

# Racionalni pristup dizajniranju lijekova - primjer ranitidina

---

**Zorc, Branka; Kardum, Mirela**

*Source / Izvornik:* **Farmaceutski glasnik, 1997, 53, 209 - 235**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:093451>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



# FARMACEUTSKI GLASNIK

## GLASILO HRVATSKOG FARMACEUTSKOG DRUŠTVA

GOD. 53

SRPANJ-KOLOVOZ 1997.

BROJ 7-8

FAGLAI

Farm.Glas.

ISSN 014-8202

### STRUČNI RADOVI

*Branka Zorc i Mirela Kardum (Zagreb)*

#### Racionalni pristup dizajniranju lijekova – primjer ranitidina

(Primljeno 23. IV. 1997.)

#### Uvod

Mnoge ljekovite tvari koje se upotrebljavaju u suvremenoj terapiji otkri-vene su slučajno – nakon sinteze ili izolacije iz prirodnih izvora primjećeno je njihovo farmakološko djelovanje. Te tvari često su samo grubi modeli ljekovitih tvari koje je potrebno modificirati da bi se pojačao željeni terapijski učinak, povećala selektivnost i/ili smanjila toksičnost. Po uzoru na njih sintetiziraju se brojni strukturni analozi. Varijacije osnovnih molekula često se izvode metodama pokušaja i pogrešaka pa je omjer ljekovitih tvari koje se primjenjuju u terapiji i tvari koje su sintetizirane kao potencijalni lijekovi vrlo nepovoljan.

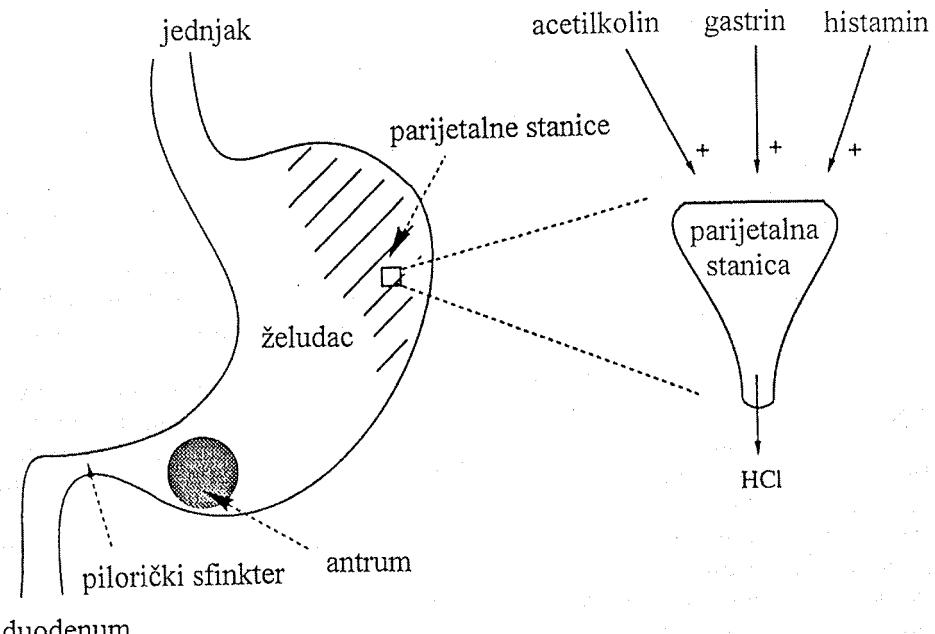
Zadnjih tridesetak godina nastoji se racionalno dizajnirati lijekove. Npr. kada želimo pronaći inhibitora nekog enzima, racionalni pristup bio bi pročistiti enzim i proučiti njegovu tercijarnu strukturu. Ako enzim može biti kristaliziran zajedno s inhibitorom, onda se može identificirati i proučiti mjesto vezanja te dizajnirati inhibitor koji se jače veže. Često je nemoguće izolirati i pročistiti enzime pa se receptor ne može izravno proučavati. Međutim, racionalno dizajniranje ljekovitih tvari moguće je i tada, što je ilustrirano na primjeru antiulkusnih lijekova. Prvi lijek iz te skupine, cimetidin, razvili su znanstvenici tvrtke Smith, Kline & French. U začetku projekta nije bilo oglednih spojeva, niti se znalo postoji li uopće neophodni receptor. U ovom radu prikazana su kemijska istraživanja koja su prethodila uvođenju antiulkusnih lijekova cimetidina i ranitidina u terapiju.

#### Ulkusna terapija do 1964. godine

Ulkus je lokalna erozija sluznice želuca ili duodenuma. Nije u potpunosti poznato kako ulkus nastaje, ali prisutnost želučane kiseline pogoršava bolest

i odgada oporavak. Kada je 1964. počeo program cimetidina, dostupne metode za liječenje ulkusa bile su malobrojne i nezadovoljavajuće. Uobičajeno liječenje sastojalo se u neutralizaciji viška kloridne kiseline u želucu pomoću antacija. Takva terapija zahtijevala je velike doze ljekovitih tvari, a praćena je značajnim nuspojavama. Bilo je očito da bi bolji pristup terapiji bio smanjiti izlučivanje želučane kiseline pa je postavljen cilj pronaći lijekove s takvim djelovanjem.

Želučana kiselina ( $HCl$ ) izlučuje se iz parijetalnih stanica želuca (slika 1). Te stanice su inervirane živcima autonomnog živčanog sustava (AŽS). Kada je AŽS stimuliran, dolazi do oslobođanja neurotransmitora acetilkolina iz živčanih završetaka. Na postsinaptičkoj membrani acetilkolin aktivira kolnergische receptore parijetalnih stanica što ima za posljedicu izlučivanje želučane kiseline. Taj proces započinje pogledom, mirisom ili čak s pomislom na hranu. Tako se želučana kiselina izlučuje i prije nego što hrana uđe u želudac.



Slika 1. Želudac

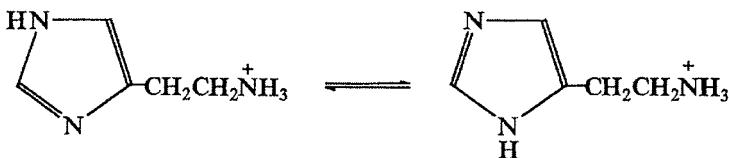
Pod utjecajem AŽS-a je i antrum u kojem se nalaze G stanice koje izlučuju peptidni hormon gastrin. Prisutnost hrane u želucu i stimulacija AŽS-a poticaj su za izlučivanje gastrina. Taj hormon krvotokom dospjeva do parijetalnih stanica i potiče oslobođanje želučane kiseline. To znači da bi se izlu-

čivanje želučane kiseline moglo inhibirati antagonistima acetikolina ili gastrina.

Doista, antikolinergički lijekovi blokiraju acetilkolinske receptore u parijetalnim stanicama te smanjuju izlučivanje želučane kiseline, ali njihovo je djelovanje neselektivno, jer inhibiraju i acetilkolinske receptore u ostalim dijelovima tijela. Zbog toga se 1964. god. najveća nuda polagala na pronalaženje lijeka koji bi blokirao djelovanje gastrina. Nekoliko istraživačkih timova bilo je aktivno na tom području. Međutim, znanstvenici tvrtke Smith, Kline & French odlučili su se za poseban pristup. Pretpostavili su da bi i antihistaminici mogli biti učinkoviti kod liječenja ulkusa. Naime, bilo je poznato da i histamin može stimulirati izlučivanje želučane kiseline, ali nije bilo sigurnog dokaza da ima neku važniju ulogu *in vivo*. Mnogi istraživači nisu priznavali važnost histamina, naročito kada je nađeno da uobičajeni antihistaminici ne inhibiraju oslobađanje želučane kiseline. Ti su rezultati sugerirali odsutnost histaminskih receptora u parijetalnim stanicama. Stimulirajući učinak histamina mogao bi se objasniti njegovim vezanjem na receptore gastrina ili acetikolina. Zašto je onda nastavljeno traganje za učinkovitim antihistaminicima?

### Histamin

Histamin je tkivni hormon koji se oslobađa iz oštećenih stanica te uzrokuje nastajanje edema. Sastoji se od imidazolskog prstena koji može biti, kao što prikazuje slika 2, u dva tautomerna oblika. Na imidazolski prsten nastavlja se lanac od dva atoma ugljika s amino skupinom na kraju.  $pK_a$  te amino skupine je 9.80, što znači da je kod pH plazme (7.4), bočni lanac histamina 99.6% ioniziran.  $pK_a$  imidazolskog prstena je 5.74 pa je on na pH 7.4 uglavnom neioniziran.



Slika 2. Struktura histamina

### Teorija o dva histaminska receptora

S obzirom da tada poznati antihistaminici nisu inhibirali oslobađanje želučane kiseline, ali niti neke druge učinke histamina, npr. nisu potpuno inhibirali vazodilataciju uzrokovanoj histaminom, pretpostavljeno je da bi mogla postojati dva tipa histaminskih receptora. Sam histamin bi neselektivno aktivirao oba receptora, a prikladno dizajnirani antagonisti mogli bi ih razlikovati. Do tada poznati antihistaminici selektivno su inhibirali histamin-

ske receptore uključene u upalne procese (nazvane H1 receptori), ali nisu mogli inhibirati histaminske receptore odgovorne za izlučivanje želučane kiseline (nazvane H2 receptori). Započela je potraga za antagonistima pretpostavljenih H2 receptora. Dok se takve tvari ne pronađu nije sigurno da H2 receptori uopće postoje.

