Sinteza harmizinina amidnog tipa u položajima O-7 i N-9 β-karbolinskog prstena

Gregorić, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:595909

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Magdalena Gregorić

Sinteza harmizinina amidnog tipa u položajima O-7 i N-9 β-karbolinskog prstena

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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 prof. dr. sc. Zrinke Rajić.

Zahvaljujem se prvenstveno svojoj mentorici, prof. dr. sc. Zrinki Rajić, na ukazanom povjerenju i strpljenju, prenesenom znanju i stručnosti, te pruženoj pomoći u svim koracima izrade ovog rada. Zahvaljujem se i ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na ugodnom društvu, strpljenju i suradljivosti koji su moj boravak ondje učinili ugodnim i vrijednim iskustvom, a posebno asistentu Goranu bez kojeg izrada ovog diplomskog rada nebi bila moguća.

Najveće hvala roditeljima, sestrama i bratu Mateju, te ostatku obitelji na podršci i motivaciji, a najviše strpljenju koje su iskazali kroz razdoblje moga obrazovanja.

Naposlijetku, hvala svim mojim prijateljima na smijehu i predivnim uspomenama stvorenim tijekom studentskih dana.

„Neka nama ništa ne ide, bitno da se pjesma ori.“ G.P.

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
^{1}H NMR	^{1}H nuklearna magnetska rezonancija
ACT	kombinirana terapija koja uključuje artemizinin *(engl. artemizinin-based combination therapy*)
CYP	citokrom P_{450}
DIEA	*N*-etil-*N*-(propan-2-il)propan-2-amin (*N*,*N*-diizopropiletilamin)
DMF	*N*,*N*-dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
ESI	ionizacija elektronskim raspršenjem
GIT	gastrointestinalni sustav
HATU	1-(bis(dimetilamino)metilen)-1*H*-1,2,3-triazolo(4,5-*b*)piridinijev 3-oksid heksafluorfosfat
HIV	virus humane imunodeficijencije
HPLC-*MS/MS*	vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije
HCMV	ljudski citomegalovirus
IR	infracrvena spektroskopija
log K_p	koeficijent propusnosti otopljene tvari kroz *stratum corneum*
log *P*	dekadski logaritam particijskog koeficijenta
KMB	krvno-moždana barijera
MS	masena spektrometrija
NCI	Nacionalni institut za tumore
NF-κB	nuklearni faktor kappa B
P-gp	P-glikoprotein
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

t_t	temperatura tališta
TCM	tradicionalna kineska medicina
TCTP	translacijski kontrolirani tumorski protein
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TNF-α	faktor tumorske nekroze alfa
TPSA	topološka polarna površina
WHO	Svjetska znanstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Artemizinin 2

1.1.1. Otkriće artemizinina 2

1.1.2. Struktura artemizinina 4

1.1.3 Mehanizam djelovanja 5

1.1.3.1. Aktivacija lijeka 5

1.1.3.2. Mete aktiviranog artemizinina 7

1.1.3.3. Rezistencija 8

1.1.3.4. Toksičnost 8

1.1.4. Primjena artemizinina 9

1.1.4.1. Artemizinin kao antimalarik 10

1.1.4.2. Artemizinin i njegovo antikancerogeno djelovanje 10

1.1.4.3. Artemizinin i njegovo antibakterijsko djelovanje 12

1.1.4.4. Artemizinin i njegovo antivirusno djelovanje 12

1.1.4.5. Artemizinin i njegovo antifungalno djelovanje 13

2. OBRAZLOŽENJE TEME 14

3. MATERIJALI I METODE 16

3.1 Sinteza tert-butil(2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)etil) karbamata (**1**) 18

3.2 Sinteza 2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)etan-1-amina (**2**) 18

3.3 Sinteza 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-ola (**4**) 19

3.4 Sinteza tert-butil(2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)oksi)etil)karbamata (**5**) 19

3.5 Sinteza 2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)oksi)etan-1-amina (**6**) 20

3.6 Sinteza harmizinina **3** i **7**. Opća metoda 21

4. REZULTATI I RASPRAVA 23

5. ZAKLJUČAK 34

6. LITERATURA 36

7. SAŽETAK/SUMMARY 41

8. PRILOZI 44

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD.....49

1. UVOD

1.1. Artemizinin

Artemizinin, vrlo učinkovita djelatna tvar izolirana iz biljke slatki pelin (*Artemisia annua*, Asteraceae) posjeduje antivirusno, antibakterijsko, antifungalno, antimalarijsko, protuupalno i citostatsko djelovanje. Karakterističan po svojoj jedinstvenoj kemijskoj strukturi, smatra se najučinkovitijim lijekom za liječenje nekomplicirane malarije, ali i ozbiljnog kompliciranog oblika malarije uzrokovane parazitom *Plasmodium falciparum*. Malarija je akutna, ali izlječiva bolest ako se na vrijeme primjeni potrebna terapija. Prema zadnjim smjernicama, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) preporuča kombiniranu terapiju koja uključuje artemizinin (engl. *artemizinin-based combination therapy*, ACT) kao prvu liniju u liječenju nekomplicirane malarije, a intravensku primjenu artezunata, jednog od derivata artemizinina, u liječenju komplicirane uznapredovale malarije u odraslih bolesnika (*World Health Organisation*, 2015). Godine istraživanja i proučavanja djelovanja ovog lijeka pokazale su visoku učinkovitost, malo neželjenih nuspojava i nisku učestalost rezistencije što je zaslužno za to što je artemizinin i dalje temelj antimalarijske terapije. Daljnjim istraživanjima u budućnosti očekuje se proširenje postojećeg znanja o mehanizmu djelovanja artemizinina, zbog čega bi se i spektar upotrebe ovog lijeka mogao proširiti na liječenje onkoloških bolesnika ili čak virusnih infekcija (Wang i sur., 2019).

1.1.1. Otkriće artemizinina

Otkriće mnogih učinkovitih insekticida i antimalarijskih lijekova, u godinama nakon Drugog svjetskog rata, pomoglo je u borbi protiv malarije koja je u to vrijeme zadavala velike probleme diljem svijeta. Dok je WHO bila posebno ponosna na otkriće klorokina i rješavanje velikog zdravstvenog problema, već 50-ih godina 20. stoljeća susrela se s novom prijetnjom. Izazov pred kojim se WHO tada pronašla bila je pojava malarije, čiji je uzročnik bio otporan na sve postojeće lijekove. To je bila glavna prekretnica zbog koje je potreba za pronalaskom i otkrićem novih lijekova u terapiji malarije bila povećana. Nekoliko godina kasnije, 1970-ih godina otkriven je artemizinin. U to vrijeme, u Kini je na snazi bila „Kulturna revolucija“ koja nije dozvoljavala znanstvena istraživanja niti njihovu publikaciju. Bez obzira na tadašnje zakone, 1967. godine u Pekingu je pokrenuta tajna operacija pod nazivom Projekt 523. Taj je projekt pokrenut kao odgovor Vijetnamskoj vladi koja je tražila pomoć u liječenju malarije. Profesorica You-You Tu postavljena je kao voditeljica projekta, a cilj je bio istražiti stare kineske recepte koji posjeduju antimalarijsko djelovanje. Profesorica Tu i njezina grupa mladih

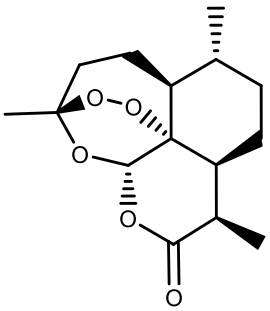
znanstvenika pregledala je preko 2000 starih recepata iz tradicionalne kineske medicine (engl. *Traditional Chinese Medicine,* TCM) od kojih je oko 640 imalo antimalarijsko djelovanje. Profesorica Tu primijetila je kako se u većini tih recepata spominje biljka slatki pelin, *Artemisia annua,* Asteraceae. Pretpostavka je bila kako je to biljka koja ispoljava antimalarijsko djelovanje i s kojom treba ići dalje u istraživanja. Grupa znanstvenika pod vodstvom profesorice Tu, ispitala je djelovanje ekstrakta biljke *A. annua* na prijenosniku malarije *Plasmodium berghei,* pri čemu je inhibitorna učinkovitost bila tek oko 68% uz lošu stabilnost pripravka, što je dovodilo do pada aktivnosti s vremenom (Wang i sur., 2019).

Dubljim istraživanjem tisućljećima starih recepata, profesorica Tu pronašla je spis u kojem je bio opisan način dobivanja „soka“ iz biljke Qinghao (*A. annua*) u kojem je spomenuto kako je biljku, uz naglasak na list biljke, potrebno obraditi hladnom vodom, a ne vrućom, kako se tada koristilo u TCM. Profesorica Tu izvela je ekstrakciju listova biljke *A. annua* na nižim temperaturama te je tako dobiveni ekstrakt biljke pokazao vrlo snažno djelovanje na uzročnika malarije *P. berghei* u mišu. Međutim, usprkos visokoj učinkovitosti, ovakav ekstrakt bio je i visoke toksičnosti za ispitivane životinje. Idući korak bio je odvojiti kiseline iz ekstrakta, koje nisu pokazivale antimalarijski učinak, dok je preostali dio ekstrakta pokazao smanjenu toksičnost, a u isto vrijeme zadržao veliku učinkovitost. S obzirom na vrijeme u kojem su se ova istraživanja odvijala, kineska Kulturna revolucija nije dozvoljavala klinička istraživanja novih lijekova, osim ako je dokazana neškodljivost za ljude. Profesorica Tu i njezina grupa, kako bi dokazali netoksičnost, neškodljivost i sigurnost primjene dobivenog ekstrakta i ubrzali cijeli proces ispitivanja potencijalno novog lijeka, dobrovoljno su odlučili provesti prva istraživanja toksičnosti na sebi. Prema rezultatima, ekstrakt je utvrđen kao siguran i neškodljiv te je dobio odobrenje da se provedu klinička istraživanja (Tu i sur., 2016).

Klinička istraživanja provedena su u bolnici u kineskoj provinciji Hainan na 21 bolesniku te je ispitivani ekstrakt pokazao do 100%-tnu aktivnost u liječenju malarije uzrokovane *P. vivax* i *P. falciparum*. Također je pokazao veću učinkovitost u snižavanju visoke tjelesne temperature i broja parazita u odnosu na kontrolnu grupu pacijenata liječenih klorokinom. 1972. godine profesorica Tu izvijestila je nadležne o rezultatima kliničkih istraživanja i dokazanoj kliničkoj učinkovitosti, nakon čega se lijek proširio na nacionalnu razinu. Iste je godine grupa znanstvenika zajedno sa profesoricom Tu uspjela izolirati artemizinin, kemijski spoj molekulske formule $C_{15}H_{22}O_5$ i točke tališta oko 156 – 157 °C te su ga nazvali Qinghaosu po kineskom imenu biljke iz koje je izoliran. Kasnije su identificirali i nekoliko derivata artemizinina, od kojih je najznačajniji dihidroartemizinin koji je topljiviji u vodi zbog čega pokazuje bolje djelovanje i učinkovitost (Liao i sur., 2009).

Otkriće artemizinina predstavlja veliki doprinos rješavanju globalnog zdravstvenog problema. Artemizinin je u velikoj mjeri smanjio smrtnost kod oboljelih od malarije i na taj način spasio mnoge živote. Za otkriće velike zasluge idu Kini, a posebno profesorici You-You Tu koja je zbog svog velikog doprinosa 2015. godine dobila Nobelovu nagradu za medicinu, pri čemu je i sama napomenula kako najveće zahvale idu TCM (Su i Miller, 2016).

1.1.2. Struktura artemizinina



Slika 1. Struktura artemizinina

Artemizininu je, prema podacima dobivenim masenom spektrometrijom, infracrvenom spektroskopijom i nuklearnom magnetskom rezonancijom, utvrđen broj i vrsta atoma u molekuli te molekulska formula spoja, $C_{15}H_{22}O_5$. Veliki izazov predstavljalo je utvrđivanje točne strukture ovoga spoja, odnosno kako povezati pet kisikovih atoma u strukturu sa petnaest ugljikovih atoma. Početna pretpostavka bila je kako je spoj peroksid, međutim ta je pretpostavka odbačena s obzirom da se tada vjerovalo da su svi peroksidi nestabilni, za razliku od artemizinina koji je relativno stabilan spoj. Ideja o artemizininu kao spoju koji u svojoj strukturi sadrži peroksidnu vezu napuštena je sve do 1974. kada je otkriven još jedan antimalarik koji u svojoj strukturi sadrži peroksid. Nakon toga, mnogim kvantitativnim i kvalitativnim karakterizacijama utvrđeno je kako artemizinin uistinu jest peroksid. Međutim, tek je 1977. rendgenskom kristalografijom utvrđena točna struktura, tj. pozicija peroksidnog mosta u seskviterpenskoj strukturi koja uključuje lakton, kao i apsolutna konfiguracija artemizinina (Li i sur., 2018).

1.1.3. Mehanizam djelovanja

Iako je prošlo gotovo pola stoljeća od otkrića artemizinina i njegovih derivata, kao i dokaza o njihovoj učinkovitosti u terapiji malarije, još uvijek se vrše istraživanja na području mehanizma djelovanja, aktivacije lijeka kao i metama na koje djeluje aktivirani artemizinin. Do sada je utvrđeno kako je artemizinin stabilna, ali visoko učinkovita molekula koju karakterizira brzo djelovanje, niska toksičnost i vrlo kratko vrijeme polueliminacije. Zbog takve specifične farmakokinetike WHO je u svojim smjernicama kao prvu liniju u liječenju malarije odabrao artemizinin u kombinaciji s dugodjelujućim antimalaricima (German i Aweeka, 2008). Smatra se kako artemizinin svoj učinak ostvaruje aktivacijom lijeka u reaktivnu molekulu i daljnjim reakcijama alkilacije aktivirane molekule artemizinina s biološkim metama. U zadnjih se nekoliko godina novim pristupima proteomike identificiralo nekoliko meta na koje artemizinin djeluje, no mete i dalje nisu u potpunosti poznate. Iz tog razloga, u budućnosti područje fokusa proučavanja artemizinina bit će istraživanje i otkrivanje ključnih meta artemizinina kako bi se doznao precizan mehanizam djelovanja (Ma i sur., 2020).

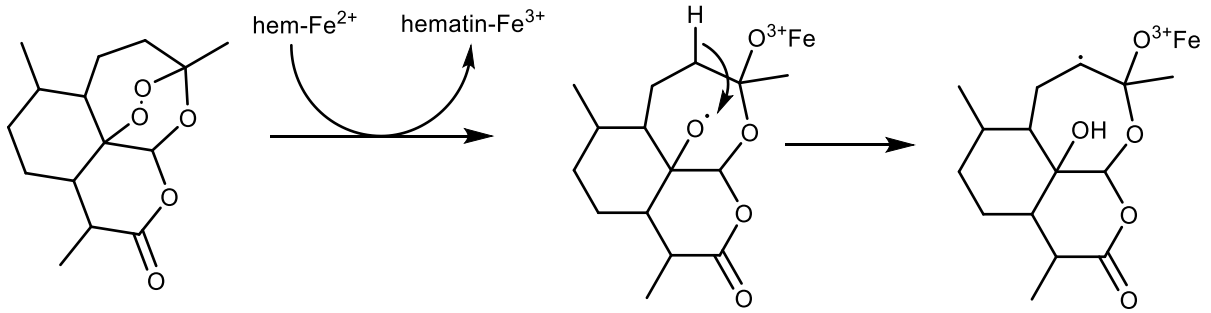
1.1.3.1. Aktivacija lijeka

Prema dosadašnjim istraživanjima, dio molekule artemizinina odgovoran za njegovo antimalarijsko djelovanje jest 1,2,4-trioksanski prsten unutar seskviterpenske strukture. Još 1988. godine su A. Brossi i sur. utvrdili prvi korak u razumijevanju mehanizma djelovanja artemizinina protiv malarije, a to je posjedovanje endoperoksidnog mosta. U svojem su istraživanju izolirali deoksiartemizinin, jedan od metabolita artemizinina pronađen u urinu ljudi liječenih artemizininom. Deoksiartemizinin u svojoj strukturi ne sadrži endoperoksidni most, već je on reduciran u eter. Njihova istraživanja na miševima pokazala su kako deoksiartemizinin ne posjeduje antimalarijsko djelovanje za razliku od artemizinina. Budući da je jedina razlika u njihovoj strukturi posjedovanje endoperoksidnog mosta koji je u deoksiartemizininu zamijenjen eterskom vezom, već se tada shvatilo da je ključ antimalarijskog djelovanja upravo u visoko reaktivnom peroksidnom dijelu molekule (Brossi i sur., 1988).

