Sinteza hidroksamske kiseline hibrida primakina i cimetne kiseline

Poje, Goran

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:196243

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Goran Poje

Sinteza hidroksamske kiseline hibrida primakina i cimetne kiseline

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Zrinki Rajić Džolić na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu te pomoći pri izradi ovog rada.

Veliko hvala kolegi Zvonimiru Mlinariću na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada i nesebičnim savjetima.

Hvala zaposlenicima Zavoda za farmaceutsku kemiju, s kojima sam se družio u laboratoriju tijekom eksperimentalog rada, na korisnim savjetima i ugodnom društvu.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci i pomoći tijekom studiranja.

Rad je financiran sredstvima projekta *Dizajniranje, sinteza i evaluacija derivata primakina, vorinostata i sorafeniba kao potencijalnih citostatika* (IP-09-2014-1501) Hrvatske zaklade za znanost.



KRATICE

CTCL	kožni limfom T-stanica (eng. *cutaneous T-cell lymphoma*)
CYP	citokrom P450
DIEA	*N*-etil-*N*-(propan-2-il)propan-2-amin (*N*,*N*-diizopropiletilamin)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
eNOS	endotelna sintaza dušikovog oksida
ERK	eng. *extracellular-signal-regulated kinase*
FDA	Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*)
HAT	histonska acetil-transferaza
HATU	1-(bis(dimetilamino)metilen)-1*H*-1,2,3-triazolo(4,5-*b*)piridinijev 3-oksid heksafluorfosfat
HDAC	histonska deacetilaza
IC_{50}	inhibitorna koncentracija koja zaustavlja rast 50% stanica
K_i	konstanta inhibicije
MHC	glavni kompleks histokompatibilnosti (eng. *major histocompatibility complex*)
MS	masena spektrometrija
n.o.	nije određeno
NAD^+	nikotinamid adenin dinukleotid
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
OTP	*O*-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)
PQ	primakin
RNA	ribonukleinska kiselina

SAHA	suberoilanilidhidroksamska kiselina (eng. *suberoylanilide hydroxamic acid*)
TEA	trietilamin
TLC	tankoslojna kromatografija
t_t	temperatura taljenja
VPA	valproična kiselina
WHO	Svjetska zdrastvena organizacija (eng.*World Health Organisation*)

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Acetilacije i deacetilacije histona 3

1.1.1. Histoni 3

1.1.2. Acetilacije i deacetilacije histona 3

1.1.3. Utjecaj acetilacija i deacetilacija histona na strukturu kromatina i regulaciju genske ekspresije 4

1.2. Histonske deacetilaze 5

1.2.1. Podjela i specifičnosti histonskih deacetilaza 5

1.2.2. Biološka uloga histonskih deacetilaza 7

1.2.3. Uloga histonskih deacetilaza u razvoju tumora 7

1.3. Učinci inhibicije histonskih deacetilaza 8

1.3.1. Zaustavljanje staničnog ciklusa 9

1.3.2. Induciranje apoptoze 9

1.3.3. Učinak na stanične signalne putove 9

1.3.4. Antiangiogeni učinak 10

1.3.5. Učinak na nekodirajuće RNA 10

1.3.6. Moduliranje imunosnog odgovora 10

1.4. Lijekovi inhibitori HDAC 11

1.4.1. Pregled HDAC inhibitora 12

1.4.1.1. Alifatske kiseline kratkog lanca 12

1.4.1.2. Hidroksamske kiseline 12

1.4.1.3. Depsipeptidi i ostali makrocikli 13

1.4.1.4. *O*-aminoanilidi 14

1.4.2. Panobinostat 14

2. OBRAZLOŽENJE TEME 16

3. MATERIJALI I METODE 18

3.1. Metil -3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enoat **(1)** 20

3.2. 3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enska kiselina **(2)** 20

3.3. *N*-metoksi-3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enamid **(3)** 21

3.4. *N*-hidroksi-3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enamid **(4)** 21
3.5. 3-(4-formilfenil)-*N*-metoksiprop-2-enamid **(5)** 21
3.6. *N*-metoksi-3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enamid **(6)** 22
4. REZULTATI I RASPRAVA 23
5. ZAKLJUČAK 28
6. LITERATURA 30
7. SAŽETAK/SUMMARY 38
8. PRILOZI 41
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Tumor, neoplazma ili novotvorevina definira se kao bilo koje nenormalno umnažanje stanica (www.cancer.gov). Nastaje zbog mutacija gena koje dovode do deaktivacije tumor supresorskih gena i aktivacije protoonkogena. Rezultat je gubitak regulacijskih mehanizama koji kontroliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje. Umjesto da na odgovarajući način reagiraju na signale koji kontroliraju ponašanje normalnih stanica, stanice tumora nekontrolirano rastu i dijele se (Cooper i Housman, 2010).

Tumor je po učestalosti drugi uzročnik smrtnosti u svijetu. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO), u 2015. godini uzročnik je oko 8,8 milijuna smrti u svijetu. Žene najčešće obolijevaju od tumora dojke, cerviksa i karcinoma debelog crijeva, dok je u muškaraca najčešći tumor pluća, prostate te debelog crijeva (www.who.int). Zbog prethodnog, istraživanje patofizioloških mehanizama nastaka tumora i unaprijeđenje terapijskih mogućnosti temeljni su ciljevi suvremene biomedicine.

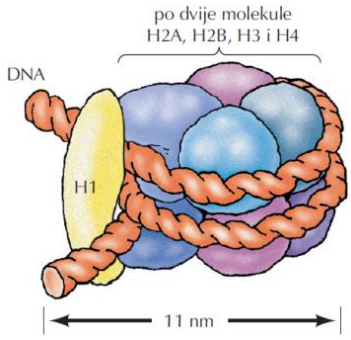
Istraživanja novijeg datuma pokazuju da su epigenetske modifikacije bitne u procesu razvoja tumora jednako kao i mutacije gena (Skinner i sur., 2010). Epigenetske modifikacije uključuju metilaciju, odnosno hidroksimetilaciju molekule DNA, potom promjene histona i regulaciju nekodirajućih RNA. Promjene histona se ostvaruju kao acetilacije i deacetilacije, fosforilacije i ubikvitinizacije (Ching-Yu i sur., 2016). Spomenute modifikacije predmet su izučavanja epigenetike. Ova relativno nova grana znanosti proučava nasljedne promjene u ekspresiji gena koje nisu posljedica mutacija, već epigenetičkih modifikacija (Handy i sur., 2011).

Posebno su značajne acetilacije i deacetilacije histona jer, uz metilaciju molekule DNA, određuju tzv. epigenetički kod koji regulira transkripcijski status pojedinih gena (Zhong-Tian i sur., 2017). Poremećaji acetilacija i deacetilacija dovode do nenormalne ekspresije gena. U slučaju tumorskih stanica, prethodno omogućava njihovu nekontroliranu proliferaciju (Ropero i sur., 2007). Ovo saznanje omogućilo je razvoj nove klase antitumorskih lijekova – inhibitora histonske deacetilaze. Suberoilanilidhidroksamska kiselina (SAHA, vorinostat), prvi lijek iz ove skupine, registriran je u SAD-u u listopadu 2006. godine za liječenje kožnog limfoma T-stanica (CTCL). Nakon njega registrirani su belinostat, panobinostat i romidepsin, dok je nekoliko lijekova u fazama kliničkih ispitivanja (Manal i sur., 2016).

1.1. Acetilacije i deacetilacije histona

1.1.1. Histoni

Histoni su mali proteini građeni pretežito od bazičnih aminokiselina (lizina i arginina). Postoji pet vrsta histona koji se zovu H1, H2A, H2B, H3 i H4. Prisutni su u jezgri eukariotskih stanica gdje s molekulom DNA stvaraju kompleks poznat kao kromatin. Osnovna strukturna jedinica kromatina je nukleosom (Slika 1.). Građen je od 147 parova baza DNA omotanih 1,67 puta oko histonske srži, oktamera koji se sastoji od po dviju molekula H2A, H2B, H3 i H4. Ovi histoni se nazivaju histoni srži (eng. *core histones*). Strukturu nukleosoma dodatno učvršćuje molekula H1 (Cooper i Housman, 2010).

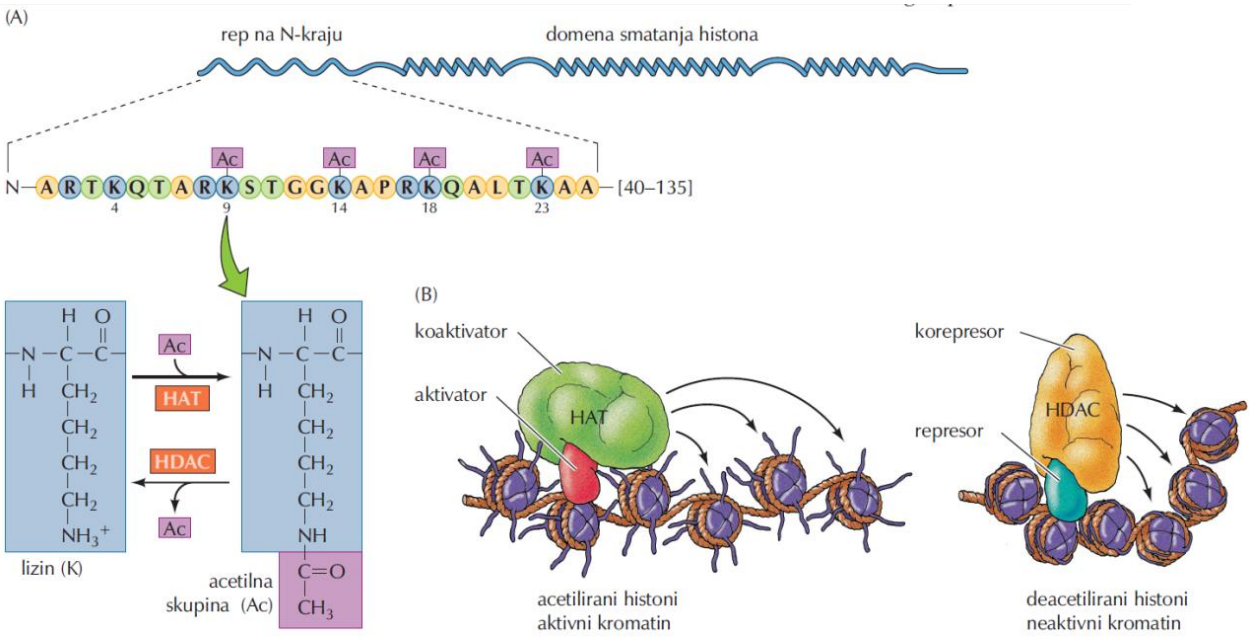


Slika 1. Građa nukleosoma (modificirano prema Cooper i Housman, 2010).

1.1.2. Acetilacije i deacetilacije histona

Sržni histoni imaju dvije domene: domenu histonskog namatanja, uključenu u interakcije s drugim histonima i smotavanje DNA oko srži nukleosoma te domenu repa na amino kraju koja se pruža izvan nukleosoma. Repna domena na amino kraju bogata je lizinom te se može modificirati acetiliranjem lizinskih ostataka (Cooper i Housman, 2010). Acetiliranje lizina (Slika 2.A) podrazumijeva dodavanje acetilne skupine na ε-amino skupinu aminokiselinskog ostatka (Eckschlager i sur., 2017)

Reakcija acetilacije katalizirana je histonskim acetil-transferazama (HAT), a obrnuta reakcija uklanjanja acetilne skupine histonskim deacetilazama (HDAC) (Hodawadekar i Marmorstein, 2007).



Slika 2. (A) Acetiliranje i deacetiliranje histona. (**B)** Uloga HAT i HDAC enzima kao koaktivatora, odnosno korepresora u regulaciji strukture kromatina i genske ekspresije (modificirano prema Cooper i Housman, 2010.)

1.1.3. Utjecaj acetilacija i deacetilacija histona na strukturu kromatina i regulaciju genske ekspresije

Lizinski aminokiselinski ostatci su pri fiziološkim uvjetima pozitivno nabijeni što omogućava povezivanje histona s negativno nabijenim fosfatima u okosnici molekule DNA. Zbog prethodnog, kromatin je kondenziran (heterokromatin) te transkripcijski neaktivan. Acetilacijom amino skupine neutralizira se pozitivni naboj te slabe veze s fosfatima iz molekule DNA, a struktura kromatina postaje dekondenziranija. Ovakva rahla struktura omogućava pristup replikacijskoj ili transkripcijskoj mašineriji (Grunstein, 1997). Dakle, stupanj kondenzacije kromatina ima utjecaj na raspoloživost molekule DNA kao kalupa za transkripciju (Slika 2.B).

