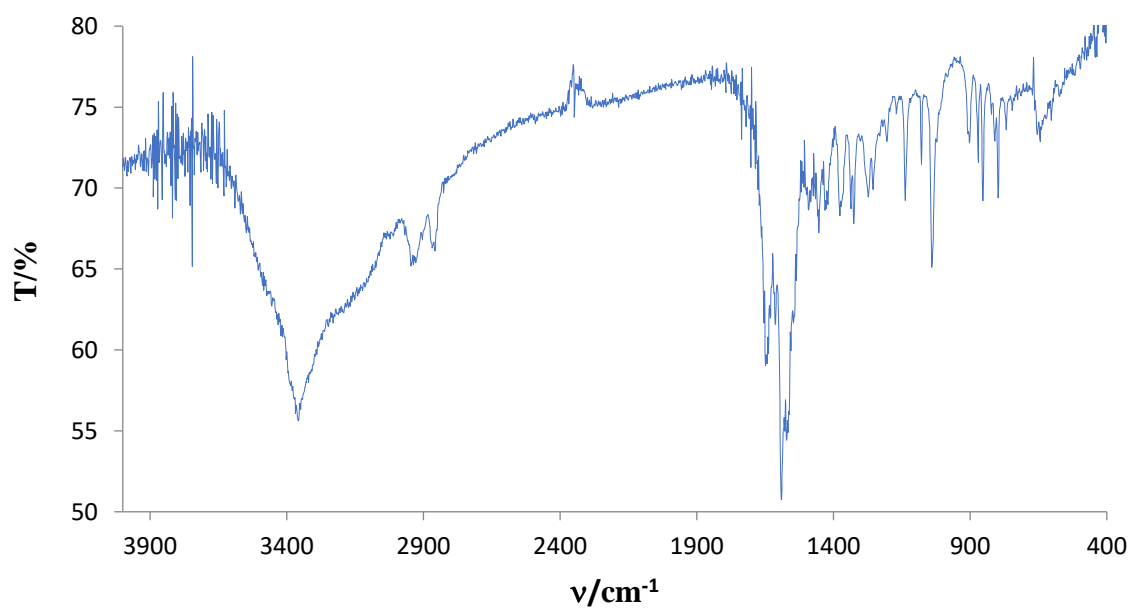
**4b**