Artemizinin se smatra prolijekom čiji metabolizam i aktivacija mogu ići preko dihidroartemizinina, ali i ne moraju. Nastali dihidroartemizinin u svojoj strukturi ne sadrži laktonski prsten, čime je povećana stabilnost molekule, kao i vrijeme polueliminacije, što vodi produljenom antimalarijskom djelovanju. Pokazano je kako je laktonski prsten puno osjetljiviji na nizak pH nego što je to endoperoksidni most te se samim time antimalarijsko djelovanje

ovog spoja ne može pripisati kiseloj razgradnji peroksida, kao što je to ranije bilo predloženo (Robert i sur., 2002). Umjesto toga, dolazi do pucanja endoperoksidnog mosta unutar seskviterpenske strukture artemizinina/dihidroartemizinina, čime se generiraju vrlo učinkovite reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) za koje se vjeruje da su odgovorne za antimalarijsko djelovanje.

Uzročnici malarije roda *Plasmodium* mijenjaju nekoliko razvojnih faza tijekom svog životnog ciklusa u čovjeku. Njihov životni ciklus dijeli se na eritrocitnu i egzoeritrocitnu fazu. Egzoeritrocitna (nespolna) faza razvoja plazmodija odvija se u jetri i završava puknućem shizonata plazmodija čime se merozoitni oblik plazmodija oslobađa u cirkulaciju. Merozoiti napadaju crvene krvne stanice i u njima prelaze u trofozoite, koji su zatim odgovorni za proteolizu hemoglobina kojeg koriste kao izvor aminokiselina koje su im potrebne za preživljavanje i razmnožavanje (eritrocitna/spolna faza) (Francis i sur., 1997). Intraeritrocitni parazit ima pristup neograničenim količinama hemoglobina, i doista razgrađuje oko 75% hemoglobina unutar stanice (Nectarios i sur., 2013). U tom procesu iz hemoglobina nastaje molekula hema koja u svojoj strukturi sadrži porfirin povezan s dvovalentnim željezom, koji ima potencijal reagirati s drugim molekulama. Upravo je taj korak oslobađanja hema unutar eritrocita tijekom razgradnje hemoglobina ključan korak u razumijevanju selektivnosti artemizinina prema inficiranim stanicama (Meshnick i sur., 2002). Željezo iz hema reagira s endoperoksidom artemizinina, dolazi do pucanja veze i nastanka slobodnih kisikovih radikala, koji se kasnije prevode u slobodne radikale u čijem se središtu nalazi atom ugljika (Slika 2.) (Cumming i sur., 1997).



Slika 2. Pucanje endoperoksidnog mosta u pristutstvu hema i aktivacija artemizinina

1.1.3.2. Mete djelovanja lijeka

Iako se točne mete djelovanja artemizinina još uvijek istražuju, današnje spoznaje dovele su nas do zaključka kako artemizinin, s obzirom na svoj oksidacijski potencijal i aktivaciju, ne djeluje kao ostali oksidansi oštećujući proteine, nukleinske kiseline i lipide. Zhang i sur. u svojemu radu pokazali su kako je artemizinin specifičan po tome što oksidacija nije reverzibilna, odnosno oksidirani oblik ne može se više vratiti u reducirano stanje karakterizirano endoperoksidnim mostom (Zhang i sur., 1992). Posljedica ovog svojstva artemizinina jest što iz jedne molekule artemizinina nastaje samo jedan slobodni radikal. Prema tome, kada bi jedini mehanizam djelovanja artemizinina bio nastajanje slobodnih radikala, bile bi potrebne puno veće količine artemizinina nego što zbilja jesu. Artemizinin djeluje već pri jako niskim koncentracijama stoga je zaključak kako postoji još neki selektivni mehanizam djelovanja, koji ovome lijeku osigurava veliku učinkovitost (Meshnick i sur., 2002).

Meshnick je u svome radu 2002. godine prvi identificirao i opisao stvaranje adukata između artemizinina i hema masenom spektrometrijom. Kasnije su istraživanja na miševima pokazala kako aktivni endoperoksidi u inficiranim miševima reagiraju s porfirinskim prstenovima stvarajući adukte, za razliku od zdravih miševa, kod kojih nije došlo do aktivacije artemizinina i endoperoksidnog mosta, što je dovelo do zaključka da nastajanje adukata ima važnu ulogu u uništenju parazita (Robert i sur., 2005). Dakle, hem služi i kao aktivator artemizinina i kao meta aktiviranog artemizinina.

Jedan od vjerojatnih mehanizama uključuje i vezanje aktiviranog artemizinina na ciljane proteine plazmodija, odnosno alkilacija ciljnih proteina. Nekoliko istraživanja potvrdilo je kako se artemizinin kovalentno veže na četiri velika membranska proteina u plazmodiju. Najmanji od ta četiri proteina, translacijski kontrolirani tumorski protein (engl. *translational controlled tumor protein*, TCTP), najistraživanija je meta artemizinina, iako se ne zna njegova točna uloga. Druga meta artemizinina, koja je znanstvenicima bila od interesa, jest enzim *Pf*ATP6, Ca^{2+}-ATPaza prisutna u endoplazmatskom retikulumu. Znanstvenici su pokazali kako izlaganjem plazmodija artemizininu dolazi do vrlo brzog oticanja endoplazmatskog retikuluma, a nakon toga i smrti stanice, što je vjerojatno povezano s vezanjem artemizinina na enzim *Pf*ATP6 (Eckstein-Ludwig i sur., 2003).

1.1.3.3. Rezistencija

Rezistencija na antimalarike definirana je kao sposobnost soja parazita da preživi ili da se razmnožava unatoč primjeni i apsorpciji lijeka u dozi jednakoj ili višoj od preporučene (World malaria report, 2021). Poznato je kako rezistencija na lijekove najčešće nastaje uslijed genetske mutacije parazita, stoga se kombiniranom terapijom lijekovima različitog mehanizma djelovanja smanjuje mogućnost pojave rezistencije. Rezistencija na artemizinin, kao i na kombiniranu terapiju temeljenu na artemizininu, prvi je puta uočena i dokazana u zapadnoj Kambodži. Nakon toga, rezistencija se počela širiti ostatkom Azije, a zatim i cijelim svijetom (Siddiqui F.A i sur, 2021).

Različita istraživanja pokazala su kako su u pozadini rezistencije na artemizinin prisutni razni molekularni procesi i genetske mutacije. Dolazi do promjene u različitim metaboličkim putevima. Primjerice, ekspanzija PI3P vezikula učinkovito inducira porast otpornosti na artemizinin. Radi se o vezikulama čije je formiranje, kao i uloga, složen proces koji može utjecati i mijenjati oblik parazita, ali i samih eritrocita (Suresh i Haldar, 2018). Također, nedavne su studije pokazale smanjenu osjetljivost na artemizinin u plazmodija s područja Francuske Gvajane, kod kojih je izolirana posebna S769N mutacija u genu za *Pf*ATP6, što potvrđuje da je *Pf*ATP6 važna meta artemizinina (Jambou i sur., 2005).

Istraživanja su pokazala kako je u ljudi plazmodij razvio rezistenciju na artemizinin u samo jednoj fazi svog životnog ciklusa, tj. kada je u obliku trofozoita. Danas nije prijavljen niti jedan slučaj rezistencije plazmodija na artemizinin u nekom drugom obliku ili u drugoj fazi životnog ciklusa, kao što nije poznato može li ta rezistencija koju je plazmodij razvio i dalje evoluirati, tj. da plazmodij i u drugim fazama ciklusa i u drugim oblicima postane rezistentan, stoga je rezistenciju prikladnije nazvati „djelomičnom rezistencijom“. Zbog postojanja kombinirane terapije, ipak je uspješnost izlječenja malarije kod osoba zaraženih djelomično rezistentnim sojevima na artemizinin prilično velika (https://www.who.int/).

1.1.3.4. Toksičnost

Artemizinin je prolijek koji tek u aktiviranom obliku generira ROS, uzrokuje oksidativni stres i alkilaciju raznih proteina. Selektivnost i učinkovitost artemizinina povezani su s njegovom aktivacijom u inficiranim stanicama, zbog čega se smatra relativno sigurnim lijekom. Međutim, prema istraživanjima na životinjama, primjena artemizinina i njegovih derivata kroz

duži vremenski period, kao i primjena visokih doza može dovesti do toksičnih učinaka artemizinina na razne organske sustave.

Ispitivanja embriotoksičnosti artemizinina provedena su i na životinjama i na ljudima gdje je pronađen smanjen broj retikulocita, ali broj malformacija, pobačaja ili preranih rođenja nije se statistički značajno razlikovao od kontrolne grupe koja nije bila na terapiji artemizininom (Efferth i Kaina, 2010). Znanstvenici smatraju kako je jedan od mogućih mehanizama embriotoksičnosti ovoga lijeka inhibicija eritropoeze. Zbog dobivenih eksperimentalnih podataka na životinjama, WHO ne preporuča korištenje artemizinina u prvom tromjesečju trudnoće kako bi smanjili rizik od embriotoksičnosti (WHO, 2015).

In vitro studije, kao i pokusi na životinjama i klinička istraživanja na ljudima pokazala su kako artemizinin u nekim slučajevima ima neželjene reakcije kao što su ataksija, tremor ili gubitak sluha, što se povezuje s potencijalnom neurotoksičnosti. Eksperimenti na sisavcima pokazali su kako intramuskularna primjena lipofilnih derivata artemizinina, kao što je artemeter, uzrokuje oštećenja nekih dijelova mozga zaduženih za sluh ili vestibularne reflekse. Također je ispitivana oralna primjena lipofilnih derivata artemizinina i dokazano je kako je neurotoksičnost povećana u slučajevima kada je lijek primjenjen u lipofilnoj suspenziji ili s masnom hranom. Zaključak jest kako je lijek siguran ako se koristi u terapijskim dozama za liječenje malarije, jednom dnevno kroz tri dana, za razliku od kronične primjene artemizinina i njegovih derivata, koja bi se mogla primjenjivati kao alternativna metoda liječenja kroničnih bolesti ili raka (Medhi B i sur., 2009).

Tijekom godina istraživani su i mnogi drugi potencijalni toksični učinci artemizinina kao što su nefrotoksičnost, genotoksičnost, imunotoksičnost, hematotoksičnost i kardiotoksičnost. Zanimljivo je kako je artemizinin u nano do mikro koncentracijama pokazao izrazito citotoksično djelovanje na stanice tumora. Ova se karakteristika artemizinina danas intenzivno istražuje kao potencijalno važno otkriće u terapiji tumora. Oralna primjena artemizinina pokazana je kao siguran put primjene za razliku od intramuskularne primjene gdje se artemizinin odlaže u masno tkivo gdje nastaje depo zbog kojeg kasnije može doći do toksičnih učinaka (Efferth i Kaina, 2010).

1.1.4. Primjena artemizinina

Od otkrića artemizinina do danas prošlo je oko pola stoljeća. Zadnja tri desetljeća Kina i SAD zaslužni su za velik broj znanstvenih istraživanja čiji je cilj bio istražiti molekulu artemizinina, njegovu sintezu, način primjene, farmakokinetiku, rezistenciju i djelovanje. S

obzirom da artemizinin posjeduje relativno nisku toksičnost, ali širok spektar djelovanja, znanstvenici diljem svijeta ulažu napore kako bi otkrili nove derivate artemizinina s potencijalnim biološkim djelovanjem. Danas je najpoznatija indikacija artemizinina terapija malarije, međutim moguća je njegova primjena u terapiji raka, virusnih ili bakterijskih infekcija (Liu i sur., 2020).

1.1.4.1. Artemizinin kao antimalarik

Artemizinin i njegovi derivati (artemeter, arteeter, artenimol, artezunat, dihidroartemizinin) u kombinaciji sa dugodjelujućim antimalaricima, koji se sporije izlučuju iz organizma, danas su prvi izbor za liječenje malarije prema smjernicama koje je donio WHO (npr. artezunat + amodiakin, artemeter + lumefantrin, artenimol + piperakin). Također, preporučeno trajanje terapije je 3 dana, a doza se prilagođava s obzirom na tjelesnu masu pacijenta (WHO Guidelines for the treatment of malaria third edition, 2015).

Iako je ACT pokazala veliku učinkovitost i pripada joj ogromna zasluga u kontroliranju malarije na globalnoj razini, mnogi oboljeli od malarije zapravo si takvu terapiju ne mogu priuštiti. Troškovi, kao i raspolaganje lijekovima, ostaju velika zapreka. Postoje mnoge javnozdravstvene organizacije i projekti koji uspijevaju osigurati dovoljnu količinu potrebnih lijekova siromašnim i udaljenim dijelovima svijeta. Međutim, i dalje ostaje izazov prikupiti dovoljno sredstava, smisliti najoptimalniju strategiju upravljanja prikupljenim sredstvima te uspostaviti mehanizam praćenja i evaluacije u svrhu reduciranja broja zaraženih i prevencije rezistencije (Nosten i sur., 2007).

1.1.4.2. Artemizinin i njegovo antikancerogeno djelovanje

Aktivirani oblik artemizinina u obliku slobodnog radikala u čijem se središtu nalazi atom ugljika, zbog svoje velike sposobnosti alkiliranja drugih molekula, možemo ubrojiti u visoko učinkovite alkilirajuće agense. Zbog alkilirajućeg svojstva aktivirana molekula artemizinina reagira s nukleofilima na nukleinskim bazama, pri čemu se sprječava replikacija i transkripcija DNA. To je otkriveno još davne 1980. godine kada je i prvi puta uočeno citotoksično djelovanje artemizinina na humane stanice (Olliaro i sur., 2001). Od tada do danas provedena su mnoga *in vitro* i *in vivo* istraživanja na životinjama, koja su uključivala artemizinin i njegove derivate (dihidroartemizinin i artezunat) kao potencijalne antikancerogene agense.

Mehanizam citostatskog djelovanja artemizinina može se, ali i ne mora, povezati s posjedovanjem endoperoksidnog mosta u strukturi. Derivati artemizinina koji u svojoj strukturi ne posjeduju endoperoksidni most također su pokazali antikancerogeno djelovanje, ali čak pedeset puta slabije u usporedbi s citotoksičnim djelovanjem molekula koji u strukturi sadrže endoperoksidni most. Dio citostatske aktivnosti može se pripisati i alternativnim mehanizmima, koji ne uključuju endoperoksidni most, kao što su interferencija s mnogim signalnim putevima u malignim tumorskim stanicama (Beekman i sur., 1995). Budući da postoje posebne mete u plazmodiju koje alkilira aktivirani artemizinin, da bi artemizinin i derivati postigli toksičnost prema humanim tumorskim stanicama potrebne su puno veće koncentracije lijeka i učestalija primjena s obzirom da se radi o kroničnim bolestima, za razliku od malarije koja je akutna infekcija.

Dihidroartemizinin, artezunat i artemeter moduliraju gene, čime reguliraju razinu raznih faktora rasta, apoptozu, proliferaciju, angiogenezu i rast tkiva. Od navedenih derivata artemizinina, najsnažnije djelovanje, citostatsko i citotoksično, pokazuje dihidroartemizinin (Crespo-Ortiz i Wei, 2012). Istraživanje koje je proveo Nacionalni institut za tumore (engl. *National Cancer Institute*, NCI) na 55 staničnih linija pokazalo je kako artezunat djeluje na humane tumorske stanične linije leukemije, melanoma, tumora debelog crijeva, raka dojke, jajnika, prostate i bubrega (Efferth i sur., 2003).