Poremećaj ravnoteže acetilacije i deacetilacije histona podloga je za razvoj brojnih poremećaja. U raznih vrsta tumora uočene su varijacije u količini i aktivnosti HDAC u odnosu na normalne stanice (Muraoka i sur., 1996) što je navedene enzime učinilo zanimljivom i pogodnom metom za razvoj novih antitumorskih lijekova.

1.2. Histonske deacetilaze

Histonske deacetilaze su enzimi koji kataliziraju reakciju hidrolize acetilne skupine bočnog ogranka L-lizina u histonima, ali i nehistonskim proteinima (Seto i Yoshida, 2014). Nazvane su histonskim jer se prvotno smatralo da su njihove jedine mete histoni. Danas se zna da postoji više od 50 nehistonskih proteina koji su mete HDAC (Glozak i sur., 2005).

1.2.1. Podjela i specifičnosti histonskih deacetilaza

U ljudi je do sada otkriveno 18 HDAC koje se prema sličnosti s kvaščevim proteinima razvrstavaju u četiri glavne skupine (Tablica 1). Međusobno se razlikuju prema strukturi, enzimskoj aktivnosti, subcelularnoj lokalizaciji i ekspresiji (de Ruijter i sur., 2003).

Skupina 1 je slična kvaščevom proteinu Rpd3, a uključuje HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC8 (Taunton i sur., 1996). Ove HDAC su konstantno eksprimirane, smještene isključivo unutar stanične jezgre te pokazuju najjaču enzimsku aktivnost. HDAC1 i HDAC2 pokazuju znantnu funkcionalnu redundanciju i sličnost u aminokiselinskom sastavu. Uvijek se nalaze u sklopu multiproteinskih represorskih kompleksa kao što su Sin3A, NcoR/SMRT i Co-REST (de Ruijter i sur., 2003).

Skupina 2 pokazuje sličnost s kvaščevom Hda1. Može se podijeliti na podskupinu 2a koja uključuje HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9 te podskupinu 2b kojoj pripadaju HDAC6 i HDAC10. U odnosu na skupinu 1, slabije su eksprimirane, a aktivnost im je tkivno specifična. HDAC podskupine 2a mogu kružiti između jegre i citoplazme, ovisno o vanjskim stimulansima, dok su HDAC6 i HDAC10 pretežito lokalizirane u citoplazmi (Yang i Gregoire, 2003.; Fischle i sur., 2001).

Jedini predstavnik skupine 4 je HDAC11. U strukturi ove HDAC uočene su aminokiselinske sekvence specifične za skupine 1 i 2, dok je o njezinoj ekspresiji i funkciji malo poznatih informacija (Gao i sur., 2002).

HDAC iz skupina 1, 2 i 4 u aktivnom mjestu sadrže ion cinka kao kofaktor zbog čega se nazivaju cink-ovisnim ili klasičnim histonskim deacetilazama (Tang i sur., 2013).

Skupina 3 slična je kvaščevom proteinu Sir2 te su ove HDAC poznatije kao sirtuini. U katalitičkom mjestu ne sadrži ion cinka, već im je za aktivnost neophodan koenzim NAD^+. U sisavaca poznato je sedam sirtuina (Sirt1-Sirt7) koji se razlikuju prema smještaju u stanici (Blander i Guarente, 2004).

Tablica 1. Podjela i karakteristike enzimske porodice HDAC (modificirano prema Zhan i Zhong, 2014)

Skupine	**HDAC**	**Smješta unutar stanice**	**Veličina**	**Ne-histonske mete**
Skupina1	HDAC1	jezgra	483	p53, STAT3, YY1, androgen receptor, estrogen receptor, SHP, MyoD, E2F-1
	HDAC2	jezgra	488	STAT3, YY1
	HDAC3	jezgra	427	SRY, STAT3, YY1, SHP, GATA1, GATA2, RelA
	HDAC8	jezgra	377	
Skupina 2a	HDAC4	jezgra/citoplazma	1084	GATA1
	HDAC5	jezgra/citoplazma	1122	GATA1
	HDAC7	jezgra/citoplazma	855	
	HDAC9	jezgra/citoplazma	1011	
Skupina 2b	HDAC6	ugl. citoplazma	1215	SHP, α-Tubulin, Hsp90
	HDAC10	ugl. citoplazma	669	
Skupina 4	HDAC11	jezgra/citoplazma	347	
Skupina 3	Sirt1	jezgra	747	p53, NF-κB, FOXO1, Ku70, p300
	Sirt2	citoplazma	389	α-tubulin
	Sirt3	jezgra/mitohondriji	257	acetil-CoA sintetaza
	Sirt4	mitohondriji	314	glutamat dehidrogenaza
	Sirt5	mitohondriji	292	
	Sirt6	jezgra	355	DNA polimeraza
	Sirt7	jezgra	400	

1.2.2. Biološka uloga histonskih deacetilaza

Kao što je prije spomenuto u Uvodu, HDAC zajedno s HAT određuju stupanj acetilacije sržnih histona čime reguliraju strukturu kromatina i ekspresiju gena. Posebice je bitna acetilacija histona H3 i H4 (Allfrey i sur., 1964). Acetilacije histona također imaju bitnu ulogu u popravku, replikaciji i rekombinaciji molekule DNA (Polo i Almouzni, 2005; Vidanes i sur., 2005).

Otkriveni su brojni drugi nehistonski proteini (vidi Tablicu 1.) koji su mete HDAC. Acetilacija, odnosno deacetilacija nehistonskih proteina ima utjecaj na njihovu stabilnost, smještaj u stanici, interakciju s drugim proteinima te vezanje na molekulu DNA (Minucci i Pelicci, 2007).

1.2.3. Uloga histonskih deacetilaza u razvoju tumora

Poremećaj u acetilaciji histona često je obilježje tumorskih stanica. Usporedbom normalnih i tumorskih stanica utvrđeno je da je gubitak acetilacije i metilacije histona H4 ključan događaj u razvoju tumora (Fraga i sur., 2005). Nadalje, izučavanjem gastrointestinalnog tumora zaključeno je da je smanjena razina acetilacije histona važna ne samo za proces karcinogeneze, već i za metastaziranje tumora (Yasui i sur., 2003).

Hipoacetilacija histona u tumorskih stanicama može biti posljedica smanjene aktivnosti HAT ili povećane aktivnosti HDAC. Nefunkcionalnost enzima HAT uzrokovana je mutacijama ili kromosomskim translokacijama zbog čega je smanjena razina acetiliranja histona. S druge strane, postoji više uzroka povećane aktivnosti HDAC. Većina znanstvenih radova ističe važnost dopremanja enzima HDAC do odgovarajućih promotora putem interakcije s proteinima koji su nastali kromosomskim translokacijama (Lin i sur., 2001).

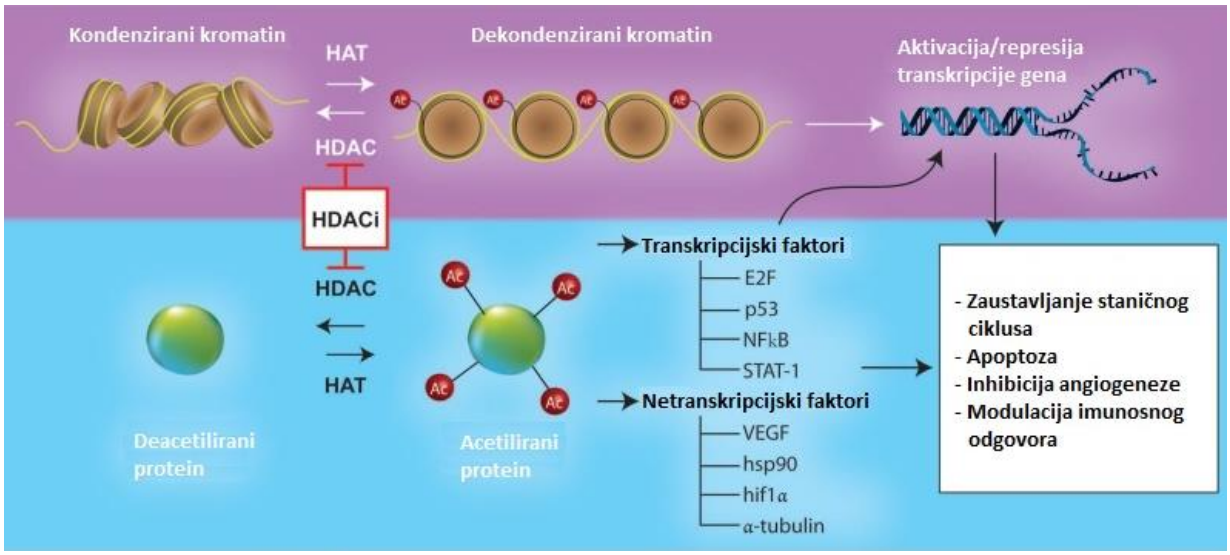
Prekomjerna aktivnost HDAC omogućuje razvoj tumora poglavito putem hipoacetiliranja tumorsupersorskih gena te njihove transkripcijske represije. Tipičan primjer je gen CDNK1 koji kodira protein p21, inhibitor ciklin-ovisne kinaze. Protein p21 sprječava nastajanje dimera iz ciklina i ciklin ovisne kinaze koji je potreban za napredovanje u S fazu staničnog ciklusa. Posljedica je zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi (Gui i sur., 2004; Cooper i Housman, 2010).

Daljnji primjer je E-kadherin, protein bitan za međustaničnu adheziju. Transkripcijski faktor Snail doprema HDAC1, HDAC2 i supresorski kompleks mSin3A do promotora za E-kadherin i uzrokuje njegovu represiju. Tako je smanjeno stvaranje E-kadherina, a međustanične veze su narušene što omogućava metastaziranje stanica tumora (Peinado i sur., 2004; Christofori i Semb, 1999).

HDAC sudjeluju u procesu karcinogeneze djelovanjem i na nehistonske proteine. Primjer je tumorsupresorski protein p53. HDAC deacetiliraju p53 čime smanjuju njegovu stabilnost i aktivnost (Juan i sur., 2000).

1.3. Učinci inhibicije histonskih deacetilaza

Lijekovi inhibitori HDAC blokiraju deacetilaciju histona, ali i nehistonskih proteina. Rezultat je zaustavljanje staničnog ciklusa i proliferacije, apoptoza tumorskih stanica te inhibicija angiogeneze. Uočen je i učinak na stanične signalne putove i nekodirajuće RNA te sposobnost modulacije imunosnog odgovora (Slika 3.) (Eckschlager i sur., 2017).



Slika 3. Učinci lijekova inhibitora HDAC (modificirano prema: Paik i Krug, 2010)

Relativnu specifičnost HDAC inhibitora na stanice tumora objašnjava hipoteza „epigenetičke ranjivosti stanica tumora“ . Prema toj teoriji, stanicama tumora za ekspresiju gena odgovornih za nekontroliranu proliferaciju nužni su enzimi HDAC, dok normalne stanice imaju više epigenetičkih regulatornih mehanizama te njihovo preživljavanje nije isključivo ovisno o aktivnosti HDAC enzima (Dawson i Kouzarides, 2012).

1.3.1. Zaustavljanje staničnog ciklusa

HDAC inhibitori uzrokuju zaustavljanje staničnog ciklusa putem nekoliko mehanizama, od kojih je najvažniji povećana ekspresija gena CDKN1A (p21). Protein p21 sprječava stvaranje dimera iz ciklina i ciklin ovisne kinaze koji je neophodan za napredovanje kroz G1 kontrolnu točku staničnog ciklusa (Richon i sur., 2000). Ekspresija gena CDKN1A regulirana je proteinom p53 koji se veže na njegov promotor. HDAC inhibitori povećavaju acetilaciju p53 što doprinosi njegovoj stabilizaciji i povećanoj aktivnosti. Na CDKN1A promotor kompetitivno se veže i HDAC1, ali s inhibirajućim učinkom na ekspresiju. Lijekovi inhibitori uzrokuju otpuštanje HDAC1 s promotora što povećava ekspresiju gena CDKN1A (Ocker i Schneider-Stock, 2007; Gius i sur., 2004).

