

Sinteza i karakterizacija amida 3- i 6-supstituiranog derivata beta-karbolina i analoga klorokina

Vilenica, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:627856>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-28**



Repository / Repozitorij:

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



Ivana Vilenica

**Sinteza i karakterizacija amida 3- i 6-
supstituiranog derivata β -karbolina i analoga
klorokina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Ivani Perković na stručnom vodstvu i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se i svim zaposlenicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na ugodnom društvu u laboratoriju, a posebno hvala Goranu Poje na nesebičnoj pomoći, savjetima i uputama tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Najveće hvala mojim roditeljima i bratu Anti na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom cijelog života, a posebno ovih 5 godina studiranja. Hvala i mom dečku Borutu što je uvijek vjerovao u mene i bio mi oslonac.

Hvala i svim prijateljicama za puno smijeha i lijepih uspomena.

Rad je financiran sredstvima uspostavnog istraživačkog projekta Derivati harmina kao potencijalni antimalarici (UIP-2017-05-5160) Hrvatske zaklade za znanost.



KRATICE

^{13}C NMR	^{13}C nuklearna magnetska rezonancija
^1H NMR	^1H nuklearna magnetska rezonancija
5-HT	5-hidroksitriptamin ili serotonin
AChE	acetilkolinesteraza
ADMA	acetaldehid-dimetil-acetal
ADMP	2-azido-1,3-dimetilimidazolinijev heksafluorofosfat
AML	akutna mijelocitna leukemija
ATP	adenozin-trifosfat
BChE	butirilkolinesteraza
BOP	(benzotriazol-1-iloksi)tri(dimetilamino)-fosfonij heksafluorofosfat
CDK	ciklin-ovisna kinaza
cGMP	ciklički gvanozinmonofosfat
CQ	klorokin
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en
DCC	dicikloheksilkarbodiimid
DCE	dikloretan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EC_{50}	koncentracija ispitivanog uzorka u testu potrebna za izazivanje 50% maksimalnog učinka
FDA	Agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FG	funkcionalna skupina (engl. <i>functional group</i>)
GABA	γ -aminomaslačna kiselina
HATU	1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinij 3-oksid heksafluorofosfat
HOBt	hidroksibenzotriol
Hsp	protein toplinskog šoka (engl. <i>heat shock protein</i>)
IC_{50}	koncentracija koja izaziva 50 %-tnu inhibiciju rasta stanica
IR	infracrvena spektroskopija
MAO	monoaminooksidaza
MS	masena spektrometrija

MW	mikrovalno zračenje
P-gh1	P-glikoprotein homolog 1
<i>PfCRT</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> klorokin-rezistentni transporter
<i>PfHsp90</i>	<i>P. falciparum</i> heat shock protein 90
<i>q.s.</i>	količina koja je dovoljna (lat. <i>quantum satis</i>)
SAR	odnos strukture i djelovanja (engl. <i>structure-activity relationship</i>)
s.t.	sobna temperatura
$t_{1/2}$	vrijeme polueliminacije
T3P	anhidrid propanfosfonske kiseline
TBAHS	tetrabutilamonij hidrogen sulfat
TEA	trietilamin
TFA	trifluoroctena kiselina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin layer chromatography</i>)
TMS	tetrametilsilan
t_i	temperatura tališta
UV	ultraljubičasto zračenje

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Malaria.....	2
1.2. β-Kربولin.....	3
1.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva.....	3
1.2.2. Biološko djelovanje.....	4
1.2.3. Sintaza prstena β -kربولina.....	5
1.2.4. Lijekovi i druge molekule koje sadrže β -kربولin u strukturi.....	6
1.3. Klorokin.....	11
1.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva.....	11
1.3.2. Mehanizam djelovanja.....	11
1.3.3. Nuspojave.....	12
1.3.4. Rezistencija.....	12
1.4. Coupling-reakcije.....	13
1.4.1. Uvod u reakcije.....	13
1.4.2. Stvaranje amidne veze N-C coupling-reakcijama.....	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. Sintaza amina u položaju 3 β-kربولina.....	21
3.1.1. Sintaza metil-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-3-karboksilata (1a).....	21
3.1.2. Sintaza etil-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-3-karboksilata (1b).....	21
3.1.3. Sintaza (1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-3-il)metanola (1c).....	21
3.1.4. Sintaza 3-(azidometil)-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (1d).....	22
3.1.5. Sintaza (1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-3-il)metanamina (1e).....	23
3.2. Sintaza amina u položaju 6 β-kربولina.....	24
3.2.1. Sintaza 6-metoksi-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2-ijevog trifluoroacetata (2a).....	24
3.2.2. Sintaza 6-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (2b).....	24
3.2.3. Sintaza 1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-6-ola (2c).....	24
3.2.4. Sintaza tert-butil(2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-6-il)oksi)etil)karbamata (2d).....	25
3.2.5. Sintaza 2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-6-il)oksi)etan-1-amina (2e).....	26

3.3. Sinteza (7-klorokinolin-4-il)glicina (3).....	26
3.4. Sinteza amidnih derivata klorokinske kiseline i harmina (4a, 4b).....	27
3.4.1. Sinteza 2-((7-klorokinolin-4-il)amino)-N-((1-metil-9H-pirido[3,4-<i>b</i>]indol-3-il)metil)acetamida (4a).....	27
3.4.2. Sinteza 2-((7-klorokinolin-4-il)amin)-N-(2-((1-metil-9H-pirido[3,4-<i>b</i>]indol-6-il)etil)acetamida (4b).....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1. Sinteza i karakterizacija spojeva.....	30
4.2. Procjena svojstava sličnih lijeku (engl. „ <i>drug-likeness</i> “)......	36
5. ZAKLJUČCI.....	41
6. LITERATURA.....	43
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	47
8. PRILOZI.....	50
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

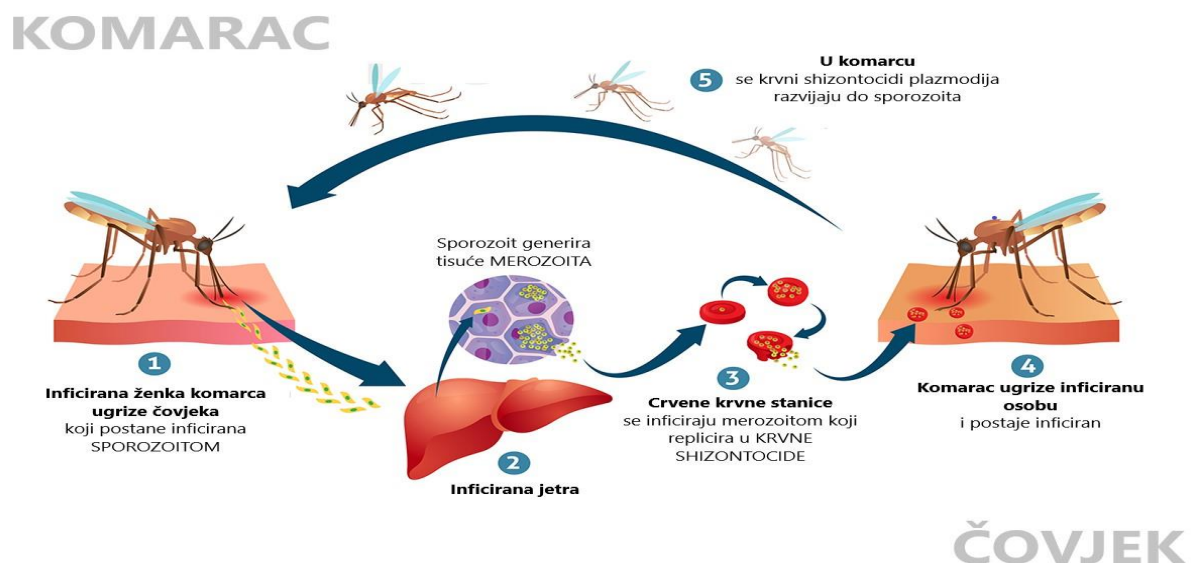
1. UVOD

1.1. Malarija

Malarija je bolest uzrokovana parazitom roda *Plasmodium* koji se prenosi pomoću inficirane ženke komarca roda *Anopheles*.

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) u 2019. godini zabilježeno je oko 229 milijuna slučajeva u svijetu, gdje je 409 000 završilo smrću, a od toga 67% (274 000) su bila djeca do 5 godina. Veliki dio svjetske populacije spada u rizičnu skupinu (djeca, trudnice, imunokompromitirani), a bolest je najviše raširena u Africi južno od Sahare, ali i jugoistočnoj Aziji, istočnom Mediteranu, sjevernom Pacifiku te Sjevernoj i Južnoj Americi. Ukupna sredstva za suzbijanje i uklanjanje malarije dosežu do visokih tri milijarde američkih dolara što potvrđuje koliki je izazov liječenje ove bolesti (www.who.int).

Od ukupno pet parazita koji mogu prouzročiti malariju kod čovjeka, *P. falciparum* i *P. vivax* su najopasniji po ljudski život (Singh i sur., 2004). Zaražena ženka komarca tijekom hranjenja krvlju ubrizgava u čovjeka sporozoite, zarazni i pokretni oblik *Plasmodium spp.*, koji putuju do hepatocita u jetri. Unutar hepatocita pojedinačni sporozoit generira desetke tisuća merozoita (tkivni shizontocidi) koji se oslobađaju u krvotok gdje ulaze u crvene krvne stanice kako bi se replicirali čime postaju krvni shizontocidi (Slika 1) (Miller i sur., 2013). Simptomi bolesti javljaju se 10 do 15 dana nakon ugriza komarca, a uključuju porast tjelesne temperature (čak i do 41,5 °C), groznicu, glavobolje i povraćanje. Ukoliko se s terapijom ne započne na vrijeme, može doći do pogoršanja stanja, pojave anemije, povećanja jetre, akutnog respiratornog zatajenja, zatajenja bubrega i oštećenja mozga koji mogu rezultirati komom i na kraju smrću (www.webmd.com).



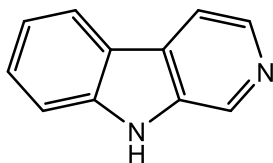
Slika 1. Životni ciklus plazmodija (preuzeto i prilagođeno iz www.eu.biogents.com)

Prvi učinkovit lijek protiv malarije bio je kinin, izoliran kao prirodni produkt iz kore kininovca, čija su ljekovita svojstva poznata već od 17. st. Kinin je bio i spoj uzor u razvoju ostalih kinolinskih antimalarika od kojih se najčešće u terapiji koriste klorokin i primakin (Willcox i sur., 2004).

1.2. β -Kربولин

1.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva

β -Kربولин (Slika 2) građen je od tricikličke strukture sastavljene od indolskog i piridinskog prstena. Kemijsko ime prema IUPAC-u glasi 9H-pirido[3,4-*b*]indol, a u prirodi se nalazi u čvrstom agregatnom stanju. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva nalaze se u Tablici 1 (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).



Slika 2. Struktura β -karbolina

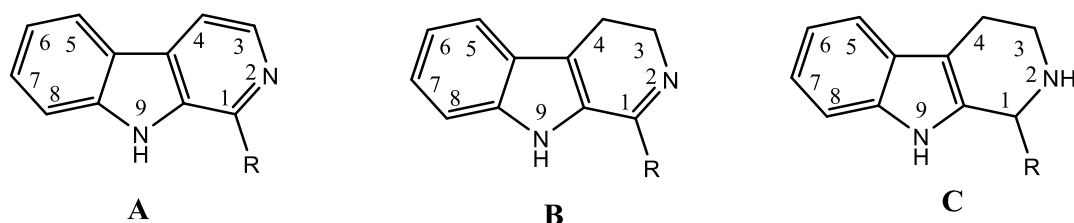
Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva β -karbolina

Molekulska formula	C ₁₁ H ₈ N ₂
Relativna molekulska masa	168,19
Topljivost u vodi ($\mu\text{g/mL}$)	25,2
Temperatura tališta (°C)	199,0
log <i>P</i>	3,17

Indolski alkaloidi čine skupinu široko rasprostranjenih prirodnih spojeva, značajne strukturne raznolikosti, gdje mnogi od njih sadrže β -karbolinski kostur. Predstavnici skupina su tzv. jednostavni β -karbolini koji se sastoje od tricikličke strukture pirido[3,4-*b*]indola koji može biti supstituiran na nekom od ugljikovih atoma. Takvi jednostavni β -karbolini pogodni su za velik broj modifikacija koristeći nekomplikirane kemijske supstitucije. Trivialna nomenklatura, koja se najčešće koristi, temelji se na korijenu -harm-, a potječe od prve

izolacije iz vrste *Peganum harmala*, dok su ostala imena predstavnika skupina predložena neovisno (Allen i Holmstedt, 1980).

Tablica 2. Strukture nekih jednostavnih β -karbolina



Ime spoja	Prsten	R	Alkil
β -karbolin	A	H	/
Harman	A	CH ₃	/
Harmin	A	CH ₃	C7 - OCH ₃
Harmol	A	CH ₃	C7 - OH
Harmalan	B	CH ₃	/
Harmalol	B	CH ₃	C7 - OH
Triptolin	C	CH ₃	/
Pinolin	C	H	C6 - OCH ₃

1.2.2. Biološko djelovanje

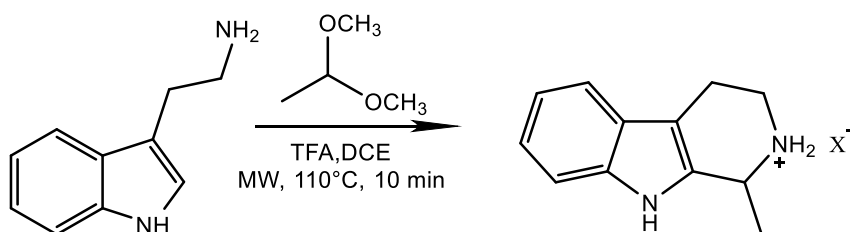
U prirodi su β -karbolini široko rasprostranjeni, uključujući razne biljke, hranu, morska bića, insekte, sisavce, te ljudska tkiva i tjelesne tekućine. Od biljaka, ponajviše se mogu pronaći u sirijskoj rutvici (*Peganum harmala*, Nitrariaceae) i dušnoj lozi (*Banisteriopsis caapi*, Malpighiaceae). Sadrže brojne biološke aktivnosti među kojima su mogućnost interkaliranja u DNA ovojnicu, inhibicija CDK, topoizomerase i MAO, interakcija s receptorima benzodiazepina (GABA_A receptori) i serotoninским receptorima. Iz navedenih funkcija, farmakološka svojstva uključuju sedativni, anksiolitički, hipnotički, antikonvulzivni, antitumorski, antivirusni, antiparazitski i antimikrobni učinak (Cao i sur., 2007). Nekoliko derivata β -karbolina izoliranih iz lista guiere (*Guiera senegalensis*, Combretaceae, Slika 3) pokazalo je dobar antimalarijski učinak prema vrsti *P. falciparum* koja predstavlja najveći izazov u liječenju bolesti malarije (Fiot i sur., 2006).



Slika 3. Biljna vrsta *Guiera senegalensis* (preuzeto s www.species.wikimedia.org)

1.2.3. Sinteza prstena β -karbolina

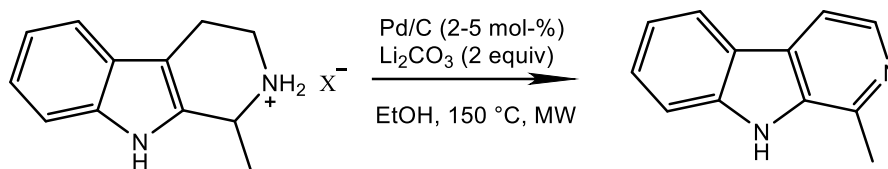
Raširenost alkaloida β -karbolina u prirodi te njihova mnoga biološka djelovanja potaknula su znanstvenike na istraživanje jednostavnih metoda njegove pripreve, koje bi poslužile za dobivanje različitih derivata. Najpovoljnijom opcijom pokazala se Pictet-Spenglerova reakcija (Slika 4), između derivata triptamina i aldehida u prisutstvu jake kiseline. Vrijeme trajanja reakcije može se značajno smanjiti provođenjem reakcije u mikrovalnom reaktoru. Optimalni rezultati sinteze postižu se reakcijom po 2 ekvivalenta kiseline TFA i acetaldehid-dimetil-acetala u diklorethanu (DCE) pri 110 °C tijekom 2 minute. Time se postiže zatvaranje šesteročlanog prstena, nastanak tetrahidro- β -karbolina, uz iskorištenje reakcije do visokih 89%. Metodologija tolerira širok spektar funkcionalnih skupina kao što su eteri, halogenidi, esteri, karboksilne kiseline, supstituirani aromatski prstenovi i neki heterociklički spojevi.



Slika 4. Pictet-Spenglerova reakcija

Nakon uspješne sinteze soli tetrahidro- β -karbolina, potrebno je provesti oksidaciju kako bi dobili β -karbolinski prsten. Oksidacija se također provodi u mikrovalnom reaktoru na

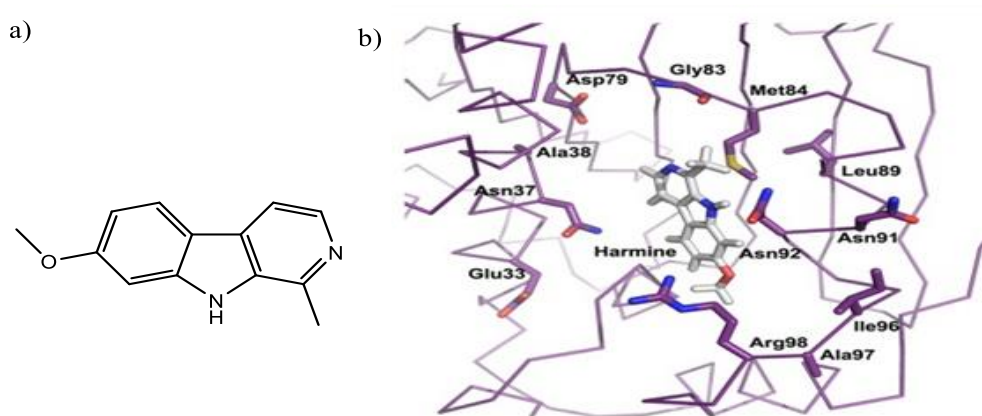
150 °C, koristeći 2 ekvivalenta litijevog karbonata uz 2-5% Pd/C kao katalizator u etanolu (Slika 5). U reakcijama nastaje vrlo malo nusprodukata, a β -karbolini se dobivaju u visokom iskorištenju, npr. iskorištenje u sintezi harmina iznosi čak 99% (Eagon i Anderson, 2014).



Slika 5. Aromatizacija tetrahidro- β -karbolina do β -karbolina

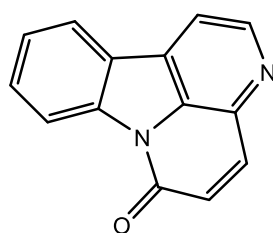
1.2.4. Lijekovi i druge molekule koji sadrže β -karbolin u strukturi

Harmin (Slika 6a) je jedan od alkaloida skupine β -karbolina, izoliran iz mnogih biljnih vrsta. Osim sirijske rutvice, guiere i dušne loze, može se pronaći u kineskom androfagisu (*Andrographis paniculata*, *Acanthaceae*), gomoljastom cecelju (*Oxalis tuberosa*, *Oxalidaceae*) i ljubičastoj pasiflori (*Passiflora incarnata*, *Passifloraceae*) (Javeed i sur., 2018). Istraživanja su pokazala da inhibira protein toplinskog šoka 90 (engl. *heat shock protein*, Hsp90) vrste *P. falciparum* uklapajući se u ATP-vezujuću domenu. Proteini toplinskog šoka su vrlo konzervirani molekularni šaperoni (engl. *chaperone*) koji pomažu novosintetiziranim proteinima da poprime terciarnu strukturu koja im osigurava aktivnost. Kod vrste *P. falciparum*, Hsp90 je jako eksprimiran u eritrocitnoj fazi te kao takav ima ključnu ulogu u razvoju parazita. Sa strukturnog gledišta, kristalna struktura Hsp90 ATP-vezujuće domene otkrila je da postoji nekoliko jedinstvenih aminokiselinskih ostataka unutar mjesta za vezanje ATP-a i da mogu pomoći u dizajniranju novih inhibitora Hsp90. Mogući razlog vezanja harmina u ATP-vezujuću domenu je planarni karakter koji odgovara purinskoj jezgri ATP-a, a odsutnost polarne hidroksilne skupine u harminu sugerira kako se specifično veže u suženu i hidrofobnu ATP-vezujuću domenu Hsp90 vrste *P. falciparum* (Slika 6b). Kombinacije harmina s postojećim antimalaricima – npr. klorokinom i artemisinom, mogle bi rezultirati sinergističkim učinkom i u konačnici dovesti do smanjene rezistencije plazmodija (Shahinas i sur., 2012).



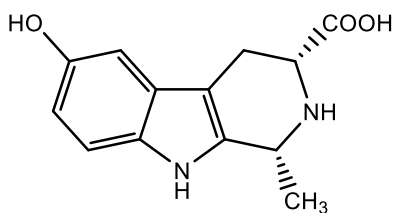
Slika 6. a) Struktura harmina; **b)** Uklapanje u ATP-vezujuću domenu Hsp90 (Shahinas i sur. 2012)

Kantin-6-on (Slika 7) je prirodna molekula β -karbolinske strukture izolirana iz biljaka i gljivica s potencijalnim antitumorskom, antimikotičnom i antibakterijskom aktivnošću. Istraživanjima *in vitro* dokazala se antitumorska aktivnost naspram akutne mijelocitne leukemije (AML) za čiji su model korištene Kasumi-1 stanice. AML je brzoprogresivna bolest u kojoj dolazi do zamjene normalne koštane srži zloćudnim stanicama koje nastaju malignom transformacijom matičnih stanica krvi. Kasumi-1 stanice pokazale su se najosjetljivijima prilikom tretiranja kantin-6-onom u koncentraciji približno EC_{50} te je uočeno oštećenje DNA i time zaustavljanje staničnog ciklusa, aktivacija stanične smrti te nekrotički učinak što potencijalno može zaustaviti širenje zloćudnih stanica (Vieira Torquato i sur., 2017).



