

Natan Koraj

**Sinteza i karakterizacija harmicena; novih 1-,
7- i 9-supstituiranih amida β -karbolina i
ferocena**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Perković.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Perković na pomoći i savjetima u izradi ovog rada.

Hvala zaposlenicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na strpljenju, pomoći i savjetima tijekom rada u laboratoriju.

Hvala obitelji i prijateljima na podršci.

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



KRATICE

5-HT _{2A}	serotoninski receptor tip 2A
ACT	kombinirana terapija temeljena na artemisininu (engl. <i>artemisinin-based combination therapy</i>)
ADMP	2-azido-1,3-dimetilimidazolin heksafluorofosfat
Boc	butoksikarbonil
D4	dopaminski receptor tip 4
DBU	1,8-diazabiciklo[5,4,0]undeka-7-en
DIEA	diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
F ₂₅₄	fluorescencija na 254 nanometara
FTIR-ATR	infracrvena spektroskopija Fourierove transformacije - atenuirana potpuna refleksija
HATU	(1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinij 3-oksidgeksafluorofosfat
HPLC-MS/MS	tehnika vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemске masene spektrometrije
IC ₅₀	koncentracija koja inhibira rast 50 % stanica
IR	infracrveno elektromagnetsko zračenje
MeOH	metanol
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MS	masena spektrometrija
MW	mikrovalni reaktor
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
OAt-	1-oksi-7-azabenzotriazol
Pf3D7	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 klorokin osjetljivi soj

<i>PfBre1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Bre1 klorokin rezistentan soj
<i>PfCRT</i>	transporter rezistencije na klorokin vrste <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfCytB</i>	citokrom <i>b Plasmodium falciparum</i>
<i>PfD10</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> D10 atovakvon rezistentan soj
<i>PfD6</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> D6 soj osjetljiv na širok spektar lijekova
<i>PfDd2</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Dd2 klorokin rezistentan soj
<i>PfF32</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> F32 artemisinin rezistentan soj
<i>PfFcB1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> FcB1 klorokin rezistentan soj
<i>PfFcM17</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> FcM17 klorokin rezistentan soj
<i>PfFcM29</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> FcM29 klorokin visoko rezistentan soj
<i>PfFcM6</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> FcM6 klorokin rezistentan soj
<i>PfFCR3</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> FCR3 klorokin rezistentan soj
<i>PfFG1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> FG1 klorokin rezistentan soj
<i>PfHsp90</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> protein toplinskog šoka 90
<i>PfK1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> K1 soj rezistentan na klorokin, pirimetamin i sulfadoksin
<i>PfNF-54</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> NF-54 klorokin osjetljivi soj
<i>PfThai</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Thai klorokin rezistentan soj
<i>PfW2</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> W2 širokog spektra rezistencije
s.t.	sobna temperatura
SAD	Sjedinjene Američke Države
Sp.	srodna vrsta (lat. <i>Species affinis</i>)
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctena kiselina
THF	tetrahidrofuran

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Malarija – javnozdravstveni problem i plazmodij kao uzročnik bolesti	2
1.1.1	Terapijski pristup u liječenju malarije i problem rezistencije	3
1.2	Hibridni spojevi kao alternativa kombiniranoj terapiji kod rezistencije	5
1.3	Hibridni spojevi – pristup u dizajnu novih lijekova	7
1.4	Antimalarijski hibridi	9
1.5	Derivati β -karbolina kao farmakofori u hibridnim antimalaricima	12
1.6	Ferocen u hibridnim molekulama kao potencijalnim antimalaricima	16
2	OBRAZLOŽENJE TEME	18
3	MATERIJALI I METODE	20
3.1	Sinteza amina β -karbolina u položaju 1 (1f)	22
3.1.1	Sinteza 1-(dimetoksimetil)-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (1a)	22
3.1.2	Sinteza 1-(dimetoksimetil)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (1b)	22
3.1.3	Sinteza 9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-1-karbaldehida (1c)	23
3.1.4	Sinteza (9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-1-il)metanola (1d)	23
3.1.5	Sinteza 1-(azidometil)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (1e)	23
3.1.6	Sinteza (9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-1-il)metanamina (1f)	24
3.2	Sinteza amina β -karbolina u položaju 7 (2c)	25
3.2.1	Sinteza harmola (2a)	25
3.2.2	Sinteza <i>tert</i> -butil (2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-7-il)oksi)etil)karbamata (2b)	25
3.2.3	Sinteza 2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-7-il)oksi)etan-1-amina (2c)	26
3.3	Sinteza amina β -karbolina u položaju 9 (3b)	27
3.3.1	Sinteza <i>tert</i> -butil (2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)etil)karbamata (3a)	27
3.3.2	Sinteza 2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)etan-1-amina (3b)	28

3.4	Sinteza amida ferocenkarkoboksilne kiseline i β -karbolinskih amina (4a-c).....	28
3.4.1	Sinteza <i>N</i> -((9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-1-il)metil)ferocenamida (4a)	29
3.4.2	Sinteza <i>N</i> -(2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-7-il)oksi)etil)ferocenamida (4b)	30
3.4.3	Sinteza <i>N</i> -(2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)etil)ferocenamida (4c)	31
4	REZULTATI I RASPRAVA	32
5	ZAKLJUČAK	41
6	LITERATURA	43
7	SAŽETAK / SUMMARY	50
8	PRILOZI	53

1 UVOD

1.1 Malarija – javnozdravstveni problem i plazmodij kao uzročnik bolesti

Malarija, bolest uzrokovana parazitom iz roda *Plasmodium*, predstavlja veliki globalni zdravstveni problem, a posebno pogađa zemlje jugoistočne Azije i supsaharske Afrike. U posljednjem desetljeću broj oboljelih i umrlih od malarije redovito pada zahvaljujući naporima uložnim u prevenciju zaraze i povećanoj dostupnosti lijekova. Ipak, u 2020. godini opet dolazi do porasta broja oboljelih i umrlih. U toj godini procijenjeno je više od dvjesto milijuna slučajeva malarije u svijetu, od čega je više od šesto tisuća završilo smrću (www.who.int, a). Iako je poznato preko 200 vrsta plazmodija, kod ljudi su najznačajniji uzročnici bolesti vrste *P. falciparum* i *P. vivax*, te manje značajne vrste *P. malariae*, *P. ovalae* i *P. knowlesi*. Parazit se na čovjeka prenosi pomoću vektora – komarca. Bolest karakteriziraju periodičke groznice ovisne o fazi životnog ciklusa parazita, a osim groznicom, klinički se manifestira i znojenjem, glavoboljom i slabošću. U kasnijim fazama mogu se razviti ozbiljniji simptomi poput promjena u svijesti, teške anemije i otkazivanja bubrega ili drugih organa (Sato, 2021; Crutcher i Hoffman, 1996).

Životni ciklus plazmodija čine četiri faze u dva domaćina. Za ljude infektivna faza, sporozoit, prenosi se na čovjeka ubodom komarca roda *Anopheles*. Uneseni sporozoiti krvotokom dopijevaju do jetre, inficiraju stanice u kojima formiraju shizonte te se repliciraju. Pucanjem nastalih shizonta dolazi do oslobađanja merozoita, eritrocitne faze plazmodija. Vrste *P. vivax* i *P. ovale* mogu ostati u jetri u latentnoj fazi hipnozoita. Oslobođeni merozoiti šire se kroz krvotok, inficiraju eritrocite gdje diferenciraju u trofozoite. Trofozoiti zatim tvore eritrocitni oblik shizonta u kojem nastaje nova generacija merozoita. Oslobođanjem merozoita iz shizonta dolazi do oštećenja eritrocita i upravo ovaj događaj je odgovoran za periodičke groznice. Vrijeme potrebno da nastane nova generacija merozoita ovisi o vrsti plazmodija pa se stoga razlikuje i period između napadaja. Druga mogućnost je da trofozoit diferencira u gametocit, spolnu fazu plazmodija koja ulazi u komarca prilikom sljedećeg uboda. Gametociti koji dopijaju u komarca sazrijevaju i oplodnjom proizvode za ljude infektivne sporozoite (Sato, 2021; Crutcher i Hoffman, 1996).

1.1.1 Terapijski pristup u liječenju malarije i problem rezistencije

Farmakoterapija započinje nakon potvrde infekcije nekom od prikladnih tehnika detekcije poput mikroskopskih tehnika pregleda razmaza krvi ili brzih dijagnostičkih antigenskih testova. Razlikujemo farmakoterapiju nekomplikirane malarije i teške malarije. U nekomplikiranoj malariji cilj je eliminirati sve parazite iz krvi, a kod sojeva koji prelaze u latentnu fazu i uništiti hipnozoite kako bi se spriječio relaps. Teška malarija po život je ugrožavajuće stanje koje bez terapije završava fatalno u gotovo 100 % slučajeva, stoga je primarni cilj spriječiti smrt pacijenta. Da bi terapija bila uspješna ključno je uzeti u obzir geografsko područje infekcije kako bi se procijenilo radi li se o sojevima rezistentnim na neke lijekove (www.who.int, b).

Terapija nekomplikirane malarija uzrokovane vrstama *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malarie* i *P. knowlesi* dijeli se na liječenje infekcije sojevima osjetljivim i otpornim na klorokin. Kod infekcija sojevima osjetljivim na klorokin lijekovi izbora su klorokin ili hidroksiklorokin (www.cdc.gov). Ovi lijekovi djeluju na trofozoite i na krvne shizonte inhibicijom nastanka hemozoina, razgradnog produkta hema, što rezultira nakupljanjem toksičnog hema oslobođenog tijekom hranjenja u plazmodiju. Iako su ovi lijekovi bili zlatni standard u terapiji, razvojem rezistencije njihova uporaba je ograničena. Tome je najzaslužnija povećana ekspresija proteina za izbacivanje klorokina iz hranidbenih vakuola. Ti proteini kod sojeva *P. falciparum* (*PfCRT*) posebno su problematični (Halder i sur., 2018).

Izbjegavanje monoterapije može smanjiti potencijal za razvoj rezistencije, stoga su u slučaju infekcija sojevima otpornim na klorokin preporučeni kombinirani terapijski režimi. Prema smjernicama Centra za kontrolu bolesti, terapije izbora su meflokin u monoterapiji i sljedeće kombinacije: a) artemeter i lumefantrin; b) atovakvon i progvanil; c) kinin i doksiciklin, tetraciklin ili klindamicin (www.cdc.gov). Nažalost, kombinirana terapija atovakvom i progvanilom također nailazi na problem rezistencije. Mehanizam shizontocidnog i gametocidnog djelovanja atovakvona je inhibicija citokroma *b P. falciparum* (*PfCytB*), a određene mutacije dovode do promjena u katalitičkoj aktivnosti enzima. Povećanjem katalitičke aktivnosti *PfCytB* slabi učinak atovakvona (Halder i sur., 2018). Terapija kininom tek u kombinaciji s antibioticima rezultira zadovoljavajućom stopom izlječenja. Zbog visoke toksičnosti kinina u terapijskim dozama ove kombinacije su druga linija liječenja (Achan i sur., 2011). Već spomenuta kombinacija artemetera i lumefantrina jedan je

od primjera standarda liječenja prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji; kombinirane terapije bazirane na artemisininu (engl. *artemisinin-based combination therapy*, ACT). U principu artemisinini koji su dio ACT-a (artesunat, artemeter, dihidroartemisinin) brzo i učinkovito uništavaju parazite u svim fazama generiranjem slobodnih radikala pomoću endoperoksidne skupine i Fe²⁺ nastalih uslijed razgradnje hema. Brzu eliminaciju artemisinina nadomješta partnerski lijek dugotrajnog učinka različitog mehanizma djelovanja (lumefantrin, amodiakin, meflokin, piperakin, sulfadoksin-pirimetamin). Do rezistencije na partnerske lijekove, meflokin i lumefantrin, dolazi uslijed mutacije ili pojačane ekspresije proteina odgovornih za izbacivanje ksenobiotika što rezultira smanjenom koncentracijom lijeka na mjestu djelovanja. Prisutnost rezistencije uzrokovane proteinskim kompleksima za izbacivanje ksenobiotika značajne za neke partnerske lijekove može se zaobići korištenjem drugačije kombinacije – npr. artesunata i amodiakina (Halder i sur., 2018; www.who.int, b). U terapiji infekcija sojevima *P. vivax* i *P. ovale* uz redovnu terapiju ključno je korištenje primakina ili tafenokina. Ovi lijekovi djeluju na latentnu fazu plazmodija – hipnozoit te na taj način sprečavaju relaps bolesti (www.cdc.gov; www.who.int, b).

U teškim slučajevima malarije većina pacijenata nije u mogućnosti primiti oralnu ACT pa je lijek odabira derivat artemisinina (artesunat, artemeter) ili alkaloid kininovca (kinin, kinidin) za parenteralnu uporabu te se po poboljšanju stanja pacijenta nastavlja oralna ACT. Samo neke od komplikacija teške malarije su konvulzije, plućni edem, šok i anemija koje zahtijevaju dodatno liječenje antikonvulzivima, diureticima, antibioticima ili transfuzijom krvi (Li i Weina, 2010; www.who.int, b).

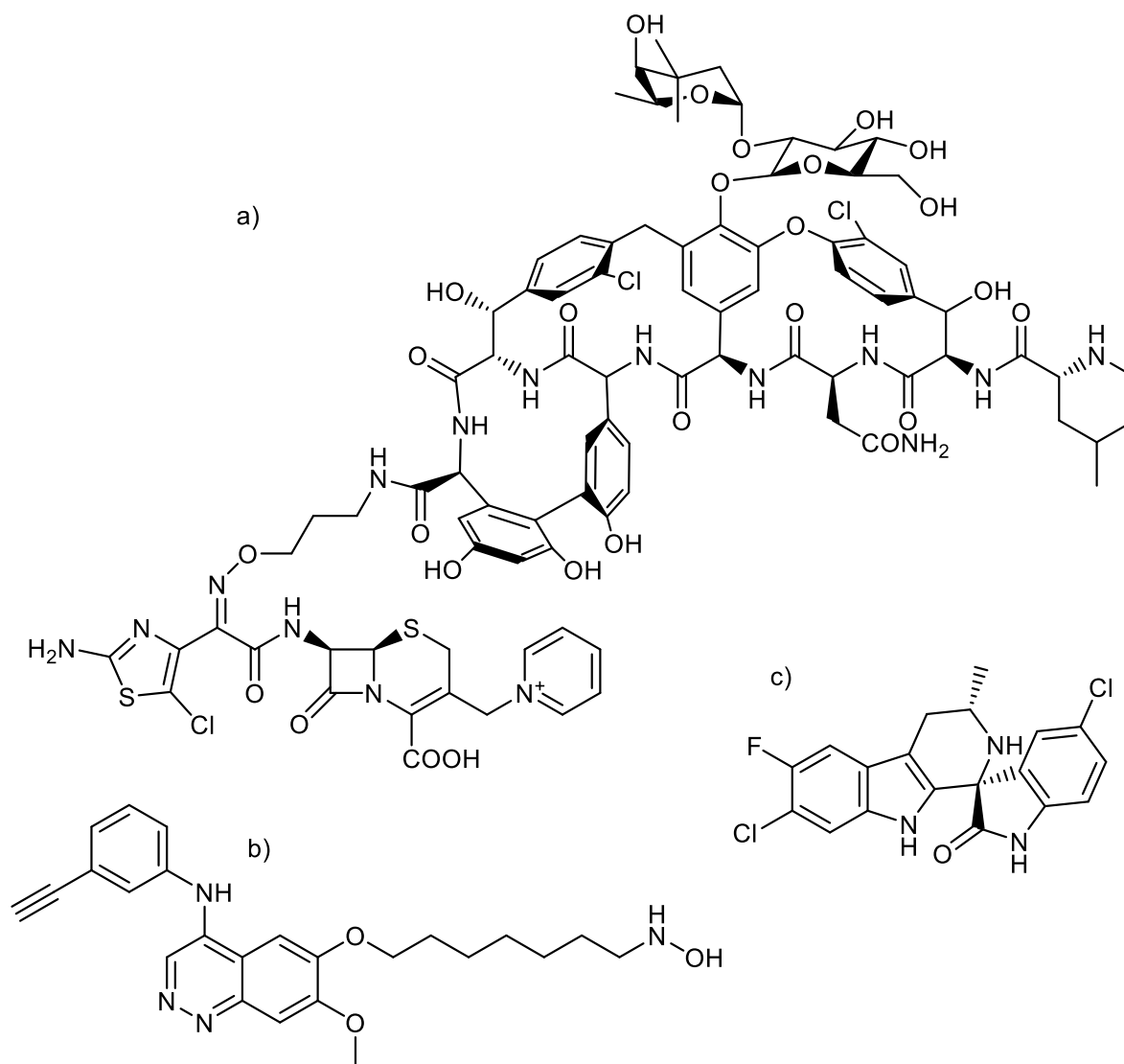
Uz već spomenutu široko rasprostranjenu rezistenciju različitih sojeva plazmodija na klorokin, u dijelovima jugoistočne Azije došlo je do pojave sojeva *P. falciparum* smanjenog odgovora na artemisinine. Ovo predstavlja veliki problem jer su artemisinini najviše zaslužni za djelotvornost ACT pa dolazi do puno većeg pritiska na učinkovitost partnerskih lijekova za koje je rezistencija već široko prisutna (Nsanzabana, 2019; www.who.int, b). Problem rezistencije na ACT od još većeg značaja je u Kambodži. U ispitivanjima je kod 3,3 % ispitanika produljeno vrijeme odgovora na terapiju, unatoč potvrđenoj zadovoljavajućoj izloženosti artemisininu. Zabilježeni su slučajevi kod kojih liječenjem s ACT nije postignuto izlječenje (Noedl i sur., 2010; www.who.int, b).

1.2 Hibridni spojevi kao alternativa kombiniranoj terapiji kod rezistencije

Kombinirana terapija odličan je alat u svladavanju rezistencije, uz već spomenuti primjer ACT u liječenju malarije, bitna je kod bakterijskih infekcija te karcinoma. Primjena više od jednog antibiotika povećava spektar djelotvornosti i uništava veći udio bakterija čime se smanjuje opasnost od rezistencije. Kombinirana terapija u liječenju karcinoma igra glavnu ulogu u sprečavanju brzog razmnožavanja mutirajućih stanica s potencijalom za razvoj rezistencije (Alven i Aderibigbe, 2019; Bayat Mokhtari i sur., 2017; Pletz i sur., 2017). S druge strane, kombinirana terapija ima svoje nedostatke. Različito poluvrijeme eliminacije stvara probleme u održavanju učinkovite koncentracije svih lijekova. Na učinkovitu koncentraciju utječu i različita raspodjela te manje predvidive interakcije lijekova. Kombinirana terapija može zahtijevati odvojeno uzimanje lijekova što dovodi do slabije adherencije pacijenata. Na posljeticu, korištenjem više različitih lijekova povećava se vjerojatnost nuspojava. Fiksne kombinacije lijekova omogućuju jednostavnije doziranje, a time i bolju adherenciju, no njihov razvoj je izazovan. Različita svojstva molekula zahtijevaju posebnu pozornost u izradi formulacije, a lijekovi mogu stupati u neočekivane interakcije koje smanjuju bioraspoloživost (Goodwin i sur., 2009; Riechelmann i sur., 2007; Morphy i Rankovic, 2005).

Hibridni spojevi definirani su kao dva ili više farmakofora povezani kovalentnom vezom u jednu molekulu, pri čemu svaki farmakofor djeluje na svoju biološku metu u organizmu. Dvostruko biološko djelovanje u jednoj molekuli oponaša kombiniranu terapiju; omogućava širi spektar djelovanja na tumorske stanice, bakterije ili plazmodije. Uz to, farmakokinetika i farmakodinamika takvih spojeva lakše se može predvidjeti, a hibridni lijekovi potencijalno su jeftiniji od kombinacija. Adherencija pacijenata očekivano je viša od adherencije terapiji s više lijekova, čime hibridni lijekovi pružaju odgovore na nedostatke kombinirane terapije. Glavni nedostatak hibridnih spojeva je fiksni omjer farmakofora koji bi mogao ograničiti aktivnost i/ili sigurnost (Walsh i Bell, 2009; Meunier, 2008). Samo neki od primjera koji pokazuju veliki potencijal u povećanju učinkovitosti i zaobilazanju rezistencije su antibakterijski hibridi rifampicina s fluorokinolonima te vankomicina s cefalosporinima. Hibrid vankomicina i cefalosporina – cefilavancin (Slika 1a) u 2020. godini ušao je u 3. fazu kliničkih ispitivanja za liječenje kompliciranih infekcija kože i mekih tkiva (Surur i Sun, 2021). Uz brojne hibride temeljene na cisplatinu, uspješan primjer citostatika je hibrid građevnih elemenata inhibitora kinaze i histondeacitalaze – CUDC-101 (Slika 1b). U 1. fazi kliničkih ispitivanja u liječenju raka pločastih stanica glave i vrata pokazani su preliminarni dokazi o učinkovitosti i dobra

tolerancija pacijenata na lijek (Szumilak i sur., 2021). Cipargamin (Slika 1c), hibrid tetrahidro- β -karbolina i oksindola, trenutno je u počecima 2. faze kliničkog ispitivanja za liječenje teške malarije uzrokovane *P. falciparum* u kojem će mu se ispitati sigurna i učinkovita intravenozna doza (Efange i sur., 2020; www.clinicaltrials.gov).



Slika 1. Primjeri hibridnih spojeva u kliničkim ispitivanjima: a) cefilavancin; b) CUDC-101; c) cipargamin (Surur i Sun, 2021; Szumilak i sur., 2021; Efange i sur., 2020)

1.3 Hibridni spojevi – pristup u dizajnu novih lijekova

Morphy i Rankovic (2005) prepoznali su već početkom 2000-ih na lijekovima s dvostrukim djelovanjem bolju učinkovitost u odnosu na lijekove s jednom biološkom metom. Povećanjem selektivnosti djelovanjem samo na D₄ ili samo na 5-HT_{2A} željelo se smanjiti nuspojave antipsihotika klozapina. Međutim, povećanje selektivnosti odrazilo se negativno na aktivnost te je ona bila razočaravajuća. Zaključak je bio da će derivati s dvojnim djelovanjem imati bolju aktivnost. Ovakav se pristup dizajniranja ciljano neselektivnih lijekova počeo češće primjenjivati. Na primjer, pozornost je s neselektivnih tricikličkih antidepresiva skrenuta na selektivne inhibitore ponovne pohrane serotonina i noradrenalina, dok je s nesteroidnih protuupalnih lijekova, inhibitora ciklooksigenaze-1 i -2 usmjerena na inhibitore ciklooksigenaze-2 i 5-lipooksigenaze. Za takve spojeve uveden je naziv „dizajnirani višestruki ligandi“. Grupirani su u tri skupine s obzirom na način povezanosti farmakofora: 1) farmakofori povezani kovalentnom ili biorazgradivom poveznicom; 2) pridruženi farmakofori i 3) farmakofori s djelomičnim preklapanjem u strukturi (Slika 2) (Morphy i Rankovic, 2005).