Poznato je kako polusintetski derivat artemizinina, artezunat, pokazuje antiproliferativno djelovanje u istraživanjima *in vitro*. Također, istraživanjem je dokazano kako inhibira nastanak novih mikrovena, odnosno inhibira angiogenezu na način da smanjuje ekspresiju VEGF, koji vezanjem na receptore stimulira angiogenezu. Poznato je kako razina VEGF u endotelnim stanicama korelira s velikom sposobnošću stanice za preživljavanje, kao i rezistencijom na apoptozu. Budući da artezunat ima sposobnost smanjiti razinu VEGF-a, samim time smanjuje i sposobnost preživljavanja endotelnih stanica te stimulira apoptozu tumorskih i endotelnih stanica. Zbog ovog se otkrića smatra kako da bi se artezunat mogao koristiti u terapiji leukemije samostalno ili u kombinaciji s drugim kemoterapeuticima (Chen i sur., 2007).

S obzirom na mnoge dokaze o učinkovitosti derivata artemizinina prema tumorskim stanicama, trenutno su derivati artemizinina alternativni lijekovi u terapiji metastatskih i agresivnih tumora koji nemaju uspješnu dugoročnu terapiju i rezistentni su na postojeću antitumorsku terapiju. Moraju se primjenjivati u točno određenim dozama i ciklusima kako se ne bi pojavili toksični učinci. Ovi antimalarijski lijekovi, u kombinaciji s drugim antitumorskim lijekovima, postižu dobru sinergiju s minimalnim neželjenim nuspojavama (Ma i sur., 2021).

1.1.4.3. Artemizinin i njegovo antibakterijsko djelovanje

Antibakterijska aktivnost artemizinina, njegovih derivata, kao i prekursora, istraživana je na nekoliko sojeva bakterija. Smatra se kako je mehanizam djelovanja protiv bakterija sličan aminoglikozidima, odnosno inhibicijom sinteze proteina bakterije. Baktericidno djelovanje artemizinin je pokazao prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama (Appalasamy i sur., 2014). Budući da nedostaje podataka o značajnijem antibakterijskom djelovanju, artemizinin se u ovoj indikaciji ne koristi.

Istraživanjem na miševima pokazano je kako artemizinin pokazuje izvrsnu sinergiju u kombinaciji s klasičnim antibioticima u liječenju teške infekcije s *E. coli*. Rani pokazatelj sepse u organizmu velika je količina citokina TNF-α. Kod miševa koji su dobivali artemizinin, uz klasični antibiotik, pronađena je značajno manja količina TNF-α nego u onih koji su dobivali samo antibiotik. Pokazano je da artemizinin djeluje protuupalno, jer blokira aktivaciju NF-κB, čime sprječava lučenje upalnih citokina, a samim time sprječava upalu (Wang i sur, 2006).

1.1.4.4. Artemizinin i njegovo antivirusno djelovanje

Antivirusno djelovanje artemizinina prvi su puta spomenuli i opisali kineski znanstvenici u svom radu još 1982. godine (Qian i sur., 1982), a do danas su provedena brojna istraživanja koja su potvrdila njegovu učinkovitost u terapiji virusnih infekcija.

Artezunat se pokazao vrlo učinkovitim u terapiji infekcije humanim citomegalovirusom (HCMV). Mehanizam djelovanja povezan je s inhibicijom aktivacije signalnog puta povezanog s NF-κB, koji je potreban za replikaciju virusa. Zanimljivo je kako je artezunat pokazao vrlo sličnu učinkovitost i protiv mutiranog HCMV rezistentnog na ganciklovir. Opisano je i kliničko istraživanje djelovanja artezunata u terapiji HCMV rezistentnog na klasičnu terapiju antiviroticima, u kojemu je artezunat pokazao visoku učinkovitost i dobru podnošljivost. Nadalje, artezunat je pokazao slično djelovanje na herpes simplex virus, Epstein-Barrov virus te virus hepatitisa B i C u kombinaciji s postojećim antiviroticima. Učinkovitost protiv HIV-1 nije zabilježena, međutim zanimljivo je kako je antimalarijska aktivnost artemizinina i njegovih derivata u bolesnika oboljelih od HIV-a smanjena i ovisi o imunosnom sustavu oboljele osobe (Efferth i sur., 2008).

1.1.4.5. Artemizinin i njegovo antifungalno djelovanje

Antifungalno djelovanje artemizinina i njegovih derivata opisano je u nekoliko radova. Neki od derivata artemizinina pokazali su fungistatsko djelovanje na gljivice *Cryptococcus neoformans*, za razliku od djelovanja na *Candidu albicans*, gdje nisu pokazali nikakvu aktivnost. Mehanizam djelovanja ovih molekula na gljivice smatra se vrlo sličnim mehanizmu djelovanja amfotericina B ili kaspofungina (Galal i sur., 2005).

Novije je istraživanje provedeno na miševima u svrhu prevencije rezistencije na antifungalne lijekove. Miševima oboljelim od oralne kandidijaze u klasičnu terapiju amfotericinom B dodan je artemizinin koji je pokazao odlično sinergijsko djelovanje. Artemizinin povećava ekspresiju gena važnih u biosintezi ergosterola i na taj način povećava razinu ergosterola u gljivici. Višak ergosterola zaslužan je za lakše vezanje amfotericina B na stanicu gljivice, a time i bolji učinak. Dodatkom artemizinina u terapiju oralne kandidijaze smanjuje se potrebna doza amfotericina B (Zhu i sur, 2021).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Malarija je infektivna bolest koja predstavlja veliki svjetski zdravstveni problem. U 2020. godini prijavljeno je preko 240 milijuna slučajeva malarije u 85 endemskih zemalja, pri čemu je čak 627 tisuća slučajeva završilo smrtnim ishodom (World malaria report, 2021). Premda postoje brojni antimalarici koji su već godinama u upotrebi, današnje liječenje malarije susreće se s ozbiljnim problemom pojave rezistencije na postojeće lijekove. Tijekom godina plazmodij je razvio različite mehanizme pomoću kojih se uspijeva razmnožavati i preživjeti u domaćinu unatoč terapiji, zbog čega znanstvena zajednica ulaže velike napore u rješavanju ovog problema kako bi poboljšali kvalitetu života ljudi u endemskim područjima gdje je malarija prisutna.

Jedan od obećavajućih pristupa u rješavanju ovog problema je sinteza hibridnih spojeva. Hibridni spojevi su kombinacija dva različita aktivna spoja koji su povezani kovalentnom vezom, što rezultira sinergijom učinaka, pri čemu je farmakološko djelovanje veće od zbroja farmakološkog djelovanja svakog pojedinog spoja (Muller-Schiffmann i sur., 2012). Na taj način moguće je sintetizirati hibridni spoj koji se sastoji od dva antimalarijska lijeka različitih mehanizama djelovanja čija će farmakokinetička svojstva biti poboljšana, a učinkovitost povećana i na taj način će se smanjiti rizik od rezistencije.

Harmin je β-karbolinski alkaloid izoliran iz sjemenki biljke *Peganum harmala*, Nitrariaceae, koji pokazuje različita farmakološka djelovanja, između kojih i antimalarijsko djelovanje dokazano *in vitro* i *in vivo* studijama. Mehanizam djelovanja harmina je selektivno vezanje na protein toplinskog šoka 90 P. falciparum (*Pf*Hsp90), što sprječava razvoj plazmodija u intraeritrocitnoj fazi životnog ciklusa (Shahinas i sur., 2012).

Cilj ovog diplomskog rada jest sinteza i karakterizacija harmizinina, hibridnih spojeva harmina i artemizinina reakcijom povezivanja (engl. *coupling reaction*) u svrhu sinteze novih spojeva s antimalarijskim djelovanjem. Reakcijom povezivanja nastaje amidna veza, a za reakciju je potreban tzv. *coupling* reagens 1-[*bis*(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinij 3-oksid heksafluorofosfat (HATU) i baza *N*,*N*-diizopropiletilamin (DIEA). HATU ima ulogu tvorbe aktiviranog estera, a DIEA je baza koja služi za deprotonaciju karboksilne kiseline i amina koji sudjeluje u reakciji povezivanja.

U kasnijim istraživanjima, koja nadilaze okvire ovog diplomskog rada, bit će ispitano antimalarijsko djelovanje sintetiziranih spojeva.

3. MATERIJALI I METODE

Tijek kemijskih reakcija, kao i čistoća dobivenih produkata i međuprodukata, praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Kao nepokretna faza TLC-a korištene su ploče silikagela 60 F_{254} (Merck, Njemačka), dok su smjese otapala diklormetan/metanol (8:1), diklormetan/metanol (9:1) i cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) korištene kao pokretna faza. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem (λ = 254 nm) i parama joda. Za pročišćavanje i izolaciju dobivenih produkata koristila se kromatografija na koloni. Nepokretna faza bio je silikagel veličine čestica 0,063 – 0,200 mm (Kemika, Hrvatska), a kao pokretna faza koristile su se iste smjese otapala kao za TLC. Tališta analiziranih spojeva određena su na Stuart SMP3 instrumentu (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana.

^{1}H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker AV–600 (Bruker, Billerica, MA, SAD) pri 300,13 MHz za ^{1}H, odnosno pri 75,47 MHz za ^{13}C jezgru. Uzorci su mjereni u otopinama DMSO-d_6 pri temperaturi od 20°C u NMR cjevčicama promjera 5 mm. U ^{1}H NMR kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS), a kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na unutarnji standard. Kao unutarnji standard u ^{13}C NMR korišten je dimetilsulfoksid (DMSO) te su kemijski pomaci izraženi u ppm u odnosu na DMSO. Spektrofotometar FT-IR PerkinElmer Paragon 500 (Perkin Elmer, UK) korišten je za snimanje IR spektara analiziranih spojeva. Spektri masa snimljeni su na instrumentu HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420).

Za reakcije u mikrovalnom reaktoru korišten je CEM Discover reaktor (CEM GmbH, Njemačka).

Harmin, diklormetan (CH_2Cl_2), ledena octena kiselina, cezijev karbonat, i 2-(Boc-amino)etil bromid ($BocNH(CH_2)_2Br$), bromovodična kiselina (HBr) i 1-(bis(dimetilamino)metilen)-1*H*-1,2,3-triazolo(4,5-*b*)piridinijev 3-oksid heksafluorfosfat (HATU) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD). Artezunat je nabavljen od tvrtke TCI (Japan). Metanol je nabavljen od tvrtke Honeywell Riedel de Haën, dietil-eter od tvrtke Kemika, klorovodična kiselina (HCl) od tvrtke Carlo Erba, a *N*,*N*-diizopropiletilamin (DIEA) od tvrtke Alpha Aesar. Sve kemikalije bile su *p.a.* čistoće.

3.1. Sinteza *tert*-butil (2- (7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il) etil) karbamata (1)

U suspenziju harmina (0,300 g, 1,413 mmol) u bezvodnom DMF-u (4 mL) dodani su cezijev karbonat (2,072 g, 6,359 mmol) i 2-(Boc-amino)etil bromid (1,267 g, 5,652 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 18 h na 90 °C u atmosferi argona. Reakcijska smjesa je razrijeđena vodom (40 mL) i ekstrahirana etil-acetatom (4 × 50 mL). Organski slojevi su skupljeni, isprani vodom (2 × 200 mL), sušeni nad bezvodnim Na_2SO_4, profiltrirani te je otapalo upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 8:1 i rastrljavanjem u dietil-eteru/petroleteru.

Iskorištenje: 0,296 g (59 %).

^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, *J*/Hz) 7,14 (d, 1H, *J* = 5,1), 7,05 (d, 1H, *J* = 8,5), 6,84 (d, 1H, *J* = 5,2), 6,20 (d, 1H, *J* = 2,2), 6,01 (s, 1H), 5,86 (d, 1H, *J* = 8,6, 2,2), 2,90 (s, 3H), 1,93 (s, 3H), 1,49 (dt, 4H, *J* = 3,7, 1,9), 0,28 (s, 9H).

^{13}C NMR (DMSO-d_6, δ ppm) 160,45, 155,62, 142,85, 140,47, 137,64, 134,70, 128,40, 122,21, 114,35, 112,11, 108,95, 93,81, 77,78, 55,48, 43,99, 39,98, 28,02, 23,00.

3.2. Sinteza 2- (7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il) etan-1-amina (2)

Suspenziji spoja **1** (0,296 g, 0,833 mmol) u metanolu (6 mL) dodana je 4 M otopina HCl u metanolu (2,083 mL, 8,333 mmol) te je reakcijska smjesa grijana 6 h na 50 ºC. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a ostatak je otopljen u destiliranoj vodi (50 mL), zalužen 5 %-tnim NaOH do pH 12 i ekstrahiran etil-acetatom (5 × 50 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim Na_2SO_4, filtrirani, a otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera, nakon čega je dobiven žuti talog amina **2**.

Iskorištenje: 0,126 g (59 %).

^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, *J*/Hz) 8,16 (d, 1H, *J* = 5,2), 8,07 (d, 1H, *J* = 8,6), 7,86 (d, 1H, *J* = 5,1), 7,24 (d, 1H, *J* = 2,2), 6,87 (dd, 1H, *J* = 8,6, 2,2), 4,54 (t, 2H, *J* = 7,3), 3,91 (s, 3H), 2,97 (s, 3H), 2,93 (dd, 2H, *J* = 7,9, 6,7).

^{13}C NMR (DMSO-d_6, δ ppm) 160,50, 142,92, 140,64, 137,66, 134,76, 128,23, 122,30, 114,18, 112,18, 109,12, 93,80, 55,61, 46,87, 41,94, 23,28.

3.3.Sinteza 1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-ola (4)

Smjesa harmina (0,250 g, 1,178 mmol), octene kiseline (3 mL) i 47 %-tnog HBr (1,5 mL) miješana je 25 min na 140 °C u mikrovalnom reaktoru (150 W). Reakcijska smjesa zalužena je 5 %-tnim NaOH do pH 9 te je ekstrahirana etil-acetatom (4 × 40 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim Na_2SO_4, filtrirani, a otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 85:15 i rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera te je dobiven žuti talog fenola **4**.

Iskorištenje: 0,207 g (88 %).

^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, *J*/Hz) 11,21 (s, 1H), 9,73 (s, 1H), 8,12 (d, 1H, *J* = 5,3), 7,94 (d, 1H, *J* = 8,5), 7,73 (d, 1H, *J* = 5,3), 6,91 (d, 1H, *J* = 2,1), 6,71 (dd, 1H, *J* = 8,5, 2,1), 2,70 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO-d_6, δ ppm) 158,24, 142,27, 140,89, 137,58, 134,40, 127,51, 122,52, 113,87, 111,64, 109,64, 96,60, 20,24.

3.4.Sinteza *tert*-butil(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)karbamata (5)

U suspenziju spoja **4** (0,207 g, 1,044 mmol) u bezvodnom DMF-u (2 mL) dodani su cezijev karbonat (2,072 g, 6,359 mmol) i 2-(Boc-amino)etil bromid (1,267 g, 5,652 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 18 h na 90 °C u atmosferi argona. Reakcijska smjesa je razrijeđena vodom (40 mL) i ekstrahirana etil-acetatom (4 × 50 mL). Organski slojevi su skupljeni, isprani vodom (2 × 200 mL), sušeni nad bezvodnim Na_2SO_4, profiltrirani, a otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 8:1 i rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera.

Iskorištenje: 0,250 g (70 %).

^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, *J*/Hz): δ = 11,43 (s, 1H), 8,15 (d, 1H, *J* = 5,3), 8,06 (d, 1H, *J* = 8,6), 7,81 (d, 1H, *J* = 5,3), 7,07 (t, 1H, *J* = 5,7), 7,00 (d, 1H, *J* = 2,2), 6,85 (dd, 1H, *J* = 8,7, 2,2), 4,08 (t, 2H, *J* = 5,8), 3,37 (q, 3H, *J* = 5,6), 2,73 (s, 3H), 1,40 (s, 9H).

^{13}C NMR (DMSO-d_6, δ ppm): δ = 159,22, 155,74, 141,92, 141,23, 137,61, 134,55, 127,26, 122,68, 114,96, 111,98, 109,34, 95,38, 77,82, 66,66, 39,73, 28,25, 20,29.

