

Sinteza novih urea i semikarbazidnih derivata primakina

Ubregić, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:163:051502>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



Tomislav Ubrekić

**Sinteza novih urea i semikarbazidnih derivata
primakina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

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 dr.sc. Ivane Perković

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog
fakulteta u Zagrebu na vodstvu, posebno mentorici Ivani Perković. Također, zahvaljujem
svojoj obitelji, prijateljima, kolegama i djevojci Martini na podršci tijekom studiranja.

KRATICE

^{13}C NMR	^{13}C nuklearna magnetska rezonancija
^1H NMR	^1H nuklearna magnetska rezonancija
BtcCl	klorid 1-benzotriazol karboksilne kiseline
BtH	benzotriazol
CYP 450	citokrom P450
G6PD	glukoza 6-fosfat dehidrogenaza
IC_{50}	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infracrvena spektroskopija
MAO	monoaminoksidaza
MS	masena spektrometrija
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NSAID	nesteroidni protuupalni lijekovi
PQ	primakin
TEA	Trietilamin
n.o.	nije određeno
s.t.	sobna temperatura

SADRŽAJ

1. UVOD	3
1.1. Malaria	4
1.2. Primakin	6
1.2.1. Terapijske indikacije	6
1.2.2. Mehanizam djelovanja.....	7
1.2.3. Nuspojave	8
1.2.4. Metabolizam	8
1.3. Primakin kao model za razvoj novih lijekova	11
1.3.1. Modifikacije supstituenata na kinolinskom prstenu	11
1.3.2. Modifikacije terminalne amino skupine	12
1.4. Citotoksičnost derivata primakina	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME	19
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. SINTEZA KLORIDA 1-BENZOTRIAZOLKARBOKSILNE KISELINE (BtcCl, 1) .	23
3.2. SINTEZE 1-KARBAMOILBENZOTRIAZOLA (2a-c).....	23
3.2.1. Sintaza 1-(N-(3-hidroksifenil)karbamoil)benzotriazola (2a)	23
3.2.2. Sintaza 1-(N-(4-hidroksifenil)karbamoil)benzotriazola (2b)	23
3.2.3. Sintaza 1-(N-(4-bromfenil)karbamoil)benzotriazola (2c)	24
3.3. SINTEZE UREA DERIVATA PRIMAKINA (3a-c)	24
3.3.1. Sintaza 1-(3-hidroksifenil)-3-(4((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)uree (3a)	24
3.3.2. Sintaza 1-(4-hidroksifenil)-3-(4((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)uree (3b).....	25
3.3.3. Sintaza 1-(4-bromfenil)-3-(4((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)uree (3c)	25
3.4. SINTEZA PRIMAKINSKOG SEMIKARBAZIDA (5).....	26
3.5. SINTEZE SEMIKARBAZIDNIH DERIVATA PRIMAKINA (6a-c).....	27
3.5.1. Sintaza N^1 -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)- N^2 -(3-hidroksifenil)hidrazin-1,2-dikarboksamida (6a)	27
3.5.2. Sintaza N^1 -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)- N^2 -(4-hidroksifenil)hidrazin-1,2-dikarboksamida (6b).....	28
3.5.3. Sintaza N^1 -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)- N^2 -(4-bromfenil)hidrazin-1,2-dikarboksamida (6c).....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
5. ZAKLJUČAK	42

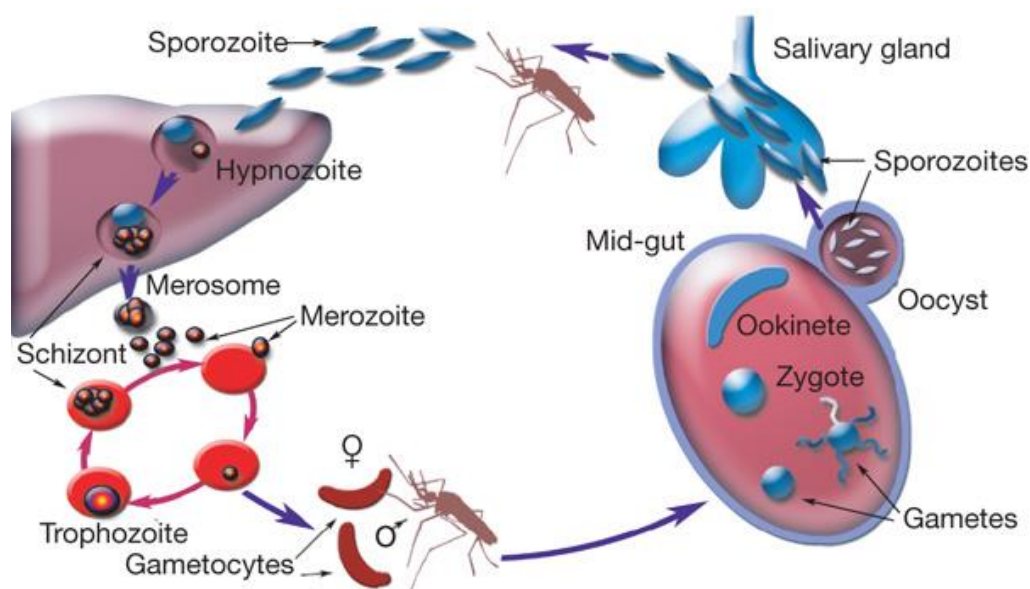
6. LITERATURA	44
7. SAŽETAK.....	49
8. SUMMARY.....	51
9. PRILOZI	53
10. Temeljna dokumentacijska kartica	72

1. UVOD

1.1. Malarija

Malarija je tropska infektivna bolest. Peti je uzročnik smrti od infektivnih bolesti u svijetu (nakon respiratornih infekcija, HIV/AIDS, dijareje i tuberkuloze) i drugi u Africi nakon HIV/AIDS (www.malariasite.com). Od malarije godišnje oboli oko 300 milijuna ljudi u više od 90 zemalja svijeta, a oko 1 milijun zaraženih umre (Golan i sur., 2011). Pet je identificiranih vrsta parazita *Plasmodium* koji uzrokuju ovu bolest i oni su *vivax*, *falciparum*, *ovale*, *malariae* i *knowlesi*. Prijenosnik ovih parazita je ženka komarca iz roda *Anopheles*. *P. falciparum* i *P. vivax* su odgovorni za 95% svih infekcija. Gotovo sve teške i smrtne posljedice su uzrokovane *P. falciparum* (Schlitzer, 2008). Ta vrsta predstavlja najveći problem kod liječenja malarije te je najvažnija meta u razvoju antimalarijskih lijekova (Wells i Gutteridge, 2011).

Životni ciklus parazita ovisan je o vektoru, komarcu *Anopheles spp.* i domaćinu čovjeku (Slika 1). Komarac unosi spolni oblik parazita (gametocite) tijekom uboda zaraženog čovjeka. U komarcu dolazi do fuzije ženskog i muškog gametocita u zigotu i maturacije zigote u oocistu iz koje se otpuštaju sporozoiti. Sporozoiti migriraju u žlijezde slinovnice komarca i mogu zaraziti novog čovjeka tijekom idućeg uboda komarca (Golan i sur., 2011).



Slika 1. Životni ciklus plazmodija

Inficirane ženke komarca ubodom unose u čovjeka sporozoite, koji brzo prodiru u hepatocite, gdje se zatim paraziti razmnožavaju jedan do dva tjedna (hepatalna egzoeritrocitna faza). Rupturom hepatocita oslobađaju se tisuće merozoita koji potom napadaju eritrocite. Kod *P. vivax* i *P. ovale* jetrena faza može latentno i dalje perzistirati 1,5-5 godina. U eritrocitima parazit najprije poprima oblik prstena, a zatim rastom prelazi u ameboidni oblik. Dijeljenjem jezgre nastaje shizont s 8-24 merozoita, ovisno o vrsti. Rupturom eritrocita oslobađaju se merozoiti koji potom napadaju nove eritrocite. Eritrocitna faza kod *P. malariae* traje 72 sata, a kod drugih vrsta *Plasmodium* 48 sati. Neki od parazita u eritrocitima prelaze u spolne gametocite kojima se zaraze komarci sišući krv. U komarcu se odvija spolni ciklus stvaranjem tisuća sporozoita koji se nakupljaju u njegovim žlijezdama slinovnicama (Vrhovac i sur., 2008).

Klinički simptomi malarije javljaju se nakon puknuća eritrocita, pri čemu dolazi do otpuštanja otpadnih produkata parazita i staničnog sadržaja u krv. Glavni simptomi su: vrućica, groznica, glavobolja, bolovi u abdomenu i leđima, mučnina, dijareja i ponekad povraćanje (Schlitzer, 2008). Od dodatnih simptoma mogu se javiti bolovi u mišićima, suhi kašalj i hepatomegalija. U nalazima su uvijek povišene transaminaze, što zbog oštećenja jetra, što zbog oštećenja bubrega. Jetru oštećuje sami parazit svojim razvojem unutar parenhimskih stanica, dok bubrege oštećuju imunosni kompleksi nastali napadom imunosnih stanica na parazita. Ti imunosni kompleksi se nakupljaju na membranama glomerula i otežavaju glomerularnu filtraciju. Jača oštećenja bubrega ovakvim kompleksima najčešće su vezana uz *P. malariae* (Bulat i sur., 1999.)

Najbolji način borbe s malarijom je prevencija. Potrebno je spriječiti ubode insekata izbjegavanjem malaričnih područja, nošenjem odjeće dugih rukava, uporabom repelenata i mreža za krevete impregniranih insekticidima poput permetrina (Rang i sur., 2006).

Antimalarijski lijekovi (antimalarici) se koriste ili profilaktički za sprječavanje nastanka bolesti ukoliko dođe do uboda komarca i prijenosa plazmodija ili u liječenju već nastale bolesti. Najstariji antimalarik je kinin, te je njegova struktura korištena u razvoju ostalih kinolinskih antimalarika od kojih se danas najčešće u terapiji koriste klorokin i primakin (Zorc, 1995).

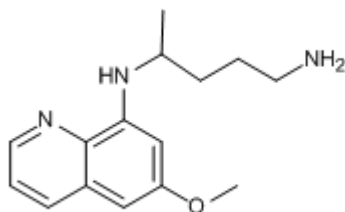
Prema kemijskoj strukturi antimalarike dijelimo na (Rajić Džolić, 2015):

- 8-aminokinoline - primakin
- 4-supstituirane kinoline - klorokin, kinin, meflokin, amodiakin
- diaminopirimidine - pirimetamin (u kombinaciji s sulfadoksinom)
- bigvanide - progvanil (u kombinaciji s atovakvonom)

- artemisinini - artemeter
- ostale - halofantrin, doksiciklin

1.2. Primakin

Primakin (Slika 2) pripada kemijskoj skupini derivata 8-aminokinolina. Kemijsko ime prema IUPAC-u glasi (RS)-N-(6-metoksikinolin-8-il)pentan-1,4-diamin. U većini farmakopeja dolazi kao fosfatna ili difosfatna sol. Primakin difosfat je narančasti, kristalini prašak vrlo gorka okusa i bez mirisa, s temperaturom tališta oko 200 °C. Optički je aktivan spoj, s jednim kiralnim ugljikovim atomom, a najveću aktivnost pokazuje racemična smjesa oba enantiomera (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).



Slika 2. Primakin

1.2.1. Terapijske indikacije

Primakin je jedini antimalarik koji ima snažnu aktivnost protiv gametocita svih vrsta *Plasmodium* parazita koji uzrokuju malariju u čovjeka, uključujući i djelovanje i *P. falciparum* rezistentnog na klorokin. Sprječava transmisiju s domaćina na komarca. Također je i jedini lijek koji učinkovit protiv latentnih egzoeritrocitnih formi (hipnozoita) *P. vivax*, koje su odgovorne za relaps malarije. Nadalje, on je i krvni shizontocid s izrazitim učinkom na *P. vivax* i *P. falciparum*, ali u dozama koje uzrokuju značajne nuspojave, npr. methemoglobinemiju (Mata i sur., 2012).

Koristi se za liječenje malarije u tri slučaja: kao primarna profilaksa protiv svih vrsta parazita malarije, kao terminalna profilaksa (terapija relapsa) za ljude koji su ekstenzivno izloženi *P. vivax* ili *P. ovale*, te kao radikalni lijek kod osoba zaraženih s *P. vivax* ili *P. ovale* (Vale i sur., 2009).

Kao primarni profilaktik koristi se zato što uništava parazite u jetri prije nego dođu u krvotok. Za primarnu profilaksu parazitemije kod odraslih osoba koristi se dnevna doza od 30

mg primakina. Primjena počinje jedan dan prije rizika od ekspozicije, npr. odlaska u regiju u kojoj je malarija prisutna, i nastavlja se tjedan dana nakon odlaska iz regije (Vale i sur., 2009).

Ukoliko se neki drugi lijek koristi kao primarni profilaktik, a osoba boravi u regiji gdje su prisutni *P. vivax* ili *P. ovale*, primakin se dodaje u terapiju na kraju perioda ekspozicije kako bi se spriječio relaps, odnosno odgođena klinička manifestacija malarije uzrokovane hipnozoitima *P. vivax* ili *P. ovale*. Takav pristup naziva se terminalna profilaksa malarije (eng. *presumptive antirelapse therapy*). U tu se svrhu koristi dnevna doza od 15 mg primakina kroz 14 dana (Hill i sur., 2006).

Osim kod malarije koristi se i u terapiji gljivične infekcije pluća kod imunokompromitiranih pacijenata poput oboljelih od HIV-a te kod pneumocistične pneumonije. Kontraindiciran je u trudnoći i kod djece mlađe od 4 godine zbog rizika od hemolize, zatim kod ljudi s nedostatkom enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze i u bolestima izazvanim poremećajem imunološkog sustava poput reumatoidnog artritisa i sistemskog eritemskog lupusa (www.almp.hr).

1.2.2. Mehanizam djelovanja

Još uvijek nije u potpunosti razjašnjen mehanizam djelovanja primakina, no spoznaje upućuju da se radi o interferencijama u mitohondriju parazita. Smatra se da primakin ometa funkciju ubikinona, jednog od prenositelja elektrona u respiratornom lancu te zbog toga dolazi do zaustavljanja mitohondrijske proliferacije čime se inhibira rast parazita u fazi koja zahtijeva funkcionalne mitohondrije. Drugi mogući mehanizam vezan je uz stvaranje visokoreaktivnih metabolita koji povećavaju oksidativni potencijal unutar stanice (Vale i sur., 2009). Biotransformacija 8-aminokinolina u aktivne metabolite poput 5-hidroksiprimakina pokazala se kao ključna za antimalarijsko djelovanje, a ujedno i kao odgovorna za toksičnost (Recht i sur., 2014)

Rasprave oko mehanizma djelovanja još uvijek traju. Smatra se da razlog niske rezistencije parazita na primakin i njegove specifičnosti prema određenim životnim stadijima plazmodija leži u tome što određeni stadiji plazmodija nemaju obrambeni mehanizam od oksidativnog stresa, kao i činjenica da parazit nema biokemijskih mehanizama kojima bi uklonio primakin i njegove metabolite (Vale i sur., 2009).

1.2.3. Nuspojave

Najčešće nuspojave koje su povezuju s uporabom primakina su gastrointestinalne (mučnina, dijareja, abdominalna bol) koje uglavnom nisu po život opasne te se javljaju prilikom uzimanja primakina uz hranu ili ako se se uzima u dnevnim dozama većim od 30 mg (Vale i sur., 2009).

Autooksidacijom željeza u hemoglobinskoj jezgri dolazi do nastanka methemoglobina po kojem se patološko stanje naziva methemoglobinemija. To stanje predstavlja najznačajniju nuspojavu primakina i svih ostalih 8-aminokinolina. Važno je naglasiti da primakin nije direktno toksičan za eritrocite kod klinički značajnih koncentracija. Smatra se da se hematotoksičnost javlja zbog nekih metabolita, ali odgovorni metaboliti i mehanizam nisu razjašnjeni. Bowman i suradnici (Bowman i sur., 2003) spominju *N*-hidroksilirani metabolit primakina (6-metoksi-8-hidroksiaminokinolin) kao glavnog uzročnika hemolize i methemoglobinemije kod štakora. Methemoglobinemija, sa ili bez cijanoze, nije teška komplikacija, a stanje se vraća u normalu ubrzo nakon prestanka primjene lijeka (Recht i sur., 2014).

Akutna hemolitička anemija kod osoba s urođenom deficijencijom glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) smatra se najozbiljnijom nuspojavom. G6PD deficijencija je ovisna o prijenosu na X kromosomu, najraširenija je enzimska bolest na svijetu, zahvaća nekoliko stotina milijuna ljudi i osobito je česta u regijama pogođenim malarijom (Recht i sur., 2014).

G6PD kao prvi enzim u putu pentoza fosfata uključena je u produkciju NADPH, koji je nužan za opskrbu reduciranim glutationom. NADPH je također esencijalan za funkciju katalaze (Recht i sur., 2014). Produkt puta pentoza fosfata NADPH je zato vrlo bitan za zaštitu stanica od oksidativnog stresa. Taj je stres najjače izražen u eritrocitima, koji nemaju mitohondrije, a time ni alternativnog izvora NADPH (Berg i sur., 2013).

G6PD deficijencija kod ljudi koji su izloženi oksidativnom stresu uslijed primjene nekih lijekova ili infekcija, može dovesti do akutne hemolitičke anemije. Česti pratitelj hemolize je anemija, hemoglobinurija i u nekim slučajevima bubrežno zatajenje (Recht i sur., 2014).

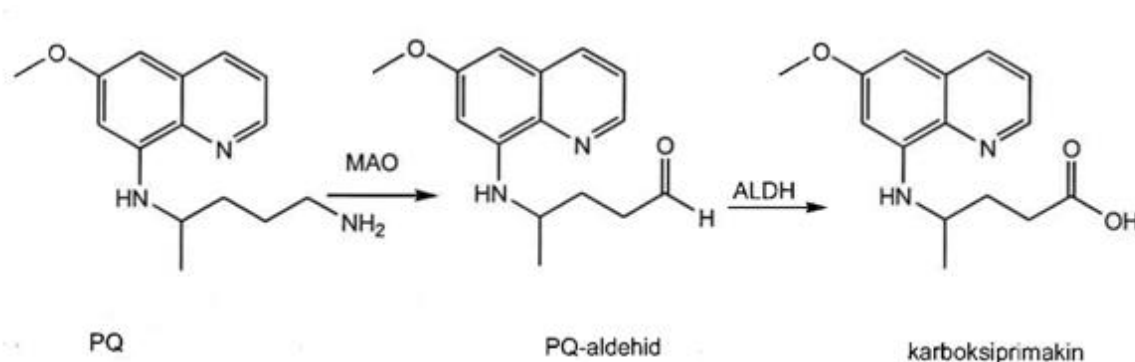
1.2.4. Metabolizam

Apsorpcija primakina iz gastrointestinalnog trakta je brza te se lijek nakon toga koncentrira u srcu, jetri, plućima i mišićima. Srednji volumen distribucije je 3 l/kg.

Maksimalnu koncentraciju u krvi doseže 1-3 h nakon primjene, brzo se metabolizira u jetri te se izlučuje urinom, s vremenom polueliminacije 4-9 h (Vale i sur., 2009). Vezanje na proteine plazme iznosi oko 75%, a visoke koncentracije pojavljuju se i u eritrocitima što je poželjno zbog lokalizacije parazita. Primakin prolazi placentarnu barijeru i izlučuje se u majčino mlijeko. Brzo se izlučuje i to većinom urinom preko hidrofilnih metabolita. Primakin ima poluvrijeme života 4-9 sati i ne podliježe intenzivnom metabolizmu tijekom prvog prolaska kroz jetru (www.inchem.org).

U homogenatu jetre štakora, CYP450 i MAO enzimski sustavi gotovo jednako doprinose metabolizmu primakina. Metabolizam je balansiran između nastanka različitih hidroksiliranih derivata, za koje se vjeruje da su odgovorni za farmakološka i toksična svojstva lijeka, i pretvorbe u inaktivne karboksiprimakinske metabolite (Abraham, 2003).

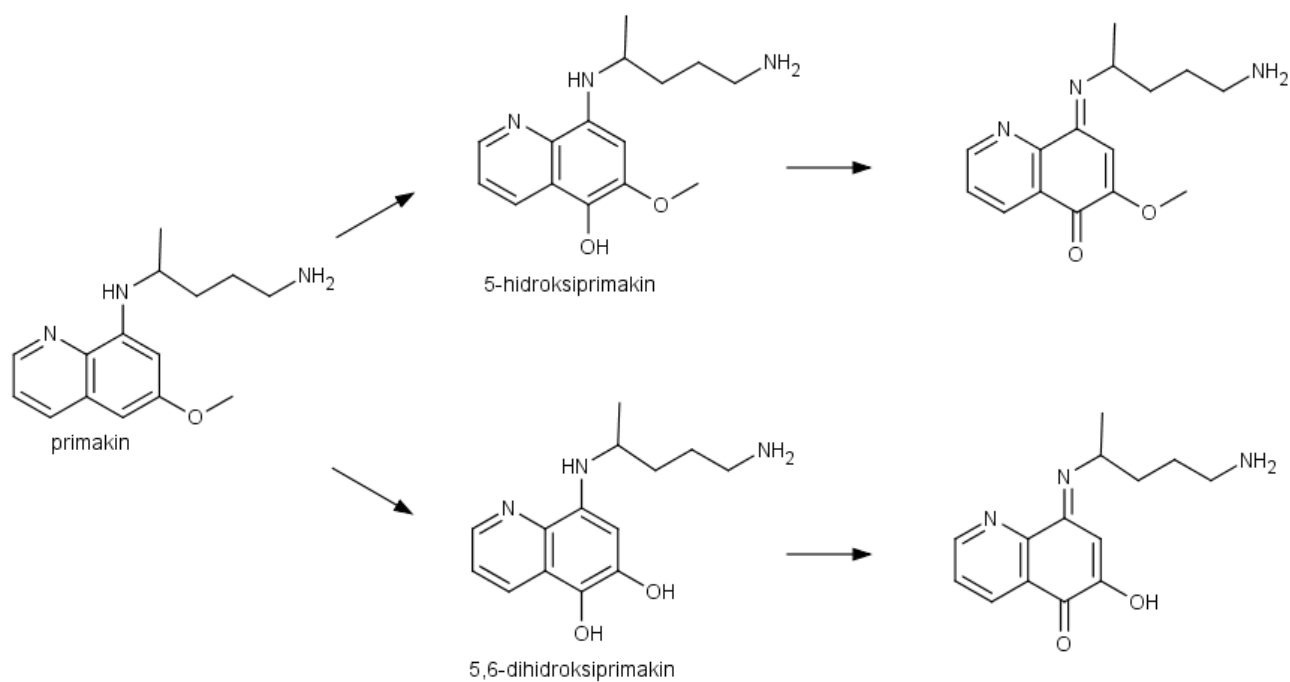
Karboksiprimakin nema značajnu antimalarijsku aktivnost. Oksidativna deaminacija sporednog alkilnog lanca najvjerojatnije uključuje tri enzima u dva koraka: prvo dolazi do oksidacije primakina u aldehid uz monoamino-oksidazu, a dalje se aldehid oksidira u karboksiprimakin aldehid dehidrogenazom (Mata i sur., 2011). Iz primakina oksidativnom deaminacijom postraničnog lanca nastaje karboksiprimakin, jedini metabolit primakina koji nastaje u ljudskoj jetri *in vitro* (slika 3). U ljudskom organizmu, njegovo poluvrijeme eliminacije je dulje nego ono primakina, i njegove koncentracije u plazmi su mnogo više (Abraham, 2003).



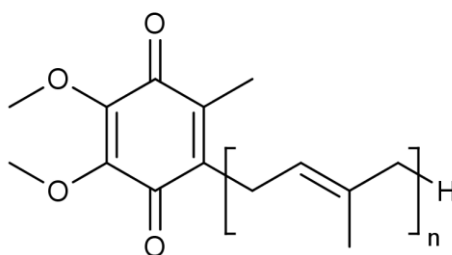
Slika 3. Oksidativna deaminacija primakina

Metabolička hidroksilacija primakina povezana je s njegovom toksičnošću (O'Neill i sur., 1998). Najreprezentativniji metabolit hidroksilacije je 5-hidroksiprimakin. On uzrokuje methemoglobinemiju i depleciju glutationa. Brojni hidroksilirani metaboliti primakina identificirani su u animalnim modelima, no nisu dokazani kod ljudi. Mehanizam djelovanja 8-

aminokinolina uključuje oksidaciju takvih metabolita u kinoniminske derivate (Slika 4), koji mogu oponašati ubikvinon (Slika 5) (Abraham, 2003).