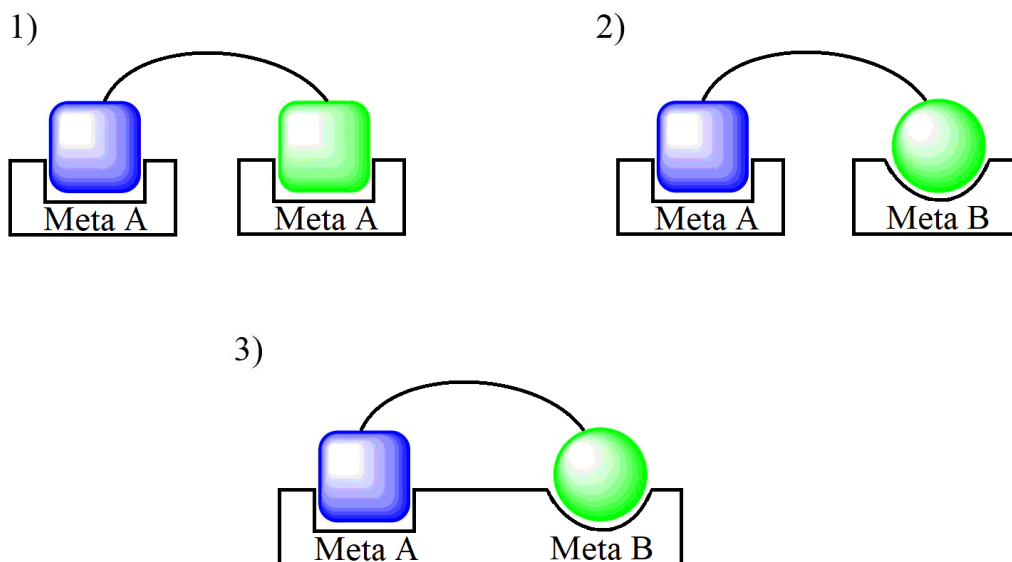
Slika 2. Prikaz odnosa farmakofora u dizajniranim višestrukim ligandima (Morphy i Ranković, 2005).

Hibridni spojevi u suštini su dizajnirani višestruki ligandi te se mogu dizajnirati povezivanjem već poznatih lijekova u jednu molekulu pomoću poveznice ili pak povezivanjem farmakofora za koje je poznata biološka aktivnost. Cilj hibridizacije je izbjeći nedostatke pojedinih farmakofora, što uključuje slabu topljivost, toksičnost i/ili rezistenciju. Odlični izvori novih farmakofora su prirodni spojevi ili organometalni spojevi koji u hibridima pokazuju izraženu biološku aktivnost. Potrebno je poznavati strukturne promjene farmakofora koje se toleriraju kako u povezivanju ne bi došlo do izostanka biološke aktivnosti. Poveznica može biti stabilna ili biorazgradiva, a u povezivanju deriviranih molekula često se primjenjuje takozvana 'klik kemija' koja omogućava jednostavnu sintezu hibridnih molekula (Bérubé, 2016; Fortin i Bérubé, 2013; Walsh i Bell, 2009). Farmakofori hibridnih spojeva mogu ispoljavati učinak na biološke mete na tri načina (Slika 3):

1) Spojevi kod kojih svaki od farmakofora neovisno djeluje na jednaku biološku metu, ali im je mehanizam djelovanja različit (npr. kod trioksakina aminokinolinski farmakofor inhibira polimerizaciju hema, dok nakon redukcije endoperoksidni farmakofor alkilira hem, zbog takvog djelovanja još se nazivaju hibridi 'dvosjekli mač')

2) Spojevi koji ispoljavaju učinak djelovanjem na različite biološke mete (npr. hibrid klorokina i inhibitora pumpe za izbacivanje klorokina *PfCRT*, inhibitor pumpe omogućuje djelovanje klorokinskog farmakofora na drugu metu čime se zaobilazi rezistencija)

3) Spojevi koji djeluju istovremeno na dvije povezane biološke mete (npr. DNA ligandi koji ciljaju specifične sekvence s ciljem kontrole ekspresije DNA) (Meunier, 2008).



Slika 3. 1) Hibridi 'dvosjekli mač' čiji farmakofori djeluju na istu metu različitim učinkom; 2) Hibridi čiji farmakofori djeluju na različite biološke mete; 3) Hibridi čiji farmakofori djeluju istovremeno na različita mjesta iste biološke mete (Meunier, 2008)

1.4 Antimalarijski hibridi

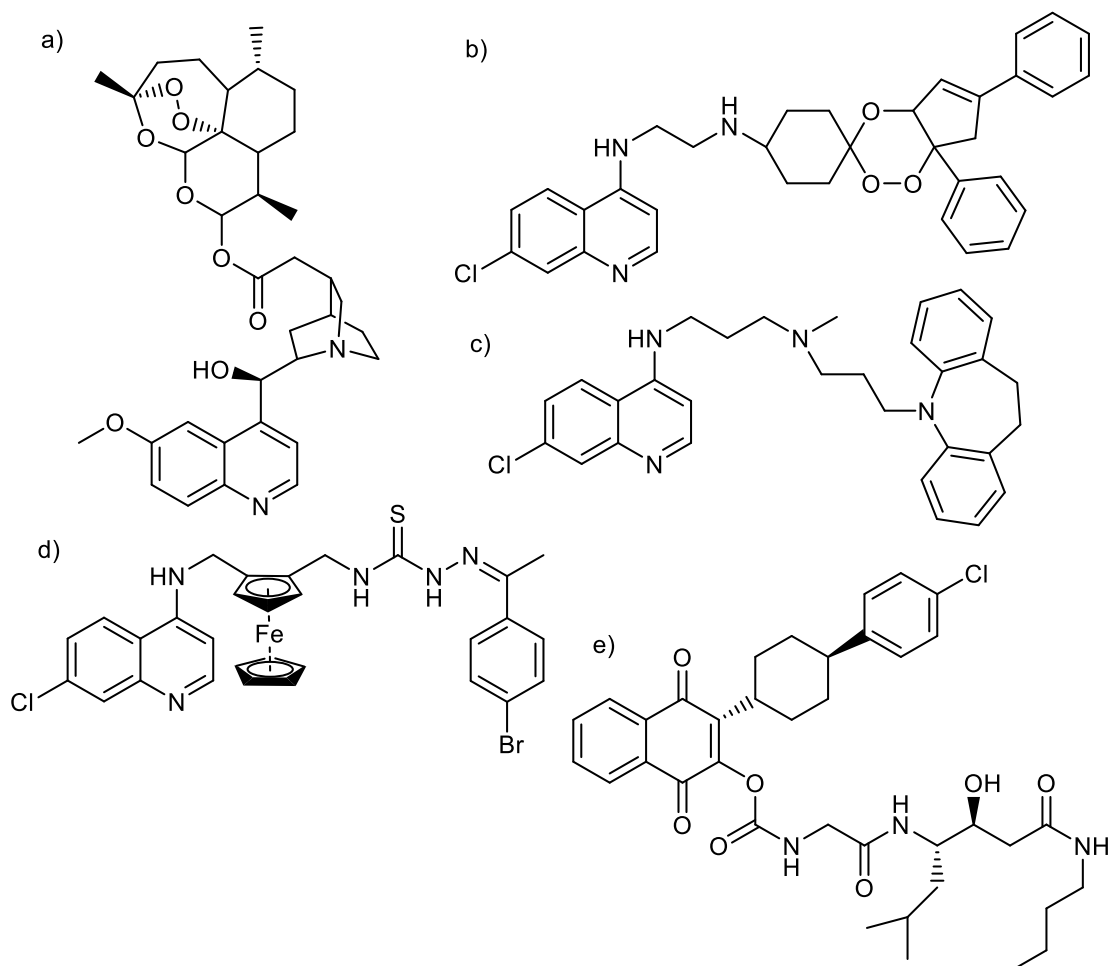
Do sada je jasno da u terapiji malarije postoji problem rezistencije koji se relativno uspješno rješava korištenjem kombinirane terapije međutim i takav način terapije ima svoja ograničenja. Vidljivo je da hibridni spojevi predstavljaju potencijal u zaobilazanju nedostataka kombinirane terapije te da postoji trend u razvoju novih lijekova koji bi djelovali na više meta. U preglednom radu Walsh i Bella opisani su brojni hibridni spojevi s antimalarijskim djelovanjem razvijeni u prvom desetljeću 2000-ih godina (Walsh i Bell, 2009). Tablica 1 prikazuje raznolikost farmakofora i poveznica hibrida na nekim od aktivnijih spojeva protiv *P. falciparum in vitro*.

Tablica 1. Hibridni spojevi s antimalarijskom aktivnošću (Walsh i Bell, 2009). IC₅₀ = koncentracija u nM koja inhibira rast *P. falciparum* za 50 %.

Molekula A	Molekula B	Poveznica	IC ₅₀	Soj
Artemisinin	Kinin	Ester	9,0-10	3D7 i FcB1
Triflorometil- artemisinin	Meflokin	C-N, diester	2,4-17	F32, Thai, FcB1, K1
Trioksan/oksolan	Aminokinolin	C-N	2,0-540	FcB1, FcM29, Nigerian
Aminokinolin	Tetraoksan	Amid, C-N	2,0-33	W2
Klorokin	Imipramin	C-N	2,9-5,5	D6, Dd2
Aminokinolin	Inhibitor glutation reduktaze	Ester, eter, C- N, amid	5,0-520	Thai, F32, D6, FcB1, W2, K1
Ferokin	Tiosemikarbazon	C-N	100-9600	3D7, W2, FCR3, Bre1
Atovakvon	Inhibitor plazmapepsina	Karbamat	0,61-5,3	D10, W2

Novi hibridni spojevi uglavnom imaju jače antimalarijsko djelovanje od pojedinačnih farmakofora te su često učinkoviti protiv rezistentnih sojeva. Jedan od prvih i najjednostavnijih primjera antimalarijskih hibrida je spoj artemisinina i kinina povezanih esterskom poveznicom. Taj hibrid je pokazao jaču biološku aktivnost *in vitro* protiv sojeva *Pf3D7* i *PfFcB1* od pojedinačnih lijekova te kombinacije lijekova u omjeru 1:1 (Slika 4a) (Walsh i sur., 2007). Trioksani i triksolani su sintetski endoperoksidi, sadrže komponentu zaslužnu za aktivnost artemisinina, a njihovi se razni derivati jednostavno sintetiziraju. Primjer su korištenja samo

aktivne komponentne poznatih antimalarika kao farmakofora u hibridima. Njihovi hibridi s aminokinolinima nazvani su trioksakini, a jedan od aktivnijih derivata – DU 1102 (Slika 4b) protiv soja *PfFcb1* aktivan je u nanomolarnim koncentracijama (Walsh i Bell, 2009; Dechy-Cabaret i sur., 2000). Već spomenuti hibrid klorokina i imipramina povezanih C-N vezom primjer je spajanja aktivnog farmakofora s farmakoforom za premošćivanje rezistencije (Slika 4c) (Burgess i sur., 2006). Kao farmakofor u hibridnim spojevima može poslužiti i već postojeći hibrid. Tako je ferokin – hibrid ferocena i klorokina, korišten u hibridizaciji s arilom tiosemikarbazona, a poveznicu je činila C-N veza tiouree (Slika 4d) (Biot i sur., 2007). Mogućnost korištenja farmakofora drugačijeg mehanizma djelovanja od klasičnih antimalarika, poput inhibitora plazmapepsina pokazana je u hibridu inhibitora plazmapepsina i antimalarika atovakvona povezanih karbamatnom poveznicom (Slika 4e) (Walsh i Bell, 2009; Romeo i sur., 2008).



Slika 4. Primjeri antimalarijskih hibrida: a) klorokina i artemisininina; b) klorokina i trioksana; c) klorokina i imipramina; d) ferokina i tiosemikarbazona; e) atovakvona i inhibitora plazmapepsina

Hibridi temeljeni na artemisininu i klorokinu intenzivno su ispitivani u proteklom desetljeću. Pregledni radovi opisuju neiscrpan broj njihovih hibridnih spojeva, čiji bi detaljan opis mogao biti znanstveni rad sam za sebe. Sintetizirani su i opisani derivati artemisinina s derivatima akridina, kinazolina, estrogena, ferocena, primakina i mnogih drugih spojeva. Jednako mnogo su istraživani hibridi klorokina s derivatima triazola, pirazolopiridina, cimetne kiseline, sulfonamida, triazola i drugih molekula. Zajednički zaključak je da postoji potencijal u ovim hibridima, posebno u onima klorokina i artemisinina, polusintetskih endoperoksida i klorokina sa spojevima koji mogu poništiti rezistenciju. Još jedan zaključak je da mehanizam ovih hibridnih spojeva nije potpuno razjašnjen te je potrebno još daljnjih ispitivanja kako bi se mogli dizajnirati spojevi optimalnog učinka (Sharma i sur., 2021; Uddin i sur., 2021; Feng i sur., 2020).

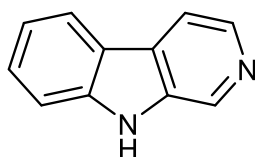
Derivati artemisinina, primakina, kinolina, indola samo su neki od primjera spojeva korištenih u čestim hibridima s organometalnim spojem – ferocenom, no njihova aktivnost još nije u potpunosti objašnjena pa zahtijeva daljnja ispitivanja (Li i sur., 2020; Reiter i sur., 2015; Matos i sur., 2012; Domarle i sur., 1998).

Otkrivanje novih terapijskih meta, a time i novih potencijalnih farmakofora za sintezu hibridnih antimalarika od ključne je važnosti u daljnjem razvoju lijekova (Tibon i sur., 2020). Jedan od novih farmakofora su spojevi s indolom u strukturi. Indol je u prirodi sveprisutan i često se može pronaći u strukturama alkaloida među koje spadaju i β -karbolini. Derivati indola vjerojatno djeluju na degradaciju hemoglobina i formiranje hemozoina zbog čega bi ispoljavali antimalarijski učinak. Nedavno su spojevi bazirani na indolu uspješno korišteni u sintezi hibridnih antimalarijskih spojeva. Sintetizirani su hibridi indola i već postojećih antimalarika te hibridi derivata indola i novih molekula (Li i sur., 2020; Surur i sur., 2020).

1.5 Derivati β -karbolina kao farmakofori u hibridnim antimalaricima

β -karbolini su velika skupina alkaloida karakterizirani pirido[3,4-*b*]indolnom strukturom i širokim spektrom biološke aktivnosti (Slika 5). Triciklička struktura derivata često je supstituirana na piridinskom ili indolnom prstenu što utječe na farmakološka svojstva. Uz nespecifične interakcije s molekulama DNA i metaboličkim enzimima, zabilježeno je antitumorsko, antitrombotsko, antiviralno, antibakterijsko, antiparazitsko i neurofarmakološko djelovanje. Upravo zbog toga predstavljaju česti polazni spoj u razvoju novih lijekova. Poznato antiparazitsko djelovanje od interesa je u razvoju antimalarika. Iako predstavljaju velik potencijal u različitim terapijskim indikacijama, bitno je uzeti u obzir i njihovu visoku toksičnost. Na primjer, harman i norharman su prekursori mutagena, dok *N*-nitrozo derivati imaju kancerogeni učinak (Cao i sur., 2007).

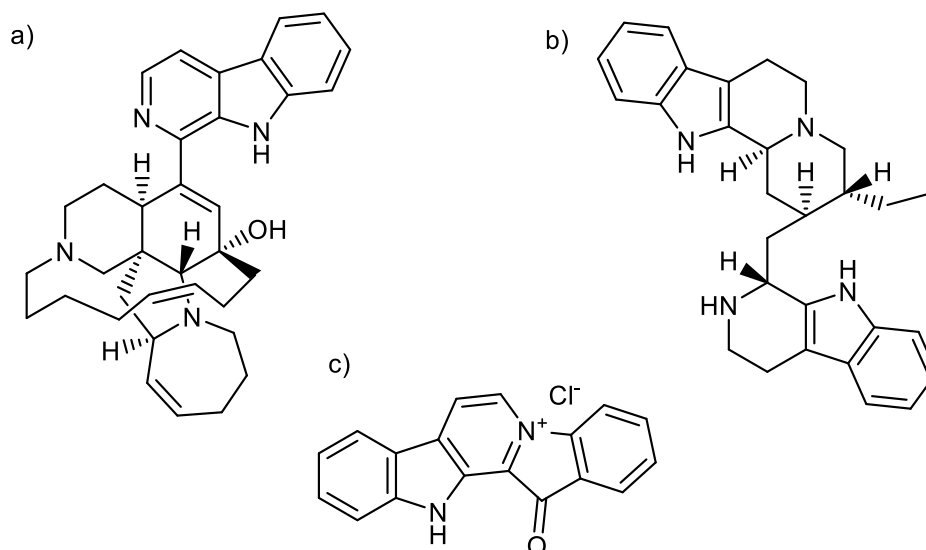
Derivati β -karbolina prvi put su izolirani iz biljke *Peganum harmala* tradicionalno korištene u halucinogenim pripravcima te u terapiji raka i malarije. Brojni biološki aktivni alkaloidi izolirani su iz morskih beskralježnjaka rodova *Aglaophenia*, *Cribricellina*, *Catenicella*, *Lignopsis*, *Eudistoma*, *Didemnum*, *Lissoclinum*, *Ritterella*, *Pseudodistoma* te iz različitih vrsta morskih spužvi (Cao i sur., 2007). Derivati poput harmana i norharmana su pronađeni u prehrambenim proizvodima i ljudskim tkivima te fiziološkim tekućinama (Piechowska i sur., 2019). Uz široku rasprostranjenost u prirodi, dostupnosti derivata doprinosi jednostavna sinteza Pictet-Spengler kondenzacijom iz triptamina i srodnih spojeva (Stöckigt i sur., 2011).



Slika 5. Kemijska struktura β -karbolina

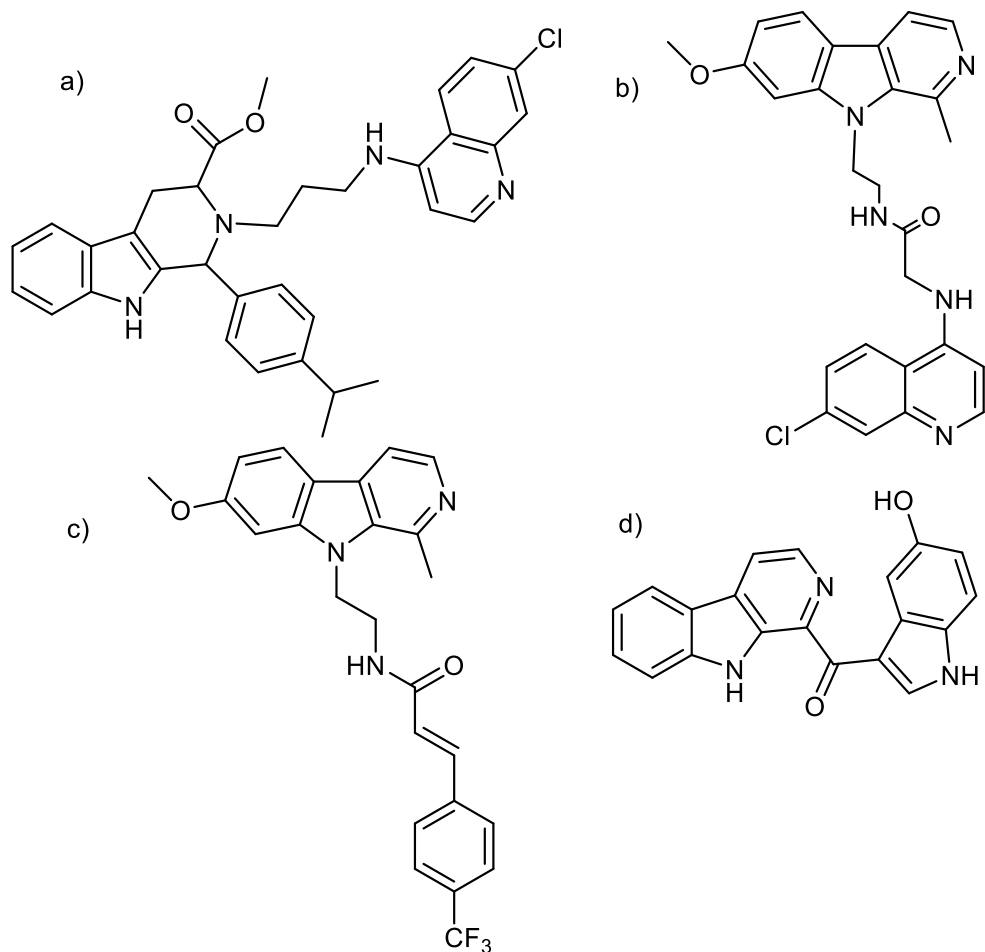
Brojni prirodni derivati β -karbolina pokazali su se visoko djelotvornima protiv plazmodija. Manzamin A je alkaloid izoliran iz spužve *Haliclona* sp. (Slika 6a). Jedan je od značajnijih spojeva uzora za nove antimalarike jer uz dobru oralnu bioraspoloživost ima jače antimalarijsko djelovanje od artemisinina i klorokina (Winkler i sur., 2006). Okrolifuanin A izoliran iz *Strychnos* sp. na rezistentnim sojevima *PfFcB1* i *PfW2* *in vitro* pokazuje učinkovitost

u nanomolarnim koncentracijama (Slika 6b) (Frédérich i sur., 2002). Još jedan prirodni derivat s nanomolarnom aktivnosti je fascaplisin (Silka 6c) izoliran iz *Didemnum* sp. Na rezistentni soj *PfW2-Mef* djeluje jače od klorokina *in vitro* protiv svih krvnih faza parazita osim trofozoita (Lu i sur., 2011). Pretpostavljeni mehanizam ovih spojeva je interkaliranje β -karbolinskog farmakofora u molekulu DNA čime ometaju njenu sintezu što rezultira inhibicijom razvoja plazmodija (Gorki i sur., 2020).



Slika 6. Derivati β -karbolina s antimalarijskom aktivnošću: a) manzamin A; b) okrolifuanin A; c) fascaplisin

Derivati β -karbolina također pokazuju potencijal u hibridnim antimalaricima. Tetrahidro derivati korišteni su u sintezi hibrida s klorokinom. U radu iz 2008. godine od 23 sintetizirana spoja, čak 6 je pokazalo aktivnost značajno veću od klorokina protiv soja *PfNF-54*, od kojih je najaktivniji imao IC_{50} od 50 nM *in vitro* (Slika 7a). Time je otkrivena nova skupina potencijalnih hibridnih antimalarika (Gupta i sur., 2008). Prethodni hibridi su supstituirani samo na piperidinskom aminu tetrahidro- β -karbolina, no nedavno sintetizirani hibridi klorokina s harminom supstituiranim su i u drugim pozicijama te s poveznicom amidnog ili triazolnog tipa. Jedan od spojeva (Slika 7b) – supstituiran na indolnom dušiku β -karbolina hibridiziran amidnom poveznicom, pokazao je iznimnu aktivnosti u koncentraciji od 2 nM protiv soja *Pf3D7* *in vitro* (Poje i sur., 2022).