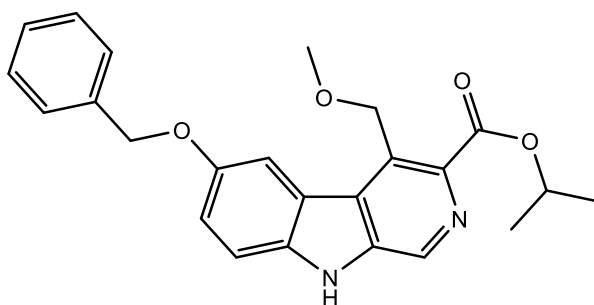
Slika 7. Struktura kantin-6-on

Hyrtioerektini A-C (Slika 8), alkaloidi izolirani iz crvene morske spužve vrste *Hyrtios erectus*, molekule su koje pokazuju umjerenu citotoksičnu aktivnost na staničnoj liniji grlića maternice (HeLa) gdje je IC_{50} iznosio 10, 5,0 i 4,5 $\mu\text{g/mL}$ (Youssef, 2005).



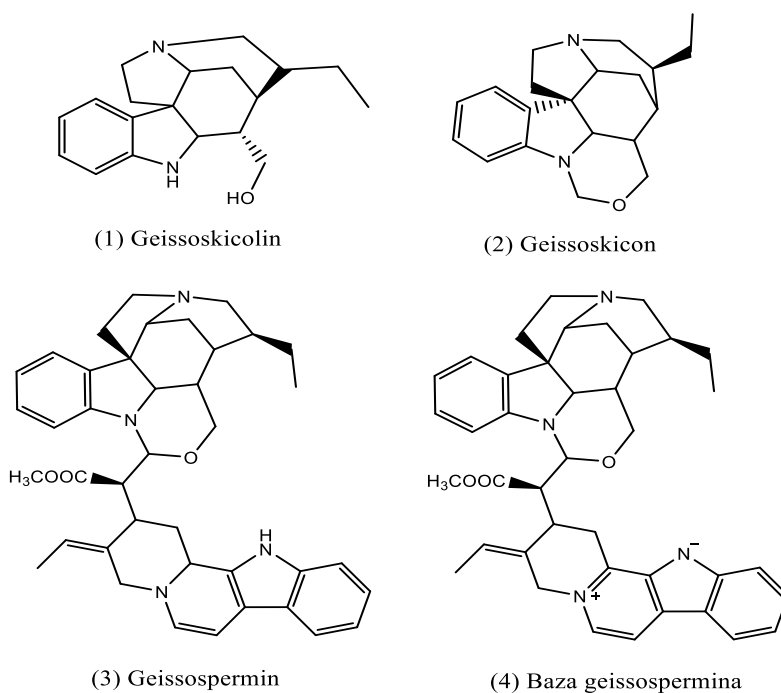
Slika 8. Struktura hyrtioerektina B

Abekarnil (Slika 9) je spoj koji u svojoj strukturi sadrži β -karbolinski prsten koji se veže na GABA_A-receptore. U pokusima na glodavcima, pokazao je 2-10 puta učinkovitije anksiolitičko djelovanje, a nikakvo ili vrlo slabo antikonvulzivno djelovanje u usporedbi s benzodiazepinima (Stephens i sur., 1990). Štoviše, istraživanja su pokazala da abekarnil može pružiti novi pristup smanjenju tolerancije na antikonvulzivne učinke benzodiazepina, osobito diazepama (Zanotti i sur., 1999).



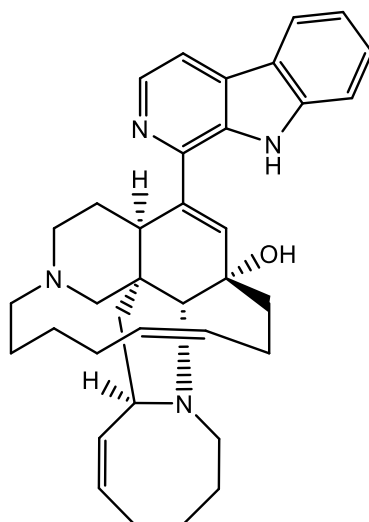
Slika 9. Struktura abekarnila

Geissospermin, jedan je od 4 alkaloida (Slika 10) sintetizirana iz vrste *Geissospermum vellosii* koji pokazuju potencijalnu antikolinesteraznu aktivnost, te su time nova terapijska opcija u borbi protiv Alzheimerove bolesti. Patogeneza bolesti nije u potpunosti istražena, ali poznato je da dolazi do nakupljanja proteina amiloid- β što dovodi do stvaranja β -amiloidnih plakova, te do propadanja kolinergičkih neurona zbog pojačane aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). Od navedenih spojeva, najpotentnijim pokazao se geissoskicolin koji inhibira i BChE i AChE, a osim toga ima protuupalno, obnavljajuće i neuroprotektivno djelovanje (Lima i sur., 2020).



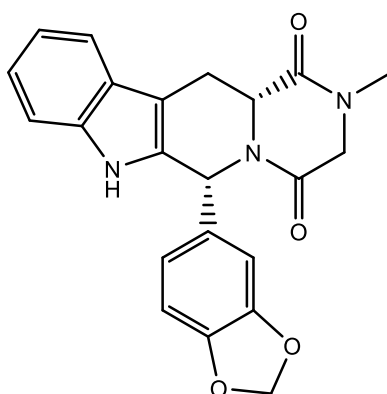
Slika 10. Strukture alkaloida roda *Geissospermum* (Lima et al. 2020)

Manzamin A (Slika 11) alkaloid je koji u svojoj složenoj strukturi sadrži β -karbolinski prsten. Izoliran je iz morske spužve *Haliclona spp.* te pokazuju raznolik spektar aktivnosti uključujući citotoksično, antimalarijsko, antivirusno, antibakterijsko i protuupalno djelovanje. Novije studije ukazuju na potencijalni antitumorski učinak u borbi protiv raka gušterače i raka debelog crijeva, no točan mehanizam djelovanja još se istražuje (Lin i sur., 2018).



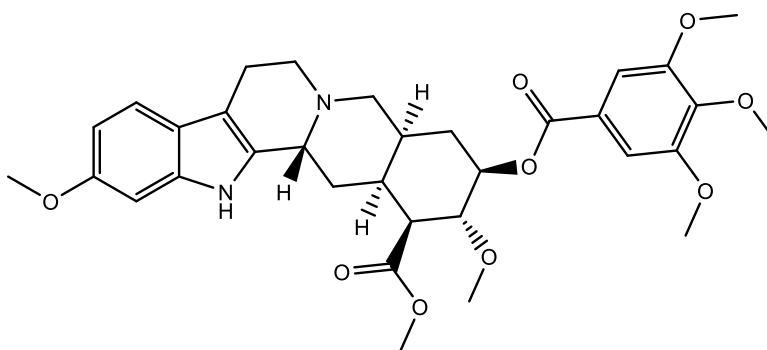
Slika 11. Struktura manzamina A

Tadalafil (Slika 12) je registrirani lijek za erektilnu disfunkciju i benignu hiperplaziju prostate kod muškaraca. Indiciran je i za smanjenje povišenog krvnog tlaka i angine pectoris. Vazodilatatorsko djelovanje bazira se na inhibiciji fosfodiesteraze-5, čime dolazi do povišenja cGMP-a u stanicama. Sintetiziran je po uzoru na sildenafil, no za razliku od njega, tadalafil u svojoj strukturi sadrži tetrahidro-beta-karbolinski prsten spojen s piperidinom (Galiè i sur., 2009).



Slika 12. Struktura tadalafila

Reserpin (Slika 13) je alkaloid izoliran iz vrste *Rauwolfia spp.* Koristio se kao prva linija u smanjenju povišenog krvnog tlaka još od 1940-ih, a zbog popratnog sedativnog učinka koristio se i u terapiji shizofrenije kao neuroleptik. Danas se više ne koristi kao monoterapija, no postoji registrirani lijek u kombinaciji s hidroklorotiazidom, i hidralazinom, indiciran kao antihipertenziv. Znanstvenici i dalje rade na istraživanju novih terapijskih mogućnosti (Shamon i Perez, 2009).

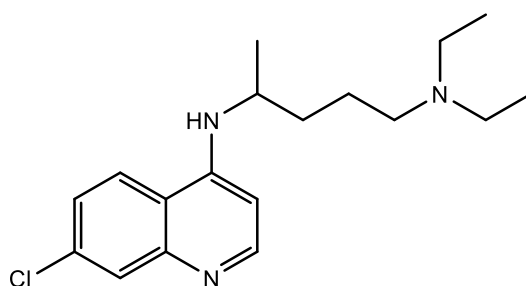


Slika 13. Struktura reserpina

1.3. Klorokin

1.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva

Klorokin (Slika 14) pripada skupini 4-aminokinolina s antimalarijskim i protuupalnim djelovanjem te potencijalnom ulogom kemoreceptora u dijagnostici. Spoj se u prirodi nalazi kao bijelo-žuti prah, bez mirisa, gorkog okusa te povećane osjetljivosti na svjetlost. Naziv po IUPAC-u glasi 4-*N*-(7-klorokinolin-4-il)-1-*N*,1-*N*-dietilpentan-1,4-diamin. Slabo je topljiv u vodi, a dobro topljiv u organskim otapalima kloroformu i eteru. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva nalaze se u Tablici 3 (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).



Slika 14. Struktura klorokina

Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva klorokina

Molekulska formula	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃
Relativna molekulska masa	319,9
Temperatura tališta (°C)	87,0-89,5
log <i>P</i>	4,63

1.3.2. Mehanizam djelovanja

Iako mehanizam djelovanja klorokina nije u potpunosti razjašnjen, poznato je da inhibira hem-polimerazu, enzim plazmodija odgovoran za pretvorbu hemoglobina domaćina u hemozoin. Hemoglobin je toksičan za parazita, jer se u eritrocitima razgrađuje na hem koji narušava membranu plazmodija i potiče peroksidaciju lipida. Stoga, plazmodij pomoću hem-polimeraze pretvara hemoglobin u netoksični hemozoin ili pigment malarije, koji parazitu služi i kao izvor energije. Klorokin inhibicijom enzima potiče nakupljanje toksičnog hemoglobina u eritrocitima te uzrokuje smrt plazmodija (Slater, 1993).

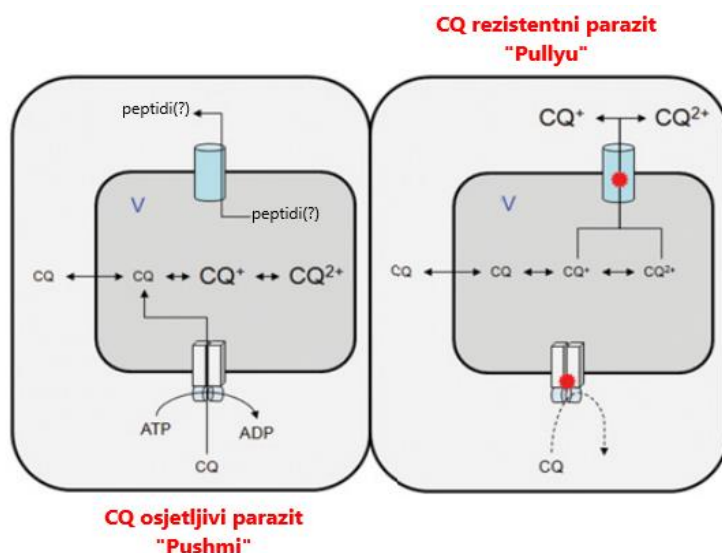
1.3.3. Nuspojave

Lijek se uzima peroralno, preventivno 1-2 tjedna prije, tijekom i 4-8 tjedana nakon boravka u rizičnim područjima. Česte nuspojave su mučnina, glavobolja, vrtoglavica, grčevi i dijareja. Rijetko se javljaju bradikardija, promjene raspoloženja, anksioznost, slabost mišića, te hipoglikemija koja se očituje kao znojenje i drhtavica. Kao najozbiljnija nuspojava navode se razna oštećenja oka (www.webmd.com). Ukoliko se ne poštuju propisane doze, te se uzima previsoka koncentracija lijeka, može nastupiti retinopatija (zamagljen vid, djelomični gubitak centralnog i perifernog vida te potpuni gubitak vida), naslage rožnice, neprozirnost subkapsularne leće, gubitak makularnog pigmenta i sl. (Michaelides i sur. 2011).

1.3.4. Rezistencija

U posljednjim godinama povećana je incidencija rezistencije *P. falciparum* na postojeće lijekove među kojima su u prvom planu klorokin (CQ) i kinin. Jednim od najznačajnijih objašnjenja mehanizma nastanka rezistencije smatra se smanjena akumulacija lijeka, naziva „pushmi-pullyu“. Glavni sudionici tog mehanizma su P-glikoprotein homolog 1 (P-gh1), *Plasmodium falciparum* klorokin-rezistentni transporter (*PfCRT*) te proteini koji se nalaze na vakuolarnim stijenkama. Kod parazita osjetljivih na klorokin, P-gh1 (pushmi) omogućava prijenos klorokina ovisnom o ATP-u unutar probavne vakuole, dok nenabijeni klorokin ulazi difuzijom. U kiseloj probavnoj vakuoli klorokin se protonira i ostaje zarobljen unutar lumena. *PfCRT* u ovom slučaju nema značajni učinak na akumulaciju klorokina, već posreduje u istjecanju peptida iz vakuole. Kod rezistentnog parazita, mutacije P-gh1 spriječavaju transport klorokina u vakuolu. Suprotno tome, mutacije *PfCRT* (pullyu) omogućuju proteinu izbacivanje klorokina iz vakuole (Slika 15). *P. falciparum* na taj način koordinira prisustvo toksičnog lijeka te kroz prilagodljive mutacije osigurava preživljavanje (Skrzypek i Callaghan, 2017).

Druga pretpostavka mehanizma rezistencije obuhvaćala je povećanje vakuolarnog pH tako da se smanji protonski gradijent odgovoran za koncentraciju lijeka koji je po strukturi slaba baza. Rezultati novijih istraživanja pokazali su da nema značajne razlike u kiselosti vakuole između rezistentnih i osjetljivih plazmodija, te se time vakuolarni pH isključuje kao mehanizam rezistencije (Hayward i sur., 2006).



Slika 15. Mehanizam rezistencije *P. falciparum* na klorokin (preuzeto i prilagođeno iz Skrzypek i Callaghan, 2017)

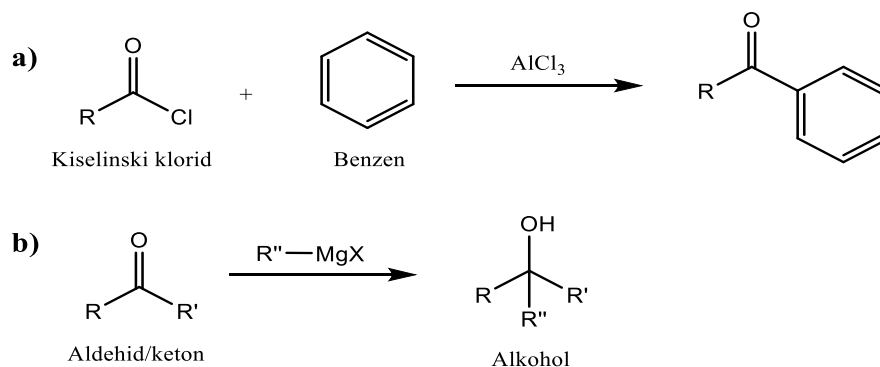
1.4. Coupling-reakcije

1.4.1. Uvod u reakcije

Amidne veze, osim što su ključne u sintezi proteina, osnovna su poveznica u strukturi često korištenih sintetičkih polimera. Omiljena svojstva amida, poput visoke polarnosti, stabilnosti i konformacijske raznolikosti, čine ga jednim od najpopularnijih i najpouzdanijih funkcionalnih skupina u svim granama organske kemije. Iako su kemijske reakcije za njihov nastanak među najčešće korištenima u sintezama, često dolazi do otežanog formiranja produkta. Stoga trenutne metode sinteze amida, iako izgledaju kao jednostavne reakcije, mogu biti skupe i rasipne. *American Chemical Society Green Chemistry Institute*, čiji su članovi glavne farmaceutske industrije diljem svijeta, 2007. godine izglasalo je „stvaranje amida izbjegavajući lošu ekonomičnost atoma reagensa“ kao glavni izazov u organskoj kemiji. Pitanja otpada i troškova povezanih s amidnom sintezom posebno su velika kada se primjenjuju na sinteze peptida te su razlog visokih cijena sintetski dobivenih peptida koji se koriste u terapiji. Sve to znanstvenike potiče na istraživanje novih, poboljšanih metoda za sinteze kemijskih spojeva, posebice amidnih veza (Pattabiraman i Bode, 2011).

Coupling-reakcije su reakcije u kojima se dvije molekulske jedinice povezuju u treću, veću molekulu. Jako često su korištene jer njima nastaju mnoge funkcionalne skupine poput etera, amina, imina, estera, amida i 1,2-amino alkohola. Zaslužne su za stvaranje C-N, C-O i

C-C veza, te u nekim slučajevima i N-S, O-S i S-C veza. Neke od najkorištenijih reakcija su Friedel-Craftsova alkilacija i acilacija za supstituiranje benzenskog prstena, te Grignardova reakcija kojom se iz aldehida ili ketona dobije alkohol (Slika 16).



Slika 16. a) Friedel-Craftsova acilacija; b) Grignardova reakcija

Osnovni razlozi za korištenje *coupling*-reakcija su:

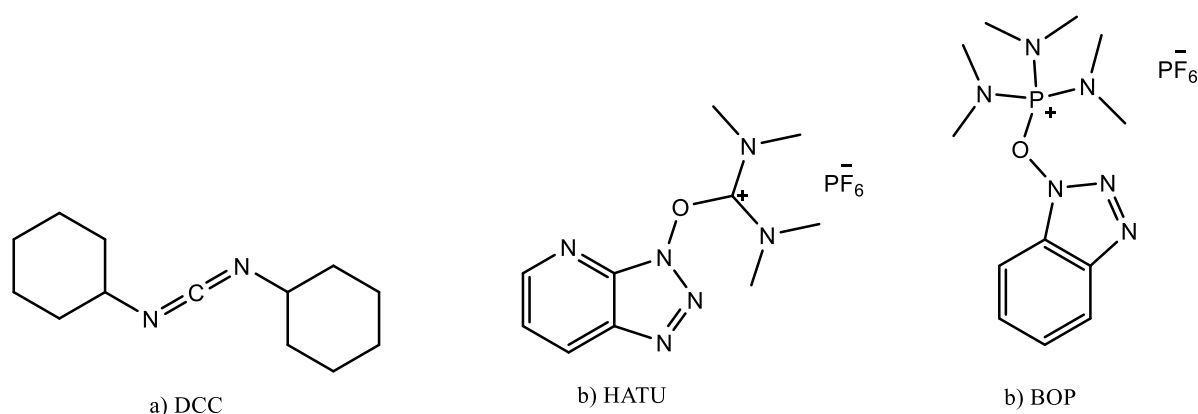
- Uvođenje nove funkcionalne skupine (engl. *functionalization*)
- Skidanje postojeće funkcionalne skupine (engl. *FG removal*)
- Pretvorba i aktivacija postojeće funkcionalne skupine (engl. *FG activation*)
- Uvođenje/skidanje zaštitne skupine (engl. *protection/deprotection*)
- Transformacija funkcionalne skupine (engl. *FGT*) (Patrick, 2014).

1.4.2. Stvaranje amidne veze N-C *coupling*-reakcijama

Amidna skupina često je prisutna u mnogim lijekovima i iz tog je razloga u farmaceutskoj industriji sinteza amidne veze itekako česta reakcija. Amidna veza nastaje *coupling*-reakcijama u kojoj jedna molekula sadrži amin, dok druga sadrži funkcionalnu skupinu u obliku karboksilne kiseline, kiselinskog klorida, anhidrida ili estera, a provodi se uz korištenje *coupling*-reagensa.

Na primjeru sinteze paracetamola iz 4-aminofenola, amidna veza stvara se reakcijom nukleofilnijeg amina s kiselinskim anhidridom. Dobivanje amida moguće je i reakcijom amina i estera u prisutstvu baze koja učini amin nukleofilnim supstratom oduzimajući mu vodik. Primjer takve reakcije je sinteza lokalnog anestetika mepivakaina. Sljedeći način dobivanja amida je reakcija kiselinskog klorida i amina na primjeru antiaritmika acetilprokainamida i prokainamida (Patrick, 2014).

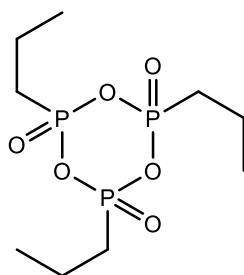
Direktna reakcija amina s karboksilnom kiselinom često rezultira nastajanjem soli. Iz tog razloga, karboksilnu kiselinu treba aktivirati, tj. povećati joj elektrofilnost, prevođenjem u kiselinski klorid, anhidrid ili ester pomoću *coupling*-reagensa. Najpoznatija metoda kondenzacije je uz dicikloheksilkarbodiimid (DCC), koji se koristi sam ili uz dodatak hidroksibenzotriola (HOBt). DCC sadrži dva dušika, te je slaba baza, stoga u reakciji s karboksilnom kiselinom tvori *O*-acil izoureu koja s HOBt stvara aktivni ester te on s amino skupinom izgrađuje amid (Patrick, 2014). Neki od nedostataka ove metode su iritativna i toksična svojstva DCC, te eksplozivnost HOBt. Danas postoji mnogo *coupling*-reagensa (Slika 17) koji su zamijenili karbodiimide. Primjerice aminijevi reagensi čiji je glavni predstavnik HATU (1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinij 3-oksidi heksafluorofosfat), fosfonijeve soli koje predstavlja BOP ((benzotriazol-1-iloksi)tri(dimetilamino)-fosfonij heksafluorofosfat), derivati fosfonske kiseline gdje se najčešće koristi T3P (anhidrid propanfosfonske kiseline) i mnogi drugi (El-Faham i Albericio, 2011).