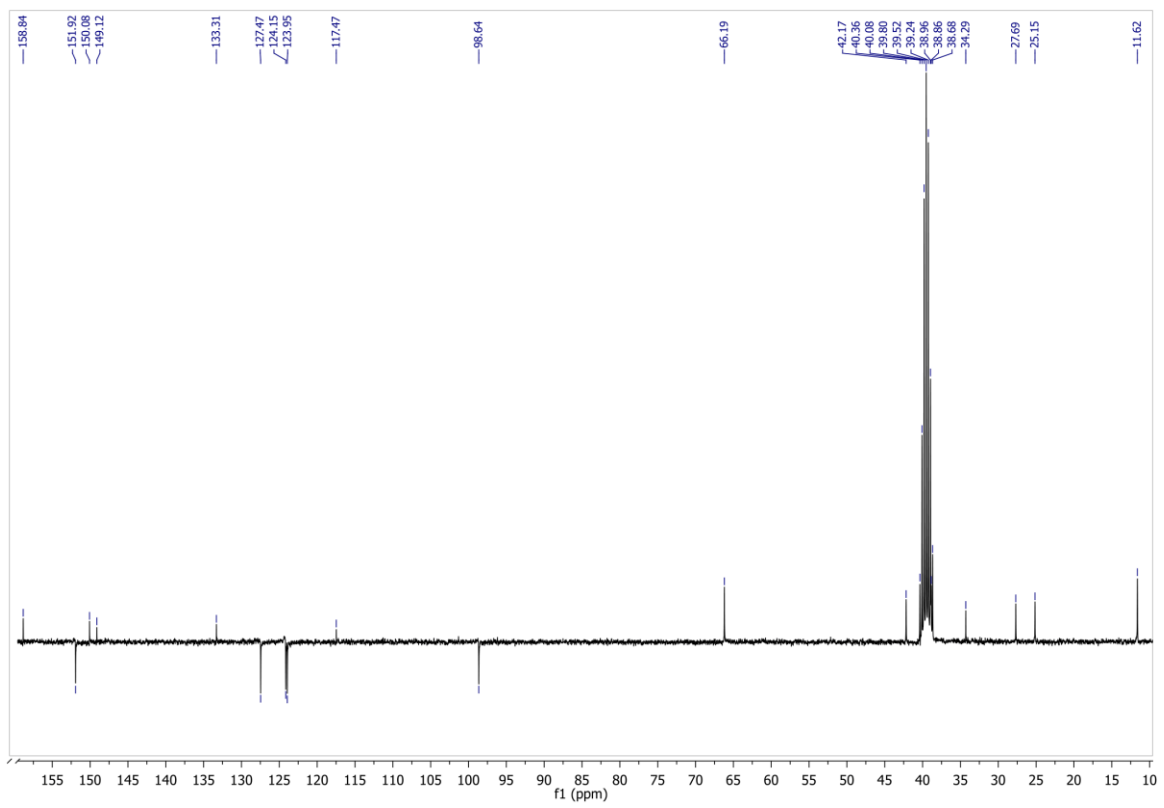
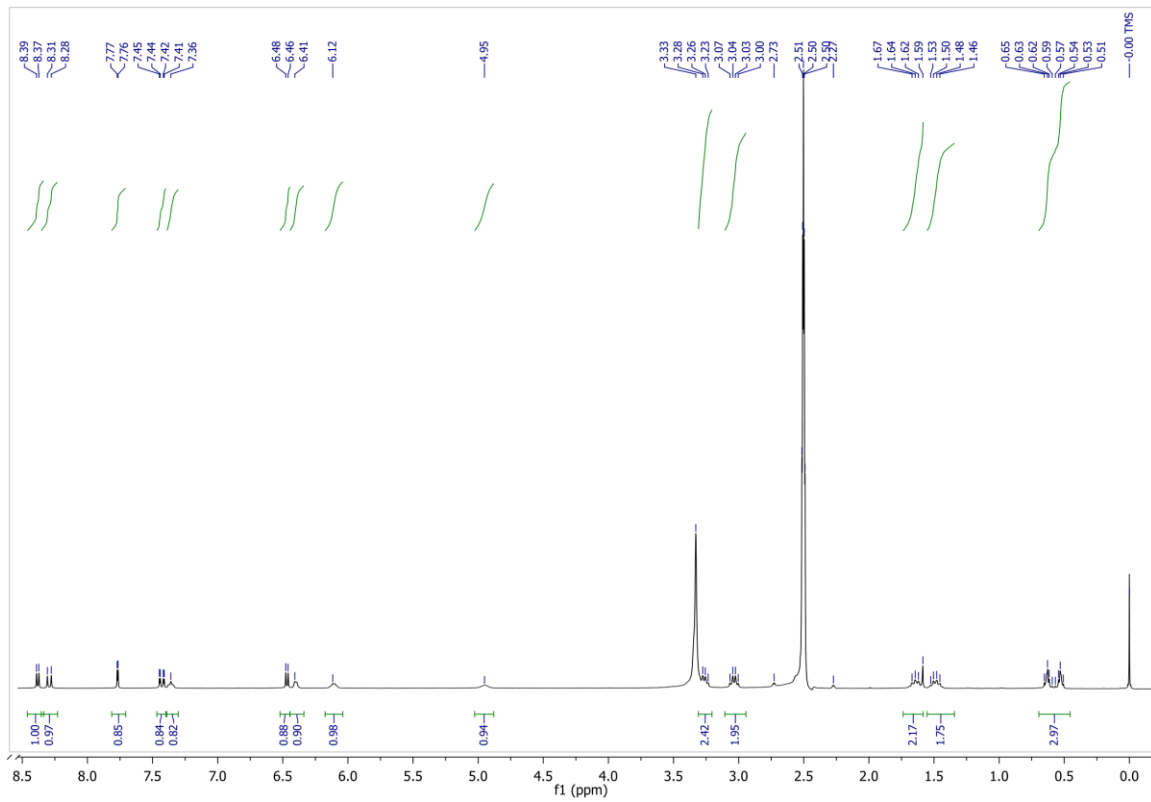




