

Priprava i biološka evaluacija novih hidroksipiridinonskih derivata

Dandić, Andrea

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:798402>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Andrea Dandić

PRIPRAVA I BIOLOŠKA EVALUACIJA NOVIH HIDROKSIPIRIDINONSKIH DERIVATA

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Andrea Dandić

PREPARATION AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NOVEL HYDROXYPIRIDINONE DERIVATIVES

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Zagreb, 2022.

Ova disertacija izrađena je na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Petrović Peroković u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvale

Prije svega najveće hvala mojim mentoricama, izv.prof.dr.sc. Vesni Petrović Peroković i doc.dr.sc.Željki Car na idejama, uloženom vremenu i velikoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela kao i tijekom pisanja disertacije. Hvala na svim savjetima i riječima motivacije, puno sam naučila radeći uz vas i s vama.

Također, želim zahvaliti dr.sc. Martini Bosnar na provođenju in vitro antiproliferativnih testiranja pripremljenih spojeva, bez čega ovaj rad ne bi bio potpun.

Veliko hvala mojim brojnim kolegama i prijateljima s Odjela za kemiju (i biologiju), hvala što ste me slušali, bodrili te uljepšavali i olakšavali radne dane. Hvala mojoj dugogodišnjoj kolegici i prije svega prijateljici, Danijeli, na velikoj prijateljskoj podršci, razveseljavanju u teškim trenucima i pomoći kada god je bilo potrebno.

Hvala doc.dr.sc. Aleksandru Sečenji na brojnim savjetima, podršci i pomoći te prof.dr.sc. Berislavu Markoviću i izv.prof.dr.sc. Elviri Kovač-Andrić na velikom razumijevanju i pruženoj pomoći i podršci u mom istraživačkom radu.

Posebno hvala mojim roditeljima koji su me uvijek poticali na učenje, motivirali me i pružali podršku. Bez vašeg truda, pomoći i pružene ljubavi ne bih bila na ovom mjestu. Mama i tata, hvala vam! Hvala mojim sestrama, Matei i Dini, na tome što ste uvijek uz mene, što ste moje najbolje prijateljice, te na tome što znate uvijek reći pravu riječ kada god je to potrebno.

I na kraju najljepše hvala, mojem suprugu Marinu, što je uz mene u svim životnim situacijama, hvala na velikom strpljenju, razumijevanju i ljubavi koju mi pružaš svaki dan.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIV
ABSTRACT	XVI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj rada	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Hidroksipiridinoni.....	4
2.2. Biološka aktivnost 3-hidroksipiridin-4-ona (3,4-HP-a).....	5
2.2.1. Uloga željeza u ljudskome organizmu.....	5
2.2.2. Upotreba derivata 3,4-HP-a u liječenju talasemija i srodnih krvnih oboljenja.....	7
2.2.3. Upotreba 3,4-HP-a u liječenju neurodegenerativnih bolesti	10
2.2.3.1. Potencijal 3,4-HP-a u liječenju Parkinsonove bolesti	11
2.2.3.2. Potencijal 3,4-HP-a u liječenju Alzheimerove bolesti.....	13
2.2.4. Antitumorska aktivnost 3,4-HP-a	15
2.2.4.1. Uloga željeza u proliferaciji tumorskih stanica	15
2.2.4.2. Ribonukleotid-reduktaza	17
2.2.4.3. Potencijal 3,4-HP-a u liječenju raka kože fotodinamičkom terapijom	17
2.2.5. Ostali biološki učinci 3,4-HP-a.....	20
2.2.5.1. Antimalarijska aktivnost 3,4-HP-a.....	20
2.2.5.2. Antimikrobna aktivnost 3,4-HP-a.....	21
2.2.5.3. Antiadhezijska aktivnost 3,4-HP-a	22
2.3. Priprava N-supstituiranih 3,4-HP-a	23
2.3.1. Mehanizam reakcije priprave N-supstituiranih 3,4-HP-a	25
2.4. Strukturne modifikacije 3,4-HP-a	27
2.4.1. Prolazak potencijalnog kelatora kroz biomembrane	27
2.4.2. Koncept priprave i djelovanja prolijeka.....	28
2.4.3. Adamantan	30
2.4.3.1. Neuroaktivni i infektivni agensi s adamantanom u strukturi.....	31
2.4.3.2. Antitumorska aktivnost adamantilnih derivata	34
2.4.3.2.1. Antitumorska aktivnost adamantilnih derivata supstituiranih N-aril-3,4-HP-a	36
2.4.3.2.2. Antitumorska aktivnost adamantilnih derivata 3-hidroksipiran-4-ona.....	38
2.4.4. Biološka aktivnost derivata cimetine kiseline.....	39
2.5. In vitro testovi i tehnike za određivanje antitumorske aktivnosti	42

2.5.1. In vitro stanični testovi temeljeni na staničnim enzimima i proteinima	43
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	46
3.1. Materijali i metode	46
3.2. Priprava meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (1-15).....	47
3.2.1. Općeniti postupak priprave meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (1-15) u autoklavu.....	47
3.2.2. Općeniti postupak priprave para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (11-15) sintezom potpomognutom mikrovalnim zračenjem	54
3.2.3. Pokušaj priprave 3-hidroksi-2-metil-1-(m-propilfenil)piridin-4-ona reakcijom m-propilanilina i maltola u autoklavu.....	55
3.2.3.1. Priprava m-propilanilina (A).....	55
3.2.3.2. Pokušaj priprave 3-hidroksi-2-metil-1-(m-(propilfenil)piridin-4-ona (B).....	56
3.2.4. Pokušaj priprave 3-hidroksi-2-metil-1-[p-(trifluormetil)fenil]piridin-4-ona.....	56
reakcijom p-trifluormetilnilina i maltola u autoklavu (C)	56
3.2.5. Pokušaj priprave halogenih meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (D-G).....	57
3.3. Priprava benziliranih meta-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (16-18)	57
3.3.1. Priprava 3-benziloksi-2-metil-1-(m-nitrofenil)piridin-4-ona (16).....	57
3.3.2. Priprava 1-(m-aminofenil)-3-benziloksi-2-metilpiridin-4-ona (17).....	58
3.3.3. Priprava 3-benziloksi-1-(m-hidroksifenil)-2-metilpiridin-4-ona (18).....	59
3.4. Općeniti postupak priprave adamantilnih derivata meta- i para- supstituiranih N-aril-3,4- HP-a (19-31).....	59
3.5. Selektivna priprava adamantilnih derivata 1-(m-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona (32-35).....	65
3.5.1. Priprava 1-(m-aminofenil)-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-etanoata (32)	65
3.5.2. Priprava 1-[m-(adamantan-1-iletanamido)fenil]-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il- etanoata (33) i N-[3-(3-benziloksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]adamantan-1-iletanamida (34)	66
3.5.3. Priprava N-[3-(3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]adamantan-1-iletanamida (35)	67
3.6. Priprava adamantilnih derivata 3-hidroksi-1-(m-hidroksifenil)-2-metilpiridin-4-ona (36-38)	67
3.6.1. Priprava m-(3-benziloksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil-adamantan-1-il-etanoata (36).....	67
3.6.2. Priprava m-(3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil-adamantan-1-il-etanoata (37).....	68
3.6.3. Priprava 1-[m-(adamantan-1-iletanoiloksi)fenil]-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il- etanoata (38).....	69
3.7. Općeniti postupak priprave derivata meta i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i cimetne kiseline (39-45).....	69
3.8. Priprava [4-(3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]-3-fenilpropanoata (46).....	72
3.9. Priprava eterskih derivata para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i bromoctene kiseline (47-50)	73
3.9.1. Priprava (adamantan-1-il)-bromacetata (H).....	73

3.9.2. Općeniti postupak pripreme adamantilnih piridinonskih etera bromoctene kiseline (47-50)	74
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	77
4.1. Uvod.....	77
4.2. Priprava meta- i para-supstituiranih N-aril-3-hidroksipiridin-4-ona (N-aril-3,4-HP-a) i njihovih lipofilnih derivata.....	82
4.2.1. Priprava meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (1-15).....	82
4.2.1.1. Priprava spojeva 1-15 u autoklavu	82
4.2.1.2. Priprava odabranih para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a sintezom potpomognutom mikrovalnim zračenjem	87
4.2.1.3. Pokušaj pripreme 3-hidroksi-2-metil-1-(m-(propilfenil)piridin-4-ona (B) u autoklavu.....	88
4.2.1.4. Pokušaj pripreme 3-hidroksi-2-metil-1-[p-(trifluormetil)fenil]piridin-4-ona (C) u autoklavu.....	90
4.2.1.5. Pokušaj pripreme halogenih derivata meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (D-G) u autoklavu.....	92
4.2.2. Priprava adamantilnih derivata meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (19-31)	94
4.2.2.1. Selektivna priprava spojeva 32-35 - adamantilnih derivata 1-(m-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona 9	96
4.2.2.2. Selektivna priprava spojeva 37 i 38 - adamantilnih derivata 3-hidroksi-1-(m-hidroksifenil)-2-metilpiridin-4-ona 10	98
4.2.3. Priprava derivata cimetine kiseline i odabranih meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (39-45)	100
4.2.4. Priprava eterskih derivata para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i bromoctene kiseline (47-50)	102
4.2.4.1. Priprava (adamantan-1-il)-bromacetata (H).....	102
4.2.4.2. Priprava derivata para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i bromoctene kiseline Williamsonovom sintezom etera (47-50)	103
4.3. Biološka evaluacija meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata	105
4.3.1. In vitro antiproliferativna aktivnost meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata.....	106
4.3.1.1. Selektivna in vitro antiproliferativna aktivnost meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata prema određenim tumorskim staničnim linijama.....	106
4.3.1.2. Selektivna in vitro antiproliferativna aktivnost meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata na tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju NHLF	107
4.3.2. In vitro antiproliferativna aktivnost odabranih spojeva na NCI-H460 tumorskoj staničnoj liniji	108
4.4. Istraživanja odnosa strukture i biološke aktivnosti (SAR).....	110
4.4.1. SAR studija novih meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a.....	111
4.4.1.1. Utjecaj položaja supstituenta na arilnom dijelu na antiproliferativnu aktivnost.....	111
4.4.1.2. Utjecaj prirode i strukture supstituenta na arilnom dijelu na antiproliferativnu aktivnost.....	112

4.4.2. SAR studija adamantilnih derivata novih meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a	115
4.4.2.1. Utjecaj prirode i strukture supstituenta na antiproliferativnu aktivnost.....	116
4.4.2.2. Utjecaj položaja supstituenta na arilnom dijelu na antiproliferativnu aktivnost.....	120
4.4.2.3. Utjecaj položaja adamantilne podjedinice na antiproliferativnu aktivnost	122
4.4.2.4. Utjecaj vrste kemijske veze adamantilnih derivata na arilnom dijelu 3,4-HP antiproliferativnu aktivnost	125
4.4.2.5. Utjecaj vrste kemijske veze na piranonskom dijelu adamantilnih derivata 3,4-HP-a na antiproliferativnu aktivnost.....	127
4.4.3. Utjecaj strukturnih karakteristika lipofilne podjedinice na antiproliferativnu aktivnost 3,4-HP-a	128
4.4.4. Istraživanja odnosa strukture pripremljenih spojeva i in vitro antiproliferativne aktivnosti na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460.....	130
4.4.5. Utjecaj strukturnih karakteristika 3,4-HP-a na selektivnost in vitro antiproliferativnog učinka prema određenim tumorskim staničnim linijama i prema tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju.....	131
4.4.6. Povezanost fizikalno-kemijskih deskriptora s biološkom aktivnosti meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a.....	135
§ 5. ZAKLJUČAK	137
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	142
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	146
§ 8. DODATAK	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

PRIPRAVA I BIOLOŠKA EVALUACIJA NOVIH HIDROKSIPIRIDINONSKIH DERIVATA

Andrea Dandić

Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,
Cara Hadrijana 8/A, 31 000 Osijek, Hrvatska

U ovoj doktorskoj disertaciji opisana je priprava novih derivata *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona koji se razlikuju po strukturi supstituenata vezanih u *meta*- i *para*-položaj arilnog dijela molekule. Reakcije su provedene zagrijavanjem vodenih otopina polaznih reaktanata, maltola i *meta*- i *para*-supstituiranih anilina u autoklavu. Odabrani *para*-supstituirani *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-oni uspješno su sintetizirani i u uvjetima mikrovalne sinteze. Pripravljeni 3-hidroksipiridin-4-oni dodatno su strukturno modificirani uvođenjem lipofilnih podjedinica u njihovu strukturu s naglaskom na adamantilnoj podjedinici. Na piranonski dio molekule 3-hidroksipiridin-4-ona adamantilna podjedinica vezana je esterskim i eterskim tipom veze dok je na *meta*- i *para*-položaj arilnog dijela molekule vezana esterskom i amidnom vezom. U disertaciji je opisana i biološka evaluacija pripravljenih spojeva. Ispitivana su antiproliferativna svojstva pripravljenih spojeva te je sustavno istražen odnos strukture i biološke aktivnosti (engl. *Structure-Activity Relationship*, SAR). Na temelju dobivenih rezultata izdvojeni su najpotentniji spojevi (engl. *lead compound*) pri čemu je uzet u obzir njihov selektivni antiproliferativni učinak.

(151 + xvi + XVII stranica, 52 slike, 25 shema, 6 tablica, 166 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: adamantan / antiproliferativna aktivnost / 3-hidroksipiridin-4-oni / istraživanja odnosa strukture i aktivnosti / lipofilnost

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Rad prihvaćen: 2. ožujka 2022.

Ocjenitelji: 1. Doc. dr. sc. Đani Škalamera
2. Prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
3. Doc. dr. sc. Rosana Ribić



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

PREPARATION AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NOVEL HYDROXYPIRIDINONE DERIVATIVES

Andrea Dandić
Department of Chemistry, Cara Hadrijana 8/A, 31 000 Osijek, Croatia

In this thesis preparation and structural modification of novel *N*-aryl 3-hydroxypyridin-4-one derivatives is described. Prepared compounds are distinguished by position and structure of substituent on the aryl part of the molecule. Reactions were conducted with heating of aqueous solutions of starting materials, maltol and *meta*- and *para*-substituted anilines, in autoclave. Selected *para*-substituted *N*-aryl 3-hydroxypyridin-4-ones were successfully prepared in conditions of microwave synthesis. Prepared 3-hydroxypyridin-4-ones were additionally structurally modified by incorporating lipophilic units into pyridinone structure, primarily adamantyl unit. On the pyranone part of the molecule adamantyl unit was introduced by ester and ether bond type and by using ester and amide bond in *meta* and *para* position of the aryl part of the molecule. Antiproliferative activity of prepared compounds was examined and structure-activity relationship was systematically researched. On the basis of obtained results lead compounds were singled out whereby selective activity of compounds towards tumor versus normal cell lines was considered.

(151 + xvi + XVII, 52 figures, 25 schemes, 6 tables, 166 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: adamantane / antiproliferative activity / 3-hydroxypyridin-4-ones / structure-activity relationship study / lipophilicity

Supervisor: Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Thesis accepted: 2nd March 2022.

Reviewers: Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor

Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Dr. Rosana Ribić, Assistant Professor

§ 1. UVOD

Hidroksipiridinoni (HP-i) su heterociklički polifunkcijski spojevi, derivati piridina, u čijoj se strukturi karbonilna i hidroksilna skupina nalaze međusobno u *ortho*-položaju. Zahvaljujući takvom položaju funkcijskih skupina, ova skupina spojeva posjeduje veliki afinitet keliranja trovalentnih iona metala, primjerice Fe^{3+} i Al^{3+} , zbog čega pokazuju široki spektar bioloških aktivnosti. Afinitetom prema navedenim ionima metala, a samim time i svojom biološkom aktivnošću, posebno se ističu 3-hidroksipiridin-4-oni (3,4-HP-i), koji u svojoj strukturi sadrže hidroksilnu skupinu na položaju 3 i karbonilnu skupinu na položaju 4 osnovnog piridinonskog skeleta. Veliki broj patoloških stanja uzrokovanih poremećajem metabolizma biološki važnih metala, bilo kao posljedica genetske promjene ili pretjeranog izlaganja štetnom vanjskom utjecaju, može se liječiti ili ublažiti djelovanjem kelirajućih agenasa.^{1,2} Derivati 3,4-HP-a ponajprije se istražuju kao potencijalni kelatori iona metala, ali i kao antibakterijski i antitumorski agensi, potencijalni antimalarici i antidementici.³ Osim toga, poznat je njihov potencijal u liječenju neurodegenerativnih poremećaja kao što su Alzheimerova bolest,⁴ Friedreichova ataksija⁵ te Parkinsonova bolest.⁶

Spojevi iz skupine 3,4-HP-a uobičajno se pripremaju reakcijom komercijalno dostupnih hidroksipiranona, poput maltola ili kojične kiseline, i odgovarajućih alifatskih i aromatskih amina. Za razliku od 3,4-HP-a, hidroksipiranoni u strukturi prstena sadrže atom kisika dok su hidroksilna i karbonilna skupina također u međusobnom *ortho*-položaju zbog čega i sami pokazuju široki spektar bioloških aktivnosti.⁷ Prethodna istraživanja provedena na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a uključivala su strukturne modifikacije hidroksipiranona,⁸ te pripremu i strukturnu modifikaciju *para*-supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona (*N*-aril-3,4-HP)⁹ s ciljem poboljšavanja njihovog biološkog odgovora, primarno antiproliferativnog učinka. Jedan od uobičajenih načina strukturne modifikacije potencijalno biološki aktivnih spojeva podrazumijeva uvođenje lipofilne podjedinice u njihovu strukturu čime im se povećava biodostupnost. Česti izbor pritom je lipofilna adamantilna podjedinica. Literaturno je poznato kako se spojevi koji u svojoj strukturi posjeduju lipofilnu adamantilnu podjedinicu koriste u liječenju neurodegenerativnih bolesti, poput primjerice memantina¹⁰ koji je u kliničkoj upotrebi kao lijek za ublažavanje simptoma Alzheimerove bolesti.

Od ostalih spojeva s adamantilnom podjedinicom u strukturi koji su u kliničkoj upotrebi posebno se ističu oni s antiviralnim učinkom te spojevi koji se koriste kao agensi za liječenje dermatoloških poremećaja i dijabetesa tipa 2.¹¹ Također, u literaturi je opisana i antitumorska aktivnost adamantilnih derivata kolhicina¹² kao i adamantilnih derivata acilamidoksima.¹³ Temeljem navedenog, za strukturu modifikaciju hidroksipiranona i 3-hidroksipiridin-4-ona u prethodnim istraživanjima odabrana je upravo lipofilna adamantilna podjedinica.

S obzirom da su 3,4-HP-i i njihovi adamantilni derivati pokazali bolju antiproliferativnu aktivnost u odnosu na aktivnost pripremljenih hidroksipiranona i njihovih adamantilnih derivata, u nastavku istraživanja provedenih u okviru ove doktorske disertacije fokus je stavljen na strukturne modifikacije 3,4-HP-a. Složenija struktura 3,4-HP-a omogućava više kemijskih modifikacija u svrhu pripreme novih lipofilnih derivata 3,4-HP-a s potencijalno boljim antiproliferativnim učinkom.

1.1. Cilj rada

Eksperimentalni dio doktorske disertacije predstavlja nastavak prethodnih istraživanja⁹ i uključuje pripremu novih heterocikličkih spojeva iz klase 3-hidroksipiridin-4-ona (3,4-HP-a). Primarna istraživanja usmjerena su na pripremu novih *N*-aril supstituiranih 3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata s ciljem poboljšanja biološkog odgovora, s posebnim naglaskom na antiproliferativni učinak. Pripremljenim spojevima u okviru dogovorene suradnje (Fidelta d.o.o.) ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost na pet tumorskih staničnih linija te na normalnim stanicama.

U pripravi ishodnih derivata *N*-aril-3,4-HP u radu će, uz *para*-supstituirane anilinske derivate, biti korišteni i *metasupstituirani* anilini s različitim elektron-donirajućim i elektron-odvlačećim skupinama. Osim navedenog, u sklopu rada opisana je i priprema novih derivata *N*-aril-3,4-HP-a koji u *meta*- i *para*-položaju arilnog dijela molekule sadrže manje polarne, alkilne supstituente. Za pripremu većine ishodnih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a primijenit će se tzv. izravna metoda pripreme koja uključuje reakciju nezaštićenog piranonskog derivata i odgovarajućeg arilamina uz zagrijavanje u autoklavu. Osim pripreme izravnom metodom u autoklavu, odabrani derivati 3,4-HP-a pripremit će se i sintezom potpomognutom mikrovalnim zračenjem. S obzirom na rezultate prethodnih istraživanja,⁹ koji su pokazali kako uvođenje lipofilne adamantilne podjediniice u strukturu 3,4-HP-a povećava njihov antiproliferativni

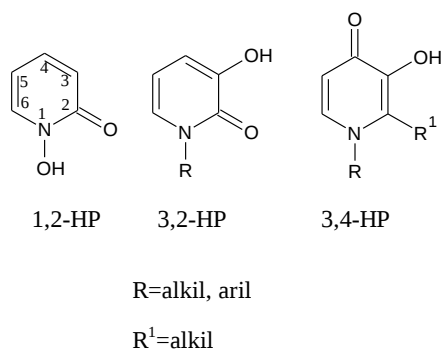
učinak, adamantilna podjedinica primarni je odabir za strukturnu modifikaciju hidroksipiridinona pripremljenih u sklopu ove disertacije.

Adamantilna podjedinica uvest će se u strukturu *N*-aril-3,4-HP-a na piranonskom dijelu molekule esterskim i eterskim tipom veze te esterskim i amidnim tipom veze na arilnom dijelu molekule. Osim lipofilne adamantilne podjedinice u strukturu 3,4-HP uvest će se i cimetna kiselina ((*2E*)-3-fenilprop-2-enska kiselina), koja i sama pokazuje biološku aktivnost,¹⁴ i čiji je fizikalni parametri ($\log P$, molarna masa) i strukturne karakteristike čine pogodnim strukturnim motivom za modificiranje hidroksipiridinonskog skeleta. Za selektivnu pripremu derivata 3,4-HP-a i cimetne kiseline te adamantan-1-iloctene kiseline u kojima je cilj lipofilne podjedinice vezati amidnom ili esterskom vezom u *meta*- ili *para*-položaj arilnog dijela molekule, koristit će se sintetski putevi koji podrazumijevaju uvođenje zaštitne skupine na hidroksilnu skupinu hidroksipiridinonskog skeleta sa svrhom postizanja regioselektivnosti. Ovakav dizajn spojeva omogućit će praćenje utjecaja promjene različitih strukturnih parametara na antiproliferativnu aktivnost pripremljenih spojeva, odnosno provođenje opsežnih istraživanja odnosa strukture i biološke aktivnosti (engl. *Structure-Activity Relationship*, SAR). Svi pripremljeni spojevi poslužit će za izgradnju SAR modela s ciljem identifikacije osnovnih strukturnih motiva odgovornih za antiproliferativnu aktivnost pripremljenih spojeva pri čemu su uzeti u obzir selektivnost djelovanja na određene tumorske stanice te na tumorske u odnosu na zdrave stanične linije kao i fizikalno-kemijska i farmakološka svojstva spojeva u skladu s Lipinski pravilima.^{1,15} Konačni cilj istraživanja jest dobivanje ključnih smjernica za otkrivanje staničnog mehanizma antiproliferativnog učinka najpotentnijih spojeva (engl. *lead compounds*).

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Hidroksipiridinoni

Hidroksipiridinoni (HP-i) su heterociklički, polifunkcijski derivati piridina koji se, s obzirom na položaj hidroksilne i karbonilne skupine u odnosu na dušikov atom u prstenu, uobičajeno dijele na 1-hidroksipiridin-2-one (1,2-HP-e), 3-hidroksipiridin-2-one (3,2-HP-e) i 3-hidroksipiridin-4-one (3,4-HP-e) (slika 1). Osim kod 1,2-HP-a, dušikov atom najčešće je supstituiran alkilnim ili arilnim supstytutentima dok su hidroksilna i karbonilna skupina, međusobno u *ortho*-položaju, zaslužne za njihov kelirajući učinak. Unutar skupine HP-a najvećom sposobnošću kompleksiranja različitih trovalentnih i tvrdih metalnih iona, naročito Fe^{3+} i Al^{3+} , ističu se 3,4-HP-i zbog čega pokazuju niz bioloških aktivnosti. Razlog tome je položaj (*O,O*)-donorskih skupina na piridinskom prstenu pa je u slučaju 3,4-HP-a hidroksilna skupina najbazičnija ($\text{p}K_a$ 9 - 9,5)¹⁵ s najvećom elektronskom gustoćom na koordinirajućim atomima kisika. U području fizioloških pH-vrijednosti 3,4-HP su neutralne vrste i bidentatni ligandi metalnih iona što je u pravilu osnova njihova raznolikog biološkog djelovanja.^{15,16}

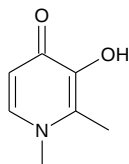


Slika 1. Općenite strukturne formule derivata HP-a¹⁶

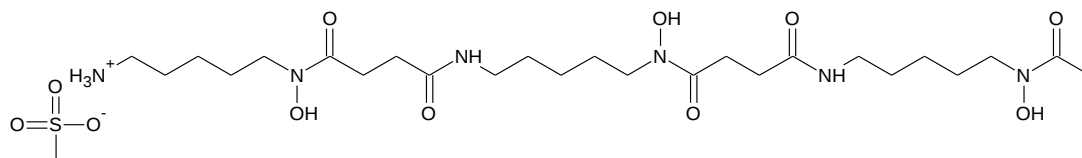
Jedan od najpoznatijih predstavnika 3,4-HP-a jest 3-hidroksi-1,2-dimetilpiridin-4-on (deferipron, Ferriprox[®], **I**) (slika 2) koji je u kliničkoj upotrebi kao sredstvo za keliranje željeza kod osoba kod kojih je došlo do prekomjernog nakupljanja željeza u organizmu.¹⁶ Prije otkrića deferiprona 1982. godine, kao jedini klinički lijek za keliranje suviška željeza upotrebljavala se prirodna siderofora *Streptomyces pilosus*, desferioksamin B u obliku mesilatne soli (DFO, Desferal[®], **II**).¹⁵

Glavni nedostatak DFO-a jest njegova neučinkovitost pri oralnoj primjeni, pa se mora primjenjivati intravenozno što bolesnici, zajedno s brojnim i dugotrajnim transfuzijama krvi, teško podnose. Unatoč tome, derivati 3,4-HP-a iznimno su proučavana skupina spojeva koja posjeduje fizikalno-kemijska i farmakološka svojstva pogodna za keliranje željeza *in vivo* kao i oralnu primjenu.¹⁶

a)



b)



Slika 2. Strukturne formule molekula:

a) deferiprona (Ferriprox[®]) (I); b) desferioksamina B, (Desferal[®], DFO) (II)¹⁶

2.2. Biološka aktivnost 3-hidroksipiridin-4-ona (3,4-HP-a)

2.2.1. Uloga željeza u ljudskome organizmu

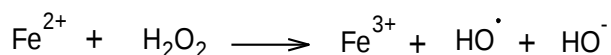
Biometali poput željeza, cinka, bakra ili molibdena esencijalni su elementi u tragovima uključeni u brojne biološke procese kao što su rast, razvoj i reprodukcija. Tako je, primjerice, superoksid-dismutaza antioksidativni enzim koji katalizira pretvorbu superoksida u kisik i vodikov peroksid a sadrži bakar i cink, dok enzimi poput matriks-metaloproteinaze (engl. *Matrix Metalloproteinase*, MMP) i ugljikove-anhidraze (engl. *Carbonic Anhydrase*, CA) sadrže cink u aktivnome mjestu. U zdravome organizmu održava se homeostaza biometala, odnosno ravnoteža između njihova unosa, iskorištenja u staničnim procesima i skladištenja.

Glavni uzrok prekomjernom nakupljanju biometala u ljudskom organizmu jest izloženost okolišu i primjena metalolijekova u terapijske svrhe, što može dovesti do kompeticijske reakcije za apsorpciju potrebnih biometala, nastanka oksidativnog stresa i narušavanja funkcioniranja različitih enzimskih sustava te u konačnici do pojave različitih bolesti.⁵ U skupini biometala naročito se ističe željezo koje osigurava specifično vezno mjesto za kisik u hemoglobinu te je kofaktor različitih enzima poput citokroma c i ribonukleotid-

reduktaze. Udio željeza u organizmu strogo je kontroliran i iznosi 40-50 mg kg⁻¹ tjelesne mase.¹⁷ Željezo se u organizam unosi u anorganskom obliku ili vezano za hem. Anorgansko željezo prolazi kroz stanične membrane u dvovalentnom obliku pomoću transportnih proteina kao što je transportni protein 1 za dvovalentne metale (engl. *Divalent Metal Transporter 1*, DMT1). Metabolički put željeza još nije do kraja razjašnjen, no poznato je da na tom putu željezo alternira između dva oksidacijska stanja u čemu najveću ulogu imaju enzimi oksidoreduktaze. Na putu do tkiva, u serumu, željezo se nalazi u svom topljivom obliku (Fe(III)) vezano za transportni protein transferin (engl. *Transferrin*, Tf). Transferin se sastoji od dva reznja, C- i N-reznja, a svaki od njih ima vezno mjesto za ione Fe³⁺ koje čine četiri aminokiselinska ostatka (aspartat, histidin i dva tirozinska ostatka) te karbonatni anion. Transferin veže po dva iona Fe³⁺ s visokim afinitetom (pFe = 20,3) pri čemu oba reznja podliježu konformacijskim promjenama.¹⁷ Dvije molekule nastalog kompleksa Tf i Fe³⁺ unose se u stanicu na način da se vežu na homodimerni transferinski receptor 1 (engl. *Transferrin Receptor 1*, TfR1) na površini stanice. Kompleks Tf-TfR1 ulazi u unutarstanični dio pomoću endocitoze i membranskih receptora uz stvaranje endosoma. Zahvaljujući blago kiselim uvjetima (pH = 5) u endosomu se otpušta karbonatni ion, što dovodi do disocijacije Fe³⁺ iz veznog mjesta transferina. Pomoću enzima oksidoreduktaze Fe³⁺ se reducira u Fe²⁺ i prenosi na DMT1, koji nadalje transportira željezo u citosol preko endosomske membrane. Iz citosola se željezo transportira u tzv. nestabilni skladišni odjeljak (engl. *Labile Iron Pool*, LIP) gdje stvara komplekse sa spojevima manje molekulске mase.¹⁸ Budući da sastav odjeljka LIP još uvijek nije potpuno razjašnjen, pretpostavka je da se željezo u navedenom odjeljku veže na citrate, šećere, nukleotide i aminokiseline. Iz odjeljka LIP željezo se ugrađuje u protein feritin, koji ima ulogu skladištenja željeza unutar stanice. Na temelju iznesenog može se zaključiti da bi agensi koji su potencijalni kelatori željeza trebali moći kompetirati vezanju željeza za transferin odnosno vezati tzv. netransferinsko željezo (engl. *non-transferrin-bound iron*) ili ga vezati unutar odjeljka LIP.^{1,17}

Pojavom određene bolesti dolazi do narušavanja homeostaze željeza u organizmu te u konačnici do povećanja koncentracije željeza u tkivima. Kada je prisutno u suvišku, željezo je iznimno toksično zahvaljujući svom redoks-ciklusu. Željezo alternira između dva oksidacijska stanja, tj. može primati ili donirati elektrone što pridonosi stvaranju slobodnih radikala. Nastajanje radikalskih vrsta, konkretno onih koje uključuju kisik (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), uz pomoć željeza opisano je Fentonovom reakcijom (slika 3).¹⁹

Fentonovom reakcijom nastaju iznimno reaktivni hidroksilni radikali koji mogu uzrokovati niz nepoželjnih reakcija što u konačnici dovodi do oštećenja važnih biomolekula kao što su DNA, membranski lipidi, proteini.^{1,2}



Slika 3. Jednadžba Fentonove reakcije¹⁹

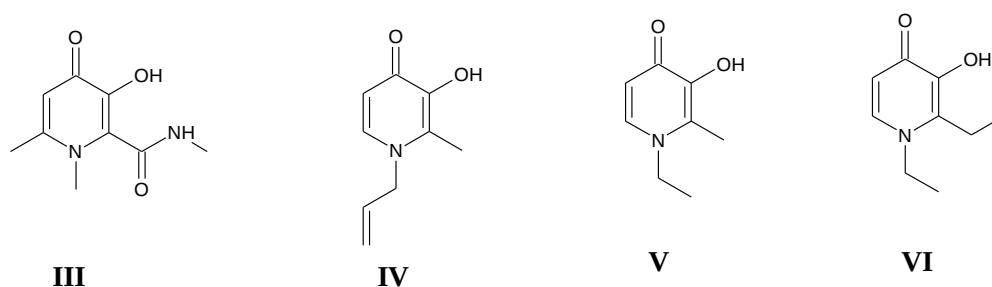
2.2.2. Upotreba derivata 3,4-HP-a u liječenju talasemija i srodnih krvnih oboljenja

Talasemija je naziv za skupinu bolesti koje uključuju poremećaje u normalnoj proizvodnji hemoglobina što za posljedicu ima nisku razinu hemoglobina u krvi i visoku stopu razaranja crvenih krvnih stanica. Glavni uzrok smrtnosti bolesnika koji boluju od β -talasemije je srčani zastoj koji se javlja kao posljedica akumuliranja željeza u krvožilnom sustavu. Stoga je kod bolesnika koji boluju od β -talasemije nužna transfuzija krvi. Bez liječenja ovakve bolesti željezo se akumulira u srcu, jetri, zglobovima i ostalim organima i tkivima što u konačnici može dovesti do propadanja organa i smrti.⁵ Od 60-ih godina prošlog stoljeća kao jedini kelator u kliničkoj upotrebi koristi se već spomenuta prirodna siderofora desferioksamin B (Desferal®, DFO, **II**) (slika 2, b)), heksadentatni kelator trovalentnih metalnih iona koji *in vivo* selektivno veže Fe^{3+} stvarajući komplekse u stehiometrijskom odnosu 1 : 1. Iznimno je učinkovit jer produljuje životni vijek bolesnika, ali unatoč tome ima nekoliko nedostataka. Glavni mu je nedostatak nemogućnost oralne primjene zbog hidrofilnog karaktera ($\log P = -2$)¹⁷ i velike molekulske mase zbog koje se lijek ne može apsorbirati kroz membrane gastrointestinalnog trakta. Umjesto toga, DFO se primjenjuje intravenozno što podrazumijeva dugotrajne transfuzije krvi (≥ 8 h, ≥ 5 dana u tjednu) koje bolesnici oboljeli od ovakve bolesti vrlo teško podnose. Također, DFO može uzrokovati alergijske reakcije i njegova primjena može dovesti do brojnih nuspojava poput dermatoloških poremećaja, poremećaje sluha ili vida te neuroloških poteškoća.^{1,5}

Zbog navedenih nedostataka DFO-a ispitana je upotreba drugih kelatora u *in vitro* kao i u *in vivo* uvjetima na životinjskom modelu s ciljem pronalaženja idealnog kelatoterapeutika. Budući da Fe^{3+} pripada skupini tvrdih iona metala, najveći broj potencijalnih kelatora sadržavao je funkcijske skupine koje uključuju atome kisika, poput poliaminokarboksilnih kiselina kao što su etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylendiaminetetraacetic Acid*, EDTA) ili dietilentriaminpentaoctena kiselina (engl. *Diethylenetriaminepentaacetic Acid*, DTPA),

katehola ili hidroksamata.⁵ Navedene kiseline, EDTA i DTPA, potencijalni su heksadentatni i oktaadentatni aminokarboksilatni kelatori koji se koriste u liječenju bolesnika oboljelih od β -talasemije intolerantnih na DFO.²⁰ Kao i DFO, EDTA i DTPA nisu oralno aktivne, ali za razliku od DFO, navedeni kelatori pokazuju malu selektivnost prema Fe^{3+} ionima zbog čega mogu dovesti do smanjenja količine ostalih važnih dvovalentnih biometala u organizmu, poput primjerice cinka. Kako bi se ovaj efekt ublažio, u liječenju bolesti nastalih akumulacijom željeza DTPA se može primjenjivati u obliku cinkove soli.⁵

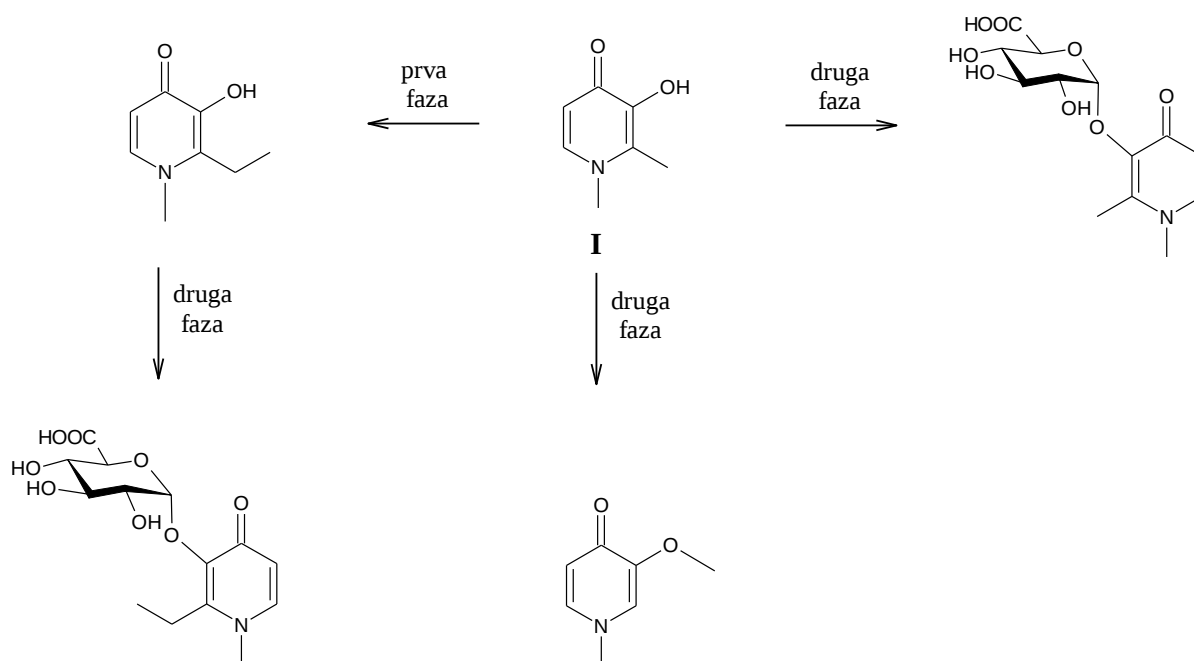
Provedene su strukturne modifikacije velikog broja derivata 3,4-HP-a s ciljem poboljšavanja njihovih fizikalno-kemijskih svojstava, poput lipofilnosti, kako bi se u konačnici pripravljeni spojevi mogli koristiti kao potencijalni kelatori iona Fe^{3+} u liječenju krvnih oboljenja poput β -talasemije.²¹ Među pripravljenim spojevima, istaknulo se samo nekoliko kandidata koji su predloženi za klinička ispitivanja: već spomenuti 3-hidroksi-1,2-dimetilpiridin-4-on (deferipron, **I**) (slika 2, a)), 3-hidroksi-1,6-dimetil-2-(*N*-metilkarbamoil)piridin-4-on (CP502, **III**), 1-alil-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on (L1NAlI, **IV**)²², 1-etil-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on (L1NEt, **V**)²¹ i 1,2-dietil-3-hidroksipiridin-4-on (**VI**) (slika 4).¹⁹



Slika 4. Strukturne formule derivata 3,4-HP-a, spojeva **III**, **IV**²², **V**²¹ i **VI**,¹⁹ koji se koriste u liječenju talasemije

Kako je već spomenuto, deferipron (**I**) upotrebljava se kao kelator koji selektivno u *in vivo* uvjetima veže Fe^{3+} ione, a u upotrebi je od 1980. godine. No, ovaj derivat pokazuje i brojne nedostatke. Jedan od glavnih nedostataka jest njegov metabolički put u jetri (shema 1). Hidroksilna skupina na položaju 3 hidoksipiridinonskog prstena potrebna za kompleksiranje s metalom podložna je glukuronidaciji, enzimski kataliziranoj *N*- ili *O*- glikozidaciji glukuronskom kiselinom. Organizam se koristi postupkom glukuronidacije kako bi se povećala topljivost određenih tvari u svrhu njihove lakše eliminacije iz organizma putem urinarnog trakta ili žuči. Osim navedenog, DFO pokazuje i gastrointestinalne nuspojave, a kod nekih je

bolesnika (oko 2 %) zabilježena agranulocitoza, odnosno smanjenje broja bijelih krvnih stanica. Zbog navedenih nedostataka deferipron je u Sjedinjenim Američkim Državama odobren tek 2011. godine.¹ Unatoč tome, deferipron pokazuje značajnu prednost u odnosu na DFO jer omogućava uklanjanje željeza akumuliranog u srcu.²³ Zbog navedenog razloga deferipron se 1998. godine počeo upotrebljavati u kombiniranoj kelatoterapiji s DFO, pri čemu se preko dana bolesnicima administrira DFO, a preko noći deferipron. Navedena terapija rezultirala je smanjenjem razine željeza u jetri, serumu, skladišnom proteinu feritinu te poboljšanjem funkcije krvožilnog sustava.^{1,17}



Shema 1. Prva i druga faza metabolizma deferiprona u jetri čovjeka ¹

U svrhu uklanjanja suviška akumuliranog željeza kao potencijalni kelatoterapeutik dizajniran je 1-alil-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on (L1NAll, **IV**). Spoj **IV** lipofilniji je u odnosu na deferipron (**I**) te pokazuje veću efikasnost u selektivnom uklanjanju željeza u *in vivo* uvjetima u pokusima sa životnjama.²² Osim toga, oralno je aktivan i pokazao je dobre rezultate u prvoj fazi kliničkih ispitivanja na ljudima.²² Dobbin i sur.²¹ sintetizirali su seriju 3,4-HP-a s alkilnim supstituentima na položajima 1 i 2 s ciljem dobivanja efektivnog i oralnog aktivnog kelatora željeza. Ispitan je veliki broj spojeva u *in vivo* uvjetima na miševima pri čemu se mnogo njih pokazalo oralno aktivnim, no samo je jedan spoj, spoj **V**, pokazao bolju *in vivo* aktivnost u odnosu na DFO (slika 4).

Općenito, glavni nedostatak primjene 3,4-HP-a u liječenju talasemija i srodnih krvnih oboljenja jest već spomenuta glukuronidacija hidroksilne skupine na položaju 3.

Jedan od načina kojim se može izbjeći opisana reakcija uključuje modifikaciju položaja 2 hidroksipiridinonskog prstena pomoću supstituenta koji je sterički zahtjevniji od metilne skupine pri čemu se log P vrijednost ne bi smjela drastično izmijeniti. Ova se vrijednost definira kao omjer množinskih koncentracija promatrane vrste (liganda ili kompleksa) nakon njezine razdiobe između dvaju otapala koja se ne miješaju, najčešće oktan-1-ola i puferirane vodene otopine (pH = 7,4).¹ Derivat 3,4-HP-a, spoj **VI** (CP94, slika 4), s etilnim skupinama na položajima 1 i 2, pokazao se uspješnim u keliranju željezu u *in vivo* uvjetima i predložen je za klinička ispitivanja, no i u slučaju navedenog derivata dolazi do neželjene reakcije glukuronidacije.¹⁹

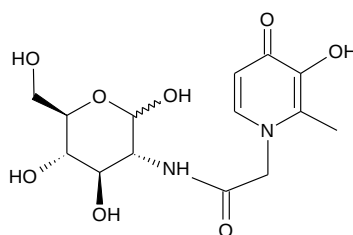
Druga sintetska strategija obuhvaća vezanje supstituenta koji bi stvarao unutarmolekulske vodikove veze s hidroksilnom skupinom i time umanjio njezin nukleofilni karakter u reakciji glukuronidacije. U tu svrhu pripravljeno je nekoliko derivata s amidnim skupinama na položaju 2 hidroksipiridinonskog skeleta pri čemu je došlo do stvaranja željenih vodikovih veza, što u konačnici sprječava reakciju glukuronidacije hidroksilne skupine, a pripremljeni derivati pokazali su veliki afinitet prema Fe^{3+} ionima.¹⁷

2.2.3. Upotreba 3,4-HP-a u liječenju neurodegenerativnih bolesti

Neurodegenerativne bolesti, primjerice Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest, karakterizira stvaranje proteinskih agregata u mozgu, što uzrokuje gubitak funkcije sinapsi i živčanih stanica (neurona) u moždanoj ovojnici.^{1,24} U slučaju Alzheimerove bolesti dolazi do izvanstanične akumulacije β -amiloidnih peptida (peptidi $\text{A}\beta_{40}$ i $\text{A}\beta_{42}$)²⁵ u amiloidne ploče, a kod Parkinsonove bolesti proteina α -sinukleina.²⁶ Mehanizam akumulacije navedenih proteina nije još uvijek razjašnjen, no pretpostavlja se da su za inicijaciju tih neuropatoloških procesa bitne mutacije gena koji kodiraju navedene proteine.^{26,27} Smatra se kako poremećaji u homeostazi nekih prijelaznih metala, primjerice željeza, bakra i cinka,^{28,29} te aluminija³⁰ imaju ulogu u akumulaciji spomenutih proteina. Metaloprotein $\text{A}\beta_{42}$, koji posjeduje vezna mjesta za Fe^{2+} i Fe^{3+} u *N*-terminalnim regijama, doprinosi oksidoreduktivnom ciklusu između ta dva ionska oblika i nastanku već spomenutih ROS-vrsta, koje uzrokuju oštećenja mnogih biološki važnih molekula.^{1,31,32} Prema tome, spojevi koji posjeduju afinitet prema ionima metala, poput primjerice željeza, mogu se koristiti kao potencijalni terapeutici za liječenje neurodegenerativnih bolesti, što potvrđuju brojni pokusi na životinjskom modelu kao i klinička istraživanja.^{33–35}

Idealan kelatoterapeutik za uklanjanje željeza iz moždanog tkiva trebao bi moći selektivno vezati željezo samo u mozgu, ali ne i u ostalim organima. Nastale kompleksne vrste bi se nakon toga trebale eliminirati iz organizma čime je moguće spriječiti toksične procese poput Fentonove reakcije. Također, kelator bi trebao ostvariti interakcije s amilodininim proteinima. Najbitniji uvjet koji bi potencijalni kelatoterapeutik trebao zadovoljiti jest prolazak kroz krvno-moždanu barijeru (engl. *Blood Brain Barrier*, BBB), pri čemu njegova molekulska masa mora biti manja od 300 Da. Za uspješnu eliminaciju molekulska masa nastalog kompleksa također bi trebala zadovoljavati iste uvjete. U tom se smislu hidroksipiridinoni, konkretno derivati 3,4-HP-a, spojevi male molekulske mase koji pokazuju visoku selektivnost za trovalentne katione metala u odnosu na dvovalentne, čine dobrim kandidatima za liječenje neurodegenerativnih bolesti.

Hidroksipiridinoni se mogu lako sintetski modificirati, s ciljem povećanja lipofilnosti, što je također jedan od uvjeta uspješnog prolaska potencijalnog kelatora kroz BBB.^{1,5} U svrhu povećanja lipofilnosti spojeva može se primijeniti glukozilacija, konkretno, uvođenje glukozne podjedinice u strukturu 3,4-HP-a. Za razliku od ostalih membrana u organizmu, BBB je obogaćena membranskim proteinima koji služe transportu glukoze (engl. *Glucose Transporter 1*, GLUT-1) čime se omogućava prijenos glukoziliranog spoja u moždano tkivo. Feraleks-G (VII, slika 5) spoj je koji pripada skupini 3,4-HP-a, uspješno prolazi kroz BBB i kelira Fe^{3+} i Al^{3+} ione. Glukozna podjedinica uvedena je u strukturu 3,4-HP-a na amidnu skupinu alkilne poveznice vezane na dušikov atom piridinonskog prstena. Osim navedenog načina, glukoznu podjedinicu moguće je uvesti na hidroksilnu skupinu na položaju 3 prstena čime se privremeno blokira kelirajuće vezno mjesto za željezo i pripravlja prolijek (poglavlje 2.4.2.).^{1,3,36}



Slika 5. Strukturna formula molekule Feraleksa-G (VII)^{1, 3,36}

2.2.3.1. Potencijal 3,4-HP-a u liječenju Parkinsonove bolesti

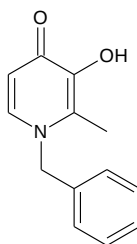
Parkinsonova bolest manifestira se poremećajem pokreta do kojeg dolazi zbog smanjenog lučenja dopamina u dijelu mozga koji je odgovoran za kontrolu pokreta.^{37,38}

Jedan od načina liječenja Parkinsonove bolesti uključuje inhibiciju enzima katehol-O-metil-transferaze (engl. *Catechol-O-Methyltransferase*, COMT) koji katalizira prijenos metilne skupine s kofaktora S-adenozil-L-metionina (engl. *S-Adenosyl-L-Methionine*, SAM) na supstrat kateholne strukture. Jedan od takvih supstrata je L-3,4-dihidroksifenilalanin (engl. *L-3,4-Dihydroxyphenylalanine*, L-DOPA) koji je prekursor dopamina. U liječenju Parkinsonove bolesti dosad su korišteni inhibitori enzima COMT koji u svojoj strukturi sadrže nitrokateholnu podjedinicu, poput entakapona ili tolkapona.³⁹ Klinička upotreba nitrokateholnih COMT inhibitora ograničena je zbog nuspojava koje izaziva njihova upotreba, kao što su hepatitis i neurološke reakcije, naročito kod primjene tolkapona.⁴⁰ Temeljem navedenog Beer i suradnici⁶ pripravili su seriju derivata 3,4-HP-a, spojeva koji u svojoj strukturi ne posjeduju nitrokateholnu podjedinicu, u svrhu ispitivanja njihovog potencijala u inhibiciji enzima COMT te u konačnici u svrhu liječenja Parkinsonove bolesti. Navedeni spojevi odabrani su zbog toga što pod utjecajem spomenutog enzima neće doći do njihovog O-metiliranja. Osim toga, 3,4-HP-i izosteri su kateholnog prstena i pokazuju tri prednosti pred upotrebom nitrokateholnih inhibitora enzima COMT:

1) oralna aktivnost i uspješna apsorpcija nekoliko derivata 3,4-HP-a iz gastronitestinalnog trakta;⁴¹

2) sposobnost selektivnog keliranja iona Fe^{3+} ;^{41,42}

3) analgetički efekt pojedinih 3,4-HP-a pri čemu je njihova aktivnost usporediva s aspirinom dok je njihova protuupalna aktivnost usporediva s indometacinom.⁴³ Pripravljene derivati 3,4-HP-a pokazali su potencijal u liječenju Parkinsonove bolesti s poboljšanim svojstvima u odnosu na nitrokateholne COMT inhibitore, a međusobno su se razlikovali prema strukturi supstituenata vezanih na dušikov atom osnovnog piridinonskog skeleta. Svi pripremljeni derivati 3,4-HP-a na dušikovom atomu imaju fenilnu podjedinicu koja je vezana ili izravno na dušikov atom ili preko alkilne poveznice, čime je povećana fleksibilnost hidroksipiridinonskog sustava. Dodatno, na fenilni prsten vezani su supstituenti poput halogenih elemenata ili metilne skupine. Kao najpotentniji COMT inhibitor istaknuo se spoj **VIII** (slika 6) s $\text{IC}_{50} = 4,55 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Općenito, IC_{50} vrijednost jest koncentracija spoja koja je potrebna za 50 %-tnu inhibiciju nekog staničnog procesa,⁴⁴ a u ovome slučaju predstavlja koncentraciju spoja koja je potrebna za 50 %-tnu inhibiciju enzima COMT.⁶



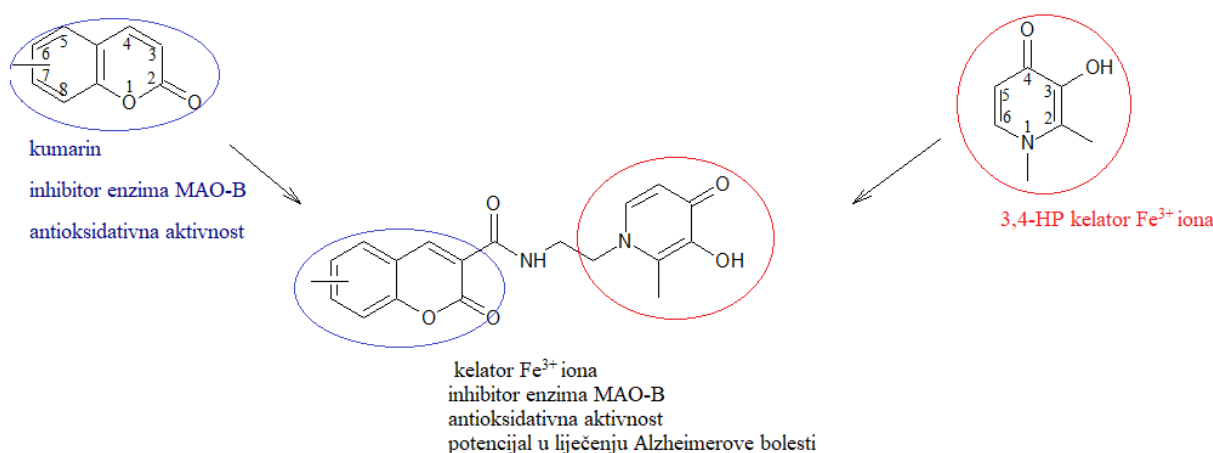
VIII

Slika 6. Strukturna formula deivata 3,4-HP-a s najvećom aktivnošću u inhibiciji COMT enzima⁶

2.2.3.2. Potencijal 3,4-HP-a u liječenju Alzheimerove bolesti

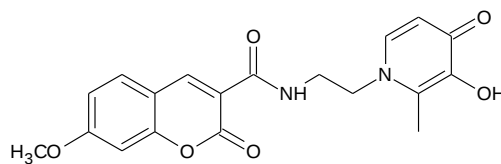
Alzheimerova bolest je neurodegenerativna bolest koju karakterizira propadanje kognitivnih funkcija.⁴⁵ Kako je opisano u poglavlju 2.2.3., poremećaji u homeostazi nekih metala, poput primjerice željeza, mogu utjecati na akumulaciju proteina i stvaranje proteinskih agregata što u konačnici može dovesti do pojave neurodegenerativnih bolesti. Narušavanje homeostaze metala, konkretno željeza, doprinosi nastanku ROS vrsta Fentonovom reakcijom, koje uzrokuju oštećenja biološki važnih molekula. U zdravom i mladom organizmu navedene vrste eliminiraju se staničnim obrambenim mehanizmima, no u slučaju kada je njihova razina viša od dopuštene, nastupa oksidativni stres.¹ U slučaju Alzheimerove bolesti postoje literaturni dokazi koji povezuju oksidativne procese s nastalim proteinskim amiloidnim lezijama.^{19,46,47} Oksidativni stres povezan je s enzimom monoamin-oksidadom (engl. *Monoamine-Oxidase*, MAO), naročito s monoamin-oksidadom B (MAO-B), koja katalizira oksidaciju monoamina, a nalazi se na vanjskoj membrani mitohondrija u većini vrsta tjelesnih stanica. Jedan od supstrata za navedeni enzim su β -feniletilamini, poput primjerice dopamina, pri čemu u takvoj reakciji dolazi i do nastanka vodikovog peroksida.⁴⁸ Vodikov peroksid ključni je međuprodukt u Fentonovoj reakciji (poglavlje 2.2.1, slika 3) kojom nastaju ROS vrste koje potiču pojavu oksidativnog stresa povezanog s razvojem Alzheimerove bolesti.^{49,50} Prema tome, jedan od potencijalnih načina liječenja Alzheimerove bolesti jest dizajn i priprava inhibitora enzima MAO-B.⁵¹ Jiang i suradnici⁴ pripremili su seriju hibrida 3,4-HP-a s kumarinima s ciljem ispitivanja njihova potencijala u liječenju Alzheimerove bolesti. Literaturno je poznata aktivnost kumarina u inhibiciji enzima MAO-B i primjena u prevenciji i liječenju bolesti središnjeg živčanog sustava (engl. *Central Nervous System*, CNS).⁵²⁻⁵⁶

Istraživanja odnosa strukture i aktivnosti (SAR) pokazala su kako se aktivnost kumarina u inhibiciji enzima MAO-B može poboljšati uvođenjem pogodnih supstituenata na položaje C-3, C-4 i C-7 kumarinskog sustava.^{57, 58} Ovakav pristup uključivao je strategiju koja podrazumijeva MTDL dizajn (engl. *Multi Target Directed Ligands*), što uključuje kombiniranje više farmakološki aktivnih fragmenata s ciljem sinteze jedne biološki aktivne molekule.^{59–61} Konkretno, molekule pripravljene u okviru opisanog istraživanja⁴ sadrže kumarinski fragment koji inhibira enzim MAO-B i posjeduje antioksidativnu aktivnost te hidroksipiridinonski dio odgovoran za keliranje iona Fe^{3+} (slika 7).



Slika 7. Općenita strukturna formula derivata 3,4-HP-a i kumarina kao liganada u MTDL dizajnu⁴

Pripravljenim spojevima ispitana je aktivnost u keliranju iona Fe^{3+} pri čemu je kao referentni spoj korišten deferipron (I). Svi pripravljeni spojevi pokazali su veliki afinitet prema ionima Fe^{3+} , a kod tri spoja afinitet je bio veći u odnosu na deferipron. Ciljnim spojevima ispitana je i aktivnost u inhibiciji enzima MAO-B pri čemu se svojom IC_{50} vrijednošću od 87,9 nmol dm^{-3} istaknuo spoj IX (slika 8). Spoj IX pokazao je puno bolju IC_{50} vrijednost u odnosu na referentni spoj pargilin ($\text{IC}_{50} = 107,3 \text{ nmol dm}^{-3}$). Također, rezultati SAR studije pokazali su kako uvođenje metilne skupine na položaj 2 hidroksipiridinonskog prstena te modifikacija položaja 7 na kumarinskom prstenu povećava njihovu aktivnost u inhibiciji enzima MAO-B.⁴



IX

Slika 8. Stukturna formula molekule kumarinskog derivata 3,4-HP-a (IX) s potencijalom u liječenju Alzheimerove bolesti ⁴

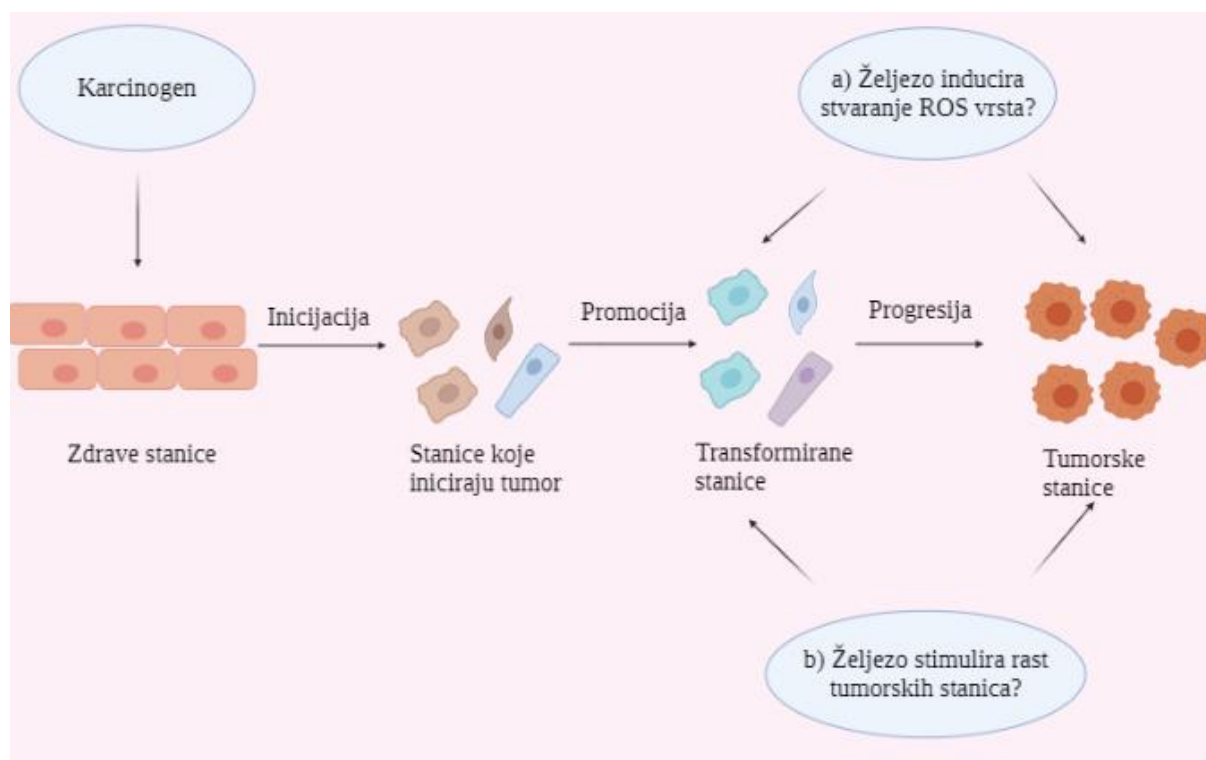
2.2.4. Antitumorska aktivnost 3,4-HP-a

2.2.4.1. Uloga željeza u proliferaciji tumorskih stanica

Jedan od načina antitumorskog djelovanja kelatora podrazumijeva vezanje željeza, pri čemu se tumorskoj stanici oduzima moć proliferacije, odnosno umnožavanja.⁶² Zbog brze proliferacije tumorske stanice imaju puno veću potrebu za željezom u odnosu na zdrave stanice, odnosno izmijenjen metabolizam željeza. Povećan unos željeza moguć je zbog većeg broja transferinskih receptora, TfR1 (poglavlje 2.2.1.), na površini tumorskih stanica, što je dokazano brojnim istraživanjima provedenim na stanicama raka dojke, debelog crijeva i grlića maternice.^{63,64} Također, pokazano je kako je razina TfR1 proporcionalna stadiju razvoja tumorske stanice.^{65,66}

Osim stimulacije proliferacije tumorskih stanica, željezo može biti uključeno i u razvoj tumorskih stanica na način da inducira stvaranje ROS vrsta Fentonovom reakcijom, a nastali hidroksilni radikali mogu uzrokovati oštećenje biološki važnih molekula poput DNA, membranskih lipida i proteina. Povezanost ROS vrsta i razvoja tumorskih stanica nije u potpunosti razjašnjena. Jedna od poveznica može biti činjenica da je razvoj tumorskih stanica višestupanjski proces koji može biti uzrokovan brojnim čimbenicima kao što su prehrana, način života te genetske predispozicije. Također, željezo kao metal nije karcinogen, ali je kofaktor koji utječe na razvoj tumorskih stanica. Općenito, karcinogeneza, odnosno proces nastanka i razvoja tumorskih stanica, podijeljena je u tri faze: inicijacija, promocija i progresija (shema 2). Inicijacija je proces u kojemu se normalna stanica pod utjecajem već spomenutih potencijalnih faktora, poput genetskih faktora ili različitih čimbenika iz okoliša (karcinogen), transformira u tumorsku stanicu. Promocija je proces koji obuhvaća rast tumorske stanice dok progresija obuhvaća daljnje mutacije generirane tumorske stanice pri čemu dolazi do autonomnog rasta stanice te stvaranja metastaza. Na shemi 2 prikazan je pretpostavljeni model uloge željeza u razvoju tumorskih stanica, pri čemu su prikazane već spomenute tri faze karcinogeneze. Željezo

može potaknuti progresiju tumorske stanice na jedan od dva opisana načina. Prvi način (shema 2, (a)) podrazumijeva sudjelovanje željeza u stvaranju ROS vrsta, dok je prema drugom načinu željezo uključeno u proliferaciju matičnih tumorskih stanica koje iniciraju tumor (engl. *Cancer Stem Cell/s*, CSCs) i transformiranih stanica (shema 2 (b)).⁶⁷



Shema 2. Faze procesa karcinogeneze i pretpostavljene uloge željeza u razvoju tumorskih stanica⁶⁷

Brojna istraživanja pokazala su kako DFO (II) pokazuje antitumorsku aktivnost u *in vitro* uvjetima te u kliničkim pokusima.^{68,69} Takva istraživanja pokazala su kako su tumorske stanice raka grlića maternice te stanice mijeloidne leukemije osjetljive na terapiju keliranja željeza s DFO-om. Antiproliferativna aktivnost DFO-a u potpunosti je ili bar djelomično reverzibilna u slučaju tretiranja navedenih tumorskih stanica sa solima željeza ili DFO zasićenim željezom, što upućuje na činjenicu da je vezanje željeza unutar stanica bitna komponenta koja utječe na antitumorsku aktivnost DFO-a. Osim navedenog, DFO uzrokuje povećanje ekspresije receptora TfR1 i smanjenje razine proteina feritina što indicira na postojanje mehanizma za održavanje homeostaze željeza u organizmu. Također, dokazano je kako DFO uzrokuje prestanak sinteze DNA te apoptozu (poseban oblik stanične smrti nužan za razvoj organizma i održavanje stanične homeostaze)⁷⁰ tumorske stanice u *in vitro* uvjetima, ali u ispitivanjima *in vivo* na mišjem modelu nije pokazao značajnu antitumorsku aktivnost.⁶⁷

2.2.4.2. Ribonukleotid-reduktaza

Jedan od načina potencijalnog antitumorskog djelovanja kelatora uključuje inaktivaciju enzima ribonukleotid-reduktaze (engl. *Ribonucleotide-Reductase*, RR) koji katalizira redukciju ribonukleotida u njihove odgovarajuće deoksiribonukleotidne analoge važne za sintezu DNA. Inaktivacija ovog enzima uzrokuje prestanak sinteze DNA, odnosno terminaciju proliferacije. Ribonukleotid-reduktaza je enzim građen od dvije podjedinice, manje R1 i veće R2 podjedinice, kojemu je za aktivnost potrebno željezo. Sudjeluje u koraku koji određuje brzinu reakcije sinteze DNA, odnosno u redukciji ribonukleotida u deoksiribonukleotidne analoge.⁷¹ Podjedinice R1 i R2 zajedno sa dvjema manjim podjedinicama RRM2 i RRM2B tvore aktivni heterodimerni tetramer.⁷² Podjedinica R1 odgovorna je za vezanje ribonukleotida i alosteričkih faktora. Radikal tirozinskog ostatka unutar podjedinice R2 stabilizira trovalentno željezo, što upućuje na važnu ulogu spomenutog metala u katalitičkoj aktivnosti RR.⁷¹ Provedena su istraživanja u kojima je pokazano kako se antiproliferativna aktivnost DFO-a zasniva na keliranju željeza u tumorskim stanicama čime se inhibira enzim RR. Keliranjem željeza iz skladišnih odjeljaka u tumorskim stanicama moglo bi se utjecati na njihovu proliferaciju uskraćivanjem DNA nukleotidnih prekursora.^{67,73,74} No, hidrofilnost DFO-a smanjuje njegovu antiproliferativnu aktivnost zbog slabe membranske permeabilnosti.⁶⁷

2.2.4.3. Potencijal 3,4-HP-a u liječenju raka kože fotodinamičkom terapijom

Terapija svjetlošću ili fototerapija je terapija u kojoj se bolesnik izlaže dnevnoj svjetlosti ili svjetlosti određenih valnih duljina čiji su izvori laseri, diode ili specijalne lampe. Najčešće se primjenjuje kod liječenja kožnih oboljenja, tumora, poremećaja spavanja i pojedinih oblika depresije. Može se primjenjivati i za ublažavanje boli, ubrzano zacjeljivanje rana, rast kose, liječenje alergija, Parkinsonove bolesti, demencije i opsesivno-kompulzivnih poremećaja. Fotodinamička terapija (engl. *Photodynamic Therapy*, PDT) vrsta je fototerapije u kojoj se koriste fotosenzibilizatori koji se pomoću svjetlosti određene valne duljine aktiviraju i izazivaju terapijski učinak, odnosno uništenje stanice. Oštećenje i uništenje stanica i tkiva postiže se kombinacijom svjetlosti, kisika i fotosenzibilizatora. Nakon apsorpcije svjetlosti fotosenzibilizator prelazi u singletno pobuđeno stanje, iz kojeg se procesom fluorescencije ili oslobađanjem toplinske energije vraća u osnovno stanje ili, alternativno, može prijeći u tripletno pobuđeno stanje.