Slika 17. Strukture *coupling*-reagensa

Anhidrid propanfosfonske kiseline T3P (Slika 18) komercijalno je dostupan reagens koji se pokazao korisnim za izravnu tvorbu amida iz komponenata karboksilne kiseline i amina. Sinteza se u ovom slučaju sastoji od 2 ključna koraka. U reakciji s karboksilnom kiselinom dolazi do otvaranja prstena cikličkog anhidrida te nastaje odgovarajući miješani anhidrid trifosfonske kiseline. U sljedećem koraku dolaskom amina, odvaja se propanfosfonska kiselina te nastaje amid. Utvrđeno je da T3P kao *coupling*-reagens u odnosu na DCC i druge ima bolja fizičko-kemijska svojstva, zahvaljujući dobroj topljivosti, stabilnosti, dugom roku trajanja i niskoj osjetljivosti na racemizaciju. T3P nudi veliku pomoć u minimaliziranju vremena i novaca utrošenih na organske sinteze, kao i smanjenju otrovnog

otpada zahvaljujući ekološki prihvatljivim svojstvima, lakoj dostupnosti i jednostavnim uvjetima reakcije i obrade (Waghmare i sur., 2014).



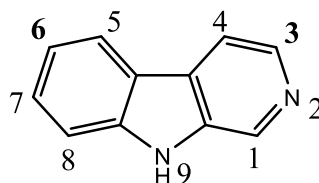
Slika 18. Struktura anhidrida propanfosfonske kiseline T3P

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Veliki izazov u prevenciji i liječenju malarije predstavlja porast rezistencije na antimalarijske lijekove. Danas se kao lijek prvog izbora koristi kombinacija derivata artemisinina. Iako djeluje na rezistentne sojeve plazmodija, istraživanja ukazuju na porast rezistencije i na terapiju temeljenu na artemisininu (Dondorp i sur., 2009; Suresh i Halder, 2018). Zbog svega navedenog, teži se pronaći molekule s novim mehanizmima koje će biti učinkovite, sigurne i prihvatljive širokoj populaciji.

Harmicini su hibridi harmina i cimetne kiseline povezani triazolnim prstenom ili amidnom vezom. U *in vitro* ispitivanjima pokazali su značajno antimalarijsko djelovanje (Perković i sur., 2020; Marinović i sur., 2020). Na temelju tih istraživanja, dizajnirani su novi hibridi β -karbolinske strukture, koji umjesto derivata cimetne kiseline povezuju kinolinski fragment srodan antimalariku klorokinu, s harminom preko amidne poveznice. Kako bi se provjerio utjecaj trodimenzionalne strukture ovih spojeva na antimalarijsko djelovanje, za derivatizaciju su odabrani položaji 3 i 6 β -karbolinskog prstena (Slika 19). Povezivanje ovih fragmenata u jednu molekulu moglo bi dovesti do pojačanog antimalarijskog djelovanja.

U daljnim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, ispitat će se biološko djelovanje pripremljenih spojeva.



Slika 19. Numeracija β -karbolinskog prstena

3. MATERIJALI I METODE

Tijek kemijskih reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za tankoslojnu kromatografiju kao nepokretna faza upotrijebljene su silikagel ploče 60F-254 (Merck, Njemačka), a diklormetan/metanol (8,5:1,5, 10:1 i 8:1) te cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) kao pokretne faze. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063 - 0,200 mm (Sigma Aldrich, SAD) uz iste pokretne faze kao u tankoslojnoj kromatografiji. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem (λ =254 i 366 nm) te parama joda.

Tališta (t_r) su određena na Stuart SMP3 instrumentu (Barloworld Scientific, UK) u otvorenim kapilarama i nisu korigirana.

IR spektri snimljeni su na Paragon FT-IR spektrometru (Perkin Elmer, UK). ^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-400 (Bruker, SAD) kod 400 MHz za ^1H , odnosno kod 101 MHz za ^{13}C . Uzorci su mjereni u DMSO- d_6 otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci dani su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard u ^1H , odnosno dimetilsulfoksid (DMSO) u ^{13}C spektru. Maseni spektri snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420). Kao tehnika ionizacije korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom i negativnom modu.

Za reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem korišten je mikrovalni reaktor CEM discover reactor (CEM GmbH, Njemačka).

U svrhu predviđanja fizikalno-kemijskih svojstava poželjnih za ljekovite tvari korišteni su računalni programi SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, Švicarska) i Chemicalize (ChemAxon, SAD).

Trietilamin, anhidrid propanfosfonske kiseline (T3P), acetaldehid-dimetil-acetal, litijev karbonat, paladij na ugljiku, octena kiselina, 2-(*tert*-butoksikarbonilamin)etil bromid (BocNH(CH₂)₂Br), litij aluminijev hidrid, DBU, klorovodična kiselina, 4,7-diklorkinolin i fenol nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD). Cezijev karbonat, *N,N*-dimetilformamid, 5-metoksitriptamin, ADMP, metilni ester triptofana i TBAHS nabavljeni su od tvrtke TCI Chemicals (Japan). Trifluorooctena kiselina i diklormetan nabavljeni su od tvrtke Thermo Fischer Scientific (SAD), apsolutni etanol, metanol i petrol-eter od tvrtke Honeywell (SAD), dietil-eter od tvrtke ITW Reagents (Njemačka), tetrahidrofuran, i bromovodična kiselina od

tvrtke Merck (Njemačka), acetonitril od tvrtke CARLO EREBA Reagents (Francuska), a glicin i natrijev karbonat nabavljeni su od tvrtke Kemika (Hrvatska).

Spojevi **1a**, **1b**, **2a**, **2b** i **3** sintetizirani su prema prilagođenim ranije objavljenim propisima (Devi i sur., 2016; Eagon i Anderson, 2014; Starčević i sur., 2012).

3.1. Sinteza amina u položaju 3 β -karbolinskog prstena

3.1.1. Sinteza metil-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-3-karboksilata (1a) (Eagon i Anderson, 2014)

U suspenziju metilnog estera triptofana hidroklorida (1,000 g, 3,926 mmol) u diklormetanu (5 mL) dodani su acetaldehid-dimetil-acetal (0,525 mL, 0,424 g, 4,711 mmol) i otopina TFA u H₂O (0,583 mL, 7,852 mmol, u 2 mL H₂O). Nastala emulzija miješana je 18 h na s.t. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je izlivena u 50 mL 10 %-tne vodene otopine natrijevog hidrogenkarbonata. Smjesa je zakiseljena do pH 7,5 korištenjem 1 %-tne klorovodične kiseline te ekstrahirana diklormetanom (3 $\times$ 50 mL). Organski slojevi su sakupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani te upareni pod sniženim tlakom. Sirovi produkt (žuto ulje) je korišten u idućem reakcijskom koraku bez pročišćavanja. Iskorištenje: 0,732 g (76,3 %)

3.1.2. Sinteza etil-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-3-karboksilata (1b) (Eagon i Anderson, 2014)

Suspenzija spoja **1a** (0,200 g, 0,819 mmol) i 10 % Pd/C (0,045 g) u etanolu (4 mL) miješana je u mikrovalnom reaktoru 25 minuta na 150 °C (75 W). Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu te filtrirana kroz sloj Celita. Filtrat je uparen pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja rastrljan u dietil-eteru. Nastali sirovi talog je filtriran te je dobivena bijela krutina. Iskorištenje: 0,535 g (74,3 %)

3.1.3. Sinteza (1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il)metanola (1c)

Otopini spoja **1b** (0,535 g, 2,227 mmol) u bezvodnom THF-u (10 mL) dodan je litijev aluminijev hidrid (0,127 g, 3,341 mmol) u malim oborcima. Reakcijska smjesa miješana je 30 minuta na s.t. nakon čega je dodana voda (10 mL). Smjesa je ekstrahirana etil-acetatom (3 $\times$ 50 mL) pri pH $\approx$ 9. Organski slojevi su sakupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom,

filtrirani te upareni pod sniženim tlakom. Ostatak nakon uparavanja rastrljan je u dietil-eteru te je dobiven bijeli talog spoja **1c**.

Iskorištenje: 0,341 g (72,2 %)

$t_f = 195\text{--}196\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI-MS (m/z) 213,2 ($M+1$)⁺

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3246, 3130, 3102, 2830, 2364, 1628, 1566, 1498, 1454, 1364, 1330, 1246, 1144, 1076, 990, 906, 872, 834, 748, 630

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11,46 (s, 1H, 10), 8,19 (d, 1H, 3, $J = 7,8$ Hz), 7,96 (s, 1H, 6), 7,58 (dt, 1H, 12, $J = 8,3, 1,0$ Hz), 7,49-7,53 (m, 1H, 1), 7,19-7,23 (m, 1H, 2), 5,30 (t, 1H, 15, $J = 5,8$ Hz) 4,69 (d, 2H, 14, $J = 5,6$ Hz), 2,75 (s, 3H, 13)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 149,84 (11), 140,78 (8), 140,70 (7), 133,41 (9), 127,70 (5), 127,66 (1), 121,62 (3), 121,21 (4), 119,03 (2), 111,87 (12), 108,77 (6), 64,60 (14), 20,29 (13)

3.1.4. Sinteza 3-(azidometil)-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indola (**1d**)

Otopini alkohola **1c** (0,515 g, 2,426 mmol) u bezvodnom THF-u (10 mL) na 0 °C dodani su ADMP (1,728 g, 6,063 mmol) i DBU (1,125 mL, 1,145 g, 7,520 mmol). Reakcija je miješana 30 minuta na 0°C, a potom prekinuta dodatkom zasićene vodene otopine amonijevog klorida (30 mL) te je smjesa ekstrahirana diklormetanom (2 × 50 mL). Organski slojevi su sakupljeni i ekstrahirani zasićenom vodenom otopinom NaCl (2 × 100 mL), sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) te je dobiveno smeđe ulje **1d**.

Iskorištenje: 0,387 g (67,2 %)

t_f (ulje)

ESI-MS (m/z) raspad.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11,66 (s, 1H, 10), 8,20 (d, 1H, 3, $J = 7,8$ Hz), 8,00 (s, 1H, 6), 7,61 (dt, 1H, 12, $J = 8,2, 1,0$ Hz), 7,51-7,55 (m, 1H, 1), 7,26-7,23 (m, 1H, 2), 4,57 (s, 2H, 14), 2,78 (s, 3H, 13)

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 143,23 (7), 142,12 (11), 140,74 (8), 133,94 (9), 128,02 (1), 127,56 (5), 121,74 (3), 121,00 (4), 119,39 (2), 112,07 (12), 111,72 (6), 55,30 (14), 20,41 (13)

3.1.5. Sinteza (1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il)metanamina (1e)

Suspencija azida **1d** (0,180 g, 0,759 mmol) i 10 % Pd/C (0,036 g) u metanolu (5 mL) miješana je na s.t. pod atmosferom vodika 1 sat. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je filtrirana kroz sloj Celita, a filtrat uparen pod sniženim tlakom. Dobiveno prozirno ulje rastrljano je u smjesi dietil-etera i petrol-etera te je nastao prljavo-bijeli talog **1e**.

Iskorištenje: 0,115 g (71,8 %)

$t_{\text{f}} = 177,5\text{--}179,0$ °C

ESI-MS (m/z) 209,9 ($\text{M}-1$) $^-$

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3338, 3239, 3130, 3057, 2978, 2940, 2914, 2882, 2850, 2783, 2737, 2690, 2637, 1626, 1606, 1566, 1503, 1453, 1401, 1374, 1344, 1317, 1284, 1250, 1176, 1147, 1103, 1083, 1009, 970, 945, 891, 838, 813, 775, 734, 643, 588, 545

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11,43 (s, 1H, 10), 8,16 (d, 1H, 3, $J = 7,6$ Hz), 7,92 (s, 1H, 6), 7,57-7,47 (m, 2H, 1, 12), 7,21 (t, 1H, 2, $J = 7,4$ Hz), 3,90 (s, 2H, 14), 2,75 (s, 3H, 13)

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 151,12 (7), 140,89 (11), 140,74 (8), 133,28 (9), 127,76 (5), 127,62 (3), 121,53 (1), 121,19 (4), 118,97 (2), 111,88 (12), 109,01 (6), 47,59 (14), 20,38 (13)

3.2. Sinteza amina u položaju 6 β -karbolinskog prstena

3.2.1. Sinteza 6-metoksi-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-ijevog trifluoroacetata (**2a**) (Eagon i Anderson, 2014)

U otopinu 5-metoksitriptamina (0,200 g, 1,051 mmol) u acetonitrilu (4,5 mL) dodani su acetaldehid-dimetil-acetal (0,234 mL, 0,189 g, 2,102 mmol) i TFA (0,161 mL, 0,239 g, 2,102 mmol). Reakcijska smjesa miješana je u mikrovalnom reaktoru 10 minuta na 110 °C (150 W). Po završetku reakcije, smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu te je dodan dietil-eter (40 mL). Nastali talog je odsisan i ispran dietil-eterom (2 × 10 mL). Dobivena je svijetlo smeđa krutina koja je iskorištena u sljedećem reakcijskom koraku bez pročišćavanja.

Iskorištenje: 0,236 g (67,6 %)

3.2.2. Sinteza 6-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indola (**2b**) (Eagon i Anderson, 2014)

Suspenzija spoja **2a** (0,200 g, 0,602 mmol), litijevog karbonata (0,089 g, 1,204 mmol) i 10% Pd/C (0,023 g) u etanolu (3,5 mL) miješana je u mikrovalnom reaktoru 25 minuta na 150 °C (75 W). Po završetku reakcije, reakcijska smjesa ohlađena je na sobnu temperaturu i filtrirana kroz sloj Celita. Filtrat je uparen na sniženom tlaku te rastrljan u 20 % vodenoj otopini natrijevog klorida. Dobiveni spoj je prekristaliziran iz dietil-etera te je dobiven prljavo-bijeli talog spoja **2b**.

Iskorištenje: 0,286 g (37,3 %)

3.2.3. Sinteza 1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-ola (**2c**)

Smjesa spoja **2b** (0,100 g, 0,471 mmol), octene kiseline (1,2 mL) i 47% bromovodične kiseline (0,6 mL) miješana je u mikrovalnom reaktoru tijekom 25 minuta na 140 °C (75W). Po završetku reakcije, smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu te ekstrahirana etil-acetatom (3 × 100 mL) pri pH $\approx$ 9. Organski slojevi su sakupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani te upareni pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (8,5:1,5). Rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petrol-etera dobiven je žuti talog **2c**.

Iskorištenje: 0,080 g (86,0 %)

$t_f = 213$ °C (raspad)

ESI-MS (m/z) 199,9 ($M+1$)⁺

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3796, 3728, 3676, 3380, 3062, 3026, 2924, 2850, 2680, 2602, 2506, 2364, 2330, 1878, 1848, 1762, 1734, 1640, 1576, 1516, 1458, 1428, 1376, 1296, 1264, 1192, 1128, 1030, 982, 952, 866, 806, 702, 622, 594

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11,28 (s, 1H, 10), 9,15 (s, 1H, 14), 8,12 (d, 1H, 7, $J = 5,4$ Hz), 7,82 (d, 1H, 6, $J = 5,4$ Hz), 7,48 (d, 1H, 3, $J = 2,4$ Hz), 7,42 (d, 1H, 12, $J = 8,7$ Hz), 7,07 (dd, 1H, 1, $J = 8,8, 2,4$ Hz), 2,73 (s, 3H, 13)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 150,87 (2), 141,84 (8), 136,31(7), 135,06 (11), 134,58 (9), 126,64 (4), 121,66 (5), 118,05 (6), 112,68 (1), 112,47 (12), 105,62 (3), 20,22 (13)

3.2.4. Sinteza *tert*-butil(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil)karbamata (2d)

Otopini spoja **2c** (0,288 g, 1,453 mmol) u bezvodnom DMF-u (2 mL) dodan je cezijev karbonat (1,325 g, 4,068 mmol) i TBAHS (0,395 g, 1,162 mmol) te je miješano na sobnoj temperaturi pod atmosferom argona 20 minuta. Zatim su dodani 2-(*tert*-butoksikarbonilamin)etil bromid (1,302 g, 5,812 mmol) i bezvodni DMF (2 mL) te je smjesa miješana na s.t. pod atmosferom argona 48 sati. Potom je reakcijska smjesa ekstrahirana etil-acetatom (4 × 40 mL). Organski slojevi su sakupljeni i isprani destiliranom vodom (3 × 30 mL), sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (8:1) dobivena je smeđa smola **2d**.

Iskorištenje: 0,311 g (62,7 %)

t_r (ulje)

ESI-MS (m/z) 340,1 ($M-1$)⁻

IR (ATR, ν/cm^{-1}) ulje.

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) 11,42 (s, 1H, 10), 8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 7,92 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,77 (d, 1H, 3, $J = 1,7$ Hz), 7,51 (d, 1H, 12, $J = 8,8$ Hz), 7,18 (dd,

^1H , 1, $J = 8,8$, 2,3 Hz), 7,06 (t, 1H, 3', $J = 5,0$ Hz), 4,05 (t, 2H, 1', $J = 5,8$ Hz), 3,39-3,34 (m, 2H, 2'), 2,75 (s, 3H, 13), 1,40 (s, 9H, 6', 7', 8')

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 155,73 (4'), 152,39 (2), 142,04 (8), 136,56 (7), 135,41 (11), 135,03 (9), 126,88 (4), 121,35 (5), 118,42 (6), 112,78 (1), 112,75 (12), 104,67 (3), 77,76 (5'), 67,19 (1'), 39,61 (2'), 28,24 (6', 7', 8'), 20,23 (13)

3.2.5. Sinteza 2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-il)oksi)etan-1-amina (2e)

Otopini **2d** (0,290 g, 0,849 mmol) u metanolu (6 mL) dodana je 4M klorovodična kiselina (2,123 mL, 8,490 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na s.t. preko noći. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa uparena je pod sniženim tlakom, a ostatku nakon uparavanja dodana je destilirana voda (15 mL). Dodatkom 5% natrijevog hidroksida do pH $\approx$ 8 stvoren je prljavo bijeli talog koji je filtriran te ispran dietil-eterom (2 $\times$ 10 mL).

Iskorištenje: 0,209 g (102 %)

$t_f = 170,5\text{--}172,0$ °C

ESI-MS (m/z) 242,2 ($M+1$)⁺

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3645, 3359, 3241, 3065, 2925, 2869, 1605, 1581, 1566, 1478, 1500, 1458, 1401, 1288, 1234, 1211, 1126, 1071, 1059, 992, 905, 884, 847, 825, 816, 741, 703, 632

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11,36 (s, 1H, 10), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 7,90 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,74 (d, 1H, 3, $J = 2,3$ Hz), 7,50 (d, 1H, 12, $J = 8,8$ Hz), 7,19 (dd, 1H, 1, $J = 8,8$, 2,5 Hz), 4,02 (t, 2H, 1', $J = 5,8$ Hz), 2,94 (t, 2H, 2', $J = 5,7$ Hz), 2,74 (s, 3H, 13)

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 152,47 (2), 141,87 (8), 136,69 (7), 135,18 (11), 134,93 (9), 126,54 (4), 121,29 (5), 117,98 (6), 112,34 (1), 112,18 (11), 104,86 (3), 71,06 (1'), 40,87 (2'), 19,97 (13)

3.3. Sinteza (7-klorokinolin-4-il)glicina (3) (Starčević i sur., 2012)

4,7-diklorokinolin (1,000 g, 5,049 mmol), glicin (0,758 g, 10,098 mmol) i fenol (2,737 g, 29,082 mmol) refluksirani su 18 sati na 120 °C. Potom je u reakcijsku smjesu dodan još jedan

obrok glicina (0,379 g, 5,049 mmol) te je nastavljeno refluksiranje tijekom 3 sata. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu te je dodan etil-acetat (20 mL). Nastali talog je filtriran te otopljen u 10 %-tnoj vodenoj otopini natrijevog hidrogenkarbonata (50 mL) uz zagrijavanje. Otopina je ohlađena na sobnu temperaturu te ekstrahirana tolueonom (2×50 mL). Vodenom sloju je pH podešen do 5,7 te je nastali bijeli talog filtriran.

Iskorištenje: 0,595 g (50,0 %)

3.4. Sinteza amidnih derivata (7-klorokinolin-4-il)glicina i harmina (4a, 4b)

Opća metoda:

Suspencija kiseline **3** (0,050 g, 0,211 mmol), odgovarajućeg harminskog amina **1e** ili **2e** (0,232 mmol) i TEA (0,059 mL, 0,043 g, 0,422 mmol) u DMF-u miješana je na s.t. tijekom 20 minuta nakon čega je postepeno dodan T3P (0,126 mL, 0,067 g, 0,211 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na s.t. 18 h. Po završetku, u reakcijsku smjesu je dodana 5 %-tna vodena otopina NaOH do pH 10. Nastali talog je filtriran i ispran dietil-eterom (3×2 mL). Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (75:25) dobiveni su amidi **4a** i **4b**.