Slika 7. Antimalarijski hibridi β -karbolina povezanog s: a) klorokinom (tetrahidro- β -karbolin); b) klorokinom; c) cimetnom kiselinom; d) indolom

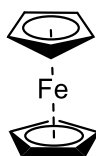
Nadalje, hibridi harmina i cimetne kiseline – harmicini također su ispitani na antimalarijskom djelovanju. Ovi spojevi pokazali su jači učinak od samog harmina, a u nekim slučajevima i primakina. Većina derivata su djelovali na krvne faze soja *PfDd2* rezistentnog na klorokin u submikromolarnim koncentracijama, te na tkivnu fazu *P. berghei* u mikromolarnim koncentracijama (Marnović i sur., 2020; Perković i sur., 2020). U nastavku istraživanja dovedena je u pitanje važnost poveznice u hibridnim spojevima, tj. ispitana je razlika u aktivnosti hibrida s triazolnom i amidnom poveznicom. Pokazalo se da hibridi s amidnom vezom imaju jači učinak, te da supstitucija na indolnom dušiku β -karbolina ima povoljan utjecaj na antimalarijsko djelovanje. Najaktivniji od spojeva s IC_{50} od 40 i 170 nM protiv sojeva *Pf3D7* i *PfDd2* *in vitro* prikazan je na Slici 7c. Uz to je predložen i pojašnjen još jedan mogući mehanizam djelovanja β -karbolina. Pomoću molekuskog sidrenja predviđeno je da se derivati β -karbolina vežu na vezno mjesto za adenozin trifosfat plazmodijskog proteina toplinskog šoka – *PfHsp90*. Budući da je ovaj protein pojačano eksprimiran u eritrocitnoj fazi

plazmodija, pretpostavlja se da se njegovom inhibicijom djeluje na razvoj parazita (Marinović i sur., 2021).

Hibridi β -karbolina i indola su također dizajnirani i sintetizirani kao potencijalni antimalarici. Jedan od derivata iz te serije, spoj na Slici 7d bio je aktivan protiv *P. falciparum* 3D7 *in vitro* dok je na humanim stanicama pokazao iznimno nisku toksičnost (Gorki i sur., 2020; Li i sur., 2020).

1.6 Ferocen u hibridnim molekulama kao potencijalnim antimalaricima

Ferocen je organometalni spoj u kojem je dvovalentno željezo vezano za dva ciklopentadienilska prstena (Slika 8.) Na sobnoj temperaturi je narančasta krutina izrazite stabilnosti na zraku, u vodi i jakim lužinama. Ferocen ima široku mogućnost primjene, npr. u sintezama spojeva, kao aditiv gorivu, katalizator u raketnom gorivu te u farmaceutskoj industriji (Bhatt, 2016). Općenito, smatra se da je uloga ferocena u strukturi popunjavanje hidrofobnih regija u veznom mjestu proteina, dakle može ga se smatrati bioizosterom fenilne skupine. Osim toga aktivnosti doprinosi generiranjem reaktivnih kisikovih specija (Patra i Gasser, 2017).

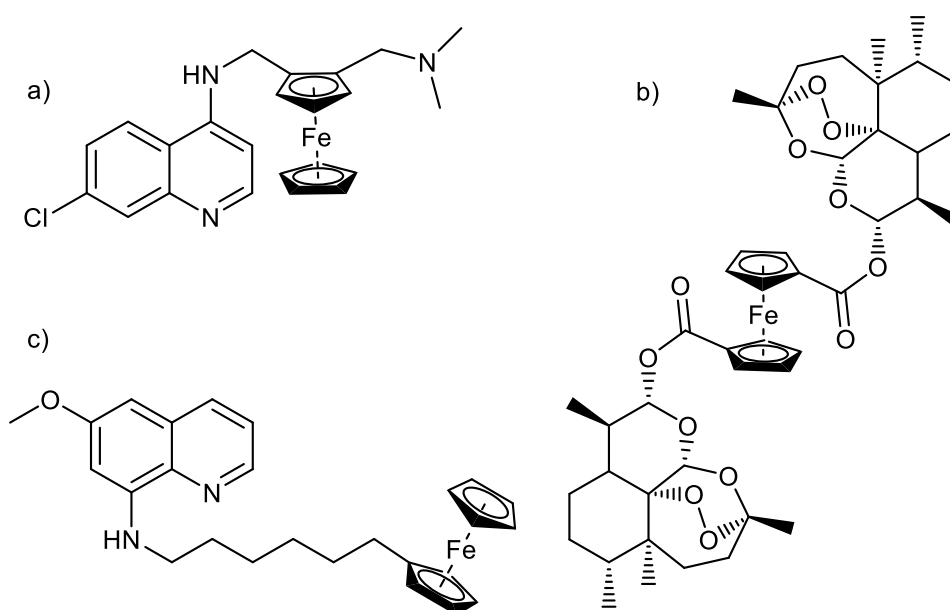


Slika 8. Kemijska struktura ferocena

Ferocen je potaknuo interes za organometalne spojeve kao potencijalne farmakofore u hibridnim spojevima još 1990-ih. Sintetizirani su hibridi klorokina i disupstituiranih amino derivata ferocena što je u konačnici rezultiralo otkrićem ferokina – jednim od najaktivnijih hibridnih antimalarika (Slika 9a). Ferokin je, uz djelovanje na klorokin osjetljive sojeve *P. falciparum* pokazao i do 22 puta jaču aktivnost od klorokina na klorokin rezistentne sojeve PfFCM6, PfFCM17 i PfFG1. Ispitivanje antimalarijskog djelovanja soli klorokina i ferocenkarboksilne kiseline pokazalo je da sol nema aktivnost što je bio dokaz da ferocen mora biti kovalentno vezan na klorokin za antimalarijsko djelovanje (Domarle i sur., 1998; Biot i sur., 1997). Pojačana aktivnost objašnjavala se poboljšanom lipofilnošću i bazičnošću, a pretpostavljeni mehanizam djelovanja bio je jednak djelovanju klorokina – inhibicija nastanka hemozoina (Fouda i sur., 2007). Noviji radovi ulogu ferocenskog farmakofora u ferokinu objašnjavaju drugačije. Generiranje hidroksilnih radikala potpomognuto klorokinom potvrđeno je u *in vivo* ispitivanjima. Istraživanja su pokazala da nastali radikali uzrokuju razgradnju probavnih vakuola plazmodija. Još jedan pretpostavljeni mehanizam je inhibicija izbacivanja klorokina putem PfCRT ili sličnih proteina, no ta tvrdnja nije potvrđena budući da nema dokaza o direktnoj interakciji organometala i transportnih proteina (Patra i Gasser, 2017, Wani i sur., 2015). Ferokin je kao partnerski lijek artefenomelu u novoj ACT stigao u 2. fazu kliničkih ispitivanja (Ashley i Phyto, 2018).

Ferocen je korišten kao građevni element u sintezi još nekih spojeva s antimalarijskim djelovanjem. Derivati trioksana hibridizirani su s ferocenom te se pokazalo da bi 1,2,3-trioksan-ferocenski hibridi mogli biti novi spojevi uzori u razvoju novih antimalarika. Jedan od hibrida (Slika 9b) imao je jaču aktivnost od klorokina s IC_{50} od 7.2 nM protiv soja *Pf3D7*, no niti jedan spoj iz ove serije ipak nije uspio nadmašiti učinkovitost artemisinina (Reiter i sur., 2015; Reiter i sur., 2014).

Derivati ferocena korišteni su u sintezi hibrida s derivatima primakina. Većina hibrida iz ove serije pokazala je *in vitro* aktivnost protiv tkivne faze plazmodija *P. berghei*, a jedan od derivata s IC_{50} od 0,17 μ M pokazao je značajno jaču aktivnost od primakina s IC_{50} od 7,5 μ M (Slika 9c). Zanimljivo je da su neki od tih spojeva bili aktivni i protiv eritrocitnih shizonta soja *PfW2* (Matos i sur., 2012). Hibridi indolnih derivata i ferocena pokazali su aktivnost protiv širokog spektra sojeva *P. falciparum*, no njihova aktivnost bila je slabija od klorokina i meflokina kod svih ispitanih sojeva (Li i sur., 2020).



Slika 9. Antimalarijski hibridi ferocena s: a) klorokinom; b) trioksanom; c) primakinom

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Malarija unatoč velikim naporima u liječenju i prevenciji svake godine uzima brojne živote. Rezistencija na često korištene lijekove poput klorokina je proširena, a smanjen odgovor nekih sojeva plazmodija na noviju terapiju – ACT, dodatno otežava liječenje. Kako bi se zaobišao problem rezistencije ključno je korištenje kombinirane terapije i uvođenje novih lijekova različitih mehanizama djelovanja, no to nosi nove izazove. Kombinirana terapija zahtjeva korištenje više ljekovitih oblika što smanjuje adherenciju i potencijalno izaziva interakcije koje mogu smanjiti učinkovitost terapije. Razvoj fiksnih kombinacija lijekova kojima bi se riješio problem adherencije, zahtjevan je i skup.

Kovalentna dvojna terapija razvojem hibridnih lijekova predstavlja mogući odgovor na postojeće probleme kombinirane terapije. Budući da se u hibridnoj molekuli nalaze dva ili više farmakofora u jednoj molekuli, razvoj ljekovitog oblika je jednostavniji, a takvi lijekovi otporniji su na razvoj rezistencije, što je od iznimne važnosti u liječenju malarije. U razvoju hibridnih spojeva kao potencijalnih antimalarika, racionalno se odabiru spojevi koji pokazuju djelovanje protiv plazmodija i kovalentno se povezuju u jednu molekulu.

Biljka *Peganum harmala* tradicionalno je korištena za liječenje malarije zbog toga što u svom sastavu sadrži harmin, jedan od najpoznatijih predstavnika β -karbolina. Tijekom godina sintetizirani su brojni derivati β -karbolina kojima je potvrđeno antimalarijsko djelovanje u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima. Ferocen je organometalni spoj koji u hibridnim spojevima pojačava antimalarijski učinak ili doprinosi prevladavanju rezistencije.

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija 3 nova hibridna spoja, derivata β -karbolina i ferocenkarboksilne kiseline koji su amidnom vezom povezani u jednu molekulu. U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada ispitat će se antimalarijsko djelovanje novih spojeva; na eritrocitnu fazu *P. falciparum* (klorokin osjetljivi Pf3D7 i klorokin-rezistentni PfDd2 sojevi) i na jetreni fazu *P. berghei*.

3 MATERIJALI I METODE

Tijek kemijskih reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su kao nepokretna faza upotrijebljene silikagel ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka) uz sljedeće pokretne faze: cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5); diklormetan/metanol (8:1); aceton/diklormetan (1:1; 9:1; 3:2); cikloheksan/etil-acetat/metanol (30:10:5). Za pročišćavanje spojeva korištena je kromatografija na koloni, pri čemu je kao nepokretna faza korišten 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 ($\lambda = 254$ i 366 nm) te parama joda.

Tališta (t_r) su određena na Stuart SMP3 instrumentu za određivanje tališta (Barloworld Scientific, UK) u otvorenim kapilarama i nisu korigirana. ¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-600 (Bruker, SAD) pri 300, 400 i 600 MHz za ¹H i 75, 101, 151 MHz za ¹³C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO-*d*₆ otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard u ¹H, odnosno signal dimetilsulfoksida (DMSO) u ¹³C spektru, a konstante sprege (J) izražene su u hertzima (Hz). Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420). Kao tehnika ionizacije korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom i negativnom modu. FTIR-ATR spektri snimljeni su na UATR Two spektrometru (Perkin Elmer, SAD).

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

N,N-dimetilformamid (DMF), cezijev karbonat, triptamin, trifluorocetna kiselina (TFA), (1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinij 3-oksidheksafluorofosfat (HATU), diizopropiletilamin (DIEA) i 2-(*tert*-butoksikarbonilamino)-etilbromid nabavljeni su od tvrtke TCI Chemicals (Japan), a natrijev hidroksid, etil-acetat i diklormetan od tvrtke Kemika (Hrvatska). Petroleter, klorovodična kiselina (37 %) i cikloheksan nabavljeni su od tvrtke Carlo Erba Reagents (Francuska), metanol od tvrtke Honeywell Riedel de Haën (Njemačka), a natrijev sulfat i kalijev permanganat od tvrtke Gram-Mol (Hrvatska). Dietil-eter je nabavljen od tvrtke Macron Fine Chemicals (SAD), bezvodni metanol, 2,2-dimetoksiacetaldehid, harmin, ferocen karboksilna kiselina, 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en (DBU), litij aluminijev hidrid, 2-azido-1,3-dimetilimidazolin heksafluorofosfat (ADMP), octena kiselina, i paladij na ugljenu od tvrtke Sigma Aldrich (SAD), a bromovodična kiselina

(47 %) i tetrahidrofuran (THF) od tvrtke Merck (Njemačka). Argon, vodik i dušik nabavljeni su od tvrtke Messer (Hrvatska).

Sve kemikalije bile su *p.a.* stupnja čistoće.

Spojevi **1a-f**, **2b-c** i **3a-b** pripremljeni su prema ranije objavljenim propisima (Marinović i sur. 2021; Marinović i sur., 2020; Devi i sur., 2018).

3.1 Sinteza amina β -karbolina supstituiranog u položaju 1 (**1f**)

3.1.1 Sinteza 1-(dimetoksimetil)-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indola (**1a**) (Devi i sur., 2018)

U suspenziju 1 g triptamina (6,24 mmol) u 10 ml diklormetana dodani su 1,13 mL 2,2-dimetoksiacetaldehida (7,49 mmol) i otopina 0,654 mL TFA (8,798 mmol) u 2,18 mL diklormetana. Reakcijska smjesa je miješana tijekom 18 h na s.t. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je izlivena u 50 mL 5 %-tne vodene otopine natrijevog hidrogenkarbonata. Smjesa je zakiseljena do pH 7,5 korištenjem 10 %-tne klorovodične kiseline te je ekstrahirana diklormetanom (3 \times 50 mL). Organski slojevi su sjedinjeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani te upareni pod sniženim tlakom. Produkt **1a** je korišten u sljedećoj reakciji bez pročišćavanja.

Iskorištenje reakcije: 1,531 g (99 %)

3.1.2 Sinteza 1-(dimetoksimetil)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indola (**1b**) (Devi i sur., 2018)

U otopinu 1,531 g spoja **1a** (6,215 mmol) u 10 mL bezvodnog THF dodano je 3,919 g KMnO₄ (24,86 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 48 h na s.t. Po završetku reakcijska smjesa je filtrirana kroz sloj Celita, a filtrat je uparen pod sniženim tlakom do suha. Ostatak nakon uparavanja otopljen je u 100 mL diklormetana te ispran destiliranom vodom (2 \times 100 mL). Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen do suha pod sniženim tlakom. Nastali međuprodukt **1b** korišten je u sljedećoj reakciji bez pročišćavanja.

Iskorištenje reakcije: 1,030 g (68 %)

3.1.3 Sinteza 9H-pirido[3,4-b]indol-1-karbaldehida (1c) (Marinović i sur., 2021)

Otopina 0,944 g spoja **1b** (3,896 mmol) u smjesi 4,922 mL octene kiseline i 7,383 mL destilirane vode refluksirana je na 100 °C tijekom 1 h. Reakcijska smjesa je zaluzena otopinom NaOH do pH 8-9 te ekstrahirana diklormetanom (3 × 50 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani te upareni do suha pod snizenim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 30:10:5 i rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje reakcije: 0,619 g (81 %)

3.1.4 Sinteza (9H-pirido[3,4-b]indol-1-il)metanola (1d) (Marinović i sur., 2021)

Suspenziji 0,896 g spoja **1c** (4,567 mmol) u 10 mL bezvodnog THF dodano je 0,260 g litij aluminijevog hidrida (6,851 mmol) u malim obrocima. Reakcijska smjesa je miješana na s.t. tijekom 1 h. Po završetku, pH reakcijske smjese je podešen do 9 te je ekstrahirano etil-acetatom (4 × 50 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani te upareni do suha pod snizenim tlakom.

Iskorištenje reakcije: 0,737 g (81 %)

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*/Hz): δ 11,39 (s, 1H, 10); 8,26 (d, 1H, 7, *J* = 5,3 Hz); 8,22 (d, 1H, 3, *J* = 7,9 Hz); 8,03 (d, 1H, 6, *J* = 5,3 Hz); 7,70 – 7,65 (m, 1H, 12); 7,54 (m, 1H, 1); 7,24 (m, 1H, 2); 5,53 (t, 1H, 14, *J* = 5,7 Hz); 4,98 (d, 2H, 13, *J* = 5,7 Hz)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*/Hz): δ 144,95 (8); 140,55 (11); 136,89 (7); 133,49 (9); 127,90 (1); 127,36 (5); 121,52 (3); 120,56 (4); 119,14 (2); 113,77 (6); 112,26 (12); 63,54 (13)

3.1.5 Sinteza 1-(azidometil)-9H-pirido[3,4-b]indola (1e) (Marinović i sur., 2021)

Otopina 0,737 g spoja **1d** (3,718 mmol) u 10 mL bezvodnog THF je ohladena na 0 °C te su dodani 2,544 g ADMP-a (8,923 mmol) i 1,668 mL DBU (11,154 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na 0 °C tijekom 2 h. Po završetku, reakcijska smjesa prebacena je u lijevak za

ekstrakciju, dodano joj je 15 mL amonijevog klorida i ekstrakcija je provedena diklormetanom (3 × 50 mL). Organske frakcije su spojene i isprane zasićenom vodenom otopinom natrijevog klorida (2 × 100 mL). Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran te uparen do suha pod sniženim tlakom. Ostatak nakon uparavanja pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5 te je dobiveno žuto ulje spoja **1e**.

Iskorištenje reakcije: 0,505 g (61 %)

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*/Hz): δ 11,78 (s, 1H, 10); 8,36 (d, 1H, 7, *J* = 5,2 Hz); 8,26 (d, 1H, 3, *J* = 8,1 Hz); 8,13 (d, 1H, 6, *J* = 5,2 Hz); 7,64 (dt, 1H, 12, *J* = 8,3; 0,9 Hz); 7,58 (m, 1H); 7,28 (m, 1H, 2); 4,89 (s, 2H, 13)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*/Hz): δ 140,58 (8); 139,19 (11); 137,75 (7); 133,86 (9); 128,50 (5); 128,44 (1); 121,87 (3); 120,74 (4); 119,57 (2); 114,77 (6); 112,02 (12); 51,59 (13)

3.1.6 Sinteza (9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)metanamina (**1f**) (Marinović i sur., 2021)

U otopinu 0,079 g spoja **1e** (0,354 mmol) u 3 mL bezvodnog metanola dodano je 0,015 g paladija na aktivnom ugljenu te je smjesa propuhana dušikom. Smjesa je zatim propuhana vodikom i tijekom 18 h miješana pod atmosferom vodika na s.t. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je filtrirana kroz Celite, a filtrat je uparen. Dobiveni produkt rastavljen je u smjesi dietil-etera i petroletera te je dobiven žuti talog spoja **1f**.

Iskorištenje reakcije: 0,056 g (80 %)

*t*_t 201–205 °C

MS (*m/z*) 196,0 (M-1)⁻

IR (ATR, *v*/cm⁻¹) 3347, 3282, 3120, 3051, 2955, 2856, 2776, 1625, 1600, 1562, 1501, 1477, 1460, 1430, 1355, 1327, 1316, 1240, 1212, 1163, 1127, 1108, 1071, 960, 896, 848, 829, 772, 747, 671, 595, 564, 516

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*/Hz): δ 8,26 (d, 1H, 7, *J* = 5,2 Hz); 8,21 (dt, 1H, 3, *J* = 7,8, 1,0 Hz); 7,97 (d, 1H, 6, *J* = 5,2 Hz); 7,62 (d, 1H, 12, *J* = 8,2 Hz); 7,53 (m, 1H, 1); 7,23 (m, 1H, 2); 4,19 (s, 2H, 13); 3,42 – 3,30 (m, 2H, 14)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 146,50 (8); 140,35 (11); 137,18 (7); 133,23 (9); 127,82 (1); 127,42 (5); 121,60 (3); 120,88 (4); 119,15 (2); 113,19 (6); 112,01 (12); 44,59 (13)

3.2 Sinteza amina β -karbolina supstituiranog u položaju 7 (2c)

3.2.1 Sinteza harmola (2a) (Marinović i sur., 2020)

Smjesa 0,250 g harmina (1,178 mmol), 3 mL koncentrirane octene kiseline i 1,5 mL 47 %-tne bromovodične kiseline miješana je u mikrovalnom reaktoru 25 minuta pri 140 °C (150 W). Po završetku reakcije, pH reakcijske smjese je pomoću 10 %-tne HCl i 5 %-tne otopine natrijeva hidroksida podešen do 9. Smjesa je ekstrahirana etil-acetatom (3×150 mL). Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt rastrljan je u dietil-eteru, te je dobiven svijetlo-žuti talog spoja **2a**.

Iskorištenje reakcije: 0,207 g (88,8 %)

3.2.2 Sinteza *tert*-butil (2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)karbamata (2b) (Marinović i sur., 2020)

U suspenziju 0,207 g harmola **2a** (1,044 mmol) u 2 mL bezvodnog DMF-a, dodano je 0,476 g cezijeveg karbonata (1,462 mmol) te je smjesa propuhana argonom tijekom 15 min. Potom je dodano 0,562 g 2-(*tert*-butoksikarbonilamino)-etilbromida (2,506 mmol) te je reakcijska smjesa grijana na 100 °C tijekom 18 h. Reakcija je prekinuta dodatkom 20 mL destilirane vode te je ekstrahirano etil-acetatom (3×40 mL). Organski slojevi su sakupljeni, isprani destiliranom vodom (2×60 mL), sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani i upareni do suha pod sniženim tlakom. Ostatak nakon uparavanja pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 8:1 te je rastrljavanjem u smjesi dietl-etera i petroletera dobiven talog spoja **2b**.