Povratak u osnovno stanje uključuje redoks-reakcije s okolnim molekulama koje rezultiraju prijenosom elektrona i nastankom radikal-kationa i aniona, koji dalje mogu reagirati s kisikom i uzrokovati nastanak već spomenutih ROS vrsta. Fotosenzibilizator u tripletnom pobuđenom stanju prenosi energiju izravno na molekulski kisik te nastaje kisik u singletnom stanju. On reagira s biološkim molekulama poput DNA, RNA, proteina i lipida. Novonastale specije posjeduju visoku reaktivnost i kratko vrijeme poluživota što rezultira oštećenjem samo molekula u neposrednoj blizini fotosenzibilizatora, pa je učinak u fotodinamičkoj terapiji lokaliziran.⁷⁵⁻⁷⁷

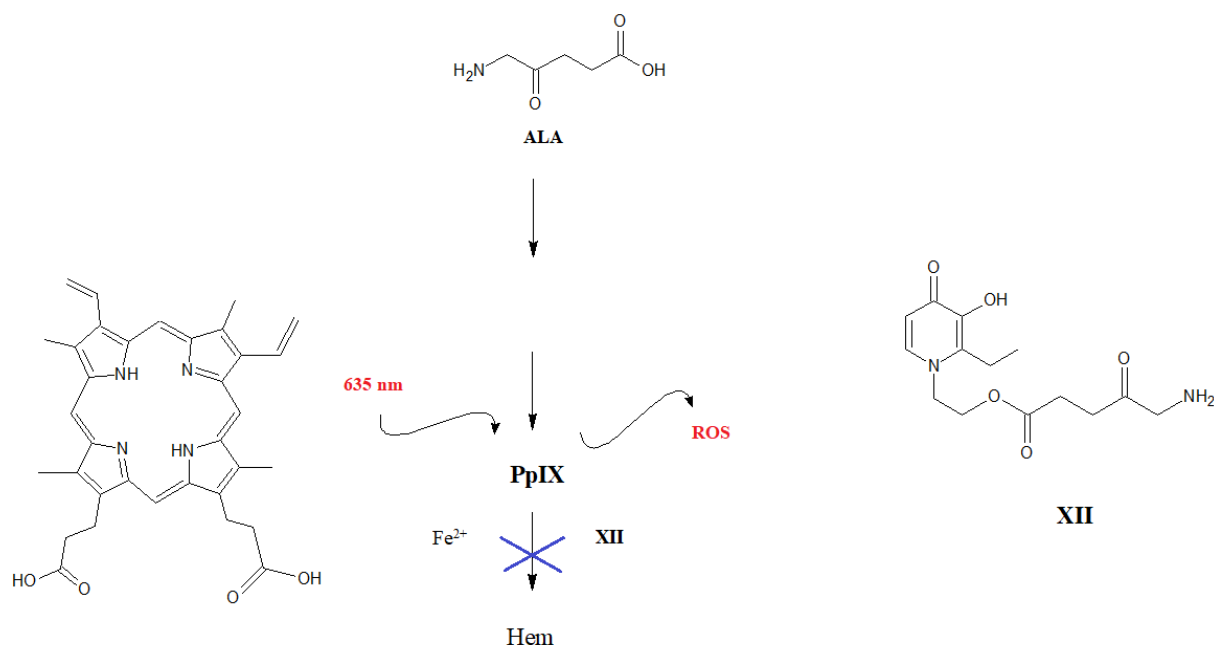
Za primjenu u fotodinamičkoj terapiji pogodan je fotosenzibilizator koji ima sposobnost duljeg zadržavanja u stanicama tumora u odnosu na normalne stanice. Jedan od najvažnijih fotosenzibilizatora jest 5-aminolevulinska kiselina (engl. *5-aminolevulinic acid*, ALA), prekursor u biosintezi porfirina (hema).⁷⁸ U slučaju egzogenog unosa u organizam, u stanici se nakupljaju porfirini, primarno protoporfirin IX (PpIX), osjetljiv na crvenu svjetlost valne duljine oko 635 nm koja prodire kroz kožu. Porfirini se u stanici smještaju u blizini mitohondrija, a izlaganjem svjetlosti uzrokuju apoptozu (poglavlje 2.2.4.1.) ili nekrozu stanice (odumiranje stanica kao posljedica znatnijeg oštećenja stanica izazvanog različitim fizikalno-kemijskim agensima).^{70,79}

Protoporfirin IX je velika i u vodi netopljiva molekula koja se u organizam unosi posredno preko odgovarajućih prekursora. Jedan od najčešćih prekursora jest već spomenuta ALA koja se apsorbira u stanice i enzimskim putem prevodi u fotoosjetljivi PpIX.^{80,81} Na ovaj se način može izbjeći prvi korak koji određuje brzinu reakcije, a koji uključuje sintezu ALA iz glicina i sukcinil-CoA uz enzim ALA-sintetazu pri čemu dolazi do akumulacije PpIX. Posljednji korak u ovom sintetskom putu predstavlja umetanje Fe^{2+} iona u PpIX pri čemu nastaje molekula hema. Navedeni korak predstavlja drugi limitirajući korak ovog sintetskog puta. Biosinteza hema u tumorskim stanicama je pojačana i slabije kontrolirana u odnosu na zdrave stanice. Metabolizam željeza u tumorskim stanicama je izmijenjen te dolazi do poremećaja u regulaciji enzima koji sudjeluju u biosintezi porfirina, pa će se u tumorskim stanicama PpIX brže akumulirati u odnosu na zdrave stanice.^{82,83}

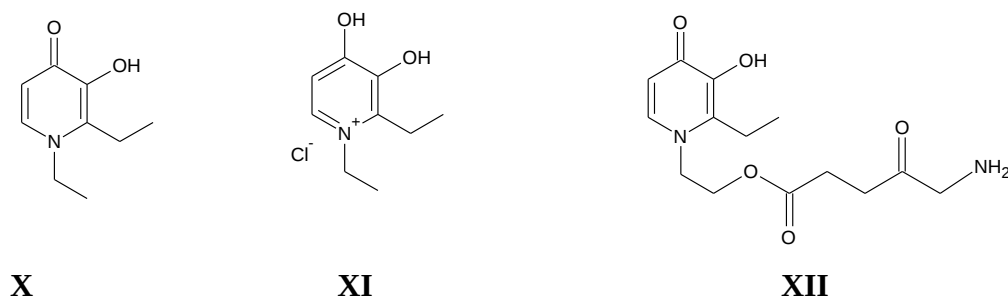
Kako bi se spriječio posljednji korak u biosintezi porfirina – umetanje Fe^{2+} iona u PpIX, jedno od farmakoloških rješenja uključuje administraciju kelirajućih agenasa (shema 3). Kelirajući agensi vezanjem Fe^{2+} iona privremeno će inhibirati posljednji korak biosinteze hema.^{83,84}

U svrhu povećanja akumulacije PpIX i liječenja dermatoloških poremećaja te nemelanomskog karcinoma kože (engl. *Non-Melanoma Skin Cancer*, NMSC) Curnow i suradnici⁸⁵ dizajnirali su potencijalni kelator Fe^{2+} iz skupine 3,4-HP-a, 1,2-dietil-3-hidroksipiridin-4-on (**X**). Usporedbom fotodinamičkih svojstava spoja **X** i DFO-a (**II**) pokazalo se kako spoj **X** više pojačava fluorescenciju PpIX u odnosu na DFO koji pak pojačava fluorescenciju PpIX više nego EDTA.

Spoj **X** ima veću lipofilnost u odnosu na DFO, manju molekulsku masu i neutralna je molekula čime je olakšan i ubrzan njegov pristup unutarstaničnom željezu. S ciljem dizajna spoja koji će se koristiti u fotodinamičkoj terapiji kao kelirajući agens željeza, pripremljen je spoj **XII** (slika 9). Prvi korak u sintezi spoja **XII** je prevođenje spoja **X** u analogni hidroklorid, spoj **XI**, koji u reakciji s ALA daje spoj **XII**, ester spoja **X** i ALA. Rezultati opisanog istraživanja pokazali su kako spoj **XII** ne pokazuje toksičnost na temelju čega može biti podvrgnut dermatološkim testiranjima. Spoj **XII** znatno povećava akumulaciju PpIX u dva tipa ispitanih dermatoloških stanica (humani dermalni fibroblasti-84BR i humane epitelne stanice raka-A431) u *in vitro* uvjetima. U okviru istraživanja ispitan je i utjecaj spoja **XI**, ALA, njegovog metilnog estera (MAL), kao i produkata reakcije MAL/ALA sa spojem **XI** na povećanje akumulacije PpIX, no najbolje rezultate pokazao je spoj **XII**. Spoj **XII** može proći kroz membranu stanica, a s obzirom da je pokazano kako dodatkom spoja **XII** raste produkcija PpIX, može se pretpostaviti mehanizam njegova djelovanja. Prema pretpostavljenom mehanizmu djelovanje spoja **XII** zasniva se na principu prolijeka (poglavlje 2.4.2.) čija se esterska veza cijepa pomoću esteraza prisutnih u citosolu dajući polazne ALA i spoj **XI**. Na ovaj način svaka od molekula dobivena hidrolizom može funkcionirati zasebno – ALA kao prekursor u sintezi PpIX, a spoj **XI** kao kelator Fe^{2+} iona i inhibitor sinteze hema.⁸⁵



Shema 3. Potencijalna uloga 3,4-HP-a (XII) u keliranju Fe^{2+} iona u fotodinamičkoj terapiji⁸⁵



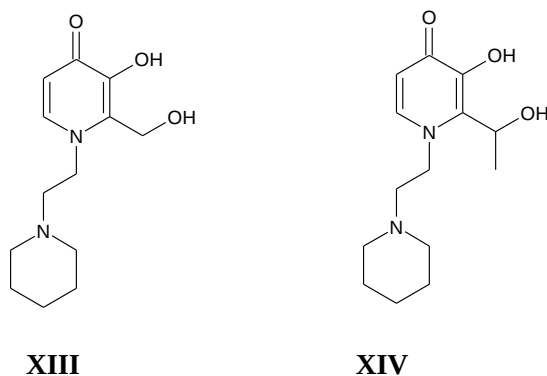
Slika 9. Strukturne formule molekula derivata 3,4-HP-a: spoja X, hidroklorida XI i spoja XII s potencijalom u liječenju raka kože⁸⁵

2.2.5. Ostali biološki učinci 3,4-HP-a

2.2.5.1. Antimalarijska aktivnost 3,4-HP-a

Dehkordi i suradnici⁸⁶ pripravili su seriju 3,4-HP-a kojima su ispitana fizikalno-kemijska svojstva te *in vitro* antimalarijske aktivnosti. Pripravljeni 3,4-HP-i strukturno su modificirani uvođenjem različitih supstituenata na položaje 1, 2 i 6 hidroksipiridinonskog prstena. Pripravljeni spojevi potencijalni su „hvatači“ (engl. *scavengers*) Fe^{3+} iona.

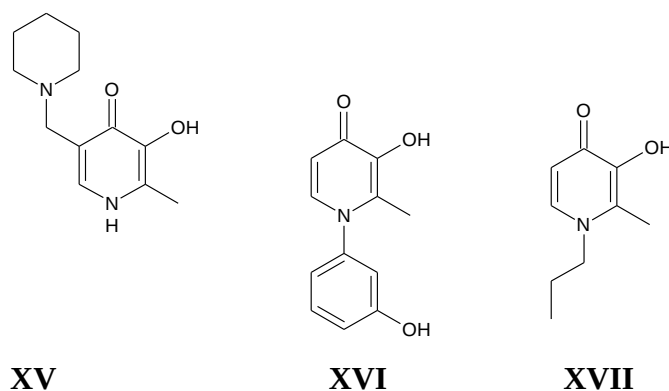
Sposobnost hvatanja iona Fe^{3+} ispitana je u *in vivo* uvjetima pri čemu su se istaknula dva spoja, spojevi **XIII** i **XIV**, s efikasnošću od 20 % (slika 10). Derivatima 3,4-HP-a ispitana je i *in vitro* antimalarijska aktivnost pri čemu su se ponovno istaknuli spojevi **XIII** i **XIV** s $\text{IC}_{50} \approx 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$.⁸⁶



Slika 10. Strukturne formule molekula derivata 3,4-HP-a s potencijalnom antimalarijskom aktivnošću⁸⁶

2.2.5.2. Antimikrobna aktivnost 3,4-HP-a

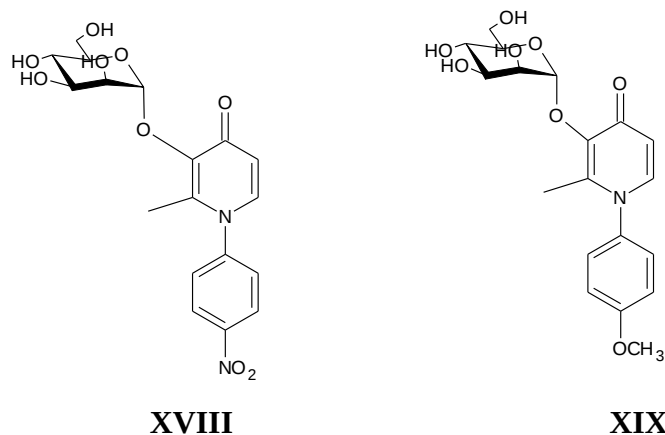
Fassihi i suradnici⁸⁷ pripravili su seriju Mannichovih baza 2-alkil-3-hidroksipiridin-4-ona, dva derivata *N*-aril-2-metil-3-hidroksipiridin-4-ona i dva *N*-alkil derivata 3,4-HP-a s ciljem ispitivanja njihove antibakterijske i antifungalne aktivnosti. Rezultati istraživanja pokazali su kako neki od pripremljenih spojeva mogu inhibirati rast bakterija. Među pripremljenim spojevima istaknuli su se spojevi **XV**, **XVI** i **XVII** koji su pokazali inhibitorni učinak na bakteriju *Staphylococcus auerus* pri koncentraciji od 16 mg mL^{-1} (slika 11). Također, spoj **XVI** pokazao je pri istoj koncentraciji aktivnost na bakteriju *Salmonella enteritidis*, te umjerenu aktivnost u inhibiciji bakterije *Bacillus subtilis*. Rezultati istraživanja kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR) pokazali su kako svi pripremljeni derivati pokazuju najveći potencijal u inhibiciji rasta gljivice *Candida albicans* na što utječu kvantni, konstitucijski, topološki i geometrijski parametri.



Slika 11. Strukturne formule molekula derivata 3,4-HP-a – inhibitora *S. auerus*⁸⁷

2.2.5.3. Antiadhezijska aktivnost 3,4-HP-a

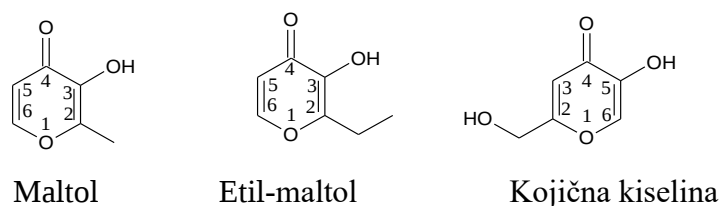
Antiadhezijska aktivnost 3,4-HP-a ispitana je *in vitro* upotrebom testa inhibicije hemaglutinacije, odnosno testom inhibicije aglutinacije uropatogene bakterije *Escherichia coli* i eritrocita iz krvi zamorčića. Pripravljena je serija α -manozidnih derivata *N*-aril-3,4-HP-a u svrhu ispitivanja njihovog potencijala u inhibiciji hemaglutinacije. Pripravljene derivati posjeduju potrebne strukturne karakteristike dobrih FimH antagonista, pri čemu je FimH bakterijski adhezin koji omogućava bakteriji vezanje za stanice domaćina.⁸⁸ Kao referentni spoj korišten je metil α -D-manopiranozid, a rezultati su pokazali da su pripremljeni α -manozidni derivati 3,4-HP-a bolji inhibitori hemaglutinacije u odnosu na referentni spoj. Studijom molekuskog modeliranja utvrđene su interakcije odgovorne za aktivnost prema bakterijskom FimH lektinu koje uključuju hidrofobne interakcije s aminokiselinskim ostacima Tyr137 i Tyr48. Spojevi koji u *para*-položaju arilnog dijela aglikona posjeduju nitro-skupinu (**XVIII**) i metoksi-skupinu (**XIX**) (slika 12) pokazali su bolju aktivnost u inhibiciji hemaglutinacije u odnosu na ostale pripravljene spojeve, što se može objasniti dodatnom vodikovom vezom između hidroksilne skupine bočnog ogranka Tyr137 i spomenutih spojeva. Ovakvim rezultatima otvoren je put dizajnu novih potencijalnih inhibitora hemaglutinacije.⁷⁴



Slika 12. Strukturne formule molekula α -manozidnih derivata *N*-aril-3,4-HP-a⁷⁴ s antiadhezijskom aktivnošću

2.3. Priprava *N*-supstituiranih 3,4-HP-a

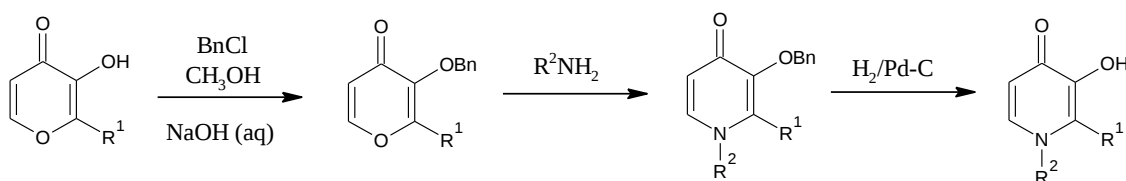
Za pripravu *N*-supstituiranih 3,4-HP-a kao polazni spojevi koriste se odgovarajući primarni amini te komercijalno dostupni hidroksipiran-4-oni poput 3-hidroksi-2-metilpiran-4-ona (maltol),⁷ 2-etil-3-hidroksipiran-4-ona (etil-maltol),⁷ 5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-ona (kojična kiselina)^{89,i} i drugi (slika 13).



Slika 13. Strukturne formule molekula komercijalno dostupnih hidroksipiran-4-ona^{7,89}

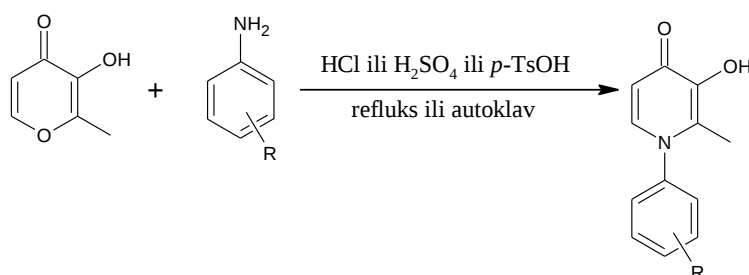
Dvije najčešće korištene literaturno opisane metode sinteze osnovne heterocikličke strukture 3,4-HP-a su metoda po Harrisu (shema 4)⁹⁰ i izravna metoda (shema 5).⁹¹ Metoda po Harrisu primijenjuje se za pripravu *N*-alkilnih i *N*-arilnih derivata 3,4-HP-a iz odabranih hidroksipiranskim derivata i alifatskih i aromatskih primarnih amina. U prvome koraku na hidroksilnu skupinu polaznog hidroksipiran-4-ona uvodi se eterska zaštitna skupina, najčešće benzilna (shema 4). U drugom koraku reakcijom s primarnim aminom nastaje zaštićeni 3,4-HP kojem se u trećem koraku hidrogenolizom uklanja benzilna zaštita.¹⁶

ⁱ Prema pravilima nomenklature IUPAC (V. Rapić, *Nomenklatura organskih spojeva*, Školska knjiga, Zagreb, 2004.) reakcijom kojične kiseline i primarnih amina nastaju 4,5-HP-i, no u praksi se oni također smatraju derivatima 3,4-HP-a.



Shema 4. Priprava *N*-alkilnih/arilnih derivata 3,4-HP-a metodom po Harrisu⁹⁰

Reakcijski uvjeti u kojima se provodi drugi korak opisane reakcije, koji uključuje reakciju s odgovarajućim primarnim aminom, ovisit će o strukturi aminskog derivata koji se upotrebljava kao nukleofil. Ako se kao nukleofil koristi alifatski amin, drugi korak provodi se u alkoholno-vodenim otapalima uz refluks. U slučaju kada se kao nukleofil koristi aromatski amin, reakcije se najčešće provode bez dodatka otapala uz zagrijavanje na nešto višim temperaturama ($\approx 120\text{ }^{\circ}\text{C}$) ili se polazni reaktanti zagrijavaju u zatvorenim sustavima (autoklav, $\approx 150\text{ }^{\circ}\text{C}$). Aromatski amini imaju drugačija fizikalna svojstva u odnosu na alifatske amine, primjerice više temperature tališta ili vrelišta te slabiju topljivost u mediju u kojemu se reakcija provodi (voda ili alkoholno-vodene sredine), što zahtijeva provođenje reakcije u drugačijim reakcijskim uvjetima.¹⁶ Druga literaturno opisana metoda koja se primjenjuje za pripravu *N*-arilnih derivata 3,4-HP-a jest izravna metoda koja, za razliku od Harrisove metode, ne uključuje uvođenje zaštitne skupine (shema 5). Izravna metoda uključuje zagrijavanje, uz refluks ili u autoklavu, nezaštićenog piranonskog derivata i odgovarajućeg arilamina. Reakcije se provode u jednome koraku sa ili bez dodatka kiselog katalizatora. Kao katalizatori se koriste Brønstedove kiseline poput klorovodične kiseline (HCl), sumporne kiseline (H_2SO_4) ili *para*-toluensulfonske kiseline (*p*-TsOH).^{91,92}



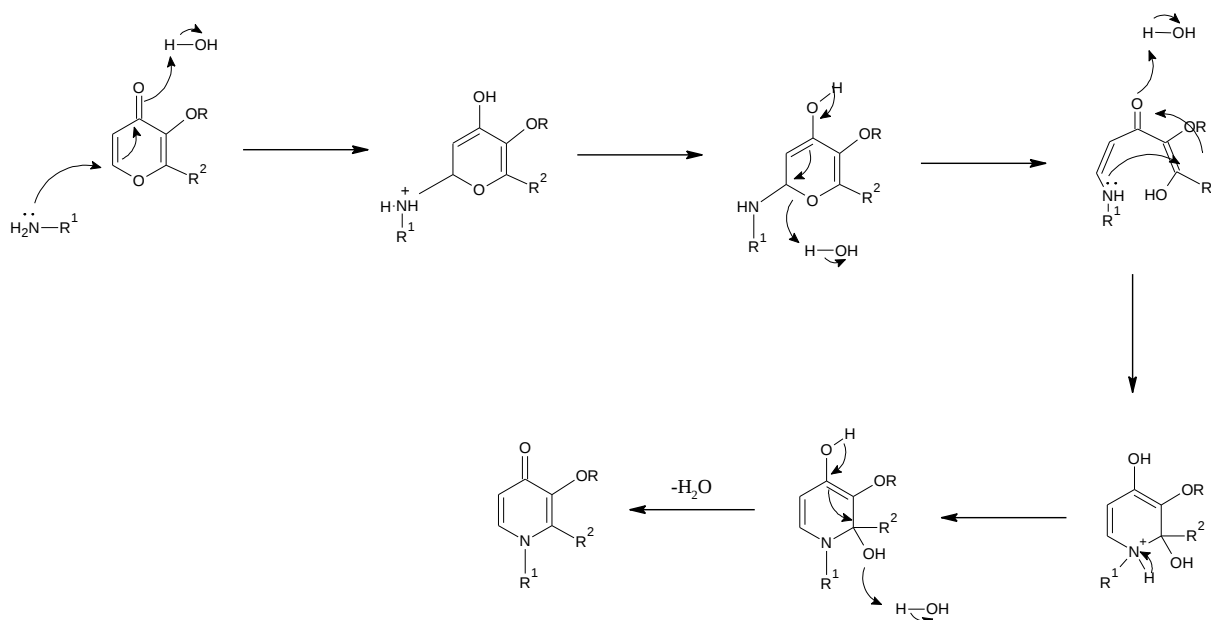
Shema 5. Izravna metoda priprave 3,4-HP-a⁹¹

Harrisov pristup u kojemu se drugi reakcijski korak provodi klasičnim zagrijavanjem u smjesi otapala alkohol/voda najučinkovitiji je način priprave *N*-alkilnih derivata 3,4-HP-a, poput metilnog derivata koji je pripravljen uz ukupni prinos od 53 %.¹⁶

Postupci pripreve *N*-alkilnih derivata 3,4-HP-a izravnom metodom bez zaštićivanja hidroksilne skupine u literaturi su rijetko opisani, poznato je da samo u slučaju kratkolančanih alifatskih amina kao reaktanata reakcije rezultiraju zadovoljavajućim prinosom.^{16,93} S druge strane, za pripravu *N*-arilnih derivata 3,4-HP-a pogodnije su reakcije koje uključuju zagrijavanje u autoklavu ili postupci koji se provode bez dodatka otapala. Glavna prednost takvih postupaka je kraće trajanje reakcije (8-40 h) u odnosu na reakcije koje se provode uz klasično zagrijavanje reaktanata u otapalu uz dodatak katalizatora (50-72 h). Općenito, obje metode pripreve 3,4-HP-a rezultiraju relativno niskim prinosima, no izravna metoda zbog manjeg broja reakcijskih koraka češće je korišteni način pripreve 3,4-HP-a.¹⁶

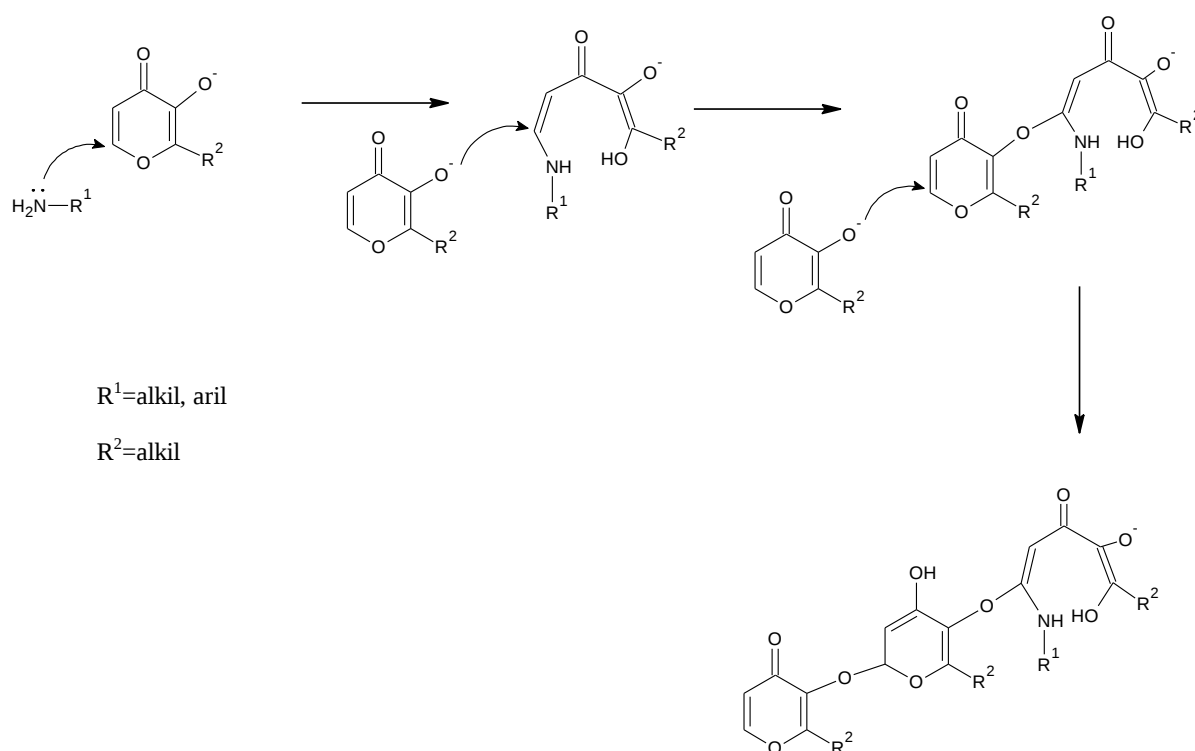
2.3.1. Mehanizam reakcije pripreve *N*-supstituiranih 3,4-HP-a

Poznavanje mehanizma reakcije sinteze osnovne heterocikličke strukture 3,4-HP-a znatno olakšava odabir metode pripreve željenog derivata. Mehanizam reakcije pripreve 3,4-HP-a je dvostruka nukleofilna konjugirana adicija Michaelova tipa na položaje C-2 i C-6 α,β -nezasićenog karbonilnog piranonskog derivata, pri čemu su nukleofili odgovarajući alkil- ili arilamini (shema 6).^{16,90} Michaelov donor u ovome slučaju nije karbanion kao u klasičnoj Michaelovoj reakciji, nego primarni amin, dok je Michaelov akceptor α,β -nezasićeni sustav piran-4-ona.



Shema 6. Mehanizam reakcije pripreve 3,4-HP-a^{16,90}

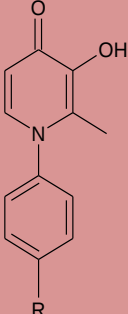
U jako bazičnom mediju, naročito kada su nukleofili razgranani alkilamini ($pK_{aH} \approx 11-12$) pogodno je zaštititi hidroksilnu skupinu hidroksipiran-4-ona (pK_a za maltol = 8,44⁹⁴) jer je u protivnom moguće njezino deprotoniranje i stvaranje kompetirajućeg nukleofila, alkoksida. U konačnici dolazi do nastanka kondenzacijskih nusprodukata te do smanjenja prinosa reakcije (shema 7). Kada se reakcije provode s manje bazičnim arilaminima, reakciju je moguće provoditi i izravnom metodom, bez uvođenja zaštitne skupine u strukturu polaznog hidroksipiran-4-ona. U tom slučaju pokazalo se kako je dodatak kiselog katalizatora dovoljan za smanjenje mogućnosti nastanka alkoksida i sprječavanje sporedne reakcije. Utjecaj kiselog katalizatora opisan je u pripravi 3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-ona izravnom sintezom u autoklavu koju su proveli Jakopčić i suradnici.⁹¹ U nekataliziranoj reakciji produkt nastaje u tragovima, dok je prinos reakcije 47 % u slučaju kada se u sintezi upotrebljavaju katalitičke količine *p*-TsOH ili H₂SO₄.^{16,91} Dodatkom kiselog katalizatora može se izbjeći nastanak kondenzacijskih nusprodukata no istodobno može doći do protoniranja polaznog amina. Stoga je u reakciji pripreve 3,4-HP-a u kiselim reakcijskim uvjetima pogodnije koristiti manje bazične arilamine koji, za razliku od alkilamina, nisu u potpunosti protonirani i u ravnoteži postoji mali udio neprotoniranog oblika.⁹⁵



Shema 7. Mogući sporedni kondenzacijski produkti u reakciji pripreve 3,4-HP-a⁹⁰

Reakcijom maltola i *p*-metoksianilina uz HCl kao katalizator pripremljen je odgovarajući 3,4-HP uz prinos od 58 %, ⁹⁶ što je znatno viši prinos u odnosu na anilinske derivate s elektron-akceptorskim skupinama u *para*-položaju, poput nitro-skupine (28 %) ili karboksilne skupine (20 %). Slično je dobiveno i u slučaju anilinskog derivata s metilnom skupinom u *para*-položaju (tablica 1). ^{95,96} Prinosi ovakvih reakcija u skladu su s elektronskim svojstvima supstituenata: kada se kao Michaelovi donori upotrebljavaju nukleofilniji anilinski derivati, tj. derivati s elektron-donirajućim supstituentima, prinosi reakcija su viši. ¹⁶

Tablica 1. Izravni pristup pripreme *N*-aril-3,4-HP-a uz dodatak kiselog katalizatora (HCl, aq) u alkoholnom otapalu, metanol (MeOH) ili etanol (EtOH), refluks, 50-72 h. ^{91,96}

	R	Prinos (%)
	NO ₂	28*
	COOH	20
	OCH ₃	58
	CH ₃	52

*bez dodatka organskog otapala

2.4. Strukturne modifikacije 3,4-HP-a

S ciljem povećanja lipofilnosti 3,4-HP-a pripremljenih u okviru ove disertacije i u konačnici olakšavanja njihova prolaska kroz biomembrane stanica pripremljeni spojevi strukturno su modificirani vezanjem lipofilnih podjedinica, o čemu će biti riječ u ovome poglavlju.

2.4.1. Prolazak potencijalnog kelatora kroz biomembrane

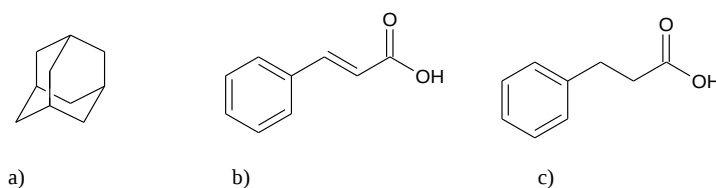
Kako bi se kelator mogao uspješno apsorbirati u gastrointestinalnom traktu, najprije mora proći kroz biomembrane stanice. Biomembrane su građene od molekula proteina i lipida koje se drže zajedno nekovalentnim interakcijama koje su kooperativne prirode. Broj membranskih lipida vrlo je velik no svi imaju jedno ključno strukturno svojstvo: amfipatske su molekule zbog čega sadrže i hidrofilni i hidrofobni dio. U svim biološkim membranama nalaze se u velikim količinama fosfolipidi i glikolipidi čije će se molekule u vodenoj sredini orijentirati na način da će polarne glave biti usmjerene prema vodi dok će njihovi ugljikovodični hidrofobni repovi,

između kojih postoje privlačne van der Waalsove sile, izbjegavati vodu. Takav način orijentacije dovodi do stvaranja micela ili lipidnog dvosloja pri čemu većina fosfolipida i glikolipida u vodenom okruženju radije stvara lipidni dvosloj nego micelu. Prema tome, lipidni dvosloj inherentno je nepropusan za ione i većinu polarnih molekula, odnosno prilikom prolaska kroz membranu molekula bi trebala posjedovati odgovarajuću lipofilnost.⁹⁷

Kao mjera lipofilnosti molekule koristi se $\log P$ vrijednost koja predstavlja omjer množinskih koncentracija promatrane vrste (liganda ili kompleksa) nakon njezine razdiobe između dvaju otapala koja se ne miješaju, najčešće oktan-1-ola i puferirane vodene otopine ($\text{pH} = 7,4$). Osim lipofilnosti, potencijalni kelator, kako bi prošao kroz biomembrane do ciljnog mjesta svog djelovanja u stanicama, mora zadovoljiti još nekoliko uvjeta poznatih kao Lipinski pravila^{1,15} prema kojima bi potencijalni kelator trebao posjedovati slijedeće karakteristike:

- 1) molekulska masa manja od 500 Da
- 2) broj donorskih skupina za stvaranje vodikovih veza ≤ 5
- 3) broj akceptorskih skupina za stvaranje vodikovih veza ≤ 10
- 4) lipofilnost izraženu kao $\log P$ vrijednost u rasponu 0,4 – 5.^{1,15}

U okviru ovoga istraživanja pripremljeni su 3,4-HP-i čije su $\log P$ vrijednosti u rasponu 1,06 – 2,99, ovisno o derivatu. U tom smislu jedan od načina strukturne modifikacije derivata 3,4-HP-a jest na osnovnu hidroksipiridinonsku strukturu vezati podjedinice koje će povećati lipofilnost spoja te olakšati njegov prolazak kroz biomembranu. Jedna od takvih lipofilnih podjedinica, adamantilna¹¹, i njeno vezanje na *N*-aril supstituirane 3,4-HP-e tema je ovoga istraživanja. Uz adamantilnu podjedinicu, kao lipofilna podjedinica, odabrana je i cimetna kiselina¹⁴, a priprava derivata cimetne kiseline omogućila je i pripravu derivata s fenilpropanskom kiselinom (slika 14).

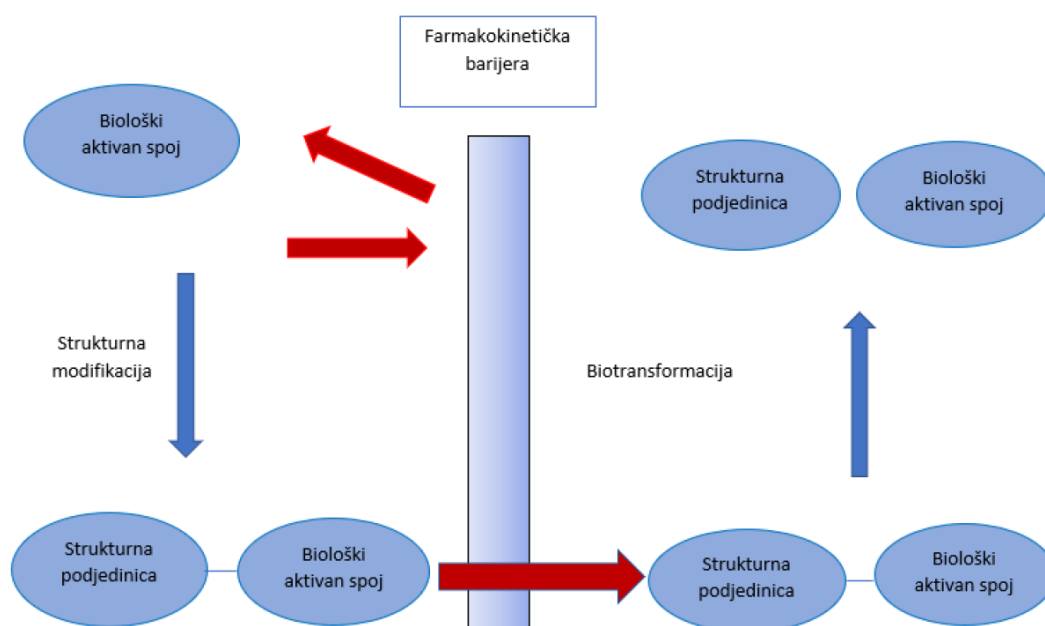


Slika 14. Strukturne formule molekula: a) adamantana; b) cimetne kiseline; c) fenilpropanske kiseline

2.4.2. Koncept priprave i djelovanja prolijeke

Pristup koji se zasniva na pripravi prolijeke vrlo često se koristi u svrhu optimiziranja kliničke primjene lijeka s ciljem poboljšanja terapijskih svojstava potencijalnog lijeka. Temelji se na

strukturnim modifikacijama potencijalnog biološki aktivnog spoja na način da se nakon njegove primjene *in vivo* oslobađa aktivna tvar. Oslobađanje ishodne aktivne tvari (engl. *parent drug*) iz pripravljenog prolijeka može se odvijati enzimskim ili neenzimskim putem. U idealnim uvjetima prolijek bi se trebao što prije prevesti u iskodišni aktivni spoj, a sam proces praćen je eliminacijom strukturne podjedinice korištene za njegovu modifikaciju (shema 8). U tu svrhu dizajnirani su brojni prolijekovi s ciljem poboljšavanja fizikalnih svojstava potencijalnog biološki aktivnog spoja poput slabe topljivosti u vodi, niske lipofilnosti i nestabilnosti ili s ciljem poboljšavanja njegovih farmakokinetičkih svojstava kao što je nemogućnost prolaska spoja kroz biomembranu. Primjerice, djelovanje aspirina (acetilsalicilna kiselina) prvotno je temeljeno na ideji prolijeka. Aspirin ireverzibilno inhibira ciklooksigenazu, enzim odgovoran za formiranje ključnih bioloških spojeva prostaglandina i tromboksana. Salicilna kiselina, ishodni aktivni spoj aspirina, slabi je reverzibilni inhibitor ciklooksigenaze te je metabolički aktivna tvar. Nakon svoje primjene slijedi brza hidroliza aspirina u gastrointestinalnom traktu, jetri i u krvi pri čemu kao produkt hidrolize nastaje biološki aktivna salicilna kiselina. Daljnjim istraživanjima ustanovljeno je kako aspirin, osim što djeluje kao prolijek, i sam pokazuje značajnu biološku aktivnost.⁹⁸ Pristup koji se temelji na ideji prolijeka također predstavlja potencijalni mehanizam djelovanja derivata *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a pripravljenih u okviru ove doktorske disertacije.

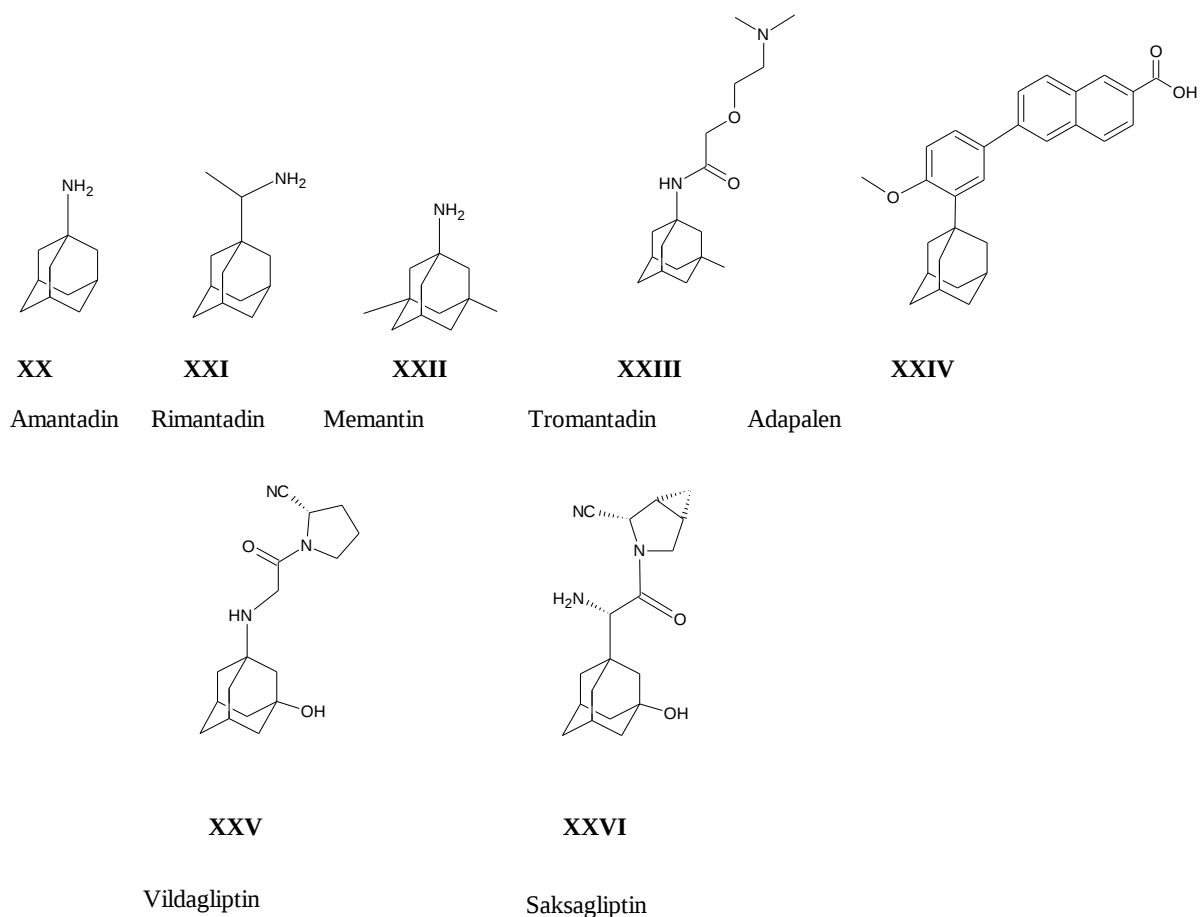
Shema 8. Prikaz koncepta djelovanja prolijeka⁹⁸

2.4.3. Adamantan

Adamantan (slika 14, a)) je policiklička, organska molekula građena od tri spojena cikloheksanska prstena. Log P vrijednost adamantana iznosi 4,22⁹⁹ što znači da se log P vrijednost spoja s velikom topljivošću u vodi ($\log P \ll 0$) može povećati uvođenjem adamantilne podjedinice u njezinu strukturu. Osim log P vrijednosti, adamantilna podjedinica pogodna je za strukturu modifikaciju potencijalnih biološki aktivnih spojeva i zbog strukturnih karakteristika, prije svega voluminoznosti. Modifikacijom spoja s adamantanom moguće je smanjiti intramolekulske interakcije i spriječiti pristup hidrolitičkih enzima čime se povećava stabilnost lijeka.¹¹

Literaturno je poznato da uvođenje adamantilne podjedinice u strukturu nekog potencijalno biološki aktivnog spoja može povoljno utjecati na njegov biološki učinak. Tako se spojevi koji sadrže adamantilnu podjedinicu u svojoj strukturi koriste u liječenju neurodegenerativnih bolesti,^{100,101} dok neki posjeduju antiviralnu¹⁰² i antitumorsku aktivnost.^{12,103} Liu i sur.¹¹ navode sedam spojeva u kliničkoj upotrebi koji posjeduju adamantan u svojoj strukturi (slika 15).

Spojevi **XX** i **XXI** su antiviralni agensi, spoj **XXII** koristi se za ublažavanje simptoma Alzheimerove bolesti, spoj **XXIII** koristi se za liječenje herpesa, spoj **XXIV** za liječenje dermatoloških poremećaja dok se spojevi **XXV** i **XXVI** koriste za liječenje dijabetesa tipa 2.¹¹



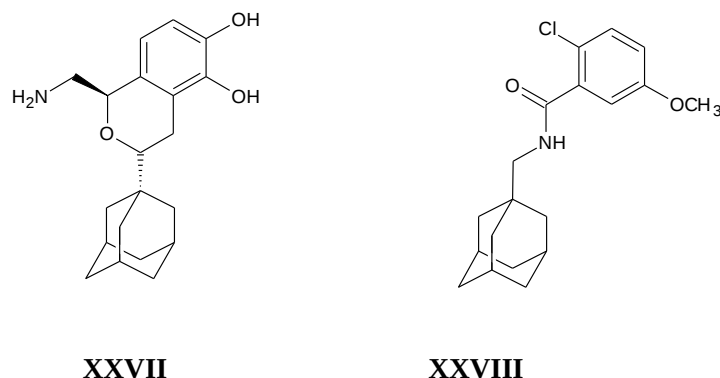
Slika 15. Strukturne formule molekula spojeva s adamantanom u strukturi koji su u kliničkoj upotrebi¹¹

2.4.3.1. Neuroaktivni i infektivni agensi s adamantanom u strukturi

Amantadin (slika 15, **XX**) prvotno je dizajniran kao antiviralni agens za liječenje gripe tipa A, no ubrzo se pokazalo kako opisani spoj olakšava simptome kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti te ima potencijal i u liječenju hepatitisa.¹⁰⁴ U slučaju liječenja gripe A spoj **XX** djeluje blokiranjem M2 proteina u istoimenom kanalu što sprječava endosomalni prihvrat protona i narušava kiselost medija potrebnu za uklanjanje kapside, proteinskog omotača virusa (engl. *virus uncoating*). Spoj **XX** blokira otvaranje M2 kanala disperzijskim silama. U slučaju Parkinsonove bolesti, spoj **XX** izravno djeluje na D2 receptor dopamina što rezultira povećanjem otpuštanja dopamina.^{100,101}

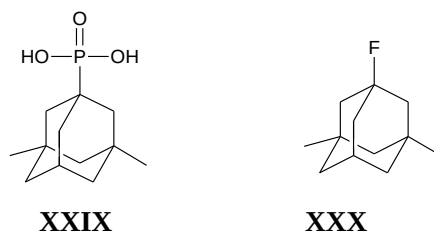
Memantin (**XXII**, slika 15) je nekompetitivni antagonist *N*-metil-D-aspartatnog receptora (engl. *N-Methyl-D-Aspartate Receptor*, NMDA), a koristi se za ublažavanje simptoma Alzheimerove bolesti.¹⁰ Rimantadin (**XXI**, slika 15) se također koristi za liječenje gripe A, a u usporedbi sa spojem **XX** pokazuje puno bolju oralnu aktivnost, uzrokuje manje nuspojave te se dobro apsorbira u gastrointestinalnom traktu. U ljudskoj plazmi vrijeme poluživota spoja **XXI** iznosi 24-36 h.^{105,106} Koncentracije spojeva koje daju polovicu maksimalnog odziva,¹⁰⁷ odnosno EC_{50} vrijednosti, za spojeve **XX** i **XXI** iznose $1,98 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i $0,362 \mu\text{mol dm}^{-3}$, dok je minimalna citotoksična koncentracija za oba spoja $>100 \mu\text{mol dm}^{-3}$.¹⁰⁸ Iako opisani spojevi imaju karakteristike spojeva koji se mogu koristiti kao lijekovi, poput dobre oralne aktivnosti i niske toksičnosti, spoj **XX** uzrokuje nuspojave u središnjem živčanom sustavu.¹⁰⁹ Tromantadin (**XXIII**, slika 15) je derivat amantadina (**XX**) koji se koristi za liječenje herpesa, ali nije aktivan u liječenju gripe A.¹¹⁰ Naftolni derivat adapalen (**XXIV**, slika 15) u kombinaciji s vodikovim peroksidom koristi se za liječenje akni.¹¹¹

Biološki učinci kao i nedostaci spoja **XX** potaknuli su brojna istraživanja koja su bila usmjerena na dizajn novih neuroaktivnih agenasa. Derivat izokromana s adamantanom u svojoj strukturi (**XXVII**, slika 16) je oralno aktivan agonist D_1 receptora dopamina koji ima potencijal u liječenju Parkinsonove bolesti.¹⁰⁴ Spoj **XXVII** pokazao je povećanje lokomotorne aktivnosti u slučaju pokusa provedenih na štakorima te smanjenje i ublažavanje nekih simptoma Parkinsonove bolesti. Međutim, štakori kojima su davane ponavljajuće doze spoja **XXVII** razvili su toleranciju prema navedenom spoju, što je uzrokovalo prekid daljnjeg istraživanja. Receptor P2X7 je ATP aktivirani ionski kanal koji je postao ciljani receptor (engl. *target*) za upalne bolesti, neurodegenerativne bolesti ili analgeziju (odsutnost bola bez gubitka svijesti).¹¹² Dizajn antagonista P2X7 receptora doveo je do priprave spoja **XXVIII** (slika 16), adamantilnog derivata benzamida, koji je u provedenim istraživanjima pokazao aktivnost pri nanomolarnim koncentracijama.¹¹³



Slika 16. Strukturne formule molekula spojeva **XXVII**¹⁰⁴ i **XXVIII**¹¹³ - neuroaktivnih agenasa s adamantanom u strukturi

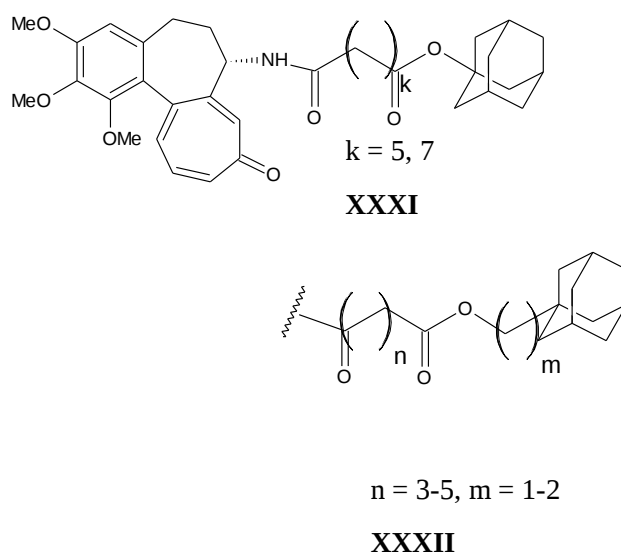
Dembitsky i sur.¹¹⁴ proveli su opsežne SAR studije, pri čemu je u obzir uzeto 75 prirodnih i sintetskih derivata adamantana. Istraživanja odnosa strukture i aktivnosti provedena su s ciljem predviđanja bioloških aktivnosti sintetskih i prirodnih derivata adamantana pri čemu je upotrijebljen program PASS (engl. *Prediction of Activity Spectra for Substances*, PASS). Istraživanje je uključivalo komparativnu farmakološku analizu baze od 75 spojeva s ciljem pronalaženja spoja koji će se koristiti za prevenciju i liječenje demencije, Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti i ostalih neurodegenerativnih poremećaja. Neki od spojeva uključenih u SAR studiju trenutno se koriste za liječenje spomenutih neurodegenerativnih poremećaja. Rezultati provedenog istraživanja pokazali su kako prirodni derivati adamantana pokazuju veći potencijal u liječenju raka nego u liječenju neurodegenerativnih bolesti. S druge strane, sintetski derivati adamantana pokazali su veći farmakološki potencijal u liječenju neurodegenerativnih bolesti, poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, od potencijala spojeva koji su u kliničkoj upotrebi, amantadina i memantina. Riječ je o derivatu adamantana i 1-fosfonske kiseline (**XXIX**) te o fluoriranom derivatu adamantana (**XXX**) (slika 17).



Slika 17. Strukturne formule molekula spojeva s adamantanom u strukturi s potencijalnom neurodegenerativnom aktivnošću¹¹⁴

2.4.3.2. Antitumorska aktivnost adamantilnih derivata

Zefirov i sur.¹² pripravili su seriju derivata kolhicina i adamantana s ciljem ispitivanja njihovog antitumorskog djelovanja. Navedene dvije strukturne podjedinice spojene su poveznicom koja sadrži esterske i metilenske skupine. Pripravljeni spojevi strukturno su se razlikovali po broju ugljikovih atoma u alkilnoj poveznici pri čemu je konačni cilj istraživanja bio ispitati utjecaj položaja esterskih skupina u strukturi pripravljenih spojeva na njihovo djelovanje na stanice raka pluća (stanična linija A549). Na slici 18 prikazane su općenite strukturne formule spojeva **XXXI** i **XXXII**. Rezultati antitumorskog testiranja homologa **XXXI** koji se razlikuju duljinom alkilne poveznice (5 ili 7 ugljikovih atoma) pokazali su kako povećanje broja metilenskih skupina s 5 na 7 nije znatno utjecalo na citotoksičnost pripravljenih spojeva. S obzirom na takve rezultate pripravljeni su homologni spojevi **XXXII** u kojima je smanjena duljine alkilne poveznice između dvije esterske skupine (3-5) te je uvedena alkilna poveznica između esterske skupine i adamantilne podjedinice.



Slika 18. Strukturne formule molekula adamantilnih derivata s antitumorskim učinkom¹²

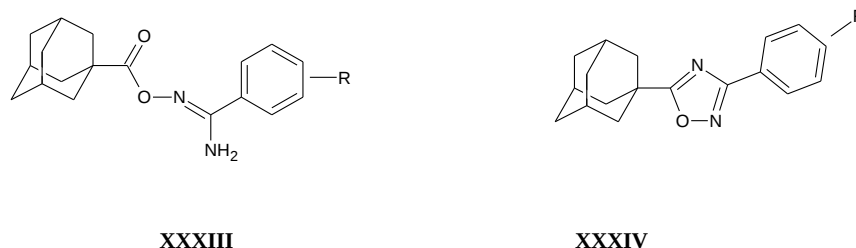
Rezultati antitumorskog testiranja pokazali su kako su svi homolozi **XXXII** pokazali citotoksičnost na humane stanice raka pluća A549 i snažno inhibirali njihovu proliferaciju. Antitumorska aktivnost pripravljenih homologa ispitana je pomoću testa MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid). Navedeni homolozi pokazali su vrijednosti EC_{50} u rasponu množinskih koncentracija od $5,9 \pm 0,2 \text{ nmol dm}^{-3}$ – $16 \pm 3 \text{ nmol dm}^{-3}$. Među

pripravljenim spojevima svojom EC_{50} vrijednošću istaknuli su se homolozi **XXXII** u kojima je $n = 3$, $m = 1$ ($EC_{50} = 5,9 \pm 0,2 \text{ nmol dm}^{-3}$) i $n = 3$, $m = 2$ ($EC_{50} = 8,5 \pm 1,5 \text{ nmol dm}^{-3}$).

Nakon tretiranja tumorskih stanica navedenim spojevima množinske koncentracije $c = 400 \text{ nmol dm}^{-3}$ u trajanju od 24 h svi konjugati uzrokovali su potpunu depolimerizaciju mikrotubula, dok su pri množinskoj koncentraciji $c = 800 \text{ nmol dm}^{-3}$ potaknuli formiranje tubulinskih klastera. Svi spojevi pri množinskoj koncentraciji $c = 800 \text{ nmol dm}^{-3}$ snažno su inhibirali stanični rast tumorske stanične linije A549 a opseg inhibicije je u korelaciji s rezultatima testa MTT. Svi homolozi **XXXII** uzrokovali su apoptozu stanica, no njihova sposobnost uzrokovanja apoptoze stanica nije u korelaciji s rezultatima testa MTT i aktivnošću u formiranju tubulinskih klastera. Uspoređene su biološke aktivnosti pripravljenih homologa spojeva **XXXI** i **XXXII** na način da su uspoređeni spojevi s istim brojem ugljikovih atoma u alkilnoj poveznici između dvije esterske skupine. Rezultati provedenog istraživanja pokazali su kako je biološka aktivnost takvih spojeva, izražena kao vrijednost EC_{50} , vrlo slična. Studija molekulskog modeliranja pokazala je kako kisikov atom esterske skupine u homologu **XXXI**, u kojemu je $k = 5$, može stvarati vodikovu vezu s fenolnom hidroksilnom skupinom $\alpha\text{Tyr 224}$ u tubulinu. U slučaju homologa **XXXII** u kojima je $m = 2$, $k = 3-5$, koji se razlikuju od homologa **XXXI** po tome što je u njihovoj strukturi esterska skupina udaljenija od adamantilne podjedinice, vodikova veza se ne formira.¹²

Aguiar i sur.¹³ pripremili su seriju novih adamantilnih derivata acilamidoksima (**XXXIII**, slika 19). Pripravljeni spojevi podvrgnuti su mikrovalnom zračenju s ciljem njihove ciklizacije u odgovarajuće adamantilne oksadiazolne derivate (**XXXIV**). Svim pripravljenim adamantilnim derivatima acilamidoksima kao i odgovarajućim oksadiazolnim adamantilnim derivatima ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost na šest tumorskih staničnih linija (K562-stanice kronične mijeloidne leukemije, HL-60-stanice ljudske promijelocitne leukemije, KG-1- stanice akutne mijeloidne leukemije, PC-3-humane stanice raka prostate, HCT-116-stanice raka debelog crijeva, SF295- humane stanice glioblastoma) kao i na normalnoj staničnoj liniji (L-929-stanice bubrega majmuna, Vero stanična linija). *In vitro* antiproliferativna aktivnost ispitana je pomoću već spomenutog testa MTT. U preliminarnim testiranjima svi pripravljeni derivati pokazali su dobru *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskim staničnim linijama K562 i HL-60. Rezultati testa MTT izraženi su pomoću vrijednosti IC_{50} (poglavlje 2.2.3.1.). Najveću aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji K562 pokazao je derivat spoja **XXXIII**, spoj **XXXIIIa** s vrijednosti $IC_{50} = 19,5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$. Svi derivati spoja **XXXIII**

pokazali su antitumorsku aktivnost na staničnoj liniji HL-60, u rasponu vrijednosti $IC_{50} = 8,61 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**XXXIIIb**) – $14,30 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**XXXIIIc**). U pravilu, svi derivati spoja **XXXIV** pokazali su slabije *in vitro* antiproliferativne aktivnosti u odnosu na derivate spoja **XXXIII**. Istaknuti spojevi pokazali su značajnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnosti na tumorske stanice leukemije i slabu aktivnost u inhibiciji rasta normalne stanične linije L-929. Ovakvi rezultati sugeriraju selektivnu aktivnost derivata *O*-acilamidoksima (**XXXIII**) na stanične linije leukemije K562 i HL-60 te mogu poslužiti kao prototip za manje agresivne lijekove u liječenju leukemije.



XXXIIIa; R=*p*-CF₃

R=H, *m*-Me, *m*-Br, *m*-NO₂, *p*-Me, *p*-OMe, *p*-CF₃, *p*-F, *p*-Cl, *p*-Br, *p*-NO₂

XXXIIIb; R=*p*-OMe

XXXIIIc; R=*m*-Me

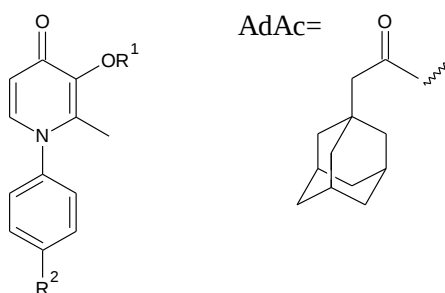
Slika 19. Adamantilni derivati acilamidoksima i oksadiazola s potencijalnom antitumorskom aktivnošću¹³

U prethodnim istraživanjima¹¹⁵ pokazano je kako diazoli interferiraju u staničnom ciklusu tumorskih stanica uzrokujući zaustavljanje G1 faze čime se onemogućava replikacija DNA u S-fazi. Prema tome, istraživanja koja su proveli Aguiar i sur.¹³ daju smjernice za bolje razumijevanje mehanizma djelovanja pripremljenih spojeva, naročito derivata *O*-acilamidoksima (**XXXIII**).