3.4.1. Sinteza 2-((7-klorokinolin-4-il)amino)-N-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il)metil)acetamida (4a)

Količina spoja **1e**: 0,049 g

Iskorištenje: 0,024 g (24,2 %)

$t_f = 274,5\text{--}277,0$ °C

ESI-MS (m/z) 430,1 ($M+1$)⁺

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3616, 3286, 1662, 1629, 1587, 1502, 1453, 1432, 1375, 1328, 1234, 1150, 1083, 1014, 902, 852, 801, 737

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11,48 (s, 1H, 10), 8,71 (t, 1H, 2', $J = 5,9$ Hz), 8,45 (d, 1H, 8', $J = 5,4$ Hz), 8,30 (d, 1H, 13', $J = 9,0$ Hz), 8,05 (d, 1H, 3, $J = 7,8$ Hz), 7,89-7,81 (m, 2H, 5', 10'), 7,71 (s, 1H, 6), 7,60-7,46 (m, 3H, 1, 12, 12'), 7,28-7,16 (m, 1H, 2), 6,47

(d, 1H, 7', $J = 5,5$ Hz), 4,52 (d, 2H, 1', $J = 5,8$ Hz), 4,07 (d, 2H, 4', $J = 6,0$ Hz), 2,70 (s, 3H, 13)

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 168,98 (3'), 151,79 (8'), 150,26 (6'), 148,97 (9'), 146,08 (7), 141,11 (8), 140,73 (11), 133,51 (9), 133,45 (11'), 127,82 (10'), 127,65 (5), 127,46 (13'), 124,32 (1), 121,46 (12'), 120,94 (4), 119,13 (3), 117,63 (14'), 111,95 (2), 109,34 (12), 99,28 (6), 48,60 (7'), 46,01 (4'), 44,21 (1'), 20,24 (13')

3.4.2. Sinteza 2-((7-klorokinolin-4-il)amin)-N-(2-((1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)etil)acetamida (4b)

Količina spoja **2e**: 0,056 g

Iskorištenje: 0,028 g (26,2 %)

$t_{\text{f}} = 304,0\text{--}307,0^\circ\text{C}$

ESI-MS (m/z) 460,1 ($\text{M}+1$)⁺

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3525, 3369, 3219, 3145, 3054, 2874, 1679, 1581, 1530, 1505, 1485, 1452, 1372, 1334, 1287, 1240, 1213, 1115, 1075, 990, 877, 854, 810, 793, 629, 614, 488, 467

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11,41 (s, 1H, 10), 8,41 (t, 1H, 3', $J = 5,7$ Hz), 8,29 (d, 1H, 9', $J = 5,4$ Hz), 8,27 (d, 1H, 14', $J = 9,1$ Hz), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,82 (t, 1H, 6', $J = 6,4$ Hz), 7,81 (d, 1H, 11', $J = 2,3$ Hz), 7,73 (d, 1H, 3, $J = 2,5$ Hz), 7,51-7,48 (d, 1H, 12, $J = 8,8$ Hz), 7,15 (dd, 1H, 13', $J = 9,0, 2,3$ Hz), 7,15 (dd, 1H, 1, $J = 8,8, 2,5$ Hz), 6,31 (d, 1H, 8', $J = 5,4$ Hz), 4,10 (t, 2H, 1', $J = 5,6$ Hz), 3,98 (d, 2H, 5', $J = 5,9$ Hz), 3,54 (q, 2H, 2', $J = 5,6$ Hz), 2,74 (s, 3H, 13)

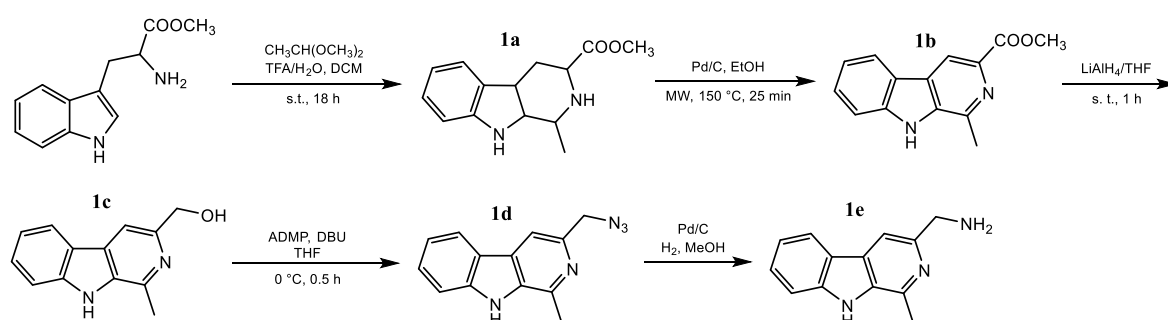
^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 169,20 (4'), 152,29 (2), 151,80 (9'), 150,21 (7'), 148,94 (10'), 142,20 (8), 136,93 (7), 135,34 (11), 135,08 (9), 133,43 (12'), 127,48 (11'), 126,67 (4), 124,28 (14'), 124,23 (13'), 121,38 (5), 118,20 (1), 117,58 (15'), 112,72 (6), 112,67 (12), 104,77 (3), 99,14 (8'), 66,99 (1'), 45,81 (5'), 38,49 (2'), 20,42 (13)

4. REZULTATI I RASPRAVA

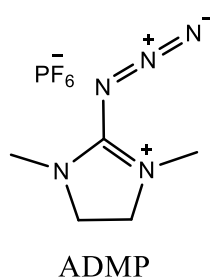
4.1. Sinteze spojeva

Priprava amina u položajima 3 i 6 β -karbolinskog prstena polazi od komercijalno dostupnih metilnog estera triptofana i 5-metoksitriptamina. U prvom koraku Pictet-Spenglerovom kondenzacijom spomenutih amina i acetaldehida-dimetil-acetala, uz TFA kao katalizator, dolazi do zatvaranja šesteročlanog prstena. Dobiveni tetrahidro- β -karbolini **1a** i **2a** se u idućem koraku oksidiraju (aromatiziraju) uz 10 % Pd/C u etanolu do odgovarajućih β -karbolina supstituiranih esterskom skupinom u položaju 3 (**1b**), odnosno eterom u položaju 6 (**2b**).

Ester **1b** se reducira uz litij aluminijev hidrid u THF-u u alkohol **1c**. U sljedećem koraku se alkohol prevodi u azid uz reagens ADMP (donor azidne skupine, Slika 20), a reakcije su izvođene pri temperaturi od 0°C. Reakciji pogoduju bazični uvjeti, zbog čega je reakcijskoj smjesi dodana baza DBU. Redukcijom azida u prisutstvu vodika nastaje amin **1e**.



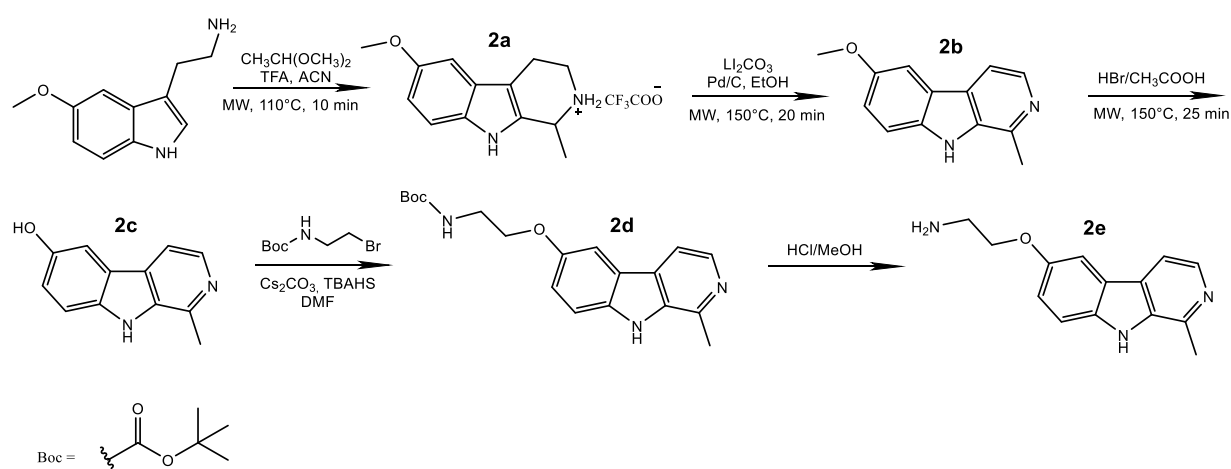
Shema 1. Sinteza amina u položaju 3 β -karbolina



Slika 20. 2-azido-1,3-dimetilimidazolin heksafluorofosfat (ADMP)

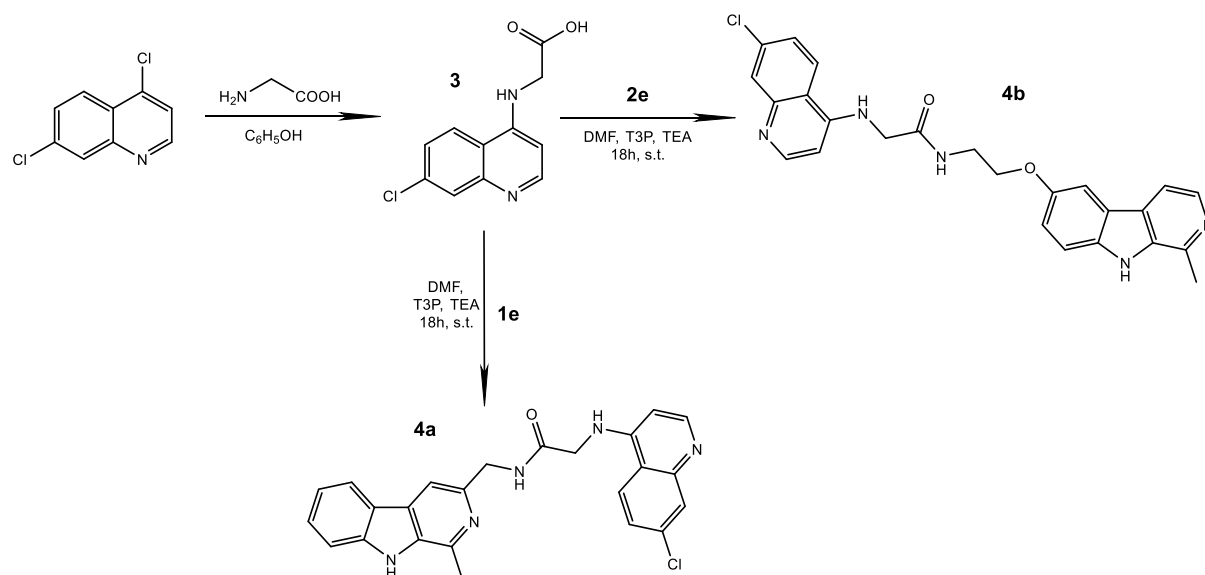
Eter **2b** je kiselim hidrolizom (smjesa octene i bromovodične kiseline) preveden u fenol **2c**. U idućoj reakciji dolazi do alkiliranja fenola 2-(*tert*-butoksikarbonilamin)etil bromidom uz bazu cezijeveg karbonata i katalizator faznog prijenosa tetrabutilamonij hidrogen sulfat (TBAHS) (Kameda i sur., 2009) u suhom DMF-u pod atmosferom argona

čime se u strukturu uvodi amin zaštićen Boc-skupinom. U zadnjem koraku dolazi do uklanjanja zaštitne skupine u prisutstvu kloridne kiseline i metanola čime nastaje amin **2e**.



Shema 2. Sinteza amina u položaju 6 β -karbolina

(7-Klorokinolin-4-il)glicin (**3**) sintetiziran je iz komercijalno dostupnih 4,7-diklorokinolina, fenola i glicina reakcijom nukleofilne supstitucije (Starčević i sur., 2012). Karboksilna skupina, zatim, reagira s aminom (**1e** ili **2e**) u prisutstvu bezvodnog DMF-a, *coupling*-reagensa T3P i baze TEA što rezultira nastankom amida (**4a**, **4b**).



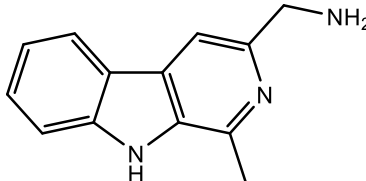
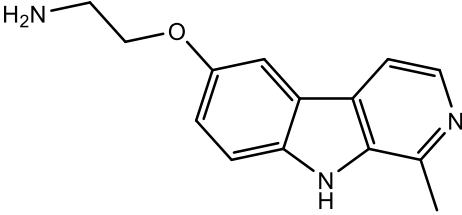
Shema 3. Sinteza hibrida harmina i klorokina amidnog tipa

Tijek svih reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom. Novi spojevi karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C

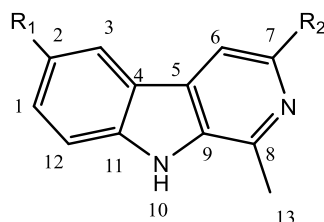
NMR, MS) te je krutinama određeno talište. Prisutnost amidne veze u konačnim produktima (**4a** i **4b**) potvrđena je pojavom pika u ^1H NMR spektru između 8,41-8,71 ppm koji pripada dušiku u amidnoj vezi, te pojavom novog pika u ^{13}C NMR spektru na približno 169 ppm što pripada karbonilnom ugljiku u amidnoj vezi.

Analitički i spektroskopski podaci za sve novo sintetizirane spojeve prikazani su u tablicama 4-7, dok se spektri spojeva nalaze u poglavlju Prilozi.

Tablica 4. Analitički i spektroskopski podaci amina (**1e**, **2e**)

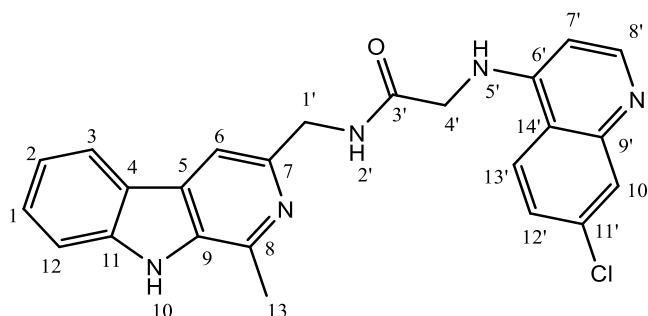
Spoj	1e	2e
Struktura		
Iskorištenje (%)	71,8	100
Molekulska formula (M_r)	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3$ (211,26)	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$ (241,29)
t_f (°C)	177,5-179,0	170,5-172,0
IR (ATR, ν/cm^{-1})	3338, 3239, 3130, 3057, 2978, 2940, 2914, 2882, 2850, 2783, 2737, 2690, 2637, 1626, 1606, 1566, 1503, 1453, 1401, 1374, 1344, 1317, 1284, 1250, 1176, 1147, 1103, 1083, 1009, 970, 945, 891, 838, 813, 775, 734, 643, 588, 545	3645, 3359, 3241, 3065, 2925, 2869, 1605, 1581, 1566, 1478, 1500, 1458, 1401, 1288, 1234, 1211, 1126, 1071, 1059, 992, 905, 884, 847, 825, 816, 741, 703, 632
MS (m/z)	209,9 ($M-1$) ⁻	242,2 ($M+1$) ⁺

Tablica 5. ^1H i ^{13}C NMR spektroskopski podaci amina (**1e**, **2e**)



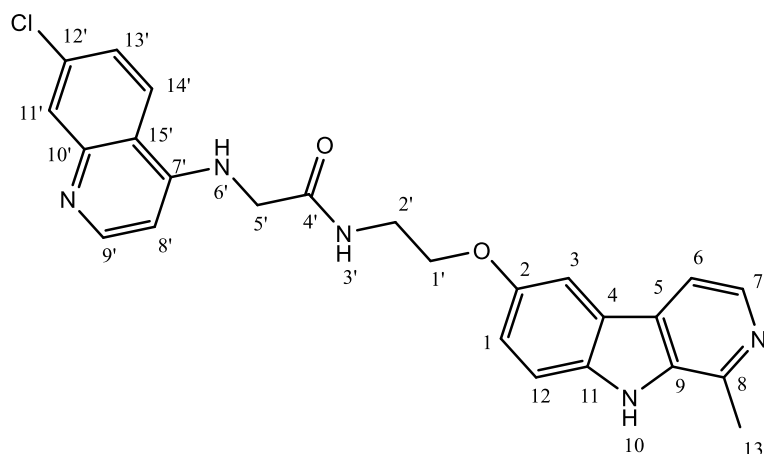
Spoj	1e	2e
R_1	H	
R_2		H
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	11,43 (s, 1H, 10), 8,16 (d, 1H, 3, $J = 7,6$ Hz), 7,92 (s, 1H, 6), 7,57-7,47 (m, 2H, 1, 12), 7,21 (t, 1H, 2, $J = 7,4$ Hz), 3,90 (s, 2H, 14), 2,75 (s, 3H, 13)	11,36 (s, 1H, 10), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 7,90 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,74 (d, 1H, 3, $J = 2,3$ Hz), 7,50 (d, 1H, 12, $J = 8,8$ Hz), 7,19 (dd, 1H, 1, $J = 8,8, 2,5$ Hz), 4,02 (t, 2H, 1', $J = 5,8$ Hz), 2,94 (t, 2H, 2', $J = 5,7$ Hz), 2,74 (s, 3H, 13)
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)	151,12 (7), 140,89 (11), 140,74 (8), 133,28 (9), 127,76 (5), 127,62 (3), 121,53 (1), 121,19 (4), 118,97 (2), 111,88 (12), 109,01 (6), 47,59 (14), 20,38 (13)	152,47 (2), 141,87 (8), 136,69 (7), 135,18 (11), 134,93 (9), 126,54 (4), 121,29 (5), 117,98 (6), 112,34 (1), 112,18 (11), 104,86 (3), 71,06 (1'), 40,87 (2'), 19,97 (13)

Tablica 6. Analitički i spektroskopski podaci te kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima amidnih derivata (**4a**)



Spoj	4a
Iskorištenje (%)	24,2
Molekulska formula (M_r)	$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{ClN}_5\text{O}$ (429.90)
t_f (°C)	274,5- 277,0
IR (ATR, ν/cm^{-1})	3616, 3286, 1662, 1629, 1587, 1502, 1453, 1432, 1375, 1328, 1234, 1150, 1083, 1014, 902, 852, 801, 737
MS (m/z)	430,1 ($M+1$) ⁺
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm, J/Hz)	11,48 (s, 1H, 10), 8,71 (t, 1H, 2', $J = 5,9$ Hz), 8,45 (d, 1H, 8', $J = 5,4$ Hz), 8,30 (d, 1H, 13', $J = 9,0$ Hz), 8,05 (d, 1H, 3, $J = 7,8$ Hz), 7,89-7,81 (m, 2H, 5', 10'), 7,71 (s, 1H, 6), 7,60-7,46 (m, 3H, 1, 12, 12'), 7,28-7,16 (m, 1H, 2), 6,47 (d, 1H, 7', $J = 5,5$ Hz), 4,52 (d, 2H, 1', $J = 5,8$ Hz), 4,07 (d, 2H, 4', $J = 6,0$ Hz), 2,70 (s, 3H, 13)
^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm)	168,98 (3'), 151,79 (8'), 150,26 (6'), 148,97 (9'), 146,08 (7), 141,11 (8), 140,73 (11), 133,51 (9), 133,45 (11'), 127,82 (10'), 127,65 (5), 127,46 (13'), 124,32 (1), 121,46 (12'), 120,94 (4), 119,13 (3), 117,63 (14'), 111,95 (2), 109,34 (12), 99,28 (6), 48,60 (7'), 46,01 (4'), 44,21 (1'), 20,24 (13')

Tablica 7. Analitički i spektroskopski podaci te kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima derivata amida (**4b**)



Spoj	4b
Iskorištenje (%)	26,2
Molekulska formula (M_r)	$\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{ClN}_5\text{O}_2$ (459.93)
t_f (°C)	304,0–307,0
IR (ATR, ν/cm^{-1})	3525, 3369, 3219, 3145, 3054, 2874, 1679, 1581, 1530, 1505, 1485, 1452, 1372, 1334, 1287, 1240, 1213, 1115, 1075, 990, 877, 854, 810, 793, 629, 614, 488, 467
MS (m/z)	460,1 ($M+1$) ⁺
^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm, J/Hz)	11,41 (s, 1H, 10), 8,41 (t, 1H, 3', $J = 5,7$ Hz), 8,29 (d, 1H, 9', $J = 5,4$ Hz), 8,27 (d, 1H, 14', $J = 9,1$ Hz), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,82 (t, 1H, 6', $J = 6,4$ Hz), 7,81 (d, 1H, 11', $J = 2,3$ Hz), 7,73 (d, 1H, 3, $J = 2,5$ Hz), 7,51-7,48 (d, 1H, 12, $J = 8,8$ Hz), 7,15 (dd, 1H, 13', $J = 9,0, 2,3$ Hz), 7,15 (dd, 1H, 1, $J = 8,8, 2,5$ Hz), 6,31 (d, 1H, 8', $J = 5,4$ Hz), 4,10 (t, 2H, 1', $J = 5,6$ Hz), 3,98 (d, 2H, 5', $J = 5,9$ Hz), 3,54 (q, 2H, 2', $J = 5,6$ Hz), 2,74 (s, 3H, 13)
^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm)	169,20 (4'), 152,29 (2), 151,80 (9'), 150,21 (7'), 148,94 (10'), 142,20 (8), 136,93 (7), 135,34 (11), 135,08 (9), 133,43 (12'), 127,48 (11'), 126,67 (4), 124,28 (14'), 124,23 (13'), 121,38 (5), 118,20 (1), 117,58 (15'), 112,72 (6), 112,67 (12), 104,77 (3), 99,14 (8'), 66,99 (1'), 45,81 (5'), 38,49 (2'), 20,42 (13)

4.2. Procjena svojstava sličnih lijekova (engl. „*drug-likeness*“)

Osim povoljnog farmakološkog djelovanja, klinički koristan lijek mora imati i zadovoljavajući farmakokinetički profil. Kako bi se procjenila svojstva slična lijeku (engl. „*drug-likeness*“) predloženi su različiti modeli. Pomoću tog kvalitativnog koncepta preko strukture se procjenjuje bioraspoloživost molekule, čak i prije same sinteze. Najpoznatiji model razvili su Lipinski i suradnici, analizirajući svojstva lijekova koji su dospjeli u fazu 2 kliničkih ispitivanja te donijeli tzv. Lipinskijevo pravilo pet (engl. *Lipinski rule of five*) (Lipinski, 2004; Lipinski, 2000; Lipinski i sur., 1997). Osim toga, postoji još cijeli niz različitih metoda za procjenu *drug-like* svojstava. Veber i suradnici 2002. predložili su pravila koja uzimaju u obzir fleksibilnost i polarnost molekule (Veber i sur., 2002) dok su Luzina i Popov predložili Gelovanijeva pravila (Luzina i Popov, 2012). Sva navedena pravila pokušavaju predvidjeti oralnu bioraspoloživost molekule na temelju njene strukture i fizikalno-kemijskih svojstava.