Iskorištenje reakcije: 0,250 g (70,1 %)

t_f 190–191 °C

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 11,42 (s, 1H, 10); 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz); 8,06 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz); 7,81 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz); 7,07 (t, 1H, 16, $J = 5,7$ Hz); 7,00 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz); 6,84 (dd, 1H, 2, $J = 8,7$; 2,2 Hz); 4,07 (t, 2H, 14, $J = 5,8$ Hz); 3,37 (q, 2H, 15, $J = 5,6$ Hz); 2,73 (s, 3H, 13); 1,40 (s, 9H, 19-21)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 159,22 (17); 155,74 (1); 141,92 (8); 141,23 (11); 137,61 (7); 134,55 (9); 127,26 (5); 122,68 (3); 114,96 (4); 111,98 (6); 109,34 (2); 95,38 (12); 77,82 (18); 66,66 (14); 40,66 (15); 28,25 (19-21); 20,29 (13)

3.2.3 Sinteza 2-((1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etan-1-amina (**2c**) (Marinović i sur., 2020)

Otopini 0,250 g spoja **2b** (0,732 mmol) u 5 mL metanola dodano je 1,83 mL 4 M klorovodične kiseline u metanolu (7,320 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na 50 °C tijekom 18 h. Po završetku, metanol je uparen, a dobiveni ostatak je otopljen u 15 mL destilirane vode. Pomoću 5%-tne vodene otopine natrijevog hidroksida pH vrijednost je podešena do 10-11 te je reakcijska smjesa ekstrahirana etil-acetatom (5 × 20 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani te upareni do suha pod sniženim tlakom. Ostatak nakon uparavanja rastavljen je u dietil-eteru te je dobiven talog spoja **2c**.

Iskorištenje reakcije: 0,185 g (104,5 %)

t_f 172-173 °C

MS (m/z) 242,2 ($M+1$)⁺

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3954, 3908, 3838, 3786, 3716, 3656, 3530, 3394, 3332, 3250, 3156, 3068, 2930, 2864, 2774, 2372, 1892, 1756, 1720, 1628, 1568, 1486, 1444, 1326, 1284, 1238, 1180, 1104, 1028, 996, 908, 860, 812, 636, 590

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 11,38 (s, 1H, 10); 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz); 8,04 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz); 7,79 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz); 7,01 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz); 6,85 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$; 2,2 Hz); 4,03 (t, 2H, 14, $J = 5,7$ Hz); 2,95 (t, 2H, 15, $J = 5,7$ Hz); 2,73 (s, 3H, 13); 1,58 (s, 2H, 16)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 159,46 (1); 141,91 (8); 141,25 (11); 137,73 (7); 134,54 (9); 127,20 (5); 122,57 (3); 114,84 (4); 111,89 (6); 109,37 (2); 95,29 (12); 70,36 (14); 40,98 (15); 20,33 (13)

3.3 Sinteza amina β -karbolina supstituiranog u položaju 9 (3b)

3.3.1 Sinteza *tert*-butil (2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamata (3a) (Marinović i sur., 2020)

Suspenzija 0,179 g harmina (0,845 mmol) u 3 mL bezvodnog DMF-a zagrijana je do 90 °C te je u nastalu otopinu dodano 1,238 g cezijeveg karbonata (3,801 mmol), a reakcijska smjesa je propuhana dušikom. Potom je dodano je 0,757 g 2-(*tert*-butoksikarbonilamino)-etilbromida (3,38 mmol), a reakcijska smjesa je miješana na 90 °C tijekom 18 h. Reakcija je prekinuta dodatkom 40 mL destilirane vode. Smjesa je ekstrahirana etil-acetatom (3 \times 40 mL), a skupljeni organski slojevi su isprane destiliranom vodom (2 \times 120 mL). Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen do suha pod sniženim tlakom. Ostatak nakon uparavanja pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 8:1. Dobiveni produkt je rastrljan u smjesi dietil-etera i petroletera te je dobiven bijeli talog spoja **3a**.

Iskorištenje reakcije: 0,204 g (68 %)

t_f 198–199 °C

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz); 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,5$ Hz); 7,85 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz); 7,22 (s, 1H, 12); 7,02 (t, 1H, 17, $J = 5,9$ Hz); 6,88 (dd, 1H, 2, $J = 8,7; 2,1$ Hz); 4,56 (t, 2H, 15, $J = 6,7$ Hz); 3,92 (s, 3H, 14); 3,33 (d, 2H, 16, $J = 6,4$ Hz); 2,95 (s, 3H, 13); 1.30 (s, 9H, 20-22)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 160,45 (1); 155,62 (18); 142,85 (8); 140,47 (9); 137,64 (7); 134,70 (11); 128,40 (4); 122,21 (3); 114,35 (5); 112,11 (6); 108,95 (2); 93,81 (12); 77,78 (19); 55,48 (14); 43,99 (15); 39,98 (16); 28,02 (20-21); 23,00 (13)

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

(Marinović i sur., 2020)

Otopini spoja **3a** (0,574 mmol) u 5 mL metanola dodano je 1,44 mL 4 M klorovodične kiseline u metanolu (9,743 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na 50 °C tijekom 18 h. Po završetku reakcije, metanol je uparen pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja otopljen u 15 mL destilirane vode. pH vodene otopine podešen je do 12 pomoću 5 %-tnog natrijevog hidroksida te je ekstrahirano etil-acetatom (5 × 30 mL). Skupljeni organski slojevi isprani su zasićenom otopinom natrijevog klorida (2 × 150 mL). Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen do suha pod sniženim tlakom. Ostatak nakon uparavanja rastrljan je u dietil-eteru te je dobiven prljavo-bijeli talog spoja **3b**.

Iskorištenje reakcije: 0,103 g (71 %)

t_f 134-136 °C

MS (m/z) 256,3 (M+1)⁺

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3354, 3327, 3274, 3054, 3039, 2966, 2932, 2837, 1751, 1621, 1563, 1496, 1443, 1404, 1343, 1302, 1283, 1236, 1219, 1151, 1136, 1117, 1089, 1040, 1021, 973, 941, 922, 887, 848, 815, 768, 723, 643, 599, 551, 528.

¹H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz); 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz); 7,86 (d, 1H, 6, $J = 5,1$ Hz); 7,24 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz); 6,87 (dd, 1H, 2, $J = 8,6; 2,2$ Hz); 4,54 (t, 2H, 15, $J = 7,3$ Hz); 3,91 (s, 3H, 14); 2,97 (s, 3H, 13); 2,93 (t, 2H, 16, $J = 7,3$ Hz)

¹³C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 160,50 (1); 142,92 (8); 140,64 (9); 137,66 (7); 134,76 (11); 128,23 (4); 122,30 (3); 114,18 (5); 112,18 (6); 109,12 (2); 93,80 (12); 55,61 (14); 46,87 (15); 41,94 (16); 23,28 (13)

3.4 Sinteza amida ferocenkarkoboksilne kiseline i β -karbolinskih amina (4a-c)

U suspenziju 0,050 g ferocenkarkoboksilne kiseline (0,217 mmol) u 4 mL diklormetana dodano je 0,075 mL DIEA (0,434 mmol) i 0,083 g HATU (0,217 mmol). Smjesa je miješana 20 minuta na s.t., a zatim je dodan odgovarajući amin (**1f**, **2c** ili **3b**; 0,197 mmol). Reakcijska smjesa

miješana je na s.t. tijekom 18 sati. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa obrađena je Metodom A, B ili C.

Metoda A

Reakcijska smjesa je uparena do suha, a ostatak nakon uparavanja je otopljen u 30 mL etil-acetata. Organska faza ekstrahirana je zasićenom otopinom natrijeva klorida (3×30 mL), sušena nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirana i uparena pod sniženim tlakom. Dobiveno smeđe ulje pročišćeno je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu aceton/diklormetan 1:1 te rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera.

Metoda B

Nastali talog iz reakcijske smjese je odsisan te pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu aceton/diklormetan 9:1 i rastrljavanjem u dietil-eteru.

Metoda C

U reakcijsku smjesu je dodano 15 mL destilirane vode te je provedena ekstrakcija vodene faze diklormetanom (3×15 mL). Organski slojevi su sakupljeni i isprani destiliranom vodom (2×30 mL), sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani te upareni do suha pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu aceton/diklormetan 3:2 te rastrljavanjem u dietil-eteru.

3.4.1 Sinteza *N*-((9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)metil)ferocenamida (4a)

Masa amina **1f**: 0,039 g

Pročišćavanje: Metoda A

Iskorištenje reakcije: 0,039 g (48,5 %)

t_f 210–213 °C

MS (m/z) 410,0 ($M+1$)⁺

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3623, 3467, 3085, 3050, 2962, 2928, 1711, 1649, 1622, 1531, 1503, 1444, 1408, 1375, 1340, 1300, 1249, 1229, 1195, 138, 1123, 1106, 1041, 1017, 914, 819, 801, 634, 598, 558

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 11,49 (s, 1H, 10); 8,58 (t, 1H, 14, $J = 6,0$ Hz); 8,31 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz); 8,23 (d, 1H, 3, $J = 7,8$ Hz); 8,05 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz); 7,68 (d, 1H, 12, $J = 8,2$ Hz); 7,56 (t, 1H, 1, $J = 7,6$ Hz); 7,25 (t, 1H, 2, $J = 7,5$ Hz); 4,88-4,87 (m, 4H, 13, 3', 6'); 4,35 (t, 2H, 4', 5', $J = 1,9$ Hz); 4,07 (s, 5H, 7'-11')

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 169,83 (1'); 142,64 (8); 140,17 (11); 137,35 (7); 133,55 (9); 128,10 (1); 127,74 (5); 121,74 (3); 120,93 (4); 119,37 (2); 113,86 (6); 112,00 (12); 76,11 (2'); 70,10 (3', 6'); 69,31 (7'-11'); 68,30 (4', 5'); 41;73 (13)

3.4.2 Sinteza *N*-(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)ferocenamida (4b)

Masa amina **2c**: 0,048 g

Iskorištenje reakcije: 0,041 g (45,9 %)

t_f 243–246 °C

Pročišćavanje: Metoda B

MS (m/z) 454,0 ($M+1$)⁺

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3216, 1716, 1622, 1551, 1451, 1422, 1376, 1312, 1278, 1236, 1217, 1105, 960, 842, 801, 741, 641, 605, 505, 476

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 11,41 (s, 1H, 10); 8,14 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz); 8,07 – 8,05 (m, 2H, 3, 16); 7,79 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz); 7,07 (d, 1H, 12, $J = 2,4$ Hz); 6,90 (dd, 1H, 2, $J = 8,7$; 2,2 Hz); 4,83 (t, 2H, 3', 6', $J = 2,0$ Hz); 4,35 (t, 2H, 4', 5', $J = 1,9$ Hz); 4,23 (t, 2H, 14, $J = 5,7$ Hz); 4,13 (s, 5H, 7'-11'); 3,63 (q, 2H, 15, $J = 5,7$ Hz); 2,71 (s, 3H, 13)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 169,36 (1'); 159,31 (1); 141,89 (8); 141,28 (11); 137,74 (7); 134,55 (9); 127,17 (5); 122,69 (3); 114,98 (4); 111,93 (6); 109,22 (2); 95,38 (12); 76,31 (2'); 70,01 (3', 6'); 69,40 (7'-11'); 68,22 (4', 5'); 66,40 (14); 38,49 (15); 20,33 (13)

3.4.3 Sinteza *N*-(2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)ferocenamida (4c)

Masa amina **3b**: 0,050g

Iskorištenje reakcije: 0,032 g (34,8 %)

t_f 225–227 °C

Pročišćavanje: Metoda C

MS (m/z) 468,1 (M+1)⁺

IR (ATR, ν/cm^{-1}) 3623, 3467, 3085, 3050, 2962, 2928, 1711, 1649, 1622, 1531, 1503, 1444, 1408, 1375, 1340, 1300, 1249, 1229, 1195, 1177, 1138, 1123, 1107, 1041, 1016, 914, 819, 801, 634, 598, 558

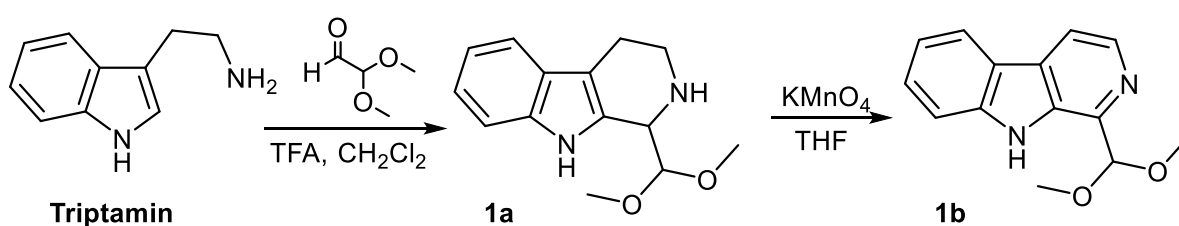
¹H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 8,18 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz); 8,10-8,07 (m, 2H, 3, 17); 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,1$ Hz); 7,32 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz); 6,88 (dd, 1H, 2, $J = 8,5; 2,1$ Hz); 4,69 (t, 2H, 3', 6', $J = 1,9$ Hz); 4,66 (t, 2H, 15, $J = 7,1$ Hz); 4,34 (t, 2H, 4', 5', $J = 1,9$ Hz); 4,07 (s, 5H, 7'-11'); 3,91 (s, 3H, 14); 3,61 (q, 2H, 16, $J = 6,7$ Hz); 3,04 (s, 3H, 13)

¹³C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 169,75 (1'); 160,52 (1); 143,00 (8); 140,66 (9); 137,82 (7); 134,67 (11); 128,43 (4); 122,39 (3); 114,28 (5); 112,26 (6); 109,20 (2); 93,78 (12); 76,40 (2'); 69,93 (3', 6'); 69,32 (7'-11'); 68,08 (4', 5'); 55,50 (14); 43,56 (15); 39,13 (16); 23,14 (13)

4 REZULTATI I RASPRAVA

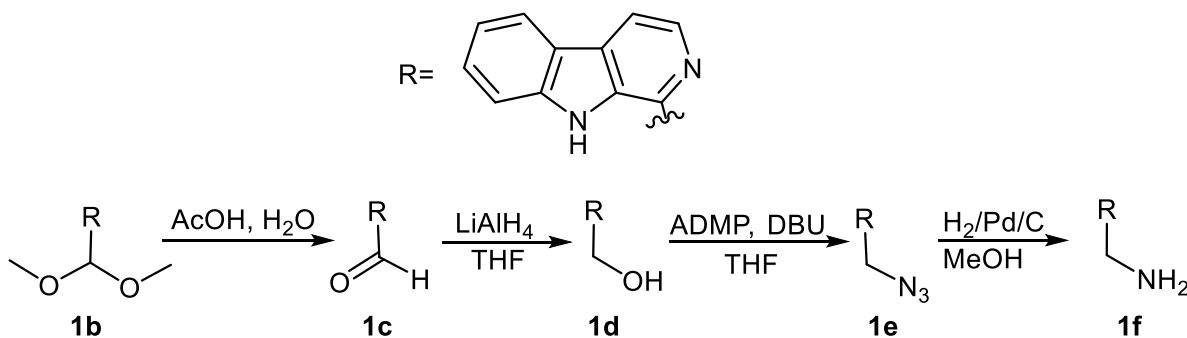
Sinteza hibridnih spojeva iz β -karbolinskih amina i ferocenkarboksilne kiseline temeljena je na klasičnoj 'coupling' reakciji. Korišten je 'coupling' reagens HATU koji u prisustvu baze DIEA aktivira karboksilnu kiselinu i omogućuje reakciju u jednom koraku i blagim uvjetima. Amini β -karbolina korišteni u 'coupling' reakcijama u cijelosti su sintetizirani prema ranije objavljenim propisima (Marinović i sur., 2021; Marinović i sur., 2020; Devi i sur., 2018), dok je ferocenkarboksilna kiselina komercijalno nabavljena.

Sinteza β -karbolinskog amina supstituiranog u položaju 1 (**1f**) započinje od triptamina (Slika 10). Kiselo kataliziranom Pictet-Spenglerovom kondenzacijom triptamina s aldehidom lako se može dobiti tetrahidro- β -karbolin **1a** supstituiran u položaju 1. Kondenzacija se odvija stvaranjem Schiffove baze reakcijom amina i aldehida, a zatim elektrofilnom aromatskom supstitucijom vodika na pirolnom prstenu triptamina ugljikovim atomom Schiffove baze. Dimetoksiacetalni supstituent iz uvedenog dimetoksiacetaldehida ostaje nepromijenjen (Stöckigt i sur., 2011). Aromatizacijom pomoću KMnO_4 iz tetrahidro- β -karbolina **1a** nastaje odgovarajući β -karbolin **1b**.



Slika 10. Pictet-Spenglerova kondenzacija i aromatizacija u sintezi β -karbolinskog amina **1f**

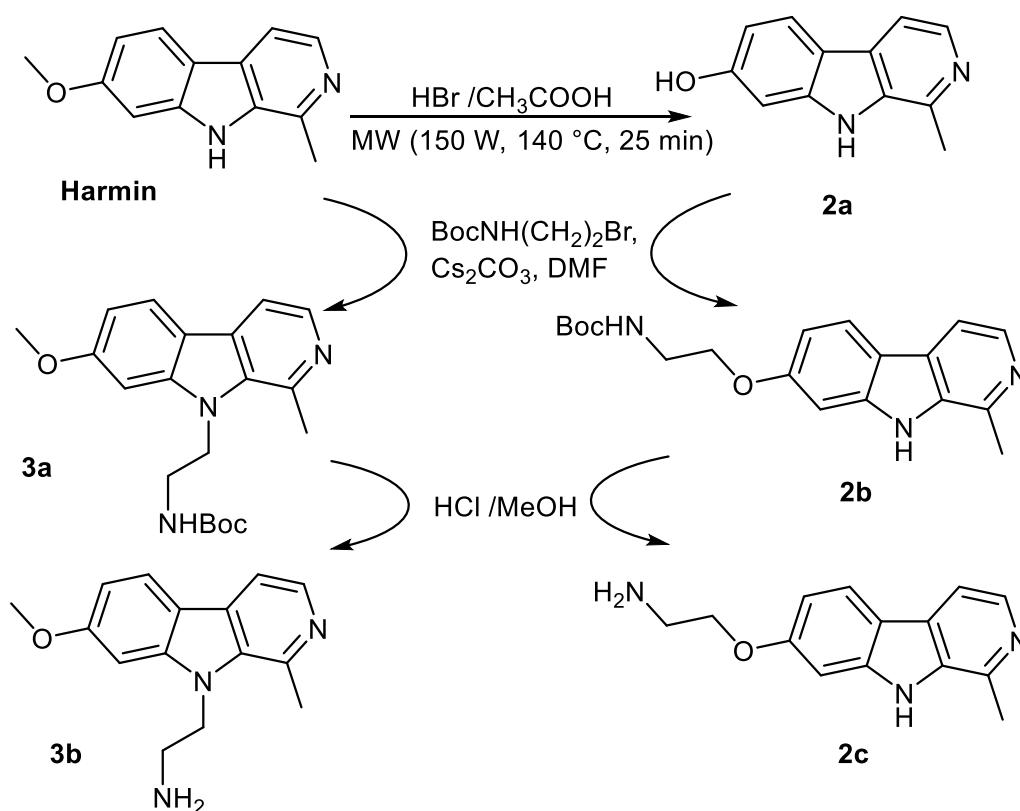
Sljedeći reakcijski koraci odnose se na prevođenje dobivenog acetala **1b** u odgovarajući amin **1f** (Slika 11). Kiselim hidrolizom uz octenu kiselinu iz acetala **1b** dobiva se aldehyd **1c** iz kojeg redukcijom uz LiAlH_4 nastaje alkohol **1d**.



Slika 11. Prevođenje β -karbolinskog acetala **1b** u amin **1f**

Alkoholna skupina spoja **1d**, u prisutnosti proton akceptora DBU, iz ADMP istiskuje azidni anion koji supstituira alkoholnu skupinu spoja **1d** čime nastaje azid **1e**. Nastanak produkta lako je potvrđen ¹H NMR spektrima. U spektru azida izostaje triplet na 5,53 ppm koji odgovara alkoholnoj skupini. Uslijed gubitka sprezanja s alkoholnim vodikom dolazi do promjene signala iz dubleta na 4,98 ppm u singlet na 4,89 ppm jezgri vodika na metilenskom ugljiku u položaju 1 β-karbolina. Redukcijom u atmosferi vodika kataliziranom paladijem na aktivnom ugljenu azida **1e** nastaje amin **1f** koji je korišten u sintezi amida. Nastanak amina vidljiv je po pojavi novog multiplleta na 3,42-3,30 ppm u ¹H spektru. Također, promjena iz alkohola u azid, i zatim u amin vidljiva je u ¹³C spektru smanjenjem kemijskog pomaka signala metilenskog supstituenta s 63,54 ppm na 51,59 ppm te konačno na 44,59 ppm.

Sinteza amina β-karbolina u položajima 7 i 9 (spojevi **2c** i **3b**) započinje od istog spoja – harmina (Slika 12). Kako bi se supstituent uveo na položaj 7 potrebno je osloboditi nukleofilnu fenolnu skupinu harmina. Hidroliza eterske veze se odvija u kiselim uvjetima i potpomognuta je mikrovalnim zračenjem čime nastaje harmol, tj. spoj **2a**.