2.4.3.2.1. Antitumorska aktivnost adamantilnih derivata supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a

U prethodnim istraživanjima provedenim na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a⁹ odabrani *para*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP-i strukturno su modificirani u svrhu ispitivanja njihove biološke aktivnosti s posebnim naglaskom na antitumorsku aktivnost. Reakcijom maltola (3-hidroksi-2-metilpiran-4-on) i *para*-supstituiranih anilinskih derivata (R = OH, NH₂, NO₂, CH₃, OCH₃) pripravljena je serija *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a. Antiproliferativna aktivnost pripremljenih *N*-aril-3,4-HP-a ispitana je na četiri tumorske stanične linije (HCT-116- stanice karcinoma debelog crijeva, H460-stanice raka pluća, MCF-

7-stanice raka dojke i K562- stanice kronične mijeloidne leukemije) kao i na normalnoj staničnoj liniji (stanice bubrega psa, engl. *Madin Darby Canine Kidney*, MDCK). Svi pripremljeni *para*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP-i pokazali su umjerenu antiproliferativnu aktivnost na prethodno spomenute stanične linije. Nadalje, u strukturu osnovnog piridinonskog skeleta uspješno je uvedena adamantilna podjedinica (ili podjedinice) s ciljem ispitivanja učinka porasta lipofilnosti spoja na promjenu biološke aktivnosti u usporedbi s osnovnim 3,4-HP derivatima. Derivati 3,4-HP-a koji u svojoj strukturi u *para* položaju arilnog dijela imaju vezanu skupinu OH i NH₂ posjeduju dodatno mjesto za uvođenje adamantilne podjedinice. Iz navedenih 3,4-HP derivata pripremljeni su esterski, diesterski, amidni te estersko-amidni adamantilni derivati 3,4-HP-a u svrhu ispitivanja utjecaja položaja adamantilne podjedinice i vrste kemijske veze na antitumorsku aktivnost. Svim pripremljenim adamantilnim derivatima 3,4-HP-a ispitan je *in vitro* antiproliferativni učinak na iste četiri tumorske stanične linije (HCT 116, H-460, MCF-7 i K-562) te na normalnoj staničnoj liniji MDCK. Rezultati istraživanja pokazali su da adamantilni derivati 3,4-HP-a u pravilu pokazuju bolji antiproliferativni učinak u usporedbi s osnovnim 3,4-HP derivatima te da položaj vezanja adamantilne podjedinice na 3,4-HP-e ima utjecaj na antiproliferativnu aktivnost. Diesterski derivat (**XXXV d**) i estersko-amidni derivat (**XXXVa**) te njihovi monoadamantilni analozi (**XXXV b** i **XXXVc**) izdvojeni su kao spojevi s najvećom aktivnošću (IC₅₀ = 0,3 - 7 μmol dm⁻³) (slika 20).⁹



XXXV a-d

a; R¹=AdAc, R²=NHAdAc

b; R¹=H, R²=NHAdAc

c; R¹=H, R²=OAdAc

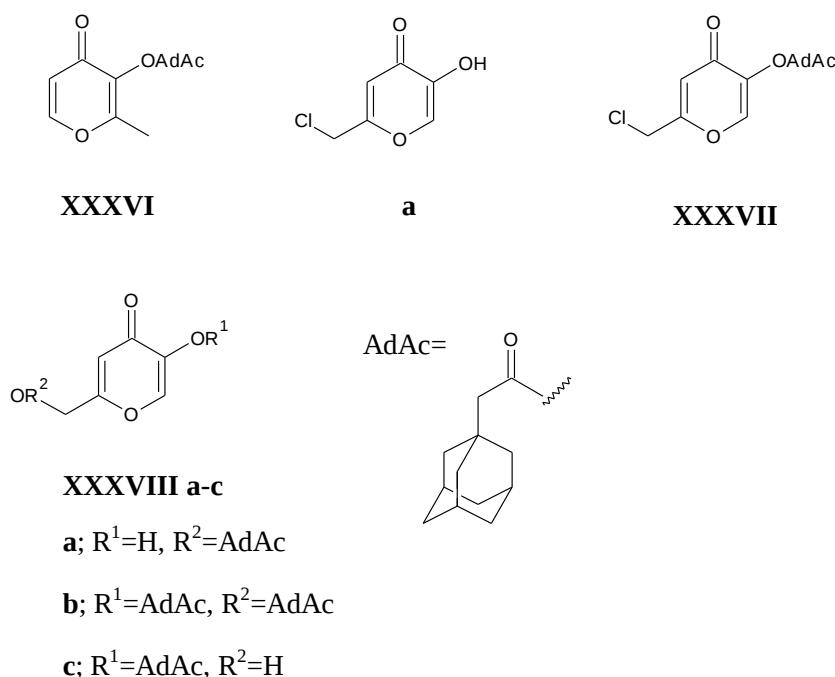
d; R¹=OAdAc, R²=OAdAc

Slika 20. Strukturne formule molekula literaturno opisanih adamantilnih derivata 3,4-HP-a s *in vitro* antiproliferativnom aktivnošću⁹

2.4.3.2.2. Antitumorska aktivnost adamantilnih derivata 3-hidroksipiran-4-ona

Kao polazni materijali za pripravu hidroksipiridin-4-ona uobičajno se koriste komercijalno dostupni hidroksipiran-4-oni, poput maltola ili kojične kiseline (poglavlje 2.3.).⁷ U istraživanjima opisanim u prethodnom poglavlju koja su provedena na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a kao polazni spoj za pripravu 3,4-HP korišten je maltol (3-hidroksi-2-metilpiran-4-on).⁹ Kojična kiselina (2-hidroksimetil-5-hidroksipiran-4-on) kemijski se modificira slično maltolu, te može poslužiti kao polazni spoj za pripravu novih derivata 3,4-HP-a. Oba spoja posjeduju afinitet prema ionima metala zbog čega se mogu koristiti kao kelirajući ligandi.⁷ Derivat kojične kiseline, klorkojična kiselina (5-hidroksi-2-klormetil-hidroksipiran-4-on), pokazuje antibakterijsku, antifungalnu te antiviralnu aktivnost. Osim toga literaturno je poznata i značajna antimikrobna i antiviralna aktivnost Mannichovih baza klorkojične kiseline i njezinih derivata s piperazinom.¹¹⁶ Iz navedenih razloga istraživanja su proširena i na same piranonske sustave poput maltola, kojične kiseline i klorkojične kiseline te njihove adamantilne derivate.⁸ Pripravljene su monoadamantilni derivati maltola i kojične kiseline, diadamantilni derivat kojične kiseline te klorkojična kiselina i njezin adamantilni derivat. Antiproliferativna aktivnost pripremljenih derivata ispitana je na četiri tumorske stanične linije: K562-*stanice* kronične mijeloidne leukemije, HeLa- *stanice* raka grlića maternice, Caco-2- *stanična* linija kolorektalnog karcinoma i NCI-H358-*stanice* bronhioalveolarnog karcinoma i na normalnoj staničnoj liniji MDCK.

Rezultati provedenog testiranja pokazali su kako položaj adamantilne podjedinice kao i prisutnost atoma klora u strukturi 3-hidroksipiran-4-ona znatno utječu na njihovu antitumorsku aktivnost. Adamantilni derivat maltola (**XXXVI**) i monoadamantilni derivat kojične kiseline, u kojemu je adamantilna podjedinica vezana na hidroksilnu skupinu na položaju 5 hidroksipiran-4-ona (**XXXVIIIc**), pokazali su selektivnu aktivnost na K562 tumorsku staničnu liniju. Diadamantilni derivat kojične kiseline (**XXXVIIIb**), monoadamantilni derivat kojične kiseline u kojemu je adamantilna podjedinica vezana na hidroksimetilnu skupinu (**XXXVIIIa**) kao i klorkojična kiselina i njezin adamantilni derivat (**XXXVII**) pokazali su umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost s IC₅₀ vrijednostima u rasponu od 13,1 – 43 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ na svim staničnim linijama (slika 21).⁸



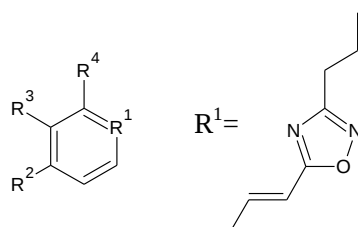
Slika 21. Strukturne formule molekula adamantilnih derivata hidroksipiran-4-ona s potencijalnim antitumorskim djelovanjem i klorkojične kiseline (**a**)⁸

2.4.4. Biološka aktivnost derivata cimetne kiseline

Cimetna kiselina ((*2E*)-3-fenilprop-2-enska kiselina, slika 14, b)) nezasićena je aromatska kiselina čiji derivati pokazuju različitu biološku aktivnost.¹⁴ U značajnim količinama prisutna je u vrstama roda *Cinnamomum cassia* i *Panax ginseng*, voću, povrću i medu.¹¹⁷ Postoji u obliku dva stereoizomera, *E* ili *Z*, pri čemu je u prirodi više zastupljen *E* izomer.^{118,119} Cimetna kiselina i njezini derivati pokazuju široki spektar bioloških aktivnosti poput antioksidativne^{120,121}, antimikrobne^{120,122,123}, antifungalne¹²⁴ i antitumorske aktivnosti^{125,126} te neuroprotektivna^{127,128}, protuupalna i antidiabetska svojstva.¹²⁹ Od navedenih bioloških aktivnosti u ovome poglavlju opisane su i izdvojene antimikrobna, antitumorska i neurodegenerativna aktivnost. Također, sastojak je deterdženata, parfema i ostalih kozmetičkih proizvoda.¹¹⁸

Cimetna kiselina može se izolirati iz brojnih prirodnih proizvoda, a od sintetskih postupaka spomenimo enzimatsku deaminaciju fenilalanina.¹³⁰ Ključni je međuprodukt u biosintezi važnih spojeva poput primjerice stirena i stilbena.¹³¹ Prisutnost benzenskog prstena i akrilne skupine u strukturi cimetne kiseline čine ju podložnom sintetskim modifikacijama što rezultira pripravom velikog broja njezinih derivata¹³², čija biološka aktivnost ovisi o prirodi i položaju supstituenta u njihovoj strukturi.¹³³

Atmaram Upare i sur.¹²² pripravili su seriju derivata cimetne kiseline u kojima je karboksilna skupina zamijenjena s 1,2,4-oksadiazolnom skupinom, dok su na fenilni prsten uvedeni različiti supstituenti što je rezultiralo pripremom serije novih stiril-oksadiazola (XXXIX a-n, slika 22). Pripravljenim spojevima ispitana je antituberkulozna aktivnost na soj H37Ra bakterije *Mycobacterium tuberculosis*. Najbolju antituberkuloznu aktivnost pokazali su spojevi s atomom halogena na *para*-položaju aromatskog prstena (slika 22). Usporedbom aktivnosti spoja s atomom fluora u *para* položaju fenilnog prstena ($IC_{50} = 0,36 \mu g mL^{-1}$) sa spojevima koji posjeduju atom klora u *ortho*- ($IC_{50} = 9,91 \mu g mL^{-1}$) i *para*-položaju ($IC_{50} = 4,54 \mu g mL^{-1}$) može se zaključiti kako su za aktivnost bitni i položaj i vrsta atoma halogena.¹²²



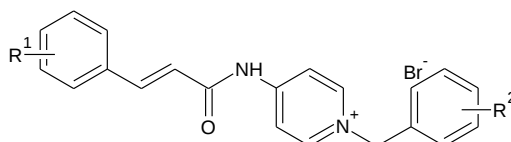
XXXIX a-n

a; $R^2, R^3, R^4=H$	h; $R^2=F, R^3, R^4=H$
b; $R^2=CH_3, R^3, R^4=H$	i; $R^2=Br, R^3, R^4=H$
c; $R^2=OCH_3, R^3=R^4=H$	j; $R^2=CN, R^3, R^4=H$
d; $R^2=SCH_3, R^3=R^4=H$	k; $R^2=F, R^3, R^4=H$
e; $R^2=Cl, R^3=R^4=H$	l; $R^2=COOH, R^3, R^4=H$
f; $R^2=R^3=H, R^4=Cl$	m; $R^2, R^3=H, R^4=NO_2$
g; $R^2, R^3=Cl, R^4=H$	n; $R^2=OCH_3, R^3=H, R^4=OCH_3$

Slika 22. Strukturne formule derivata cimetne kiseline s antimikrobnom aktivnošću¹²²

Lan i sur.¹²⁷ pripravili su *N*-benzilpiridinijeve soli cimetne kiseline u svrhu ispitivanja njihove aktivnosti u inhibiciji kolinesteraze s ciljem liječenja Alzheimerove bolesti (slika 23). Pripravljenim spojevima ispitana je aktivnost u inhibiciji acetilkolinesteraze (AChE) i butilkolinesteraze (BuChE), pri čemu su pripremljeni spojevi pokazali selektivnost u inhibiciji BuChE u odnosu na AChE. Spoj **XLI** pokazao je aktivnost u inhibiciji AChE s $IC_{50} = 12,1 \text{ nmol dm}^{-3}$ dok je spoj **XLn** pokazao najveću aktivnost u inhibiciji BuChE ($IC_{50} = 1,9 \text{ nmol dm}^{-3}$).

Cimetna kiselina pokazala je vrlo nisku aktivnost u inhibiciji oba enzima s $IC_{50} > 100 \text{ nmol dm}^{-3}$ na temelju čega se da zaključiti kako je prisutnost *N*-benzilpiridinijeve podjedinice ključna za aktivnost pripremljenih spojeva u inhibiciji kolinesteraza. Spoj **XLl** izdvojen je kao najaktivniji spoj s najboljim inhibitornim aktivnostima u slučaju oba enzima s $IC_{50} = 2,6 \text{ nmol dm}^{-3}$ u inhibiciji BuChE i $IC_{50} = 12,1 \text{ nmol dm}^{-3}$ u inhibiciji AChE.¹²⁷

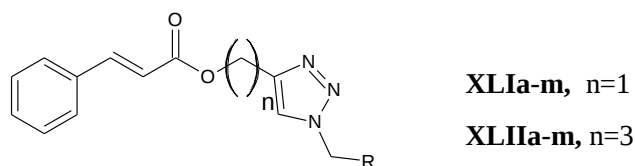


XL

a; $R^1=R^2=H$ f; $R^1=H, R^2=m\text{-}Br$ k; $R^1=3,4\text{-di-OCH}_3, R^2=m\text{-}F$ b; $R^1=H, R^2=m\text{-}CH_3$ g; $R^1=H, R^2=p\text{-}Br$ l; $R^1=3,4\text{-di-OCH}_3, R^2=p\text{-}F$ c; $R^1=H, R^2=p\text{-}CH_3$ h; $R^1=3,4\text{-di-OCH}_3, R^2=H$ m; $R^1=3,4\text{-di-OCH}_3, R^2=m\text{-}Br$ d; $R^1=H, R^2=m\text{-}F$ i; $R^1=3,4\text{-di-OCH}_3, R^2=m\text{-}CH_3$ n; $R^1=3,4\text{-di-OCH}_3, R^2=p\text{-}Br$ e; $R^1=H, R^2=p\text{-}F$ j; $R^1=3,4\text{-di-OCH}_3, R^2=p\text{-}CH_3$

Slika 23. Strukturne formule derivata cimetne kiseline
s antineurodegenerativnom aktivnošću¹²⁷

Lima i sur.¹²⁶ pripravili su derivate cimetne kiseline, spojeve **XLIIa-m** i **XLIIa-m**, koji u svojoj strukturi posjeduju i 1,2,3-triazolnu podjedinicu s ciljem ispitivanja antimetastazne aktivnosti (slika 24). Spoj **XLIIa** pokazao je najznačajniju aktivnost u supresiji migracije stanica mišjeg melanoma (B16-F10) uz aktivnost od 86 % te pokazao i aktivnost u smanjenju proliferacije navedene stanične linije. Tretiranje stanične linije B16-F10 sa spojem **XLIIa** rezultiralo je smanjenjem njezine invazije (sposobnost stanica da migriraju kroz izvanstanični matriks i prodiru u tkiva)¹³⁴ i adhezije (prianjanje stanice jedne na drugu)¹³⁵ čime je potvrđena antimetastazna aktivnost derivata cimetne kiseline u slučaju djelovanja na stanice raka debelog crijeva i stanice raka pluća.¹³⁶



a ; R=Ph	e ; R=4-BrPh	i ; R=4-OCF ₃ Ph
b ; R=2,5-Cl ₂ Ph	f ; R=4-ClPh	j ; R=4-CF ₃ Ph
c ; R=4-IPh	g ; R=3,4-F ₂ Ph	k ; R=4-OCH ₃ Ph
d ; R=4-NO ₂ Ph	h ; R=4-FPh	l ; R=2,4,6-Cl ₃ Ph
	m ; R=2-BrPh	

Slika 24. Strukturne formule derivati cimetne kiseline s antitumorskom aktivnošću¹²⁶

Studije predviđanja molekulskog vezivanja upućuju na činjenicu da inhibitorna aktivnost spoja **XLIIa** proizlazi iz njegove interakcije s enzimima koji su izravno uključeni u progresiju melanoma, matriks-metaloproteinaze MMP-9 i MMP-2.¹³⁷ Heteroatomi u strukturi spoja **XLIIa** imaju sposobnost stvaranja vodikovih veza s proteinima pri čemu inhibiraju dva spomenuta enzima.¹²⁶

2.5. *In vitro* testovi i tehnike za određivanje antitumorske aktivnosti

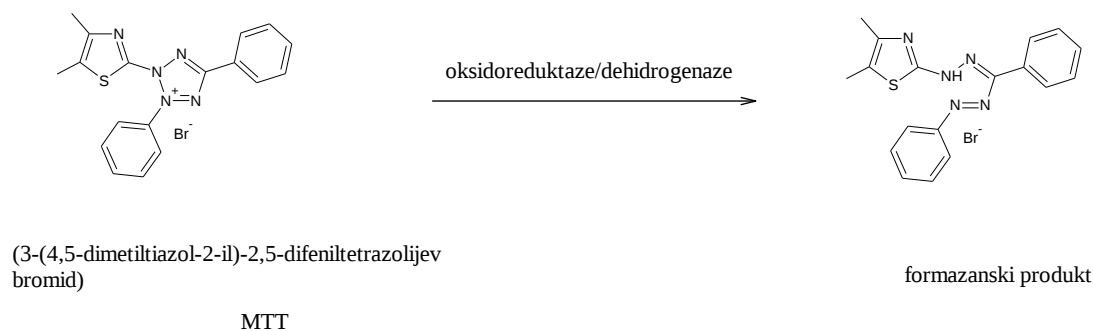
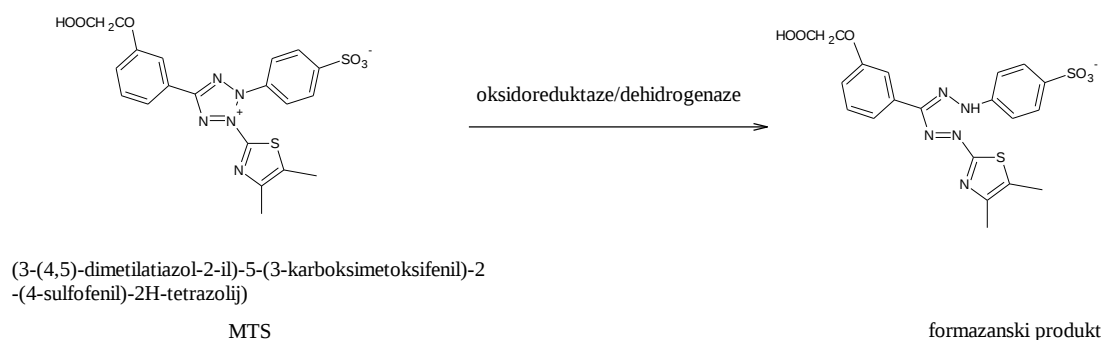
Danas je poznat veliki broj *in vitro* testova i tehnika za određivanje antitumorske aktivnosti spojeva koji se provode izvan živih organizama u kontroliranim uvjetima.¹³⁸ Spomenimo neke od njih: testovi za određivanje vijabilnosti stanica (temeljeni na staničnim enzimima i proteinima, sintezi DNA, staničnom ATP-u, integritetu staničnih membrana i impedanciji), apoptoze, migracije i invazije stanica, zatim testovi kojima se određuju antioksidativni markeri i markeri za oksidativni stres, testovi koji se temelje na tehnikama za detekciju genetskih mutacija i kromosomskih nepravilnosti, na tehnikama analize genske i proteinske ekspresije i drugi.^{139,140} Svi spomenuti *in vitro* testovi pokazuju ograničenja u svojoj primjeni, pa prvi korak u ispitivanju antitumorske aktivnosti predstavlja odabir najpogodnijeg testa, odnosno tehnike koja će se koristiti za biološku evaluaciju potencijalnog antitumorskog agensa.^{141,142}

2.5.1. In vitro stanični testovi temeljeni na staničnim enzimima i proteinima

Najznačajnije svojstvo tumorske stanice jest njezina nekontrolirana proliferacija.¹⁴³

In vitro stanični testovi koriste se za ispitivanje citotoksičnog/antiproliferativnog učinka odabranog spoja, pri čemu se kao potencijalni spojevi za testiranje mogu koristiti organski ekstrakti izolirani iz prirodnih izvora, nano-lijekovi, peptidi, inhibitorne RNA sekvence, različiti sintetizirani spojevi, lijekovi i hormoni koji pokazuju antiproliferativni učinak prema tumorskim stanicama. Većina dostupnih antiproliferativnih testova temeljeni su na aktivnosti staničnih enzima, sintezi DNA, razini staničnog ATP-a i integritetu membrane pri čemu navedeni faktori djeluju kao indikatori živih i mrtvih stanica.^{144,145} Veliki broj kolorimetrijskih antiproliferativnih testova temelji se na konverziji supstrata u obojeni produkt djelovanjem unutarstaničnih enzima koji su prisutni u živim stanicama pri čemu je intenzitet obojenja proporcionalan broju živih stanica.¹⁴¹

Jedan od najčešće korištenih testova za određivanje antiproliferativne aktivnosti odabranog spoja je MTT test koji se koristi kao početni test u procesu dizajna i razvoja potencijalnog antitumorskog agensa (shema 9). Uz pomoć enzima, NAD(P)H-ovisnih oksidoreduktaza ili dehidrogenaza u živim stanicama, MTT se reducira u ljubičasto obojeni formazan kojega je potrebno otopiti za spektrofotometrijske analize.^{146,147} Osim MTT tetrazolijevog spoja često korišteni su i drugi tetrazolijevi spojevi poput MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) (shema 10), XTT (2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolij-5-karboksanilid) i WST (kombinacija različitih reagenasa). Navedeni spojevi također mogu generirati formazan enzimskom redukcijom s oksidoreduktazama ili dehidrogenazama, no razlikuju se s obzirom na test MTT po tome što je formazanski produkt nastao njihovom redukcijom topljiv u mediju za uzgoj stanica.¹⁴⁸ Osim toga, XTT, WST i MTS reagensi mogu se koristiti za određivanje vijabilnosti stanica pri čemu ne zahtijevaju površinu za prianjanje poput stanične kolonije ili matičnih tumorskih stanica.^{141,149}

Shema 9. Redukcija MTT u formazanski produkt¹⁴⁶Shema 10. Redukcija MTS u formazanski produkt¹⁴⁸

Resazurin je nefluorescentna komponenta alamar Blue reagensa, koja može ući u žive stanice.¹⁵⁰ Nakon ulaska resazurina u stanice, dolazi do njegove konverzije u resorufin djelovanjem NADH, NAD (P) H ili FADH₂-ovisnih staničnih oksidoreduktaza.¹⁵¹ Kalcein AM je druga nefluorescentna komponenta koja se po ulasku u stanice djelovanjem unutarstaničnih esteraza prevodi u zeleni fluorescentni kalcein.¹⁵² Kalcein ljubičasto AM, kalcein crvenonarančasto, Oregon zeleno 488 i 5-CFDA-AM ostali su primjeri boja koje se koriste za praćenje vijabilnosti stanica, a podložne su djelovanju esteraza u živim stanicama.¹⁵³ Test sulforodamin B (SRB) još je jedan kolorimetrijski test korišten za određivanje vijabilnosti tumorskih stanica. Boja SRB može se vezati za proteine u živim stanicama u blago kiselim uvjetima nakon čega se vezana boja solubilizira kako bi se izmjerila apsorbancija pri 500-540 nm.¹⁴¹ Test adenozintrifosfat (ATP) često je korišten test za određivanje vijabilnosti stanica.¹⁵⁴ Molekula ATP-a je nukleotid koji se sastoji od adenina, riboze i trifosfata. Aktivni oblik ATP-a obično je kompleks ATP-a s ionom Mg²⁺ ili ionom Mn²⁺. Slobodna energija dobivena oksidacijom hranjivih tvari i djelovanjem svjetla, prije nego se uloži u kretanje, aktivni prijenos i biosintezu, djelomično se transformira u poseban oblik molekule. Taj prijenosnik slobodne energije je ATP. Za prijenos energije molekulama ATP-a najvažniji je dio molekule koji sadrži trifosfat.

Kada tumorske stanice prolaze kroz apoptozu ili nekrozu tretiranjem s ispitivanim potencijalno biološki aktivnim spojem, smanjuje se količina ATP-a u stanicama. Količina ATP-a može se kvantificirati kolorimetrijskim, fluorometrijskim ili luminometrijskim metodama. Primjer takvog testa jest test CellTiter-Glo (Promega Corporation, Madison, WI) kojim se određuje količina staničnog ATP-a uz pomoć enzima luciferaze. Ovakav test je osjetljiviji i reproducibilniji u odnosu na konvencionalne testove za određivanje vijabilnosti stanica.¹⁴¹ Za određivanje vijabilnosti stanica može se koristiti i test propuštanja laktat-dehidrogenaze (engl. *Lactat Dehydrogenase*, LDH).¹⁵⁵ Laktat-dehidrogenaza je enzim koji katalizira redukciju piruvata u laktat uz NADH kao katalizator u procesu glikolize.⁹⁷ Nakon tretiranja stanica s ispitivanim spojem, u slučaju da spoj može oštetiti membranu, stanice otpuštaju LDH u stanični medij, a otpuštena LDH može se kvantificirati kolorimetrijskim ili fluorometrijskim metodama.¹⁴¹ Jedan od testova za određivanje integriteta membrana stanica podrazumijeva i mjerenje adenilat-kinaze (engl. *Adenylate Kinase*, AK) u mediju. Adenozin-monofosfat (AMP), adenozin-difosfat (ADP) i adenozin-trifosfat (ATP) međusobno se razmjenjuju pomoću enzima adenilat-kinaza (Jednadžba (i)). Konstante ravnoteže tih reakcija približno su 1.⁹⁷ Prema tome, jedino kod stanica s oštećenom membranom adenilat-kinaza može izlaziti u medij.



Jednadžba (i). Aktivnost adenilat-kinaze

U istraživanju provedenom u okviru ove doktorske disertacije za ispitivanje *in vitro* antiproliferativne aktivnosti pripremljenih spojeva korišten je MTS test. Na temelju rezultata MTS testa nekoliko kandidata izdvojeno je za dva dodatna testa koja su podrazumijevala mjerenje količine ATP-a u stanicama te određivanje integriteta stanične membrane mjerenjem količine adenilat-kinaze u mediju, što je opisano u ovome poglavlju.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

U sintezama su korišteni komercijalno dostupni polazni spojevi, reagensi i otapala analitičke čistoće. Sve kemikalije i reagensi korišteni u sintezama naručeni su od tvrtki *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Merck*, *Lach-Ner* i *Acros Organics*. Sva korištena otapala pročišćavana su i sušena prema uobičajenim postupcima.¹⁵⁶ Za praćenje tijeka reakcije, kontrolu čistoće spojeva i preliminarnu identifikaciju produkata korištena je tankoslojna kromatografija na pločicama silikagela (60 F 254, 0,25 mm, *Fluka*). Vizualizacija je provedena apsorbacijom UV zračenja (254 nm), reverzibilnom adicijom joda te prskanjem sumpornom kiselinom ili ninhidrinom uz naknadno zagrijavanje. Pripremljeni spojevi pročišćeni su kromatografijom na stupcu uz silikagel (0,063-0,2 mm) kao stacionarnu fazu ili prekristalizacijom iz odgovarajućeg otapala. Za kromatografiju na stupcu i tankoslojnu kromatografiju korištena su sljedeća otapala ili sustavi otapala:

Sustav otapala A: Etil-acetat/metanol, 5 : 1 (v/v)

Otapalo B: Etil-acetat

Sustav otapala C: Etil-acetat/metanol, 5 : 2 (v/v)

Sustav otapala D: Kloroform/acetonitril, 3 : 1 (v/v).

Otapala su uparavana na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak (*Büchi*).

Mikrovalne sinteze odabranih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a provedene su u uređaju Discover® SP (CEM).ⁱⁱ ¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na instrumentima *Bruker AV 600* na sobnoj temperaturi pri 600 MHz i 150 MHz i *Bruker Avance III HD* na sobnoj temperaturi pri 400 MHz i 100 MHz.

ⁱⁱ Nabava uređaja financirana je u okviru projekta CluK – Centar izvrsnosti u kemiji; infrastrukturni projekt Kemijskog odsjeka (KO) Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF)

Za snimanje ^1H i ^{13}C NMR spektara na navedenim instrumentima kao otapala korišteni su deuterirani dimetilsulfoksid ($\text{DMSO-}d_6$), deuterirani metanol (CD_3OD) i deuterirani kloroform (CDCl_3). Kemijski pomaci izraženi su prema tetrametilsilanu (TMS) kao unutarnjem standardu u ppm vrijednostima. Maseni spektri snimani su na spektrometru masa *Agilent 6410* uz tehniku ionizacije elektroraspršenjem (ESI). Maseni spektri visoke razlučivosti (engl. *High-Resolution Mass Spectra*, HRMS) snimani su na instrumentu 4800 Plus MALDI TOF/TOF analyzer, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA uz tehniku ionizacije: matricom potpomognuta laserska desorpcija i ionizacija (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization*, MALDI) te uz analizator vremena leta (engl. *Time Of Flight*, TOF) kao analizator masa.

Pripravljenim spojevima u okviru dogovorene suradnje (Fidelta d.o.o., Zagreb, dr.sc. Martina Bosnar) ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost pomoću MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) testa. *In vitro* antiproliferativna testiranja provedena su na pet tumorskih staničnih linija: HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva, MCF-7-stanice raka dojke, NCI-H460-stanice karcinoma pluća, PANC-1-stanice raka gušterače i THP-1-stanice akutne monocitne leukemije te na normalnoj staničnoj liniji NHLF-normalni humani plućni fibroblasti.

3.2. Priprava *meta-* i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (1-15)

3.2.1. Općeniti postupak pripreme *meta-* i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (1-15) u autoklavu

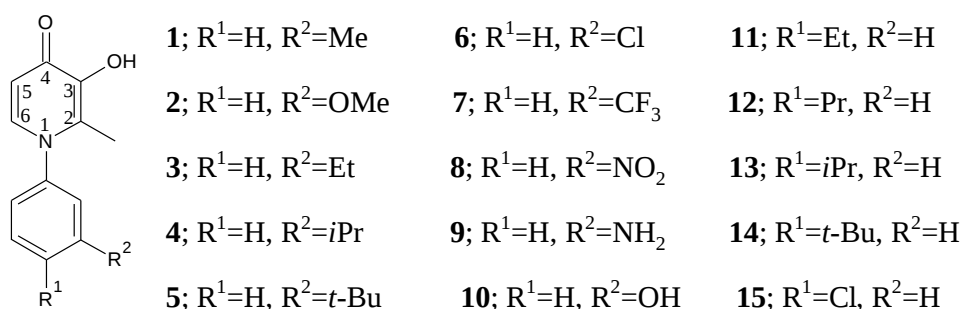
U staklenu cijev (autoklav) dodani su maltol (1 g, 7,9 mmol), odgovarajući *meta-* ili *para*-supstituirani anilin (7,9 mmol), *para*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH, 150 mg, 0,8 mmol) i voda (20 mL) (tablica 2). Priprava spojeva **2**, **8** i **9** ponovljena je prema literaturno opisanom postupku.¹⁵⁷ *Meta-* i *para*-supstituirani anilinski derivat dodan je u količinama navedenim u tablici 2. Staklena cijev prebačena je u metalni nosač te grijana 48 h na temperaturi od 150 °C. Izolacija dobivenih produkata provedena je korištenjem dvije metode:

- Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, reakcijska smjesa je filtrirana preko Büchnerovog lijevka. Hlađenjem matičnice dolazi do kristalizacije, a nastali kristali su odfiltrirani preko Büchnerovog lijevka.
- Vodena matičnica je oddekantirana te ekstrahirana s EtOAc. Dobiveni ostatak nakon uparavanja pročišćen je prekrizacijom iz vode.

Čistoća kristala i matičnice kontrolirana je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A) uz UV detekciju.

Tablica 2. Priprava *meta-i para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**1-15**)

Naziv derivata anilina	<i>m</i> / mg	<i>V</i> / μ L	<i>n</i> / mmol	Produkt	Metoda izolacije produkta	Prinos (%)
<i>m</i> -metilanilin	-	867	7,9	1	a	13
<i>m</i> -metoksianilin	-	888	7,9	2	a	33
<i>m</i> -etilanilin	-	986	7,9	3	b	22
<i>m</i> -izopropilanilin	-	1120	7,9	4	a	17
<i>m</i> -tert-butilanilin	-	1260	7,9	5	a	9
<i>m</i> -kloranilin	-	832	7,9	6	a	6
<i>m</i> -trifluometilanilin	-	992	7,9	7	b	12
<i>m</i> -nitroanilin	1100	-	7,9	8	a	13
<i>m</i> -fenilendiamin	857,6	-	7,9	9	a	4
<i>m</i> -hidroksianilin	900	-	7,9	10	a	65
<i>p</i> -etilanilin	-	986	7,93	11	a	9
<i>p</i> -propilanilin	-	1170	7,93	12	a	12
<i>p</i> -izopropilanilin	-	1040	7,93	13	a	6
<i>p</i> -tert-butilanilin	-	1260	7,93	14	a	u tragovima
<i>p</i> -kloranilin	1		7,93	15	a	u tragovima

Slika 25. Strukturne formule molekula spojeva **1-15****3-Hidroksi-2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on (1)**

Žuta krutina, spoj **1** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 217,9-218,7 °C; *R_f* = 0,68 (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm): 1,97 (s, 3H, CH₃), 2,38 (s, 3H, CH₃-Ar), 6,20 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-5), 7,24 (d, 1H, *J*=7,8 Hz, H-Ar), 7,27 (s, 1H, H-Ar), 7,35 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-Ar), 7,44 (t, 1H, *J*=7,7 Hz, H-Ar), 7,53 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-6).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13,25 (CH₃), 20,64 (CH₃-Ar), 110,71 (C-5), 123,88, 127,30, 129,30, 129,61 (4 CH-Ar), 128,50 (C-2), 137,75 (C-6), 139,41 (Ar C-CH₃), 141,48 (C-N), 144,94 (C-3), 169,88 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₃H₁₃NO₂: 215,2. Dobiveno *m/z* 216,2 [M+H]⁺.

HRMS: Izračunato za C₁₃H₁₃NO₂[M+H]⁺: 216,1025. Dobiveno 216,1023.

3-Hidroksi-2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on (2)

Žuta krutina, spoj **2** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 239,2-241,1 °C; *R_f* = 0,65 (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,99 (s, 3H, CH₃), 3,81 (s, 3H, OCH₃), 6,20 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-5), 7,54 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-6), 6,99-7,01 (m, 1H, H-Ar), 7,06 (s, 1H, H-Ar), 7,09-7,11 (m, 1H, H-Ar), 7,46 (t, 1H, *J*=8,0 Hz, H-Ar).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 13,16 (CH₃), 55,47 (OCH₃), 110,64 (C-5), 112,60 (CH-Ar), 114,91 (CH-Ar), 118,90 (CH-Ar), 128,47 (C-2), 130,28 (CH-Ar), 137,69 (C-6), 142,55 (C-N), 144,88 (C-3), 159,83 (Ar C-OCH₃), 169,51 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₃H₁₃NO₃: 231,2. Dobiveno *m/z* 232,1 [M+H]⁺.

1-(*m*-Etilfenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on (3)

Bijela krutina, spoj **3** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 162,3-163,1 °C; *R_f* = 0,58 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 1,29 (t, 3H, *J*=7,6 Hz, CH₃ Et), 2,14 (s, 3H, CH₃), 2,77 (q, 2H, *J*=7,6 Hz, CH₂ Et), 6,49 (d, 1H, *J*=7,2 Hz, H-5), 7,20-7,23 (m, 1H, H-Ar), 7,27-7,28 (m, 1H, H-Ar), 7,43-7,45 (m, 1H, H-Ar), 7,51 (t, 1H, *J*=7,7 Hz, H-Ar), 7,60 (d, 1H, *J*=7,2 Hz, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 12,35 (CH₃), 14,51 (CH₃ Et), 28,11 (CH₂ Et), 111,08 (C-5), 123,71, 125,86, 128,96, 129,54 (4 CH-Ar), 131,59 (C-2), 137,91 (C-6), 141,84 (C-3), 145,44 (Ar C-Et), 146,75 (C-N), 170,09 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₄H₁₅NO₂: 229,3. Dobiveno *m/z* 230,1 [M+H]⁺.

3-Hidroksi-1-(*m*-izopropilfenil)-2-metilpiridin-4-on (4)

Svijetložuta krutina, spoj **4** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 121,8-122,6 °C; *R_f* = 0,57 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 1,31 (d, 6H, *J*=6,9 Hz, H 2-*i*Pr), 2,13 (s, 3H, CH₃), 3,05 (sept, 1H, *J*=6,9 Hz, H 1-*i*Pr), 6,49 (d, 1H, *J*=7,2 Hz, H-5), 7,20-7,23 (m, 1H, H-Ar), 7,29 (t, 1H, *J*=2,0 Hz, H-Ar), 7,48 (dt, 1H, *J*=7,8, 1,3 Hz, H-Ar), 7,52 (t, 1H, *J*=7,5 Hz, H-Ar), 7,61 (d, 1H, *J*=7,2 Hz, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 12,40 (CH₃), 22,81 (C 2-*i*Pr), 33,85 (C 1-*i*Pr), 111,11 (C-5), 123,86, 124,54, 127,54, 129,61 (4 CH-Ar), 131,58 (C-2), 137,92 (C-6), 141,85 (C-3), 145,45 (C-N), 151,38 (Ar C-*i*Pr), 170,09 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₅H₁₇NO₂: 243,3. Dobiveno *m/z* 244,3 [M+H]⁺.

HRMS: Izračunato za C₁₅H₁₇NO₂ [M+H]⁺: 244,1338. Dobiveno 244,1344.

1-(*m*-tert-Butilfenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on (5)

Bijela krutina, spoj **5** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 193,2-194,0 °C; *R_f* = 0,35 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ / ppm: 1,31 (9H, 2-*t*Bu), 1,96 (s, 3H, CH₃), 6,21 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-5), 7,25 (dq, 1H, *J*=7,7, 1 Hz, H-Ar), 7,44 (t, 1H, *J*=1,9 Hz, H-Ar), 7,49 (t, 1H, *J*=7,8 Hz, H-Ar), 7,56 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-6), 7,54-7,57 (m, 1H, H-Ar).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO- *d*₆) δ / ppm: 13,81 (CH₃, 9 C 2-*t*Bu), 111,48 (C-5), 126,61 (CH-Ar), 127,79 (CH-Ar), 128,96 (C-2), 129,74 (CH-Ar), 131,63 (CH-Ar), 134,19 (C-3), 138,35 (C-6), 143,18 (C-N), 145,48 (Ar C-*t*Bu), 170,27 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{16}H_{19}NO_2$: 257,3. Dobiveno m/z 258,2 $[M+H]^+$.

HRMS: Izračunato za $C_{16}H_{19}NO_2$ $[M+H]^+$: 258,1494. Dobiveno 258,1487.

3-Hidroksi-2-metil-1-(*m*-klorfenil)piridin-4-on (6)

Bijela krutina, spoj **6** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 184,5-185,0 °C; R_f = 0,48 (sustav otapala A).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 1,98 (s, 3H, CH₃), 6,21 (d, 1H, J =7,3 Hz, H-5), 7,47 (dt, 1H, J =7,6, 1,9 Hz, H-Ar), 7,57-7,64 (m, 3H, 2H-Ar, 1H, J =7,3 Hz, H-6), 7,69 (t, 1H, J =1,9 Hz, H-Ar).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 13,88 (CH₃), 111,23 (C-5), 124,43 (CH-Ar), 124,51 (CH-Ar), 126,27 (CH-Ar), 129,16 (Ar C-Cl), 129,80 (CH-Ar), 138,42 (C-6), 141,99 (C-2), 145,55 (C-3), 153,19 (C-N), 170,06 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{12}H_{10}ClNO_2$: 235,7. Dobiveno m/z 236,1 $[M+H]^+$.

HRMS: Izračunato za $C_{12}H_{10}ClNO_2$ $[M+H]^+$: 236,0478. Dobiveno 236,0484.

3-Hidroksi-2-metil-1-[*m*-(trifluormetil)fenil]piridin-4-on (7)

Bijela krutina, spoj **7** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 169,7-170,6 °C; R_f = 0,52 (sustav otapala A).

1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 2,14 (s, 3H, CH₃), 6,51 (d, 1H, J =7,3 Hz, H-5), 7,65 (d, 1H, J =7,3 Hz, H-6), 7,73-7,75 (m, 1H, H-Ar), 7,81-7,87 (m, 2H, H-Ar), 7,92-7,94 (m, 1H, H-Ar).

^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 17,40 (CH₃), 116,38 (C-5), 127,102 (CH-Ar), 127,98 (C-2), 129,80 (CH-Ar), 130,02 (C-3), 135,79 (2 CH-Ar), 136,13, 136,78, 137,12, 137,45 (Ar C-CF₃), 142,88 (C-6), 147,29 (C-CF₃), 151,14 (C-N), 175,58 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{13}H_{10}F_3NO_2$: 269,2. Dobiveno m/z 270,2 $[M+H]^+$.

HRMS: Izračunato za $C_{13}H_{10}F_3NO_2$ $[M+H]^+$: 270,0742. Dobiveno 270,0739.

3-Hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on (8)

Žuta krutina, spoj **8** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 217,9-218,7 °C; R_f = 0,33 (sustav otapala A).

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 1,93 (s, 3H, CH₃), 6,25 (d, 1H, J =7,4 Hz, H-5), 7,64 (d, 1H, J =7,4 Hz, H-6), 7,83-7,88 (m, 1H, H-Ar), 7,98-8,00 (m, 1H, H-Ar), 8,38-8,40 (m, 2H, H-Ar).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 13,31 (CH₃), 111,16 (C-5), 122,42, 123,43, 130,91, 133,94 (4 CH, Ar), 128,43 (C-2), 137,81 (C-6), 142,08 (C-N), 144,96 (C-3), 148,16 (Ar C-NO₂), 169,88 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{12}H_{10}N_2O_4$: 246,2. Dobiveno m/z 247,2 $[M+H]^+$.

1-(*m*-Aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on (9)

Smeđa krutina, spoj **9** (slika 25, tablica 2); $R_f = 0,40$ (sustav otapala A).

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 1,99 (s, 3H, CH₃), 5,7 (s, 2H, *m*-NH₂), 6,19 (d, 1H, $J=7,3$ Hz, H-5), 6,49 (m, 2H, H-Ar), 6,71 (m, 1H, H-Ar), 7,16 (t, 1H, $J=7,9$ Hz, H-Ar), 7,52 (d, 1H, $J=7,3$ Hz, H-6).

^{13}C NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 13,65 (CH₃), 111,16 (C-5), 111,85, 113,85, 114,72, 125,96 (4 CH, Ar), 130,41 (C-2), 138,10 (C-6), 142,87 (C-N), 145,46 (C-3), 150,53 (Ar C-NH₂), 169,82 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{12}H_{12}N_2O_2$: 216,2. Dobiveno m/z 217,1 $[M+H]^+$.

3-Hidroksi-1-(*m*-hidroksifenil)-2-metilpiridin-4-on (10)

Smeđa krutina, spoj **10** (slika 25, tablica 2); $R_f = 0,44$ (sustav otapala A).

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 1,98 (s, 3H, CH₃), 6,19 (d, 1H, $J=7,3$ Hz, H-5), 6,75 (t, 1H, $J=2,0$ Hz, *m*-OH), 6,83 (dd, 2H, $J=1,0, 7,9$ Hz, H-Ar), 6,93 (dd, 1H, $J=1,5, 8,8$ Hz, H-Ar), 7,34 (t, 1H, $J=8,0$ Hz, H-Ar), 7,53 (d, 1H, $J=7,3$ Hz, H-6).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 13,18 (CH₃), 110,73 (C-5), 113,80, 116,11, 117,34, 130,38 (4 CH, Ar), 128,58 (C-2), 137,69 (C-6), 142,52 (C-N), 144,96 (C-3), 158,23 (Ar C-OH), 169,50 (C=O).

3-Hidroksi-2-metil-1-(*p*-etilfenil)piridin-4-on (11)

Smeđa krutina, spoj **11** (slika 25, tablica 2); $t.t. = 198,9-200,9$ °C; $R_f = 0,57$ (sustav otapala A).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ / ppm: 1,23 (t, 3H, $J=7,6$ Hz, CH₃Et), 1,91 (s, 3H, CH₃), 2,7 (q, 2H, $J=7,6$ Hz, CH₂Et), 6,2 (d, 1H, $J=7,3$ Hz, H-5), 7,35 (d, 2H, $J=8,5$ Hz, H-Ar), 7,39 (d, 2H, $J=8,5$ Hz, H-Ar), 7,53 (d, 2H, $J=7,3$ Hz, H-Ar).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ / ppm: 13,74 (CH₃), 15,84 (CH₃ Et), 28,18 (CH₂ Et), 111,29 (C-5), 127,29 (2 CH-Ar), 129,32 (C-2), 129,38 (2 CH-Ar), 138,46 (C-6), 139,89 (Ar C-Et), 145,31 (C-N), 145,50 (C-3), 170,04 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{14}H_{15}NO_2$: 229,3. Dobiveno m/z 230,2 $[M+H]^+$.

HRMS: Izračunato za $C_{14}H_{15}NO_2$ $[M+H]^+$: 230,1181. Dobiveno 230,1185.

3-Hidroksi-2-metil-1-(*p*-(propilfenil)piridin-4-on (12)

Bijela krutina, spoj **12** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 173,2-174,2 °C; *R_f* = 0,32 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ / ppm: 0,92 (t, 3H, *J*=7,3 Hz, H 3-Pr), 1,64 (sxt, 2H, *J*=7,3 Hz, H 2-Pr), 1,96 (s, 3H, CH₃), 2,64 (t, 2H, *J*=7,6 Hz, H 1-Pr), 6,20 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-5), 7,33-7,39 (m, 4H, H-Ar), 7,53 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 13,82 (2 C, CH₃, C 3-Pr), 24,37 (C 2-Pr), 37,17 (C 1-Pr), 111,29 (C-5), 127,20 (2 CH-Ar), 129,24 (C-2), 129,92 (2 CH-Ar), 138,45 (C-6), 139,89 (Ar C-Pr), 143,75 (C-N), 145,50 (C-3), 170,04 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₅H₁₇NO₂: 243,3. Dobiveno *m/z* 244,2 [M+H]⁺.

HRMS: Izračunato za C₁₅H₁₇NO₂ [M+H]⁺: 244,1338. Dobiveno 244,1330.

3-Hidroksi-1-(*p*-izopropilfenil)-2-metilpiridin-4-on (13)

Žuta krutina, spoj **13** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 173,2-174,2 °C.; *R_f* = 0,54 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ / ppm: 1,25 (d, 6H, *J*= 6,9 Hz, H 2-*i*Pr.), 1,96 (s, 3H, CH₃), 3,00 (sept, 1H, *J*=6,9 Hz, H 1-*i*Pr), 6,19 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-5), 7,35 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, H-Ar), 7,43 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, H-Ar), 7,54 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ / ppm: 13,87 (CH₃), 24,20 (2C, C 2-*i*Pr), 33,55 (C 1-*i*Pr), 111,28 (C-5), 127,30 (2 CH-Ar), 127,95 (2 CH-Ar), 129,22 (C-2), 138,58 (C-6), 139, 94 (Ar C-*i*Pr), 145,48 (C-N), 149,83 (C-3), 170,05 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₅H₁₇NO₂: 243,3. Dobiveno *m/z* 244,2 [M+H]⁺.

HRMS: Izračunato za C₁₅H₁₇NO₂ [M+H]⁺: 244,1338. Dobiveno 244,1330.

1-(*p*-(*tert*-Butilfenil)-3-hidroksi-2-metil-piridin-4-on (14)

Žuta krutina, spoj **14** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 234,2-235,3 °C; *R_f* = 0,39 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ / ppm: 1,33 (9H, H 2-*t*Bu), 1,96 (s, 3H, CH₃), 6,20 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-5), 7,35-7,38 (m, 2H, H-Ar), 7,54-7,58 (m, 3H, 2 H-Ar, 1H, *J*=7,1 Hz, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ / ppm: 35,02 (C 1-*t*Bu), 111,30 (C-5), 126,88 (2 CH-Ar), 126,97 (2 CH-Ar), 129,29 (C-2), 138,46 (C-6), 139, 66 (Ar C-*t*Bu), 145,48 (C-N), 152,07 (C-3), 169,99 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₆H₁₉NO₂: 257,3. Dobiveno *m/z* 258,2 [M+H]⁺.

3-Hidroksi-2-metil-1-(p-klorfenil)piridin-4-on (15)

Smeđa krutina, spoj **15** (slika 25, tablica 2); *t.t.* = 265,6-267,2 °C; *R_f* = 0,38 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ / ppm: 1,97 (s, 3H, CH₃), 6,22 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-5), 7,52 (d, 2H, *J*=8,6 Hz, H-Ar), 7,55 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-6), 7,63 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H-Ar).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ / ppm: 13,80 (CH₃), 111,48 (C-5), 129,01 (C-2), 129,52 (2 CH-Ar), 130,09 (2 CH-Ar), 134,19 (Ar C-Cl), 138,37 (C-6), 140,90 (C-3), 145,51 (C-N), 170,19 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₂H₁₀ClNO₂: 235,7. Dobiveno *m/z* 236,1 [M+H]⁺.

HRMS: Izračunato za C₁₂H₁₀ClNO₂ [M+H]⁺: 236,0478. Dobiveno 236,0474.

3.2.2. Općeniti postupak priprave para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (11-15) sintezom potpomognutom mikrovalnim zračenjem

Maltolu (100 mg, 0,8 mmol) je dodana voda (5 mL) te odgovarajući *para* supstituirani anilinski derivat (1 ekv.) i *p*-TsOH (tablica 3). Reakcijska smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru (reakcijski uvjeti i vrijeme reakcije navedeni su u tablici 3). Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu. Hlađenjem reakcijske smjese dolazi do kristalizacije, a nastali kristali su odfiltrirani preko sinter lijevka. Čistoća kristala i matičnice kontrolirana je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A) uz UV detekciju. Dobiveni su spojevi **11-15** i **XLIIIb** čiji ¹H i ¹³C NMR odgovaraju spektrima istih spojeva pripremljenih u autoklavu. Spoj **15** je pripremljen i na nešto većoj skali. Maltolu (250 mg, 1,99 mmol) dodan je anilinski derivat (1 ekv.), *p*-TsOH (0,2 ekv.) i voda (7 mL). Reakcija je obrađena kao u prethodnim postupcima te je izoliran produkt (286,5 mg, 72%) čiji ¹H i ¹³C NMR spektri odgovaraju spektrima ovog spoja pripremljenog u autoklavu.

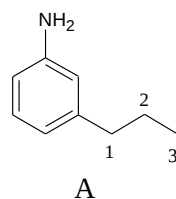
Tablica 3. Priprava *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**11-15 i XLIIIb**) sintezom potpomognutom mikrovalnim zračenjem

<i>p</i> -TsOH (ekv.)	Reakcijski uvjeti				Produkt	Prinos (%)
	Snaga (W)	Tlak (psi)	Temperatura (°C)	Vrijeme reakcije (h)		
0,2	200	260	220	1	11	17
0,3	200	260	220	2	12	10
0,2	200	260	220	1	13	26
0,2	200	260	220	1	14	13
0,2	200	260	220	1	XLIIIb ⁹	52
0,2	200	260	220	1	15	42

3.2.3. Pokušaj priprave 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-propilfenil)piridin-4-ona reakcijom *m*-propilanilina i maltola u autoklavu

3.2.3.1. Priprava *m*-propilanilina (A)

U staklenu cijev (autoklav) dodani su *m*-nitropropiofenon (200 mg, 1,1 mmol) i hidrazin-hidrat (98 %-tna vodena otopina, 3 mL, 61,8 mmol). Staklena cijev je zatvorena i zagrijavana 3 h na uljnoj kupelji na temperaturi pri 135 °C. Nakon 3 h reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i dodan je KOH (313,1 mg, 5,6 mmol). Reakcijska smjesa je nastavljena zagrijavati se na uljnoj kupelji na temperaturi od 135 °C preko noći. Nakon 24 h reakcijska smjesa je ekstrahirana 2 puta sa sustavom otapala DCM : *i*PrOH = 4 : 1 (2 × 20 mL) i 1 put s destiliranom H₂O (20 mL). Organski sloj je sušen na bezvodnom Na₂SO₄. Nakon filtriranja sredstva za sušenje DCM je uparen na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Pročišćavanjem kromatografijom na stupcu silikagela (sustav otapala A) dobiven je uljasti produkt smeđe boje, spoj **A** (44 %) (slika 26); *R*_f = 0,66 (sustav otapala A).



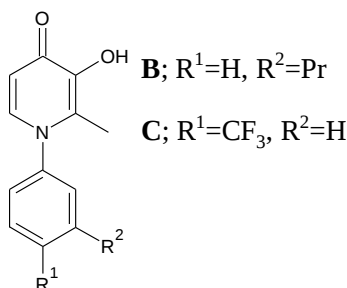
Slika 26. Strukturna formula molekule spoja A

^1H NMR (CDCl_3) δ / ppm: 0,97 (3H, $J=7,3$ Hz, H-3), 1,60-1,69 (sxt, 2H, $J=7,4$ Hz, H-2), 2,53 (t, 2H, $J=7,9$ Hz, H-1), 6,53-6,56 (m, 2H, H-Ar), 6,61-6,64 (m, 1H, H-Ar), 7,07-7,11 (m, 2H, H-Ar).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ / ppm: 13,93 (C-3), 24,45 (C-2), 38,10 (C-1), 112,53 (C-Ar), 115,38 (C-Ar), 118,97 (C-Ar), 129,11 (C-Ar), 144,02, 146,27 (C-NH₂, C-Pr).

3.2.3.2. Pokušaj priprave 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-(propilfenil)piridin-4-ona (**B**)

U staklenu cijev dodani su maltol (200 mg, 1,6 mmol), *m*-propilanilin (21,4 mg, 1,6 mmol), *p*-TsOH (30 mg, 0,2 mmol) i voda (4 mL). Ciljni produkt, 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-(propilfenil)piridin-4-on (**B**, slika 27), pokušalo se pripremiti i izolirati (metoda a) analogno postupku opisanom u poglavlju 3.2. Izolacija ciljnog produkta iz reakcijske smjese nije rezultirala izolacijom ciljnog spoja u čistom obliku. Dobivena je reakcijska smjesa ciljnog 3,4-HP-a i neizreagiranih polaznih reaktanata.



Slika 27. Pretpostavljene strukturne formule molekula spojeva B i C

3.2.4. Pokušaj priprave 3-hidroksi-2-metil-1-[*p*-(trifluormetil)fenil]piridin-4-ona

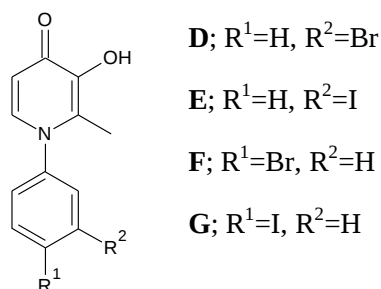
reakcijom p-trifluormetilanilina i maltola u autoklavu (C)

Ciljni produkt, 3-hidroksi-2-metil-1-[*p*-(trifluormetil)fenil]piridin-4-on (**C**, slika 27), pokušalo se pripremiti analogno postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. U staklenu cijev (autoklav) dodani su maltol (1 g, 7,9 mmol), *p*-trifluormetilanilin (7,9 mmol), *para*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH, 150 mg, 0,8 mmol) i voda (20 mL). Reakcija je postavljena a reakcijska smjesa obrađena

(metoda a) prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. Izolacija ciljnog produkta iz reakcijske smjese nije rezultirala izolacijom ciljnog spoja u čistom obliku. Dobivena je reakcijska smjesa ciljnog 3,4-HP-a i neizreagiranih polaznih reaktanata kao i u slučaju pokušaja pripreve 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-(propilfenil)piridin-4-ona, opisanom u prethodnom poglavlju.

3.2.5. Pokušaj pripreve halogenih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**D-G**)

Halogene *meta* i *para* supstituirane *N*-aril-3,4-HP-e (**D-G**, slika 28) pokušalo se pripremiti analogno postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. U staklenu cijev (autoklav) dodani su maltol (1 g, 7,9 mmol), odgovarajući *meta*- ili *para*- supstituirani halogeni anilinski derivat (7,9 mmol), *para*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH, 150 mg, 0,8 mmol) i voda (20 mL). Reakcija je postavljena, a reakcijska smjesa obrađena (Metoda a) prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. Izolacija ciljnog produkta iz reakcijske smjese i u ovome slučaju nije rezultirala izolacijom ciljnog spoja u čistom obliku.

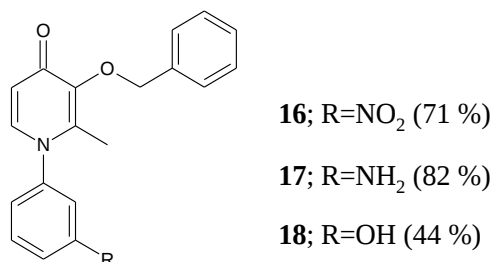


Slika 28. Pretpostavljene strukturne formule molekula spojeva **D-G**

3.3. Priprava benziliranih *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**16-18**)

3.3.1. Priprava 3-benziloksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona (**16**)

Spoju **8** (500 mg, 2 mmol) otopljenom u metanolu (15 mL) dodani su natrijev hidroksid (NaOH, 129,7 mg, 3,2 mmol) prethodno otopljen u vodi (432,4 μ L) i benzil-klorid (BnCl, 535,2 μ L, 4,7 mmol). Reakcijska smjesa je ostavljena na magnetskoj mješalici uz refluks 24 h. Nakon završetka reakcije metanol je uparen a dobiveni ostatak je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela (sustav otapala A). Dobivena je žuta krutina, spoj **16** (slika 29); *t.t.* = 134,5-135,6 °C; *R_f* = 0,36 (sustav otapala A).

Slika 29. Strukturne formule molekula spojeva **16-18**

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,91 (s, 3H, CH₃), 5,08 (s, 2H, CH₂), 6,28 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H-5), 7,33 (t, 1H, *J*=7,3 Hz, H-Ar, Bn), 7,37-7,39 (m, 2H, H-Ar, Bn), 7,45 (d, 2H, *J*=7,2 Hz, H-Ar, Bn), 7,67 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-6), 7,85 (7, 1H, *J*=8,1 Hz, H-Ar), 7,93-7,95 (m, 1H, H-Ar), 8,36-8,38 (m, 2H, H-Ar).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 13,98 (CH₃), 71,95 (CH₂), 116,04 (C-5), 122,46, 123,94, 131,06, 133,86 (4 CH, Ar), 127,72, 128,11, 128,20 (5 CH, Bn), 137,61 (C-Bn), 139,35 (C-6), 140,09 (C-2), 141,91 (C-N), 145,01 (C-3), 148,16 (Ar C-NO₂), 172,43 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₉H₁₆N₂O₄: 336,3. Dobiveno *m/z* 337,2 [M+H]⁺.

3.3.2. Priprava 1-(*m*-aminofenil)-3-benziloksi-2-metilpiridin-4-ona (**17**)

Hidrazin-hidratu (25 %-tna vodena otopina 294,9 μ L) dodani su metanol (2 mL) i Ra-Ni (50 %-tna vodena suspenzija, 26 μ L). Reakcijska smjesa je zagrijavana uz povratno hladilo i miješana na magnetskoj mješalici. Kada je otopina zagrijana do temperature pri kojoj otapalo počne refluksirati, u otopinu je dodan spoj **16** (100 mg, 0,3 mmol) prethodno otopljen u metanolu (1 mL). Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A) uz UV detekciju i prskanje ninhidrinom uz naknadno zagrijavanje. Reakcija je prekinuta nakon 24 h. Reakcijska smjesa je profiltrirana, a otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Dobivena je bijela krutina, spoj **17** (slika 29); *R_f* = 0,32 (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,91 (s, CH₃), 5,08 (s, 2H, CH₂), 5,48 (br s, 2H, NH₂), 6,21 (br s, 1H, H-5), 6,43 (br s, 2H, H-Ar), 6,67 (br s, 1H, H-Ar), 7,33-7,54 (m, 7H, H-6, H-Ar, 5 H-Bn).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 13,65 (CH₃), 71,95 (CH₂), 111,17, 113,17, 114,16, 129,87 (4 CH-Ar), 115,66 (C-5), 127,69, 128,05, 128,27 (5 CH-Bn), 137,63 (C-Bn), 139,17 (C-6), 140,15 (C-2), 142,17 (C-3), 144,76 (C-N), 149,96 (Ar C-NH₂), 172,08 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₉H₁₈N₂O₂: 306,4. Dobiveno *m/z* 307,2 [M+H]⁺.

3.3.3. Priprava 3-benziloksi-1-(*m*-hidroksifenil)-2-metilpiridin-4-ona (**18**)

Kao polazni spoj za pripravu spoja **18** korišten je benzilirani maltol, 3-benziloksi-2-metilpiran-4-on, koji je pripremljen u okviru prethodnih istraživanja provedenih na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a⁹ prema literaturno opisanoj metodi.⁹⁰ Benzilirani maltol (1,3 g, 6,1 mmol) i *m*-hidroksianilin (1,3 g, 12,3 mmol) pomiješani su u tikvici bez dodatka otapala. Reakcijska smjesa je zagrijavana 24 h na magnetskoj mješalici na uljnoj kupelji pri temperaturi 150 °C u suhim uvjetima. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A). Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela uz gradijentan način eluiranja (sustav otapala A; sustav otapala C). Dobiven je smeđi smolasti produkt, spoj **18** (slika 29); $R_f = 0,43$ (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,86 (s, CH₃), 2,09 (s, 2H, CH₂Ph) 6,22 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, H-5), 6,71 (t, 1H, $J=2,0$ Hz, H-Ar), 6,77-6,80 (m, 1H, H-Ar), 6,92 (dd, 1H, $J=8,2, 1,7$ Hz, H-Ar), 7,30-7,45 (m, 6H, 1 H-Ar, 5H-Bn), 7,57 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, H-6), 10,08 (br s, 1H, OH).

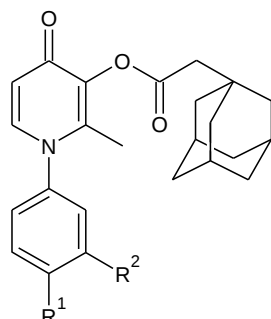
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 13,80 (CH₃), 71,79 (CH₂Ph), 113,69 (C-5), 115,76, 116,15, 117,21, 130,43 (4 CH-Ar), 127,75, 128,11, 128,31 (5 CH-Bn), 137,64 (C-Bn), 139,32 (C-6), 140,28 (C-2), 142,33 (C-N), 144,79 (C-3), 158,23 (Ar C-OH), 172,20 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₉H₁₇NO₃: 307,3. Dobiveno m/z 308,2 [M+H]⁺.

3.4. Općeniti postupak pripreme adamantilnih derivata *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**19-31**)

Meta- ili *para*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP (100 mg, **1-15**) otopljen je u suhom diklormetanu (DCM, 3 mL), dodani su adamantan-1-iloctena kiselina (AdAcOH, 1 ekv.) i 4-dimetilaminopiridin (DMAP, 0,1 ekv.). Reakcijska smjesa je hlađena na ledenoj kupelji i miješana na magnetskoj mješalici, nakon čega je dodan *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC × HCl, 1,1 ekv.). Nakon dodavanja EDC × HCl-a reakcijska smjesa se nastavlja miješati na magnetskoj mješalici, najprije na ledenoj kupelji, a nakon toga pri sobnoj temperaturi 24 h. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A) uz UV detekciju. Nakon završetka reakcije u reakcijsku smjesu je dodan DCM. Reakcijska smjesa je ekstrahirana dva puta otopinom klorovodične kiseline (HCl, 0,5 M), jednom sa zasićenom otopinom natrijeva-hidrogenkarbonata (NaHCO₃) i jednom s destiliranom vodom (H₂O).

Organski sloj je sušen na bezvodnom natrijevom sulfatu (Na_2SO_4), a nakon filtriranja sredstva za sušenje, DCM je uparen na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Ostatak nakon uparavanja pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela (sustav otapala A).



19 ; $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{Me}$ (60 %)	25 ; $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{CF}_3$ (42 %)
20 ; $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{OMe}$ (65 %)	26 ; $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{NO}_2$ (50 %)
21 ; $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{Et}$ (26 %)	27 ; $\text{R}^1=\text{Et}$, $\text{R}^2=\text{H}$ (40 %)
22 ; $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=i\text{Pr}$ (85 %)	28 ; $\text{R}^1=\text{Pr}$, $\text{R}^2=\text{H}$ (36 %)
23 ; $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=t\text{-Bu}$ (87 %)	29 ; $\text{R}^1=i\text{Pr}$, $\text{R}^2=\text{H}$ (38 %)
24 ; $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{Cl}$ (42 %)	30 ; $\text{R}^1=t\text{-Bu}$, $\text{R}^2=\text{H}$ (54 %)
	31 ; $\text{R}^1=\text{Cl}$, $\text{R}^2=\text{H}$ (35 %)

Slika 30. Strukturne formule molekula spojeva **19-31**

2-Metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on-3-iladamantan-1-il-acetat (**19**)

Bijela krutina (slika 30); spoj **19**; $t.t.$ = 195,1–196,3 °C; R_f = 0,51 (sustav otapala A).

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ / (ppm): 1,65 (br s, 6H, $\text{H}_\gamma\text{-Ad}$), 1,72 (br s, 6H, $\text{H}_\alpha\text{-Ad}$), 1,92 (s, 3H, CH_3), 1,95 (br s, 3H, $\text{H}_\beta\text{-Ad}$), 2,30 (s, 2H, CH_2Ad), 2,38 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 6,23 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-5), 7,27-7,38 (m, 3H, H-Ar), 7,46 (t, 1H, $J=7,7$ Hz, H-Ar), 7,67 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-6).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ / (ppm): 14,19 (CH_3), 20,61 ($\text{CH}_3\text{-Ar}$), 27,92 ($\text{C}_\beta\text{-Ad}$), 32,38 (C-Ad), 36,14 ($\text{C}_\gamma\text{-Ad}$), 41,41 ($\text{C}_\alpha\text{-Ad}$), 47,51 (CH_2Ad), 115,34 (C-5), 123,96, 127,43, 129,48, 129,90 (4 CH, Ar), 139,10 (C-2), 139,62 (Ar C- CH_3), 140,15 (C-3), 140,67 (C-6), 140,96 (C-N), 167,81 (C=O, ester), 169,54 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_3$: 391,5. Dobiveno m/z 392,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS: Izračunato za $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 392,2226. Dobiveno 392,2224.

2-Metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on-3-iladamantan-1-il-acetat (**20**)

Žuta krutina (slika 30); spoj **20**; $t.t.$ = 153,0-154,0 °C; R_f = 0,50 (sustav otapala A).

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ / ppm: 1,61-1,69 (m, 6H, $\text{H}_\gamma\text{-Ad}$), 1,72 (br s, 6H, $\text{H}_\alpha\text{-Ad}$), 1,94 (br s, 6H, 3H, $\text{H}_\beta\text{-Ad}$, 3H, CH_3), 2,30 (s, 2H, CH_2Ad), 3,81 (s, 3H, OCH_3), 6,23 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-5), 7,03-7,05 (m, 1H, H-Ar), 7,10-7,12 (m, 2H, H-Ar), 7,45-7,49 (m, 1H, H-Ar), 7,68 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-6).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ / (ppm): 14,68 (CH₃), 28,49 (C β -Ad), 32,73 (C-Ad), 36,71 (C γ -Ad), 41,83 (C α -Ad), 48,02 (CH₂Ad), 56,10 (OCH₃), 113,18 (C-5), 115,87, 115,95, 119,58, 131,05 (4 CH-Ar), 139,67 (C-2), 140,74 (C-3), 141,23 (C-6), 142,62 (C-N), 150,53 (Ar C-OCH₃), 168,37, 170,12 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₅H₂₉NO₄: 407,5. Dobiveno m/z 408,2 [M+H]⁺.