3.5.Sinteza 2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)oksi)etan-1-amina (6)

Suspenziji spoja **5** (0,250 g, 0,732 mmol) u metanolu (5 mL) dodana je 4 M otopina HCl u metanolu (1,83 mL, 7,32 mmol) te je reakcijska smjesa grijana 6 h na 50 ºC. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a ostatak je otopljen u destiliranoj vodi (50 mL) te je dobivena otopina zalužena 5 %-tnim NaOH do pH 12 i ekstrahirana etil-acetatom (5 × 50 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim Na_2SO_4, filtrirani, a otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera, nakon čega je dobiven žuti talog amina **6**.

Iskorištenje: 0,175 g (99 %).

^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, *J*/Hz) 11,36 (s, 1H), 8,13 (d, 1H, *J* = 5,2), 8,02 (d, 1H, *J* = 8,6), 7,77 (d, 1H, *J* = 5,3), 6,99 (d, 1H, *J* = 2,2), 6,83 (dd, 1H, *J* = 8,6, 2,2), 4,01 (t, 2H, *J* = 5,7), 2,93 (t, 2H, *J* = 5,7), 2,71 (s, 3H), 1,56 (s, 2H).

^{13}C NMR (DMSO-d_6, δ ppm) 159,46, 141,91, 141,25, 137,73, 134,54, 127,20, 122,57, 114,84, 111,89, 109,37, 95,29, 70,36, 40,98, 20,33.

3.6.Sinteza harmizinina 3 i 7. Opća metoda

Suspenziji artezunata (0,100 g, 0,26 mmol) u diklormetanu (4 mL) dodani su HATU (0,090 g, 0,236 mmol) i DIEA (0,080 mL, 0,472 mmol). Smjesa je miješana na s.t. 20 minuta, nakon čega je dodan N-9-susptituirani (**2**), odnosno u drugom slučaju O-7-susptituirani amin (**6**, 0,236 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na s.t. 4 h. Potom je razrijeđena diklormetanom (20 mL) te je dobivena otopina isprana vodom (2 × 30 mL). Organski sloj je sušen nad bezvodnim Na_2SO_4, filtriran, a otapalo upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu diklometan/metanol 9:1 i rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera.

3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2] dioksepino[4,3-*i*] izokromen-10-il 4-((2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*] indol-9-il) etil)amino)-4-oksobutanoat (3)

Količina amina **2**: 0,050 g (0,196 mmol).
Iskorištenje: 0,025 g (85 %).
T_t = 157 – 159 °C.

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3340, 2930, 1749, 1666, 1623, 1565, 1499, 1449, 1408, 1377, 1306, 1280, 1251, 1227, 1199, 1171, 1097, 1033, 1009, 946, 926, 876, 844, 824, 373, 703, 636, 598, 554, 505, 486.

^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, *J*/Hz) 8,19 (t, 1H, *J* = 6,0), 8,17 (d, 1H, *J* = 5,2), 8,09 (d, 1H, *J* = 8,6), 7,87 (d, 1H, *J* = 5,1), 7,23 (d, 1H, *J* = 2,2), 6,88 (dd, 1H, *J* = 8,5, 2,2), 5,65 (d, 1H, *J* = 9,7), 5,55 (s, 1H), 4,56 (t, 2H, *J* = 7,1), 3,91 (s, 3H), 3,46–3,42 (m, 2H), 2,96 (s, 3H), 2,57–2,53 (m, 2H), 2,34–2,28 (m, 3H), 2,20–2,14 (m, 1H), 2,01–1,96 (m, 1H), 1,82–1,77 (m, 1H), 1,63–1,52 (m, 3H), 1,48–1,40 (m, 2H), 1,34–1,29 (m, 1H), 1,27 (s, 3H), 1,19–1,14 (m, 1H), 0,96–0,91 (m, 1H), 0,88 (d, 3H, *J* = 6,3), 0,77 (d, 3H, *J* = 7,1).

^{13}C NMR (DMSO-d_6, δ ppm) 171,15, 160,51, 142,87, 140,60, 137,82, 134,64, 128,46, 122,42, 114,32, 112,27, 109,23, 103,56, 93,58, 91,67, 90,59, 79,87, 64,92, 55,52, 51,12, 44,57, 43,40, 38,72, 35,95, 35,89, 33,70, 31,65, 29,60, 28,83, 25,49, 24,19, 23,05, 21,01, 20,06, 11,72.

ESI-MS (*m/z*): 622,2 $(M+1)^+$.

3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il 4-((2-((1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)amino)-4-oksobutanoat (7)

Količina O-7-supstituiranog amina: 0,050 g (0,207 mmol).
Iskorištenje: 0,088 g (68 %).
T_t = 144 – 147 °C.

IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3427, 2927, 1744, 1662, 1627, 1568, 1451, 1378, 1275, 1236, 1166, 1100, 1032, 1009, 927, 842, 740, 557, 486.

^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, J/Hz) 11,41 (s, 1H), 8,23 (t, 1H, *J* = 5,6), 8,15 (d, 1H, *J* = 5,2), 8,05 (d, 1H, *J* = 8,6), 7,80 (d, 1H, *J* = 5,3), 7,01 (d, 1H, *J* = 2,2), 6,85 (dd, 1H, *J* = 8,6, 2,2), 5,64 (d, 1H, *J* = 9,7), 5,52 (s, 1H), 4,09 (t, 2H, *J* = 5,7), 3,51–3,47 (m, 2H), 2,72 (s, 3H), 2,65–2,59 (m, 2H), 2,48–2,43 (m, 2H), 2,29–2,24 (m, 1H), 2,20–2,14 (m, 1H), 2,01–1,96 (m, 1H), 1,82–1,77 (m, 1H), 1,58–1,48 (m, 3H), 1,43–1,30 (m, 3H), 1,28 (s, 3H), 1,17–1,12 (m, 1H, *J* = 11,4, 6,6), 0,93–0,87 (m, 1H), 0,86 (d, 3H, *J* = 6,3), 0,74 (d, 3H, *J* = 7,1)

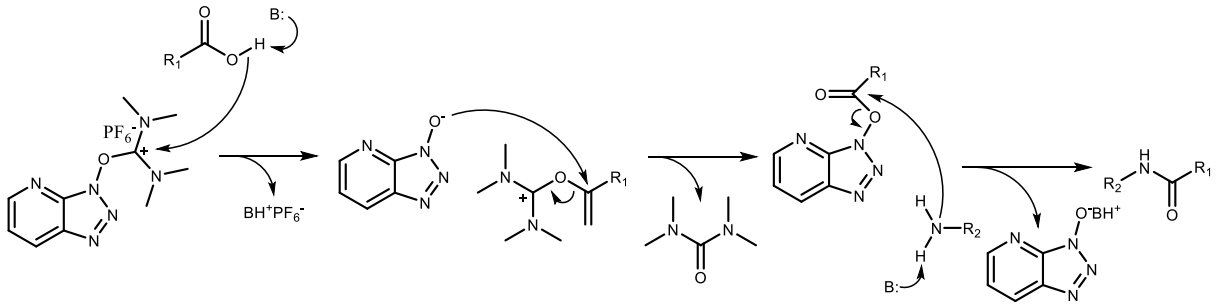
^{13}C NMR (DMSO-d_6, δ ppm) 171,20, 170,92, 159,17, 141,86, 141,27, 137,71, 134,56, 127,18, 122,62, 115,00, 111,93, 109,34, 103,56, 95,43, 91,63, 90,57, 79,84, 66,63, 51,10, 44,54, 38,37, 35,94, 35,89, 33,66, 31,63, 29,52, 28,97, 25,52, 24,18, 20,97, 20,33, 20,03, 11,70.

ESI-MS (*m/z*): 608,2 $(M+1)^+$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu sintetizirana su i karakterizirana dva harmizinina, hibridna spoja harmina i artezunata, pripravljena u položajima O-7 i N-9 β-karbolinskog prstena. Dvije građevne jedinice povezane su amidnom vezom, stoga možemo reći da su pripravljeni harmizinini amidnog tipa (Shema 1).

Harmizinini su pripravljeni reakcijom povezivanja uz *coupling* reagens HATU i bazu DIEA. U reakciji povezivanja, da bi između karboksilne kiseline i amina nastala amidna veza, potrebno je aktivirati karboksilnu kiselinu, odnosno povećati joj elektrofilnost. Iz tog razloga potrebni su *coupling* reagensi. U prisutnosti Hünigove baze (DIEA), koja deprotonira karboksilnu kiselinu (u ovom slučaju artezunat), nastaje anion koji napada elektrofilni ugljikov atom HATU, čime nastaje anion, koji zatim reagira s aktiviranom karboksilnom kiselinom i nastaje stabilniji aktivirani ester. Dodatkom amina u tu reakcijsku smjesu, dušik iz amina nukleofilno napada elektrofilni karbonilni ugljikov atom na aktiviranom esteru, pri čemu nastaje amidna veza (Slika 3).



Slika 3. Opći prikaz reakcijskog mehanizma reakcije povezivanja uz *coupling* reagens HATU

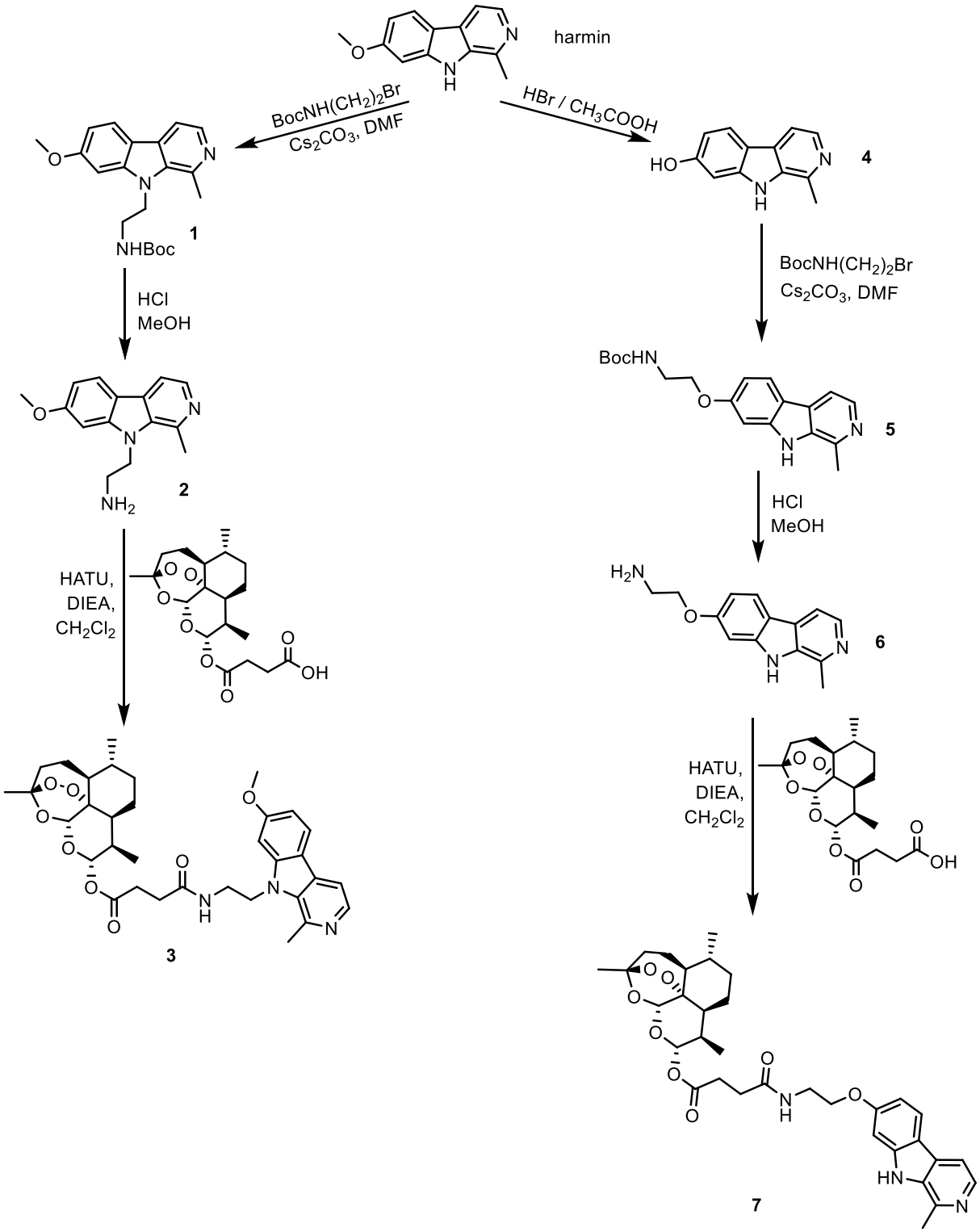
Građevni elementi koji su reakcijom povezivanja povezani u hibridne spojeve bili su artezunat i N-9-, odnosno O-7-supstituirani amini harmina, koje je bilo potrebno sintetizirati. Početni spoj u sintezi oba amina bio je komercijalno dostupan harmin. Sinteza O-7-supstituiranog amina započinje prevođenjem harmina u harmol. Druge dvije reakcije u sintezi amina su analogne, kao i reakcije povezivanja kojim dobivamo ciljne harmizinine.

Prema Shemi 1. Prvi je korak u sintezi N-9-supstituiranog amina nukleofilna supstitucija Boc-zaštićenog etilnog amina na dušikov atom harmina. U ovoj je reakciji dušik u položaju 9 β-karbolinskog prstena harmina nukleofil, dok je Br^- izlazna skupina. Reakcija se odvija u suhom DMF-u, pri povišenoj temperaturi i u bazičnim uvjetima, koje postižemo dodatkom cezijevog karbonata. Po završetku reakcije nastaje spoj **1,** koji je topljiv u organskim otapalima, zbog čega je ekstrahiran etil-acetatom. Iduća reakcija u sintezi je uklanjanje zaštitne Boc-skupine u kiselim uvjetima, pri čemu nastaje N-9 supstituirani amin harmina, spoj **2**. U ovoj

reakciji prvo dolazi do hidrolize, pri čemu *tert*-butilni alkohol napušta molekulu, a zatim dolazi do spontane dekarboksilacije nastale karbaminske kiseline. Zadnji korak u sintezi je reakcija povezivanja uz *coupling* reagens HATU i DIEA između artezunata i dobivenog spoja **2** te nastaje ciljni hibridni spoj **3**.

Prva reakcija u sintezi O-7-supstituiranog amina je prevođenje harmina u harmol reakcijom *O*-demetilacije uz ledenu octenu kiselinu i 47%-tnu otopinu HBr u mikrovalnom reaktoru na 140 ºC kroz 25 minuta. Po završetku je reakcijska smjesa zalužena 5 %-tnom otopinom NaOH do pH 9. Pri tom je pH harmol neioniziran te je topljiv u organskom otapalu, zbog čega smjesu ekstrahiramo etil-acetatom. Idući korak sinteze analogan je prvom koraku u sintezi N-9-supstituiranog amina, samo što je polazni spoj u ovom slučaju harmol, čiji je kisik iz fenolne skupine nukleofil. Po završetku reakcije nastaje spoj **5**. Iduća reakcija u sintezi je uklanjanje Boc-skupine u kiselim uvjetima, pri čemu nastaje O-7-supstituirani amin harmina, spoj **6**. Zadnji korak u sintezi je reakcija povezivanja uz *coupling* reagens HATU i DIEA između artezunata i dobivenog spoja **6**, te nastaje ciljni harmizinin, spoj **7**.