1.3.2. Induciranje apoptoze

HDAC inhibitori uzrokuju apoptozu povećanjem ekspresije proapoptotičkih te utišavanjem ekspresije antiapoptotičkih gena (Miller i sur., 2011). Utjecaj na vanjski apopotozni put očituje se u povećanju broja receptora smrti: TRAIL, DR5 i Fas. Pojačano su eksprimirani i njihovi ligandi: Fas-L, LIGHT i TLA1. Vezanjem liganada receptori se aktiviraju, prenose apoptotički signal nizvodno te u konačnici dolazi do aktivacije kaspaza koje su izvršitelji apoptoze (Fulda, 2008; Kwon i sur., 2002). Na unutarnji put apoptoze HDAC inhibitori utječu tako što uzrokuju pojačanu ekspresiju proteina BAX, BAK i APAF1 koji dovode do aktivacije kaspaza, a smanjuju ekspresiju proteina Bcl-2 koji inhibira aktivaciju istih (Vrana i sur., 1999; Miller i sur., 2011).

1.3.3. Učinak na stanične signalne putove

HDAC inhibitori ostvaruju učinak na stanične signalne putove aktivacijom odgovarajućih protein kinaza. Primjerice, aktivacijom ERK aktivira se transkripcijski faktor AP-1 te se povećava njegova sposobnost vezanja za molekulu DNA. AP-1 ima utjecaj na brojne stanične procese poput proliferacije, diferencijacije i apoptoze. (Yuan i sur., 2001).

1.3.4. Antiangiogeni učinak

Antiangiogeni učinak HDAC inhibitori postižu utišavanjem proangiogenih gena poput gena za faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) i/ili gena za endotelnu sintazu dušikovog oksida (eNOS) (Zupkovitcz i sur., 2006). Jedan od mogućih mehanizama djelovanja je hiperacetilacija proangiogenetskog transkripcijskog faktora HIF-1α što potiče njegovu degradaciju (Jeong i sur., 2002). Lijekovi inhibitori također smanjuju količninu VEGF receptora u stanicama neuroblastoma (Deroanne i sur., 2002) te narušavaju stabilnost eNOS mRNA tako što se vežu za netranslatirani 5`- kraj (Rössig i sur., 2002).

1.3.5. Učinak na nekodirajuće RNA

HDAC inhibitori utječu na ekspresiju nekodirajuće RNA. Primjerice, SAHA inducira prekomjernu ekspresiju miR-129-5p. Ova nekodirajuća RNA sama inducira apoptozu tumorskih stanica štitnjače (Brest i sur., 2011). Štoviše, neke miRNA same djeluju na HDAC i inhibiraju ih (Noonan i sur., 2009).

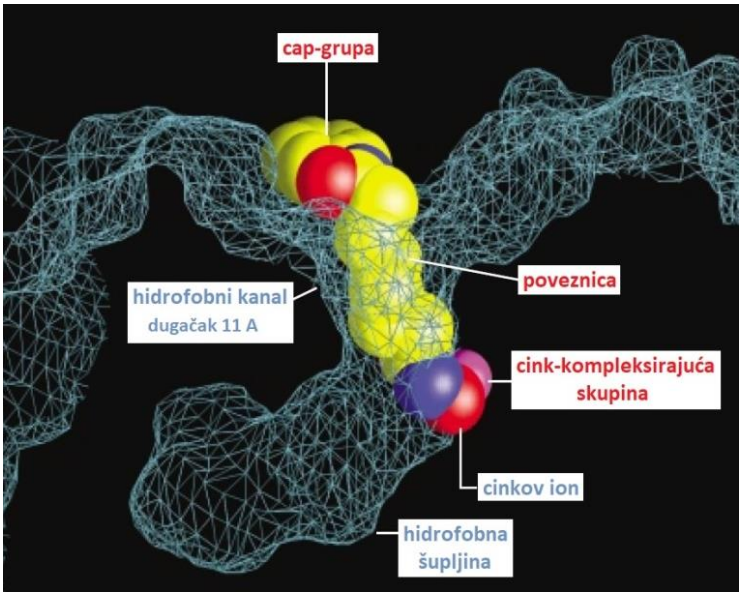
1.3.6. Moduliranje imunosnog odgovora

Smanjena aktivnost HDAC uzrokuje povećanu ekspresiju MHC i kostimulirajućih molekula što rezultira aktivacijom T-stanica (Woan i sur., 2015). U određenih vrsta tumora (dojka, prostata, gušterača) zapaženo je da izlaganje tumorskih stanica HDAC inhibitoru (SAHA) povećava osjetljivost istih na lizu posredovanu T-stanicama (Gameiro i sur., 2016).

1.4. Lijekovi inhibitori HDAC

Prvi inhibitori HDAC sintetizirani su po uzoru na endogeni supstrat ovih enzima, odnosno acetilirani lizin. Kristalne strukture bakterijskih analoga eukariotskih HDAC i HDAC sličnih proteina te kompleksa istih enzima s molekulom inhibitora (trihostatin A) određene difrakcijom X zraka ukazale su na ključne dijelove u strukturi molekula inhibitora: 1) površinska vezujuća grupa, 2) poveznica, 3) cink-kompleksirajuća grupa (Slika 4.). Površinska vezujuća domena (eng. *cap group*) omogućava interakciju s aminokiselinskim ostatcima na površini enzima. Poveznica (eng. *linker*) je dio strukture molekule inhibitora kojoj je uloga povezivanje *cap*-grupe i cink-kompleksirajuće grupe pri čemu premoštava kanal dug oko 11 Å. Cink-kompleksirajuća skupina (eng. *zinc binding group* ili ZBG) se smješta u katalitičko mjesto enzima te, kako joj ime govori, kompleksira ion cinka i tako inhibira aktivnost enzima. Manji broj sintetiziranih inhibitora HDAC u strukturi posjeduje grupu koja ulazi u tzv. unutrašnju šupljinu unutar katalitičkog mjesta i povećava jakost vezanja na enzim (Finnin i sur., 1999).

Inhibitori HDAC mogu se ovisno o vrsti cink kompleksirajuće grupe podijeliti u četiri glavne kemijske skupine: alifatske kiseline, hidroksamske kiseline, depsipeptidi ili makrocikli te *orto*-aminoanilidi.



Slika 4. Dijelovi katalitičkog mjesta HDAC enzima (imenovani plavom bojom) te dijelovi molekule inhibitora (imenovani crvenom bojom) bitni za interakciju s enzimom. (modificirano prema Finnin i sur., 1999)

1.4.1. Pregled HDAC inhibitora

1.4.1.1. Alifatske kiseline kratkog lanca

Alifatske kiseline su prvi razvijeni HDAC inhibitori. U ovu skupinu ubrajaju se valproična kiselina (VPA) te njoj slične molekule: natrijev butirat i fenilbutirat. Karboksilna skupina, odnosno njezina konjugirana baza djeluje kao cink-vezujuća grupa, dok se alifatski dio smješta u hidrofobni kanal koji vodi do cinkovog iona. Ovi spojevi su slabi inhibitori koji pokazuju selektivnost prema grupi 1 HDAC enzima. Nisu zaživjeli kao antitumorski lijekovi već se koriste za druge indikacije (Fass i sur., 2011). Primjerice, VPA se koristi za liječenje epilepsije te psihičkih poremećaja poput depresije i shizofrenije (Rosenberg, 2007).

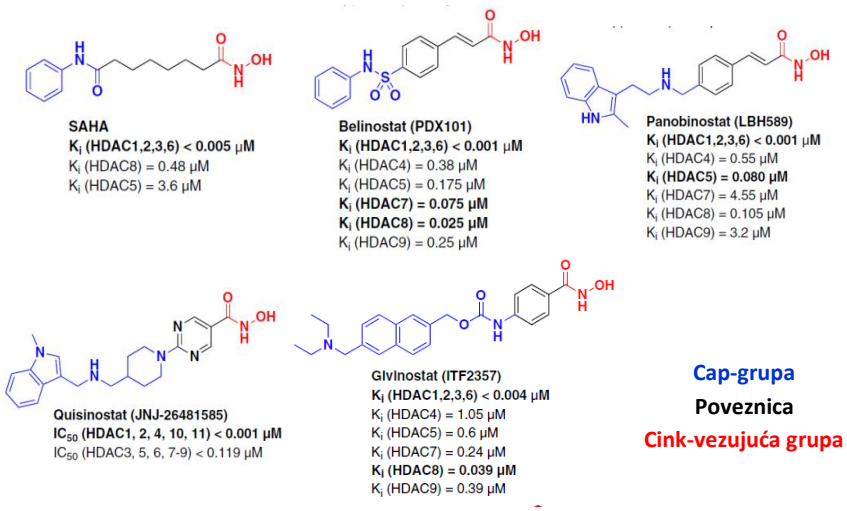
1.4.1.2. Hidroksamske kiseline

Ova skupina HDAC inhibitora poznata je i kao hidroksamati. Najintenzivnije se istražuje zato što hidroksamska funkcionalna skupina pokazuje visoku učinkovitost u keliranju metala. Hidroksamske kiseline su učinkoviti HDAC inhibitori u nanomolarnim koncentracijama (Slika 5.) (Arts i Marien, 2009).

SAHA je prvi HDAC inhibitor iz ove kemijske skupine. Snažan je inhibitor histonskih deacetilaza 1,2,3, i 6, a slabo inhibira ostale HDAC enzime. Zbog prethodnog se ubraja u tzv. pan-inhibitore HDAC.

Brojne druge molekule iz ove skupine strukturno su slične SAHA-i, uz modifikacije poveznice i *cap*-grupe. Poveznice mogu sadržavati alkenske (TSA), cinamilne (belinostat i panobinostat), fenilne (givinostat) ili heteroaromatske skupine (quisinostat). *Cap*-grupe se razlikuju u veličini, a njihovom modifikacijom može se utjecati na selektivnost inhibitora prema određenoj vrsti HDAC. Prethodno se postiže odabirom *cap*-grupe koja odgovara topologiji površine odgovarajućeg HDAC enzima.

Obzirom na različitost u strukturi, farmakokinetička svojstva hidroksamskih kiselina se podosta razlikuju. Općenito se može reći da im je bioraspoloživost mala (< 20%), a klirens velik ($t_{1/2}$ < 1h). Jedan od razloga je brza biotransformacija (redukcija) hidroksamske skupine u primarni amid. S druge strane, neke molekule iz ove skupine (primjerice SAHA) su supstrati P-glikoproteina te slabo prolaze krvno-moždanu barijeru (Flipo i sur., 2009).

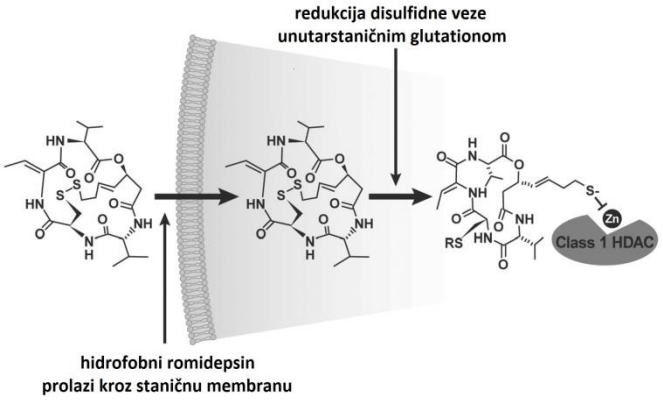


Slika 5. Strukture odabranih hidroksamskih kiselina s pripadajućim K_i, odnosno IC_{50}.

1.4.1.3. Depsipeptidi i ostali makrocikli

HDAC inhibitore koji pripadaju ovoj kemijskoj skupini karakteriziraju velike *cap*-grupe izvedene iz cikličkih peptida, depsipeptida ili makrocikala koje su preko alkilne poveznice vezane na različite cink-vezujuće grupe. Snažni su inhibitori jer *cap*-grupe ostvaruju značajne interakcije s aminokiselinskim ostacima na površini enzima. Većina ovih molekula su prirodni produkti ili njihovi derivati (Seidel i sur., 2012).