1-(*m*-Etilfenil)-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-acetat (21)

Bijela krutina, spoj **21** (slika 30); *t.t.* = 132,7-133,7 °C; *R_f* = 0,57 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ / ppm: 1,22 (t, 3H, *J*=7,6 Hz, CH₃Et), 1,61-1,72 (m, 12H, 6H, H γ -Ad, 6H, H α -Ad), 1,93-1,95 (m, 6H, 3H, CH₃, 3H, H β -Ad), 2,30 (s, 2H, CH₂Ad), 2,69 (q, 2H, *J*=7,6 Hz, CH₂Et), 6,24 (1H, *J*=7,6 Hz, H-5), 7,29-7,31 (m, 1H, H-Ar), 7,35 (s, 1H, H-Ar), 7,41 (d, 1H, *J*=8,0 Hz, H-Ar), 7,48 (t, 1H, *J*=7,7 Hz, H-Ar), 7,69 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ / ppm: 14,76 (CH₃), 15,76 (CH₃, Et), 28,26 (CH₂, Et), 28,49 (C β -Ad), 32,94 (C-Ad), 36,70 (C γ -Ad), 41,97 (C α -Ad), 48,09 (CH₂Ad), 115,92 (C-5), 124,76 (CH-Ar), 126,88 (CH-Ar), 129,29 (CH-Ar), 130,17 (CH-Ar), 139,71 (C-2), 140,75 (C-3), 141,29 (C-6), 141,62 (Ar C-Et), 146,44 (C-N), 168,39, 170,13 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₆H₃₁NO₃: 405,5. Dobiveno m/z 406,3 [M+H]⁺.

HRMS: Izračunato za C₂₆H₃₁NO₃ [M+H]⁺: 406,2382. Dobiveno 406,2394.

1-(*m*-Izopropilfenil)-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-acetat (22)

Smeđa krutina, spoj **22** (slika 30); *t.t.* = 140,8-141,8 °C; *R_f* = 0,60 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 1,29 (d, 6H, *J*=6,9 Hz, H 2-*i*Pr), 1,71 (s, 6H, H γ -Ad), 1,80-1,81 (m, 6H, H α -Ad), 2,00 (s, 6H, 3H, CH₃, 3H, H β -Ad), 2,43 (s, CH₂Ad), 3,01 (sept, 1H, *J*=6,9 Hz, H 1-*i*Pr), 6,49 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-5), 7,10-7,12 (m, 1H, H-Ar), 7,14 (s, 1H, H-Ar), 7,34-7,39 (m, 2H, 1H H-Ar, 1H, *J*=7,6 Hz, H-6), 7,45 (t, 1H, *J*=7,7 Hz, H-Ar).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 14,78 (CH₃), 23,84 (2 C-2*i*Pr), 28,68 (C β -Ad), 33,08 (C-Ad), 33,97 (C 1-*i*Pr), 36,78 (C γ -Ad), 42,28 (C α -Ad), 48,27 (CH₂Ad), 116,74 (C-5), 124,13, 124,85, 127,90, 129,88 (4 CH-Ar), 139,71 (C-6), 140,12 (C-2), 140,63 (C-3), 141,49 (C-N), 151,52 (Ar C-*i*Pr), 168,89, 171,17 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₇H₃₃NO₃: 419,6. Dobiveno m/z 442,4 [M+Na]⁺.

HRMS: Izračunato za C₂₇H₃₃NO₃ [M+H]⁺: 420,2539. Dobiveno 420,2544.

1-(*m*-tert-Butilfenil)-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-acetat (23)

Svijetlosmeđa krutina, spoj **23** (slika 30); $R_f = 0,72$ (sustav otapala A).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 1,37 (s, 9H, 2-*t*Bu), 1,72 (s, 6H, $\text{H}_\gamma\text{-Ad}$), 1,81-1,82 (m, 6H, $\text{H}_\alpha\text{-Ad}$), 2,01 (6H, 3H, CH_3 , 3H, $\text{H}_\beta\text{-Ad}$), 2,43 (s, 2H, CH_2Ad), 6,53 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-5), 7,10-7,12 (m, 1H, H-Ar), 7,28 (s, 1H, H-Ar), 7,37 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-6), 7,46 (t, 1H, $J=7,8$ Hz, H-Ar), 7,54-7,56 (m, 1H, H-Ar).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 14,81 (CH_3), 28,69 ($\text{C}_\beta\text{-Ad}$), 31,23 (CH_3 , 2-*t*Bu), 33,09 (C-Ad), 35,04 ($\text{C-1-}t\text{Bu}$), 36,78 ($\text{C}_\gamma\text{-Ad}$), 42,22 ($\text{C}_\alpha\text{-Ad}$), 48,28 (CH_2Ad), 116,71 (C-5), 133,77 (CH-Ar), 123,95 (CH-Ar), 126,67 (CH-Ar), 129,65 (CH-Ar), 139,78 (C-6), 140,10 (C-2), 140,73 (C-3), 141,30 (Ar C-*t*Bu), 153,99 (C-N), 168,89, 171,12 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{NO}_3$: 433,6. Dobiveno m/z 434,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-(*m*-Klorfenil)-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-acetat (24)

Bijela krutina, spoj **24** (slika 30); $t.t. = 174,2\text{-}175,4$ °C; $R_f = 0,57$ (sustav otapala A).

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ / ppm: 1,61-1,63 (m, 12H, 6H, $\text{H}_\gamma\text{-Ad}$, 6H, $\text{H}_\alpha\text{-Ad}$), 1,94-1,95 (m, 6H, 3 H, $\text{H}_\beta\text{-Ad}$, 3H, CH_3), 2,31 (s, 2H, CH_2Ad), 6,24 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-5), 7,50-7,53 (m, 1H, H-Ar), 7,58-7,66 (m, 2H, H-Ar), 7,72 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-6), 7,75- 7,76 (m, 1H, H-Ar).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ / ppm: 14,19 (CH_3), 27,92 ($\text{C}_\beta\text{-Ad}$), 32,39 (C-Ad), 36,15 ($\text{C}_\gamma\text{-Ad}$), 41,41 ($\text{C}_\alpha\text{-Ad}$), 47,50 (CH_2Ad), 115,98 (C-5), 126,17, 127,40, 129,48, 131,21 (4 CH-Ar), 133,78 (Ar C-Cl), 139,10 (C-2), 140,07 (C-3), 140,63 (C-6), 142,06 (C-N), 167,74, 169,66 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClNO}_3$: 411,9. Dobiveno m/z 412,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS: Izračunato za $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClNO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 412,1680. Dobiveno 412,1697.

2-Metil-1-(trifluormetilfenil)piridin-4-on-3-iladamantan-1-il-acetat (25)

Bijela krutina, spoj **25** (slika 30); $t.t. = 116,4\text{-}117,2$ °C; $R_f = 0,56$ (sustav otapala A).

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ / ppm: 1,64-1,76 (m, 12H, 6H, $\text{H}_\gamma\text{-Ad}$, 6H, $\text{H}_\alpha\text{-Ad}$), 1,93-1,95 (m, 6H, 3H, CH_3 , 3H, $\text{H}_\beta\text{-Ad}$), 2,31 (s, 2H, CH_2Ad), 6,26 (d, 1H, $J=7,64$ Hz, H-5), 7,76 (d, 1H, $J=7,65$ Hz, H-6), 7,79-7,84 (m, 1H, H-Ar), 7,86-7,88 (m, 1H, H-Ar), 7,94 (d, 1H, $J=8,03$ Hz, H-Ar), 8,05 (s, 1H, H-7).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ / ppm: 14,82 (CH₃), 28,49 (C β -Ad), 32,96 (C-Ad), 36,69 (C γ -Ad), 41,98 (C α -Ad), 48,08 (CH₂Ad), 116,05 (C-5), 125,31 (CH-Ar), 126,75 (CH-Ar), 130,77 (Ar C-CF₃), 131,10 (Ar, CF₃), 131,56 (CH-Ar), 132,20 (CH-Ar), 139,73 (C-2), 140,65 (C-3), 142,06 (C-N), 141,30 (C-6), 168,31, 170,27 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₅H₂₆F₃NO₃: 445,5. Dobiveno m/z 446,2 [M+H]⁺.

2-Metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on-3-iladamantan-1-il-etanoat (26)

Bijela krutina, spoj **26** (slika 30); $t.t.$ = 228,0-229,4 °C; R_f = 0,49 (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,62-1,69 (m, 6H, H γ -Ad), 1,72 (br s, 6H, H α -Ad), 1,95 (br s, 6H, 3H, H β -Ad, 3H, CH₃), 2,31 (s, 2H, CH₂Ad), 6,28 (d, 1H, J =7,6 Hz, H-5), 7,76 (d, 1H, J =7,6 Hz, H-6), 7,86 (t, 1H, J =8,1 Hz, H-Ar), 8,03 (d, 1H, J =7,8 Hz, H-Ar), 8,40 (d, 1H, J =8,2 Hz, H-Ar), 8,45 (t, 1H, J =2,0 Hz, H-Ar).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 14,22 (CH₃), 27,91 (C β -Ad), 32,36 (C-Ad), 36,11 (C γ -Ad), 41,39 (C α -Ad), 47,47 (CH₂Ad), 115,55 (C-5), 122,71, 124,12, 131,04, 134,05 (4 CH, Ar), 139,14 (C-2), 140,06 (C-3), 140,54 (C-6), 141,50 (C-N), 148,22 (Ar C-NO₂), 167,68 (C=O, ester), 169,74 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₄H₂₆N₂O₅: 422,5. Dobiveno m/z 423,4 [M+H]⁺.

1-(*p*-Etilfenil)-2-metilpiridin-4-on-3-il adamantan-1-il-acetat (27)

Bijela krutina, spoj **27** (slika 30); $t.t.$ = 188,5-190 °C; R_f = 0,59 (sustav otapala A).

¹H NMR (CDCl₃) δ / ppm: 1,31 (t, 3H, J =7,6 Hz, CH₃Et), 1,72 (s, 6H, H γ -Ad), 1,81-1,82 (m, 6H, H α -Ad), 2,01 (s, 6H, 3H, H β -Ad, 3H, CH₃), 2,43 (s, 2H, CH₂Ad), 2,76 (q, 2H, J =7,6 Hz, CH₂Et), 6,49 (d, 1H, J =7,6 Hz, H-5), 7,21 (d, 2H, J =8,3 Hz, H-Ar), 7,33 (d, 1H, J =7,6 Hz, H-6), 7,35 (d, 2H, J =8,5 Hz, H-Ar).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 14,79 (CH₃), 15,35 (CH₃, Et), 28,51 (C, CH₂CH₃), 28,70 (C β -Ad), 33,09 (C-Ad), 36,94 (C γ -Ad), 42,33 (C α -Ad), 48,28 (CH₂Ad), 116,78 (C-5), 126,72 (2 CH Ar), 129,39 (2 CH Ar), 139,13 (Ar C-Et), 139,79 (C-3), 140,10 (C-N), 140,77 (C-6), 146,13 (C-2), 168,8, 171,16 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₆H₃₁NO₃: 405,5. Dobiveno m/z 406,3 [M+H]⁺.

HRMS: Izračunato za C₂₆H₃₁NO₃ [M+H]⁺: 406,2382. Dobiveno 406,2393.

2-Metil-1-(*p*-propilfenil)piridin-4-on-3-iladamantan-1-il-acetat (28)

Bijela krutina, spoj **28** (slika 30); *t.t.* = 155,1-156,1 °C; *R_f* = 0,56 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 0,99 (t, 3H, *J*=7,3 Hz, H 3-Pr.), 1,67-1,72 (m, 8H, 6H, H γ -Ad, 2H, H 2-Pr) 1,81 (s, 6H, H α -Ad) 2,00 (s, 6H, 3H, H β -Ad, 3H, CH₃), 2,42, (s, 2H, CH₂Ad), 2,68 (t, 2H, *J*=7,7 Hz, H 1-Pr), 6,49 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-5), 7,19 (d, 2H, *J*=8,1 Hz, H-Ar), 7,32 (d, 3H, *J*=8,0 Hz, 2H Ar, 1H, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 13,77 (CH₃), 14,77 (C 3-Pr), 24,35 (C 2-Pr), 28,70 (C β -Ad), 33,08 (C-Ad), 36,78 (C γ -Ad), 37,56 (C 1-Pr), 42,21 (C α -Ad), 48,28 (CH₂ Ad), 116,76 (C-5), 126,62 (2 CH-Ar), 129,94 (2 CH-Ar), 139,15 (Ar C-Pr), 139,79 (C-6), 140,10 (C-3), 140,77 (C-N), 144,64 (C-2), 168,85, 171,16 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₇H₃₃NO₃: 419,6. Dobiveno *m/z* 420,3 [M+H]⁺.

HRMS: Izračunato za C₂₇H₃₃NO₃ [M+H]⁺: 420,2539. Dobiveno 420,2532.

1-(*p*-Izopropilfenil)-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-acetat (29)

Bijela krutina, spoj **29** (slika 30); *t.t.* = 170-171,5 °C; *R_f* = 0,67 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 1,31 (d, 6H, *J*=7,0 Hz, H 2-*i*Pr), 1,71 (s, 6H, H γ -Ad), 1,81-1,83 (m, 6H, H α -Ad), 2,01 (s, 6H, 3H, H β -Ad, 3H, CH₃), 2,43 (s, 2H, CH₂Ad), 3,00 (sept, 1H, *J*=6,9 Hz, H 1-*i*Pr), 6,48 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-5), 7,20 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, H-Ar), 7,33 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-6), 7,37 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, H-Ar).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 14,81 (CH₃), 23,87 (2 C, C 2-*i*Pr), 28,69 (C β -Ad), 33,09 (C-Ad), 33,90 (C 1-*i*Pr), 36,78 (C γ -Ad), 42,21 (C α -Ad), 48,28 (CH₂Ad), 116,77 (C-5), 126,72 (2 CH-Ar), 127,98 (2 CH-Ar), 139,16 (Ar C-*i*Pr), 139,78 (C-6), 140,10 (C-3), 140,77 (C-N), 150,72 (C-2), 168,86, 171,15 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₇H₃₃NO₃: 419,6. Dobiveno *m/z* 420,3 [M+H]⁺.

HRMS: Izračunato za C₂₇H₃₃NO₃ [M+H]⁺: 420,2539. Dobiveno 420,2529.

1-(*p*-*tert*-Butilfenil)-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-acetat (30)

Bijela krutina, spoj **30** (slika 30); *t.t.* = 76-78 °C; *R_f* = 0,49 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 1,39 (s, 9H, H 2-*t*Bu), 1,72 (s, 6H, H γ -Ad), 1,81-1,82 (m, 6H, H α -Ad), 2,02 (s, 6H, 3H, H β -Ad, CH₃), 2,43 (s, 2H, CH₂Ad), 6,48 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-5), 7,21 (d, 2H, *J*=8,5 Hz, H-Ar), 7,33 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-6), 7,53 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H-Ar).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 14,84 (CH₃), 28,70 (C β -Ad), 31,27 (C 2-*t*Bu), 33,10 (C-Ad), 34,92 (C 1-*t*Bu), 36,778 (C γ -Ad), 42,22 (C α -Ad), 48,27 (CH₂Ad), 116,78 (C-5), 126,39

(2 CH-Ar), 126,92 (2 CH-Ar), 138,87 (Ar C-*t*Bu), 139,87 (C-6), 140,10 (C-3), 140,76 (C-N), 153,04 (C-2), 168,86, 171,15 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{28}H_{35}NO_3$: 433,6. Dobiveno m/z 434,4 $[M+H]^+$.

HRMS: Izračunato za $C_{28}H_{35}NO_3$ $[M+H]^+$: 434,2695. Dobiveno 434,2711.

1-(*p*-Klorfenil)-2-metilpiridin-4-one-3-iladamantan-1-il-acetat (31)

Bijela krutina, spoj **31** (slika 30); $t.t.$ = 112,3-114 °C; R_f = 0,49 (sustav otapala A).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm: 1,72 (s, 6H, H_γ -Ad), 1,80-1,81 (m, 6H, H_α -Ad), 2,01 (s, 6H, 3H, H_β -Ad, 3H, CH_3), 2,24 (s, 2H, CH_2 Ad), 6,53 (d, 1H, J = 7,6 Hz, H-5), 7,26-7,32 (m, 4H, J =8,2 Hz, 2H-Ar, 2H, J =7,6 Hz, H-6), 7,53 (d, 2H, J =8,8 Hz, H-Ar).

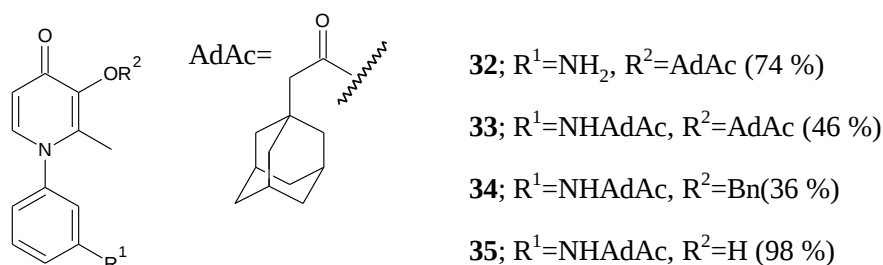
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm: 14,76 (CH_3), 28,68 (C_β -Ad), 33,10 (C-Ad), 36,76 (C_γ -Ad), 42,21 (C_α -Ad), 48,25 (CH_2 Ad), 117,10 (C-5), 128,34 (2CH-Ar), 130,34 (2 CH-Ar), 135,94 (C-3), 139,43 (C-6), 139,85 (C-2), 140,29 (C-N), 168,81, 171,18 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{24}H_{26}ClNO_3$: 411,9. Dobiveno m/z 412,2 $[M+H]^+$.

3.5. Selektivna priprava adamantilnih derivata 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona (32-35)

3.5.1. Priprava 1-(*m*-aminofenil)-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-etanoata (32)

Spoju **26** (110 mg, 0,3 mmol) dodani su DCM (3 mL), metanol (4 mL) i paladij na ugljiku (Pd/C, 10 %, 32,2 mg). Provedeno je hidrogeniranje pod tlakom od 31 psi u trajanju od 3 h, nakon čega je reakcijska smjesa analizirana tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A) uz UV detekciju i prskanje ninhidrinom uz naknadno zagrijavanje. Reakcijska smjesa je profiltrirana, a otapalo upareno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Dobivena je bijela krutina, spoj **32** (slika 31); $t.t.$ = 198,0-198,5 °C; R_f = 0,51 (sustav otapala A).



Slika 31. Strukturne formule molekula spojeva **32-35**

1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ / ppm: 1,65 (br s, 6H, H_γ -Ad.), 1,71 (br s, 6H, H_α -Ad), 1,94 (br s, 6H, 3H, H_β -Ad, 3H, CH_3), 2,30 (s, 2H, CH_2 Ad), 6,22 (d, 1H, J =7,6 Hz, H-5), 6,50-

6,53 (m, 2H, H-Ar), 6,68-6,71 (m, 1H, H-Ar), 7,17 (t, 1H, $J=8,2$ Hz, H-Ar), 7,66 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-6).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 14,07 (CH_3), 27,93 ($\text{C}\beta\text{-Ad}$), 32,38 (C-Ad), 36,14 ($\text{C}\gamma\text{-Ad}$), 41,41 ($\text{C}\alpha\text{-Ad}$), 47,49 (CH_2Ad), 111,30, 113,26, 114,41, 130,05 (4 CH, Ar), 115,22 (C-5), 138,99 (C-2), 140,23 (C-3), 140,56 (C-6), 141,78 (C-N), 150,06 (Ar C-NH₂), 167,87 (C=O, ester), 169,42 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$: 392,5. Dobiveno m/z 393,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.5.2. Priprava 1-[*m*-(adamantan-1-iletanamido)fenil]-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-etanoata (33) i N-[3-(3-benziloksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]adamantan-1-iletanamida (34)

Kao polazni spoj za pripravu spoja **33** korišten je spoj **32**, dok je spoj **17** poslužio kao polazni spoj za pripravu spoja **34**. Polazni spoj (100 mg, **32**, **17**) otopljen je u suhom DCM (3 mL), nakon čega su dodani AdAcOH (1 ekv.) i DMAP (0,1 ekv.). U ohlađenu reakcijsku smjesu dodan je EDC $\times$ HCl (1,1 ekv.). Tijek reakcije je praćen tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A). Reakcija je postavljena, reakcijska smjesa obrađena a produkt je pročišćen prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.

1-[*m*-(Adamantan-1-iletanamido)fenil]-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-etanoat (33)

Bijela krutina, spoj **33** (slika 31); $t.t.$ = 267,6-268,5 °C; R_f = 0,51 (sustav otapala A).

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ / ppm: 1,59-1,66 (m, 18H, 12H, $\text{H}\alpha\text{-Ad}$, 6H, $\text{H}\gamma\text{-Ad}$), 1,72 (br s, 6H, $\text{H}\alpha\text{-Ad}$), 1,94 (br s, 9H, 6H, $\text{H}\beta\text{-Ad}$, 3H, CH_3), 2,08 (s, 2H, CH_2Ad), 2,30 (s, 2H, CH_2Ad), 6,24 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-5), 7,14-7,16 (m, 1H, H-Ar), 7,48 (t, 1H, $J=8,1$ Hz, H-Ar), 7,62-7,64 (m, 1H, H-Ar), 7,70 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-6), 7,76 (br s, 1H, H-Ar), 10,05 (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 14,06 (CH_3), 27,88 (2 $\text{C}\beta\text{-Ad}$), 32,30, 32,59 (2 C-Ad), 36,09, 36,23 (2 $\text{C}\gamma\text{-Ad}$), 41,41, 41,88 (2 $\text{C}\alpha\text{-Ad}$), 47,49, 50,65 (2 CH_2Ad), 115,37 (C-5), 117,12, 119,46, 121,15, 129,91 (4 CH, Ar), 139,09 (C-2), 139,94 (Ar C-NH), 140,24 (C-3), 140,50 (C-6), 141,03 (C-N), 167,87, 169,49 (C=O, ester i amid), 169,52 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4$: 568,7. Dobiveno m/z 569,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[3-(3-Benziloksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]adamantan-1-iletanamid (34)

Bijela krutina, spoj **34** (slika 31); $t.t.$ = 135,1-136,1 °C; R_f = 0,54 (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,57-1,68 (m, 12H, 6H, H α -Ad, 6H, H γ -Ad), 1,87 (s, 3H, CH₃), 1,93 (br s, 3H, H β -Ad), 2,08 (s, 2H, CH₂Ad), 5,08 (s, 2H, CH₂, Bn), 6,25 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H-5), 7,04-7,07 (m, 1H, H-Ar), 7,31-7,48 (m, 6H, H-Ar), 7,59-7,61 (m, 1H, H-Ar), 7,61 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H-6), 7,76 (t, 1H, *J*=1,8 Hz, H-Ar), 10,15 (s, 1H, NH).
¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 13,88 (CH₃), 27,93 (C β -Ad), 32,67 (C, Ad), 36,30 (C γ -Ad), 41,93 (C α -Ad), 50,67 (CH₂Ad), 115,89 (C-5), 117,03, 119,36, 121,15, 129,88 (4 CH, Ar), 127,77, 128,14, 128,32 (5 CH, Bn), 137,62 (C, Bn), 139,41 (C-6), 140,22 (C-2), 140,29 (Ar C-NH), 141,50 (C-N), 144,91 (C-3), 169,63 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₃₁H₃₄N₂O₃: 482,6. Dobiveno *m/z* 483,3 [M+H]⁺.

3.5.3. Priprava N-[3-(3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]adamantan-1-iletanamida (35)

Spoju **34** (41 mg, 0,1 mmol) dodani su DCM (2 mL), metanol (3 mL) i Pd/C (10 %, 12 mg). Hidrogenoliza je provedena pod tlakom od 29 psi u trajanju od 4 h. Reakcija je postavljena a reakcijska smjesa obrađena prema postupku opisanom u poglavlju 3.5.1. Dobivena je bijela krutina, spoj **35** (slika 31); *t.t.* = 175,6-176,5 °C; *R_f* = 0,40 (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,57-1,69 (m, 12H, 6H, H α -Ad, 6H, H γ -Ad), 1,93 (br s, 3H, H β -Ad), 1,99 (s, 3H, CH₃), 2,08 (s, 2H, CH₂Ad), 6,23 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-5), 7,12 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-6), 7,47 (t, 1H, *J*=8,0 Hz, H-Ar), 7,57-7,64 (m, 2H, H-Ar), 7,75 (s, 1H, H-Ar), 10,11 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 13,21 (CH₃), 27,91 (C β -Ad), 32,64 (C-Ad), 36,27 (C γ -Ad), 41,92 (C α -Ad), 50,68 (CH₂Ad), 110,78 (C-5), 117,032, 119,24, 121,15, 129,76 (4 CH, Ar), 137,71 (C-6), 140,18 (C-2), 140,29 (Ar C-NH), 141,59 (C-N), 144,94 (C-3), 169,55 (2 C=O).

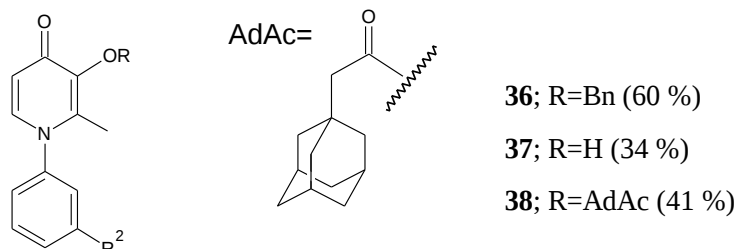
ESI-MS: Izračunato za C₂₄H₂₈N₂O₃: 392,5. Dobiveno *m/z* 393,2 [M+H]⁺.

3.6. Priprava adamantilnih derivata 3-hidroksi-1-(*m*-hidroksifenil)-2-metilpiridin-4-ona (36-38)

3.6.1. Priprava m-(3-benziloksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil-adamantan-1-il-etanoata (36)

Spoj **18** (360 mg, 1,2 mmol) otopljen je u bezvodnom DCM-u (3 mL). Otopini su dodani AdAcOH, (227,3 mg, 1,2 mmol) prethodno otopljena u bezvodnom DCM-u (2 mL), i DMAP (10 mg, 0,1 mmol). Reakcijska smjesa je hlađena na ledenoj kupelji i miješana na magnetskoj mješalici, nakon čega je u ohlađenu reakcijsku smjesu dodan EDC × HCl (247,3 mg, 1,3 mmol). Tijek reakcije je praćen tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A). Reakcija je

postavljena, reakcijska smjesa obrađena a produkt pročišćen prema postupku opisanom u poglavlju 3.4. Dobivena je žuta krutina, spoj **36** (slika 32); *t.t.* = 171,5-172,7 °C; *R_f* = 0,42 (sustav otapala A).



Slika 32. Strukturne formule molekula spojeva **36-38**

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,63-1,70 (m, 12H, 6H, H α -Ad, 6H, H γ -Ad), 1,89 (s, 3H, CH₃), 1,97 (br s, 3H, H β -Ad), 2,30 (s, 2H, CH₂Ad), 5,08 (s, 2H, CH₂Ph), 6,24 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H-5), 7,28-7,33 (m, 4H, H-Ar), 7,36-7,38 (m, 2H, H-Ar), 7,34-7,35 (m, 2H, H-Ar), 7,58-7,60 (m, 1H, H-Ar), 7,61 (d, 1H, *J*=7,6 Hz, H-6).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 13,81 (CH₃), 27,83 (C β -Ad), 32,50 (C-Ad), 36,01 (C γ -Ad), 41,55 (C α -Ad), 47,62 (CH₂Ad), 71,80 (CH₂Ph), 115,84 (C-5), 120,89, 122,68, 124,31, 130,43 (4 CH, Ar), 127,62, 128,02, 128,17 (5 CH, Ph), 137,60 (C, Ph), 139,28 (C-6), 140,04 (C-2), 141,94 (C-N), 144,89 (C-3), 150,50 (Ar C-OCO), 168,97 (C=O, ester), 172,22 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₁₃H₃₃NO₄: 483,6. Dobiveno *m/z* 484,3 [M+H]⁺.

3.6.2. Priprava m-(3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil-adamantan-1-il-etanoata (**37**)

Spoj **36** (220 mg, 0,5 mmol) je otopljen u DCM (3 mL). Otopini je dodan metanol (10 mL) i Pd/C (10 %, 14 mg). Hidrogenoliza je provedena 24 h pod tlakom od 29 psi. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A). Reakcijska smjesa je profiltrirana preko Büchnerovog lijevka, te je isprana s DCM i metanolom koji je nakon toga uparen. Dobivena je žuta krutina, spoj **37** (slika 32); *t.t.* = 182,3-183,1 °C; *R_f* = 0,39 (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,67 (br s, 12H, 6H, H α -Ad, 6H, H γ -Ad), 1,97 (br s, 6H, 3H, H β -Ad, 3H, CH₃), 2,32 (s, 2H, CH₂Ad), 6,21 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-5), 7,28-7,38 (m, 3H, H-Ar), 7,56-7,63 (m, 1H, H-Ar), 7,57 (d, 1H, *J*=7,3 Hz, H-6).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 13,24 (CH₃), 27,88 (C β -Ad), 32,58 (C-Ad), 36,07 (C γ -Ad), 41,61 (C α -Ad), 47,69 (CH₂Ad), 110,87 (C-5), 121,02, 122,69, 124,45, 130,42 (4 CH, Ar), 128,44 (C-2), 137,76 (C-6), 142,15 (C-N), 144,95 (C-3), 150,50 (Ar C-OCO), 169,14 (C=O, ester), 169,64 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{24}H_{27}NO_4$: 393,5. Dobiveno m/z 394,3 $[M+H]^+$.

3.6.3. Priprava 1-[*m*-(adamantan-1-iletanoiloksi)fenil]-2-metilpiridin-4-on-3-iladamantan-1-il-etanoata (**38**)

Spoj **37** (200 mg, 0,5 mmol) otopljen je u bezvodnom DCM (3 mL). Otopini su dodani AdAcOH (1 ekv.), prethodno otopljena u bezvodnom DCM (2 mL) i DMAP (0,1 ekv.). Nakon hlađenja reakcijskoj smjesi dodan je EDC $\times$ HCl (1,1 ekv.). Tijek reakcije je praćen tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A). Reakcija je postavljena, reakcijska smjesa obrađena a produkt je pročišćen prema postupku opisanom u poglavlju 3.4. Dobivena je žuto-smeđa krutina, spoj **38** (slika 32); $t.t.$ = 154-155,8 °C; R_f = 0,70 (sustav otapala A).

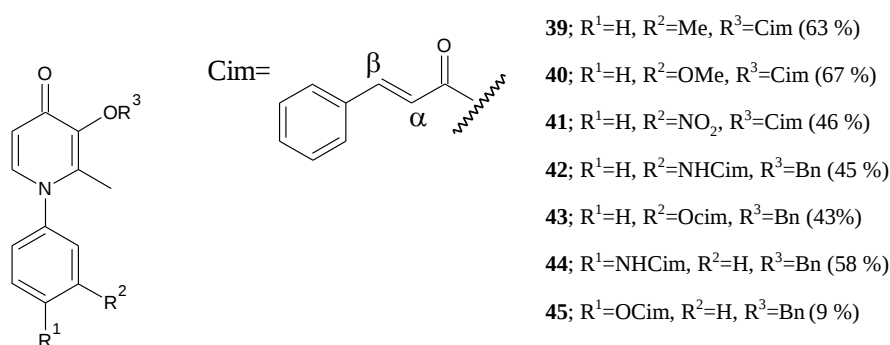
1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 1,62-1,72 (br s, 24H, 12 H α -Ad, 12 H γ -Ad), 1,93 (s, 3H, CH₃), 1,95-1,99 (m, 6H, H β -Ad), 2,30 (s, 2H, CH₂Ad), 2,32 (s, 2H, CH₂Ad), 6,24 (d, 1H, J =7,6 Hz, H-5), 7,30-7,33 (m, 1H, H-Ar), 7,41-7,43 (m, 2H, H-Ar), 7,61 (t, 1H, J =8,4 Hz, H-Ar), 7,72 (d, 1H, J =7,6 Hz, H-6).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 14,19 (CH₃), 27,88, 27,92 (C β -Ad), 32,39, 32,58 (C-Ad), 36,06, 36,13 (C γ -Ad), 41,41,41,60 (C α -Ad), 47,51, 47,89 (CH₂Ad), 115,42 (C-5), 121,21, 122,99, 124,58, 130,60 (4 CH, Ar), 139,13 (C-2), 140,09 (C-N), 140,66 (C-6), 141,60 (C-3), 150,60 (Ar C-OAdAc), 167,77, 169,10 (C=O, AdAc), 169,62 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{36}H_{43}NO_5$: 569,7. Dobiveno m/z 570,4 $[M+H]^+$.

3.7. Općeniti postupak pripreme derivata *meta* i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i cimetne kiseline (**39-45**)

Kao polazni spojevi za pripravu spojeva derivata *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i cimetne kiseline korišteni su odgovarajući 3,4-HP-i **1**, **2** i **8** (**39-41**) i benzilirani *meta*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP-i **17** i **18** (**42** i **43**). Kao polazni spojevi za pripravu derivata *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i cimetne kiseline **44** i **45** korišteni su benzilirani 3,4-HP-i pripremljeni u okviru prethodnih istraživanja provedenih na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a.⁹ Polazni spoj (70 mg) otopljen je u suhom DCM (2 mL). Otopini su dodani cimetna kiselina (1 ekv.) i DMAP (0,1 ekv.). U ohlađenu reakcijsku smjesu dodan je EDC $\times$ HCl (1,1 ekv.). Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A). Reakcija je postavljena, reakcijska smjesa obrađena a produkt pročišćen prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.

Slika 33. Strukturne formule molekula spojeva **39-45****[2-Metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoat (39)**

Bijela krutina, spoj **39** (slika 33); $R_f = 0,74$ (sustav otapala A).

1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ /ppm: 2,09 (s, CH_3), 2,47 (s, CH_3-Ar), 6,60 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, H-5), 6,83 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H- α), 7,27-7,29 (m, 1H, H-Ar), 7,32-7,33 (m, 1H, H-Ar), 7,42-7,43 (m, 1H, H-Ar), 7,45-7,48 (m, 3H, *m+p*-CIM), 7,49-7,53 (m, 1H, H-Ar), 7,69-7,73 (m, 2H, H-*o*-CIM), 7,82 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, H-6), 7,95 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H- β).

[2-Metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoat (40)

Bijela krutina, spoj **40** (slika 33); $R_f = 0,68$ (sustav otapala A).

1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ /ppm: 2,04 (s, CH_3), 3,84 (s, OCH_3), 6,51 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H-5), 6,71 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H- α), 6,82-6,84 (m, 1H, H-Ar), 6,87-6,89 (m, 1H, H-Ar), 7,02-7,05 (m, 1H, H-Ar), 7,35 (d, 1H, $J=7,0$ Hz, H-6), 7,38-7,41 (m, 3H, *m+p*-CIM), 7,43 (d, 1H, $J=8,1$ Hz, H-Ar), 7,55-7,57 (m, 2H, H-*o*-CIM), 7,89 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H- β).

[2-Metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoat (41)

Bijela krutina, spoj **41** (slika 33); $R_f = 0,54$ (sustav otapala A).

1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ /ppm: 2,03 (s, CH_3), 6,62 (d, 1H, $J=7,57$ Hz, H-5), 6,83 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H- α), 7,46-7,47 (m, 3H, *m+p*-CIM), 7,69-7,71 (m, 2H, H-*o*-CIM), 7,87-7,97 (m, 4H, 2H-Ar + H- β + H-6), 8,48-8,50 (m, 2H, H-Ar).

***N*-[3-(3-Benziloksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]-3-fenil-prop-2-enamid (42)**

Bijela krutina, spoj **42** (slika 33); *t.t.* = 118,0-119,0 °C; $R_f = 0,42$ (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 1,94 (s, 3H, CH₃), 5,17 (s, 2H, CH₂Ph), 6,58 (d, 1H, $J=7,4$ Hz, H-5), 6,80 (d, 1H, $J=15,7$ Hz, H- α), 7,06 (dd, 1H, $J=7,9, 1,27$ Hz, H-Ar), 7,35-7,46 (m, 8H, 5H, CH₂Ph, 3H, $m+p$ -CIM), 7,54 (t, 1H, $J=8,1$ Hz, H-Ar), 7,62-7,64 (m, 2H, 1H, H-Ar, 1H, $J=7,8$ Hz, H-6), 7,70-7,74 (m, 3H, 2H, H- o -CIM, 1H, $J=15,6$ Hz, H- β) 7,86 (t, 1H, $J=1,8$ Hz, H-Ar).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 13,39 (CH₃), 73,20 (CH₂Ph), 115,73 (C-5), 117,74 (C- α), 120,32, 120,46, 121,58, 127,66 (4 CH-Ar), 128,05, 128,67, 128,87 (5 CH-Bn) 129,89, 130,01 (5 CH CIM), 134, 66 (C-CIM), 137,05 (C-Bn), 139,94 (C-6), 140,38 (C-2), 141,91 (C-3), 142,25 (C- β), 143,61 (Ar C-NHCIM), 145,32 (C-N), 165,42, 174,19 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₈H₂₄N₂O₃: 436,5. Dobiveno m/z 437,2 [M+H]⁺.

(2E)-[3-(3-Benziloksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]-3-fenilprop-2-enoat (43)

Bijeli smolasti produkt, spoj **43** (slika 33); $R_f = 0,56$ (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 1,95 (s, 3H, CH₃), 5,15 (s, 2H, CH₂Bn), 6,57 (d, 1H, $J=7,4$ Hz, H-5), 6,77 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H- α), 7,25-7,49 (m, 11H, 5H, H-Bn, 3H, H-Ar, 3H, $m+p$ CIM), 7,64 (t, 1H, $J=8,0$ Hz, H-Ar), 7,69-7,73 (m, 3H, 2H, o -CIM, 1H, $J=7,5$ Hz, H-6), 7,93 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H- β).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 13,42 (CH₃), 73,20 (CH₂), 115,78 (C-5), 116,15 (C- α), 120,69, 123,10, 123,89 (3 CH-Ar), 128,04, 128,21, 128,77, 128,87 (3 CH-Bn, 1 CH-Ar), 130,56, 130,73 (5 CH-CIM), 134,05 (C-CIM), 137,08 (C-Bn), 139,94 (C-6), 142,14 (C-2), 143,58 (C-3), 145,37 (C-N), 147,32 (C- β), 151,62 (Ar C-O-C=O), 165,03, 174,43 (C=O).

ESI MS: Izračunato za C₂₈H₂₃NO₄: 437,5. Dobiveno m/z 438,1[M+H]⁺.

N-[4-(3-Benziloksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]-3-fenil-prop-2-enamid (44)

Žuti smolasti produkt, spoj **44** (slika 33); $R_f = 0,34$ (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 1,92 (s, CH₃), 5,13 (s, 2H, CH₂Ph), 6,56 (d, 1H, $J=7,4$ Hz, H-5), 6,82 (d, 1H, $J=15,7$ Hz, H- α), 7,31 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, H-Ar), 7,36-7,40 (m, 3H, $m+p$ H-CIM), 7,43-7,47 (m, 5H, H-Bn), 7,62-7,66 (m, 2H, H- o -CIM), 7,68-7,74 (m, 2H, 1H, $J=7,4$ Hz, H-6, 1H, $J=15,7$ Hz, H- β), 7,89 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, H-Ar).

ESI-MS: Izračunato za C₂₈H₂₄N₂O₃: 436,5. Dobiveno m/z 437,2 [M+H]⁺.

(2E)-[4-(3-Benziloksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]-3-fenilprop-2-enoat (45)

Bijela krutina, spoj **45** (slika 33); *t.t.* = 154,1-155,2 °C; *R_f* = 0,56 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 1,93 (s, 3H, CH₃), 5,16 (s, 2H, CH₂-Bn), 6,57 (d, 1H, *J*=7,4 Hz, H-5), 6,78 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H- α), 7,35-7,48 (m, 12H, 5H, H-Bn, 4H, H-Ar, 3H, *m* + *p*-H-Ar CIM), 7,69-7,72 (m, 3H, 2H, *o*-H-Ar CIM, 1H, *J*=7,4 Hz, H-6), 7,93 (d, 1H, *J*=16,0 Hz, H- β).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 13,46 (CH₃), 73,18 (CH₂Ph), 115,75 (C-5), 116,21 (C- α), 123,12, 127,78 (4 CH Ar), 127,99, 128,04, 128,21 (5 CH-Bn), 128,77, 128,87, 130,7 (5 CH-CIM), 140,13 (C-6), 134,07 (C-CIM), 137,10 (C-Bn), 138,95 (C-2), 143,75 (C-3), 145,35 (C-N), 147,27 (C- β), 151,69 (Ar C-O-C=O), 165,06, 174,24 (2 C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₈H₂₃NO₄: 437,5. Dobiveno *m/z* 438.1 [M+H]⁺.

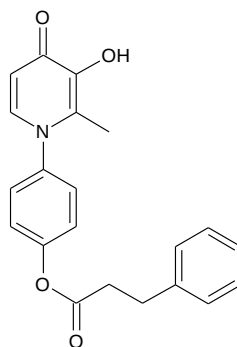
3.8. Priprava [4-(3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]-3-fenilpropanoata (**46**)

Spoju **45** (37,9 mg) dodani su DCM (3 mL), MeOH (3 mL) i Pd/C (10 %, 11 mg). Hidrogenoliza je provedena pod tlakom od 22 psi u trajanju 2,5 h. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A) uz UV detekciju. Reakcijska smjesa je obrađena prema postupku opisanom u poglavlju 3.5.1. Dobivena je bijela krutina, spoj **46** (slika 34); *t.t.* = 157,5-158,6 °C; *R_f* = 0,69 (sustav otapala A).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 2,14 (s, 3H, CH₃), 2,94-2,99 (m, 2H, H- α), 3,06-3,10 (m, 2H, H- β), 7,21-7,25 (m, 3H, *J*=8,7 Hz, 2 H-Ar, 1H, H-5), 7,30-7,35 (m, 5H, H-Ph), 7,41-7,45 (m, 3H, *J*=8,7 Hz, 2H-Ar, 1H, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ / ppm: 12,47 (CH₃), 30,45 (C- α), 35,33 (C- β), 122,98, 126,10, 127,78, 128,11, 128,21 (CH), 138,06 (CH), 140,18 (C⁴), 151,52 (C⁴), 171,27 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₁H₁₉NO₄: 349,4. Dobiveno *m/z* 350.1 [M+H]⁺.



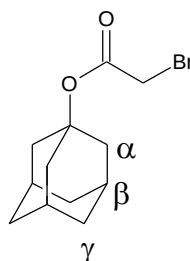
46

Slika 34. Strukturna formula molekula spoja 46

3.9. Priprava eterskih derivata *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i bromoctene kiseline (47-50)

3.9.1. Priprava (adamantan-1-il)-bromacetata (**H**)

Bromoctenoj kiseline (640 mg, 4,7 mmol) otopljenoj u suhom toluenu (6,4 mL), dodan je adamantan-1-ol (1,2 g, 7,9 mmol) i koncentrirana sumporna kiselina (5 μ L). Reakcijska smjesa je zagrijavana uz refluks 24 h uz Dean-Starkov nastavak za uklanjanje vode. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala D) uz UV detekciju, detekciju jodom te prskanje sumpornom kiselinom uz naknadno zagrijavanje. Otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču, a dobiveni ostatak je otopljen u etil-acetatu (20 mL) i ekstrahiran je 3 puta s vodom (20 mL). Organski ekstrakt je sušen na bezvodnom Na₂SO₄, sredstvo za sušenje je odfiltrirano a otapalo upareno. Dobiveni ostatak nakon uparavanja je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela (sustav otapala D). Dobiven je žuti uljasti produkt, spoj **H** (64 %) (slika 35); R_f = 0,74 (sustav otapala D).

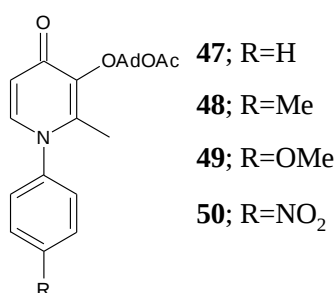
Slika 35. Strukturna formula molekule spoja **H**

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,62 (br s, 6H, H- γ), 2,05 (br s, 6H, H- α), 2,14 (br s, 3H, H- β), 4,06 (s, 2H, CH₂Br).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 28,56 (CH_2Br), 30,11 ($\text{CH}-\beta$), 35,38 ($\text{CH}_2-\gamma$), 40,48 ($\text{CH}_2-\alpha$).

3.9.2. Općeniti postupak priprave adamantilnih piridinonskih etera bromoctene kiseline (47-50)

Kao polazni spojevi za pripravu spojeva **47-50** (200 mg) korišteni su spojevi **XLIIIa-d** pripremljeni u okviru prethodnih istraživanja provedenih na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a.⁹ Spojevi (**XLIIIa-d**) otopljeni su u suhom acetonu (6 mL) nakon čega su dodani (adamantan-1-il)-bromacetat (**AdBrOAc**, **H**, 1 ekv.) i K_2CO_3 (1 ekv.). Reakcijska smjesa je refluksirana 24 h. Nakon završetka reakcije aceton je uparen, a dobiveni ostatak otopljen u DCM i ekstrahiran s 5 %-tnom otopinom NaOH. Nakon sušenja na bezvodnom Na_2SO_4 i filtriranja sredstva za sušenje, otapalo je upareno. Dobiveni ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu; **47** (sustav otapala C), **48-50** (sustav otapala A).



Slika 36. Strukturna formula molekula spojeva **47-50**

(Adamantan-1-il)-2-(1-fenil-2-metilpiridin-4-on-3-iloksi)-acetat (**47**)

Svijetlo smeđa krutina, spoj **47** (slika 36); $t.t.$ = 108,5-109,7 °C; R_f = 0,65 (sustav otapala C).

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 1,61 (br s, 6H, $\text{H}_\gamma\text{-Ad}$), 2,05 (br s, 6H, $\text{H}_\alpha\text{-Ad}$), 2,07 (s, 3H, CH_3), 2,12 (br s, 3H, $\text{H}_\beta\text{-Ad}$), 4,79 (s, 2H, CH_2O), 6,21 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, H-5), 7,43-7,47 (m, 2H, H-Ar), 7,54-7,61 (m, 3H, H-Ar), 7,60 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, H-6).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 14,25 (CH_3), 30,09 ($\text{C}_\beta\text{-Ad}$), 36,01 ($\text{C}_\gamma\text{-Ad}$), 40,77 ($\text{C}_\alpha\text{-Ad}$), 66,82 (CH_2O), 80,60 (C-Ad), 115,78 (C-5), 126,91, 129,18, 129,70 (5 CH, Ph), 139,32 (C-6), 139,69 (C-2), 141,39 (C-N), 144,36 (C-3), 168,28 (C=O, ester), 171,50 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_4$: 393,5. Dobiveno m/z 394,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(Adamantan-1-il)-2-[2-metil-(*p*-metilfenil)piridin-4-on-3-iloksi]-acetat (48)

Svijetlo smeđa krutina, spoj **48** (slika 36); *t.t.* = 152,2-153,8 °C; *R_f* = 0,53 (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,61 (br s, 6H, H γ -Ad), 2,04 (br s, 6H, H α -Ad), 2,06 (s, 3H, CH₃), 2,12 (br s, 3H, H β -Ad), 2,39 (s, CH₃-Ph), 4,78 (s, 2H, CH₂O), 6,22 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H-5), 7,30-7,38 (m, 4H, H-Ar), 7,58 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H-6).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 14,27 (CH₃), 20,55 (CH₃-Ph), 30,09 (C β -Ad), 35,43 (C γ -Ad), 40,78 (C α -Ad), 66,89 (CH₂O), 80,63 (C-Ad), 115,64 (C-5), 126,59, 130,10 (4 CH, Ph), 138,88 (1 CH, Ph), 138,96, (C-2), 139,50 (C-6), 140,15 (C-N), 144,26 (C-3), 168,26 (C=O, ester), 171,22 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₅H₂₉NO₄: 407,5. Dobiveno *m/z* 408,2 [M+H]⁺.

(Adamantan-1-il)-2-[2-metil-1-(*p*-metoksilfenil)piridin-4-on-3-iloksi]-acetat (49)

Svijetlo crvena krutina, spoj **49** (slika 36); *t.t.* = 153,8-154,4 °C; *R_f* = 0,51 (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ / ppm: 1,61 (br s, 6H, H γ -Ad), 2,04 (br s, 6H, H α -Ad), 2,06 (s, 3H, CH₃), 2,12 (br s, 3H, H β -Ad), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 4,78 (s, 2H, CH₂O), 6,18 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H-5), 7,06-7,11 (m, 2H, H-Ar), 7,34-7,39 (m, 2H, H-Ar), 7,55 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H-6).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 14,19 (CH₃), 30,08 (C β -Ad), 35,43 (C γ -Ad), 40,77 (C α -Ad), 55,44 (OCH₃), 66,82 (CH₂O), 80,57 (C-Ad), 114,62 (2 CH, Ph), 115,66 (C-5), 128,08 (2 CH, Ph), 134,29, (C-N), 139,63 (C-6), 140,14 (C-2), 144,26 (C-3), 159,30 (Ar C-OCH₃), 168,26 (C=O, ester), 171,22 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za C₂₅H₂₉NO₅: 423,5. Dobiveno *m/z* 424,3 [M+H]⁺.

(Adamantan-1-il)-2-[2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on-3-iloksi]-acetat (50)

Žuta krutina, spoj **50** (slika 36); *t.t.* = 218,3-219,7 °C; *R_f* = 0,68 (sustav otapala A).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 1,61 (br s, 6H, H γ -Ad), 2,05 (br s, 6H, H α -Ad), 2,12 (br s, 6H, CH₃, H β -Ad), 4,79 (s, 2H, CH₂O), 6,26 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H-5), 7,68 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H-6), 7,80 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H-Ar), 8,40 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H-Ar).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 14,40 (CH₃), 30,12 (C β -Ad), 35,46 (C γ -Ad), 40,79 (C α -Ad), 66,89 (CH₂O), 80,72 (C-Ad), 116,15 (C-5), 124,97 (2 CH, Ph), 128,75 (2 CH, Ph), 139,02 (C-6), 139,25 (C-2), 144,55 (C-3), 146,26 (C-N), 147,33 (Ar C-NO₂), 168,26

(C=O, ester), 171,22 (C=O).

ESI-MS: Izračunato za $C_{24}H_{26}N_2O_6$: 438,5. Dobiveno m/z 439,1 $[M+H]^+$.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Biološki se učinak derivata 3,4-HP-a u pravilu temelji na njihovoj sposobnosti kompleksiranja trovalentnih iona metala. Zahvaljujući svojoj maloj molekulskoj masi te visokoj selektivnosti za trovalentne u odnosu na dvovalentne katione metala, 3,4-HP-i idealni su kandidati za keliranje trovalentnih iona, prije svega željeza, Fe^{3+} , čije se nakupljanje u organizmu dovodi u vezu s određenim patološkim stanjima.^{1,15} Navedena svojstva te mogućnost strukturne modifikacije čine ih pogodnim strukturnim motivima za dizajn novih biološki potentnih spojeva. U prethodnim istraživanjima, provedenima na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a,⁹ opisana je priprava nekoliko *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i njihovih adamantilnih derivata u svrhu ispitivanja biološke aktivnosti s posebnim naglaskom na antiproliferativnu aktivnost.

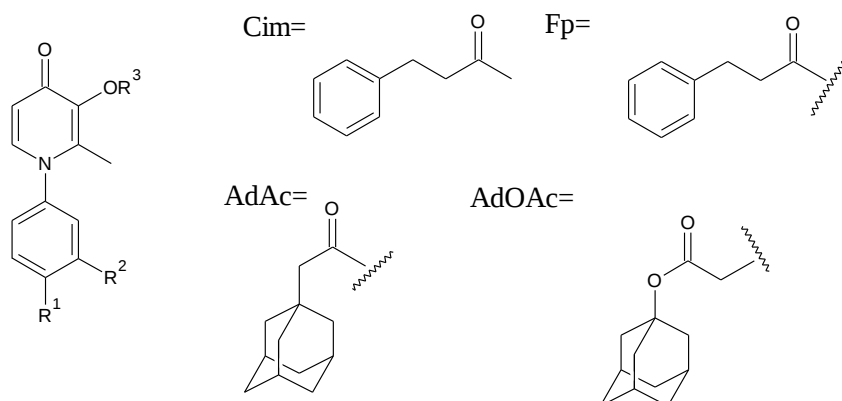
Istraživanja provedena u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju nastavak prethodnih istraživanja⁹ i uključuju pripravu *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a, njihovih lipofilnih derivata te ispitivanje *in vitro* antiproliferativne aktivnosti novopripremljenih spojeva. Arilni dio molekule 3,4-HP modificiran je na način da su uvedeni novi supstituenti u *para*-položaj aromatskog prstena čime je proširen spektar supstituenata u odnosu na prethodna istraživanja. Osim toga, u ovome radu opisana je priprava nove serije derivata 3,4-HP s različitim supstituentima u *meta*-položaju aromatskog prstena (tablica 4).

S obzirom na rezultate prethodnih istraživanja⁹ koji su pokazali kako uvođenje adamantilne podjedinice povoljno utječe na antiproliferativnu aktivnost *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a, adamantilna podjedinica pokazala se kao logičan odabir za modificiranje strukture osnovnog hidroksipiridinonskog skeleta novopripremljenih derivata *N*-aril-3,4-HP-a. Ova je podjedinica uvedena na različite položaje 3,4-HP-a pri čemu su pripremljeni derivati s esterskim, eterskim i amidnim tipom veze. Svrha pripreme ovako dizajniranih molekula bila je ispitati utjecaj položaja vezanja adamantilne podjedinice te vrste kemijske veze na antiproliferativnu aktivnost pripremljenih spojeva. Osim adamantilne podjedinice, u strukturu novih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a esterskim i amidnim tipom veze uvedena je i cimetna kiselina, nezasićena aromatska kiselina čiji derivati također pokazuju biološku

aktivnost,¹⁴ čime se željelo ispitati utjecaj promjene strukture lipofilne podjedinice na antiproliferativnu aktivnost derivata 3,4-HP-a.

Uz uvodni dio poglavlje *Rezultati i rasprava* sadrži još tri dijela. U prvome dijelu opisana je priprava *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata (poglavlje 4.2.). Drugi se dio (poglavlje 4.3.) odnosi na biološku evaluaciju pripremljenih spojeva koja je provedena ispitivanjem *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na odabranim staničnim linijama (HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva, MCF-7-stanice raka dojke, NCI-H460-stanice karcinoma pluća, PANC-1-stanice raka gušterače, THP-1-stanice akutne monocitne leukemije i na normalnoj staničnoj liniji NHLF-normalni humani plućni fibroblasti). *In vitro* antiproliferativna aktivnost pripremljenih spojeva na navedenim staničnim linijama opisana je s vrijednosti IC₅₀, odnosno koncentracijom spoja koja je potrebna za 50 %-tnu inhibiciju staničnog rasta. Treći dio (poglavlje 4.4.) obuhvaća opsežna istraživanja odnosa strukture i biološke aktivnosti, SAR, kao i proučavanje povezanosti fizikalno-kemijskih deskriptora i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti pripremljenih 3,4-HP-a. Usporedbom strukture pripremljenih spojeva i njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti izdvojeni su najpotentniji spojevi (engl. *lead compound*) pri čemu je uzeta u obzir i selektivnost njihova djelovanja. Navedeni pojam podrazumijeva kemijski spoj koji pokazuje farmakološku ili biološku aktivnost te potencijal upotrebe u terapijske svrhe. Pronalaženje najpotentnijeg spoja predstavlja ključni korak u procesu dizajna lijekova a spoj koji je izdvojen kao najpotentniji spoj je dalje podvrgnut strukturnim modifikacijam s ciljem poboljšavanja njegovih farmakokinetičkih svojstava te u konačnici s ciljem postizanja još boljeg biološkog učinka.¹⁵⁸

Tablica 4. Strukture svih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata pripremljenih u okviru ove disertacije



Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³
1	H	Me	H
2	H	OMe	H
3	H	Et	H
4	H	<i>i</i> Pr	H
5	H	<i>t</i> Bu	H
6	H	Cl	H
7	H	CF ₃	H
8	H	NO ₂	H
9	H	NH ₂	H
10	H	OH	H
11	Et	H	H
12	Pr	H	H
13	<i>i</i> Pr	H	H

Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³
14	<i>t</i> Bu	H	H
15	Cl	H	H
16	H	NO ₂	Bn
17	H	NH ₂	Bn
18	H	OH	Bn
19	H	Me	AdAc
20	H	OMe	AdAc
21	H	Et	AdAc
22	H	<i>i</i> Pr	AdAc
23	H	<i>t</i> Bu	AdAc
24	H	Cl	AdAc
25	H	CF ₃	AdAc
26	H	NO ₂	AdAc
27	Et	H	AdAc
28	Pr	H	AdAc
29	<i>i</i> Pr	H	AdAc
30	<i>t</i> Bu	H	AdAc
31	Cl	H	AdAc
32	H	NH ₂	AdAc
33	H	NHAdAc	AdAc
34	H	NHAdAc	Bn

Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³
35	H	NHAdAc	H
36	H	OAdAc	Bn
37	H	OAdAc	H
38	H	OAdAc	AdAc
39	H	Me	Cim
40	H	OMe	Cim
41	H	NO ₂	Cim
42	H	NHCim	Bn
43	H	OCim	Bn
44	NHCim	H	Bn
45	OCim	H	Bn
46	OFp	H	H
47	H	H	AdOAc
48	CH ₃	H	AdOAc
49	OCH ₃	H	AdOAc
50	NO ₂	H	AdOAc

4.2. Priprava *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona (*N*-aril-3,4-HP-a) i njihovih lipofilnih derivata

4.2.1. Priprava *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (1-15)

4.2.1.1. Priprava spojeva 1-15 u autoklavu

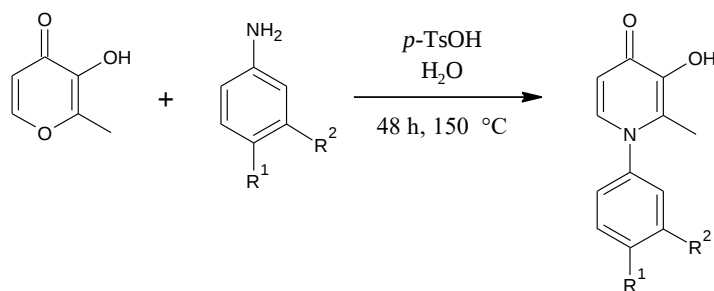
Meta- i *para*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP-i (1-15) pripremljeni su reakcijom ekvimolarnih količina odabranog hidroksipiran-4-ona, maltola, i odgovarajućih *meta*- i *para*-supstituiranih anilinskih derivata u jednom reakcijskom koraku u vodi kao otapalu uz dodatak *p*-TsOH kao katalizatora (poglavlje 3.2.). Kako je opisano u poglavlju 2.3.1. reakcija pripreme *N*-supstituiranih 3,4-HP-a jest Michaelova adicija u kojoj odgovarajući *meta*- ili *para*-supstituirani anilinski derivat ima ulogu Michaelovog donora, dok je polazni hidroksipiran-4-on, u ovom slučaju maltol, Michaelov akceptor. Odabir supstituenata u *meta*-položaju anilina načinjen je na temelju nekoliko kriterija. Prema jednome kriteriju odabrani su oni derivati anilina koji u *meta*-položaju imaju iste supstituente kao i prethodno pripremljeni *para*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP, konkretno metilnu (Me), metoksi- (OMe), nitro- (NO₂), amino- (NH₂) i hidroksilnu (OH) skupinu, kako bi se mogao usporediti utjecaj vrste i položaja supstituenta na antiproliferativnu aktivnost. Prema drugome kriteriju, uz već navedenu metilnu skupinu, odabrano je još nekoliko anilinskih derivata s alkilnim supstituentima u *meta*-položaju čijim se uvođenjem u hidroksipiridinonsku strukturu također mijenja njezina lipofilnost. Za njihovu pripravu odabrani su derivati anilina s etilnom (Et), propilnom (Pr), izopropilnom (*i*Pr) i *tert*-butilnom (*t*-Bu) skupinom u *meta*-položaju aromatskog prstena. Da bi bila moguća usporedba, uz *meta*-supstituirane alkilne *N*-aril-3,4-HP-e pripremljeni su analogni *para*-supstituirani alkilni derivati. Konačno, kao supstituenti u *meta*- i *para*-položaju odabrani su i klor te trifluormetilna skupina.

Spojevi 1-15 pripremljeni su izravnom metodom⁹¹ iz maltola i odgovarajućeg derivata anilina. Reakcija je provedena u autoklavu, a reakcijska smjesa je zagrijavana na temperaturi od 150 °C 48 h. Budući da je literaturno poznato⁹¹ kako ovakve reakcije u pravilu rezultiraju niskim prinosom, opisana metoda modificirana je na način da je reakcijskoj smjesi dodana *p*-TsOH. Dodatak kiselog katalizatora sprječava sporednu reakciju kondenzacijskih produkata nastalih reakcijom nezaštićene hidroksilne skupine polaznog hidroksipiranona s međuprodukatima koji nastaju tijekom aminacijskog koraka (poglavlje 2.3., shema 7).

Sintezu spojeva **1-15** bilo je moguće provesti u kiselim reakcijskim uvjetima s obzirom da su kao primarni amini korišteni manje bazični arilamini čija amino-skupina u navedenim uvjetima nije u potpunosti protonirana što omogućuje nukleofilni napad dušika na nezaštićeni piranonski sustav.⁹⁵

U shemi 11 navedeni su prinosi reakcija dobivanja svih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a pripremljenih u ovome radu, pri čemu je riječ o prinosima izoliranih produkata. Najveći prinos postignut je u slučaju pripreme spoja **9** (65 %), koji u svojoj strukturi sadrži hidroksilnu skupinu u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a, i spoja **2** (33 %) s metoksi-skupinom na istome položaju. Usprkos korištenju kiselog katalizatora ostali spojevi u navedenim reakcijskim uvjetima pripremljeni su uz nizak prinos (4-33 %). Problem prilikom svih sinteza provedenih u autoklavu jest otežana izolacija produkata iz reakcijske smjese nakon provedene reakcije. Pokazalo se da u reakcijama u autoklavu nastaje velika količina nusprodukata, poput literaturno opisanih produkata nastalih polimerizacijom anilinskih derivata,¹⁵⁹ što otežava izolaciju željenog 3,4-HP-a. Nakon više ili manje uspješne izolacije produkta iz reakcijske smjese, tankoslojnom kromatografijom uočeno je da preostala reakcijska smjesa sadržava ciljne produkte onečišćene neizreagiranim polaznim reaktantima, maltolom i odgovarajućim *meta*-supstituiranim anilinskim derivatom. Tako dobivene reakcijske smjese pokušalo se pročistiti kromatografijom na stupcu (sustavi otapala A, B i C), ekstrakcijom s EtOAc i 10 %-tnom otopinom NaOH te prekrizacijom iz vode ili metanola.

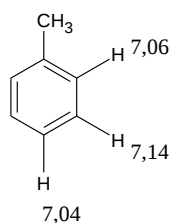
Ekstrakcijom s 10 %-tnom NaOH omogućilo bi se deprotoniranje hidroksilne skupine maltola te njegovo prevođenje u sol koja bi zaostala u vodenom sloju, dok bi polazni 3,4-HP zaostao u organskom sloju. No, zbog sličnih vrijednosti pK_a 3,4-HP-a ($pK_a = 9 - 9,5$)¹⁵ i maltola ($pK_a = 8,44$)⁹⁴ za pretpostaviti je da dolazi do deprotoniranja hidroksilne skupine oba spoja što otežava njihovo razdvajanje postupkom kiselo-bazne ekstrakcije. Navedenu reakciju pokušalo se optimizirati produljenjem vremena reakcije kao i povećanjem količine dodanog katalizatora (*p*-TsOH) što nije rezultiralo povećanjem prinosa provedenih reakcija.



1; R ¹ =H, R ² =Me (13%)	7; R ¹ =H, R ² =CF ₃ (12 %)	13; R ¹ = <i>i</i> Pr, R ² =H (6 %)	XLIIIe; R ¹ =OH, R ² =H (65 %)
2; R ¹ =H, R ² =OMe (33 %)	8; R ¹ =H, R ² =NO ₂ (13 %)	14; R ¹ = <i>t</i> -Bu, R ² =H (u tragovima)	XLIIIf; R ¹ =NH ₂ , R ² =H (55 %)
3; R ¹ =H, R ² =Et (22 %)	9; R ¹ =H, R ² =NH ₂ (4 %)	15; R ¹ =Cl, R ² =H (u tragovima)	
4; R ¹ =H, R ² = <i>i</i> Pr (17 %)	10; R ¹ =H, R ² =OH (65 %)	XLIIIb; R ¹ =Me, R ² =H (66 %)	
5; R ¹ =H, R ² = <i>t</i> -Bu (9 %)	11; R ¹ =Et, R ² =H (9 %)	XLIIIc; R ¹ =OMe, R ² =H (65 %)	
6; R ¹ =H, R ² =Cl (6 %)	12; R ¹ =Pr, R ² =H (12 %)	XLIIIId; R ¹ =NO ₂ , R ² =H (42 %)	

Shema 11. Općeniti postupak pripreme *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**1-15**) i **XLIIIb-f** u autoklavu

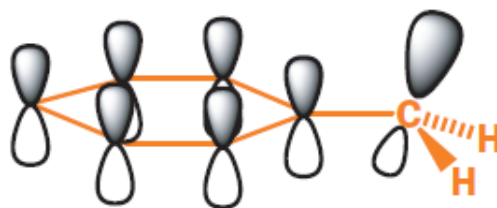
Spojevi **1**, **3-5** i **11-14** s alkilnim skupinama u *meta*- ili *para*-položaju arilnog dijela pripremljeni su reakcijom maltola i *meta*- ili *para*-supstituiranih alkilnih anilinskih derivata. Alkilne skupine doniraju elektrone preko σ -veze kojom su vezane na benzenski prsten, a takav efekt se naziva induktivna stabilizacija.¹⁶⁰ Ukoliko bi induktivni efekt bio jedini elektron-donirajući efekt, tada bi ugljikov atom aromatskog prstena na kojemu je vezana alkilna skupina imao najveću elektronsku gustoću koja bi opadala s porastom udaljenosti od mjesta vezanja, a najmanja bi bila na atomu ugljika u *para*-položaju. No, prema ¹H NMR spektru toluena, koji nam može poslužiti kao modelni spoj (slika 37), da se zaključiti kako je elektronska gustoća na atomu ugljika u *para*-položaju aromatskog prstena veća od onoga u *meta*-položaju. Što je veća elektronska gustoća oko neke jezgre, ona je zasjenjenija, a pomaci su manji.¹⁶¹



Slika 37. Pomaci vodikovih atoma u *ortho*-, *meta*- i *para*-položaju u ¹H NMR spektru toluena¹⁶¹

Za razliku od molekule fenola, kod koje je elektronski par atoma kisika konjugiran s π -elektronima aromatskog prstena, kod toluena takva konjugacija nije moguća.