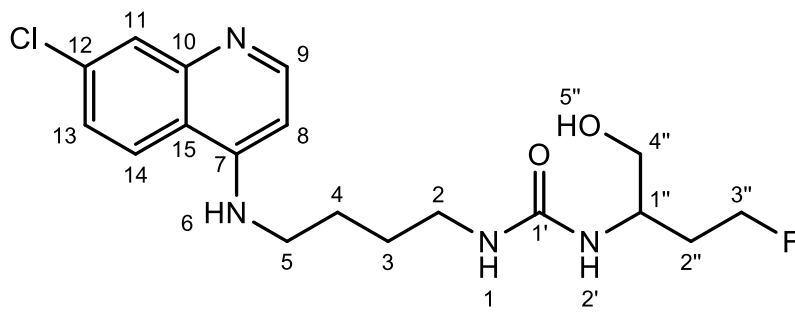


4c

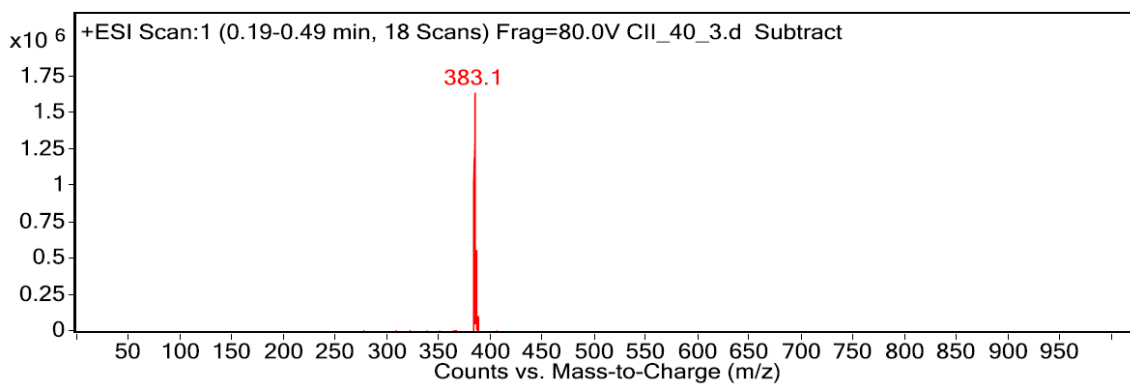
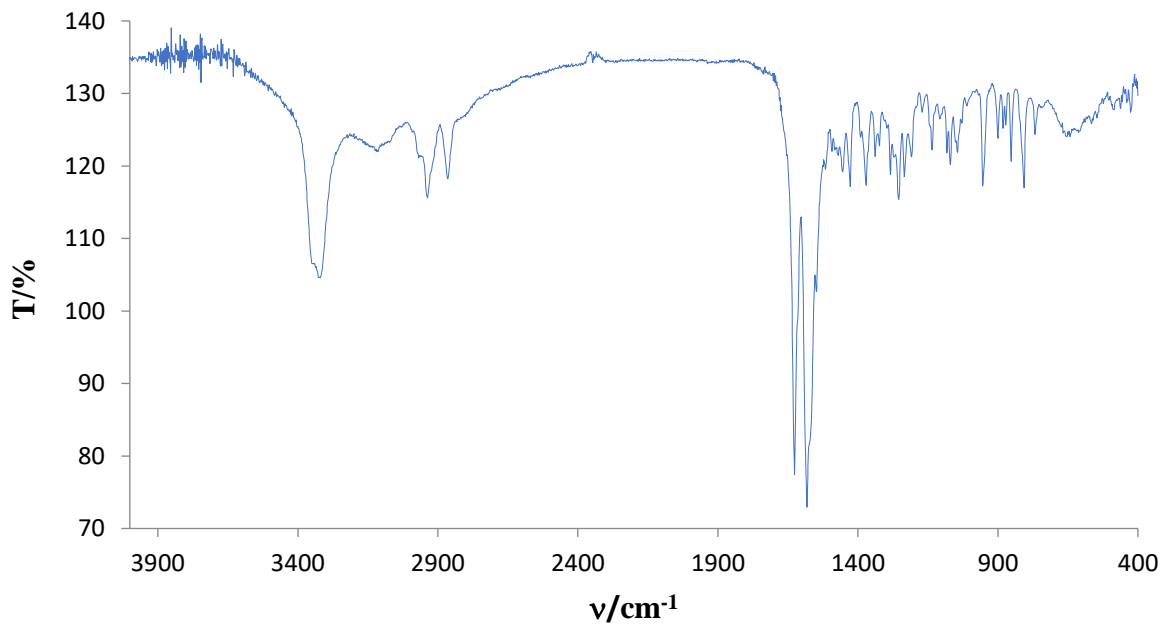