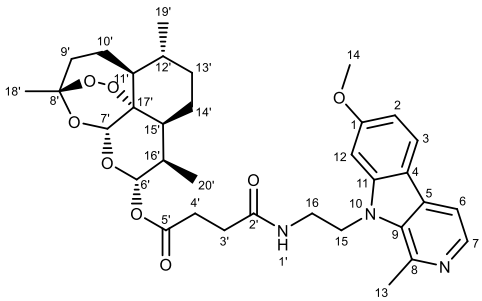
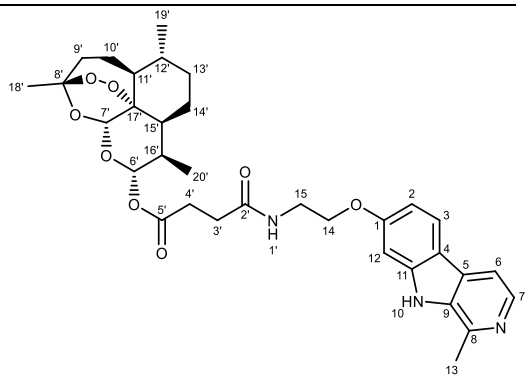
Po završetku reakcija, produkti (spojevi **1**, **3**, **5** i **7**) su pročišćeni kromatografijom na koloni uz mobilne faze ovisne o svojstvu dobivenog produkta. Dodatno su pročišćeni rastrljavanjem u dietil-eteru. Iskorištenja reakcija povezivanja kojima su dobiveni konačni spojevi su vrlo dobra (u sintezi spoja **3** iskorištenje iznosi 85 %, dok u sintezi spoja **7** iznosi 70 %). Tijek reakcija i čistoća dobivenih spojeva praćeni su TLC-om, spojevi detektirani UV zračenjem (λ = 254 nm) i parama joda, budući da artezunat, kao i njegovi derivati, ne fluorescira.



Shema 1. Sinteza harmizinina **3** i **7**

Pripravljeni harmizinini su novi spojevi te je provedena njihova strukturna karakterizacija spektroskopskim i analitičkim metodama (^{1}H i ^{13}C NMR, IR, MS, temperatura tališta). Strukture, analitički i spektroskopski podaci spojeva **3** i **7** prikazani su u Tablici 1, a spektri se nalaze u Prilogu.

Tablica 1. Analitički i spektroskopski podaci harmizinina **3** i **7**

Spoj	**3**	**7**
Struktura		
t_t (°C)	157–159 °C	144 – 147 °C
Molekulska formula	$C_{34}H_{43}N_3O_8$	$C_{33}H_{41}N_3O_8$
Relativna molekulska masa (M_r)	621,73	607,70
MS (*m/z*) (M+1)$^+$	622,2 (M+1)$^+$	608,2 (M+1)$^+$
IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1})	3340, 2930, 1749, 1666, 1623, 1565, 1499, 1449, 1408, 1377, 1306, 1280, 1251, 1227, 1199, 1171, 1097, 1033, 1009, 946, 926, 876, 844, 824, 373, 703, 636, 598, 554, 505, 486	3427, 2927, 1744, 1662, 1627, 1568, 1451, 1378, 1275, 1236, 1166, 1100, 1032, 1009, 927, 842, 740, 557, 486

^{1}H NMR (DMSO-d_6, δ ppm, *J*/Hz)	8,19 (t, 1H, 1’, *J* = 6,0), 8,17 (d, 1H, 7, *J* = 5,2), 8,09 (d, 1H, 3, *J* = 8,6), 7,87 (d, 1H, 6, *J* = 5,1), 7,23 (d, 1H, 12, *J* = 2,2), 6,88 (dd, 1H, 2, *J* = 8,5, 2,2), 5,65 (d, 1H, 6’, *J* = 9,7), 5,55 (s, 1H, 7’), 4,56 (t, 2H, 15, *J* = 7,1), 3,91 (s, 3H, 14), 3,46–3,42 (m, 2H, 16), 2,96 (s, 3H, 13), 2,57–2,53 (m, 2H, 3’), 2,34–2,28 (m, 3H, 4’, 16’), 2,20–2,14 (m, 1H, 9’a), 2,01–1,96 (m, 1H, 9’b), 1,82–1,77 (m, 1H, 14’a), 1,63–1,52 (m, 3H, 10’a, 13’a, 14’b), 1,48–1,40 (m, 2H, 10’b, 13’b), 1,34–1,29 (m, 1H, 12’), 1,27 (s, 3H, 18’), 1,19–1,14 (m, 1H, 11’), 0,96–0,91 (m, 1H, 15’), 0,88 (d, 3H, 19’, *J* = 6,3), 0,77 (d, 3H, 20’, *J* = 7,1)	11,41 (s, 1H, 10), 8,23 (t, 1H, 1’, *J* = 5,6), 8,15 (d, 1H, 7, *J* = 5,2), 8,05 (d, 1H, 3, *J* = 8,6), 7,80 (d, 1H, 6, *J* = 5,3), 7,01 (d, 1H, 12, *J* = 2,2), 6,85 (dd, 1H, 2, *J* = 8,6, 2,2), 5,64 (d, 1H, 6’, *J* = 9,7), 5,52 (s, 1H, 7’), 4,09 (t, 2H, 14, *J* = 5,7), 3,51–3,47 (m, 2H, 15), 2,72 (s, 3H, 13), 2,65–2,59 (m, 2H, 3’), 2,48–2,43 (m, 2H, 4’), 2,29–2,24 (m, 1H, 16’), 2,20–2,14 (m, 1H, 9’a), 2,01–1,96 (m, 1H, 9’b), 1,82–1,77 (m, 1H, 14’a), 1,58–1,48 (m, 3H, 10’a, 13’a, 14’b), 1,43–1,30 (m, 3H, 10’b, 12’, 13’b), 1,28 (s, 3H, 18’), 1,17–1,12 (m, 1H, 11’), 0,93–0,87 (m, 1H, 15’), 0,86 (d, 3H, 19’, *J* = 6,3), 0,74 (d, 3H, 20’, *J* = 7,1)
^{13}C NMR (DMSO-d_6, δ ppm)	171,15 (2’), 160,51 (5’), 142,87 (1), 140,60 (8), 137,82 (7), 134,64 (9), 128,46 (11), 122,42 (3), 114,32 (8’), 112,27 (6), 109,23 (2), 103,56 (4), 93,58 (12), 91,67 (6’), 90,59 (7’), 79,87 (5), 64,92 (17’), 55,52 (14), 51,12 (11’), 44,57 (15’), 43,40 (15), 38,72 (16), 35,95 (12’), 35,89 (9’), 33,70 (13’), 31,65 (16’), 29,60 (4’), 28,83 (14’), 25,49 (18’), 24,19 (3’), 23,05 (13), 21,01 (10’), 20,06 (19’), 11,72 (20’)	171,20 (2’), 170,92 (5’), 159,17 (1), 141,86 (8), 141,27 (11), 137,71 (7), 134,56 (9), 127,18 (5), 122,62 (3), 115,00 (8’), 111,93 (6), 109,34 (2), 103,56 (4), 95,43 (6’), 91,63 (7’), 90,57 (12), 79,84 (17’), 66,63 (14), 51,10 (11’), 44,54 (15’), 38,37 (15), 35,94 (12’), 35,89 (9’), 33,66 (13’), 31,63 (16’), 29,52 (4’), 28,97 (14’), 25,52 (18’), 24,18 (3’), 20,97 (10’), 20,33 (13), 20,03 (19’), 11,70 (20’)

Da bi lijek bio klinički značajan, osim zadovoljavajućeg farmakološkog djelovanja, važno je da njegov farmakokinetički profil bude prihvatljiv. U tu svrhu postoje brojni računalni programi i modeli za predviđanje farmakokinetike novih molekula. Jedan od najpoznatijih i prvih modela postavio je Lipinski (Lipinski i sur., 1997). Njihovi zaključci danas su poznati kao Lipinskijeva pravila, a ona zahtijevaju da molekula koja ima dobru oralnu bioraspoloživost mora imati $M_r \leq 500$, log $P \leq 5$, broj donora vodikove veze ≤ 5, broj akceptora vodikove veze ≤ 10. Ova pravila odnose se na molekule koje se apsorbiraju pasivnom difuzijom, a ne odnose se na molekule koje su supstrati raznih transportera u gastrointestinalnom sustavu. Nekoliko godina kasnije u svojem su radu Veber i sur. predložili nova pravila koja uzimaju u obzir polarnost i fleksibilnost molekula (Veber i sur., 2002). Prema Veberovim pravilima molekula koja ima dobru bioraspoloživost trebala bi imati broj donora i akceptora vodikove veze < 12, broj veza koje mogu rotirati ≤ 10 i topološku polarnu površinu molekule (TPSA) < 140 Å^2.

Pomoću programa *SwissADME* (http://www.swissadme.ch/) izračunati su parametri za procjenu pridržavanja navedenim pravilima za konačne spojeve **3** i **7** te su dobivene vrijednosti dane u Tablici 2.

Tablica 2. Parametri za procjenu pridržavanja Lipinskijevim i Veberovim pravilima za harmizinine 3 i 7

Spoj	**3**	**7**
Molekulska formula	$C_{34}H_{43}N_3O_8$	$C_{33}H_{41}N_3O_8$
M_r	621,72	607,69
log *P*	3,32	3,18
TPSA (Å²)	119,35	130,23
Broj donora H-veze	1	2
Broj akceptora H-veze	9	9
Broj rotirajućih veza	10	10
Lipinski	3 / 4	3 / 4
Veber	4 / 4	4 / 4

Harmizinini **3** i **7** zadovoljavaju ¾ Lipinskijeva pravila, jer im je relativna molekulska masa veća od 500. S druge strane, novosintetizirani hibridi odgovaraju u potpunosti Veberovim pravilima stoga je moguće očekivati dobru oralnu bioraspoloživost ovih spojeva.

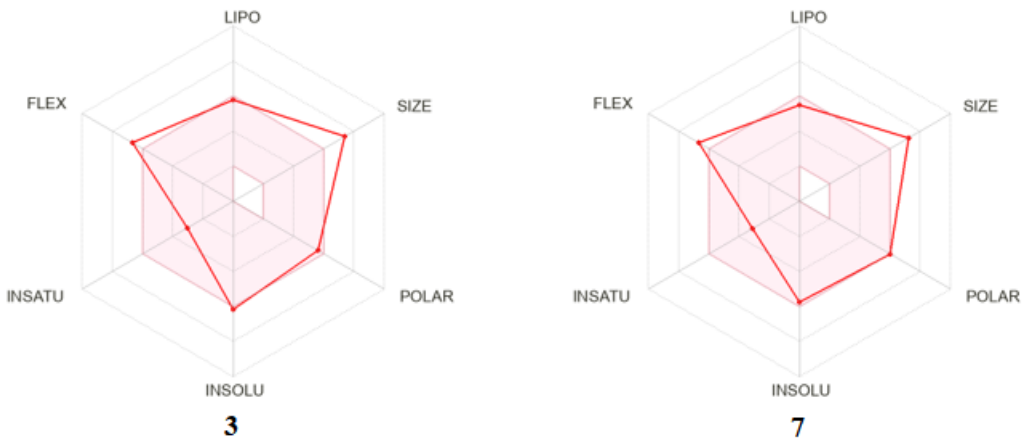
Online program *SwissADME*, osim gore spomenutih parametara, ima mogućnost izračuna i parametara potrebnih za izradu grafičkog modela *Bioavailability radar* koji se također koristi za procjenu oralne bioraspoloživosti molekule. Parametri i uvjeti za vrijednosti parametara koji ulaze u izračun ovog modela su:

- XLOGP3 – lipofilnost – log *P* izračunat računalnim programom XLOGP, potreban interval od -0,7 do +5,0
- M_r – relativna molekulska masa (veličina molekule), potreban interval od 150 do 500
- TPSA – topološka polarna površina molekule, potreban interval od 20Å² do 140Å²
- log *S* – logaritam topljivosti u vodi izračunat računalno ESOL metodom, potreban interval od 0 do 6
- FC*sp*3 – nezasićenost – udio sp^3 hibridiziranih ugljikovih atoma u molekuli, potreban interval od 0,25 do 1
- broj rotirajućih veza – fleksibilnost, potreban interval od 0 do 9.

Vrijednosti ovih parametara izračunatih programom *SwissADME* za harmizinine **3** i **7** dani su u Tablici 3 te je grafički prikaz dan na Slici 4.

Tablica 3. Vrijednosti parametara za *Bioavailability radar* harmizinina **3** i **7** izračunati računalnim programom *SwissADME*.

Spoj	XLOGP3	M_r	TPSA (Å²)	log *S*	FCsp^3	Broj rotirajućih veza
3	4,62	621,72	119,37	-6,16	0,62	10
7	4,09	607,69	130,23	-5,74	0,61	10



Slika 4. Grafički prikaz *Bioavailability radar*-a harmizinina **3** i **7**

Na temelju vrijednosti i grafičkog prikaza predikcije oralne bioraspoloživosti sintetiziranih harmizinina vidljivo je kako niti jedan hibrid ne zadovoljava kriterij veličine molekule niti fleksibilnosti. Budući da su vrijednosti tih parametara izvan zadanog intervala, može se zaključiti kako će oralna bioraspoloživost novosintetiziranih harmizinina biti smanjena, što je u suprotnosti s dobivenim rezultatima vezanima uz Lipinskijeva i Veberova pravila.

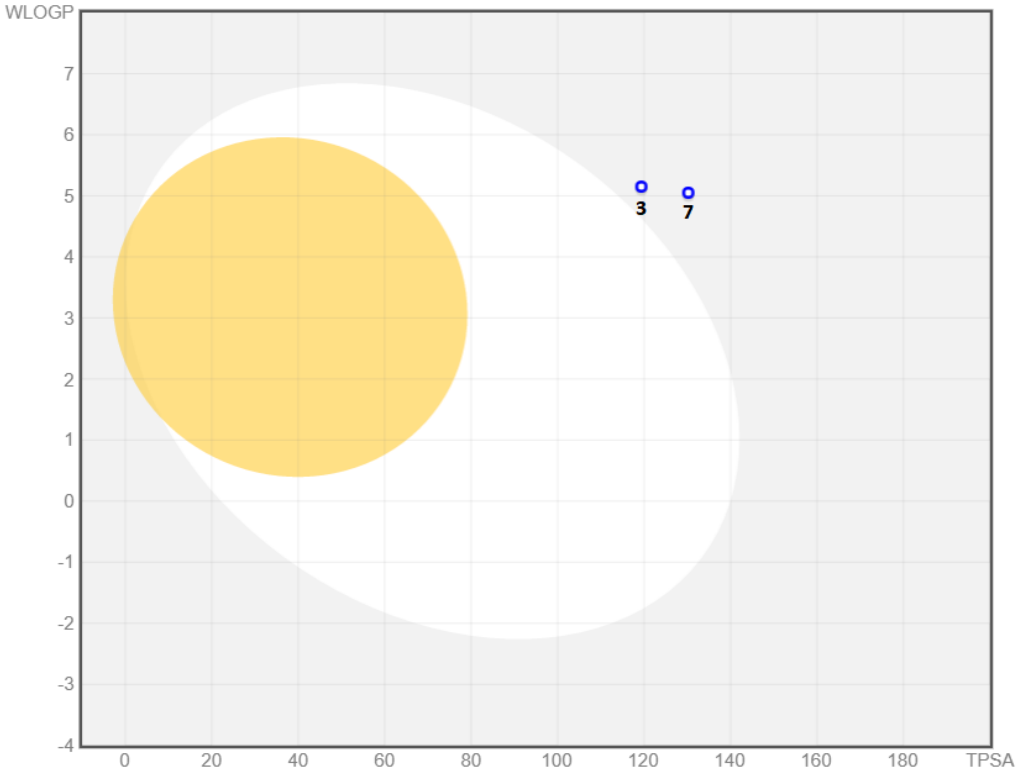
Za farmakokinetiku lijeka, uz oralnu bioraspoloživost, važan parametar jest i metabolizam same molekule. Pomoću programa *SwissADME* moguće je predvidjeti inhibiciju najvažnijih CYP enzima, zaslužnih za metabolizam većine lijekova. Osim toga, ovaj program predviđa apsorpciju u gastrointestinalnom traktu, sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i permeabilnost kroz kožu te je li molekula supstrat P-glikoproteina (P-gp). Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Farmakokinetička predviđanja za harmizinine **3** i **7** određeni programom *SwissADME*

Spoj	GI	KMB	P-gp	inhibitor CYP1A2	inhibitor CYP2C19	inhibitor CYP2C9	inhibitor CYP2D6	inhibitor CYP3A4	log K_p (cm/s)[a]
3	Niska	-	+	-	-	-	-	+	-6,81
7	Niska	-	+	-	-	-	-	+	-7,10

[a] log K_p – mjera permeabilnosti kroz kožu izračunata prema QSPR modelu

U programu *SwissADME* kreiran je dijagram poznat pod nazivom *Boiled-Egg* dijagram. Ova vrsta dijagrama uzima u obzir neke od parametara koji su spomenuti i navedeni u tablicama iznad. Žuti krug („žumanjak jajeta“) predstavlja pasivan prijelaz krvno-moždane barijere stoga su u toj zoni smještene molekule koje pasivno prelaze KMB. Bijela elipsa („bjelanjak jajeta“) predstavlja zonu u kojoj su smještene molekule koje se pasivno apsorbiraju u probavnom traktu. Plavo su označene molekule koje su supstrati P-glikoproteina, za razliku od crveno označenih molekula koje nisu supstrati P-glikoproteina (Daina i Zoete, 2016). *Boiled-Egg* dijagram za harmizinine **3** i **7** prikazan je na Slici 5.