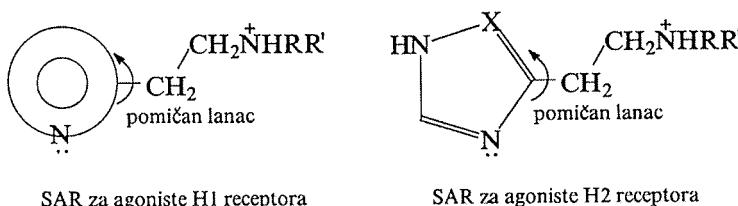
### Početak istraživanja

U istraživanjima se krenulo od histamina. Ako histamin stimulira izlučivanje želučane kiseline vežući se za hipotetske H2 receptore, onda ti receptori mogu prepoznati histamin. Promjenom strukture histamina trebalo je pronaći tvar koju bi receptor prepoznavao, a koja bi djelovala više kao antagonist nego kao agonist.

Bilo je, stoga, nužno otkriti kako se histamin veže na odgovarajući receptor. Proučavanjem strukture histamina i njegovih analoga zaključeno je da se razlikuju zahtjevi za vezanje histamina na H1 i zamišljene H2 receptore. Bitni zahtjevi za vezanje na H1 receptor su:

- Bočni lanac mora imati pozitivno nabijeni dušikov atom s jednim pripadajućim protonom. Kvarterne amonijeve soli kojima nedostaje taj proton vrlo su slabog djelovanja.
- Moru postojati pokretan lanac između kationa i heterocikličkog prstena.
- Prsten ne mora biti imidazolski, ali mora sadržavati dušikov atom s parom elektrona u položaju 2 s obzirom na lanac.

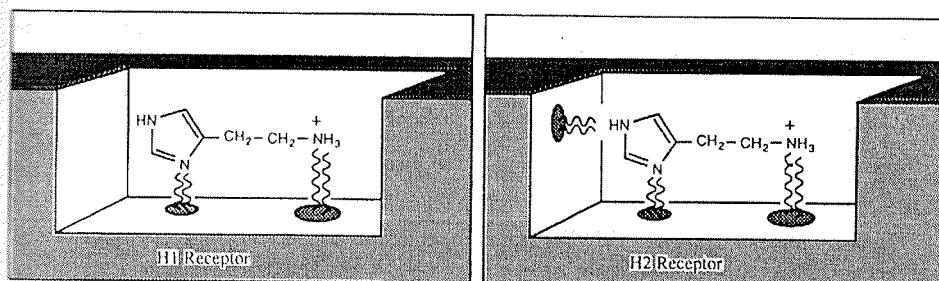
Bitni strukturni zahtjevi za vezanje na H2 receptore bili su isti kao i za H1 receptore, osim što je prsten morao sadržavati amidinsku skupinu ( $\text{HN}-\text{CH}=\text{N}:)$  (slika 3).



Slika 3. Rezultati SAR istraživanja

Zaključeno je da je krajnja amino skupina uključena u interakciju s oba tipa receptora ionskom ili vodikovom vezom, dok je dušikov atom u heterocikličkom prstenu samo u interakciji s H2 receptorom (slika 4).

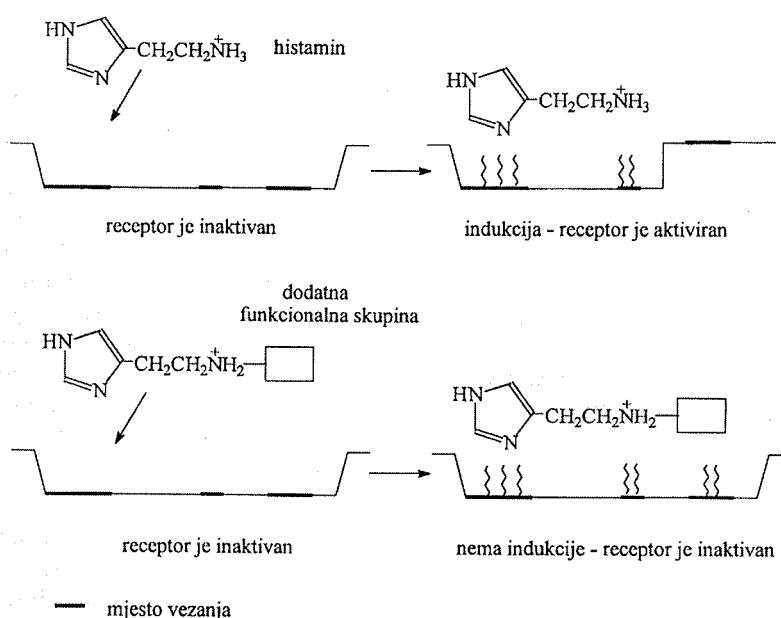
Već je spomenuto da je trebalo dizajnirati molekulu koju bi H2 receptor prepoznao, a koja ga ne bi aktivirala. Da bi se postiglo antagonističko djelovanje bilo bi neophodno promijeniti način na koji se molekula veže na recep-



Slika 4. Interakcija histamina s H1 i H2 receptorima

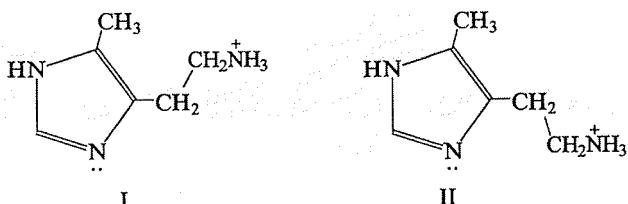
tor. Može se zamisliti kako se histamin veže na receptorskog mjesto i izaziva promjenu koja aktivira receptor (slika 5). Antagonist bi mogao nastati dodavanjem funkcionalne skupine koja se veže na drugo vezno mjesto na receptoru i sprječava promjenu u obliku potrebnu za tu aktivaciju.

Za početak su proučeni poznati agonisti i antagonisti iz ostalih područja farmaceutske kemije. Utvrđene su strukturne razlike agonista i antagonista za određeni receptor pa su slične promjene pokušane i na histaminu, npr. uvedene su alkilne i arilne skupine na različitim mjestima u molekuli histamina. Na žalost, niti jedan od tih analogova nije bio antagonist.



Slika 5. Moguće interakcije histamina i antagonista s receptorom

Ipak, dobiven je interesantan podatak, važan za kasnija istraživanja. Otkriveno je da je 4-metilhistamin (slika 6) vrlo selektivan H<sub>2</sub> agonist koji ima puno veću aktivnost za H<sub>2</sub> nego za H<sub>1</sub> receptore. Zašto je tako mala promjena na molekuli uzrokovala takvu selektivnost?



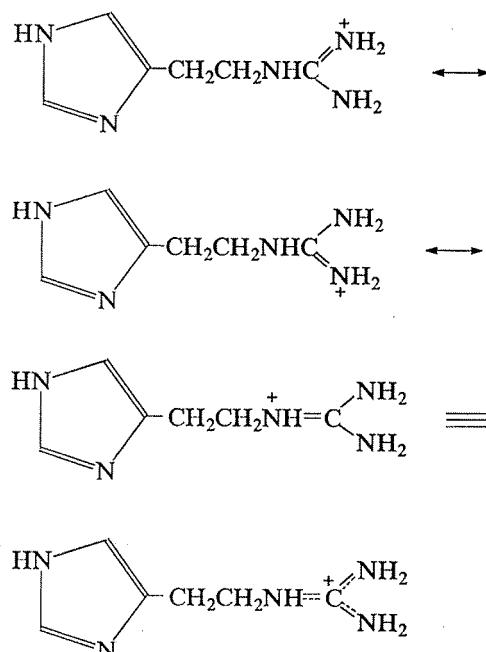
Slika 6. Konformacije 4-metilhistamina

Zbog bočnog lanca 4-metilhistamin je (kao i histamin) vrlo fleksibilna molekula koja može postojati u različitim konformacijama. Neke konformacije su manje stabilne. Posebno je nestabilna konformacija I na slici 6 zbog snažne stericke smetnje. Primjećena selektivnost sugerira da 4-metilhistamin (a logično i histamin) mora zauzeti dvije različite konformacije da bi odgovarao H<sub>1</sub> ili H<sub>2</sub> receptoru. Kako je 4-metilhistamin aktivniji na H<sub>2</sub> receptore, može se zaključiti da je za H<sub>2</sub> receptor potrebna stabilnija konformacija II, a za H<sub>1</sub> receptor nestabilnija konformacija I.

Unatoč ovom interesantnom rezultatu, znanstvenici na projektu nisu bili bliže H<sub>2</sub> antagonistu. Sintetizirano je oko dvije stotine spojeva, ali nijedan nije davao nagovještaj antagonističkog djelovanja.