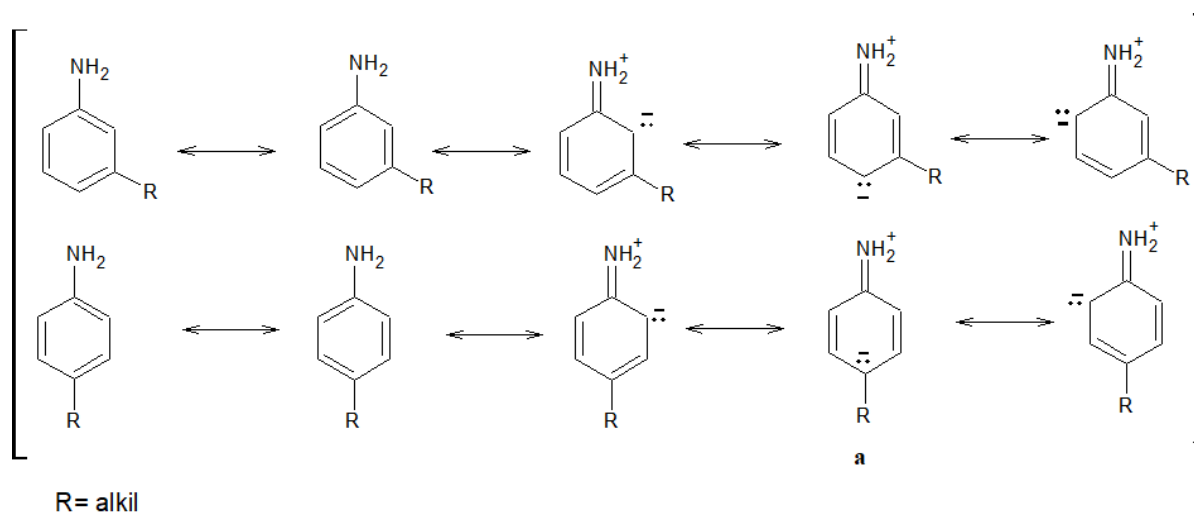
No, jedna od metilnih C-H σ -veza može ostvariti interakciju s π -elektronima aromatskog prstena. Ovakva interakcija naziva se σ -konjugacija (slika 38).¹⁶¹



Slika 38. σ -Konjugacija u molekuli toluena¹⁶¹

Konjugacija elektronskog para atoma kisika molekule fenola (rezonancijski efekt) povećava elektronsku gustoću u *ortho*- i *para*-položaju aromatskog prstena, dok σ -konjugacija djeluje na isti način ali puno slabije. U strukturi *meta*- i *para*-supstituiranih alkilnih anilinskih derivata dvije su funkcijske skupine: amino-skupina, koja posjeduje nevezni elektronski par koji konjugacijom s π -elektronima povećava elektronsku gustoću u *ortho*- i *para*-položajima aromatskog prstena, i alkilna skupina čija jedna od C-H σ -veza može ostvariti σ -konjugaciju s π -elektronima aromatskog prstena. U slučaju *para*-supstituiranih anilinskih derivata konjugacijom neveznog elektronskog para atoma dušika s π -elektronima aromatskog prstena dobivena je rezonancijska struktura u kojoj je negativni naboj na ugljikovom atomu na kojemu je vezana alkilna skupina (shema 12, struktura **a**). Takva rezonancijska struktura izrazito je nepovoljna i neznatno doprinosi rezonancijskom hibridu. Doprinos rezonancijskih struktura s nepodijeljenim nabojima kod *para*-supstituiranih anilina znatniji je u odnosu na *meta*-supstituirane aniline kod kojih delokalizacija neveznog elektronskog para atoma dušika u aromatski prsten ne rezultira takvom nepovoljnom rezonancijskom strukturom. Iz navedenog proizlazi da bi veća elektronska gustoća trebala biti na dušikovom atomu *para*-supstituiranih u usporedbi s *meta*-supstituiranim alkilnim anilinskim derivatima (shema 12), odnosno da su *para*-supstituirani alkilni anilinski derivati bolji Michaelovi donori u odnosu na njihove *meta*-supstituirane analoge. Sukladno tome, za očekivati je bilo kako će alkilni *para*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP-i biti pripravljeni u većem prinosu u odnosu na analogne alkilne *meta*-supstituirane derivate, no svi spojevi iz obiju serija pripravljeni su u relativno niskome prinosu. Izuzetak je *para*-supstituirani metilni derivat *N*-aril-3,4-HP-a (**XLIIIb**, 66 %).

Razlog niskim prinosima u reakcijama priprave svih alkilnih *N*-aril-3,4-HP-a u našem slučaju najvjerojatnije je otežana izolacija ciljnih 3,4-HP-a iz reakcijske smjese.



Shema 12. Rezonancijske strukture *meta*- i *para*-supstituiranih alkilnih anilinskih derivata

Usporedbom prinosa alkilnih *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**11-15**, 3 % (**14**)–12 % (**12**)) s prinosima literaturno opisanih spojeva,⁹ poput primjerice **XLIIIc** (65 %), koji u *para*-položaju arilnog dijela molekule sadrži metoksi-skupinu, **XLIIIf** (55 %) s amino-skupinom u *para*-položaju te **XLIIIe** s hidroksilnom skupinom u *para*-položaju (65 %), uočava se znatna razlika u prinosu. Razlog tome su, kako je prethodno opisano na primjeru fenola, elektronska svojstva polaznih *para*-supstituiranih anilinskih derivata za pripravu spojeva **XLIIIc**, **XLIIIe** i **XLIIIf**: *p*-metoksianilina, *p*-hidroksianilina i *p*-fenilendiamina. Navedeni spojevi u svojoj strukturi sadrže elektron-donirajuće skupine. Kao polazni anilinski derivat za pripravu spoja **XLIIId** korišten je *p*-nitroanilin koji u svojoj strukturi sadrži elektron-odvlačeću nitro-skupinu, zbog čega je spoj **XLIIId** pripravljen uz manji prinos (42 %). U sklopu rada pripravljeni su derivati *N*-aril-3,4-HP-a s istim skupinama u *meta*-položaju (**2**, **8-10**). Pripravljeni spojevi dobiveni su uz prinose od 4 % (**9**) – 65 % (**10**), dok su alkilni *meta*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP-i (**1**, **3-5**) pripravljeni uz prinose od 9 % (**5**) – 22 % (**3**). Spojevi **2**, **9** i **10**, analogno spojevima **XLIIIc**, **XLIIIf** i **XLIIIe**, u svojim strukturama u *meta*-položaju arilnog dijela molekule posjeduju metoksi-skupinu (**2**), amino-skupinu (**9**) i hidroksilnu skupinu (**10**) koje su elektron-donirajuće skupine, dok spoj **8** posjeduje nitro-skupinu kao elektron-odvlačeću skupinu, analogno spoju **XLIIId**. Pripravljenim spojevima **1-15** ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost na odabranim staničnim linijama (tablica D1, poglavlje 4.2.).

Pripravom spojeva **1-10** koji u svojoj strukturi posjeduju različite supstituente u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a, bilo je moguće ispitati utjecaj prirode supstituenta na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost 3,4-HP-a te usporediti dobivene rezultate s onima dobivenim za analogne *para*-supstituirane *N*-aril-3,4-HP-e, spojeve **11-15** te ranije pripravljene spojeve **XLIIb-XLIIIf**.⁹ Na temelju ovakvog dizajna osnovnih hidroksipiridinonskih derivata moguće je doći do spoznaja ne samo o utjecaju prirode supstituenta već i o utjecaju položaja iste vrste supstituenta na arilnome dijelu na biološki odgovor. Osim toga, pripravljeni *meta*- (**1-10**) i *para*-hidroksipiridinoni (**11-15**) korišteni su kao polazni spojevi za pripravu lipofilnih, prvenstveno adamantilnih derivata. Priprava analognih adamantilnih derivata spojeva **XLIIb-XLIIIf**⁹ te njihov antiproliferativni učinak opisan je u prethodnim istraživanjima.⁹

4.2.1.2. Priprava odabranih *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a sintezom potpomognutom mikrovalnim zračenjem

S ciljem povećanja prinosa i čistoće *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a **11-15** provedena je njihova preliminarna sinteza u mikrovalnom reaktoru na probnoj skali (100 mg), kako je opisano u poglavlju 3.2.2. Optimiziranje reakcijskih uvjeta provedeno je na literaturno opisanom spoju **XLIIb**, koji u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a posjeduje metilnu skupinu. Spoj je ovom metodom dobiven u prinosu od 52 %. U tablici 3 navedeni su reakcijski uvjeti pripreme *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a u mikrovalnom reaktoru. Sve su reakcije trajale 1 sat uz dodatak 0,2 molarna ekvivalenta katalizatora, *p*-TsOH. Izuzetak je bio spoj **12** s propilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a, za čiju je pripravu u mikrovalnom reaktoru bila potrebna veća količina katalizatora (0,3 ekv.) te duže vrijeme reakcije (2 h). Usporedbom prinosa spojeva **11-15** pripravljenih u autoklavu s prinosima spojeva **11-15** pripravljenih u mikrovalnom reaktoru zaključeno je kako su, u pravilu, prinosi reakcija bolji u slučaju mikrovalne sinteze (tablica 5). Temeljem navedenog može se zaključiti kako mikrovalna sinteza predstavlja dobar alternativni način pripreme *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a pri čemu je njezina najveća prednost u odnosu na sintezu u autoklavu znatno kraće trajanje reakcija.

Tablica 5: Usporedba prinosa i vremena reakcija pripreve spojeva **11-15** a) u autoklavu i b) potpomognuta mikrovalnim zračenjem

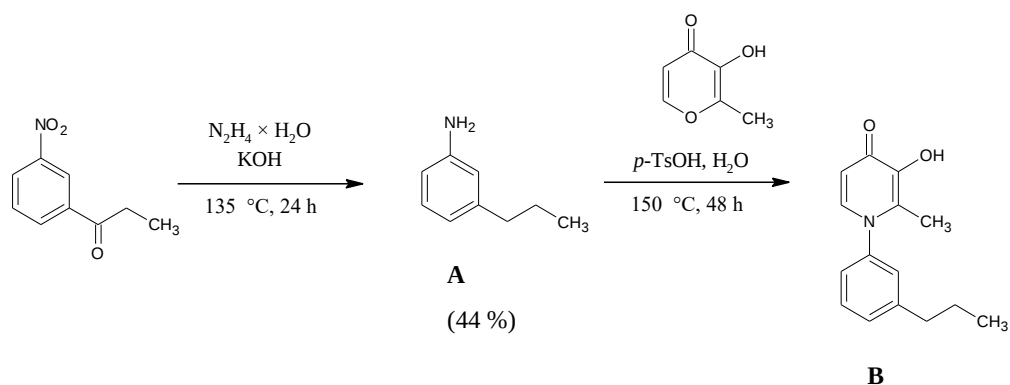
Spoj	Autoklav		Sinteza potpomognuta mikrovalnim zračenjem	
	Prinos (%)	Vrijeme reakcije (h)	Prinos (%)	Vrijeme reakcije (h)
11	9	48	17	1
12	12	48	10	2
13	6	48	26	1
14	u tragovima	48	13	1
XLIIIb	66	48	52	1
15	u tragovima	48	42	1

S obzirom na dobivene rezultate u slučaju preliminarne pripreve odabranih *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a kao mogući smjer u nastavku istraživanja nameće se pripreva analognih *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a u mikrovalnom reaktoru s ciljem povećanja prinosa i čistoće ciljnih produkata te, u konačnici, optimiziranje provedbe sinteze svih spojeva na većoj skali. Takav preliminarni pokušaj provedbe reakcije u reaktoru na nešto većoj skali (250 mg) isproban je na pripravi *p*-klor derivata **15** pri čemu je on izoliran u 72 %-tnom iskorištenju. U odnosu na sintezu u autoklavu u kojoj je spoj **15** dobiven u tragovima, sinteza u mikrovalnim uvjetima predstavlja značajan pomak u njenoj pripravi kako u pogledu prinosa tako i u pogledu čistoće spoja.

4.2.1.3. Pokušaj pripreve 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-(propilfenil)piridin-4-ona (**B**) u autoklavu

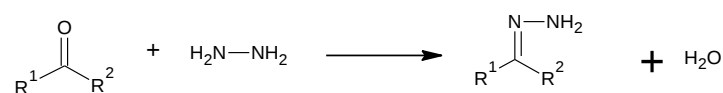
Kao jedan od alkilnih supstituenata na anilinskom prstenu izabrana je i propilna skupina, a odgovarajući *m*-propilanilin, za razliku od *p*-propilanilina, nije komercijalno dostupan te ga je bilo potrebno prethodno pripremiti. Budući da se *m*-propilanilin ne može izravno prirediti reakcijom Friedel-Craftsovog alkiliranja, kao polazni spoj za pripravu *m*-propilanilina (spoj **A**, shema 13) odabran je keton *m*-nitropropiofenon koji bi se u uvjetima Wolff-Kishnerove redukcije preveo u željeni anilinski derivat pri čemu bi se u istome koraku reducirale i nitro- i karbonilna skupina. Kao reducens u ovoj se redukciji koristi hidrazin-hidrat u bazičnim uvjetima.

Wolff-Kishnerova redukcija primarno se koristi za redukciju aldehida ili ketona kojima ne pogoduju kiseli reakcijski uvjeti, a u navedenoj reakciji dolazi do deoksigeniranja aldehida ili ketona. Deoksigeniranje je proces u kojemu se karbonilni kisikov atom zamjenjuje dvama vodikovim atomima, odnosno karbonilna skupina se reducira u metilensku.



Shema 13. Priprava *meta*-propilanilina (**A**) i 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-(propilfenil)piridin-4-ona (**B**) u autoklavu

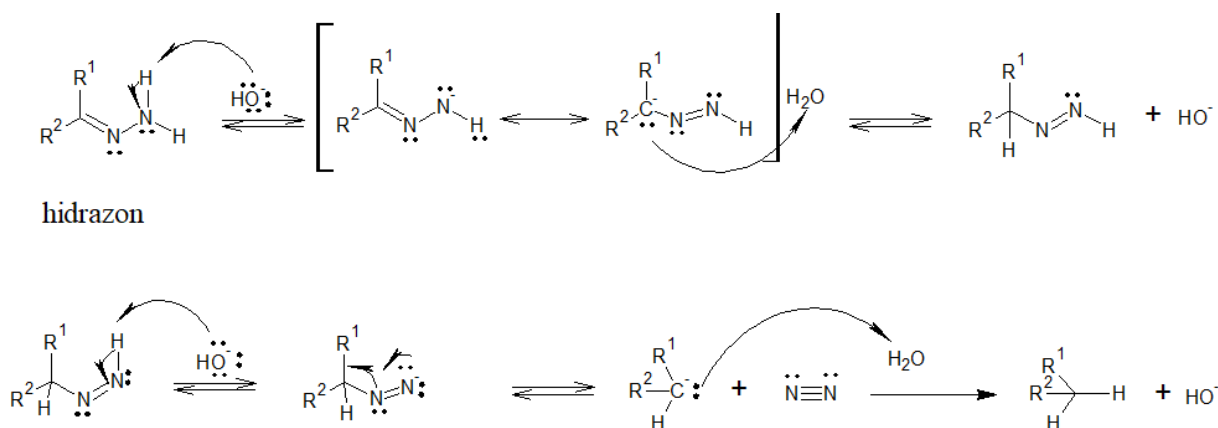
U prvim koracima Wolff-Kishnerove redukcije mehanizmom nukleofilne supstitucije nakon koje slijedi eliminacija vode keton ili aldehid prevode se u hidrazon (shema 14). Nakon toga zagrijavanjem s jakom bazom, poput KOH ili kalijeva *tert*-butoksida, dolazi do odcjepljenja drugog protona s dušika. Za ovaj korak potrebne su vrlo visoke temperature ($140\text{--}200^\circ\text{C}$), što se postiže upotrebom otapala visokog vrelišta poput etilen-glikola ili dietilen-glikola. Budući je u našem slučaju u ovoj reakciji otapalo voda, reakcija se provodi u autoklavu. Stvarni redukcijski stupanj uključuje prijenose tautomernih protona na ugljikov atom. U takvim, jako bazičnim uvjetima, za očekivati je da se prijenos protona s dušika na ugljik odvija na način da se naprije odcjepljuje proton s dušikova atoma, nakon čega se se ponovo protonira ugljikov atom. Drugo deprotoniranje daje međuprodukt s kojega se odcjepljuje dušik i nastaje karbanion koji se brzo protonira i daje produkt (shema 15).¹⁶⁰



$R^1=H$, alkil, aril

$R^2=H$, alkil, aril

Shema 14. Općeniti prikaz reakcije dobivanja hidrazona iz ketona ili aldehida¹⁶⁰



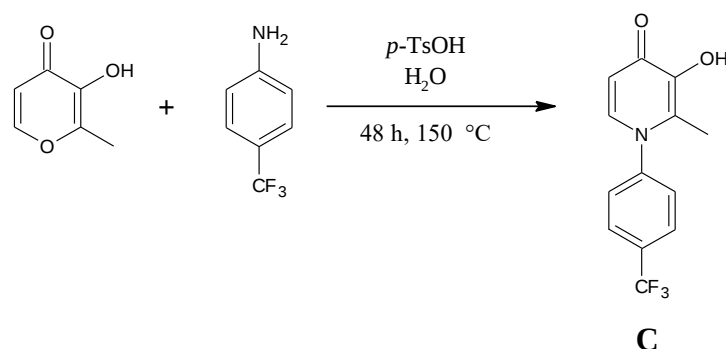
Shema 15. Mehanizam redukcije hidrazona u bazičnim reakcijskim uvjetima¹⁶⁰

Nakon pripreve *m*-propilanilina **A** 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-(propilfenil)piridin-4-on, spoj **B**, pokušalo se pripremiti analogno pripravi ostalih *N*-aril-3,4-HP-a **1-15** u autoklavu (poglavlja 3.2. i 4.2.1., shema 13). Premda se na temelju tankoslojne kromatografije moglo zaključiti da je željeni produkt nastao, nije uspješno izoliran iz reakcijske smjese niti jednim od ranije navedenih postupaka (kristalizacija hlađenjem vodene matičnice, ekstrakcija vodene matičnice s EtOAc i kromatografija na stupcu silikagela).

4.2.1.4. Pokušaj pripreve 3-hidroksi-2-metil-1-[*p*-(trifluormetil)fenil]piridin-4-ona (**C**) u autoklavu

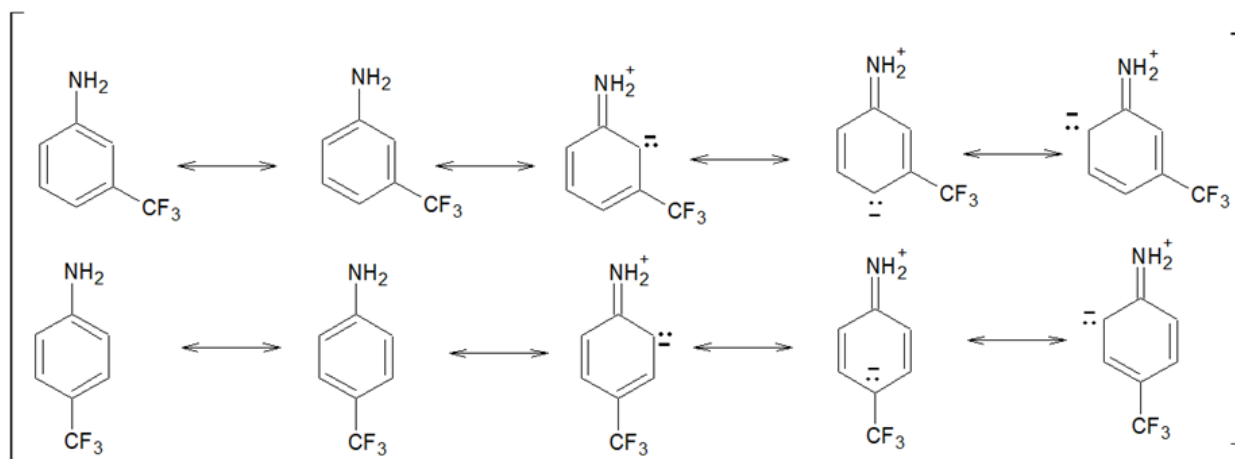
Analogni *para*-derivat spoja **7** s trifluormetilnom skupinom u *meta*-položaju arilnog dijela, spoj **C**, nije uspješno pripremljen postupkom istovjetnom postupcima pripreve *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a **1-15** prema modificiranoj literaturno opisanoj metodi⁹¹

(shema 16). Reakcija se pokušala optimizirati povećanjem količine katalizatora te produljenjem vremena reakcije, no u svim slučajevima priprava ciljnog spoja **C** nije bila uspješna.



Shema 16. Pokušaj priprave 3-hidroksi-2-metil-1-[*p*-(trifluormetil)fenil]piridin-4-ona (**C**)

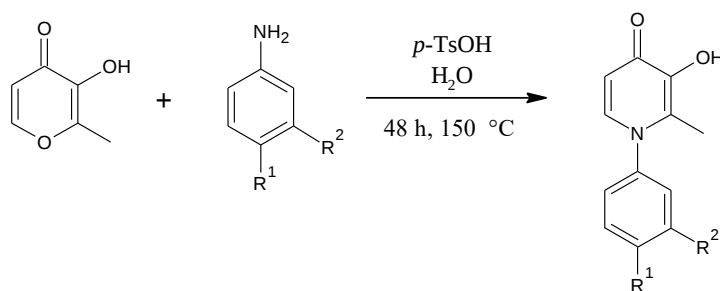
Anilinski derivat koji se, uz maltol, koristio kao polazni spoj za pripravu 3-hidroksi-2-metil-1-[*p*-(trifluormetil)fenil]piridin-4-ona u svojoj strukturi posjeduje u *para*-položaju trifluormetilnu skupinu. Trifluormetilna skupina induktivnim efektom odvlači elektronsku gustoću iz benzenskog prstena zbog velike elektronegativnosti atoma fluora. U strukturi trifluormetilanilina dvije su funkcijske skupine koje pokazuju dva suprotna efekta: amino-skupina donira elektrone rezonancijskim efektom dok trifluormetilna skupina snažnim induktivnim efektom odvlači elektrone. Na shemi 17. prikazane su rezonancijske strukture *p*-trifluormetilanilina i *m*-trifluormetilanilina. U slučaju *p*-trifluormetilanilina konjugacija neveznog elektronskog para atoma dušika s π -elektronima aromatskog prstena rezultirala je rezonancijskom strukturom u kojoj je negativni naboj na atomu ugljika s vezanom trifluormetilnom skupinom, dok u slučaju *m*-trifluormetilanilina takva rezonancijska struktura ne postoji. Rezonancijska struktura u kojoj je elektron-odvlačeća skupina vezana na atom ugljika na kojemu je negativni naboj više doprinosi rezonancijskom hibridu, što u slučaju *p*-trifluormetilanilina rezultira smanjenom elektronskom gustoćom na atomu dušika. Stoga će atom dušika *p*-trifluormetilanilina biti manje nukleofilan, odnosno *p*-trifluormetilanilin je slabiji Michaelov donor u reakciji Michaelove adicije s maltolom kao Michaelovim akceptorom, dok je *m*-trifluormetilanilin bolji Michaelov donor. Ovakvo objašnjenje predstavlja jedan od potencijalnih razloga nesuđane priprave 3-hidroksi-2-metil-1-[*p*-(trifluormetil)fenil]piridin-4-ona, reakcijom *p*-trifluormetilanilina i maltola u navedenim uvjetima.



Shema 17. Rezonancijske strukture *m*- i *p*-trifluormetilanilina

4.2.1.5. Pokušaj priprave halogenih derivata meta- i para-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**D-G**) u autoklavu

Spoj **6** je *meta*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP koji u svojoj strukturi u *meta*-položaju arilnog dijela posjeduje atom klora, dok spoj **15** posjeduje atom klora u *para*-položaju arilnog dijela hidroksipiridinonske strukture. Kao jedan od ciljeva ovog istraživanja zamišljena je i priprava analognih derivata kod kojih će u *meta*- i *para*-položaju arilnog dijela biti vezani atomi broma ili joda (shema 18). Ciljne produkte pokušalo se pripremiti na jednak način kao i *meta*- i *para*-supstituirane *N*-aril-3,4-HP-e, zagrijavanjem ekvimolarnih količina maltola i polaznog anilinskog derivata u autoklavu. Pripravom ovih spojeva bilo bi moguće ispitati utjecaj vrste te položaja halogenog elementa u strukturi 3,4-HP-a, kao i u strukturi njihovih lipofilnih derivata, na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost.



D; R¹=H, R²=Br

E; R¹=H, R²=I

F; R¹=Br, R²=H

G; R¹=I, R²=H

Shema 18. Pokušaj priprave halogenih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**D-G**)

Atomi halogenih elemenata vezani na benzenski prsten pokazuju dva suprotna efekta: doniranje elektrona konjugacijom neveznog elektronskog para s π -elektronima aromatskog prstena (rezonancijski efekt) i odvlačenje elektrona kroz σ -vezu zbog velike elektronegativnosti atoma halogenih elemenata (induktivni efekt). Induktivni elektron-odvlačeći efekt to je veći što je atom elektronegativniji, dakle opada od fluora prema bromu. Također, induktivni utjecaj opada s udaljenošću od mjesta vezanja elektronegativnog atoma. U slučaju *para*-halogeniranih anilina induktivni će efekt biti manje izražen nego kod *meta*-anilina gdje je atom halogena bliže amino-skupini. No, kod fluora će do izražaja najviše doći i suprotan efekt rezonancijskog doniranja, jer se njegove 2*p*-valentne orbitale najlakše preklapaju s 2*p*-orbitalama ugljika aromatskog prstena. Ovaj će efekt također opadati od fluora prema bromu te će dodatno ovisiti i o relativnom položaju amino-skupine i atoma halogena na benzenskom prstenu. Za očekivati je da će svi *meta*-halogenirani anilini biti lošiji Michelovi donori u pripravi *N*-aril-3,4-HP-a od *para*-derivata među kojima se posebno ističe *para*-fluoranilin s najvećom elektronskom gustoćom na atomu dušika amino-skupine. U nastavku istraživanja posebnu pažnju valjalo bi usmjeriti na pripravu *meta*- i *para*-halogeniranih derivata *N*-aril-3,4-HP-a u uvjetima mikrovalne sinteze.

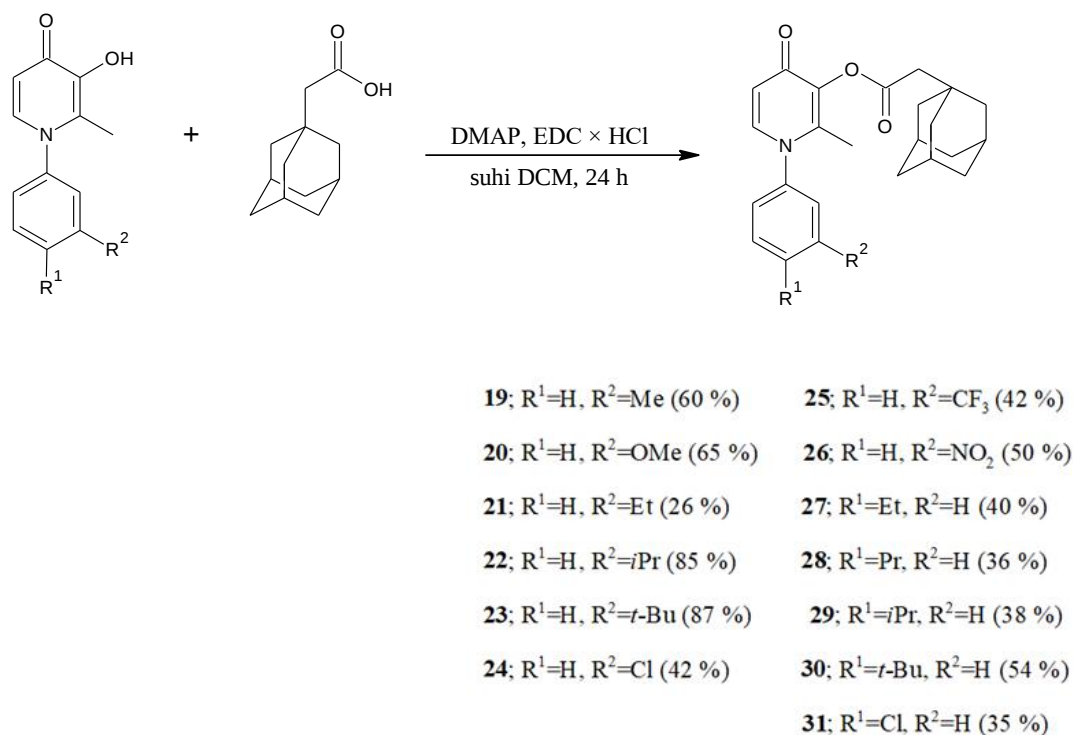
4.2.2. Priprava adamantilnih derivata meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (19-31)

U poglavlju 2.4.1. opisana je strukturna modifikacija 3,4-HP-a u svrhu povećanja njihove lipofilnosti s ciljem olakšavanja prolaska kroz biomembranu te dolaska do ciljnog mjesta djelovanja u stanicama. Prilikom prolaska kroz biomembrane stanica potencijalni kelator mora zadovoljiti nekoliko uvjeta poznatih kao Lipinski pravila.^{1,15} U skladu s tim, jedan od načina strukturne modifikacije derivata 3,4-HP-a jest na osnovnu hidroksipiridinonsku strukturu vezati podjedinice koje će povećati lipofilnost spoja te olakšati njegov prolazak kroz biomembranu. Jedna od takvih podjedinica je adamantilna podjedinica, koja osim svoje lipofilnosti ($\log P = 4,22$)⁹⁹ posjeduje i odgovarajuće strukturne karakteristike potrebne za uvođenje u strukturu biološki aktivnog spoja (poglavlje 2.4.2.)^{1,15} Navedena svojstva adamantilne podjedinice iskorištena su u ovome radu te je ona u strukturu svih pripremljenih meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a **1-15** ili njihovih benzilom zaštićenih derivata **16-18** uvedena Steglichovom metodom esterifikacije korištenjem adamantan-1-iloctene kiseline kao acilnog donora.¹⁶²

Za pripravu adamantilnih derivata **19-31** kao polazni spojevi korišteni su odgovarajući 3,4-HP-i, spojevi **1-15** (shema 19, poglavlje 3.4.). Meta- ili para-supstituirani N-aril-3,4-HP (**1-15**) otopljen je u suhom DCM, dodani su adamantan-1-iloctena kiselina (AdAcOH), 4-dimetilaminopiridin (DMAP) i N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC × HCl) u molarnom omjeru 1 : 1 : 0,1 : 1,1. Adamantilna podjedinica uvedena je u strukturu spojeva **1-15** na hidroksilnu skupinu na položaju 3 piranonskog dijela molekule 3,4-HP-a.¹⁶² Steglichova metoda esterifikacije je metoda pripreme estera u blagim reakcijskim uvjetima i koristi se za sintezu sterički zahtjevnih i nestabilnih estera, primjerice tert-butilnih estera. Tert-butanol u uvjetima Fisherove esterifikacije (kiseli reakcijski uvjeti) daje stabilni tercijarni karbokation kao međuprodukt koji teži eliminaciji pri čemu dolazi do nastanka izobutena i izostaje stvaranje ciljnog esterskog produkta. Steglichova esterifikacija podrazumijeva reakciju karboksilne kiseline i alkohola uz DMAP kao katalizator i odgovarajući karbodiimidni reagens kao aktivator, najčešće N,N'-dicikloheksilkarbodiimid (DCC). Karbodiimidni reagens aktivira karboksilnu skupinu i s karboksilnom kiselinom daje međuprodukt O-acilizourea na koji se adira alkohol pri čemu nastaje ester i dicikloheksilurea (DHU) kao međuprodukt. O-acilizourea je međuprodukt koji se, kod sporijih reakcija esterifikacije, može pregraditi u vrlo stabilnu N-acilureu čime se smanjuje prinos željene reakcije te otežava izolacija ciljnog estera.

Navedena sporedna reakcija može se spriječiti dodatkom DMAP-a koji je puno jači nukleofil nego alkohol te će brže reagirati s aktiviranim međuproduktom. Na ovaj način DMAP djeluje kao prenositelj acilne skupine.¹⁶²

Kada se kao karbodiimidni reagens koristi DCC, kao nusprodukt reakcije s aminima ili alkoholima nastaje dicikloheksilurea (DHU). Budući da se DHU zbog svoje dobre topljivosti u vodi i organskim otapalima vrlo teško uklanja iz reakcijske smjese ekstrakcijom, u reakciji priprave adamantilnih derivata *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a, spojeva **19-31**, kao aktivator je korišten EDC $\times$ HCl. Za razliku od DCC-a, EDC kao nusprodukt reakcije s alkoholima ili aminima daje ureu koja je topljiva u vodi i vrlo se lako uklanja iz reakcijske smjese ekstrakcijom. Spojevi **19-31** (shema 19) dobiveni su u zadovoljavajućim prinosima u rasponu od 26-85 %, ovisno o derivatu.



Shema 19. Priprava adamantilnih derivata *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**19-31**)

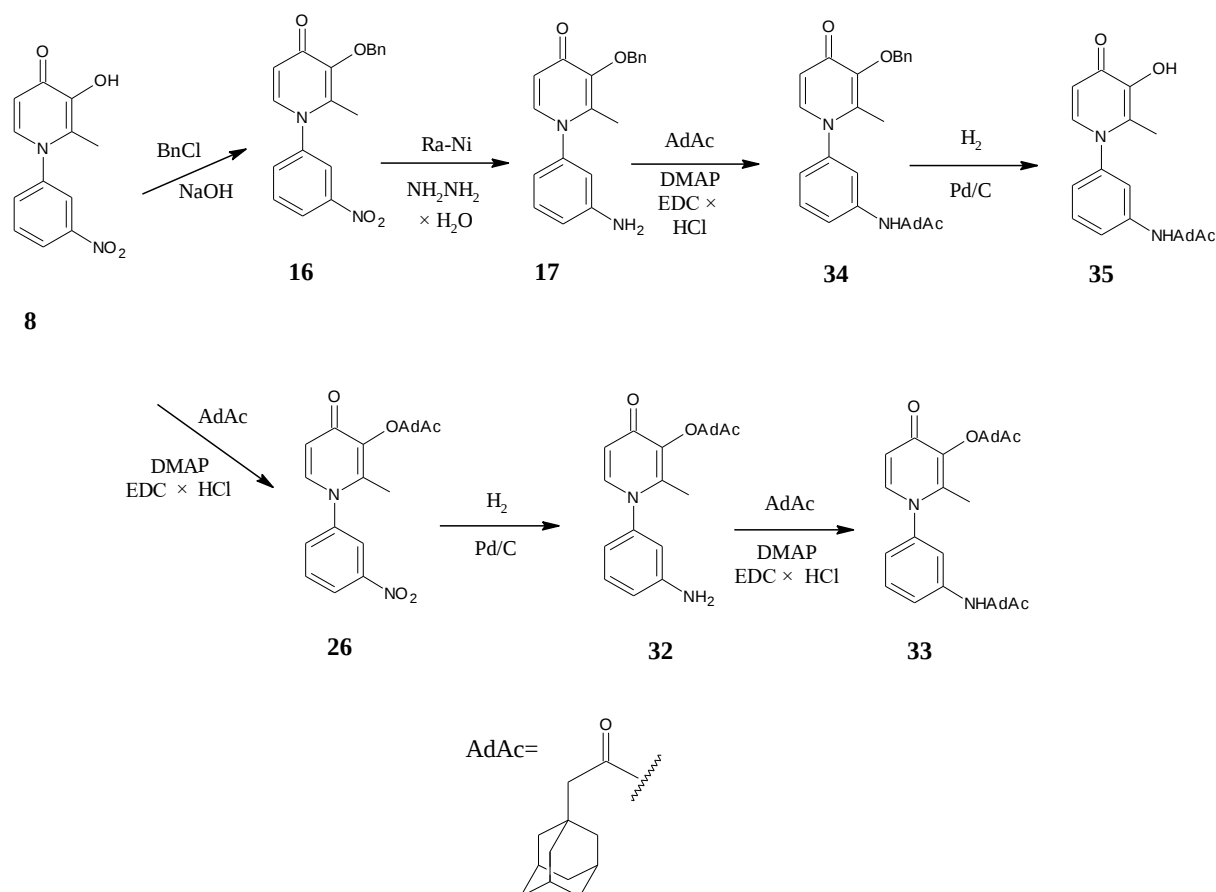
Adamantilni derivati *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a pripremljeni su kako bi im se ispitala *in vitro* antiproliferativna aktivnost i usporedila s *in vitro* antiproliferativnom aktivnošću polaznih *meta* i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (poglavlje 4.4.2.) te se dobile informacije o utjecaju lipofilne adamantilne podjedinice na biološki odgovor.

Također, usporedbom dobivenih rezultata za adamantilne derivate *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a moći će se izvesti zaključci o utjecaju vrste i položaja supstituenta na arilnom dijelu hidroksipiridinona na antiproliferativnu aktivnost.

4.2.2.1. Selektivna priprava spojeva 32-35 - adamantilnih derivata 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona **9**

1-(*m*-Aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on **9** je spoj koji u svojoj strukturi sadrži dvije funkcijske skupine, amino-skupinu i hidroksilnu skupinu, što omogućava pripravu amidnog i esterskog adamantilnog derivata. Pokušaj pripreme spoja **9** literaturno opisanim postupkom kojim je pripravljen analogni *para*-derivat nije urodio plodom te je spoj **9** u sklopu ovog rada pripravljen redukcijom nitro-derivata **8** s Ra-Ni. Nitro-derivat **8** korišten je kao polazni spoj i za selektivnu pripravu adamantilnih derivata spoja **9**, najprije benzilnom skupinom zaštićenog nitro-derivata **16** koji je pripravljen za potrebe sinteze spoja **17** (shema 20). Spoj **17** u svojoj strukturi posjeduje amino-skupinu u *meta*-položaju, čime je dobiveno dodatno mjesto za uvođenje lipofilne podjedinice i to na selektivan način budući da je hidroksilna skupina na piranonskom dijelu molekule 3,4-HP-a zaštićena benzilnom eterskom zaštitom.

Spoj **16** pripravljen je Williamsonovom sintezom etera, reakcijom spoja **8**, BnCl i NaOH u molarnom omjeru 1 : 2,3 : 1,6 (shema 20). Literaturno opisani postupak⁹⁰ modificiran je na način da je dodana dvostruko veća količina BnCl čime je, nakon kromatografskog pročišćavanja, postignut zadovoljavajući prinos produkta **16** (71 %). Kisikov atom hidroksilne skupine 3,4-HP-a je nukleofilan te može reagirati s elektrofilima pri čemu dolazi do nastanka etera ili estera. Jedan od razloga odabira benzilne zaštitne skupine, uz prednosti kao što su njezino lako uvođenje u strukturu spojeva te lako uklanjanje, jest i njezina lipofilnost ($\log P$, benzil-klorid = 2,51)⁹⁹ te se može smatrati potencijalnom lipofilnom podjedinicom za strukturnu modifikaciju *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a.



Shema 20. Priprava lipofilnih derivata 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona (32-35)

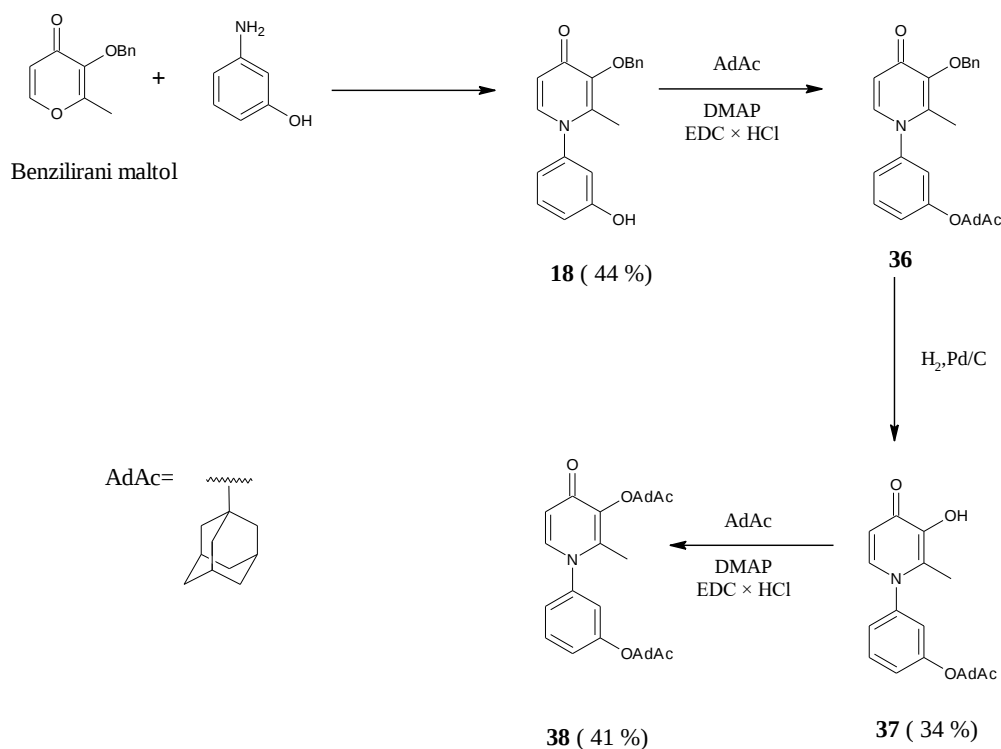
Spoj 17 pripravljen je redukcijom nitro-skupine spoja 16 s hidrazin-hidratom uz prisutnost Ra-Ni kao katalizatora u prinosu od 82 %. Reakcija je provedena prema općenitom postupku redukcije opisanom u literaturi,¹⁶³ a provođenjem reakcije u navedenim uvjetima omogućena je selektivna redukcija nitro-skupine aromatskih spojeva u amino-skupinu u prisutnosti benzilne skupine. Uz selektivnost, prednost ovakve metode jest provođenje reakcije pri atmosferskom tlaku te izbjegavanje kiselih reakcijskih uvjeta. Svrha priprave spoja 17 s amino-skupinom u *meta*-položaju arilnog dijela molekule je uvođenje dodatnog mjesta za vezanje lipofilne podjedinice u strukturu 3,4-HP-a amidnim tipom veze. Spoj 17 korišten je kao polazni spoj najprije za pripravu benzilom zaštićenog adamantilnog derivata 34, iz kojeg je uklanjanjem benzila reakcijom katalitičke hidrogenolize dobiven spoj 35, kao i benzilom zaštićenog derivata s cimetnom kiselinom, spoja 42 (shema 22). Rezultati prethodnih istraživanja⁹ pokazali su kako položaj i broj adamantilnih podjedinica u strukturi *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a znatno utječe na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost pripremljenih spojeva.

Prema tome, u okviru ovog istraživanja jedan od ciljeva bio je pripremiti derivate novih *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a koji će se razlikovati po položaju i broju adamantilnih podjedinica u svojoj strukturi, te po vrsti kemijske veze (amidna i esterska). Provedeni sintetski put (shema 20) omogućio je selektivnu pripravu esterskog (**32**), estersko-amidnog (**33**) i amidnog (**35**) adamantilnog derivata spoja **9**, kao i pripravu benzilom zaštićenog amidnog adamantilnog derivata **34**. Kako je već istaknuto, priprava spoja **34** omogućila je selektivnu pripravu amidnog derivata **35** uz prinos od 98 %. U svim slučajevima za uvođenje adamantilne podjedinice korištena je već opisana Steglichova metoda esterifikacije (poglavlje 4.2.3.). Spojevi **32-34** pripremljeni su u umjerenom do visokom prinosu (36-74 %).

Priprava spojeva **32-35** omogućila je ispitivanje utjecaja položaja i broja adamantilnih podjedinica (poglavlje 4.4.2.3.), vrste kemijske veze (esterska ili amidna, poglavlje 4.4.2.4.), kao i lipofilnosti opisane log *P* vrijednostima (poglavlje 4.4.6.) na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost pripremljenih spojeva. Dobivene IC₅₀ vrijednosti u okviru studije odnosa strukture i reaktivnosti usporedit će se s IC₅₀ vrijednostima analognih literaturno opisanih adamantilnih derivata *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**XXXVa** i **XXXVb**).⁹

4.2.2.2. Selektivna priprava spojeva **37** i **38** - adamantilnih derivata 3-hidroksi-1-(*m*-hidroksifenil)-2-metilpiridin-4-ona **10**

Spoj **10** u svojoj strukturi posjeduje dvije hidroksilne skupine, što omogućava pripravu dva monoesterska i jednog diesterskog adamantilnog derivata (shema 21). Uvođenjem benzilne zaštitne skupine u strukturu spoja **10**, pri čemu nastaje spoj **18**, omogućena je priprava esterskih adamantilnih derivata **37** i **38** koji se razlikuju prema položaju lipofilne podjedinice, kao i po svojoj lipofilnosti koja je izražena log *P* vrijednostima. Pripravom ovih spojeva bilo je moguće ispitati utjecaj lipofilnosti (log *P* vrijednosti, poglavlje 4.4.6.), položaja lipofilne podjedinice (poglavlje 4.4.2.3.) i tipa kemijske veze kojim je adamantilna podjedinica uvedena na arilni dio 3,4-HP-a (poglavlje 4.4.2.4.) na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost. Također, pripravom spojeva **37** i **38** omogućena je usporedba njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti s analognim adamantilnim derivatima *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**XXXVc** i **XXXVd**).⁹



Shema 21. Selektivna priprava spojeva **37** i **38** - adamantilnih derivata 3-hidroksi-1-(*m*-hidroksifenil)-2-metilpiridin-4-ona **10**

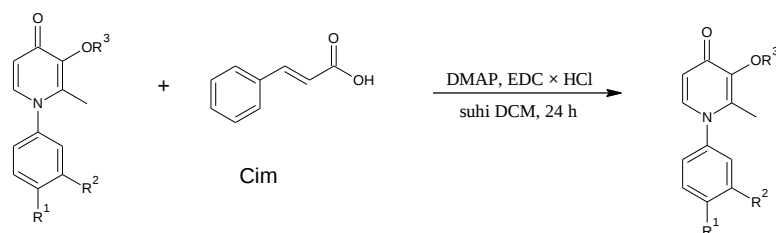
Spoj **18** pripravljen je reakcijom benziliranog maltola, pripravljenog po literaturno opisanom postupku,⁹⁰ i *m*-hidroksianilina u molarnom omjeru 1 : 2 (shema 21). Reakcijska smjesa zagrijavana je na uljnoj kupelji, u trajanju od 24 h, a reakcija je provedena bez dodatka otapala. Nakon obrade reakcijske smjese i pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela dobiven je spoj **18** uz prinos od 44 %. Za pripravu spoja **18** korištena je Harrisova metoda priprave 3,4-HP-a (poglavlje 2.3.) koja se sastoji od tri reakcijska koraka. Prvi korak je uvođenje eterske zaštite, najčešće benzilne, na hidroksilnu skupinu na položaju 3 polaznog piranona, u našem slučaju maltola. Drugi korak obuhvaća reakciju zaštićenog piranonskog sustava s primarnim aminom što rezultira formiranjem zaštićenog 3,4-HP derivata, kojem se u trećem koraku benzilna zaštitna skupina uklanja hidrogenolizom.^{7,16} Benzilom zaštićeni *meta*-hidroksi-derivat **18** korišten je kao polazni spoj za pripravu dva esterska adamantilna derivata, monoestera **37** i diestera **38**. Također, spoj **18** korišten je i kao polazni spoj za pripravu esterskog derivata s cimetnom kiselinom, spoja **43**.

Monoesterski derivat **37** pripremljen je debenziliranjem spoja **36** katalitičkom hidrogenolizom u prinosu od 34 %, dok je spoj **36** dobiven Steglichovom esterifikacijom benziliranog spoja **18**. Istim postupkom esterifikacije iz spoja **37** pripremljen je diesterski adamantilni derivat **38** (41 %). Spoj **38** može se pripremiti i reakcijom nezaštićenog spoja **10** sa suviškom adamantan-1-iloctene kiseline, no takva je reakcija rezultirala nastankom smjese produkata.

4.2.3. Priprava derivata cimetne kiseline i odabranih meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a (**39-45**)

Cimetna kiselina ((2*E*)-3-fenilprop-2-enska kiselina) nezasićena je aromatska kiselina koja pokazuje značajnu biološku aktivnost, a njezina log *P* vrijednost iznosi 2,13⁹⁹ što ju čini pogodnom lipofilnom podjedinicom za strukturnu modifikaciju 3,4-HP-a (poglavlje 2.4.3.). Jedan od ciljeva ovog istraživanja uključivao je uvođenje cimetne kiseline u strukturu novih meta- i ranije pripremljenih para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a s ciljem ispitivanja utjecaja promjene strukture lipofilne podjedinice na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost pripremljenih spojeva.

Prvotni cilj ovog istraživanja bio je uvođenje cimetne kiseline na hidroksilnu skupinu na položaju 3 piranonskog dijela molekula meta-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i priprava spojeva **39-41** postupkom Steglichove esterifikacije (shema 22). Prilikom pročišćavanja ciljnih spojeva **39-41** kromatografskim postupcima došlo je do njihovog raspada, što je potvrđeno spektroskopijom NMR gdje je bilo vidljivo da su produkti onečišćeni polaznim spojevima. Iz navedenog se moglo zaključiti da će ovi spojevi imati smanjenu stabilnost u mediju korištenom za uzgoj stanica zbog čega se odustalo od pripreme derivata ostalih meta-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a s cimetnom kiselinom te analognih para-derivata.



1; $R^1=H$, $R^2=Me$, $R^3=H$

2; $R^1=H$, $R^2=OMe$, $R^3=H$

8; $R^1=H$, $R^2=NH_2$, $R^3=H$

17; $R^1=H$, $R^2=NH_2$, $R^3=Bn$

18; $R^1=H$, $R^2=OH$, $R^3=Bn$

***p*-NH₂OBn;** $R^1=NH_2$, $R^2=H$, $R^3=Bn$

***p*-OHOBn;** $R^1=OH$, $R^2=H$, $R^3=Bn$

39; $R^1=H$, $R^2=Me$, $R^3=Cim$ (63 %)

40; $R^1=H$, $R^2=OMe$, $R^3=Cim$ (67 %)

41; $R^1=H$, $R^2=NH_2$, $R^3=Cim$ (46 %)

42; $R^1=H$, $R^2=NHCim$, $R^3=Bn$ (45 %)

43; $R^1=H$, $R^2=OCim$, $R^3=Bn$ (43 %)

44; $R^1=NHCim$, $R^2=H$, $R^3=Bn$ (58 %)

45; $R^1=OCim$, $R^2=H$, $R^3=Bn$ (9 %)

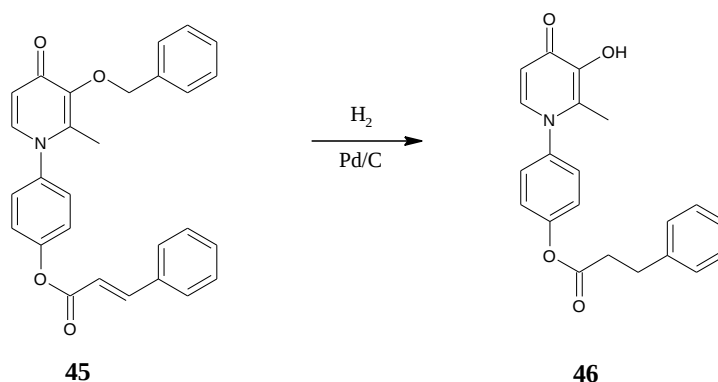
Shema 22. Priprava derivata cimetne kiseline i *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**39-45**)

Spojevi **39-41** pokazali su puno manju stabilnost u odnosu na spojeve **42** i **43** u čijim je strukturama cimetna kiselina vezana amidnom ili esterskom vezom u *meta*-položaj arilnog dijela 3,4-HP-a. Cimetna kiselina u strukturu benziliranih *meta*-amino- i hidroksi-derivata (**17** i **18**) i literaturno opisanih *para*-amino- i *para*-hidroksi-derivata 3,4-HP-a (***p*-NH₂OBn**, ***p*-OHOBn**)⁹ uvedena je amidnom i esterskom vezom na arilni dio osnovnog piridinonskog skeleta (shema 22), kao i slučaju priprave analognih adamantilnih derivata. Za uvođenje cimetne kiseline u strukturu spojeva **17** i **18**, kao i u strukturu analognih benzilom zaštićenih *para*-derivata, ***p*-NH₂OBn**) i ***p*-OHOBn**, korištena je već spomenuta Steglichova esterifikacija,¹⁶² a spojevi **42-45** dobiveni su u zadovoljavajućim prinosima (43-58 %). Na ovaj način moguće je usporedbom s analognim adamantilnim derivatima spojeva **1**, **2** i **8** ispitati utjecaj strukture lipofilne podjedinice, kao i njezine log *P* vrijednosti (log *P* (adamantan) = 4,22⁹⁹, log *P* (cimetna kiselina) = 2,13⁹⁹) na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost pripremljenih spojeva (poglavlje 4.4.6).

4.2.3.1. Priprava [4-(3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on-1-il)fenil]-3-fenilpropanoata (**46**)

Benzilnu zaštitnu skupinu pokušalo se ukloniti iz strukture spoja **45** uobičajenim postupkom hidrogenolize koja je provedena pod tlakom od 22 psi u trajanju 2,5 h (poglavlje 3.11.).

Hidrogenoliza spoja **45** rezultirala je uklanjanjem benzilne skupine ali i redukcijom dvostruke veze cimetne kiseline, odnosno navedeni reakcijski uvjeti rezultirali su pripravom spoja **46** (shema 23). Benzilnu zaštitnu skupinu pokušalo se selektivno ukloniti i reakcijom spoja **45** s BBr_3 , Lewisovom kiselinom kojom se uobičajeno uklanja eterska zaštita, no i u tom slučaju reakcija nije rezultirala željenim produktom. S obzirom da oba pokušaja uklanjanja benzilne zaštitne skupine iz strukture spoja **45** nisu bila uspješna, reakcije uklanjanja zaštitne skupine iz strukture spoja **44** nisu provedene. Također, u tablicama D1 i D5 opisani su rezultati *in vitro* antiproliferativnog testiranja na temelju kojih je vidljivo kako su derivat fenilpropanske kiseline i 3,4-HP-a, spoj **46**, kao i benzilnom skupinom zaštićeni derivati cimetne kiseline i 3,4-HP-a, **44** i **45**, pokazali slabu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na odabranim tumorskim staničnim linijama. Iz tog razloga priprava derivata fenilpropanske kiseline i drugih 3,4-HP-a nisu razmatrane te daljnji pokušaji uklanjanja benzilne skupine iz strukture analognih *meta*-derivata, spojeva **42** i **43**, nisu provedeni.



Shema 23. Priprava spoja **46**

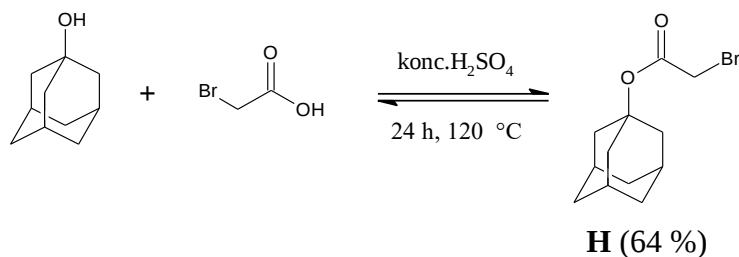
4.2.4. Priprava eterskih derivata para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i bromoctene kiseline (**47-50**)

4.2.4.1. Priprava (adamantan-1-il)-bromacetata (**H**)

Radi ispitivanja učinka vrste kemijske veze na biološku aktivnost derivata N-aril-3,4-HP-a i imajući u vidu pozitivan učinak uvođenja adamantilne podjedinice u njihovu strukturu, dizajnirani su i pripremljeni eterski derivati para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a.

Kao izvor adamantilne podjedinice odabrana je adamantan-1-il-bromoctena kiselina (spoj **H**) koju je prethodno trebalo pripremiti (shema 24). Spoj **H** pripremljen je reakcijom Fischerove esterifikacije bromoctene kiseline i adamantan-1-ola.

Kao katalizator korištena je sumporna kiselina, a adamantan-1-ol dodan je u 70 %-tnom suvišku. Reakcija je provedena u suhom toluenu kao otapalu. Fischerova esterifikacija ravnotežna je reakcija, često s nepovoljnom konstantom ravnoteže, iz tog razloga potrebno je primijeniti različite metode kako bi se esteri dobili u dobrom iskorištenju. To se može postići dodatkom velikog suviška alkohola ili kiseline čime se ravnoteža reakcije pomiče udesno (u smjeru produkata). Drugi način je dodatkom sredstva za dehidratiranje, čime se uklanja voda kao jedan od produkata ove reakcije.¹⁶⁰ U ovome radu korišten je 70 %-tni suvišak adamantan-1-ola, a voda je uklonjena iz reakcijske smjese uz Dean-Starkov nastavak. Kako bi se povećala elektrofilnost karbonilnog ugljika bromoctene kiseline te u konačnici i iskorištenje provedene reakcije, reakcijskoj smjesi je dodana sumporna kiselina kao katalizator. Ciljni produkt, (adamantan-1-il)-bromacetat **H**, nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela dobiven je uz prinos od 64 %.



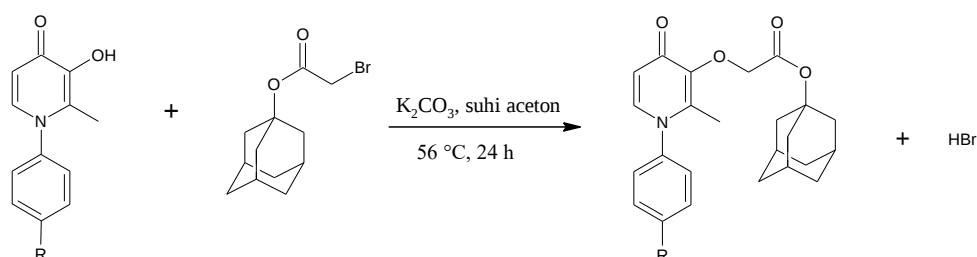
Shema 24. Priprava spoja **H**

4.2.4.2. Priprava derivata para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i bromoctene kiseline Williamsonovom sintezom etera (47-50)

Kao polazni spojevi za pripravu spojeva **47-50** korišteni su spojevi **XLIIIa-d** pripremljeni prema literaturno opisanom postupku.⁹ (Adamantan-1-il)-acetatna podjedinica uvedena je u strukturu spojeva **XLIIIa-d** Williamsonovom sintezom etera (poglavlje 4.2.2.1.). Nakon obrade reakcijske smjese i pročišćavanja produkata kromatografijom na stupcu silikagela, spojevi **47-50** dobiveni su uz prinos u rasponu od 35-55 % (shema 25). U ovome slučaju, za razliku od uvođenja benzilne skupine u strukturu 3,4-HP-a (poglavlja 3.3. i 4.2.2.), reakcije su provedene u puno blažim reakcijskim uvjetima korištenjem K_2CO_3 kao baze, za razliku od NaOH koji se koristi prilikom uvođenja benzilne skupine u strukturu 3,4-HP-a.

Reakcija priprave spojeva **47-50** odvija se mehanizmom nukleofilne supstitucije (S_N2). Iz literature¹⁶⁰ je poznato kako takvim reakcijama pogoduju primarni supstrati, prema tome (adamantan-1-il)-bromacetat kao 1° halogenoalkan predstavlja pogodan supstrat za navedenu reakciju. U suprotnom, kada halogenoalkan nije primarni, dolazi do kompeticijske reakcije

eliminacije. Reakciji eliminaciji također pogoduje povišenje temperature, prema tome reakciju je bilo potrebno provesti na nižoj temperaturi kako bi se omogućio nastanak ciljnog supstitucijskog produkta, odnosno koristiti otapalo s nižom temperaturom vrelišta. U prijelaznom stanju S_N2 reakcije manje je odvajanje nastalog naboja, pa bi solvatacija jako polarnim otapalima smanjila jakost nukleofila. Prema tome, S_N2 reakcija često se brže odvija u manje polarnim otapalima. Polarna aprotionska neće stvarati vodikove veze s nukleofilom te na taj način smanjiti njegovu reaktivnost. Oba navedena uvjeta zadovoljena su upotrebom acetona kao otapala, koje je polarno aprotionsko otapalo, a temperatura vrelišta mu je 56 °C.¹⁶⁰



47; R=H (35 %)

48; R=Me (45 %)

49; R=OMe (55 %)

50; R=NO₂ (48 %)

Shema 25. Priprava derivata *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i bromoctene kiseline **47-50**

Spojevima **47-50** ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost na odabranim staničnim linijama, no pokazalo se da eterska veza i udaljavanje adamantilnog strukturnog motiva od piridinonskog skelata nema pozitivni učinak na biološki odgovor.

4.3. Biološka evaluacija *meta-* i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata

Pripravljenim 3,4-HP-ima i njihovim derivatima ispitana je u okviru dogovorene suradnje (Fidelta d.o.o., Zagreb) *in vitro* antiproliferativna aktivnost na pet tumorskih staničnih linija: HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva, MCF-7-stanice raka dojke, NCI-H460-stanice karcinoma pluća, PANC-1-stanice raka gušterače, THP-1-stanice akutne monocitne leukemije kao i na normalnoj staničnoj liniji NHLF-normalni humani plućni fibroblasti. *In vitro* antiproliferativna aktivnost novih *meta-* i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i njihovih esterskih i amidnih derivata ispitana je pomoću MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazolijeva sol) testa. Kako je opisano u poglavlju 2.5.1. MTS test je novija izvedba MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) testa. Oba testa služe za određivanje vitalnosti stanica *in vitro* kolorimetrijskim metodama. Temelje se na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije tetrazolijeve soli u formazanski produkt koji je kod MTS testa topljiv u mediju za uzgoj stanica, dok kod MTT testa kao produkt redukcije nastaje plavi netopljivi formazan kojega je prije mjerenja potrebno otopiti dodatkom organskog otapala (sheme 9 i 10).¹⁶⁴

In vitro antiproliferativna aktivnost izražena je pomoću IC₅₀ vrijednosti, odnosno kao množinska koncentracija spoja koja uzrokuje 50 %-tnu smrtnost stanica, a služi kao pokazatelj citotoksičnosti pojedinog spoja na odabranoj staničnoj liniji (tablica 6).⁴⁴ Općenito, najaktivniji spoj na odabranim staničnim linijama je onaj spoj čija minimalna koncentracija uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju nekog staničnog procesa, u konkretnom slučaju 50 %-tnu smrtnost stanica. Spojevi čije su IC₅₀ vrijednosti > 100 μmol dm⁻³ na određenoj staničnoj liniji smatraju se neaktivnima.

U slučaju eterskih adamantilnih derivata 3,4-HP-a (**47-50**) provedeni su preliminarni testovi mjerenja *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spoja pri najvišoj početnoj množinskoj koncentraciji uobičajnoj kod ove vrste testiranja, $c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$, na dvije tumorske stanične linije, K-562 i MCF-7 te na normalnoj staničnoj liniji MDCK, a aktivnost je izražena kao postotak preživjelih stanica. Budući da su spojevi **47-50** pokazali nisku citotoksičnost pri navedenoj koncentraciji, detaljnija mjerenja, u smislu određivanja IC₅₀ vrijednosti na odabranim staničnim linijama, nisu provedena.