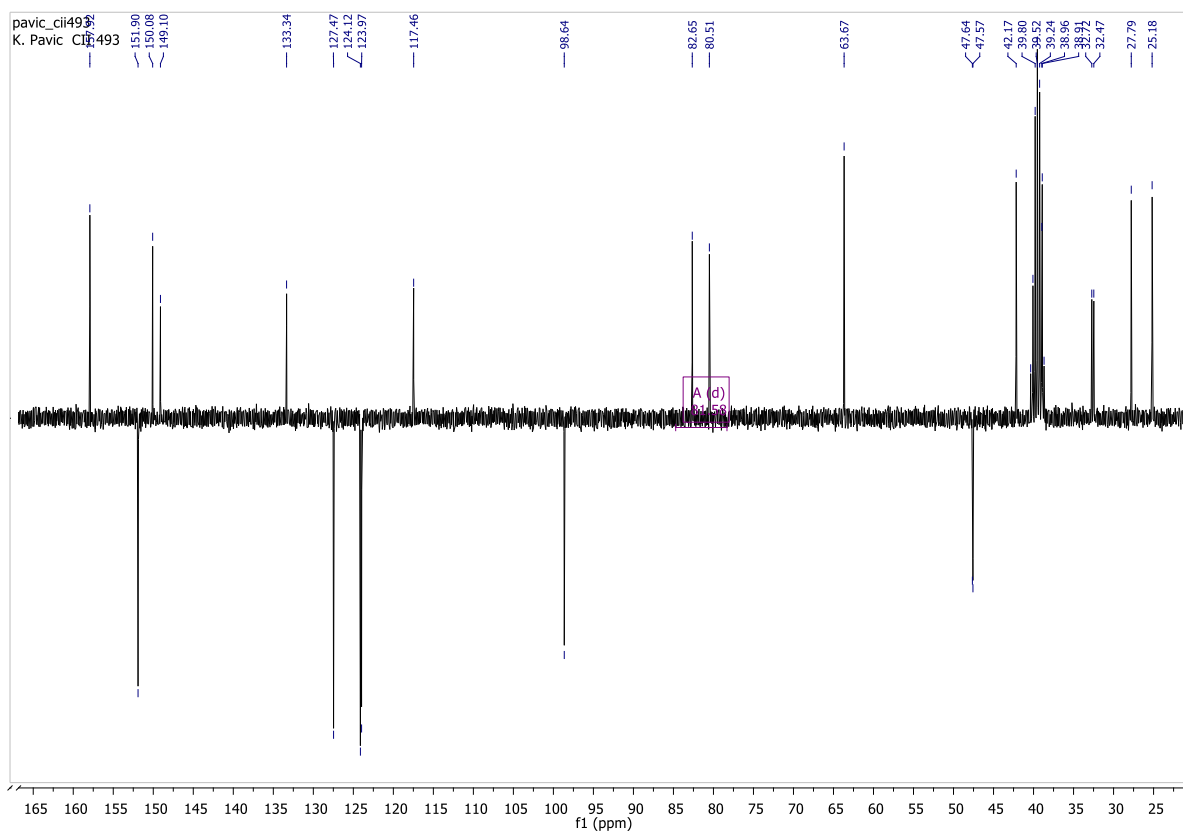