Istraživanja su do tada bila usredotočena na traženje dodatnog hidrofobnog mjesta vezanja na receptoru. S obzirom da nisu dobiveni zadovoljavajući rezultati, promijenjen je fokus istraživanja – promatrano je što će se dogoditi ako se krajnja  $\text{NH}_3^+$  skupina zamijeni različitim funkcionalnim skupinama. To je dovelo do prvog značajnjeg rezultata – otkriveno je da *N*-gvanilhistamin (slika 7) ima vrlo slabo antagonističko djelovanje. Iako je taj spoj sintetiziran ranije, nije zapaženo da djeluje kao antagonist, jer istodobno djeluje i kao agonist. Daljnja farmakološka istraživanja pokazala su da je *N*-gvanilhistamin samo parcijalni agonist – aktivira H<sub>2</sub> receptore, ali u manjoj mjeri od histamina. Osim toga, dok je *N*-gvanilhistamin vezan na receptor histamina se ne može vezati. Tako je onemogućena cjelokupna aktivacija receptora, što ima za posljedicu manju količinu izlučene želučane kiseline.

To je bila prva naznaka nekog antagonista histamina. Trebalo je proučiti koji su dijelovi *N*-gvanilhistamina neophodni za antagonistički učinak. Radi toga sintetizirani su derivati gvanidina bez imidazolskog prstena, ali nijedan nije pokazivao antagonističko djelovanje. To je ukazivalo da su neophodni imidazolski prsten i gvanidinska skupina.

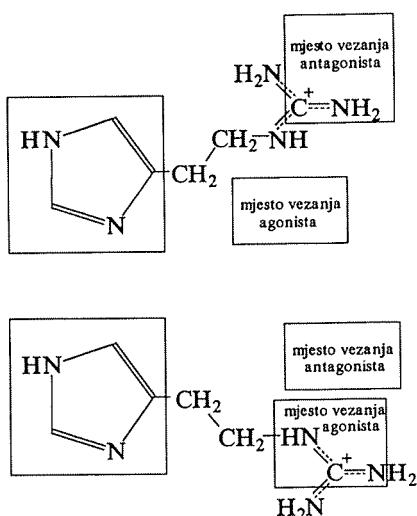


Slika 7. Struktura N-gvanilhistamina

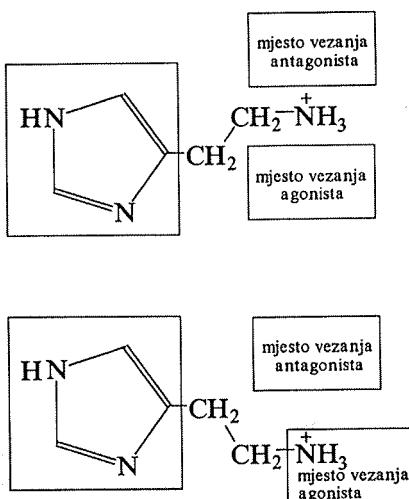
Uspoređene su strukturne formule *N*-gvanilhistamina i histamina. U oba spoja prisutan je imidazolski prsten i pozitivno nabijena skupina povezani lancem od dva atoma ugljika. Gvanidinska skupina je bazična i protonirana na pH 7.4 pa analozi imaju pozitivan naboј kao i histamin. Međutim, naboј gvanidinske skupine zbog tautomerije može biti raširen oko planarno postavljenih atoma dušika, nije lokaliziran kao kod histamina i udaljeniji je od imidazolskog prstena (slika 7). To daje mogućnost analogu da uspostavi interakciju s drugom veznom skupinom na receptoru koja je izvan dosega histamina. Za kationsku skupinu mogu biti dostupna dva mesta vezanja – ako se veže na agonističko mjesto, receptor se aktivira, a ako se veže na antagonističko mjesto ne dolazi do aktivacije. Dok *N*-gvanilhistamin može dosegnuti obje strane receptora (slika 8), histamin može dosegnuti samo agonističko mjesto (slika 9).

### Teorija kelatnog vezanja

Neophodno je bilo utvrditi može li se načiniti analog koji bi se vezao samo na mjesto antagonista. U tu svrhu sintezirani su analozi *N*-gvanilhistamina iz skupine izotiourea (slika 10) u kojima je dušikov atom najbliži imidazolskom prstenu zamijenjen atomom sumpora. Pozitivni naboј molekule ograničen je tako na krajnji dio lanca i trebao bi snažnije reagirati sa zamišljenim mjestom vezanja antagonista, ukoliko je on uistinu udaljen.

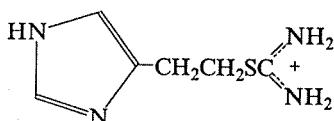


Slika 8. Mogući načini vezanja N-gvanilhistamina

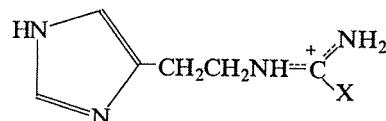


Slika 9. Vezanje histamina

Na taj način povećala se aktivnost antagonista, ali je molekula i dalje bila parcijalni agonist, što je značilo da je još uvijek bilo moguće vezanje na mjesto agonista. Sintetizirana su još dva analoga, u kojima je jedna od terminalnih amino skupina u gvanidinu zamjenjena tiometilnom ili metilnom skupinom (slika 11). Obaju spoja bila su parcijalni agonisti, ali slabi antagonisti.

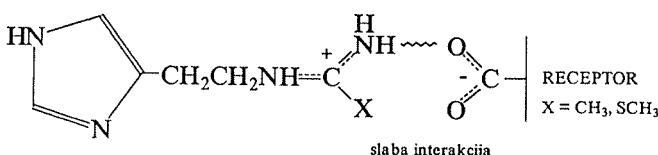
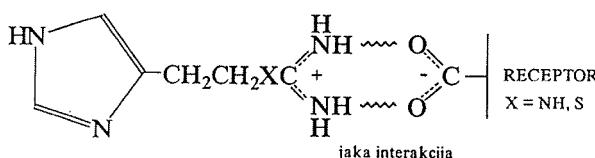


Slika 10. Analog histamina iz skupine izotiourea



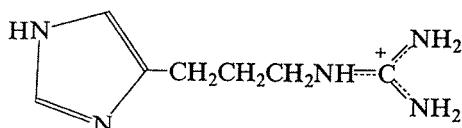
Slika 11. Analog histamina u kojem je X tiometilna ili metilna skupina

Iz ovih je rezultata zaključeno da su za vezanje na mjesto antagonista neophodne obje terminalne amino skupine. Pretpostavljeno je da je nabijena gvanidinska skupina preko dvije vodikove veze u interakciji s karboksilnom skupinom na receptoru (slika 12). Ako jedna od amino skupina nedostaje, vezanje će biti slabije, a time i slabiji antagonistički učinak.

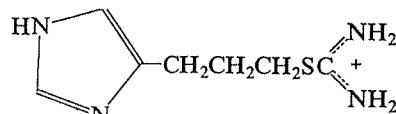


Slika 12. Moguća interakcija pozitivno nabijene gvanidinske skupine s receptorom

Zatim je lanac produžen s dva na tri ugljikova atoma da bi se vidjelo što će se dogoditi ako je gvanidinska skupina udaljenija od imidazolskog prstena. Aktivnost antagonista se povećala kod gvanidinskog derivata (slika 13), a smanjila kod derivata iz skupine izotiourea (slika 14). Zato je pretpostavljeno da kod analoga duljine lanca dva atoma ugljika u vodikovim vezama s receptorom sudjeluju terminalne amino skupine, dok kod lanca od tri atoma ugljika vodikove veze uključuju jednu terminalnu amino skupinu i amino skupinu unutar lanca (slika 15).

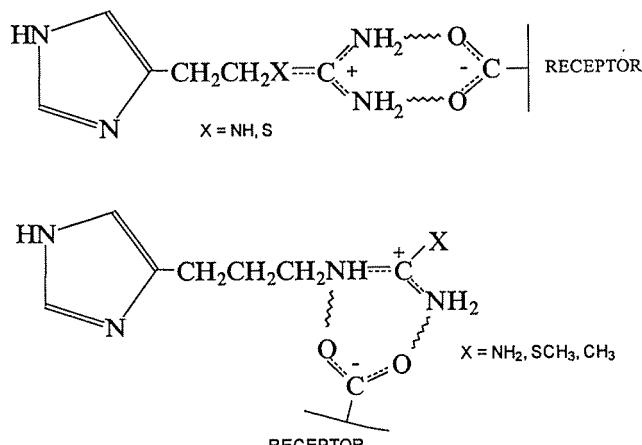


Slika 13. Analog histamina iz skupine gvanidina

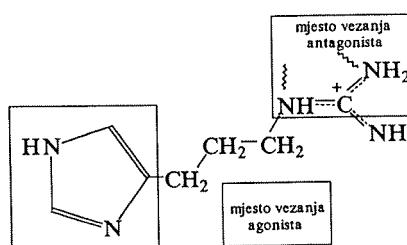


Slika 14. Analog histamina iz skupine izotiourea

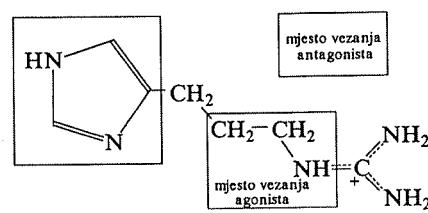
Teorija je potvrđena kada je jedna od terminalnih amino skupina u gvanidinskom derivatu (slika 13) zamijenjena tiometilnom ili metilnom skupinom (slika 15). Ta promjena u kemijskoj strukturi nije smanjila antagonističko djelovanje. Rezultati dobiveni sličnim promjenama na molekuli duljine lanca dva atoma ugljika bili su posve različiti. Pretpostavljene vezne interakcije prikazane su na slikama 16 i 17.