Lipinskijeva pravila zahtijevaju da molekula ima $M_r \leq 500$, $\log P \leq 5$, broj donora vodikove veze ≤ 5 , broj akceptora vodikove veze ≤ 10

Gelovanijeva nalažu da topološka polarna površina (TPSA) bude manja od $140 \text{ \AA}^2$, molarna refraktivnost (MR) između 40 i $130 \text{ cm}^3/\text{mol}$ te broj atoma u molekuli od 20 do 70.

Veberova pravila postavljaju zahtjev da molekula ima polarnu površinu manju od $140 \text{ \AA}^2$ i 10 ili manje veza koje mogu slobodno rotirati ili manje od 12 donora i akceptora vodikove veze uz polarnu površinu manju od $140 \text{ \AA}^2$.

Prema prikazanim podacima, sve molekule zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, dok Gelovanijeva pravila ne zadovoljava spoj **4b** koji ima molarnu refraktivnost iznad $130 \text{ cm}^3/\text{mol}$ (Tablice 8 i 9).

Tablica 8. Parametri uključeni u Lipinskijeva pravila za novosintetizirane spojeve

Spoj	1e	2e	4a	4b
Molekulska formula	C ₁₃ H ₁₃ N ₃	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O	C ₂₄ H ₂₀ ClN ₅ O	C ₂₅ H ₂₂ ClN ₅ O ₂
M_r	211,26	241,29	429,90	459,93
log P^a	2,02	2,01	3,77	3,85
donori H-veze	2	2	3	3
akceptori H-veze	2	3	3	4
Lipinski^b	4/4	4/4	4/4	4/4

^a log *P* – srednja vrijednost log *P*_{o/w} izračunata programom *SwissAdme*; ^b Lipinski – broj parametara (od ukupno 4) koji odgovaraju Lipinskijevim pravilima

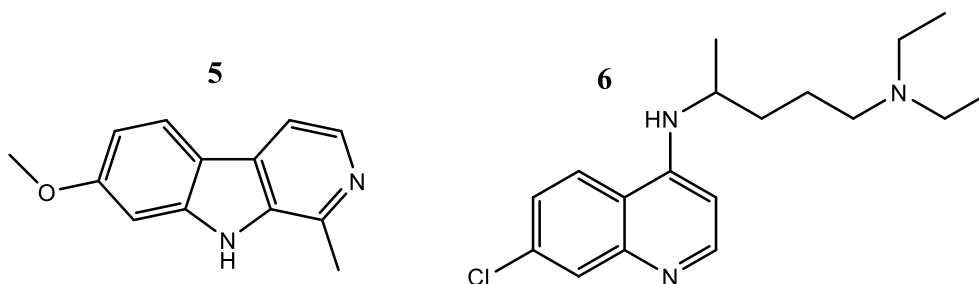
Tablica 9. Parametri uključeni u Gelovanijeva i Veberova pravila za novosintetizirane spojeve

Spoj	1e	2e	4a	4b
Molekulska formula	C ₁₃ H ₁₃ N ₃	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O	C ₂₄ H ₂₀ ClN ₅ O	C ₂₅ H ₂₂ ClN ₅ O ₂
M_r	211,26	241,29	429,90	459,93
MR^a (cm³/mol)	66,24	72,57	125,29	131,62
TPSA^b (Å²)	54,70	63,93	82,70	91,93
broj donora i akceptora H-veze	4	5	6	7
broj rotirajućih veza	1	3	6	8
Gelovani^c	3/3	3/3	3/3	2/3
Veber^d	+	+	+	+

^a MR – molekularna refraktivnost; ^b TPSA – topološka polarna površina; ^c Gelovani – broj parametara (od ukupno 3) koji odgovaraju Gelovanijevim pravilima; ^d slaganje s Veberovim pravilima

Za usporedbu izračunata su navedena svojstva za harmin i klorokin, spojeve koji su građevne jedinice amidnih derivata. Obje molekule zadovoljavaju Lipinskijeva, Gelovanijeva i Veberova pravila (Tablica 10).

Tablica 10. Parametri uključeni u Lipinskijeva, Gelovanijeva i Veberova pravila za spojeve harmin **5** i klorokin **6**



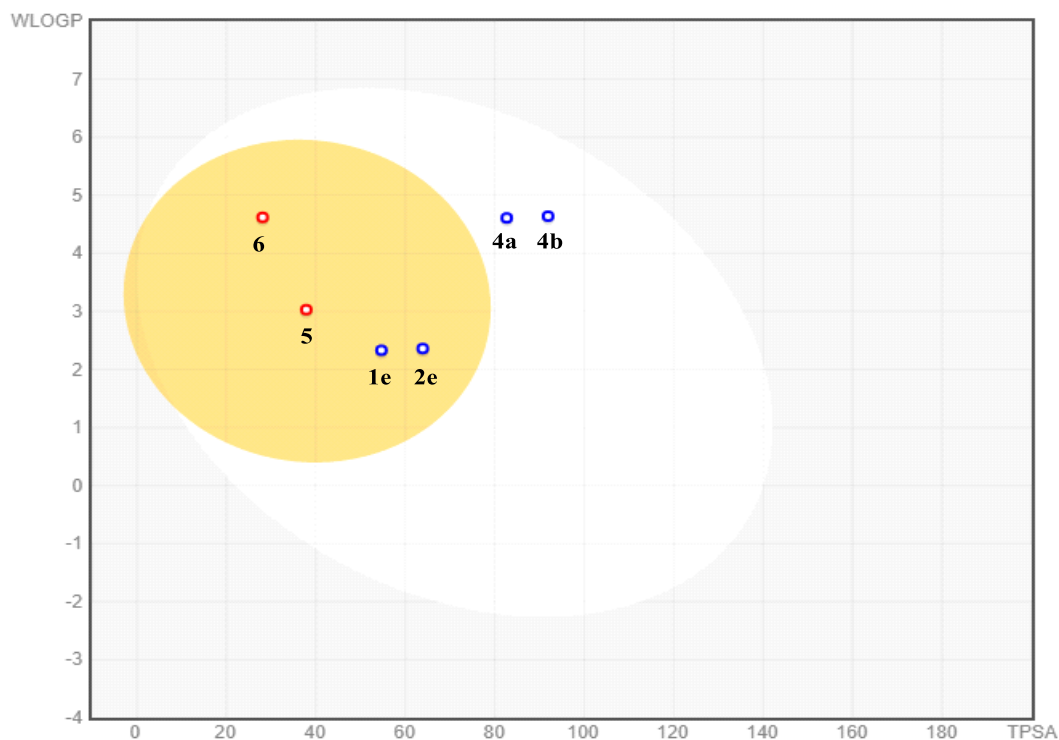
Spoj	5	6
Molekulska formula	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃
<i>M_r</i>	212,25	319,87
log <i>P</i> ^a	2,78	4,15
donori H-veze	1	1
akceptori H-veze	2	2
Lipinski ^b	4/4	4/4
MR ^c (cm ³ /mol)	65,06	97,41
TPSA ^d (Å ²)	37,91	28,16
broj donora i akceptora H-veze	3	3
broj rotirajućih veza	1	8
Gelovani ^e	3/3	3/3
Veber ^f	+	+

^a log *P* – srednja vrijednost log *P*_{o/w} izračunata programom *SwissAdme*; ^b Lipinski – broj parametara (od ukupno 4) koji odgovaraju Lipinskijevim pravilima; ^c MR – molekularna refraktivnost; ^d TPSA – topološka polarna površina; ^e Gelovani – broj parametara (od ukupno 3) koji odgovaraju Gelovanijevim pravilima; ^f slaganje s Veberovim pravilima

Za predviđanje pasivne apsorpcije u gastro-intestinalnom traktu te istovremeno prolazak krvno- moždane barijere kreiran je tzv. *Boiled-Egg* dijagram u *web aplikaciji* SwissADME (www.swissadme.ch). Žuto obojena zona predstavlja „žumanjak jajeta“ i obuhvaća molekule koje pasivno prelaze krvno-moždanu barijeru. Bijela zona simbolizira „bjelanjak“ i prikazuje molekule koje se pasivno apsorbiraju iz probavnog trakta. Vanjska siva regija označava molekule kojima se predviđa slaba apsorpcija iz gastro-intestinalnog trakta te ograničen prelazak krvno-moždane barijere. Dodatno, molekule označene plavim

krugom su supstrati P-glikoproteina, dok one označene crvenim krugom nisu podložne efluksu od strane P-glikoproteina (Daina i sur., 2017)

Spojevi amina **1e** i **2e**, zajedno s harminom **5** i klorokinom **6** pasivno prolaze krvno-moždanu barijeru, dok se spojevi amida **4a** i **4b** pasivno apsorbiraju iz probavnog trakta. Za razliku od novosintetiziranih spojeva, klorokin i harmin nisu potencijalni supstrati P-glikoproteina, zaslužnog za eliminaciju lijekova iz središnjeg živčanog sustava (Slika 21).



Slika 21. Boiled-Egg dijagram za spojeve kreiran alatom SwissAdme (www.swissadme.ch)

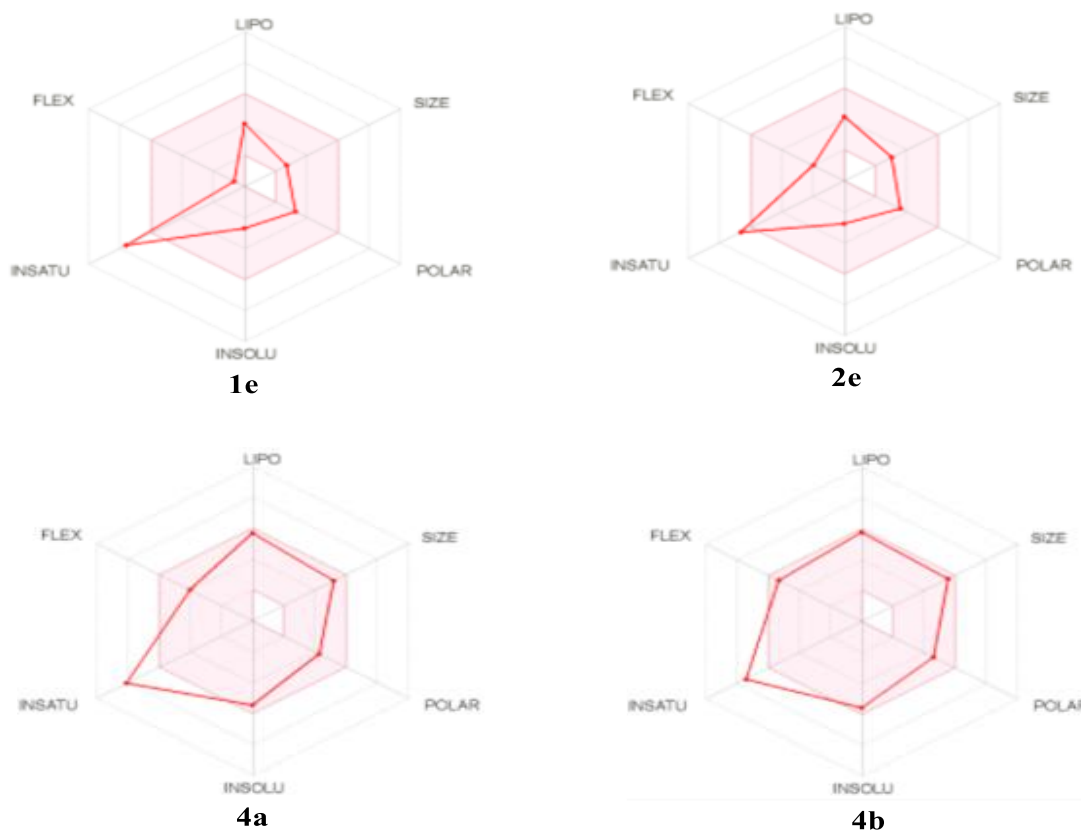
Uz *Boiled-Egg* dijagram, alatom *SwissAdme* (www.swissadme.ch) kreiran je i *Bioavailability radar* za procjenu oralne bioraspoloživosti molekule, koji uzima u obzir šest parametara:

- I. veličina, izražena kao molekulska masa, mora biti između 150 i 500
- II. lipofilnost, izražena kao XLOGP329, mora biti između -0,7 i +5,0
- III. polarnost, izražena kao TPSA, mora biti između 20 Å² i 140 Å²
- IV. netopljivost, izražena kao log S (ESOL), mora biti između 0 i 6
- V. nezasićenost, izražena kao udio sp³ hibridiziranih atoma, mora biti između 0,25 i 1
- VI. fleksibilnost, izražena kao broj veza koje mogu rotirati, mora biti između 0 i 9

Tablica 10. Vrijednosti parametara za *Bioavailability radar* za spojeve **1e**, **2e**, **4a** i **4b** izračunatih alatom *SwissAdme* (www.swissadme.ch)

Spoj	1e	2e	4a	4a
XLOGP^a	1,61	1,75	4,47	4,61
M_r	211,26	241,29	429,90	459,93
TPSA	63,93	54,70	82,70	91,93
log S^b	-2,70	-2,77	-5,47	-5,58
FCsp3^c	0,15	0,21	0,12	0,16
Broj rotirajućih veza	1	3	6	8

^a XLOGP3 – log *P* izračunat računalnim programom XLOGP (verzija 3.2.2); ^b log *S* – logaritam topljivosti u vodi izračunat računalno ESOL metodom; ^c FCsp3 – udio sp3 hibridiziranih C atoma u molekuli



Slika 20. Grafički prikaz rezultata *Bioavailability Radar* alata za spojeve **1e**, **2e**, **4a** i **4b**

Iz prikazanog može se zaključiti da svi novოსინтетизирани spojevi zadovoljavaju 5 od 6 parametara, dok im nezasićenost molekule izlazi iz granica prihvatljivog raspona (Slika 21, Tablica 10).

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog diplomskog rada provedena je sinteza i karakterizacija dva amina u položajima 3 i 6 β -karbolina, te dva amida klorokinske kiseline i harmina. Sintetizirani su sljedeći spojevi:

- (1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il)metanol (**1c**)
- 3-(azidometil)-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**1d**)
- (1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il)metanamin (**1e**)
- 1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-ol (**2c**)
- *tert*-butil(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil)karbamat (**2d**)
- 2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etan-1-amin (**2e**)
- (7-klorokinolin-4-il)glicina (**3**)
- 2-((7-klorokinolin-4-il)amino)-*N*-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il)metil)acetamid (**4a**)
- 2-((7-klorokinolin-4-il)amin)-*N*-(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)etil)acetamid (**4b**)

Standardnim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS) potvrđena je struktura novosintetiziranih spojeva te su im određena tališta. Utvrđeno je da svi spojevi zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, dok Gelovanijeva pravila ne zadovoljava spoj **4b** koji ima molarnu refraktivnost iznad $130\text{ cm}^3/\text{mol}$. Računalnim alatom *SwissAdme* provedena je predikcija farmakokinetičkih svojstava, prema kojoj su svi novosintetizirani spojevi dobre oralne bioraspoloživosti. Spojevi amina **1e** i **2e** pasivno prolaze krvno-moždanu barijeru, dok se spojevi amida **4a** i **4b** pasivno apsorbiraju iz probavnog trakta, a svi su potencijalni supstrati P-glikoproteina. U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovoga diplomskog rada, bit će ispitan biološki učinak pripremljenih spojeva.

6. LITERATURA

Allen JRF. and Holmstedt BR. The simple β -carboline alkaloids. *Phytochem*, 1980, 19, 1573-1582.

Beta-carboline, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 27.3.2021.

Cao R, Peng W, Wang Z, Xu A. Beta-Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. *Curr Med Chem*, 2007, 14, 479-500.

Chang GT, Harvey RG, Hsu WT, Weiss SB. Inactivation of SV40 replication by derivatives of benzo[a]pyrene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979, 88, 688-695.

Chloroquine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 27.3. 2021.

Chloroquine Phosphate, <https://www.webmd.com/>, pristupljeno 30.3.2021.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 2017, 7, 3-8.

Devi N, Singh D, Honey H, Mor S, Chaudhary S, Rawal RK, Kumar V, Chowdhury AK. In(OTf)₃ Catalysed an Expeditious Synthesis of β -Carboline- imidazo[1,2-a]pyridine and imidazo[1,2- a]pyrazine Conjugates. *RSC Adv.*, 2016, 43881-43883.

Dondorp Arjen M. *et al.* Artemisinin Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria. *N Engl J Med*, 2009, 361, 455-467.

Eagon Scott and Marc O. Anderson Microwave-Assisted Synthesis of Tetrahydro-beta-Carbolines. *Eur J Org Chem*, 2014, 2014, 1653-1665.

El-Faham A. i Albericio F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem Rev*, 2011, 111, 6557-6602.

Fiot J, Sanon S, Azas N, Mahiou V, Jansen O, Angenot L, Balansard G, Ollivier E. Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (*Combretaceae*). *J Ethnopharmacol*, 2006, 106, 173-178.

Galie N, Brundage BH, Ghofrani HA, Oudiz RJ, Simonneau G, Safdar Z, Shapiro S, White RJ, Chan M, Beardsworth A, Frumkin L, Barst RJ. Tadalafil Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*, 2009, 119, 2894-2903.

Hayward R, Saliba KJ, Kirk K. The pH of the digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* is not associated with chloroquine resistance. *J Cell Sci*, 2006, 119, 1016-1025.

Javeed M, Rasul A, Hussain G, Jabeen F, Rasool B, Shafiq N, Ali M. Harmine and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in human diseases. *Bangladesh J Pharmacol*, 2018, 13, 203-213.

Kameda T, Ono M, Grause G, Mizoguchi T, Yoshioka T. Effect of a phase-transfer catalyst on the chemical modification of poly(vinyl chloride) by substitution with thiocyanate as a nucleophile. *Mater Chem Phys*, 2009, 118, 362-366.

Lima JA, Wilson R. Costa T, da Fonseca ACC, do Amaral RF, do Desterro S.B. Nascimento M., Santos-Filho OA, de Mirandaf ALP, Ferreira Neto DC, Lima FRS, Hamerski L, Tinoco LW. Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking. *Bioorg Chem*, 2020, 104, 104215

Lin LC, Kuo TT, Chang HY, Liu WS, Hsia SM, Huang TC. Manzamine A Exerts Anticancer Activity against Human Colorectal Cancer Cells. *Mar Drugs*, 2018, 16, 252.

Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2000, 44, 235-249.

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

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

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

Malaria, <https://eu.biogents.com/malaria/>, pristupljeno 25.3.2021.

Malaria, <https://www.webmd.com/>, pristupljeno 25.3.2021.

Marinović M, Perković I, Fontinha D, Prudêncio M, Held J, Pessanha de Carvalho L, Tandarić T, Vianello R, Zorc B, Rajić Z. Novel Harmicines with Improved Potency against Plasmodium. *Molecules*, 2020, 25, 19.

Michaelides M. Retinal Toxicity Associated With Hydroxychloroquine and Chloroquine. *Archives of Ophthalmology*, 2011, 129, 30.

Miller LH, Ackerman HC, Su X, Wellems TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*, 2013, 19, 156-167.

Patrick GL, An Introduction to Drug Synthesis. Oxford, *Oxford University Press*, 2014, str. 28-35, 204-205.

Pattabiraman VR. and Bode JW. Rethinking amide bond synthesis. *Nature*, 2011, 480, 471-479.

Perković I, Raić-Malić S, Fontinha D, Prudêncio M, Pessanha de Carvalho L, Held J, Tandarić T, Vianello R, Zorc B, Rajić Z. Harmicines – harmine and cinnamic acid hybrids as novel antiplasmodial hits. *Eur J Med Chem*, 2019, 111927.

Shahinas D, MacMullin G, Benedict C, Crandall I, Pillai DR. Harmine Is a Potent Antimalarial Targeting Hsp90 and Synergizes with Chloroquine and Artemisinin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56.

Shamon SD. and Perez MI. Blood pressure lowering efficacy of reserpine for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009, 1.

Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*, 2004, 363, 1017-1024.

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

Slater AFG. Chloroquine: Mechanism of drug action and resistance in *plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*, 1993, 57, 203-235.

Starčević K, Pešić D, Toplak A, Landek G, Alihodžić S, Herreros E, Ferrer S, Spaventi R, Perić M. Novel hybrid molecules based on 15-membered azalide as potential antimalarial agents. *Eur J Med Chem*, 2012, 49, 365-378.

Stephens DN, Schneider HH, Kehr W, Andrews JS, Rettig KJ, Turski L, Schmiechen R, Turner JD, Jensen LH, Petersen EN, Honore T, Hansen JB. Abecarnil, a metabolically stable, anxiolytic β -carboline acting at benzodiazepine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, 253.

Suresh N. and Halder K. Mechanisms of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Curr Opin Pharmacol*, 2018, 42, 46-54.

SwissADME, <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 20.2.2021.

Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J Med Chem*, 2002, 45, 2615-2623.

Vieira T, Heron F. *et al.* Canthin-6-one induces cell death, cell cycle arrest and differentiation in human myeloid leukemia cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861.

Waghmare AA, Hindupur RM, Pati HN. Propylphosphonic anhydride (T3P®): An expedient reagent for organic synthesis. *Rev J Chem*, 2014, 4, 53-131.

Willcox M. and Honigsbaum M. Cinchona. U: Traditional Medicinal Plants and Malaria. Willcox M, Bodeker G, Rasoaiva P, Addae-Kyereme J. urednici, Boca Raton, Florida, CRC Press, 2000, str. 23-24

World Health Organisation, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>, pristupljeno 25.3. 2021.

Youssef DTA. Hyrtioerectines A–C, Cytotoxic Alkaloids from the Red Sea Sponge *Hyrtios erectus*. *J Nat Prod*, 2005, 68, 1416-1419.

Zanotti A, Natolino F, Contarino A, Lipartiti M, Giusti P. Abecarnil enhances recovery from diazepam tolerance. *Neuropharmacol*, 1999, 38, 1281-1288.