Tablica 6. Klasifikacija citotoksičnosti spojeva s obzirom na vrijednosti IC_{50} ⁴⁴

IC_{50} ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)	Citotoksičnost
< 1	Visoka
1-10	Umjerena
>10	Niska

4.3.1. In vitro antiproliferativna aktivnost meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata

U dodatku u tablici D1 navedene su vrijednosti IC_{50} svih testiranih *meta*- i *para*-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata na odabranim staničnim linijama. Spojevi **26**, **32** i **33** (tablica D1) nisu pokazali aktivnost na tumorskim staničnim linijama kao ni na normalnoj staničnoj liniji. Među pripremljenim spojevima istaknuo se spoj **14**, s skupinom *t*-Bu u *para*-položaju N-aril-3,4-HP-a, koji je pokazao umjerenu antiproliferativnu aktivnost s $IC_{50} \leq 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na svim tumorskim staničnim linijama, kao i na normalnoj staničnoj liniji NHLF. Spojevi **3-5**, svi s alkilnim supstituentima u *meta*-položaju N-aril-3,4-HP-a, i **29**, adamantilni *para*-izopropilni derivat N-aril-3,4-HP-a, pokazali su umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost s $IC_{50} \leq 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460, dok se spoj **19**, adamantilni derivat *meta*-metilnog N-aril-3,4-HP-a, istaknuo svojom umjerenom *in vitro* antiproliferativnom aktivnošću selektivno na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7 s vrijednošću $IC_{50} = 5,71 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Spoj **24**, adamantilni derivat N-aril-3,4-HP-a s klorom u *meta*-položaju, pokazao je umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost s vrijednostima $IC_{50} = 10,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na NCI-H460 i $IC_{50} = 11,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na normalnoj staničnoj liniji NHLF. Spoj **35**, adamantilni amidni derivat *meta*-amino N-aril-3,4-HP-a, pokazao je umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na četiri tumorske stanične linije (MCF-7, HCT-116, PANC-1 i THP-1) kao i na normalnoj staničnoj liniji s $IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

4.3.1.1. Selektivna in vitro antiproliferativna aktivnost meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata prema određenim tumorskim staničnim linijama

Jedan od ciljeva istraživanja provedenog u sklopu ove disertacije podrazumijevao je pripravu novih derivata N-aril-3,4-HP-a s poboljšanim antiproliferativnim učinkom u odnosu na spojeve pripremljene u prethodnim istraživanjima u smislu selektivnosti prema: a) određenim tumorskim staničnim linijama i b) tumorskim stanicama u odnosu na zdrave stanice.

U tablici D2 izdvojeni su spojevi koji su pokazali selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na određenim tumorskim staničnim linijama pri čemu su uzeti u obzir samo spojevi čije su IC_{50} vrijednosti $< 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ali u obzir nije uzeta njihova aktivnost ispitana na normalnoj staničnoj liniji NHLF.

Uz već spomenutu IC_{50} vrijednost, vrlo bitan pokazatelj citotoksičnosti pojedinih spojeva jest i faktor selektivnosti (engl. *Selectivity Index*, SI), koji se može definirati kao:

$$SI = IC_{50} (\text{normalna stanična linija}) / IC_{50} (\text{tumorska stanična linija}).$$

Spojevi čiji je faktor selektivnosti ≥ 10 smatraju se spojevima s potencijalnim atitumorskim djelovanjem.¹⁶⁵ Spojevi **24** i **27** pokazali su selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 uz $SI = 1,09$ (**24**) i $SI = 0,82$ (**27**), dok je spoj **46** pokazao selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na HCT-116 tumorskoj staničnoj liniji uz $SI = 0,62$. U oba slučaja vrijednosti SI iznose < 1 , što znači da spoj može biti toksičan te se ne može koristiti kao lijek. Također, spojevi **24**, **27** i **46** osim aktivnosti na navedenim tumorskim staničnim linijama pokazali su aktivnost i na normalnoj staničnoj liniji NHLF (tablica D2).

4.3.1.2. Selektivna *in vitro* antiproliferativna aktivnost meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata na tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju NHLF

U tablici D3 izdvojeni su spojevi **19**, **29** i **31** koji su pokazali selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskim staničnim linijama u usporedbi s normalnom staničnom linijom NHLF (normalni humani plućni fibroblasti), pri čemu su uzeti u obzir spojevi koji nisu pokazali *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na normalnoj staničnoj liniji NHLF, odnosno spojevi čija je vrijednost IC_{50} na normalnoj staničnoj liniji NHLF iznosila $IC_{50} > 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Sva tri izdvojena spoja, **19**, **29** i **31**, pokazali su selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na jednoj tumorskoj staničnoj liniji, uz već istaknutu neaktivnost na normalnoj staničnoj liniji (tablica D3). Spoj **19**, adamantilni meta-metilni derivat N-aril-3,4-HP-a, pokazao je selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na MCF-7 tumorskoj staničnoj liniji uz IC_{50} vrijednost od $IC_{50} = 5,71 \mu\text{mol dm}^{-3}$ te $SI > 17,51$. Spojevi **29** i **31**, oba adamantilni derivati N-aril-3,4-HP-a s izopropilnom skupinom odnosno atomom klora u para-položaju, pokazali su selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460, pri čemu se spoj **29** istaknuo svojom IC_{50} vrijednosti $IC_{50} = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i $SI > 10$.

Spojevi **19** i **29** pokazuju selektivnost prema određenoj tumorskoj staničnoj liniji bez djelovanja na normalnu staničnu liniju NHLF čime su zadovoljili oba tražena uvjeta selektivnosti te su izdvojeni kao najpotentniji spojevi (engl. *lead compounds*) s IC_{50} vrijednostima $IC_{50} = 1-10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ te $SI \geq 10$.

4.3.2. In vitro antiproliferativna aktivnost odabranih spojeva na NCI-H460 tumorskoj staničnoj liniji

Usporedbom rezultata *in vitro* antiproliferativnog testiranja (tablica D1) zaključeno je kako najveći broj pripremljenih spojeva s najnižim IC_{50} vrijednostima inhibira rast tumorske stanične linije NCI-H460. S obzirom da se navedena stanična linija pokazala najosjetljivijom na djelovanje pripremljenih *meta-* i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a kao i njihovih lipofilnih derivata, nekoliko spojeva izdvojeni su za dodatno *in vitro* antiproliferativno testiranje na NCI-H460.

Kao kandidati za dodatno *in vitro* antiproliferativno testiranje odabrani su spojevi koji su pokazali značajnu aktivnost na odabranoj tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460, spojevi **7**, **14**, **25** i **29**.

Uz navedene spojeve odabran je i spoj **19**, koji se pokazao najaktivnijim na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7, kao i spoj **1** koji je korišten kao polazni spoj za pripravu spoja **19**. Iako spoj **1** i spoj **19** nisu pokazali aktivnost u inhibiciji rasta tumorske stanične linije NCI-H460, odabrani su kao kandidati za dodatno ispitivanje *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na navedenoj tumorskoj staničnoj liniji. Na ovaj način bilo je moguće, usporedbom dobivenih rezultata, dobiti smjernice za otkrivanje mehanizma djelovanja pripremljenih spojeva.

Odabranim spojevima **1**, **7**, **14**, **19**, **25** i **29** (tablica D4) ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji, NCI-H460 uz pomoć već spomenutog testa MTS. Provedena su dva dodatna testa u kojima su mjerene količine:

- 1) ATP-a (adenozin-trifosfata) u stanicama
- 2) enzima adenilat-kinaze u mediju.

1) Molekula ATP-a je molekula bogata energijom sadržanom u dvjema fosfoanhidridnim vezama (poglavlje 2.5.1.).⁹⁷ Koncentracija ATP-a u stanicama direktno je proporcionalna količini živih stanica, a IC_{50} vrijednost predstavlja koncentraciju spoja koja je potrebna za 50 %-tno smanjenje koncentracije ATP-a u stanicama. Najbolju aktivnost pokazao je spoj **14**, derivat *N*-aril-3,4-HP-a s *tert*-butilnom skupinom u *para*-položaju, s IC_{50} vrijednosti od $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (tablica D4).

2) Drugo dodatno mjerenje uključivalo je mjerenje količine adenilat-kinaze u mediju (poglavlje 2.5.1.). Ovakvim testom određuje se integritet membrana stanice, budući da jedino kod stanica s oštećenom membranom enzim može izlaziti u stanični medij. Spojevi koji uzrokuju inhibiciju rasta stanica, u konkretnom slučaju inhibiciju rasta stanica raka pluća NCI-H460, uzrokovat će otpuštanje adenilat-kinaze u stanični medij. U ovome slučaju vrijednost IC_{50} predstavlja koncentraciju spoja koja je potrebna za 50 %-tno smanjenje koncentracije adenilat-kinaze unutar stanice. I u ovome testu najbolju aktivnost pokazao je spoj **14** s IC_{50} vrijednosti od $IC_{50} = 17,3 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (tablica D4). U ovome slučaju nije uzeta u obzir selektivnost djelovanja na tumorsku staničnu liniju NCI-H460 s obzirom na normalnu staničnu liniju NHLF. Rezultati testiranja navedeni su u dodatku u tablici D4. Spoj **19** nije pokazao aktivnost u inhibiciji rasta stanica raka pluća, NCI-H460, čime je potvrđena njegova selektivnost u inhibiciji rasta stanica raka dojke, MCF-7. U slučaju spoja **29**, koji je pokazao selektivnu aktivnost na NCI-H460 dobivene su umjerene IC_{50} vrijednosti u slučaju MTS testa i mjerenja količine ATP-a u stanicama, no spoj **29** nije pokazao aktivnost u narušavanju integriteta membrane tumorske stanične linije NCI-H460. Ostali spojevi, **1**, **7** i **25** pokazali su podjednake i umjerene *in vitro* antiproliferativne aktivnosti u sva tri provedena mjerenja.

4.4. Istraživanja odnosa strukture i biološke aktivnosti (SAR)

Osnovni princip pri istraživanju odnosa strukture i biološke aktivnosti (engl. *Structure-Activity Relationship*, SAR) polazi od pretpostavke da biološka aktivnost molekule proizlazi iz njezine strukture. Prema tome, molekule sličnih strukturnih karakteristika pokazivat će slične biološke učinke. Studija SAR opisuje strukturne karakteristike o kojima ovisi biološka aktivnost, te predstavlja kvalitativnu analizu. Može se koristiti za spojeve kojima je već ispitana biološka aktivnost u svrhu identificiranja strukturnih motiva koji su bitni za biološku aktivnost određenih spojeva te za predviđanje biološke aktivnosti novopripremljenih spojeva usporedbom njihove strukture sa strukturama biološki aktivnih spojeva. U tome slučaju, spojevi čije se strukture uspoređuju moraju biti u istoj skupini, odnosno moraju imati zajedničke strukturne karakteristike.¹⁶⁶ U okviru provedenog istraživanja svim pripremljenim spojevima ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost na odabranim staničnim linijama. Rezultati *in vitro* antiproliferativnog testiranja poslužili su, zajedno s rezultatima testiranja spojeva pripremljenih u okviru prethodnog istraživanja,⁹ za izgradnju modela SAR čime su identificirani strukturni motivi koji su bitni za *in vitro* antiproliferativnu aktivnost *N*-aril-3,4-HP-a i njihovih derivata. U tablici D5 u dodatku prikazana je SAR studija svih pripremljenih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata dok je u tablici D6 prikazana povezanost strukture i biološke aktivnosti literaturno opisanih spojeva, odabranih *para*-derivata *N*-aril-3,4-HP-a.⁹ Literaturno opisanim spojevima ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost pomoću testa MTT na četiri tumorske stanične linije od kojih su tri tumorske stanične linije istovjetne tumorskim staničnim linijama odabranim za ispitivanje *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva pripremljenih u okviru ovog istraživanja. Stoga je *in vitro* antiproliferativnu aktivnost moguće uspoređivati na trima tumorskim staničnim linijama: HCT-116, MCF-7 i NCI-H460. Literaturno opisanim spojevima ispitana je i *in vitro* antiproliferativna aktivnost na normalnim stanicama bubrega psa (MDCK, engl. *Madin Darby Canine Kidney*).

U poglavljima 4.4.1., 4.4.2. i 4.4.3. opisano je ispitivanje utjecaja promjene određenih strukturnih karakteristika pripremljenih spojeva na njihovu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na pojedinim tumorskim staničnim linijama pri čemu su istaknuti spojevi čija je $IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Utjecaj strukturnih karakteristika na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost pripremljenih spojeva na najosjetljivijoj tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 opisan je u poglavlju 4.4.4.

Utjecaj strukturnih karakteristika pripremljenih derivata *N*-aril-3,4-HP-a na selektivnost antiproliferativnog djelovanja prema određenim tumorskim staničnim linijama te prema tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju NHLF tema je poglavlja 4.4.5, dok se u poglavlju 4.4.6 raspravlja o povezanosti fizikalno-kemijskih parametara pripremljenih spojeva i njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti.

4.4.1. SAR studija novih meta- i para-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a

U prvome dijelu ovog poglavlja razmatrat će se utjecaj: a) položaja i b) strukture i prirode supstituenta na arilnom dijelu novopripremljenih meta- i para-supstituiranih derivata *N*-aril-3,4-HP-a (**1-15**) na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost. U SAR studiju uključeni su i analogni prethodno pripremljeni para-supstituirani derivati *N*-aril-3,4-HP-a, spojevi **XLIIIb-f**.⁹

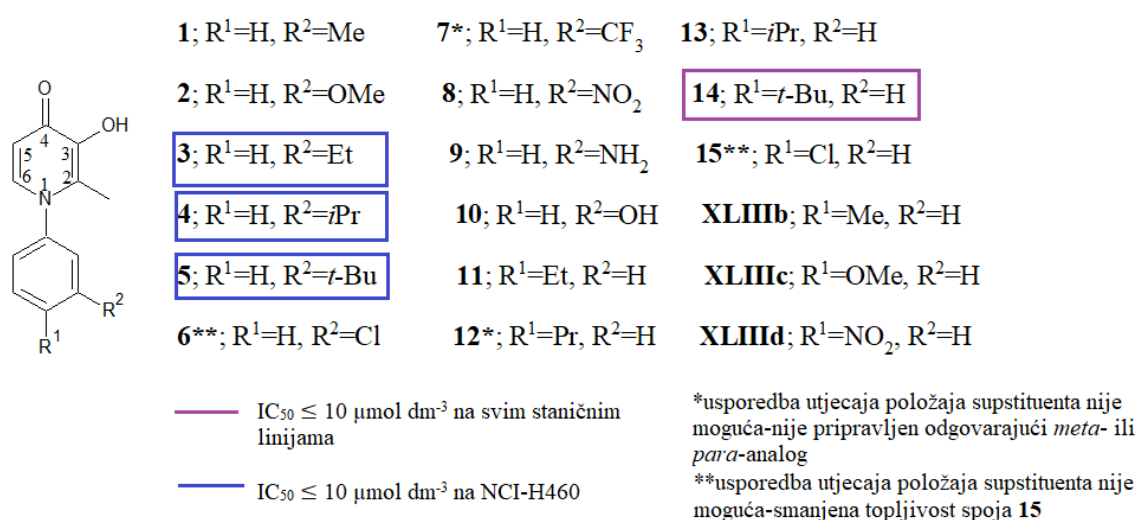
4.4.1.1. Utjecaj položaja supstituenta na arilnom dijelu na antiproliferativnu aktivnost

Usporedbom IC₅₀ vrijednosti meta- i analognih para-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a testiranih na odabranim staničnim linijama (tablice D5 i D6) moguće je ispitati utjecaj položaja supstituenta na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost svih dosad pripremljenih *N*-aril-3,4-HP-a. Na temelju podataka u tablicama D5 i D6 može se zaključiti kako položaj supstituenta na arilnom dijelu *N*-aril-3,4-HP-a ima znatan utjecaj na njihovu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost.

Među spojevima **1-10**, koji posjeduju supstituent u meta-položaju arilnog dijela molekule 3,4-HP-a, ističu se spojevi **3**, **4** i **5** s etilnom, izopropilnom i *tert*-butilnom skupinom koji su pokazali IC₅₀ < 10 μmol dm⁻³ na najosjetljivijoj tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 te prema tablici klasifikacije citotoksičnosti (tablica 6) pripadaju skupini spojeva s umjerenom *in vitro* antiproliferativnom aktivnosti (IC₅₀ = 5,5 μmol dm⁻³ (**3**), IC₅₀ = 5,7 μmol dm⁻³ (**4**), IC₅₀ = 4,9 μmol dm⁻³ (**5**)) na spomenutoj staničnoj liniji (slika 39). Njihovi analozi spojevi **11**, **13** i **14** s istim supstituentima u para-položaju u pravilu su pokazali nešto niže *in vitro* antiproliferativne aktivnosti (veće vrijednosti IC₅₀) na istoj tumorskoj staničnoj liniji (IC₅₀ = 16,7 μmol dm⁻³ (**11**), IC₅₀ = 8,7 μmol dm⁻³ (**13**), IC₅₀ = 5,6 μmol dm⁻³ (**14**)). Na temelju vrijednosti IC₅₀ meta- (**3**, **4** i **5**) i analognih para-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**11**, **13** i **14**) čini se kako je za *in vitro* antiproliferativnu aktivnost spomenutih spojeva na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 povoljniji meta-položaj alkilnog supstituenta na arilnom dijelu molekule (slika 39). Spoj **14** s *tert*-butilnom skupinom u para-položaju arilnog dijela pokazao je IC₅₀ ≤ 10 μmol dm⁻³ na svim ispitanim tumorskim staničnim linijama.

Svi spojevi s alkilnim skupinama na arilnom dijelu molekule bili su aktivni i na normalnim staničnim linijama korištenima u testovima (NHLF i MDCK). Spoj **5**, analog spoja **14** s *tert*-butilnom skupinom u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a, također je pokazao umjerene *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na svim ispitanim staničnim linijama ($IC_{50} \leq 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) osim MCF-7 ($IC_{50} = 18,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Aktivnost *meta*-metilnog derivata **1** na staničnoj liniji NCI-H460 je izostala, dok je odgovorajući *para*-derivat **XLIIIb** pokazao nisku citotoksičnost. Aktivnost spoja **12** s propilnom skupinom u *para*-položaju nije se mogla usporediti s aktivnošću analognog *meta*-derivata jer on nije uspješno pripremljen.

Ostali *meta*-supstituirani derivati *N*-aril-3,4-HP-i (**2**, **6-10**) s nealkilnim supstituentima pokazali su odsutnost *in vitro* antiproliferativne aktivnosti ili niske aktivnosti na svim tumorskim staničnim linijama s $IC_{50} > 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ što vrijedi i za analogne *para*-supstituirane *N*-aril-3,4-HP-e (**XLIIIc-f**). Svi spojevi iz obiju serija pokazali su *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na normalnim staničnim linijama, pri čemu *para*-supstituirani derivati 3,4-HP-a više od *meta*-derivata.



Slika 39. Usporedba položaja supstituenta i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti *meta*- (**1-10**) i *para*-supstituiranih (**XLIIIb-f**, **11**, **13**, **14** i **15**) *N*-aril-3,4-HP-a

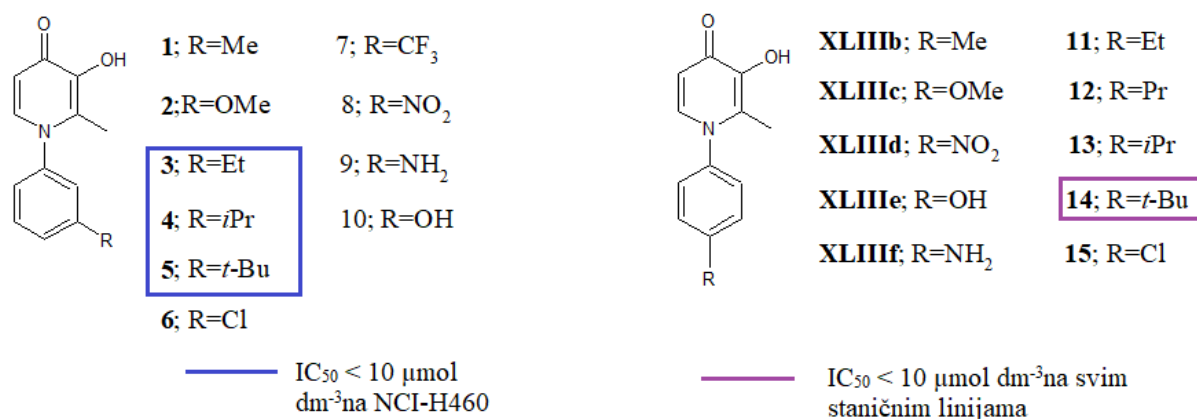
4.4.1.2. Utjecaj prirode i strukture supstituenta na arilnom dijelu na antiproliferativnu aktivnost

Spojevi **1**, **3**, **4** i **5** su *meta*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP-i koji na arilnom dijelu strukture svojih molekula posjeduju alkilne supstituente. Usporedbom vrijednosti IC_{50} na odabranim tumorskim staničnim linijama te na normalnoj staničnoj liniji NHLF, moguće je dobiti uvid o utjecaju povećanja broja ugljikovih atoma alkilnog supstituenta na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost

3,4-HP-a. U pravilu, porastom broja ugljikovih atoma supstituenta u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a dolazi do povećanja njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na većini tumorskih staničnih linija, kao i na normalnoj staničnoj liniji NHLF. Spojevi **3**, **4** i **5** pokazali su umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na NCI-H460 tumorskoj staničnoj liniji s $IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$, dok je aktivnost metilnog derivata **1** izostala.

Spojevi **2**, **6-10** u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a posjeduju polarnije skupine u odnosu na alkilne skupine (OMe, NO₂, NH₂, OH, Cl, CF₃) s elektron-donirajućim i elektron-odvlačućim učinkom. Na svim ispitanim staničnim linijama uključujući i normalnu staničnu liniju NHLF ovi su spojevi pokazali nisku citotoksičnost. Spojevi **2**, **6-9** nisu pokazali aktivnost u inhibiciji rasta tumorske stanične linije MCF-7 ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), u što se uklapa i spoj **10** sa zanemarivom aktivnošću ($IC_{50} = 94,82 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Dodatno, spojevi **8-10** ne inhibiraju rast tumorske stanične linije NCI-H460. Čini se da je učinak elektron-odvlačućih supstituenata (NO₂, CF₃ i Cl) na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost u pravilu nešto povoljniji od učinka supstituenata s elektron-donirajućim učinkom, osobito skupinom NH₂ i OH.

Usporedbom strukture i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti *meta*-derivata **1-10** zaključeno je kako prisutnost alkilnog supstituenta u *meta*-položaju arilnog dijela *N*-aril-3,4-HP-a u pravilu povećava njihov *in vitro* antiproliferativni učinak na većini tumorskih staničnih linija. Spoj **5** s *tert*-butilnom skupinom u *meta*-položaju pokazao je najvišu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 ($IC_{50} = 4,9 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Usporedbom IC_{50} vrijednosti spoja **5** na ovoj tumorskoj staničnoj liniji s vrijednostima IC_{50} ostalih alkilnih *meta*-supstituiranih derivata: **1** s metilnom skupinom ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), **3** s etilnom skupinom ($IC_{50} = 5,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i **4** s izopropilnom skupinom ($IC_{50} = 5,7 \mu\text{mol dm}^{-3}$) zaključeno je kako povećanje broja ugljikovih atoma te razgranatost ugljikovodičnog lanca povećava sposobnost *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a u inhibiciji rasta tumorske stanične linije NCI-H460 (slike 40 i 41).

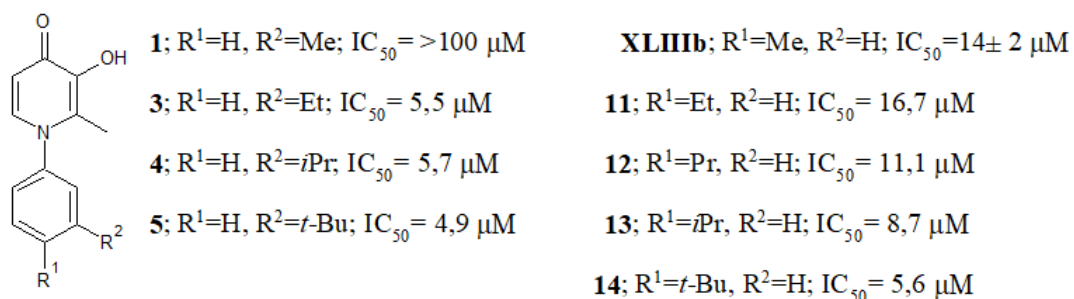


Slika 40. Usporedba strukture i prirode supstituenta i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**1-15** i **XLIIfb-f**)

Spojevi **XLIIfb**, **11-14**, analozi su spojeva **1**, **3-5** s alkilnim supstituentima u *para*-položaju na arilnom dijelu 3,4-HP-a. Spojevi **12** i **13** u svojim strukturama posjeduju supstituente s istim brojem ugljikovih atoma, ali različite strukture (slika 40): spoj **12** sadrži propilnu skupinu, a spoj **13** razgrananu izopropilnu skupinu. Spoj **13** s izopropilnom skupinom pokazao je *in vitro* antiproliferativnu aktivnost uz IC₅₀ = 8,7 μmol dm⁻³ na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 dok je aktivnost spoja **12** na navedenoj tumorskoj staničnoj liniji nešto niža (IC₅₀ = 11,1 μmol dm⁻³). Spoj **13** prema klasifikaciji citotoksičnosti (tablica 6) pripada skupini spojeva s umjerenom *in vitro* antiproliferativnom aktivnosti. Spoj **14** s *tert*-butilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela molekule pokazao je još višu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 s IC₅₀ = 5,6 μmol dm⁻³. Na temelju navedenog može se zaključiti kako je struktura alkilnog supstituenta u *para*-položaju arilnog dijela molekule 3,4-HP-a, u smislu povećanja broja ugljikovih atoma i stupnja razgranatosti alkilnog supstituenta, ključna za *in vitro* antiproliferativnu aktivnost 3,4-HP-a na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460. U pravilu, spojevi s većim brojem ugljikovih atoma alkilnog supstituenta u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a pokazali su više *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 (slika 41). Spoj **14**, osim umjerene aktivnosti na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460, pokazao je umjerene aktivnosti na svim tumorskim staničnim linijama (IC₅₀ ≤ 10 μmol dm⁻³), kao i na normalnoj staničnoj liniji NHFL. Napomenimo da je isti trend uočen i u *meta*-seriji kada je riječ o alkilnim supstituentima. Analogan *meta*-derivat spoja **12** s propilnom skupinom nije uspješno pripremljen, čime bi se teza o utjecaju

razgranosti alkilnog supstituenta u usporedbi s nerazgrananim s istim brojem atoma ugljika na antiproliferativnu aktivnost mogla dodatno potvrditi.

Spojevi **XLIIIc-f**, analogno spojevima **2**, **8-10**, u svojim strukturama u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a posjeduju supstituente koji su polarniji u odnosu na alkilne skupine. Spojevi **XLIIIc-f** pokazali su niske *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na svim tumorskim staničnim linijama ($IC_{50} = 26 \pm 3$ (**XLIIIc**, HCT-116)- $53 \pm 45 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**XLIIIe**, MCF-7)), kao i na normalnoj staničnoj liniji NHLF ($IC_{50} = 9 \pm 1$ (**XLIIIc**) - $43 \pm 4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**XLIIIe**)).



Slika 41. Usporedba strukture i prirode supstituenta i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti alkilnih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (**1-5**, **XLIIIb**, **11-15**) na NCI-H460 tumorskoj staničnoj liniji

Na temelju svega iznesenog može se zaključiti kako je utjecaj alkilnih supstituenata, bili oni u *meta*- ili *para*-položaju, na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost značajniji u odnosu na ostale supstituente s izraženijim elektron-donorskim (OMe, OH, NH₂) ili elektron-akceptorskim učinkom (NO₂, CF₃). Niti se jedan od ove serije spojeva nije istaknuo selektivnim učinkom, a također svi su pokazali aktivnost i prema normalnim staničnim linijama.

4.4.2. SAR studija adamantilnih derivata novih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a

Na temelju rezultata prethodnih istraživanja⁹ zaključeno je kako uvođenje adamantilne podjedinice u strukturu *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a u pravilu poboljšava njihovu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost. Stoga se adamantilna podjedinica pokazala kao logičan odabir za strukturnu modifikaciju novih *meta*-i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a s ciljem povećanja njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti.

Pripravljena serija ishodnih *meta*- i novih *para*-derivata *N*-aril-3,4-HP-a poslužila je ne samo ispitivanju njihovog antiproliferativnog učinka već i pripravi odgovarajućih lipofilnih adamantilnih derivata. Pripravom adamantilnih derivata *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a analognih literaturno opisanim spojevima⁹ željelo se usporediti rezultate testiranja *meta*-serije

s opisanom *para*-serijom u smislu utjecaja položaja i vrste supstituenta na arilnom dijelu molekule kao i mjesta vezanja i vrste kemijske veze kojom je vezana adamantilna podjedinica. Dodatno, pripremljeni su novi alkilni *meta*- i *para*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP-i i iz njih izvedeni adamantilni derivati čime se željelo ispitati utjecaj duljine i razgranitosti ugljikovodičnog lanca na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost kako osnovnog *N*-aril-3,4-HP-i tako i odgovarajućih adamantilnih derivata. Poglavlje 4.4.2. bavit će se upravo ovim temama.

Rezultati SAR studije navedeni su u dodatku u tablici D5 a pokazali su kako uvođenje adamantilne podjedinice u strukturu novih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a znatno utječe na njihovu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost te su pripremljeni spojevi pokazali umjerene *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na svim ispitanim staničnim linijama, uključujući i normalnu staničnu liniju NHLF.

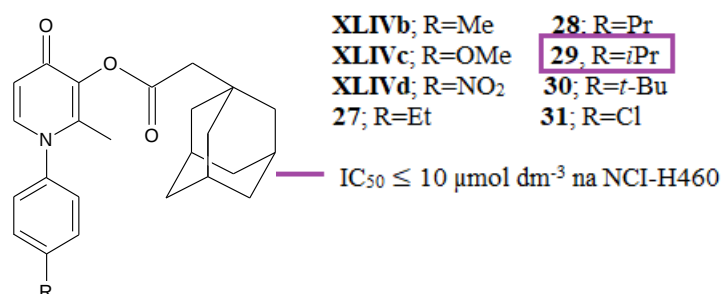
4.4.2.1. Utjecaj prirode i strukture supstituenta na antiproliferativnu aktivnost

U prethodnim istraživanjima⁹ pripremljena je serija adamantilnih derivata *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a među kojima su se svojim *in vitro* antiproliferativnim aktivnostima istaknuli amidni derivat **XXXVb** i esterski derivat **XXXVc**. Spojevi **XLIVb-d** pokazali su umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost, među kojima se istaknuo spoj **XLIVb** s metilnom skupinom u *para*-položaju, koji je u odnosu na spojeve **XLIVc** i **XLIVd** pokazao najnižu IC_{50} vrijednost na tumorskim staničnim linijama HCT-116 ($IC_{50} = 18 \pm 2 \mu\text{mol dm}^{-3}$), MCF-7 ($IC_{50} = 19 \pm 3 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i NCI-H460 ($IC_{50} = 27 \pm 7 \mu\text{mol dm}^{-3}$) te nisku *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na normalnoj staničnoj liniji MDCK ($IC_{50} = 34 \pm 15 \mu\text{mol dm}^{-3}$). U sklopu istraživanja u okviru ove doktorske disertacije željelo se ispitati utjecaj povećanja duljine, ali i stupnja razgranitosti alkilnog lanca u *para*-položaju arilnog dijela molekule 3,4-HP-a na njihovu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost. U tu svrhu odabrane su etilna, propilna, izopropilna i *tert*-butilna skupina i pripremljeni ishodni *N*-aril-3,4-HP-i **11-14** te njihovi odgovarajući adamantilni derivati **27-30**. Kako je opisano u poglavlju 4.4., *in vitro* antiproliferativnu aktivnost bilo je moguće usporediti na trima tumorskim staničnim linijama: HCT-116, MCF-7 i NCI-H460 uz normalnu staničnu liniju MDCK. Spoj **XLIVb** s metilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a pokazao je nisku *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 uz $IC_{50} = 27 \pm 7 \mu\text{mol dm}^{-3}$, dok je za spoj **27** s etilnom skupinom na istoj staničnoj liniji dobivena $IC_{50} = 13,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Aktivnost spoja **29** s izopropilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela hidrosipiridinonske strukture bila je umjerena ($IC_{50} = 10 \mu\text{mol}$

dm⁻³), a spoja **28** s propilnom skupinom nešto niža (IC₅₀ = 18,9 μmol dm⁻³), obje na staničnoj liniji NCI-H460.

Usporedbom IC₅₀ vrijednosti (tablice D5 i D6) vidljivo je kako porastom duljine alkilnog lanca u *para*-položaju arilnog dijela adamantilnih derivata 3,4-HP-a u pravilu raste *in vitro* antiproliferativna aktivnost na NCI-H460 tumorskoj staničnoj liniji. Osim navedenog, usporedbom IC₅₀ vrijednosti spojeva **28** i **29**, koji u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a posjeduju alkilnu skupinu s istim brojem ugljikovih atoma, može se zaključiti kako osim broja ugljikovih atoma na aktivnost pripremljenih spojeva utječe i razgranatost alkilne skupine. Spoj **29** s izopropilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela pokazao je bolju *in vitro* antiproliferativnu aktivnost (IC₅₀ = 10 μmol dm⁻³ na NCI-H460) u odnosu na spoj **28** s propilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela. Valja istaknuti da spoj **29** nije pokazao aktivnost na ostalim tumorskim staničnim linijama niti na normalnoj staničnoj liniji NHLF (slika 42). Usporedba aktivnosti spojeva **29** i **30**, oba s razgrananim alkilnim supstituentima u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a (*i*-Pr kod **29**, *t*-Bu kod **30**, nije bila moguća zbog smanjene topljivosti spoja **30** pri početnoj množinskoj koncentraciji ishodne otopine (*c* = 30 mmol dm⁻³), zbog čega njegovo testiranje nije bilo moguće provesti (tablice D1 i D5).

Spojevi **XLIVb**, **27-29** razlikuju se po strukturi i/ili broju ugljikovih atoma alkilnog supstituenta, a svi su osim spoja **29** pokazali *in vitro* antiproliferativne aktivnosti s IC₅₀ > 10 μmol dm⁻³ na ispitanim staničnim linijama te prema tablici klasifikacije citotoksičnosti (tablica 6) pripadaju skupini spojeva s niskom antiproliferativnom aktivnosti. Na temelju modela SAR navedenih spojeva može se zaključiti kako je za umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost pripremljenih alkilnih *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a na NCI-H460 tumorskoj staničnoj liniji ključna prisutnost izopropilne skupine.



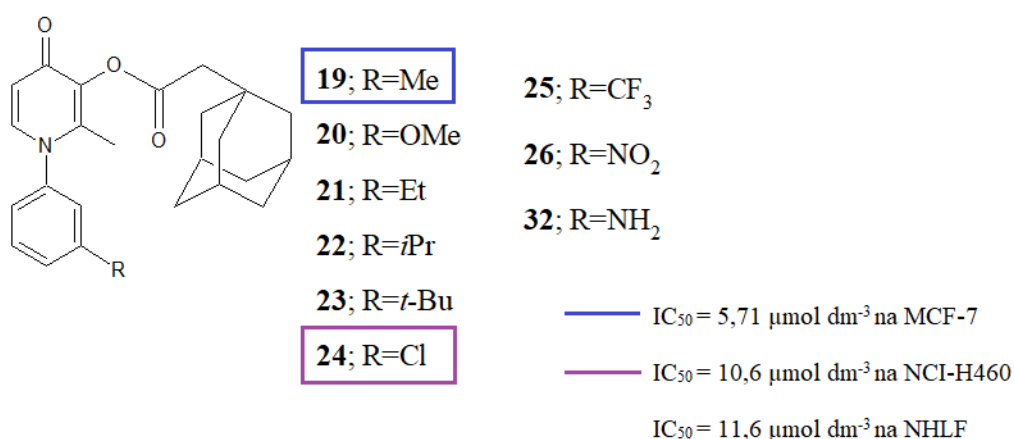
Slika 42. Usporedba prirode i strukture supstituenta na arilnom dijelu i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti adamantilnih derivata **XLIVb-d** i **27-31**

Spojevi **XLIVc**, **XLIVd** i **31** u svojim strukturama u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a posjeduju polarnije supstituente u odnosu na prethodno opisane alkilne supstituente (slika 42). Spoj **XLIVc** sadrži u *para*-položaju metoksi-skupinu, spoj **XLIVd** nitro-skupinu, a spoj **31** atom klora. Među pripremljenim spojevima niti jedan spoj nije se istaknuo svojom $IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na tumorskim staničnim linijama kao ni na normalnim staničnim linijama MDCK ili NHLF. Antiproliferativna aktivnost spoja **XLIVc** ($IC_{50} = 45 \pm 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) bila je niža u usporedbi s aktivnošću spoja **31** ($IC_{50} = 35,8 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na NCI-H460 staničnoj liniji, dok spoj **XLIVd** nije pokazao aktivnost na istoj staničnoj liniji. Prema tome, spoj **31**, koji posjeduje atom klora u *para*-položaju na arilnom dijelu 3,4-HP-a pokazao se kao bolji kandidat za inhibiciju rasta tumorske stanične linije NCI-H460. Dodatno, spoj **31** za razliku od spoja **XLIVc** nije pokazao aktivnost na ostalim tumorskim staničnim linijama, kao niti na normalnoj staničnoj liniji NHLF. Prema tome, prisutnost alkilne skupine u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a ključna je za *in vitro* antiproliferativnu aktivnost pripremljenih 3,4-HP-a na većini tumorskih staničnih linija dok je atom klora u istom položaju važan za selektivnu aktivnost na staničnoj liniji NCI-H460.

Spojevi **19-26** su adamantilni derivati *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a koji u svojim strukturama posjeduju jednake supstituente kao spojevi **XLIVb-d** i **27-31** ali na različitom položaju arilnog dijela molekule. Pripremljeni su s ciljem ispitivanja utjecaja položaja supstituenta na arilnom dijelu 3,4-HP-a na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost o čemu će biti riječ u poglavlju 4.4.2.2. No, osim navedenoga, priprava spojeva **19-26** te spoja **32** omogućila je i ispitivanje utjecaja prirode i vrste supstituenta na njihovu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost. Spojevi **19**, **21-23** u svojoj strukturi u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a posjeduju alkilne supstituente koji se razlikuju strukturom i brojem ugljikovih atoma (slika 43). Među pripremljenim spojevima istaknuo se spoj **19** s metilnom skupinom u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a koji je pokazao aktivnost samo na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7 uz $IC_{50} = 5,71 \mu\text{mol dm}^{-3}$ bez djelovanja na ostale tumorske stanične linije i normalnu staničnu liniju NHLF. Prisutnost metilne skupine u strukturi adamantilnih derivata *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a ključna je za *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7. Povećanjem broja ugljikovih atoma supstituenta u pravilu dolazi do smanjenja *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na ovoj staničnoj liniji. Izuzetak je spoj **23** koji posjeduje *tert*-butilnu skupinu u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a, a pokazao je bolju aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7 ($IC_{50} = 30,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$) u odnosu na spoj **21** s etilnom

skupinom ($IC_{50} = 63,0 \mu\text{mol dm}^{-3}$) te spoj **22** ($IC_{50} = 67,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$) s izopropilnom skupinom u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a. Spoj **23** pokazao je umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 ($IC_{50} = 9,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$), no također je pokazao sličnu aktivnost i na normalnoj staničnoj liniji NHLF ($IC_{50} = 12,7 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Može se zaključiti da je prisutnost *tert*-butilne skupine u strukturi adamantilnih derivata *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a odgovorna za *in vitro* antiproliferativni učinak na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460, ali i za umjeren do nizak antiproliferativni učinak na normalnoj staničnoj liniji NHLF.

Spojevi **20** i **24-26** te spoj **32** (slika 43) u svojoj strukturi u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a posjeduju polarnije supstituente u odnosu na spojeve **19** i **21-23** s alkilnim supstuentima u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a. Među pripravljenim spojevima niti jedan se nije istaknuo svojom *in vitro* antiproliferativnom aktivnošću s $IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Donekle se može izdvojiti spoj **24** s atomom klora u *meta*-položaju s umjerenom *in vitro* antiproliferativnom aktivnosti ($IC_{50} = 10,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460, kao i sličnom aktivnosti na normalnoj staničnoj liniji NHFL ($IC_{50} = 11,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Spoj **32** s amino-skupinom u *meta*-položaju nije pokazao aktivnost na tumorskim staničnim linijama niti na normalnoj staničnoj liniji NHLF. U pravilu, kao i u slučaju adamantilnih derivata *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a, derivati s alkilnim supstuentima u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a pokazali su bolje *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na odabranim tumorskim staničnim linijama. Izuzetak je već spomenuti spoj **24** s atomom klora u *meta*-položaju arilnog dijela molekule.

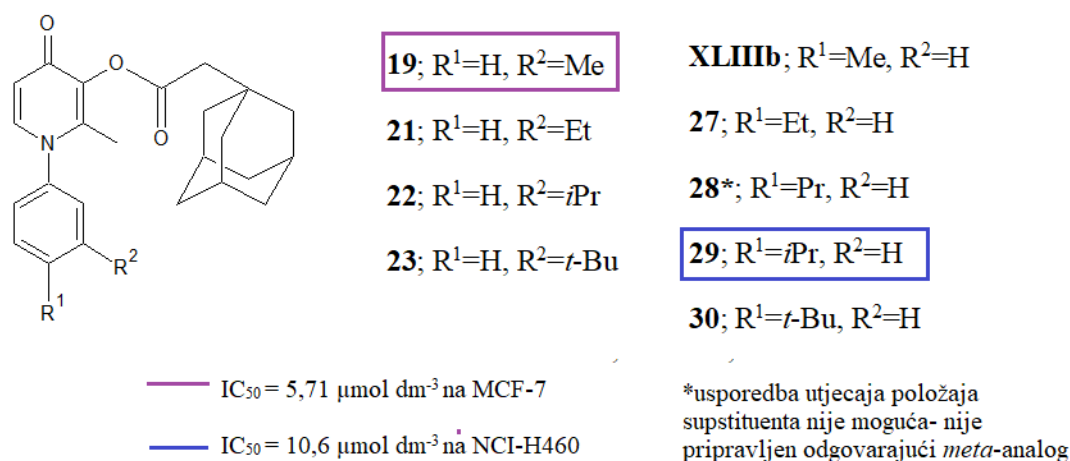


Slika 43. Usporedba strukture supstituenta na arilnom dijelu 3,4-HP-a i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva **19-26** i spoja **32**

4.4.2.2. Utjecaj položaja supstituenta na arilnom dijelu na antiproliferativnu aktivnost

Rezultati SAR studije koji su opisani u poglavlju 4.4.1. pokazali su kako uz prirodu i strukturu supstituenta na arilnom dijelu 3,4-HP-a veliki utjecaj na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost ima i njihov položaj. Slično, utjecaj prirode i strukture supstituenta na aktivnost pokazao se bitnim i kod adamantilnih derivata *N*-aril-3,4-HP-a (poglavlje 4.4.2.1.), a ovdje će se razmotriti imaju li *meta*- i *para*-položaj istog supstituenta utjecaj na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost ovih spojeva.

Pripravom adamantilnih alkilnih *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a, spojeva **19**, **21-23**, i *para*-derivata **27-30** kao i ranije pripravljenog **XLIVb** te ispitivanjem njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na 5 tumorskih staničnih linija (HCT-116, MCF-7, NCI-H460, PANC-1, THP-1) kao i na normalnim staničnim linijama, bilo je moguće dobiti sliku o utjecaju položaja alkilne skupine na arilnom dijelu na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost (tablica D5) (slika 44).

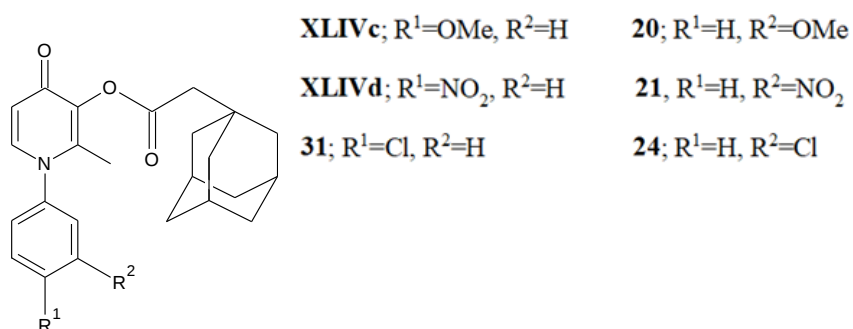


Slika 44. Usporedba položaja alkilnih supstituenta na arilnom dijelu *N*-aril-3,4-HP-a i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva **19**, **21-23**, **XLIVb**, **27-30**

Položaj alkilne skupine na arilnom dijelu 3,4-HP-a bitno utječe na rezultate *in vitro* antiproliferativnih testiranja adamantilnih derivata alkilnih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a. Među pripravljenim spojevima istaknuli su se spojevi **19** i **29** s IC₅₀ vrijednostima IC₅₀ < 10 μmol dm⁻³ na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7 (**19**) i NCI-H460 (**29**). Spoj **19** s metilnom skupinom u *meta*-položaju pokazao je puno bolju *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7 (IC₅₀ = 5,71 μmol dm⁻³) u odnosu na analogni *para*-derivat **XLIVb** (IC₅₀ = 19 ± 3 μmol dm⁻³). Dodatno, valja istaknuti da spoj **19** selektivno djeluje samo

na navedenu staničnu liniju bez djelovanja na ostale tumorske stanične linije kao i na normalne stanice NHLF (tablica D5) (slika 44). S druge strane, spoj **29**, s izopropilnom skupinom u *para*-položaju na arilnom dijelu 3,4-HP-a pokazao je puno bolju *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na NCI-H460 ($IC_{50} = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) u odnosu na spoj **22** ($IC_{50} = 16,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$) s istom skupinom u *meta*-položaju. Učinak spoja **29** na tumorsku staničnu liniju NCI-H460 također je selektivan bez djelovanja na normalnu staničnu liniju NHLF.

Parovi spojeva **20** i **XLIVc**, **24** i **31** i **26** i **XLIVd** u svojim strukturama u *meta*- i *para*-položaju arilnog dijela molekule sadrže istovrsne, no polarnije skupine u odnosu na alkilne skupine (slika 45). Usporedba aktivnosti spojeva **26** i **XLIVd** s nitro-skupinom na arilnom dijelu nije bila moguća zbog problema s topljivošću spoja **26**. Kod spojeva **20** i **XLIVc** s metoksi-skupinom na arilnom dijelu aktivnost ili izostaje ili je slaba ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$), te se nisu razmatrali. Zanimljiv rezultat dobiven je ispitivanjem aktivnosti spojeva **24** i **31** s atomom klora na odgovarajućem položaju arilnog dijela molekule. Spoj **31** s atomom klora u *para*-položaju pokazao je u odnosu na analogni *meta*-derivat, spoj **24**, slabiju *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 ($IC_{50} = 10,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**24**), $IC_{50} = 35,8 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**31**)). Za razliku od spoja **24**, spoj **31** nije pokazao aktivnost na normalnoj staničnoj liniji NHLF (tablica D5). Oba adamantilna derivata s atomom klora u *meta*- (**24**) i *para*-položaju (**31**) selektivno djeluju na staničnu liniju NCI-H460, što je komentirano u prethodnom poglavlju (poglavlje 4.4.2.1.). Osim spoja **24**, *para*-derivati **XLIVc** i **XLIVd** također pokazuju nisku aktivnost na normalnim staničnim linijama ($IC_{50} = 52 \pm 6 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**XLIVc**), $IC_{50} = 79 \pm 18 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**XLIVd**)).



Slika 45. Strukturne formule spojeva **20**, **24**, **26**, **XLIVc**, **31** i **XLIVd**

Na temelju iznesenog može se zaključiti kako položaj supstituenta na arilnom dijelu 3,4-HP-a utječe na promjenu *in vitro* antiproliferativne aktivnosti pripremljenih adamantilnih derivata, te je od značaja osobito ako govorimo o alkilnim supstituentima. Od četiri spoja koja

su se izdvojila s $IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tri su iz *meta*-serije (**19**, **23** i **24**), a jedan iz *para*-serije (**29**), tri sadrže alkilne supstituente (**19**, **23** i **29**), dok je spoj **24** klor-derivat. Promjenom položaja istog supstituenta u nekim slučajevima mijenja se i selektivnost. Najbolji primjer je *meta*-metilni derivat **19** koji pokazuje umjerenu citotoksičnost ($IC_{50} = 5,71 \mu\text{M}$) i selektivnost isključivo na staničnu liniju MCF-7 u usporedbi s neselektivnim niskim učinkom *para*-metilnog derivata **XLIIIb**.

4.4.2.3. Utjecaj položaja adamantilne podjedinice na antiproliferativnu aktivnost

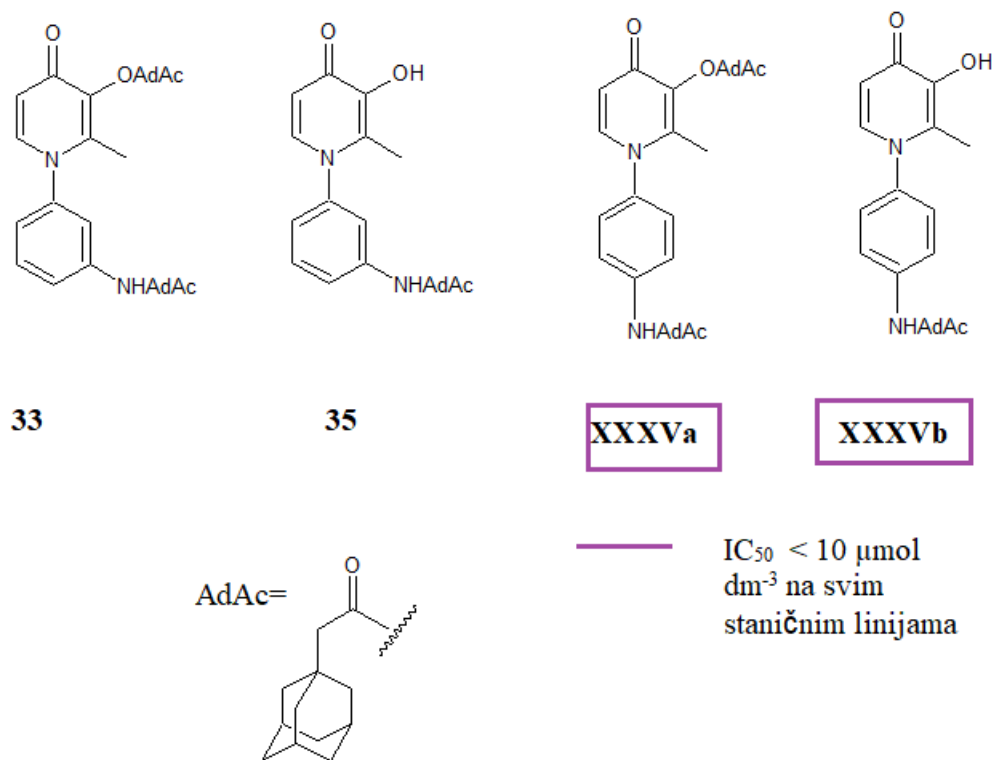
Spojevi **9** i **10** koji imaju vezane amino-skupinu i hidroksilnu skupinu u *meta*-položaju arilnog dijela molekule 3,4-HP-a posjeduju dodatno vezno mjesto za uvođenje adamantilne podjedinice. Osim vezanja adamantilne podjedinice esterskom vezom na hidroksilnu skupinu na položaju 3 piranonskog dijela molekule, supstituent na arilnom dijelu omogućuje vezanje još jedne adamantilne podjedinice bilo esterskim (OH skupina) bilo amidnim (NH_2 skupina) tipom veze. Iz navedenih derivata *N*-aril-3,4-HP-a pripravljeni su njihovi esterski, diesterski, amidni te estersko-amidni adamantilni derivati u svrhu ispitivanja utjecaja položaja adamantilne podjedinice i vrste kemijske veze na njihovu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost. Priprava analognih adamantilnih *para*-derivata ranije je opisana.⁹

Spojevi **33**, **35**, **XXXVa** i **XXXVb**, izvedeni iz osnovnih *meta*- i *para*-hidroksipiridinona s amino-skupinom na odgovarajućem položaju, imaju na istom položaju amidnom vezom vezanu adamantilnu podjedinicu. Dodatno, u strukturi spojeva **33** i **XXXVa** prisutna je još jedna adamantilana podjedinica vezana esterskom vezom na piranonskom dijelu molekule, pa su oni estersko-amidni derivati. Usporedbom *in vitro* antiproliferativnih aktivnosti navedenih spojeva, odnosno IC_{50} vrijednosti na odabranim tumorskim staničnim linijama, kao i na normalnim staničnim linijama NHLF ili MDCK, moguće je ispitati utjecaj položaja adamantilne podjedinice na arilnom dijelu 3,4-HP-a na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost amidnih adamantilnih derivata (slika 46).

Adamantilni derivati koji u svojoj strukturi posjeduju adamantilnu podjedinicu vezanu amidnom vezom u *para*-položaju arilnog dijela molekule (**XXXVa** i **XXXVb**) pokazali su umjerenu ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$) do visoku ($IC_{50} > 1 \mu\text{M}$) *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na svim ispitanim tumorskim staničnim linijama, kao i na normalnoj staničnoj liniji MDCK ($IC_{50} = 0,3 \pm 0,03 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**XXXVb**) na MCF-7 - $6 \pm 0,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**XXXVa**) na MDCK) (tablica D6). Usporedbom IC_{50} vrijednosti spoja **XXXVa**, estersko-amidnog *para*-derivata, i njegovog *meta*-

analogu, spoja **33**, na odabranim staničnim linijama moguće je komentirati utjecaj položaja adamantilne podjedinice na arilnom dijelu 3,4-HP-a na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost. Spoj **33** nije pokazao *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskim staničnim linijama kao niti na normalnoj staničnoj liniji NHLF. Za razliku od njega, spoj **XXXVa** pokazao je značajnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskim staničnim linijama HCT-116 ($IC_{50} = 2 \pm 0,9 \mu\text{mol dm}^{-3}$), MCF-7 ($IC_{50} = 1 \pm 0,9 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i NCI-H460 ($IC_{50} = 2 \pm 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) te na normalnoj staničnoj liniji MCDK ($IC_{50} = 6 \pm 0,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$).

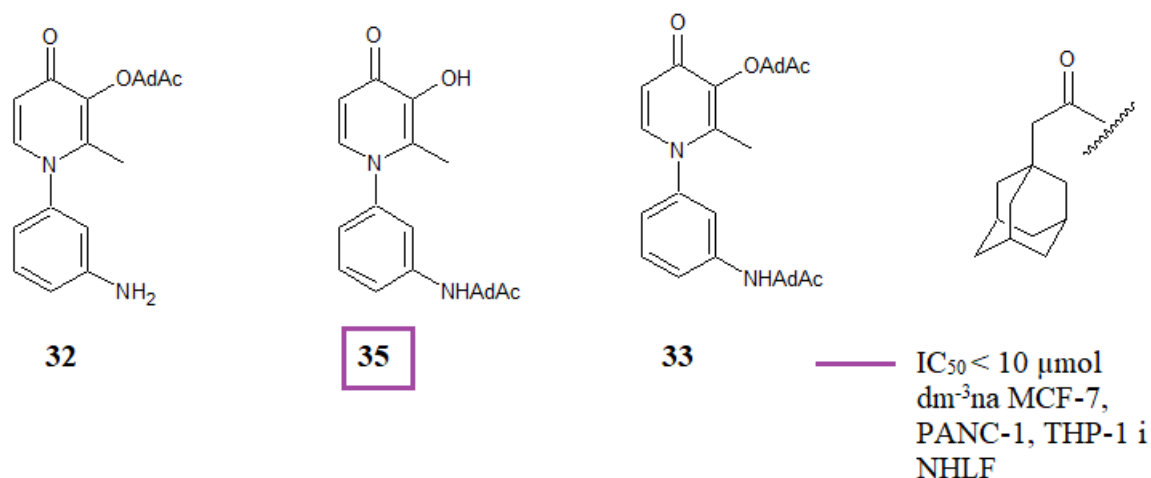
Kod drugog para amidnih monoadamantilnih analoga, spojeva **35** i **XXXVb**, i *meta*-derivat **35** pokazuje umjerene do visoke antiproliferativne aktivnosti ($IC_{50} = 1,50\text{--}2,15 \mu\text{mol dm}^{-3}$), ali je *para*-derivat **XXXVb** još efikasniji te je na svim ispitanim staničnim linijama pokazao visoku citotoksičnost ($IC_{50} < 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Premda neselektivnog djelovanja, spoj **XXXVb** najaktivniji je do sada opisani ne samo adamantilni derivat 3-hidroksipiridin-4-ona, već derivat 3,4-HP-a općenito. Možemo zaključiti kako položaj adamantilne podjedinice na arilnom dijelu 3,4-HP-a znatno utječe na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost, odnosno da je u slučaju adamantilnih derivata **33**, **35**, **XXXVa** i **XXXVb** za aktivnost na svim staničnim linijama, uključujući i normalne stanične linije NHLF ili MDCK, bitniji *para*-položaj adamantilne podjedinice na arilnom dijelu 3,4-HP-a.



Slika 46. Usporedba položaja adamantilne podjedinice i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva **33**, **35**, **XXXVa** i **XXXVb**

Utjecaj položaja adamantilne podjedinice u strukturi 3,4-HP-a na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost adamantilnih derivata 3,4-HP-a može se ispitati i usporedbom IC_{50} vrijednosti serije *meta*-derivata **32**, **33** i **35** (slika 47). Spoj **32** je adamantilni esterski derivat *N*-aril-3,4-HP-a koji posjeduje u svojoj strukturi slobodnu amino-skupinu u *meta*-položaju arilnog dijela. Već opisani spoj **35** je monoadamantilni amidni derivat sa slobodnom hidroksilnom skupinom, dok je spoj **33** diadamantilni estersko-amidni derivat. Od navedenih spojeva jedino je spoj **35**, monoadamantilni amidni derivat, pokazao značajnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost s $IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na tumorskim staničnim linijama HCT-116 ($IC_{50} = 2,15 \mu\text{mol dm}^{-3}$), MCF-7 ($IC_{50} = 2,09 \mu\text{mol dm}^{-3}$), PANC-1 ($IC_{50} = 1,50 \mu\text{mol dm}^{-3}$), THP-1 ($IC_{50} = 2,10 \mu\text{mol dm}^{-3}$), kao i na normalnoj staničnoj liniji NHLF ($IC_{50} = 4,57 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Preostala dva derivata, spoj **32** i spoj **33** nisu pokazali aktivnost niti na odabranim tumorskim staničnim linijama kao niti na normalnoj staničnoj liniji NHLF. Usporedbom njihovih struktura uočava se da je, za razliku od spoja **35**, kod spojeva **32** i **33** hidroksilna skupina na pironskom dijelu molekule blokirana adamantilnom podjedinicom. Nagađajući o mogućem mehanizmu antitumorskog djelovanja spojeva iz serije *N*-aril-3,4-HP, može se uočiti

da samo spoj **35** posjeduje slobodnu hidroksilnu skupinu bitnu za keliranje Fe^{3+} iona. Ovakvi rezultati pokazatelj su važnosti prisutnosti slobodne hidroksilne skupine u strukturi 3,4-HP-a koja omogućava keliranje Fe^{3+} iona, dok adamantilna skupina u *meta*-položaju arilnog dijela piridinonskog skeleta povećava lipofilnost spoja te olakšava njegov prolazak kroz biomembranu u skladu s Lipinski pravilima (poglavlja 2.4.1. i 4.2.3.).^{1,15} Spoj **35** nije pokazao selektivnost u smislu *in vitro* antiproliferativnog djelovanja na određenim tumorskim staničnim linijama kao niti prema tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju NHLF.



Slika 47. Usporedba položaja adamantilne podjedinice i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva **32**, **33** i **35**

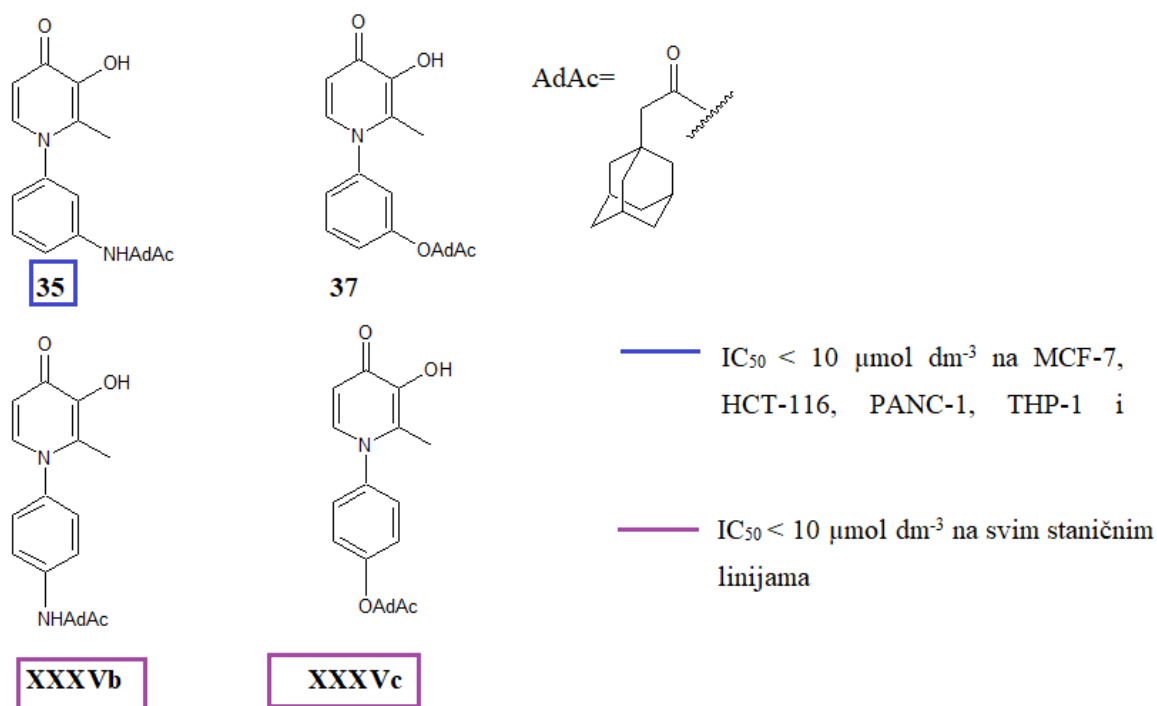
4.4.2.4. Utjecaj vrste kemijske veze adamantilnih derivata na arilnom dijelu 3,4-HP antiproliferativnu aktivnost

Spojevi **35** i **37** posjeduju adamantilne podjedinice u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a koje su vezane različitim vrstama kemijske veze, amidnom i esterskom vezom (slika 48).

Amidni derivat **35** pokazao je višu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na svim testiranim tumorskim staničnim linijama (osim stanične linije NCI-H460 gdje je aktivnost izostala) u odnosu na esterski derivat **37**. Osim toga, aktivnost spoja **35** na svim je staničnim linijama bila umjerena prema visoka (IC_{50} od $1,50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ – $2,15 \mu\text{mol dm}^{-3}$) dok je spoj **37** u pravilu pokazao nisku citotoksičnost, a samo je kod stanične linije MCF-7 ona bila umjerena ($\text{IC}_{50} = 8,16 \mu\text{mol dm}^{-3}$).

Temeljem navedenog zaključeno je kako promjena vrste kemijske veze kojom je adamantilna podjedinica uvedena u *meta*-položaj arilnog dijela 3,4-HP-a utječe na njihovu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost, osobito na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7.

Spojevi **XXXVb** i **XXXVc** posjeduju adamantilne podjedinice u *para*-položaju na arilnom dijelu 3,4-HP-a vezane amidnom i esterskom vezom. Oba spoja pokazali su značajne *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na svim testiranim tumorskim staničnim linijama s vrijednostima IC_{50} u pravilu manjim od $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ($0,3 \pm 0,03 \mu\text{mol dm}^{-3}$ – $0,9 \pm 0,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Odstupanje je pokazao spoj **XXXVc** čija je aktivnost na staničnoj liniji HCT-116 bila umjerena ($IC_{50} = 2 \pm 0,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Sva su četiri spoja pokazala aktivnost i na normalnim staničnim linijama (MDCK i NHLF). $IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na MCF-7, HCT-116, PANC-1, THP-1 i NHLF



Slika 48. Usporedba vrste kemijske veze na arilnom dijelu i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva **35**, **37**, **XXXVb** i **XXXVc**

Na temelju iznesenog može se zaključiti kako vrsta kemijske veze kojom je adamantilna podjedinica vezana na arilni dio 3,4-HP-a samo u *meta*-seriji ima utjecaj na antiproliferativni učinak spoja, pri čemu je amidna veza povoljnija od esterske.

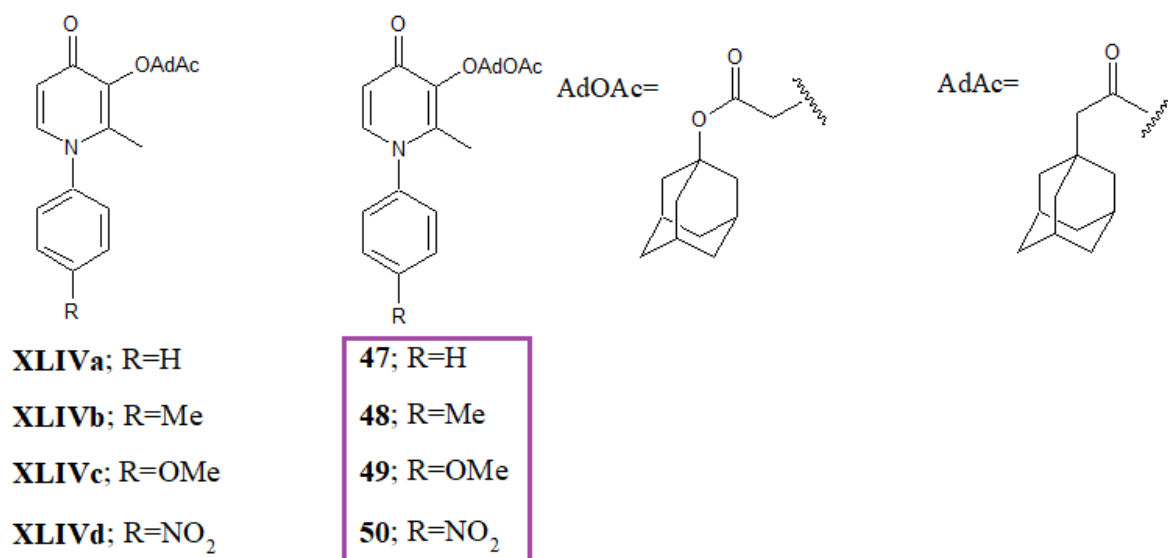
4.4.2.5. Utjecaj vrste kemijske veze na piranonskom dijelu adamantilnih derivata 3,4-HP-a na antiproliferativnu aktivnost

U poglavljima 4.4.2.1 i 4.4.2.2. opisan je utjecaj strukturnih modifikacija arilnog dijela molekule na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost adamantilnih derivata 3,4-HP.