Slika 15. Moguća interakcija analoga različitih duljina lanaca s receptorom

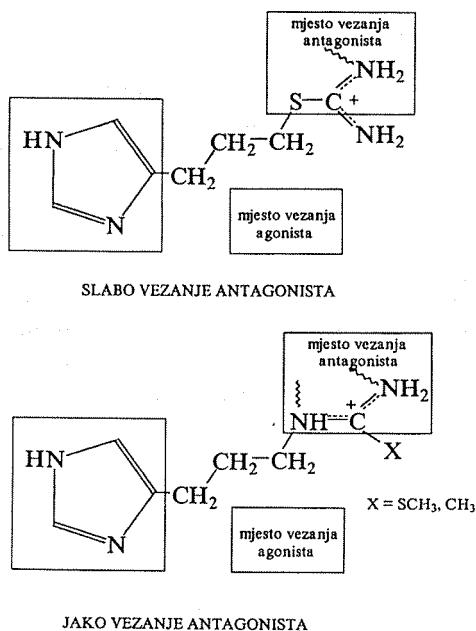


JAKO VEZANJE ANTAGONISTA



VEZANJE AGONISTA

Slika 16. Interakcija receptora s analognom duljine lanca tri atoma ugljika



*Slika 17. Učinak promjene na gvanidinskom dijelu molekule na vezno mjesto antagonista*

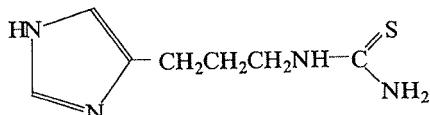
### Od parcijalnog agonista do antagonista – razvoj burimamida

U dalnjim istraživanjima nastojao se dobiti spoj koji djeluje samo kao antagonist. To je značilo dizajnirati molekulu koja će razlikovati mjesto vezanja agonista od mesta vezanja antagonista. Na prvi pogled to je izgledalo nemoguće jer oba mesta ostvaruju interakciju preko istog tipa veze. Za djelovanje histamina kao agonista bitni su imidazolski prsten i nabijena amino skupina, koji se preko vodikove i ionske veze vezuju na receptor. Opisano antagonističko djelovanje parcijalnog agonista također ovisi o vezanju imidazolskog prstena vodikovom vezom i gvanidinske skupine ionskom vezom.

Strukture koje pokazuju antagonističko djelovanje mogu ući u interakciju s receptorom stvaranjem kelata (slika 15). Ta interakcija uključuje dvije vodikove veze između dviju nabijenih skupina. Postavljeno je pitanje je li neophodno da kelatna skupina bude nabijena i može li neutralna skupina isto stvarati kelate. Uz potvrđan odgovor, bilo bi moguće razlikovati mjesto vezanja agonista od antagonista, jer je za vezanje agonista nužna ionska veza. Zbog toga je bazična gvanidinska skupina zamijenjena neutralnom skupinom sposobnom za interakciju s receptorom preko vodikove veze. Postoji mnogo takvih skupina, ali je izbor ograničen po načelu koje je praćeno tijekom cijelog istraživanja. Kada se god željelo promijeniti fizikalnu ili kemijsku ka-

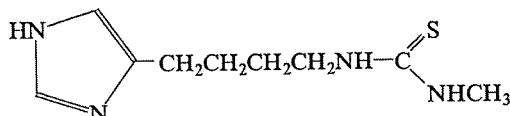
rakteristiku molekule, nastojalo se ostale karakteristike promijeniti što manje. Zato je pri zamjeni gvanidinske skupine neutralnom skupinom bilo neophodno osigurati sličnost u veličini, obliku i hidrofobnosti.

Isprobano je nekoliko funkcionalnih skupina, a uspjeh je konačno postignut derivatom tiouree koji je slabi antagonist bez agonističke aktivnosti (slika 18). Tiourea je veoma slična gvanidinskoj skupini. Obje skupine su planarne, podjednake veličine i mogu se vezati preko vodikove veze. Za razliku od gvanidinske skupine, tiourea je neutralna. Ona posjeduje C=S skupinu koja ima elektron akceptorska svojstva, pa su susjedni atomi dušika manje bazični i sličniji amidnim dušicima. Razlika u biološkoj aktivnosti se stoga može pripisati razlici u bazičnosti dviju skupina. Činjenica da se neutralna skupina može vezati na mjesto antagonista, a ne može na mjesto agonista, mogla je značiti da je za vezanje agonista važna ionska veza, dok je za vezanje antagonista važna vodikova veza.



Slika 18. Slabi antagonist histamina iz skupine tiourea

Produljenjem lanca i dodatkom N-metilne skupine, stvoren je burimamid (slika 19) koji je imao povećano djelovanje. To je sugeriralo da je produljenjem lanca tiourea pomaknuta bliže mjestu vezanja antagonista, a da je dodatak N-metilne skupine povećao hidrofobnost. Burimamid je visoko specifičan kompetitivni antagonist histamina na H<sub>2</sub> receptoru sa stostruko jačim djelovanjem od N-gvanilhistamina. Njegovo je otkriće napokon dokazalo postojanje H<sub>2</sub> receptora.

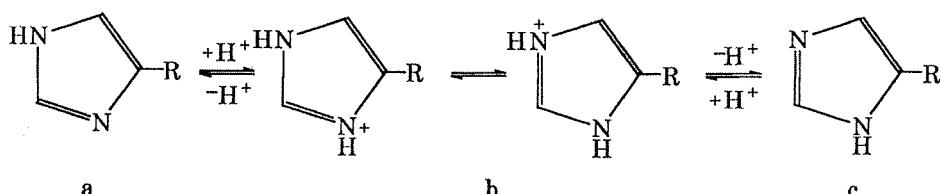


Slika 19. Struktura burimamida

### Razvoj metiamida

Burimamid ipak nije bio pogodan za liječenje, jer je njegovo antagonističko djelovanje bilo još uvijek preslabo za oralnu primjenu. Neophodna su bila daljnja istraživanja. Pažnja je posvećena imidazolskom prstenu burimamida, tj. različitim tautomernim oblicima tog prstena. Ako je određeni tautomer pogodniji za vezanje na H<sub>2</sub> receptor, djelovanje bi se moglo povećati modifikacijom strukture burimamida tako da taj tautomer bude favoriziran.

Na pH 7.4 imidazolski prsten je u ravnoteži između dva neionizirana tautomerna oblika (a) i (c) preko protoniranih intermedijera (b) (slika 20). Proton neophodan za ovaj proces mora donirati voda ili pogodan aminokiselinski ostatak s izmjenjivim protonom na mjestu vezanja. Ako je izmjena spora, lijek se može vezati i napustiti receptor prije uspostave ravnoteže između tautomera. Ako je za vezanje važan samo jedan tautomerni oblik, onda bi se antagonističko djelovanje povećalo u spoju u kojem bi taj tautomer bio favoriziran. Hipotetski model vezanja na receptor pokazuje da je imidazolski prsten važan za vezanje i agonista i antagonistu. Zato je razumljivo prihvatići da je favorizirani tautomer imidazola jednak za agoniste i antagoniste. Ako je to istina, onda bi favorizirani tautomer jakog agonista kao što je histamin, trebao biti i favorizirani tautomer jakog antagonistu. Prvo se nastojalo doznati je li favorizirani tautomer ioniziran ili neioniziran.

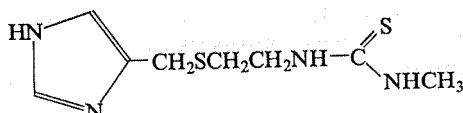


Slika 20. Tautomeri derivata imidazola

Već je spomenuto da je  $pK_a$  imidazolskog prstena u histaminu 5.74.  $pK_a$  samog imidazola je 6.80, a u burimamidu je 7.25, što znači da su ti prstenovi bazičniji nego u histaminu i podložniji ionizaciji. To se objašnjava utjecajem bočnog lanca na imidazolski prsten. Određeno je da je bočni lanac burimamida slab elektron donor (reda veličine kao i metilna skupina). Zbog toga je imidazolski prsten u burimamidu podložniji ionizaciji nego u histaminu gdje je bočni lanac elektron akceptor. Na pH 7.4, 40% burimamida ima ionizirani imidazolski prsten, dok je kod histamina taj iznos samo 3%. Kako je vezanje imidazolskog prstena važno i za antagonističko i za agonističko djelovanje, znači da  $pK_a$  bliži onom od histamina može značiti jače vezanje i bolju antagonističku aktivnost. Stoga je bilo poželjno da se sintetizira spoj s elektron akceptorskim bočnim lancem. To se može učiniti uvođenjem elektronegativnog atoma u bočni lanac, po mogućnosti onoga koji uzrokuje minimalne poremećaje u ostatku molekule. Drugim riječima, tražio se analog za metilensku skupinu koji ima elektronski utjecaj, ali približno istu veličinu i svojstva kao metilenska skupina.