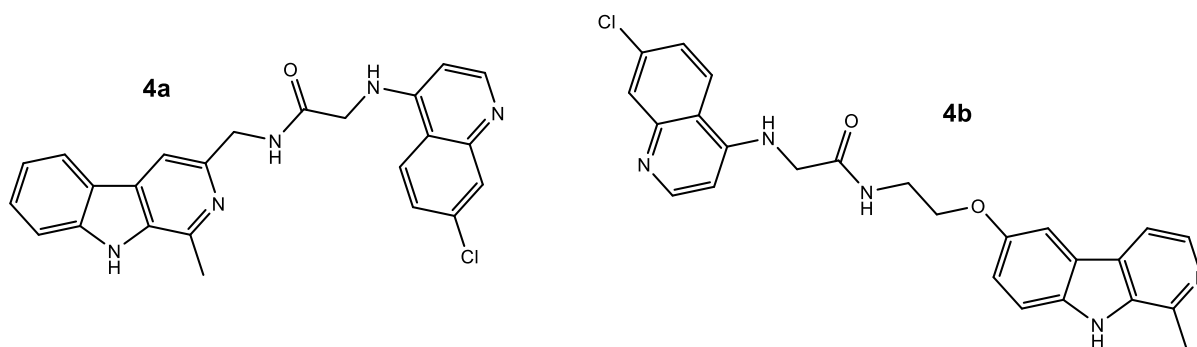
7. SAŽETAK/SUMMARY

U ovom radu sintetizirana su i strukturno okarakterizirana dva nova hibridna spoja **4a** i **4b**, sastavljena od β -karbolinskog prstena koji je amidnom poveznicom preko položaja 3 i 6 povezan s kinolinskim derivatom po uzoru na klorokin.

Za sintezu ovih spojeva bilo je potrebno sintetizirati obje građevne jedinice, kinolinski derivat, (7-klorokinolin-4-il)glicin, i 3- i 6- supstituirane β -karbolinske amine **1e** i **2e**. Priprava amina **1e** i **2e** na položajima β -karbolinskog prstena polazi iz metilnog estera triptofana i 5-metoksitriptamina te se odvija u pet reakcijskih koraka. Najprije Pictet-Spenglerovom kondenzacijom dolazi do nastanka tetrahydro- β -karbolina (**1a** i **2a**), koji se zatim oksidiraju do odgovarajućih β -karbolina **1b** i **2b**. U slučaju amina iz serije **1**, metilni ester na položaju 3 se reducira do primarnog alkohola **1c**. Slijedi konverzija alkoholne u azidnu skupinu uz pomoć donora azida ADMP-a u bazičnim uvjetima čime nastaje odgovarajući azid **1d**, te njegova redukcija u primarni amin **1e**.

Eter na položaju 6 spoja **2b** hidrolizom u kiselom prelazi u odgovarajući fenol **2c**, koji u reakciji nukleofilne supstitucije u bazičnim uvjetima prelazi u spoj **2d** kod kojeg terminalna amino skupina posjeduje Boc-zaštitnu skupinu. Potom se amino skupina oslobađa zaštite, hidrolizom funkcionalne skupine karbamata u kiselom, te nastaje amin **2e**.

Konačni produkti **4a** i **4b** dobiveni su u reakciji amina **1e** i **2e** s (7-klorokinolin-4-il)glicinom (**3**), koristeći standardne *coupling* uvjete (T3P, TEA, DMF).



Strukture sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim spektroskopskim/spektrometrijskim metodama (¹H i ¹³C NMR, MS, IR). Sva četiri spoja zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, a dobru oralnu bioraspoloživost predviđa im i alat SwissADME. Sintetiziranim derivatima će u daljnjim istraživanjima biti ispitano biološko djelovanje.

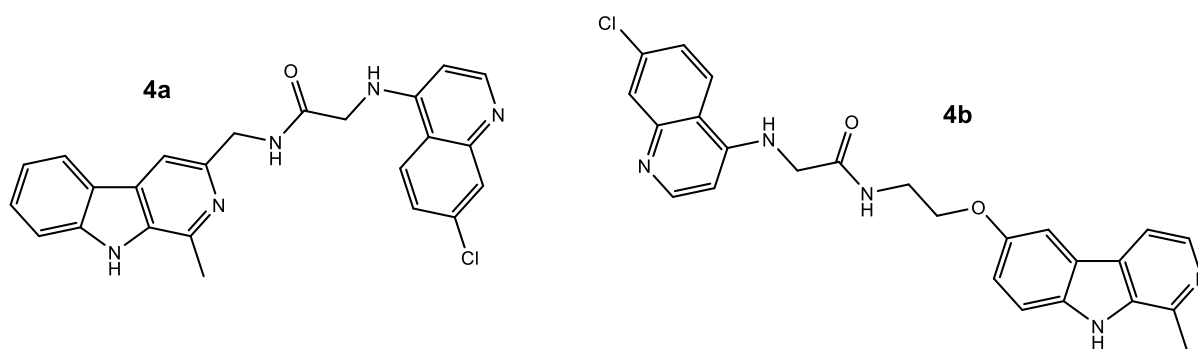
Ključne riječi: hibrid, β -karbolin, klorokin, amid, sinteza

In this work, two novel hybrid compounds **4a** and **4b**, consisting of a β -carboline ring which is connected to a quinoline derivative via the chloroquine model by an amide bond in positions 3 and 6, were synthesized and characterized.

In order to achieve this goal, building blocks for these compounds were prepared, a quinoline derivative (7-chloroquinolin-4-yl) glycine and 3- and 6-substituted β -carboline amines **1e** and **2e**. The preparation of amines **1e** and **2e** at the β -carboline ring positions starts from the methyl ester of tryptophan and 5-methoxytryptamine and takes place in five reaction steps. First, Pictet-Spengler condensation produces tetrahydro- β -carbolines (**1a** and **2a**), which are then oxidized to the corresponding β -carbolines **1b** and **2b**. In case of amine from series 1, the methyl ester at position 3 is reduced to the primary alcohol **1c**. This is followed by the conversion of the alcohol **1c** to the corresponding azide **1d** by using ADMP under basic conditions, and reduction to the primary amine **1e**.

The ether moiety at the position 6 of the compound **2b** is hydrolyzed in acidic conditions to corresponding phenol **2c**, which in the reaction of nucleophilic substitution under basic conditions is converted to compound **2d** in which the terminal amino group carries a Boc-protecting group. The amino group is then deprotected by acid hydrolysis of the carbamate, and amine **2e** is formed.

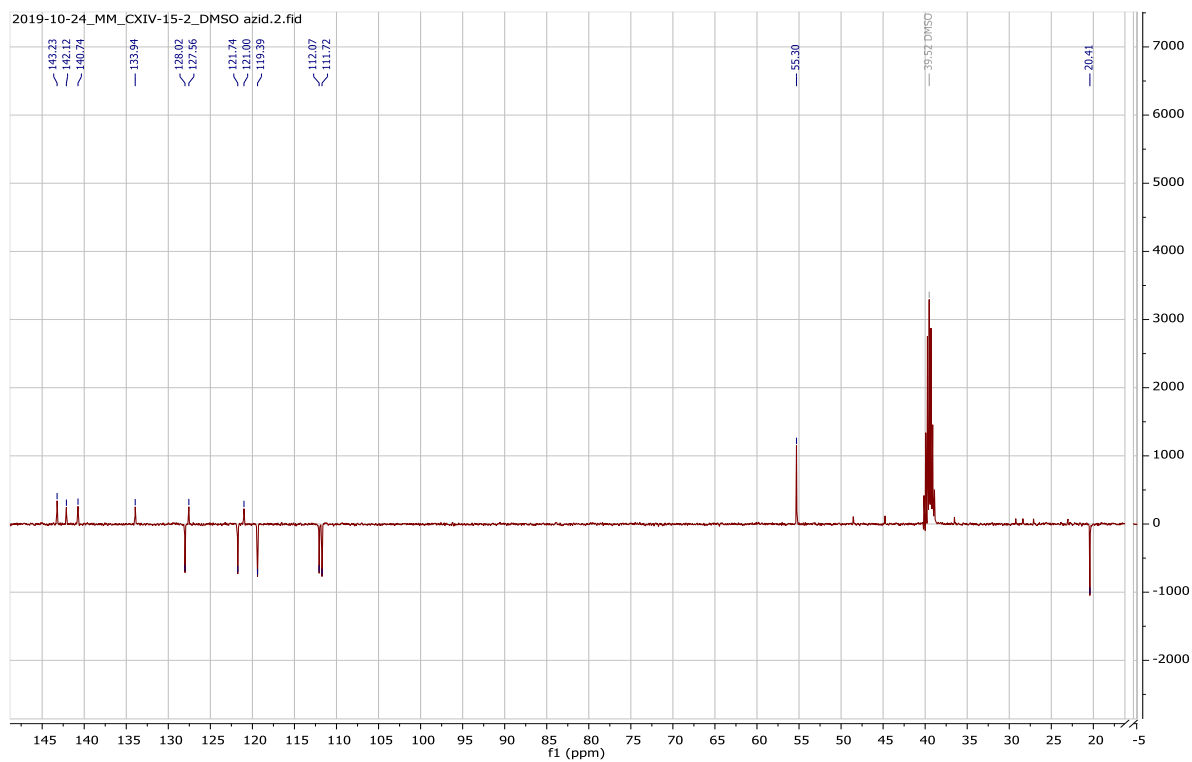
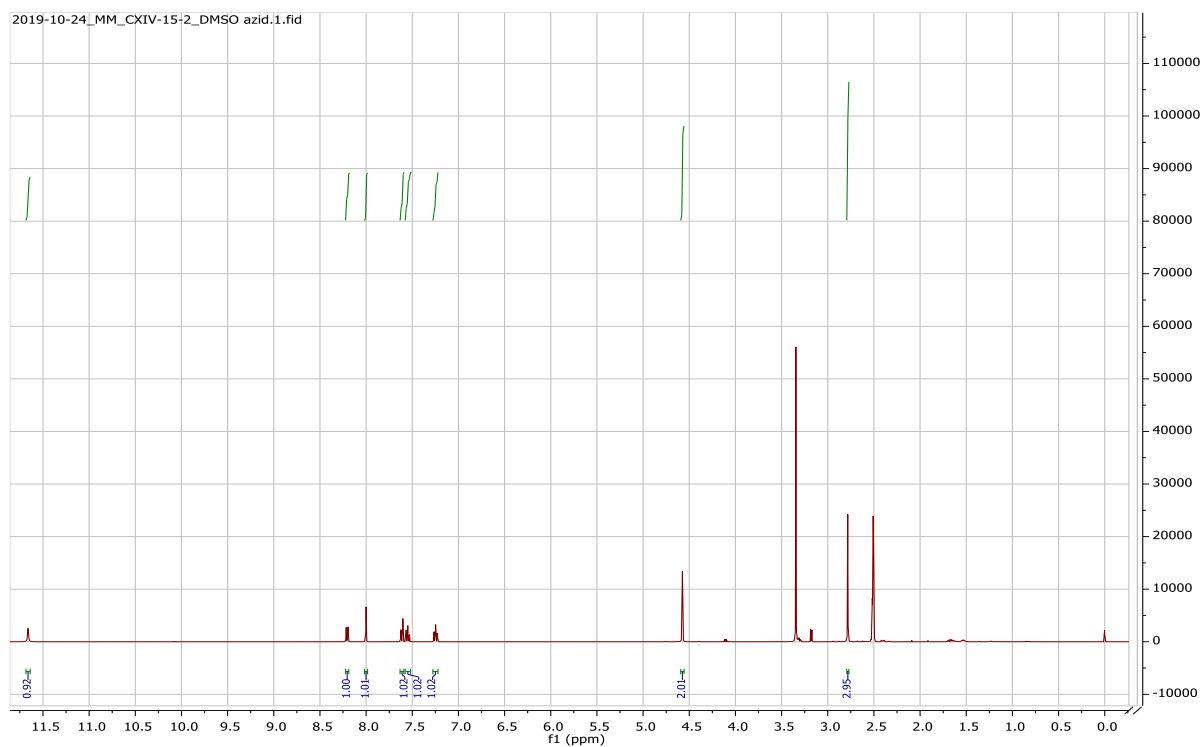
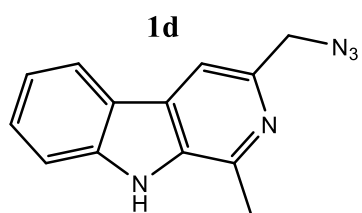
The final products **4a** and **4b** were obtained by the reaction of amines **1e** and **2e** with (7-chloroquinolin-4-yl) glycine (**3**), by using standard coupling conditions (T3P, TEA, DMF).

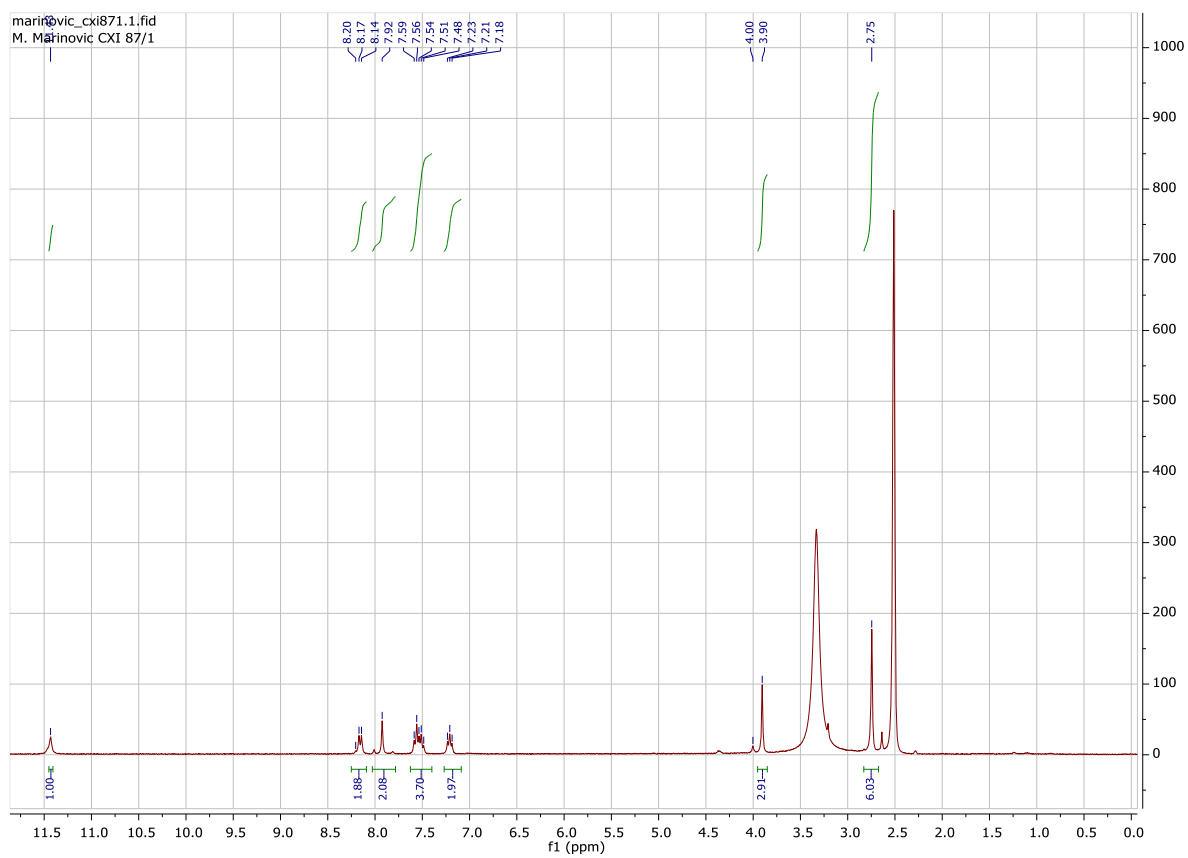
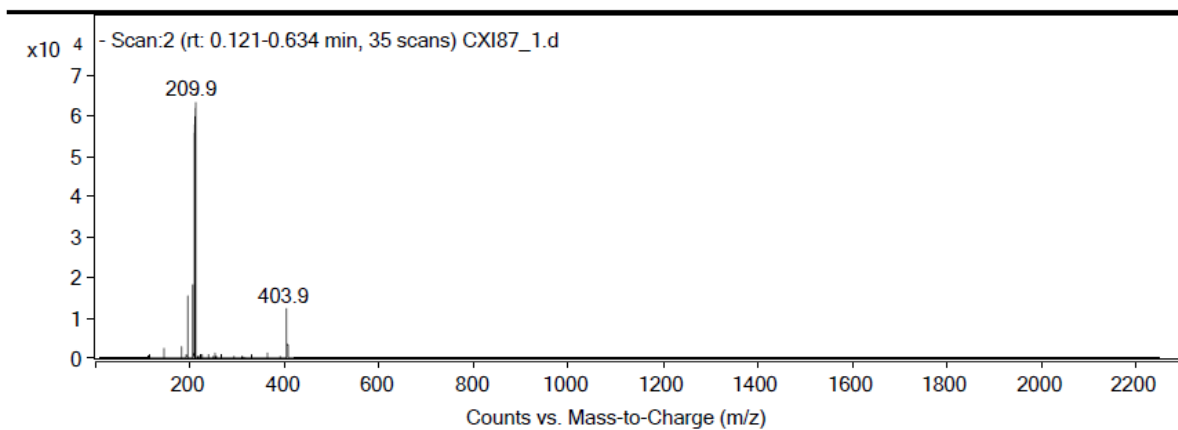
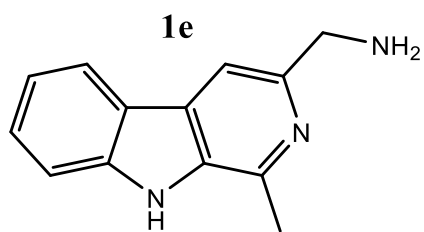


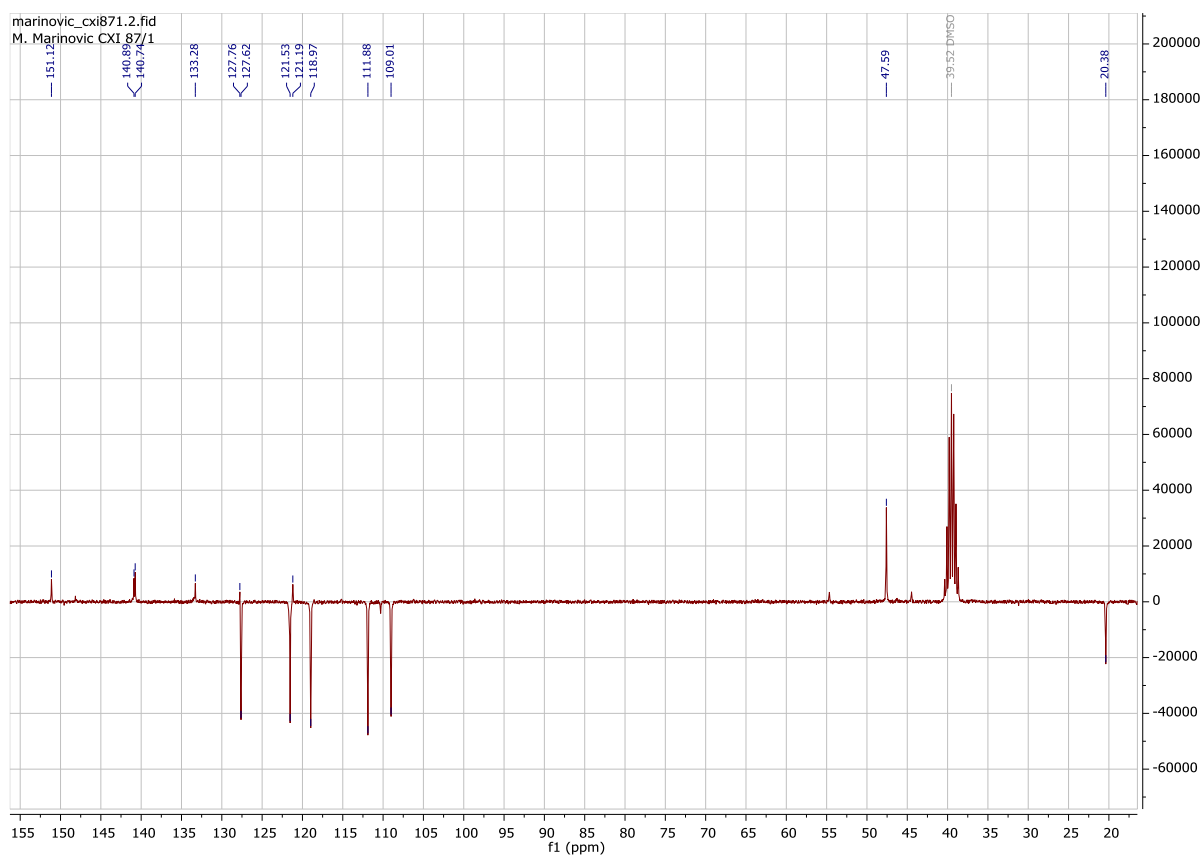
Structures of the newly prepared compounds were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (^1H i ^{13}C NMR, MS, IR). All four novel derivatives meet all of the Lipinski's and Veber's criteria for good oral bioavailability of potential drugs. SwissADME tool predicts good oral bioavailability of all four derivatives. Further studies will investigate biological activity of the prepared compounds.