Slika 4. Oksidativni metabolizam primakina u potencijalno toksične kinoniminske metabolite



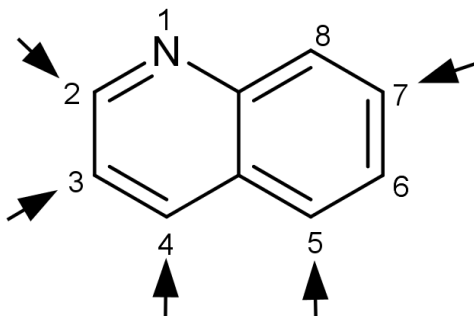
Slika 5. Ubikvinon

1.3. Primakin kao model za razvoj novih lijekova

Upotreba primakina ograničena je zbog njegovog opsežnog metabolizma u inaktivni metabolit karboksiprimakin i zbog toksičnih učinaka koji su već prije navedeni u ovom radu (Sall i sur., 2008). Cilj modifikacije njegove strukture je postići smanjenje toksičnosti uz poboljšanje aktivnosti. Modifikacije se mogu raditi na kinolinskom prstenu ili na terminalnoj primarnoj amino skupini.

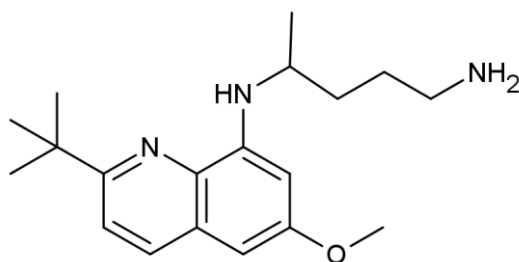
1.3.1. Modifikacije supstituenata na kinolinskom prstenu

Jedan od načina kako dobiti što učinkovitije derivate uz što manju toksičnost, bilo je uvođenje novih supstituenata na različitim položajima kinolinskog prstena (Slika 6). Sintetizirano je preko 200 primakinskih derivata s različitim supstituentima na položajima 2, 3, 4, 5 i 7 kinolinskog prstena. Najpovoljniji su bili derivati koji su imali metilnu skupinu na položajima 2 i 4, *tert*-butilnu na položaju 2, etilni supstituent na položajima 2 i 4, pentiloksi supstituent na položaju 5 i alkoksi, fluoro, 3- ili 4- supstituiranu fenoksi skupinu na položaju 5. Često se događalo da se uvođenjem neke skupine poveća aktivnost, no povećala bi se i toksičnost, što nije poželjno kod izbora supstituenata (Vale i sur., 2009).



Slika 6. Položaji na kinolinskom prstenu

Bitno je za spomenuti da je 2-*tert*-butilprimakin (Slika 7) jedini 8-aminokinolin kod kojeg nema opasnosti od methemoglobinemije (Vale i sur., 2009). Metabolički stabilni *tert*-butil na položaju 2 također je znatno poboljšao antimalarijsku aktivnost prema krvnim shizontima (Thanh Thuy i sur., 2010).

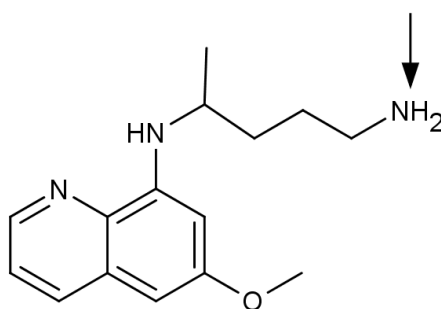


Slika 7. 2-*tert*-butilprimakin

Može se zaključiti kako se uvođenjem supstituenta na položaj 2 kinolinskog prstena ne povećava značajno aktivnost, te se malo smanjuje toksičnost. Uvođenjem metilne skupine na položaj 4 povećava se aktivnost spoja, ali i toksičnost, dok fenoksi supstituent na položaju 5 smanjuje toksičnost zadržavajući ili povećavajući aktivnost. Jain i suradnici (2004) uveli su druge metabolički stabilne skupine (adamatil, izopropil, cikloheksil, ciklopentil) na položaj 2 kako bi povećali antimalarijsku aktivnost, no aktivnost takvih spojeva bila je manja od aktivnosti 2-*tert*-butilprimakina.

1.3.2. Modifikacije terminalne amino skupine

Modificiranjem terminalne primarne amino skupine (Slika 8) mogla bi se poboljšati bioraspoloživost primakina uslijed blokiranja metaboličke inaktivacije takvih derivata. (Vale i sur., 2009). Proučavani su derivati s aminokiselinama i peptidima, koji sporo hidroliziraju u serumu, te je moguće da se ponašaju kao prolijekovi primakina (Vangapandu i sur., 2004). Sall i sur. (2008) su opisali peptidne i aminokiselinske derivate primakina koji pokazuju smanjenu toksičnost i povećanu aktivnost, no brzo hidroliziraju u primakin pod utjecajem aminopeptidaza i endopeptidaza, što onemogućuje njihovu peroralnu primjenu.



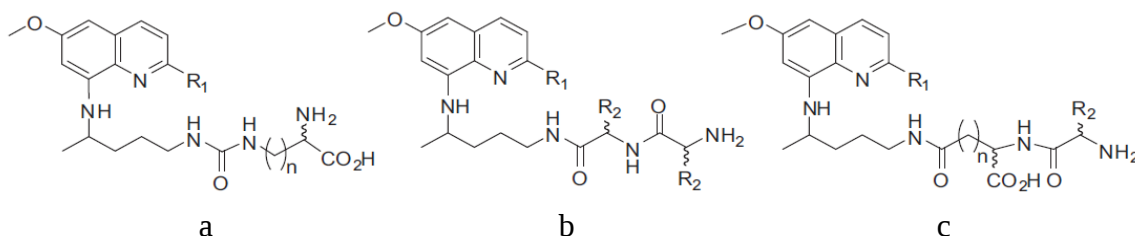
Slika 8. Terminalna amino skupina primakina

Vangapandu i suradnici (2004) sintetizirali su konjugate primakina, kao i njegovih analoga sa supstituentima na kinolinskom prstenu s L-aminokiselinama alaninom, leucinom, lizinom i ornitinom. Zatim su promatrali antimalarijsku aktivnost nastalih spojeva te opazili kako se aktivnost povećala uspoređujući sa aktivnošću samih 8-aminokinolina. Najveću antimalarijsku aktivnost su pokazali konjugati s lizinom i ornitinom.

Kao nastavak istraživanja ovog problema Jain i suradnici (2004) sintetizirali su konjugate 2-*tert*-butilprimakina s lizinom i ornitinom, ali nije došlo do povećanja aktivnosti.

Kaur i suradnici (2012) sintetizirali su aminokiselinske konjugate 8-aminokinolinskih antimalarika. Sintetizirani su konjugati s lizinom i ornitinom na način da je amino skupina bočnog lanca aminokiselina povezana s terminalnom amino skupinom primakina (Slika 9a). Nažalost, spojevi su se pokazali manje aktivnim od primakina, iz čega možemo zaključiti da slobodna karboksilna skupina aminokiseline smanjuje učinak. Također su sintetizirali konjugate 8-aminokinolina s kationskim dipeptidima (Slika 9b). Razlog izbora kationskih dipeptida je bila da dolazi do povećane aktivnosti konjugata 8-aminokinolina s kationskim aminokiselinama (Vangapandu i sur., 2004). Također, uslijed povećanja bazičnosti konjugata trebala bi se povećati akumulacija konjugata, a time i djelotvornost. Spojevi s vezanim dipeptidima pokazali su se učinkovitim antimalaricima *in vitro* i *in vivo*. Bitno je za spomenuti da su se dipeptidni analozi s D-aminokiselinama pokazali slabo učinkovitim. Serija pseudopeptida 8-aminokinolinskih antimalarika i anionskih aminokiselina (Slika 9c) sintetizirana je povezivanjem karboksilne skupine iz bočnog lanca s 8-aminokinolinom, te

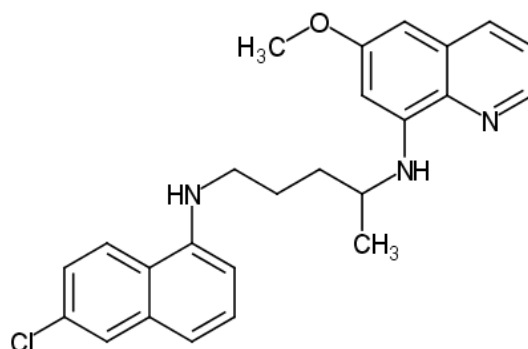
dodatnim vezanjem α -amino skupine anionske aminokiseline s kationskom aminokiselinom. Pseudopeptidi s L-lizinom pokazali su najsnažniju aktivnost.



Slika 9. Serije sintetiziranih konjugata 8-aminokinolina s aminokiselinama/dipeptidima

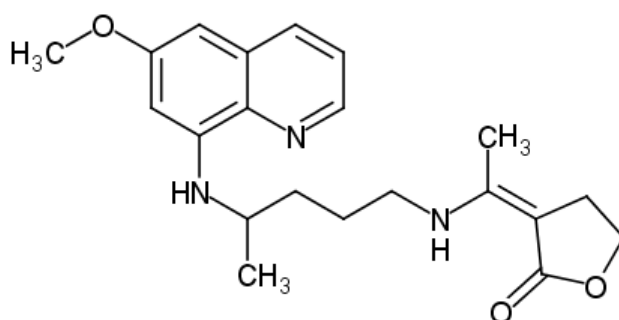
Mata i sur. (2012.) problem brze metabolizacije primakina u karboksiprimakin pokušavaju spriječiti sintezom karbamatnih prolijekova. Sintetizirana je serija *O*-alkil i *O*-aril karbamata. Dolazi do spore aktivacije u homogenatu jetre štakora obje serije prolijekova. Etil i *n*-heksil karbamatni derivati značajno su smanjili broj oocista u komarcima u usporedbi s kontrolnom skupinom, što je bitno za razvoj karbamatnih derivata primakina u antimalarike.

Klorokin je uz primakin glavni antimalarijski lijek. Zbog niske cijene, lake dostupnosti i brzog odgovora on je prvi izbor kod liječenja malarije u krvnoj fazi. Uslijed razvitka rezistencije na klorokin, znanstvenici su pokušali poboljšati njegova svojstva sintetiziranjem klorokinsko-primakinskih hibrida spajanjem amino skupine bočnog lanca primakina s klorokinskim farmakoforom. Sintetizirani hibridi (Slika 10) pokazali su se izuzetno potentnima *in vivo* i *in vitro*. Također, pokazali su se efektivnima u liječenju relapsirajuće malarije uzrokovane *P. vivax* (Mushtaque, 2015.).



Slika 10. Hibrid klorokina i primakina

Pinto i sur. patentirali su kombinaciju antimalarijskih lijekova koja se sastoji od klorokina i primakinskog derivata (3-[1-[4-[(6-metoksi-8-kinolinaminopentil)amino]etiliden]-dihidro-2(3)-furanon) (Slika 11). Prema patentu pacijent koji boluje od relapsirajuće malarije može se potpuno izliječiti kroz 6 dana. Također, autor navodi da je aktivnost i toksičnost hibridnog lijeka superiorna u odnosu na odvojeno uzimanje ta dva lijeka (Mushatque, 2015.).



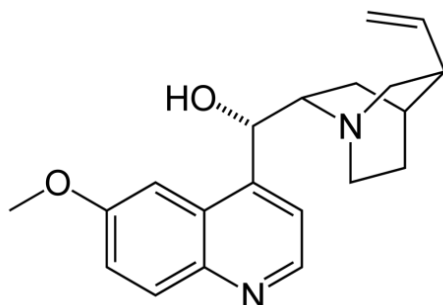
Slika 11. Primakinski derivat korišten u kombinaciji s klorokinom

1.4. Citotoksičnost derivata primakina

Potencijal za otkriće novog citostatika među antimalaricima prvi put je otkriven kod artemizininina i njegovih derivata. Od 21 antimalarika na WHO listi, kod dvije trećine otkrivena je antitumorska aktivnost, koja se ispituje u kliničkim studijama (Duffy, i sur., 2012).

Znanstvenici su otkrili da kinidin (Slika 12), prirodni antimalarik kinolinske strukture, zaustavlja rast i diferencijaciju ljudskih stanica karcinoma dojke, što je bio okidač za nova istraživanja u kojima su ispitali *in vitro* aktivnost serije ostalih antimalarika kinolinske

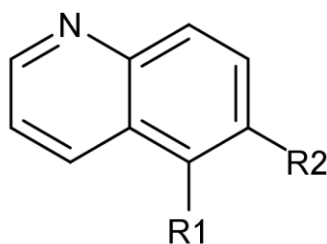
strukture na stanice karcinoma dojke. Primakin je dao podijeljene rezultate, dok su se kinolini sa supstuentima na položaju C4 pokazali najučinkovitijima (Martirosyan i sur., 2004).



Slika 12. Kinidin

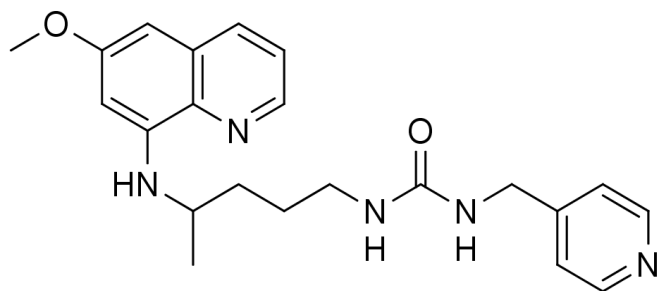
Kamptotecin je prvi spoj kod kojeg je otkrivena citostatska aktivnost te su na temelju tih istraživanja sintetizirani analozi koji također imaju kinolinski prsten u strukturi - topotekan, irinotekan i eksatekan. Istraživanjima se ustanovilo da kinolinski prsten ima važnu ulogu u citostatskoj aktivnosti te su sintetizirane serije analoga koje su pokazale širok spektar antitumorskog djelovanja (Afzal i sur., 2014).

Daljnijim istraživanjem derivata kinolina ispitano je citostatsko djelovanje kinolina supstituiranih na poziciji 5 i 6 (Slika 13) i primakina na 3 različite tumorske stanične linije. Rezultati ukazuju da kinolini sa supstuentima na položajima 5 i 6 kinolinskog prstena inaktivni, dok je primakin imao najveću aktivnost od svih ispitivanih spojeva prema linijama MCF-7 i Caco-2. Važnost ovog istraživanja je u tome što otkriva važnost 4-amino-1-metilbutil alifatskog lanca na C8 amino skupini za antitumorsko djelovanje (Fernandes i sur., 2009).



Slika 13. Opća struktura kinolina supstituiranih na položajima 5 i 6

N-alkilni, cikloalkilni i aril urea derivati ispitani su na citostatsku i antivirusnu aktivnost te je piridinski derivat (slika 14) pokazao najjaču citostatsku aktivnost, ali i značajnu toksičnost. Cikloheksilni, feniletilni i cikloheksanmetilni derivati su pokazali umjereno antitumorsko djelovanje, i nisu bili citotoksični za normalne ljudske fibroblaste. Istraživanjem je ustanovljeno da derivati uree imaju najveću selektivnost prema tumorskim stanicama (Džimbeg i sur., 2008).

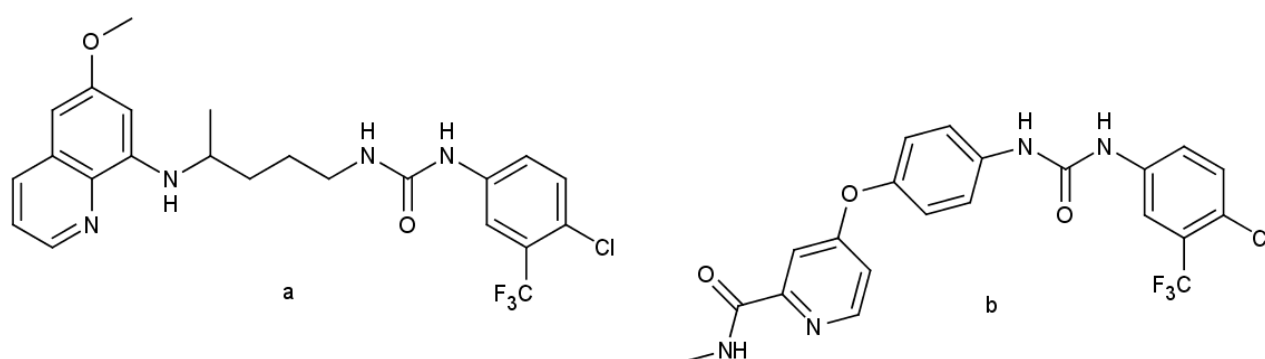


Slika 14. Najaktivniji derivat iz serije *N*-supstiruiranih urea primakina

Šimunović i suradnici (2009) sintetizirali su urea derivate primakina s jednom ili više hidroksilnih skupina na *N*-supstituentu te karbamatne derivate primakina. Ti derivati posjeduju jaku antioksidativnu aktivnost i svojstvo inhibicije lipidne peroksidaze. Urea derivati primakina pokazali su antiproliferativnu aktivnost sličnu onoj primakina. Najveću specifičnost prema SW620 staničnoj liniji (stanice raka kolona) pokazala je hidroksipentil urea. *O*-benzilni derivat bio je jednako aktivan kao piridinski derivat iz prethodne serije. Iz toga možemo zaključiti da su dušik ili kisik (elektrofilni atomi) bitni za citostatsku aktivnost.

U daljnim istraživanjima, sintetizirani su i ispitani derivati bogatiji dušikovim/kisikovim atomima, 1,4-supstituirani semikarbazidi u kojima je primakinski ostatak karbonilnom skupinom povezan s N1 atomom, a na poziciju N4 semikarbazida su vezani cikloalkilni, arilni, benziloksi ili hidroksi supstituent. Svi sintetizirani primakinski semikarbazidi su pokazali visoku selektivnost naspram MCF-7 linije (karcinom dojke). Benzhidrilni derivat pokazao je značajnu citostatsku aktivnost prema svim ispitivanim tumorskim staničnim linijama. Rezultati dobiveni ispitivanje semikarbazidnih derivata NSAID (Perković i sur., 2012), pokazuje slični obrazac aktivnosti, gdje je prisutnost velike lipofilne skupine semikarbazida uvjet za citostatsku aktivnost, dok je drugi dio molekule manje bitan za antiproliferativnu aktivnost (Perković i sur., 2013).

U daljnjim istraživanjima sintetizirani su urea i semikarbazidni derivati primakina s velikim arilnim supstituentima. Urea derivati bili su manje aktivni od semikarbazidnih analoga. Urea analog sličan citostatiku sorafenibu pokazao se najaktivnijim (Slika 15). Iz ovih rezultata može se zaključiti da je primakinski ostatak presudan za citostatsko djelovanje novih urea i semikarbazida te da su lipofilni ostatci vrlo bitni za antiproliferativan učinak. Mnogi derivati iz ove serije pokazali su veću selektivnost prema MCF-7 linij nego prethodni primakinski derivati (Pavić i sur., 2014).



Slika 15. Najaktivniji urea derivat primakina (a) i citostatik sorafenib (b)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada bio je sintetizirati i karakterizirati tri nova urea i semikarbazidna derivata primakina sa supstituiranim benzenskim prstenom. U daljnim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, ispitat će se antitumorsko djelovanje sintetiziranih spojeva.

3. MATERIJALI I METODE

Tališta (t_r) su određena na Stuart SMP3 instrumentu (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana. Iskorištenja nisu optimirana.

Za tankoslojnu kromatografiju upotrijebljene su silikagel ploče 60F-254 (Kemika, Hrvatska) te cikloheksan /EtOAc/MeOH (3:1:0,5), diklormetan/MeOH (97:3, 95:5, 92:8, 9:1), diklormetan/MeOH (9:1), diklormetan/MeOH (95:5) i EtOAc/cikloheksan (2:1) u omjeru 1:1, te diklormetan/MeOH (95:5) i petroleter/EtOAc (3:1) u omjeru 2:1 kao pokretne faze. Supstance su vizualizirane pod kratkovalnim UV-svjetlom te uz pare joda.

Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063-0,200 nm (Merck, Njemačka), a diklormetan/metanol (95:5, 9:1, 92:8) kao pokretne faze. Analizirani spojevi su detektirani UV zračenjem ($\lambda = 254\text{nm}$) i parama joda. IR spektri snimljeni su na Paragon FT -IR spektrofotometru (Perkin Elmer, UK). NMR spektri snimljeni su Bruker AV -600 spektrometrom (Bruker, USA) kod 300,13 MHz za ^1H , odnosno kod 75,47 MHz za ^{13}C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO - d_6 otopinama 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 (HPLC, Agilent Technologies 1200 Series, MS, Agilent Technologies 6410 Triple Quad).

Primakin difosfat, benzotriazol, trifozgen, hidrazin hidrat i trietilamin (TEA), 3-hidroksianilin, 4-hidroksianilin, 4-bromanilin nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD). Sve ostale kemikalije bile su *p.a.* čistoće.

Sve reakcije s primakinom izvođene su uz zaštitu od svjetlosti.

U eksperimentalnom dijelu korištena su bezvodna otapala. Bezvodni toluen dobiven je sljedećim postupkom: toluen je ekstrahiran vodom, zatim osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destiliran i čuvan nad elementarnim natrijem. Bezvodni dioksan dobiven je refluksiranjem nad natrijem 24 h. Potom je destiliran i čuvan nad elementarnim natrijem.

Klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (**1**) pripravljen je prema poznatom propisu (Kalčić i sur., 2003) te je bez daljnjeg čišćenja upotrijebljen u sljedećem reakcijskom koraku.

Benzotriazolid primakina (**4**) također je pripremljen prema poznatom propisu (Džimbeg i sur., 2008) i bez pročišćavanja upotrijebljen za sintezu primakinskog semikarbazida prema postupku opisanom u literaturi (Pavić i sur., 2014).

3.1. SINTEZA KLORIDA 1-BENZOTRIAZOLKARBOKSILNE KISELINE (BtcCl, 1)

Reakcijska smjesa koja se sastojala od 0,596 g (0,005 mol) benzotriazola i 0,815 g (0,00272 mol) trifozgena u suhom toluenu refluksirana je 3 sata na 115 °C, zatim uparena te naparena suhim toluenom (20 ml). Sirovi produkt je korišten u sljedećem koraku bez izolacije.

3.2. SINTEZE 1-KARBAMOILBENZOTRIAZOLA 2a-c

3.2.1. Sinteza 1-(N-(3-hidroksifenil)karbamoil)benzotriazola (2a)

Otopina BtcCl (1) u suhom dioksanu dokapana je u smjesu 0,546 g (0,005 mol) 3-aminofenola, 0,507 g (0,005 mol) TEA i 55 ml suhog dioksana. Reakcijska smjesa je miješana 1 sat, a zatim je višak otapala uparen pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je pomoću kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5). Naknadnim rastrljavanjem u eteru dobiven je produkt **2a**.

Iskorištenje: 0,406 g (32%)

$t_f = 147,0\text{--}148,8\text{ }^{\circ}\text{C}$

IR (KBr, ν_{max} / cm^{-1}): 3385, 3164, 1748, 1615, 1604, 1551, 1449, 1251, 1069, 842, 791, 773, 752

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm): 10,98 (s, 1H, 1''), 9,55 (s, 1H, 7'), 8,28-8,24 (m, 2H, 3,6), 7,79-7,74 (m, 1H, 5), 7,62-7,57 (m, 1H, 4), 7,38-7,16 (m, 3H, 2', 5', 6'), 6,65-6,60 (m, 1H, 4')

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm): 158,15 (3'), 147,29 (1), 146,03 (7), 138,68 (1'), 131,97 (2), 130,54 (5), 129,94 (5'), 126,22 (4), 120,36 (6), 114,20 (3), 112,29, 112,28 (4', 6'), 108,65 (2')

3.2.2. Sinteza 1-(N-(4-hidroksifenil)karbamoil)benzotriazola (2b)

Sinteza ovog spoja je prethodno opisana (Rajić Džolić i sur., 2015, *in press*). Otopina BtcCl (1) u suhom dioksanu dokapana je u smjesu 0,545 g (0,005 mol) 4-aminofenola, 0,507 g (0,005 mol) TEA i 55 ml suhog dioksana te je reakcijska smjesa miješana 2 sata. Višak otapala je uparen pod sniženim tlakom. Talog je rastrljan u eteru i odsisan, a preostala matičnica također je uparena i obrađena aktivnim ugljenom te je talog spojen s prethodnim u produkt **2b**.