Tipičan predstavnik je romidepsin koji je izoliran iz *Chromobacterium violaceum*. U strukturi posjeduje veliku *cap*-grupu baziranu na depsipeptidu, poveznicu od četiri C atoma te dvije tiolne skupine koje imaju ulogu cink-vezujućih grupa. Zapravo romidepsin je prolijek s disulfidnom vezom u strukturi. Aktivira se redukcijom ove veze pri čemu nastaju dvije slobodne tiolne skupine (Slika 8.).

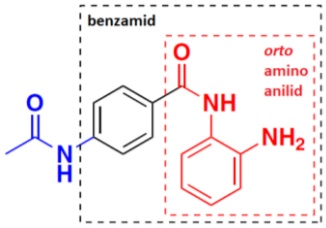


Slika 6. Ulazak romidepsina u stanicu i aktivacija unutarstaničnim glutationom (preuzeto od: McGraw, 2013).

Romidepsin inhibira grupu 1 HDAC enzima. Registriran je pod trgovačkim imenom Istodax za liječenje kožnog limfoma T-stanica (CTCL) (McGraw, 2013).

1.4.1.4. *O*-aminoanilidi

Ovu skupinu karakterizira *orto*-amino-anilidna skupina kao cink-vezujuća grupa (označena crvenom bojom na Slici 10). Najpoznatija podskupina su benzamidi koji uključuju benzen, odnosno fenil kao poveznicu *o*-aminoanilidne skupine s ostatkom molekule (Wagner i sur., 2013).



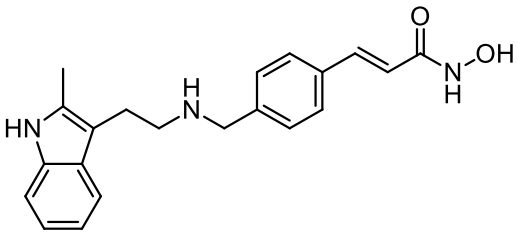
Slika 7. Aminoanilidna skupina.

U nastavku teksta biti će više riječi o panobinostatu koji je registriran u Republici Hrvatskoj.

1.4.2. Panobinostat

Panobinostat je trenutačno jedini HDAC inhibitor registriran u Republici Hrvatskoj pod zaštićenim imenom Farydak. U kombinaciji s bortezomibom i deksametazonom, indiciran je za terapiju multiplog mijeloma u pacijenata koji su prethodno bili na barem dva terapijska režima, uključujući bortezomib i jedan od imunomodulatora. (http://www.halmed.hr/).

Struktura



Slika 8. Struktura panobinostata

Mehanizam djelovanja

Panobinostat je snažan, neselektivan inhibitor HDAC. U nanomolarnim koncentracijama inhibira 1, 2 i 4 skupinu HDAC enzima (Richardson i sur., 2015). Rezultat je povećanje acetilacije histona i nekih nehistonskih proteina što ima višestruke antitumorske učinke (vidi Uvod). Važno je istaknuti da panobinostat blokira alternativni put razgradnje proteina koji uključuje agresom, a koji je uzrok rezistencije tumorskih stanica na bortezomib. Prethodno objašnjava sinergistički učinak panobinostata i bortezomiba u terapiji (Atadja, 2009).

Farmakokinetika

Oralna bioraspoloživost panobinostata je oko 21%. Hrana može smanjiti apsorpciju lijeka. Za proteine plazme se veže oko 90%, neovisno o koncentraciji u plazmi (http://www.fda.gov).

Panobiostat je supstrat P-glikoproteina te se intenzivno metabolizira redukcijom, oksidacijom, hidrolizom i glukuronidizacijom. Supstrat je CYP3A4 te inhibira CYP2D6. Lijekovi CYP3A4 inhibitori mogu povećati, a lijekovi CYP3A4 induktori smanjiti koncentraciju panobinostata te je u tom slučaju potrebna prilagodba terapijske doze lijeka.

Lijek se izlučuje iz organizma urinom i fecesom. Uglavnom se eliminira biotransformiran, u obliku metabolita, dok se u malom postotku izlučuje nepromijenjen (manje od 2,5%) (http://www.ema.europa.eu).

Neželjeni učinci

Panobinostat uzrokuje dijareju, mijelosupresiju, hemoragiju te pogoduje razvoju infekcija. Mogu se razviti lokalne ili sistemske infekcije, bakterijskog, gljivičnog ili virusnog podrijetla. Uočeni su kardiotoksični i hepatotoksični učinci. Kardiotoksični učinci su najčešće vezani uz produljenje QT intervala.

Lijek oštećuje plod te se ne bi smio uzimati za vrijeme trudnoće. Ne postoje informacije da li se izlučuje u majčino mlijeko pa se ne preporuča korištenje za vrijeme dojenja (http://www.ema.europa.eu).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

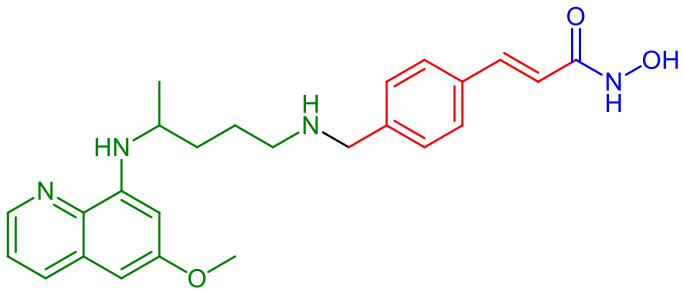
Cilj ovog diplomskog rada jest sinteza hibridnog derivata primakina (zelena boja) i cimetne kiseline (crvena boja) s terminalnom hidroksamskom kiselinom (plava boja) (Slika 9).

Primakin je derivat 8-aminokinolina, a koristi se za liječenje malarije. Prema mehanizmu djelovanja je tkivni shizontocid te djeluje na egzoeritrocitnu fazu razvoja plazmodija. Uz antimalarijsko, posjeduje i citostatsko djelovanje.

Cimetna kiselina, odnosno 3-fenilprop-2-enska kiselina, i njeni derivati široko su rasprostranjeni u biljnome svijetu, posebice među vrstama roda *Cinnamomum* iz porodice Lauraceae. Ostvaruju brojne biološke učinke, a između ostalog posjeduju i citostatsko djelovanje.

Prevođenjem karboksilne skupine cimetne kiseline u hidroksamsku funkcionalnu skupinu dobiva se farmakofor koji ima veliku sposobnost kompleksiranja metalnih iona, između ostalih i iona cinka u aktivnom mjestu HDAC enzima. Štoviše, dizajnirana molekula pokazuje strukturnu sličnost panobinostatu koji je registriran kao antitumorski lijek. Sličnost se uočava u području cink-vezujuće grupe i poveznice, dok su *cap*-grupe različite.

Nekoliko različitih istraživanja pokazalo je da HDAC inhibitori inhibiraju istoimeni enzim plazmodija,uzročnika malarije, te djeluju negativno na njegovo preživljavanje i razvoj. Zbog prethodnog se pretpostavlja da bi dizajnirani spoj mogao imati antimalarijski i/ili citostatski učinak.



Slika 9. Struktura dizajniranog ciljnog spoja

3. MATERIJALI I METODE

Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su upotrijebljene silikagel ploče 60 F254 (Merck, Njemačka), te diklormetan/metanol (95:5, 85:15) kao pokretna faza. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Kemika, Hrvatska) uz diklormetan/metanol (96:4) kao pokretnu fazu. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem (λ = 254 nm) i 1%-tnom otopinom željezovog(III) klorida.

^{1}H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-600 (Bruker, SAD) kod 300,13 MHz za ^{1}H i kod 75,47 MHz za ^{13}C jezgru .Uzorci su mjereni u DMSO-d_6 otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard.
Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420).

Primakinijev difosfat, diklormetan, ledena octena kiselina, litijev hidroksid monohidrat, 1-(*bis*(dimetilamino)metilen)-1*H*-1,2,3-triazolo(4,5-*b*)piridinijev 3-oksid heksafluorfosfat (HATU) i TEA (trietilamin) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD). Metanol je nabavljen od tvrtke Honeywell Riedel de Haën, etil-eter od tvrtke Kemika, klorovodična kiselina od tvrtke Carlo Erba, N-etil-N-(propan-2-il)propan-2-amin (N,N-diizopropiletilamin, DIEA) od tvrtke Alpha Aesch, tionil klorid od tvrtke Fluka, a *O*-metilhidroksilamin hidroklorid od tvrtke Merck (Njemačka). Sve kemikalije bile su *p.a.* čistoće.

Primakin je prije izvođenja reakcija oslobođen iz oblika soli na sljedeći način: otopina 0,364 g (0,8 mmol) primakinijevog difosfata u 20 mL vode zalužena je 5 % otopinom NaOH do pH 10 te ekstrahirana diklormetanom (5 × 20 mL). Otopina primakina ispirana je vodom do pH 7. Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom.
Sve reakcije s primakinom izvođene su uz zaštitu od svjetlosti.

3.1. Metil -3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enoat (1)

0,717 g (2,76 mmol) primakina, 0,350 g (1,84 mmol) metil-4-formilcinamata, 0,276 g (4,6 mmol) octene kiseline i 0,975 g (4,6 mmol) natrijevog triacetoksiborhidrida u 40 mL metanola miješani su na sobnoj temperaturi. Nakon 21 h otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja otopljen u etil-acetatu i ekstrahiran tri puta vodom pri pH ≈ 10. Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, a otapalo upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kormatografijom na koloni uz mobilnu fazu diklormetan/metanol (96:4) te je dobiven zeleni uljasti produkt.

Iskorištenje: 0,565 g (70,80%).

MS/MS *m/z* 434,0 $(M+1)^+$.

^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, *J*/Hz): 8,52-8,50 (dd, 1H, 10, *J* = 1,3, 4,1), 7,92-7,89 (dd, 1H, 12, *J* = 1,0, 8,1), 7,66 (d, 1H, 8', *J* = 16,0), 7,44 (d, 2H, 3', 7' *J* = 8,0), 7,36-7,15 (m, 3H, 4', 6', 11), 6,41 (d, 1H, 16, *J* = 16,0), 6,33-6,27 (m, 2H, 14, 9'), 6,03 (d, 1H, 7, *J* = 5,7), 3,88 (s, 3H, 11'), 3,80-3,78 (m, 5H, 17, 1'), 3,64-3,6 (m, 1H, 5), 2,66 (t, 2H, 2, *J* = 6,4), 2,19 (bs, 1H, 1), 1,77-1,61 (m, 4H, 3, 4), 1,29 (d, 3H, 6, *J* = 6,3).

3.2. 3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enska kiselina (2)

0,087 g (0,2 mmol) g spoja **1** i 0,042 g (1 mmol) litijevog hidroksida monohidrata u smjesi vode i metanola (10 mL) miješani su na sobnoj temperaturi. Nakon 23 h metanol je uparen pod sniženim tlakom, a vodeni sloj višekratno ekstrahiran diklormetanom pri različitim pH vrijednostima (u kiselom i bazičnom pH području). Unatoč tome, spoj **2** vrlo slabo prelazi u organski sloj, te je nakon sušenja (bezvodni natrijev sulfat), filtriranja i uparavanja diklormetana dobivena zanemariva količina spoja **2**. Alternativno, nakon završetka hidrolize (prema TLC-u), otapalo je upareno, a sirovi produkt upotrebljen u sintezi spoja **3**.

MS/MS *m/z* 420,0 $(M+1)^+$

3.3. *N*-metoksi-3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enamid (3)

0,026 g (0,06 mmol) sirovog spoja **2**, 0,024 g (0,06 mmol) HATU i 22 μL (0,12 mmol) DIEA u 2 mL diklormetana miješani su na sobnoj temperaturi. Nakon 0,25 h u reakcijsku smjesu je dodano 0,006 g (0,07 mmol) OTP. Nakon 24 h TLC nije pokazao nastajanje željenog produkta **3**.

3.4. *N*-hidroksi-3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enamid (4)

U otopinu 0,019 g (0,36 mmol) natrijevog metoksida u 3 mL metanola dodano je 0,049 g (0,36 mmol) hidroksilamina hidroklorida te otopina 0,050 g (0,12 mmol) spoja **1** u 7 mL metanola. Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi. Nakon 11 dana otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja otopljen u diklormetanu i ekstrahiran vodom tri puta. Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, a otapalo upareno pri sniženom tlaku. Sirovi produkt je pročišćen prekristalizacijom iz acetona te je dobiven narančasti prah. Međutim, ^{1}H i ^{13}C NMR pokazao je da nije dobiven željeni produkt **4**.