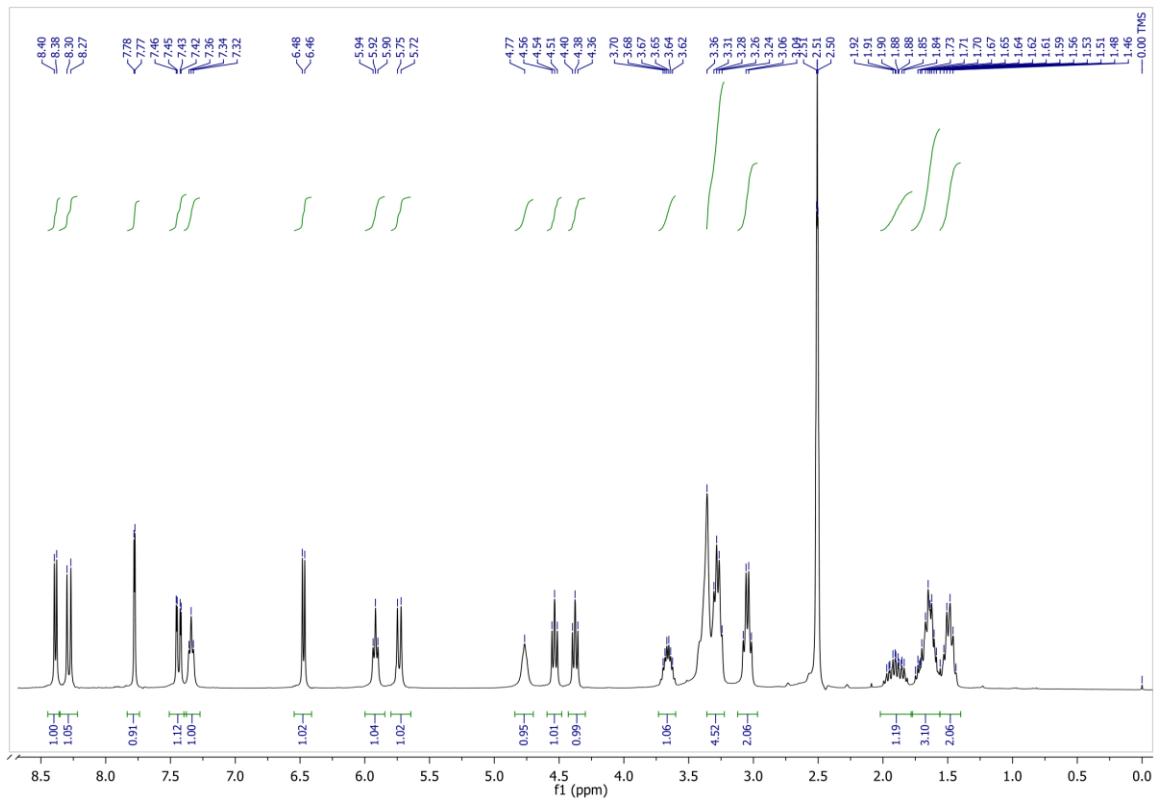