Za pripravu svih navedenih derivata kao izvor adamantana korištena je adamantan-1-iloctena kiselina čime je omogućena priprava esterskih derivata 3,4-HP-a, odnosno vezanje adamantilne podjedinice esterskom vezom na piranonski dio molekula hidroksipiridinona. Pokazalo se da je prisutnost adamantilne podjedinice u strukturi *N*-aril-3,4-HP-a ključna za njihovu dobru i selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost.

U nastavku istraživanja pripravljena je *para*-serija spojeva **47-50** koji u svojoj strukturi posjeduju adamantilnu podjedinicu vezanu eterskim tipom veze u strukturu 3,4-HP-a (slika 49). Pripravom takvih spojeva i ispitivanjem njihove *in vitro* antiproliferativnu aktivnost željelo se dobivene rezultate usporediti s aktivnostima analognih *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a⁹ kod kojih je adamantilna podjedinica vezana esterskom vezom i ispitati utjecaj vrste kemijske veze na antiproliferativni učinak.

U poglavlju 4.3. opisani su rezultati preliminarnih testova koji su provedeni pri najvišoj koncentraciji spojeva **47-50**, $c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri čemu je *in vitro* antiproliferativna aktivnost izražena u obliku postotka preživjelih stanica. Spojevi **47-50** pokazali su nisku *in vitro* antiproliferativnu aktivnost pri navedenoj koncentraciji zbog čega nisu uključeni u daljnja istraživanja. Na temelju opisanih rezultata zaključeno je da je za *in vitro* antiproliferativnu aktivnost adamantilnih derivata *N*-aril-3,4-HP-a ključna vrsta kemijske veze kojom je adamantilna podjedinica uvedena na piranonski dio hidroksipiridinonske strukture, a to je esterska veza.

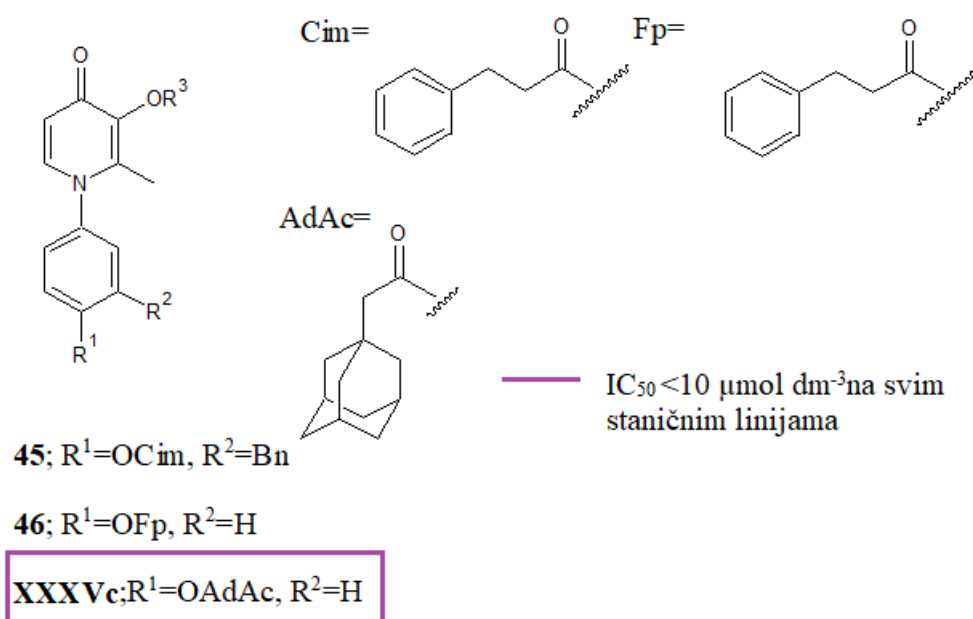


Slika 49. Usporedba strukture i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva **47-50** i **XLIVa-d**

4.4.3. Utjecaj strukturnih karakteristika lipofilne podjedinice na antiproliferativnu aktivnost 3,4-HP-a

Uvođenjem lipofilne podjedinice u strukturu osnovnih 3,4-HP-a moguće je olakšati njihov prolazak kroz biomembranu te samim time povećati njihovu biološku aktivnost. U poglavlju 4.4.2. opisani su derivati u kojima je kao lipofilna podjedinica za uvođenje u strukturu 3,4-HP-a na temelju rezultata prethodnih istraživanja odabrana adamantilna podjedinica.⁹ Kako bi se ispitao utjecaj same lipofilne podjedinice na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost 3,4-HP-a u strukturu hidroksipiridnonskih derivata uvedena je cimetna kiselina (poglavlje 4.2.4.). Jedan od ciljeva ovog istraživanja podrazumijevao je uvođenje cimetne kiseline na hidroksilnu skupinu na položaju 3 hidroksipiridinonskog prstena, no, kako je opisano u poglavlju 4.2.4.2., takvi su se derivati pokazali nestabilnima. Iz tog razloga cimetna kiselina uvedena je u *para*-položaj arilnog dijela 3,4-HP-a. Dodatni i važniji razlog vezanja cimetne kiseline na *para*-položaj arilnog dijela molekula osnovnih 3,4-HP bio je taj što su *para*-derivati *N*-aril-3,4-HP-a s adamantilnom podjedinicom na arilnom dijelu pokazali najveću *in vitro* antiproliferativni učinak.⁹ Cimetnu kiselinu u tom je smislu bilo moguće uvesti samo na dva osnovna *N*-aril-3,4-HP-a čija je hidroksilna skupina na piranonskom dijelu strukture bila zaštićena benzilnom zaštitom: zaštićene spojeve **XLIIIe** s hidroksilnom skupinom i **XLIIIf** s amino-skupinom u *para*-položaju arilnog dijela molekule pri čemu su dobiveni odgovarajući zaštićeni ester **45** i amid **44**. Prilikom uklanjanja benzilne eterske zaštite iz zaštićenog estera cimetne kiseline, spoja **45**, pripremljen ester fenilpropanske kiseline, spoj **46**.

Spojevi **45**, **46** i **XXXVc** u svojoj strukturi na *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a posjeduju esterski vezanu lipofilnu podjedinicu (slika 50): spoj **45** cimetnu kiselinu, spoj **46** fenilpropansku kiselinu dok spoj **XXXVc** sadrži adamantan-1-iloctenu kiselinu. Spoj **45** pokazao je niske *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na tumorskim staničnim linijama NCI-H460 ($IC_{50} = 30,46 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i PANC-1 ($IC_{50} = 35,88 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Spoj **46** pokazao je nisku *in vitro* antiproliferativnu aktivnost samo na tumorskoj staničnoj liniji HCT-116 ($IC_{50} = 57,30 \mu\text{mol dm}^{-3}$) te u odnosu na spoj **45** ($IC_{50} = 7,87 \mu\text{mol dm}^{-3}$) nižu aktivnost na normalnoj staničnoj liniji NHLF ($IC_{50} = 35,01 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Oba spoja pokazuju lošiju aktivnost u usporedbi s aktivnošću adamantilnog estera **XXXVc** čija je aktivnost na svim ispitanim staničnim linijama u pravilu bila visoka ($IC_{50} < 1 \mu\text{M}$). No, za razliku od spojeva **46** i **XXXVc**, spoju **45** hidroksilna skupina na piranonskome dijelu nije slobodna već je zaštićena benzilnom eterskom zaštitom. Benzilna podjedinica svojim strukturnim karakteristikama kao i svojom log *P* vrijednošću (poglavlje 4.2.2.1.) također se može smatrati pogodnom lipofilnom podjedinicom za strukturnu modifikaciju 3,4-HP-a. Bez obzira na to, spoj **45** nije pokazao značajni antiproliferativni učinak, pa analognom amidnom *para*-derivatu cimetne kiseline, spoju **44**, antiproliferativna aktivnost nije ispitana. Dodajmo još da sva tri spoja pokazuju aktivnost na normalnim staničnim linijama NHLF ili MDCK ($IC_{50} = 6 \pm 0,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**XXXVc**), $IC_{50} = 7,87 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**45**), $IC_{50} = 35,01 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (**46**)). Na temelju iznesenog može se zaključiti da je od ispitanih lipofilnih strukturnih motiva adamantilna podjedinica najpogodnija za strukturnu modifikaciju 3,4-HP-a.



Slika 50. Usporedba strukture lipofilne podjedinice na arilnom dijelu molekule i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva **45**, **46** i **XXXVc**

4.4.4. Istraživanja odnosa strukture pripremljenih spojeva i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460

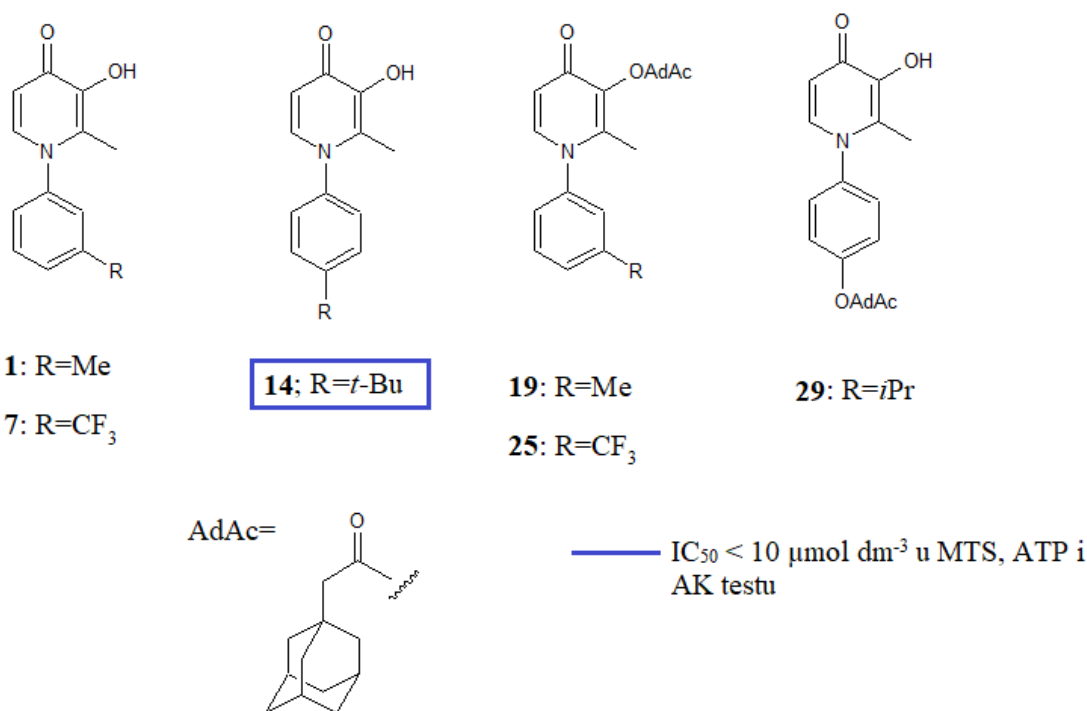
U tablici D7 prikazan je odnos strukture odabranih spojeva **1**, **7**, **14**, **19**, **25** i **29** i njihove biološke aktivnosti na najosjetljivijoj tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460. Uz test MTS, provedena su dva dodatna testiranja koja su uključivala mjerenja:

- 1) količine ATP-a (adenozin-trifosfata) u stanicama
- 2) količine enzima adenilat-kinaze u mediju.

U ovome slučaju sva dodatna mjerenja provedena su na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 pri čemu nije uzeta u obzir selektivnost djelovanja s obzirom na normalnu staničnu liniju NHLF.

Spoj **29**, adamantilni derivat 3,4-HP-a s izopropilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela molekule, istaknuo se selektivnom *in vitro* antiproliferativnom aktivnošću na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 (slika 51). U testu koji podrazumijeva mjerenje količine ATP-a u stanicama pokazao je nisku aktivnost, odnosno nije pokazao aktivnost u narušavanju integriteta membrane tumorske stanične linije NCI-H460. Spojevi **19** i **25** adamantilni su derivati 3,4-HP-a s metilnom skupinom u *meta*-položaju arilnog dijela hidropiridinonskog prstena, a istaknuo se svojom selektivnom aktivnošću na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7.

U slučaju dodatnih mjerenja na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460, spoj **19** nije pokazao aktivnost u sva tri provedena testa. Ovakvi rezultati potvrđuju selektivnu aktivnost spoja **19** na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7, odnosno prisutnost metilne skupine u *meta*-položaju na arilnom dijelu 3,4-HP-a, kao i prisutnost adamantilne podjedinice u strukturi spoja **19**, ključni su za selektivnu aktivnost na tumorsku staničnu liniju MCF-7. Spoj **14** u svojoj strukturi u *para*-položaju arilnog dijela osnovnog piridinonskog skeleta posjeduje *tert*-butilnu skupinu dok je hidroksilna skupina na položaju 3 slobodna, tj. spoj **14** u svojoj strukturi osim *tert*-butilne ne posjeduje drugu lipofilnu podjedinicu. Ostali spojevi **1**, **7** i **25** pokazali su podjednako niske *in vitro* antiproliferativne aktivnosti u sva tri provedena mjerenja, kao što je već napomenuto u poglavlju 4.3.2.



Slika 51. Usporedba strukture i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti odabranih spojeva **1**, **7**, **14**, **19**, **25** i **29** na staničnoj liniji NCI-H460

4.4.5. Utjecaj strukturnih karakteristika 3,4-HP-a na selektivnost *in vitro* antiproliferativnog učinka prema određenim tumorskim staničnim linijama i prema tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju

Cilj ovoga istraživanja uključivao je pripremu novih derivata 3,4-HP-a s poboljšanim antiproliferativnim učinkom u odnosu na spojeve pripravljene u prethodnim istraživanjima u smislu selektivnosti prema: a) određenim tumorskim staničnim linijama i b) tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju (poglavlja 4.3.2.1. i 4.3.2.2.).

U tablici D8 prikazana je usporedba strukture spojeva i njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti pri čemu su uzeti u obzir samo spojevi koji su pokazali antiproliferativnu aktivnost s $IC_{50} < 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na određenoj tumorskoj staničnoj liniji, ali u obzir nije uzeta njihova aktivnost na normalnoj staničnoj liniji NHLF. U tablici D9 navedene su strukture spojeva i njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti pri čemu su izdvojeni spojevi koji nisu pokazali *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na normalnoj staničnoj liniji ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$).

Kako je opisano u poglavlju 4.3.1.1., za definiranje selektivnosti biološke aktivnosti spojeva koristi se faktor selektivnosti SI koji se definira kao omjer vrijednosti IC_{50} spoja na normalnoj staničnoj liniji NHLF i IC_{50} vrijednosti na određenoj tumorskoj staničnoj liniji. Vrijednosti faktora selektivnosti izdvojenih spojeva izračunate su u dodatku u tablicama D8 i D9. Uvođenjem adamantilne podjedinice u strukturu *meta-* i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a moguće je utjecati na selektivnost *in vitro* antiproliferativnog djelovanja i to a) djelovanja na određene tumorske stanične linije i b) djelovanja na tumorske stanične linije bez utjecaja na normalnu staničnu liniju NHLF. Spoj **24** u svojoj strukturi posjeduje atom klora u *meta*-položaju arilnog dijela strukture 3,4-HP-a, a na položaju 3 hidroksipiridinonskog prstena esterskom vezom vezanu adamantilnu podjedinicu. Spoj **24** pokazao je selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost ($IC_{50} = 10,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$) na tumorsku staničnu liniju NCI-H460, no vrijednost faktora selektivnosti SI iznosi 1,09 što također ukazuje na veliku *in vitro* antiproliferativnu aktivnost prema normalnoj staničnoj liniji NHLF ($IC_{50} = 11,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Spoj **31** je adamantilni analog spoja **24** s atom klora u *para*-položaju. U usporedbi sa spojem **24**, spoj **31** pokazao je nižu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 ($IC_{50} = 35,8 \mu\text{mol dm}^{-3}$), no spoj **31**, za razliku od spoja **24**, nije pokazao aktivnost na normalnoj staničnoj liniji NHLF ($SI > 17,51$). U navedenom primjeru može se zaključiti kako je položaj atoma klora na arilnom dijelu 3,4-HP-a ključan za selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na određenoj tumorskoj staničnoj liniji u odnosu na normalnu staničnu liniju NHLF (slika 52).

Spoj **27**, adamantilni derivat s etilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a, pokazao je umjerenu selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost ($IC_{50} = 13,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$) također prema tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 te umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost prema normalnoj staničnoj liniji NHLF ($IC_{50} = 11,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Vrijednost SI faktora iznosi 0,82, a predstavlja omjer IC_{50} vrijednosti spoja **27** na normalnoj staničnoj liniji NHLF i tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460.

Ovakve vrijednosti upućuju na nisku selektivnost spoja **27**. Spoj **29** inačica je spoja **27** s izopropilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP. Oba spoja su alkilni derivati adamantilnih *N*-aril-3,4-HP. Usporedbom strukture navedenih spojeva i njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti (tablica D5) zaključeno je kako se povećanjem broja ugljikovih atoma alkilnog supstituenta u *para*-položaju arilnog dijela molekule može povećati njegova *in vitro* antiproliferativna aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460. Osim povećanja aktivnosti na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 opisana strukturna modifikacija omogućila je i postizanje selektivnosti prema određenoj tumorskoj staničnoj liniji (NCI-H460) te prema tumorskoj staničnoj liniji u odnosu na normalnu staničnu liniju NHLF čime su zadovoljena oba uvjeta selektivnosti *in vitro* antiproliferativnog djelovanja pripremljenih spojeva. Spoj **29**, koji posjeduje izopropilnu skupinu u *para*-položaju, pokazao je IC_{50} vrijednost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 $IC_{50} = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ te faktor selektivnosti $SI > 10$.

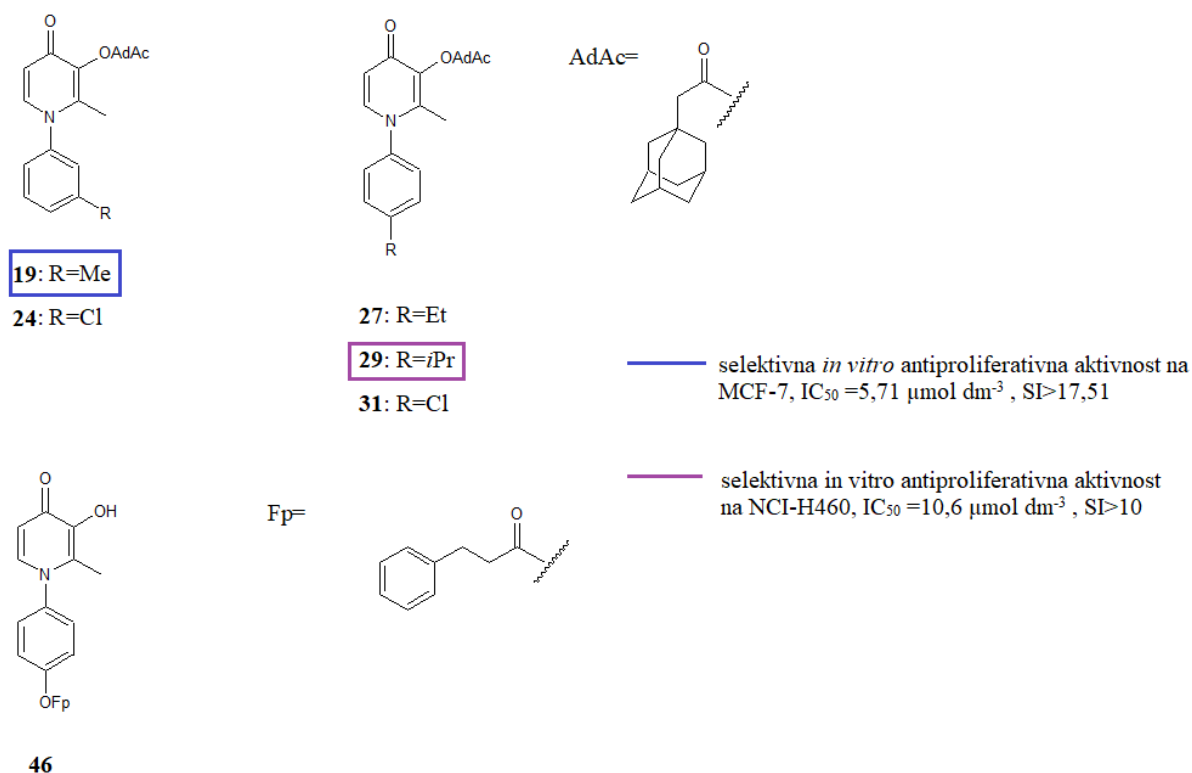
Spoj **19** je adamantilni derivat *N*-aril-3,4-HP-a s metilnom skupinom u *meta*-položaju arilnog dijela molekule. Pokazao je selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7, pri čemu je SI faktor omjer IC_{50} vrijednosti na normalnoj staničnoj liniji NHLF i tumorskoj staničnoj liniji MCF-7 ($SI > 17,51$). Spojevi **21-23** koji u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a sadrže alkilne skupine s većim brojem ugljikovih atoma u odnosu na spoj **19**, pokazali su znatno slabije *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7. Osim toga, navedeni spojevi nisu pokazali selektivnost u smislu antiproliferativnog djelovanja prema određenim tumorskim staničnim linijama niti selektivnost djelovanja prema tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju NHLF. Odsutnost selektivnosti može se dovesti u vezu s porastom broja ugljikovih atoma alkilnog supstituenta u *meta*-položaju arilnog dijela strukture 3,4-HP-a. Spoj **20**, adamantilni derivat s polarnijom metoksi-skupinom u *meta*-položaju arilnog dijela svoje strukture, pokazuje smanjenu antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7, ali je i dalje zadržana niska selektivnost *in vitro* antiproliferativnog djelovanja prema tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju NHLF ($SI < 10$) (tablica D9).

Spojevi **20**, **24**, **27** i **31** pokazali su selektivnost *in vitro* antiproliferativnog djelovanja ili prema određenim tumorskim staničnim linijama (tablice D2 i D8) ili prema tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju (tablice D3 i D9). Spojevi **19** i **29** zadovoljavaju oba navedena uvjeta. Svi navedeni spojevi u svojoj strukturi sadrže adamantilnu podjedinicu na položaju 3 hidroksipiridinonskog prstena.

Budući da svi spojevi izdvojeni u tablicama D8 i D9, osim spoja **46**, u svojoj strukturi sadrže adamantilnu podjedinicu vezanu esterskom vezom na hidroksilnu skupinu na položaju 3, može se zaključiti da je prisutnost adamantilne podjedinice na piranonskom dijelu 3,4-HP-a ključna za selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost navedenih derivata 3,4-HP-a.

U skupini adamantilnih derivata *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a istaknuo se već spomenuti spoj **19** s metilnom skupinom u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP s faktorom selektivnosti $SI > 17,51$ (MCF-7). Usporedbom strukture i selektivnosti (tablice D8 i D9) zaključeno je kako je prisutnost metilne skupine u *meta*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a ključna za selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost njihovih adamantilnih derivata.

Na temelju navedenih rezultata spoj **19** izdvojen je kao najpotentniji spoj (engl. *lead compound*) u skupini adamantilnih derivata *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a. U skupini adamantilnih derivata *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a istaknuo se spoj **29**, s izopropilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a, koji je pokazao selektivnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 ($SI > 10$), pri čemu je faktor selektivnosti definiran kao omjer IC_{50} vrijednosti spoja **29** na normalnoj staničnoj liniji NHLF i tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460. Usporedbom strukture i selektivnosti zaključeno je kako je izopropilna skupina u *para*-položaju adamantilnih derivata 3,4-HP-a ključna za selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460. Spoj **29** prema tome izdvojen je kao najpotentniji spoj na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 u skupini adamantilnih derivata *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a.



Slika 52. Usporedba strukture i selektivnosti *in vitro* antiproliferativnog djelovanja spojeva 19, 20, 24, 27, 29, 31 i 46

4.4.6. Povezanost fizikalno-kemijskih deskriptora s biološkom aktivnosti meta- i para-supstituiranih N-aril-3,4-HP-a

Potencijalni kelator bi za uspješnu apsorpciju u gastrointestinalnom traktu te prolazak kroz biomembranu trebao zadovoljiti nekoliko strukturnih parametara prema Lipinski pravilima (poglavlja 2.4.1. i 4.2.3.).^{1,15} U tablici D10 navedeni su neki od faktora koji utječu na prolaznost potencijalnog lijeka kroz biomembranu; molekulska masa spoja koja mora biti manja od 500 Da te njegova log *P* vrijednost koja treba biti u rasponu -0,4-5. Log *P* vrijednost (poglavlje 2.2.2.) opisuje njegov lipo-hidrofilni karakter i predstavlja omjer množinskih koncentracija promatrane vrste (liganda ili kompleksa) nakon njezine razdiobe između dvaju otapala koja se ne miješaju, najčešće oktan-1-ola i puferirane vodene otopine (pH = 7,4). Za izračunavanje log *P* vrijednosti pripremljenih 3,4-HP i njihovih adamantilnih analoga korištena je *on-line* metoda ALOGP uz korištenje softvera ALOGPS 2.1. *Virtual Computational Chemistry Laboratory*.⁹⁹

Porast log *P* vrijednosti, koja opisuje lipo-hidrofilni karakter spoja, u pravilu povećava njegovu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost (tablica D10).

Spoj **19**, izdvojen je kao spoj s umjerenom i selektivnom *in vitro* antiproliferativnom aktivnosti, uz $IC_{50} = 5,71 \mu\text{mol dm}^{-3}$, na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7. Njegova $\log P$ vrijednost (4,49), kao i njegova molekulska masa (391,5 Da), zadovoljavaju kriterije za prolazak kroz biomembranu definirane Lipinski pravilima.^{1,15} Osim spoja **19**, spoj **29** pokazao je dobru i selektivnu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460, uz $IC_{50} = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Fizikalno-kemijski parametri spoja **29**, $\log P = 4,95$ i $M = 419,56$ Da, također zadovoljavaju kriterije za prolazak kroz biomembranu definirane Lipinski pravilima. U tablici D11 izdvojeni su spojevi čije $\log P$ vrijednosti i/ili molarna masa nisu u skladu s Lipinski pravilima. Spojevima **23**, **25**, **28**, **30**, **45** i **46** izračunate $\log P$ vrijednosti iznose > 5 što nije u skladu s Lipinski pravilima, no njihova molarna masa iznosi < 500 Da što odgovara uvjetu Lipinski pravila. Spoj **23** pokazao je umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na svim tumorskim staničnim linijama, kao i na normalnoj staničnoj liniji NHLF. Svi ostali navedeni spojevi pokazali su umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na normalnoj staničnoj liniji NHLF, te umjerene *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na nekima od tumorskih staničnih linija pri čemu je izostala selektivnost djelovanja na pojedinim tumorskim staničnim linijama. Strukturni parametri spoja **33** iznose; $\log P = 5,42$ i $M = 568,75$ Da te nisu u skladu s Lipinski pravilima, što je imalo utjecaja na njegovu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost. Spoj **33** nije pokazao aktivnost na odabranim tumorskim staničnim linijama, kao niti na normalnoj staničnoj liniji NHLF. Spoj **38**, s $\log P = 5,44$, $M = 569,73$ Da, nije pokazao *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskim staničnim linijama, no pokazao je nisku aktivnost na normalnoj staničnoj liniji NHLF. Prema tome, na temelju podataka navedenih u tablici D11, za spoj **33** i **38**, vidljivo je kako spojevi čija molekulska masa i $\log P$ vrijednost nisu u skladu s uvjetima definiranim Lipinski pravilima, nisu pokazali *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskim staničnim linijama, kao niti na normalnoj staničnoj liniji NHLF.

§ 5. ZAKLJUČAK

- U okviru doktorske disertacije izravnom metodom uz zagrijavanje u autoklavu pripremljeni su novi *meta*- i *para*-supstituirani derivati *N*-aril-3,4-HP-i (**1-15**) s ciljem ispitivanja njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti na odabranim staničnim linijama. U svrhu povećanja prinosa i čistoće produkata uspješno je provedena sinteza odabranih *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a uz primjenu mikrovalnog zračenja. Provedena sinteza rezultirala je skraćivanjem vremena reakcije u odnosu na reakciju u autoklavu te, u pravilu, povećanjem prinosa produkta na temelju čega je zaključeno kako mikrovalna sinteza predstavlja obećavajući alternativni način pripreme *N*-aril-3,4-HP-a.
- Novi derivati *N*-aril-3,4-HP-a sintetski su modificirani u odnosu na spojeve pripremljene u prethodnim istraživanjima na način da je: a) uvedeno novo mjesto vezivanja supstituenata na arilnom dijelu molekule i b) proširen odabir supstituenata. Osim u *para*-položaj, supstituenti su vezani i u *meta*-položaj arilnog dijela hidroksipiridinonske strukture (**1-10**), a poseban je naglasak stavljen na alkilne supstituente (**1**, **3-5** i **11-14**). Ovakav dizajn spojeva omogućio je praćenje utjecaja prirode i strukture supstituenta te položaja supstituenta na biološki odgovor pripremljenih spojeva.
- Pripremljeni novi *meta*- i *para*-supstituirani *N*-aril-3,4-HP-i strukturno su modificirani s ciljem povećanja njihove lipofilnosti radi olakšavanja prolaska kroz biomembranu te u konačnici poboljšanja njihovog biološkog odgovora. Jedna od strukturnih modifikacija podrazumijevala je uvođenje lipofilne adamantilne podjedinice na piranonski i/ili na arilni dio molekule hidroksipiridinona različitim vrstama kemijske veze (esterska, eterska i amidna). Pripravom adamantilnih derivata *N*-aril-3,4-HP-a (**19-38** i **47-50**) omogućeno je praćenje utjecaja položaja adamantilne podjedinice kao i vrste kemijske veze na biološki odgovor.
- Osim adamantilne podjedinice kao lipofilna podjedinica u strukturu odabranih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a esterskim ili amidnim tipom veze uvedena je i cimetna kiselina (**39-45**).

Iz esterskog derivata cimetine kiseline, spoja **45**, uspješno je pripremljen ester fenilpropanske kiseline, spoj **46**. Spojevima **45** i **46** ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost na odabranim staničnim linijama. Ovakav dizajn spojeva omogućio je praćenje utjecaja strukture lipofilne podjedinice, kao i fizikalno-kemijskih svojstava u skladu s Lipinski pravilima, na biološki odgovor pripremljenih spojeva.

- Pripremljenim *N*-aril-3,4-HP-ima i njihovim lipofilnim derivatima ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost na pet tumorskih staničnih linija: HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva, MCF-7-stanice raka dojke, NCI-H460-stanice karcinoma pluća, PANC-1-stanice raka gušterače, THP-1-stanice akutne monocitne leukemije kao i na normalnoj staničnoj liniji NHLF-normalni humani plućni fibroblasti. *In vitro* antiproliferativna aktivnost ispitana je pomoću MTS testa. Na odabranim spojevima provedena su dodatna testiranja na najosjetljivijoj tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460: mjerenje količine ATP-a u stanicama i mjerenje količine enzima adenilat-kinaze u mediju čime se određuje integritet membrane stanice.
- Na temelju rezultata bioloških testova provedena su opsežna proučavanja odnosa strukture i aktivnosti, SAR, s ciljem identificiranja strukturnih motiva odgovornih za antitumorsku aktivnost pri čemu je u obzir uzeta selektivnost prema a) određenim tumorskim staničnim linijama i b) tumorskim stanicama u odnosu na zdrave stanice.
- Proučavanjem odnosa strukture i biološke aktivnosti proveden je probir najznačajnijih strukturnih motiva odgovornih za povećanje *in vitro* antiproliferativne aktivnosti 3,4-HP-a. U proučavanje odnosa strukture i biološke aktivnosti bili su uključeni: a) spojevi pripremljeni u okviru ove disertacije i b) spojevi pripremljeni u okviru disertacije zajedno sa literaturno opisanim spojevima pripremljenim u sklopu prethodnih istraživanja. Temeljem navedenog zaključci dobiveni usporedbom strukture i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti pripremljenih spojeva mogu se podijeliti u dvije kategorije:
 - a) SAR studija spojeva pripremljenih u okviru ove disertacije:
 - 1) Prisutnost alkilnog supstituenta u *meta*- i *para*-položaju arilnog dijela molekule *N*-aril-3,4-HP-a (**1**, **3-5** i **11-14**) u pravilu povećava *in vitro* antiproliferativni učinak na većini tumorskih staničnih linija.
 - 2) Adamantilna podjedinica pokazala se najpogodnijom lipofilnom podjedinicom za strukturnu modifikaciju *N*-aril-3,4-HP-a.

Ispitivanjem utjecaja prirode kemijske veze i položaja adamantilne podjedinice u strukturi *N*-aril-3,4-HP-a zaključeno je kako je najpogodniji položaj za uvođenje adamantilne podjedinice položaj 3 na piranonskom dijelu 3,4-HP-a a najpogodniji tip veze je esterski tip veze (19-32).

- 3) Uvođenjem adamantilne podjedinice u strukturu novih *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a postignuta je selektivnost *in vitro* antiproliferativnog djelovanja prema određenim tumorskim staničnim linijama te prema tumorskim staničnim linijama u odnosu na zdrave stanice.
- 4) Uvođenje alkilnih supstituenata u strukturu adamantilnih derivata *meta*- i *para*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (19, 21-23 i 27-30) u pravilu povećava *in vitro* antiproliferativni učinak na većini tumorskih staničnih linija.
- 5) Prisutnost izopropilne skupine u *para*-položaju arilnog dijela *N*-aril-3,4-HP-a i adamantilne podjedinice na položaju 3 hidroksipiridinonskog prstena odgovorna je za selektivnu i umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost spoja 29 na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460.
- 6) Prisutnost metilne skupine u *meta*-položaju arilnog dijela hidroksipiridinonskog skeleta i adamantilne podjedinice na položaju 3 hidroksipiridinonskog prstena odgovorna je za selektivnu i umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7 spoja 19.

b) SAR studiju spojeva pripremljenih u okviru ove disertacije uključujući i literaturno opisane spojeve pripremljene u okviru prethodnih istraživanja:

- 1) Utjecaj alkilnog supstituenta u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a (11-14) na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost značajniji je u odnosu na polarnije supstituente na istom položaju arilnog dijela 3,4-HP-a (XLIIIc-f).
- 2) Aktivnost *meta*-supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a (2, 6-10) s nealkilnim supstituentima kao i analognih *para*-supstituiranih derivata (XLIIIc-f) na svim ispitanim tumorskim staničnim linijama bila je niska ili je izostala. Navedeni spojevi pokazali su *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na normalnim staničnim linijama, pri čemu je aktivnost *para*-derivata u pravilu bila viša u usporedbi s analognim *meta*-derivatima.

3) Adamantilni derivati *N*-aril-3,4-HP-a s polarnijim supstituentima u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a (**XLIVc** i **XLIVd**) nisu se istaknuli svojom aktivnošću niti na tumorskim niti na normalnoj staničnoj liniji MDCK. Među pripremljenim adamantilnim derivatima s alkilnim supstituentima u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a (**27-30**) svojom aktivnošću i selektivnošću na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460 istaknuo se spoj **29** ($IC_{50} = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) s izopropilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela hidroksipiridinonske strukture.

4) Prisutnost metilne skupine u *meta*-položaju arilnog dijela adamantilnog derivata **19** odgovorna je za njegovu selektivnu i umjerenu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7 ($IC_{50} = 5,71 \mu\text{mol dm}^{-3}$) što je zaključeno usporedbom njegove aktivnosti s analognim *para*-derivatom **XLIVb**.

5) Spoj **XXXVa**, estersko-amidni diadamantilni derivat, s adamantilnom podjedinicom u *para*-položaju arilnog dijela molekule pokazao je *in vitro* antiproliferativnu aktivnost s $IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na svim staničnim linijama uključujući i normalnu staničnu liniju.

6) Spoj **XXXVb**, amidni adamantilni derivat s adamantilnom podjedinicom u *para*-položaju arilnog dijela molekule premda neselektivnog djelovanja, najaktivniji je do sada opisani derivat 3,4-HP-a s IC_{50} vrijednostima u rasponu ($0,3 \pm 0,03 - 6 \pm 0,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$).

7) Usporedbom *in vitro* antiproliferativne aktivnosti eterskih adamantilnih *para*-derivata **47-50** s literaturno opisanim esterskim adamantilnim derivatima *N*-aril-3,4-HP-a **XLIVa-d** zaključeno je kako je za *in vitro* antiproliferativnu aktivnost adamantilnih derivata *N*-aril-3,4-HP-a ključna esterska veza.

- Spojevi čija fizikalno-kemijska svojstva (molekulska masa i log *P*) nisu u skladu s Lipinski pravilima nisu pokazali *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na tumorskim staničnim linijama kao niti na normalnoj staničnoj liniji NHLF.
- Spoj **14** *tert*-butilnom skupinom u *para*-položaju arilnog dijela 3,4-HP-a pokazao je $IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ neselektivno na svim staničnim linijama i na normalnoj staničnoj liniji NHLF. Osim toga, spoj **14** pokazao je najbolje rezultate u slučaju dodatnih mjerenja na najosjetljivijoj tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460.

- Adamantilni derivati **19** (*meta*-metil) i **29** (*para*-izopropil) istaknuli su se svojom umjerenom i selektivnom *in vitro* antiproliferativnom aktivnošću na MCF-7 (spoj **19**, $IC_{50}=5,71 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $SI>17,51$) i NCI-H460 (spoj **29**, $IC_{50} = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $SI >10$) te su izdvojeni su kao najpotentniji i najselektivniji spojevi (engl. *lead compound*).
- Na temelju dobivenih rezultata unaprijeđen je proces dizajna novih biološki aktivnih *N*-aril-3,4-HP-a te je za očekivati da će dobiveni rezultati dati smjernice za konačno otkrivanje mehanizma njihovog *in vitro* antiproliferativnog djelovanja.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

AChE - Acetilkolinesteraza

Ad - Adamantan

AdAcOH - Adamantan-1-iloctena kiselina

AdBrOAc - (Adamantan-1-il)-bromacetat

ADP - Adenozin-difosfat

AK - Adenilat-kinaza (engl. *Adenylate Kinase*)

ALA - 5-aminolevulinska kiselina (engl. *5-aminolevulinic acid*)

AMP - Adenozin-monofosfat

ATP - Adenozin-trifosfat

B16-F10 - Stanice melanoma pluća

BBB - Krvno-moždana barijera (engl. *Blood Brain Barrier*)

BnCl - Benzil-klorid

BuChE - Butilkolinesteraza

CA - Ugljikova anhidraza (engl. *Carbonic Anhydrase*)

Caco-2 - Stanična linija kolorektalnog karcinoma

CDCl₃ - Deuterirani kloroform

CD₃OD - Deuterirani metanol

5-CFDA-AM-5 - Karboksifluorescein diacetat, acetoksi-metil ester

CNS - Središnji živčani sustav (engl. *Central Nervous System*)

CoA - Koenzim A

COMT - Katehol-O-metiltransferaza (engl. *Catechol-O-Methyltransferaze*)

CP94 - 1,2-Dietil-3-hidroksipiridin-4-on

CP502 - 3-Hidroksi-1,6-dimetil-2-(*N*-metilamid)piridin-4-on

CSCs – Stanice koje iniciraju tumor (engl. *Cancer Stem Cell/s*)

d - Dublet

DCM - Diklormetan

dd - Dublet dubleta

DFO - Desferioksamin B

- DMAP - 4-Dimetilaminopiridin
- DMT1 - Transportni protein 1 za dvovalentne metale (engl. *Divalent Metal Transporter 1*)
- (DMSO-*d*₆) - Deuterirani dimetilsulfoksid
- DNA - Deoksiribonukleinska kiselina
- dq - Dublet kvarteta
- dt - Dublet tripleta
- DTPA - Dietilentriaminpentaoktenska kiselina (engl. *Diethylenetriaminepentaacetic Acid*)
- EC₅₀ - Koncentracija spoja koja daje polovicu maksimalnog odziva
- EDC × HCl - *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid-hidroklorid
- EDTA - Etilendiamintetraoktenska kiselina (engl. *Ethylendiaminetetraacetic Acid*)
- ESI - Elektoraspršenje (engl. *Electrospray Ionization*)
- Et - Etil
- EtOAc - Etil-acetat
- FADH₂ - Flavin-adenin-dinukleotid
- GLUT-1 - Membranski protein koji omogućava transport glukoze (engl. *Glucose Transporter 1*)
- HP - Hidroksipiridinon
- 1,2-HP - 1-Hidroksipiridin-2-on
- 3,2-HP - 3-Hidroksipiridin-2-on
- 3,4-HP - 3-Hidroksipiridin-4-on
- HeLa - Stanice raka grlića maternice
- HCT-116 - Stanice karcinoma debelog crijeva
- HRMS - Spektrometrija masa visoke razlučivosti (engl. *High Resolution Mass Spectrometry*)
- IC₅₀ - Koncentracija spoja koja je potrebna za 50 %-tnu inhibiciju nekog staničnog procesa
- i*Pr - Izopropil
- i*PrOH - Izopropilni alkohol
- K562 - Stanice kronične mijeloidne leukemije
- LDH - Laktat-dehidrogenaza (engl. *Lactat Dehydrogenase*)
- L-DOPA - L-3,4-Dihidroksifenilalanin (engl. *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*)
- L1NAll-1 - Alil-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on
- L1NEt-1 - Etil-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on
- LIP - Nestabilni skladišni odjeljak (engl. *Labile Iron Pool*)

$\log \beta$ - Konstanta stabilnosti za komplekse metala i liganada

$\log P$ - Omjer množinskih koncentracija promatrane vrste (liganda ili kompleksa) nakon njezine razdiobe između dvaju otapala koja se ne miješaju, najčešće oktan-1-ol i puferirane vodene otopine (pH = 7,4)

m - eng. *meta*

m - Multiplet

MAL - Metil-aminolevulinat

MALDI - Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)

MAO - Monoamin-oksidaaza (engl. *Monoamine-Oxidase*)

MCF-7 - Stanice raka dojke

MDCK - Normalne stanice bubrega psa (engl. *Madin Darby Canine Kidney*)

Me - Metil

MeOH - Metanol

MMP - Matriks-metaloproteinaza (engl. *Matrix Metalloproteinase*)

MS - Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*)

MTDL - Pristup koji podrazumijeva kombiniranje više farmakoloških fragmenata s ciljem sinteze jedne biološki aktivne molekule (engl. *Multi Target Directed Ligands*)

MTS - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij

MTT - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

NADH – Nikotinamid-adenin-dinukleotid

NAD (P) H – Nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat

NCI-H358 - Stanice bronhioalveolarnog carcinoma

NCI-H460 - Stanice raka pluća

NHLF - Normalni humani plućni fibroblasti

NMR - Nuklearna magnetska rezonancija

NMSC – Nemelanomski karcinom kože (engl. *Non-Melanoma Skin Cancer*)

o - engl. *ortho*

OMe - Metoksi

p - engl. *para*

PANC-1 - Stanice raka gušterače

PASS - engl. *Prediction of Activity Spectra for Substances*

Pd/C - Paladij na ugljiku
PDT - Fotodinamička terapija (engl. *Photodynamic Therapy*)
Ph - Fenil
pK_a - Konstanta disocijacije kiseline
Pr - Propil
PpIX - Protoporfirin IX
p-TsOH - *para*-Toluensulfonska kiselina
q - kvartet
QSAR - Istraživanje kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*)
Ra-Ni - Raney nikal
RNA - Ribonukleinska kiselina
ROS - Radikalske vrste s kisikom (engl. *Reactive Oxygen Species*)
RR - Ribonukleotid-reduktaza (engl. *Ribonucleotide-Reductase*)
s - Singlet
SAM - S-Adenozil-L-metionina (engl. *S-Adenosyl-L-Methionine*)
SAR - Istraživanja odnosa strukture i aktivnosti (engl. *Structure Activity Relationship*)
sept - Septet
SI - Faktor selektivnosti (engl. *Selectivity Index*)
SRB - Sulforodamin B
sxt - Sekstet
t - Triplet
*t*Bu - *tert*-Butil
Tf - Transportni protein transferin (engl. *Transferrin*)
TfR1 - Homodimerni transferinski receptor 1 (engl. *Transferrin Receptor 1*)
THP-1 - Stanice akutne monocitne leukemije
TLC - Tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*)
TMS - Tetrametilsilan
TOF - Analizator vremena leta (engl. *Time Of Flight*)
Tyr - Tirozin
UV - Ultraljubičasto zračenje (engl. *Ultraviolet Radiation*)
XTT - (2,3-Bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolij-5-karboksanilid

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Ž. Car, V. Petrović Peroković, S. Tomić-Pisarović, *Kem. Ind.* **66** (2017) 17–28.
2. M. A. Santos, S. M. Marques, S. Chaves, *Coord. Chem. Rev.* **256** (2012) 240–259.
3. M. A. Santos, *Coord. Chem. Rev.* **252** (2008) 1213–1224.
4. X. Jiang, J. Guo, Y. Lv, C. Yao, C. Zhang, Z. Mi, Y. Shi, J. Gu, T. Zhou, R. Bai, Y. Xie, *Bioorganic Med. Chem.* **28** (2020) 115550.
5. L. E. Scott, C. Orvig, *Chem. Rev.* **109** (2009) 4885–4910.
6. J. de Beer, J. P. Petzer, A. C. U. Lourens, A. Petzer, *Mol. Divers.* **25** (2021) 753–762.
7. W. Kandiolle, A. Kurzwernhart, M. Hanif, S. M. Meier, H. Henke, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, *J. Organomet. Chem.* **696** (2011) 999–1010.
8. V. P. Peroković, Ž. Car, A. Usenik, T. Opačak-Bernardi, A. Jurić, S. Tomić, *Mol. Divers.* **24** (2020) 253–263.
9. V. Petrović Peroković, Car, T. Opačak-Bernardi, I. Martin-Kleiner, M. Kralj, S. Tomić, *Mol. Divers.* **21** (2017) 881–891.
10. J. M. Kelly, M. A. Miles, A. C. Skinner, *Antimicrob. Agents Chemother.* **43** (1999) 985–987.
11. J. Liu, D. Obando, V. Liao, T. Lifa, R. Codd, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 1949–1963.
12. N. A. Zefirov, M. Hoppe, I. V. Kuznetsova, N. A. Chernyshov, Y. K. Grishin, O. A. Maloshitskaya, S. A. Kuznetsov, O. N. Zefirova, *Mendeleev Commun.* **28** (2018) 308–310.
13. D. F. Aguiar, L. L. A. Dutra, W. M. Dantas, G. G. Camelo de Carvalho, R. P. Gonçalves Lemes, C. do Ó Pessoa, C. R. Koscky Paier, P. L. Barros Araujo, E. S. Araujo, L. J. Pena, R. N. de Oliveira, *J. Med. Chem.* **4** (2019) 9112–9118.
14. F. Natella, M. Nardini, M. Di Felice, C. Scaccini, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 1453–1459.
15. S. C. M. A. Santos, *Future Med. Chem.* **7** (2015) 383–410.
16. Ž. Car, V. Petrović Peroković, S. Tomić-Pisarović, *Kem. Ind.* **65** (2016) 595–604.
17. A. Raab, *Appl. Organomet. Chem.* **16** (2002) 280–280.
18. R. W. Evans, X. Kong, R. C. Hider, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820** (2012) 282–290.
19. D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, *Pharmacol. Rev.* **57** (2005) 547–583.
20. M. J. Pippard, M. J. Jackson, K. Hoffman, M. Petrou, C. B. Modell, *Scand. J. Haematol.* **36** (1986) 466–472.
21. P. S. Dobbin, R. C. Hider, A. D. Hall, P. D. Taylor, P. Sarpong, J. B. Porter, G. Xiao, D. van der Helm, *J. Med. Chem.* **36** (1993) 2448–2458.
22. G. J. Kontoghiorghes, E. Eracleous, C. Economides, A. Kolnagou, *Curr. Med. Chem.* **12** (2005) 2663–2681.
23. M. A. Tanner, R. Galanello, C. Dessi, G. C. Smith, M. A. Westwood, A. Agus, M. Roughton, R. Assomull, S. V. Nair, J. M. Walker, D. J. Pennell, *Circulation* **115** (2007) 1876–1884.
24. S. Ayton, P. Lei, A. I. Bush, *Free Radic. Biol. Med.* **62** (2013) 76–89.

25. W. Huang, W. Wei, Z. Shen, *RSC Adv.* **4** (2014) 52088–52099.
26. R. C. Hider, Y. Ma, F. Molina-Holgado, A. Gaeta, S. Roy, *Biochem. Soc. Trans.* **36** (2008) 1304–1308.
27. S. Chaves, A. C. Mendonça, S. M. Marques, M. I. Prata, A. C. Santos, A. F. Martins, C. F. G. C. Geraldés, M. A. Santos, *J. Inorg. Biochem.* **105** (2011) 31–38.
28. R. R. Crichton, D. T. Dexter, R. J. Ward, *Coord. Chem. Rev.* **252** (2008) 1189–1199.
29. Y. Ke, Z. M. Qian, *Prog. Neurobiol.* **83** (2007) 149–173.
30. S. Kong, S. Liochev, I. Fridovich, *Free Radic. Biol. Med.* **13** (1992) 79–81.
31. D. G. Smith, R. Cappai, K. J. Barnham, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1768** (2007) 1976–1990.
32. V. Dias, E. Junn, M. M. Mouradian, *J. Parkinsons. Dis.* **3** (2013) 461–491.
33. R. J. Ward, D. T. Dexter, R. R. Crichton, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **31** (2015) 267–273.
34. P. Dusek, S. A. Schneider, J. Aaseth, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **38** (2016) 81–92.
35. Y. P. Singh, A. Pandey, S. Vishwakarma, G. Modi, *Mol. Divers.* **23** (2019) 509–526.
36. T. P. A. Kruck, T. E. Burrow, *J. Inorg. Biochem.* **88** (2002) 19–24.
37. L. V. Kalia, A. E. Lang, *Lancet* **386** (2015) 896–912.
38. A. J. Lees, J. Hardy, T. Revesz, *Lancet* **373** (2009) 2055–2066.
39. A. J. Lees, *CNS Drug Rev.* **14** (2008) 83–93.
40. S. Kaakkola, *Drugs* **59** (2000) 1233–1250.
41. B. L. Rai, Z. D. Liu, D. Y. Liu, S. L. Lu, R. C. Hider, *Eur. J. Med. Chem.* **34** (1999) 475–485.
42. F. A. Zucca, J. Segura-Aguilar, E. Ferrari, P. Muñoz, I. Paris, D. Sulzer, T. Sarna, L. Casella, L. Zecca, *Prog. Neurobiol.* **155** (2017) 96–119.
43. G. Öztürk, D. D. Erol, T. Uzbay, M. D. Aytemir, *Farmaco* **56** (2001) 251–256.
44. B. F. Krippendorff, P. Lienau, A. Reichel, W. Huisinga, *J. Biomol. Screen.* **12** (2007) 92–99.
45. J. D. Grill, J. Cummings, *Neurobiol. Ment. Illn.* (2013) 854–871.
46. O. Myhre, H. Utkilen, N. Duale, G. Brunborg, T. Hofer, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013** (2013).
47. C. B. P. J. Ryu, K. Girigoswami, H. Chanki, S. Hee Ku, *Biochemistry* **47** (2008) 5328–5335.
48. R. R. Ramsay, *Curr. Top. Med. Chem.* **12** (2013) 2189–2209.
49. A. W. K. Yeung, M. G. Georgieva, A. G. Atanasov, N. T. Tzvetkov, *Front. Mol. Neurosci.* **12** (2019) 1–12.
50. P. Sharma, P. Srivastava, A. Seth, P. N. Tripathi, A. G. Banerjee, S. K. Shrivastava, *Prog. Neurobiol.* **174** (2019) 53–89.
51. B. Kumar, Sheetal, A. K. Mantha, V. Kumar, *RSC Adv.* **6** (2016) 42660–42683.
52. C. Gnerre, M. Catto, F. Leonetti, P. Weber, P. A. Carrupt, C. Altomare, A. Carotti, B. Testa, *J. Med. Chem.* **43** (2000) 4747–4758.
53. E. Jameel, T. Umar, J. Kumar, N. Hoda, *Chem. Biol. Drug Des.* **87** (2016) 21–38.
54. M. Rullo, M. Catto, A. Carrieri, M. de Candia, C. D. Altomare, L. Pisani, *Molecules* **24** (2019).
55. D. Viña, M. J. Matos, M. Yáñez, L. Santana, E. Uriarte, *Medchemcomm* **3** (2012) 213–218.
56. J. Joubert, G. B. Foka, B. P. Repsold, D. W. Oliver, E. Kapp, S. F. Malan, *Eur. J. Med. Chem.* **125** (2017) 853–864.
57. D. Tao, Y. Wang, X. Q. Bao, B. B. Yang, F. Gao, L. Wang, D. Zhang, L. Li, *Eur. J. Med. Chem.* **173** (2019) 203–212.

58. A. C. Tripathi, S. Upadhyay, S. Paliwal, S. K. Saraf, *Eur. J. Med. Chem.* **145** (2018) 445–497.
59. J. Hu, Y. D. Huang, T. Pan, T. Zhang, T. Su, X. Li, H. Bin Luo, L. Huang, *ACS Chem. Neurosci.* **10** (2019) 537–551.
60. M. Rosini, E. Simoni, M. Bartolini, A. Cavalli, L. Ceccarini, N. Pascu, D. W. McClymont, A. Tarozzi, M. L. Bolognesi, A. Minarini, V. Tumiatti, V. Andrisano, I. R. Mellor, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.* **51** (2008) 4381–4384.
61. X. Y. Jiang, T. K. Chen, J. T. Zhou, S. Y. He, H. Y. Yang, Y. Chen, W. Qu, F. Feng, H. P. Sun, *ACS Med. Chem. Lett.* **9** (2018) 171–176.
62. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=50620>, 10. srpnja 2021.
63. M. J. Brookes, S. Hughes, F. E. Turner, G. Reynolds, N. Sharma, T. Ismail, G. Berx, A. T. McKie, N. Hotchin, G. J. Anderson, T. Iqbal, C. Tselepis, *Gut* **55** (2006) 1449–1460.
64. X. P. Jiang, R. L. Elliott, J. F. Head, *Anticancer Res.* **30** (2010) 759–766.
65. J. Boulton, K. Roberts, M. J. Brookes, S. Hughes, J. P. Bury, S. S. Cross, G. J. Anderson, R. Spychal, T. Iqbal, C. Tselepis, *Clin. Cancer Res.* **14** (2008) 379–387.
66. J. A. Habeshaw, T. A. Lister, A. G. Stansfeld, M. F. Greaves, *Lancet* **321** (1983) 498–501.
67. A. M. Merlot, D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, *Antioxidants Redox Signal.* **18** (2013) 973–1006.
68. H. L. Hann, M. W. Stahlhut, C. L. Hann, *Hepatology* **11** (1990) 566–569.
69. P. N. Dayani, M. C. Bishop, K. Black, P. M. Zeltzer, *J. Neurooncol.* **67** (2004) 367–377.
70. V. Žlender, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **54** (2003) 267–274.
71. J. Shao, B. Zhou, B. Chu, Y. Yen, *Curr. Cancer Drug Targets* **6** (2006) 409–431.
72. L. Xue, X. Liu, Q. Wang, C. Q. Liu, Y. Chen, W. Jia, R. Hsie, Y. Chen, F. Luh, S. Zheng, Y. Yen, *Am. J. Transl. Res.* **10** (2018) 3635–3649.
73. A. Kicic, A. C. G. Chua, E. Baker, *Br. J. Pharmacol.* **135** (2002) 1393–1402.
74. Ž. Car, T. Hrenar, V. Petrovic Perokovic, R. Ribic, M. Seničar, S. S. S. Tomic, *Chem. Biol. Drug Des.* **84** (2014) 393–401.
75. B. Zorc, Z. Rajić, *Farm. Glas.* **67** (2011) 671–676.
76. F. H. Sakamoto, J. D. Lopes, R. R. Anderson, *J. Am. Acad. Dermatol.* **63** (2010) 183–193.
77. C. A. Morton, K. E. McKenna, L. E. Rhodes, *Br. J. Dermatol.* **159** (2008) 1245–1266.
78. E. L. Taylor, S. B. Brown, *J. Dermatolog. Treat.* **13** (2002) 3–11.
79. S. E. Wolverton, *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy*, Saunders Elsevier, 2007.
80. C. A. Morton, R. M. Szeimies, A. Sidoroff, L. R. Braathen, *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **27** (2013) 536–544.
81. S. G. Bown, *JNCCN J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **10** (2012) 69–74.
82. Q. Peng, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, J. M. Nesland, *Photochem. Photobiol.* **65** (1997) 235–251.
83. Q. Peng, T. Warloe, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, K. E. Giercksky, J. M. Nesland, *Cancer* **79** (1997) 2282–2308.
84. J. C. Kennedy, R. H. Pottier, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **14** (1992) 275–292.
85. A. Curnow, A. Perry, M. Wood, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **25** (2019) 157–165.
86. L. S. Dehkordi, Z. D. Liu, R. C. Hider, *Eur. J. Med. Chem.* **43** (2008) 1035–1047.
87. A. Fassihi, D. Abedi, L. Saghaie, R. Sabet, H. Fazeli, G. Bostaki, O. Deilami, H.

- Sadinpour, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 2145–2157.
88. L. K. Mydock-McGrane, T. J. Hannan, J. W. Janetka, *Expert Opin. Drug Discov.* **12** (2017) 711–731.
89. M. Tsuchiya, K. Kohata, T. Odashimat, C. R. Science, *Anal. Sci.* **11** (1995) 1–5.
90. R. L. N. Harris, *Aust. J. Chem.* **29** (1976) 1329–1334.
91. K. Jakopčić, B. Tamhina, F. Zorko, M. J. Herak, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **39** (1977) 1201–1203.
92. A. Gojmerac Ivšić, V. Tomišić, Ž. Car, B. Prugovečki, S. Tomić, *J. Mol. Struct.* **990** (2011) 237–243.
93. R. J. C. Kleipool, J. P. Wibaut, *Recl. Des Trav. Chim. Des Pays-Bas* **69** (1950) 1041–1047.
94. C. Queiros, M. J. Amorim, A. Leite, M. Ferreira, P. Gameiro, B. De Castro, K. Biernacki, A. Magalhães, J. Burgess, M. Rangel, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2011) 131–140.
95. A. N. L. Saghaie, M. Mirmohammad Sadeghi, *Res. Pharm. Sci.* **1** (2006) 40–48.
96. Z. Zhang, S. J. Rettig, C. Orvig, (1991) 509–515.
97. L. S. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
98. V. K. Redasani, S. B. Bari, *Prodrug Des.* (2015) 7–20.
99. <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>, 15. lipnja 2021.
100. E. De Clercq, *Nat. Rev. Drug Discov.* **5** (2006) 1015–1025.
101. S. D. Cady, W. Luo, F. Hu, M. Hong, *Biochemistry* **48** (2009) 7356–7364.
102. J. Balzarini, B. Orzeszko-Krzesińska, J. K. Maurin, A. Orzeszko, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 303–311.
103. A. Levitzki, E. Mishani, *Annu. Rev. Biochem.* **75** (2006) 93–109.
104. M. Malo, L. Brive, K. Luthman, P. Svensson, *Chem. Med. Chem.* **5** (2010) 232–246.
105. E. L. Anderson, L. P. van Voris, J. Bartram, H. E. Hoffman, R. B. Belshe, *Antimicrob. Agents Chemother.* **31** (1987) 1140–1142.
106. R. J. Wills, D. A. Farolino, N. Choma, N. Keigher, *Antimicrob. Agents Chemother.* **31** (1987) 826–828.
107. J. L. Sebaugh, *Pharm. Stat.* **10** (2011) 128–134.
108. N. Kolocouris, G. Zoidis, G. B. Foscolos, G. Fytas, S. R. Prathalingham, J. M. Kelly, L. Naesens, E. De Clercq, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17** (2007) 4358–4362.
109. G. Zoidis, N. Kolocouris, J. M. Kelly, S. R. Prathalingam, L. Naesens, E. De Clercq, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 5022–5030.
110. K. S. Rosenthal, M. S. Sokol, R. L. Ingram, R. Subramanian, R. C. Fort, *Antimicrob. Agents Chemother.* **22** (1982) 1031–1036.
111. G. E. Piérard, C. Piérard-Franchimont, P. Paquet, P. Quatresooz, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **5** (2009) 1565–1575.
112. <https://www.britannica.com/science/analgesia>, 15. lipnja 2021.
113. A. Baxter, J. Bent, K. Bowers, M. Braddock, S. Brough, M. Fagura, M. Lawson, T. McInally, M. Mortimore, M. Robertson, R. Weaver, P. Webborn, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **13** (2003) 4047–4050.
114. V. M. Dembitsky, T. A. Gloriovova, V. V. Poroikov, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **529** (2020) 1225–1241.
115. S. Cascioferro, A. Attanzio, V. Di Sarno, S. Musella, L. Tesoriere, G. Cirrincione, P. Diana, B. Parrino, *Mar. Drugs* **17** (2019) 1–15.
116. M. D. Aytemir, B. Özçelik, *Med. Chem. Res.* **20** (2011) 443–452.
117. S. Chandra, A. Roy, M. Jana, K. Pahan, *Neurobiol. Dis.* **124** (2019) 379–395.
118. S. Yilmaz, M. Sova, S. Ergün, *Antimicrobial activity of trans-cinnamic acid and*

- commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates*, 2018.
119. M. P. Rodrigues, D. C. Tomaz, L. Ângelo de Souza, T. S. Onofre, W. Aquiles de Menezes, J. Almeida-Silva, A. M. Suarez-Fontes, M. Rogéria de Almeida, A. Manoel da Silva, G. C. Bressan, M. A. Vannier-Santos, J. L. Rangel Fietto, R. R. Teixeira, *Eur. J. Med. Chem.* **183** (2019).
 120. O. M. Abd El-Raouf, E. S. M. El-Sayed, M. F. Manie, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **29** (2015) 426–431.
 121. E. Ugazio, M. E. Carlotti, S. Sapino, M. Trotta, D. Vione, C. Minero, *J. Dispers. Sci. Technol.* **29** (2008) 641–652.
 122. A. Atmaram Upare, P. K. Gadekar, H. Sivaramakrishnan, N. Naik, V. M. Khedkar, D. Sarkar, A. Choudhari, S. Mohana Roopan, *Bioorg. Chem.* **86** (2019) 507–512.
 123. Z. Deng, C. Li, D. Luo, P. Teng, Z. Guo, X. Tu, K. Zou, D. Gong, *Nat. Prod. Res.* **31** (2017) 2413–2419.
 124. B. Korošec, M. Sova, S. Turk, N. Kraševac, M. Novak, L. Lah, J. Stojan, B. Podobnik, S. Berne, N. Zupanec, M. Bunc, S. Gobec, R. Komel, *J. Appl. Microbiol.* **116** (2014) 955–966.
 125. R. Wang, W. Yang, Y. Fan, W. Dehaen, Y. Li, H. Li, W. Wang, Q. Zheng, Q. Huai, *Bioorg. Chem.* **88** (2019) 102951.
 126. G. D. de A. Lima, M. P. Rodrigues, T. A. de O. Mendes, G. A. Moreira, R. P. Siqueira, A. M. da Silva, B. G. Vaz, J. L. R. Fietto, G. C. Bressan, M. Machado-Neves, R. R. Teixeira, *Toxicol. Vitro.* **53** (2018) 1–9.
 127. J. S. Lan, J. W. Hou, Y. Liu, Y. Ding, Y. Zhang, L. Li, T. Zhang, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32** (2017) 776–788.
 128. S. Ghafary, Z. Najafi, M. Mohammadi-Khanaposhtani, H. Nadri, N. Edraki, N. Ayashi, B. Larijani, M. Amini, M. Mahdavi, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **351** (2018) 1–10.
 129. Y. Guo, Y. Yu, L. Han, S. Ma, J. Zhao, H. Chen, Z. Yang, F. Zhang, Y. Xia, Y. Zhou, *Mater. Sci. Eng. C* **100** (2019) 226–235.
 130. J. B. Jin, B. Cai, J. M. Zhou, *Horm. Metab. Signal. Plants* (2017) 273–289.
 131. N. Ruwizhi, B. A. Aderibigbe, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 1–36.
 132. J. Zhang, S. Wang, Y. Ba, Z. Xu, *Eur. J. Med. Chem.* **174** (2019) 1–8.
 133. J. F. Malheiro, J. Y. Maillard, F. Borges, M. Simões, *Int. Biodeterior. Biodegradation* **141** (2019) 71–78.
 134. <https://hr.differencevs.com/6852932-difference-between-cell-migration-and-invasion>., 9. srpnja 2021.
 135. <https://hr.healthandmedicineinfo.com/zelladh-sion-P42>., 10. srpnja 2021.
 136. C. M. Tsai, G. C. Yen, F. M. Sun, S. F. Yang, C. J. Weng, *Mol. Pharm.* **10** (2013) 1890–1900.
 137. R. Brewster, P. A. Pincus, S. A. Safran, *Biophys. J.* **97** (2009) 1087–1094.
 138. W. J. T. A. Rahman, M. Iqbal Choudhary, *Bioassay Techniques for Drug Development*, Harwood Academic, Amsterdam, 2001.
 139. S. Fox, S. Farr-Jones, L. Sopchak, A. Boggs, H. W. Nicely, R. Khoury, M. Biros, *J. Biomol. Screen.* **11** (2006) 864–869.
 140. V. C. Abraham, D. L. Taylor, J. R. Haskins, *Trends Biotechnol.* **22** (2004) 15–22.
 141. M. K. Ediriweera, K. H. Tennekoon, S. R. Samarakoon, *J. Appl. Toxicol.* **39** (2019) 38–71.
 142. X. W. L. S. George, H. Pang, *Cancer Clinical Trials*, CRC Press, Boca Raton, 2016.
 143. D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **144** (2011) 646–674.