Slika 5. *Boiled-Egg* dijagram za spojeve **3** i **7**

Iz Tablice 4 i dijagrama zaključujemo kako se naši konačni spojevi, harmizinini **3** i **7**, ne apsorbiraju pasivno u gastrointestinalnom traktu, niti pasivno prelaze KMB, ali su zato potencijalni supstrati P-glikoproteina. P-glikoprotein je efluksni transportni protein čija je uloga izbacivanje mnogih tvari iz stanica, npr. iz intersticijskog epitela u lumen crijeva ili iz stanica KMB nazad u kapilare. S obzirom na predikciju, P-glikoprotein će izbaciti novosintetizirane harmizinine iz KMB kada se nađu tamo i na taj način neće dopustiti harmizininima da dođu u mozak i intersticijsku tekućinu. Iz tog razloga, možemo pretpostaviti kako novi potencijalni antimalarijski lijekovi sintetizirani u ovom radu neće dospjeti u mozak iz čega proizlazi kako neće imati neželjene nuspojave povezane uz središnji živčani sustav.

Važan podatak je i da su novosintetizirani spojevi potencijalni inhibitori enzima CYP3A4 što znači da će vjerojatno ulaziti u interakciju s onim lijekovima koji se metaboliziraju putem ovog enzima na način da će povećavati njihovu plazmatsku koncentraciju.

SwissADME računalni program izračunao je vrijednosti parametara za procjenu predviđanja oralne bioraspoloživosti na temelju više različitih modela. Prema Veberovim pravilima peroralna bioraspoloživost bit će dobra. Lipinskijeva pravila primijenjena na harmizininima **3** i **7** govore kako će peroralna bioraspoloživost biti djelomično smanjena zbog prevelike relativne molekulske mase molekula. Nadalje, *Bioavailability radar* predviđa lošu

peroralnu bioraspoloživost zbog veličine molekula i prevelike fleksibilnosti. Budući da se radi o predikcijama i da neki modeli govore kako će peroralna bioraspoloživost biti dobra, a neki da će biti loša, ne možemo sa sigurnošću predvidjeti i zaključiti kakva će biti peroralna raspoloživost ovih molekula. Svakako je poželjna što veća peroralna bioraspoloživost lijeka, jer je time potrebna manja terapijska doza lijeka, a time se smanjuje mogućnost pojave neželjenih nuspojava i toksičnosti. Kako bi lijekovi primijenjeni peroralno došli u krvotok, a potom i u tkiva, gdje će ostvariti svoj učinak potrebna je dobra apsorpcija u gastrointestinalnom sustavu. Prema *Boiled-Egg* dijagramu dobivenim računalnim programom *SwissADME* za harmizinine **3** i **7** previđa se loša apsorpcija iz GIT-a, što rezultira većom dozom peroralno primijenjenog lijeka. U slučaju da se daljnjim istraživanjima utvrdi kako su harmizinini učinkoviti i sigurni za primjenu u terapiji malarije, niska oralna bioraspoloživost bila bi prepreka zbog čega bi bilo potrebno razvijati drugačije farmaceutske oblike kojim bi se bioraspoloživost i apsorpcija povećali.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada opisana je sinteza dva harmizinina amidnog tipa, novih hibridnih spojeva harmina i artezunata:

- 3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2] dioksepino[4,3-*i*] izokromen-10-il-4-((2- (7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido [3,4-*b*] indol-9-il)etil)amino)-4-oksobutanoat (**3**)
  i
- 3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il-4-((2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)amino)-4-oksobutanoat (**7**).

Usto, sintetizirani su i karakterizirani potrebni polazni međuprodukti, derivati harmina **1**, **2**, **4-6**. Ciljni spojevi sintetizirani su reakcijom povezivanja artezunata i N-9-, odnosno O-7-susptituiranog amina **2** i **6** uz *coupling* reagens HATU i bazu DIEA, pri čemu su nastali hibridni spojevi, harmizinini **3** i **7**, povezani amidnom vezom. Harmizinini **3** i **7** strukturno su karakterizirani uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS, ^{1}H NMR i ^{13}C NMR, temperatura tališta).

Online računalnim programom *SwissADME* spojevima **3** i **7** izračunati su parametri koji predviđaju farmakokinetička svojstva lijeka na temelju strukture od kojih je najvažnije svojstvo peroralna bioraspoloživost i apsorpcija. Također, pomoću istog su programa izračunati parametri pomoću kojih se utvrđuje odgovara li molekula Lipinskijevim i Veberovim pravilima. Oba harmizinina pokazala su potpuno slaganje s Veberovim pravilima, za razliku od Lipinskijevih pravila, gdje su spojevi pokazali odstupanje od kriterija veličine. Zbog veličine i prevelike fleksibilnosti molekule, računalni program predviđa lošiju oralnu bioraspoloživost i lošu apsorpciju u GIT-u te nemogućnost pasivnog prolaska KMB. Prema predikciji, ovi su spojevi potencijalni supstrati P-glikoproteina i potencijalni inhibitori CYP3A4, najvažnijeg enzima zaduženog za metabolizam većine lijekova.

Daljnjim istraživanjima, koji nadilaze okvire ovog diplomskog rada, sintetiziranim harmizininima **3** i **7** biti će ispitano antimalarijsko i antiproliferativno djelovanje.

6. LITERATURA

Appalasamy S, Lo KY, Ch'ng SJ, Nornadia K, Othman AS, Chan LK. Antimicrobial activity of artemisinin and precursor derived from in vitro plantlets of Artemizia annua L. Biomed Res Int. 2014; 2014: 215872.

Beekman AC, Wierenga PK, Woerdenbag HJ, et al. Artemisinin-derived sesquiterpene lactones as potential antitumour compounds: cytotoxic action against bone marrow and tumour cells. Planta Medica. 1998; 64(7): 615–619.

Brossi A, Venugopalan B, Dominguez Gerpe L, Yeh HJC, Flippen-Anderson JL, Buchs P, Luo XD, Milhous W, Peters W. Arteether, a new antimalarial drug: synthesis and antimalarial properties, Journal of Medicinal Chemistry, 1988; 31 (3), 645-650.

Chen HH, Zhou HJ, Wu GD, Lou XE. Inhibitory effects of artesunate on angiogenesis and on expressions of vascular endothelial growth factor and VEGF receptor KDR/flk-1. Pharmacology. 2004; 71(1): 1-9.

Crespo-Ortiz MP, Wei MQ. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012: 247597.

Cumming JN, Ploypradith P, Posner GH. Antimalarial activity of artemisinin (qinghaosu) and related trioxanes: mechanism(s) of action. Adv Pharmacol. 1997; 37: 253-97.

Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem LDA., East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. Artemisinins target the SERCA of plasmodium falciparum. Nature. 2003; 424: 957–961.

Efferth T, Kaina B. Toxicity of the antimalarial artemisinin and its dervatives. Crit Rev Toxicol. 2010; 40(5): 405-21.

Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJ, Marschall M. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. Clin Infect Dis. 2008; 47(6): 804-11.

Efferth T, Saverbrey A, Olbrich A, et al. Molecular modes of action of artesunate in tumour cell lines. Molecular Pharmacology . 2003; 64(2): 382–394.

Francis SE, Sullivan DJ Jr, Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite Plasmodium falciparum. Annu Rev Microbiol. 1997; 51: 97-123.

Galal AM, Ross SA, Jacob M, ElSohly MA. Antifungal activity of artemisinin derivatives. J Nat Prod. 2005; 68(8): 1274-6.

German PI, Aweeka FT. Clinical pharmacology of artemisinin-based combination therapies. Clin Pharmacokinet 2008; 47 str.

Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, et al. Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. Lancet. 2005; 366: 1960–1963.

Li G, Li Y, Li Z, Zeng M. Artemisinin-Based and Other Antimalarials. Academic Press, 2018, str. 129-175.

Liao F. Discovery of Artemisinin (Qinghaosu). Molecules. 2009; 14(12): 5362-5366.

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 Deliv Rev, 1997; 23: 3–25.

Liu K, Zuo H, Li G, Yu H, Hu Y. Global research on artemisinin and its derivatives: Perspectives from patents. Pharmacol Res. 2020; 159: 105048.

Ma N, Zhang Z, Liao F, Jiang T, Tu Y. The birth of artemisinin. Pharmacol Ther. 2020 Dec; 216: 107658.

Ma Z, Woon CY, Liu CG, Cheng JT, You M, Sethi G, Wong AL, Ho PC, Zhang D, Ong P, Wang L, Goh BC. Repurposing Artemisinin and its Derivatives as Anticancer Drugs: A Chance or Challenge? Front Pharmacol. 2021 Dec 31; 12: 828856.

Malaria: Artemisinin resistance, 2021., https://www.who.int/, pristupljeno 18. 03. 2022.

Medhi B, Patyar S, Rao R, S, Byrav DS P, Prakash A: Pharmacokinetic and Toxicological Profile of Artemisinin Compounds: An Update. Pharmacology 2009; 84: 323-332.

Meshnick SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. Int J Parasitol. 2002; 32: 1655- 1660.

Müller-Schiffmann A, Sticht H, Korth C. Hybrid compounds: from simple combinations to nanomachines. BioDrugs. 2012; 26(1): 21-31.

Klonis N, Creek DJ, Tilley L. Iron and heme metabolism in Plasmodium falciparum and the mechanism of action of artemisinins. Curr Opin Microbiol. 2013 Dec; 16(6): 722-7.

Nosten F, White NJ. Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria. In: Breman JG, Alilio MS, White NJ, urednici. Defining and Defeating the Intolerable Burden of Malaria III: Progress and Perspectives: Supplement to Volume 77(6) of American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Northbrook (IL): American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2007.

Olliaro PL, Haynes RK, Meunier B, Yuthavong Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. Trends in Parasitology. 2001; 17(3): 122–126.

Qian RS, Li ZL, Yu JL, Ma DJ. The immunologic and antiviral effect of qinghaosu. J Tradit Chin Med. 1982; 2(4): 271-6.

Robert A., Benoit-Vical F.O., Claparols C., Meunier B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2005; 102: 13676–13680.

Robert A, Dechy-Cabaret O, Cazelles J, Meunier B. From Mechanistic Studies on Artemisinin Derivatives to New Modular Antimalarial Drugs, 2002, Accounts of Chemical Research 2002; 35 (3), 167-174.

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(8): 4207-4213.

Siddiqui FA, Liang X, Cui L. Plasmodium falciparum resistance to ACTs: Emergence, mechanisms, and outlook. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2021; 16: 102-118.

Su X, Miller LH. The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. Sci China Life Sci. 2015; 58: 1175- 1179.

Suresh N, Haldar K. Mechanisms of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. Curr Opin Pharmacol. 2018; 42: 46-54.

Tu Y. Artemisinin—a gift from traditional Chinese medicine to the world (Nobel lecture). Angew Chem Int Ed, 2016; 55(35): 10210.

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.

Wang J, Xu C, Wong YK, Li Y, Liao F, Jiang T, Tu Y. Artemisinin, the Magic Drug Discovered from Traditional Chinese Medicine, Engineering, 2019; 15: 32-39.

Wang J, Zhou H, Zheng J, et al. The antimalarial artemisinin synergizes with antibiotics to protect against lethal live Escherichia coli challenge by decreasing proinflammatory cytokine release. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(7): 2420-2427.

World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria, 3rd edition. Geneva: World Health Organization; 2015.

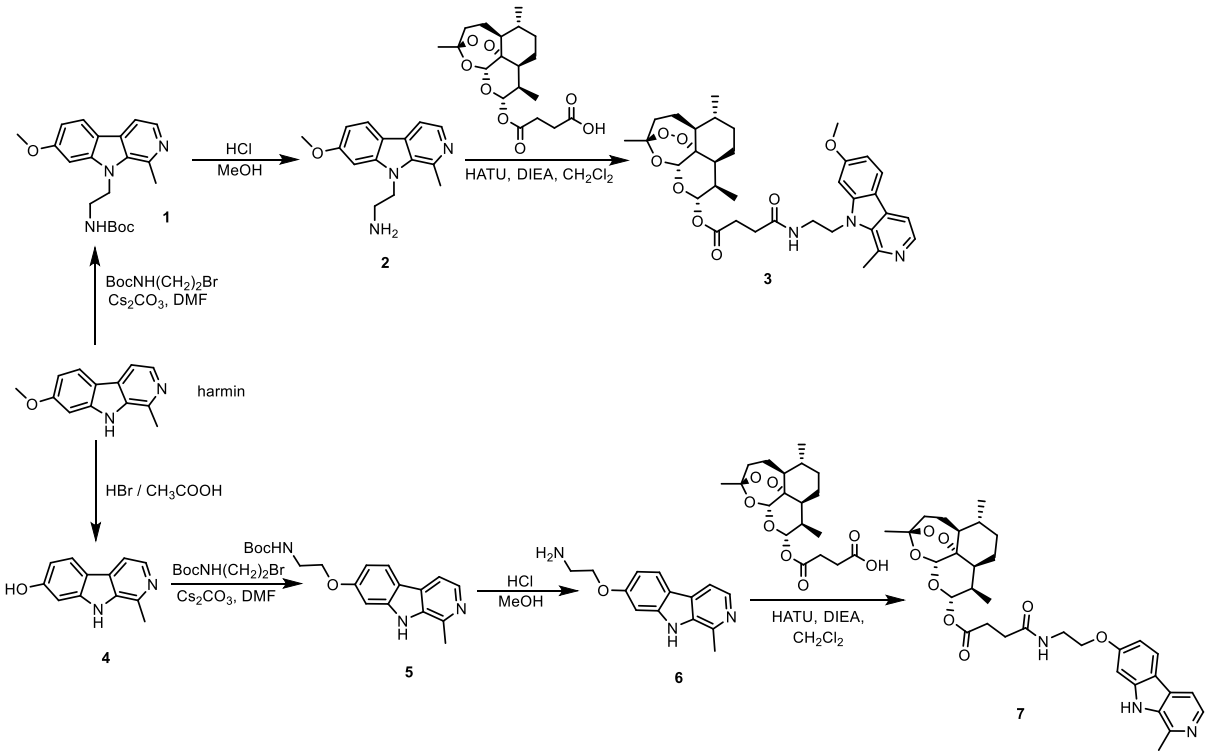
World Health Organization. (2021). World malaria report 2021. World Health Organization.

Zhang F, Gosser DK Jr, Meshnick SR. Hemin-catalyzed decomposition of artemisinin (qinghaosu). Biochem Pharmacol, 1992; 43(8): 1805-9.

Zhu C, Liao B, Ye X, Zhou Y, Chen X, Liao M, Cheng L, Zhou X, Ren B. Artemisinin elevates ergosterol levels of Candida albicans to synergise with amphotericin B against oral candidiasis. Int J Antimicrob Agents. 2021; 58(3): 106394.