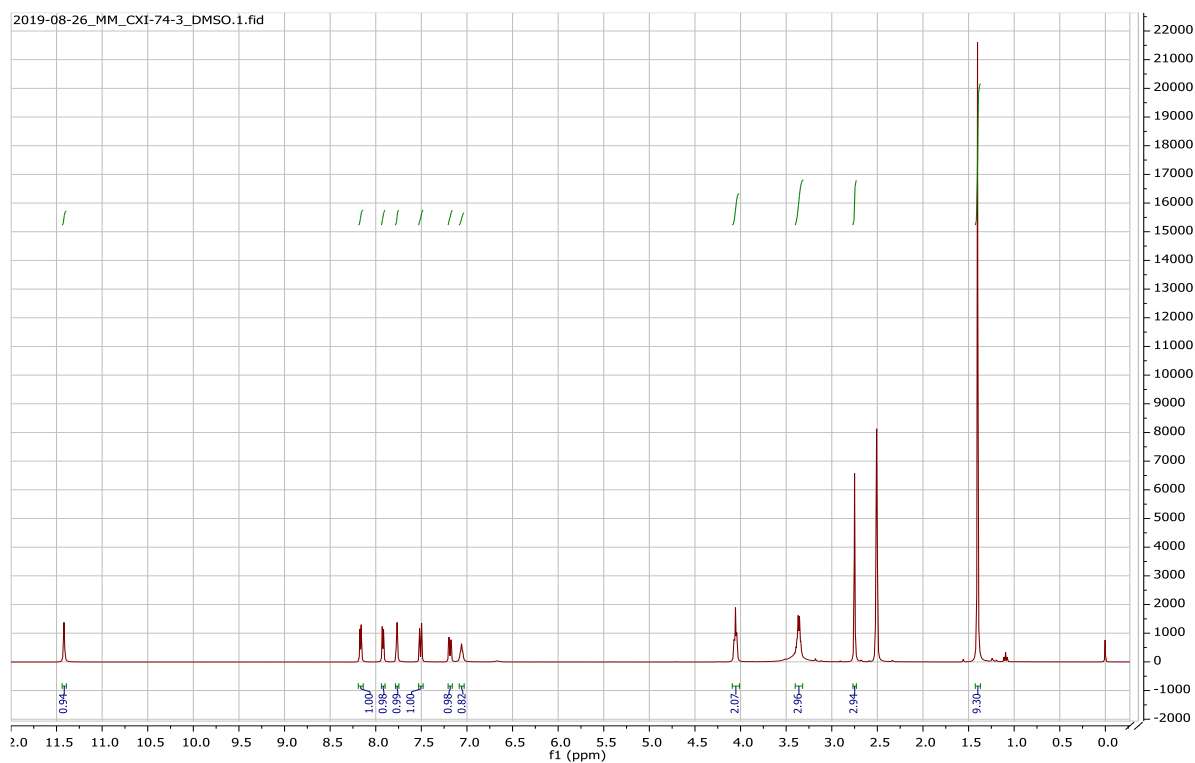
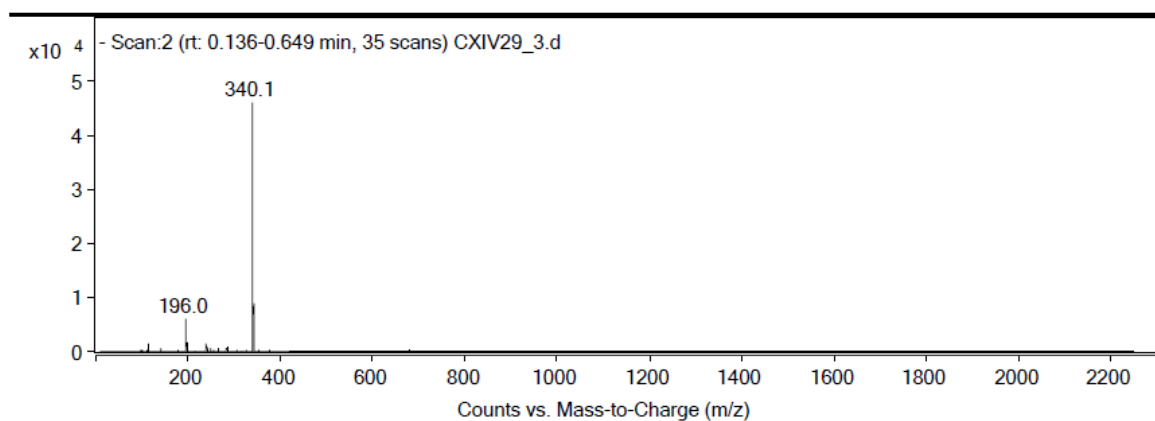
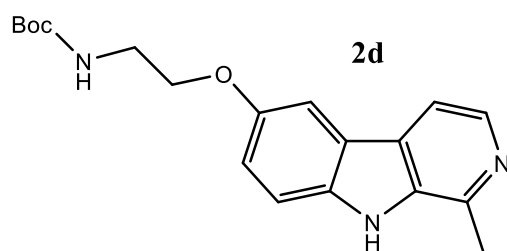
Keywords: hybrid, β -carboline, chloroquine, amide, synthesis

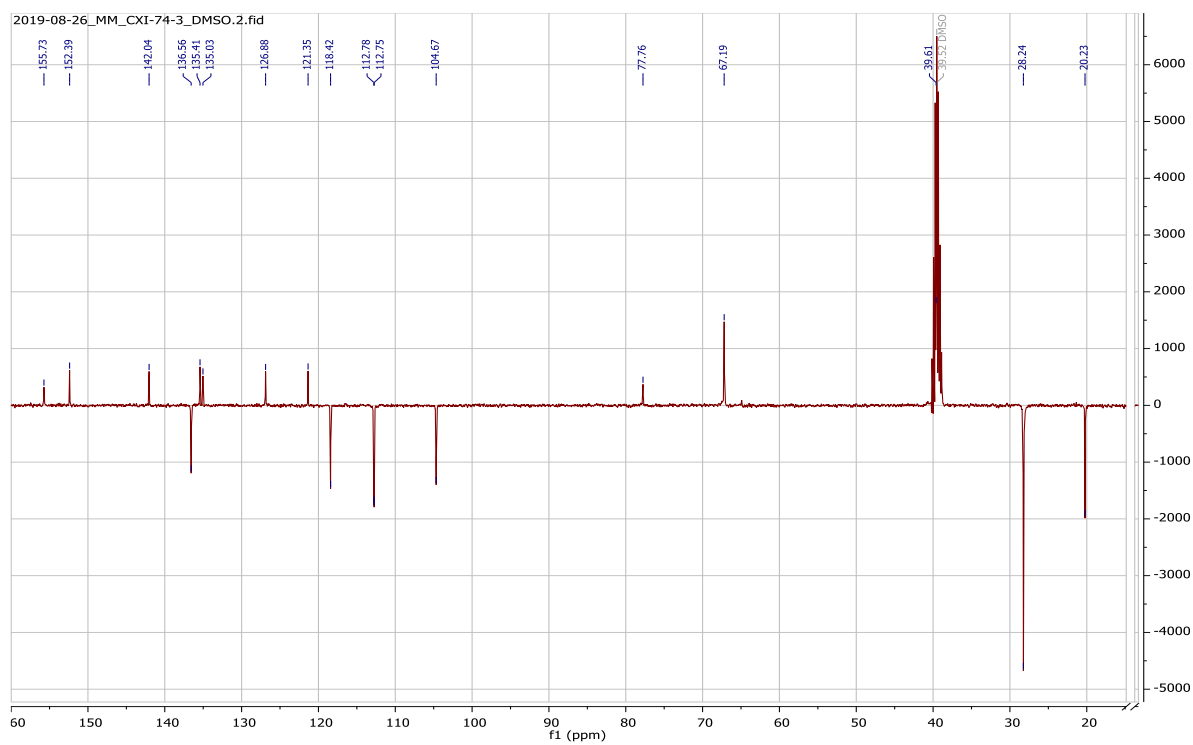
8. PRILOZI

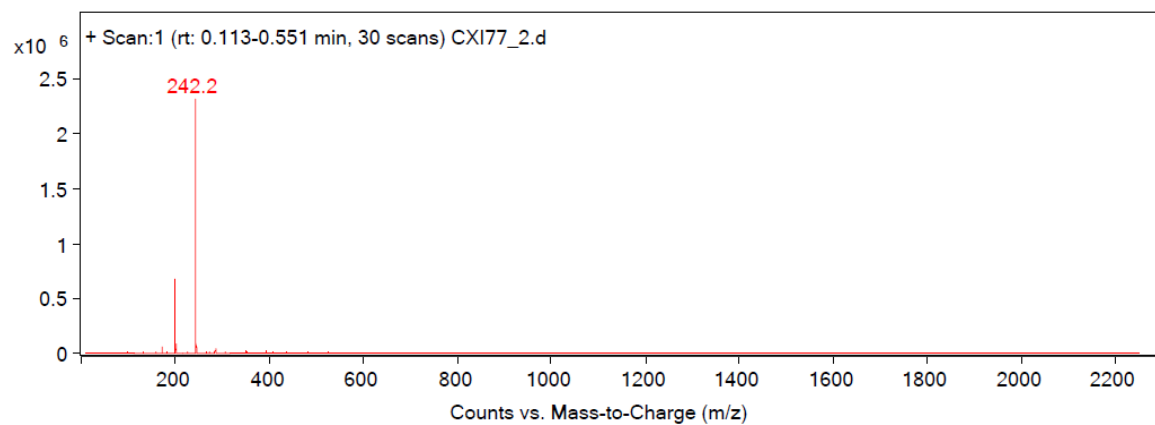
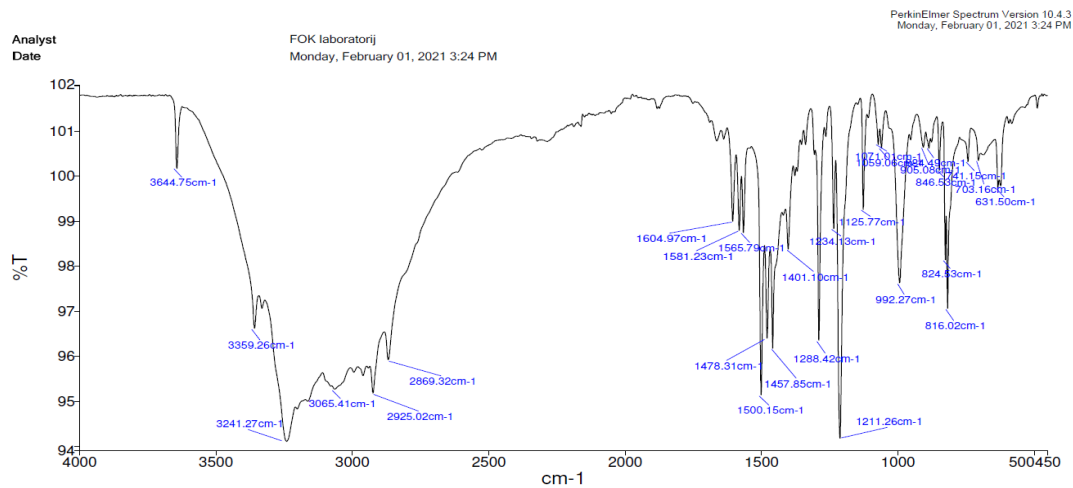
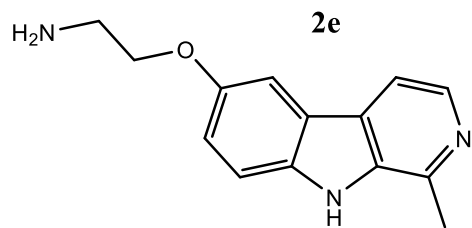


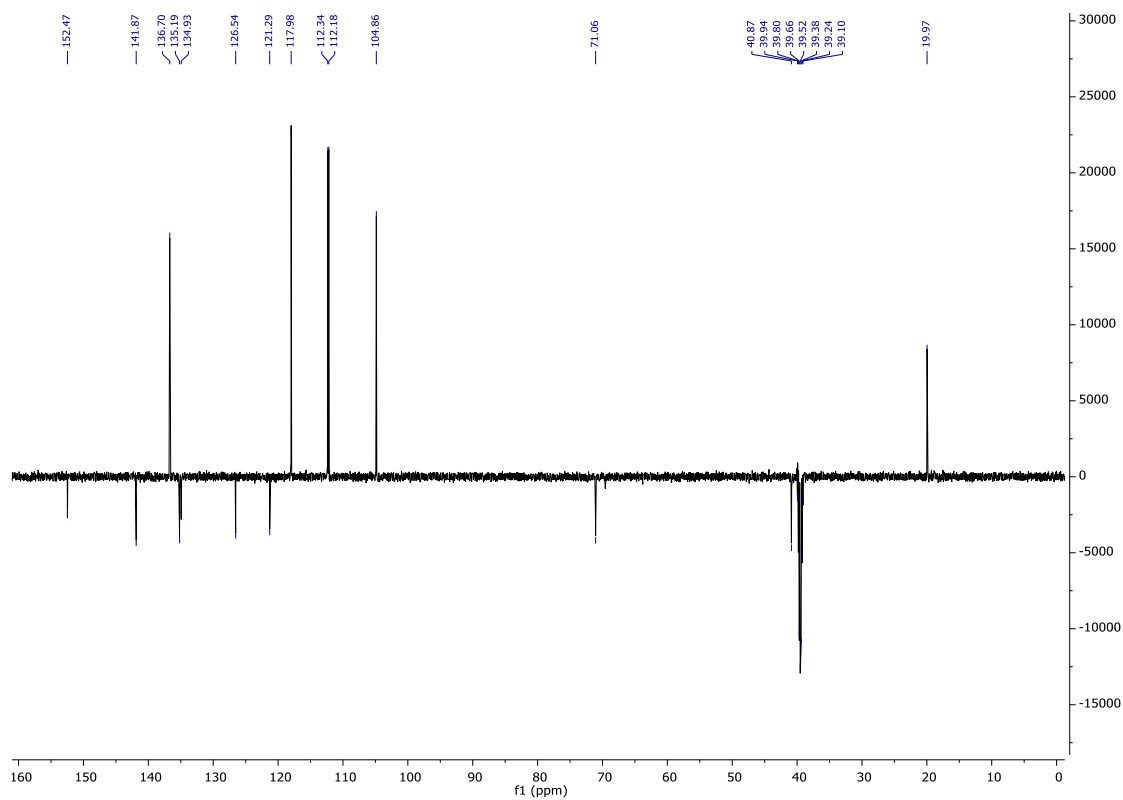
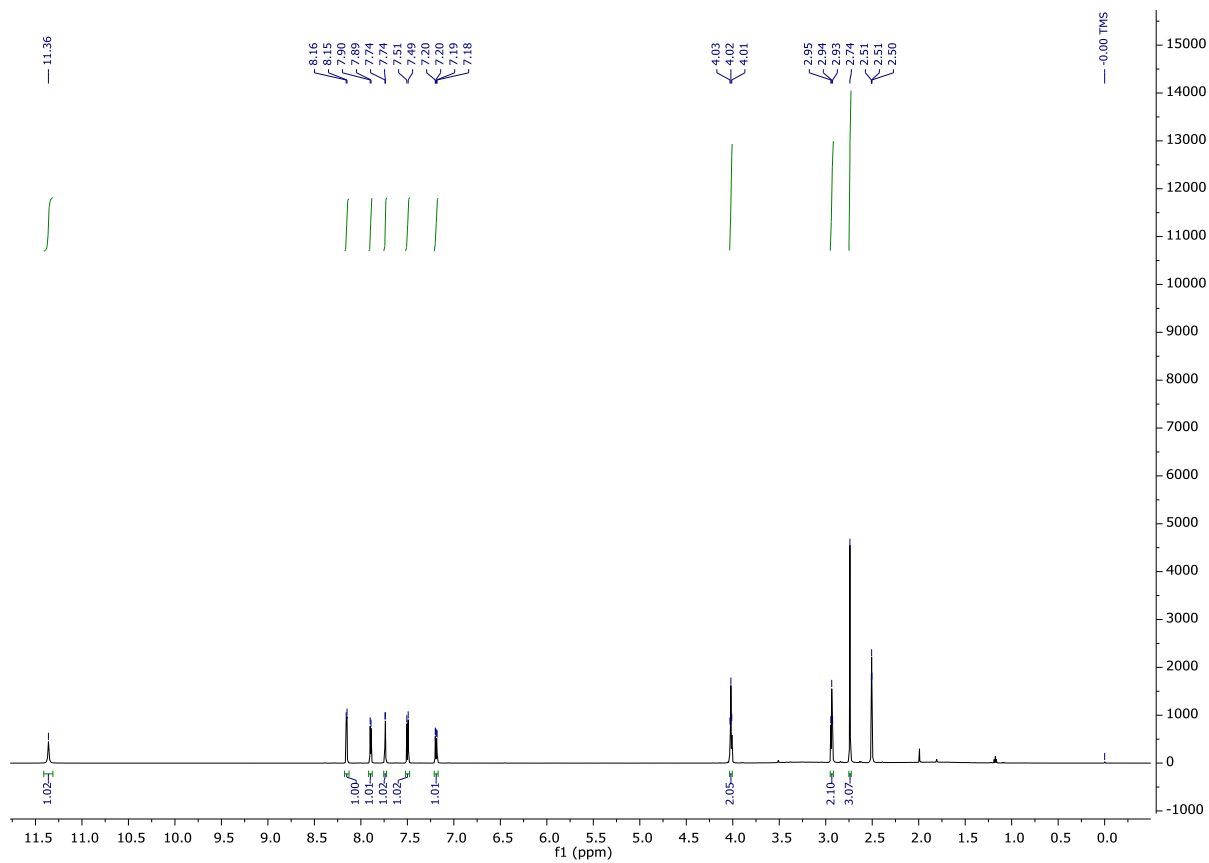


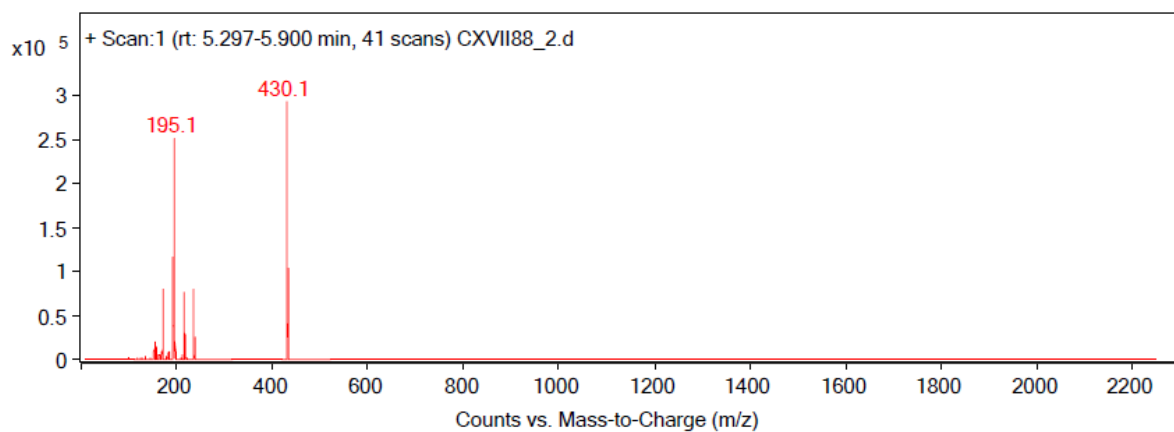
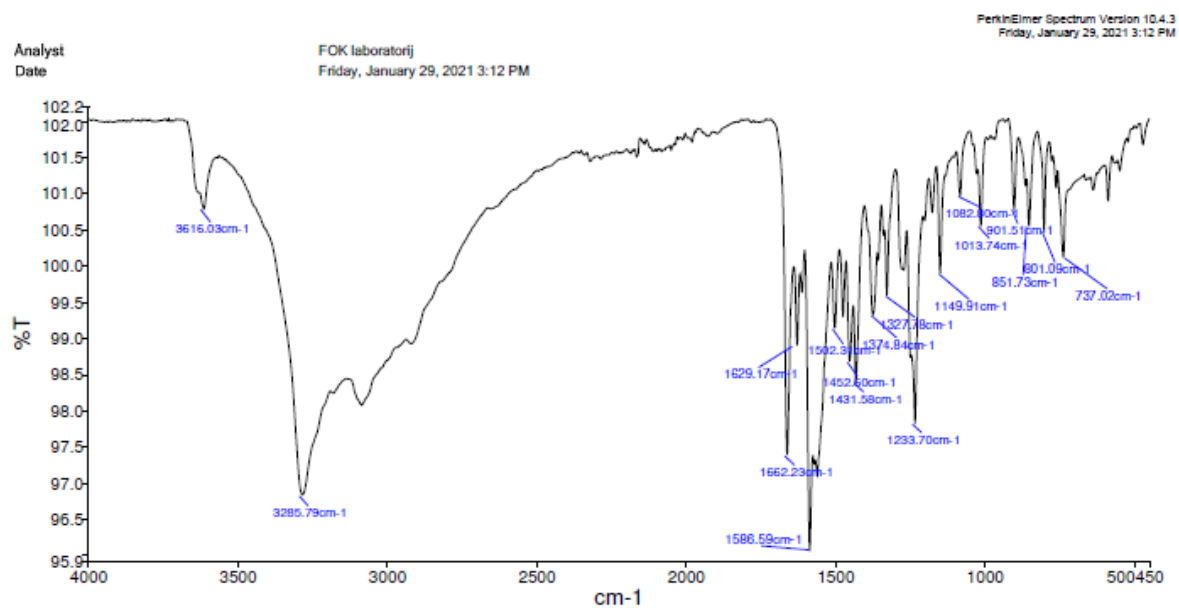
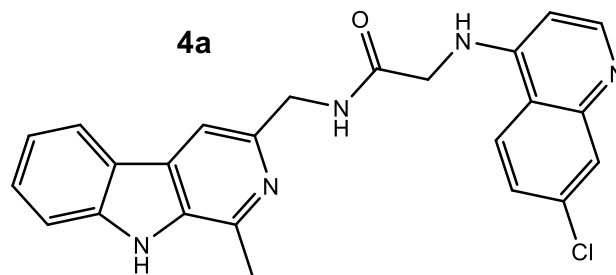