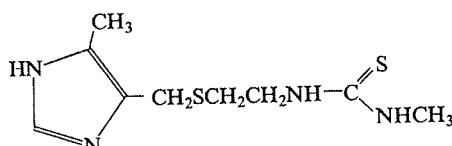
Prvo se pokušalo s atomom sumpora. Sumpor je dobar izoster za metilensku skupinu, jer ima sličan van der Waalsov radijus i sličan kut vezanja. Ipak, veza C-S je nešto dulja od veze C-C, što vodi do malog produljenja molekule. Načinjen je derivat burimamida u kojem je druga metilenska skupina

(brojeći od imidazolskog prstena) zamijenjena atomom sumpora. To mjesto nije izabrano iz strategijskih razloga, nego iz sintetskih. Kao što se očekivalo, nastala molekula, tiaburimamid (slika 21), imala je značajno niži  $pK_a$  (6.25) i poboljšano antagonističko djelovanje. Taj je rezultat podupirao teoriju da je smanjivanje udjela ioniziranog tautomera korisno za djelovanje i interakciju s receptorom.



Slika 21. Struktura tiaburimamida

Vec je pokazano da su moguća dva neionizirana tautomera histamina. Ako je jedan od njih stabilniji, onda se može pretpostaviti da je on važniji za vezanje s receptorom. Favorizirani tautomer kod histamina je tautomer (a) (slika 20) što se objašnjava elektron akceptorskim djelovanjem bočnog lanca. Kako je bočni lanac tiaburimamida elektron akceptor, kod njega će također biti favoriziran tautomer (a). Uvodenjem elektron donorske skupine u prsten na položaj četiri, taj bi tautomer bio još stabilniji, a induktivni učinak na susjednom atomu dušika jači. Važno je bilo izabrati skupinu koja neće ometati uobičajenu interakciju s receptorom. Izabrana je metilna skupina, jer se znalo da je 4-metilhistamin agonist i visoko selektivan za H2 receptore. Tako je sintetiziran metiamid (slika 22). Antagonističko djelovanje metiamida bilo je jače usprkos porastu  $pK_a$  vrijednosti imidazolskog prstena na 6.80. U usporedbi s burimamidom, postotak ioniziranog imidazolskog prstena je kod metiamida niži, a omjer dva neionizirana tautomera imidazola je obrnut. Činjenica da je aktivnost u odnosu na tiaburimamid porasla, sugerira da povećanje udjela tautomera (a) ima prevagu nad povećanjem udjela ioniziranog tautomera (b).



Slika 22. Struktura metiamida

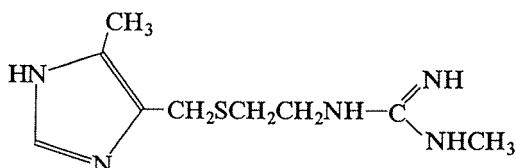
Za usporedbu je sintetiziran i 4-metilburimamid. Uvodenje metilne skupine u položaj 4 nije povećalo djelovanje.  $pK_a$  je povećan na 7.80 što je rezultiralo porastom udjela ioniziranog imidazolskog prstena. Dok se uvođenje metilne skupine u tiaburimamid pokazalo korisnim, u burimamidu nije.

Nadalje je otkriveno da tioeterski lanac povećava pomičnost bočnog lanca, a da metilni supstituent na položaju 4 imidazolskog prstena pomaže pravilnoj orijentaciji imidazolskog prstena za vezanje s receptorom. Značajno je da oksaburimamid – analog koji sadrži kisik, ima slabije djelovanje nego burimamid, unatoč činjenici da je elektron akceptorski učinak kisika sličan učinku sumpora. Duljina i kutevi eterske veze slični su metilenskoj skupini pa je kisik bolji izoster nego sumpor. Međutim, atom kisika je manji, bazičniji i hidrofilniji od atoma sumpora i metilenske skupine. Za slabiju aktivnost oksaburimamida može biti više razloga, npr. manja fleksibilnost bočnog lanca ili stvaranje vodikove veze s receptorom ili s imidazolskim prstenom.

Djelovanje metiamida bilo je deset puta jače od djelovanja burimamida. Međutim, kod nekih pacijenata metiamid je pokazao značajne nuspojave kao što su oštećenje bubrega i granulocitopenija. Bila su neophodna daljnja istraživanja da se pronađe bolji lijek.

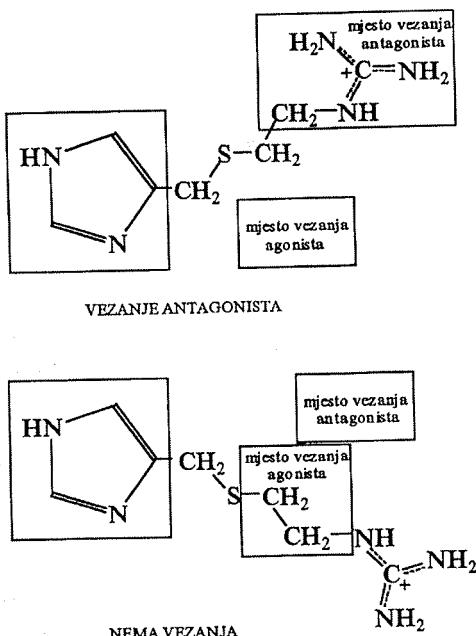
### Razvoj cimetidina

Prepostavljen je da su nuspojave metiamida povezane s tiourom. Zato je predloženo da se zamjeni ta skupina. Pokušalo se s derivatima uree i gvanidina, ali su oni bili manje aktivni. Derivat gvanidina prikazan na slici 23 također je bio manje aktivan, ali je imao samo antagonističko djelovanje bez imalo agonističkog. Prijašnji derivati gvanidina bili su parcijalni agonisti.



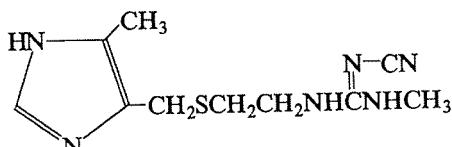
Slika 23. Derivat gvanidina

To je moguće objasniti na sljedeći način: lanac od četiri atoma je dulji pa gvanidinska skupina ne može dosegnuti mjesto vezanja agonista (slika 24), dok kraći lanac od tri atoma omogućava vezanje i na agonističko i na antagonističko vezno mjesto (slika 16). Iako je antagonističko djelovanje derivata gvanidina slabo, odlučeno je da se ova molekula bolje prouči, jer je gvanidinska skupina manje toksična od tiouree. Trebalo je zadržati gvanidinsku skupinu, a povećati djelovanje. Prepostavilo se da se to može postići smanjenjem bazičnosti gvanidinskog ostatka, npr. uvođenjem supstituenata koji odvlače elektrone kao što su nitro i cijano skupina. Imajući to u vidu sintetizirani su nitrogvanidinski i cijanogvanidinski derivati metiamida. Analog iz skupine cijanogvanidina – cimetidin bio je najaktivniji pa je izabran za klinička ispitivanja.



Slika 24. Lanac duljine četiri atoma

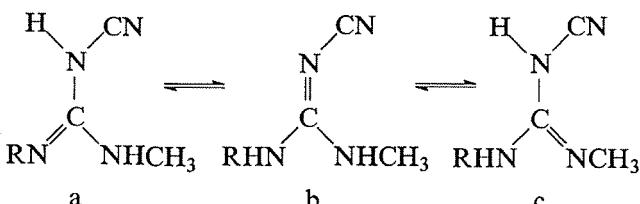
Klinička su ispitivanja pokazala da cimetidin (slika 25) inhibira H<sub>2</sub> receptore, da nema značajnije nuspojave kao metiamid te da ima jače djelovanje. Nadeno je, također, da cimetidin inhibira pentagastrin, analog gastrina, koji stimulira izlučivanje želučane kiseline. Godine 1976. cimetidin je registriran i stavljen u prodaju. Tijekom nekoliko godina bio je najčešće propisivani lijek u svijetu, dok ga 1988. godine nije potpisnuo ranitidin.



Slika 25. Struktura cimetidina

Otkriće da su metiamid i cimetidin dobri H<sub>2</sub> antagonisti sličnih aktivnosti pokazuje da je cijanogvanidinska skupina dobar bioizoster za tioureu. Dok je tiourea najstabilnija u jednom tautomernom obliku, gvanidinska skupina može postojati u tri tautomerna oblika (slika 26), od kojih je tautomer (b) preferiran. To možemo objasniti utjecajem cijano skupine koja odvlači elek-

trone više na susjedni atom dušika nego na dva udaljenija dušika. Zato je susjedni dušik manje bazičan i manje podložan protonizaciji.



Slika 26. Tautomeri gvanidinske skupine

Struktura tautomera b gvanidinske skupine slična je tiourei. Obje skupine imaju planarni  $\pi$  sustav elektrona sa sličnom geometrijom (jednake kuteve i C-N udaljenosti), polarne su, hidrofilne i neionizirane kod pH 7.4.

Svakom novom lijeku potrebno je proučiti metabolizam, jer nastali metaboliti mogu biti odgovorni za nuspojave, ali mogu imati i jači željeni farmakološki učinak od samog lijeka. Poznavanje kemizma i farmakološkog djelovanja metabolita može dati smjernice za daljnja istraživanja. Zbog toga je proučen metabolizam cimetidina. Pronađeno je da je on u organizmu prilično stabilan i izlučuje se uglavnom nepromijenjen, uz manju količinu metabolita nastalih S-oksidacijom ili oksidacijom metilne skupine na prstenu.