Iskorištenje: 1,004 g (79%)

$t_f = 240\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura raspada)

IR (KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3456, 3252, 1726, 1544, 1616, 1544, 1618, 1488, 1446, 1370, 1236, 1212, 1060, 926, 825, 146, 583

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm): 10,89 (s, 1H, 1''), 9,41 (s, 1H, 7'), 8,25-8,23 (m, 2H, 3,6), 7,76-7,73 (m, 1H, 5), 7,60-7,57 (m, 3H, 4, 2', 6'), 6,83-6,81 (m, 2H, 3', 5')

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm): 154,61 (4'), 146,99 (1), 145,50 (7), 131,47 (2), 129,94 (5), 128,40 (1'), 125,62 (4), 123,19 (2', 6'), 119,81 (6), 115,18 (3', 5'), 114,20 (3)

3.2.3. Sinteza 1-(N-(4-bromfenil)karbamoil)benzotriazola (2c)

Otopina BtcC (**1**) dokapana je u smjesu 0,860 g (0,005 mol) 4-bromanilina, 0,507 g (0,005 mol) TEA i 30ml suhog dioksana. Nakon 1 h reakcijska smjesa je uparena, a dobiveni talog otopljen u etilacetatu. Organski sloj je ekstrahiran destiliranom vodom (3x15 ml) i osušen nad bezvodnim Na_2SO_4 , filtriran te uparen pod sniženim tlakom. Rastrljavanjem u eteru dobiven je produkt **2c**.

Iskorištenje: 1,300 g (82%)

$t_t = 196,0\text{--}198,2\text{ }^\circ\text{C}$

IR (KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3248, 3103, 3048, 1741, 1596, 1543, 1534, 1486, 1446, 1400, 1367, 1285, 1238, 1127, 1099, 1053, 928, 827, 808, 750

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm): 11,29 (s, 1H, 1''), 8,28-8,24 (m, 2H, 3,6), 7,84-7,75 (m, 3H, 5, 2', 6'), 7,65-7,58 (m, 3H, 4, 3', 5')

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm): 146,96 (1), 145,55 (7), 136,75 (1'), 131,50 (3', 5'), 131,29 (2), 130,20 (5), 125,84 (4), 120,20 (2', 6'), 119,94 (6), 113,73 (3), 113,36 (4')

3.3. SINTEZE UREA DERIVATA PRIMAKINA 3a-c

3.3.1. Sinteza 1-(3-hidroksifenil)-3-(4((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)uree (3a)

Suspencija 0,227 g (0,0005 mol) primakin difosfata i 0,152 g (0,0015 mol) TEA u diklormetanu (10 ml) miješana je 10 min na s.t., zatim je dodano 0,127 g (0,0005 mol) 1-(N-(3-hidroksifenil)karbamoil)benzotriazola (**2a**). Reakcijska smjesa miješana je 3,5 sati na s.t. Zatim je uparena pod sniženim tlakom. Čisti produkt **3a** dobiven je pročišćavanjem pomoću kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5).

Iskorištenje: 0,156 g (66%)

t_t - (ulje)

IR (KBr, $\nu_{\max}$ /cm⁻¹): 3368, 2936, 2866, 1656, 1610, 1559, 1521, 1452, 1386, 1338, 1225, 1163, 1053, 973, 824, 781

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ /ppm): 9,17 (s, 1H, 7'), 8,54-8,53 (dd, 1H, 11, J = 1,41, 2,63), 8,24 (s, 1H, 1''), 8,08-8,06 (dd, 1H, 13, J = 1,42, 6,84), 7,43-7,41 (m, 1H, 12), 6,98 (s, 1H, 2'), 6,96 (t, 1H, 5', J = 8,04), 6,71 (d, 1H, 6'), 6,47 (d, 1H, 17), 6,29-6,28 (m, 2H, 4', 15), 6,14 (d, 1H, 8, J = 8,75), 6,08 (t, 1H, 2, J = 5,54), 3,82 (s, 3H, 18), 3,66-3,63 (m, 1H, 6), 3,11-3,09 (q, 2H, 3, J = 5,72), 1,70-1,49 (m, 4H, 4, 5), 1,23 (d, 3H, 7, J = 6,36)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ /ppm): 158,99 (16), 157,61 (3'), 155,08 (1), 144,63 (9), 144,23 (11), 143,59 (1'), 142,88 (3'), 134,77 (13), 134,51 (10), 129,56 (14), 129,16 (5'), 122,06 (12), 108,39 (6'), 108,08 (4'), 104,72 (2'), 96,12 (17), 91,64 (15), 54,95 (18), 47,05 (6), 39,02 (3), 33,51 (5), 26,64 (4), 20,22 (7)

3.3.2. Sinteza 1-(4-hidroksifenil)-3-(4((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)uree (3b)

Suspencija 0,228 g (0,0005 mol) primakin difosfata i 0,156 g (0,0015 mol) TEA u diklormetanu (10 ml) je miješana 10 min na s.t., zatim je dodano 0,127 g (0,0005 mol) 1-(*N*-(4-hidroksifenil)karbamoyl)benzotriazola (**2b**). Reakcijska smjesa miješana je 3,5 sati na s.t. Zatim je uparena pod sniženim tlakom. Čisti produkt **3b** dobiven je pročišćavanjem pomoću kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5) i rastrljavanjem u eteru.

Iskorištenje: 0,173 g (73%)

t_r = 148,0–152,8 °C

IR (KBr, $\nu_{\max}$ /cm⁻¹): 3419, 3326, 2934, 2865, 1683, 1659, 1616, 1576, 1556, 1515, 1455, 1424, 1388, 1223, 1204, 1159, 1101, 1054, 1036, 967, 906, 828, 788

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ /ppm): 8,91 (s, 1H, 7'), 8,55-8,53 (dd, 1H, 11, J = 1,73, 2,31), 8,09-8,06 (dd, 1H, 13, J = 1,73, 6,36), 8,00 (s, 1H, 1''), 7,44-7,40 (m, 1H, 12), 7,13 (d, 2H, 2', 6', J = 8,67), 6,62 (d, 2H, 3', 5', J = 9,25), 6,47 (d, 1H, 17, J = 2,31), 6,28 (d, 1H, 15, J = 2,31), 6,14 (d, 1H, 8, J = 8,67), 5,98 (t, 1H, 2, J = 5,78), 3,82 (s, 3H, 18), 3,67-3,63 (m, 1H, 6), 3,11-3,06 (q, 2H, 3, J = 5,78), 1,68-1,48 (m, 4H, 4, 5), 1,23 (d, 3H, 7, J = 5,78)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ /ppm): 158,98 (16), 155,52 (1), 151,84 (4'), 144,62 (9), 144,21 (11), 134,76 (13), 134,49 (10), 132,06 (1'), 129,55 (14), 122,05 (12), 119,82 (2', 6'), 115,00 (3', 5'), 96,11 (17), 91,63 (15), 54,94 (18), 47,05 (6), 39,09 (3), 33,50 (5), 26,72 (4), 20,20 (7)

3.3.3. Sinteza 1-(4-bromfenil)-3-(4((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)uree (3c)

Suspencija 0,227 g (0,0005 mol) primakin difosfata i 0,152 g (0,0015 mol) TEA u diklormetanu (10 ml) je miješana 10 min na s.t., zatim je dodano 0,158 g (0,0005 mol) 1-(N-(4-bromfenil)karbamoil)benzotriazola (**2c**). Reakcijska smjesa miješana je pola sata na s.t. Zatim je uparena pod sniženim tlakom. Dobiveni talog otopljen je u diklormetanu, a organski sloj je ekstrahiran 5%-tnom otopinom NaOH (3x10 ml) i destiliranom vodom (3x15 ml), osušen nad bezvodnim Na₂SO₄, filtriran te uparen pod sniženim tlakom. Čisti produkt **3c** dobiven je rastrljavanjem u eteru i petroleteru.

Iskorištenje: 0,181 g (66%)

$t_f = 107,2-109,3\text{ }^{\circ}\text{C}$

IR (KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3324, 2969, 2936, 2861, 1638, 1619, 1595, 1585, 1522, 1490, 1456, 1424, 1388, 1304, 1289, 1238, 1206, 1158, 1112, 1050, 1006, 964, 820, 792

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ/ppm): 8,54-8,53 (m, 2H, 11, 1''), 8,09-8,06 (dd, 1H, 13, $J = 1,47, 6,84$), 7,44-7,40 (m, 1H, 12), 7,36 (s, 4H, 2', 3', 5', 6'), 6,47 (d, 1H, 17, $J = 2,44$), 6,28 (d, 1H, 15, $J = 1,95$), 6,20 (t, 1H, 2, $J = 5,37$), 6,14 (d, 1H, 8, $J = 8,79$), 3,81 (s, 3H, 18), 3,67-3,61 (m, 1H, 6), 3,12-3,07 (q, 2H, 3, $J = 5,37$), 1,69-1,51 (m, 4H, 4, 5), 1,22 (d, 3H, 7, $J = 6,35$)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ/ppm): 158,99 (16), 154,97 (1), 144,62 (9), 144,24 (11), 140,00 (1'), 134,80 (13), 134,51 (10), 131,27 (3', 5'), 129,57 (14), 122,10 (12), 119,48 (2', 6'), 112,11 (4'), 96,13 (17), 91,61 (15), 54,96 (18), 47,03 (6), 39,08 (3), 33,46 (5), 26,59 (4), 20,23 (7)

3.4. SINTEZA PRIMAKINSKOG SEMIKARBAZIDA (5)

1,366 g (0.003 mol) primakin difosfata je otopljeno u vodi i zalučeno 5% natrijevim hidroksidom do pH 10. Vodena otopina ekstrahirana je 4x s po 20 ml diklorometana. Organski sloj je osušen nad bezvodnim Na₂SO₄, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni je uljasti produkt žuto-smeđe boje (primakin u obliku baze).

Otopini 0.543 g (0.003 mol) BtCl (**1**) i 0.303 g (0.003 mol) TEA u suhom toluenu dokapana je otopina primakina u suhom toluenu. Nakon 1 h toluen je uparen, reakcijska smjesa ekstrahirana 3x destiliranom vodom, sušena nad bezvodnim Na₂SO₄, filtrirana i uparena. Dobivena je narančasta smola, primakinski benzotriazolid koji je korišten dalje u reakciji bez pročišćavanja (**4**).

Primakinski benzotriazolid (**4**) je otopljen zajedno s 0.300 g (0.006 mol) hidrazin hidrata u 10 ml suhog dioksana, uz dodatak Na-ditionita. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 4 dana. Otapalo je upareno, smjesa ekstrahirana 5 % NaOH (3x10 ml) i destiliranom vodom (3x15 ml), osušena nad bezvodnim Na₂SO₄, filtrirana i uparena. Pročišćavanjem pomoću

kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5) i prekrizacijom iz etera dobiven je čisti produkt 5.

Iskorištenje: 81%

$t_r = 109\text{--}110.5\text{ }^\circ\text{C}$

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

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm): 8,54-8,53 (dd, 1H, 11), 8,09-8,06 (dd, 1H, 13), 7,44-7,41 (m, 1H, 12), 6,84 (s, 1H, 1'), 6,47 (d, 1H, 17), 6,34 (t, 1H, 2, D₂O exchangeable), 6,26 (d, 1H, 15), 6,11 (d, 1H, 8, D₂O exchangeable), 4,03 (s, 2H, 2''), 3,82 (s, 3H, 18), 3,63-3,57 (m, 1H, 6), 3,04-3,01 (q, 2H, 3), 1,68-1,45 (m, 4H, 4,5), 1,21 (d, 3H, 7)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm): 160,23 (16), 159,00 (1), 144,63 (9), 144,28 (11), 134,80 (13), 134,51 (10), 129,57 (14), 122,11 (12), 96,09 (17), 91,59 (15), 54,98 (18), 47,05 (6), 38,88 (3), 33,44 (5), 27,00 (4), 20,20 (7)

3.5. SINTEZE SEMIKARBAZIDNIH DERIVATA PRIMAKINA 6a-c

3.5.1. Sintaza N^1 -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil- N^2 -(3-hidroksifenil)hidrazin-1,2-dikarboksamida (6a)

Suspenciji 0,159 g (0,0005 mol) primakin-semikarbazida 5 u diklormetanu (10 ml) dodano je 0,127 g (0,0005 mol) 1-(N -(3-hidroksifenil)karbamoil)benzotriazola (2a) i 0,0505 g (0,0005 mol) TEA. Reakcijska smjesa miješana je 4 sata na s.t. i zatim je uparena pod sniženim tlakom. Čisti produkt 6a dobiven je pročišćavanjem kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (9:1) te rastrljavanjem u eteru i petroleteru.

Iskorištenje: 0,166 g (70%)

$t_r = 196,6\text{--}198,7\text{ }^\circ\text{C}$

IR (KBr, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3323, 3097, 2934, 1669, 1611, 1523, 1455, 1386, 1311, 1206, 1160, 1053, 1032, 973, 823, 776,

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm): 9,24 (s, 1H, 7'), 8,54-8,53 (dd, 1H, 11, $J = 1,41, 2,63$), 8,47 (s, 1H, 4''), 8,08-8,07 (dd, 1H, 13, $J = 7,71$), 7,73, 7,60 (2s, 2H, 1'', 2''), 7,43-7,41 (m, 1H, 12), 7,06 (s, 1H, 2'), 6,99 (t, 1H, 5', $J = 7,71$), 6,80 (d, 1H, 6', $J = 7,71$), 6,47 (m, 2H, 2, 17), 6,35-6,34 (d, 1H, 4', $J = 7,71$), 6,27-6,26 (d, 1H, 15), 6,11 (d, 1H, 8, $J = 8,31$), 3,83 (s, 3H, 18), 3,65-3,61 (m, 1H, 6), 3,08-3,02 (m, 2H, 3), 1,64-1,48 (m, 4H, 4, 5), 1,21 (d, 3H, 7, $J = 5,93$)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm): 158,99 (16), 158,64 (1), 157,57 (3'), 155,82 (3''), 144,63 (9), 144,23 (11), 140,71 (1'), 134,77 (13), 134,51 (10), 129,56 (14), 129,16 (5'), 122,07

(12), 109,16 (6'), 108,89 (4'), 105,47 (2'), 96,08 (17), 91,61 (15), 54,97 (18), 47,04 (6), 39,23 (3), 33,41 (5), 26,66 (4), 20,20 (7)

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

Suspenciji 0,159 g (0,0005 mol) primakin-semikarbazida **5** u diklormetanu (10 ml) dodano je 0,127 g (0,0005 mol) 1-(N -(4-hidroksifenil)karbamoil)benzotriazola (**2b**) i 0,0505 g (0,0005 mol) TEA. Reakcijska smjesa miješana je 4 sata na s.t. i zatim je uparena pod sniženim tlakom. Čisti produkt **6b** dobiven je pročišćavanjem kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (9:1) te rastrljavanjem u eteru.

Iskorištenje: 0,166 g (70%)

$t_f = 119\text{--}121,4\text{ }^\circ\text{C}$

IR (KBr, $\nu_{\max}$ / cm^{-1}): 3289, 3098, 2936, 1666, 1614, 1553, 1518, 1454, 1386, 1330, 1223, 1166, 1051, 827, 790

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm): 8,91 (bs, 1H, 7'), 8,56-8,54 (dd, 1H, 11, $J = 1,40, 2,81$), 8,34 (s, 1H, 4''), 8,12-8,09 (dd, 1H, 13, $J = 1,40, 6,74$), 7,69, 7,59 (2s. 2H, 1'', 2''), 7,46-7,42 (m, 1H, 12), 7,23 (d, 2H, 2', 6', $J = 8,99$), 6,64 (d, 2H, 3', 5', $J = 8,99$), 6,49-6,48 (d+t, 2H, 2, 17), 6,28 (d, 1H, 15, $J = 2,25$), 6,18 (bs, 1H, 8), 3,82 (s, 3H, 18), 3,67-3,60 (m, 1H, 6), 3,08-3,02 (q, 2H, 3, $J = 6,74$), 1,65-1,46 (m, 4H, 4, 5), 1,20 (d, 3H, 7, $J = 6,18$)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm): 159,05 (16), 158,72 (1), 156,28 (3''), 152,40 (4'), 144,43 (9), 144,10 (11), 135,15 (13), 134,14 (10), 131,15 (1'), 129,66 (14), 122,11 (12), 120,55 (2', 6'), 114,96 (3', 5'), 96,39 (17), 91,75 (15), 55,02 (18), 47,13 (6), 39,23 (3), 33,36 (5), 26,67 (4), 20,17 (7)

3.5.3. Sinteza N^1 -(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)- N^2 -(4-bromfenil)hidrazin-1,2-dikarboksamida (**6c**)

Suspenciji 0,159 g (0,0005 mol) primakin-semikarbazida **5** u diklormetanu (10 ml) dodano je 0,159 g (0,0005 mol) 1-(N -(4-bromfenil)karbamoil)benzotriazola (**2c**) i 0,0505 g (0,0005 mol) TEA. Reakcijska smjesa miješana je 24 sata na s.t. i zatim je uparena pod sniženim tlakom. Dobiveni talog otopljen je u etil-acetatu, a organski sloj je ekstrahiran 5%-tnom otopinom NaOH (3x10 ml) i destiliranom vodom (3x15ml), te je višak otapala uparen pod sniženim tlakom bez prethodnog sušenja. Čisti produkt **6c** dobiven je pročišćavanjem kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (92:8) te rastrljavanjem u eteru i petroleteru.

Iskorištenje: 0,211 g (77%)

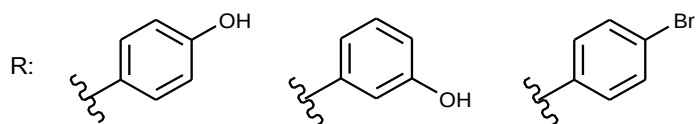
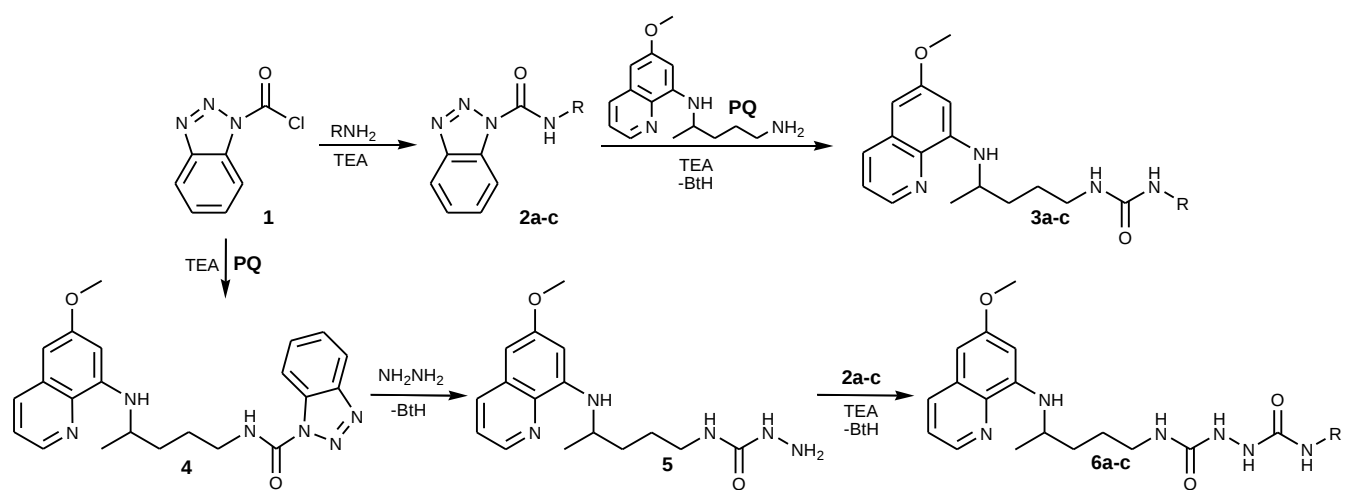
$t_f = 172,5\text{--}174,0\text{ }^{\circ}\text{C}$

IR (KBr, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3289, 3236, 3101, 2932, 1672, 1595, 1526, 1457, 1389, 1325, 1211, 1161, 1053, 822, 789

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm): 8,78 (s, 1H, 4"), 8,53-8,52 (dd, 1H, 11, $J = 1,37, 2,75$), 8,08-8,06 (dd, 1H, 13, $J = 1,37, 6,87$), 7,89, 7,63 (s, 1H, 1", 2"), 7,47 (d, 2H, 2', 6', $J = 8,93$), 7,43-7,41 (m, 1H, 12), 7,38 (d, 2H, 3', 5', $J = 8,93$), 6,78 (t, 1H, 2), 6,47 (d, 1H, 17, $J = 2,40$), 6,26 (d, 1H, 15, $J = 2,40$), 6,11 (d, 1H, 8, $J = 8,59$), 3,82 (s, 3H, 18), 3,64-3,60 (m, 1H, 6), 3,07-3,03 (m, 2H, 3), 1,66-1,47 (m, 4H, 4, 5), 1,20 (d, 3H, 7, $J = 6,18$)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm): 158,97 (16), 158,52 (1), 155,88 (3"), 144,61 (9), 144,20 (11), 139,18 (1'), 134,75 (13), 134,49 (10), 131,19 (3', 5'), 129,54 (14), 122,05 (12), 120,43 (2', 6'), 113,11 (4'), 96,06 (17), 91,59 (15), 54,95 (18), 47,03 (6), 39,20 (3), 33,39 (5), 26,63 (4), 20,18 (7)

4. REZULTATI I RASPRAVA



Za sintezu urea i semikarbazida izabran je reakcijski put koji uključuje prevođenje supstituiranih anilina u 1-karbamoilbenzotriazole **2a-c**, te potom reakciju dobivenih spojeva s primakinom (PQ) za sintezu urea **3a-c**, odnosno primakinskim semikarbazidom **5** za sintezu semikarbazidnih derivata **6a-c**. Naime, na korištenim anilinima nalaze se elektronakceptorske skupine koje smanjuju nukleofilnost dušikova atoma. Stoga je reakcija uspješnija ukoliko terminalna amino skupina primakina ili primakinskog semikarbazida **5** nukleofilnom supstitucijom zamjenjuje benzotriazol, stvarajući konačne spojeve **3a-c**, **6a-c**, nego da je nukleofil u supstituciji dušikov atom supstituiranih anilina, a benzotriazol vezan za primakin ili primakinski semikarbazid **5**.

Početni spoj u sintezi bio je klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (**1**), koji je pripremljen reakcijom benzotriazola i trifozgena na 115 °C (Kalčić i sur., 2003). Sintetizirani BtcCl (**1**) bez pročišćavanja je upotrijebljen u sintezama 1-karbamiolbenzotriazola **2a-c** i primakinskog benzotriazolida **4**.

1-Karbamoilbenzotriazoli **2a-c** pripremljeni su reakcijom BtcCl (**1**) i odgovarajućeg anilina u suhom dioksanu, uz dodatak trietilamina, koji veže HCl nastalu u reakciji. Nakon završetka reakcije, koji je utvrđen praćenjem reakcije tankoslojnom kromatografijom, reakcijska smjesa otopljena je u etil-acetatu i ekstrahirana destiliranom vodom, osim u slučaju hidroksi derivata, koji se ne mogu na taj način pročišćavati zbog djelomične topljivosti u vodi. Hidroksi derivati pročišćeni su kolonskom kromatografijom, dok su ostali produkti djelomično pročišćeni rastrljavanjem u smjesi etera i petroletera. Naime, 1-karbamoilbenzotriazoli **2a-c** su međuprodukti u sintezama, i ne ispituje im se biološko djelovanje, te je stoga racionalniji pristup izbjegavanje njihovog potpunog pročišćavanja i time smanjenje utrošenog vremena i organskih otapala koji su potrebni za kolonsku kromatografiju.

Primakin komercijalno dolazi u obliku soli, kao primakin difosfat, te ga je prije reakcija potrebno prevesti u oblik baze. Za to su upotrijebljena dva načina. U sintezama urea derivata primakina **3a-c**, primakin difosfat je miješan 15 min uz dvostruko veću količinu TEA. Za sintezu primakinskog benzotriazolida **5** primakin je u oblik baze preveden pomoću 5 % NaOH.

Urea derivati primakina **3a-c** dobiveni su reakcijama 1-karbamoilbenzotriazola **2** s primakinom u diklormetanu, uz dodatak TEA kao katalizatora. BtH koji nastaje u reakciji, uklanja se nakon završetka reakcije ekstrakcijom natrijevom lužinom ($w = 5\%$). Naime, uz dodatak lužine BtH se ionizira i prelazi u vodeni sloj. BtH je moguće ekstrahirati i kiselinom, ali u ovom bi slučaju došlo do nastanka soli uree, te se produkti ne bi mogli razdvojiti

ekstrakcijom. Organski sloj se potom ekstrahira i destiliranom vodom. U reakcijama u kojima su produkti bili hidroksi derivati ekstrakcija nije provedena zbog mogućnosti otapanja produkata u vodi, što bi smanjilo iskorištenje reakcije. Čisti produkti dobiveni su pročišćavanjem kolonskom kromatografijom i prekristalizacijama iz odgovarajućih otapala, ovisno o njihovoj topljivosti.

Primakinski benzotriazolid **4** dobiven je reakcijom primakina i BtcCl (**1**) prema već opisanom postupku (Džimbeg i sur., 2008).