144. F. A. Barile, *Introduction to In Vitro Cytotoxicology Mechanisms and Methods*, CRC Press, Boca Raton, 1994.
145. G. Fotakis, J. A. Timbrell, *Toxicol. Lett.* **160** (2006) 171–177.
146. Berridge MV, Tan AS., *Arch Biochem Biophys* **2** (1993) 474–82.
147. D. Gerlier, N. Thomasset, *J. Immunol. Methods* **94** (1986) 57–63.
148. M. J. Stoddart, *Methods Mol. Biol.* **740** (2011) 1–6.
149. C. C. Chang, X. H. Ling, H. F. Hsu, J. M. Wu, C. P. Wang, J. F. Yang, L. W. Fang, J. Y. Houg, *Molecules* **21** (2016) 1–13.
150. S. Anoopkumar-Dukie, J. B. Carey, T. Conere, E. O’Sullivan, F. N. Van Pelt, A. Allshire, *Br. J. Radiol.* **78** (2005) 945–947.
151. L. P. Candeias, D. P. S. MacFarlane, S. L. W. McWhinnie, N. L. Maidwell, C. A. Roeschlaub, P. G. Sammes, R. Whittlesey, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2333** (1998) 2333–2334.
152. D. Bratosin, L. Mitrofan, C. Palii, J. Estaquier, J. Montreuil, *Cytom. Part A* **66** (2005) 78–84.
153. P. J. Smith, R. A. Falconer, R. J. Errington, *J. Microsc.* **251** (2013) 113–122.
154. B. L. Strehler, W. D. McElroy, *Methods Enzymol.* **3** (1957) 871–873.
155. S. M. Smith, M. B. Wunder, D. A. Norris, Y. G. Shellman, *PLoS One* **6** (2011).
156. *Vogel’s Textbook of Practical Organic Chemistry, Fourth edition*, Longman, London, 1978.
157. V. Petrović Peroković, R. Ribić, Ž. Car, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **89** (2016) 237–242.
158. H. Arya, M. S. Coumar, *Des. Dev. Nov. Drugs Vaccines* (2021) 31–63.
159. R. Ratheesh, K. Viswanathan, *IOSR J. Appl. Phys.* **6** (2014) 01–09.
160. L. G. Wade, *Organic Chemistry*, Pearson Publishing, Boston, 2013.
161. P. W. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry 1st edition*, Oxford University Press, Oxford, 2000.
162. B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **17** (1978) 522–524.
163. F. Yuste, M. Saldaña, F. Walls, *Tetrahedron Lett.* **23** (1982) 147–148.
164. I. Radojčić Redovniković, M. Cvjetko Bubalo, V. Gaurina Srček, *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **11** (2016) 169–175.
165. O. A. Peña-Morán, M. L. Villarreal, L. Álvarez-Berber, A. Meneses-Acosta, V. Rodríguez-López, *Molecules* **21** (2016) 1–15.
166. <https://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/introductiontoquantitativestructureactivityrelationships.htm>., 15. srpnja 2021.

§ 8. DODATAK

8.1. Biološka evaluacija *meta*- i *para*- supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata

Tablica D1. *In vitro* antiproliferativna aktivnost *meta* i *para* *N*-aril supstituiranih 3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata

Oznaka spoja	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)					
	HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PANC-1 ⁴	THP-1 ⁵	NHLF ⁶
1	29,36	>100	>100	17,62	19,50	17,27
2	44,81	>100	>100	22,82	20,02	14,86
3	14,7	>100	5,5	21,0	15,1	15,2
4	9,8	7,9	5,7	15,5	7,9	21,0
5	5,4	18,5	4,9	9,5	5,0	11,8
6	19,2	>100	16,3	31,5	19,1	21,0
7	17,6	>100	13,8	29,8	19,7	17,5
8	28,69	>100	>100	15,89	18,36	24,16
9	75,26	>100	>100	37,13	65,89	31,25
10	38,32	94,82	>100	34,08	26,14	24,75
11	26,0	28,0	16,7	20,0	15,7	20,2
12	23,0	28,6	11,1	14,2	21,2	17,1
13	18,8	25,5	8,7	13,0	15,5	13,2
14	6,3	8,4	5,6	10,8	4,8	8,8
15**	-	-	-	-	-	-

Oznaka spoja	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)					
	HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PANC-1 ⁴	THP-1 ⁵	NHLF ⁶
19	>100	5,71	>100	>100	>100	>100
20	>100	>100	71,33	75,92	54,57	>100
21	33,6	63,0	18,3	>100	>100	23,5
22	35,2	67,4	16,2	>100	>100	18,0
23	32,5	30,2	9,6	18,9	12,2	12,7
24	>100	>100	10,6	>100	>100	11,6
25	>100	48,6	27,1	>100	>100	23,2
26*	>100	>100	>100	>100	>100	>100
27	>100	>100	13,6	>100	>100	11,2
28	16,8	54,1	18,9	>100	>100	15,5
29	>100	>100	10,0	>100	>100	>100
30**	-	-	-	-	-	-
31	>100	>100	35,8	>100	>100	>100
32	>100	>100	>100	>100	>100	>100
33*	>100	>100	>100	>100	>100	>100
35	2,15	2,09	>100	1,50	2,10	4,57
37	8,16	16,37	47,21	26,95	21,47	3,50
38	>100	>100	>100	>100	>100	58,50
45*	>100	>100	30,46	35,88	>100	7,87
46	57,30	>100	>100	>100	>100	35,01

¹HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva; ²MCF-7-stanice raka dojke; ³NCI-H460-stanice karcinoma pluća;

⁴PANC-1-stanice raka gušterače; ⁵THP-1-stanice akutne monocitne leukemije; ⁶NHLF-normalni humani plućni

fibroblasti; *Smanjena topljivost pri koncentracijama >25 mM; **Smanjena topljivost pri koncentraciji 30 mM stock otopine.

Tablica D2. *In vitro* antiproliferativna aktivnost spojeva **24**, **27** i **46** na odabranim staničnim linijama

Oznaka spoja	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)						
	HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PANC-1 ⁴	THP-1 ⁵	NHLF ⁶	SI ⁷
24	>100	>100	10,6	>100	>100	11,6	1,09 (NCI-H460 ³)
27	>100	>100	13,6	>100	>100	11,2	0,82 (NCI-H460 ³)
46	57,30	>100	>100	>100	>100	35,01	0,62 (HCT-116 ¹)

¹HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva; ²MCF-7-stanice raka dojke; ³NCI-H460-stanice karcinoma pluća; ⁴PANC-1-stanice raka gušterače; ⁵THP-1-stanice akutne monocitne leukemije; ⁶NHLF-normalni humani plućni fibroblasti; ⁷SI-faktor selektivnosti.

Tablica D3. *In vitro* antiproliferativna aktivnost spojeva **19**, **29** i **31** na odabranim staničnim linijama

Oznaka spoja	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)						
	HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PANC-1 ⁴	THP-1 ⁵	NHLF ⁶	SI ⁷
19	>100	5,71	>100	>100	>100	>100	>17,51 (MCF-7 ²)
29	>100	>100	10,0	>100	>100	>100	>10 (NCI-H460 ³)
31	>100	>100	35,8	>100	>100	>100	>2,79 (NCI-H460 ³)

¹HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva; ²MCF-7-stanice raka dojke; ³NCI-H460-stanice karcinoma pluća; ⁴PANC-1-stanice raka gušterače; ⁵THP-1-stanice akutne monocitne leukemije; ⁶NHLF-normalni humani plućni fibroblasti; ⁷SI-faktor selektivnosti.

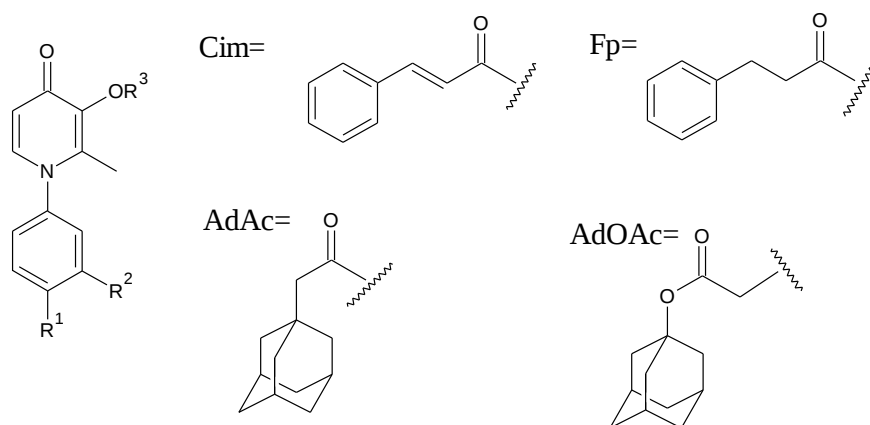
Tablica D4. *In vitro* antiproliferativna aktivnost odabranih spojeva na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460

Oznaka spoja	MTS ¹	ATP ²	AK ³
		IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)	
1	35,8	26,4	46,3
7	29,6	25,0	45,6
14	7,6	5,0	17,3
19	>100	>100	>100
25	46,2	42,9	68,5
29	17,2	14,9	>100

¹MTS -(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) test; ²ATP-količina ATP-a u stanicama; ³AK-količina adenilat-kinaze u mediju.

8.2. Povezanost strukture i biološke aktivnosti *meta*- i *para*- supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata

Tablica D5. SAR studija *meta* i *para* *N*-aril supstituiranih 3,4-HP-a i njihovih lipofilnih derivata

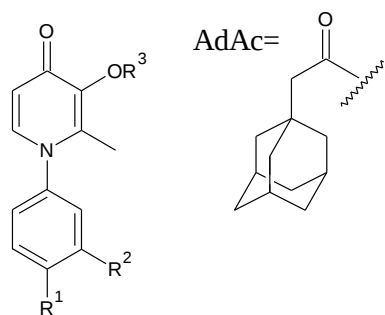


Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)					
				HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PANC-1 ⁴	THP-1 ⁵	NHLF ⁶
1	H	Me	H	29,36	>100	>100	17,62	19,50	17,27
2	H	OMe	H	44,81	>100	>100	22,82	20,02	14,86
3	H	Et	H	14,7	>100	5,5	21,0	15,1	15,2
4	H	<i>i</i> Pr	H	9,8	7,9	5,7	15,5	7,9	21,0
5	H	<i>t</i> Bu	H	5,4	18,5	4,9	9,5	5,0	11,8
6	H	Cl	H	19,2	>100	16,3	31,5	19,1	21,0
7	H	CF ₃	H	17,6	>100	13,8	29,8	19,7	17,5
8	H	NO ₂	H	28,69	>100	>100	15,89	18,36	24,16

Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)					
				HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PANC-1 ⁴	THP-1 ⁵	NHLF ⁶
9	H	NH ₂	H	75,26	>100	>100	37,13	65,89	31,25
10	H	OH	H	38,32	94,82	>100	34,08	26,14	24,75
11	Et	H	H	26,0	28,0	16,7	20,0	15,7	20,2
12	Pr	H	H	23,0	28,6	11,1	14,2	21,2	17,1
13	<i>i</i> Pr	H	H	18,8	25,5	8,7	13,0	15,5	13,2
14	<i>t</i> Bu	H	H	6,3	8,4	5,6	10,8	4,8	8,8
15**	Cl	H	H	-	-	-	-	-	-
19	H	Me	AdAc	>100	5,71	>100	>100	>100	>100
20	H	OMe	AdAc	>100	>100	71,33	75,92	54,57	>100
21	H	Et	AdAc	33,6	63,0	18,3	>100	>100	23,5
22	H	<i>i</i> Pr	AdAc	35,2	67,4	16,2	>100	>100	18,0
23	H	<i>t</i> Bu	AdAc	32,5	30,2	9,6	18,9	12,2	12,7
24	H	Cl	AdAc	>100	>100	10,6	>100	>100	11,6
25	H	CF ₃	AdAc	>100	48,6	27,1	>100	>100	23,2
26*	H	NO ₂	AdAc	>100	>100	>100	>100	>100	>100
27	Et	H	AdAc	>100	>100	13,6	>100	>100	11,2
28	Pr	H	AdAc	16,8	54,1	18,9	>100	>100	15,5
29	<i>i</i>Pr	H	AdAc	>100	>100	10,0	>100	>100	>100
30**	<i>t</i> Bu	H	AdAc	-	-	-	-	-	-
31	Cl	H	AdAc	>100	>100	35,8	>100	>100	>100

Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)					
				HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PANC-1 ⁴	THP-1 ⁵	NHLF ⁶
32	H	NH ₂	AdAc	>100	>100	>100	>100	>100	>100
33*	H	NHAdAc	AdAc	>100	>100	>100	>100	>100	>100
35	H	NHAdAc	H	2,15	2,09	>100	1,50	2,10	4,57
37	H	OAdAc	H	8,16	16,37	47,21	26,95	21,47	3,50
38	H	OAdAc	AdAc	>100	>100	>100	>100	>100	58,50
45*	OCim	H	Bn	>100	>100	30,46	35,88	>100	7,87
46	OFp	H	H	57,30	>100	>100	>100	>100	35,01
47	H	H	AdOAc	-	-	-	-	-	-
48	CH ₃	H	AdOAc	-	-	-	-	-	-
49	OCH ₃	H	AdOAc	-	-	-	-	-	-
50	NO ₂	H	AdOAc	-	-	-	-	-	-

¹HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva; ²MCF-7-stanice raka dojke; ³NCI-H460-stanice karcinoma pluća; ⁴PANC-1-stanice raka gušterače; ⁵THP-1-stanice akutne monocitne leukemije; ⁶NHLF-normalni humani plućni fibroblasti; *Smanjena topljivost pri koncentracijama >25 mM; **Smanjena topljivost pri koncentraciji 30 mM stock otopine.

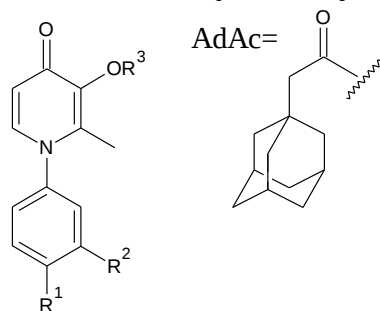
Tablica D6. Povezanost strukture i biološke aktivnosti literaturno opisanih spojeva⁹

Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)			
				HCT 116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	MDCK ⁴
XLIIIa	H	H	H	24 ± 4	25 ± 4	26 ± 8	9 ± 0,8
XLIIIb	Me	H	H	24±7	13±10	14±2	8 ± 0,7
XLIIIc	OMe	H	H	26±3	32±8	29±8	9 ± 1
XLIIId	NO ₂	H	H	27±2	32±1	23±6	10 ± 4
XLIIIe	OH	H	H	30±2	53±45	45±23	43 ± 4
XLIIIf	NH ₂	H	H	46±25	37±2	46±0,6	58±15
XLIVa	H	H	AdAc	52±14	24±7	39±6	9 ± 1
XLIVb*	Me	H	AdAc	18±2	19±3	27±7	34 ± 15
XLIVc	OMe	H	AdAc	36±8	25±6	45±1	52 ± 6
XLIVd*	NO ₂	H	AdAc	≥100	33±2	≥100	79 ± 18
XXXVa*	NHAdAc	H	AdAc	2±0,9	1±0,9	2±1	6 ± 0,2
XXXVb*	NHAdAc	H	H	0,4±0,03	0,3±0,03	0,5±0,2	6 ± 0,4
XXXVc	OAdAc	H	H	2±0,2	0,8±0,1	0,9±0,2	6 ± 0,2
XXXVd*	OAdAc	H	AdAc	4±0,8	2±0,2	5±2	6 ± 0,1

¹HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva; ²MCF-7-stanice raka dojke; ³NCI-H460-stanice karcinoma pluća;

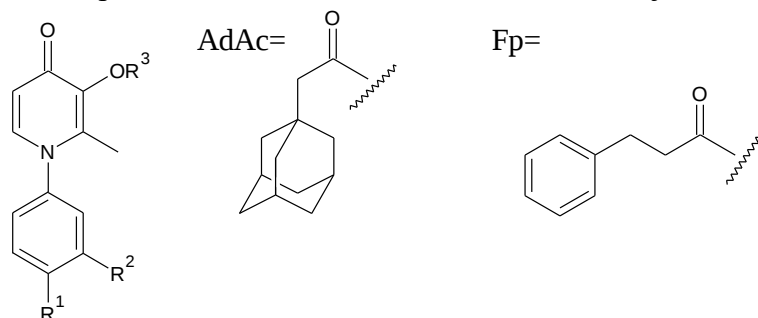
⁴MDCK-stanice bubrega psa; *Spojevi su taložili pri 10⁻⁴ M nakon 72 h

Tablica D7. Usporedba strukture i *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva **1**, **19**, **7**, **25**, **14** i **29** na tumorskoj staničnoj liniji NCI-H460



Oznaka spoja	R^1	R^2	R^3	MTS ¹	ATP ²	AK ³
IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)						
1	H	Me	H	35,8	26,4	46,3
19	H	Me	AdAc	>100	>100	>100
7	H	CF ₃	H	29,6	25,0	45,6
25	H	CF ₃	AdAc	46,2	42,9	68,5
14	<i>t</i> Bu	H	H	7,6	5,0	17,3
29	<i>i</i> Pr	H	AdAc	17,2	14,9	>100

¹MTS -(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) test; ²ATP-količina ATP-a u stanicama; ³AK-količina adenilat-kinaze u mediju.

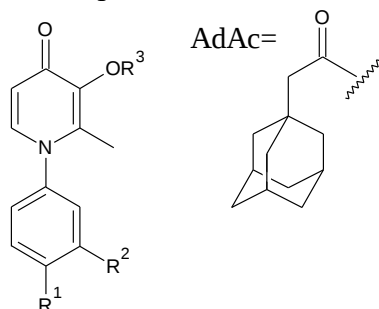
Tablica D8. Usporedba strukture i selektivne *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva **24**, **27** i **46** prema određenim tumorskim staničnim linijama

Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)						
				HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PANC-1 ⁴	THP-1 ⁵	NHLF ⁶	SI ⁷
24	H	Cl	AdAc	>100	>100	10,6	>100	>100	11,6	1,09 (NCI-H460 ³)
27	Et	H	AdAc	>100	>100	13,6	>100	>100	11,2	0,82 (NCI-H460 ³)
46	OFp	H	H	57,30	>100	>100	>100	>100	35,01	0,62 (HCT-116 ¹)

¹HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva; ²MCF-7-stanice raka dojke; ³NCI-H460-stanice karcinoma pluća;

⁴PANC-1-stanice raka gušterače; ⁵THP-1-stanice akutne monocitne leukemije; ⁶NHLF-normalni humani plućni fibroblasti; ⁷SI-faktor selektivnosti

Tablica D9. Usporedba strukture i selektivne *in vitro* antiproliferativne aktivnosti spojeva **19**, **29** i **31** prema tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju NHLF



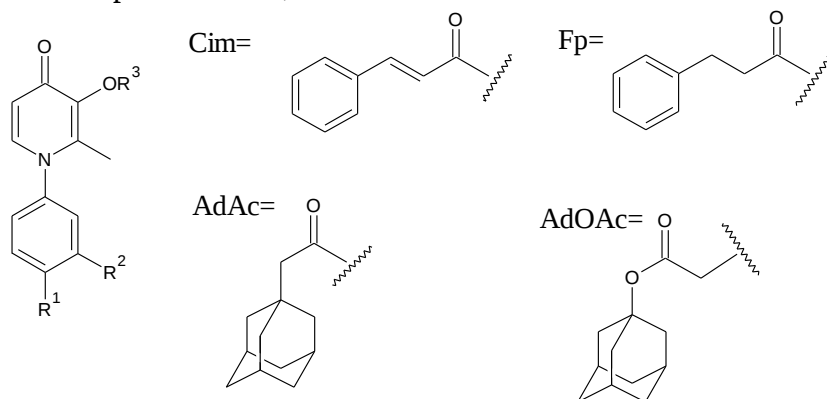
Oznaka spoja	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)									
	R ¹	R ²	R ³	HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PANC-1 ⁴	THP-1 ⁵	NHLF ⁶	SI ⁷
19	H	Me	AdAc	>100	5,71	>100	>100	>100	>100	>17,51 (MCF-7 ²)
29	<i>i</i> Pr	H	AdAc	>100	>100	10,0	>100	>100	>100	>10 (NCI-H460 ³)
31	Cl	H	AdAc	>100	>100	35,8	>100	>100	>100	>2,79 (NCI-H460 ³)

¹HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva; ²MCF-7-stanice raka dojke; ³NCI-H460-stanice karcinoma pluća;

⁴PANC-1-stanice raka gušterače; ⁵THP-1-stanice akutne monocitne leukemije; ⁶NHLF-normalni humani plućni fibroblasti; ⁷SI-faktor selektivnosti

8.3. Povezanost fizikalno-kemijskih deskriptora s biološkom aktivnosti *meta*- i *para*- supstituiranih *N*-aril-3,4-HP-a

Tablica D10. Povezanost fizikalno-kemijskih deskriptora s biološkom aktivnosti *meta* i *para* *N*-aril supstituiranih 3,4-HP-a



Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)						log <i>P</i>	M/Da
				HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PAN-C-1 ⁴	THP-1 ⁵	NH-LF ⁶		
1	H	Me	H	29,36	>100	>100	17,62	19,50	17,27	1,36	215,25
2	H	OMe	H	44,81	>100	>100	22,82	20,02	14,86	1,22	231,25
3	H	Et	H	14,7	>100	5,5	21,0	15,1	15,2	2,11	229,27
4	H	<i>i</i> Pr	H	9,8	7,9	5,7	15,5	7,9	21,0	2,42	243,30
5	H	<i>t</i> Bu	H	5,4	18,5	4,9	9,5	5,0	11,8	2,95	257,33
6	H	Cl	H	19,2	>100	16,3	31,5	19,1	21,0	1,92	235,66
7	H	CF ₃	H	17,6	>100	13,8	29,8	19,7	17,5	2,32	269,22
8	H	NO ₂	H	28,69	>100	>100	15,89	18,36	24,16	1,06	246,22
9	H	NH ₂	H	75,26	>100	>100	37,13	65,89	31,25	0,57	216,24
10	H	OH	H	38,32	94,82	>100	34,08	26,14	24,75	1,19	217,22

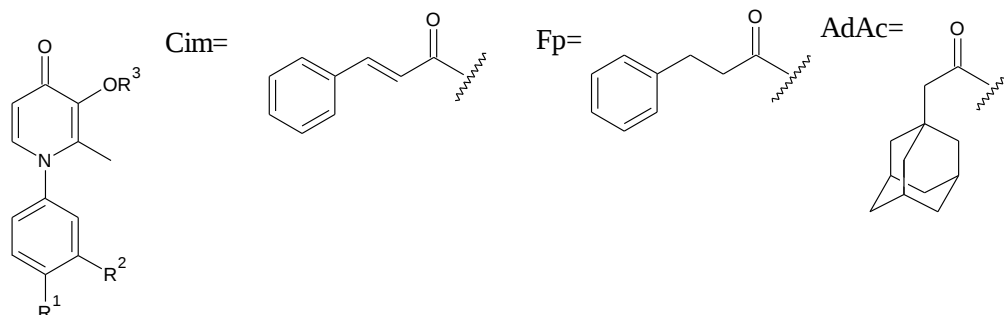
Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)						log <i>P</i>	M/Da
				HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PAN-C-1 ⁴	THP-1 ⁵	NH-LF ⁶		
11	Et	H	H	26,0	28,0	16,7	20,0	15,7	20,2	2,15	229,27
12	Pr	H	H	23,0	28,6	11,1	14,2	21,2	17,1	2,64	243,30
13	<i>i</i> Pr	H	H	18,8	25,5	8,7	13,0	15,5	13,2	2,45	243,30
14	<i>t</i> Bu	H	H	6,3	8,4	5,6	10,8	4,8	8,8	2,99	257,33
15**	Cl	H	H	-	-	-	-	-	-	1,91	235,66
19	H	Me	AdA _c	>100	5,71	>100	>100	>100	>100	4,49	391,50
20	H	OMe	AdA _c	>100	>100	71,33	75,92	54,57	>100	4,43	407,50
21	H	Et	AdA _c	33,6	63,0	18,3	>100	>100	23,5	4,96	405,53
22	H	<i>i</i> Pr	AdA _c	35,2	67,4	16,2	>100	>100	18,0	4,89	419,56
23	H	<i>t</i> Bu	AdA _c	32,5	30,2	9,6	18,9	12,2	12,7	5,21	433,58
24	H	Cl	AdA _c	>100	>100	10,6	>100	>100	11,6	4,49	411,92
25	H	CF ₃	AdA _c	>100	48,6	27,1	>100	>100	23,2	5,39	445,47
26*	H	NO ₂	AdA _c	>100	>100	>100	>100	>100	>100	4,59	422,47
27	Et	H	AdA _c	>100	>100	13,6	>100	>100	11,2	4,91	405,53
28	Pr	H	AdA _c	16,8	54,1	18,9	>100	>100	15,5	5,13	419,56
29	<i>i</i> Pr	H	AdA _c	>100	>100	10,0	>100	>100	>100	4,95	419,56
30**	<i>t</i> Bu	H	AdA _c	-	-	-	-	-	-	5,22	433,58
31	Cl	H	AdA _c	>100	>100	35,8	>100	>100	>100	4,50	411,92
32	H	NH ₂	AdA _c	>100	>100	>100	>100	>100	>100	4,22	392,49
33*	H	NHAdAc	AdA _c	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5,42	568,75
35	H	NHAdAc	H	2,15	2,09	>100	1,50	2,10	4,57	3,76	392,49

Oznaka spoja	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³)						log <i>P</i>	M/Da
				HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PAN-C-1 ⁴	THP-1 ⁵	NH-LF ⁶		
37	H	OAdA c	H	8,16	16,37	47,21	26,95	21,47	3,50	3,85	393,48
38	H	OAdA c	AdA c	>100	>100	>100	>100	>100	58,50	5,44	569,73
45*	OCi m	H	Bn	>100	>100	30,46	35,88	>100	7,87	5,13	437,49
46	OFp	H	H	57,30	>100	>100	>100	>100	35,01	5,35	349,38
47	H	H	AdO Ac	-	-	-	-	-	-	4,38	393,48
48	CH ₃	H	AdO Ac	-	-	-	-	-	-	4,48	407,50
49	OC H ₃	H	AdO Ac	-	-	-	-	-	-	4,20	423,50
50	NO ₂	H	AdO Ac	-	-	-	-	-	-	4,04	438,47

¹HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva; ²MCF-7-stanice raka dojke; ³NCI-H460-stanice karcinoma pluća;

⁴PANC-1-stanice raka gušterače; ⁵THP-1-stanice akutne monocitne leukemije; ⁶NH-LF-normalni humani plućni fibroblasti; *Smanjena topljivost pri koncentracijama >25 mM; **Smanjena topljivost pri koncentraciji 30 mM stock otopine.

Tablica D11. 3,4-HP-i i njihovi lipofilni derivati s fizikalno-kemijskim deskriptorima koji nisu u skladu s Lipinski pravilima



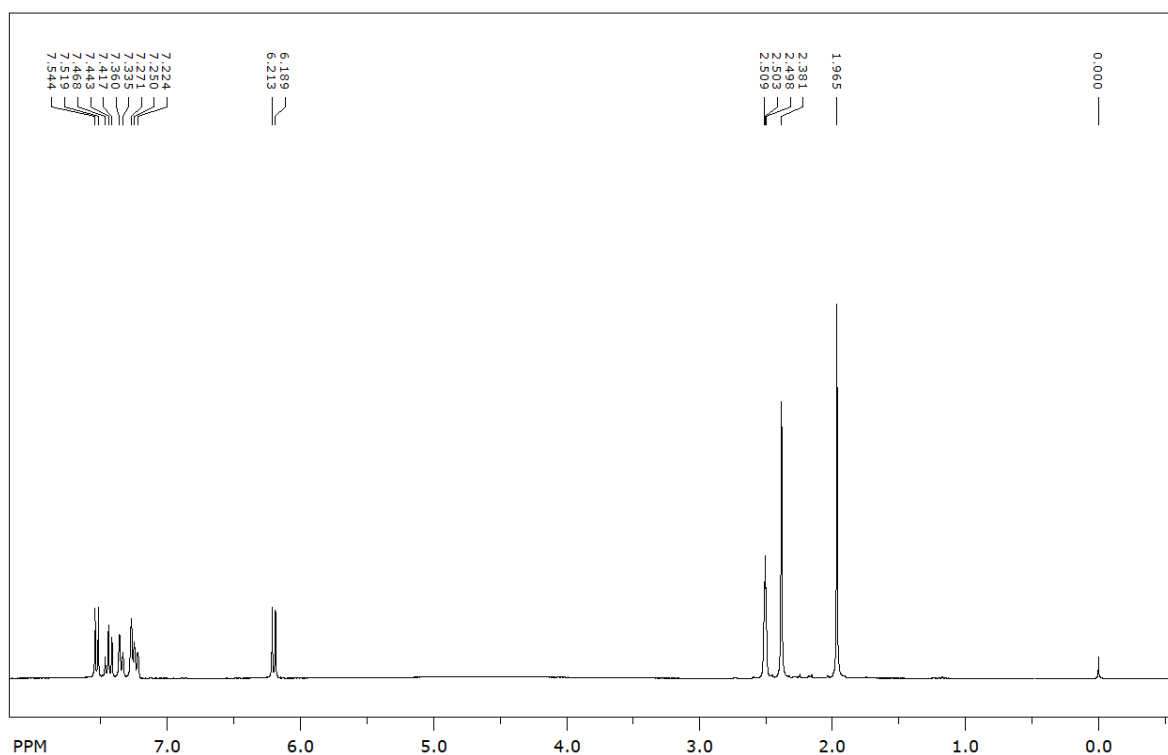
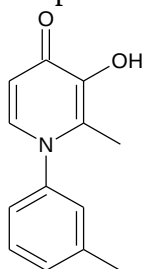
Oznaka spoja	R ₁	R ²	R ³	IC ₅₀ (μM)						log P	M/D a
				HCT-116 ¹	MCF-7 ²	NCI-H460 ³	PAN C-1 ⁴	THP-1 ⁵	NHL F ⁶		
23	H	<i>t</i> Bu	AdA _c	32,5	30,2	9,6	18,9	12,2	12,7	5,21	433,58
25	H	CF ₃	AdA _c	>100	48,6	27,1	>100	>100	23,2	5,39	445,47
28	Pr	H	AdA _c	16,8	54,1	18,9	>100	>100	15,5	5,13	419,56
30**	<i>t</i> Bu	H	AdA _c	-	-	-	-	-	-	5,22	433,58
33*	H	NHAdAc	AdA _c	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5,42	568,75
38	H	OAdAc	AdA _c	>100	>100	>100	>100	>100	58,50	5,44	569,73
45*	OCim	H	Bn	>100	>100	30,46	35,88	>100	7,87	5,13	437,49
46	OFp	H	H	57,30	>100	>100	>100	>100	35,01	5,35	349,38

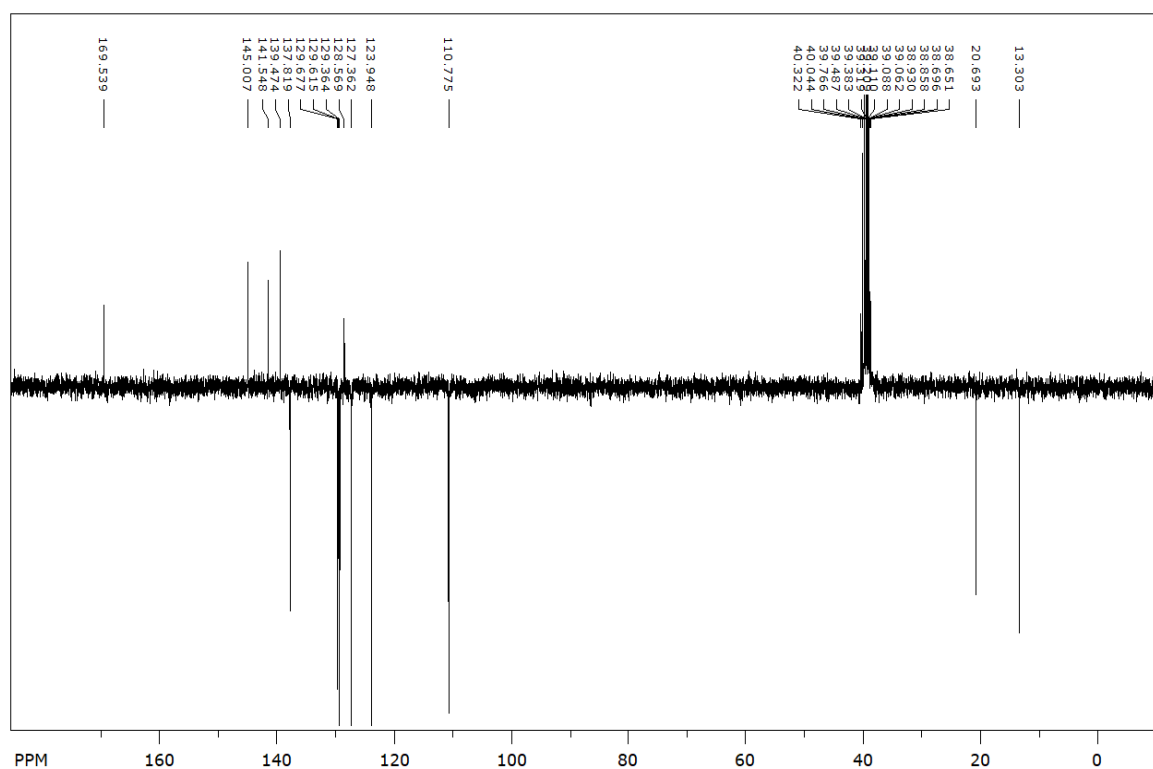
¹HCT-116-stanice karcinoma debelog crijeva; ²MCF-7-stanice raka dojke; ³NCI-H460-stanice karcinoma pluća;

⁴PANC-1-stanice raka gušterače; ⁵THP-1-stanice akutne monocitne leukemije; ⁶NHLF-normalni humani plućni fibroblasti; *Smanjena topljivost pri koncentracijama >25 mM; **Smanjena topljivost pri koncentraciji 30 mM stock otopine.

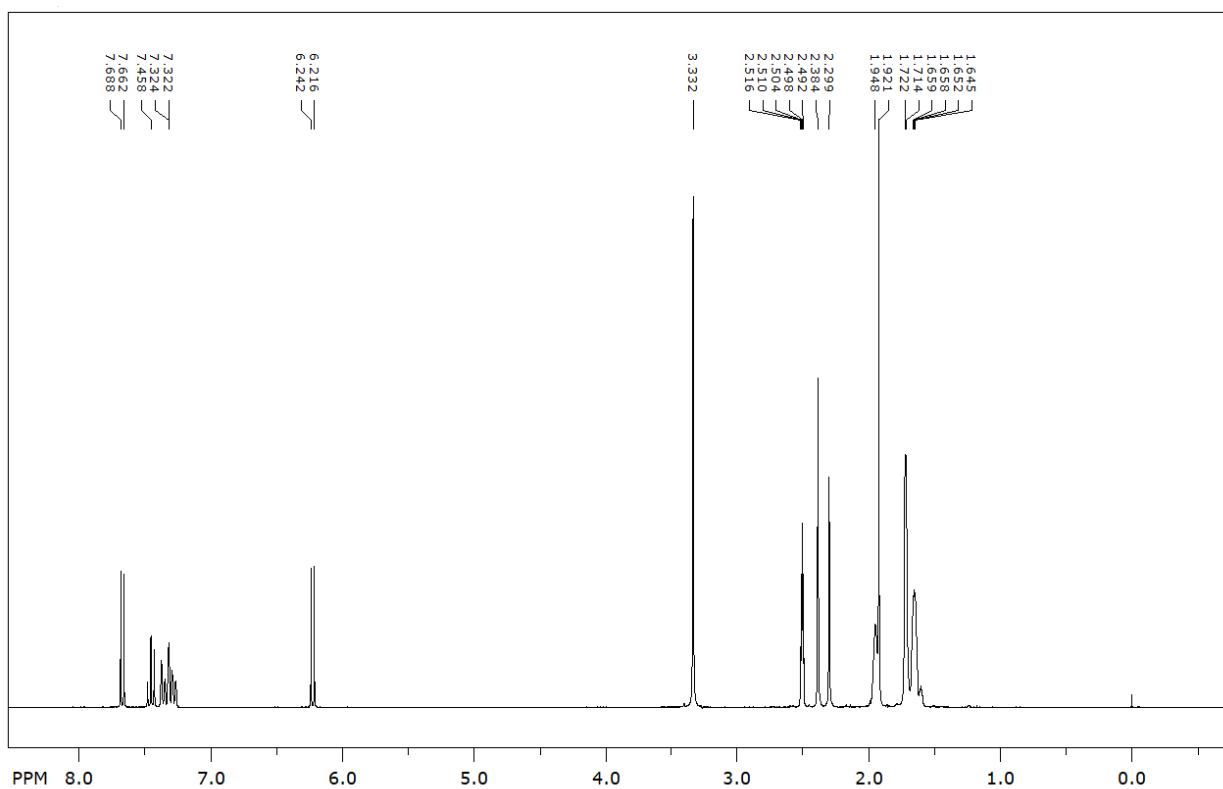
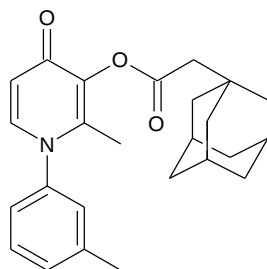
8.4. ^1H i ^{13}C NMR spektri biološki najaktivnijih spojeva i njihovih prekursora

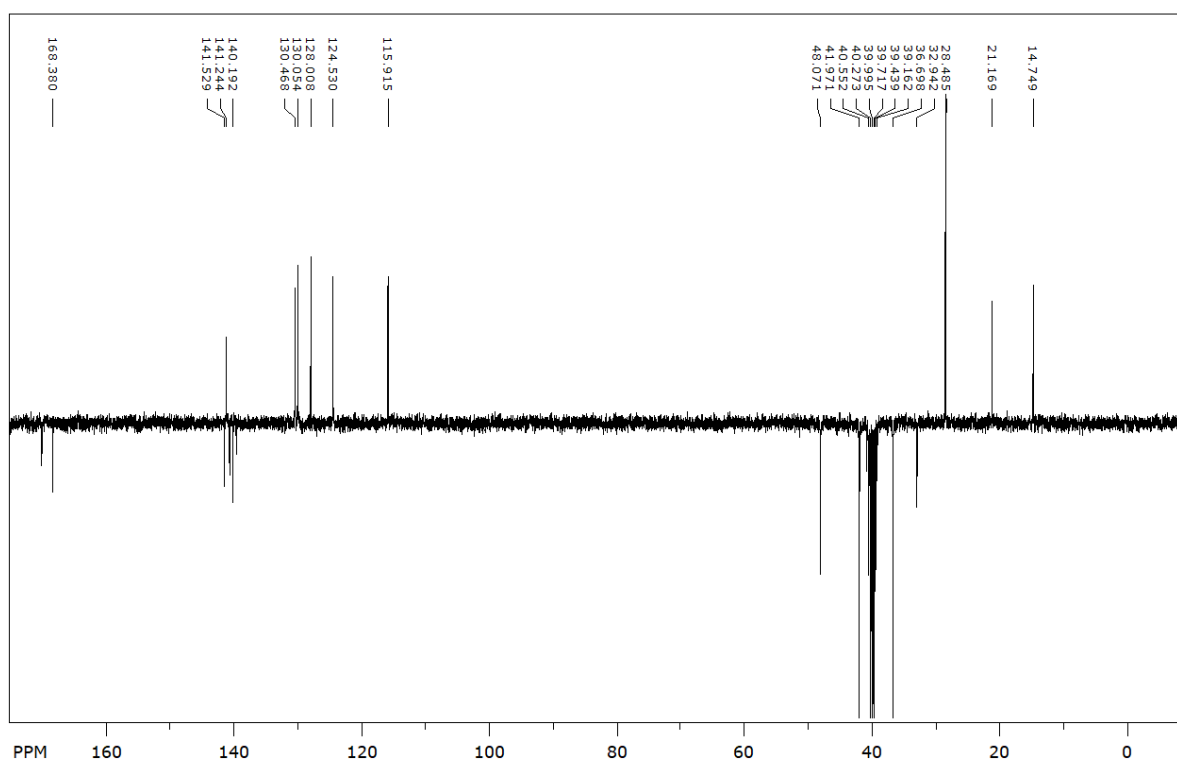
^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) i ^{13}C NMR spektri spoja **1** (150 MHz, CDCl_3)



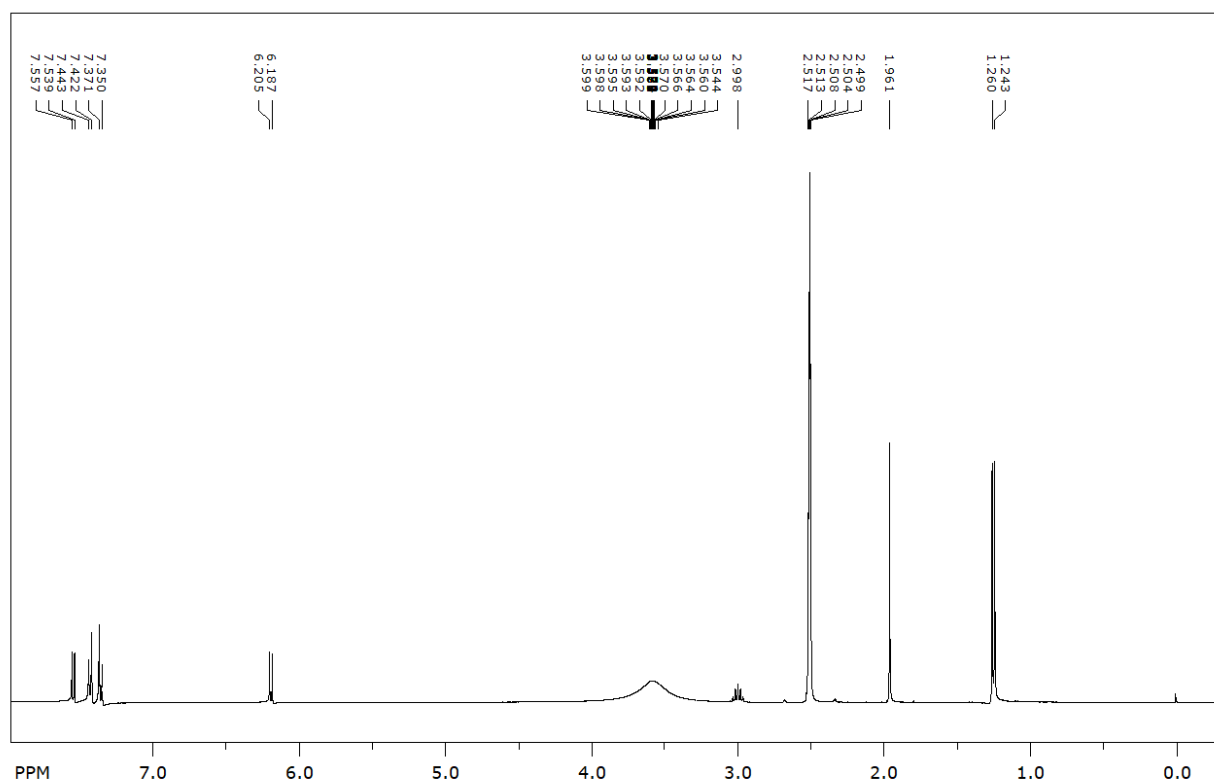
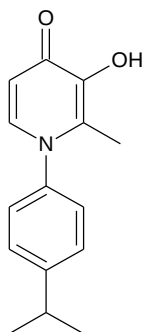


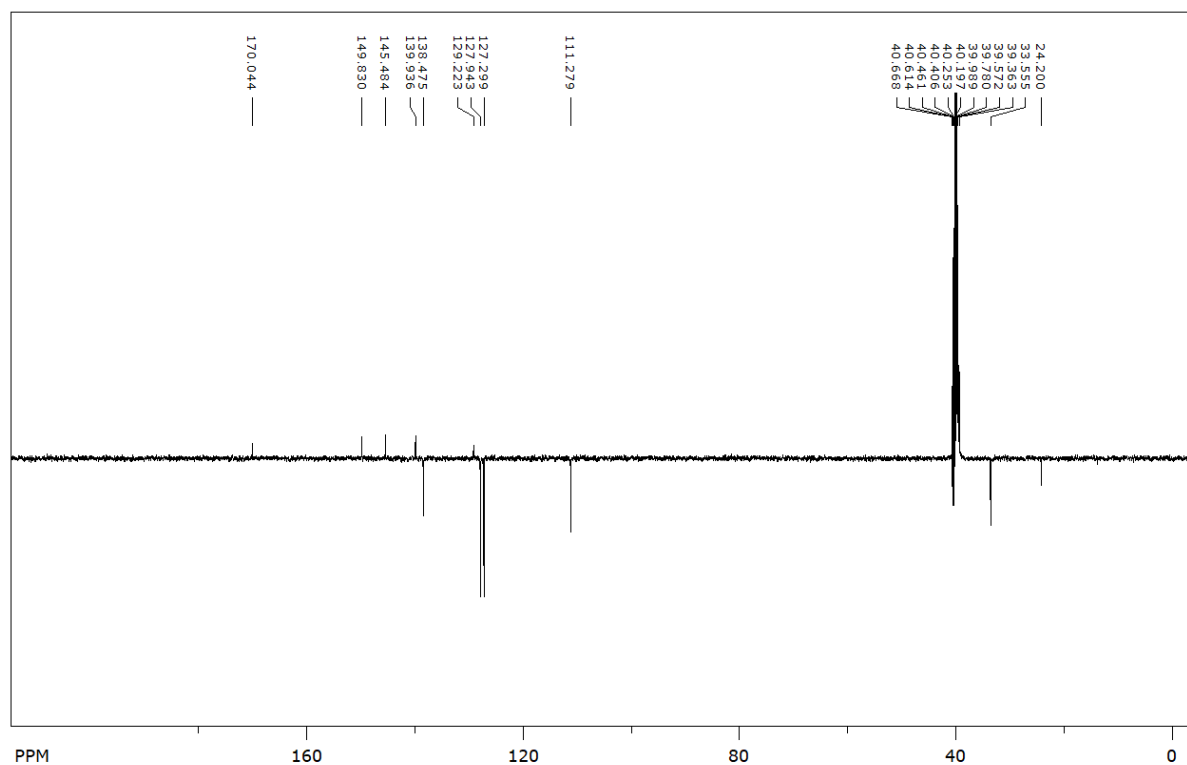
^1H NMR (600 MHz, DMSO) i ^{13}C NMR spektri spoja **19** (150 MHz, CDCl_3)

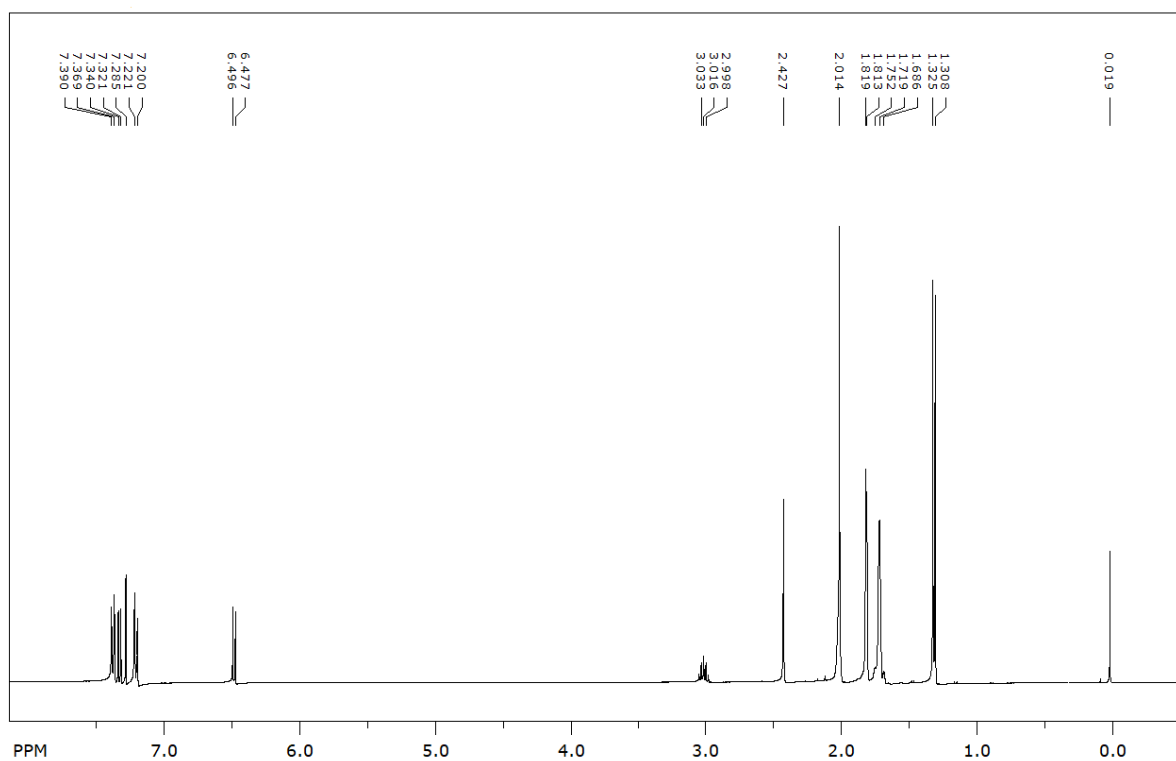
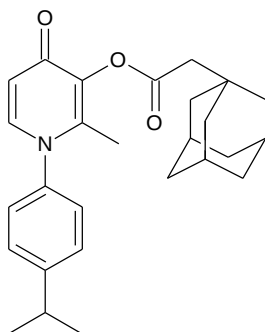


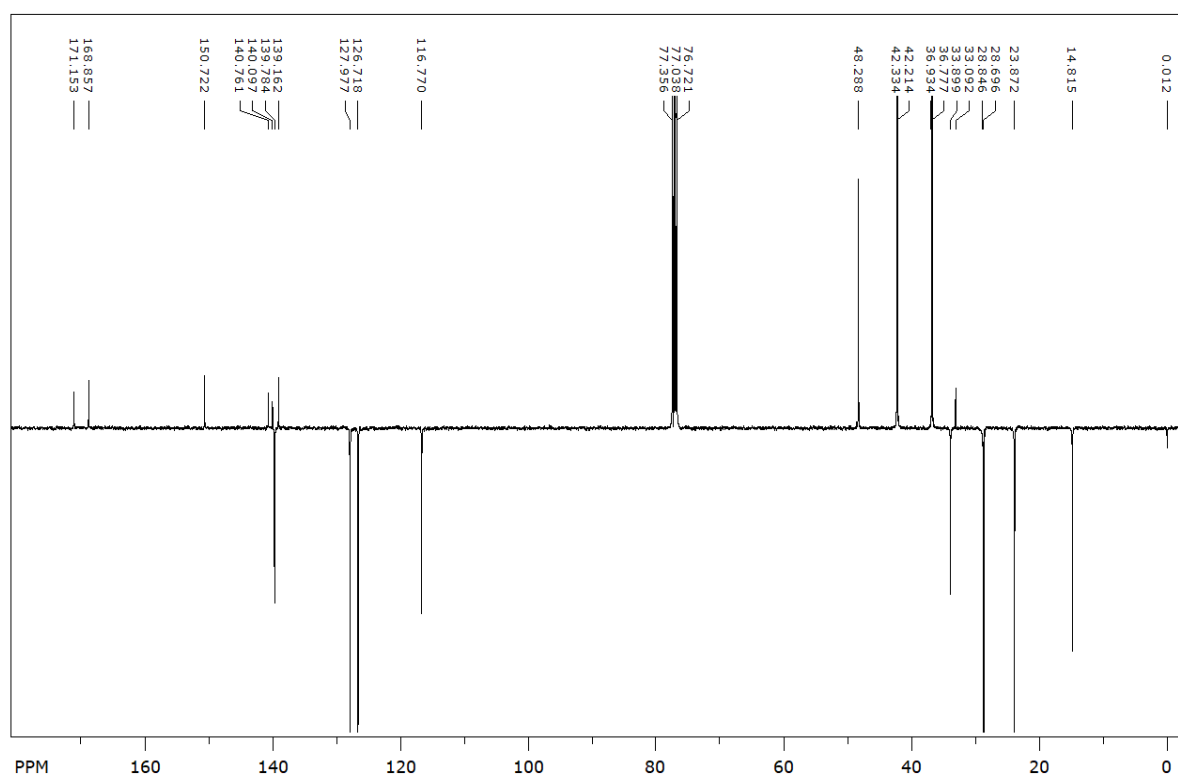


^1H NMR (400 MHz, DMSO) i ^{13}C NMR spektri spoja **13** (100 MHz, DMSO)



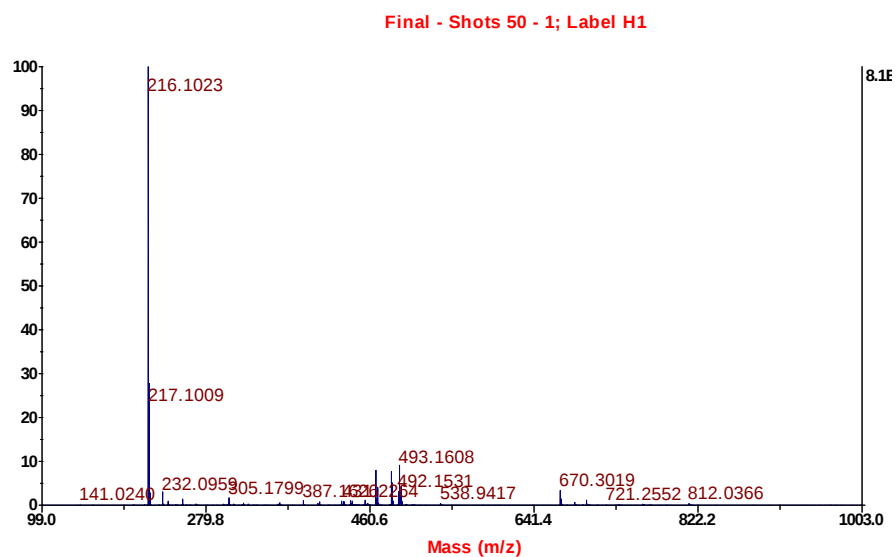


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) i ¹³C NMR spektri spoja **29** (100 MHz, CDCl₃)

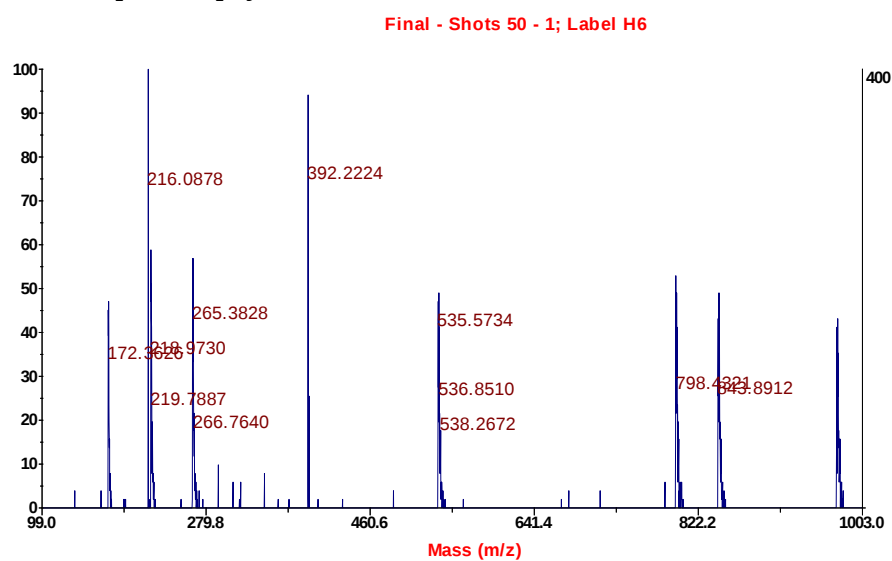


8.5. HRMS spektri biološki najaktivnijih spojeva i njihovih prekursora

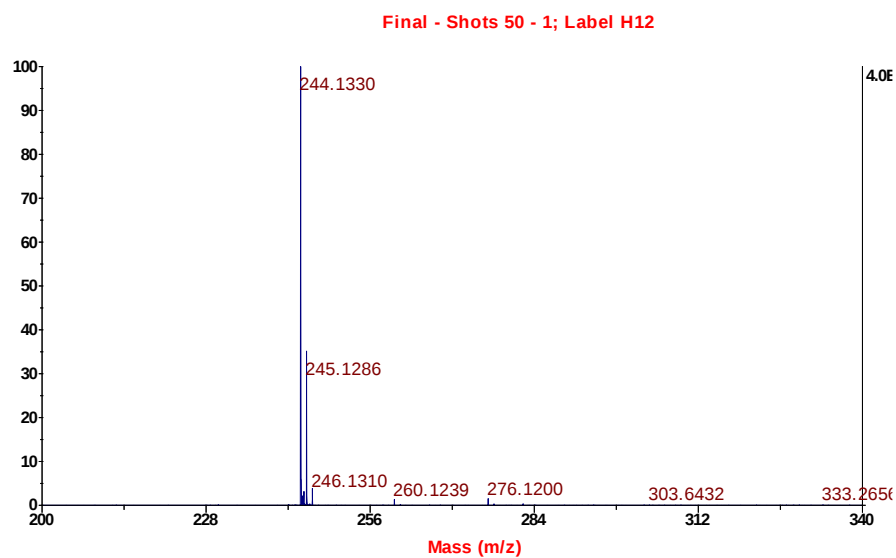
HRMS spektar spoja 1



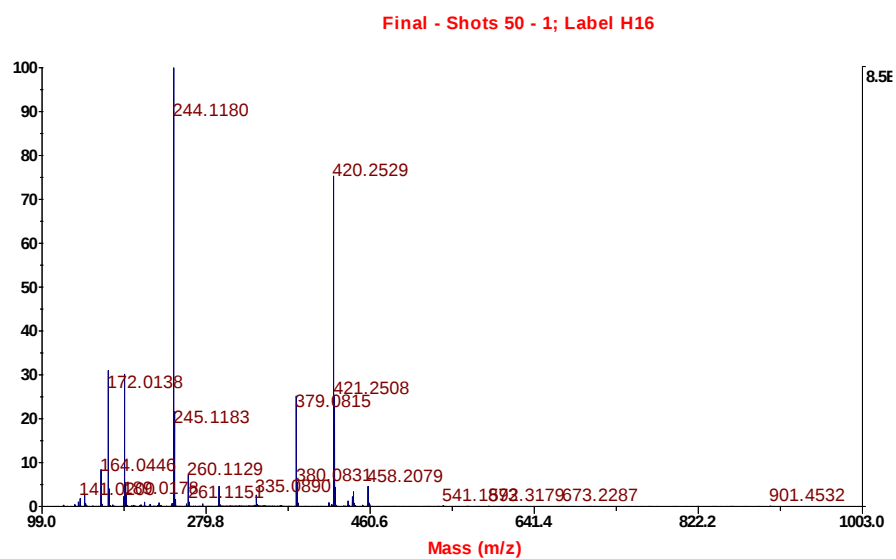
HRMS spektar spoja 19



HRMS spektar spoja 13



HRMS spektar spoja 29



§ 9. ŽIVOTOPIS

Andrea Dandić rođena je 31. siječnja 1991. godine u Vinkovcima. Opću gimnaziju u Županji završava 2009. godine a iste godine upisuje Preddiplomski studij kemije na Odjelu za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Diplomski studij kemije, upisuje 2013. godine na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te diplomira 2015. godine na Zavodu za organsku kemiju s diplomskim radom naziva „Selektivna priprava adamantilnih derivata 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona i kojične kiseline“ (mentor: izv.prof.dr.sc. Vesna Petrović Peroković). Od 2016. godine zaposlena je na Odjelu za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku na radnom mjestu asistent na Zavodu za analitičku, organsku i primijenjenu kemiju. Sudjeluje u izvođenju nastave seminara Organska kemija 1 te Praktikum organske kemije 1 i 2. Sudjelovala je na tri znanstvena projekta i radionicama popularizacije znanosti. Koautorica je na četiri znanstvena rada koje citira baza Web of Science, deset posterskih priopćenja na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima te neposredna voditeljica 6 završnih radova i 3 diplomatska rada. Kao dobitnica stipendije za sudjelovanje, pohađala je Europsku zimsku školu fizikalno organske kemije (E-WISPOC, Bressanone, Italija 2020). Članica je Hrvatskog kemijskog društva.

Popis objavljenih radova u časopisima (baza WoS):

1. Dandić, Andrea; Rajkovača, Katarina; Jozanović, Marija; Pukleš, Iva; Széchenyi, Aleksandar; Budetić, Mateja; Samardžić, Mirela, Review of characteristics and analytical methods for determination of indomethacin. // Reviews in Analytical Chemistry, **41** (2021), 34-62, doi:10.1515/revac-2022-0032 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)..
2. Budetić, Mateja; Samardžić, Mirela; Ravnjak, Gabriela; Dandić, Andrea; Živković, Pavo; Széchenyi, Aleksandar, A new solid-state anionic surfactant-selective sensor based on functionalized MWCNT. // Talanta, **226** (2021), 122196, 10 doi:10.1016/j.talanta.2021.122196 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni).
3. Paurević, Marija; Dandić, Andrea; Šrajer Gajdošik, Martina; Vidović, Barbara; Perdiš, Franc; Balić, Tomislav, Efficient synthesis of new 17-, 18-, 19- and 20-membered N₂O₂-donor macrocycles by NaBH₄ reduction and metal picrate extraction studies. // Journal of inclusion

phenomena and macrocyclic chemistry, **97** (2020), 87-98 doi:10.1007/s10847-020-00987-y (međunarodna recenzija, članak, znanstveni).

4.* Petrović Peroković, Vesna; Car, Željka; Usenik, Andrea; Opačak-Bernardi, Teuta; Jurić, Andrea; Tomić, Srđanka, Adamantyl pyran-4-one derivatives and their in vitro antiproliferative activity. // Molecular diversity, **24** (2019), 1; 253-263 doi:10.1007/s11030-019-09948-1 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni).

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. Bubnjar, Karlo; Samardžić, Mirela; Budetić, Mateja; Dandić, Andrea; Živković, Pavo; Széchenyi, Aleksandar; Kiss, László, Development of the sensor for the potentiometric determination of thiabendazole // 3rd Young Scientists' Day - Book of Abstracts / Drenjančević, Ines (ur.), Osijek, 2021. str. 22-22 (predavanje, podatak o recenziji nije dostupan, sažetak, znanstveni)

2. Andrea Dandić, Željka Car, Vesna Petrović Peroković, Novel *para* N-aryl substituted 3-hydroxypyridin-4-ones and their adamantyl derivatives // Book of Abstracts Veli Lošinj, 2021. str. 202-202 (poster, domaća recenzija, sažetak, ostalo).

3. Dandić Andrea, Car Željka, Petrović Peroković Vesna Novel meta N-aryl substituted 3-hydroxypyridin-4-ones and their adamantyl derivatives. // Book of Abstracts, 18th Ružička Days Today Science -Tomorrow industry / Jukić, Ante ; Očelić Bulatović, Vesna ; Kučić Grgić, Dajana (ur.).

Vukovar, Hrvatska, 2020. str. 130-130 (poster, domaća recenzija, sažetak, ostalo)

4. Dandić Andrea, Paurević Marija, Šrajer Gajdošik Martina, Balić Tomislav Synthesis and characterization of novel naphthodiazacrown macrocyclic Schiff bases. // Book of Abstracts

Bressanone (Brixen, BZ, Italy), 2020. str. 2-2 (poster, međunarodna recenzija, ostalo)

5. Paurević, Marija; Dandić, Andrea; Šrajer Gajdošik, Martina; Vidović, Barbara; Balić, Tomislav Efficient synthesis of new of 17-, 18-, 19- and 20-membered N₂O₂-donor macrocycles by

NaBH₄ reduction. // 18th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry / Helena Brodnik

Žugelj, Krištof Kranjc (ur.).

6. Andrijević, Martina; Dandić, Andrea; Budetić, Mateja; Samardžić, Mirela; Sečenji, Aleksandar

Sinteza i karakterizacija novog fluorescentnog indikatora za detekciju selenija. // 26. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera s međunarodnim sudjelovanjem 4. simpozij Vladimir Prelog

Knjiga sažetaka / Galić, Nives ; Rogošić, Marko (ur.).

Zagreb, 2019. str. 165-165 (poster, recenziran, sažetak, znanstveni)

7. Ravnjak, Gabriela; Dandić, Andrea; Budetić, Mateja; Samardžić, Mirela; Sečenji, Aleksandar

Covalent modification of MWCNT with quaternary ammonium groups. // 26. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera s međunarodnim sudjelovanjem 4. simpozij Vladimir Prelog Knjiga sažetaka / Galić, Nives ; Rogošić, Marko (ur.).

Zagreb, 2019. str. 58-58 (poster, recenziran, sažetak, znanstveni)

8. Petrović Peroković, Vesna; Car, Željka; Usenik, Andrea; Opačak-Bernardi, Teuta; Jurić, Andrea; Tomić, Srđanka

Synthesis and antiproliferative activity of adamantyl kojic acid derivatives. // 26. HSKIKI, Knjiga

sažetaka / Galić, Nives ; Rogošić, Marko (ur.).

Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2019. str. 151-151 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

9. Jurić, Andrea; Car, Željka; Petrović Peroković, Vesna

Novel Adamantyl 3-Hydroxypyridin-4-ones: Synthesis and Antiproliferative in vitro Study. // 5th

EFMC Young Medicinal Chemist Symposium, Book of Abstract / Tomašić, Tihomir (ur.).

Ljubljana, Slovenija, 2018. str. 60-60 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

10. Jurić, Andrea; Petrović Peroković, Vesna; Car, Željka; Tomić, Srđanka

Novel Kojic Acid Derivatives with Potential Biological Activity. // Programme & Book of Abstract, Pharma NMR Conference, Application of NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Industry /

Novak, Predrag ; Tomišić, Vladislav ; Bregović, Nikola (ur.).

Zagreb: IAPC, 2015. str. 29-29 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)