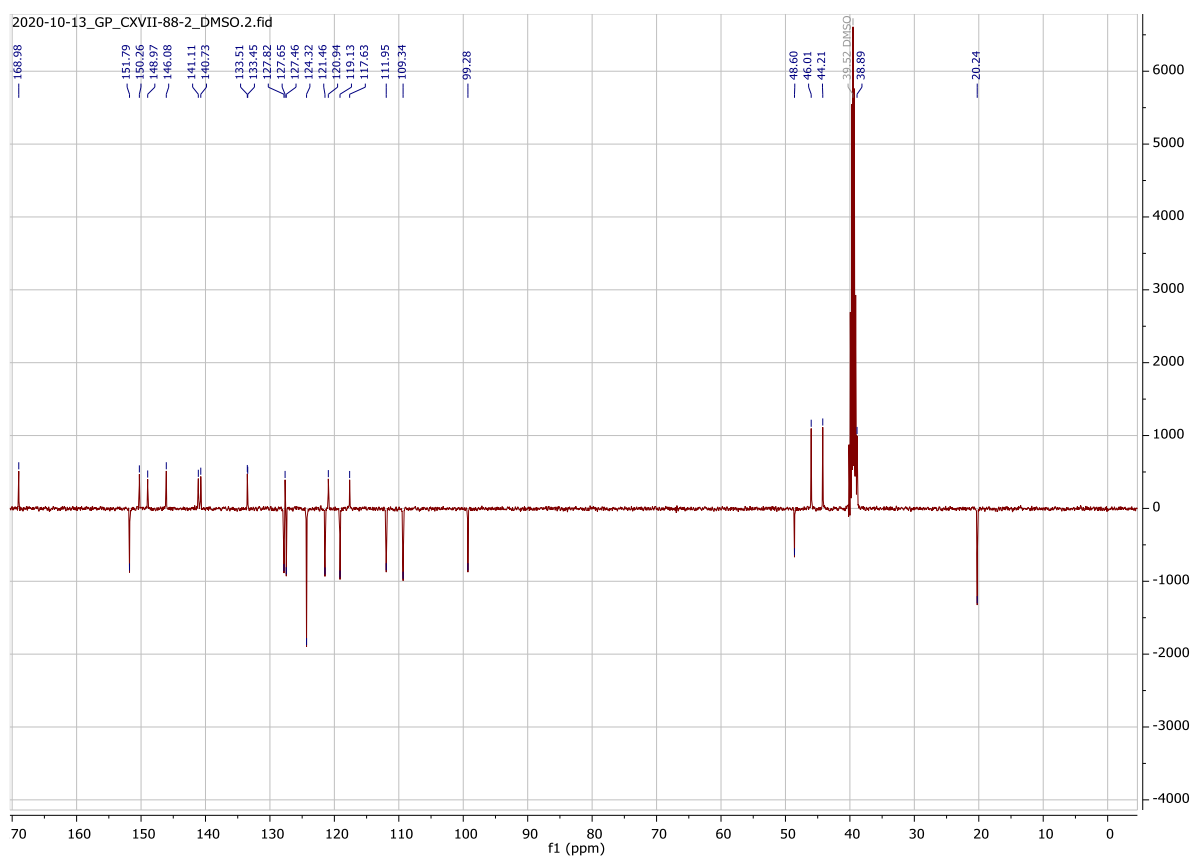
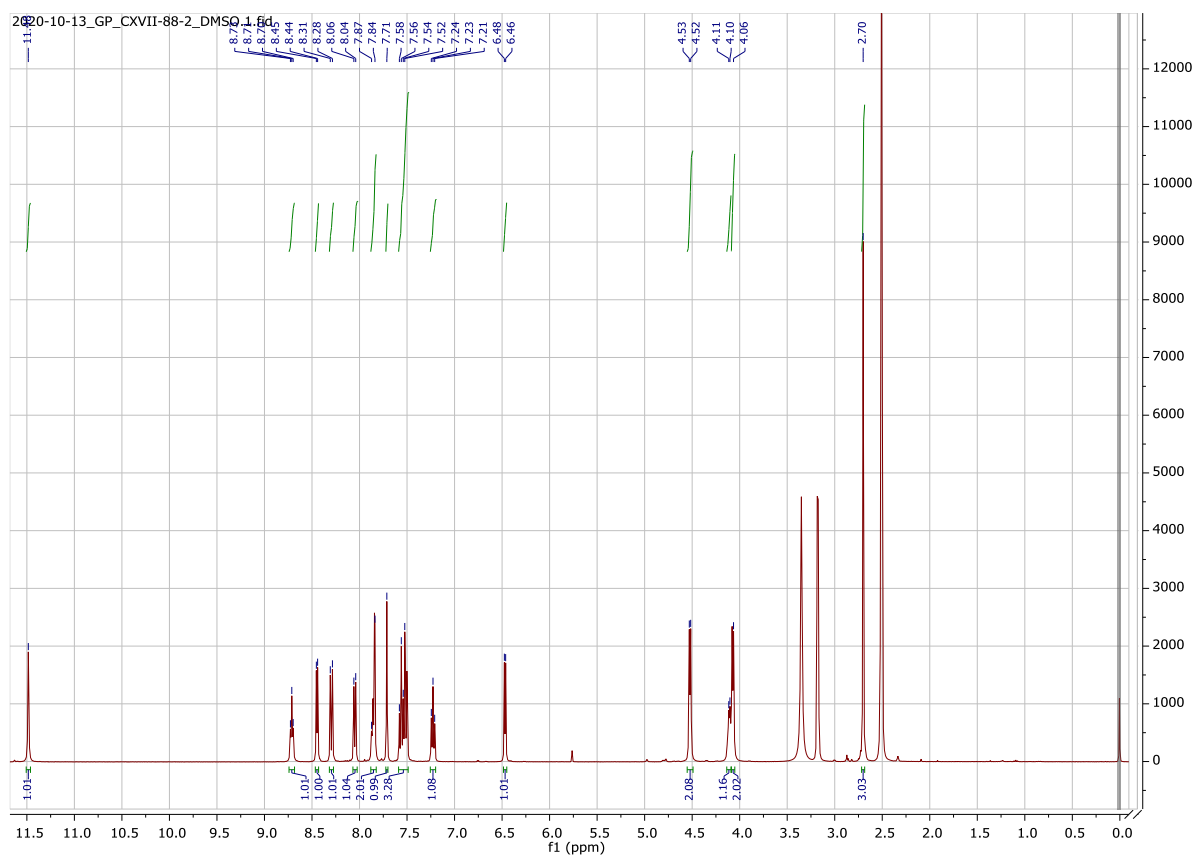


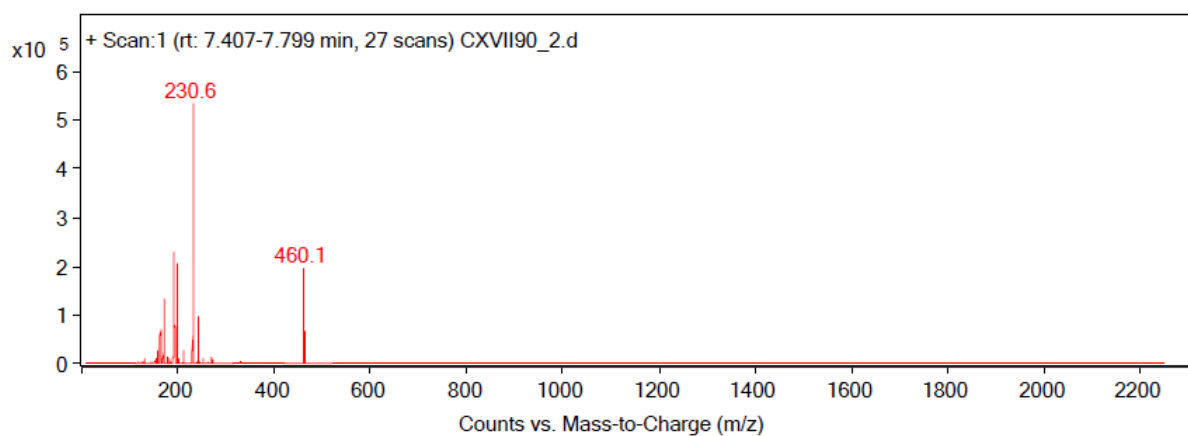
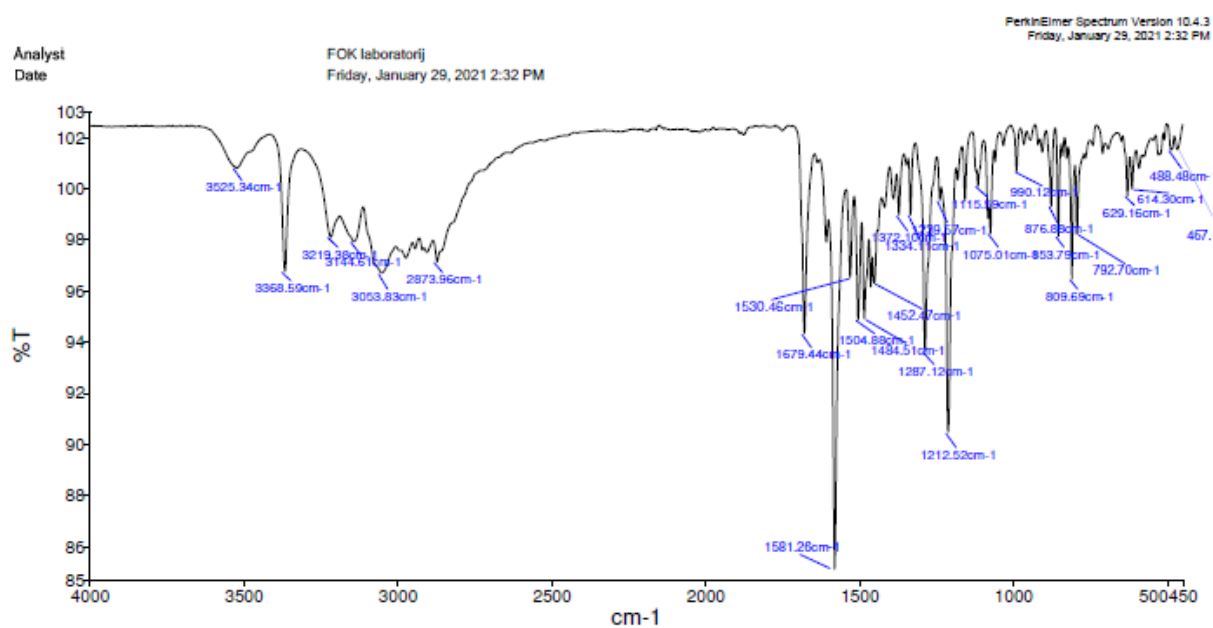
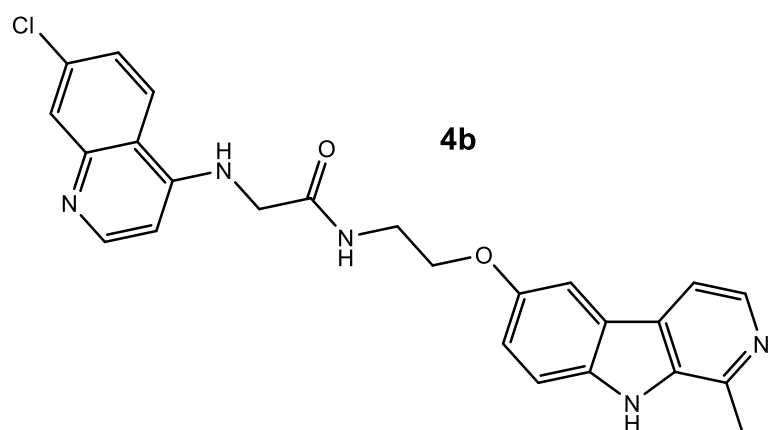


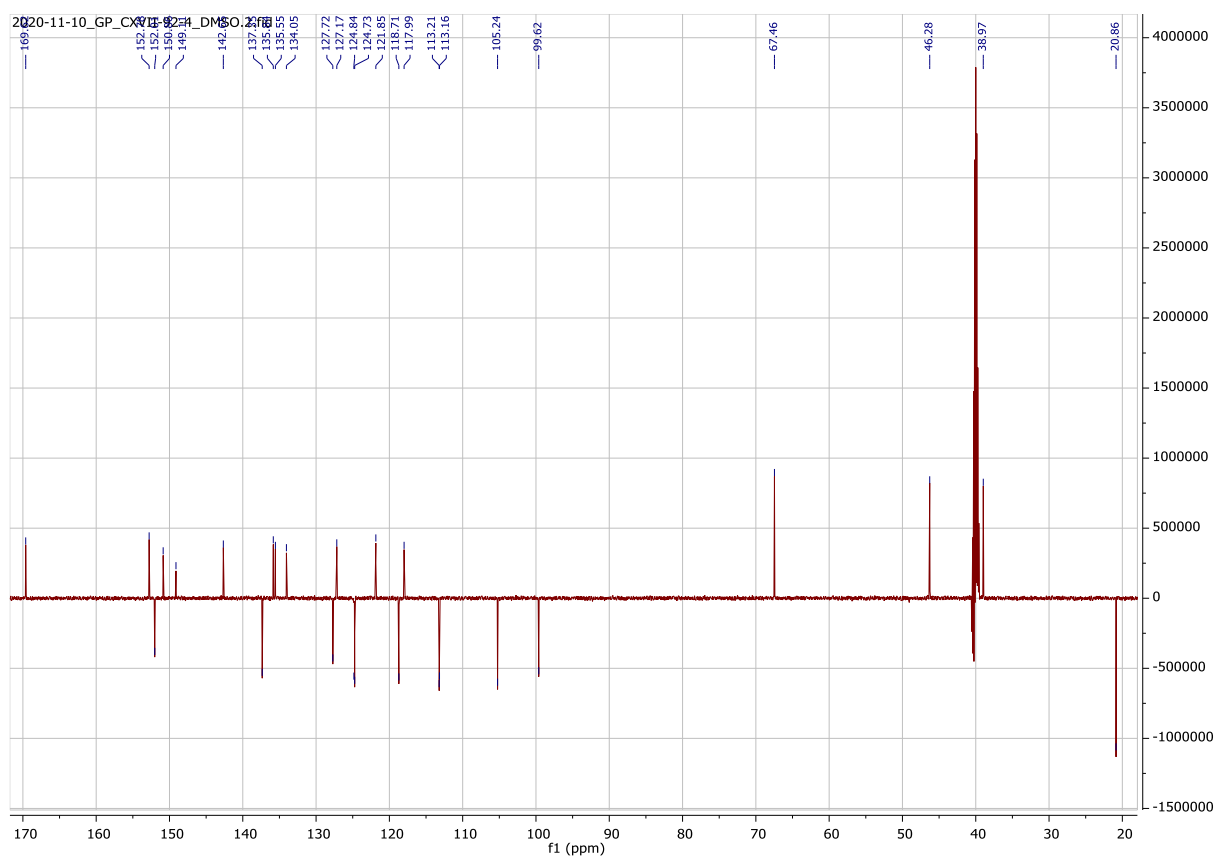
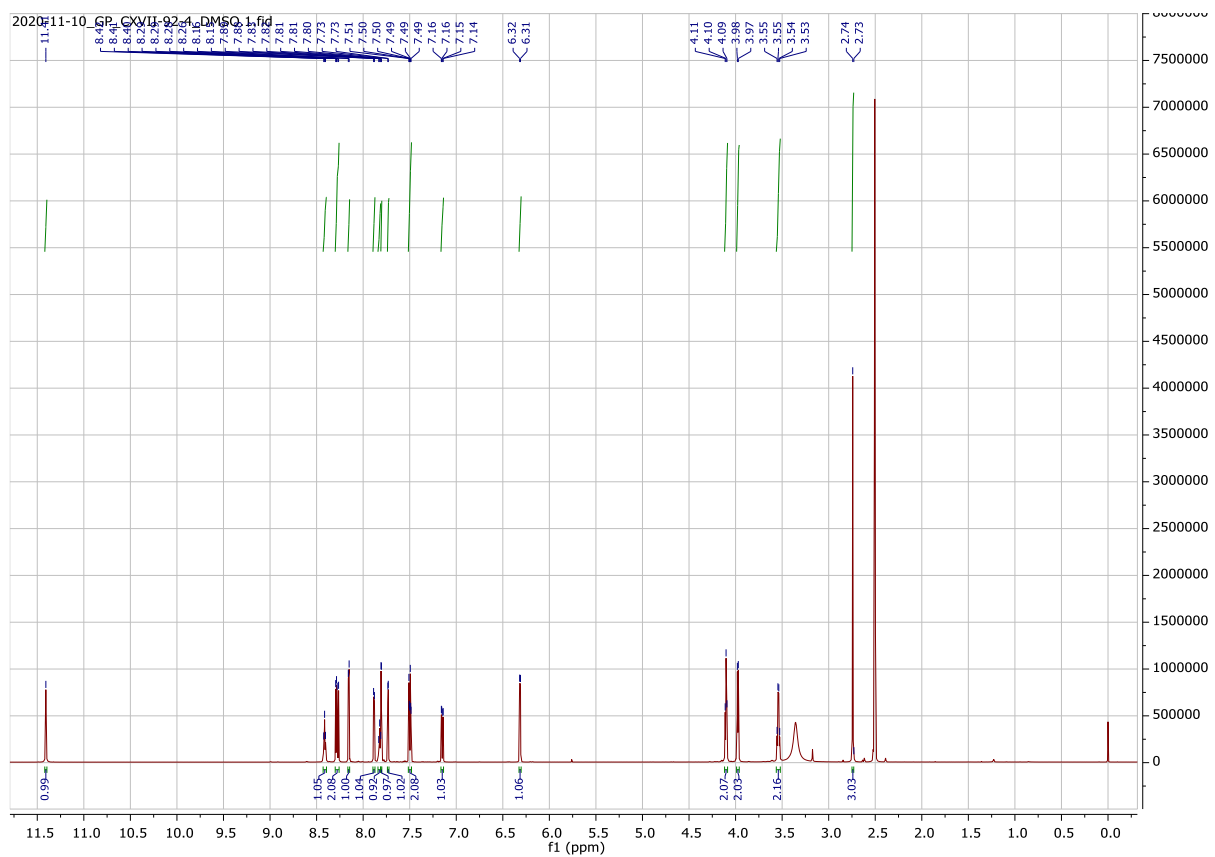












9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Sinteza i karakterizacija amida 3- i 6- supstituiranog derivata β -karbolina i analoga klorokina

Ivana Vilenica

SAŽETAK

U ovom radu sintetizirana su i strukturno okarakterizirana dva nova hibridna spoja **4a** i **4b**, sastavljena od β -karbolinskog prstena koji je amidnom poveznicom preko položaja 3 i 6 povezan s kinolinskim derivatom po uzoru na klorokin.

Za sintezu ovih spojeva bilo je potrebno sintetizirati obje građevne jedinice, kinolinski derivat, (7-klorokinolin-4-il)glicin, i 3- i 6- supstituirane β -karbolinske amine **1e** i **2e**. Priprava amina **1e** i **2e** na položajima β -karbolinskog prstena polazi iz metilnog estera triptofana i 5-metoksitriptamina te se odvija u pet reakcijskih koraka. Najprije Pictet-Spenglerovom kondenzacijom dolazi do nastanka tetrahydro- β -karbolina (**1a** i **2a**), koji se zatim oksidiraju do odgovarajućih β -karbolina **1b** i **2b**. U slučaju amina iz serije **1**, metilni ester na položaju 3 se reducira do primarnog alkohola **1c**. Slijedi konverzija alkoholne u azidnu skupinu uz pomoć donora azida ADMP-a u bazičnim uvjetima čime nastaje odgovarajući azid **1d**, te njegova redukcija u primarni amin **1e**.

Eter na položaju 6 spoja **2b** hidrolizom u kiselom prelazi u odgovarajući fenol **2c**, koji u reakciji nukleofilne supstitucije u bazičnim uvjetima prelazi u spoj **2d** kod kojeg terminalna amino skupina posjeduje Boc-zaštitnu skupinu. Potom se amino skupina oslobađa zaštite, hidrolizom funkcionalne skupine karbamata u kiselom, te nastaje amin **2e**.

Konačni produkti **4a** i **4b** dobiveni su u reakciji amina **1e** i **2e** s (7-klorokinolin-4-il)glicinom (**3**), koristeći standardne *coupling* uvjete (T3P, TEA, DMF).

Strukture sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim spektroskopskim/spektrometrijskim metodama (^1H i ^{13}C NMR, MS, IR). Sva četiri spoja zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, a dobru oralnu bioraspoloživost predviđa im i alat SwissADME. Sintetiziranim derivatima će u daljnjim istraživanjima biti ispitano biološko djelovanje.

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

Rad sadrži: 61 stranica, 20 grafičkih prikaza, 10 tablica i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: hibrid, β -karbolin, klorokin, amid, sinteza

Mentor: **Dr. sc. Ivana Perković**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivana Perković**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Kristina Pavić, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Mirela Matić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Synthesis and characterization of amides of 3- and 6- substituted β -carboline derivatives and chloroquine analogs

Ivana Vilenica

SUMMARY

In this work, two novel hybrid compounds **4a** and **4b**, consisting of a β -carboline ring which is connected to a quinoline derivative via the chloroquine model by an amide bond in positions 3 and 6, were synthesized and characterized.

In order to achieve this goal, building blocks for these compounds were prepared, a quinoline derivative (7-chloroquinolin-4-yl) glycine and 3- and 6-substituted β -carboline amines **1e** and **2e**. The preparation of amines **1e** and **2e** at the β -carboline ring positions starts from the methyl ester of tryptophan and 5-methoxytryptamine and takes place in five reaction steps. First, Pictet-Spengler condensation produces tetrahydro- β -carbolines (**1a** and **2a**), which are then oxidized to the corresponding β -carbolines **1b** and **2b**. In case of amine from series 1, the methyl ester at position 3 is reduced to the primary alcohol **1c**. This is followed by the conversion of the alcohol **1c** to the corresponding azide **1d** by using ADMP under basic conditions, and reduction to the primary amine **1e**.

The ether moiety at the position 6 of the compound **2b** is hydrolyzed in acidic conditions to corresponding phenol **2c**, which in the reaction of nucleophilic substitution under basic conditions is converted to compound **2d** in which the terminal amino group carries a Boc-protecting group. The amino group is then deprotected by acid hydrolysis of the carbamate, and amine **2e** is formed.

The final products **4a** and **4b** were obtained by the reaction of amines **1e** and **2e** with (7-chloroquinolin-4-yl) glycine (**3**), by using standard coupling conditions (T3P, TEA, DMF).

Structures of the newly prepared compounds were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (^1H i ^{13}C NMR, MS, IR). All four novel derivatives meet all of the Lipinski's and Veber's criteria for good oral bioavailability of potential drugs. SwissADME tool predicts good oral bioavailability of all four derivatives. Further studies will investigate biological activity of the prepared compounds.

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

Thesis includes: 61 pages, 20 figures, 10 tables and 46 references. Original is in Croatian language.

Keywords: hybrid, β -carboline, chloroquine, amide, synthesis

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

Reviewers: **Ivana Perković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina Pavić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mirela Matic, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2021.