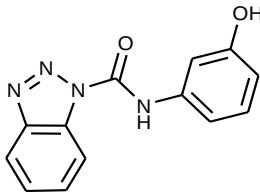
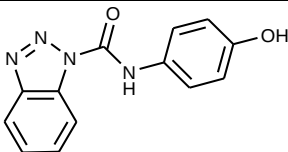
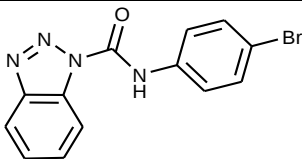
Primakinski semikarbazid **5** dobiven je reakcijom primakinskog benzotriazolida **4** s dvostrukom količinom hidrazin monohidrata u suhom dioksanu (Pavić i sur., 2014).

Semikarbazidi primakina **6a-c** dobiveni su reakcijom primakinskog semikarbazida **5** i odgovarajućeg 1-karbamoilbenzotriazola **2a-c** u diklormetanu, pri sobnoj temperaturi. Provedena je ekstrakcija u lužnatom radi uklanjanja BtH i potom vodom, osim u slučaju hidroksi derivata. Čisti produkti dobiveni su pročišćavanjem kolonskom kromatografijom i prekristalizacijom iz odgovarajućeg otapala.

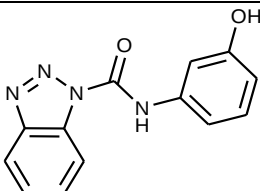
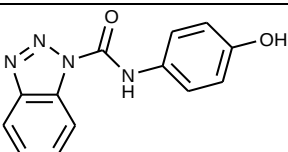
Sve sintetizirane uree i semikarbazidi primakina su novi, u literaturi dosad neopisani spojevi. Svi odgovarajući prekursorski 1-karbamoilbenzotriazoli **2a-c**, osim spoja **2a** su također novi spojevi.

Svi 1-karbamoilbenzotriazoli, uree i semikarbazidi karakterizirani su uobičajenim spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS), te je čvrstim produktima određeno talište. Analitički i spektroskopski podaci za sve sintetizirane spojeve prikazani su u tablicama.

Tablica 1. Analitički podaci za 1-karbamoilbenzotriazole 2a-c

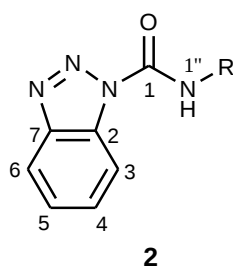
Spoj	Struktura	Molekulska formula (M_r)	Iskorištenje (%)	t_r (°C)
2a		$C_{13}H_{10}N_4O_2$ (254,24)	32	147,0–148,8
2b		$C_{13}H_{10}N_4O_2$ (254,24)	79	240 (raspad)
2c		$C_{13}H_9BrN_4O$ (317,14)	82	196,0–198,2

Tablica 2. IR i MS spektroskopski podaci za 1-karbamoilbenzotriazole 2a-c

Spoj	Struktura	IR (KBr) ν_{max} (cm ⁻¹)	MS (m/z)
2a		3385, 3164, 1748, 1615, 1604, 1551, 1449, 1251, 1069, 842, 791, 773, 752	BtH fragment; 120,2 (M+1) ⁺
2b		3456, 3252, 1726, 1544, 1616, 1544, 1618, 1488, 1446, 1370, 1236, 1212, 1060, 926, 825, 146, 583	277,1 (M+23) ⁺ , BtH fragment 120,1 (R ² H+1) ⁺

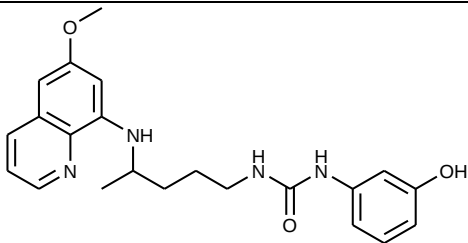
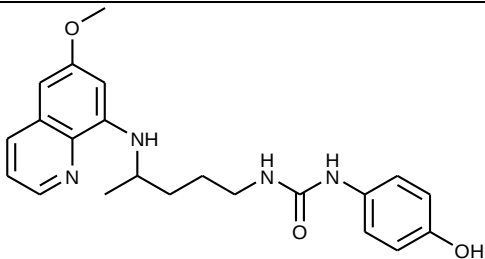
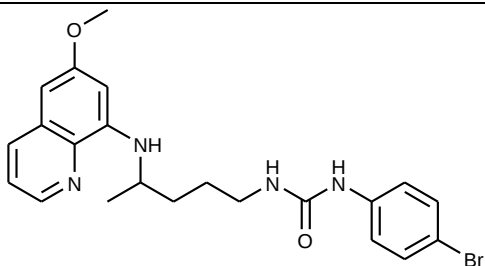
2c		3248,	3103,	3048,	1741,	BtH fragment; 120,1 (M+1) ⁺
		1596,	1543,	1534,	1486,	
		1446,	1400,	1367,	1285,	
		1238,	1127,	1099,	1053,	
		928,	827,	808,	750	

Tablica 3. ¹H i ¹³C NMR spektroskopski podaci za 1-karbamoilbenzotriazole 2a-c

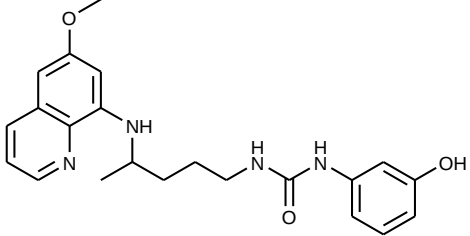
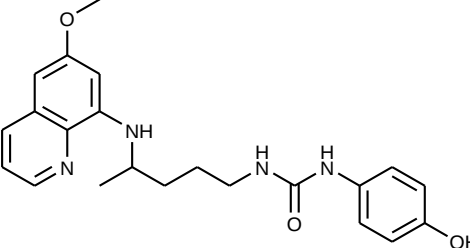
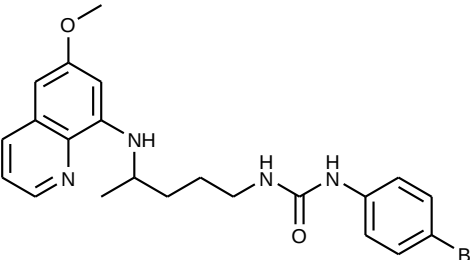


Spoj	R	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm, J/Hz)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm, J/Hz)
2a		10,98 (s, 1H, 1''), 9,55 (s, 1H, 7'), 8,28-8,24 (m, 2H, 3,6), 7,79-7,74 (m, 1H, 5), 7,62-7,57 (m, 1H, 4), 7,38-7,16 (m, 3H, 2', 5', 6'), 6,65-6,60 (m, 1H, 4')	158,15 (3'), 147,29 (1), 146,03 (7), 138,68 (1'), 131,97 (2), 130,54 (5), 129,94 (5'), 126,22 (4), 120,36 (6), 114,20 (3), 112,29, 112,28 (4', 6'), 108,65 (2')
2b		10,89 (s, 1H, 1''), 9,41 (s, 1H, 7'), 8,25-8,23 (m, 2H, 3,6), 7,76-7,73 (m, 1H, 5), 7,60-7,57 (m, 3H, 4, 2', 6'), 6,83-6,81 (m, 2H, 3', 5')	154,61 (4'), 146,99 (1), 145,50 (7), 131,47 (2), 129,94 (5), 128,40 (1'), 125,62 (4), 123,19 (2', 6'), 119,81 (6), 115,18 (3', 5'), 114,20 (3)
2c		11,29 (s, 1H, 1''), 8,28-8,24 (m, 2H, 3,6), 7,84-7,75 (m, 3H, 5, 2', 6'), 7,65-7,58 (m, 3H, 4, 3', 5')	146,96 (1), 145,55 (7), 136,75 (1'), 131,50 (3', 5'), 131,29 (2), 130,20 (5), 125,84 (4), 120,20 (2', 6'), 119,94 (6), 113,73 (3), 113,36 (4')

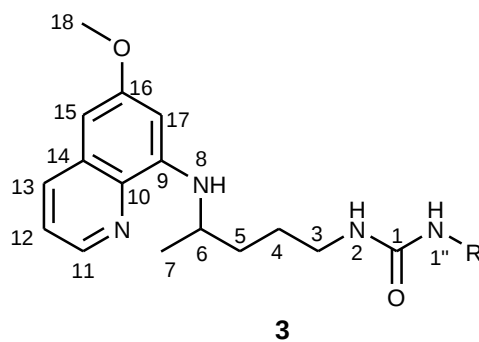
Tablica 4. Analitički podaci za urea derivate primakina 3a-c

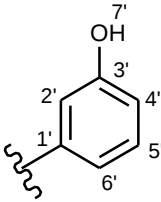
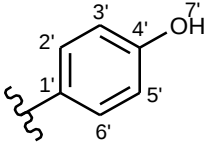
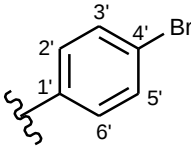
Spoj	Struktura	Molekulska formula (M_r)	Iskorištenje (%)	t_f (°C)
3a		$C_{22}H_{26}N_4O_3$ (394,47)	66	ulje
3b		$C_{22}H_{26}N_4O_3$ (394,47)	73	148,0–152,5
3c		$C_{22}H_{25}BrN_4O_2$ (457,36)	66	107,2–109,3

Tablica 5. IR i MS spektroskopski podaci za urea derivate primakina 3a-c

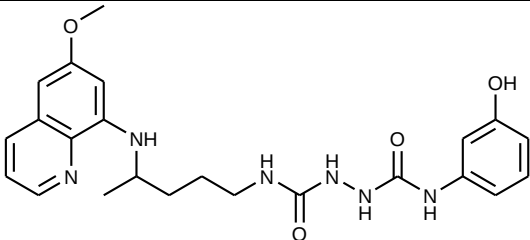
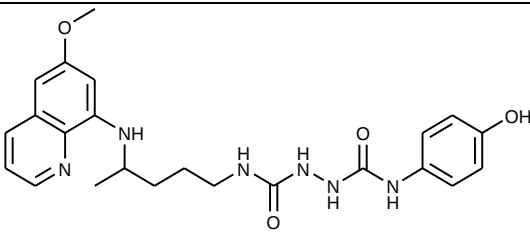
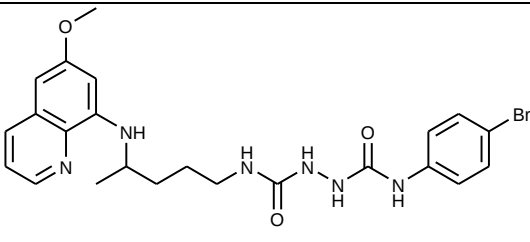
Spoj	Struktura	IR (KBr) ν_{max} (cm ⁻¹)	MS (m/z)
3a		3368, 2936, 2866, 1656, 1610, 1559, 1521, 1452, 1386, 1338, 1225, 1163, 1053, 973, 824, 781	395,3 (M+1) ⁺
3b		3419, 3326, 2934, 2865, 1683, 1659, 1616, 1576, 1556, 1515, 1455, 1424, 1388, 1223, 1204, 1159, 1101, 1054, 1036, 967, 906, 828, 788	395,4 (M+1) ⁺
3c		3324, 2969, 2936, 2861, 1638, 1619, 1595, 1585, 1522, 1490, 1456, 1424, 1388, 1304, 1289, 1238, 1206, 1158, 1112, 1050, 1006, 964, 820, 792	457,1 (M+1) ⁺ 458,2 (M(Br)+1) ⁺

Tablica 6. ¹H i ¹³C NMR spektroskopski podaci za urea derivate primakina (3a-c)



Spoj	R	^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J /Hz)	^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J /Hz)
3a		9,17 (s, 1H, 7'), 8,54-8,53 (dd, 1H, 11, $J = 1,41, 2,63$), 8,24 (s, 1H, 1''), 8,08-8,06 (dd, 1H, 13, $J = 1,42, 6,84$), 7,43-7,41 (m, 1H, 12), 6,98 (s, 1H, 2'), 6,96 (t, 1H, 5', $J = 8,04$), 6,71 (d, 1H, 6'), 6,47 (d, 1H, 17), 6,29-6,28 (m, 2H, 4', 15), 6,14 (d, 1H, 8, $J = 8,75$), 6,08 (t, 1H, 2, $J = 5,54$), 3,82 (s, 3H, 18), 3,66-3,63 (m, 1H, 6), 3,11-3,09 (q, 2H, 3, $J = 5,72$), 1,70-1,49 (m, 4H, 4, 5), 1,23 (d, 3H, 7, $J = 6,36$)	158,99 (16), 157,61 (3'), 155,08 (1), 144,63 (9), 144,23 (11), 143,59 (1'), 142,88 (3'), 134,77 (13), 134,51 (10), 129,56 (14), 129,16 (5'), 122,06 (12), 108,39 (6'), 108,08 (4'), 104,72 (2'), 96,12 (17), 91,64 (15), 54,95 (18), 47,05 (6), 39,02 (3), 33,51 (5), 26,64 (4), 20,22 (7)
3b		8,91 (s, 1H, 7'), 8,55-8,53 (dd, 1H, 11, $J = 1,73, 2,31$), 8,09-8,06 (dd, 1H, 13, $J = 1,73, 6,36$), 8,00 (s, 1H, 1''), 7,44-7,40 (m, 1H, 12), 7,13 (d, 2H, 2', 6', $J = 8,67$), 6,62 (d, 2H, 3', 5', $J = 9,25$), 6,47 (d, 1H, 17, $J = 2,31$), 6,28 (d, 1H, 15, $J = 2,31$), 6,14 (d, 1H, 8, $J = 8,67$), 5,98 (t, 1H, 2, $J = 5,78$), 3,82 (s, 3H, 18), 3,67-3,63 (m, 1H, 6), 3,11-3,06 (q, 2H, 3, $J = 5,78$), 1,68-1,48 (m, 4H, 4, 5), 1,23 (d, 3H, 7, $J = 5,78$)	158,98 (16), 155,52 (1), 151,84 (4'), 144,62 (9), 144,21 (11), 134,76 (13), 134,49 (10), 132,06 (1'), 129,55 (14), 122,05 (12), 119,82 (2', 6'), 115,00 (3', 5'), 96,11 (17), 91,63 (15), 54,94 (18), 47,05 (6), 39,09 (3), 33,50 (5), 26,72 (4), 20,20 (7)
3c		8,54-8,53 (m, 2H, 11, 1''), 8,09-8,06 (dd, 1H, 13, $J = 1,47, 6,84$), 7,44-7,40 (m, 1H, 12), 7,36 (s, 4H, 2', 3', 5', 6'), 6,47 (d, 1H, 17, $J = 2,44$), 6,28 (d, 1H, 15, $J = 1,95$), 6,20 (t, 1H, 2, $J = 5,37$), 6,14 (d, 1H, 8, $J = 8,79$), 3,81 (s, 3H, 18), 3,67-3,61 (m, 1H, 6), 3,12-3,07 (q, 2H, 3, $J = 5,37$), 1,69-1,51 (m, 4H, 4, 5), 1,22 (d, 3H, 7, $J = 6,35$)	158,99 (16), 154,97 (1), 144,62 (9), 144,24 (11), 140,00 (1'), 134,80 (13), 134,51 (10), 131,27 (3', 5'), 129,57 (14), 122,10 (12), 119,48 (2', 6'), 112,11 (4'), 96,13 (17), 91,61 (15), 54,96 (18), 47,03 (6), 39,08 (3), 33,46 (5), 26,59 (4), 20,23 (7)

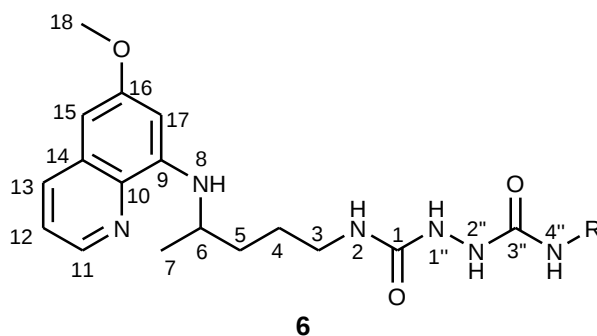
Tablica 7. Analitički podaci za semikarbazidne derivate primakina 6a-c

Spoj	Struktura	Molekulska formula (M_r)	Iskorištenje (%)	t_f (°C)
6a		$C_{23}H_{28}N_6O_4$ (452,51)	70	196,6–198,7
6b		$C_{23}H_{28}N_6O_4$ (452,51)	70	119,0–121,4
6c		$C_{23}H_{27}BrN_6O_3$ (515,4)	77	172,5–174,0

Tablica 8. IR i MS spektroskopski podaci za semikarbazidne derivate primakina 6a-c

Spoj	Struktura	IR (KBr) ν_{max} (cm ⁻¹)	MS (m/z)
6a		3323, 3097, 2934, 1669, 1611, 1523, 1455, 1386, 1311, 1206, 1160, 1053, 1032, 973, 823, 776	453,3 (M+1) ⁺
6b		3289, 3098, 2936, 1666, 1614, 1553, 1518, 1454, 1386, 1330, 1223, 1166, 1051, 827, 790	453,3 (M+1) ⁺
6c		3289, 3236, 3101, 2932, 1672, 1595, 1526, 1457, 1389, 1325, 1211, 1161, 1053, 822, 789	516,2 (M+1) ⁺ 517,2 (M(Br)+1) ⁺

Tablica 9. ¹H i ¹³C NMR spektroskopski podaci za semikarbazidne derivate primakina 6a-c



Spoj	R	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm, J/Hz)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm, J/Hz)
------	---	--	---

6a		9,24 (s, 1H, 7'), 8,54-8,53 (dd, 1H, 11, $J = 1,41, 2,63$), 8,47 (s, 1H, 4''), 8,08-8,07 (dd, 1H, 13, $J = 7,71$), 7,73, 7,60 (2s, 2H, 1'', 2''), 7,43-7,41 (m, 1H, 12), 7,06 (s, 1H, 2'), 6,99 (t, 1H, 5', $J = 7,71$), 6,80 (d, 1H, 6', $J = 7,71$), 6,47 (m, 2H, 2, 17), 6,35-6,34 (d, 1H, 4', $J = 7,71$), 6,27-6,26 (d, 1H, 15), 6,11 (d, 1H, 8, $J = 8,31$), 3,83 (s, 3H, 18), 3,65-3,61 (m, 1H, 6), 3,08-3,02 (m, 2H, 3), 1,64-1,48 (m, 4H, 4, 5), 1,21 (d, 3H, 7, $J = 5,93$) 158,99 (16), 158,64 (1), 157,57 (3'), 155,82 (3''), 144,63 (9), 144,23 (11), 140,71 (1'), 134,77 (13), 134,51 (10), 129,56 (14), 129,16 (5'), 122,07 (12), 109,16 (6'), 108,89 (4'), 105,47 (2'), 96,08 (17), 91,61 (15), 54,97 (18), 47,04 (6), 39,23 (3), 33,41 (5), 26,66 (4), 20,20 (7)
6b		8,91 (bs, 1H, 7'), 8,56-8,54 (dd, 1H, 11, $J = 1,40, 2,81$), 8,34 (s, 1H, 4''), 8,12-8,09 (dd, 1H, 13, $J = 1,40, 6,74$), 7,69, 7,59 (2s, 2H, 1'', 2''), 7,46-7,42 (m, 1H, 12), 7,23 (d, 2H, 2', 6', $J = 8,99$), 6,64 (d, 2H, 3', 5', $J = 8,99$), 6,49-6,48 (d+t, 2H, 2, 17), 6,28 (d, 1H, 15, $J = 2,25$), 6,18 (bs, 1H, 8), 3,82 (s, 3H, 18), 3,67-3,60 (m, 1H, 6), 3,08-3,02 (q, 2H, 3, $J = 6,74$), 1,65-1,46 (m, 4H, 4, 5), 1,20 (d, 3H, 7, $J = 6,18$) 159,05 (16), 158,72 (1), 156,28 (3''), 152,40 (4'), 144,43 (9), 144,10 (11), 135,15 (13), 134,14 (10), 131,15 (1'), 129,66 (14), 122,11 (12), 120,55 (2', 6'), 114,96 (3', 5'), 96,39 (17), 91,75 (15), 55,02 (18), 47,13 (6), 39,23 (3), 33,36 (5), 26,67 (4), 20,17 (7)
6c		8,78 (s, 1H, 4''), 8,53-8,52 (dd, 1H, 11, $J = 1,37, 2,75$), 8,08-8,06 (dd, 1H, 13, $J = 1,37, 6,87$), 7,89, 7,63 (s, 1H, 1'', 2''), 7,47 (d, 2H, 2', 6', $J = 8,93$), 7,43-7,41 (m, 1H, 12), 7,38 (d, 2H, 3', 5', $J = 8,93$), 6,78 (t, 1H, 2), 6,47 (d, 1H, 17, $J = 2,40$), 6,26 (d, 1H, 15, $J = 2,40$), 6,11 (d, 1H, 8, $J = 8,59$), 3,82 (s, 3H, 18), 3,64-3,60 (m, 1H, 6), 3,07-3,03 (m, 2H, 3), 1,66-1,47 (m, 4H, 4, 5), 1,20 (d, 3H, 7, $J = 6,18$) 158,97 (16), 158,52 (1), 155,88 (3''), 144,61 (9), 144,20 (11), 139,18 (1'), 134,75 (13), 134,49 (10), 131,19 (3', 5'), 129,54 (14), 122,05 (12), 120,43 (2', 6'), 113,11 (4'), 96,06 (17), 91,59 (15), 54,95 (18), 47,03 (6), 39,20 (3), 33,39 (5), 26,63 (4), 20,18 (7)

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu nastavljeno je istraživanje primakinskih derivata kao potencijalnih antitumorskih lijekova, koje se provodi na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta proteklih nekoliko godina. Opisana je sinteza tri uree i tri semikarbazidna derivata primakina s modificiranim fenilnim supstituentom, dosada neopisanih u literaturi, kao i prekursorskih 1-karbamoilbenzotriazola. Strukture svih spojeva potvrđene su spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS). U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, sintetiziranim primakinskim derivatima bit će ispitano antitumorsko djelovanje.

6. LITERATURA

Abraham DJ. Burger's medicinal chemistry and drug discovery, Volume 5. New Jersey, Wiley & Sons, Inc., 2003, str 100-148.

Afzal O, Kumar S, Haider MR, Ali MR, Kumar R, Jaggi M, Bawa S. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur J Med Chem*, 2014, 97, 871-910.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013

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

Bowman ZS, Oatls JE, Whelan JL, Jollow DJ, McMillan DC. Primaquine-Induced Hemolytic Anemia: Susceptibility of Normal versus Glutathione-Depleted Rat Erythrocytes to 5-Hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 309, 79-85.

Bulat SA, Mokrousov IV, Podlipaev SA. Classification of trypanosomatids from insects and plants by the UP-PCR (universally primed PCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products. *Europ J Protozol*, 1999, 35, 319-326.

Duffy R, Wade C, Chang R. Discovery of anticancer drugs from antimalarial natural products: a MEDLINE literature review. *Drug Discov Today*, 2012, 45, 17-18.

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

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

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

Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 75, 402-415.

Jain M, Vangapandu S, Sachdeva S, Jain R. Synthesis and blood-schizontocidal antimalarial activities of 2-substituted/2,5-disubstituted-8-quinolinamines and some of their amino acid conjugates. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12, 1003-1010.

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

Kaur K, Jain M, Reddy RP, Jain R. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *Eur J Med Chem*, 2010, 45, 3245-3264.

Kontraindikacije primakina, <http://www.almp.hr>, pristupljeno 20.4.2015.

Malaria Sire-All about Malaria, <http://www.malariasite.com>, pristupljeno 20.4.2015.

Martirosyan AR, Rahim-Bata R, Freeman AB, Clarke CD, Howard RL, Strobl JS. Differentiation-inducing quinolines as experimental breast cancer agents in the MCF-7 human breast cell model. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68, 1729-1738.

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

Mushtaque S. Reemergence of chloroquine (CQ) analogs as multi-targeting antimalarial agents: A review. *Eur J Med Chem*, 2015, 90, 280-295.

O'Neill PM, Storr RC, Park BK. Synthesis of the 8-aminoquinoline antimalarial 5-fluoroprimaquine. *Tetrahedron*, 1998, 54, 4615-4622.

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

Perković I, Butula I, Kralj M, Martin-Kleiner I, Balzarini J, Hadjipavlou-Litina D, Katsori AM, Zorc B. Novel NSAID 1-acyl-4-cycloalkyl/arylsemicarbazides nad 1-acyl-5-benzyloxy/hydroxy) carbanoylcarbazides as potential anticancer agents and antioxidants. *Eur J Med Chem*, 2012, 51, 227-238.

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

Primaquine, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 30.6.2015.

Primaquine, <http://www.inchem.org>, pristupljeno 23.4.2015.