Slika 12. Sinteza β-karbolinskih amina **2c** i **3b**

Analognim reakcijama nukleofilne supstitucije, nukleofili iz harmola (fenol) i harmina (amin) zamjenjuju brom iz 2-(*tert*-butoksikarbonilamino)-etilbromida. Cs₂CO₃ služi kao baza potrebna

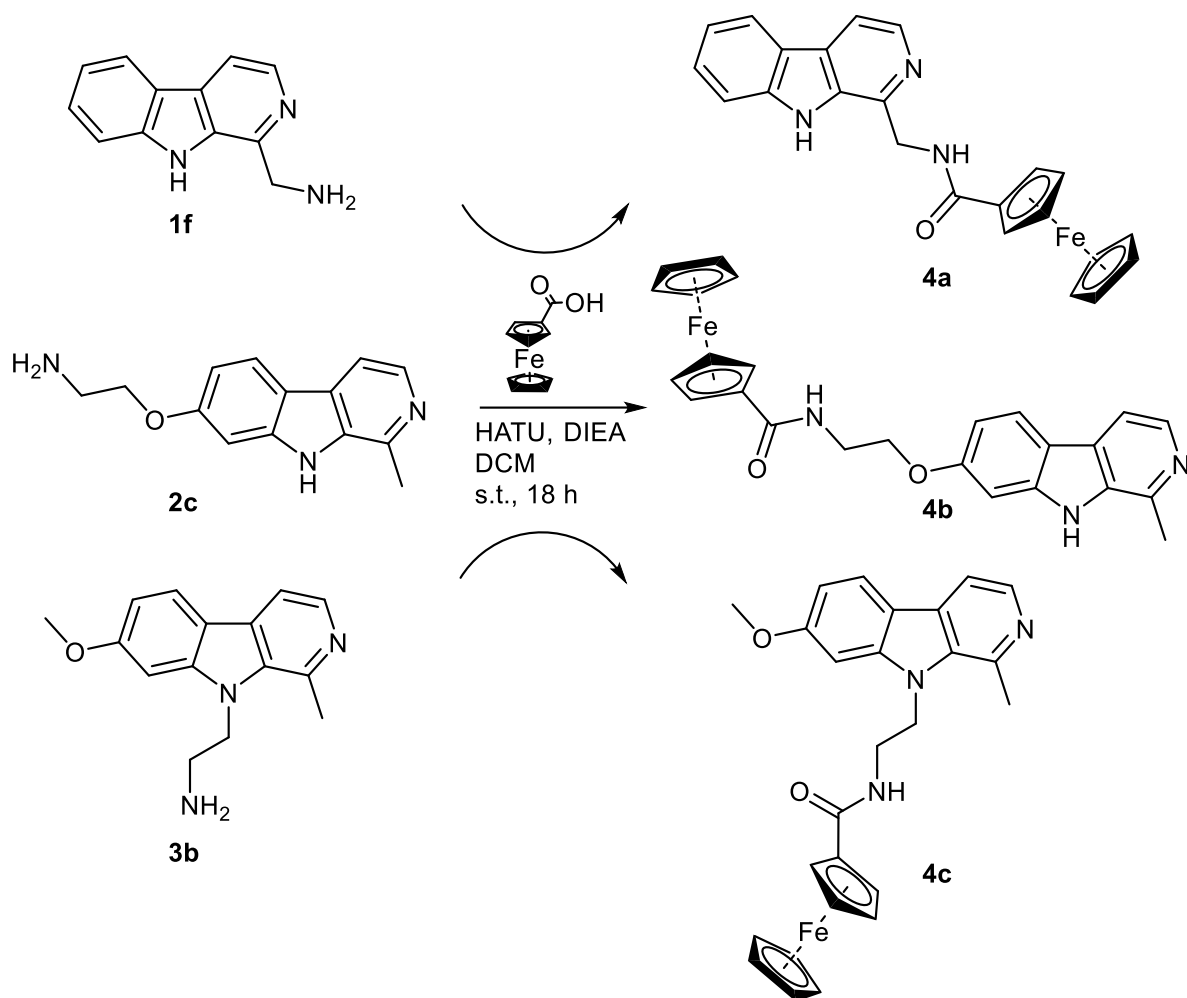
za deprotoniranje fenolne skupine spoja **2a** i amino skupine indolnog prstena harmina kako bi nastali jači nukleofili. Budući da je kisikov atom jači nukleofil od indolnog dušika, reakcija spoja **2a** odvija se selektivno. ¹H spektri novih produkata su karakteristični po singletu *tert*-butoksikarbonil skupine na 2,73 ppm u spektru spoja **2b** i 2,93 ppm spoja **3a**, koji odgovara devet ekvivalentnih vodikovih jezgri *tert*-butila. Zaštitna *tert*-butoksikarbonil skupina amina u analognim reakcijama kiselom hidrolizom je uklonjena sa spojeva **2b** i **3a** čime nastaju odgovarajući amini **2c** i **3b**. ¹³C spektrima potvrđeno je da je zaštitna skupina uspješno uklonjena po tome što nedostaje signal karbonilnog ugljika prisutan u spektrima spojeva **2b** i **3a** (159,22 i 155,62 ppm), a u ¹H spektrima gubitkom karakterističnog singleta na 2,73 i 2,93 ppm. Nastanak amina nije bilo moguće potvrditi ¹H NMR spektrima spojeva **2c** i **3b** zbog fenomena da jezgre vodika amino skupine nisu vidljive uslijed prebrze izmjene s protonima iz okoline. Snimanje spektara na nižim temperaturama usporilo bi izmjene i učinilo jezgre vidljivima. Analitički i spektroskopski podaci sintetiziranih β-karbolinskih amina **1f**, **2c** i **3b** prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Analitički i spektroskopski podaci β-karbolinskih amina **1f**, **2c** i **3b**

Spoj	1f	2c	3b
Molekulska formula	C ₁₂ H ₁₁ N ₃	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O	C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O
<i>M_r</i> / gmol ⁻¹	197,24	241,29	255,32
MS <i>m/z</i> (<i>M</i> +1) ⁺	196,0*	242,2	256,3
<i>t_f</i> / °C	201–205	172–173	134–136
IR (ATR, <i>v</i> /cm ⁻¹)	3347, 3282, 3120, 3051, 2955, 2856, 2776, 1625, 1600, 1562, 1501, 1477, 1460, 1430, 1355, 1327, 1316, 1240, 1212, 1163, 1127, 1108, 1071, 960, 896, 848, 829, 772, 747, 671, 595, 564, 516	3954, 3908, 3838, 3786, 3716, 3656, 3530, 3394, 3332, 3250, 3156, 3068, 2930, 2864, 2774, 2372, 1892, 1756, 1720, 1628, 1568, 1486, 1444, 1326, 1284, 1238, 1180, 1104, 1028, 996, 908, 860, 812, 636, 590	3354, 3327, 3274, 3054, 3039, 2966, 2932, 2837, 1751, 1621, 1563, 1496, 1443, 1404, 1343, 1302, 1283, 1236, 1219, 1151, 1136, 1117, 1089, 1040, 1021, 973, 941, 922, 887, 848, 815, 768, 723, 643, 599, 551, 528

*(*M*-1)⁻

Sintetizirani amini su zatim korišteni u 'coupling' reakciji s ferocenkarkoksilnom kiselinom (Slika 13). U prisutnosti baze DIEA ferocenkarkoksilna kiselina je deprotonirana i time su joj pojačana nukleofilna svojstva. Napadom aktiviranog kisika na elektrofilni ugljik iz HATU nastaju nestabilni O-acil(tetrametil)isouronij te anion 1-oksi-7-azabenzotriazol (OAt⁻). Brzim napadom OAt⁻ na karkoksilni ugljik nastaju tetrametilurea i aktivirani OAt-ester s dobrom izlazećom skupinom (Carpino, 1993). Nukleofilni amin β-karbolina zatim supstituira HOAt što rezultira nastankom amida. U 'coupling' reakciji amina **1f** nastaje amid **4a**, amina **2c** amid **4b** dok reakcijom amina **3b** nastaje amid **4c** čiji su analitički i spektroskopski podaci prikazani u Tablici 3.



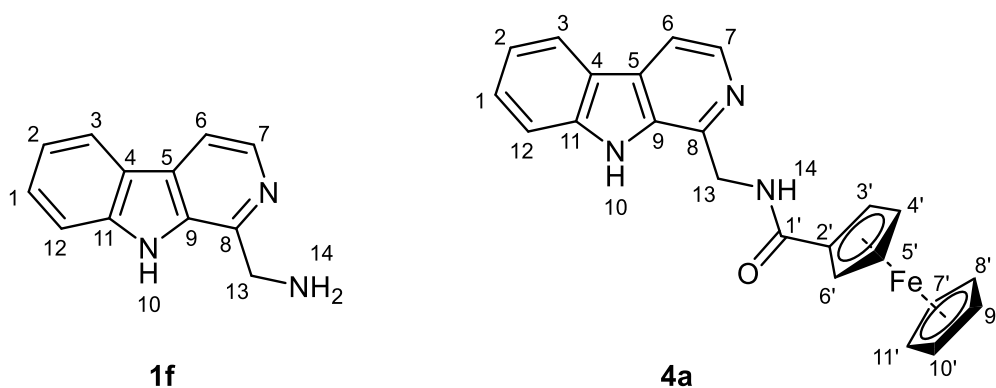
Slika 13. Sintaza konačnih produkata amida β-karbolina i ferocenkarkoksilne kiseline

Tablica 3. Analitički i spektroskopski podaci hibridnih amida **4a**, **4b** i **4c**

Spoj	4a	4b	4c
Molekulska formula	C ₂₃ H ₁₉ FeN ₃ O	C ₂₅ H ₂₃ FeN ₃ O ₂	C ₂₆ H ₂₅ FeN ₃ O ₂
<i>Mr</i> / gmol ⁻¹	409,27	453,32	467,35
MS <i>m/z</i> (M+1) ⁺	410,0	454,0	468,1
<i>t_l</i> / °C	210–213	243–246	225–227
IR (ATR, <i>v</i> /cm ⁻¹)	3623, 3467, 3085, 3050, 2962, 2928, 1711, 1649, 1622, 1531, 1503, 1444, 1408, 1375, 1340, 1300, 1249, 1229, 1195, 138, 1123, 1106, 1041, 1017, 914, 819, 801, 634, 598, 558	3216, 1716, 1622, 1551, 1451, 1422, 1376, 1312, 1278, 1236, 1217, 1105, 960, 842, 801, 741, 641, 605, 505, 476	3623, 3467, 3085, 3050, 2962, 2928, 1711, 1649, 1622, 1531, 1503, 1444, 1408, 1375, 1340, 1300, 1249, 1229, 1195, 1177, 1138, 1123, 1107, 1041, 1016, 914, 819, 801, 634, 598, 558

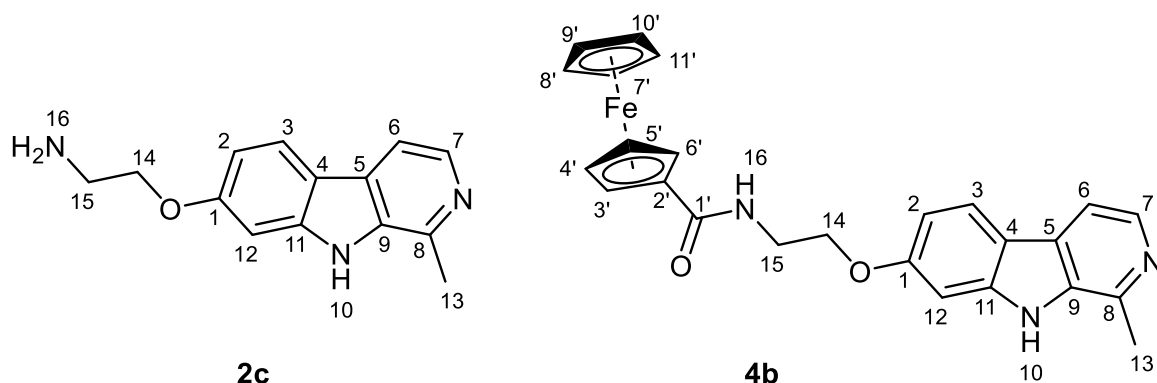
Sinteza amida potvrđena je karakterističnim promjenama u NMR spektrima (Tablica 4; 5; 6). U ¹H spektrima konačnih produkata vidljivi su karakteristični signali ferocena – dva tripleta koji odgovaraju parovima ekvivalentnih jezgri vodika supstituiranog ciklopentadiena na 4,83 i 4,35 ppm za spoj **4b** te 4,69 i 4,34 ppm za spoj **4c**, i singlet pet ekvivalentnih jezgri vodika nesupstituiranog ciklopentadiena na 4,13 (**4b**) i 4,07 ppm (**4c**). U spektru spoja **4a** dolazi do preklapanja prvog tripleta na 4,88-4,87 ppm, no vidljivi su drugi triplet i singlet na 4,35 i 4,07 ppm. Pojava signala koji odgovaraju vodikovoj jezgri amidne veze vidljiva je u spektrima spojeva **4a-c** na 8,58; 8,07-8,05 i 8,10-8,07 ppm. U ¹³C spektrima spojeva **4a-c** vidljivi su signali zasjenjenih ugljikovih jezgri elektronima bogatih prstena ferocena u području 76,40-68,02 ppm s minimalnim varijacijama i prepoznatljiv signal odsjenjene ugljikove jezgre amida na 169,83; 169,36 i 169,75 ppm.

Tablica 4. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima amina **1f** i amida **4a**



Spoj	1f	4a
^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6)	δ 8,26 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz); 8,21 (dt, 1H, 3, $J = 7,8, 1,0$ Hz); 7,97 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz); 7,62 (d, 1H, 12, $J = 8,2$ Hz); 7,53 (m, 1H, 1); 7,23 (m, 1H, 2); 4,19 (s, 2H, 13); 3,42 – 3,30 (m, 2H, 14)	δ 11,49 (s, 1H, 10); 8,58 (t, 1H, 14, $J = 6,0$ Hz); 8,31 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz); 8,23 (d, 1H, 3, $J = 7,8$ Hz); 8,05 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz); 7,68 (d, 1H, 12, $J = 8,2$ Hz); 7,56 (t, 1H, 1, $J = 7,6$ Hz); 7,25 (t, 1H, 2, $J = 7,5$ Hz); 4,88-4,87 (m, 4H, 13, 3', 6'); 4,35 (t, 2H, 4', 5', $J = 1,9$ Hz); 4,07 (s, 5H, 7'-11')
^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6)	δ 146,50 (8); 140,35 (11); 137,18 (7); 133,23 (9); 127,82 (1); 127,42 (5); 121,60 (3); 120,88 (4); 119,15 (2); 113,19 (6); 112,01 (12); 44,59 (13)	δ 169,83 (1'); 142,64 (8); 140,17 (11); 137,35 (7); 133,55 (9); 128,10 (1); 127,74 (5); 121,74 (3); 120,93 (4); 119,37 (2); 113,86 (6); 112,00 (12); 76,11 (2'); 70,10 (3', 6'); 69,31 (7'-11'); 68,30 (4', 5'); 41;73 (13)

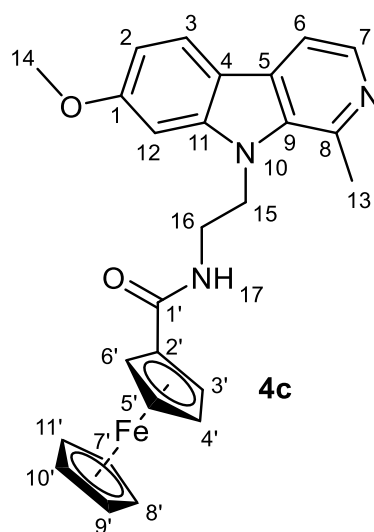
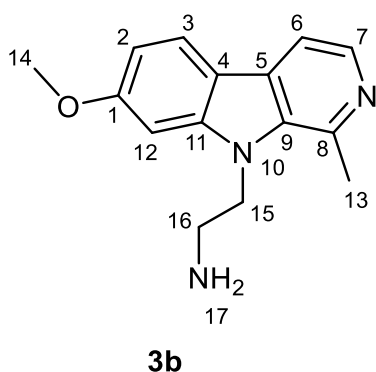
Tablica 5. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima amina **2c** i amida **4b**



Spoj	2c	4b
^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6)	δ 11,38 (s, 1H, 10); 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz); 8,04 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz); 7,79 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz); 7,01 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz); 6,85 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$; 2,2 Hz); 4,03 (t, 2H, 14, $J = 5,7$ Hz); 2,95 (t, 2H, 15, $J = 5,7$ Hz); 2,73 (s, 3H, 13); 1,58 (s, 2H, 16)	δ 11,41 (s, 1H, 10); 8,14 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz); 8,07 – 8,05 (m, 2H, 3, 16); 7,79 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz); 7,07 (d, 1H, 12, $J = 2,4$ Hz); 6,90 (dd, 1H, 2, $J = 8,7$; 2,2 Hz); 4,83 (t, 2H, 3', 6', $J = 2,0$ Hz); 4,35 (t, 2H, 4', 5', $J = 1,9$ Hz); 4,23 (t, 2H, 14, $J = 5,7$ Hz); 4,13 (s, 5H, 7'-11'); 3,63 (q, 2H, 15, $J = 5,7$ Hz); 2,71 (s, 3H, 13)
^{13}C NMR (151* MHz, DMSO- d_6)	δ 159,46 (1); 141,91 (8); 141,25 (11); 137,73 (7); 134,54 (9); 127,20 (5); 122,57 (3); 114,84 (4); 111,89 (6); 109,37 (2); 95,29 (12); 70,36 (14); 40,98 (15); 20,33 (13)	δ 169,36 (1'); 159,31 (1); 141,89 (8); 141,28 (11); 137,74 (7); 134,55 (9); 127,17 (5); 122,69 (3); 114,98 (4); 111,93 (6); 109,22 (2); 95,38 (12); 76,31 (2'); 70,01 (3', 6'); 69,40 (7'-11'); 68,22 (4', 5'); 66,40 (14); 38,49 (15); 20,33 (13)

* ^{13}C spektar spoja **2c** je snimljen na 101 MHz

Tablica 6. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima amina **3b** i amida **4c**



Spoj	3b	4c
^1H NMR (600* MHz, DMSO- d_6)	δ 8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz); 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz); 7,86 (d, 1H, 6, $J = 5,1$ Hz); 7,24 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz); 6,87 (dd, 1H, 2, $J = 8,6; 2,2$ Hz); 4,54 (t, 2H, 15, $J = 7,3$ Hz); 3,91 (s, 3H, 14); 2,97 (s, 3H, 13); 2,93 (t, 2H, 16, $J =$ 7,3 Hz)	δ 8,18 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz); 8,10-8,07 (m, 2H, 3, 17); 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,1$ Hz); 7,32 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz); 6,88 (dd, 1H, 2, $J = 8,5; 2,1$ Hz); 4,69 (t, 2H, 3', 6', $J = 1,9$ Hz); 4,66 (t, 2H, 15, $J =$ 7,1 Hz); 4,34 (t, 2H, 4', 5', $J = 1,9$ Hz); 4,07 (s, 5H, 7'-11'); 3,91 (s, 3H, 14); 3,61 (q, 2H, 16, $J = 6,7$ Hz); 3,04 (s, 3H, 13)
^{13}C NMR (151* MHz, DMSO- d_6)	δ 160,50 (1); 142,92 (8); 140,64 (9); 137,66 (7); 134,76 (11); 128,23 (4); 122,30 (3); 114,18 (5); 112,18 (6); 109,12 (2); 93,80 (12); 55,61 (14); 46,87 (15); 41,94 (16); 23,28 (13)	δ 169,75 (1'); 160,52 (1); 143,00 (8); 140,66 (9); 137,82 (7); 134,67 (11); 128,43 (4); 122,39 (3); 114,28 (5); 112,26 (6); 109,20 (2); 93,78 (12); 76,40 (2'); 69,93 (3', 6'); 69,32 (7'-11'); 68,08 (4', 5'); 55,50 (14); 43,56 (15); 39,13 (16); 23,14 (13)

* ^1H spektar spoja **3b** je snimljen na 400 Mhz, a ^{13}C na 101 MHz

5 ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je sintetizirati hibridne amidne spojeve β -karbolinskih amina supstituiranih u položajima 1, 7 i 9 ferocenkarboksilnom kiselinom.

U okviru ovog rada sintetizirana su tri konačna produkta:

- *N*-((9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)metil)ferocenamid (**4a**)
- *N*-(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)ferocenamid (**4b**)
- *N*-(2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)ferocenamid (**4c**)

Amidi **4a-c** dobiveni su u '*coupling*' reakcijama amina **1f**, **2c** i **3b** s ferocenkarboksilnom kiselinom. Sintetizirani su i njihovi prekursori, amini **1f**, **2c** i **3b**. Svi spojevi su karakterizirani uobičajenim spektroskopskim i analitičkim metodama (IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR, *t_r*) te se njihovi spektri nalaze u dijelu rada *Prilozi*.

U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada ispitat će se antimalarijsko djelovanje novih spojeva; na eritrocitnu fazu *P. falciparum* (klorokin osjetljivi Pf3D7 i klorokin-rezistentni PfDd2 sojevi) i na jetrenu fazu *P. berghei*.

6 LITERATURA

Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, Rosenthal PJ, D'Alessandro U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J*, 2011, 10, 144.

Alven S, Aderibigbe B. Combination Therapy Strategies for the Treatment of Malaria. *Molecules*, 2019, 24, 3601.

Ashley EA, Phyo AP. Drugs in Development for Malaria. *Drugs*. 2018, 78, 861–879.

Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017, 8, 38022–38043.

Bérubé G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2016, 11, 281–305.

Bhatt V. Basic Organometallic Chemistry, Essentials of Coordination Chemistry. Sjeđinjene Ameriĉke DrŹave, Academic Press, 2015, str. 173–190.

Biot C, Glorian G, Maciejewski LA, Brocard JS. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J Med Chem*. 1997, 40, 3715–3718.

Biot C, Pradines B, Sergeant M-H, Gut J, Rosenthal PJ, Chibale K. Design, synthesis, and antimalarial activity of structural chimeras of thiosemicarbazone and ferroquine analogues. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007, 17, 6434–6438.

Burgess SJ, Selzer A, Kelly JX, Smilkstein MJ, Riscoe MK, Peyton DH. A Chloroquine-like Molecule Designed to Reverse Resistance in *Plasmodium falciparum*. *J Med Chem*, 2006, 49, 5623–5625.

Carpino LA. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc*, 1993, 115, 4397–4398.

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

CDC - Malaria - Diagnosis & Treatment (United States) - Treatment (U.S.) - Guidelines for Clinicians, 2020., https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/clinicians1.html pristupljeno 5. 6. 2022.

Crutcher JM, Hoffman SL. Medical Microbiology. Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996, poglavlje 83.

Dechy-Cabaret O, Benoit-Vical F, Robert A, Meunier B. Preparation and Antimalarial Activities of “Trioxaquinines”, New Modular Molecules with a Trioxane Skeleton Linked to a 4-Aminoquinoline. *ChemBioChem*, 2000, 1, 281–283.

Devi N, Kumar S, Pandey SK, Singh V. 1(3)-Formyl- β -carbolines: Potential Aldo-X Precursors for the Synthesis of β -Carboline-Based Molecular Architectures. *Asian J Org Chem*, 2018, 7, 6–36.

Domarle O, Blampain G, Agnani H, Nzadiyabi T, Lebibi J, Brocard J, Maciejewski L, Biot C, Georges AJ, Millet P. In Vitro Antimalarial Activity of a New Organometallic Analog, Ferrocene-Chloroquine. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42, 540–544.

Efange NM, Lobe MMM, Keumoe R, Ayong L, Efange SMN. Spiro-fused tetrahydroisoquinoline-oxindole hybrids as a novel class of fast acting antimalarial agents with multiple modes of action. *Sci Rep*, 2020, 10, 17932.

Feng L, Xu Z, Chang L, Li C, Yan X, Gao C, Ding C, Zhao F, Shi F, Wu X. Hybrid molecules with potential in vitro antiplasmodial and in vivo antimalarial activity against drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Med Res Rev*, 2020, 40, 931–971.

Fortin S, Bérubé G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov*, 2013, 8, 1029–1047.

Fouda MFR, Abd-Elzaher MM, Abdelsamaia RA, Labib AA. On the medicinal chemistry of ferrocene. *Appl Organomet Chem*, 2007, 21, 613–625.