4d





## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

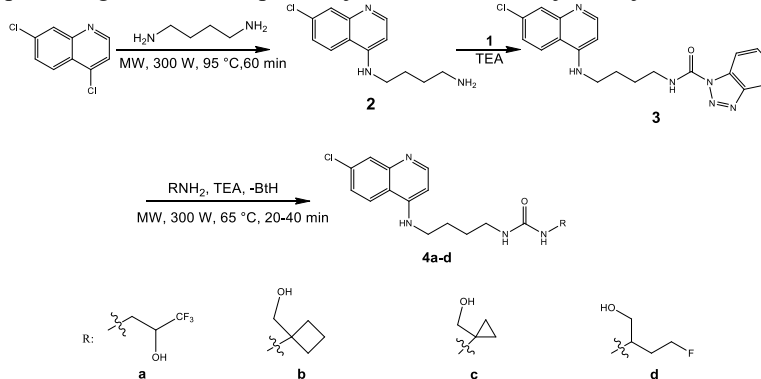
Diplomski rad

## SINTEZA I KARAKTERIZACIJA NOVIH UREA KLOOROKINA S AMINOALKOHOLIMA

Branimir Plavša

### SAŽETAK

Klorokin je antimalarijski lijek za kojeg je poznato da ima i antitumorsko djelovanje. U ovom radu dan je pregled literaturnih podataka o antitumorskom djelovanju antimalarika, s naglaskom na klorokin, kao i o njihovom potencijalu da posluže kao spojevi uzori za sintezu novih antitumorskih lijekova. Detaljnije je opisan proces autofagije, budući da se smatra da je glavni mehanizam kojim klorokin inhibira preživljavanje stanica raka vezan uz inhibiciju autofagije. U svrhu daljnjeg istraživanja potencijalne antitumorske aktivnosti derivata klorokina sintetizirano je 5 novih spojeva: BtcCQ (**3**) i uree **4a-d**. Novosintetizirani spojevi su okarakterizirani uobičajenim analitičkim tehnikama (IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR). Spojevi **3** i **4a-d** u potpunosti odgovaraju Lipinskijevim, Gelovanijevim i Veberovim pravilima, odnosno kriterijima alata *Bioavailability radar* (SwissAdme). U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovoga diplomskog rada, bit će ispitano njihovo citostatsko djelovanje.



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

Rad sadrži: 41 stranicu, 9 grafičkih prikaza, 6 tablica i 52 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Klorokin, urea, sinteza

Mentor: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Branka Zorc**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Davor Šakić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2019.

## Basic documentation card

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

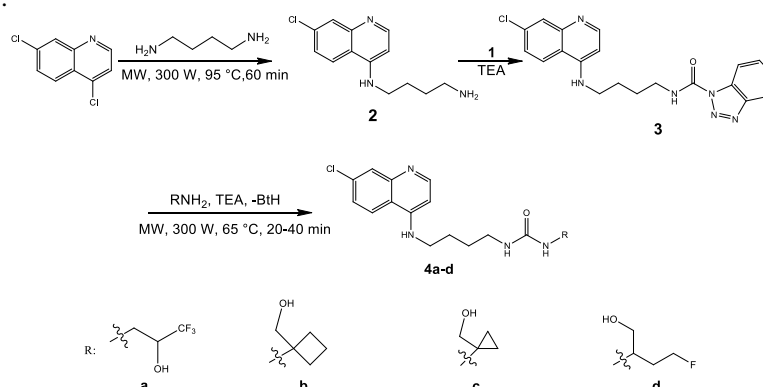
Diploma thesis

### SYNTHESIS AND CHARACTERISATION OF NEW UREA DERIVATIVES OF CHLOROQUINE AND AMINOALCOHOLS

Branimir Plavša

#### SUMMARY

Chloroquine is an antimalarial drug with well-known cytostatic properties. This thesis gives an overview of the current literature regarding the cytotoxic activity of antimalarials and their potential to serve as lead compounds for the synthesis of new anticancer agents. The process of autophagy is described in more detail since it is believed that chloroquine owes its anticancer activity to the inhibition of autophagy. Five novel chloroquine derivatives were synthesized: BtcCQ (**3**) and ureas **4a-d**. Newly synthesized compounds were characterized by standard analytical techniques (IR, MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR). Compounds **3** and **4a-d** comply with Lipinski, Gelovani and Veber rules, as well as with the criteria of *Bioavailability radar* (SwissAdme). Future investigations will focus on the evaluation of their cytostatic activity.



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

Thesis includes: 41 pages, 9 figures, 6 tables and 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Chloroquine, urea, synthesis

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

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

**Branka Zorc, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Davor Šakić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2019.