Rajić Džolić Z. Predavanja iz farmaceutske kemije 1 - Antiparazitici. Zagreb, FBF, 2015.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moor PK. Lijekovi protiv protoza. U: Farmakologija, 5. izdanje. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2006, str. 672-685.

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

Sall C, Yapi AD, Desbois N, Chevalley S, Chezal JM, Tan K, Teulade JC, Valentin A, Blache Y. Design, Synthesis and biological activities of conformationally restricted analogs of primaquine with a 1,10-phenanthroline framework. *Biorg Med Chem*, 2008, 18, 4666-4669.

Schlitzer M. Antimalarial drugs – what is in use and what is in the pipeline. *Arch Pharm Chem Life Sci*, 2008, 341, 149-163.

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

Thanh Thuy NN, Tien HN, Jain R, Kamei K. 2-tert-butyl-primaquine exhibit potent blood schizontocidal antimalarial activity via inhibition of heme crystallization. *Malaria Journal*, 2010, 9, 1-2.

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

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

Vrhovac i sur. Interna medicina. Zagreb, Naklada Ljevak, 2008, str. 1616-1617.

Wells TNC, Gutteridge WE. Malaria: new medicines for its control and eradication. U: Neglected diseases and drug discovery. Palmer M, Wells TNC, urednici, Cambridge, RSC Publishing, 2011, str. 1-32.

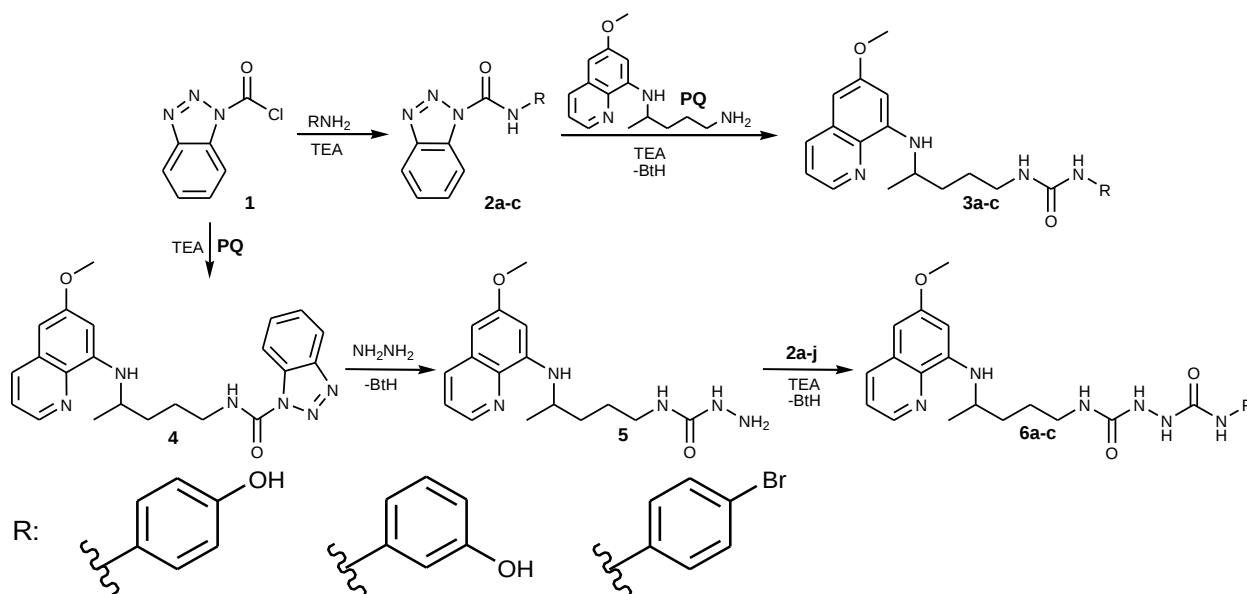
Zorc B., Butula I. Vježbe iz farmaceutske kemije, Zagreb, FBF, 1995.

7. SAŽETAK

Sinteza novih urea i semikarbazidnih derivata primakina

Primakin je poznati antimalarik i polazni spoj u dizajniranju mnogih potencijalno biološko aktivnih spojeva. U prethodnim istraživanjima otkrivena je i citostatska aktivnost urea i semikarbazidnih derivata primakina. Primakinski semikarbazidi i uree su pokazali visoku selektivnost na MCF-7 stanične linije (karcinom dojke). Cilj ovog rada bio je sintetizirati urea i semikarbazidne derivate primakina s različitim supstituentima na benzenskoj jezgri.

U sintezama je korištena benzotriazolska metoda prethodno razvijena na Zavodu za farmaceutsku kemiju. Početni spoj korišten u sintezi je klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl, **1**). Reakcijom BtcCl (**1**) i odgovarajućeg anilina dobiveni su 1-karbamoilbenzotriazoli **2a-c**. Urea derivati **3a-c** dobiveni su u reakciji primakina s odgovarajućim 1-karbamoilbenzotriazolom **2a-c**, a semikarbazidni derivati **6a-c** u reakciji primakinskog semikarbazida **5** s odgovarajućim 1-karbamoilbenzotriazolom **2a-c**. Strukture svih sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS) te je svim čvrstim produktima određeno talište. Sintetiziranim derivatima primakina u daljnjim će istraživanjima biti ispitano antitumorsko djelovanje.



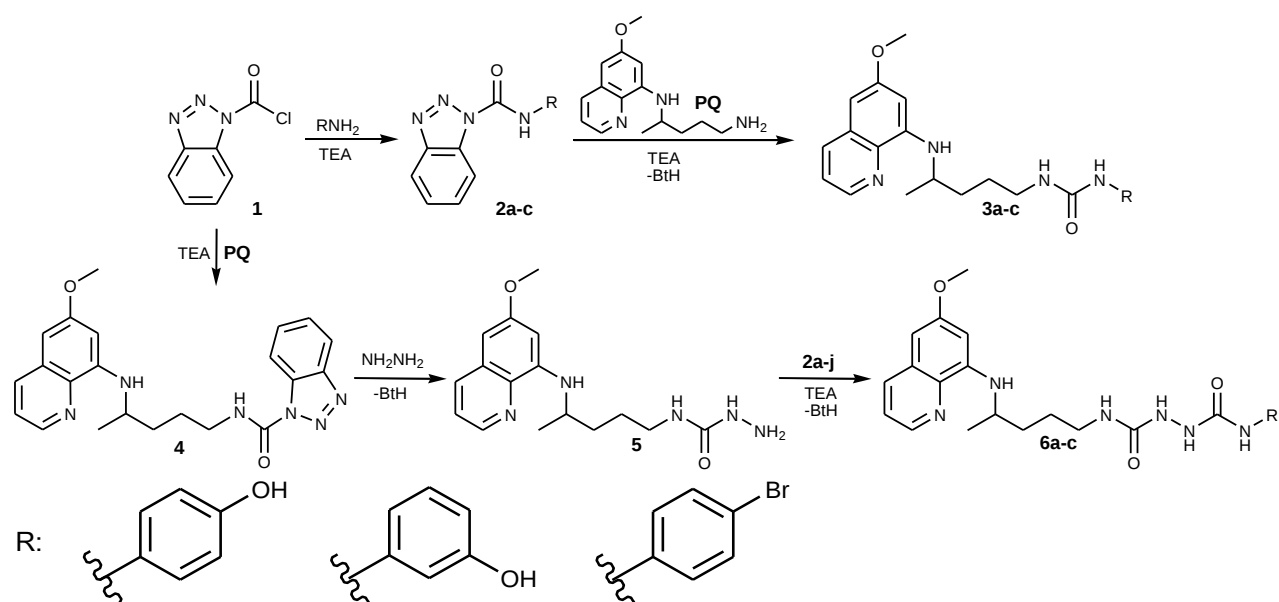
ključne riječi: primakin, semikarbazid, urea, sinteza

8. SUMMARY

Synthesis of new urea and semicarbazide derivatives of primaquine

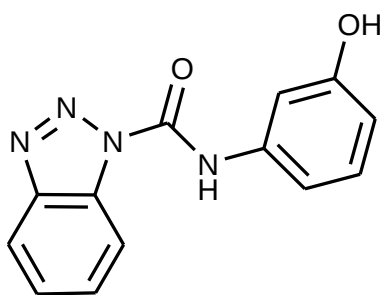
Primaquine is a well known antimalarial drug and interesting molecule for design of potentially biologically active substances. In previous researchs urea and semicarbazide derivatives of primaquine has been proven as antitumor agents and showed high selectivity towards MCF-7 cell line (breast carcinom). The purpose of this research was the synthesis of new urea and semicarbazide derivatives with various substituents on the benzene ring.

The benzotriazole methodology that was developed on Department of Medicinal Chemistry was used for synthesis of primaquine derivatives. The starting compound, chloride of benzotriazole carboxylic acid (BtcCl, **1**), reacted with corresponding anilines to prepare 1-carbamoylbenzotriazoles **2a-c**. Urea derivatives **3a-c** were prepared by reaction of primaquine diphosphate with corresponding 1-carbamoylbenzotriazoles **2a-c**, and the semicarbazide derivatives **6a-c** by reaction of primaquine semicarbazide **5** with 1-carbamoylbenzotriazoles **2a-c**. Structures of all synthesized compounds were determined by usual spectroscopic methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR, MS) and melting points were determined. Antitumor activity screening of the synthesized primaquine derivatives is in progress.

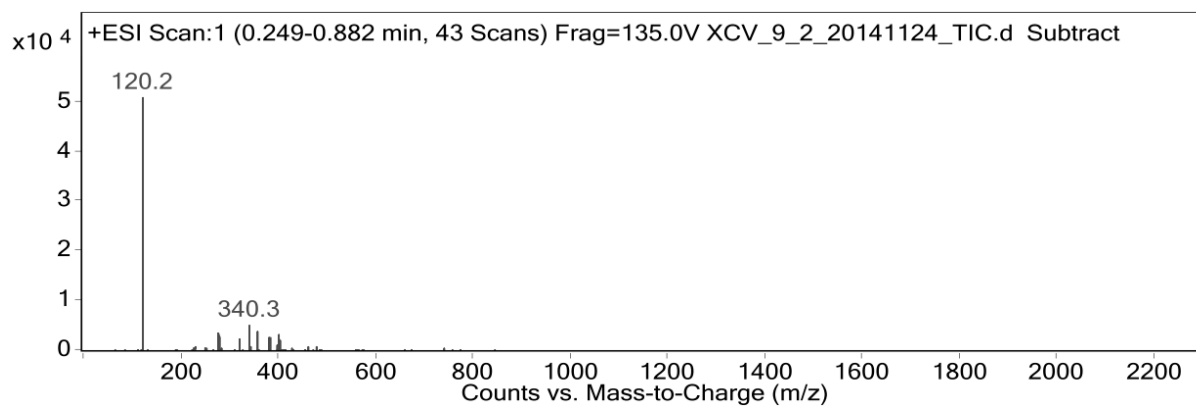
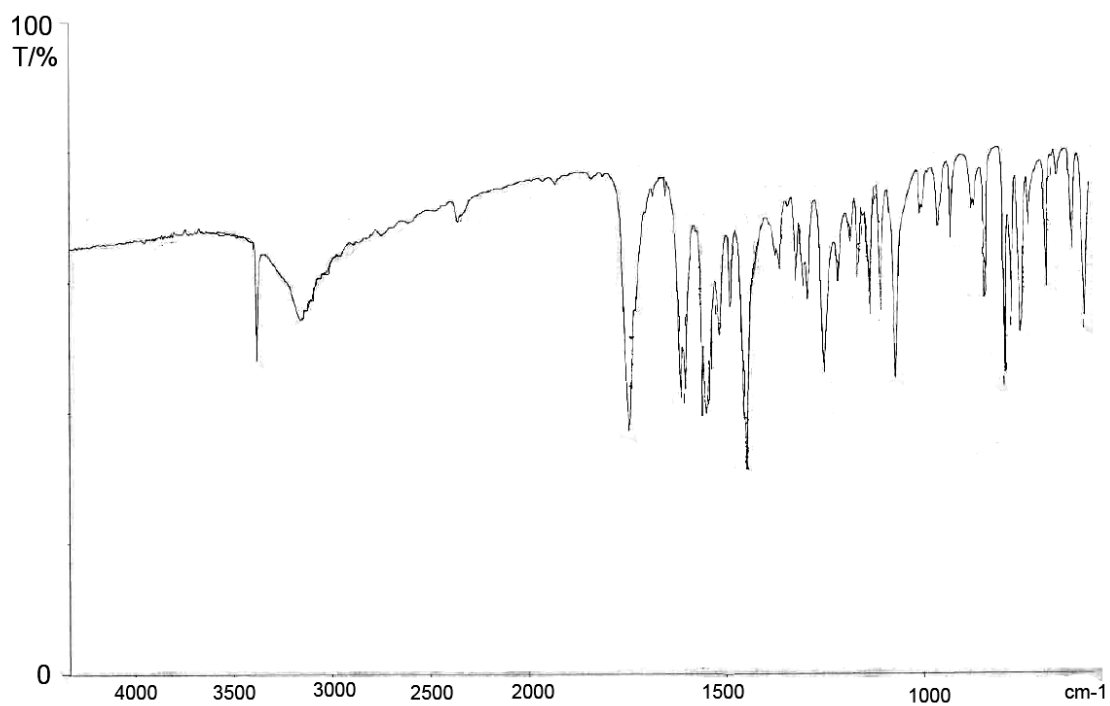


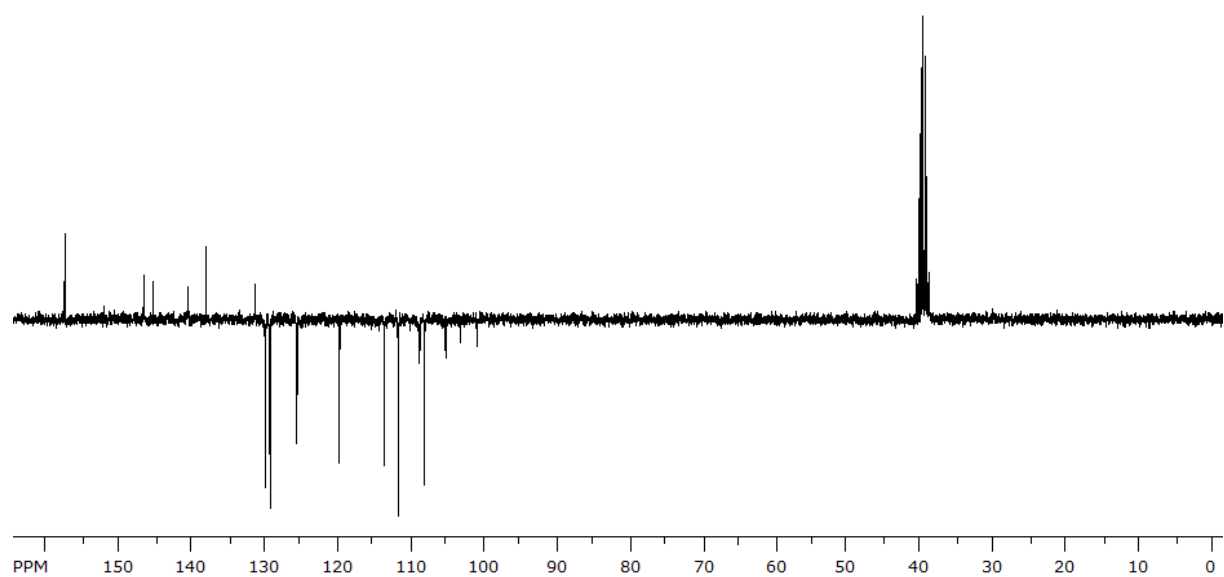
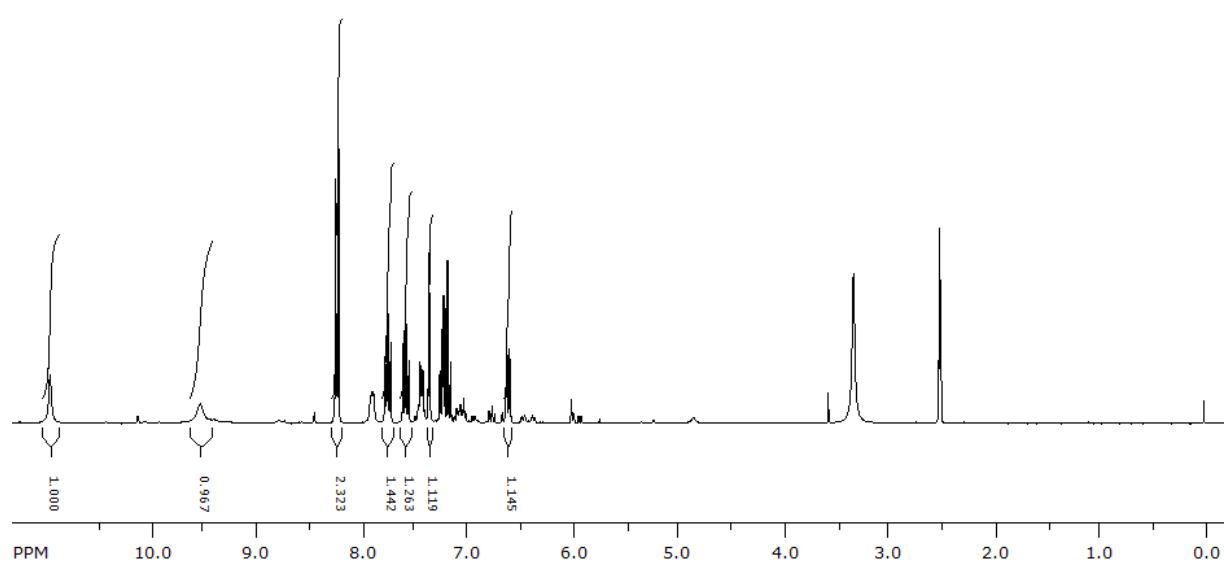
key words: primaquine, semicarbazide, urea, synthesis

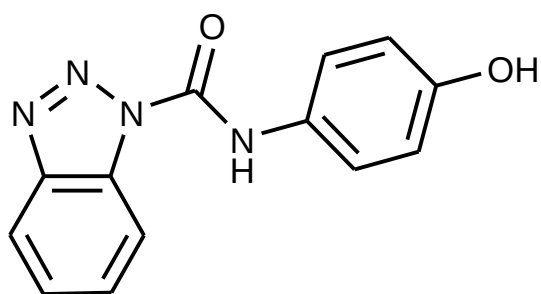
9. PRILOZI



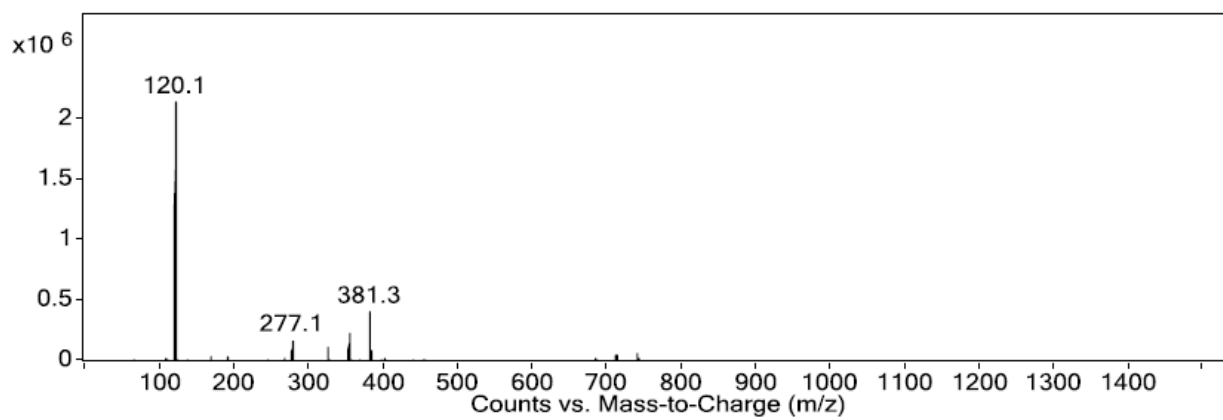
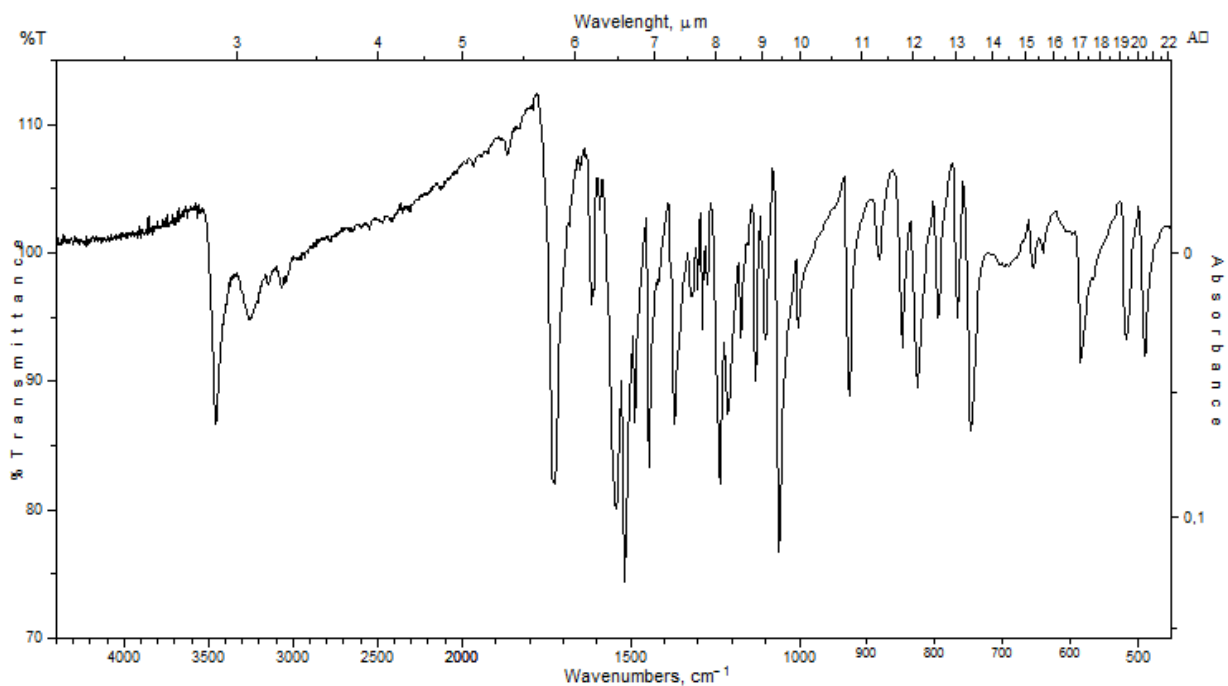
2a