Frédérich M, Jacquier M-J, Thépenier P, De Mol P, Tits M, Philippe G, Delaude C, Angenot L, Zèches-Hanrot M. Antiplasmodial Activity of Alkaloids from Various *Strychnos* Species. *J Nat Prod*, 2002, 65, 1381–1386.

Goodwin G, Fleischhacker W, Arango C, Baumann P, Davidson M, de Hert M, Falkai P, Kapur S, Leucht S, Licht R, Naber D, O’Keane V, Papakostas G, Vieta E, Zohar J. Advantages and disadvantages of combination treatment with antipsychotics: ECNP Consensus Meeting, March 2008, Nice *Eur Neuropsychopharmacol*, 2009, 19, 520–532.

Gorki V, Walter NS, Singh R, Chauhan M, Dhingra N, Salunke DB, Kaur S. β -Carboline Derivatives Tackling Malaria: Biological Evaluation and Docking Analysis. *ACS Omega* 5, 2020, 17993–18006.

Gupta L, Srivastava K, Singh S, Puri SK, Chauhan PMS. Synthesis of 2-[3-(7-Chloro-quinolin-4-ylamino)-alkyl]-1-(substituted phenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H- β -carboline as a new class of antimalarial agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18, 3306–3309.

Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in Plasmodium. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16, 156–170.

Li J-Y, Sun X, Li J-J, Yu F, Zhang Y, Huang X, Jiang F. The antimalarial activity of indole alkaloids and hybrids. *Arch Pharm*, 2020, 353, 2000131.

Li Q, Weina P. Artesunate: The Best Drug in the Treatment of Severe and Complicated Malaria. *Pharmaceuticals*, 2010, 3, 2322–2332.

Lu Z, Ding Y, Li X-C, Djigbenou DR, Grimberg BT, Ferreira D, Ireland CM, Van Wagoner RM. 3-Bromohomofascaplysin A, a fascaplysin analogue from a Fijian *Didemnum* sp. ascidian. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 6604–6607.

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, 4376.

Marinović M, Poje G, Perković I, Fontinha D, Prudêncio M, Held J, Pessanha de Carvalho L, Tandarić T, Vianello R, Rajić Z. Further investigation of harmicines as novel antiplasmodial agents: Synthesis, structure-activity relationship and insight into the mechanism of action. *Eur J Med Chem*, 2021, 224, 113687.

Matos J, da Cruz FP, Cabrita É, Gut J, Nogueira F, do Rosário VE, Moreira R, Rosenthal PJ, Prudêncio M, Gomes P. Novel Potent Metallocenes against Liver Stage Malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56, 1564–1570.

Meunier B. Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action: Dream or Reality? *Acc Chem Res*, 2008, 41, 69–77.

Morphy R, Rankovic Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J Med Chem*, 2005, 48, 6523–6543.

Noedl H, Se Y, Sriwichai S, Schaecher K, Teja-Isavadharm P, Smith B, Rutvisuttinunt W, Bethell D, Surasri S, Fukuda MM, Socheat D, Thap LC. Artemisinin Resistance in Cambodia: A Clinical Trial Designed to Address an Emerging Problem in Southeast Asia. *Clin Infect Dis*, 2010, 51, e82–e89.

Nsanzabana C. Resistance to Artemisinin Combination Therapies (ACTs): Do Not Forget the Partner Drug! *Trop Med Infect Dis*, 2019, 4, 26.

Patra M, Gasser G. The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem*, 2017, 1, 0066.

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*, 2020, 187, 111927.

Piechowska P, Zawirska-Wojtasiak R, Mildner-Szkudlarz S. Bioactive β -Carbolines in Food: A Review. *Nutrients*, 2019, 11, 814.

Pletz MW, Hagel S, Forstner C. Who benefits from antimicrobial combination therapy? *Lancet Infect Dis*, 2017, 17, 677–678.

Poje G, Pessanha de Carvalho L, Held J, Moita D, Prudêncio M, Perković I, Tandarić T, Vianello R, Rajić Z. Design and synthesis of harmiquins, harmine and chloroquine hybrids as potent antiplasmodial agents. *Eur J Med Chem*, 2022, 238, 114408.

Reiter C, Çapcı Karagöz A, Fröhlich T, Klein V, Zeino M, Viertel K, Held J, Mordmüller B, Emirdağ Öztürk S, Anıl H, Efferth T, Tsogoeva SB. Synthesis and study of cytotoxic activity of 1,2,4-trioxane- and egonol-derived hybrid molecules against *Plasmodium falciparum* and multidrug-resistant human leukemia cells. *Eur J Med Chem*, 2014, 75, 403–412.

Reiter C, Fröhlich T, Zeino M, Marschall M, Bahsi H, Leidenberger M, Friedrich O, Kappes B, Hampel F, Efferth T, Tsogoeva SB. New efficient artemisinin derived agents against human leukemia cells, human cytomegalovirus and *Plasmodium falciparum*: 2nd generation 1,2,4-trioxane-ferrocene hybrids. *Eur J Med Chem*, 2015, 97, 164–172.

Riechelmann RP, Tannock IF, Wang L, Saad ED, Taback NA, Krzyzanowska MK. Potential drug interactions and duplicate prescriptions among cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99, 592–600.

Romeo S, Parapini S, Dell'Agli M, Vaiana N, Magrone P, Galli G, Sparatore A, Taramelli D, Bosisio E. Atovaquone-Statine “Double-Drugs” with High Antiplasmodial Activity. *ChemMedChem*, 2008, 3, 418–420.

Sato S. *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J Physiol Anthropol*, 2021, 40, 1.

Sharma B, Singh P, Singh AK, Awasthi SK. Advancement of chimeric hybrid drugs to cure malaria infection: An overview with special emphasis on endoperoxide pharmacophores. *Eur J Med Chem*, 2021, 219, 113408.

Stöckigt J, Antonchick AP, Wu F, Waldmann H. The Pictet-Spengler Reaction in Nature and in Organic Chemistry. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50, 8538–8564.

Surur AS, Huluka SA, Mitku ML, Asres K. Indole: The After Next Scaffold of Antiplasmodial Agents? *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14, 4855–4867.

Surur AS, Sun D. Macrocyclic-Antibiotic Hybrids: A Path to Clinical Candidates. *Front Chem*, 2021, 9, 659845.

Szumilak M, Wiktorowska-Owczarek A, Stanczak A. Hybrid Drugs—A Strategy for Overcoming Anticancer Drug Resistance? *Molecules*, 2021, 26, 2601.

Tibon NS, Ng CH, Cheong SL. Current progress in antimalarial pharmacotherapy and multi-target drug discovery. *Eur J Med Chem*, 2020, 188, 111983.

To Evaluate Efficacy, Safety, Tolerability and PK of Intravenous Cipargamin in Participants With Severe Plasmodium Falciparum Malaria., <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04675931?term=KAE609&draw=2&rank=6>, pristupljeno 19. 6. 2022.

Uddin A, Chawla M, Irfan I, Mahajan S, Singh S, Abid M. Medicinal chemistry updates on quinoline- and endoperoxide-based hybrids with potent antimalarial activity. *RSC Med Chem*, 2021, 12, 24–42.

Walsh J, Bell A. Hybrid Drugs for Malaria. *Curr Pharm Des*, 2009, 15, 2970–2985.

Walsh JJ, Coughlan D, Heneghan N, Gaynor C, Bell A. A novel artemisinin–quinine hybrid with potent antimalarial activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17, 3599–3602.

Wani WA, Jameel E, Baig U, Mumtazuddin S, Hun LT. Ferroquine and its derivatives: New generation of antimalarial agents. *Eur J Med Chem*, 2015, 101, 534–551.

WHO Guidelines for malaria, 2021., <https://www.who.int/publications/i/item/guidelines-for-malaria>, pristupljeno 5. 6. 2022.

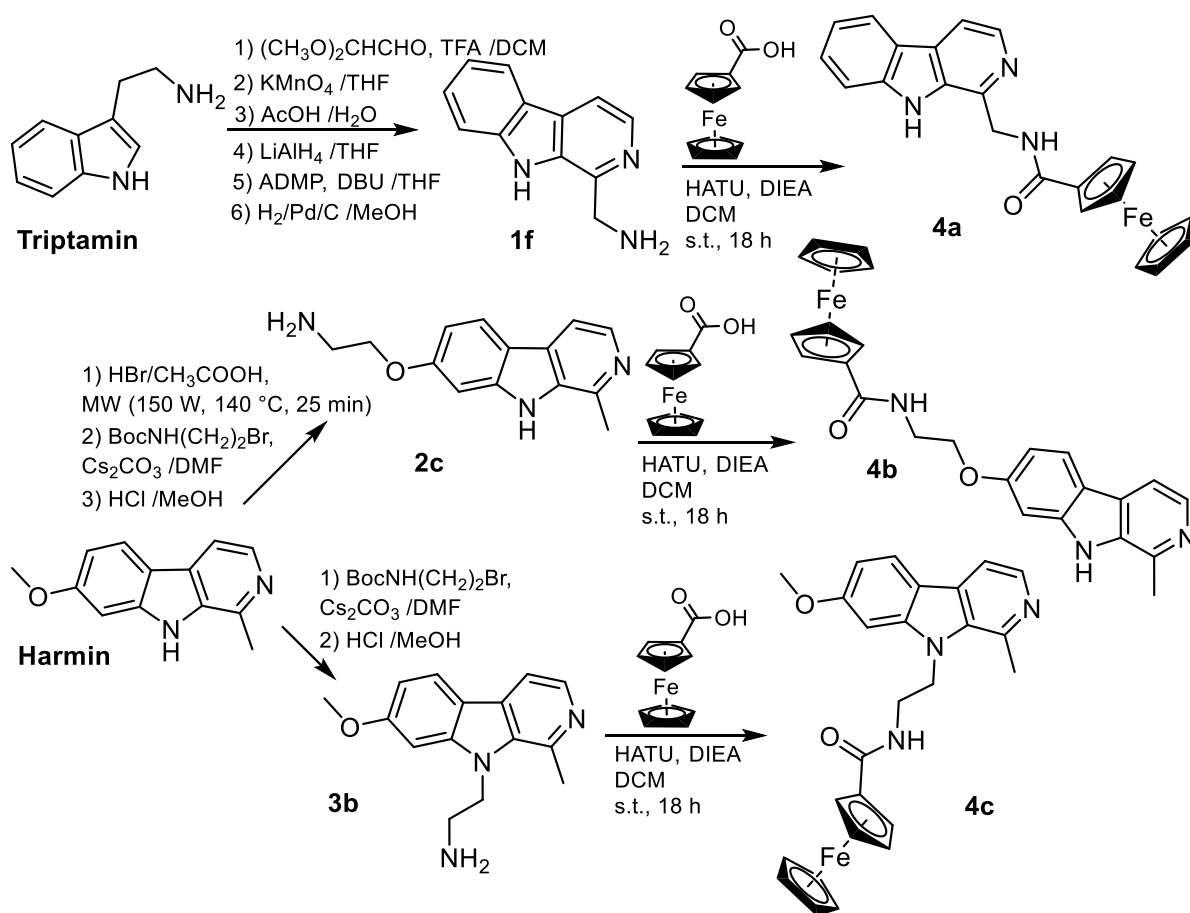
World Malaria report 2021, 2021., <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>, pristupljeno 5. 6. 2022.

Winkler JD, Londregan AT, Hamann MT. Antimalarial Activity of a New Family of Analogues of Manzamine A. *Org Lett*, 2006, 8, 2591–2594.

7 SAŽETAK / SUMMARY

Sinteza i karakterizacija harmicena; novih 1-, 7- i 9-supstituiranih amida β -karbolina i ferocena

Ovaj rad obuhvaća sintezu i karakterizaciju harmicena – hibridnih spojeva β -karbolina i ferocena. U ovom radu sintetizirana su tri nova 1-, 7- i 9- supstituirana amida **4a-c**. Amino derivat β -karbolina **1f**, potreban za sintezu amida **4a** dobiven je iz triptamina, a amini **2c** i **3b**, koji su poslužili kao prekursori za sintezu amida **4b** i **4c**, dobiveni su iz harmina prema navedenoj shemi. U posljednjem koraku u 'coupling' reakciji ferocenkarkoksilne kiseline i odgovarajućeg β -karbolinskog amina dobiveni su konačni spojevi – hibridi amidnog tipa **4a-c**.

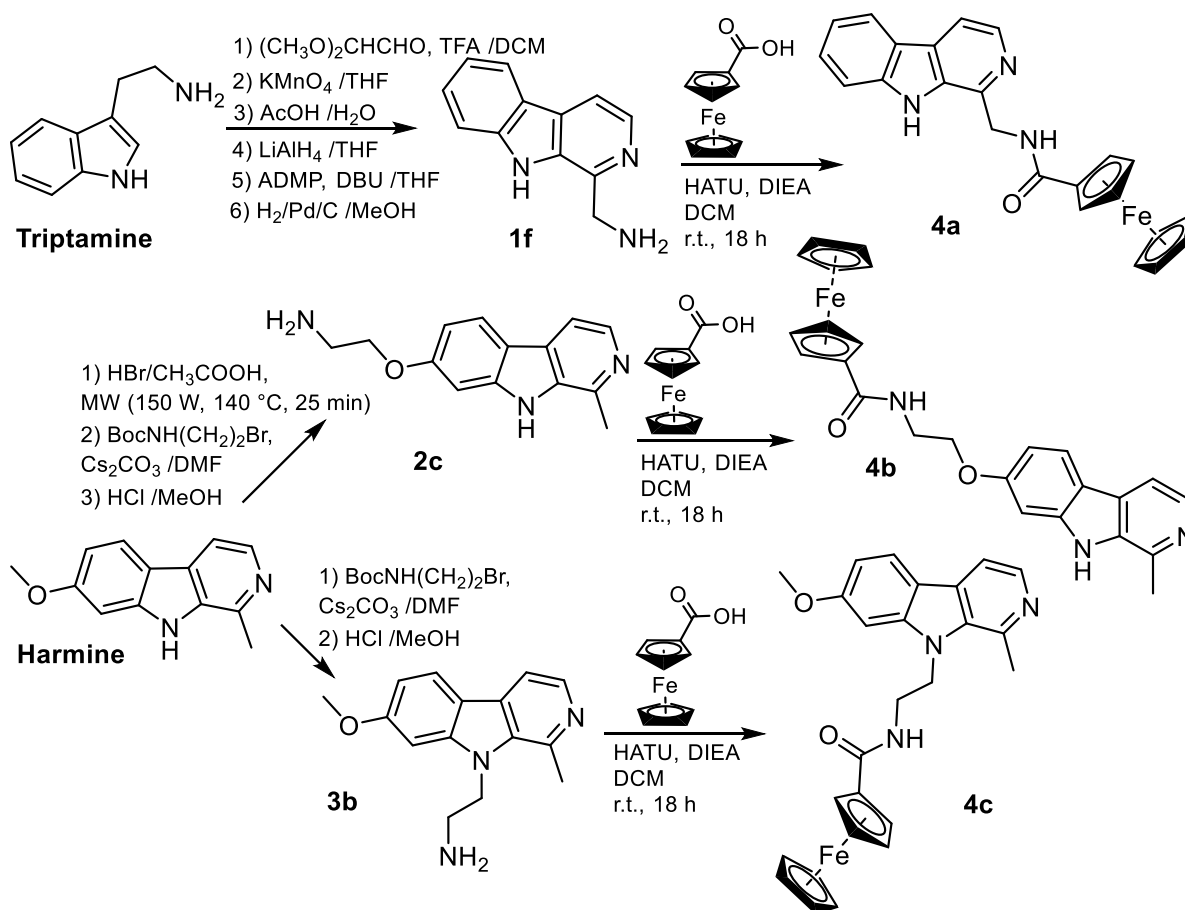


Konačni hibridni spojevi karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR), a čvrstim produktima određeno je talište. Antimalarijsko djelovanje novih spojeva na eritrocitnu fazu *P. falciparum* (Pf3D7 i PfDd2) i na jetrenu fazu *P. berghei* biti će ispitano u daljnjim istraživanjima.

Ključne riječi: β -karbolin, ferocen, hibrid, malarija

Synthesis and characterisation of harmicenes; novel 1-, 7- and 9- substituted amides of β -carboline and ferrocene

This work contains the synthesis and characterisation of harmicenes – hybrid compounds of β -carboline and ferrocene. Three novel 1-, 7- and 9- substituted amides **4a-c** were synthesised. The amino derivative of β -carboline **1f**, used for the synthesis of the amide **4a**, was prepared from triptamine, and the amines **2c** and **3b**, that served as precursors in the synthesis of the amides **4b** and **4c**, were prepared from harmine according to the presented scheme. The final amide type hybrids **4a-c** were obtained via a coupling reaction of ferrocenecarboxylic acid and the corresponding β -carboline amine.

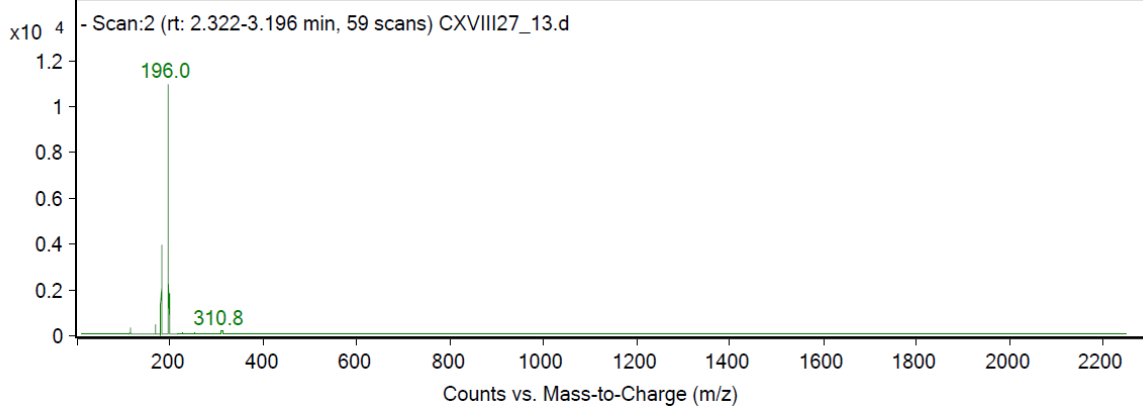
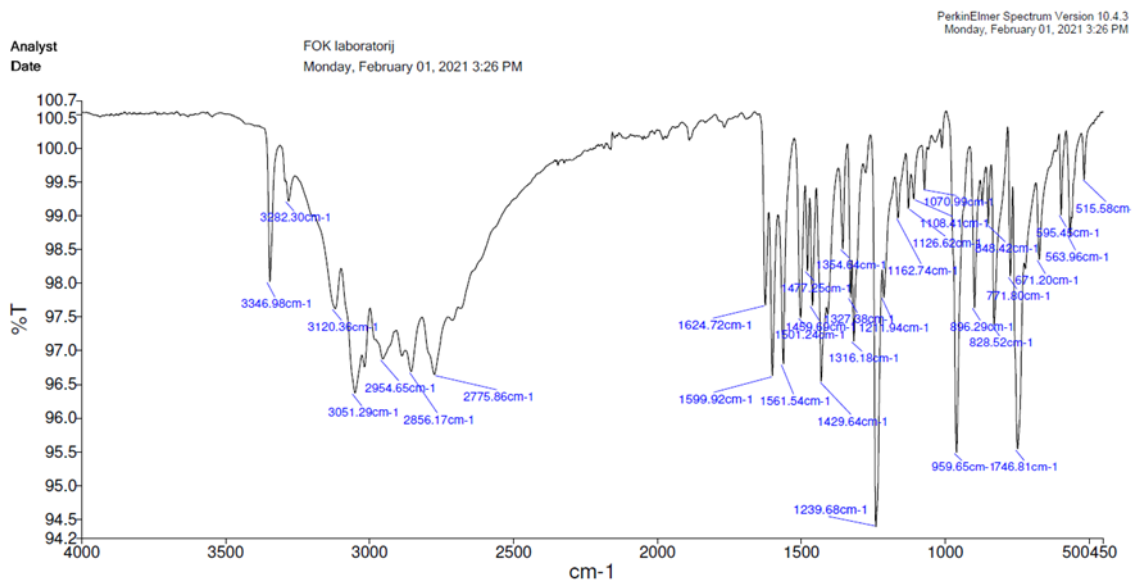
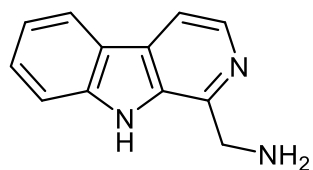