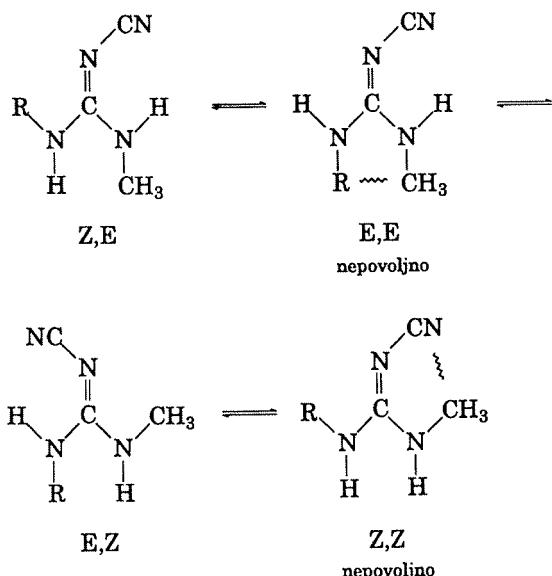
### Analozi cimetidina

Proučavanje različitih stabilnih konformacija gvanidinske skupine u cimetidinu dovelo je do preispitivanja tipa veze karakteristične za vezanje antagonist-a. Do tog trenutka, najprihvatljivija je bila teorija interakcija preko dviju vodikovih veza kao što pokazuje slika 12. Da bi se vezala na taj način gvanidinska skupina u cimetidinu bi trebala zauzeti Z,Z konformaciju (slika 27).

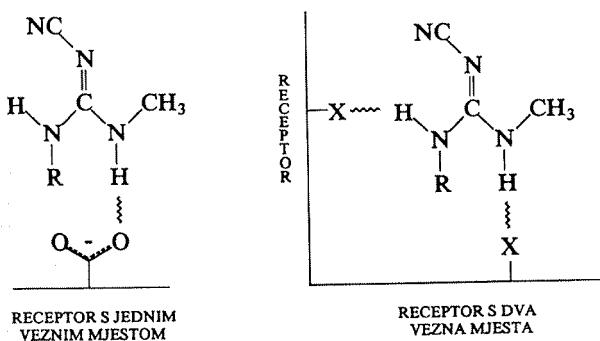
Međutim, kristalografska X-zrakama i NMR istraživanja pokazala su da cimetidin postoji kao ravnotežna smjesa E,Z i Z,E konformacija. Ako je jedna od njih aktivna konformacija, onda to ukazuje da se vezanje cimetidina na aktivno mjesto ne događa stvaranjem kelata. Moguće je da je gvanidinska skupina preko vodikovih veza u interakciji s dva različita vezna mjesta, a ne s jednom karboksilnom skupinom (slika 28).

U prilog teoriji o postojanju dvaju veznih mjesta bilo je i slabo djelovanje derivata uree koji su najstabilniji u Z,Z konformaciji i zbog toga se ne mogu vezati za oba vezna mesta.

Ako je točna ta teorija vezanja, onda bi derivati stabilniji u jednoj od tih dvaju konformacija mogli bili farmakološki aktivniji. To se može postići npr. umetanjem gvanidinske skupine u prsten. Na taj način dobiven je najbolji



Slika 27. Konformacije guanidinske skupine u cimetidinu

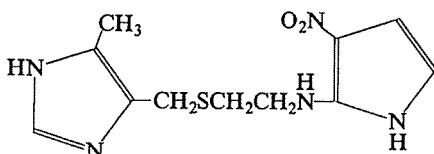


Slika 28. Alternativne teorije vezanja cimetidina na receptor

antagonist iz serije cimetidina – nitropirorolni analog cimetidina (slika 29). Time je dokazano da je *E,Z* konformacija aktivna konformacija.

### Desolvatacija

Već je spomenuto da su gvanidinska skupina i tiourea polarne i hidrofilne. To znači da su sklene solvataciji. Da bi vodikove veze mogle dosegnuti receptor, »vodeni omotač« se mora ukloniti. Što je skupina više solvatizirana,

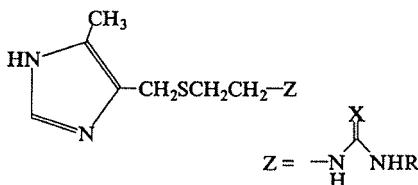


*Slika 29. Struktura nitropirolnog analoga cimetidina*

to je uklanjanje vode teže. Pretpostavljeno je da bi se smanjenjem solvatacije polarne skupine trebalo povećati djelovanje. To se može postići povećanjem njene hidrofobnosti.

U dalnjim istraživanjima sintetizirani su analozi cimetidina s planarnim aminskim dijelom (Z) (slika 30) da se vidi postoji li korelacija između antagonističkog djelovanja i hidrofobnog karaktera aminskog dijela (HZ). Dokazi o njenom postojanju podržali su teoriju desolvatacije (slika 31). Veza između farmakološke aktivnosti i participjskog koeficijenta ( $\log P$ ) može se prikazati sljedećim izrazom:

$$\log(\text{aktivnosti}) = 2.0 \log P + 7.4$$

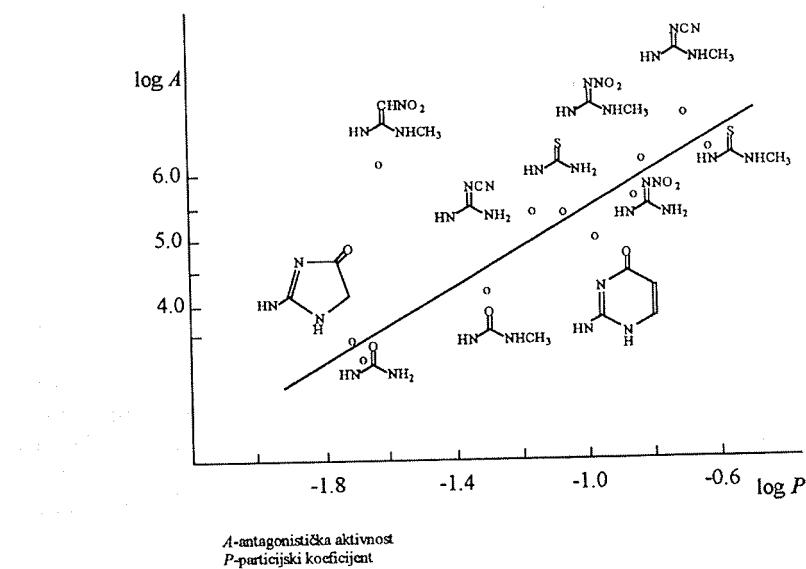


*Slika 30. Struktura analoga cimetidina s planarnim aminskim dijelom*

Utjecaj hidrofobnosti proučavan je na izocitozinskim analozima cimetidina. Najjače antagonističko djelovanje imali su butilni, pentilni i benzilni derivati. S obzirom da je benzilni derivat bio i toksičniji, u aromatski prsten uveden je alkoksij supstituent. Tako je sintetiziran oksmetidin koji je imao jače djelovanje, ali i veću toksičnost od cimetidina pa nije uveden u terapiju.

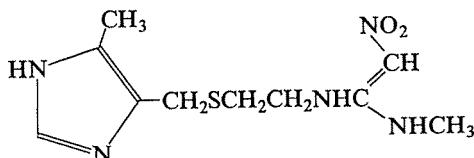
### Razvoj nitroketenaminskih derivata

S obzirom da se antagonističko djelovanje povećava s hidrofobnošću polarne skupine bilo je interesantno proučiti što će se dogoditi ako se elektro-negativni atom dušika u iminoskupini cimetidina zamjeni atomom ugljika. Tako je nastao nitroketenaminski derivat cimetidina (slika 32). Uvođenje nitroketenaminske skupine nije povećalo farmakološko djelovanje zbog povećanja hidrofilnosti. Dobiveni spoj bio je preaktivovan za tako veliku hidrofilnost, čak 30 puta aktivniji nego što bi se očekivalo iz navedene jednadžbe.



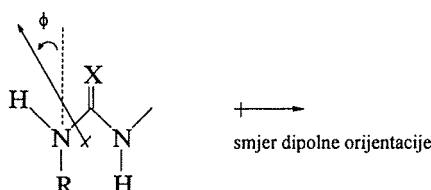
*Slika 31. Proporcionalnost aktivnosti antagonista s hidrofobnošću aminskog dijela molekule*

Nitroketenaminski analog cimetidina nije jedini odstupao od uobičajenog modela. Npr. imidazolinonski analog cimetidina, koji je relativno hidrofoban, imao je puno manju aktivnost nego što bi se zaključilo iz jednadžbe. Takva otkrića su posebno zanimljiva, jer svako odstupanje od uobičajenog modela sugerira da nisu uzeti u obzir svi čimbenici. U dalnjim istraživanjima uspostavilo se da je bitna orijentacija dipolnog momenta koja je definirana kutom  $\Phi$  između dipolnog momenta i N-R veze (slika 33). Cijanogvanidinska, nitroketenaminska i nitropirolna skupina imaju jako antagonističko djelovanje i orijentacije dipolnog momenta  $13^\circ$ ,  $33^\circ$ , odnosno  $27^\circ$  (slika 34). Izocitozinska i imidazolinonska skupina imaju slabo djelovanje i dipolne orijentacije  $2^\circ$ , odnosno  $-6^\circ$ . Čini se da jakost dipolnog momenta ( $\mu$ ) nije bitna.