3.5. 3-(4-formilfenil)-*N*-metoksiprop-2-enamid (5)

Otopina 0,175 g (1 mmol) 4-formilcimetne kiseline, 0,380 g (1 mmol) HATU i 0,255 g (2 mmol) DIEA u 20 mL diklormetana miješana je na sobnoj temperaturi. Nakon 0,25 h u reakcijsku smjesu je dodano 0,085 g (1 mmol) *O*-metilhidroksilamina hidroklorida i 165 μL (1,2 mmol) TEA. Nakon 1,5 h otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja otopljen je u etil-acetatu i ekstrahiran tri puta vodom pri pH ≈ 10. Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, a otapalo upareno pri sniženom tlaku. Dobiven je bijeli prah.

Iskorištenje reakcije: 0,156 g (76,10 %)

MS/MS *m/z* 204,0 $(M-1)^-$.

^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, J/Hz): 11,41 (s, 1H, 1), 10,02 (s, 1H, 11), 7,94 (d, 2H, 3, 7, J = 8,1), 7,81 (d, 2H, 4, 6, J = 7,45), 7,69 (d, 1H, 8, J = 15,83), 6,58 (d, 1H, 9, J = 15,81), 3,68 (s, 3H, 12).

^{13}C NMR (DMSO-d_6, δ ppm): 192,53 (1), 162,11 (10), 140,25 (5), 138,23 (8), 136,53 (2), 129,98 (3,7), 128,22 (4,6), 121,73 (9), 63,37 (12).

3.6. *N*-metoksi-3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enamid (6)

0,056 g (0,22 mmol) primakina, 0,031 g (0,15 mmol) spoja **5**, 0,014 g (0,24 mmol) octene kiseline i 0,064 g (0,3 mmol) natrijevog triacetoksiborhidrida u 15 mL metanola miješani su na sobnoj temperaturi 4 dana, nakon čega je reakcijska smjesa refluksirana 24 h. Međutim, TLC nije pokazao nastajanje željenog produkta **6**.

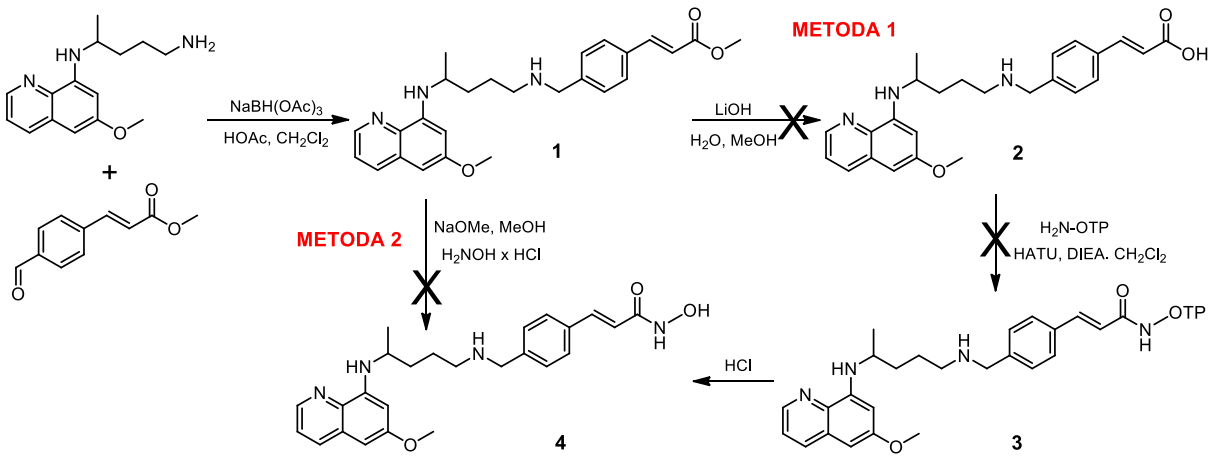
4. REZULTATI I RASPRAVA

Ciljni spoj, hibrid primakina i cimetne kiseline s terminalnom hidroksamskom kiselinom (**4**) moguće je dobiti pomoću Metode 1 i Metode 2 (Shema 1). Prvi korak je zajednički, a predstavlja sintezu imina i njegovu redukciju u amin **1**.

Sinteza imina zbiva se u dva stupnja: 1) nukleofilna adicija primarne amino skupine primakina na karbonilnu skupinu aldehida esterskog derivata cimetne kiseline, te 2) eliminacija vode pri čemu nastaje imin. Reakciji pogoduju kiseli uvjeti, zbog čega je u reakcijskoj smjesi prisutna octena kiselina. U idućem koraku natrijev triacetoksiborhidrid selektivno reducira nastali imin u amin.Varirana je količina reducensa u reakcijskoj smjesi te je zaključeno da je suvišak natrijevog triacetoksiborhidrida (2,5 ekvivalenata) njegova optimalna količina. Iskorištenje reakcije bilo je visoko (70,80%), a spektroskopski podaci potvrdili su strukturu spoja **1**.

Sljedeći korak u Metodi 1 je hidroliza terminalnog estera spoja **1** u lužnatim uvjetima (litijev hidroksid), pri čemu nastaje karboksilna kiselina. Tijek reakcije praćen je TLC-om, koja je nakon 23 h pokazala da reakcijska smjesa više ne sadrži spoj **1** te da je nastao novi produkt R_f vrijednosti koja odgovara lipofilnosti kiseline **2**. Nastajanje produkta hidrolize potvrdila je i analiza masenom spektroskopijom. Međutim, izolacija spoja **2** nije bila uspješna. Zbog prisutnosti soli i litijevog hidroksida reakcijsku smjesu je potrebno ekstrahirati. U strukturi spoja **2** prisutne su 3 amino akupine i karboksilna kiselina, te je vrlo teško postići pogodan pH pri čemu bi ukupan naboj molekule bio jedak nuli, a što je uvjet za prijelaz iste iz vodenog u organski sloj. Variranje pH pri ekstrakciji u širokom rasponu od kiselog do bazičnog nije značajno doprinijelo prelasku spoja **2** u organski sloj te je iskorištenje reakcije bilo zanemarivo.

Zbog nemogućnosti izolacije spoje **2**, iduća reakcija *couplinga* s HATU, odgovarajućim hidroksilaminom i DIEA pokušana je sa sirovim produktom. Nakon završetka reakcije hidrolize, reakcijska smjesa je zakiseljena do neutralnog pH, otapalo upareno, a ostatak nakon uparavanja upotrebljan u idućem koraku. Međutim, reakcija *couplinga* nije bila uspješna, vjerojatno zbog nepročišćenog spoja **2**. Odustalo se od reakcije hidrolize te je odlučeno da se ester izravno prevede u hidroksamsku kiselinu (Metoda 2).



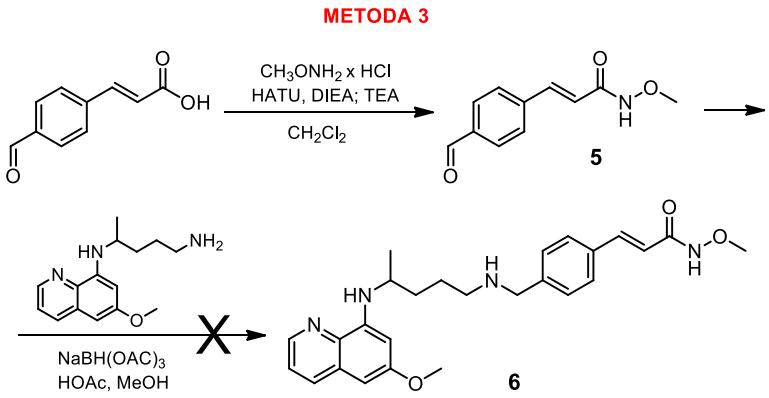
Shema 1. Sinteza hibridnog derivata primakina i cimetne kiseline **4** Metodom 1 i Metodom 2

Metoda 2 podrazumijeva nukleofilnu supstituciju, pri čemu hidroksilamin kao nukleofil pod jako bazičnim uvjetima zamjenjuje metoksi skupinu karbonila estera spoja **1**. TLC je pokazala nastajanje željenog produkta (crveno-smeđa mrlja na TLC-u nakon prskanja pločice 1%-tnom otopinom željezovog(III) klorida), ali je sama reakcija jako spora. Pokušano je provođenje reakcije uz pomoć mikrovalova i na povišenoj temperaturi, ali bez uspjeha. Nakon 11 dana na sobnoj temperaturi, reakcijska smjera je obrađena i izoliran produkt, ali spektroskopski podatci nisu potvrdili strukturu ciljnog spoja **4**.

Zbog navedenih rezultata, odustalo se od ovog reakcijskog puta, te je razvijena Metoda 3, u kojoj se zaobilazi problematični korak hidrolize (Shema 2).

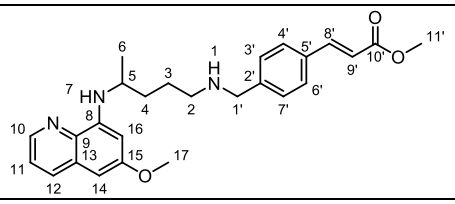
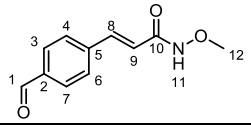
Prvi korak je *coupling* derivata cimetne kiseline s odgovarajućim hidroksilaminom, korištenjem standardnih uvjeta (HATU, DIEA, diklormetan), pri čemu nastaje spoj **5**. Reakcija je bila uspješna s zadovoljavajućim iskorištenjem, a struktura spoja **5** spektroskopski je potvrđena.

U idućem koraku pokušana je sinteza imina i njegova redukcija u amin iz spoja **5** i primakina, u kiselim uvjetima i u prisutnosti natrijevog triacetoksiborhidrida. Reakcijski uvjeti bili su analogni onima u pripremi spoja **1**, međutim nije nastao željeni spoj. Variranje reakcijskih uvjeta (količina reagensa, temperatura) također nije bilo uspješno.



Shema 2. Sinteza hibrida primakina i cimetne kiseline Metodom 3

Tablica 2. Analitički i MS podaci spojeva 1 i 5

Spoj	Struktura	Relativna molekulska masa (M_r)	Iskorištenje (%)	t_t (°C)	MS (*m/z*)
1		433,54	70,80	ulje	434,0 $(M+1)^+$
5		205,21	76,10	n.o.[a]	204,0 $(M-1)^-$

[a] nije određeno

Tablica 3. ^{1}H i ^{13}C NMR spektroskopski podaci spojeva 1 i 5

Spoj	^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, *J*/Hz)	^{13}C NMR (DMSO-d_6, δ ppm, *J*/Hz)
1	8,52-8,50 (dd, 1H, 10, *J* = 1,3, 4,1), 7,92-7,89 (dd, 1H, 12, *J* = 1,0, 8,1), 7,66 (d, 1H, 8', *J* = 16,0), 7,44 (d, 2H, 3', 7' *J* = 8,0), 7,36-7,15 (m, 3H, 4', 6', 11), 6,41 (d, 1H, 16, *J* = 16,0), 6,33-6,27 (m, 2H, 14, 9'), 6,03 (d, 1H, 7, *J* = 5,7), 3,88 (s, 3H, 11'), 3,80-3,78 (m, 5H, 17, 1'), 3,64-3,6 (m, 1H, 5), 2,66 (t, 2H, 2, *J* = 6,4), 2,19 (bs, 1H, 1), 1,77-1,61 (m, 4H, 3, 4), 1,29 (d, 3H, 6, *J* = 6,3)	-
5	11,41 (s, 1H, 1), 10,02 (s, 1H, 11), 7,94 (d, 2H, 3, 7, *J* = 8,1), 7,81 (d, 2H, 4, 6, *J* = 7,45), 7,69 (d, 1H, 8, *J* = 15,83), 6,58 (d, 1H, 9, *J* = 15,81), 3,68 (s, 3H, 12)	192,53 (1), 162,11 (10), 140,25 (5), 138,23 (8), 136,53 (2), 129,98 (3,7), 128,22 (4,6), 121,73 (9), 63,37 (12)

5. ZAKLJUČAK

Tema ovog diplomskog rada jest sinteza novog hibridnog derivata primakina i cimetne kiseline s terminalnom hidroksamskom kiselinom. Zbog poteškoća u pojedinim reakcijskim koracima željeni spoj, 3-[4-[[4-[(6-metoksi-kinolin-8-il)amino]pentilamino]metil]fenil] prop-2-enhidroksamska kiselina, nije uspješno sintetiziran. Međutim uspješno su sintetizirani sljedeći međuprodukti:

- metil-3-(4-(((4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)amino)metil)fenil)prop-2-enoat (**1**)
- 3-(4-formilfenil)- *N*-metoksiprop-2-enamid (**5**).