7. SAŽETAK / SUMMARY

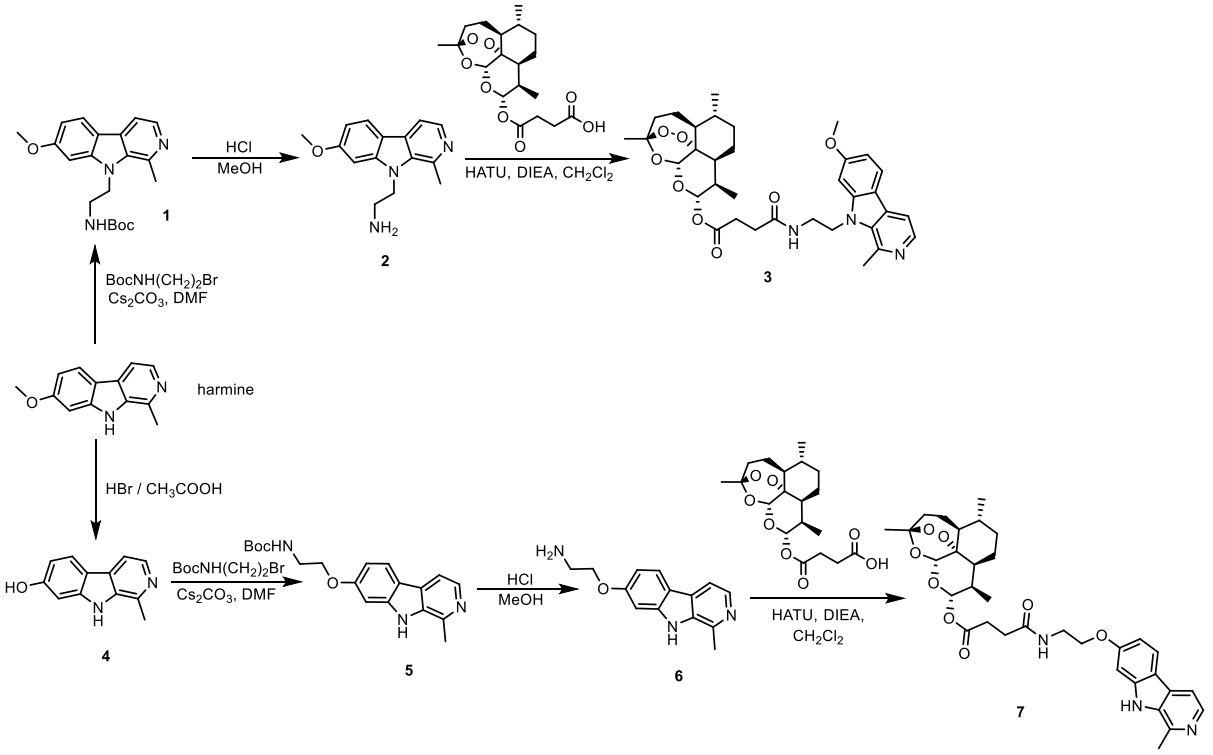
Artemizinin i njegovi derivati predstavljaju najznačajniju skupinu lijekova u borbi protiv malarije. S obzirom da je pojava rezistencije na dosad poznatu terapiju protiv malarije veliki globalni problem, potrebno je kontinuirano istraživati nove potencijalne lijekove. Cilj ovog diplomskog rada bila je sinteza harmizinina, hibridnih spojeva dviju molekula poznatih antimalarijskih svojstava, artezunata i harmina, za koje se pretpostavlja da bi mogli pokazati pojačano antimalarijsko djelovanje. Sinteza hibridnih spojeva uključivala je reakciju povezivanja artezunata i amina harmina **2** ili **6**, uz *coupling* reagens i bazu. Reakciji povezivanja prethodila je sinteza amina **2** i **6**, pripravljenih u položajima N-9 i O-7 β-karbolinskog prstena u nekoliko koraka počevši od komercijalno dostupnog harmina. Novosintetizirani harmizinini karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama te su im pomoću programa *SwissADME* određene vrijednosti farmakokinetičkih parametara koji predviđaju lošu GIT apsorpciju i upitnu oralnu bioraspoloživost ovih molekula. Nadalje, program predviđa kako su harmizinini potencijalni supstrati P-glikoproteina i potencijalni inhibitori enzima CYP3A4. Daljnjim istraživanjima, koji nadilaze okvire ovog diplomskog rada, sintetiziranim harmizininima **3** i **7** bit će ispitano antimalarijsko i antiproliferativno djelovanje.



Shema 2. Sinteza harmizinina

Ključne riječi: artemizinin, malarija, rak, harmin, sinteza, reakcija povezivanja

Artemisinin and its derivatives are the most important drugs in the fight against malaria. Since the emergence of resistance to the known antimalarial drugs is a major global problem, new potential drugs need to be constantly explored. The aim of this diploma thesis was the sythesis of harmisinins, hybrid compounds prepared by covalently linking two molecules with known antimalarial properties, artesunate and harmine, which are thought to have antimalarial activity. The synthesis of hybrid compounds was carried out by *coupling* reaction of artesunate and harmine-based amine **2** or **6**, with *coupling* reagent and base. The *coupling* reaction was preceded by the synthesis of amines **2** and **6**, which were prepared starting from commercial harmine in several steps at the N-9 and O-7 positions of the β-carboline ring. Newly synthesized harmisinins were characterized by standard analytical and spectroscopic methods. The *SwissADME* program was used to determine values of their pharmacokinetic parameters, which predicted poor GIT absorption and questionable oral bioavailability of these molecules. In addition, the program predicted that harmisinins are potential substrates of P-glycoprotein and potential inhibitors of CYP3A4 enzyme. In further research, beyond the scope of this diploma thesis, synthesized harmizinins **3** and **7** will be evaluated for their antimalarial and antiproliferative activity.

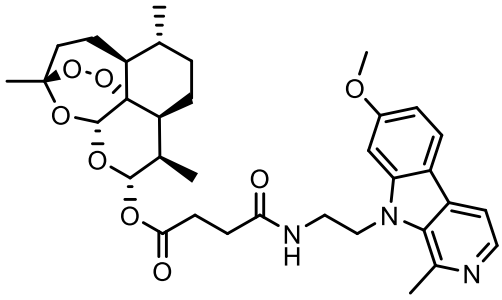


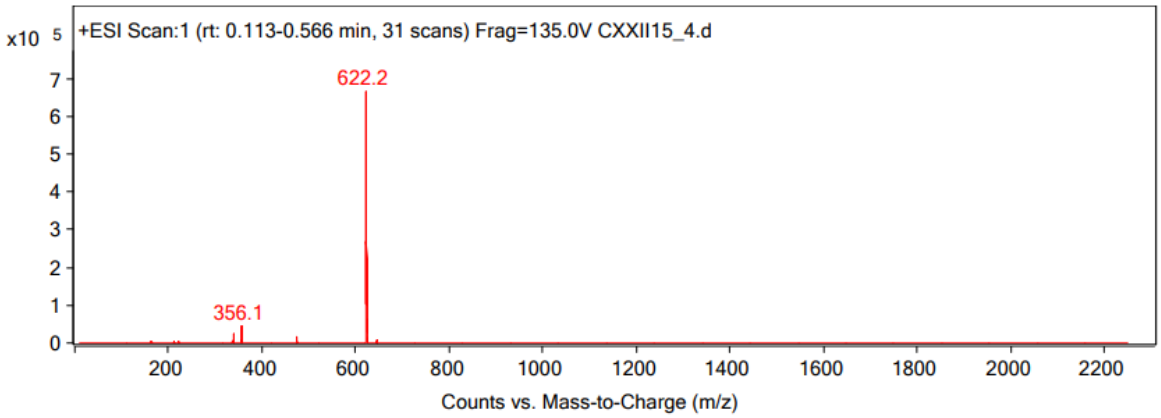
Scheme 2. Harmisinine synthesis

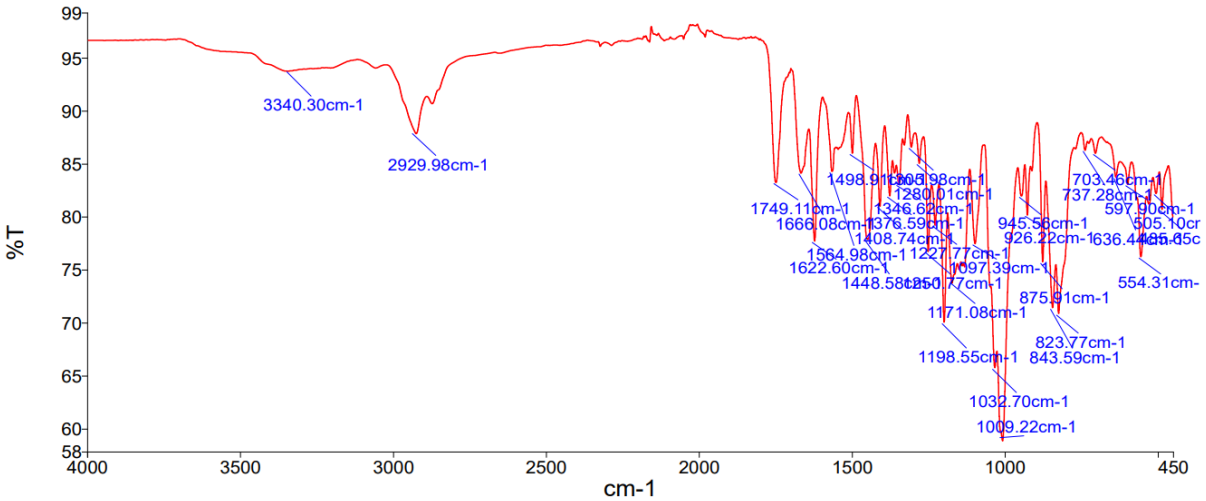
Key words: artemisinin, malaria, cancer, harmin, synthesis, *coupling* reaction

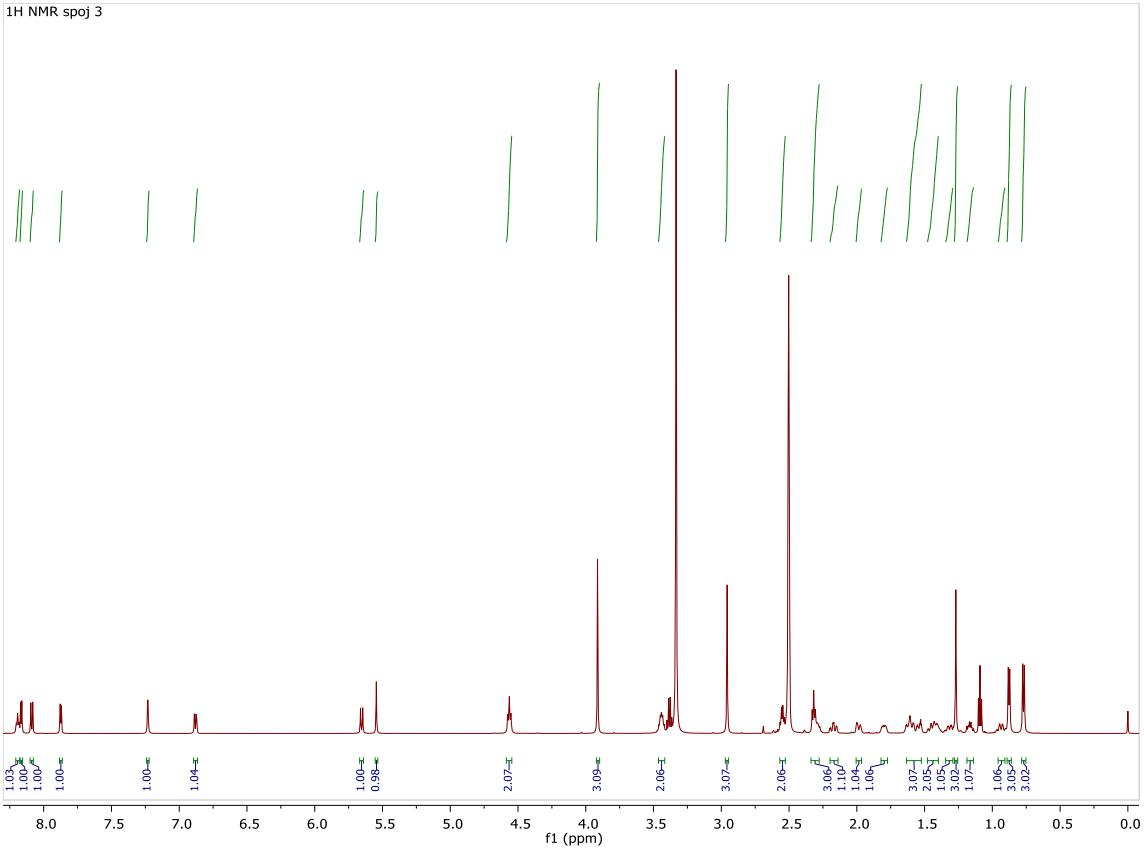
8. PRILOZI

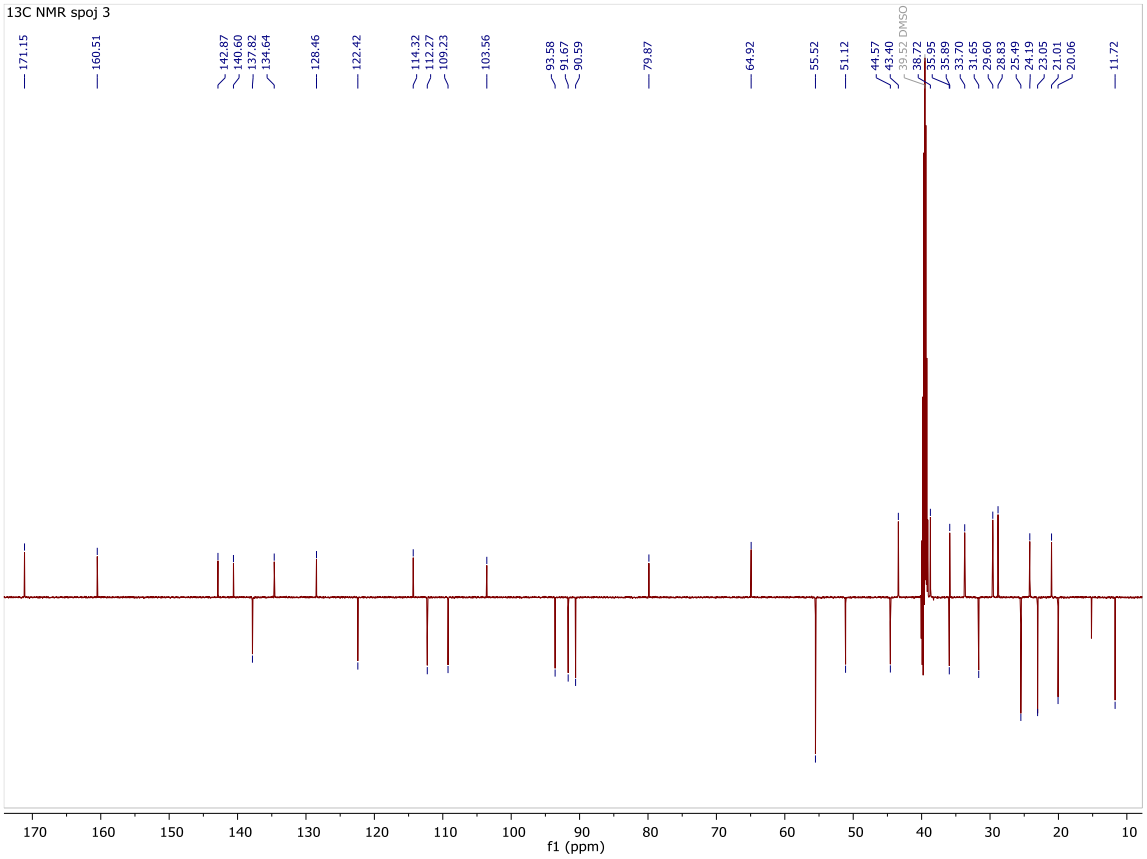
3



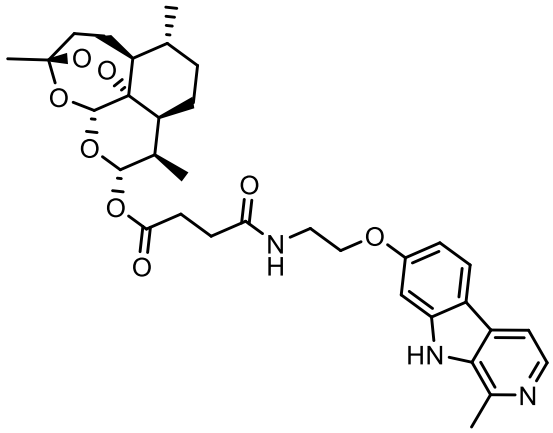

+ESI Scan:1 (rt: 0.113-0.566 min, 31 scans) Frag=135.0V CXXII15_4.d
x10 5
622.2
356.1
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)