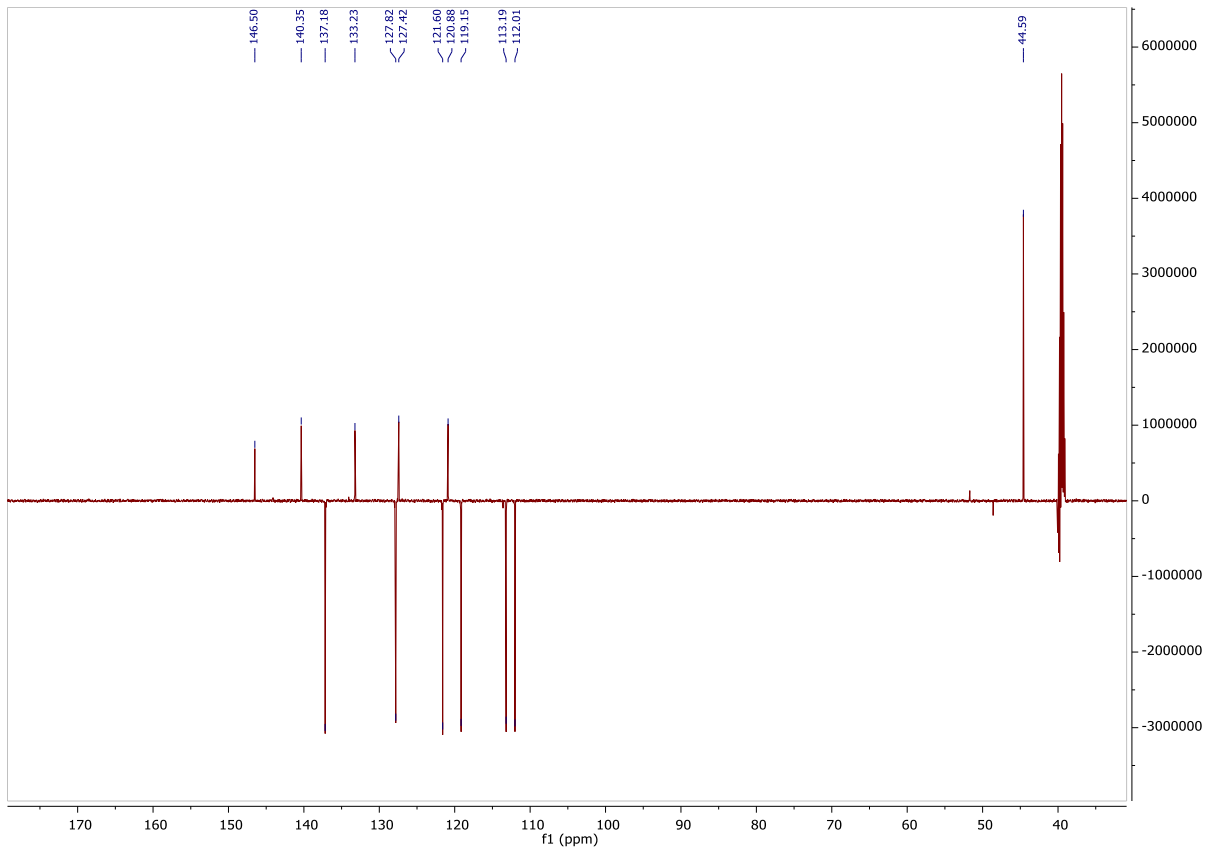
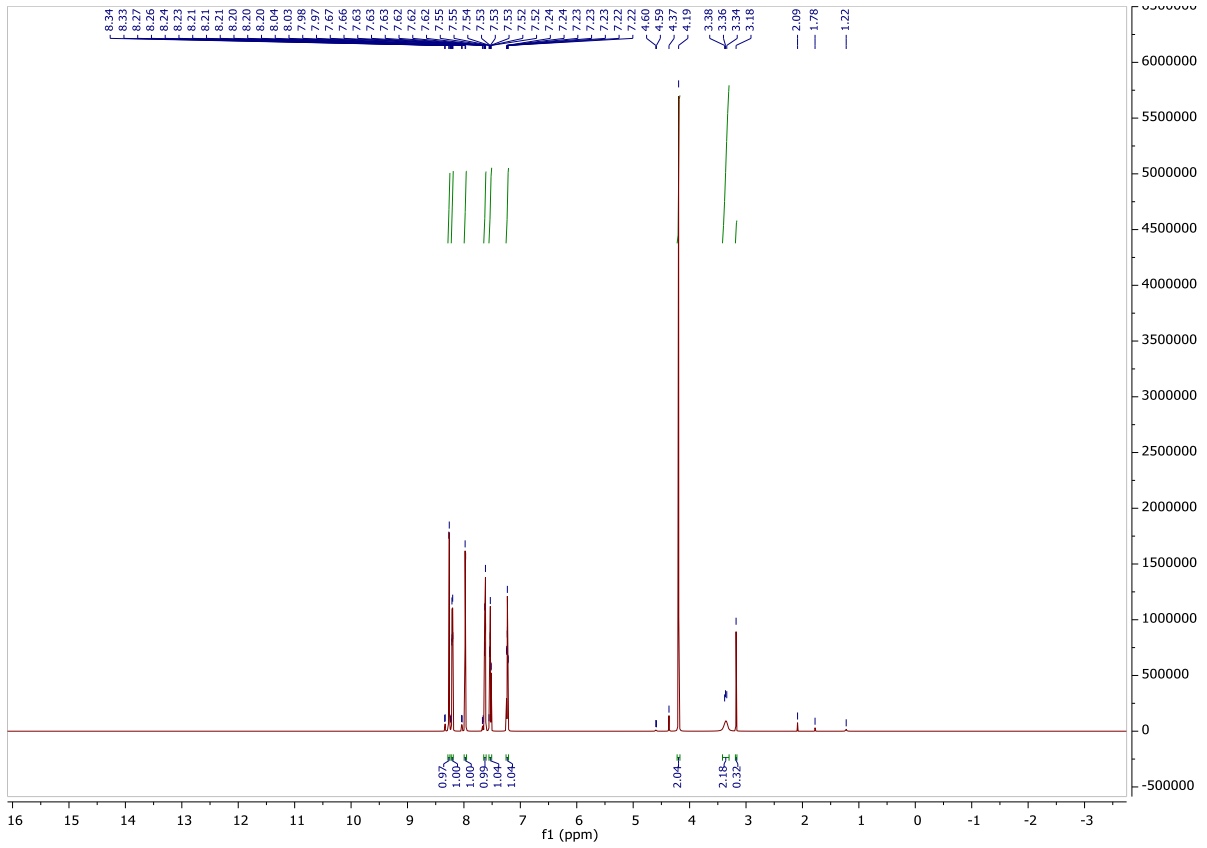
The final hybrid products were characterized using conventional spectroscopic methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR and MS), and their melting points were determined. Further studies will investigate antimalarial activity of the derivatives against erythrocytic stage of *P. falciparum* (*Pf3D7* and *PfDd2*) and liver stage of *P. berghei*.

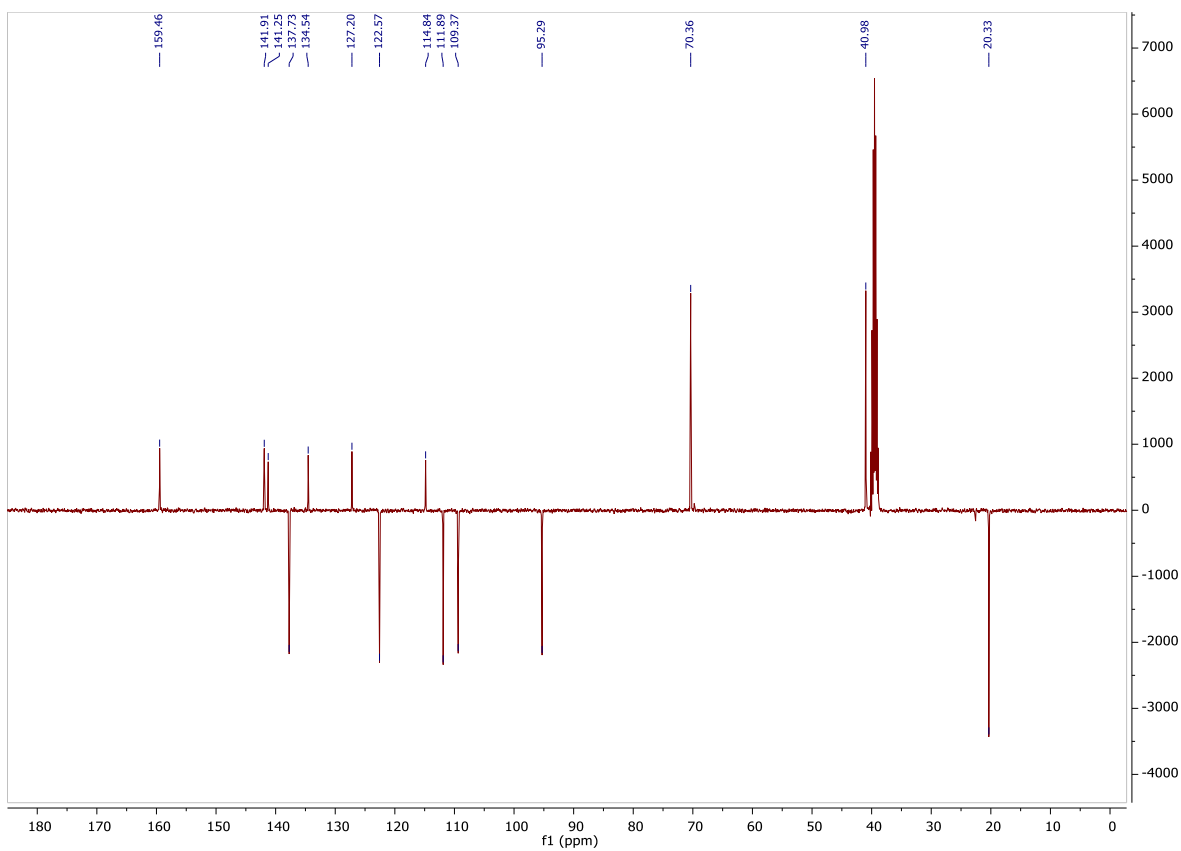
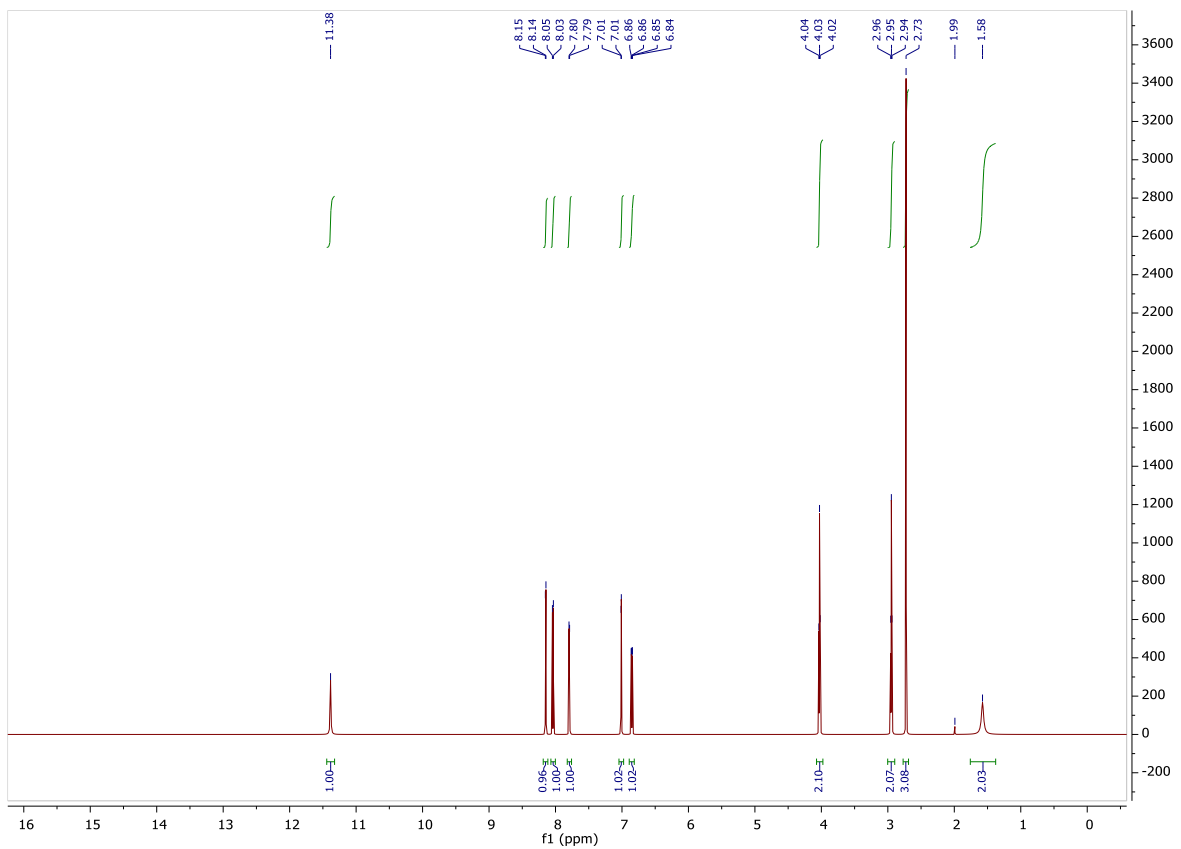
Key words: β -carboline, ferrocene, hybrid, malaria

8 PRILOZI

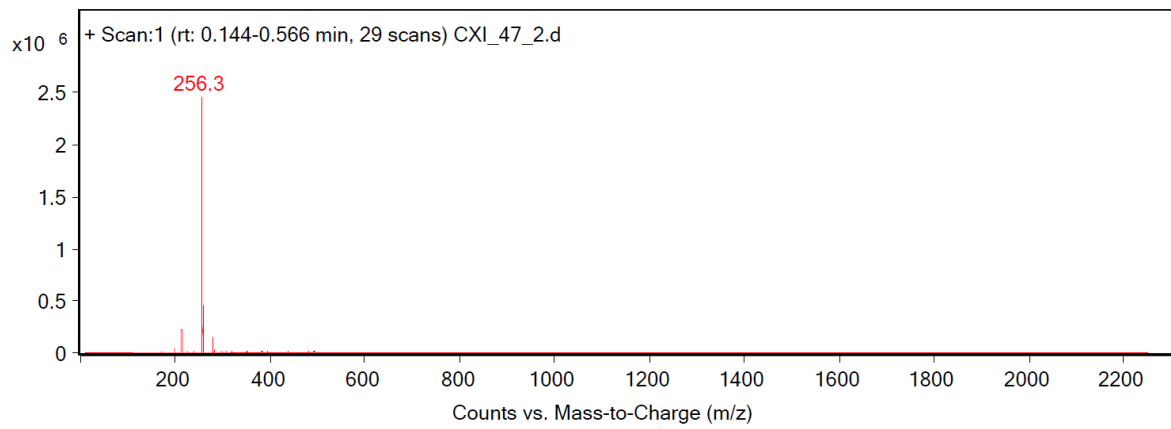
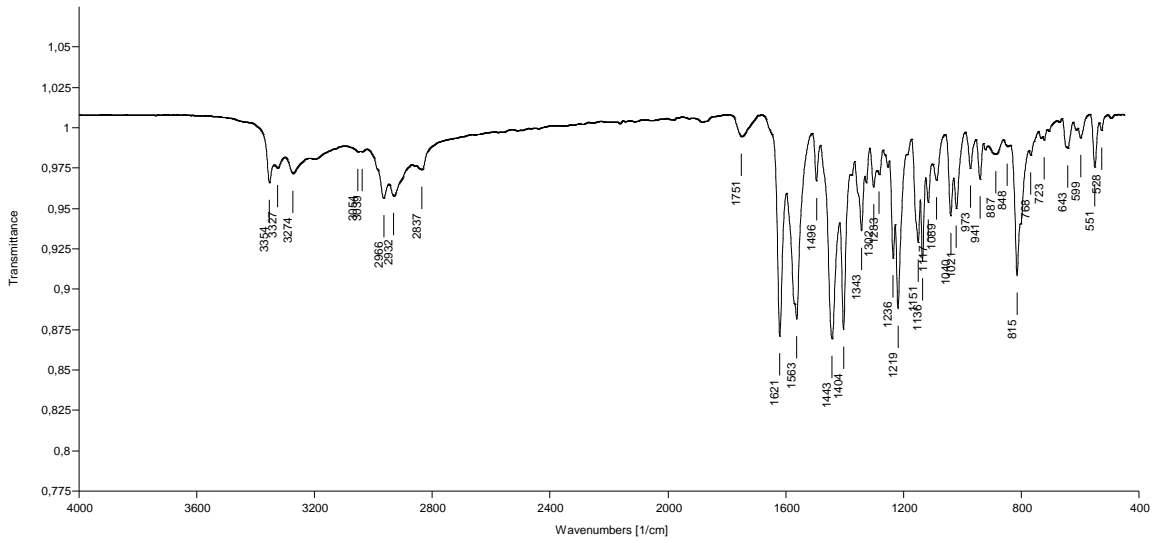
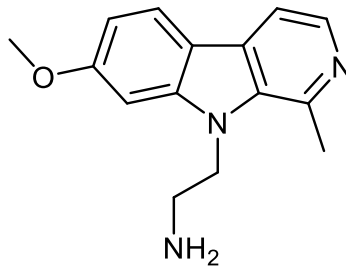
1f

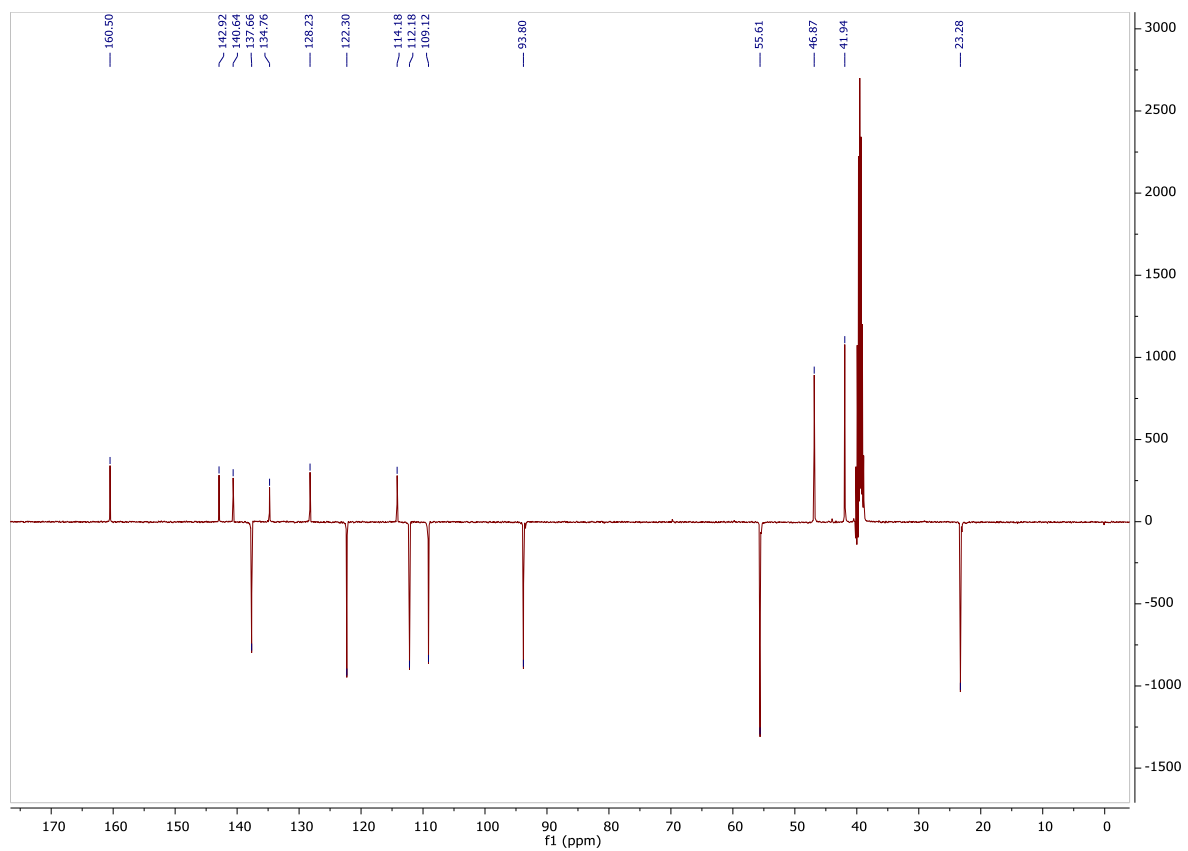
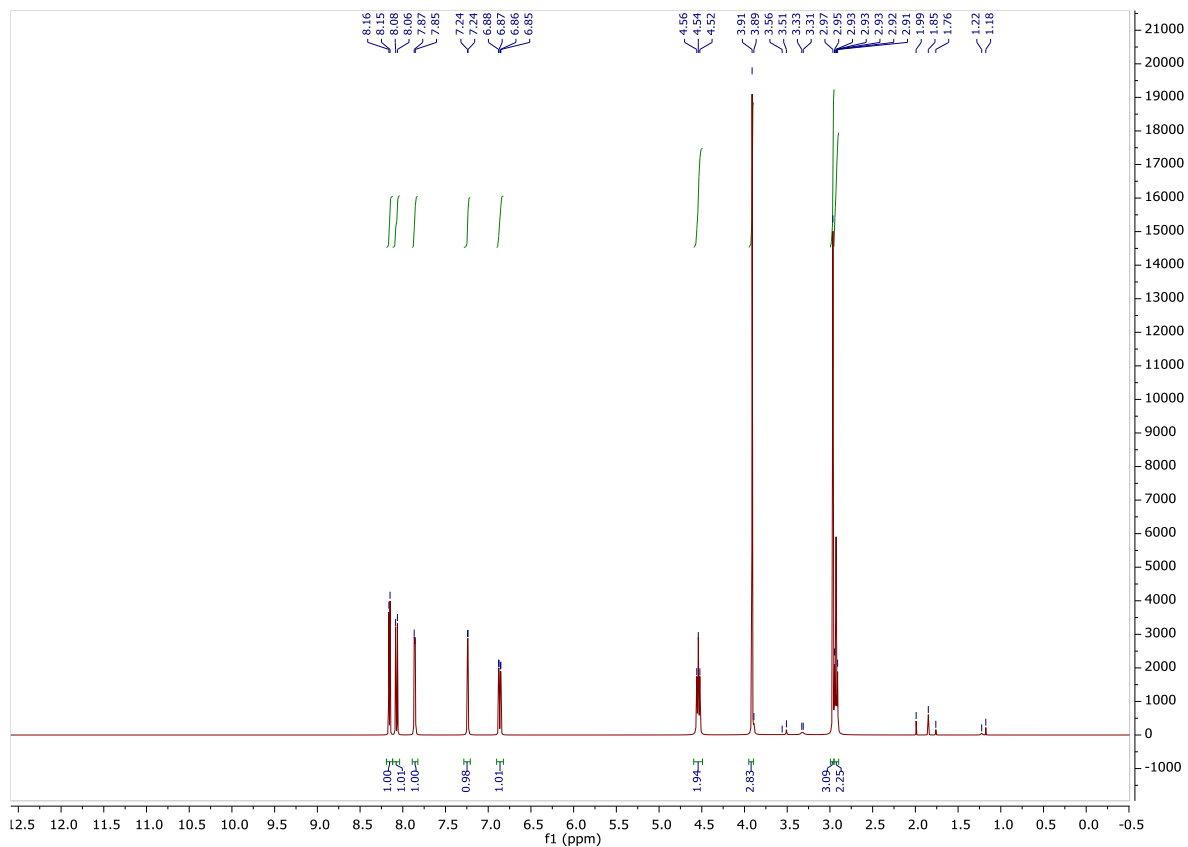