Strukture prethodnih međuprodukata potvrđene su ^{1}H i ^{13}C NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom.

6. LITERATURA

Arts J, King P, Marien A, et al. JNJ-26481585, a novel "second generation" oral histone deacetylase inhibitor, shows broadspectrum preclinical antitumoral activity. Clin Cancer Res, 2009, 15, 6841-6851.

Atadja P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. Cancer Lett., 2009, 280(2), 233–41.

Blander G and Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. Annu Rev Biochem, 2004; 73, 417-435.

Brest P, Lassalle S, Hofman V, Bordone O, Tanga VG, Bonnetaud C, Moreilhon C, Rios G, Santini J, Barbry P, et al. MiR-129–5p is required for histone deacetylase inhibitor-induced cell death in thyroid cancer cells. Endocr. Relat. Cancer, 2011, 18, 711–719.

Cancer, 2018., http://www.who.int, pristupljeno 10.03.2018.

Ching-Yu Y, Hurng-Wern H, Chih-Wen S, Ming-Feng H, Shyng-Shiou FY, Hui-Ru W, Yung-Ting C, Ammad Ahmad F, Jen-Yang T, Hsueh-Wei C. DNA methylation, histone acetylation and methylation of epigenetic modifications as a therapeutic approach for cancers. Cancer letters, 2016.

Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. Trends Biochem. Sci., 1999, 24, 73–76.

Cooper M. G, Hausman E. R. Stanica. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 631, 726, 739

Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. Cell, 2012, 150, 12–27.

Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, Devy L, Colige A, Clausse N, Blacher S, Verdin E, Foidart JM, Nusgens BV, et al. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. Oncogene, 2002, 21, 427–436.

Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. International Journal of Molecular Science, 2017.

Fass DM, Shah R, Ghosh B, et al. Short-chain HDAC inhibitors differentially affect vertebrate development and neuronal chromatin. ACS Med Chem Lett 2011, 2, 39-42.

Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. Nature, 1999, 401, 188-193.

Fischle W, Kiermer V, Dequiedt F, Verdin E (2001) The emerging role of class II histone deacetylases. Biochem Cell Biol, 79, 337–348.

Flipo M, Charton J, Hocine A, et al. Hydroxamates: relationships between structure and plasma stability. J Med Chem, 2009, 52, 6790-6802.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat. Genet., 2005, 37, 391–400.

Fulda S. Modulation of TRAIL-induced apoptosis by HDAC inhibitors. Curr. Cancer Drug Targets, 2008, 8, 132–140.

Gameiro SR, Malamas AS, Tsang KY, Ferrone S, Hodge JW. Inhibitors of histone deacetylase 1 reverse the immune evasion phenotype to enhance T-cell mediated lysis of prostate and breast carcinoma cells. Oncotarget, 2016, 7, 7390–7402.

Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. J Biol Chem, 2002, 277, 25748–25755.

Gius D, Cui H, Bradbury CM, Cook J, Smart DDK, Zhao S, Young L, Brandenburg SA, Hu Y, Bisht KS, et al. Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach. Cancer Cell, 2004, 6, 361–371.

Glozak MA, Sengupta N, Zhang X and Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. Gene, 2005, 363, 15-23.

Grunstein M. Histone acetylation in chromatine structure and transcription. Nature, 1997, 389, 349-352.

Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101, 1241–1246.

Handy ED, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. Circulation, 2011, 123(19), 2145-2156

Hodawadekar SC, Marmorstein R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure,mechanism and implications for effector design. Oncogene, 2007, 26, 5528-5540.

Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1 by ARD1-mediated acetylation. Cell, 2002, 111, 709–720.

Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, Wu CW. Histone deacetylases specifically downregulate p53-dependent gene activation. J. Biol. Chem., 2000, 275, 20436–20443.

Kwon SH, Ahn SH, Kim YK, Bae GU, Yoon JW, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW, Han JW. Apicidin, a Histone Deacetylase Inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells. J. Biol. Chem., 2002, 277, 2073–2080.

Lin R., Sternsdorf T, Tini M, Evans RM. Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukaemia. Oncogene, 2001, 20, 7204–7216.

Manal M, Chandrasekara MJN, Gomathi Priyaa J, Nanjan MJ. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. Bioorganic Chemistry, 2016, 67, 18-42.

McGraw AL. Romidepsin for the treatment of T-cell lymphomas. American Journal of Health-System Pharmacy, 2013, 70 (13), 1115-1122.

Miller CP, Singh MM, Rivera-Del Valle N, Manton CA, Chandra J. Therapeutic strategies to enhance the anticancer efficacy of histone deacetylase inhibitors. J. Biomed. Biotechnol. 2011, 2011, 514261.

Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nature, 2007, 6, 38-51.

Muraoka M, Konishi M, KikuchiYanoshita R, Tanaka K, Shitara N, Chong JM et al. p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. Oncogene, 1996, 12, 1565–1569.

NCI Dictionary of Cancer Terms, 2018., https://www.cancer.gov, pristupljeno 10.05.2018.

Noonan EJ, Place RF, Pookot D, Basak S, Whitson JM, Hirata H, Giardina C, Dahiya R. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. Oncogene, 2009, 28, 1714–1724.

Novartis Pharmaceuticals Corporation. Farydak® (panobinostat) capsules, for oral use: US prescribing information, 2015., http://www.fda.gov., pristupljeno 24.05.2018.

Novartis Europharm Limited. Farydak hard capsules: EU summary of product characteristics, 2015., http://ema.europa.eu., pristupljeno 24.05.2018.

Ocio EM, Vilanova D, Atadja P, et al. In vitro and in vivo rationale for the triple combination of panobinostat (LBH589) and dexamethasone with either bortezomib or lenalidomide in multiple myeloma. Haematologica, 2010, 95, 794–803.

Ocker M, Schneider-Stock R. Histone deacetylase inhibitors: Signalling towards p21cip1/waf1. Int. J.Biochem. Cell Biol., 2007, 39, 1367–1374.

Paik PK, Krug LM. Histone Deacetylase Inhibitors in Malignant Pleural Mesothelioma: Preclinical Rationale and Clinical Trials. Journal of Thoracic Oncology, 2010, 5(2), 275-279

Palmieri D, Lockman PR, Thomas FC, et al. Vorinostat inhibits brain metastatic colonization in a model of triple-negative breast cancer and induces DNA double-strand breaks. Clin Cancer Res, 2009, 15, 6148-6157.

Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. Mol. Cell Biol., 2004, 24, 306–319.

Polo SE, Almouzni G.Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. Cancer Lett., 2005, 220, 1–9.

Richardson PG, Laubach JP, Lonial S, et al. Panobinostat: a novel pan-deacetylase inhibitor for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. Expert Rev Anticancer Ther., 2015, 15(7), 737–48.

Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 10014–10019.

Ropero S, M Estellar. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. Molecular Oncology, 2007, 19-25.

Rosenberg G. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? Cell Mol Life Sci, 2007. 64, 2090-2103.

Rössig L, Li H, Fisslthaler B, Urbich C, Fleming I, Förstermann U, Zeiher AM, Dimmeler S. Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis. Circ. Res., 2002, 91, 837–844.

Sažetak opisa svojstava lijeka (Farydak), 2015., http://www.halmed.hr/, pristupljeno 05.05.2018.

Seidel C, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature. Genes Nutr, 2012, 7, 357-367.

Seto E, Yoshida M. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. Cold Spring Harb Perspect Biol., 2014, 6(4).

Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21, 214-222.

Tang, J.; Yan, H.; Zhuang, S. Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. Clin. Sci. 2013, 124, 651–662.

Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL.A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. Science, 1996, 272, 408–411.

Vidanes GM, Bonilla CY, Toczyski D P. Complicated tails: histone modifications and the DNA damage response. Cell, 2005, 121, 973–976.

Vrana JA, Decker RH, Johnson CR, Wang Z, Jarvis WD, Richon VM, Ehinger M, Fisher PB, Grant S. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. Oncogene, 1999, 18, 7016–7025.

Wagner FF, Weïwer M, Lewis MC, Holston EB. Small Molecule Inhibitors of Zinc-dependent Histone Deacetylases. Neurotherapeutics, 2013, 10, 589-604.

Woan KV, Lienlaf M, Perez-Villaroel P, Lee C, Cheng F, Knox T, Woods DM, Barrios K, Powers J, Sahakian E, et al. Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation. Mol. Oncol., 2015, 9, 1447–1457.

Yang XJ, Gregoire S. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. Mol Cell Biol, 2006, 25, 2873–2884.

Yasui W, Oue N, Ono S, Mitani Y, Ito R, Nakayama H, Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2003, 983, 220–231.

Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, Manji HK, Chen G. The Mood Stabilizer Valproic Acid Activates Mitogen-activated Protein Kinases and Promotes Neurite Growth. J. Biol. Chem. 2001, 276, 31674–31683.

Zhang J, Zhong Q. Histone deacetylase inhibitors and cell death. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014, 71, 3885-3901.

Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, Sadzak I, Ramsauer K, Egger G, Grausenburger R, Schweifer N, Chiocca S, Decker T, et al. Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. Mol. Cell Biol., 2006, 26, 7913–7928.

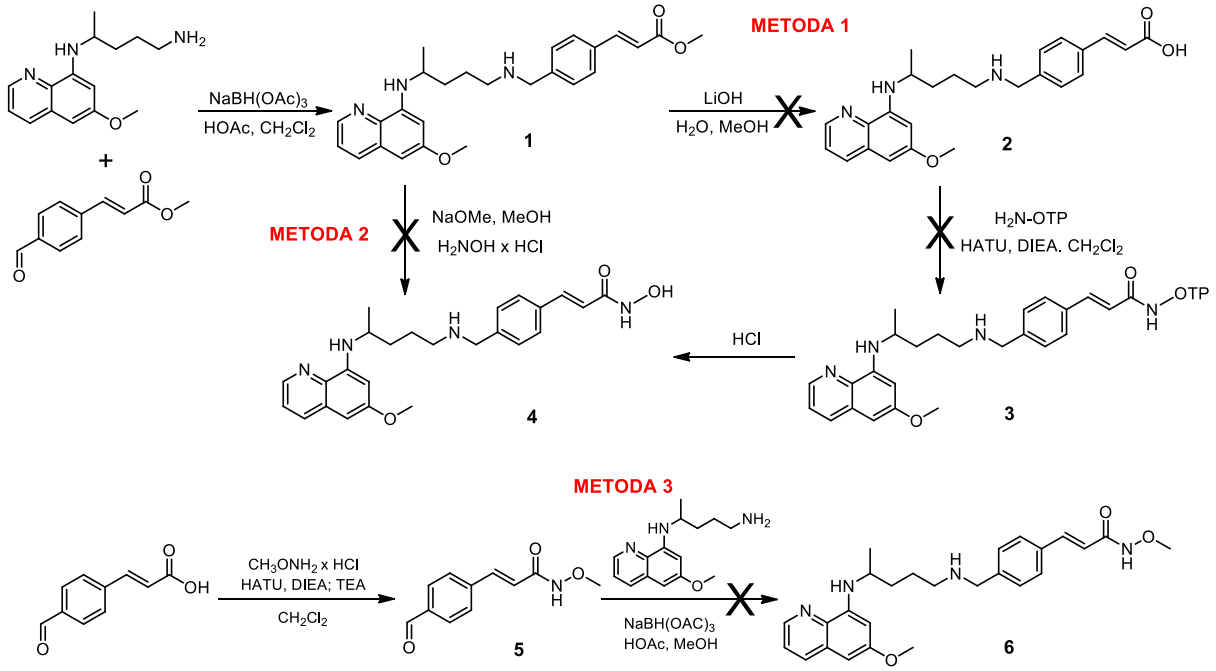
7. SAŽETAK/SUMMARY

Goran Poje

Sinteza hidroksamske kiseline hibrida primakina i cimetne kiseline

Novija istraživanja pokazuju da su epigenetske modifikacije jednako bitne u procesu razvoja tumora kao i mutacije gena. Posebno se ističu acetilacije, odnosno deacetilacije jer utječu na strukturu kromatina čime određuju gensku ekspresiju. U tumorskih stanica uočena je prekomjerna aktivnost histonskih deacetilaza (HDAC) koje uklanjaju ε-acetilnu skupinu iz bočnih aminokiselinskih ogranaka lizina. Dolazi do utišavanja tumorsupresorskih gena te aktivacije gena koji potiču preživljavanje i proliferaciju stanica tumora. Lijekovi inhibitori HDAC kompleksiraju ione cinka iz aktivnog mjesta enzima. Prema kemijskoj strukturi dijelimo ih u četiri skupine, od kojih su najzanimljivije hidroksamske kiseline zbog visoke sposobnosti keliranja iona metala i inhibicije HDAC-a.