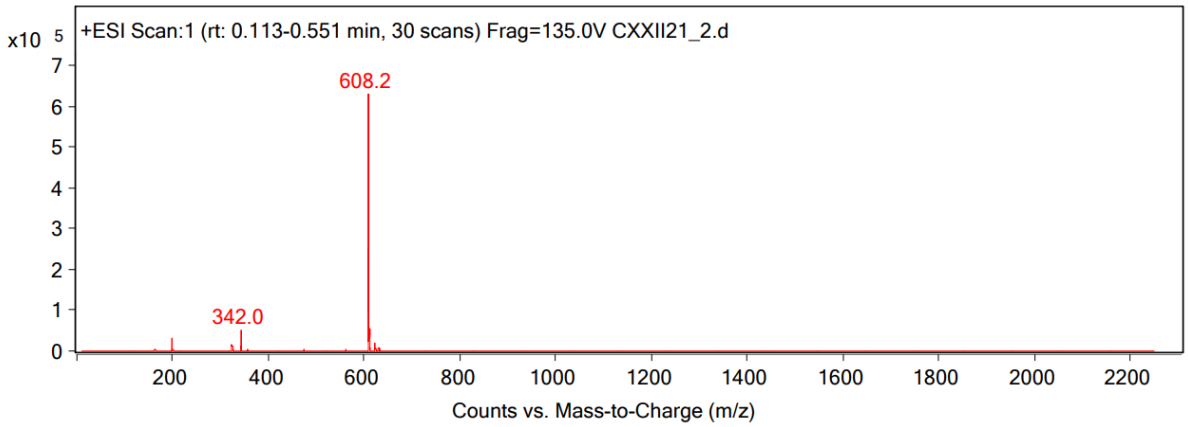

%T
3340.30cm-1
2929.98cm-1
1749.11cm-1
1666.08cm-1
1622.60cm-1
1564.98cm-1
1448.58cm-1
1408.74cm-1
1376.59cm-1
1346.62cm-1
1280.01cm-1
1171.08cm-1
1198.55cm-1
1032.70cm-1
1009.22cm-1
945.56cm-1
926.22cm-1
875.91cm-1
843.59cm-1
823.77cm-1
737.28cm-1
703.46cm-1
597.90cm-1
554.31cm-1
cm-1

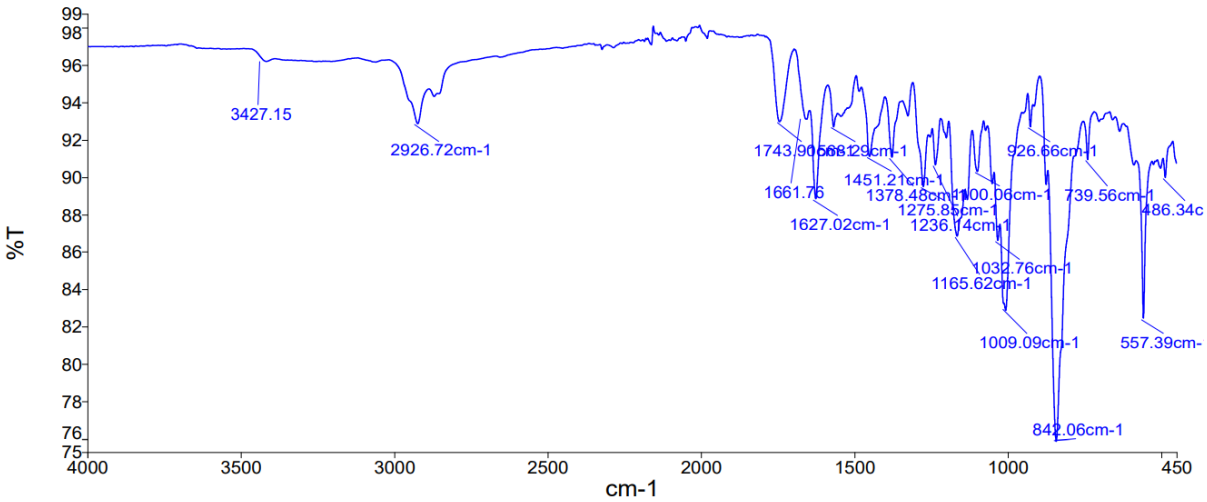

1H NMR spoj 3
1.03
1.00
1.00
1.00
1.00
1.04
1.00
0.98
2.07
3.09
2.06
3.07
2.06
3.06
1.10
1.04
1.06
3.07
2.05
1.05
3.02
1.07
1.06
3.05
3.02
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
f1 (ppm)

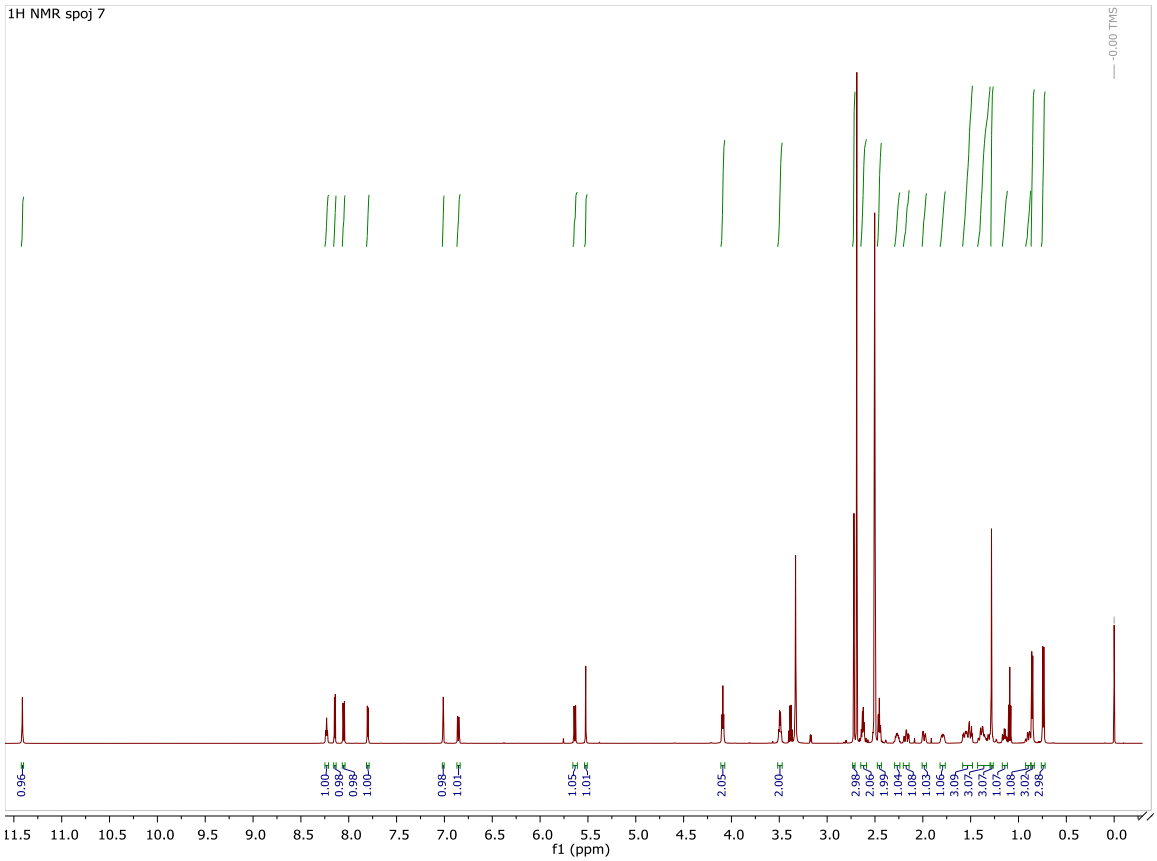

13C NMR spoj 3
171.15
160.51
142.87
140.60
137.82
134.64
128.46
122.42
114.32
112.27
109.23
103.56
93.58
91.67
90.59
79.87
64.92
55.52
51.12
44.57
43.40
39.52 DMSO
38.72
35.95
35.89
33.70
31.65
29.60
28.83
25.49
24.19
23.05
21.01
20.06
11.72
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
f1 (ppm)

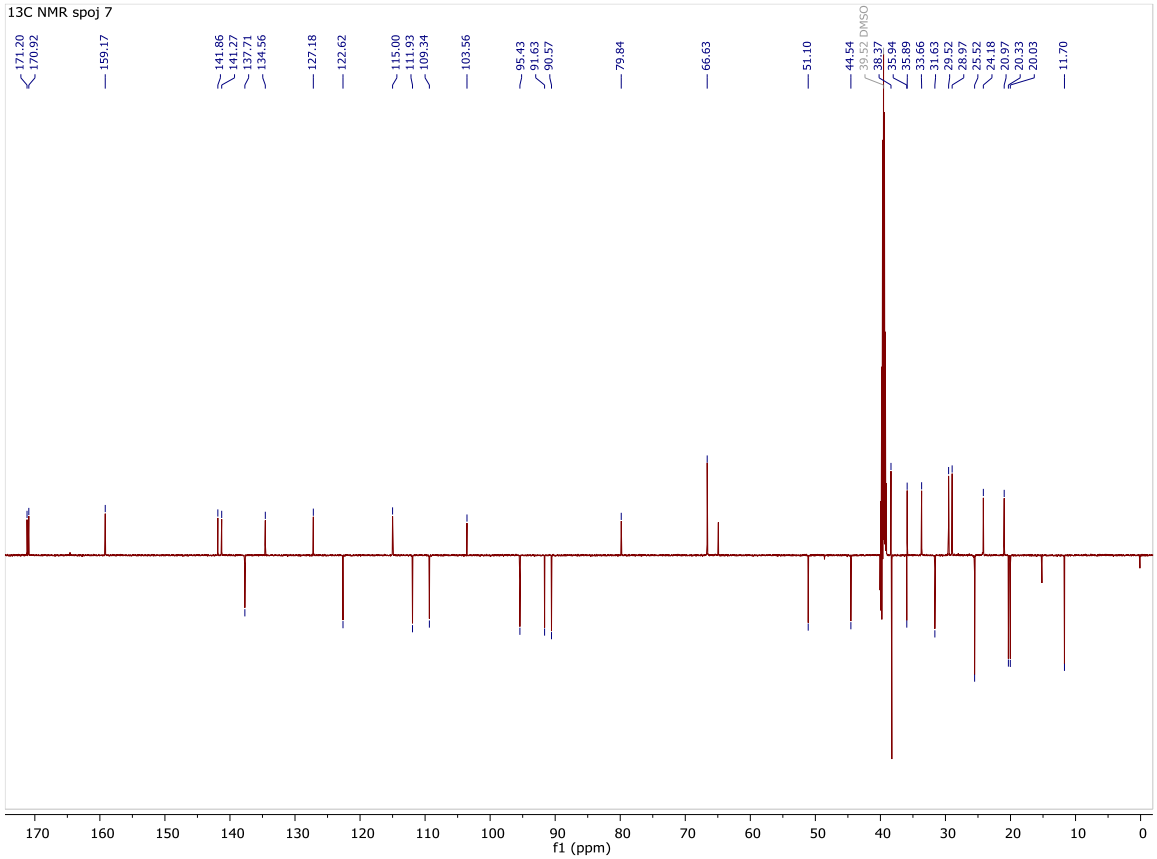
7




+ESI Scan:1 (rt: 0.113-0.551 min, 30 scans) Frag=135.0V CXXII21_2.d
x10 5
608.2
342.0
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)


%T
3427.15
2926.72cm-1
1743.90cm-1
1661.76
1627.02cm-1
1451.21cm-1
1378.48cm-1
1275.85cm-1
1236.14cm-1
1165.62cm-1
1032.76cm-1
1009.09cm-1
926.66cm-1
842.06cm-1
739.56cm-1
557.39cm-
cm-1


1H NMR spoj 7
0.00 TMS
0.96
1.00
0.98
0.98
1.00
0.98
1.01
1.05
1.01
2.05
2.00
2.98
2.06
1.99
1.04
1.08
1.03
1.06
3.09
3.07
3.07
1.07
1.08
3.02
2.98
11.5 11.0 10.5 10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
f1 (ppm)


13C NMR spoj 7
171.20
170.92
159.17
141.86
141.27
137.71
134.56
127.18
122.62
115.00
111.93
109.34
103.56
95.43
91.63
90.57
79.84
66.63
51.10
44.54
39.52 DMSO
38.37
35.94
35.89
33.66
31.63
29.52
28.97
25.52
24.18
20.97
20.33
20.03
11.70
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
f1 (ppm)

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Sinteza harmizinina amidnog tipa u položajima O-7 i N-9 β-karbolinskog prstena

Magdalena Gregorić

Artemizinin i njegovi derivati predstavljaju najznačajniju skupinu lijekova u borbi protiv malarije. S obzirom da je pojava rezistencije na dosad poznatu terapiju protiv malarije veliki globalni problem, potrebno je kontinuirano istraživati nove potencijalne lijekove. Cilj ovog diplomskog rada bila je sinteza harmizinina, hibridnih spojeva dviju molekula poznatih antimalarijskih svojstava, artezunata i harmina, za koje se pretpostavlja da bi mogli pokazati pojačano antimalarijsko djelovanje. Sinteza hibridnih spojeva uključivala je reakciju povezivanja artezunata i amina harmina **2** ili **6**, uz coupling reagens i bazu. Reakciji povezivanja prethodila je sinteza amina **2** i **6**, pripravljenih u položajima N-9 i O-7 β-karbolinskog prstena u nekoliko koraka počevši od komercijalno dostupnog harmina. Novosintetizirani harmizinini karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama te su im pomoću programa *SwissADME* određene vrijednosti farmakokinetičkih parametara koji predviđaju lošu GIT apsorpciju i upitnu oralnu bioraspoloživost ovih molekula. Nadalje, program predviđa kako su harmizinini potencijalni supstrati P-glikoproteina i potencijalni inhibitori enzima CYP3A4. Daljnjim istraživanjima, koji nadilaze okvire ovog diplomskog rada, sintetiziranim harmizininima **3** i **7** bit će ispitano antimalarijsko i antiproliferativno djelovanje.

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

Rad sadrži: 58 stranica, 7 grafičkih prikaza, 4 tablica i 42 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: artemizinin, malarija, rak, harmin, sinteza, reakcija povezivanja

Mentor: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Hrvoje Rimac, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Hafner, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Synthesis of amide-type harmisinins in the positions O-7 and N-9 of the β-carboline ring

Magdalena Gregorić

SUMMARY

Artemisinin and its derivatives are the most important drugs in the fight against malaria. Since the emergence of resistance to the known antimalarial drugs is a major global problem, new potential drugs need to be constantly explored. The aim of this diploma thesis was the sythesis of harmisinins, hybrid compounds prepared by covalently linking two molecules with known antimalarial properties, artesunate and harmine, which are thought to have antimalarial activity. The synthesis of hybrid compounds was carried out by coupling reaction of artesunate and harmine-based amine **2** or **6**, with coupling reagent and base. The coupling reaction was preceded by the synthesis of amines **2** and **6**, which were prepared starting from commercial harmine in several steps at the N-9 and O-7 positions of the β-carboline ring. Newly synthesized harmisinins were characterized by standard analytical and spectroscopic methods. The *SwissADME* program was used to determine values of their pharmacokinetic parameters, which predicted poor GIT absorption and questionable oral bioavailability of these molecules. In addition, the program predicted that harmisinins are potential substrates of P-glycoprotein and potential inhibitors of CYP3A4 enzyme. In further research, beyond the scope of this diploma thesis, synthesized harmizinins **3** and **7** will be evaluated for their antimalarial and antiproliferative activity.

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

Thesis includes: 58 pages, 7 figures, 4 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: artemisinin, malaria, cancer, harmin, synthesis, coupling reaction

Mentor: **Zrinka Rajić**, **Ph.D.** / *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Zrinka Rajić**, **Ph.D.** / *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Hrvoje Rimac, **Ph.D.** /*Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Anita Hafner, **Ph.D.** /*Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2022.