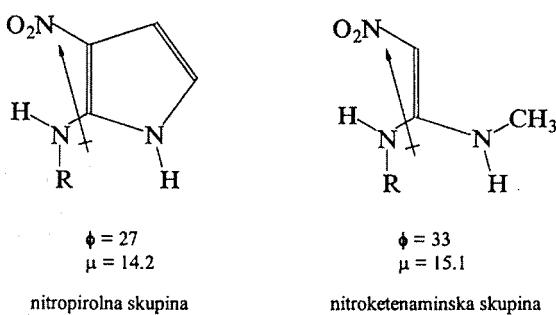
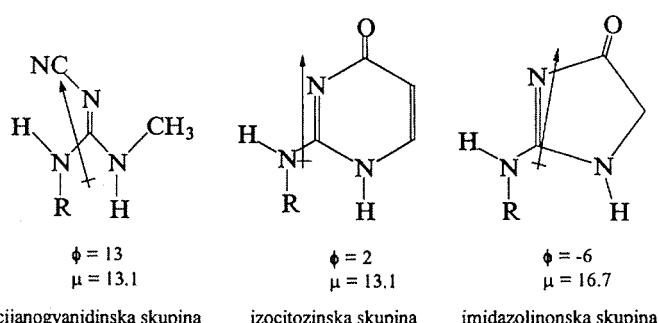


Slika 32 Struktura nitroketenaminskog analoga cimetidina

Važnost orijentacije dipolnog momenta moguće je objasniti na sljedeći način. Kada se lijek približi receptoru, njegov dipol stupa u interakciju s dipolom na površini receptora tako da su poravnati dipolni momenti. To će spe-



Slika 33. Orientacija dipolnog momenta u analogima cimetidina

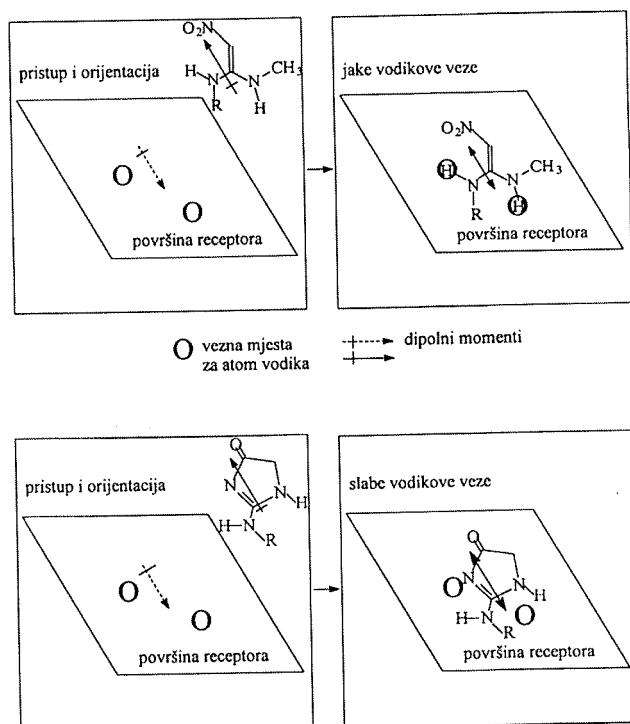


Slika 34. Dipolni momenti različitih antagonistih histamina

cifično usmjeriti lijek prije nego što nastanu vodikove veze i odrediti jakost veze (slika 35). Ako se dipolni moment pravilno orijentira kao u derivatu ketenamina, skupina će se pravilno postaviti za snažno vezanje vodikovom vezom što rezultira jakom aktivnošću. Ako je orijentacija pogrešna kao u derivatu imidazolinona, onda je vezanje manje učinkovito pa se gubi djelovanje.

Da se odredi optimalni kut  $\Phi$  provedena su QSAR istraživanja. Pronađeno je da idealni kut iznosi  $30^\circ$ . Određena je korelacija između orijentacije dipolnog momenta ( $\Phi$ ), partijskog koeficijenta ( $P$ ) i aktivnosti (A):

$$\log A = 9.12 \cos \Phi + 0.6 \log P - 2.71$$



Slika 35. Utjecaj orijentacije dipolnog momenta na vezanje za receptor

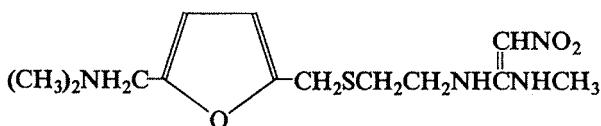
Iz jednadžbe se vidi da aktivnost raste s porastom hidrofobnosti, a pada ako je orijentacija dipolnog momenta različita od idealnog kuta  $30^\circ$ , čiji kosinus iznosi 1. Ako orijentacija dipolnog momenta odstupa od  $30^\circ$ , onda je  $\cos \Phi$  manji od 1 i aktivnost se smanjuje.

Nitroketenaminska skupina nije dala djelotvorniji analog cimetidina, ali će se ona ponovo pojaviti u ranitidinu.

### Promjene imidazolskog prstena – ranitidin

Proučavanjem analoga cimetidina otkriveno je da se imidazolski prsten može zamijeniti s drugim heterocikličkim prstenovima koji sadrže dušik. Glaxo je otišao korak dalje i dokazao da se imidazolski prsten može zamijeniti furanskim prstenom koji ima supstituent s dušikom. To je dovelo do sinteze ranitidina (slika 36). Godine 1981. ranitidin je uveden na tržište, a ubrzo je postao najprodavaniji propisivani lijek na svijetu. Istisnuo je i cimetidin jer ima deset puta jače djelovanje, pokazuje manje nuspojava, a djeluje duže.

Rezultati QSAR istraživanja koji su doveli do sinteze ranitidina mogu se sažeti ovako:



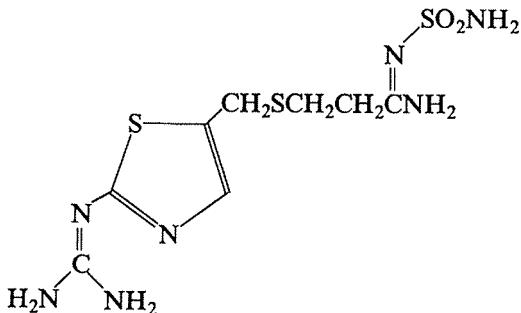
Slika 36. Struktura ranitidina

- Nitroketenaminska skupina je optimalna za farmakološko djelovanje, ali se može zamijeniti drugim planarnim  $\pi$  sustavima sposobnim za vezanje vodikovom vezom.
- Zamjenom atoma sumpora metilenskom skupinom smanjuje se djelovanje.
- Premještanjem atoma sumpora do prstena smanjuje se djelovanje.
- Zamjenom furanskog prstena hidrofobnijim prstenima kao što su fenil ili tiofen smanjuje se djelovanje.
- Optimalno je da je supstitucija na furanskom prstenu u položajima 2 i 5.
- Supstituenti na dimetilamino skupini mogu biti različiti, što znači da njena bazičnost i hidrofobnost nisu bitne za djelovanje.
- Metilni supstituent na položaju 3 furanskog prstena smanjuje djelovanje, dok ista skupina u derivatima imidazola povećava djelovanje.
- Metilni supstituent na položaju 4 furanskog prstena povećava djelovanje.

Zadnje dvije činjenice ukazuju da heterociklički prstenovi u cimetidinu i ranitidinu ne ostvaruju na isti način interakciju s H<sub>2</sub> receptorom.

### Famotidin i nizatidin

Između 1985. i 1987. godine na tržište su uvedena dva nova antiulkusna lijeka famotidin i nizatidin. Heterociklički imidazolski prsten cimetidina je kod famotidina zamijenjen 2-gvanidinotiazolskim, a u bočnom lancu prisutna je sulfonamidna skupina (slika 37). Te promjene na molekuli dovele su do velikog povećanja djelovanja.



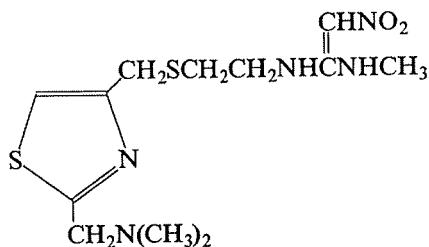
Slika 37. Struktura famotidina

Rezultati QSAR istraživanja su sljedeći:

- Sulfonilamidna skupina nije esencijalna i može se zamijeniti različitim strukturama koje su planarne, imaju dipolne momente i mogu stупить u interakciju s receptorom preko vodikove veze. Niska  $pK_a$  vrijednost nije nužna, što omogućuje izbor većeg broja planarnih skupina nego kod cimetidina.
- Djelovanje je optimalno za lanac duljine 4 ili 5 atoma.
- Zamjenom sumpora metilenskom skupinom povećava se djelovanje.
- Modifikacija lanca je moguća, npr. uklapanjem u aromatski prsten.
- Uvođenjem metilnog supstituenta u položaj 2 u odnosu na lanac, djelovanje se smanjuje (za razliku od analoga cimetidina).
- Za djelovanje su potrebna tri od četiri vodika u dvije amino skupine.

S obzirom da se razlikuju rezultati QSAR famotidina i cimetidina, može se zaključiti da famotidin i cimetidin ne ostvaruju interakciju s H<sub>2</sub> receptorm na isti način. Sljedeći je dokaz za to činjenica da gvanidinski analog famotidina ima slabije djelovanje.

Godine 1987. tvornica Lilly je na tržište uvela nizatidin koji je jednako jakog djelovanja kao i ranitidin. Iz strukturne formule nizatidina prikazane na slici 38 vidljivo je da je furanski prsten ranitidina zamijenjen tiazolskim prstenom.