Cilj ovoga diplomskog rada bila je sinteza hibridnog derivata primakina i cimetne kiseline s terminalnom hidroksamskom kiselinom, za kojeg se pretpostavlja da bi, zbog svojih strukturnih karakteristika, mogao imati antimalarijsko i/ili citostatsko djelovanje. Isprobane su tri sintetske metode, no unatoč tome, sinteza ciljne molekule nije bila uspješna.



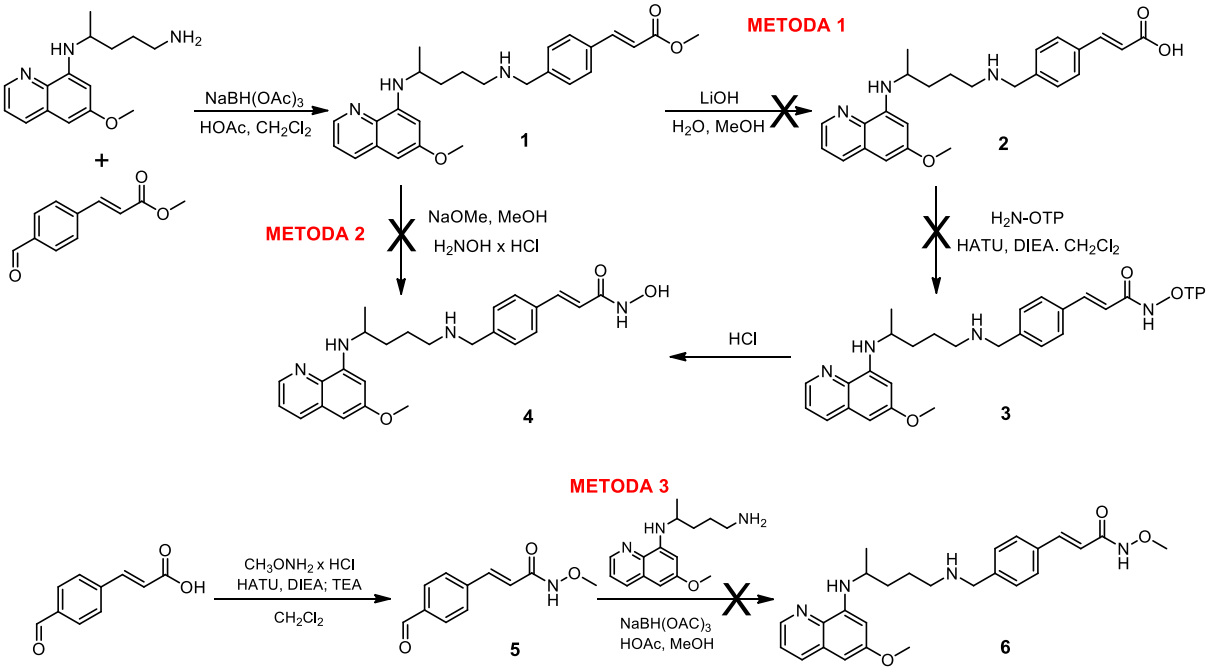
Ključne riječi: HDAC inhibitori, hidroksamska kiselina, primakin, cimetna kiselina, sinteza

Goran Poje

Synthesis of primaquine–cinammic acid hybrid with hydroxamic acid moiety

Recent research shows that carcinogenesis cannot be explained only by genetic alterations, but also involves epigenetic modifications. In particular acetylation and deacetylation affect the structure of chromatin which determines gene expression. In tumor cells excessive activity of histone deacetylases (HDAC), enzymes that remove the ε-acetyl group from the lateral lysine amino acid residues, was observed. It results in suppression of tumor-suppressor genes and activation of genes that stimulate survival and proliferation of tumor cells. HDAC inhibitors complex zinc ions found in the enzyme's active site. According to the chemical structure, they are divided into four groups, of which hydroxamic acids are the most interesting ones, due to their high metal ion chelating ability.

The goal of this diploma thesis was the synthesis of a hybrid derivative primaquine and cinnamic acid with terminal hydroxamic acid moiety, which might, due to the structural characteristics, exert cytostatic and/or antimalarial activity. Although three synthetic methods were employed, synthesis of the target compound was not achieved.

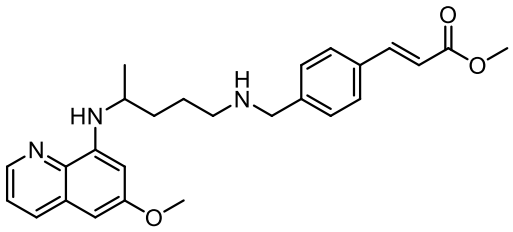


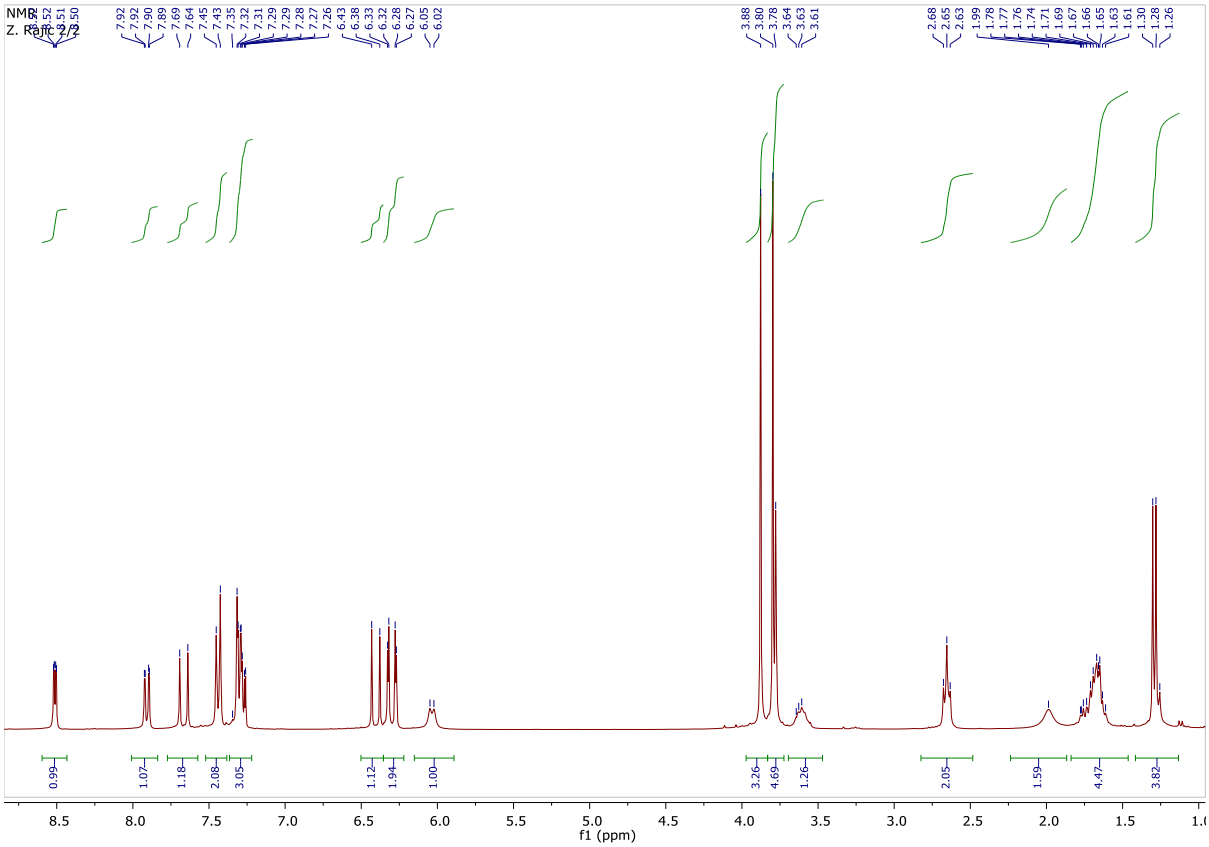
Key words: HDAC inhibitors, hydroxamic acid, primaquine, cinnamic acid, synthesis

8. PRILOZI

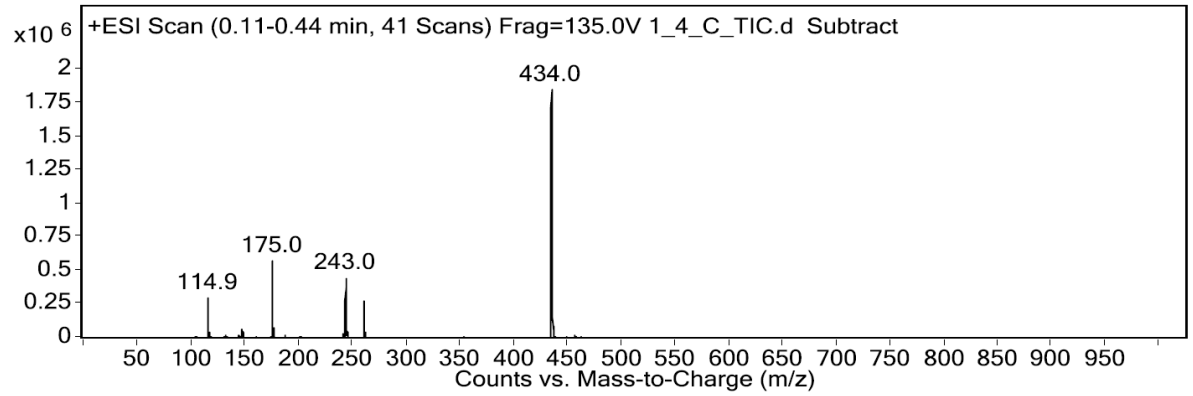
Prilozi sadrže ^{1}H NMR, ^{13}C NMR te MS spektre sintetiziranih spojeva **1** i **5**.