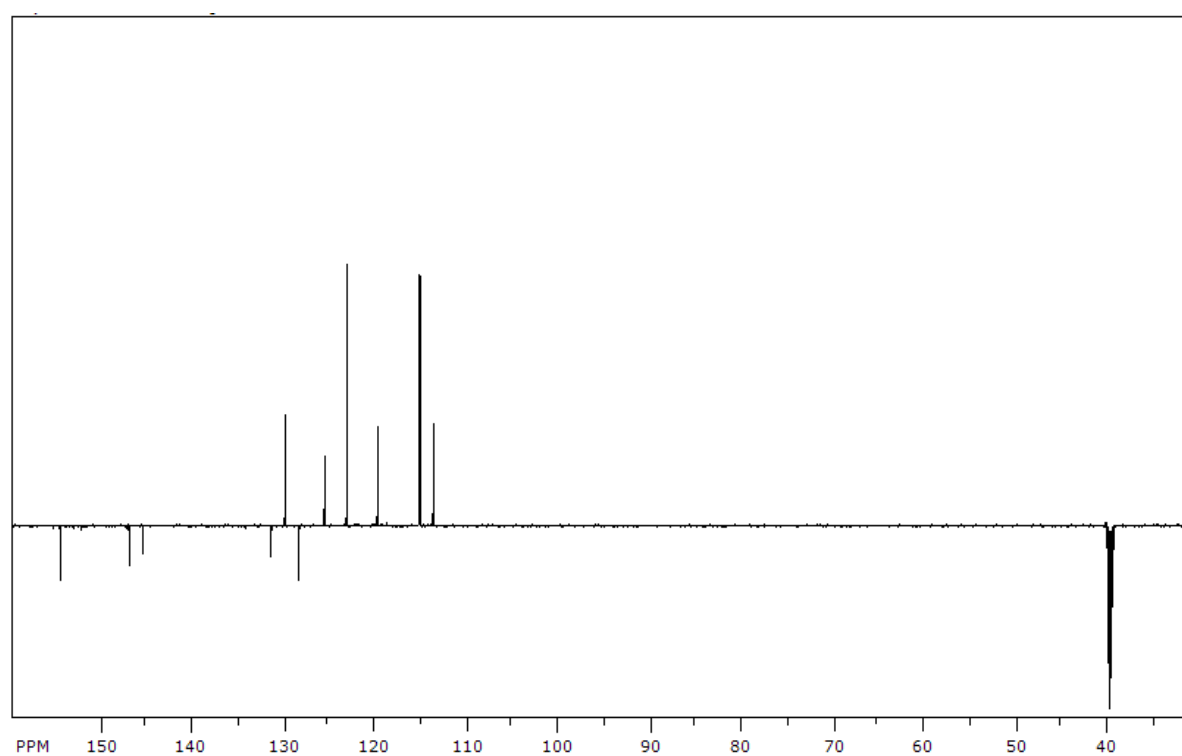
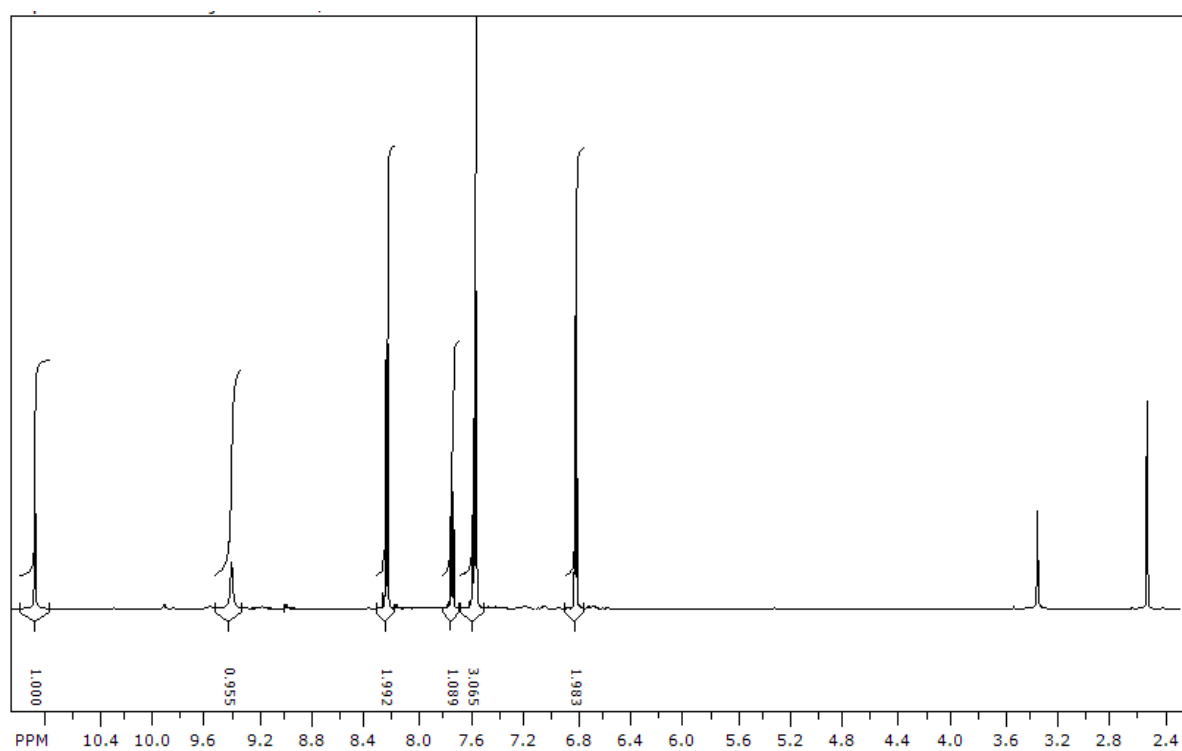


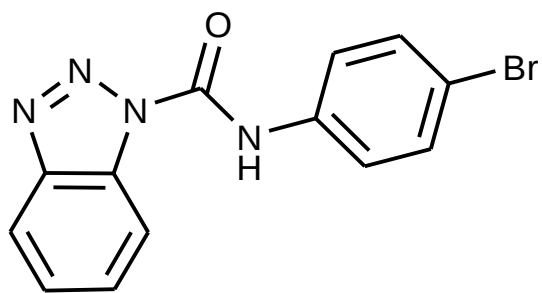




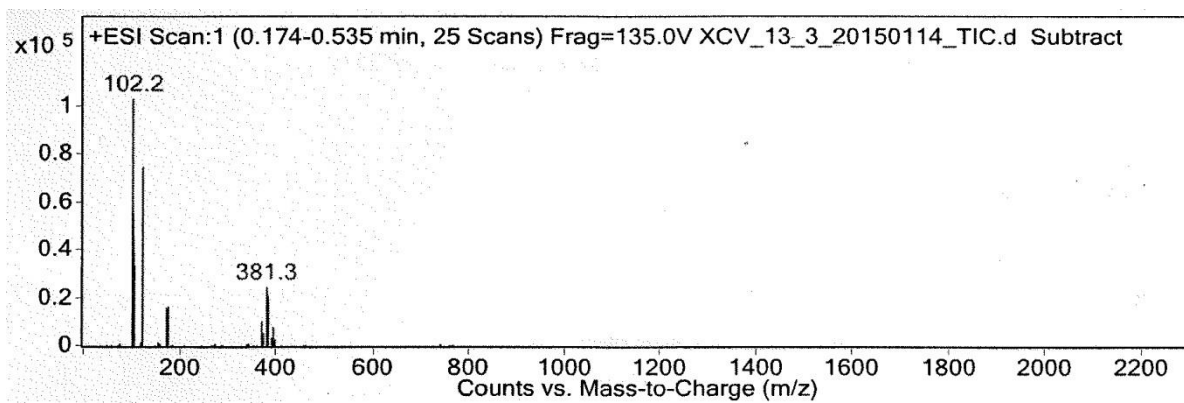
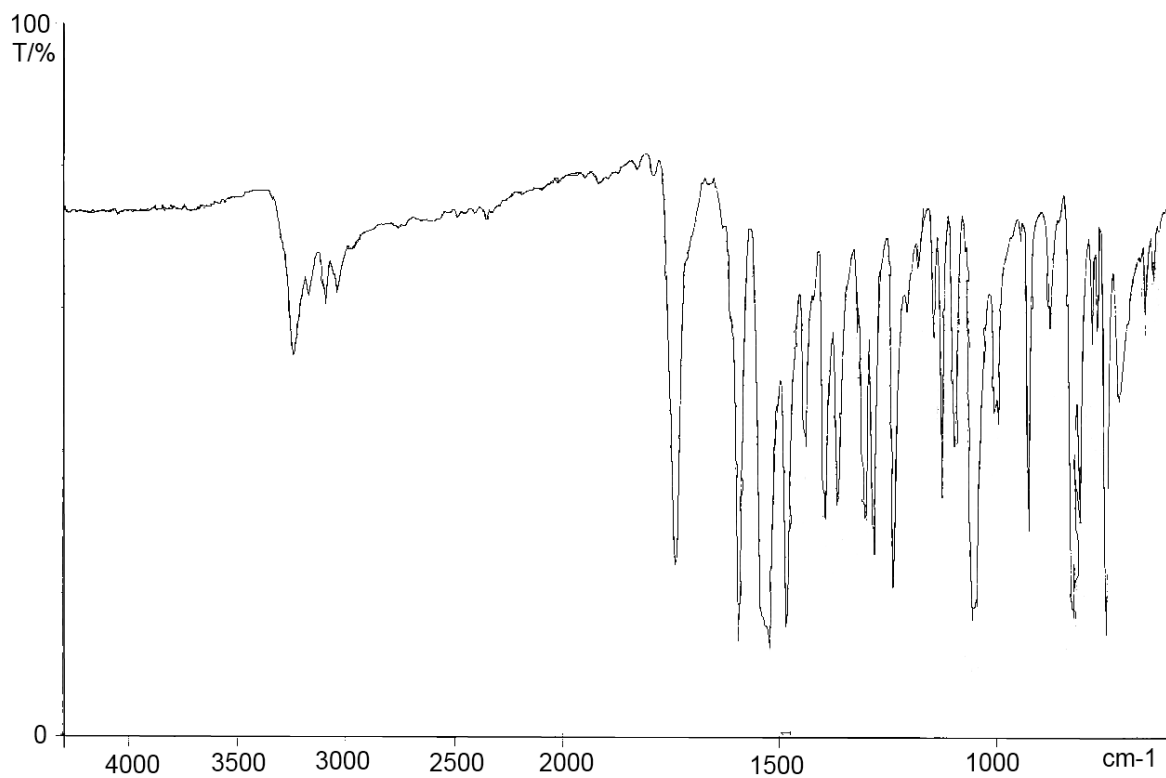
2b

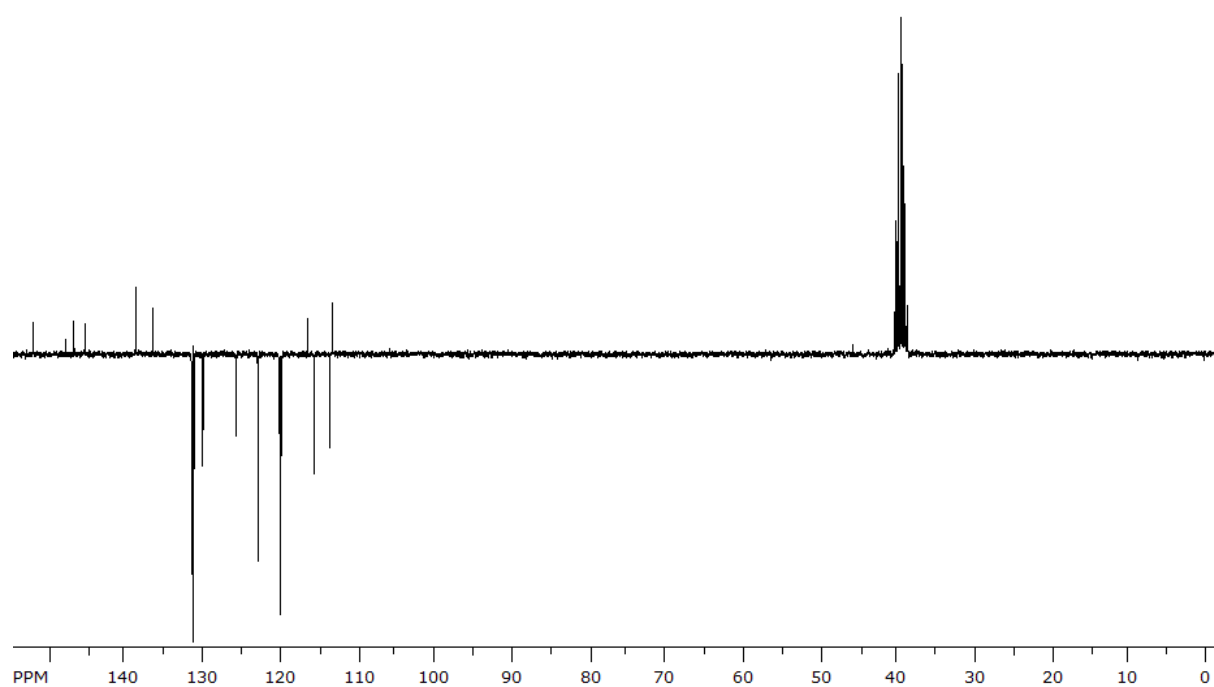
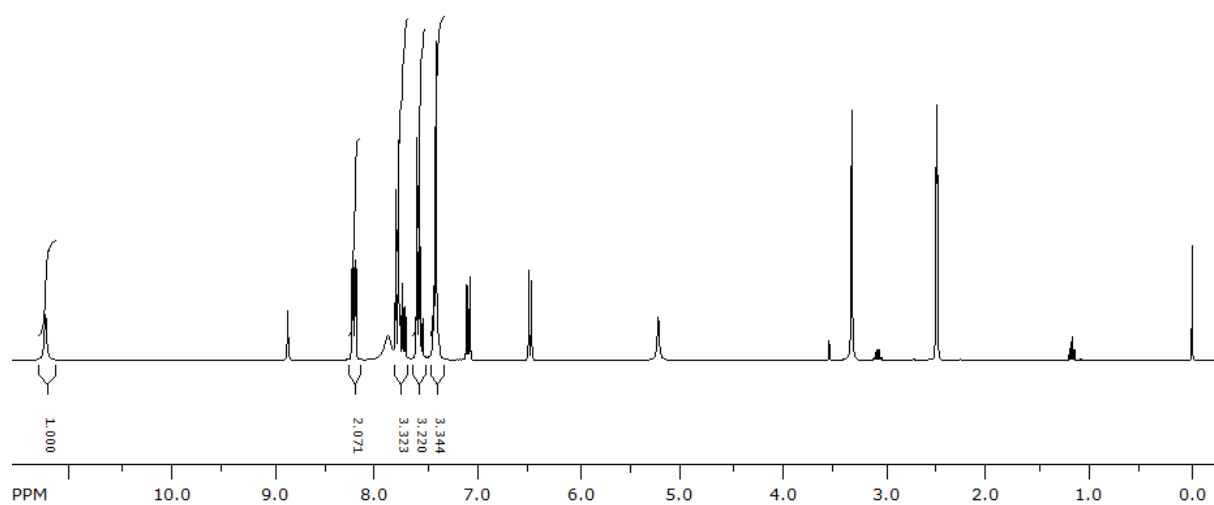


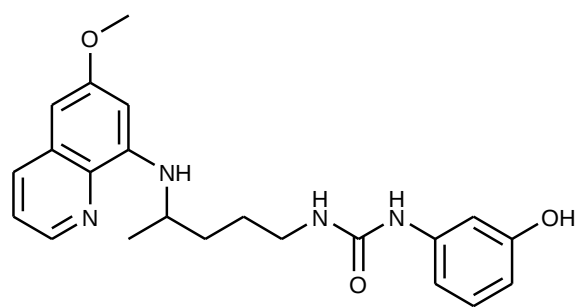




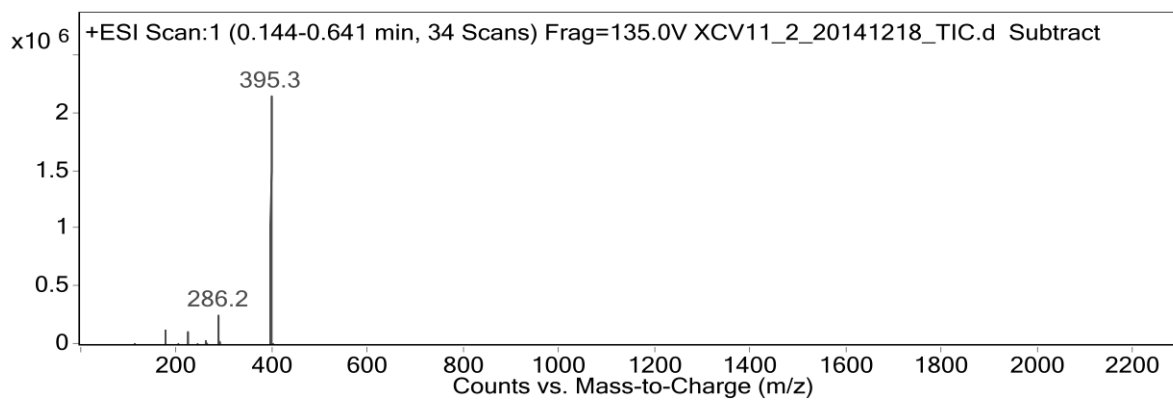
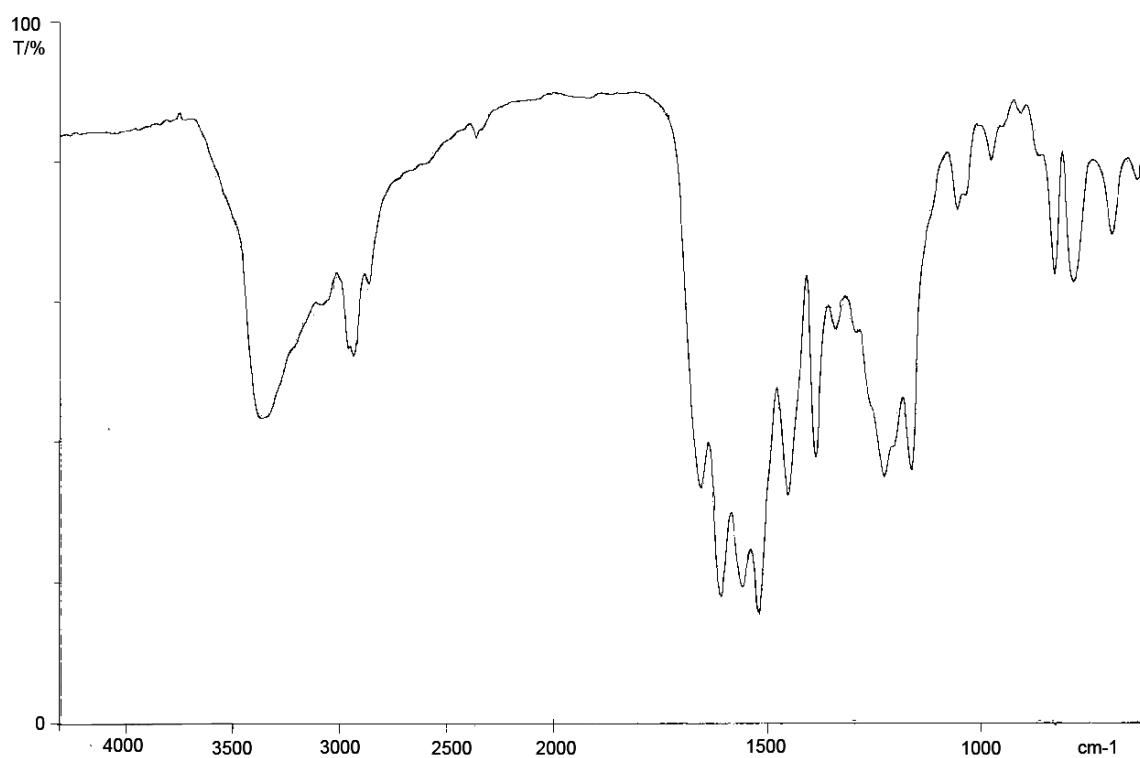
2c

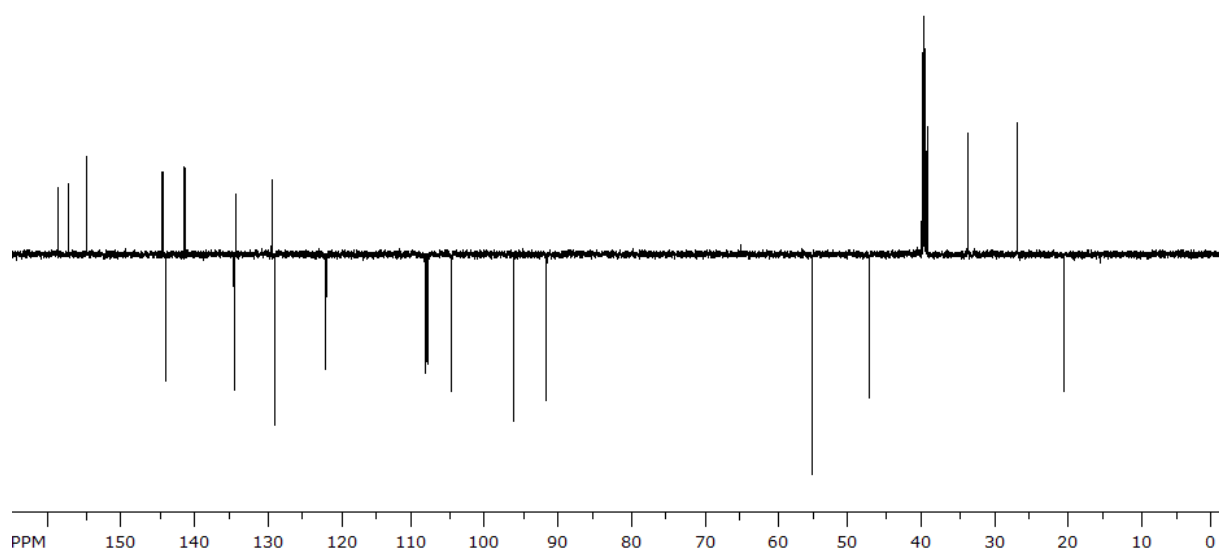
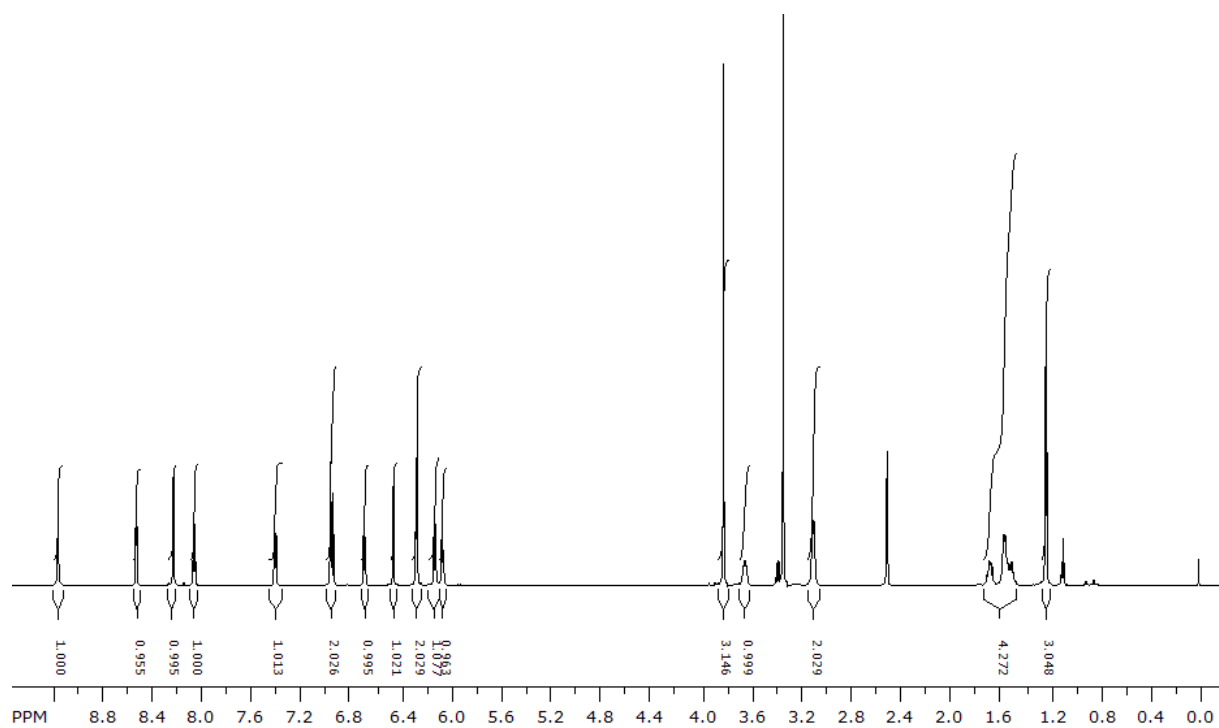