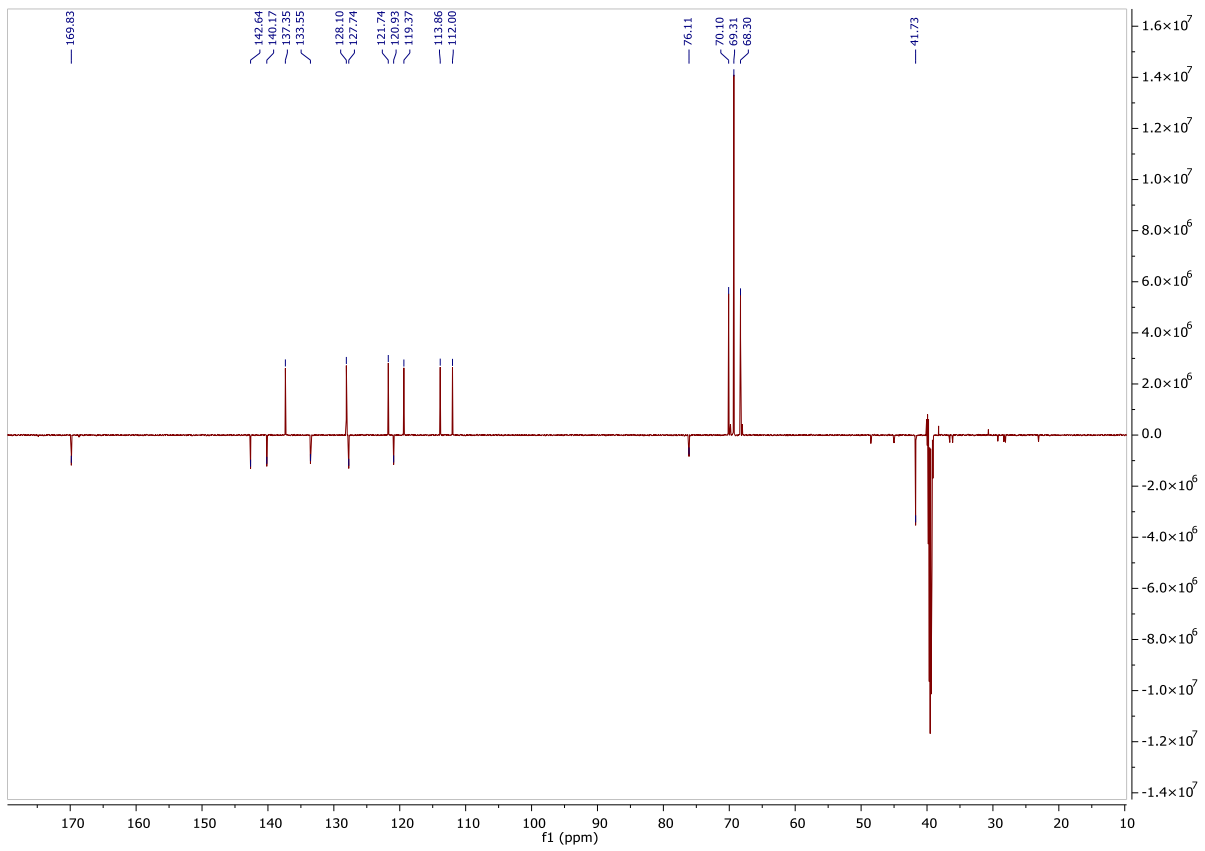
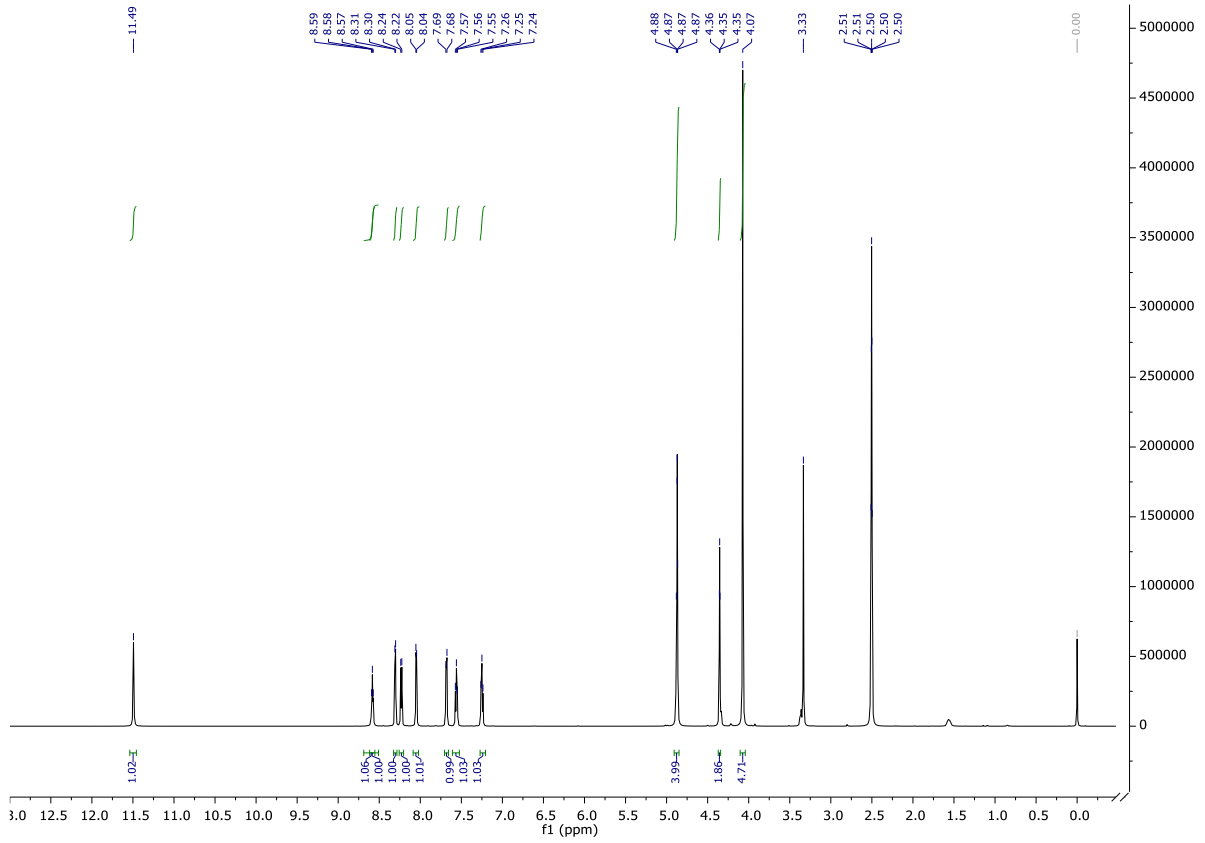




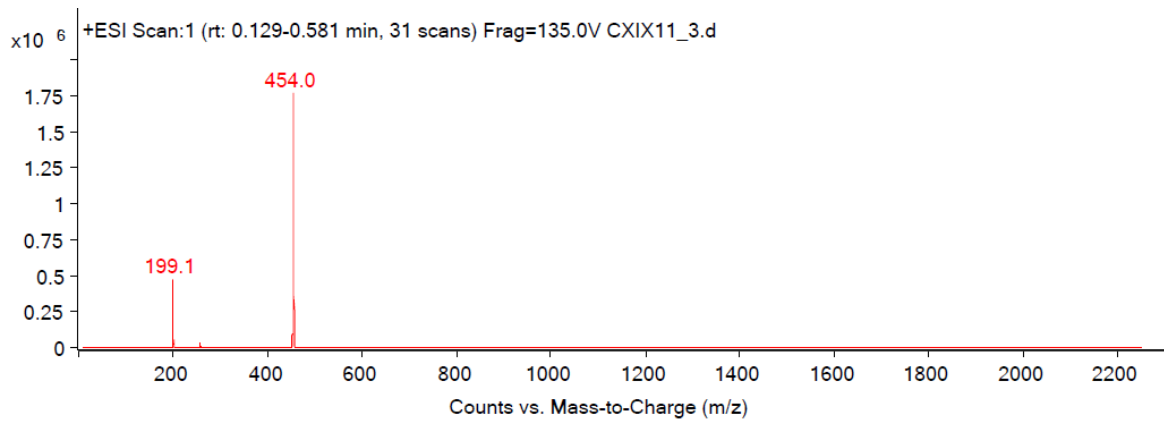
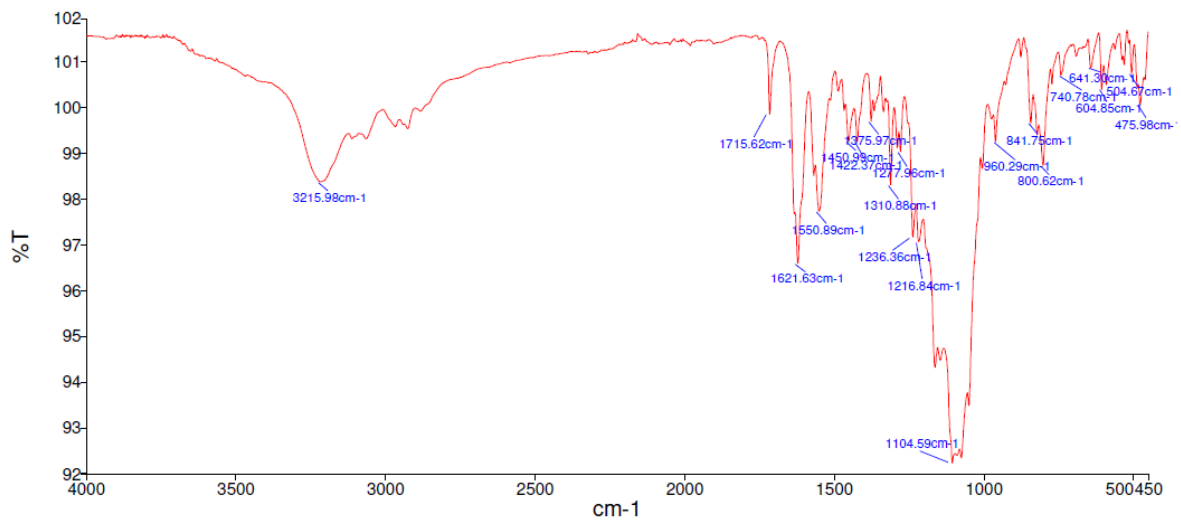
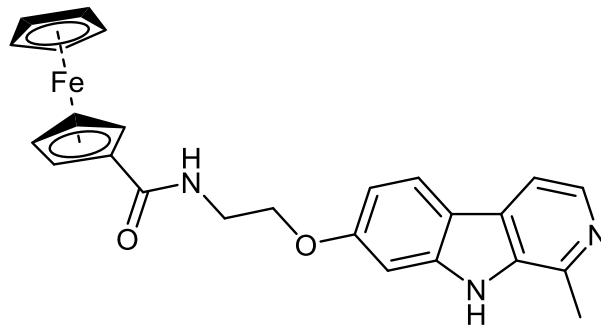
3b



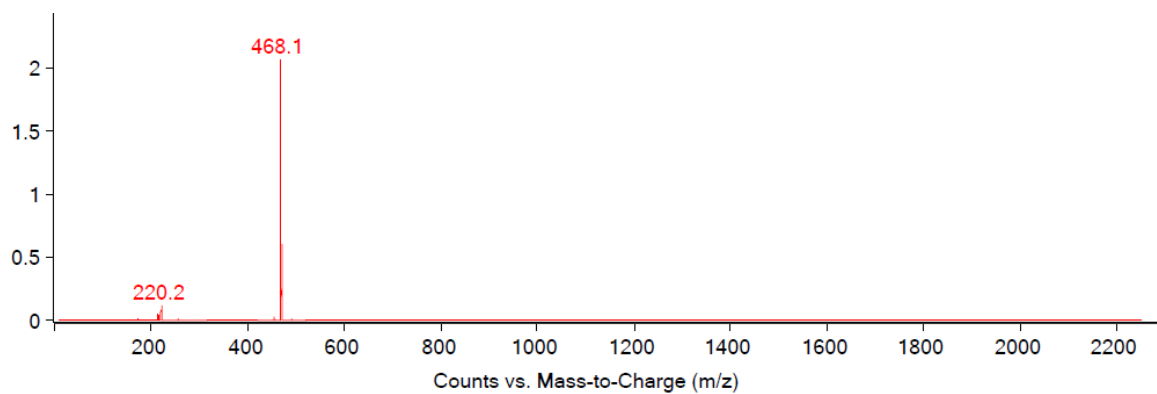
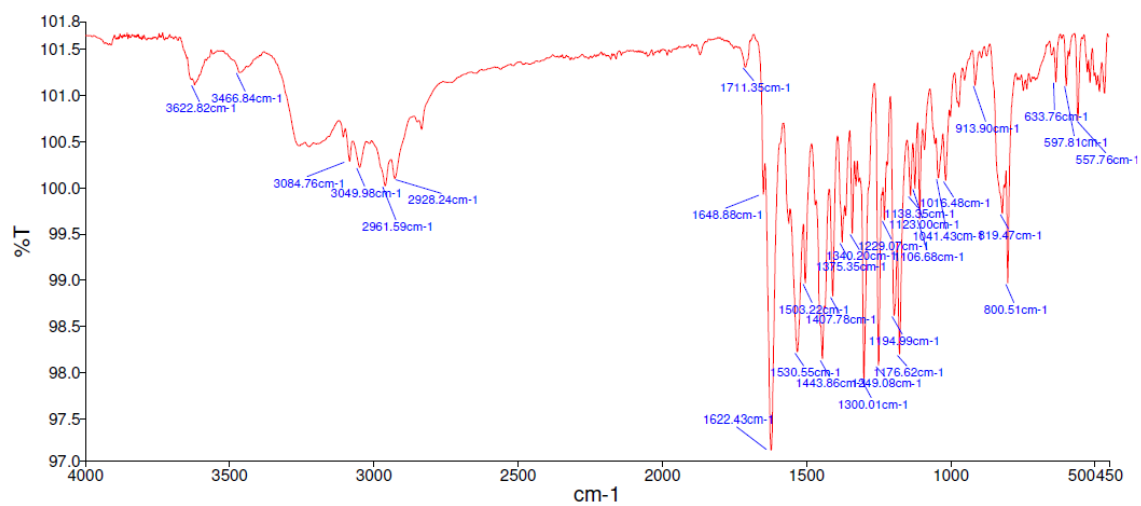
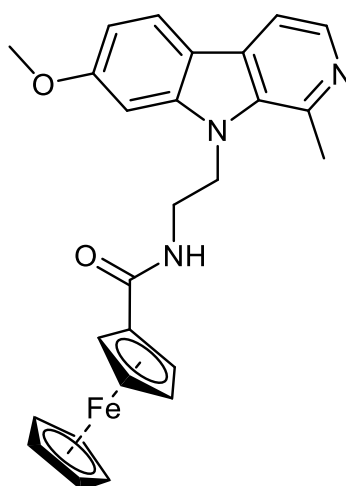


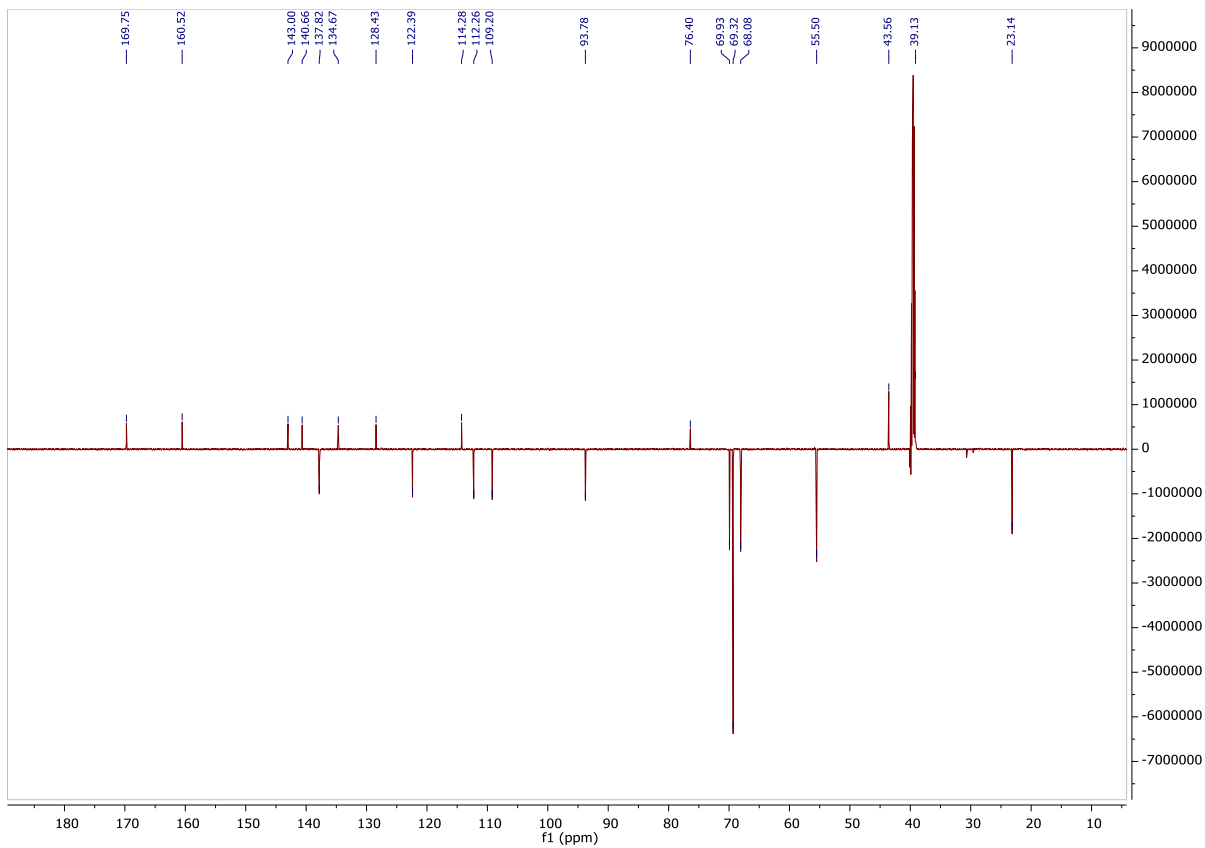
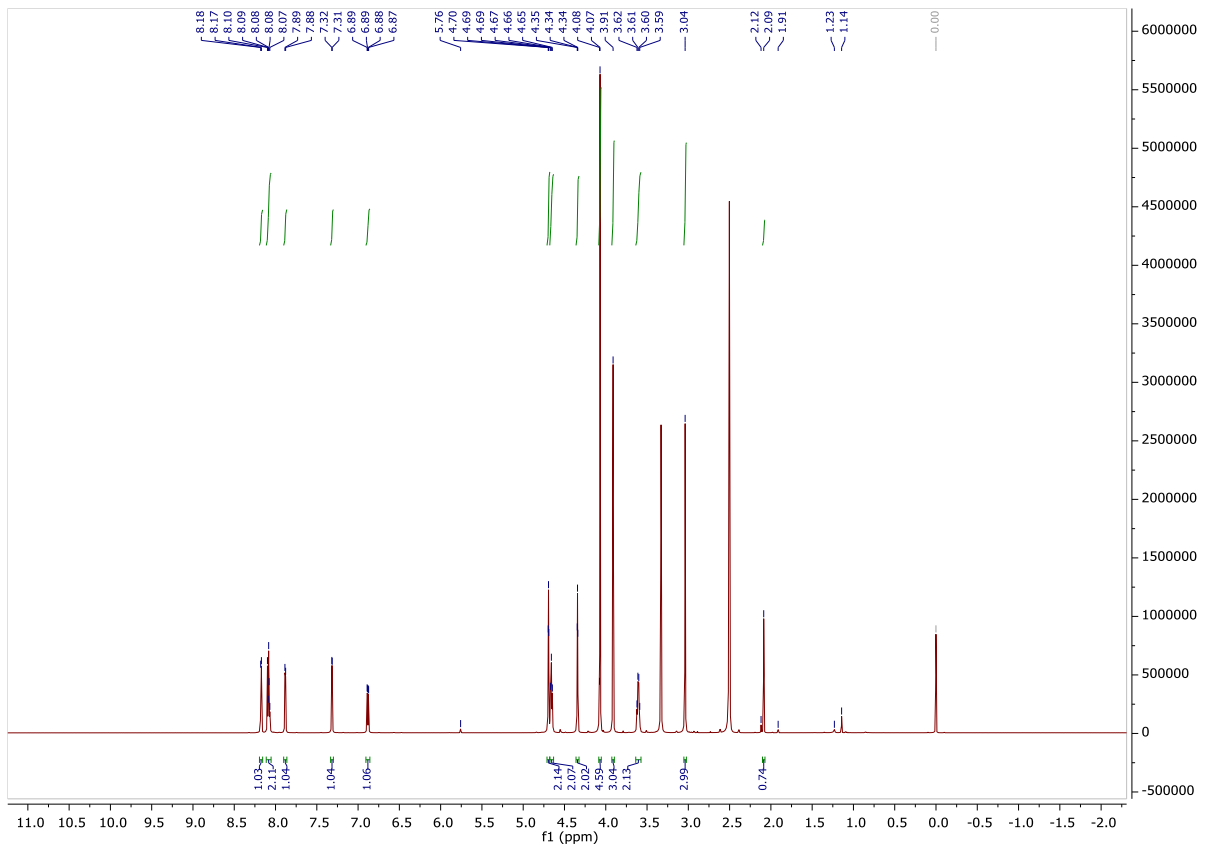


4b



4c





**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 harmicena; novih 1-, 7- i 9-supstituiranih amida β -karbolina i ferocena

Natan Koraj

SAŽETAK

Ovaj rad obuhvaća sintezu i karakterizaciju harmicena – hibridnih spojeva β -karbolina i ferocena. U ovom radu sintetizirana su tri nova 1-, 7- i 9- supstituirana amida **4a-c**. Amino derivat β -karbolina **1f**, potreban za sintezu amida **4a** dobiven je iz triptamina, a amini **2c** i **3b**, koji su poslužili kao prekursori za sintezu amida **4b** i **4c**, dobiveni su iz harmina prema navedenoj shemi. U posljednjem koraku u 'coupling' reakciji ferocenkarboksilne kiseline i odgovarajućeg amina dobiveni su konačni spojevi – hibridi amidnog tipa **4a-c**. Konačni hibridni spojevi karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR), a čvrstim produktima određeno je talište. Antimalarijsko djelovanje novih spojeva na eritrocitnu fazu *P. falciparum* (Pf3D7 i PfDd2) i na jetrenu fazu *P. berghei* biti će ispitano u daljnjim istraživanjima.

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

Rad sadrži: 65 stranica, 13 grafičkih prikaza, 6 tablica i 59 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: β -karbolin, ferocen, hibrid, malarija

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivana Perković**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Kristina Pavić, poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Miranda Sertić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

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 characterisation of harmicenes; novel 1-, 7- and 9- substituted amides of β -carboline and ferrocene

Natan Koraj

SUMMARY

This work contains the synthesis and characterisation of harmicenes – hybrid compounds of β -carboline and ferrocene. In this work three novel 1-, 7- and 9- substituted amides **4a-c** were synthesised. The amino derivative of β -carboline **1f**, used for the synthesis of the amide **4a**, was prepared from triptamine, and the amines **2c** and **3b**, that served as precursors in the synthesis of the amides **4b** and **4c**, were prepared from harmine according to the presented scheme. The final amide type hybrids **4a-c** were obtained via a coupling reaction of ferrocenecarboxylic acid and the corresponding β -carboline amine.

The final hybrid products were characterized using conventional spectroscopic methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR and MS), and their melting points were determined. Further studies will investigate antimalarial activity of the derivatives against erythrocytic stage of *P. falciparum* (*Pf3D7* and *PfDd2*) and liver stage of *P. berghei*.

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

Thesis includes: 65 pages, 13 figures, 6 tables and 59 references. Original is in Croatian language.

Keywords: β -carboline, ferrocene, hybrid, malaria

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

Reviewers: **Ivana Perković, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina Pavić, Ph.D. Postdoctoral Fellow, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Miranda Sertić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.