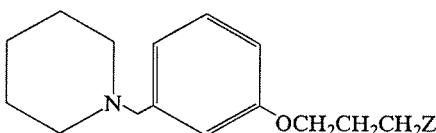


Slika 38. Struktura nizatidina

### H<sub>2</sub> antagonisti produljenog djelovanja

Glaxo je prvi uspio sintetizirati antiulkusni lijek produljenog djelovanja kemijskom modifikacijom ranitidina – stavljanjem kisika iz furanskog prstena egzociklično fenilnom prstenu i zamjenom dimetilamino skupine s piperidinskim prstenom (slika 39).

Spojevi koji su najviše obećavali bili su lamtidin i lokstidin jer su pet do deset puta djelotvorniji od ranitidina i triput dužeg djelovanja. Na žalost, *in vivo* ispitivanjima utvrđena je njihova toksičnost i moguća kancerogenost pa su povučeni iz kliničkih ispitivanja.

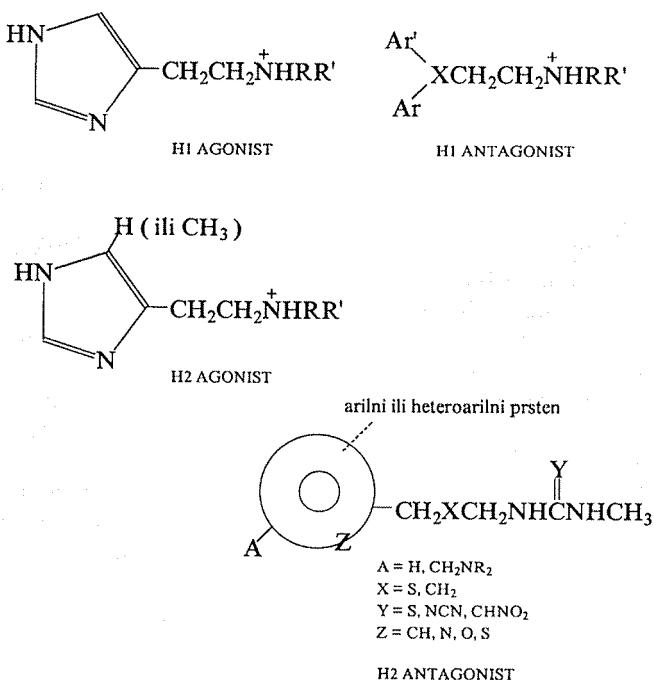


Z = planarna i polarna skupina

*Slika 39. H2 antagonisti produljenog djelovanja*

### Usporedba H1 i H2 antagonista

Strukture H2 antagonista bitno su različite od klasičnih antihistaminika – H1 antagonista. H1 antagonisti, kao i H1 agonisti, imaju ionsku amino skupinu na kraju pomičnog lanca. Za razliku od agonista, umjesto imidazolskog prstena imaju dva arilna ili heteroarilna prstena. Zbog arilnih prstenova, H1 antagonisti su hidrofobne molekule s visokim partičijskim koeficijentima. H2 antagonisti su polarne, hidrofilne molekule s visokim dipolnim momentima i niskim partičijskim koeficijentima. Na kraju pomičnog lanca imaju polarni, π elektronski sustav koji je slabo amfoteran i neioniziran na pH 7.4. Ta je vezna skupina izgleda ključna za antagonizam na H2 receptorima (slika 40).



*Slika 40. Usporedba H1 i H2 agonista i antagonista*

Peteročlani heterociklički prsten uglavnom sadrži atom dušika. Ako je prsten aromatski ili furanski, dušik se nalazi u bočnom lancu. Zbog hidrofilnog karaktera, H<sub>2</sub> antagonisti rjeđe uzrokuju nuspojave na CŽS nego H<sub>1</sub> antagonisti.

H<sub>2</sub> receptori nalaze se u mnogim organima, ali im je najvažnija uloga u izlučivanju želučane kiseline. Antagonisti tih receptora brzo i učinkovito inhibiraju izlučivanje kiseline pa su iz temelja izmjenili terapiju ulkusa.

### SAŽETAK

Suvremeni način razvoja nove ljekovite tvari temelji se na racionalnom dizajniranju, pri čemu se molekula potencijalnog lijeka kemijskim modifikacijama nastoji što više prilagoditi odgovarajućem receptoru u biološkom sustavu. Racionalni pristup dizajniranju ljekovite tvari ilustrirano je na primjeru ranitidina. U radu su prikazana kemijska istraživanja koja su pretvodila uvođenju prvog antiulkusnog lijeka cimetidina u terapiju te razvoj ranitidina, famotidina i nizatidina, danas najvažnijih lijekova iz te terapijske skupine. Do 1964. godine kada je započeo program ranitidina liječenje ulkusa sastojalo se u neutralizaciji viška kloridne kiseline u želucu pomoću antacija. Bilo je očito da bi bolji pristup terapiji bio smanjiti izlučivanje želučane kiseline pa je postavljen cilj pronaći lijekove s takvim djelovanjem. Postavljena je teorija o postojanju dviju vrsta histaminskih receptora – H<sub>1</sub> receptora koji su uključeni u upalne procese i H<sub>2</sub> receptora koji su prvenstveno odgovorni za izlučivanje želučane kiseline. U istraživanjima se krenulo od samog histamina. Provedene su modifikacije u molekuli uvođenjem alkilnih i arilnih supstituenata na različitim mjestima u molekuli, promjenom hidrofobnosti, produljenjem bočnog lanca, uvođenjem skupina kao što su gvanil, izotiourea, cijanogvanidin, zamjenom imidazolskog prstena s drugim heterociklima, te uvođenjem elektron donorskih ili akceptorskih funkcionalnih skupina. Promjene u molekuli su rađene postupno, jedna po jedna, s minimalnim promjenama u ostatku molekule, kako bi se lakše pratio učinak te promjene na konformacije, stupanj ionizacije, pK<sub>a</sub> vrijednost, hidrofobnost, fleksibilnost bočnog lanca, orientaciju dipolnog momenta i farmakološki učinak. Tijekom višegodišnjih istraživanja, od početka projekta do danas, sintetizirano je nekoliko stotina spojeva među kojima su značajniji: 4-metilhistamin (selektivan H<sub>2</sub> agonist), N-gvanilhistamin (parcijalan agonist), burimamid (prvi antagonist H<sub>2</sub> receptora), metiamid (antagonist koji je zbog toksičnosti povučen iz kliničkih ispitivanja), cimetidin (prvi registriran antagonist H<sub>2</sub> receptora), ranitidin (najčešće propisivani lijek u suvremenoj terapiji) i famotidin i nizatidin (novi antagonisti H<sub>2</sub> receptora).

(Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska)

## A rational approach to drug design – ranitidine example

by B. Zorc and M. Kardum

S u m m a r y

A modern approach to a new drug development is based on rational drug design whereby drug is designed to interact with the corresponding receptor in a known biological system. The strengths of the rational approach are amply demonstrated by the development of the first antiulcer drug cimetidine and the most important drugs from the same therapeutic group – ranitidine, famotidine and nizatidine.

When the antiulcer programme started it was proposed that there might be two different types of histamine receptors – H<sub>1</sub> receptors involved in the inflammation process and H<sub>2</sub> receptors responsible for gastric acid secretion. The task was to design a molecule which would be selectively recognized by the H<sub>2</sub> receptor, but which would not activate it. The research started from histamine itself. The numerous modifications of the histamine molecule where made – attaching of various alkyl and aryl substituents at different locations, increasing in hydrophobicity, prolongation of side-chain, introduction of groups such as guanyl, isothiourea, thiourea, cyanoguanidine, replacement of imidazole ring with other heterocyclic systems and introduction of electron donating or withdrawing group on the histamine skeleton. The changes where made step by step, with minimal changes in the remaining parts of the molecule in order to follow their influences on conformation, ionization degree, pK<sub>a</sub> value, hydrophobicity, flexibility of the side-chain, orientation of a dipole moment and pharmacological effect. From the beginning of the project until now several hundred compounds have been synthesized. The most important are 4-methylhistamine (a highly selective H<sub>2</sub> agonist), N-guanylhistamine (a partial agonist), burimamide (the first H<sub>2</sub> receptor antagonist), metiamide (a potent but too toxic antagonist), cimetidine (the first marketed H<sub>2</sub> receptor antagonist), and ranitidine (the word's biggest selling prescription drug).

(Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia)

### Literatura – References

- (1) L. P. Graham, An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press, New York, 1995, str. 281–312.
- (2) Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30th Edition (Ur. J.E.F. Reynolds), The Pharmaceutical Press, London, 1993, str. 867–910.
- (3) P. Kairisalo, E. Honkanen, Arch. Pharm. **316** (1983) 688.
- (4) R. W. Brimblecombe, W. A. M. Duncan, G. J. Durant, J. C. Emmett, C. R. Ganellin, M. E. Parsons, J. Int. Med. Res. **3** (1975) 86.
- (5) R. N. Brogden, A. Carmine, R. C. Heel, T. M. Speight, G. S. Azery, Drugs **24** (1982) 267.
- (6) M. H. Hohnjec, J. Kustinec, M. Malnar, M. Škreblin, F. Kajfež, A. Navel, N. Blažević, u Analytical Profiles of Drug Substances, vol. 15 (Ur. K. Florey), Academic Press, New York, 1986, str. 533–561.