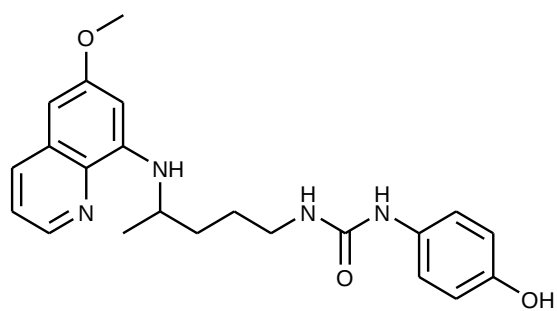




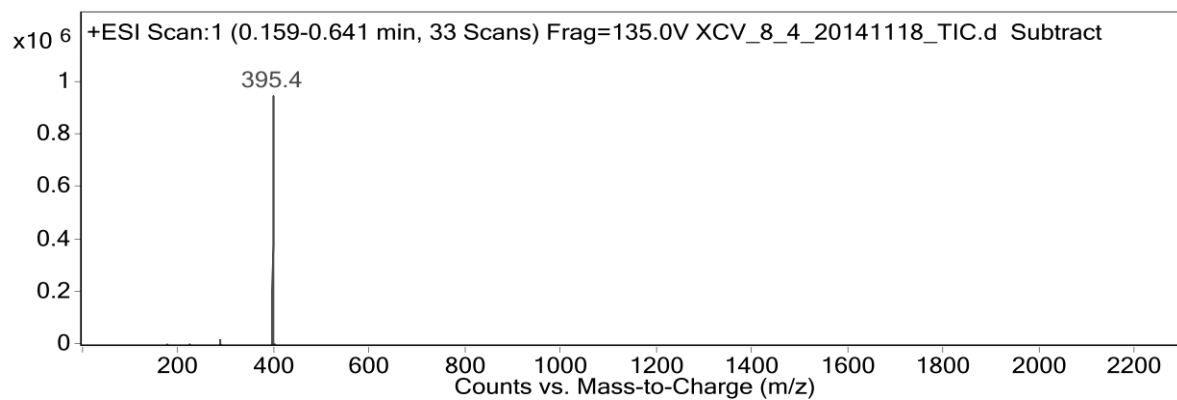
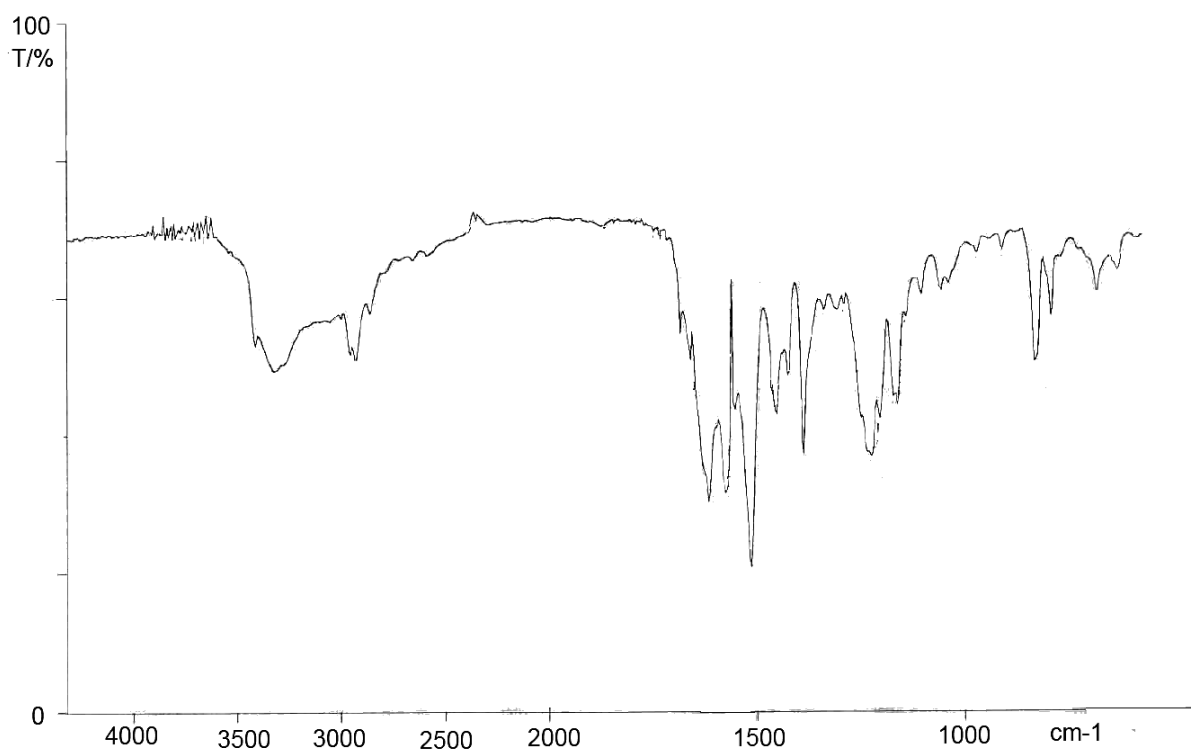
3a

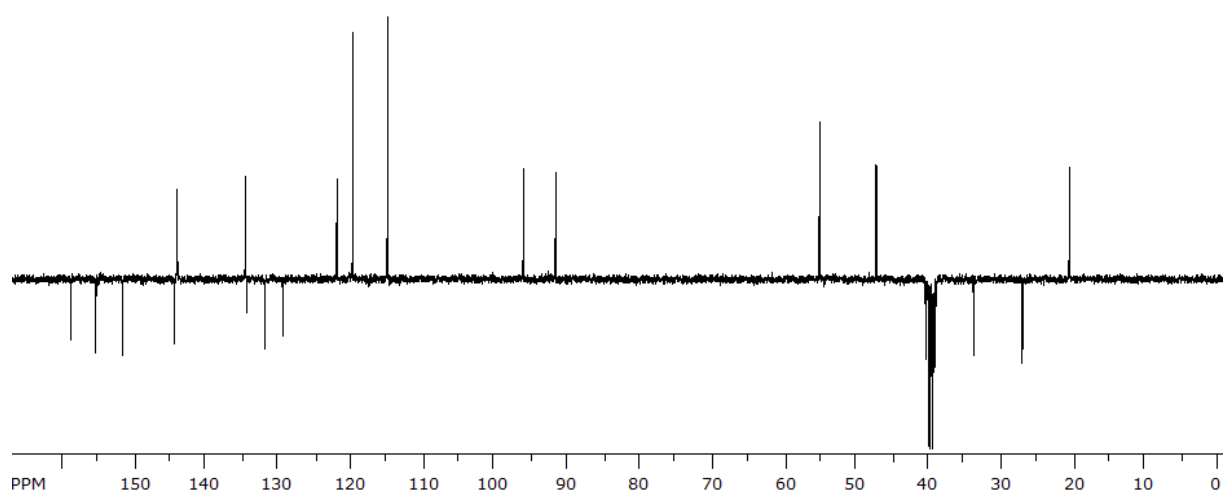
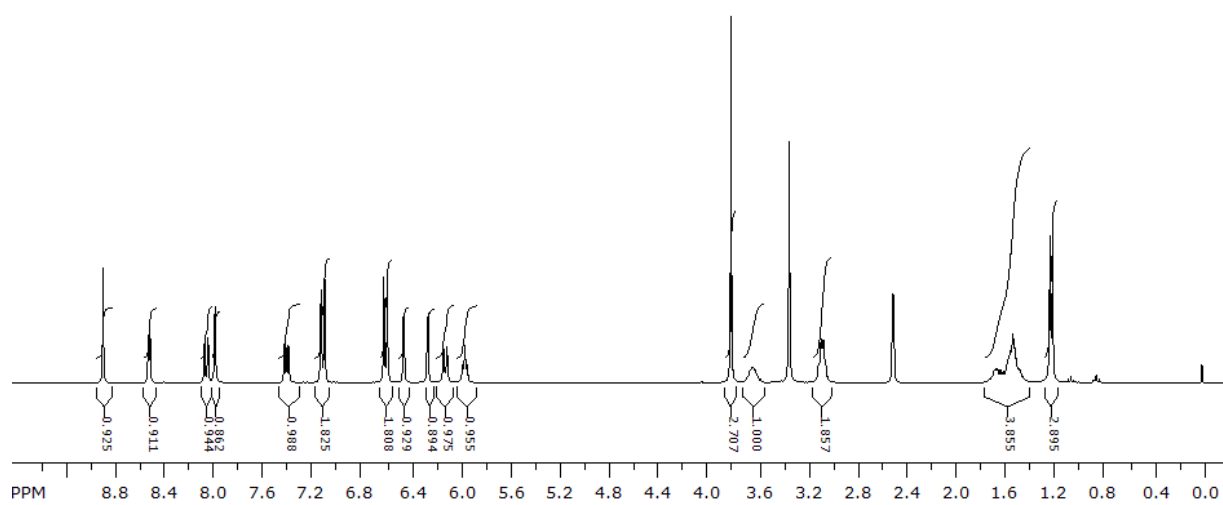


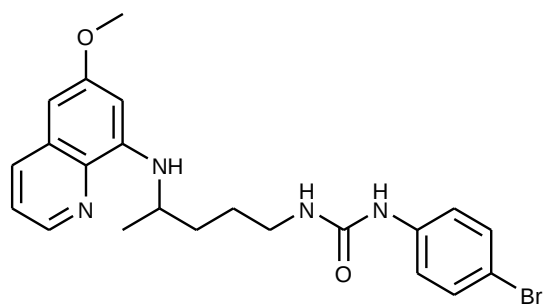




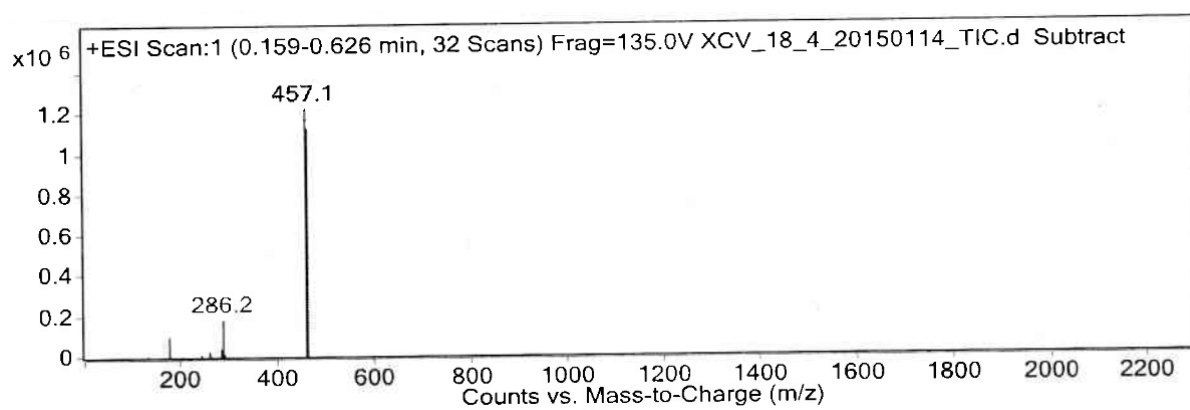
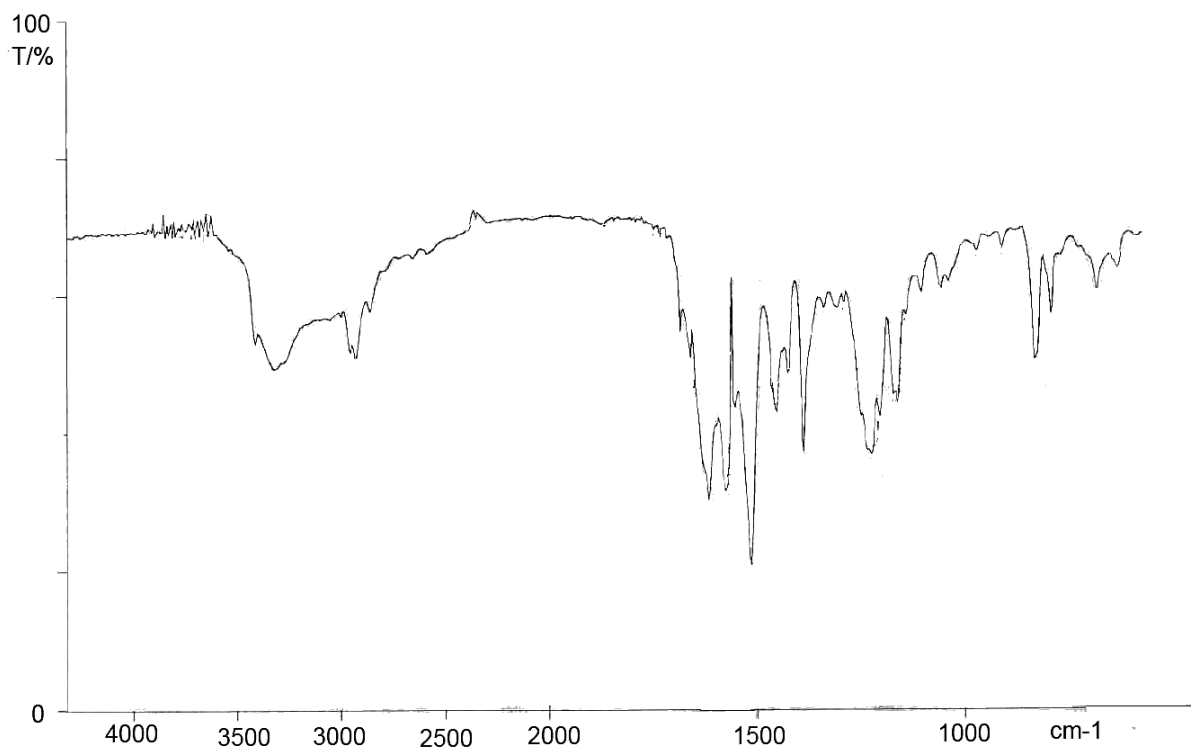
3b

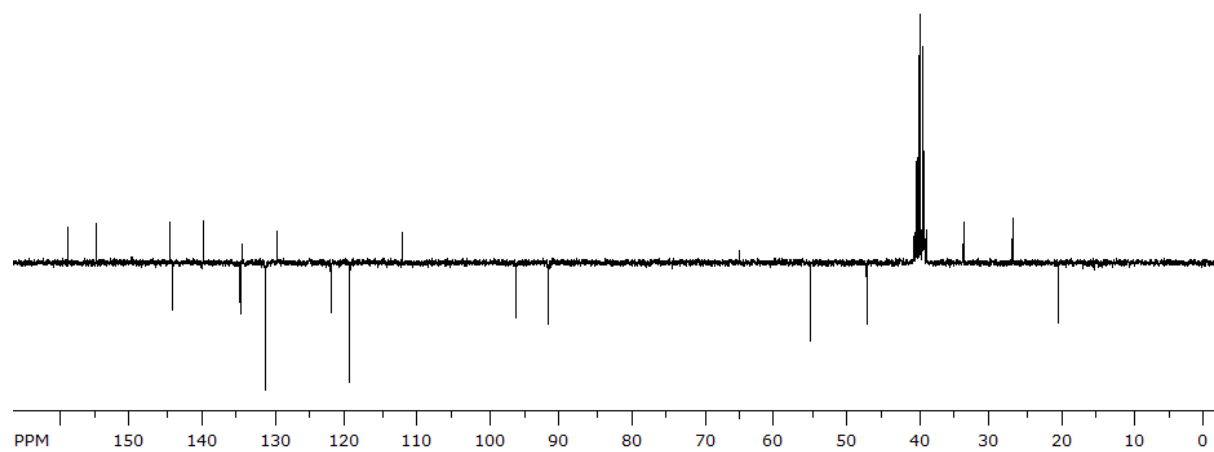
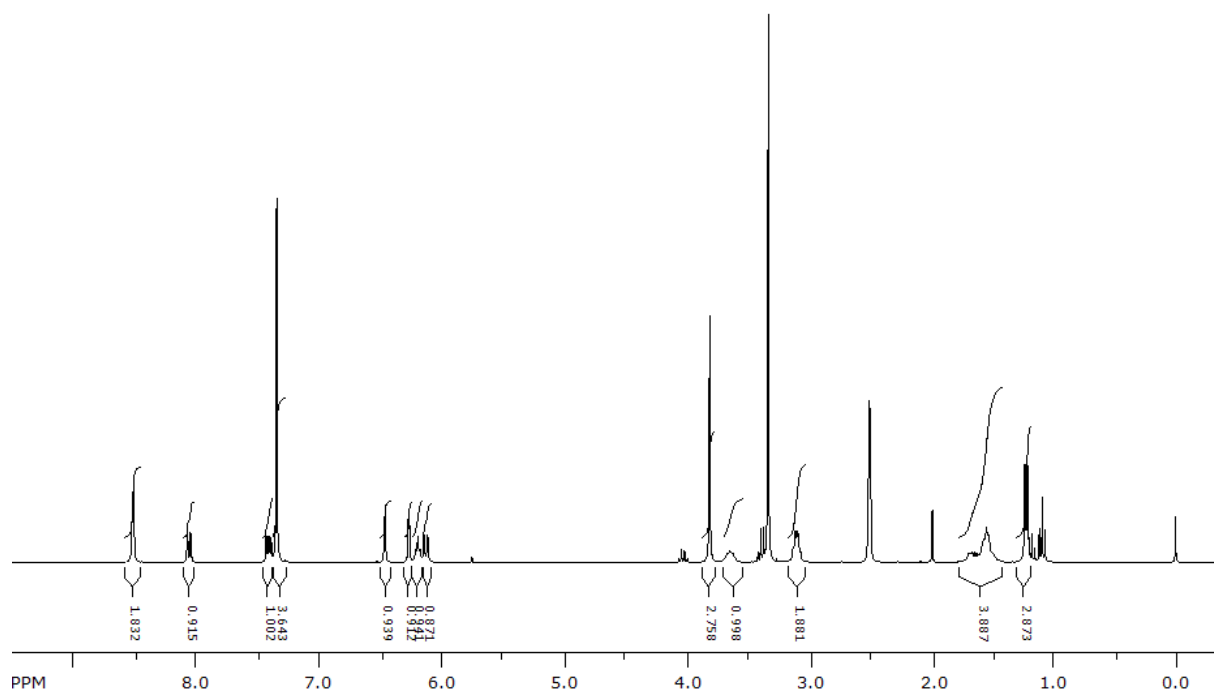


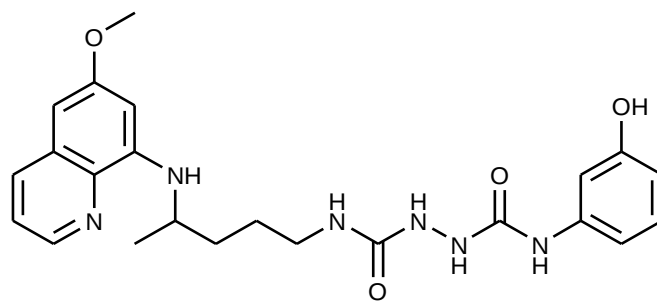




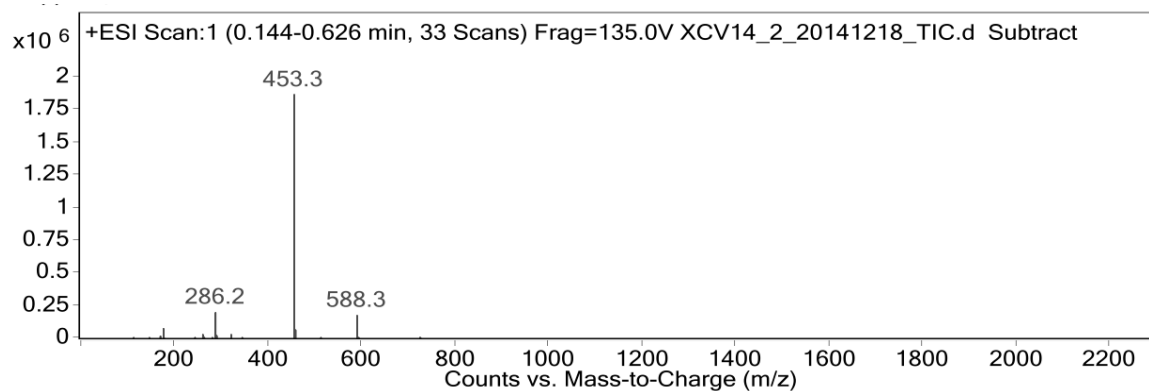
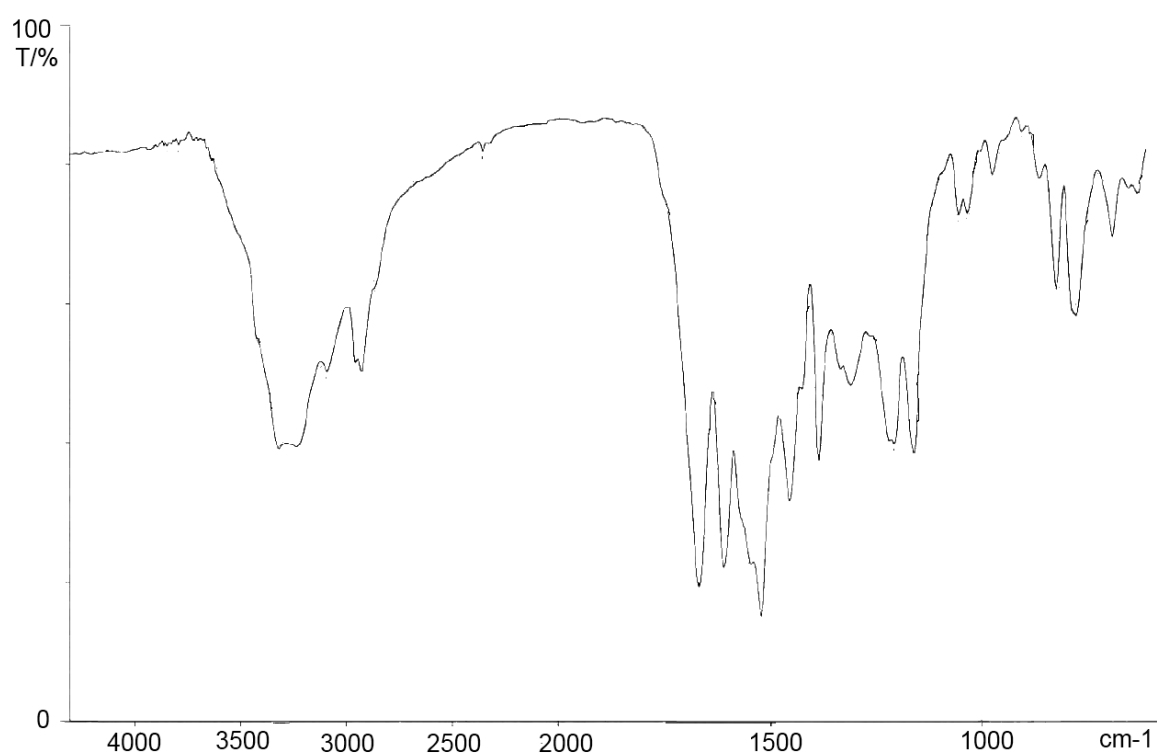
3c

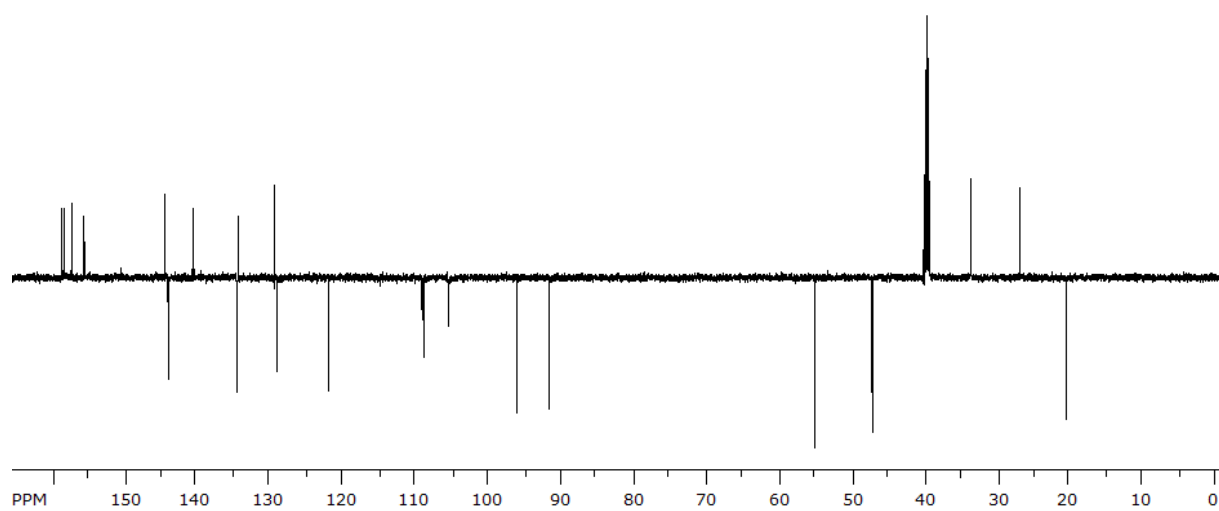
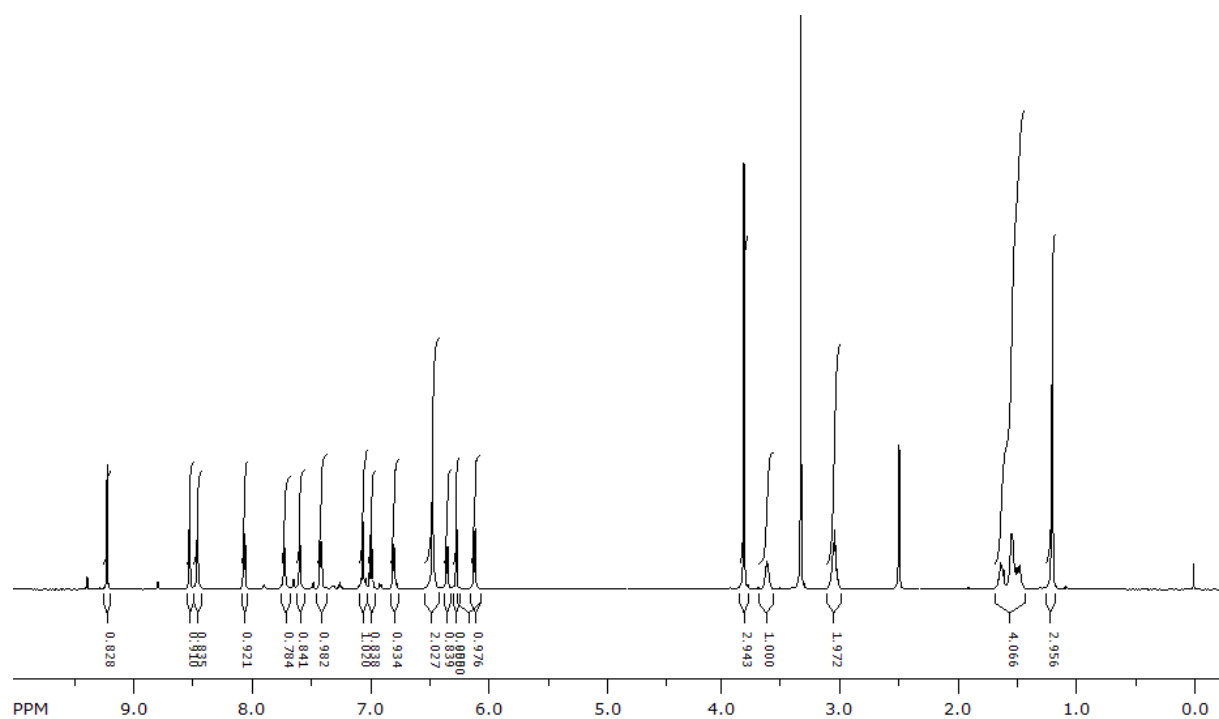