1

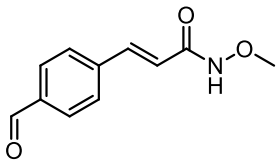


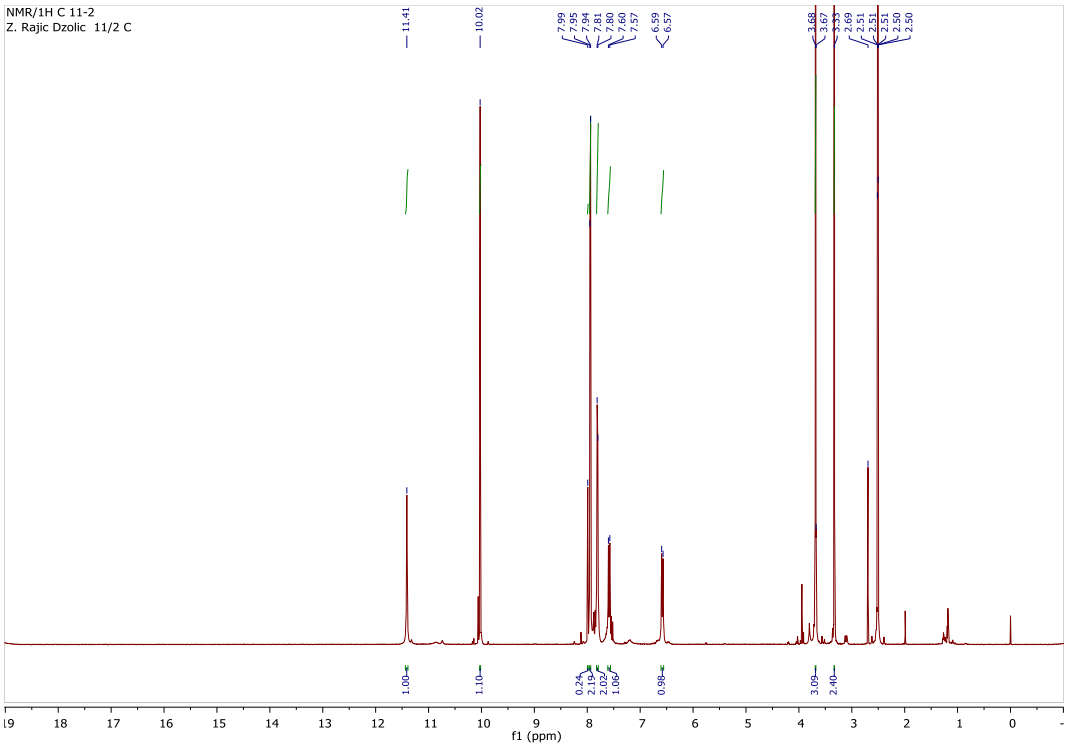


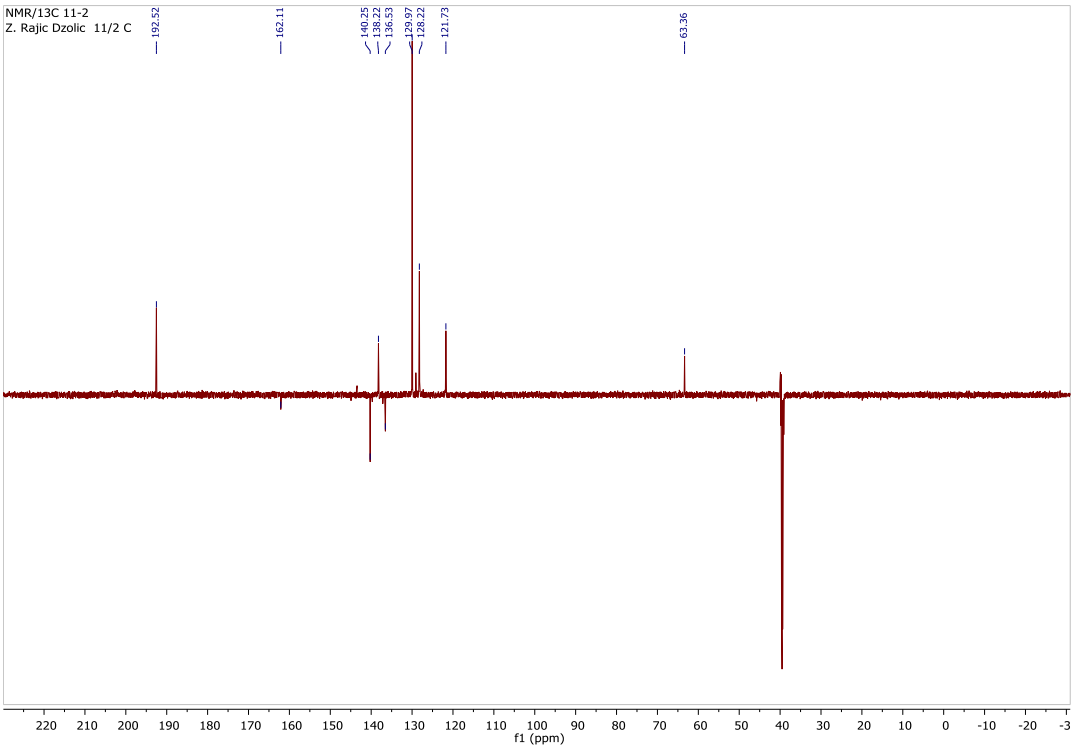
Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) in "+ TIC Scan"	135	0	ESI



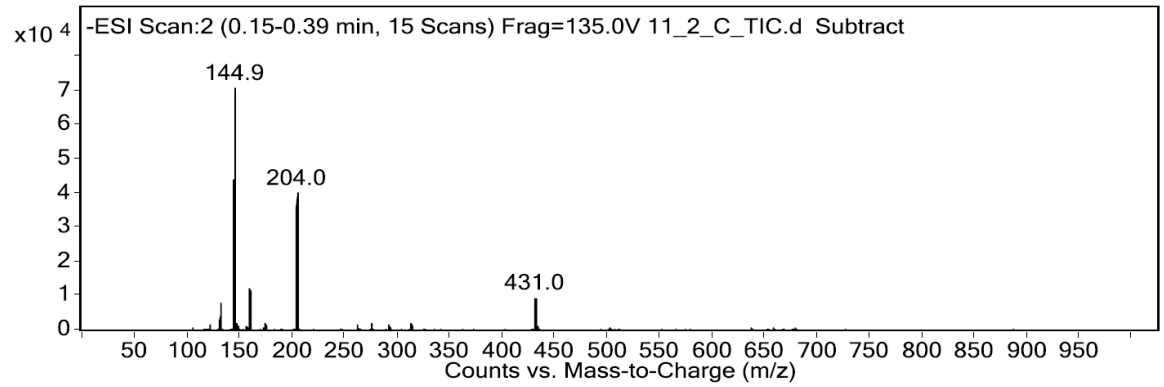
5




NMR/1H C 11-2
Z. Rajic Dzolic 11/2 C
11.41
10.02
7.99
7.95
7.94
7.81
7.80
7.60
7.57
6.59
6.57
3.68
3.67
3.33
2.69
2.51
2.51
2.50
2.50
1.00
1.10
0.24
2.19
2.02
1.06
0.98
3.09
2.40
f1 (ppm)


NMR/13C 11-2
Z. Rajic Dzolic 11/2 C
192.52
162.11
140.25
138.22
136.53
129.97
128.22
121.73
63.36
f1 (ppm)

Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) in "+/- TIC Scan"	135	0	ESI



9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

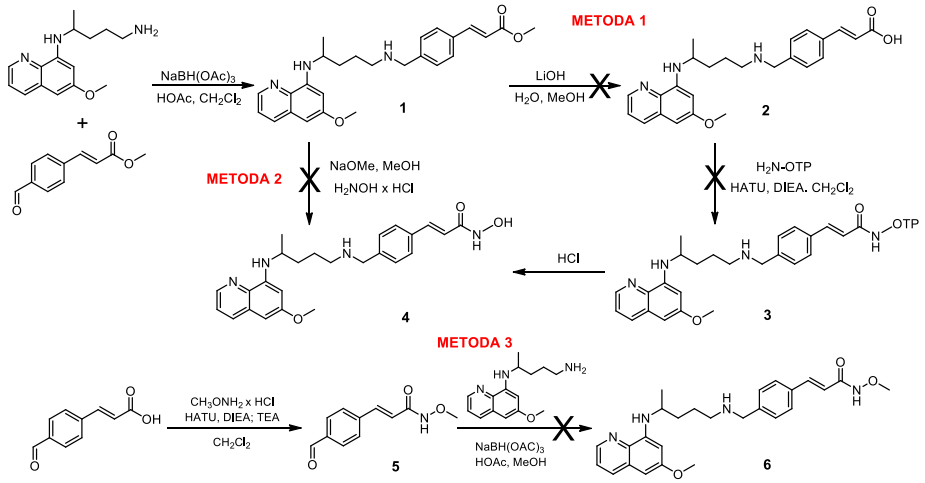
SINTEZA HIDROKSAMSKE KISELINE HIBRIDA PRIMAKINA I CIMETNE KISELINE

Goran Poje

SAŽETAK

Novija istraživanja pokazuju da su epigenetske modifikacije jednako bitne u procesu razvoja tumora kao i mutacije gena. Posebno se ističu acetilacije, odnosno deacetilacije jer utječu na strukturu kromatina čime određuju gensku ekspresiju. U tumorskih stanica uočena je prekomjerna aktivnost histonskih deacetilaza (HDAC) koje uklanjaju ε-acetilnu skupinu iz bočnih aminokiselinskih ogranaka lizina. Dolazi do utišavanja tumorsupresorskih gena te aktivacije gena koji potiču preživljavanje i proliferaciju stanica tumora. Lijekovi inhibitori HDAC kompleksiraju ione cinka iz aktivnog mjesta enzima. Prema kemijskoj strukturi dijelimo ih u četiri skupine, od kojih su najzanimljivije hidroksamske kiseline zbog visoke sposobnosti keliranja iona metala i inhibicije HDAC-a.

Cilj ovoga diplomskog rada bila je sinteza hibridnog derivata primakina i cimetne kiseline s terminalnom hidroksamskom kiselinom, za kojeg se pretpostavlja da bi, zbog svojih strukturnih karakteristika, mogao imati antimalarijsko i/ili citostatsko djelovanje. Isprobane su tri sintetske metode, no unatoč tome, sinteza ciljne molekule nije bila uspješna.



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

Rad sadrži: 42 stranice, 11 grafičkih prikaza, 3 tablice i 64 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: HDAC inhibitori, hidroksamska kiselina, primakin, cimetna kiselina, sinteza

Mentor: **Dr. sc. Zrinka Rajić Džolić**, *izvanredni profesor*
Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Ocjenjivači: **Dr. sc. Zrinka Rajić Džolić,** *izvanredni profesor*
Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Branka Zorc, *redoviti profesor*
Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Višnja Drinovac Vlah, *asistent*
Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of medicinal chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

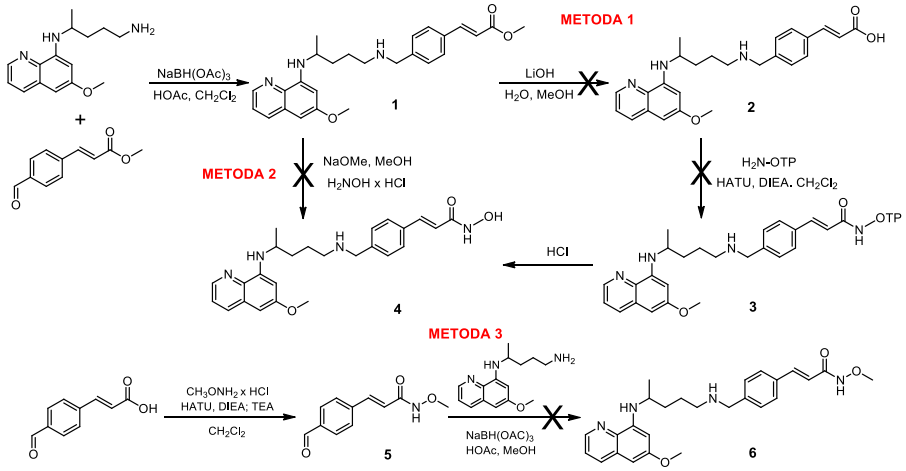
SYNTHESIS OF PRIMAQUINE-CINAMMIC ACID HYBRID WITH HYDROXAMIC ACID MOIETY

Goran Poje

SUMMARY

Recent research shows that carcinogenesis cannot be explained only by genetic alterations, but also involves epigenetic modifications. In particular acetylation and deacetylation affect the structure of chromatin which determines gene expression. In tumor cells excessive activity of histone deacetylases (HDAC), enzymes that remove the ε-acetyl group from the lateral lysine amino acid residues, was observed. It results in suppression of tumor-suppressor genes and activation of genes that stimulate survival and proliferation of tumor cells. HDAC inhibitors complex zinc ions found in the enzyme's active site. According to the chemical structure, they are divided into four groups, of which hydroxamic acids are the most interesting ones, due to their high metal ion chelating ability.

The goal of this diploma thesis was the synthesis of a hybrid derivative primaquine and cinnamic acid with terminal hydroxamic acid moiety, which might, due to the structural characteristics, exert cytostatic and/or antimalarial activity. Although three synthetic methods were employed, synthesis of the target compound was not achieved.



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

Thesis includes: 42 pages, 11 figures, 3 tables and 64 references. Original is in Croatian language.

Keywords: HDAC inhibitors, hydroxamic acid, primaquine, cinnamic acid, synthesis

Mentor: **Zrinka Rajić Džolić**, **Ph.D.** *Associate Professor*,
University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Reviewers: **Zrinka Rajič Džolić**, **Ph.D.** *Associate Professor*
University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Branka Zorc, **Ph.D.** *Full Professor*
University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Višnja Drinovac Vlah, **Ph.D.** *Assistant*
University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2018.