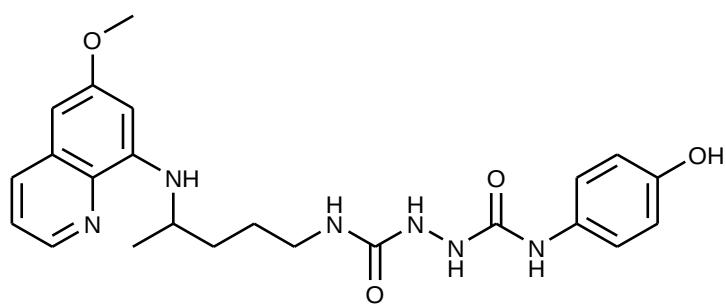




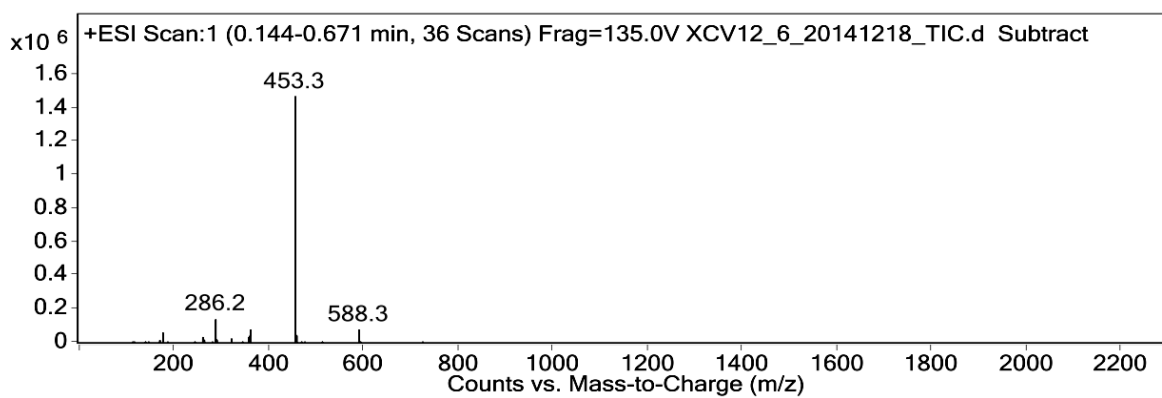
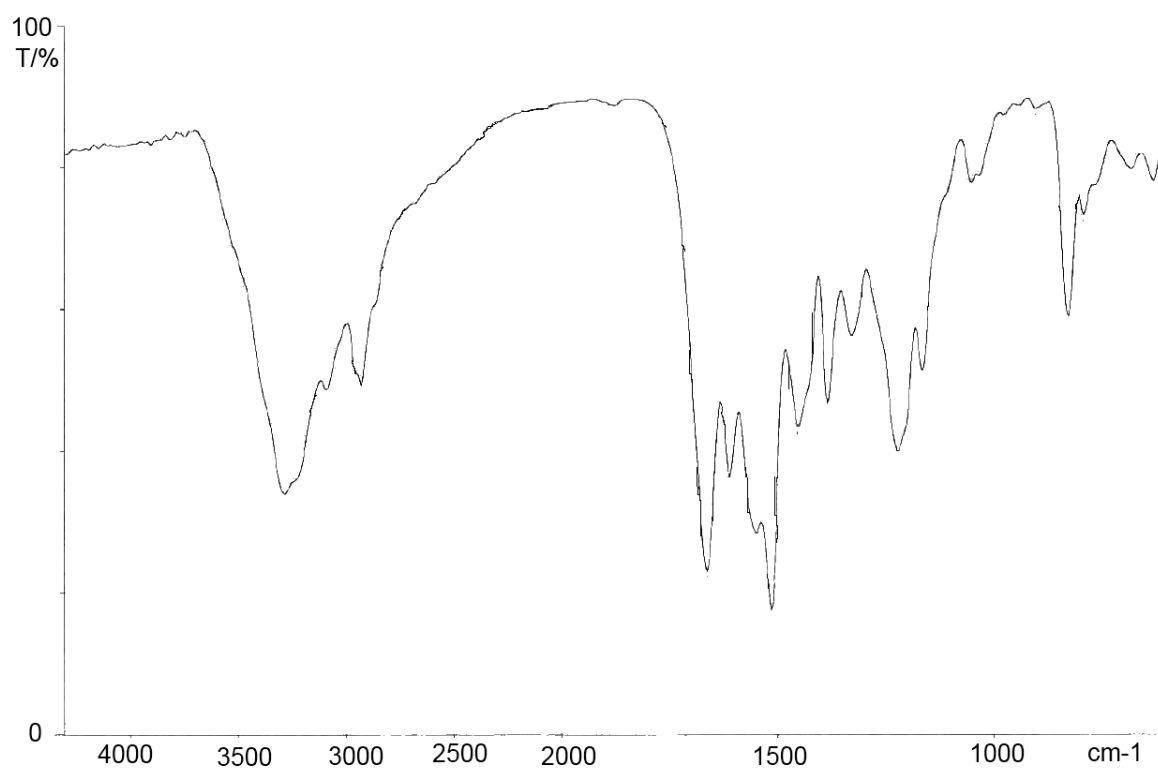
6a

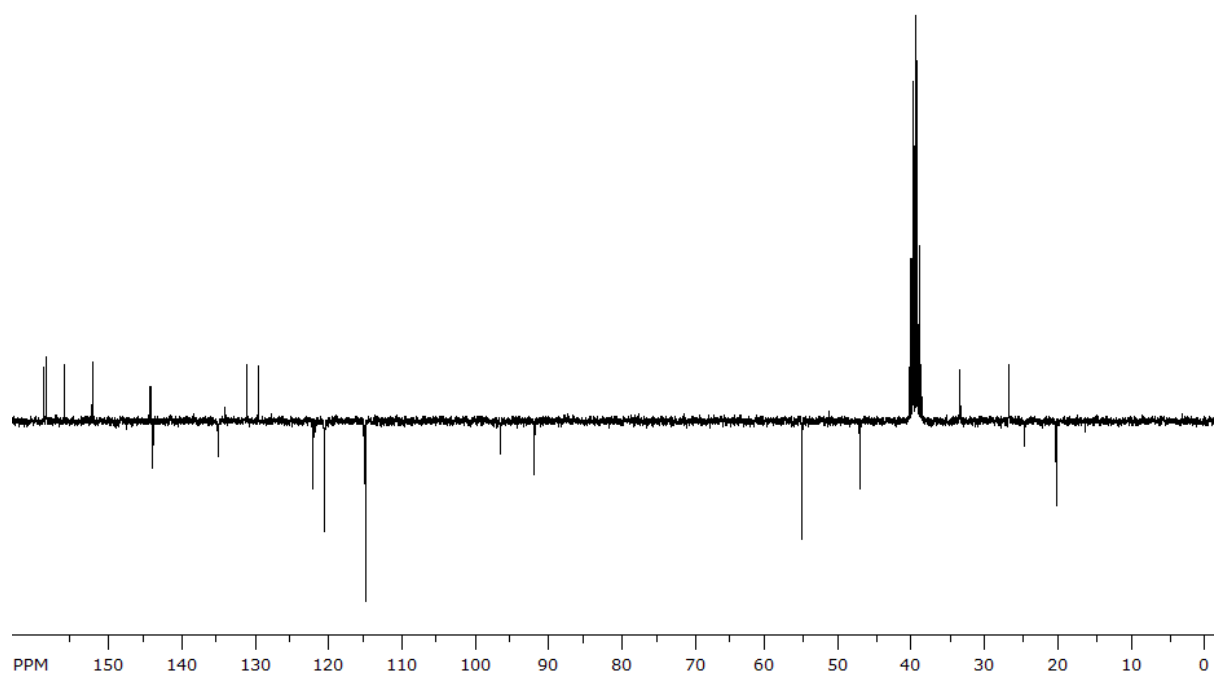
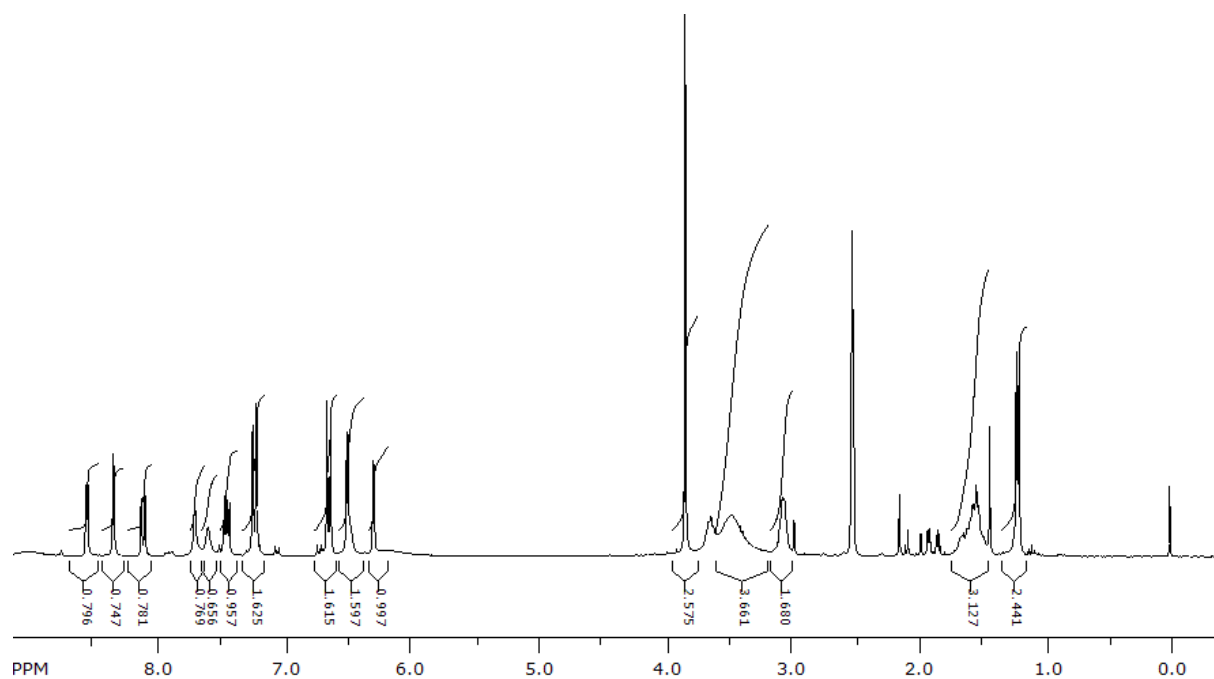


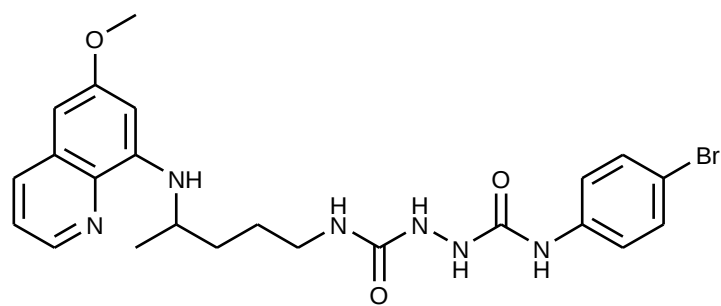




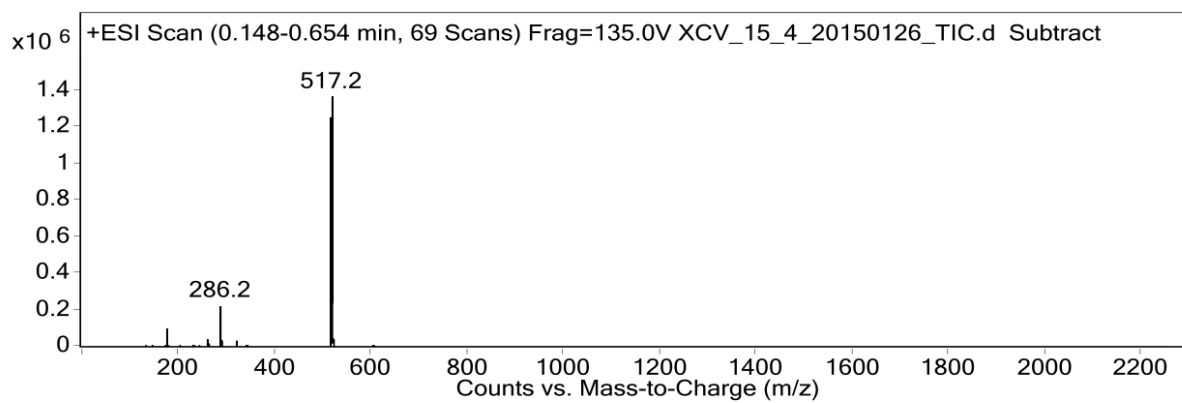
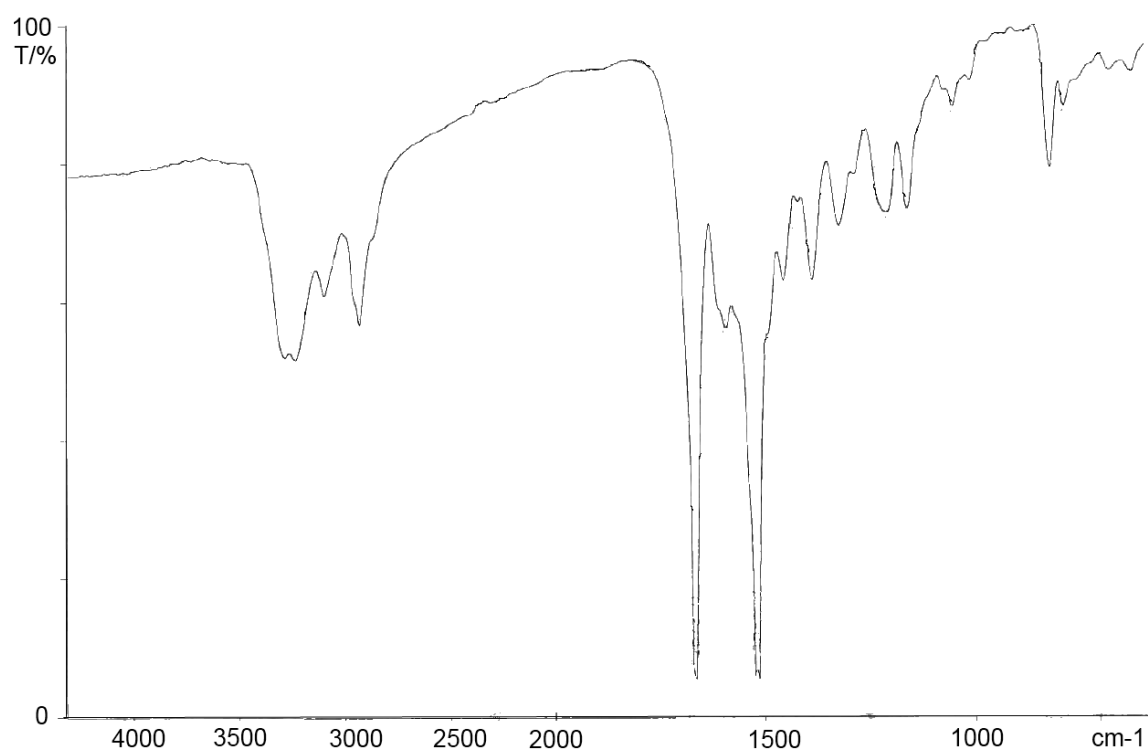
6b

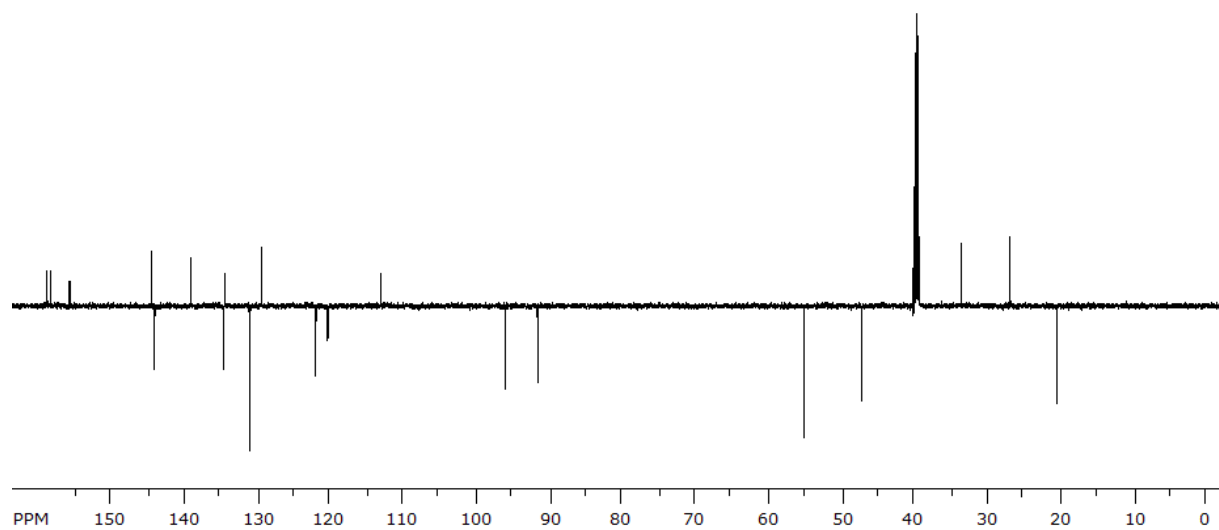
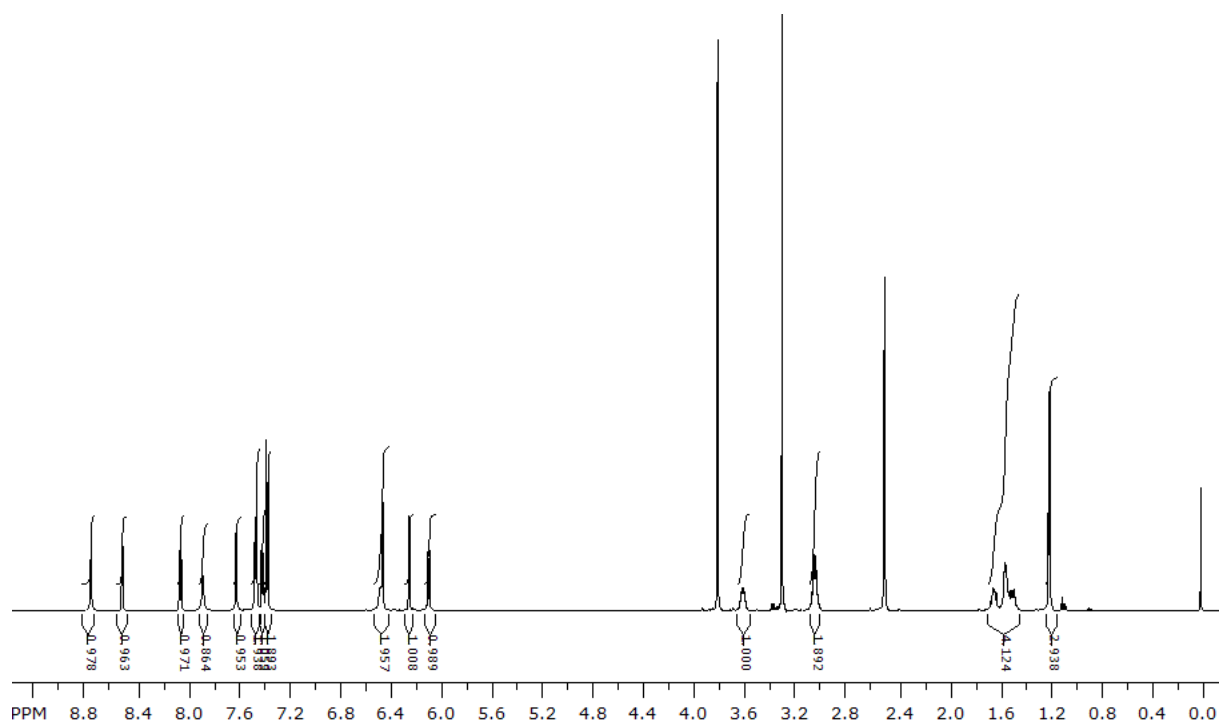






6c





10. Temeljna dokumentacijska kartica

SINTEZA NOVIH UREA I SEMIKARBAZIDNIH DERIVATA PRIMAKINA

Tomislav Ubrekić

SAŽETAK

Primakin je poznati antimalarik i polazni spoj u dizajniranju mnogih potencijalno biološko aktivnih spojeva. U prethodnim istraživanjima otkrivena je i citostatska aktivnost urea i semikarbazidnih derivata primakina. Primakinski semikarbazidi i uree su pokazali visoku selektivnost na MCF-7 stanične linije (karcinom dojke). Cilj ovog rada bio je sintetizirati urea i semikarbazidne derivate primakina s različitim supstytutentima na benzenskoj jezgri.

U sintezama je korištena benzotriazolska metoda prethodno razvijena na Zavodu za farmaceutsku kemiju. Početni spoj korišten u sintezi je klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl, **1**). Reakcijom BtcCl (**1**) i odgovarajućeg anilina dobiveni su 1-karbamoilbenzotriazoli **2a-c**. Urea derivati **3a-c** dobiveni su u reakciji primakina s odgovarajućim 1-karbamoilbenzotriazolom **2a-c**, a semikarbazidni derivati **6a-c** u reakciji primakinskog semikarbazida **5** s odgovarajućim 1-karbamoilbenzotriazolom **2a-c**. Strukture svih sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS) te je svim čvrstim produktima određeno talište. Sintetiziranim derivatima primakina u daljnjim će istraživanjima biti ispitano antitumorsko djelovanje.

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

Rad sadrži: 52 stranica, 15 grafičkih prikaza, 9 tablica i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Primakin, semikarbazid, urea, sinteza

Mentor: **Dr. sc. Ivana Perkovvić**, viši asistent-znastveni novak Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivana Perkovvić**, viši asistent-znastveni novak Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Branka Zorc, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Miranda Sertić, viši asistent-znastveni novak Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2015.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

SYNTHESIS OF NEW UREA AND SEMICARBAZIDE DERIVATIVES OF PRIMAQUINE

Tomislav Ubrekić

SUMMARY

Primaquine is a well known antimalarial drug and interesting molecule for design of potentially biologically active substances. In previous researchs urea and semicarbazide derivatives of primaquine has been proven as antitumor agents and showed high selectivity towards MCF-7 cell line (breast carcinom). The purpose of this research was the synthesis of new urea and semicarbazide derivatives with various substituents on the benzene ring.

The benzotriazole methodology that was developed on Department of Medicinal Chemistry was used for synthesis of primaquine derivatives. The starting compound, chloride of benzotriazole carboxylic acid (BtcCl, **1**), reacted with corresponding anilines to prepare 1-carbamoylbenzotriazoles **2a-c**. Urea derivatives **3a-c** were prepared by reaction of primaquine diphosphate with corresponding 1-carbamoylbenzotriazoles **2a-c**, and the semicarbazide derivatives **6a-c** by reaction of primaquine semicarbazide **5** with 1-carbamoylbenzotriazoles **2a-c**. Structures of all synthesized compounds were determined by usual spectroscopic methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR, MS) and melting points were determined. Antitumor activity screening of the synthesized primaquine derivatives is in progress.

Thesis includes: 52 pages, 15 figures, 9 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Primaquine, semicarbazide, urea, synthesis

Mentor: **Ivana Perković, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivana Perković, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Branka Zorc, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Miranda Sertić, Ph.D. *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2015.